



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades tripanocidas de 2-iminotiazolidina-4-onas e seus análogos estruturais do tipo 2-imino-1,3-tiazóis

DIOGO RODRIGO DE MAGALHÃES MOREIRA

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

Orientador: Prof. Dr Rajendra Mohan Srivastava

Recife, Julho de 2012

DIOGO RODRIGO DE MAGALHÃES MOREIRA

Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades tripanocidas de 2-iminotiazolidina-4-onas e seus análogos estruturais do tipo 2-imino-1,3-tiazóis

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final a obtenção do título de doutor em química.

Área de concentração: química orgânica medicinal.

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

Orientador: Prof. Dr Rajendra Mohan Srivastava

Recife, Julho de 2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

REITOR:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR:

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA:

Prof. Gauss Moutinho Cordeiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA:

Prof. Marcelo Navarro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL:

Prof^a. Simone Maria da Cruz Gonçalves

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA:

Prof. Severino Alves Júnior

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA:

Prof. Walter Mendes de Azevedo

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:

Prof^ª. Ana Cristina Lima Leite (co-orientadora)

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Almir Gonçalves Wanderlei

Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Roberto Dias Lins Neto

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Maria do Carmo Alves de Lima

Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Severino Alves Junior

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

**Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades
tripanocidas de 2-iminotiazolidina-4-onas e seus análogos
estruturais do tipo 2-imino-1,3-tiazóis**

Por

Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

Departamento de Química Fundamental
Centro de ciências exatas e da natureza
Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE Brasil
03 de Agosto de 2012

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno, CRB 4-1758

Moreira, Diogo Rodrigo de Magalhães.

Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades tripanocidas de 2-iminotiazolidina-4-onas e seus análogos estruturais do tipo 2-imino-1,3-tiazóis/
Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira– Recife: O Autor, 2012.

198 p.: fig.

Orientadores: Ana Cristina Lima Leite e Rajenda Mohan Srivastava

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Farmacologia. 2. Doença de chagas. 3. Trypanosoma cruzi. 4. Tiazóis I. Leite, Ana Cristina Lima (orientador). II. Título.

615.3

(22. ed.)

FQ 2012

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu agradeço os meus orientadores, Prof^ª. Ana Cristina Lima Leite (DCFAR, UFPE) e Prof. Rajendra Mohan Srivastava (DQF, UFPE), pelos ensinamentos, cobranças e pelo imenso respeito e ajuda ao longo desses anos.

A Dr^ª. Valéria Rego Alves Pereira (CPqAM, FIOCRUZ), Cristiane Moutinho Lagos de Melo, (CPqAM, FIOCRUZ), Lucas Ferreira da Rocha (CPqAM, FIOCRUZ), Dr^ª. Milena Botelho Pereira Soares (CPqGM, FIOCRUZ), Cássio Santana Meire (CPqGM, FIOCRUZ), Dr^ª. Elisalva Teixeira Guimarães (CPqGM, FIOCRUZ); meus sinceros agradecimentos pelo compromisso em avaliar as propriedades farmacológicas dos compostos no *T. cruzi*.

Prof^ª. Rafaela Salgado Ferreira (ICB, UFMG), pelos ensaios com a cruzaina e ao Prof. James Hobson McKerrow (Departamento de Patologia, UCSA) pelo fornecimento do plasmídeo e da cruzaina purificada.

Prof. Marcelo Zaldini Hernandez (DCFAR, UFPE) e Marcelo Rabello (DCFAR, UFPE), pelo desenvolvimento do modelo de docagem dos compostos na cruzaina.

Ao Prof. Carlos Alberto de Simone (Departamento de Física, USP), pela cristalização e determinação da difração de raios-X.

Aos funcionários da Central Analítica do DQF (UFPE), em especial a Eliete Barros, pelas análises espectroscópicas. Agradeço também o doutorando Phillipe J. Eugster (Departamento de Farmácia, Universidade de Lausanne) e a Dr. Nicole Fox (Departamento de Medicina, Universidade da Pensilvânia), pela aquisição dos espectros de massas.

Ao Prof. Irwin Morris Chaiken (Drexel University College of Medicine Department of Biochemistry) pela hospitalidade "brasileira" e orientação durante o estágio de doutorado.

Aos meus amigos do LpQM (DCFAR, UFPE): Gevaninho, Marcos Veríssimo, Paulo André, Daura, Wan, Miroca, Elany, Livia e Edna; pela convivência excelente. Agradeço também a Salvana Priscylla Manso Costa (DCFAR, UFPE) pela ajuda na síntese durante o início do doutorado e ao Paulo André pela ajuda na elaboração de algumas figuras da tese.

Aos meus amigos de longa data de laboratório e irmãos recifenses, os mestres Marcos Veríssimo, Renata Mendes e Frederico Leite.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da DrexelMed: Ali Emileh, Rosemary Bastian, Venkat, Karyn McFadden, Srivats, Sinan Ferit, Andy Holmes, Lauren, Laura Roselin, Kantharaju, Cait Duffy e Rachna, pela ajuda nos experimentos e amizade. Em especial, ao Ali Emileh e Ferit pelos inúmeros ensinamentos e dedicação ao meu trabalho.

Aos pesquisadores e funcionários do DQF, DCFAR e Drexel, em especial ao Maurilio e Patrícia (Pós-Graduação em Química).

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado ao Programa de Pós-Graduação em Química (UFPE). Ao programa binacional CAPES-Fulbright pela concessão da bolsa de doutorado sanduich. Mais recentemente, ao INCT-Dengue, pela bolsa concedida para o término do doutorado.

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

A minha mãe e meus irmãos, pelo indispensável suporte financeiro durante estes oito anos, em especial durante o meu estágio de doutorado sandwich.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ar – aromático
CCD – cromatografia em camada delgada
CI₅₀ – concentração inibitória para 50 %
Comp. – compostos
DEPT – "distortionless enhancement by polarization transfer"
DMF – *N,N*-dimetilformamida
DMSO – dimetilsulfóxido
Equiv. – equivalentes
EMAR – espectro de massas de alta resolução
HMBC – "heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy"
HSQC – "heteronuclear single-quantum coherence"
Hz – Hertz
J – constante de acoplamento
IS – índice de seletividade
IV – Infravermelho
K_i – constante de inibição
P.F. – ponto de fusão
Ph – fenil
ppm – partes por milhão
Py – piridina
R_f – fator de retenção
RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono treze
REA – relações estruturas-atividades
rend. – rendimento reacional
RPMI – "Roswell Park Memorial Institute"
SBF – soro bovino fetal
ta – temperatura ambiente
))) – irradiação no ultrassom

RESUMO

A doença de Chagas é uma infecção parasitária sistêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Em torno de 30–40 % dos pacientes infectados evoluem para a fase crônica sintomática, resultando em cardiomiopatias. O benznidazol é o único medicamento disponível para o tratamento durante a fase aguda e crônica assintomática, contudo não possui eficácia comprovada durante a fase crônica sintomática. O desenvolvimento de novos fármacos úteis no tratamento da doença de Chagas é necessário. Diante do exposto, realizamos o planejamento estrutural e a síntese de inéditas 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) e seus análogos estruturais 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) com o intuito de identificar compostos tripanocidas. As 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) foram planejadas na tentativa de observar um aumento nas propriedades tripanocidas de compostos com substituintes localizados nas posições N3 e C5 do anel tiazolidínico e compreender a relação estrutura *versus* atividade anti-*T. cruzi*. Já a construção da série de 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) teve como fundamento investigar o efeito na atividade tripanocida da troca bioisostérica do anel tiazolidínico pelo tiazólico. As 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**), em particular os derivados com uma fenila em N3 (**43k–q**), apresentaram propriedades inibitórias na atividade catalítica da cruzaina, enquanto que os seus análogos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) foram destituídos de tais propriedades. Com a triagem, *in vitro*, das propriedades tripanocidas dos compostos (**43a–t**) e (**44a–t**) em cultura axênica, foi possível identificar a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) e o 2-imino-1,3-tiazol (**44j**) como compostos tripanocidas tão potentes quanto o benznidazol em inibir a proliferação de epimastigotas e a viabilidade celular de tripomastigotas da cepa Y, com a vantagem de serem destituídos de toxicidade em esplenócitos na concentração de 100 µg/mL (262 µM). Estes compostos foram capazes de reduzir a infecção e a invasão, *in vitro*, de tripomastigotas em macrófagos com potência similar ao observado com o benznidazol. O composto (**43n**), por via oral na dose de 250 µmol/kg, foi eficaz em reduzir a parasitemia sanguínea em um modelo de infecção aguda pelo *T. cruzi*. Contudo, com eficácia inferior que o tratamento com o benznidazol na mesma dose; denotando assim a necessidade de otimização de suas propriedades tripanocidas. Para alcançar tais objetivos, as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) foram quimicamente reestruturadas, culminando assim com o planejamento e síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**). A triagem, *in vitro*, das propriedades tripanocidas das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) permitiu identificar as principais relações estrutura *versus* atividade anti-*T. cruzi* destes compostos, bem como permitiu identificar os compostos (**58f**) e (**58i**) como agentes tripanocidas, *in vitro*, tão potentes quanto o benznidazol. Em especial, o composto (**58f**) demonstrou propriedade inibitória na atividade catalítica da cruzaina e apresentou eficácia superior ao seu protótipo (**43n**) em reduzir a infecção pelo *T. cruzi* tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. O composto (**58f**) apresentou uma vantagem em relação ao seu protótipo (**43n**), pois este apresentou eficácia similar ao benznidazol em reduzir a parasitemia sanguínea. A estratégia empregada na construção da série (**58a–j**) logrou sucesso na identificação de compostos com propriedades tripanocidas mais pronunciadas do que os compostos da série (**43a–t**).

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, cruzaina, planejamento de fármacos, tiossemicarbazonas, tiazolidinas, tiazóis.

ABSTRACT

Chagas disease is a systemic and parasitic infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is believed that 30–40% of infected patients either have or will develop the symptomatic chronic form, resulting in cardiomyopathies. Benznidazole, the drug currently used for Chagas disease treatment in the acute and asymptomatic chronic forms, has no proven effectiveness in symptomatic chronic patients. The identification of new medicines for Chagas disease treatment is therefore needed. In view of this, we worked on the structural design and synthesis of new 2-iminothiazolidin-4-ones (**43a–t**) and their structural analogs 2-imino-1,3-thiazoles (**44a–t**) as potential trypanocidal compounds. 2-Iminothiazolidin-4-ones (**43a–t**) were chemically planned in such way to seek potency enhancement of the trypanocidal properties for compounds with substituents placed at N3 and C5 of the thiazolidine rings as well to understand the structure-activity relationships. 2-Imino-1,3-thiazoles (**44a–t**) were designed to investigate the effects of the isosteric exchange of thiazolidine by thiazole ring for the trypanocidal properties. 2-Iminothiazolidin-4-ones (**43a–t**), especially compounds with a phenyl at N3 (**43k–q**) inhibited cruzain activity, while 2-imino-1,3-thiazoles (**44a–t**) did not. When compounds (**43a–t**) and (**44a–t**) were tested against the whole parasite, we identified high-efficacy compounds, denoted 2-iminothiazolidin-4-one (**43n**) and 2-imino-1,3-thiazoles (**44j**). Both compounds inhibited proliferation of axenic epimastigotes and were cidal for bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain, but were not toxic for mouse splenocytes in concentrations of up to 100 µg/mL (262 µM). Trypomastigote development and invasion into macrophages were substantially impaired when cultures were treated with compounds (**43n**) and (**44j**), similar to that seen with benznidazole-treated cells. We also tested the ability of compound (**43n**) in reducing blood parasitemia in infected mice treated orally with 250 µmol/kg. Although (**43n**) substantially reduced the parasitemia, it was less potent than that seen with benznidazole-treated mice. The promising functional activity of compound (**43n**) led us to seek potency enhancement by synthetic redesign. To this end, and bearing in mind the structural requirements identified with compounds (**43a–t**) and (**44a–t**), 2-iminothiazolidin-4-ones (**58a–j**) were designed and prepared. *In vitro* screening of compounds (**58a–j**) against the whole parasite revealed high-efficacy compounds denoted 2-iminothiazolidin-4-one (**58f**) and (**58i**). Compound (**58f**) inhibited proliferation of epimastigotes ($IC_{50} = 4.0 \mu M$) and was cidal for trypomastigotes ($IC_{50} = 3.9 \mu M$) without affecting mouse splenocytes up to 100 µg/mL. Besides, compound (**58f**) arrested trypomastigote development and invasion in macrophages and this was even more pronounced than that seen with benznidazole-treated cells. Finally, we observed the striking ability of compound (**58f**) in reducing parasitemia in *T. cruzi*-infected BALB/c mice treated orally with 250 µmol/kg, being (**58f**) almost twice as potent as (**43n**). Therefore, potency enhancement of anti-*T. cruzi* activity was achieved for 2-iminothiazolidin-4-ones (**58a–j**) when compared to our initially studied 2-iminothiazolidin-4-ones (**43a–t**).

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, drug design, cruzain, thiosemicarbazones, thiazolidines, thiazoles.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	<u>13</u>
2.0 OBJETIVOS	<u>17</u>
3.0 REVISÃO DA LITERATURA	<u>18</u>
3.1 Alvos moleculares de compostos anti- <i>T. cruzi</i>	<u>19</u>
3.2 A química medicinal e a descoberta de fármacos anti- <i>T. cruzi</i>	<u>25</u>
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	<u>31</u>
4.1 Planejamento estrutural	<u>32</u>
4.2 Síntese dos compostos	<u>36</u>
4.2.1 Síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–r) e 2-iminotiazolidina-4-tionas (43s , 43t)	<u>36</u>
4.2.2 Síntese dos 2-imino-1,3-tiazóis (44a–t)	<u>45</u>
4.3 Avaliação farmacológica	<u>50</u>
4.3.1 Avaliação farmacológica das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–r)	<u>52</u>
4.3.1.1 Inibição da atividade catalítica na cruzaina	<u>52</u>
4.3.1.2 Avaliação, <i>in vitro</i> , das propriedades tripanocidas	<u>57</u>
4.3.2 Avaliação farmacológica das 2-iminotiazolidina-4-tionas (43s) e (43t) e o efeito da tiocarbonila	<u>61</u>
4.3.3 Avaliação farmacológica dos 2-imino-1,3-tiazóis (44a–t)	<u>64</u>
4.3.4 Triagem dos compostos em ensaios, <i>in vitro</i> , de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	<u>68</u>
4.3.4 Avaliação das propriedades farmacológicas, <i>in vivo</i> , da 2-iminotiazolidina-4-ona (43n) na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	<u>72</u>
4.3.5 Redesenho estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–r) visando a otimização das propriedades farmacológicas	<u>74</u>
4.3.6 Tentativa de preparação de complexos com metais de transição	<u>75</u>
4.3.7 Planejamento estrutural e síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a–j) e derivados (59 , 60)	<u>78</u>
4.3.8 Avaliação farmacológica, <i>in vitro</i> , das propriedades tripanocidas das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a–j) e derivados (59 , 60)	<u>86</u>

4.3.9 Avaliação das propriedades farmacológicas, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , da 2- iminotiazolidina-4-ona (58f) na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	<u>90</u>
4.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	<u>93</u>
4.1 Conclusões	<u>94</u>
4.2 Perspectivas	<u>95</u>
5.0 PARTE EXPERIMENTAL	<u>96</u>
5.1 Generalidades	<u>97</u>
5.2 Metodologias sintéticas	<u>98</u>
5.3 Protocolos da avaliação farmacológica	<u>171</u>
6.0 CITAÇÕES E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<u>177</u>
7.0 APÊNDICE	<u>191</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência global e da quimioterapia das principais doenças protozoárias.	
	<u>13</u>
Figura 2: Estruturas químicas do benznidazol (1) e do nifurtimox (2).	<u>14</u>
Figura 3: Estruturas químicas do E1224 (3) e do ravuconazol (4).	<u>15</u>
Figura 4: Sequenciamento do genoma do <i>T. cruzi</i> revelou importantes alvos moleculares de fármacos. Em parênteses, número de genes.	<u>16</u>
Figura 5: Papel da enzima <i>trans</i> -sialidase do <i>T. cruzi</i> .	<u>20</u>
Figura 6: Cruzaína é localizada em diferentes compartimentos durante o ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> .	<u>21</u>
Figura 7: Invasão do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado é mediada pela cruzaína. Estrutura cristalográfica da cruzaína (PBD 3UIT) e da cruzaina em complexo com o ligante K777 (figuras geradas pelo Pymol 2.0). SA, sítio antigênico; SC, sítio catalítico; N, N-terminal.	<u>22</u>
Figura 8: Eburicol é um precursor importante do ergosterol. Durante a biossíntese do ergosterol, a enzima CYP51 catalisa a remoção da metila na posição C14 do eburicol. Inibidores da CYP51 do <i>T. cruzi</i> (vermelho).	<u>24</u>
Figura 9: Megazol (10) e análogos estruturais. Valores de CI_{50} para tripomastigotas da cepa Y.	<u>26</u>
Figura 10: N-acilhidrazonas anti- <i>T. cruzi</i> . Valores de CI_{50} para ensaios com amastigotas.	<u>27</u>
Figura 11: Identificação do composto (28), um agente tripanocida derivado do Fenarimol (27).	<u>27</u>
Figura 12: Otimização estrutural do Tipifarnib (29) culminou com a descoberta do composto 30, um derivado racêmico, mais potente e com melhor perfil de biodisponibilidade por via oral.	<u>28</u>
Figura 13: Química medicinal que culminou com a descoberta do K777 (6), um candidato a fármaco útil no tratamento da doença de Chagas.	<u>30</u>
Figura 14: Similaridade estrutural entre tiossemicarbazonas (36) e 2-iminotiazolidina-4-onas (38).	<u>32</u>
Figura 15: Identificação das 2-iminotiazolidina-4-onas (39) e (40) como agentes tripanocidas.	<u>32</u>
Figura 16: Planejamento estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (43), utilizando as principais características estruturais identificadas nos compostos (38) e (41).	<u>33</u>
Figura 17: Emprego do bioisosterismo para o planejamento dos 2-imino-1,3-tiazóis (44).	<u>34</u>
Figura 18: Rota sintética para obtenção das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–t) e 2-imino-1,3-tiazóis (44a–t).	<u>35</u>
Figura 19: Tiossemicarbazidas (47a–f).	<u>37</u>
Figura 20: Representação elipsóide (ORTEP-3), com átomos numerados e elipsóides de vibração térmica com 50% de probabilidade, para as tiossemicarbazonas (48a) e (48c).	<u>38</u>
Figura 21: Dados espectroscópicos da 2-iminotiazolidina-4-ona (43m). Deslocamento químico em ppm.	<u>42</u>

- Figura 22:** Posição da ligação C=N no carbono C2 do composto (43a). 43
- Figura 23:** Dados estruturais (A); representação elipsoide (B) e empacotamento cristalino (C) da 2-iminotiazolidina-4-ona (52). Linhas pontilhadas são ligações de hidrogênio. 43
- Figura 24:** Deslocamento químico referente ao próton no nitrogênio N2. Valores para espectros adquiridos em DMSO-*d*₆. Valores do comprimento de ondas dos máximos de emissão ($\lambda_{\text{máx.}}$) em metanol. 48
- Figura 25:** Dados espectroscópicos do 2-imino-1,3-tiazó (44i). Deslocamento químico em ppm. 49
- Figura 26:** Planejamento da avaliação das propriedades tripanocidas para os compostos (43a-t) e (44a-t). 50
- Figura 27:** Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. Valores de CI_{50} (μM) ($\pm$ desvio padrão) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 100 μM . Valores de CI_{50} representam experimentos em triplicatas. 53
- Figura 28:** Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. Valores de CI_{50} (μM) ($\pm$ desvio padrão) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Valores de CI_{50} representam experimentos em triplicatas. 55
- Figura 29:** Tentativa de otimização das propriedades funcionais das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a-r) através da complexação com metais de transição. 75
- Figura 30:** 2-Iminotiazolidina-4-onas (38), previamente utilizadas para a formação de complexos metálicos. 76
- Figura 31:** A) Íons e os valores de m/z detectados nos espectros de massas no modo ESI+ (10 eV). B) Espectro de massas / massas (25 eV) e a proposta de fragmentação para a 2-iminotiazolidina-4-ona (43h). 77
- Figura 32:** A) Composto (41) foi identificado após triagem de diferentes substituintes (R). B) Estrutura cristalina da cruzaina em complexo com o (41) (PDB 3IUT), com destaque para o anel quinolínico localizado no subsítio S3. 78
- Figura 33:** A) Docagem das 2-iminotiazolidina-4-ona (43a-t, azul) na cruzaina. Em vermelho, o composto (41) co-cristalizado com a cruzaina.¹²⁸ Circulo meramente destacando a região S3 do sítio catalítico. B) Compostos (62a-j) planejados como análogos otimizados 2-iminotiazolidina-4-ona (43a-t). 79
- Figura 32:** Planejamento sintético das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a-j). Reagentes e condições: a) K_2CO_3 , 80 °C, 5 horas; b) tiossemicarbazida (47a); etanol, ácido acético, refluxo, 2 horas; c) 2-bromobutanoato de etila (49c), acetato de potássio, refluxo, 12 horas; d) acetato de paládio, trifenilfosfina, fosfato de potássio, ácido fenilborônico, 90 °C, 20 horas. 80
- Figura 35:** Dados espectroscópicos da 2-iminotiazolidina-4-ona (58c). Deslocamento químico em ppm. 84
- Figura 36:** Atividade inibitória na cruzaina. Valores de CI_{50} ($\pm$ DP) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. 87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Atividade inibitória dos compostos na infecção de tripomastigotas da cepa Y em macrófagos. Compostos foram adicionados na concentração de 10 μ M, em triplicatas. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0,05$. Um único experimento. **68**

Gráfico 2: **A)** Porcentagem de macrófagos infectados. **B)** Proporção de amastigotas intracelulares. Bdz (**1**) é o inibidor de referência. Compostos foram adicionados na concentração de 50 μ M, em triplicatas. Dois experimentos independentes foram realizados, valores são relativos a um único experimento. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$. **70**

Gráfico 3: Eficácia dos compostos em impedir a invasão de tripomastigotas em macrófagos. AnfB é Anfotericina B, o inibidor de referência. Compostos foram adicionados na concentração de 50 μ M, em triplicatas. Dois experimentos independentes foram realizados, valores são relativos a um único experimento. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$. **71**

Gráfico 4: Parasitemia sanguínea em camundongos da linhagem BALB/c (fêmeas, $n=6$ /grupo) infectados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y. O grupo controle recebeu somente salina mais 20 % de DMSO. Tratamento por via oral na dose de 250 μ mol/kg da 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) e Bdz (**1**). Dois experimentos independentes foram realizados, valores mostrados são relativos a um único experimento. Resultados são expressos como média da contagem da parasitemia no grupo, com desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$. **73**

Gráfico 5: Atividade inibitória da atividade catalítica na cruzaina. Valores calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Desvio padrão expresso como barras. Compostos testados na concentração de 100 μ M, em triplicatas. **83**

Gráfico 6: **A)** Porcentagem de macrófagos infectados por tripomastigotas da cepa Y. **B)** Proporção de amastigotas intracelulares. Bdz (**1**) é o inibidor de referência. Cada compostos foi testado em concentrações em triplicatas. Um único experimento foi realizado. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$. **90**

Gráfico 7: Parasitemia sanguínea em camundongos da linhagem BALB/c (fêmeas, $n=6$ /grupo) infectados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y. O grupo controle recebeu somente salina mais 20 % de DMSO. Tratamento por via oral com os compostos (**58f**) e Bdz (**1**). Um único experimento foi realizado. Resultados são expressos como média da contagem da parasitemia no grupo, com desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$. **92**

1.0 INTRODUÇÃO

Embora doenças causadas por protozoários afetem dez por cento da população mundial, menos de um por cento dos medicamentos aprovados para uso clínico nas três últimas décadas foram destinados ao tratamento destas doenças (**figura 1**).^{1,2}

Existem 14 medicamentos disponíveis para o tratamento de doenças protozoárias e juntos, estes medicamentos são destinados ao tratamento de seiscentos milhões de pessoas infectadas. Fica mais evidente que o número de medicamentos para as doenças causadas por protozoários é insuficiente quando comparamos com a quimioterapia anti-HIV. Em 2011, estimativas apontavam para 35 milhões de pacientes infectados com o HIV cujo arsenal terapêutico anti-HIV compreendia 33 medicamentos aprovados para uso clínico.³

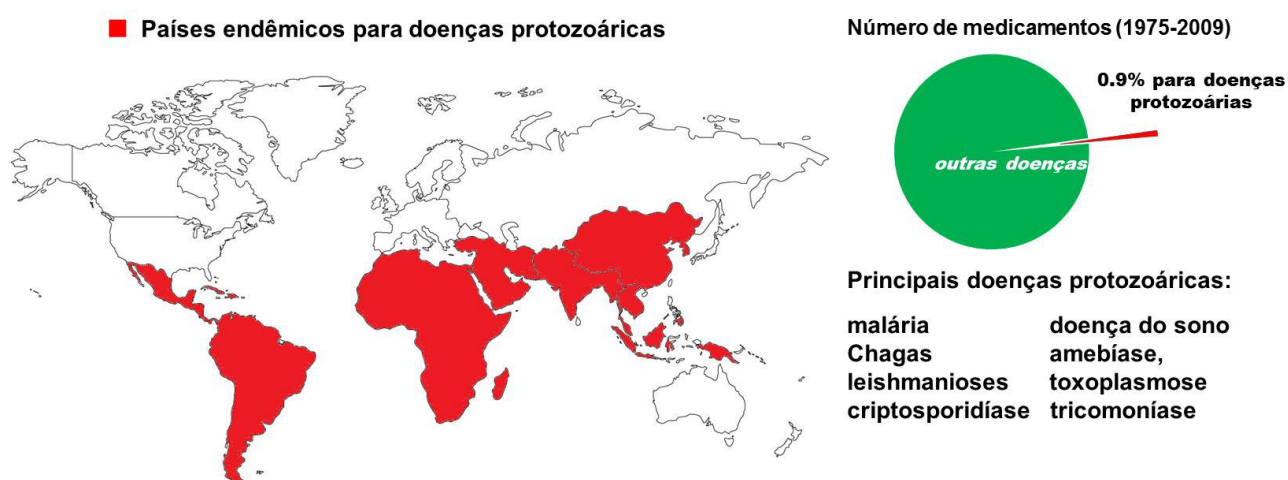


Figura 1: Prevalência global e da quimioterapia das principais doenças protozoárias. Dados coletados no site da Organização Mundial de Saúde (http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/en/index.html)

Mesmo que a eficácia e a segurança terapêutica para cada um destes medicamentos antiprotozoários fosse alta, ainda assim teríamos o problema da falta de opções terapêuticas.⁴ Por exemplo, uma parcela significativa da população mundial é alérgica a sulfonamidas, como o sulfametoxazol, mesmo assim, a combinação de sulfametoxazol e trimetoprima é o único tratamento disponível para toxoplasmose.⁴

Não apenas o número de medicamentos é insuficiente, mas também a eficácia e a segurança terapêutica são insatisfatórias. Por exemplo, embora as leishmanioses sejam causadas por sete espécies com virulência e manifestações clínicas diversas, a quimioterapia é restrita a somente três medicamentos (glucantime, miltefosina e anfotericina B).⁵ No caso da malária, os medicamentos disponíveis são eficazes em curar

os eritrócitos parasitados, mas não há tratamento disponível para a malária hepática.⁶ Talvez o exemplo mais crítico da falta de eficácia e segurança terapêutica inadequada seja do melarsoprol e eflornitina, medicamentos úteis no tratamento da doença do sono. A combinação de melarsoprol e eflornitina cura cerca de trinta e cinco por cento dos pacientes, enquanto que um em cada dez pacientes vão a óbito devido aos efeitos colaterais provocados pela quimioterapia.⁷

No caso da doença de Chagas, o tratamento farmacológico disponível atualmente também é insuficiente. Embora cerca de oito milhões de pacientes na América Latina estejam infectados, há somente dois medicamentos aprovados para uso clínico, o benznidazol (1) e o nifurtimox (2) (figura 2).^{8,9} O nifurtimox não é mais prescrito, pois apresenta eficácia inferior a do benznidazol.

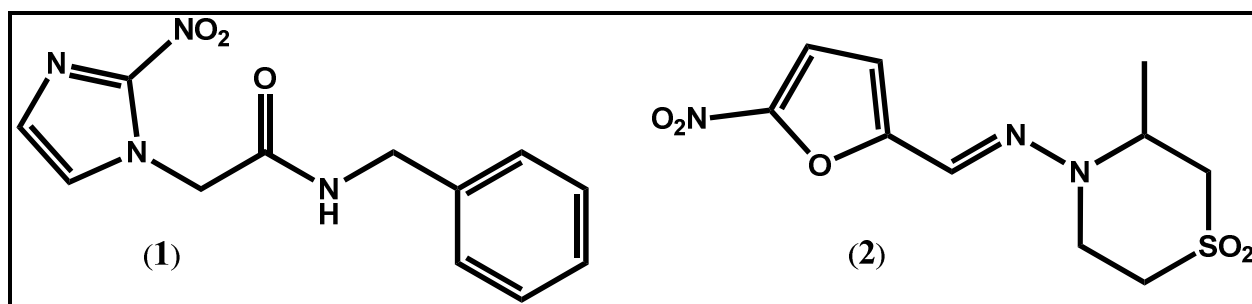


Figura 2: Estruturas químicas do benznidazol (1) e do nifurtimox (2).

O benznidazol é recomendado para pacientes com a doença de Chagas nas fases aguda e crônica indeterminada. Recomenda-se a administração de 5 mg/kg/dia durante 60–90 dias consecutivos para adultos e durante 60 dias para crianças.⁸ O tratamento com benznidazol tem uma taxa de cura de 70 % nos pacientes com a fase aguda da infecção. Entretanto, a taxa de cura em pacientes na fase crônica indeterminada é baixa, variando entre 10–33 %.^{10,11}

O benznidazol é contraindicado durante a gravidez e em pacientes com insuficiência renal ou hepática; isso significa que uma fração dos pacientes com doença de Chagas não possui nenhum tipo de tratamento. Outro agravante do benznidazol são os efeitos colaterais.¹² É bem verdade que os efeitos colaterais mais recorrentes, tais como hipersensibilidade, erupção cutânea macular, desordem gastrointestinal, parestesia e formigamento, não representam riscos de mortalidade. Porém, um levantamento publicado em 2010 mostrou que uma média de 27 % dos pacientes interrompem o tratamento devido aos efeitos colaterais do benznidazol.¹³

Todavia, a maior preocupação é com os pacientes chagásicos na fase crônica sintomática. Em torno de 30–40 % dos pacientes infectados evoluem para a fase crônica sintomática, resultando em cardiomiopatias. A eficácia do benznidazol em reduzir a parasitemia em pacientes com cardiomiopatias ainda não foi comprovada. Em 2004, teve início no Brasil um estudo clínico multicêntrico, duplo-cedo e randomizado de fase três para avaliar a eficácia e segurança do benznidazol em pacientes com cardiomiopatias chagásicas. Com previsão para terminar em julho de 2013, este é o primeiro estudo clínico que pretende avaliar a eficácia de um medicamento antiparasitário em pacientes na fase crônica sintomática da doença.^{14,15}

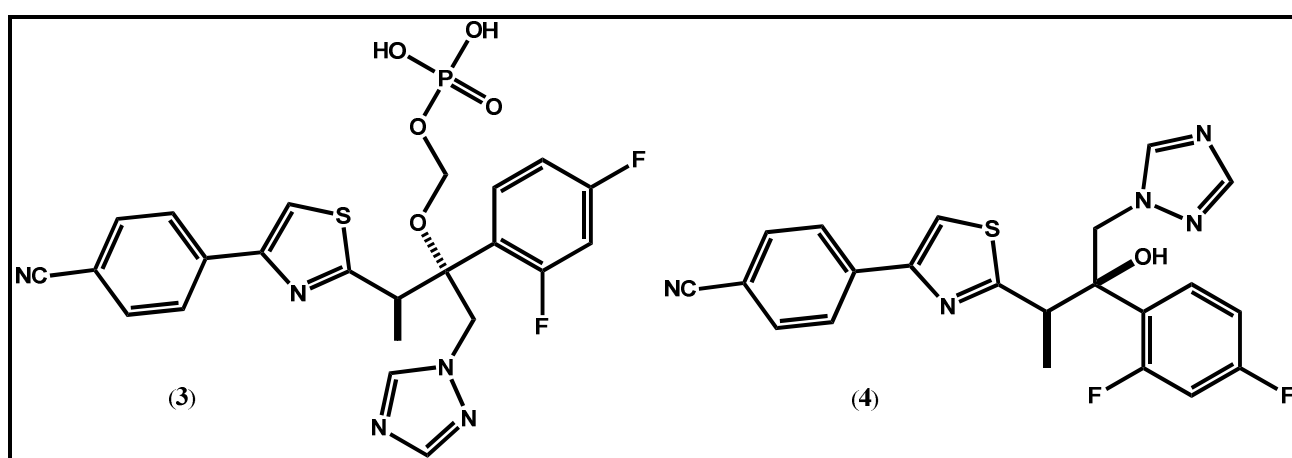


Figura 3: Estruturas químicas do E1224 (3) e do ravuconazol (4).

De acordo com o banco de dados norteamericano de estudos clínicos (<http://clinicaltrials.gov/ct2/home>), há somente um medicamento sendo avaliado em humanos para a fase aguda e crônica indeterminada (**figura 3**). O estudo de fase dois foi iniciado em 2011 e tem como objetivo avaliar a eficácia e a segurança do composto E1224 (3), um pró-fármaco do ravuconazol (BMS-207147[®], 4).¹⁶ Se aprovado para o tratamento da doença de Chagas, o composto E1224 (3) será o primeiro medicamento introduzido na clínica nos últimos 40 anos.

Mesmo que o fármaco E1224 seja aprovado, as opções terapêuticas para a doença de Chagas ainda assim estarão aquém do necessário. Sem dúvida as opções terapêuticas para a doença de Chagas devem ser melhoradas, e para tanto, o desenvolvimento de novos medicamentos é imprescindível.

Sem sombra de dúvidas, as pesquisas por fármacos úteis na doença de Chagas evoluíram nas últimas duas décadas. Em parte, isto foi possível devido ao seqüenciamento do genoma do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico da doença de Chagas.¹⁷ Um conhecimento importante que foi adquirido após o seqüenciamento genômico do *T. cruzi* é

a presença de genes que expressam proteínas com potencialidades como alvos moleculares de fármacos. O genoma do *T. cruzi* possui uma família de vinte genes que expressam cisteíno proteases (**figura 4**). Até o momento, três cisteíno proteases do *T. cruzi* foram caracterizadas bioquimicamente: cruzaina (gp57/51), catepsina B (*TccatB*) e autofagina-4 (*TcAtg4*).¹⁸

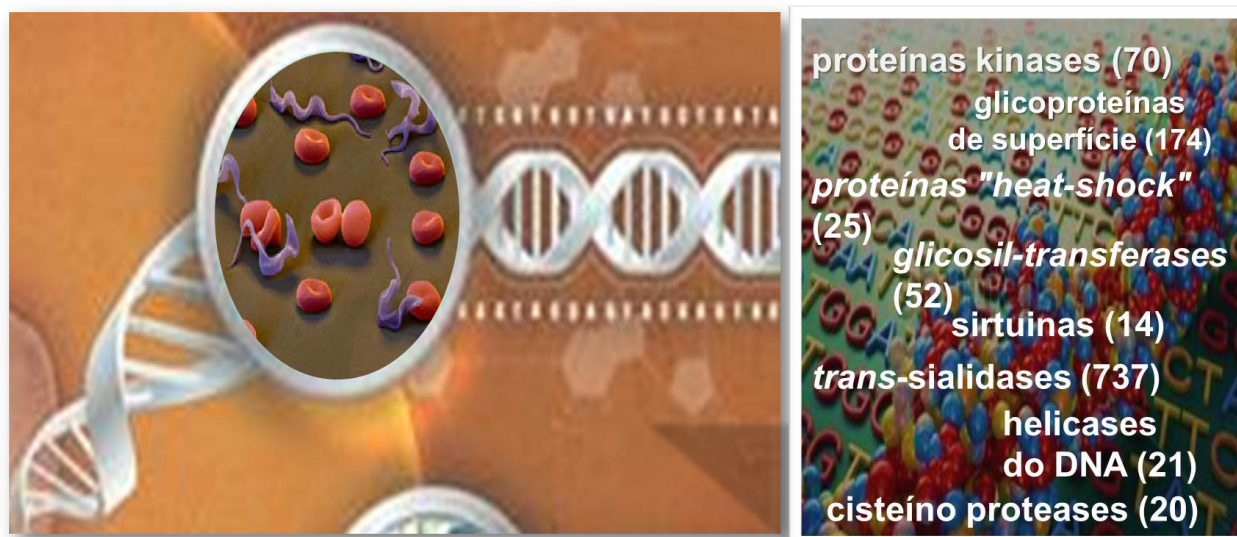


Figura 4: Sequenciamento do genoma do *T. cruzi* revelou importantes alvos moleculares de fármacos. Em parênteses, número de genes.

A bioquímica estrutural e funcional da cruzaina é de longe a mais estudada entre as cisteíno proteases do *T. cruzi*.¹⁸ A cruzaina tem um papel crucial na infecção pelo *T. cruzi*.¹⁹ A cruzaina é um alvo molecular útil para o planejamento racional de agentes tripanocidas.

Tiossemicarbazonas são inibidores potentes da cruzaina, porém com a vantagem de serem destituídos de estrutura peptídica.¹⁹ Inspirados nestes relatos, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisas observaram que 2-iminotiazolidina-4-onas possuem propriedades tripanocidas, porém com potência inferior as tiossemicarbazonas. Todavia, nós observamos dados mais consistentes em termos de seletividade (baixa toxicidade para células de mamíferos), denotando assim a importância das 2-iminotiazolidina-4-onas.

Diante das necessidades de identificar novos candidatos a fármacos úteis no tratamento da doença de Chagas, e por outro lado, em virtude da semelhança estrutural e funcional entre tiossemicarbazonas e 2-iminotiazolidina-4-onas, este trabalho descreve o planejamento estrutural, a síntese, a avaliação farmacológica das propriedades tripanocidas e as REAs de novas 2-iminotiazolidina-4-onas e análogos estruturais.

2.0 OBJETIVOS

Diante da necessidade de identificar novos fármacos úteis para o tratamento da doença de Chagas, os objetivos deste trabalho envolvem o planejamento estrutural, a síntese, a avaliação farmacológica das propriedades tripanocidas e o estudo das relações estruturas-atividades de 2-iminotiazolidina-4-onas e análogos estruturais. Especificamente, tem-se:

- A síntese de inéditas 2-iminotiazolidina-4-onas e análogos estruturais do tipo 2-iminotiazolidina-4-tionas;
- A síntese de uma série congênica de inéditos 2-imino-1,3-tiazóis, planejados como análogos estruturais das 2-iminotiazolidina-4-onas;
- A determinação da afinidade destes compostos para as enzimas cruzaina do *T. cruzi* e catepsinas L e S de mamíferos;
- A avaliação dos efeitos antiproliferativos e tóxicos frente à cultura do *T. cruzi* e esplenócitos de camundongos;
- Avaliação da eficácia dos compostos em reduzir a parasitemia em modelos de infecção *in vitro* (macrófagos) e *in vivo* (camundongos);
- Síntese de uma nova geração de compostos, planejados estruturalmente a partir dos dados obtidos anteriormente bem como a avaliação farmacológica das propriedades tripanocidas.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Alvos moleculares de compostos anti-*T. cruzi*

Devido a complexidade e a diversidade de mediadores patogênicos envolvidos, a infecção pelo *T. cruzi* pode ser tratada por diferentes intervenções terapêuticas. De certa maneira, estas intervenções terapêuticas podem ser divididas ao menos em três diferentes mecanismos: estresse oxidativo, interação parasita-hospedeiro e metabolismo.

A intervenção mais clássica compreende o emprego de inibidores das nitroredutases e da tripanotiona redutase. Estas enzimas, que são dependentes da nicotinamida adenina dinucleotídeo, neutralizam espécies reativas produzidas por toxinas e portanto conferem proteção ao parasito contra o estresse oxidativo celular.^{20,21}

Inibidores clássicos destas enzimas são compostos nitroheterociclos, tais como benznidazol, nifurtimox e meglazol.²¹ Em função dos metabólitos citotóxicos bem como das espécies reativas (inclusive radicalares) que são gerados durante a metabolização de nitroheterociclos, a toxicidade desta classe de compostos para células de mamíferos é geralmente elevada.²² Consequentemente, o uso de compostos nitroheterociclos como candidatos a fármacos antichagásicos tem logrado pouco sucesso.

Para contornar esta limitação, outras classes de inibidores das nitroredutases e da tripanotiona redutase do *T. cruzi* tem sido investigados. Arilfuranos,²³ acridinas,²⁴ chalconas²⁵ e quinazolininas²⁶ são alguns dos inibidores da tripanotiona redutase do *T. cruzi* identificados mais recentemente. Todavia, a eficácia destes compostos em inibir a parasitemia *in vivo* ainda não foi demonstrada.

Outra intervenção terapêutica importante é na relação parasita-hospedeiro. O genoma do *T. cruzi* possui ao menos 700 genes envolvidos na expressão de mucinas. Tripomastigotas, a forma circulante do *T. cruzi* e invasiva para células de mamíferos, são cobertas por uma variedade de mucinas na superfície da membrana plasmática.²⁷ Contudo, estas mucinas de superfície não são capazes de mascarar o reconhecimento de tripomastigotas pelo sistema imune. Isso acontece, em parte, porque mucinas e demais glicoproteínas do *T. cruzi* não possuem ácido siálico, um monossacarídeo essencial na interação célula-célula. Para contornar isto, tripomastigotas expressam a enzima *trans*-sialidase, que não apenas hidrolisa mas também transfere o ácido siálico das células de mamíferos para as mucinas de superfície do parasito (**figura 5**).²⁸

Inicialmente, Schenkman e col.²⁹ observaram que tripomastigotas da cepa Tulahuén

eram eficientes em infectar células derivadas do ovário do hamster Chinês (CHO), porém não infectavam células CHO deficientes de ácido siálico. Estes dados foram mais tarde confirmados com outras linhagens células, inclusive usando uma cepa do *T. cruzi* deficiente de *trans*-sialidase.³⁰

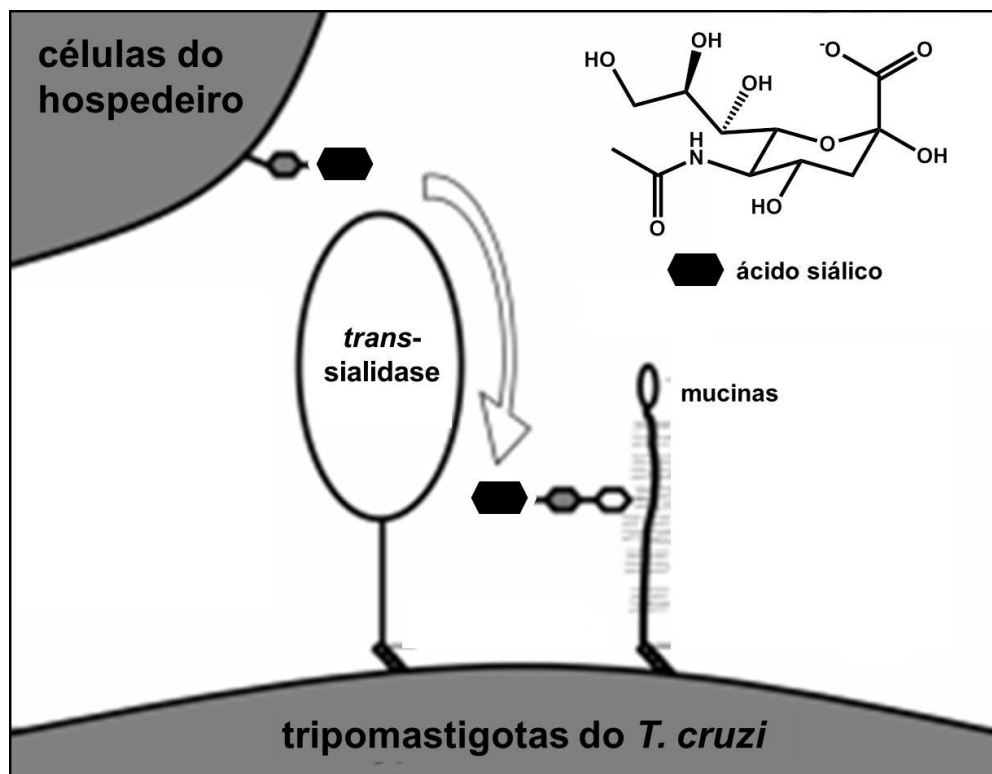


Figura 5: Papel da enzima *trans*-sialidase do *T. cruzi*.

A *trans*-sialidase tem um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, pois esta enzima confere habilidade ao parasita em escapar do sistema imune. Isso explica o porquê de mais de setenta por cento dos pacientes infectados com o *T. cruzi* não desenvolvem uma resposta imune exarcebada. Em virtude destes efeitos, o uso da *trans*-sialidase como um alvo molecular de compostos anti-*T. cruzi* tem sido amplamente almejada.³¹

A *trans*-sialidase possui um modo de ação semelhante ao das neuraminidase virais.³² Num primeiro momento, a busca por inibidores da *trans*-sialidase foi estimulada com o sucesso farmacêutico do oseltamivir (Tamiflu®), um inibidor da neuraminidase do vírus influenza aprovado para uso clínico. Porém, a enzima *trans*-sialidase não é expressa em amastigotas, que é de grande relevância para a fase crônica sintomática da infecção. Isto talvez seja um limitante para o desenvolvimento de fármacos baseado em inibidores desta enzima.³¹ Ao menos, a *trans*-sialidase tem grande potencial como antígeno para o desenvolvimento de vacinas.^{30,33}

Na relação *T. cruzi*-hospedeiro, a *trans*-sialidase permite o parasita de escapar do sistema imune, já as cisteíno proteases conferem ao parasita uma incrível habilidade de invadir células do hospedeiro, inclusive em células do sistema imune.¹⁸ As duas principais cisteíno proteases do *T. cruzi*, cruzaina (gp57/51) e autofagina-4 (*TcAtg4*), possuem funções distintas, porém complementares. A *TcAtg4* regula as alterações morfológicas do parasita durante o ciclo evolutivo, reciclando proteínas localizadas no flagelo parasitário.^{18,19} A cruzaina também participa da reciclagem de proteínas lisossomais, além de regular a expressão da *TcAtg4*. Mas o que merece destaque é o papel da cruzaina em conferir habilidade ao *T. cruzi* em invadir as células do hospedeiro.

Tal como a catepsina L humana, a cruzaina é um endopeptidase com mecanismo de catálise covalente. A região *N*-terminal da cruzaina, onde se localiza o sítio catalítico, tem uma homologia com a catepsina L e com outras cisteíno proteases de protozoários. Diferente das catepsinas, a região *C*-terminal da cruzaina é glicosilada, o que sugere um papel da cruzaina como um antígeno.^{34,35}

A cruzaina é expressa durante todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, porém localizada em diferentes compartimentos (**figura 6**).³⁶ O fato desta enzima estar localizada na superfície de amastigotas, aliado ao potencial antigênico, foram os primeiros indícios do envolvimento da cruzaina na relação parasita-hospedeiro.

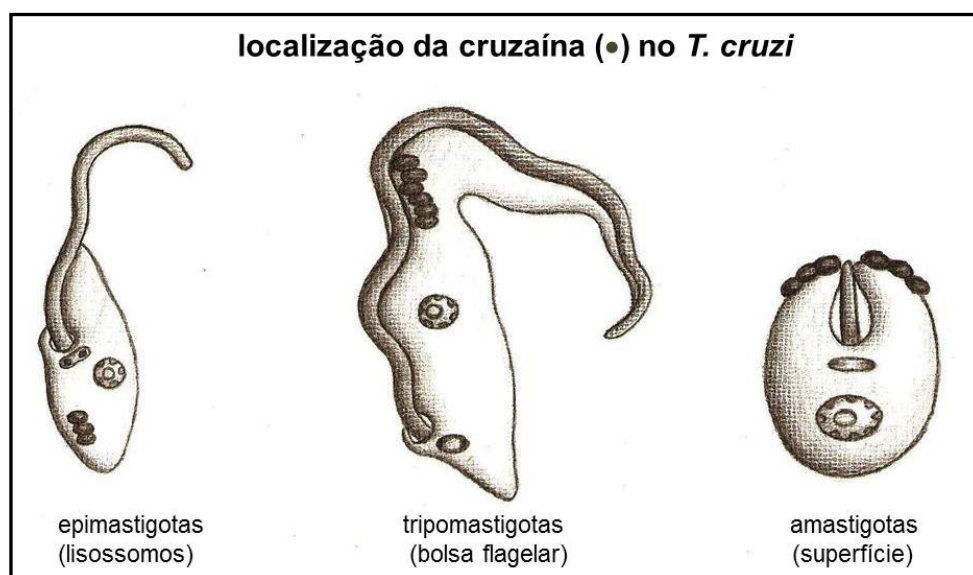


Figura 6: Cruzaina é localizada em diferentes compartimentos durante o ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

Um estudo mais recente sugere que a cruzaina participa durante a adesão e invasão do parasita em células do sistema imune. Usando uma cepa do *T. cruzi* deficiente em cruzaina, McKerrow e col.³⁷ mostraram que esta cepa possui viabilidade celular, porém não estabelece infecção *in vitro* (em macrófagos) nem *in vivo* (com camundongos C3H).

Estes mesmos autores observaram que macrófagos são ativados quando expostos com esta cepa deficiente, o que não acontece com uma cepa silvestre ("wild-type") do *T. cruzi*. Uma visão global destes experimentos sugere que durante a invasão, a cruzaina degrada proteínas secretadas por macrófagos, prevenindo a ativação do sistema imune (**figura 7**).

A cruzaina não somente contribui para a invasão, mas também para a manutenção da parasitemia no tecido cardíaco durante a fase crônica. Scharfstein e col.^{38,39} demonstraram que a cruzaina possui uma função semelhante à caliceína, degradando o cininogênio em cininas. A liberação de cininas, tais como bradicinina, ativam os receptores endoteliais e de bradicininas, causa vasodilatação tecidual; favorecendo a infecção no tecido cardíaco. Embora os efeitos da bradicinina na vasculatura endotelial sejam antagonizados pela protease conversora de angiotensina, este antagonismo parece não ser suficiente, e portanto o curso da infecção segue.

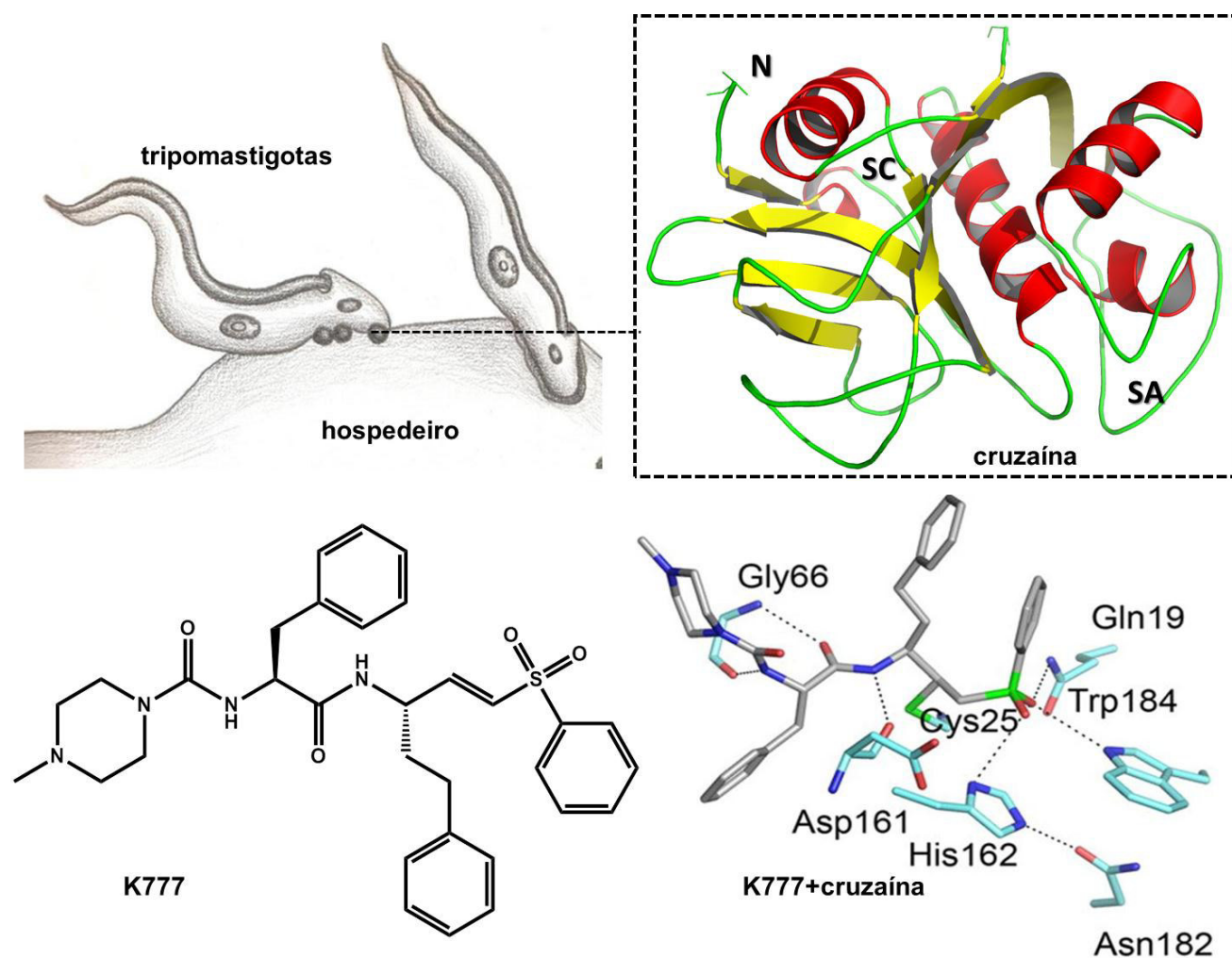


Figura 7: Invasão do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado é mediada pela cruzaina. Estrutura cristalográfica da cruzaina (PBD 3UIT) e da cruzaina em complexo com o ligante K777 (figuras geradas pelo Pymol 2.0). SA, sítio antigênico; SC, sítio catalítico; N, N-terminal.

Devido ao papel da cruzaina durante a infecção pelo *T. cruzi*, a identificação de inibidores desta enzima tem recebido uma atenção considerável. Em 2010, foi iniciado um estudo de fase I para avaliar a segurança do inibidor da cruzaina K777 (**6**, **figura 7**) em pacientes infectados na fase aguda.¹⁶

O uso de proteases como alvos moleculares logrou sucesso inquestionável na identificação de fármacos anti-HIV e antihipertensivos.⁴⁰ Ainda sim, há questões sobre a viabilidade de proteases como alvos moleculares de fármacos que precisam ser esclarecidas.

No *T. cruzi*, sabe-se que o mecanismo de resistência aos inibidores da cruzaina envolve a formação de cruzaina imatura e não funcional.³⁷ Catepsinas, inclusive a cruzaina, são expressas e armazenadas nos lisossomos na forma imatura e inativa (zimogênio). O estímulo celular que leva a clivagem do zimogênio na sua forma ativa (catepsina) ainda não é muito bem compreendida.⁴⁰ Um melhor entendimento da ativação das catepsinas é necessário para avançar no desenvolvimento de fármacos que atuam nestas proteases.

Além dos avanços com os inibidores da cruzaina, compostos que interferem no metabolismo do *T. cruzi* merecem destaque.

Tal como em fungos, a membrana plasmática do *T. cruzi* é composta de ergosterol e colesterol.^{41,42} Amastigotas capturam colesterol das células do hospedeiro, ainda assim o *T. cruzi* necessita do ergosterol que é obtido via uma biossíntese *de novo*. A depleção da cascata enzimática envolvida na síntese do ergosterol afeta substancialmente a viabilidade celular do parasita, tornando inibidores da biossíntese do ergosterol uma intervenção terapêutica atrativa.⁴³ Ao menos quatro enzimas são envolvidas na biossíntese do ergosterol: C14-demetilase (CYP51),⁴⁴ farnesiltransferase,⁴⁵ e esqualeno⁴⁶ sintetase.

A bioquímica estrutural e funcional da enzima CYP51, percentence a superfamília do citocromo P450, tem sido estudada em detalhes, facilitando o processo de identificação de inibidores.⁴⁷⁻⁴⁹ Alguns destes inibidores são os antifúngicos E1224 (**3**, **figura 3**), Ravuconazol (BMS-207147[®], **4**, **figura 3**), Posaconazol (Nofaxil[®], **7**), Cetoconazol (Ketomed[®], **8**) e Terbinafina (Lamisil[®], **9**) (**figura 8**).

Uma vantagem dos antifúngicos que inibem a CYP51 do *T. cruzi* é que muitos destes compostos já são usados na clínica. Isto diminui o tempo necessário para o desenvolvimento farmacêutico bem como os ensaios clínicos. Se o composto E1224 (**3**) for aprovado para uso na doença de Chagas, será um exemplo clássico de reposicionamento de fármacos.

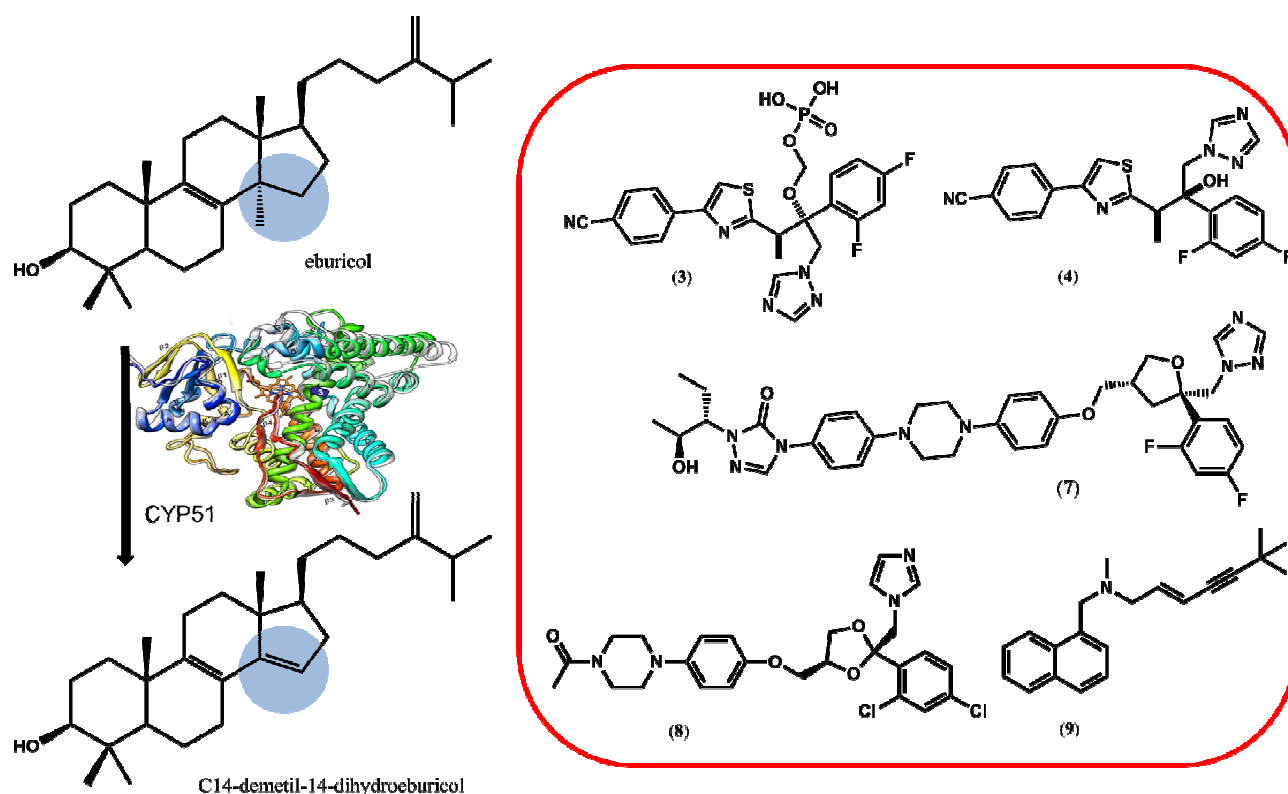


Figura 8: Eburicol é um precursor importante do ergosterol. Durante a biossíntese do ergosterol, a enzima CYP51 catalisa a remoção da metila na posição C14 do eburicol. Inibidores da CYP51 do *T. cruzi* (vermelho).

O *T. cruzi* armazena ergosterol e colesterol no reservatório parasitário.⁵⁰ Teoricamente, isto poderia resultar em baixa susceptibilidade de fármacos que atuam nesta via. Entretanto, a eficácia de inibidores da CYP51 em reduzir a parasitemia sanguínea tem sido demonstrada, e talvez não represente um problema.^{51,52}

Como discutido acima, a bioquímica funcional e estrutural de alvos moleculares de fármacos anti-*T. cruzi* tem evoluído consideravelmente. Estas informações tem melhorado a qualidade do planejamento estrutural de novos protótipos, candidatos a fármacos anti-*T. cruzi*.

3.2 A química medicinal e a descoberta de fármacos anti-*T. cruzi*

Um dos princípios utilizados no processo de descoberta de fármacos tem como fundamento o paradigma de James W. Black, ganhador do prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 1988: "*A base mais fértil para a descoberta de um novo fármaco é começar com um fármaco antigo*". De acordo com Chong e Sullivan,⁵³ o uso deste paradigma tem contribuído não somente para a descoberta de novos fármacos, mas também para o reposicionamento de fármacos antigos para uso em novas aplicações terapêuticas. Ainda segundo estes autores, o reposicionamento de fármacos pode ser útil para os antiparasitários, visto que os custos para o desenvolvimento farmacêutico e ensaios clínicos seriam reduzidos.⁵³ De fato, a estratégia de reposicionamento de fármacos antigos bem como o paradigma de James Black tem sido aplicada na doença de Chagas.

O Megazol (**10**, **figura 9**), sintetizado em 1962 pela indústria American Cyanamid (atualmente, Cytec®), é um nitroimidazol com propriedades antibacterianas. Mais tarde, em 1982, uma colaboração entre a American Cyanamid e o grupo do Prof. Zigman Brenner (do Centro de Pesquisas René Rachou) permitiu a avaliação das propriedades anti-*T. cruzi* de compostos heterocíclicos diversos, entre eles o megazol (**10**). Durante a triagem, o megazol (**10**) apresentou uma eficácia superior ao benznidazol (**1**) em reduzir a parasitemia de camundongos infectados com a cepa Y e tratados por via oral com dose única de 500 mg/kg.^{54,55}

Uma reavaliação da eficácia do megazol (**10**) em modelos de infecção aguda pela cepa Y do *T. cruzi* comprovou que a dose única de 200 mg/kg é suficiente em erradicar a infecção.⁵⁶ O megazol (**10**) possui um mecanismo de ação tripanocida semelhante ao Bdz (**1**) e Nfx (**2**), inibindo nitroredutases e a tripanotona redutase.⁵⁷ Devido a toxicidade elevada, este fármaco não evoluiu para os ensaios clínicos.⁵⁶ Por ser mais potente que o Bdz (**1**), o megazol (**10**) é um protótipo estrutural útil para o planejamento estrutural de agentes tripanocidas.

A **figura 9** resume alguns dos análogos estruturais do megazol (**10**).⁵⁸⁻⁶⁰ A brazilizona A (**12**),⁵⁸ planejado estruturalmente pela substituição da amina do megazol (**10**) pelo grupo fenilhidrazona, é um agente tripanocida mais potente, *in vitro*, que o megazol (**10**), porém destituído de toxicidade elevada. Todavia, a brazilizona A (**12**) é menos potente que o Megazol em reduzir a infecção, *in vivo*, denotando assim a necessidade de otimização estrutural e farmacológica.⁵⁶

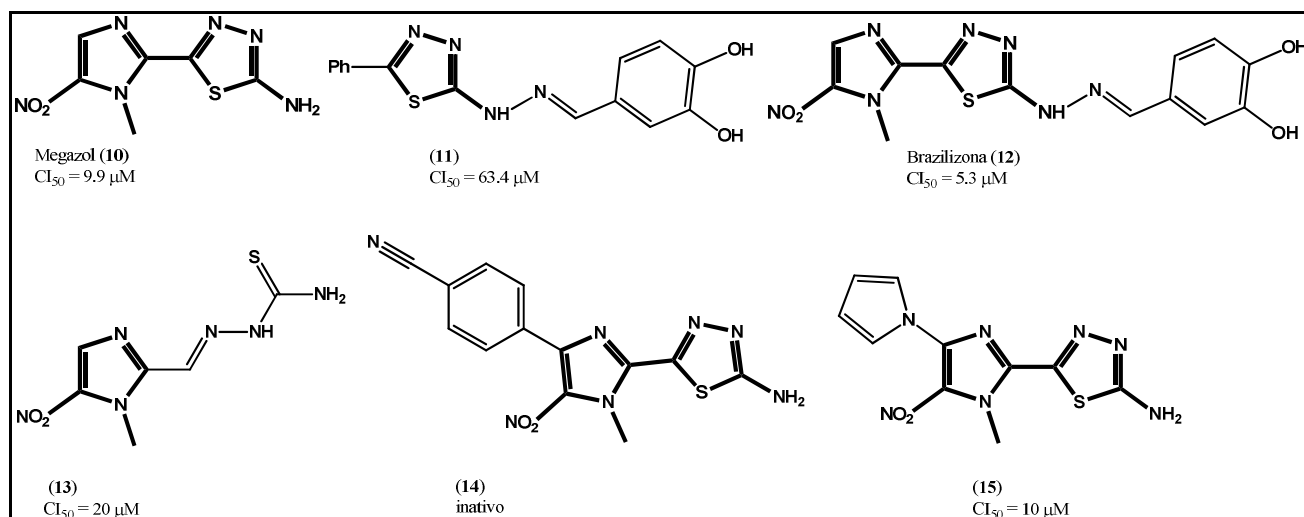


Figura 9. Megazol (10) e análogos estruturais. Valores de CI_{50} para tripomastigotas da cepa Y.

Um aspecto interessante da Brazilizona A (12) é a presença do grupo fenilhidrazona. De fato, compostos derivados de hidrazonas^{61,62} e *N*-acilhidrazonas⁶³⁻⁶⁶ são agentes tripanocidas potentes. As propriedades tripanocidas destas classes de compostos são devido a inibição da enzima cruzaina.^{63,67}

Em virtude do potencial das *N*-acilhidrazonas como agentes tripanocidas, Rodriguez e col.⁶⁸ realizaram uma triagem de alto desempenho, *in vitro*, de mil hidrazonas e *N*-acilhidrazonas. Estes autores identificaram *N*-acilhidrazonas com propriedades tripanocidas potentes (amastigotas da cepa Tulahuén) e seletivos (células de mamíferos *versus T. cruzi*). Uma análise cuidadosa dos compostos avaliados indicou um padrão de similaridade, representado pela função 2-piridina-*N*-acilhidrazona (16–23), que poderia estar associado à atividade descrita (figura 10).

O composto PCH6 (20) foi selecionado para a avaliação da eficácia, *in vivo*, em animais infectados com tripomastigotas da cepa Tulahuén. Na concentração de 5 mg/kg por via intraperitoneal durante cinco dias consecutivos, o PCH6 (20) não apresentou eficácia significativa.^{69,70}

Estes mesmos autores⁶⁹ testaram outras substâncias no modelo *in vivo* de infecção, e observaram que o derivado catiônico CID-24892493 (26) foi eficaz em erradicar a parasitemia, enquanto que neste mesmo modelo o Bdz (1) não erradicou.

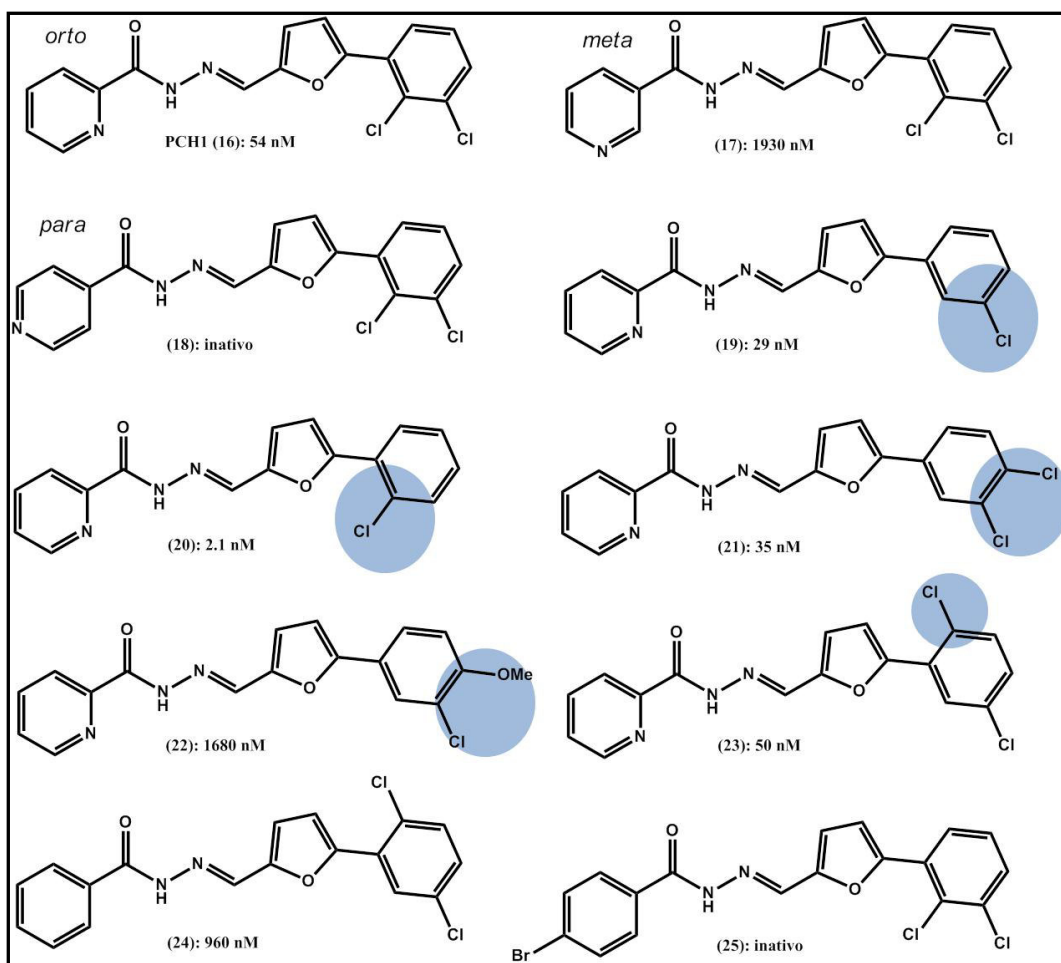


Figura 10: *N*-acilhidrazonas com propriedades anti-*T. cruzi*. Valores de CI_{50} para ensaios com amastigotas.

Uma análise minuciosa da estrutura da substância **(26)** indicou uma similaridade com o agrotóxico antifúngico Fenarimol[®] **(27)**, um triarilcarbinol de ocorrência natural (figura 11).

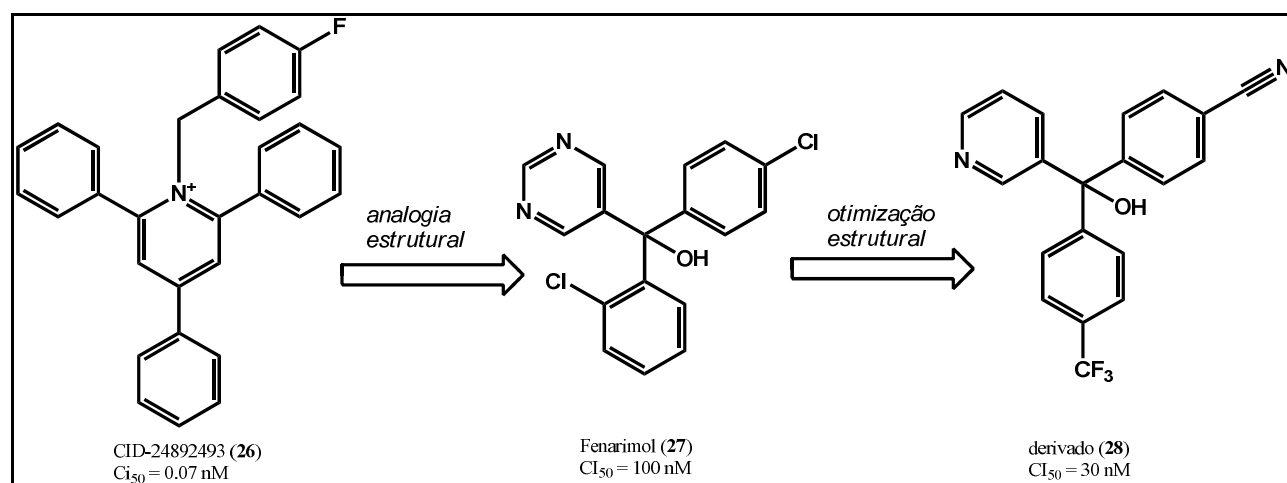


Figura 11: Identificação do composto **(28)**, um agente tripanocida derivado do Fenarimol **(27)**.

O Fenarimol **(27)**, um inibidor da biossíntese de ergosterol,⁷¹ foi de fato identificado como um inibidor potente da proliferação de epimastigotas e tóxico para tripomastigotas da

cepa Tulahuén do *T. cruzi*, com valores de CI_{50} de 0.1 e 0.35 μM , respectivamente. A toxicidade do composto **27** para células de mamíferos é baixa (CI_{50} = 76.8 μM , linhagem L6); portanto com índice de seletividade (IS) de 220.⁷²

Estes resultados promissores levaram a investigação das subunidades estruturais do Fenarimol (**27**) que são essenciais para a manutenção da atividade tripanocida. Diversas estratégias de modificação estrutural foram empregadas, incluindo a tentativa de simplificação molecular. Uma análise extensiva das REA do Fenarimol (**27**) culminou com a identificação do composto (**28**) (figura 11), um agente tripanocida potente e com eficácia e segurança terapêutica excelente *in vivo*.⁷²

Tal como com o Fenarimol (**27**), os compostos E1224 (**3**) e Posaconazol (**7**) também são agentes anti-*T. cruzi* que inibem a biossíntese do ergosterol. Como citado anteriormente, os compostos (**3**) e (**7**) estão sendo avaliados em estudos clínicos com pacientes na fase aguda. Mas cabe ressaltar a existência de relatos clínicos de hepatotoxicidade após tratamento com antifúngicos do tipo azóis, incluindo o Posaconazol.⁷³⁻⁷⁵ O potencial hepatotóxico do E1224 (**3**) e Posaconazol (**7**) representa uma preocupação quanto a segurança terapêutica destes fármacos para a doença de Chagas.

A busca por inibidores da biossíntese de ergosterol do *T. cruzi* destituídos de potencial hepatotóxico, tem sido vislumbrada. Um exemplo desta estratégia foi usado com sucesso por Buckner e col.⁷⁶ durante a identificação das propriedades tripanocidas do Tipifarnib (Zarnestra[®], **29**).

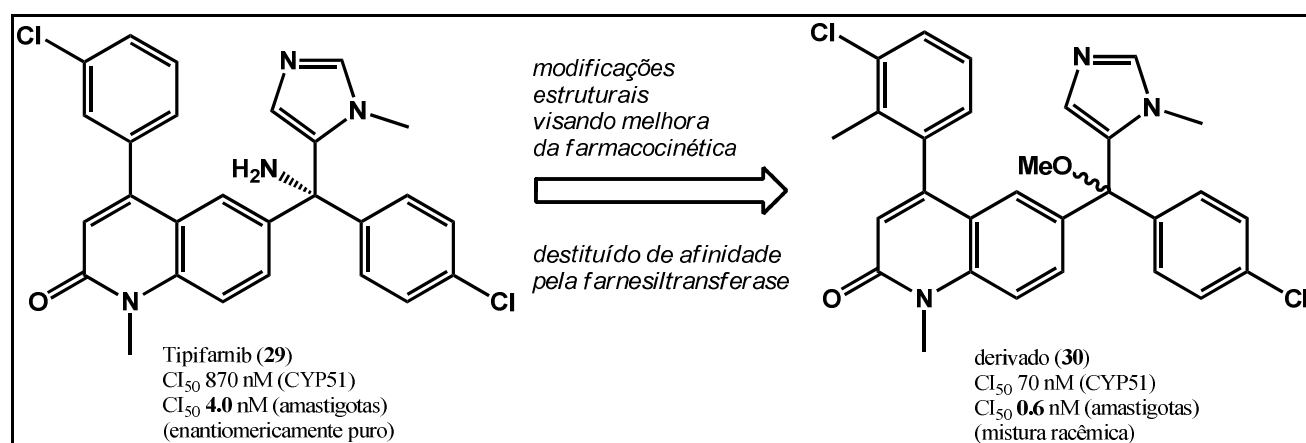


Figura 12: Otimização estrutural do Tipifarnib (**29**) culminou com a descoberta do composto (**30**), um derivado racêmico, mais potente e com melhor perfil de biodisponibilidade por via oral.

Tipifarnib (**29**, figura 12), um derivado imidazólico identificado por pesquisadores da Johnson & Johnson[®], é um fármaco antitumoral que age inibindo a enzima

farnesiltransferase humana.⁷⁷ Homólogos funcionais da farnesyltransferase também são encontrados em protozoários, incluindo em tripanossomas. Buckner e col.⁷⁶ testaram então Tipifarnib (**29**) frente ao *T. cruzi* e observaram que este fármaco antitumoral é também um agente tripanocida potente, com CI_{50} de 4 nM para amastigotas da cepa Tulahuén. O mecanismo de ação tripanocida para o Tipifarnib não envolve a inibição da farnesiltransferase ($CI_{50} < 50 \mu M$), mas sim a inibição da enzima CYP51 do *T. cruzi* ($CI_{50} = 1.7 \mu M$).

Mais tarde, Buckner e col.^{78,79} vislumbraram a identificação de análogos do Tipifarnib destituídos de afinidade pela farnesiltransferase humana; portanto seletivos para a CYP51 do *T. cruzi*. Uma análise das REA foi conduzida com o Tipifarnib (**29**) e permitiu a identificação do composto (**30**), um análogo estruturalmente otimizado do Tipifarnib, seletivo para a enzima CYP51 do *T. cruzi* e dotado de potência similar ao Bdz (**1**) e Posaconazol (**7**) em reduzir a parasitemia em animais infectados.

Diferente dos exemplos discutidos acima, a química medicinal que culminou com a descoberta do composto K777 (**6**) teve como fonte de inspiração os produtos naturais.

Há mais de 20 anos, pesquisadores da indústria farmacêutica Taisho[®] isolaram do fungo *Aspergillus japonicus* dois peptídeos de baixo peso molecular, denominados E64 e E64c (**31**).⁸⁰ Estes peptídeos inibiram a atividade catalítica de cisteíno proteases do tipo papaína. A análise de raios-X da papaína co-cristalizada com o composto (**31**) revelou que o inibidor se liga covalentemente com a proteína, envolvendo o resíduo cisteína-25. Este mecanismo é irreversível, tendo o grupo epóxido do composto (**31**) como um centro eletrofílico.⁸¹

Diante destes achados, McKerrow e col.⁸² utilizaram as propriedades funcionais do peptídeo E64c (**31**) como protótipo estrutural na busca de inibidores da protease cruzaina do *T. cruzi* (**figura 13**). Após sucessivas modificações moleculares,^{83-85,34} estes esforços culminaram com a descoberta do peptídeo K777 (**6**), um inibidor da cruzaina potente e seletivo ($IS > 100$, cruzaina versus catepsina L), e capaz em erradicar o *T. cruzi* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

McKerrow e col.^{86,87} também demonstraram que o tratamento por via intraperitoneal durante 30 dias consecutivos do composto K777 (**6**) na dose de 30 mg/kg cura camundongos imunodeficientes infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Nesse modelo experimental com camundongos da linhagem *Rag1* (deleção de linfócitos B e T), a parasitemia tecidual é cinco vezes mais alta que em camundongos silvestres BALB/c ou

C57BL ("wild-type"). O K777 (**6**) é de fato o único composto com eficácia comprovada neste modelo.

O composto K777 (**6**), juntamente com o derivado do Fenarimol (**28**) e do Tipifarnib (**30**), representam os candidatos a fármacos antichagásicos mais promissores até o momento descritos na literatura. Por um lado, o K777 (**6**) sobressai entre os demais, devido a comprovada eficácia deste composto em modelos experimentais de infecção que mimetizam a cardiomiopatia chagásica. Todavia, cabe ressaltar que o K777 (**6**) é um composto peptídico, o que talvez tenha eficácia limitada por via oral. A busca de novos inibidores da cruzaina destituídos de natureza peptídica se faz portanto necessária.

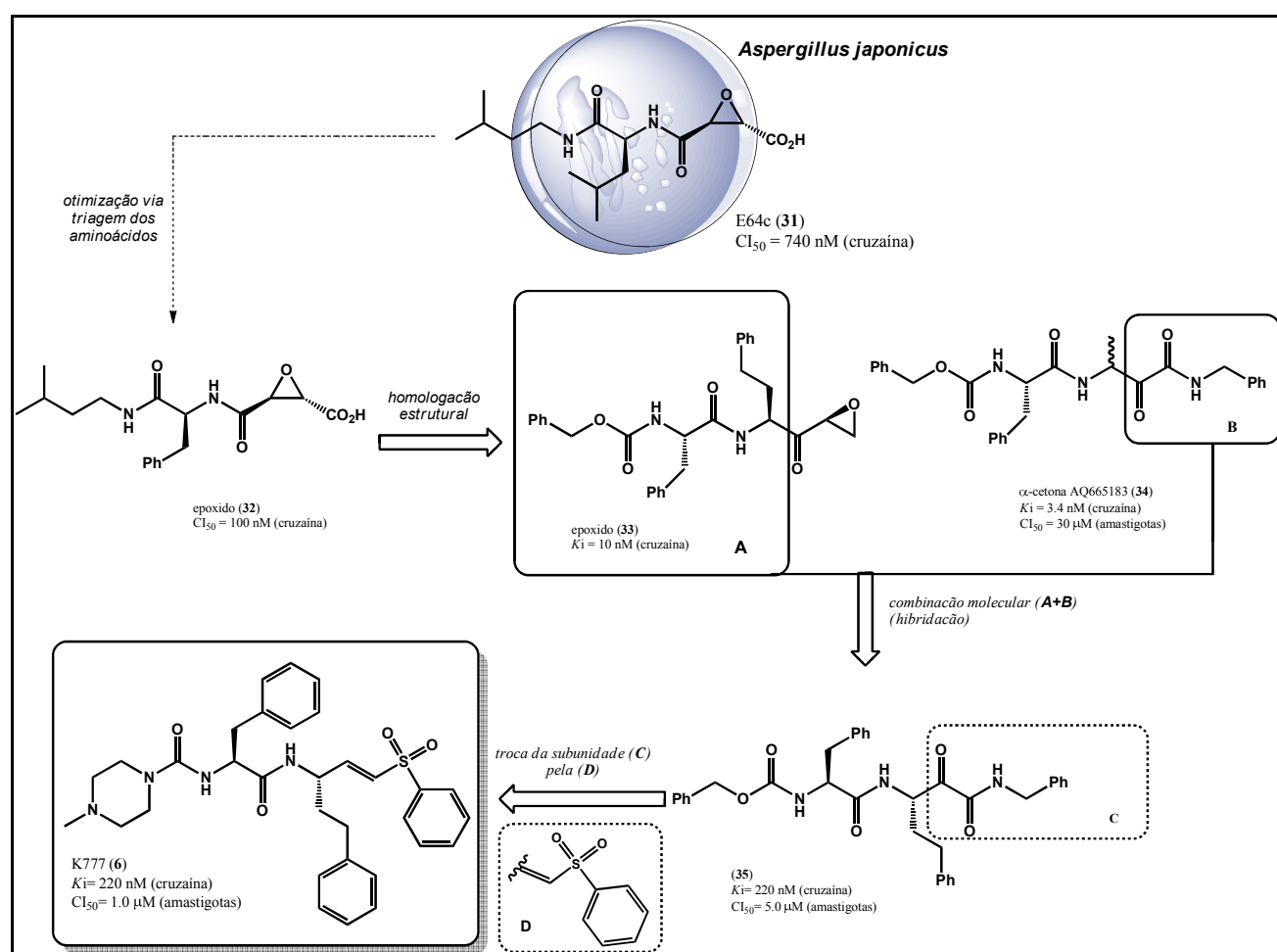


Figura 13: Química medicinal que culminou com a descoberta do K777 (**6**), um candidato a fármaco útil no tratamento da doença de Chagas.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Planejamento estrutural

Uma classe de compostos tripanocidas são as ariltiossemicarbazonas (**36**) e seus análogos cíclicos, as arilpirazolininas (**37**).^{88,89} Estas classes de compostos agem como inibidores covalentes e reversíveis da cruzaina. Neste contexto, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisas identificaram uma série de inibidores não-peptídicos da cruzaina, pertencentes a classe das 2-iminotiazolidina-4-onas.⁹⁰⁻⁹² O planejamento estrutural da série (**38**) teve como fundamento a relação bioisostérica⁹³ entre o anel tiazolidínico presente na série (**38**) e tiossemicarbazonas (**36**) (figura 14).

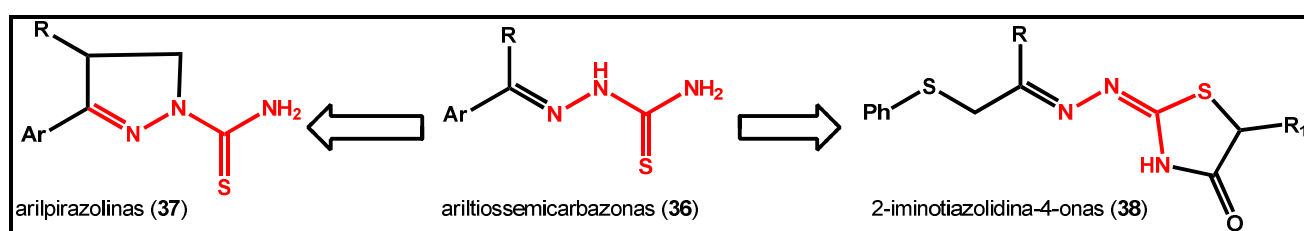


Figura 14: Similaridade estrutural entre tiossemicarbazonas (**36**) e 2-iminotiazolidina-4-onas (**38**).

Após a triagem das propriedades tripanocidas na série (**38**), o nosso grupo de pesquisas logrou sucesso na identificação dos compostos (**39**) e (**40**) (figura 15). O composto (**40**) apresentou propriedade tripanocida com potência similar ao Bdz (**1**), destituído porém de toxicidade em esplenócitos. Enquanto que o Bdz (**1**) apresentou um IS = 5, cabe destacar que o composto (**40**) apresentou IS > 20 e a toxicidade, *in vivo*, baixa em camundongos da linhagem BALB/c.^{91,92}

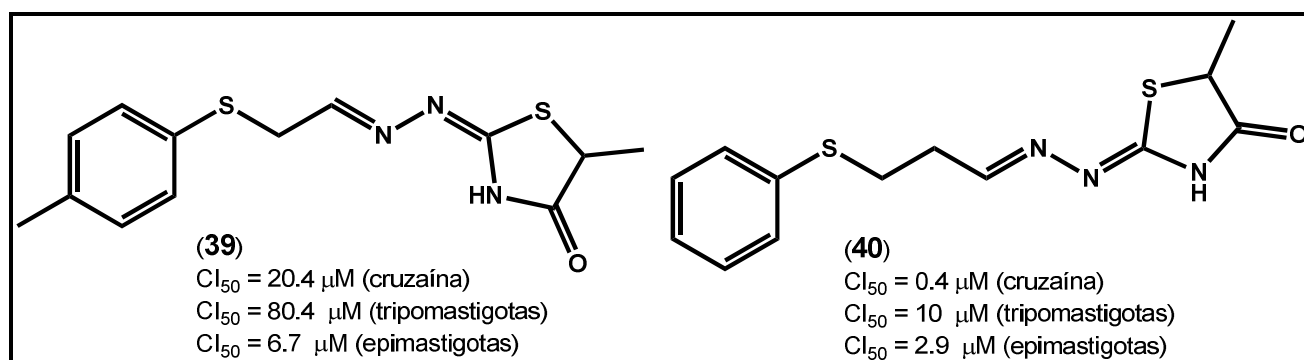


Figura 15: Identificação das 2-iminotiazolidina-4-onas (**39**) e (**40**) como agentes tripanocidas.^{89,90}

O tratamento tanto por via oral como por via intraperitoneal do composto (**40**) na dose de 100 mg/kg não reduziu significativamente a parasitemia sanguínea em camundongos BALB/c infectados com tripomastigotas da cepa Colombiana quando comparado com o controle negativo.⁹⁴ Por este motivo, decidimos reestruturar a série das

2-iminotiazolidin-4-onas (**38**) na tentativa de identificar compostos com um perfil tripanocida melhor.

Neste mesmo sentido, McKerrow e col. descreveram um trabalho com objetivo de identificar análogos estruturais e conformacionais otimizados do composto K777 (**6**).⁹⁵ Neste trabalho, inibidores da cruzaina mais potentes que o K777 (**6**) foram identificados, tais como o composto (**41**), um inibidor da cruzaina potente e seletivo ($Cl_{50} = 0.01 \mu M$), e dotado de propriedades tripanocidas ($Cl_{50} = 1.0 \mu M$, amastigotas). Em relação aos requerimentos estruturais do composto (**41**), a presença do grupo 2,2',4,4'-tetraflúorfenóximetilcetona (**42**) foi descrito como sendo importante para a propriedade inibitória na cruzaina, porém análogos sem o flúor também apresentaram propriedades inibitórias na cruzaina.⁹⁵

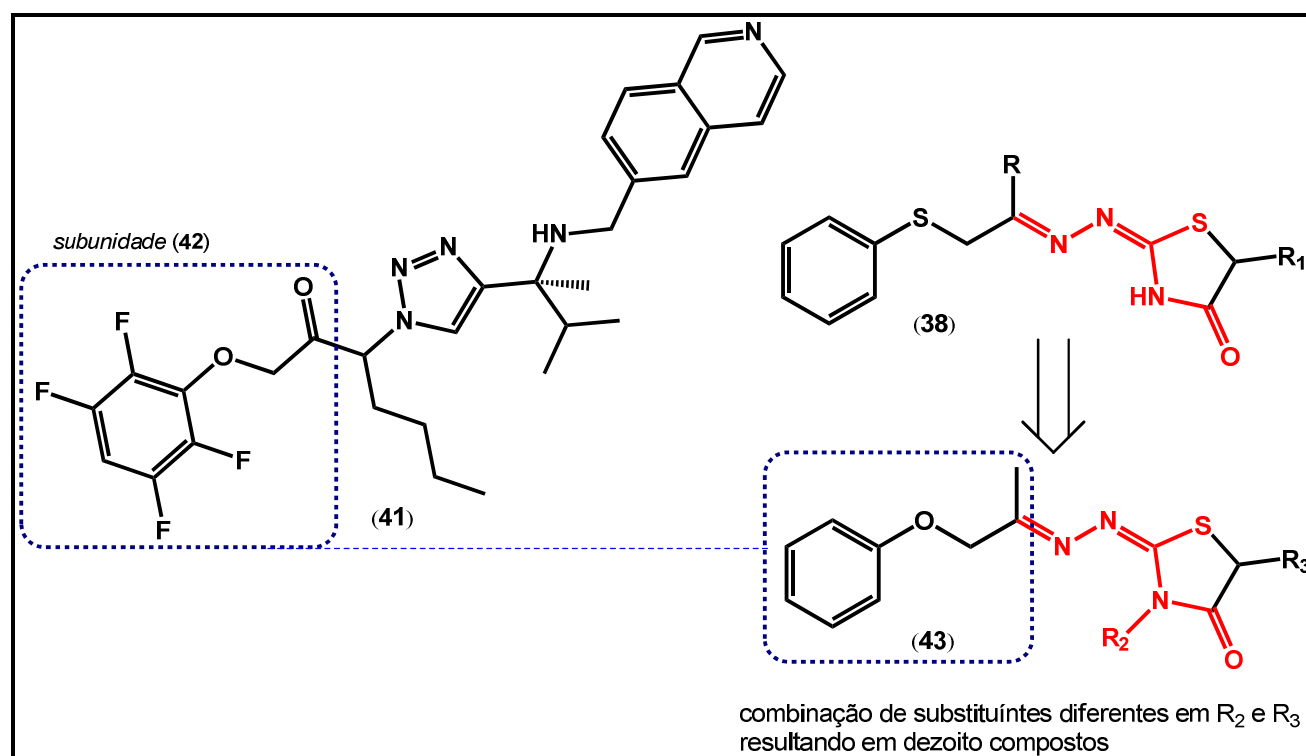


Figura 16: Planejamento estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43**), utilizando as principais características estruturais identificadas nos compostos (**38**) e (**41**).

Em virtude das propriedades tripanocidas do composto (**41**), nós decidimos substituir o grupo tiofenóxi pelo grupo fenóxi durante o planejamento estrutural de uma nova geração de 2-iminotiazolidina-4-onas (**43**) (**figura 16**). Ademais, escolheu-se realizar modificações estruturais e inserir substituintes em posições que não foram explorados anteriormente em nosso grupo de pesquisas. Por exemplo, a inserção de substituintes na posição N3 foi realizada de maneira racional, tendo como objetivo investigar a importância do NH (função aceptor/doador de ligação de hidrogênio).

Os compostos (**39**) e (**40**) possuem uma metila na posição C5. Análogos destes compostos desprovidos da metila em C5 foram menos potentes.⁹¹ Tendo em mente estes resultados, nós priorizamos a inserção de substituintes alifáticos e aromáticos na posição C5 da série (**43**). Na tentativa de investigar a importância da carbonila do anel tiazolidínico para a propriedade tripanocida, utilizamos a estratégia do bioisosterismo. Sendo assim, em alguns compostos da série (**43**), a carbonila foi substituída pela tiocarbonila.

Por fim, nós almejamos substituir o heterociclo tiazolidínico por outro heterociclo estruturalmente equivalente (bioisostérico). Por razões experimentais, nós elegemos o anel 1,3-tiazol, culminando assim com a construção estrutural dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44**) (figura 17).

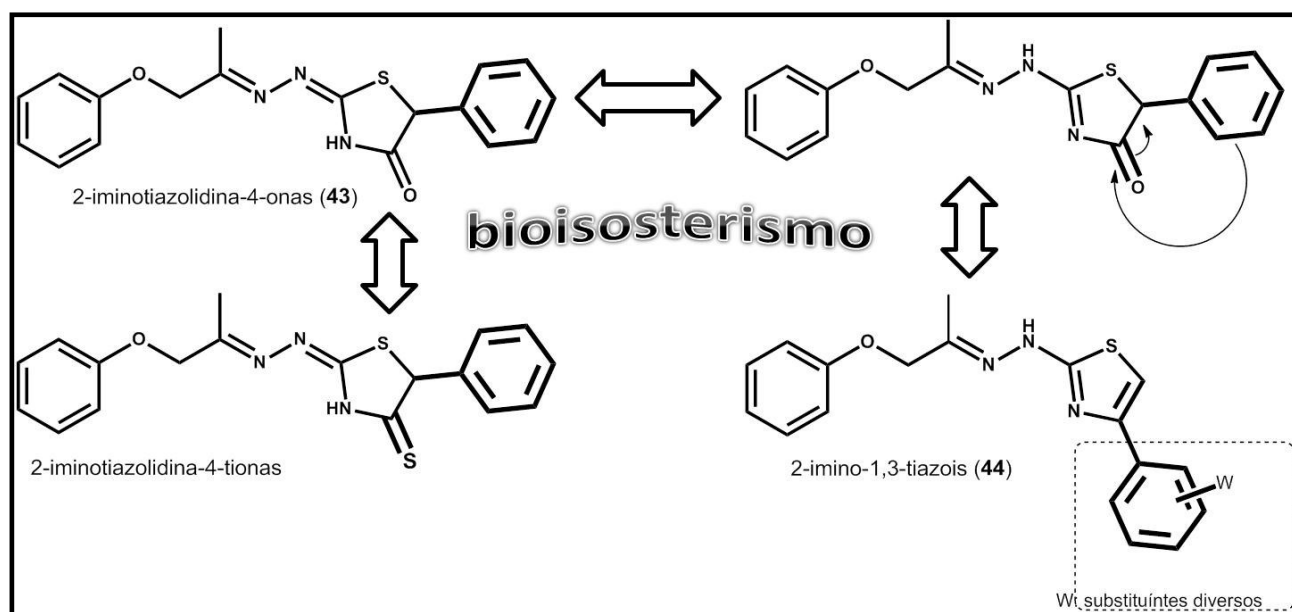


Figura 17: Emprego do bioisosterismo para o planejamento dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44**).

A construção estrutural da série de 2-imino-1,3-tiazóis (**44**) também levou em conta a possível relação bioisostérica entre os heterociclos 2-iminotiazolidina-4-onas (**43**) *versus* 2-imino-1,3-tiazóis (**44**). Ambos os heterociclos são capazes de interagir por ligações de hidrogênio com os receptores envolvidos na atividade tripanocida. Porém, com propriedades físico-químicas (estereoelétrônicas, lipofilia) distintas.

O planejamento da série (**44**) possibilitaria estudar o efeito eletrônico de substituintes localizados na posição C4 do anel tiazólico. Partindo da fenila como anel aromático de referência, diversos substituintes no anel fenílico foram inseridos (mono- e bi-substituições nas posições *orto*, *meta* e *para*), além de anéis heterocíclicos aromáticos, tais como piridina (2-, 3- e 4-), 2-furanil e 2-tiofenil.

Uma vez que o planejamento estrutural foi realizado, seguimos em direção a síntese dos compostos almejados. A **figura 18** apresenta a sequência das reações envolvidas na síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) e 2-iminotiazóis (**44a–t**).

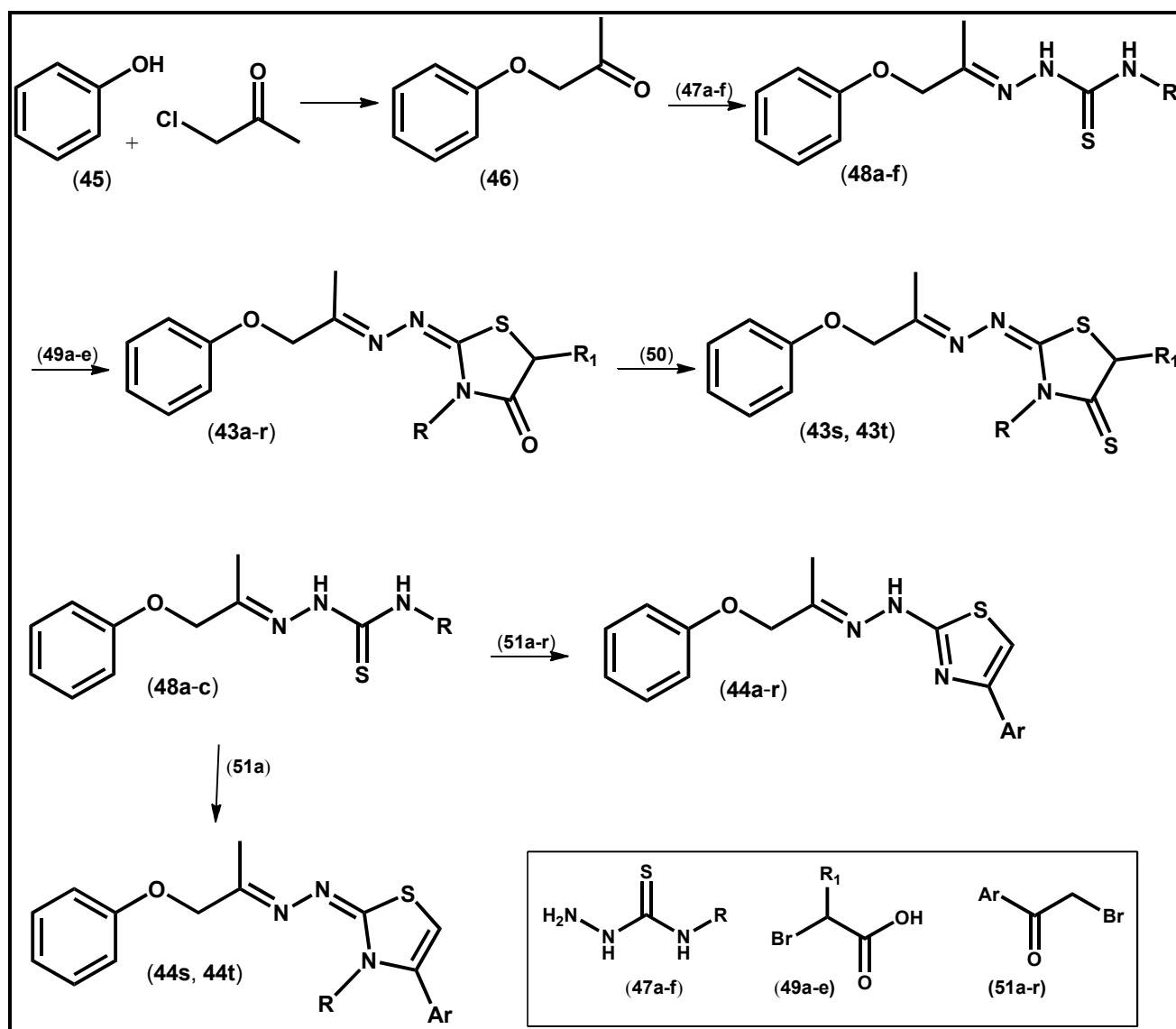
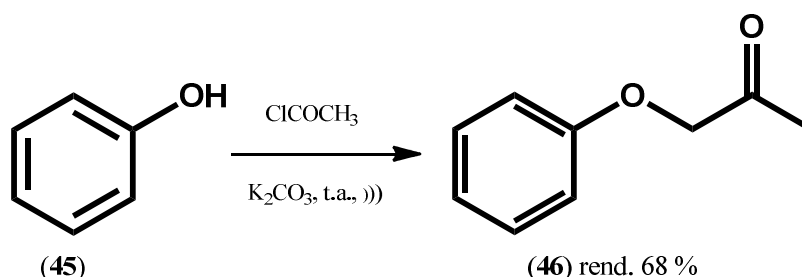


Figura 18: Rota sintética para obtenção das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) e 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**).

4.2 Síntese dos compostos

4.2.1 Síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–r) e 2-iminotiazolidina-4-tionas (43s, 43t)

A síntese da série (43a–t) é divergente e tem como ponto de partida a síntese da fenóxi-2-propanona (46). O composto (46) é disponível comercialmente, porém devido a necessidade de usar uma quantidade grande deste composto, foi necessário sintetizá-lo. A fenóxi-2-propanona (46) foi preparada a partir da O-alkilação do fénol (45) com a 2-cloroacetona a temperatura ambiente em um banho de ultrassom.⁹⁶ O produto obtido (46) foi utilizado nas etapas posteriores sem prévia purificação, pois o rendimento foi quantitativo e apresentou pureza satisfatória (esquema 1).



Esquema 1.

Para a síntese das tiossemicarbazonas (48a–f), foi necessário primeiramente preparar três tiossemicarbazidas com substituintes na posição N4 (47d–f), enquanto que as demais tiossemicarbazidas substituídas (47a–c) foram adquiridas de fontes comerciais (figura 19).

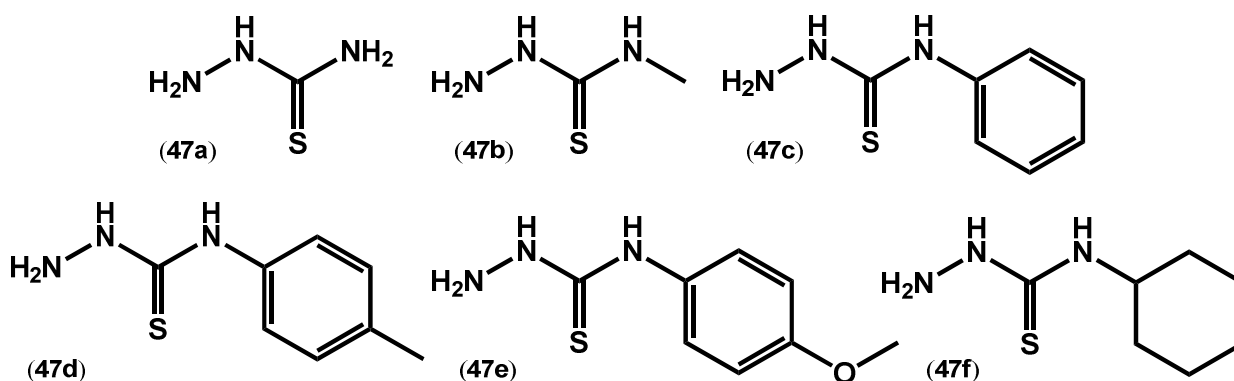
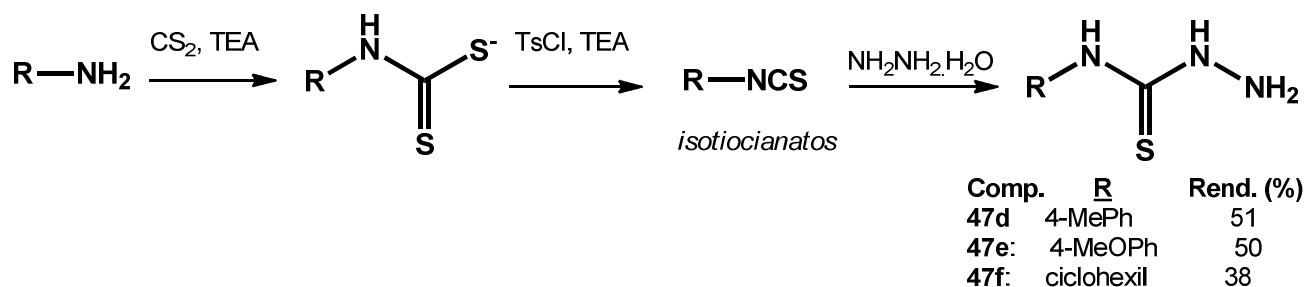


Figura 19: Tiossemicarbazidas (47a–f).

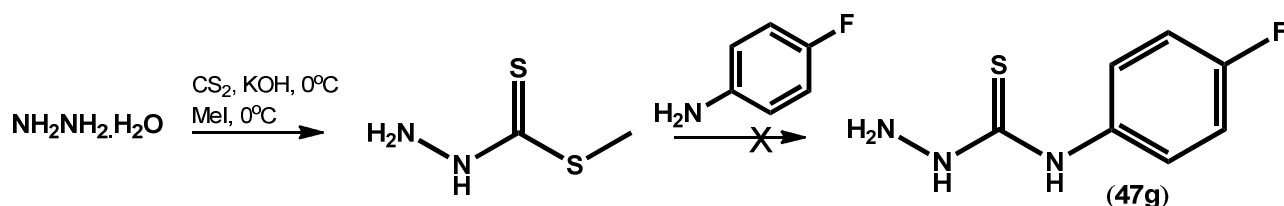
As tiossemicarbazidas (47d–f) foram preparadas através da metodologia "one-pot two-steps" descrita por Wong e Dolman⁹⁷ que se baseia na preparação de isotiocianatos seguida pela adição do hidrato de hidrazina (55 % v/v) (esquema 2). Porém, esta

metodologia não funcionou bem para a preparação de tiossemicarbazidas substituídas na posição N4 com 4-flúorfenil, 4-clorofenil e demais substituintes retiradores de elétrons.



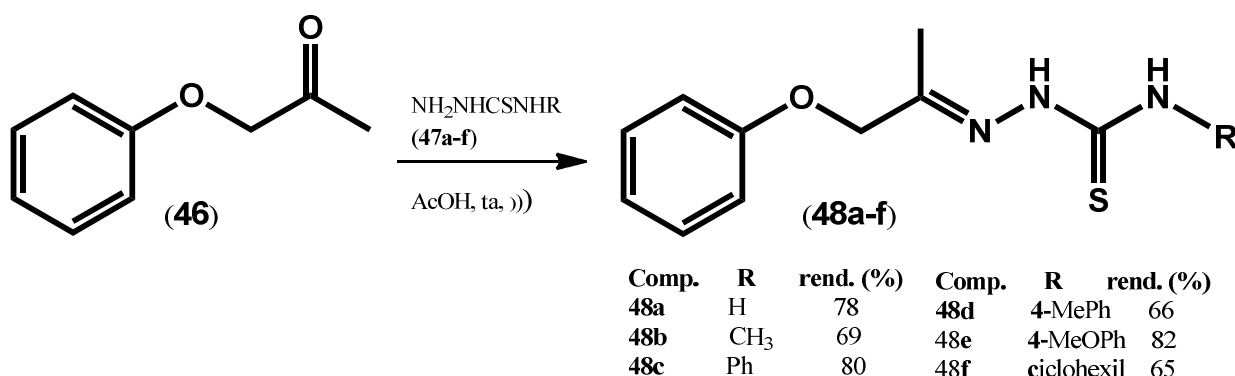
Esquema 2.

Diante desta limitação, decidimos utilizar outra metodologia "one-pot two-steps" descrita por Scovill e col.⁹⁸, que se baseia na preparação do metilhidrazino ditiocarbamato que em seguida poderia ser convertido na tiossemicarbazida (**47g**) (esquema 3). Embora com tentativas diversas, o rendimento do composto (**47g**) foi muito abaixo daquele descrito na literatura (rend. obtido 10 %; rend. lit.⁹⁶ 65 %). Por isso, não foi possível prosseguir na síntese de demais tiossemicarbazidas substituídas na posição N4.



Esquema 3.

A fenóxi-2-propanona (**46**) foi em seguida submetida a condensação com as respectivas tiossemicarbazidas (**47a-f**) para obter as tiossemicarbazonas (**48a-f**).



Esquema 4.

Conforme descrito no **esquema 4**, as reações para as tiossemicarbazonas (**48a-f**) foram realizadas na presença de ácido acético (AcOH), a temperatura ambiente, em um

banho de ultrassom.⁹⁹ Nestas condições, foi possível sintetizar seis tiossemicarbazonas (**48a–f**) com rendimentos satisfatórios (65–82 %) e tempo reacional de 30 minutos.

As tiossemicarbazonas (**48a–f**) foram caracterizadas por técnicas espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV) e por EMAR. Nos espectros de IV, a ausência de absorção na região de estiramento axial de carbonilas ($1790\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) foi um indício importante da formação da ligação $\text{C}=\text{N}$. A adição de D_2O após a aquisição do RMN de ^1H permitiu localizar os prótons de NH_2 e NH .

Nos espectros de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas (**48a–f**), nós observamos sinais duplicados dos hidrogênios referentes ao metileno e metila. Os espectros de RMN de ^{13}C dos compostos (**48a**) e (**48c**) também apresentou o mesmo tipo de duplicidade nos sinais referentes aos carbonos do metileno e metila. A duplicação destes sinais poderia ser devido a presença de rotâmeros ou diastereoisômeros nas amostras. Estes sinais duplicados possuem integração relativa distinta. Por exemplo, os dois sinais relativos aos hidrogênios do metileno no composto (**48a**) apresentam um proporção de aproximadamente 9.5 / 0.5. Além disso, a diferença de deslocamento químico entre estes sinais é em torno de 0.2 ppm; no caso de rotâmeros, geralmente se observa dois sinais quase que sobrepostos. Estas observações são sugestivas da formação de uma mistura de diastereoisômeros (*Z*) e (*E*).

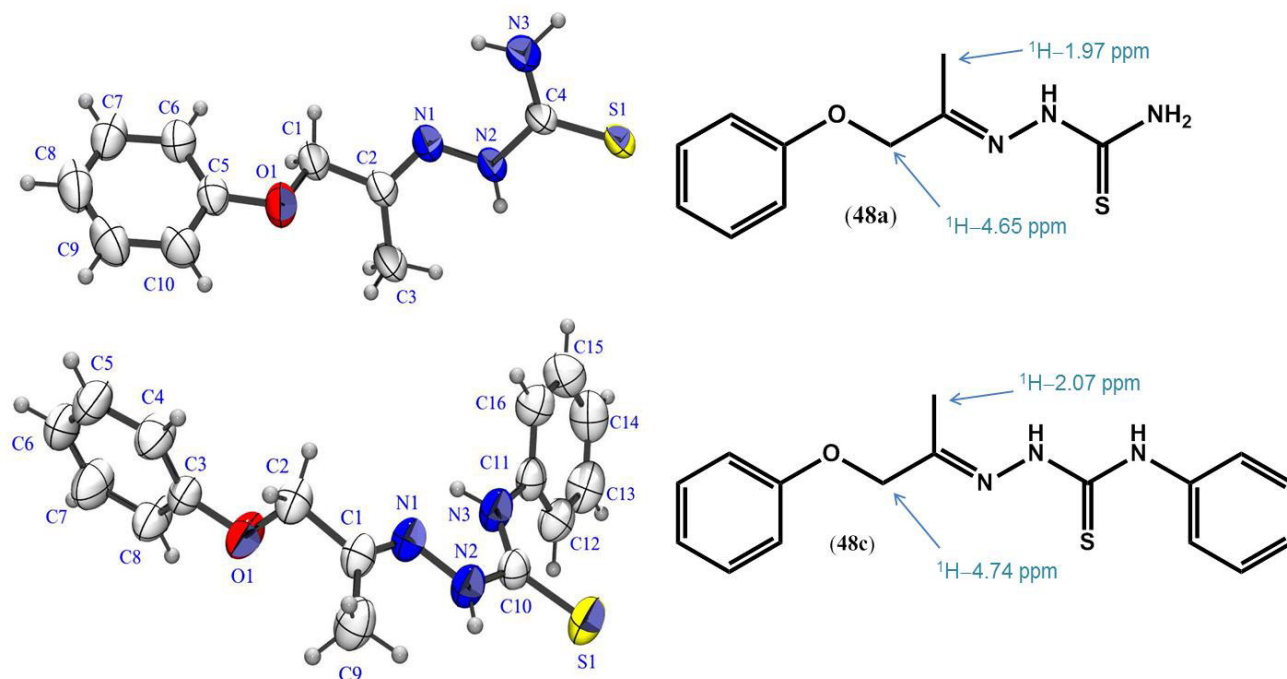
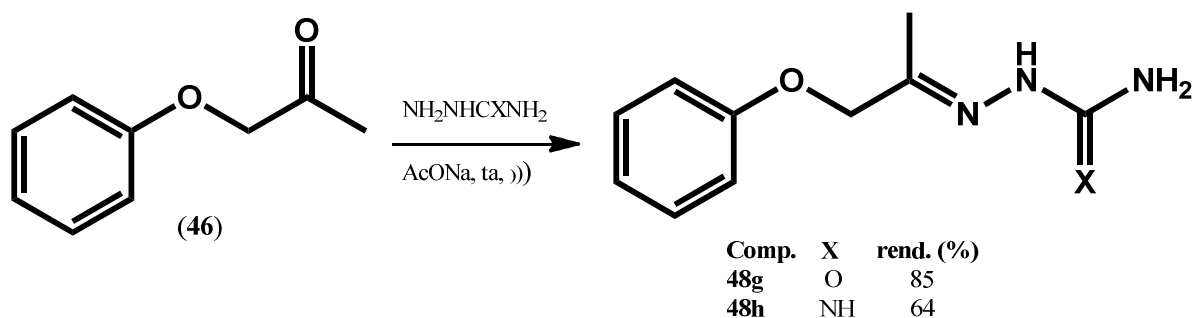


Figura 20: Representação elipsóide (ORTEP-3), com átomos numerados e elipsóides de vibração térmica com 50% de probabilidade, para as tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**).

As tiossemicarbazonas (**48a–f**) são sólidos cristalinos, o que nos permitiu obter cristais apropriados para a difração de raios-X.

A difração de raios-X foi realizada para as tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**) (figura 20). Ao analisar a sequência C(1)–C(2)–N(1)–N(2) ou C(3)–C(2)–N(1)–N(2), pode-se observar a configuração (*E*) em relação a ligação C=N. O átomo de enxofre se orienta numa posição *trans* em relação ao nitrogênio azometínico N(1). Este confôrmero é de fato observado em estruturas cristalográficas de tiossemicarbazonas na ausência de agentes quelantes, tais como metais de transição.^{100,101}

Com o intuito de comparar as propriedades tripanocidas, nós preparamos o derivado semicarbazônico (**48g**) e guanilhidrazônico (**48h**), análogos estruturais da tiossemicarbazona (**48a**) (esquema 5). Estes compostos foram preparados de maneira semelhante aos das tiossemicarbazonas da série (**48a–f**), porém com o uso de acetato de sódio ao invés do ácido acético, pois os reagentes para preparação dos compostos (**48g**) e (**48h**) estavam na forma de sais (cloridrato e bicarbonato, respectivamente).



Esquema 5.

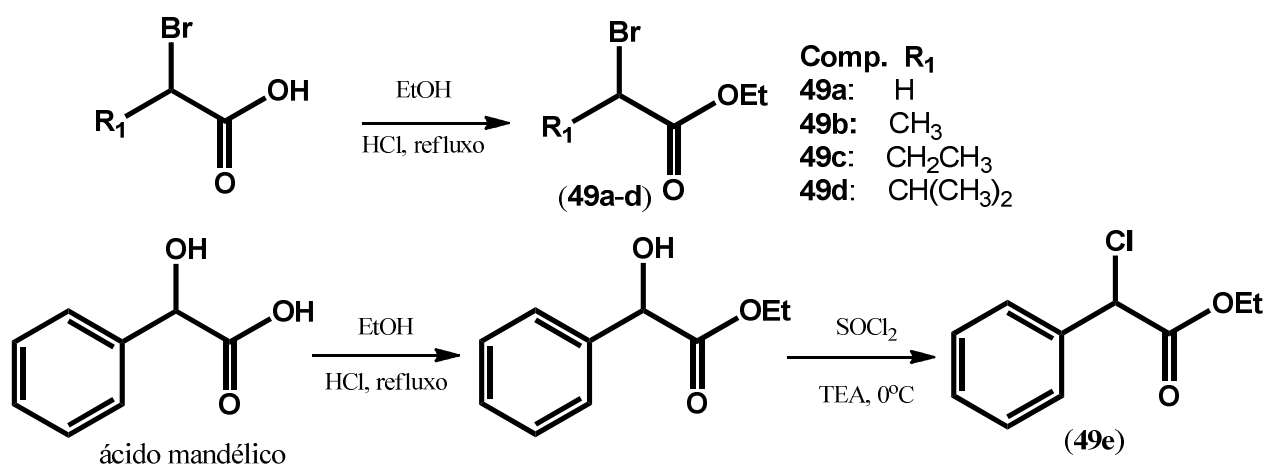
Para a nossa surpresa, a análise espectroscópica dos compostos (**48g**) e (**48h**) revelou a presença de somente um diastereoisômero, que atribuímos a configuração (*E*) relativa a ligação C=N.

Em virtude destes resultados, nós decidimos verificar se a síntese da tiossemicarbazona (**48a**) sem ácido acético levaria a formação de um único isômero. Entretanto, a análise por CCD indicou novamente a presença dos dois isômeros, que foi mais tarde confirmada pela RMN de ¹H.

Como não foi possível preparar os compostos (**48a–f**) diastereoisomericamente puros, estes foram utilizados na próxima etapa sintética sem prévia separação dos isômeros. Sendo assim, a integração relativa dos dois singletos referentes aos hidrogênios metilênicos foi utilizada para determinar a proporção percentual de cada isômero nas tiossemicarbazonas (**48a–f**). Esta determinação foi também confirmada pela cromatografia

líquida de alta eficiência. Em geral, a proporção relativa foi em torno de 95 / 5 % para os isômeros (*E*) e (*Z*), respectivamente.

Antes de prosseguir com a preparação das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**), foi necessário preparar os acetatos α -halogenados (**49a–e**). Os compostos (**49a–d**) foram obtidos a partir da esterificação dos ácidos α -haloacéticos disponíveis comercialmente. Os compostos (**49a–d**) foram utilizados na etapa posterior sem prévia purificação (**esquema 6**). Já o composto (**49e**) foi preparado em duas etapas partindo do ácido mandélico (racêmico), com rendimento de 61 %.¹⁰⁴



Esquema 5.

As 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) foram então sintetizadas através da reação entre a respectiva tiossemicarbazona (**48a–f**) com os respectivos acetatos α -halogenados (**49a–e**). Estas reações foram realizadas em etanol absoluto, em excesso de acetato de sódio anidro, a temperatura de refluxo e agitação magnética vigorosa. As reações foram acompanhadas por CCD que mostraram o consumo dos materiais de partida (tiossemicarbazonas) após 18–24 horas de reação (**tabela 1**).

Após cristalização em etanol ou tolueno, os compostos (**43a–r**) foram isolados como sólidos cristalinos e rendimentos que variaram de 38 a 84 %. Os substituintes e propriedades físicas das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) estão listadas na **Tabela 1**.

Tal como as tiossemicarbazonas (**48a–f**), as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) foram caracterizadas por técnicas espectrométricas (RMN de ¹H e ¹³C, IV) e por EMAR. A pureza foi confirmada pela análise elementar de C, N, H e S.

Tabela 1: Síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-r**) e descrição dos substituintes, rendimentos e propriedades físicas.

Reaction scheme showing the synthesis of 2-iminotiazolidina-4-onas (43a-r) from (48a-f) and (49a-e) using AcOK under reflux. The structures show the general framework with substituents R_1 and R.				
Estrutura	R_1	código	p.f. (°C)	rend. (%)
	H	43a	130-131	53
	CH ₃	43b	117-120	38
	CH ₂ CH ₃	43c	133	51
	CH(CH ₃) ₂	43d	139	38
	C ₆ H ₅	43e	150	41
	H	43f	112	54
	CH ₃	43g	67	60
	CH ₂ CH ₃	43h	129	72
	CH(CH ₃) ₂	43i	138	70
	C ₆ H ₅	43j	157	76
	H	43k	139	50
	CH ₃	43l	138	84
	CH ₂ CH ₃	43m	118	70
	CH(CH ₃) ₂	43n	128-130	78
	C ₆ H ₅	43o	159-161	74
	CH ₂ CH ₃	43p	140	68
	CH ₂ CH ₃	43q	162	68
	CH ₂ CH ₃	43r	139-140	71

Uma característica espectroscópica dos compostos (**43a–r**) é a presença de absorções na região de estiramento axial de carbonilas nos espectros de IV, confirmando assim a formação do anel tiazolidínico. O sinal referente ao carbono da carbonila foi também localizado na RMN de ^{13}C e DEPT (**figura 21**).

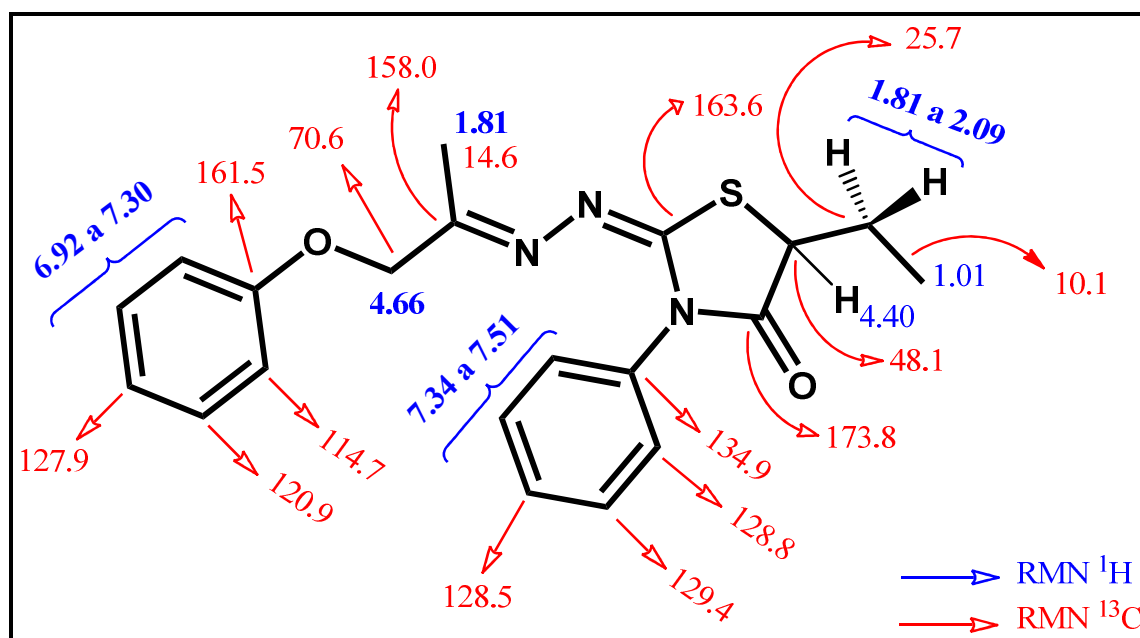


Figura 21: Dados espectroscópicos da 2-iminotiazolidina-4-ona (**43m**). Deslocamento químico em ppm.

Os compostos (**43c**, **43h**, **43m** e **43p–r**) possuem um substituinte etila localizado na posição C5 no heterociclo. Os prótons metilênicos deste substituinte estão adjacentes ao carbono assimétrico. Na RMN de ^1H , a multiplicidade destes prótons diastereotópicos se apresentou na forma de dois multipletos bem resolvidos e com integração relativa para dois prótons. Para confirmar esta atribuição, o espectro de HSQC do composto (**43c**) foi obtido. Com o uso desta técnica, foi possível observar que o carbono metilênico (δ 25.4 ppm) correlaciona com dois multipletos (δ 1.73–1.81 e 1.92–1.98 ppm), previamente atribuídos aos prótons metilênicos.

Outra característica estrutural importante é a posição da ligação dupla envolvendo o carbono C2. Dependendo do tautomerismo imino-lactama, a ligação dupla do carbono C2 presente nos compostos (**43a–e**) pode ser endocíclica ou exocíclica em relação ao heterociclo (**figura 22**).

Na RMN de ^1H dos compostos (**43a–e**), o deslocamento químico do N–H varia entre 11.86–11.94 ppm (em DMSO- d_6). Já nas tiossemicarbazonas (**48a–f**), o deslocamento químico de prótons hidrazínicos varia entre 10.17–10.70 ppm e na semicarbazona (**48g**), este próton tem deslocamento de 9.26 ppm. Já os dados da literatura para prótons

amídicos de lactamas, 2-iminotiazolidina-4-onas e tiazolidina-2,4-dionas mostram o deslocamento químico na faixa entre 11.4–12.1 ppm.^{105,106} Diante destes relatos, nós podemos sugerir que o sinal de N–H nos compostos (**43a–e**) não é característico de prótons hidrazínicos, mas sim característico de prótons amídicos típico de lactamas (**43a**, forma I).

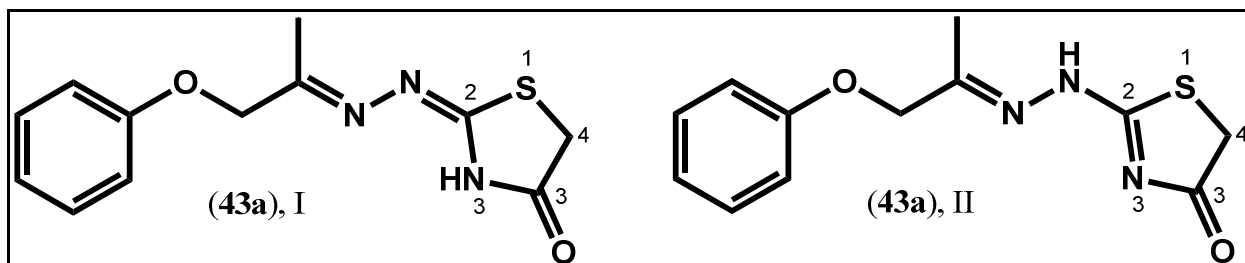


Figura 22: Posição da ligação C=N no carbono C2 do composto (**43a**).

Para uma atribuição inequívoca desta ligação, nós tentamos obter cristais dos compostos (**43a–e**) apropriados para a difração de raios-X, porém nós não logramos sucesso. Contudo, nós podemos fazer uma comparação com dados cristalográficos que foram obtidos recentemente pelo nosso grupo de pesquisas. O composto (**52**) é uma 2-iminotiazolidina-4-ona sintetizada previamente pelo nosso grupo de pesquisas e também um análogo estrutural da série (**43a–r**).¹⁰⁷

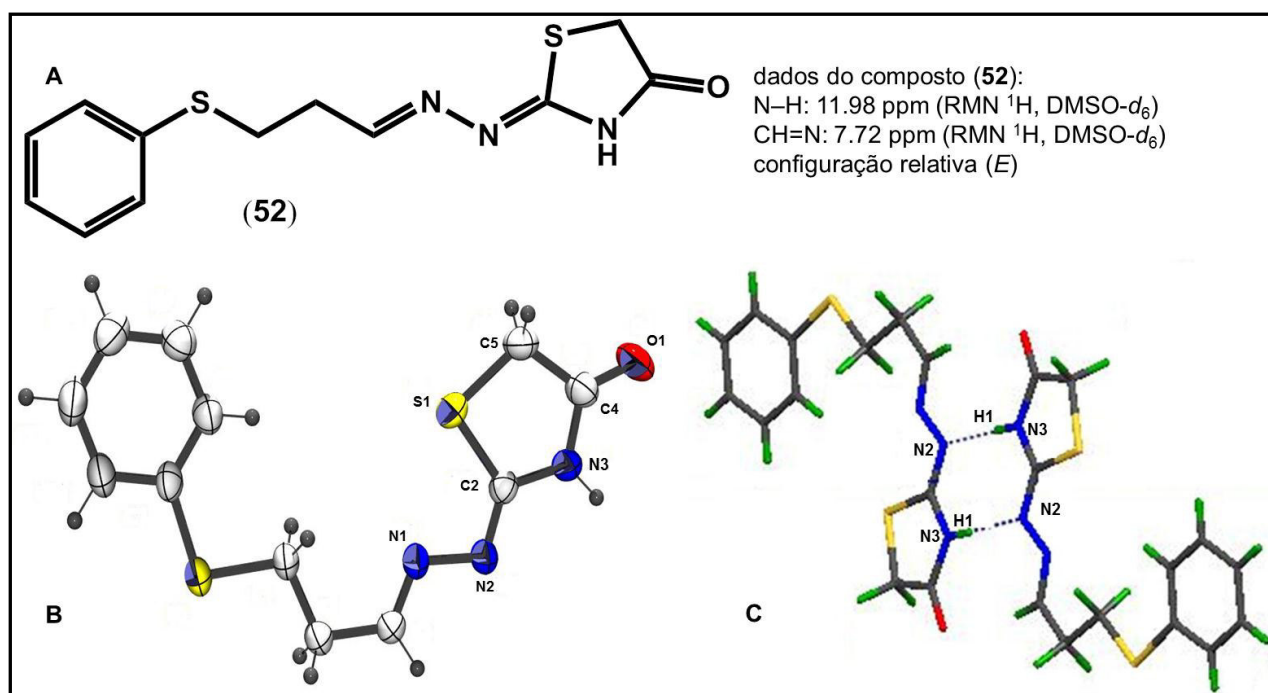
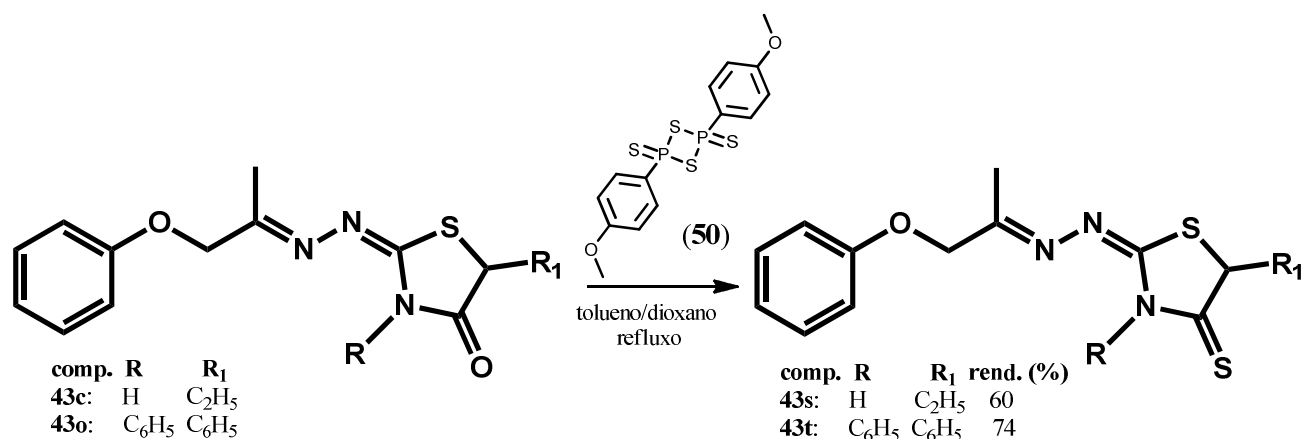


Figura 23: Dados estruturais (A); representação elipsoide (B) e empacotamento cristalino (C) da 2-iminotiazolidina-4-ona (**52**). Linhas pontilhadas são ligações de hidrogênio.

A inspeção da cristalografia de raios-X do composto (**52**) nos permitiu inferir sobre a posição da ligação dupla no carbono C2. Na célula unitária do composto (**52**), o hidrogênio se localiza na posição N3; portanto a ligação dupla é exocíclica em relação ao carbono C2. Esta atribuição é visualizada mais claramente ao se analisar as ligações de hidrogênio ao longo do empacotamento cristalino (**Figura 23**).¹⁰⁸ Portanto, é coerente sugerir que nas 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–e**), a posição da ligação C=N também é exocíclica.

Com o intuito de comparar as propriedades farmacológicas entre os bioisostéros clássicos do tipo 2-iminotiazolidina-4-onas e 2-iminotiazolidina-4-tionas, os compostos (**43c**) e (**43o**) foram convertidos em derivados tionilados usando o reagente de Lawesson (**50**).¹⁰⁹ Os compostos (**43c**) e (**43o**) foram solubilizados em uma mistura de 1,4-dioxano/tolueno, e após aquecimento brando, o reagente de Lawesson (**50**) foi adicionado na mistura reacional. As reações foram acompanhadas por CCD e mostraram o consumo dos materiais de partida (2-iminotiazolidina-4-onas) após 24 horas de reação (**esquema 6**).



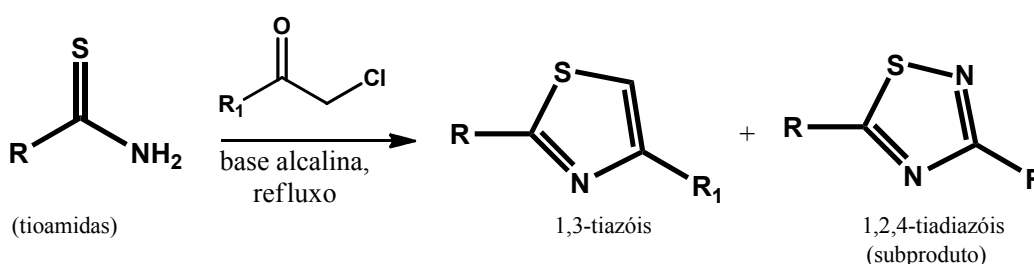
Esquema 6.

Após purificação em coluna cromatográfica e cristalização em etanol, os compostos (**43s**) e (**43t**) foram isolados como sólidos cristalinos amarelos. A caracterização espectroscópica destes compostos foi realizada da mesma maneira que nos compostos (**43a–r**).

4.2.2 Síntese dos 2-imino-1,3-tiazóis (44a–t)

Diferentemente da química de 2-iminotiazolidina-4-onas, na qual nosso grupo de pesquisas possui experiência prévia, para a síntese dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) nós tivemos a necessidade de identificar as melhores condições reacionais antes de conduzir a síntese da série inteira.

Para a preparação de compostos 1,3-tiazólicos, o método sintético mais utilizado é o de Hantzsch (**Esquema 7**). Esta rota fornece rendimentos satisfatórios, é de fácil execução, além de ser compatível com diversos substratos.¹¹⁰



Esquema 7.

Em relação as condições reacionais para a síntese de 1,3-tiazóis, uma consulta na literatura revelou um trabalho descrito por Filetici e col.¹¹¹ para a síntese de 2-imino-1,3-tiazóis. Neste trabalho, as condições reacionais foram brandas, sem a adição de base, a temperatura ambiente e usando 2-propanol como solvente. Com estas condições, Filetici e col. observaram rendimentos entre 59–99 % e tempo reacional de 120 minutos. Nesta mesma época, foi descrito outro procedimento para a síntese de 2-aril-1,3-tiazóis na presença de líquidos iônicos como aditivo e usando um banho de ultrassom (25 kHz). Nestas condições, Li e col.¹¹² observam rendimentos de 88–98% e tempos reacionais entre 2–10 minutos.

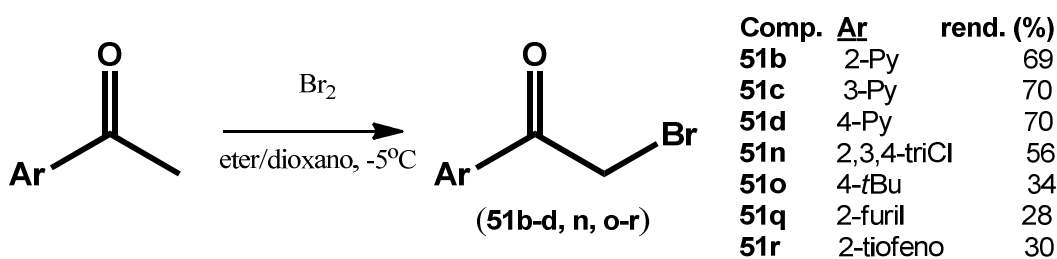
Nós então decidimos testar se a síntese dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) a temperatura ambiente e sem a adição de base levaria a rendimentos satisfatórios. Usando 2-propanol como solvente, o tiazol (**44a**) foi obtido com rendimento desejável (76%) após quatro horas de agitação magnética. Quando a síntese do tiazol (**44a**) foi conduzida em um banho de ultrassom (40 MHz por 30 minutos) ao invés de agitação magnética, um rendimento similar (73 %) foi obtido.

Após observar que o tempo reacional foi menor sob a irradiação no banho de ultrassom do que na agitação magnética, decidimos variar o solvente (metanol, etanol ou 2-propanol).

Em 2-propanol, nós observamos uma mistura reacional aparentemente homogênea após cerca de 2 minutos de sonicação. Ao longo da reação, o produto reacional precipita, sendo necessário apenas uma filtração para coletar o produto ao final da reação. Ou seja, o uso de 2-propanol permitir que o produto precipite ao longo da reação, deslocando assim o equilíbrio reacional em direção à formação dos produtos. Quando etanol ou metanol foram utilizados ao invés do propanol, o produto não precipitou ao longo da reação, sendo necessário evaporar o solvente e efetuar uma extração para isolar o tiazol (**44a**). Como consequência, os rendimentos reacionais foram ligeiramente menores (68% em etanol e 61% em metanol).

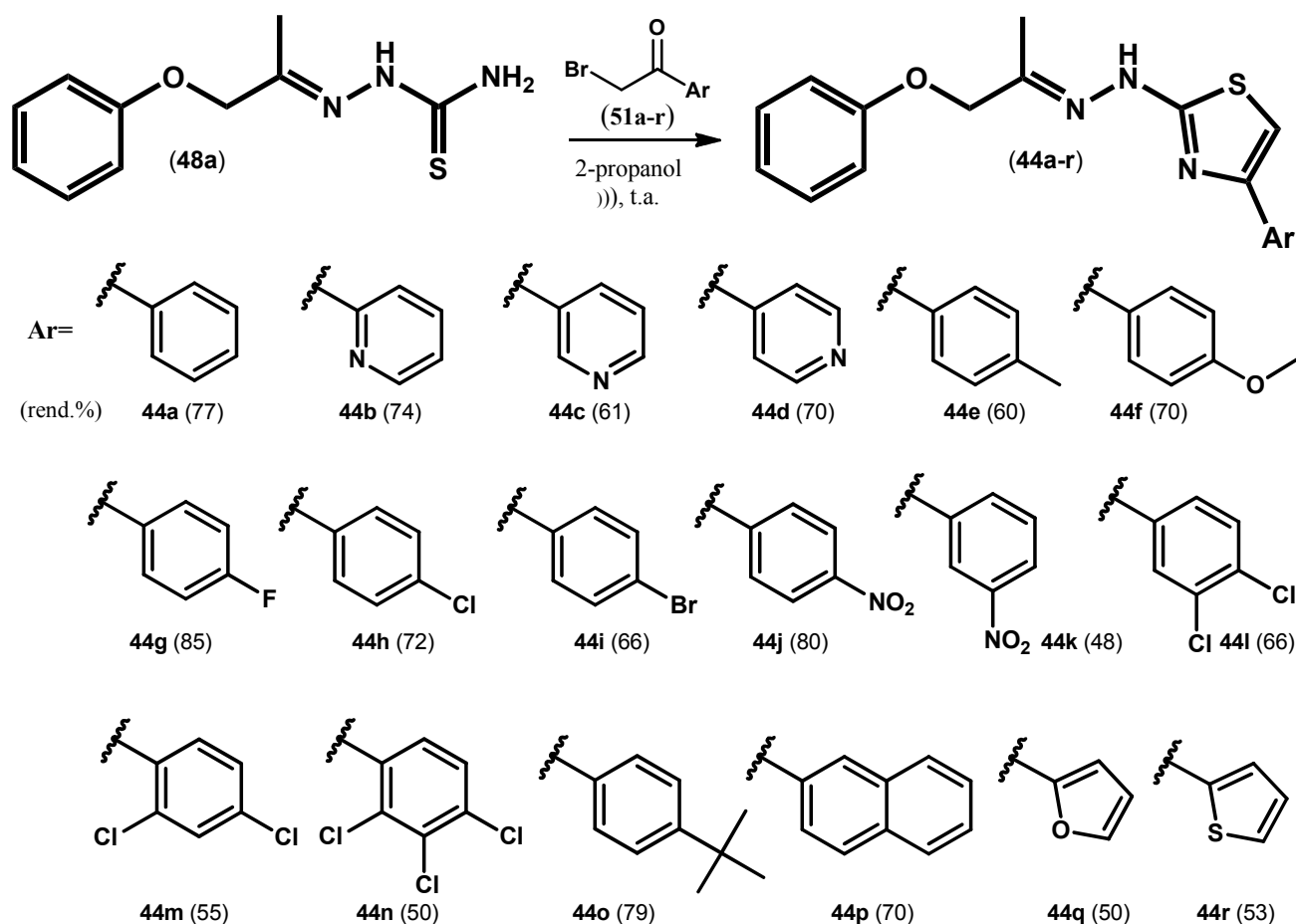
Uma vez que nós identificamos as condições reacionais apropriadas para a síntese dos tiazóis, nós prosseguimos para a obtenção das 2-bromoacetofenonas (**51a–r**). As 2-bromoacetofenonas (**51b–d**, **51n**, **51o**, **51q** e **51r**) foram preparadas aqui através da bromação da respectiva acetofenona com bromo molecular, usando uma mistura de éter dietílico e dioxano (1/1, v/v) como solvente, em agitação magnética a -5 °C (**esquema 8**).¹¹³

Uma limitação que nós enfrentamos foi o rendimento baixo na bromação de acetofenonas com substituintes metóxi ou nitro na posição *orto*, o que impossibilitou a preparação de 2-imino-1,3-tiazóis com substituintes na posição *orto*. As demais 2-bromoacetofenonas da série (**56a–r**) foram adquiridas de fontes comerciais.



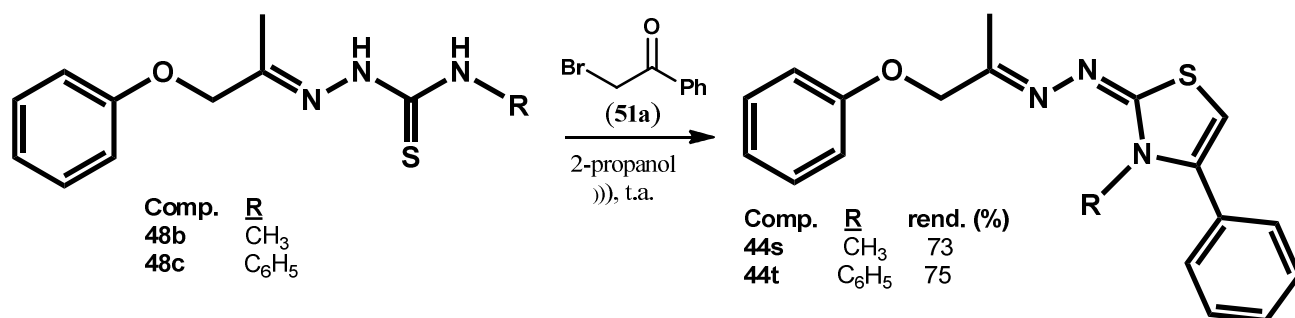
Esquema 8.

Em mãos das 2-bromoacetofenonas (**51a–r**), a série de 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–r**) foi preparada em banho de ultrassom, usando propanol como solvente e sem aquecimento externo. As reações foram mantidas durante 30 minutos e os compostos (**44a–r**) foram isolados como sólidos cristais com rendimentos entre 48–85 % (**esquema 9**).



Esquema 9.

Para investigar o efeito de substituintes inseridos na posição N2 para a atividade farmacológica, nós preparamos os 2-imino-1,3-tiazóis (**44s**) e (**44t**) (**esquema 10**). Estes dois compostos foram preparados da mesma maneira que os compostos (**44a-r**), porém com um tempo reacional de 60 minutos.



Esquema 10.

As estruturas dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a-t**) foram confirmadas por IV, RMN (¹H, ¹³C e DEPT quando necessário) e EMAR. A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos (**44a-t**) permitiu evidenciar os sinais referentes ao metino localizado na posição C5 no anel heterocíclico, diagnóstico para esta classe de compostos. Na RMN de ¹³C, o

carbono referente a este metino é de fácil localização, tendo $\delta = 102.8$ ppm. Nos espectros de IV, a presença de banda referentes as ligações imínicas, bem como a ausência de absorção na região de carbonilas, que também são sugestivos da formação dos compostos (**44a–t**).

Nos espectros de RMN de ^1H dos compostos (**44a–r**), o deslocamento químico dos prótons do N–H variam entre 10.53–11.25 ppm. Esta faixa de deslocamento químico é similar com o observado para as tiossemicarbazonas (**48a–f**) (figura 24). É evidente que este tipo de comparação deve ser utilizado com cautela, pois o deslocamento químico de prótons lábeis variam com a temperatura, concentração e o solvente usado. Todavia, nos parece coerente sugerir que o N–H nos compostos (**44a–r**) é hidrazínico.

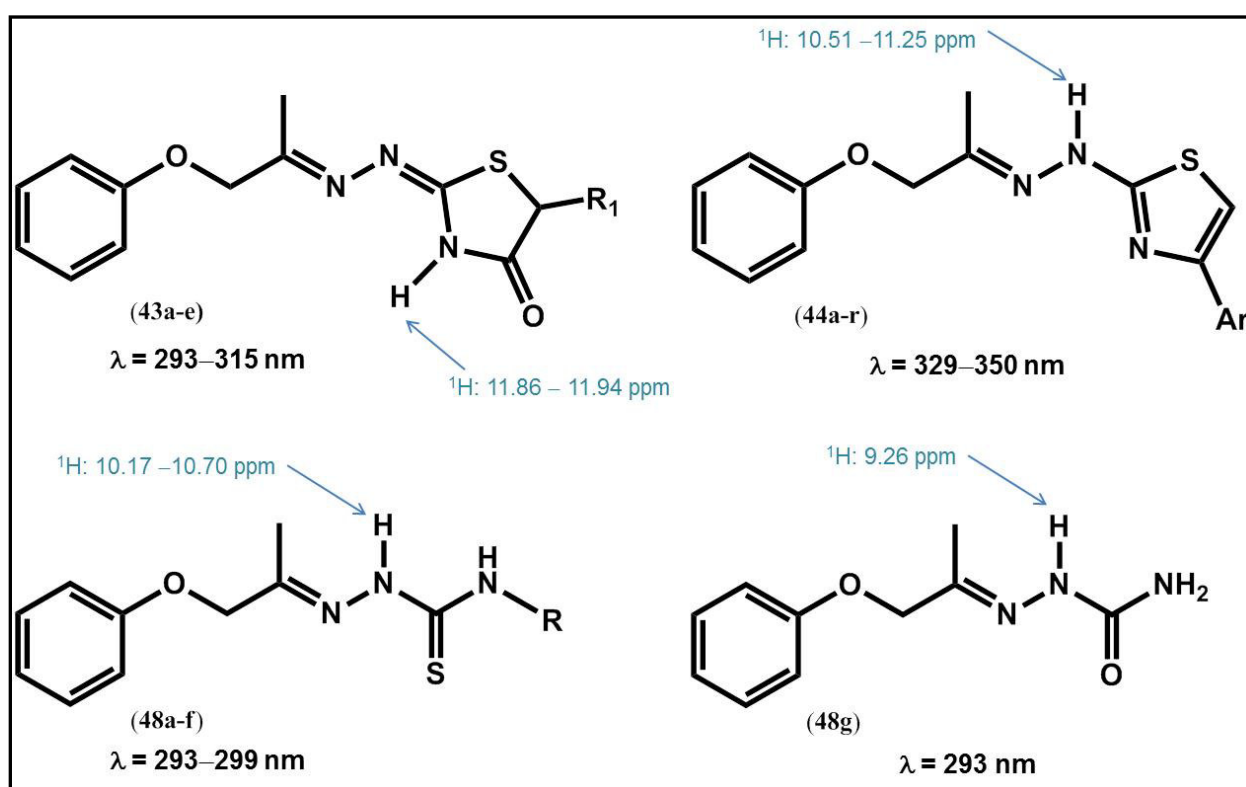


Figura 24. Deslocamento químico referente ao próton no nitrogênio N2. Valores para espectros adquiridos em DMSO- d_6 . Valores do comprimento de ondas dos máximos de emissão ($\lambda_{\text{máx.}}$) em metanol.

Outra evidência sobre a localização do N–H pode ser inferida pelas características físicas dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–r**). Os compostos (**44a–r**) são sólidos cristalinos com coloração intensa e absorção na região da luz visível característica de heterociclos aromáticos. Já as tiossemicarbazonas (**48a–f**) e as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) são sólidos cristalinos, na sua grande maioria, incolores e com baixa absorção na região da luz visível. A **figura 25** apresenta, de maneira ilustrativa, os dados espectroscópicos do 2-imino-1,3-tiazol (**44i**).

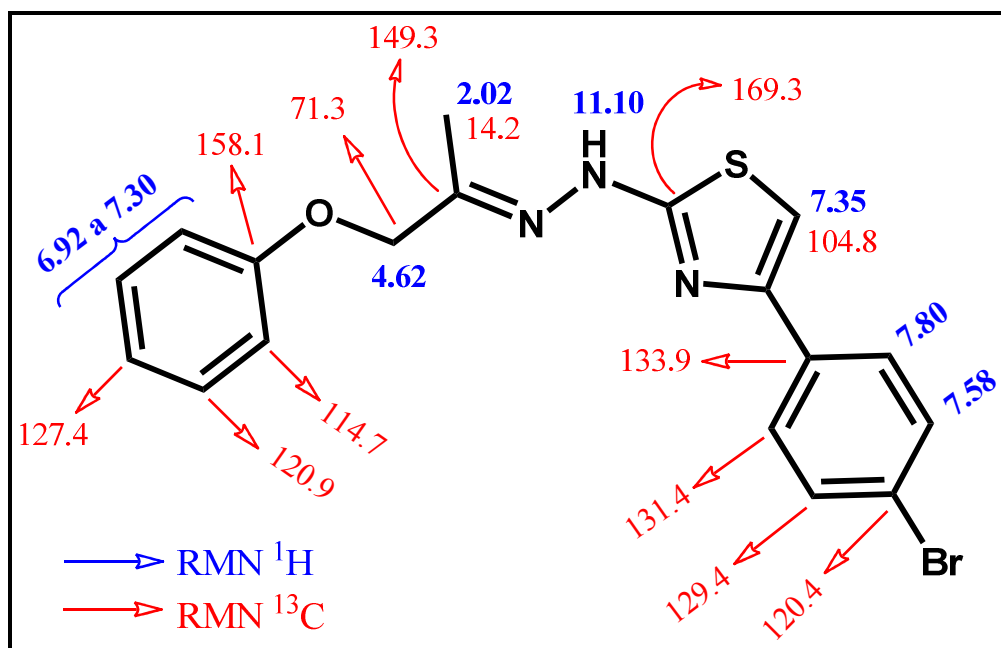


Figura 25: Dados espectroscópicos do 2-imino-1,3-tiazol (44i). Deslocamento químico em ppm.

4.3 Avaliação farmacológica

A **figura 26** ilustra o planejamento utilizado para a avaliação farmacológica das propriedades tripanocidas, bem como os critérios utilizados durante a triagem dos compostos.

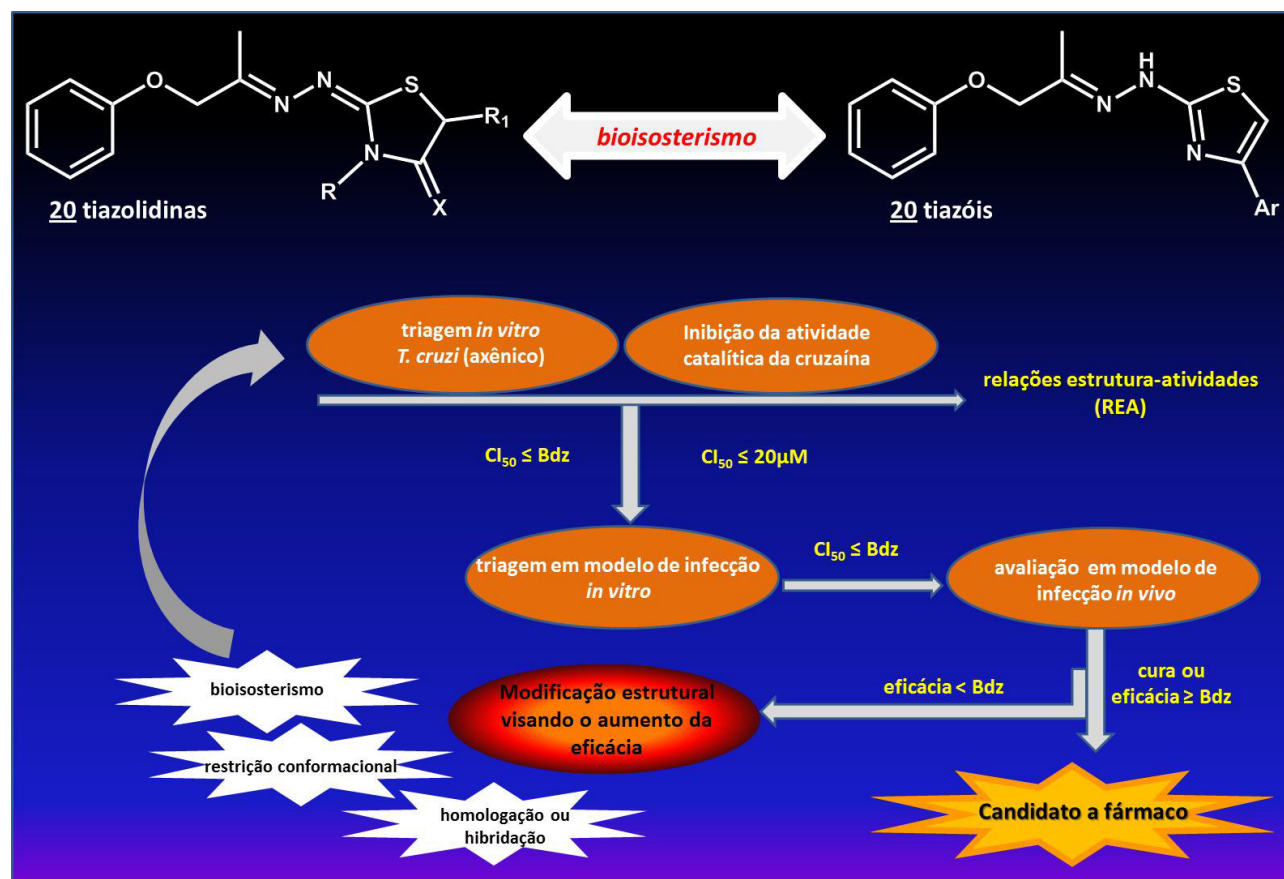


Figura 26: Planejamento da avaliação das propriedades tripanocidas para os compostos (43a-t) e (44a-t).

Como mostrado na **figura 26**, as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-t**) e os 2-imino-1,3-tiazóis (**44a-t**) foram inicialmente avaliados, *in vitro*, quanto as propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente às formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Y ou Dm28c do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de Cl_{50} (μM) foram calculados.

Nos ensaios com epimastigotas, o valor da Cl_{50} reflete a capacidade do composto em inibir a proliferação celular do parasita quando comparado com a cultura celular não tratada (controle negativo). Os compostos (**43a-t**) e (**44a-t**) foram incubados na presença de epimastigotas por cinco (cepa Dm28c) ou onze dias (cepa Y). Já nos ensaios com tripomastigotas, a forma evolutiva infectante em mamíferos, o valor da Cl_{50} reflete o efeito do composto em reduzir a viabilidade celular do parasita quando comparado com o controle

negativo. Neste ensaio, os compostos (**43a-t**) e (**44a-t**) foram incubados na presença de tripomastigotas da cepa Y por vinte e quatro horas.

Para determinar a seletividade, os compostos (**43a-t**) e (**44a-t**) foram testados em ensaios com células de mamíferos. O efeito na viabilidade celular (toxicidade) destes compostos em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c foi avaliado. Como este ensaio é de viabilidade celular, os esplenócitos foram incubados na presença dos compostos (**43a-t**) e (**44a-t**) por vinte e quatro horas. Devido ao grande número de compostos, a toxicidade em esplenócitos foi quantificada como a maior concentração não-tóxica para as células, e quando necessário, os valores de CI_{50} (em μM) foram determinados.

Para a triagem dos compostos tripanocidas mais potentes, os valores de CI_{50} foram comparados com os fármacos Bdz (**1**) e Nfz (**2**). Seguindo os critérios preconizados pelo Programa Integrado de Doença de Chagas da Fiocruz (Brasil),¹¹⁴ compostos com valores de CI_{50} igual ou menor que o Bdz (**1**) foram selecionados para a avaliação em ensaios com amastigotas do *T. cruzi*, assim como a determinação do índice de seletividade ($IS = CI_{50}$ células mamíferos / CI_{50} amastigotas).

Os compostos selecionados para a avaliação com amastigotas foram testados em dois modelos experimentais.

No modelo de desenvolvimento da infecção, macrófagos de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y. Após infecção, os compostos foram adicionados na cultura celular e incubados por quatro dias. Neste modelo, o controle negativo apresenta uma taxa de macrófagos infectados elevada, e como consequência do desenvolvimento da infecção, o número de amastigotas intracelulares é alto.¹¹⁴ Portanto, a eficácia de um composto neste modelo se reflete na capacidade em reduzir a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, interrompendo o curso da infecção. Os valores de CI_{50} foram calculados tendo como valor de referência a CI_{50} do Bdz (**1**).

Já no modelo de invasão do parasita, macrófagos de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y e simultaneamente tratados com os compostos e então incubados por duas horas. A eficácia de um composto neste modelo se traduz na capacidade de impedir a adesão e invasão de tripomastigotas em macrófagos, evitando assim a infecção.¹¹⁵ A anfotericina B (AnfB) foi utilizada como fármaco de referência.

Compostos com valores de CI_{50} (amastigotas) igual ou menor do que o Bdz (**1**) e com $IS > 50$ foram eleitos para a avaliação da eficácia, *in vivo*, em reduzir a parasitemia sanguínea. Nós utilizamos o modelo de infecção aguda em camundongos da linhagem BALB/c infectados com tripomastigotas da cepa Y. Neste modelo, os animais infectados foram tratados por via oral com os compostos durante cinco dias consecutivos no quinto dia após infecção. O Bdz (**1**) foi utilizado como fármaco de referência neste ensaio.

Compostos com eficácia similar ao Bdz (**1**) são considerados protótipos estruturais, candidatos a fármacos úteis no tratamento da doença de Chagas. Compostos que reduziram a parasitemia com eficácia inferior ao Bdz (**1**) foram sinteticamente reestruturados visando a otimização das propriedades farmacológicas.

Com o objetivo de identificar o mecanismo de ação dos compostos (**43a–t**) e (**44a–t**) no *T. cruzi*, a inibição da atividade catalítica da cruzaina pelos compostos foi determinada. Este ensaio é colorimétrico e baseado na competição de substratos pelo sítio catalítico da enzima.¹¹⁵ A incubação da cruzaina com o peptídeo ZFR-AMC resulta em clivagem deste peptídeo, produzindo 4-metilcumarina que possui fluorescência diferente do ZFR-AMC. Compostos com afinidade pela cruzaina competem com o peptídeo ZFR-AMC pelo sítio catalítico, diminuindo assim a quantidade de 4-metilcumarina formada.¹¹⁶ Neste ensaio, a inibição da atividade catalítica da cruzaina se reflete na capacidade de um composto em impedir a ligação da enzima pelo seu substrato ZFR-AMC. Devido ao grande número de compostos, os compostos (**43a–t**) e (**44a–t**) foram testados em uma única concentração (de 100 ou 20 μM), e após a triagem dos mais ativos, os valores de CI_{50} (μM) foram calculados. Os compostos mais potentes em inibir a cruzaina foram ainda selecionados para os ensaios com as enzimas recombinantes cathepsinas L e S. Com isso, pretendemos determinar a seletividade destes compostos em inibir a protease do *T. cruzi* versus as proteases de mamíferos.

4.3.1 Avaliação farmacológica das 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–r)

4.3.1.1 Inibição da atividade catalítica da cruzaina

A série (**43a–t**) foi planejada através do uso do grupamento fenóximetilcetona, previamente descrito numa classe de inibidores potentes da cruzaina⁹⁵ em combinação com o grupamento 2-iminotiazolidina-4-onas (**38**) previamente explorada pelo nosso grupo de pesquisas. A partir deste planejamento, seguido pela combinação de substituintes

localizados nas posições N3 e C5 resultaram na composição dos compostos (**43a–r**). Por último, a troca bioisostérica da carbonila pela tiocarbonila levou a preparação dos compostos (**43s**) e (**43t**).

A **figura 27** apresenta os dados de inibição da atividade catalítica da cruzaina do *T. cruzi*. O protocolo experimental descrito por Ferreira e col.¹¹⁶ foi utilizado neste ensaio com a enzima. Inicialmente, todos os compostos foram testados na concentração de 20 ou 100 μM . Os compostos que inibiram 50 % da atividade enzimática foram selecionados para determinação dos valores de CI_{50} .

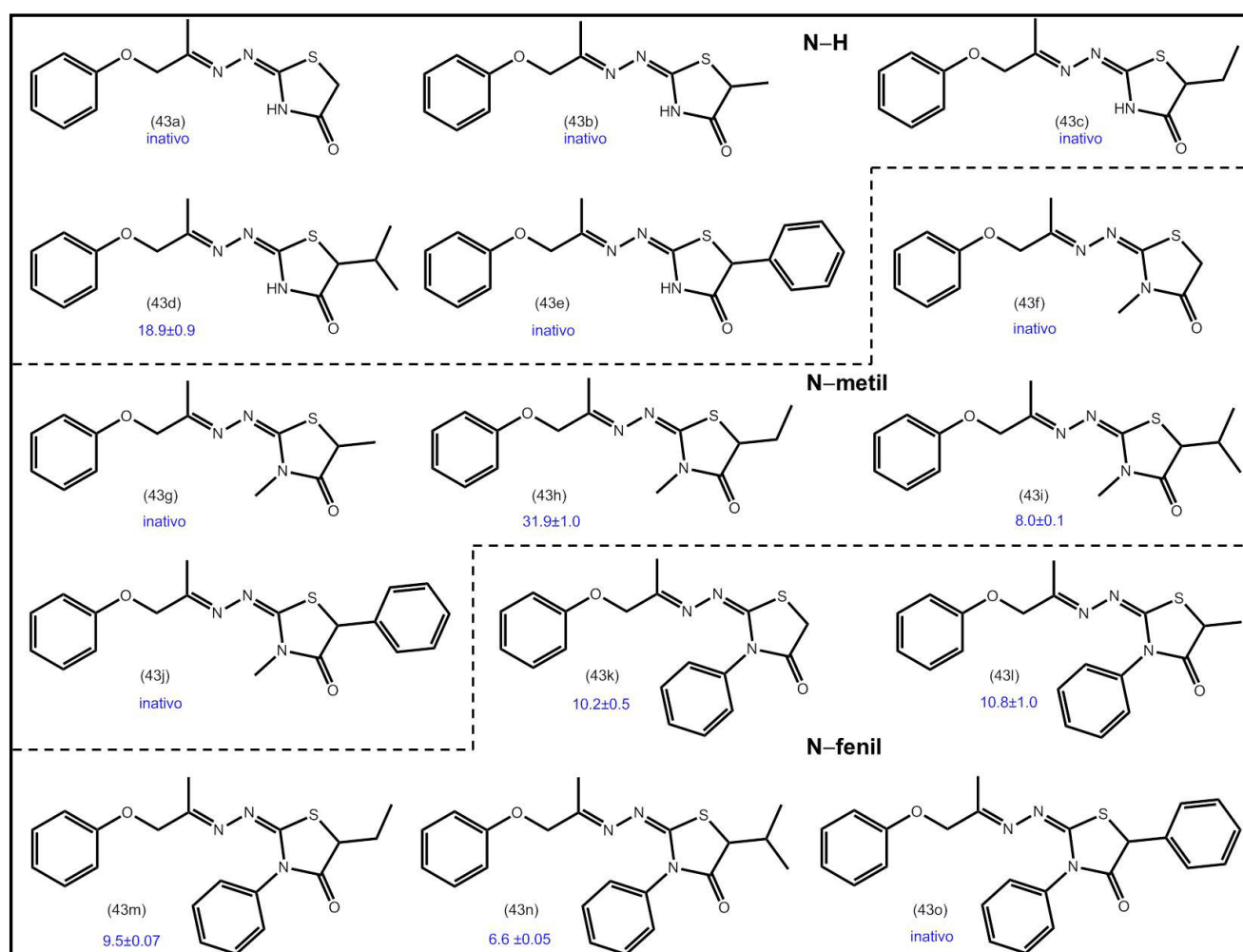


Figura 27: Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. Valores de CI_{50} (μM) ($\pm$ desvio padrão) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 100 μM . Valores de CI_{50} representam experimentos em triplicatas.

Podemos iniciar a análise das REA comparando os compostos com substituintes inseridos nas posições N3 e C5 no anel tiazolidínico (**43b–r**) em comparação com o composto não substituído (**43a**).

Nós percebemos que modificações na posição N3 afetam as propriedades inibitórias das 2-iminotiazolidina-4-onas na cruzaina muito mais do que modificações realizadas na

posição C5. Por exemplo, os compostos com o NH livre (**43a–e**) não inibiram a cruzaina quando comparado com os compostos (**43k–o**), que possuem uma fenila na posição N3. Os compostos (**43f–j**), que possuem uma metila na posição N3, não apresentaram propriedades inibitórias frente a cruzaina, com exceção do composto (**43i**), que apresentou $CI_{50} = 8.0 \pm 0.1 \mu M$.

Os compostos (**43k–n**) possuem um anel fenílico em N3 e exibiram propriedades inibitórias pronunciadas na cruzaina. Os compostos (**43k–m**) possuem propriedades inibitorias na cruzaina nas mesmas ordens de magnitude. Estes resultados são indicativos que a inserção de uma metila (**43l**) ou etila (**43m**) não aumenta a inibição da atividade catalítica na cruzaina quando comparado com o composto não substituído (**43k**). Mas isto muda quando uma isopropila ou fenila são inseridos na posição C5. O composto (**43n**), que possui um substituinte isopropil (**43n**), apresentou $CI_{50} = 6.6 \pm 0.1 \mu M$, sendo duas vezes mais potente do que o composto (**43k**) e o mais potente de toda a série (**43b–r**). Ao contrário dos compostos (**43m**, etil) e (**43n**, isopropil), que inibiram significativamente a cruzaina, o composto com uma fenila em C5 (**43o**) não apresentou propriedade inibitória.

Os resultados com os compostos (**43k–o**) sugerem que grupos alifáticos (etil ou isopropil) na posição C5 do anel tiazolidínico são benéficos para inibir a cruzaina, mas não um substituinte fenílico.

Após identificarmos que a fenila na posição N3 como sendo a melhor modificação estrutural para conferir propriedades inibitórias frente a cruzaina, nós vislumbramos a substituição da fenila por outros grupo. Devido a facilidade em preparar o composto (**43m**), nós decidimos usá-lo como protótipo-estrutural. Estas modificações levaram aos compostos (**43p–r**).

Ao analisar a inibição na cruzaina pelos compostos (**43p–r**) em comparação com o protótipo (**43m**), podemos observar algumas relações estruturais interessantes (**figura 28**).

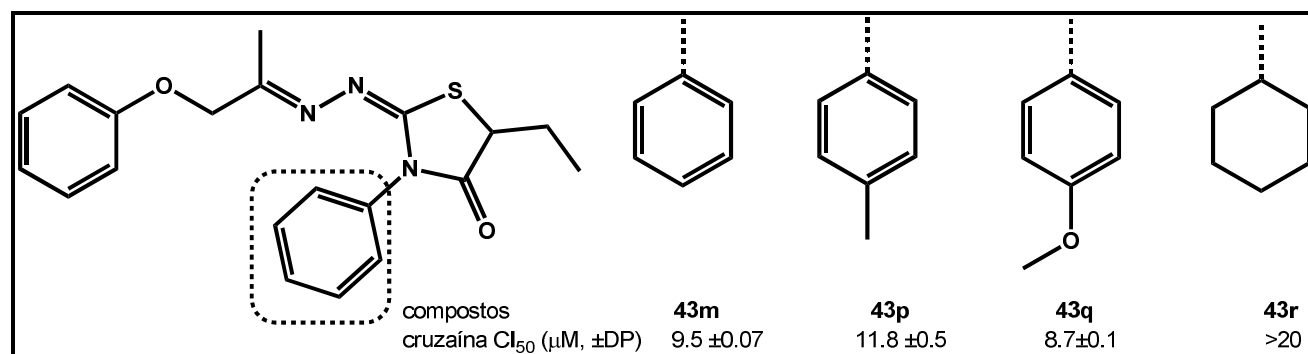


Figura 28: Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. Valores de CI_{50} (μM) ($\pm$ desvio padrão) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Valores de CI_{50} representam experimentos em triplicatas.

A troca do substituinte fenil (**43m**) pelo 4-metilfenil (**43p**) ou 4-metóxfenil (**43q**) não alterou a inibição da atividade catalítica na cruzaína, sendo estes compostos equipotentes. Porém, a troca da fenila (**43m**) pelo substituinte ciclohexil (**43r**) não foi benéfico, sendo o composto (**43r**) destituído de afinidade pela enzima cruzaína ($CI_{50} > 20 \mu M$).

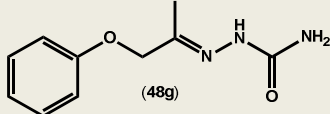
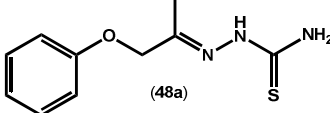
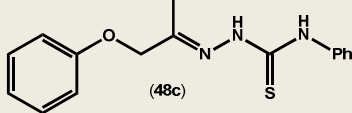
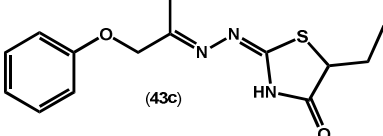
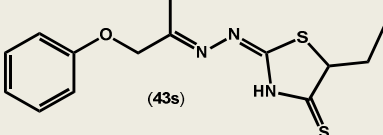
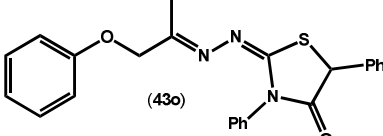
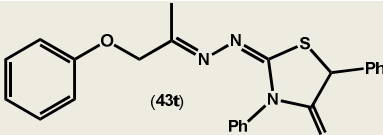
Após a determinação da inibição da atividade catalítica na cruzaína pelos compostos (**43a–r**), podemos inferir uma visão geral sobre o efeito dos substituintes inseridos nas posições N3 e C5 no anel tiazolidínico. Por um lado, substituintes alifáticos na posição N3, tais como metila ou ciclohexila, não são bem acomodados no sítio catalítico da enzima cruzaína, enquanto que um anel aromático é bem acomodado. Por outro lado, os melhores substituintes na posição C5 foram etil (**43m**) e isopropil (**43d**, **43i**, **43n**), enquanto que uma fenila (**43j**, **43o**) nesta posição não é benéfico para a atividade.

Uma vez que nós investigamos as modificações estruturais nas posições N3 e C5, nós decidimos explorar a modificação estrutural na carbonila. Para isto, a troca da carbonila (**43c**, **43o**) pela tiocarbonila (**43s**, **43t**) foi efetuada (tabela 2). Os compostos (**43c**, **43o**) foram selecionados como precursores para a síntese dos compostos tiocarbonilados (**43s**, **43t**), pois estes dois compostos apresentaram atividade tripanocida baixa, além de serem inativos frente a cruzaína. Para ter uma visão mais geral sobre os efeitos esteroeletrônicos da carbonila *versus* tiocarbonila, nós decidimos avaliar a atividade inibitória na cruzaína pelas tiossemicarbazonas (**48a**, **48c**) e semicarbazona (**51**).

O composto tiocarbonilado (**43t**) com $CI_{50} = 7.0 \pm 0.4 \mu M$, enquanto que seu análogo carbonilado (**43o**) na concentração de $100 \mu M$ inibiu $43 \pm 2.0 \%$ da atividade catalítica da cruzaína na concentração de $20 \mu M$ ($CI_{50} > 20 \mu M$). A mesma relação é observada na comparação entre os compostos (**43o**) e (**43t**). Portanto, a troca da carbonila pela tiocarbonila melhora a atividade inibitória na cruzaína para as 2-iminotiazolidina-4-onas.

As tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**) apresentaram inibição potente frente à cruzaína, com valores de CI_{50} na faixa de $0.3\text{--}0.5 \mu M$. Já a semicarbazona (**51**) não apresentou atividade inibitória na cruzaína. Os valores de CI_{50} que observamos para as tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**) são consistentes com os dados na literatura, que descrevem tiossemicarbazonas como inibidores da cruzaína com valores de CI_{50} em concentrações na faixa de $0.01\text{--}0.001 \mu M$, enquanto que semicarbazonas são destituídas de propriedades inibitórias na cruzaína.^{88,89}

Tabela 2: Inibição da atividade catalítica na cruzaína pelos compostos carbonilados (**43c**, **43o**) versus tiocarbonilados (**43s**, **43t**).

Compostos	% de inibição da cruzaína (compostos 20 μ M) ^{[a],[b]}	Cl ₅₀ $\pm$ DP (μ M) na cruzaína ^{[a],[c]}
 (48g)	0	ND ^[d]
 (48a)	-	0.28 $\pm$ 0.01
 (48c)	-	0.51 $\pm$ 0.001
 (43c)	0	ND
 (43s)	48 $\pm$ 1.0	18.7 $\pm$ 2.0
 (43o)	43 $\pm$ 2.0	> 20
 (43t)	72 $\pm$ 5.0	7.0 $\pm$ 0.4

^[a]Após 10 minutos de incubação com a enzima cruzaína. ^[b]Cada composto foi testado na concentração de 20 μ M, em triplicata. ^[c]Valores estimados usando ao menos oito concentrações diferentes. ND, não determinado.

As 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**, **43t**) e as tiossemicarbazonas (**48a**, **48c**) têm em comum a presença da tiocarbonila. Se a presença de uma tiocarbonila fosse essencial para a inibição da cruzaína, seria de se esperar que 2-iminotiazolidina-4-tionas e tiossemicarbazonas apresentassem valores de Cl₅₀ na mesma ordem de magnitude. Porém, isto não foi observado. As tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**) foram ao menos dez vezes mais potentes que as 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**, **43t**) em inibir a cruzaína.

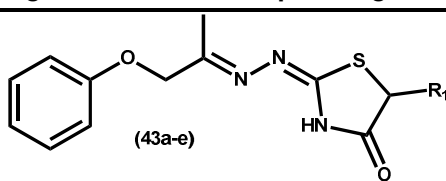
O composto (**43n**), que foi identificado como o mais potente dentre as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-r**), possui Cl₅₀ = 6.6 $\pm$ 0.05 μ M. Ao compararmos o composto carbonilado (**43n**) e o composto tiocarbonilado (**43t**, Cl₅₀ = 7.0 $\pm$ 0.4 μ M), observamos que ambos são essencialmente equipotentes. De uma maneira, a troca da carbonila pela tiocarbonila melhora as propriedades inibitórias frente a cruzaína, porém não resulta em inibidores com potência na faixa em nanomolar como observado com tiossemicarbazonas.

4.3.1.2 Avaliação, *in vitro*, das propriedades tripanocidas

Uma vez que as relações estrutura-atividade inibitória na cruzaina foram analisadas para os compostos (43a–t), estes compostos foram testados frente a células do *T. cruzi* e de mamíferos. A **Tabela 3** apresenta os resultados da avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e da toxicidade em esplenócitos para as 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–o).

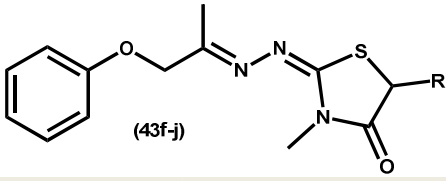
Tabela 3: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos, para as 2-iminotiazolidina-4-onas (43a–o).

compd.	R ₁	<i>T. cruzi</i> Cl ₅₀ (μM), cepa Y		esplenócitos BALB/c (μg/mL) ^[c]
		tripomastigotas ^[a]	epimastigotas ^[b]	



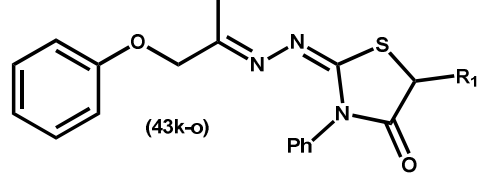
(43a-e)

43a	H	19.0	23.2	>100
43b	CH ₃	ND	ND ^[d]	>100
43c	C ₂ H ₅	ND	ND	>100
43d	CH(CH ₃) ₂	16.8	12.2	>100
43e	Ph	18.7	34.8	25



(43f-j)

43f	H	ND	ND	>100
43g	CH ₃	ND	ND	25
43h	C ₂ H ₅	ND	ND	>100
43i	CH(CH ₃) ₂	10.7	14.0	>100
43j	Ph	18.0	12.0	>100



(43k-o)

43k	H	18.0	25.8	>100
43l	CH ₃	29.0	31.8	100
43m	C ₂ H ₅	5.8	11.1	100
43n	CH(CH ₃) ₂	6.1	4.9	>100
43o	Ph	11.1	15.6	>100
Bdz (1)	-	6.2	6.6	25
Nfx (2)	-	2.7	1.9	1.0
SAP ^[e]	-	-	-	<1.0

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^{[a],[b]} Cl₅₀ com valores de desvio padrão < ±10 %. ^[c] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[d] ND, não determinado, pois não foi possível calcular a Cl₅₀. ^[e] SAP, saponina.

Primeiramente, podemos analisar a toxicidade dos compostos (**43a–o**) para esplenócitos de camundongos BALB/c. Tanto a saponina (inibidor de referência) como o Nfx (**2**) apresentaram toxicidade elevada, afetando severamente a viabilidade celular de esplenócitos em concentrações de 1.0 µg/mL. Já os compostos (**43a–o**) foram significativamente menos tóxicos que a saponina e o Nfx (**2**). A maioria dos compostos (**43a–o**) não afetou a viabilidade celular de esplenócitos na concentração de 100 µg/mL, enquanto que nesta concentração o Bdz (**1**) afetou.

De fato, a toxicidade baixa que observamos aqui com as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–o**) em esplenócitos é consistente com os resultados descritos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas com as 2-iminotiazolidina-4-onas (**39**) em comparação com o Bdz (**1**) e Nfx (**2**).^{91,92} Uma vez que a toxicidade em esplenócitos foi determinada, as propriedades tripanocidas para as formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foram avaliadas.

Podemos iniciar a análise das propriedades tripanocidas comparando os compostos com substituintes nas posições N3 e C5 no anel tiazolidínico (**43b–o**) em comparação com o composto não substituído (**43a**).

A 2-iminotiazolidina-4-ona não substituída (**43a**) apresentou Cl_{50} para tripomastigotas de 19.0 µM, sendo três vezes menos potente do que o Bdz (**1**). Os compostos (**43b**, metil) e (**43c**, etil), que diferem do (**43a**) pela presença de substituintes na posição C5, foram inativos. Já os compostos (**43d**, isopropil) e (**43e**, fenil) foram equipotentes ao composto (**43a**). Uma análise das propriedades tripanocidas para os compostos (**43a–e**) nos mostra que a inserção de substituintes na posição C5 não necessariamente leva a incremento da atividade em relação ao composto não substituído.

Para verificar se a inserção de substituintes na posição N3 levaria a um aumento das propriedades tripanocidas, os compostos substituídos na posição N3 (**43f–j**, *N*-metil) e (**43k–o**, *N*-fenil) foram avaliados.

Dentre as 2-iminotiazolidina-4-onas da subsérie *N*-metil (**43f–j**), o composto (**43i**, isopropil), com Cl_{50} para tripomastigotas de 10.7 µM, foi o mais potente desta subsérie, sendo inclusive duas vezes mais potente que a 2-iminotiazolidina-4-ona não substituída (**43a**). Os outros compostos da subsérie *N*-metil (**43f–j**) não apresentaram propriedades tripanocidas significativas.

Para as 2-iminotiazolidina-4-onas da subsérie *N*-fenil (**43k–o**), o derivado com o substituinte isopropil em C5 (**43n**) foi novamente o mais potente desta subsérie. O composto (**43n**), que possui Cl_{50} de 6.1 e 4.9 µM para tripomastigotas e epimastigotas

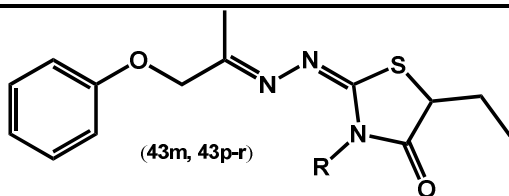
respectivamente, foi mais potente que a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43a**) e equipotente com o Bdz (**1**). A 2-iminotiazolidina-4-ona (**43m**, etil) também foi equipotente com o Bdz (**1**). Já o composto (**43o**, fenil) foi duas vezes menos potente que o Bdz (**1**), porém ainda mais potente que a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43a**).

Uma vez que nós identificamos propriedades tripanocidas excelentes para os compostos com a fenila na posição N3 (**43k–o**), decidimos investigar a substituição desta fenila. Para tanto, temos os compostos (**43p–r**).

O composto com uma fenila em N3 (**43m**) foi equipotente ao Bdz (**1**) frente a tripomastigotas. Já o derivado 4-metilfenil (**43p**) foi três vezes menos potente que o (**43m**), apresentando $CI_{50} = 19.9 \mu M$ (tabela 4).

Tabela 4: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos, para as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43p–r**).

compd.	R	<i>T. cruzi</i> CI_{50} (μM), cepa Y		esplenócitos BALB/c ($\mu g/mL$) ^[c]
		tripomastigotas ^[a]	epimastigotas ^[b]	



(43m, 43p-r)

43m	fenil	5.8	11.1	100
43p	4-metilfenil	19.9	15.0	100
43q	4-metoxifenil	9.0	6.8	100
43r	ciclohexil	ND ^[d]	ND	>100
Bdz (1)	-	6.2	6.6	25

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^{[a],[b]} CI_{50} com valores de desvio padrão $< \pm 10 \%$. ^[c] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[d] ND, não determinado.

O derivado 4-metóxifenil (**43q**) foi ligeiramente menos potente que o protótipo (**43m**) para tripomastigotas. Comparando o composto (**43m**) com o derivado *N*-ciclohexil (**43r**), observamos que a troca do fenil pelo ciclohexil foi deletéria para a atividade tripanocida, sendo o *N*-ciclohexil (**43r**) destituído de propriedades tripanocidas. O derivado *N*-ciclohexil (**43r**) também foi destituído de propriedades inibitórias frente a cruzaina.

Dentre os compostos (**43a–e**, NH) e (**43f–j**, *N*-metil), não identificamos nenhum composto com propriedades tripanocidas similares ao Bdz (**1**). Se cruzarmos os dados da série (**43f–j**, *N*-metil) com o derivado *N*-ciclohexil (**43r**), nos parece coerente afirmar que substituintes alifáticos na posição N3 das 2-iminotiazolidina-4-onas não são benéficos para as propriedades tripanocidas e inibição da cruzaina.

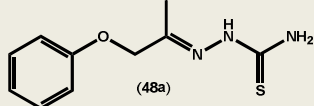
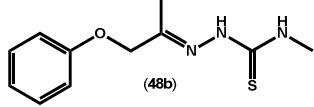
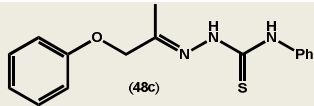
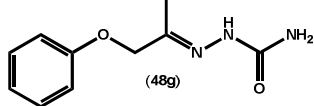
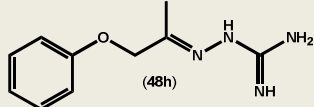
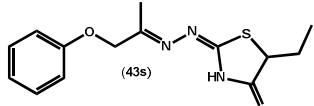
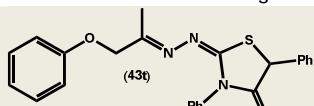
De posse dos compostos (**43k–o**, *N*-fenil) e (**43p–r**), foi possível observar correlações estrutura *versus* atividade de uma maneira muito mais clara. Isto culminou com

a identificação da 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) com o agente tripanocida mais potente da série investigada. A 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) inibiu a atividade catalítica da cruzaina ($CI_{50} = 6.8 \pm 0.05 \mu M$), foi tóxica para tripomastigotas ($CI_{50} = 6.1 \mu M$) e inibiu a proliferação de epimastigotas ($CI_{50} = 4.9 \mu M$) do *T. cruzi* sem afetar a viabilidade celular de esplenócitos ($CI_{50} > 200 \mu M$). A 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) possui um IS (CI_{50} esplenócitos / CI_{50} tripomastigotas) de pelo menos 33, sendo assim selecionada para a avaliação em modelos, *in vitro*, de infecção pelo *T. cruzi*.

4.3.2 Avaliação farmacológica das 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**) e (**43t**) e o efeito da tiocarbonila

Devido a similaridade estrutural com as 2-iminotiazolidina-4-onas, 2-iminotiazolidina-4-tionas foram previamente investigadas em nosso grupo de pesquisas. Nós observamos que 2-iminotiazolidina-4-tionas foram agentes tripanocidas e inibidores da cruzaina ligeiramente mais potentes que 2-iminotiazolidina-4-onas.⁹² Para melhor compreender a importância da carbonila para a atividade tripanocida, as 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**) e (**43t**) foram preparadas e avaliadas (**tabela 5**). Nesta mesma ótica, decidimos avaliar as propriedades tripanocidas para as tiossemicarbazonas (**48a–c**), semicarbazona (**48g**) e a guanilhidrazona (**48h**).

Tabela 5: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**) e (**43t**) e análogos estruturais.

comp.	cruzaína ^[a] CI ₅₀ ±DP(μM)	T. cruzi CI ₅₀ (μM), cepa Y		esplenócitos BALB/c (μg/mL) ^[d]
		tripomastigotas ^[b]	epimastigotas ^[c]	
 (48a)	0.28±0.01	7.5	4.7	50
 (48b)	NT	5.8	95.7	>100
 (48c)	0.51±0.001	4.1	12.9	>100
 (48g)	>20	56.5	71.3	50
 (48h)	NT	25.1	100.4	10
 (43s)	18.7±2.0	31.5	26.1	25
 (43t)	7.0±0.4	11.2	4.2	100

^[a]Após 10 minutos de incubação com a enzima cruzaina. Cada composto foi testado em triplicata. ^[b]Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[c]Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^{[b],[c]} CI₅₀ com valores de desvio padrão < ±10 %. ^[d] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[e] ND, não determinado, pois não foi possível calcular a CI₅₀. NT, não foi testado.

Como esperado, as tiossemicarbazonas (**48a–c**) apresentaram propriedades tripanocidas potentes. A tiossemicarbazona (**48a**) apresentou $CI_{50} = 7.5 \mu M$ para tripomastigotas, enquanto que o seu análogo, a semicarbazona (**48g**), apresentou $CI_{50} = 56.5 \mu M$, sendo assim dez vezes menos potente. Já a guanilhidrazona (**48h**) foi aproximadamente quatro vezes menos potente que a tiossemicarbazona (**48a**), apresentando uma $CI_{50} = 25.1 \mu M$. Guanilhidrazonas e amidinas têm sido descritos como agentes anti-*T. cruzi*, enquanto que semicarbazonas são destituídas de tais propriedades.^{88,117}

Quando comparamos a atividade inibitória na cruzaina, também observamos uma relação estrutura *versus* atividade semelhante. Enquanto que as tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**) foram potentes inibidores da cruzaina (CI_{50} entre 0.28–0.51 μM), a semicarbazona (**48g**) foi inativa. Devido a problemas de solubilidade, a guanilhidrazona (**48h**) não foi testada na cruzaina.

Uma análise das tiossemicarbazonas *versus* semicarbazonas claramente indica que a tiocarbonila é um requerimento estrutural indispensável tanto para a atividade tripanocida bem como para a atividade inibitória na cruzaina.

A 2-iminotiazolidina-4-tiona (**43s**) resultou em CI_{50} de 31.5 e 26.1 μM para tripomastigotas e epimastigotas respectivamente. Já o seu análogo, a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43c**) foi inativo. Ainda assim, a 2-iminotiazolidina-4-tiona (**43s**) é menos potente que o Bdz (**1**). No outro exemplo, a 2-iminotiazolidina-4-tiona (**43t**) resultou em CI_{50} de 11.2 e 4.2 μM para tripomastigotas e epimastigotas respectivamente, enquanto que o seu análogo 2-iminotiazolidina-4-ona (**43o**) resultou em CI_{50} de 11.1 e 15.6 μM para tripomastigotas e epimastigotas respectivamente.

Podemos estabelecer a seguinte ordem de afinidade: tiossemicarbazonas (**48a**, **48c**) > 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**, **43t**) > 2-iminotiazolidina-4-onas (**43c**, **43o**). Esta ordem de afinidade é sugestiva que o modo de ligação destes compostos no sítio catalítico da cruzaina é diferente.

Discutimos anteriormente que as 2-iminotiazolidina-4-tiona (**43s**, **43t**) foram mais ativas frente a cruzaina que as 2-iminotiazolidina-4-ona (**43c**, **43o**). Intrigantemente, este ganho de afinidade na enzima não se refletiu nas propriedades tripanocidas. De uma maneira geral, podemos postular que a troca da carbonila pela tiocarbonila incrementa a afinidade pela cruzaina, mas isto não necessariamente melhora a atividade tripanocida de uma maneira substancial.

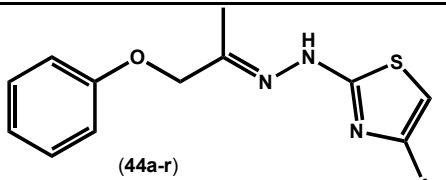
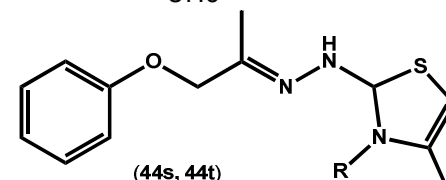
Finalmente, cabe citar a seletividade dos compostos para a cruzaina *versus* catepsinas. As catepsinas L e S humana e a cruzaina são endopeptidases com homologia estrutural elevada entre si. Porém, a cruzaina tem diferenças estruturais nas regiões S2 e S3 do sítio catalítico, permitindo assim o desenvolvimento de inibidores com seletividade para cruzaina.

Neste contexto, nós avaliamos as propriedades inibitórias da atividade catalítica nas catepsinas L e S para as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a**), (**43m**) e (**43n**). Estes compostos apresentaram valores de $CI_{50} > 20 \mu M$, enquanto que apresentaram valores de CI_{50} entre 5-10 μM para a cruzaina. Já as tiossemicarbazonas (**48a**) e (**48c**) apresentaram propriedades inibitórias frente as catepsinas L (CI_{50} de 0.01 ± 0.005 e $0.06 \pm 0.007 \mu M$) e S (CI_{50} de 6.5 ± 0.4 e $5.5 \pm 0.08 \mu M$), respectivamente. Testamos também a 2-iminotiazolidina-4-tiona (**43t**) na catepsina L e identificamos uma afinidade moderada ($CI_{50} = 10.8 \pm 0.7 \mu M$). Embora as tiossemicarbazonas (**48a–c**) sejam inibidores da cruzaina mais potentes que as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a**), (**43m**) e (**43n**), as tiossemicarbazonas são menos seletivas, inibindo também as catepsinas.

4.3.3 Avaliação farmacológica dos 2-imino-1,3-tiazóis (44a–t)

Os 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) foram planejados estruturalmente pela troca do heterociclo tiazolidina pelo tiazol. Os compostos das séries (**44a–t**) foram planejados de tal forma a variar o grupamento aromático em C4. Anéis fenílicos foram funcionalizados em *orto*-, *meta*- e *para*- com substituintes de contribuições estéreoelétrônicas variadas: –H, –F, –Cl, –Br, –NO₂, –Me, –OMe e –^tBu, de modo a construir um relação entre suas estruturas químicas e a atividade tripanocida pretendida. Ainda em comparação com o anel fenílico, a troca por anéis heterocíclicos, tais como 2-piridinila, 3-piridinila, 4-piridinila, 2-furanila e 2-tiofênico foram considerados.

Tabela 6: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as 2-iminotiazolidina-4-tionas (**44a–t**).

comp.	Ar/R	% de inibição cruzaína ^[a] ±DP	<i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (μM), cepa Y tripomastigotas ^[b]	epimastigotas ^[c]	esplenócitos BALB/c (μg/mL) ^[d]
 (44a-r)					
44a	Ph	–	19.6	ND	50
44b	2-Py	NT	34.8	11.8	100
44c	3-Py	–	12.3	20.5	100
44d	4-Py	NT	3.9	4.0	100
44e	4-CH ₃ Ph	–	49.7	67.0	100
44f	4-CH ₃ OPh	–	17.8	14.9	100
44g	4-FPh	–	11.5	41.3	>100
44h	4-ClPh	13±6.0	ND	57.1	100
44i	4-BrPh	25±1.0	ND	49.8	100
44j	4-NO ₂ Ph	–	5.7	1.9	100
44k	3-NO ₂ Ph	–	3.8	4.0	100
44l	3,4-diClPh	20±6	17.0	19.0	25
44m	2,4-diClPh	40±6	17.0	42.2	<1
44n	2,3,4-triClPh	–	ND	ND	<1
44o	4- ^t BuPh	–	ND	ND	50
44p	2-Naftil	–	36.4	83.0	>100
44q	2-furila	NT	17.7	26.6	>100
44r	2-tiofeno	30±6	37.6	16.6	50
 (44s, 44t)					
44s	CH ₃	–	174.7	25.6	10
44t	Ph	–	61.1	2.6	>100

^[a]Porcentagem de inibição após 10 minutos de incubação dos compostos (20 μM) com a enzima. ^[b]Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[c]Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. CI₅₀ com valores de desvio padrão < ±10 %. ^[d]Maior concentração atóxica. Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[e]ND, não determinado. –/– significa que não observamos inibição.

Além da posição C4 (**44a–r**), preparamos tiazóis substituídos na posição N3 (**44s**, **44t**), permitindo assim comparar com as 2-iminotiazolidina-4-onas que possuem uma fenila em N3 (**43k–o**). Os resultados da avaliação farmacológica são mostrados na **Tabela 6**.

Na concentração de 20 μM , nenhum dos tiazóis testados apresentou propriedades inibitórias na cruzaina. Nem mesmo na concentração de 100 μM , observamos inibição da atividade catalítica da cruzaina. A falta de afinidade dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) pela cruzaina confirma que o anel tiazolidínico é um requerimento estrutural para a afinidade dos compostos (**43a–t**) pela cruzaina. Mas em termos de afinidade na cruzaina, tiazóis e tiazolinonas não são pares bioisostéricos.

Em seguida, nós avaliamos as propriedades tripanocidas, *in vitro*, para os tiazóis (**44a–t**). Com relação a toxicidade dos compostos (**44a–t**) para esplenócitos de camundongos BALB/c, cinco compostos foram tóxicos em concentrações menores que 25 $\mu\text{g/mL}$. O restante dos tiazóis não afetou a viabilidade celular de esplenócitos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Em comparação com o composto não substituído no anel fenílico (**44a**), os compostos com mono-*para*-substituintes CH_3 (**44e**), OCH_3 (**44f**) e $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (**44o**) não resultaram em ganho da atividade tripanocida em tripomastigotas. Nesta mesma posição, a substituição por cloro (**44h**) ou bromo (**44i**) foi deletéria para atividade tripanocida. A substituição por dicloro nas posições 3,4- (**44l**) e 2,4- (**44m**) ou por 2,3,4-tricloro (**44n**) também não foi benéfica para a atividade tripanocida, e apresentaram toxicidade elevada para esplenócitos.

Embora os tiazóis com cloro (**44h**) ou (**44i**) não tenham apresentado propriedades tripanocidas, o tiazol com flúor (**44g**) resultou em CI_{50} de 11.5 μM para tripomastigotas, sendo assim mais potente que o tiazol não substituído (**44a**), porém ainda menos potente que o Bdz (**1**).

Ainda em relação aos compostos monosubstituídos no anel fenílico, nós identificamos os resultados mais promissores quando um grupo nitro foi inserido.

Enquanto que o tiazol não substituído (**44a**) apresentou uma CI_{50} de 19.5 μM para tripomastigotas, os tiazóis substituídos com o grupo nitro em *para* (**44j**) e *meta* (**44k**) apresentaram valores de CI_{50} de 5.7 e 3.8 μM , respectivamente. Portanto, o grupo nitro tanto em *para* como em *meta* foi benéfico, incrementando em pelo menos quatro vezes a atividade anti-*T. cruzi* quando comparado com o composto (**44a**). Cabe destacar que estes compostos derivados do nitro (**44j**, **44k**) foram tão potentes quanto o Nfx (**2**) em inibir a

proliferação de epimastigotas, porém destituídos de toxicidade elevada em esplenócitos como observado para o Nfx (**2**).

Nós observamos uma correlação interessante entre a posição do nitrogênio piridínico nos 2-imino-1,3-tiazóis (**44b–d**) e a atividade tripanocida. O derivado da *orto*-piridina (**44b**), com uma CI_{50} de 34.8 μ M, não apresentou atividade tripanocida significativa quando comparado com o tiazol (**44a**). Já a piridina em *meta* (**44c**) tendo CI_{50} de 12.3 μ M, foi duas vezes mais potente que o (**44a**). O efeito tripanocida para o composto com a piridina em *para* (**44d**) foi ainda mais pronunciado. O composto (**44d**) mostrou toxicidade elevada para tripomastigotas (CI_{50} de 3.9 μ M) e inibiu severamente a proliferação de epimastigotas (CI_{50} de 4.0 μ M), sendo assim o composto (**44d**) tão potente quanto o Bdz (**1**).

O composto com um anel 2-furila (**44q**) apresentou atividade tripanocida similar ao tiazol (**44a**). Porém, a simples substituição do anel 2-furila pelo 2-tiofênico (**44r**) reduziu em duas vezes a magnitude da atividade tripanocida.

A magnitude das propriedades tripanocidas segue a seguinte ordem: (**44d**, 4-Py) > (**44c**, 3-Py) > (**44q**, 2-furila) > (**44b**, 2-Py) ~ (**44r**, 2-tiofeno). Curiosamente, tanto a piridina em *orto* (**44b**) como o 2-tiofeno (**44r**) possuem uma configuração adequada para a formação de complexo de coordenação (quelatos) com íons metálicos. Compostos que formam quelatos com íons em meio biológico podem inativar metaloproteases e consequentemente apresentar propriedades farmacológicas relevantes. Este mecanismo é utilizado em 2-piridina-tiossemicarbazonas.¹¹⁸ Porém, os compostos (**44b**) e (**44r**) apresentaram propriedades tripanocidas baixas, portanto, este mecanismo de ação não deve estar envolvido.

A ordem de magnitude das propriedades tripanocidas para os compostos (**44b–d**) é: (4-piridina) > (3-piridina) > (2-piridina). Uma racionalização para estes resultados pode ser a presença de ligação de hidrogênios entre a piridina e o alvo molecular no *T. cruzi*, regiosseletiva para a 4-piridina. Em concordância com isto, o composto com flúor na posição *para* (**44g**) que é igualmente capaz de estabelecer ligações polares (halogênio) com alvos moleculares, também apresentou propriedade tripanocida potente.

A troca da fenila (**43a**) pela naftila (**44p**) não resultou em aumento da atividade tripanocida, pelo contrário, o derivado naftílico (**44p**) apresentou-se destituído de propriedades tripanocidas. No anel heterocíclico, a introdução de uma metila (**44s**) ou fenila (**44t**) na posição N3 foi deletéria para a atividade tripanocida, evidenciando assim a importância do NH. Estes resultados, juntamente com a potência pronunciada nos

compostos (**44d**, 4-piridina), (**44g**, flúor) e (**44j**, **44k**, nitro), são indicativos que o anel tiazólico se orienta numa região hidrofílica no sítio ativo dos alvos moleculares envolvidos na atividade tripanocida.

Finalmente, cabe ressaltar que, embora o alvo molecular envolvido nas propriedades tripanocidas dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) não seja conhecido, o perfil das propriedades farmacológicas identificadas são relevantes. Durante a triagem desta série, identificamos os compostos (**44d**), (**44j**) e (**44k**) como agentes tripanocidas equipotentes com o Bdz (**1**), e portanto, selecionados para a avaliação em ensaios de infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*.

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

Os compostos com Cl_{50} em tripomastigotas igual ou menor que o Bdz (**1**) foram selecionados para a avaliação em ensaios, *in vitro*, de infecção pelo *T. cruzi*, bem como a determinação do índice de seletividade ($IS = Cl_{50} \text{ células mamíferas} / Cl_{50} \text{ amastigotas}$). Na série das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**), os compostos (**43m**), (**43n**) foram selecionados. Já para a série dos 2-imino-1,3-tiazóis, os compostos (**44d**) e (**44j**) foram selecionados. Para fins de comparação, decidimos incluir a tiossemicarbazona (**48a**) e a 2-iminotiazolidina-4-ona não substituída (**43a**) na avaliação.

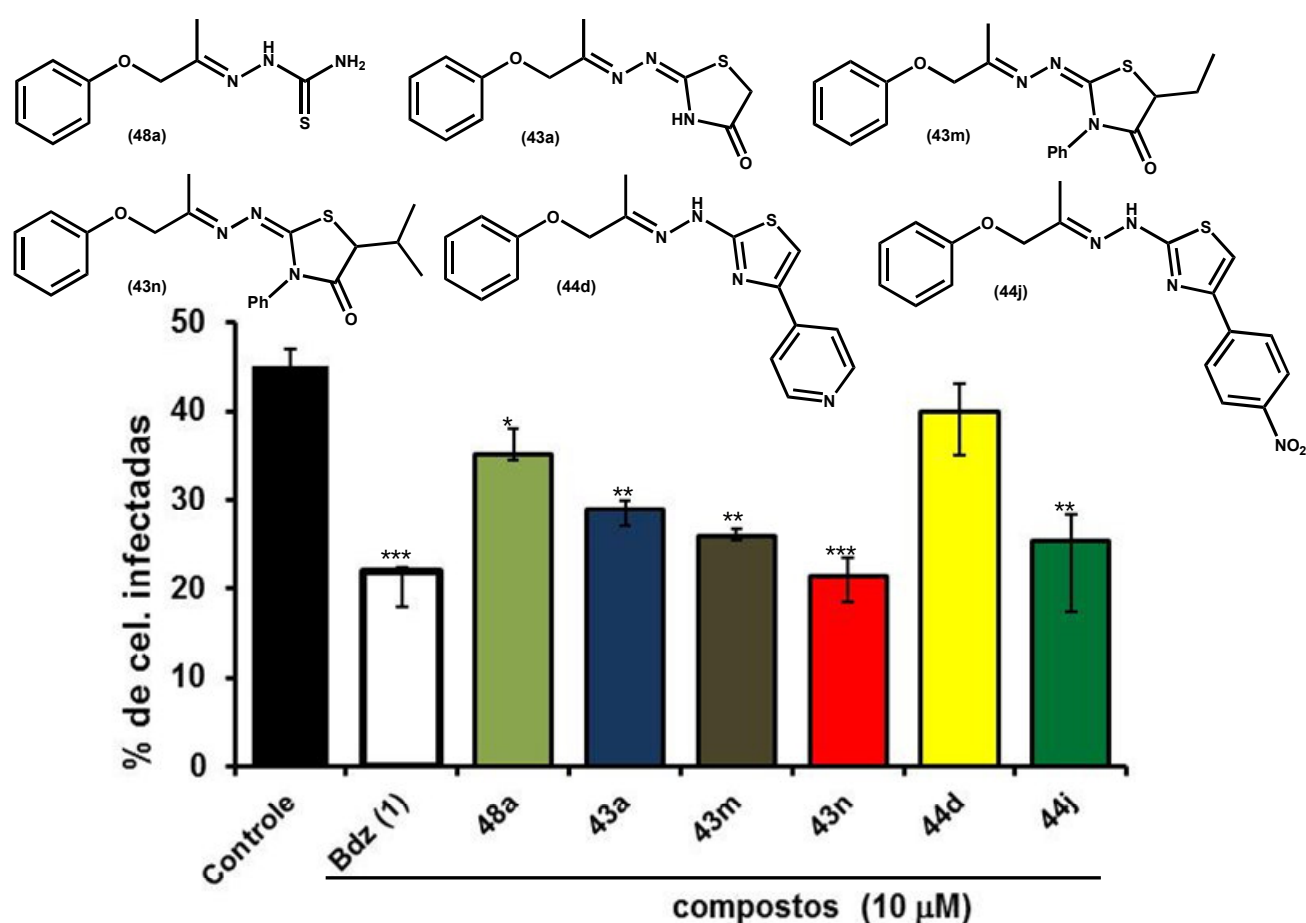


Gráfico 1: Atividade inibitória dos compostos na infecção de tripomastigotas da cepa Y em macrófagos. Compostos foram adicionados na concentração de 10 μ M, em triplicatas. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0,05$. Um único experimento.

Para os ensaios de infecção, macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y numa proporção de 1/10 (macrófagos / tripomastigotas). Após infecção, os compostos selecionados foram

adicionados ao meio celular e incubados por quatro dias. Todos os compostos, inclusive o Bdz (**1**), foram inicialmente testados na concentração de 10 μ M (**gráfico 1**).

O controle negativo (não tratado) apresentou uma taxa de macrófagos infectados de 43 %. No controle negativo, também se observa um número elevado de amastigotas, com média de 800 amastigotas por 100 macrófagos. Já na cultura celular tratada com o Bdz (**1**), 22 % dos macrófagos estavam infectados, sendo substancialmente menor que o observado no controle negativo ($P < 0.001$).

Para fins de comparação, nós testamos a 2-iminotiazolidina-4-ona sem substituíntes (**43a**). Este composto, que apresentou propriedade tripanocida baixa nos ensaios anteriores ($Cl_{50} = 19.0 \mu$ M para tripomastigotas) foi de fato pouco ativo em reduzir a infecção de tripomastigotas em macrófagos (30 %). No tratamento com a tiossemicarbazona (**48a**), 36 % das células estavam infectadas, e portanto com este composto inibiu muito pouco a taxa de infecção. Já no tratamento com as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43m**) e (**43n**), a taxa de infecção foi de 26 ± 1 e 21.5 ± 3 % respectivamente, menor que no controle negativo ($P < 0.001$).

No tratamento com o 2-imino-1,3-tiazol (**44j**), 25.1 ± 8 % dos macrófagos foram infectados, mostrando assim propriedades tripanocida similar ao Bdz (**1**). Para nossa surpresa, o 2-imino-1,3-tiazol derivado da 4-piridina (**44d**), que apresentou uma Cl_{50} de 3.9 μ M para tripomastigotas, não reduziu a taxa de infecção em comparação com o controle negativo (sem significância).

Uma vez que as propriedades dos compostos (**43n**) e (**44j**) em inibir, *in vitro*, a infecção pelo *T. cruzi* foram observadas, nós decidimos realizar um estudo de dose-resposta, com determinação dos valores de Cl_{50} . Para a estimativa da seletividade, a toxicidade dos compostos em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c foram determinadas e expressas em Cl_{50} . Para fins de comparação, nós incluímos a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43a**) nestes testes. Todos os compostos, incluindo o Bdz (**1**), foram testados em cinco concentrações diferentes, em triplicatas.

Quando as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a**) e (**43n**) foram testadas na concentração de 50 μ M (**gráfico 2**), nós claramente observamos que o composto (**43n**) é, de fato, mais potente em reduzir a infecção do que o composto (**43a**). O composto (**43n**) foi duas vezes mais potente que o seu análogo não substituído (**43a**) e apresentou potência semelhante ao Bdz (**1**). Na concentração de 262 μ M, a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) não afetou a viabilidade nem a proliferação da esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c (**tabela 7**).

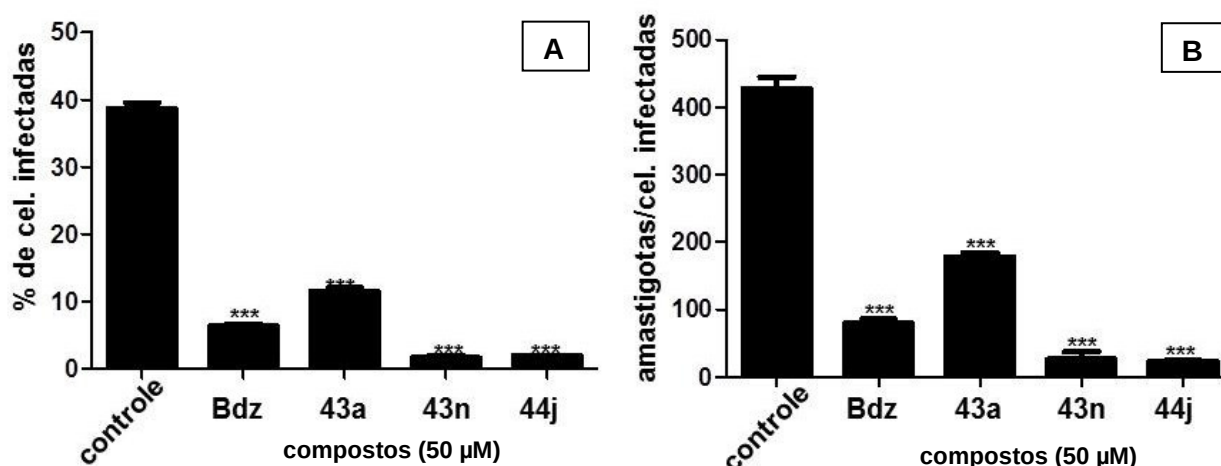


Gráfico 2: A) Porcentagem de macrófagos infectados. **B)** Proporção de amastigotas intracelulares. Bdz (1) é o inibidor de referência. Compostos foram adicionados na concentração de 50 µM, em triplicatas. Dois experimentos independentes foram realizados, valores são relativos a um único experimento. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Tabela 7: Avaliação, *in vitro*, da potência e seletividade dos compostos.

compostos	<i>T. cruzi</i>	esplenócitos BALB/c		índice de seletividade (IS)
	Cl ₅₀ (±DP), µM	Cl ₅₀ (±DP), µM		
	infecção ^[a]	citotoxicidade ^[b]	proliferação ^[c]	
43a	19.54±1.18	>262	98±10	10
43n	10.11±0.09	>262	>262	25
44j	12.9±1.0	160.1	NT	12
referência	13.99±0.39 (Bdz)	1.7±0.002 (saponina)	0.01 µg/mL (ciclosporina A)	-

^[a]Redução da taxa de infecção em comparação com o controle negativo. Valores de Cl₅₀ calculadas após 4 dias de incubação, usando cinco concentrações dos compostos, em triplicatas. ^[b]Diminuição da viabilidade celular de esplenócitos BALB/c. Valores de Cl₅₀ calculadas após 24 horas de incubação com os compostos. ^[c]Efeito antiproliferativo em esplenócitos de BALB/c estimulados com concanavalina A. Valores de Cl₅₀ calculadas após 72 horas de incubação com os compostos. NT, não testado.

O 2-imino-1,3-tiazol (**44j**) também apresentou substancial efeito sobre a infecção *in vitro*, reduzindo o número de macrófagos infectados de uma maneira mais pronunciada do que na cultura celular tratada com Bdz (**1**). Todavia, em concentrações acima de 100 µM, a viabilidade de esplenócitos foi afetada pelo composto (**44j**), e consequentemente o composto apresentou um índice de seletividade menor.

Uma vez que as propriedades farmacológicas dos compostos (**43n**) e (**44j**) em inibir a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, interrompendo assim o curso da infecção *in vitro*, foram observadas, nós decidimos avaliar se estes compostos possuem impedem o processo de invasão do *T. cruzi* em macrófagos.

Diferentemente do ensaio descrito no **gráfico 2**, onde os compostos foram adicionados na cultura célula somente após infecção, no ensaio de invasão, macrófagos (densidade celular de 10⁵/mL) foram expostos as tripomastigotas da cepa Y (densidade

celular de 10^7) e simultaneamente tratados com os compostos. Todos os compostos foram testados na concentração de 50 μ M, em triplicatas (**gráfico 3**).

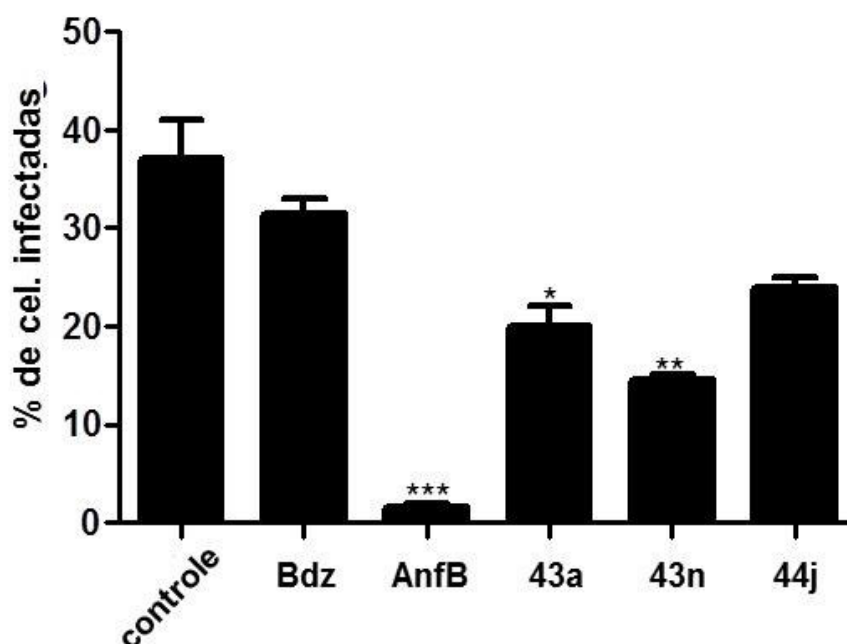


Gráfico 3: Eficácia dos compostos em impedir a invasão de tripomastigotas em macrófagos. AnfB é Anfotericina B, o inibidor de referência. Compostos foram adicionados na concentração de 50 μ M, em triplicatas. Dois experimentos independentes foram realizados, valores são relativos a um único experimento. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Após duas horas, 38 % dos macrófagos estão infectados no controle negativo. Comparado com o controle negativo, o tratamento com 50 μ M de Bdz (**1**) não reduz significativamente a infecção. Já no tratamento com 50 μ M da anfotericina B, a proporção de macrófagos infectados foi nitidamente menor que no controle negativo, demonstrando assim a capacidade da anfotericina B de impedir a invasão de tripomastigotas em macrófagos. A 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) reduziu em 46 % a proporção de macrófagos infectados e de uma maneira mais pronunciada que o seu análogo não substituído, a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43a**). Porém, a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) foi nitidamente menos potente que a anfotericina B. Da mesma maneira que o Bdz (**1**), o 2-imino-1,3-tiazol (**44j**) não reduziu a invasão celular numa maneira significativa.

4.3.4 Avaliação das propriedades farmacológicas, *in vivo*, da 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) na infecção pelo *T. cruzi*

Os compostos (**43n**) e (**44j**) possuem CI_{50} (amastigotas) de 10.11 ± 0.09 e 12.9 ± 1.0 μM respectivamente, enquanto que neste mesmo ensaio, o Bdz (**1**) possui CI_{50} de 13.99 ± 0.39 μM , denotando assim a necessidade de determinar a eficácia em modelos, *in vivo*, de infecção. O Programa Integrado de Doença de Chagas da Fiocruz (Brasil) recomenda a avaliação da eficácia em reduzir a parasitemia em camundongos infectados na fase aguda. Nós decidimos avaliar inicialmente o composto (**43n**), pois esta 2-iminotiazolidina-4-ona atua como agente tripanocida inibindo a enzima cruzaina do *T. cruzi* ($CI_{50} = 6.6 \pm 0.05$ μM , cruzaina).

Para o cálculo da dose máxima tolerada, o composto (**43n**) foi administrado por via oral nas doses de 100, 250 e 500 $\mu mol/kg$ em camundongos saudáveis da linhagem BALB/c ($n=2/grupo$). Nas doses de 100 e 250 $\mu mol/kg$, nenhum sinal aparente de toxicidade nem mortalidade foi observado. A dose de 250 $\mu mol/kg$ (95 mg/kg) do composto (**43n**) foi selecionada para o modelo experimental de infecção. O Bdz (**1**) também foi administrado por via oral na dose de 250 $\mu mol/kg$ (65 mg/kg).

A eficácia, *in vivo*, do composto (**43n**) em reduzir a parasitemia foi avaliada no modelo de infecção aguda em camundongos da linhagem BALB/c infectados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y. No quinto dia após infecção, grupos com seis animais infectados foram tratados uma vez ao dia durante cinco dias consecutivos, por via oral. A parasitemia sanguínea foi avaliada no quinto, oitavo, décimo e décimo segundo dia após infecção, em comparação com os animais infectados e não tratados (grupo controle). A mortalidade dos animais foi monitorada durante trinta dias após o término do tratamento.

A parasitemia nos animais infectados e não tratados (grupo controle) é alta, com o pico da parasitemia ocorrendo no décimo dia após a infecção (**gráfico 4**). A inoculação de 10^4 tripomastigotas da cepa Y não provocou mortalidade durante o período monitorado. Estes dados são coerentes com a literatura, pois a cepa Y do *T. cruzi* possui uma virulência branda na fase aguda da infecção em camundongos silvestres "wild-type".¹¹⁹

O tratamento farmacológico com Bdz (**1**) ou (**43n**) foram bem tolerados em ambos os grupos, sem mortalidade no período de monitoramento. Nos animais tratados com o Bdz (**1**), a parasitemia sanguínea foi severamente reduzida. Em dois dos seis animais tratados, a infecção foi erradicada no décimo dia. Nos animais tratados com a 2-iminotiazolidina-4-

ona (**43n**), também se obteve uma redução severa da parasitemia sanguínea, embora não se tenha logrado erradicação da infecção.

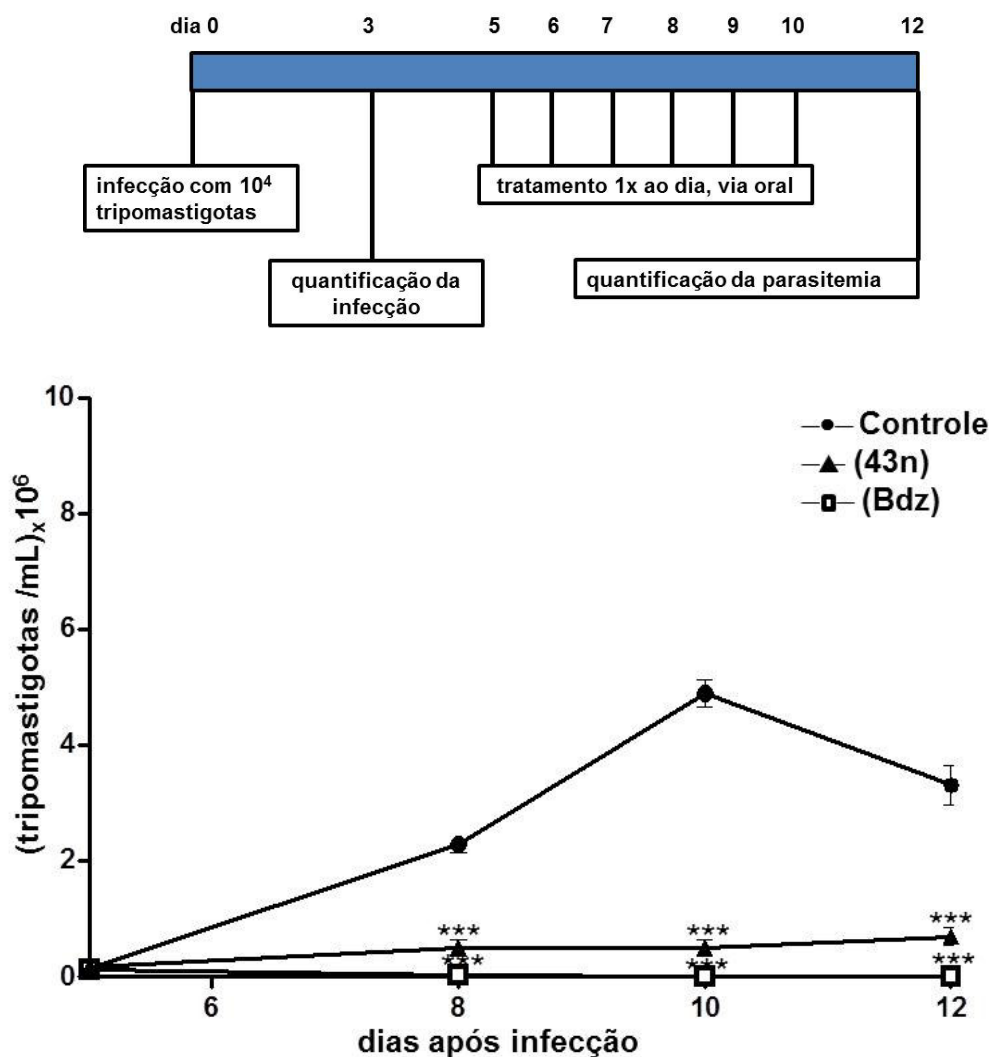


Gráfico 4: Parasitemia sanguínea em camundongos da linhagem BALB/c (fêmeas, $n=6$ /grupo) infectados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y. O grupo controle recebeu somente salina mais 20 % de DMSO. Tratamento por via oral na dose de 250 $\mu\text{mol/kg}$ da 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) e Bdz (**1**). Dois experimentos independentes foram realizados, valores mostrados são relativos a um único experimento. Resultados são expressos como média da contagem da parasitemia no grupo, com desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Em relação ao décimo dia após infecção, temos uma redução da parasitemia sanguínea de 89.6 e > 99 % nos tratamentos com o composto (**43n**) e Bdz (**1**), respectivamente. Como a eficácia do composto (**43n**) é menor que o Bdz (**1**), houve a necessidade de otimização das propriedades farmacológica.

4.3.5 Redesenho estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) visando a otimização das propriedades farmacológicas

O planejamento estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas da série (**43b–r**) teve como sítio de modificação estrutural a inserção de substituintes nas posições N3 e C5 do anel heterociclo. Isto resultou em incremento das propriedades tripanocidas, *in vitro*, em comparação com o composto não substituído (**43a**). Como resultado destes esforços, foi possível identificar o composto (**43n**), um agente tripanocida potente, seletivo e dotado de eficácia, *in vivo*, em reduzir a infecção pelo *T. cruzi*.

Já os 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) foram planejados com o objetivo de comparar a importância do anel heterociclo (tiazolidina *versus* tiazol). Nesta série, também foi possível identificar agentes tripanocidas potentes e seletivos, como exemplificado com o composto (**44j**), mas destituídos de propriedades inibitórias na enzima cruzaina.

A tentativa de otimizar as propriedades tripanocidas nas 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) nos parece uma escolha apropriada.

A potência das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) em inibir a atividade catalítica da cruzaina ainda é baixa quando comparado com outros inibidores descritos na literatura.^{88,89} A identificação de 2-iminotiazolidina-4-onas com afinidade incrementada pela cruzaina poderia, por último, resultar na melhoria das propriedades tripanocidas. Modificações estruturais subsequentes nestes compostos deveriam preservar o anel heterocíclico 4-tiazolidina.

Uma possibilidade de otimização das propriedades inibitórias das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) na cruzaina seria a complexação destes compostos com metais de transição. A cisteína-25 localizada no sítio catalítico de catepsinas é um nucleófilo que reconhece metais de transição como centros eletrofílicos, permitindo assim o planejamento de complexos de coordenação e compostos organometálicos como inibidores de catepsinas.^{120,121}

Devido a analogia estrutural e funcional entre catepsinas e a cruzaina, esta estratégia tem sido utilizada na busca por complexos metálicos como inibidores da cruzaina.¹²² De fato, esta linha de pesquisa tem logrado sucesso na identificação de agentes tripanocidas,^{123,124} inclusive com compostos metálicos dotados de eficácia *in vivo*.^{115,125,126} Em vista disto, complexos de coordenação de paládio e platina com as 2-

iminotiazolidina-4-onas (**43a-r**) foram idealizados, representados na **figura 29** pela estrutura (**53**).

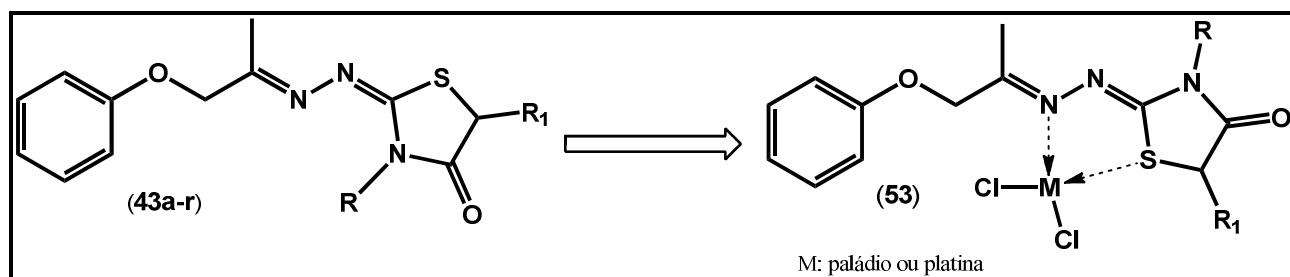


Figura 29: Tentativa de otimização das propriedades funcionais das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-r**) através da complexação com metais de transição.

4.3.6 Tentativa de preparação de complexos de coordenação com metais de transição

Fundamentados nos resultados da literatura, que complexos de coordenação com metais de transição são agentes tripanocidas, provavelmente atuando na enzima cruzaina do *T. cruzi*, idealizamos a preparação dos mesmos.*

Utilizando uma metodologia previamente descrita,¹¹⁸ tentou-se inicialmente preparar complexos de paládio com os compostos (**48a**) e (**48b**). Embora diversas tentativas e condições reacionais tenham sido utilizadas, não foi possível obter os complexos metálicos esperados. Foram feitas ainda tentativas com o composto (**43a**), usando platina ou paládio, todavia não logramos sucesso (**Esquema 11**).



Esquema 11.

Os resultados das análises elementares das reações com cloreto de paládio e os compostos (**48a**, **48b** e **43a**) foram sugestivos de algum tipo de fragmentação dos compostos mediada pelo metal. Por estes motivos, decidimos abandonar as tentativas de preparar complexos de coordenação com estes compostos.

Interessantemente, a preparação de complexos de coordenação com as 2-iminotiazolidina-4-onas derivados do fenol (**38**) logrou sucesso,¹²⁹ mas não para a 2-iminotiazolidina-4-ona derivados do tiofenol (**43a**). A principal diferença estrutural entre

*Agradecimento a Prof.^a. Heloisa Beraldo e Dr.^a. Gabrieli Lessa Parrilha, Departamento de Química da UFMG, pela experimentos

estas duas séries é o heteroátomo adjacente ao anel fenila (**figura 30**). Talvez os compostos da série (**43a–r**) possuam uma susceptibilidade maior em sofrer hidrólise que seus análogos da série (**38**).

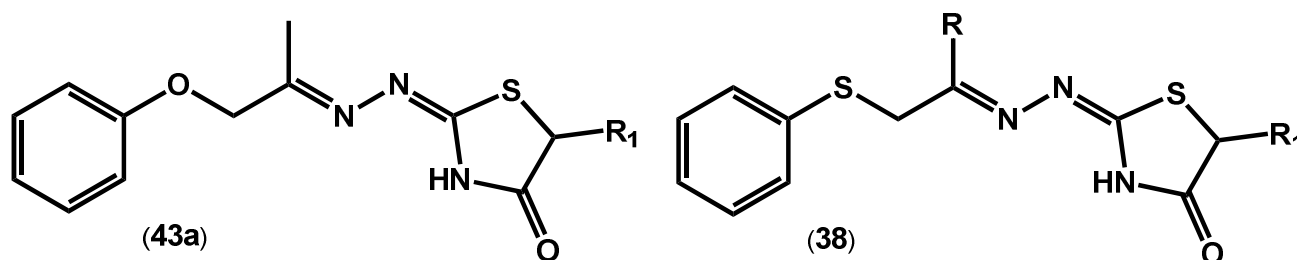


Figura 30. 2-Iminotiazolidina-4-onas (**38**), previamente utilizadas para a formação de complexos metálicos.¹²⁷

Para compreender um pouco melhor a diferença de reatividade entre estas duas classes de compostos, nós decidimos monitorar o processo de fragmentação pela espectrometria de massas. Para tanto, os compostos (**43f**), (**43h**) e o (**55**)⁹¹ foram analisados nas mesmas condições experimentais, usando a ionização por electrospray no modo de íons positivos (ESI+).

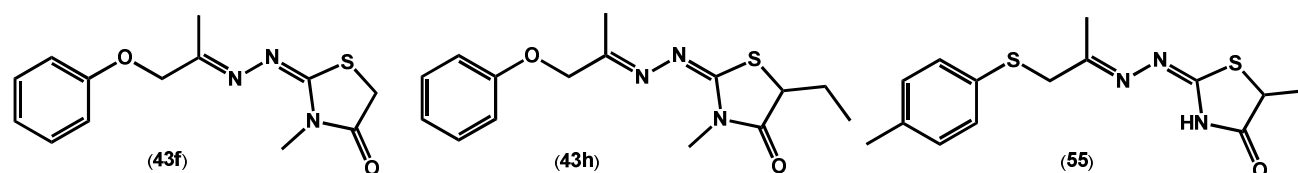
Inicialmente, os picos referentes as moléculas intactas foram localizados. Em seguida, os íons foram selecionados para colisão com argônio em diferentes energias de colisão (10, 20, 25 ou 30 eV). As rotas de dissociação das formas cationizadas [M+Na] e protonadas [M+H] foram estabelecidas através das determinações de massas de alta resolução (**figura 31**). Uma análise minuciosa destes compostos revelou uma diferença entre o perfil de fragmentação do composto (**55**) *versus* (**43a–r**).

No composto (**55**), não foi possível identificar fragmentos sob colisão a 10 eV, somente o íon molecular. Quanto a energia de colisão foi aumentada para 20 ou 30 eV, foi possível localizar fragmentos referentes a perda de uma ou duas metila e de uma etila. Todavia, no foi possível localizar a dissociação do grupo tiofenol no composto (**55**).

Já nos compostos (**43f**) e (**43h**), nós observamos fragmentos sob colisão a 10 eV. Nestes dois compostos, ocorre a perda de 93 unidades do [M+H], resultando nos íons de 184.0490 e 212.0873 *m/z* respectivamente para os compostos (**43f**) e (**43h**). Estes fragmentos correspondem a dissociação do grupo fenóxi. Quando o íon molecular foi isolado e a energia de colisão foi aumentada para 20, 25 ou 30 eV, nós identificamos outros fragmentos, mas em todas as condições experimentais testadas, a formação do íon [M-C₆H₅O] foi majoritário.

É bem possível que na presença de metais, as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) sejam clivadas de uma maneira semelhante ao observado nos espectros de massas, muito

provavelmente envolvendo a quebra da ligação CH₂–O do grupo fenóxi, o que também é consistente com dados descritos na literatura.^{130,131}



Íon	<i>m/z</i> acurado	Íon	<i>m/z</i> acurado	Íon	<i>m/z</i> acurado
[M+H] ⁺	278.0995	[M+H] ⁺	306.1283	[M+H] ⁺	322.1041
[M+Na] ⁺	300.0581	[M+Na] ⁺	328.1111	[M+Na] ⁺	não observado
[M–C ₆ H ₅ O] ⁺	184.0390	[M–C ₆ H ₅ O] ⁺	212.0873	[M–C ₂ H ₅] ⁺	292.0596
[M+H–C ₆ H ₅ O] ⁺	185.0598	[M+H–C ₆ H ₅ O] ⁺	213.0947	[M–C ₂ H ₅ –CH ₃] ⁺	277.9097
		[M+H–C ₆ H ₅ O–C ₂ H ₅] ⁺	184.0817		

pos dil 3

120127_Diogo_TS-12_neg_fragm_305_20-25-30eV 1 (0.534) Cm (1:18)

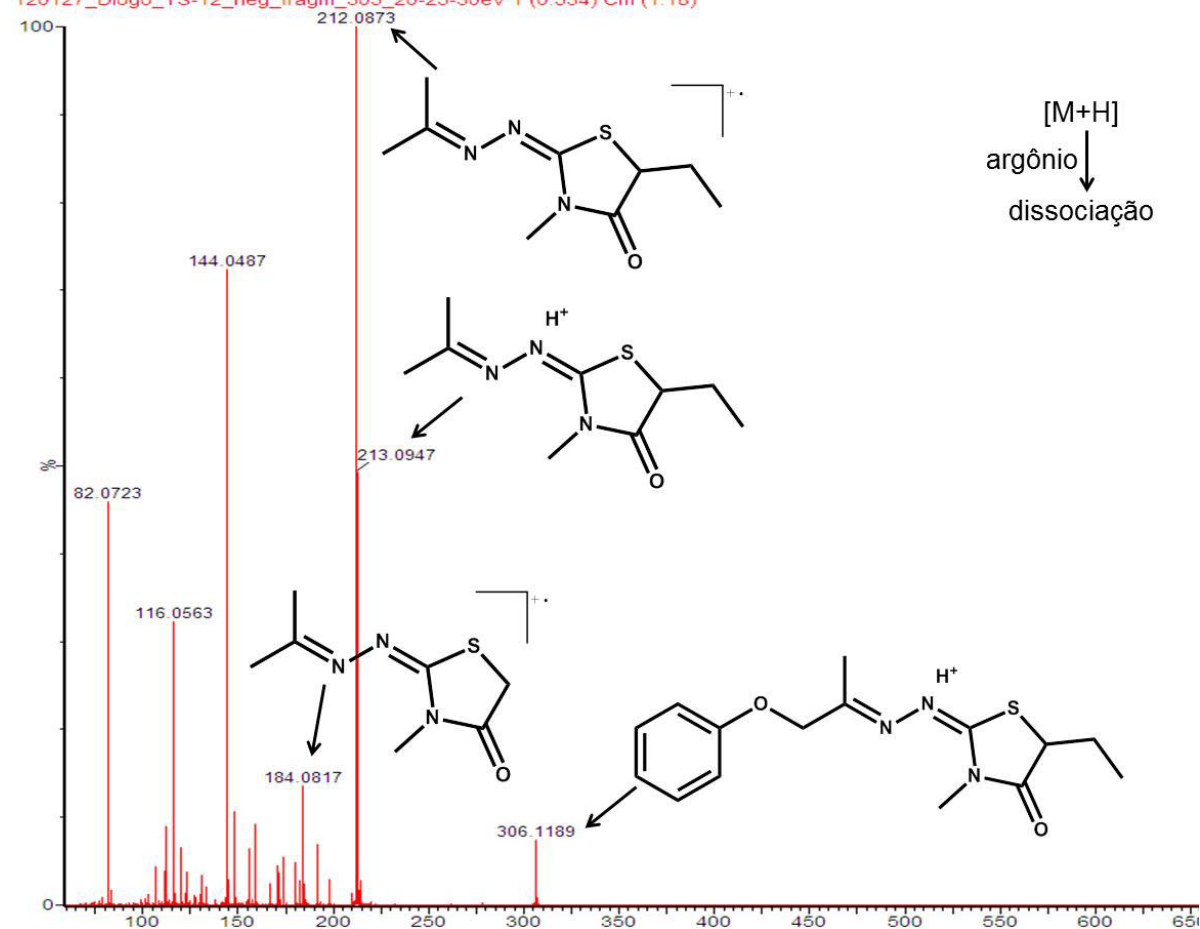


Figura 31: A) Íons e os valores de *m/z* detectados nos espectros de massas no modo ESI+ (10 eV). B) Espectro de massas / massas (25 eV) e a proposta de fragmentação para a 2-iminotiazolidina-4-ona (43h).

4.3.7 Planejamento estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a–j) e derivados (59, 60)

Além da complexação metálica, vislumbramos também o redesenho estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**) para o incremento das afinidades na cruzaina. Para alcançar este objetivo, nós nos inspiramos na estratégia adotada por Ellman e col.⁹⁵

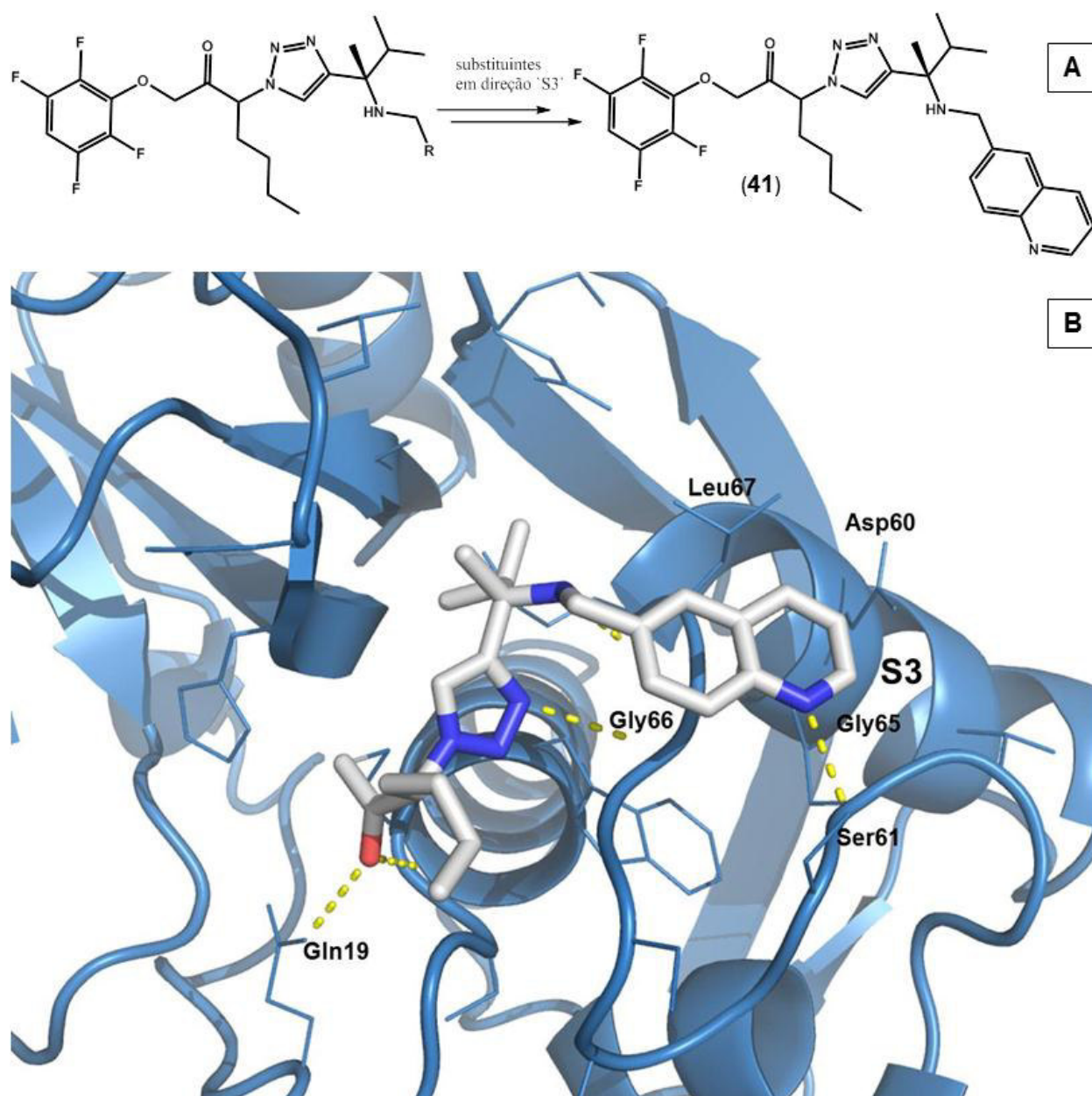


Figura 32: A) Composto (**41**) foi identificado após triagem de diferentes substituintes (R). B) Estrutura cristalina da cruzaina em complexo com o (**41**) (PDB 3IUT), com destaque para o anel quinolínico localizado no subsítio S3.^{95,127}

O subsítio S3 da cruzaina é um ambiente hidrofóbico (glicina-65, glicina-66). Na tentativa de aumentar a afinidade de derivados do composto K777 (**6**), Ellman e col.⁹⁵ realizaram modificações estruturais nos derivados que permitissem estes estabelecer

interações intermoleculares com a região S3 da cruzaína. Com o uso desta estratégia, Ellman e col.⁹⁵ alcançaram sucesso na otimização da afinidade na cruzaína, identificando inibidores potentes da cruzaína, como o composto **(41)** (**figura 32**).

O composto **(41)** é um inibidor da cruzaína potente ($CI_{50} = 0.01 \mu M$) e seletivo (destituído de afinidade pela catepsina L). Este composto possui uma geometria semelhante a letra "Y", com o anel quinolínico orientado na região S3 e o fragmento fenóximetil orientado na região S1' da cruzaína.

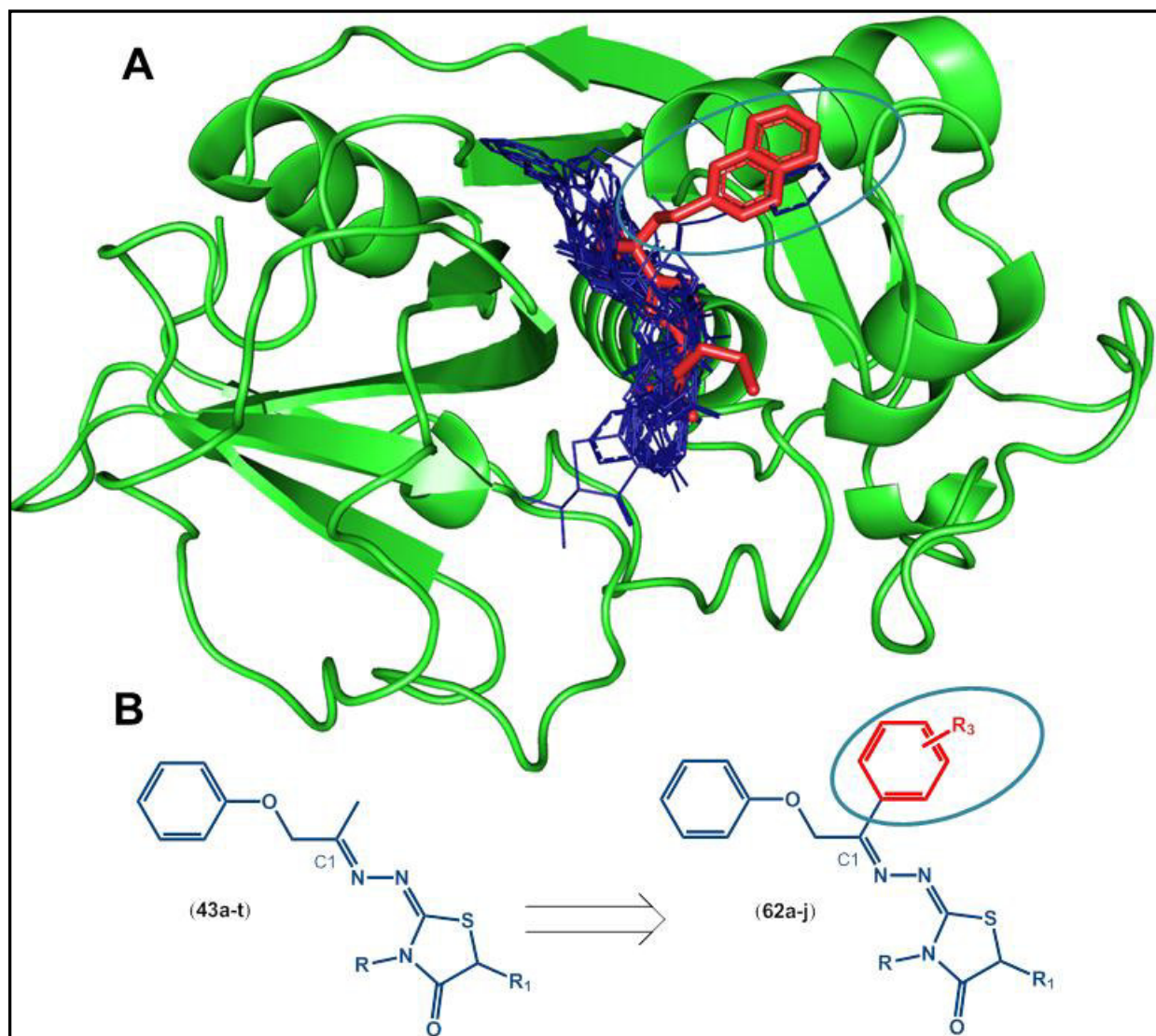


Figura 33: **A)** Docagem das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-t**, azul) na cruzaína. Em vermelho, o composto **(41)** co-cristalizado com a cruzaína.¹²⁸ Circulo meramente destacando a região S3 do sítio catalítico. **B)** Compostos (**62a-j**) planejados como análogos otimizados 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-t**).

Uma comparação do modelo de docagem das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-r**) na cruzaína em comparação com o composto **(41)** nos mostra as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a-r**) não ocupam a região S3 do sítio catalítico da cruzaína (**figura 33**).¹²⁹ Fundamentado neste modelo, a inserção de substituintes arilas em C1 da ligação imínica

poderia, eventualmente, melhorar a afinidade dos compostos na cruzaina, pois o grupo arila em C1 poderia estar orientada na região S3 da cruzaina numa maneira semelhante ao anel quinolínico do composto (41).

4.3.7 Síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a-j) e derivados (59, 60)

Dando continuidade ao nosso trabalho, a **figura 34** apresenta a sequência das reações envolvidas na síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a-j).

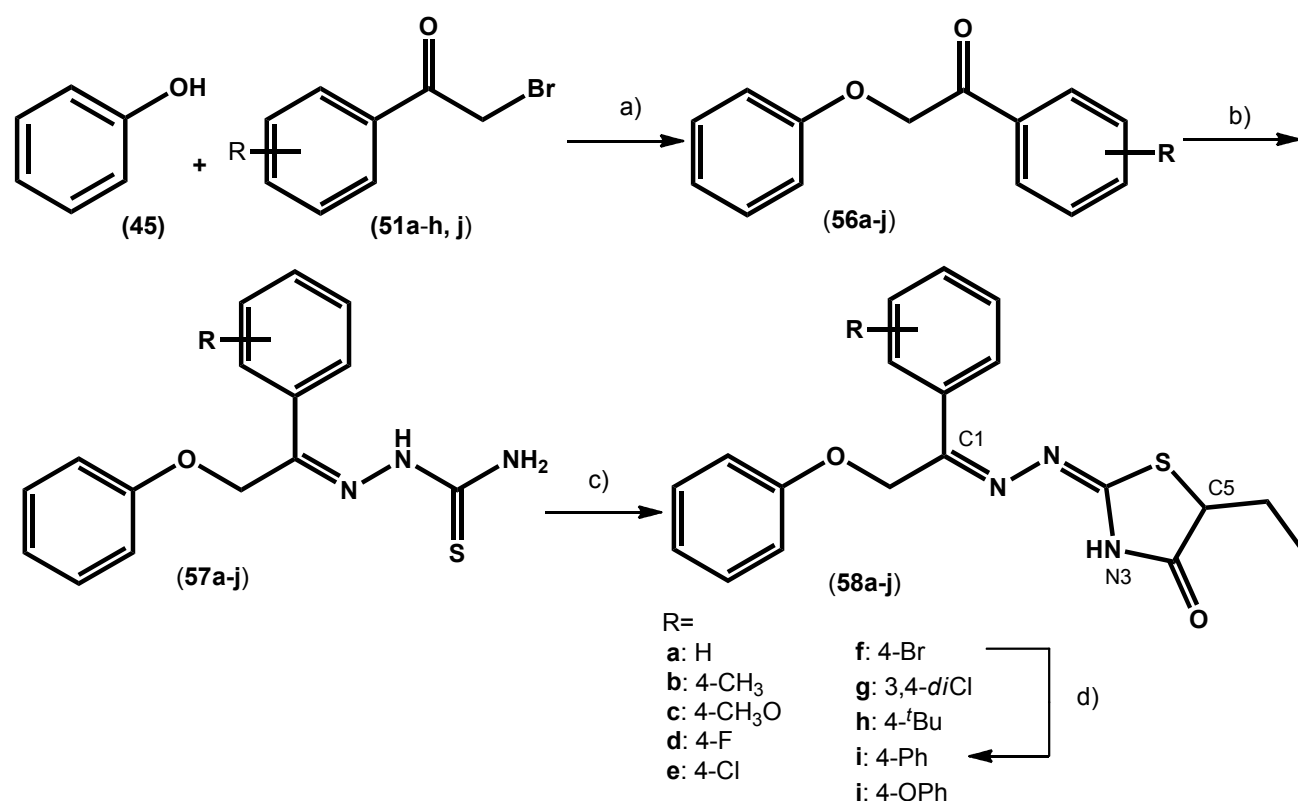


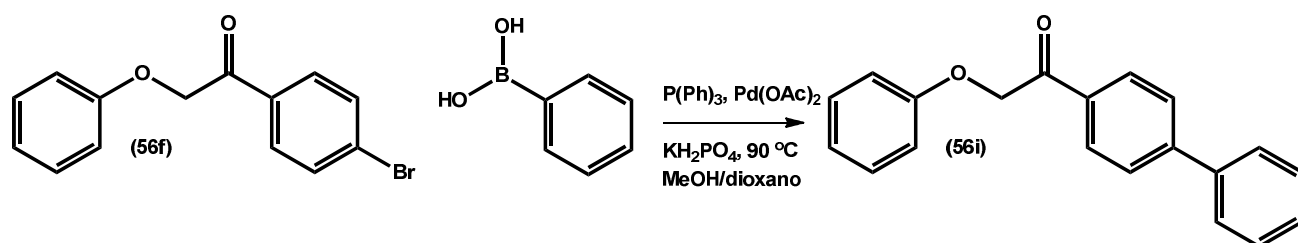
Figura 34: Planejamento sintético das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a-j). Reagentes e condições: a) K₂CO₃, 80 °C, 5 horas; b) tiossemicarbazida (47a); etanol, ácido acético, refluxo, 2 horas; c) 2-bromobutanoato de etila (49c), acetato de potássio, refluxo, 12 horas; d) acetato de paládio, trifenilfosfina, fosfato de potássio, ácido fenilborônico, 90 °C, 20 horas.

As 2-iminotiazolidina-4-onas (58a-j) foram planejadas pela introdução da subunidade fenila em C1. Inspirados pelas características estruturais previamente identificadas na série (43a-r), o grupo etila foi introduzido na posição C5 no anel tiazolidínico. Por razões experimentais, decidimos manter o NH livre. Já na posição C1, os substituintes foram selecionados de tal forma a investigar grupos funcionais com contribuições estereoeletrônicas diferentes: -H, -F, -Cl, -Br, -Me, -OMe, -OPh, -^tBu e -Ph. Portanto, de modo a estabelecer uma relação entre suas estruturas químicas e a atividade tripanocida pretendida.

A síntese da série (**58a–j**) também é divergente e tem como etapa inicial a síntese das 1-fenóxi-2-acetofenonas (**56a–j**).

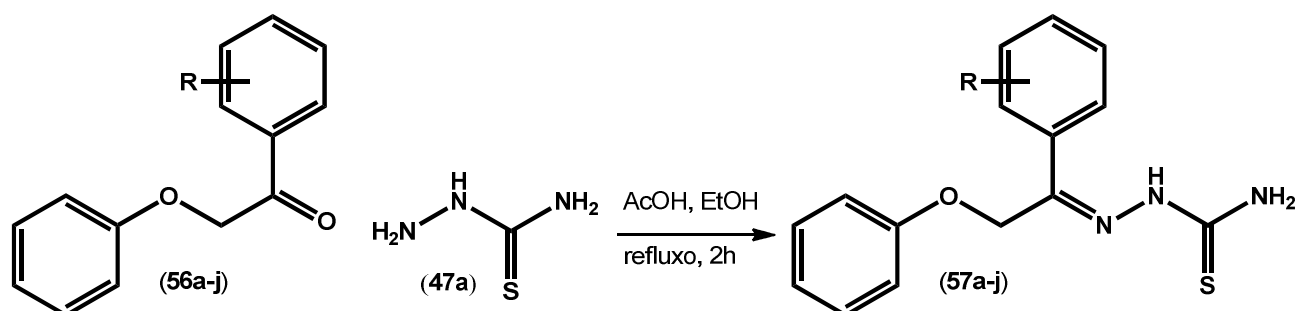
As 1-fenóxi-2-acetofenonas (**56a–h, j**) foram preparadas a partir da O-alkilação do fénol (**45**) com as 2-bromoacetofenonas (**51a–h, j**). Inicialmente, tentamos preparar os compostos em condições brandas (temperatura ambiente em banho de ultrassom), contudo, estas condições não geraram rendimentos satisfatórios. Com isso, as reações para a síntese dos compostos (**56a–h, j**) foram conduzidas a 80 °C sob agitação magnética vigorosa, com um tempo reacional médio de 5 horas.¹³²

A 1-fenóxi-2-acetofenona (**56i**) foi preparada através do acoplamento cruzado de Suzuki entre o derivado 4-bromofenil (**56f**) e o ácido fenilborônico (esquema 12).¹³³ A reação foi mantida sob aquecimento a 90 °C por 20 horas. Após purificação, foi obtido um rendimento de 50 % do composto (**56i**).



Esquema 12.

Uma vez que as 1-fenóxi-2-acetofenonas (**56a–j**) foram preparadas e purificadas, prosseguimos para a síntese das tiossemicarbazonas (**57a–j**) (esquema 13).



comp.	R	rend. (%)	comp.	R	rend. (%)
57a:	Hh	70	57f:	4-Br	55
57b:	4-CH ₃	83	57g:	3,4-diCl	56
57c:	4-CH ₃ O	75	57h:	4- ^t Bu	73
57d:	4-F	80	57i:	4-Ph	55
57e:	4-Cl	78	57j:	4-PhO	55

Esquema 13.

Para a síntese destes compostos, nós inicialmente testamos as mesmas condições reacionais que foram previamente usadas nas tiossemicarbazonas (**48a–f**), isto é,

temperatura ambiente, ácido acético (quantidade catalítica) em banho de ultrassom. Nesta condição, o composto (**57a**) foi isolado com um rendimento de 30 %. Devido ao rendimento baixo, nós decidimos sintetizar as tiossemicarbazonas (**57a–j**) em temperatura de refluxo e agitação magnética por 2 horas.

As tiossemicarbazonas (**57a–j**) foram preparadas com rendimentos satisfatórios (55–83 %) e isoladas como sólidos cristalinos. Estes compostos foram caracterizados por técnicas espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV) e por EMAR.

Nos espectros de RMN de ^1H de algumas das tiossemicarbazonas (**57a–j**), nós observamos sinais duplicados referentes aos hidrogênios do metileno. Nos espectros de RMN de ^{13}C , o mesmo tipo de duplicidade referente ao carbono do metileno foi observado. Este comportamento, que foi observado anteriormente com as tiossemicarbazonas (**48a–f**), é sugestivo da formação de uma mistura de diastereoisômeros (*Z*) e (*E*).

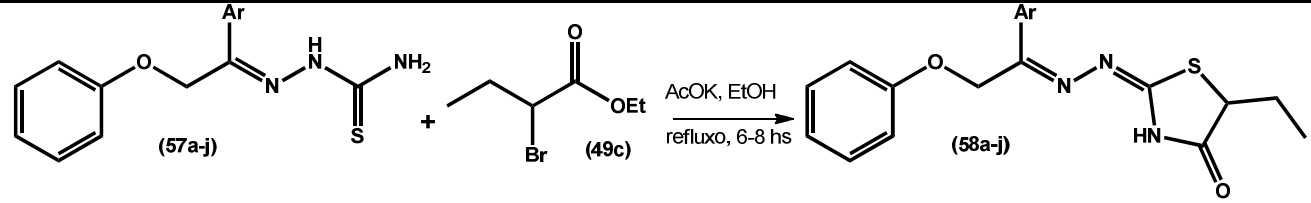
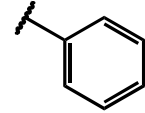
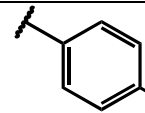
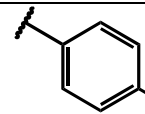
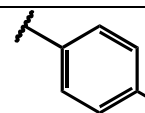
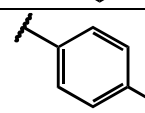
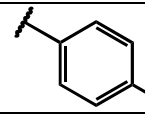
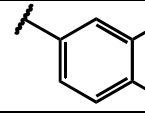
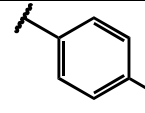
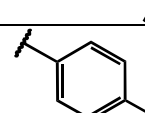
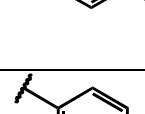
Os compostos (**57a–j**) foram isolados como sólidos cristalinos, mesmo assim nós não tivemos sucesso na obtenção de cristais apropriados para a difração de raios-X. Por este motivo, não foi possível inferir com precisão a geometria dos compostos (**57a–j**).

De posse das tiossemicarbazonas (**57a–j**), finalmente prosseguimos com a síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**). Estes compostos foram sintetizadas através da reação entre a respectiva tiossemicarbazona (**57a–j**) com o 2-bromobutanoato de etila (**49c**).

Estas reações foram realizadas em etanol absoluto, em excesso de acetato de potássio anidro, temperatura de refluxo e agitação magnética vigorosa. O acompanhamento destas reações por CCD mostrou o consumo dos materiais de partida (tiossemicarbazonas) após 6–8 horas de reação. O tempo reacional foi significativamente menor para as 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) do que para as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**, 18–24 horas).

Após cristalização em solventes apolares (geralmente tolueno ou benzeno), os compostos (**58a–j**) foram isolados como sólidos cristalinos e caracterizados por técnicas espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV) e por EMAR. A pureza foi confirmada pela análise elementar de C, N, H e S. Os substituintes na fenila em C1 e as propriedades físicas das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) estão listadas na **tabela 8**.

Tabela 8: Síntese e propriedades físicas das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**).

				
estruturas de Ar	códigos	rend. (%)	p.f. (°C)	formula molecular ^[a]
	58a	70	159	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₂ S
	58b	71	150	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₂ S
	58c	75	157	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₃ S
	58d	81	159–160	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₂ SF
	58e	70	162–164	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₂ SCl
	58f	48	177–178	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₂ SBr
	58g	60	175	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₂ SCl ₂
	58h	73	139–142	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₂ S
	58i	60	159–162	C ₂₅ H ₂₃ N ₃ O ₂ S
	58j	80	180	C ₂₅ H ₂₃ N ₃ O ₃ S

^[a] Formulas estimadas a partir dos espectros de massas.

Cabe ressaltar que os rendimentos na síntese das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) também foram melhores que os das (**43a–r**). Exceto para o composto (**58f**), que foi isolado com um rendimento de 48 %, os outros compostos foram isolados com rendimentos entre 70–81 %. Um aspecto particular da síntese dos compostos (**58a–j**) é que eles precipitam ainda durante a reação, o que provalmente desloca o equilíbrio reacional em favor da

formação dos produtos. Tal comportamento não foi observado durante a síntese dos compostos (**43a–r**).

Na RMN de ^1H das 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**), os sinais referentes ao N–H apresentam deslocamentos químicos entre 12.05–12.22 ppm. Como discutido anteriormente, esta faixa de deslocamento químico sugere que a ligação imínica é exocíclica em relação ao heterociclo. A **figura 35** apresenta, de forma representativa, os dados espectroscópicos da 2-iminotiazolidina-4-ona (**58c**).

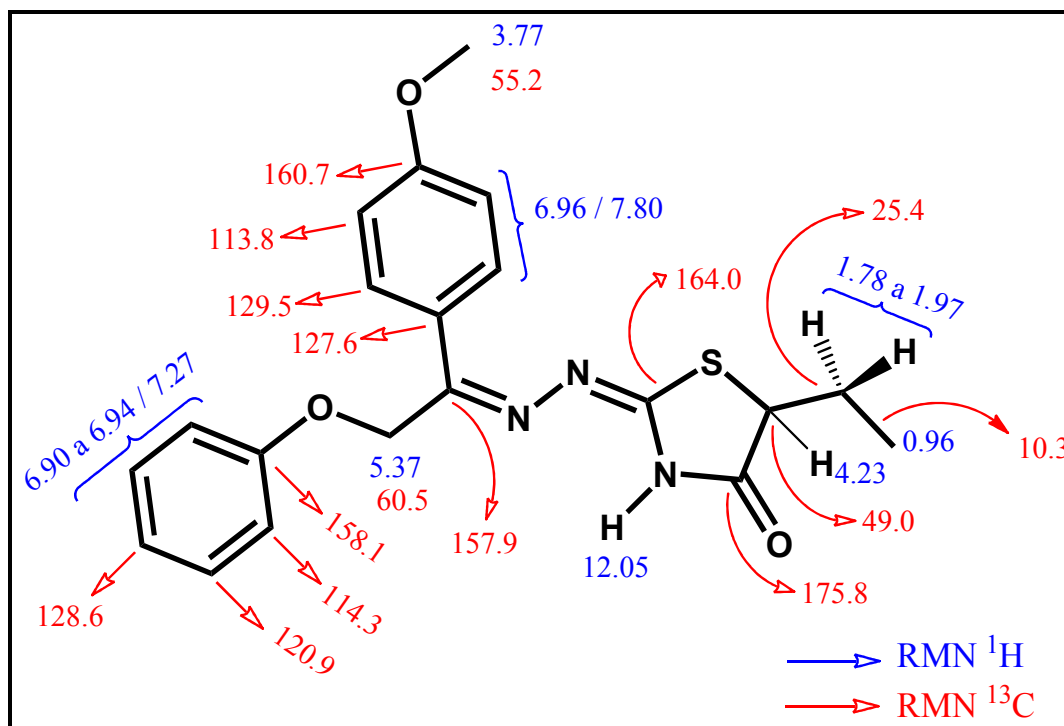
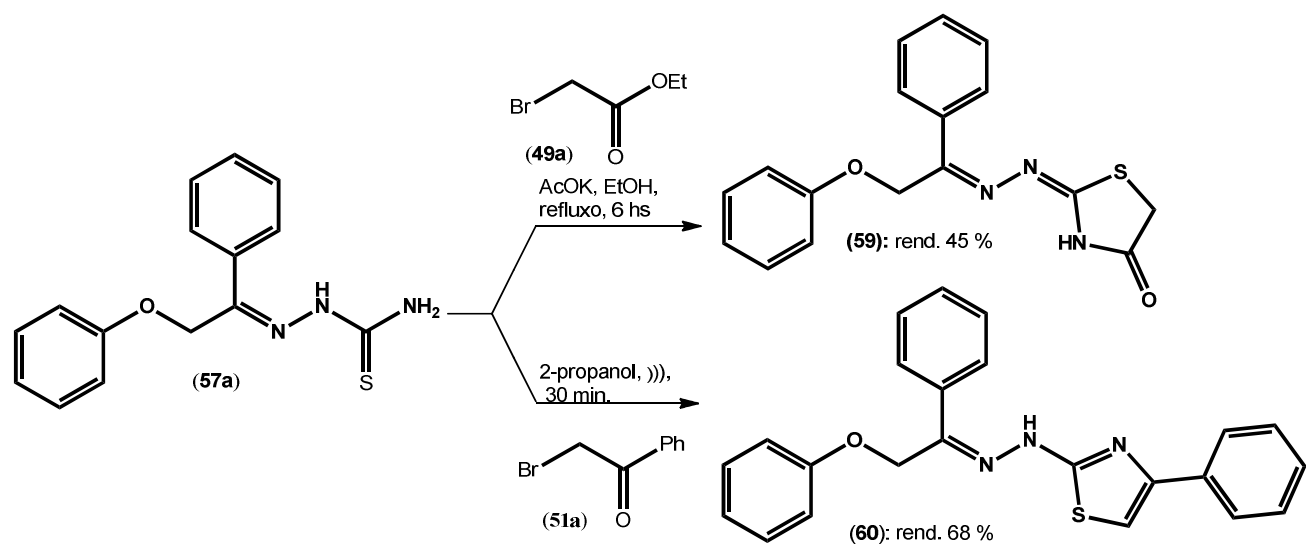


Figura 35: Dados espectroscópicos da 2-iminotiazolidina-4-ona (**58c**). Deslocamento químico em ppm.

Com o intuito de comparar os efeitos tripanocidas com as 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**), nós preparamos um derivado tiazolidínico sem a etila em C5 (**59**) e um derivado tiazólico contendo uma fenila em C4 (**60**). Estes dois compostos foram preparados a partir da tiossemicarbazona (**57a**) e também caracterizados por técnicas espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV) e por EMAR (**esquema 14**).



Esquema 14.

4.3.8 Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas das 2-iminotiazolidina-4-onas (58a–j) e derivados (59, 60)

As 2-iminotiazolidina-4-onas (58a–j) e seus derivados (59) e (60) foram testados na concentração de 100 μ M frente a enzima cruzaina. Para fins de comparação, a tiossemicarbazona (57a) também foi testada. Os percentuais de inibição da atividade catalítica destes compostos na cruzaina são apresentados no **gráfico 5**.

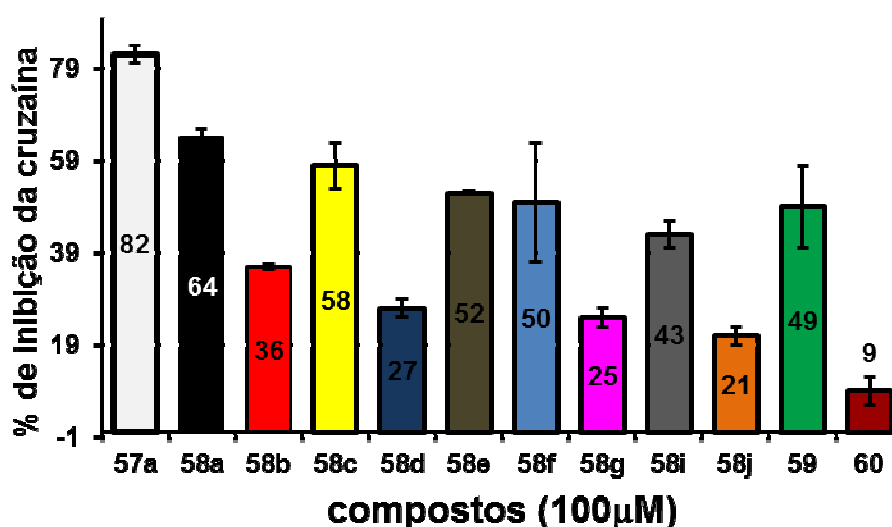


Gráfico 5: Atividade inibitória da atividade catalítica na cruzaina. Valores calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Desvio padrão expresso como barras. Compostos testados na concentração de 100 μ M, em triplicatas.

Como esperado, a tiossemicarbazona (57a) inibiu significativamente a atividade catalítica da cruzaina, de uma maneira semelhante ao observado com as tiossemicarbazonas (48a) e (48c). Em relação as 2-iminotiazolidina-4-onas (58a–j), nós observamos que estes compostos foram menos potentes que a tiossemicarbazona (57a) em inibir a cruzaina. Todavia, nós conseguimos identificar algumas relações estruturais interessantes.

A 2-iminotiazolidina-4-ona (58a) inibiu 64 ± 2 % da atividade catalítica da cruzaina, sendo o composto mais potente desta série. A inserção de uma metila (58b) ou flúor (58d) na posição *para* da fenila não foi benéfico, sendo estes dois compostos duas vezes menos potentes que o (62a). Por outro lado, a inserção de uma metóxila (58c) foi benéfica, inibindo 58 ± 2 % da atividade catalítica da cruzaina.

As 2-iminotiazolidina-4-onas com um substituinte cloro (58e) ou bromo (58f) em *para* também apresentaram atividade inibitória na cruzaina, embora menos potentes que o

composto não substituído (**58a**). Intrigantemente, a 2-iminotiazolidina-4-ona dissubstituída com 3,4-dicloro (**58g**) inibiu somente 25 ± 2 % da atividade catalítica da cruzaína, sendo este composto duas vezes menos potente que o derivado 4-cloro (**58e**).

As 2-iminotiazolidina-4-onas (**58g**, **58h**, **58j**) possuem grupos hidrofóbicos na posição *para* do anel fenílico. Nenhum destes compostos inibiu a atividade catalítica da cruzaína de uma maneira significativa. Mesmo assim, podemos estabelecer algumas REA.

A 2-iminotiazolidina-4-ona com uma metila (**58b**) inibiu 36 ± 0.6 % da atividade catalítica da cruzaína e o derivado com 4-*terc*butil (**58h**) não apresentou inibição mensurável (dado não mostrado).

A 2-iminotiazolidina-4-ona com um substituínte 4-fenóxi (**58j**) inibiu 21 ± 2 % da atividade catalítica da cruzaína, sendo quase três vezes menos potente que o composto com a metóxila (**58c**). O simples fato que a troca do metóxi pelo fenóxi não é benéfico para a atividade inibitória na cruzaína sugere que o anel fenílico em C1 se orienta numa região hidrofílica da enzima, tendo a participação de ligações intermoleculares polares.

O composto com um substituínte 4-fenil (**58i**) inibiu 43 ± 3 % da atividade catalítica da cruzaína. Do ponto de vista estérico, podemos comparar o efeito do bromo *versus* fenil. Se compararmos com 4-bromo (**58f**), que inibiu 50 ± 9 %, a troca do bromo pelo fenil de fato retem a atividade inibitória, porém não incrementa.

A presença da etila em C5 nos compostos (**58a–j**) é importante para a atividade inibitória na cruzaína. Isto pode ser inferido com a 2-iminotiazolidina-4-ona (**59**), que não possui a etila em tal posição. Enquanto que o (**59**) inibiu 43 ± 9 %, o seu análogo com uma etila em C5 (**58a**) inibiu 64 ± 2 % da atividade catalítica da cruzaína. Por último, observamos novamente a ausência de atividade inibitória de 2-imino-1,3-tiazóis pela cruzaína, como exemplificado aqui com o composto (**60**).

As 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) foram planejadas visando o incremento da afinidade pela cruzaína em comparação com as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**).

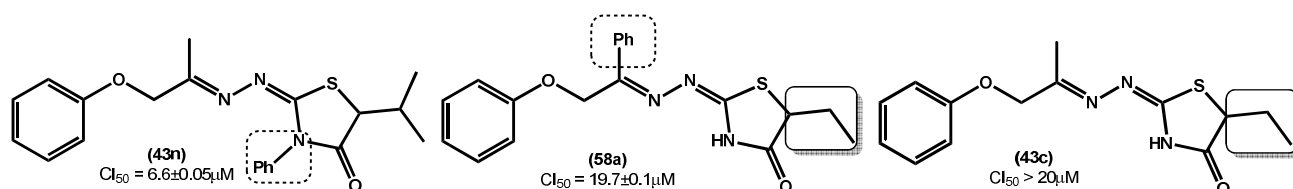
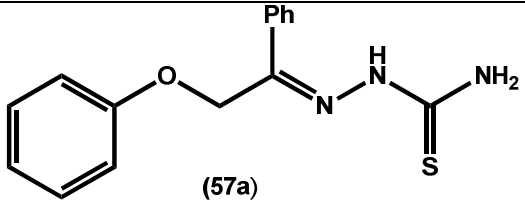
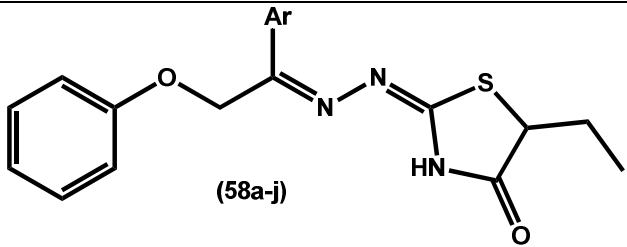
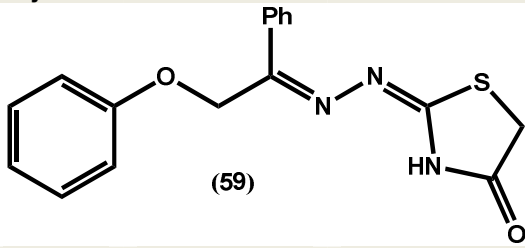
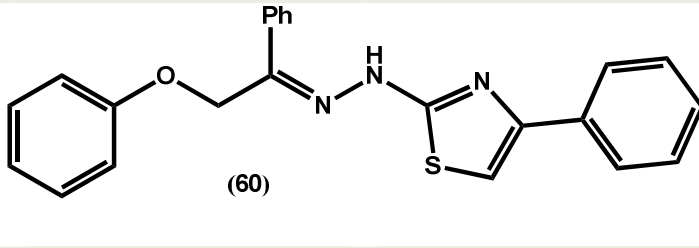


Figura 36. Atividade inibitória na cruzaína. Valores de Cl_{50} ($\pm DP$) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima.

Ao compararmos os valores de Cl_{50} para o composto (**43n**) versus (**58a**), não observamos incremento da afinidade (**figura 36**). Porém, ao compararmos os valores de Cl_{50} para o composto (**43c**) versus (**58a**), observamos um incremento significativo da afinidade, pois o composto (**43c**) é inativo, enquanto que o composto (**58a**) possui $Cl_{50} = 19.7 \pm 0.1 \mu M$.

Uma vez que nós testamos os compostos (**58a-j**) e derivados (**59**) e (**60**), prosseguimos com a avaliação, *in vitro*, das propriedades tripanocidas (**tabela 9**). Para fins de comparação, novamente a tiossemicarbazona (**57a**) foi testada.

Tabela 9: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as 2-iminotiazolidina-4-tionas (**58a-j**) e derivados (**59**, **60**).

comp.	Ar	<i>T. cruzi</i> Cl_{50} (μM)		esplenócitos BALB/c ($\mu g/mL$) ^[c]
		tripomastigotas, Y ^[a]	epimastigotas, Dm28c ^[b]	
 (57a)  (58a-j)				
57^a	Ph	2.0	4.7	25
58^a	Ph	17.7	25.0	>100
58b	4-CH ₃ Ph	97.2	ND ^[e]	>100
58c	4-CH ₃ OPh	82.0	ND	>100
58d	4-FPh	78.9	ND	>100
58e	4-ClPh	17.3	11.3	100
58f	4-BrPh	4.0	3.9	>100
58g	3,4-diClPh	50.8	ND	100
58h	4-tBuPh	74.9	ND	>100
58i	4-PhPh	10.8	14.1	>100
58j	4-PhOPh	68.5	ND	>100
 (59)  (60)				
59	-	29.9	31.9	>100
60I	-	20.7	1.8	>100
Bdz (1)	-	6.0	4.8	25
Nfx (2)	-	2.7	5.7	1

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 5 dias de incubação na presença dos compostos. ^{[b][c]} Cl_{50} com valores de desvio padrão $< \pm 10 \%$. ^[c] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[d] ND, não determinado, pois não foi possível calcular a Cl_{50} .

A tiossemicarbazona (**57a**) inibiu severamente a proliferação de epimastigotas e apresentou toxicidade elevada para tripomastigotas, com valores de Cl_{50} similares ao Bdz (**1**) e Nfx (**2**). Porém, em concentrações acima de 25 $\mu g/mL$, a tiossemicarbazonas (**57a**)

afetou a viabilidade celular em esplenócitos, tendo assim um perfil de seletividade similar ao Bdz (**1**).

Dentre as 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**), nós identificamos compostos com valores de Cl_{50} similares ao Bdz (**1**) e Nfx (**2**), porém destituídos de toxicidade elevada para esplenócitos.

A 2-iminotiazolidina-4-ona sem substituíntes *para* no anel fenílico (**58a**) apresentou propriedades tripanocidas modestas, sendo três vezes menos potente que o Bdz (**1**). A inserção de uma metila (**58b**), metóxila (**58c**) ou flúor (**58d**) na posição *para* não foi benéfica, sendo estes compostos menos potentes que o (**58a**).

Por outro lado, a inserção de um cloro (**58e**) ou bromo (**58f**) foi benéfica para a atividade tripanocida, mas não para o derivado diclorado (**58g**). O derivado com bromo (**62f**) inibiu severamente a proliferação de epimastigotas ($Cl_{50} = 3.9 \mu M$) e apresentou toxicidade elevada para tripomastigotas ($Cl_{50} = 4.0 \mu M$), sendo assim um agente tripanocida equipotente ao Bdz (**1**) e Nfx (**2**). De fato, o composto (**58f**) foi o agente tripanocida mais potente dentre a série (**58a–j**).

Interessantemente, a troca do bromo (**58f**) pelo fenil, resultando no composto (**58i**), apresentou $Cl_{50} = 10.8 \mu M$ para tripomastigotas. Porém, a troca do bromo pelo fenóxi, resultando no composto (**58j**), não foi benéfica, sendo o composto (**58j**) pouco potente ($Cl_{50} = 68.5 \mu M$, tripomastigotas). O composto com *terc*butil (**58h**) também apresentou propriedade tripanocida baixa.

Por último, temos os derivados (**59**) e (**60**). O composto (**59**) não possui a etila em C5 e apresentou $Cl_{50} = 29.9 \mu M$ para tripomastigotas. Em comparação com o seu análogo substituído em C5 (**58a**), o composto (**59**) foi quase duas vezes menos potente; reforçando assim a importância de um substituínte localizado na posição C5 do anel tiazolidínico. O derivado tiazólico (**60**) apresentou propriedades tripanocida similar ao (**59**), porém este tiazol não foi mais potente que o seu análogo (**44a**, $Cl_{50} = 19.9 \mu M$ para tripomastigotas) previamente identificado durante a série (**44a–t**).

Uma comparação das 2-iminotiazolidina-4-onas substituída em *para* (**58b–j**) *versus* 2-iminotiazolidina-4-onas não substituída (**58a**) sugere que modificações estruturais no anel fenílico em C1 alteram a magnitude das propriedades tripanocidas. Somente quando um bromo (**58e**) ou fenila (**58i**) são inseridos é que se obtém agentes tripanocidas mais potentes que o composto (**58a**). Por outro lado, se substituíntes hidrofóbicos, tais como metila (**58b**) ou *terc*butila (**58h**) são inseridos, observa-se uma diminuição substancial das propriedades tripanocidas. Estas correlações das estruturas *versus* propriedades

tripanocidas também são observadas para a atividade inibitória na cruzaina, exceto para o derivado da metoxila (**58c**). A principal excessão é do composto (**58c**). Este composto inibiu 58 ± 2 % da atividade catalítica da cruzaina, porém este composto não manifestou propriedades tripanocida relevante, apresentando CI_{50} de $82.0 \mu M$ para tripomastigotas.

De fato, não observamos uma vantagem clara das propriedades inibitórias na cruzaina dos compostos (**58b–j**) em comparação com a série inicial (**43a–r**). Entretanto, a triagem das propriedades tripanocidas dos compostos (**58b–j**) nos permitiu identificar o composto (**58f**), um agente tripanocida equipotente ao Bdz (**1**) e Nfx (**2**), porém destituído de toxicidade para esplenócitos em concentração de $25 \mu g/mL$. Em virtude destes resultados, decidimos avaliar a eficácia do composto (**58f**) em modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, de infecção pelo *T. cruzi*.

4.3.9 Avaliação das propriedades farmacológicas, *in vitro* e *in vivo*, da 2-iminotiazolidina-4-ona (**58f**) na infecção pelo *T. cruzi*

Para avaliar a eficácia da 2-iminotiazolidina-4-ona (**58f**) na infecção, *in vitro*, pelo *T. cruzi*, o mesmo protocolo experimental descrito no item 4.3.4 foi utilizado (gráfico 6).

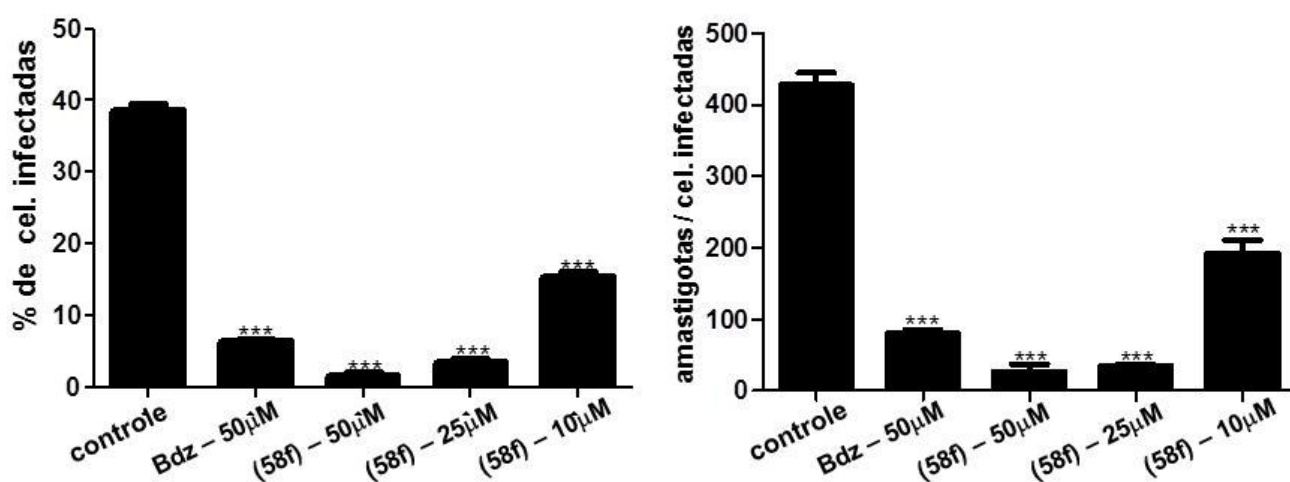


Gráfico 6: A) Porcentagem de macrófagos infectados por tripomastigotas da cepa Y. B) Proporção de amastigotas intracelulares. Bdz (**1**) é o inibidor de referência. Cada compostos foi testado em concentrações em triplicatas. Um único experimento foi realizado. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

A 2-iminotiazolidina-4-ona (**58f**) apresentou um efeito substancial sobre a infecção *in vitro*, reduzindo a porcentagem de células infectadas em uma maneira dependente da concentração. Na concentração de $50 \mu M$, o composto (**58f**) reduziu a taxa de células

infectadas e o número de amastigotas intracelulares de uma maneira mais pronunciada do que na cultura celular tratada com 50 μM Bdz (**1**).

A CI_{50} calculada para o composto (**58f**) foi de 5.20 ± 0.54 μM no ensaio de infecção. Os valores de CI_{50} calculados anteriormente para o Bdz (**1**) e o composto (**43n**) foram de 13.99 ± 0.39 e 10.11 ± 0.09 μM , respectivamente. Portanto, a 2-iminotiazolidina-4-ona (**58f**), identificada após triagem da série (**58a-j**) é duas vezes mais potente que a 2-iminotiazolidina-4-ona (**43f**), identificada dentre a série (**43a-t**) e do que o Bdz (**1**).

Os compostos (**43n**) e (**58f**) não afetam a viabilidade de esplenócitos em concentrações de até 100 $\mu\text{g/mL}$. O composto (**58f**) inibiu, *in vitro*, a infecção pelo *T. cruzi* com potência superior ao seu protótipo estrutural (**43n**), porém sem detrimento da toxicidade em mamíferos. Portanto, nos parece coerente afirmar que o redesenho estrutural, que teve como objetivo a otimização das propriedades tripanocidas da série (**43a-t**), logrou sucesso, culminando com a série (**58a-j**) e identificação do composto (**58f**).

Como limitação, o composto (**58f**) é menos potente que o K777 (**6**, CI_{50} de 1.0 μM e 0.25 μM para cepas Y e Tulahuén, respectivamente)^{85,86} e que o derivado do Tipifarnib (**30**, CI_{50} de 0.6 nM, cepa Tulahuén)⁷⁸ em ensaios de infecção *in vitro*, denotando assim a necessidade de identificar análogos do (**58f**) mais potentes. Antes de prosseguir com a tentativa de identificar análogos do (**58f**) mais potentes, nós achamos mais prudente verificar se este possui eficácia em reduzir, *in vivo*, a parasitemia.

A eficácia do composto (**58f**) em reduzir, *in vivo*, a parasitemia sanguínea foi avaliada no mesmo modelo de infecção aguda que utilizado com o composto (**43n**). Como a administração do composto (**43n**) foi bem tolerada em camundongos BALB/c sadios na dose de 250 $\mu\text{mol/kg}$, as doses de 125 (53) e 250 (107) $\mu\text{mol/kg}$ (mg/kg) foram utilizadas para avaliar a eficácia do composto (**58f**) no modelo experimental de infecção. O Bdz (**1**) foi administrado somente na dose de 250 $\mu\text{mol/kg}$ (65 mg/kg) (**gráfico 7**).

O tratamento por via oral com o (**58f**) foi bem tolerado nas duas doses testadas, sem mortalidade no período de monitoramento. Como esperado, os animais tratados com o Bdz (**1**) tiveram a parasitemia sanguínea severamente reduzida; em quatro dos seis animais tratados, a infecção foi erradicada no décimo dia. Nos animais tratados com 250 $\mu\text{mol/kg}$ da 2-iminotiazolidina-4-ona (**58f**), também se observou uma redução severa da parasitemia sanguínea. Embora com menor eficácia, a 2-iminotiazolidina-4-ona (**58f**) na dose de 125 $\mu\text{mol/kg}$ reduziu significativamente a parasitemia ($P < 0.001$) em comparação com o controle negativo.

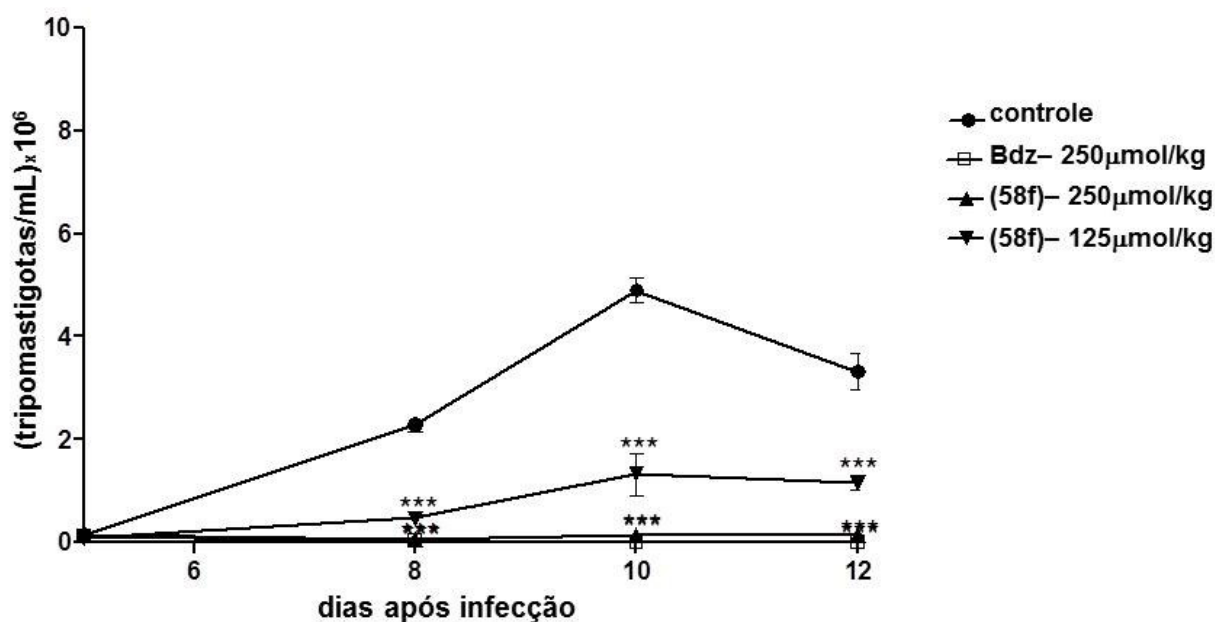


Gráfico 7: Parasitemia sanguínea em camundongos da linhagem BALB/c (fêmeas, $n=6$ /grupo) infectados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y. O grupo controle recebeu somente salina mais 20 % de DMSO. Tratamento por via oral com os compostos **(58f)** e Bdz (**1**). Um único experimento foi realizado. Resultados são expressos como média da contagem da parasitemia no grupo, com desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Ao compararmos a eficácia do tratamento na dose de 250 $\mu\text{mol/kg}$ das 2-iminotiazolidina-4-onas **(58f)** *versus* **(43n)**, a 2-iminotiazolidina-4-ona **(58f)** foi mais potente em reduzir a parasitemia, apresentando uma eficácia muito semelhante ao Bdz (**1**), corroborando assim que as 2-iminotiazolidina-4-onas **(58a–j)** possuem propriedades tripanocidas mais potentes que as 2-iminotiazolidina-4-onas **(43a–r)**.

4.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1 Conclusões

A construção estrutural das 2-iminotiazolidina-4-onas (**43b–r**) foi fundamentada na tentativa de identificar se substituíntes localizados nas posições N3 e C5 no anel tiazolidínico incrementam as propriedades tripanocidas em comparação ao composto não substituído (**43a**). Já a construção dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) teve como fundamento investigar o efeito na atividade tripanocida após a troca do anel tiazolidínico pelo tiazólico.

Com estes intuitos, as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43b–r**) foram sintetizadas através de metodologias sintéticas já implementadas em nosso laboratório, enquanto que para a síntese dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**), foi necessário identificar as condições reacionais. Estes tiazóis foram preparados em temperatura ambiente em banho de ultrassom; estas condições reacionais resultaram em rendimentos satisfatórios e praticidade no isolamento do produto.

As 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–r**), em particular os derivados contendo uma fenila localizada na posição N3 no anel heterocíclico (**43k–q**), apresentaram propriedades inibitórias na atividade catalítica da cruzaina, já os 2-imino-1,3-tiazóis (**44a–t**) foram destituídos de tais propriedades. Os derivados tiazólicos devem utilizar um mecanismo distinto dos derivados tiazolidínicos em inibir o parasita. Por outro lado, 2-iminotiazolidina-4-tionas (**43s**, **43t**) apresentaram propriedades inibitórias na atividade catalítica da cruzaina mais pronunciadas que seus análogos não tiocarbonilados (**43c**, **43o**).

Após triagem das propriedades tripanocidas dos compostos (**43a–t**) e (**44a–t**), foi possível identificar os compostos (**43n**) e (**44j**) como agentes tripanocidas tão potentes quanto o Bdz (**1**) em inibir a proliferação de epimastigotas e a viabilidade celular de tripomastigotas da cepa Y. Estes compostos foram capazes de reduzir a infecção, *in vitro*, com potência similar ao observado com o Bdz (**1**).

A 2-iminotiazolidina-4-ona (**43n**) foi identificada como o composto tripanocida bem como inibidor da cruzaina mais potente dentre os compostos (**43a–r**). Esta 2-iminotiazolidina-4-ona possui como característica estrutural a presença de uma fenila em N3 e uma isopropila em C5.

O tratamento com o composto (**43n**) por via oral na dose de 250 µmol/kg foi eficaz em reduzir a parasitemia sanguínea em um modelo de infecção aguda pelo *T. cruzi*. Todavia, com eficácia inferior que o tratamento com o Bdz (**1**), denotando assim a necessidade de otimização das propriedades tripanocidas.

Para otimizar as propriedades funcionais, as 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**) foram reestruturadas, culminando assim com o planejamento e síntese de uma segunda geração de 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**).

A triagem das propriedades tripanocidas para as 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) nos permitiu mapear as principais relações estrutura *versus* atividade tripanocida, bem como nos permitiu identificar os compostos (**58f**) e (**58i**) como agentes tripanocidas, *in vitro*, tão potentes quanto o Bdz (**1**).

O composto (**58f**) apresentou eficácia superior ao seu protótipo (**43n**) em reduzir a infecção pelo *T. cruzi* tanto em modelos *in vitro* com *in vivo*. Com a vantagem que o composto (**58f**) apresentou eficácia similar ao Bdz (**1**) em reduzir a parasitemia sanguínea.

Por um lado, não ficou muito claro se os compostos da série (**58a–j**) são mais potentes em inibir a atividade catalítica da cruzaina que os compostos da série (**43a–t**). Por outro lado, a metodologia empregada na construção racional da série (**58a–j**), nitidamente, logrou sucesso na identificação de compostos com propriedades tripanocidas mais pronunciadas que os da série (**58a–j**).

4.2 Perspectivas

O composto (**58f**) apresentou eficácia substancial, *in vivo*, na dose de 250 $\mu\text{mol/kg}$, contudo é importante estudar o efeito dose-resposta para o composto (**58f**) nos ensaios de infecção *in vivo* bem como estudar a toxicidade em camundongos tratados com o (**58f**), permitindo assim identificar a melhor dose terapêutica e o índice de seletividade.

Os compostos mais potentes nas 2-iminotiazolidina-4-onas (**43a–t**), tais como o (**43n**), possuem uma fenila na posição N3. Por motivos sintéticos, as 2-iminotiazolidina-4-onas (**58a–j**) foram planejadas sem a inserção de uma fenila em N3. A inserção deste grupo na estrutura do composto (**58f**) talvez resulte em aumento das propriedades inibitórias na cruzaina e frente ao *T. cruzi*.

O 2-imino-1,3-tiazol (**44j**) apresentou propriedades funcionais semelhantes ao composto (**44n**), contudo não foi possível avaliar a eficácia deste composto na infecção, *in vivo*, pelo *T. cruzi* nem identificar o mecanismo de ação no parasita.

Não ficou muito claro se a troca da carbonila pela tiocarbonila é vantajosa em termos das propriedades tripanocidas. A comparação com um número maior de compostos é necessário.

5.0 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO- d_6 , $CDCl_3$, D_2O) são da marca CIL (Tédia Brazil). Tiossemicarbazida foi adquirida pela Acros Organics e recristalizada em etanol. Acetato de sódio foi fundido em bico de Bunsen antes do uso. Os solventes ciclohexano, hexano, acetato de etila e tolueno foram destilados, enquanto que etanol e 2-propanol foram usados como adquirido pelos fornecedores.

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F_{254} . As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm), exceto para o composto **60c**, no qual se usou vapores de iodo. Usou-se sílica gel de 70-230 mesh na cromatografia em coluna.

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

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

Para todos os compostos inéditos, foram feitas as análises de RMN de 1H e ^{13}C e quando necessário, análises bidimensionais (DEPT, HSQC e HMBC) bem como a adição de D_2O para a localização dos sinais de NH. Os espectros de RMN 1H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para 1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para 1H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN 1H foram designadas da seguinte forma: s / singlete; d / dublete; t / tripleto; dd / duplo duplete; q / quarteto; m / multiplete.

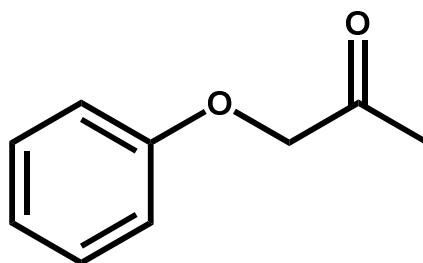
Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr. As micro-análises para C, N, H, S foram feitas em um analisador elementar Carlo Erba (modelo EA 1110). Para os espectros de absorção no ultravioleta, o instrumento de varredura Shimadzu modelo 1240 foi utilizado. Para os espectros de

massas de alta-resolução (EMAR), usou-se a técnica de ionização por electrospray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo "time-of-flight" (TOF), medidos nos aparelhos LC-IT-TOF da Shimadzu ou nanoUPLC-Xevo G2 Tof da Waters.

A difração de raios X foi realizada em um difratômetro Kappa-CCD Enraf-Nonius (câmera CCD de 95 mm). Os dados da difração de raios X foram depositados no "Cambridge Crystallographic Data Centre" (Cambridge, Inglaterra). Composto (**48a**) TS-01 (depósito 874915); (**48c**) TS-03 (depósito 874916).

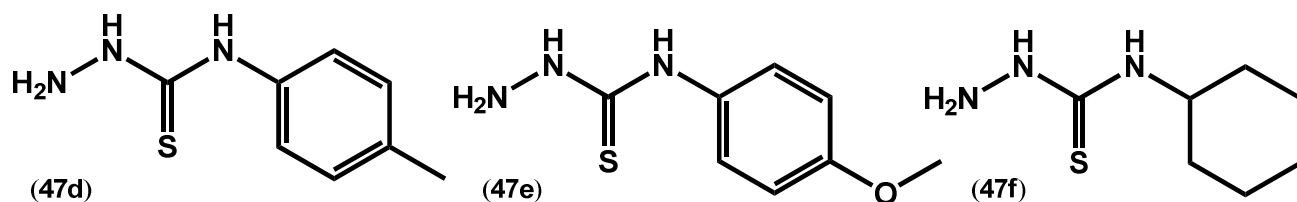
5.2 Metodologias sintéticas

5.2.1 Síntese da 1-fenóxi-2-propanona (**46**)



Em um balão de fundo redondo, 50 mmol (4.7 g) de fenol (**45**) foram solubilizados em 20 mL de butanona. Logo após, foram adicionados 70 mmol (9.7 g) do carbonato de potássio macerado e a mistura foi sonicado por 10 min. Em um vidro de penicilina, cerca de 50 mg de iodeto de potássio foi adicionado a 50 mmol (4.1 g) da mono-cloroacetona. Esta solução foi adicionada em porções na mistura reacional e mantida por 2 horas sob sonicação em temperatura ambiente. Após o consumo do fenol (acompanhado por CCD), o precipitado formado foi filtrado e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Água foi adicionada na mistura reacional e extraída com ciclohexano (3x50 mL). As frações orgânicas foram reunidas e uma segunda extração foi feita com uma solução aquosa de NaOH (10%). A fase orgânica foi então coletada e seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. 5.1g (rend.: 68%) de um líquido incolor e pouco viscoso foi obtido e comparado com o produto comercial com número de catálogo 152021 na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), registro no Chemical Abstracts Service: 621-87-4.

5.2.2 Síntese das tiossemicarbazidas (47d–f) (Wong & Dolman, 2007)⁹⁷



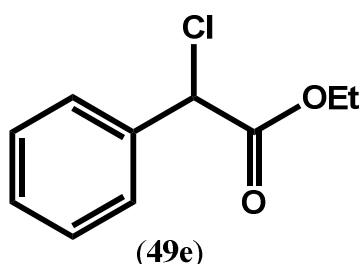
Em um balão de fundo redondo com capacidade para 50 mL, foram adicionados 2 mmol da respectiva anilina, e 4 mmol (4.0 g) de trietilamina e 10 mL de THF. A mistura foi resfriada em banho de gelo e mantida sob agitação magnética. Após 30 minutos, 2 mmol (1.5 g) de disulfeto de carbono foi lentamente gotejado com o auxílio de uma seringa. Após a mistura reacional adquirir uma coloração vermelha intensa, mais 1 mmol de disulfeto de carbono foram adicionados e a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 0–5°C durante 24 horas. Após 24 horas, resfriou-se novamente a mistura reacional e adicionou-se lentamente 2.5 mmol de hidrato de hidrazina (55%). Após a mistura reacional adquirir uma coloração amarela, a mesma foi resfriada em banho de gelo e ainda sob agitação, 15 mL de HCl (36%) foram gotejados sobre a reação seguida pela adição de 50 mL de água. 30 mL de éter dietílico foram adicionados e mantidos em agitação magnética por 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta, a fase orgânica foi removida do balão e o precipitado da fase aquosa foi então filtrado em funil de Büchner com filtro sinterizado. O produto foi transferido para o dessecador com SiO₂ sob vácuo. A respectiva tiossemicarbazida foi re-cristalizada do metanol a quente.

*N*⁴-(4-toluidil)tiossemicarbazida (**47d**): cristais incolores; rend. 51%; P.F. de 160 °C, *R*_f de 0.4 (acetato de etila).

*N*⁴-(4-metóxfenil)tiossemicarbazida (**47e**): cristais incolores; rend. 50%; P.F. de 145–146 °C, *R*_f de 0.3 (acetato de etila).

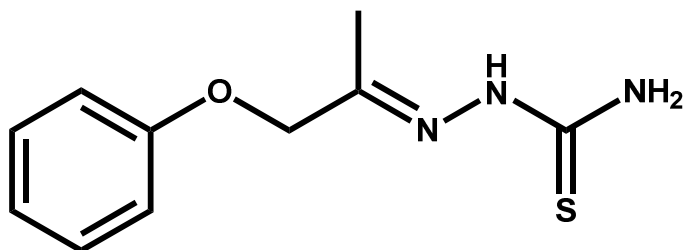
*N*⁴-(ciclohexil)tiossemicarbazida (**47f**): cristais incolores; rend. 38 %; P.F. de 100 °C, *R*_f de 0.5 (acetato de etila).

5.2.3 Síntese do 2-cloro-2-fenilacetato de etila (49e)¹⁰⁴



Em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL, 5 mmol (7.1 g) do ácido mandélico foram dissolvidos em 50 mL de etanol e a mistura foi mantida sob agitação magnética. Em seguida, 0.5 mL do ácido clorídrico foi adicionado e a reação foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 80 °C durante 5 horas. Após o término da reação, a mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Adicionou-se cerca de 50 mL de uma solução de bicarbonato de sódio, seguido pela extração da mistura aquosa com éter dietílico (2x50 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavou-se novamente com a de solução de bicarbonato de sódio, e por último com uma solução saturada de NaCl. A fase eterea foi seca com MgSO₄ anidro, o solvente removido sob pressão reduzida, levando a formação de um óleo incolor que foi transferido para o dessecador com SiO₂ e mantido sob vácuo. Em seguida, 2.6 g do ester foi transferido para um balão de fundo redondo com capacidade para 25 mL e suspenso em 10 mL de diclorometano. A mistura foi resfriada em banho de gelo e em seguida 3.1 mL do cloreto de tionila foi adicionado com a ajuda de um funil de adição. A reação foi mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente durante 24 horas. Após, mistura foi aquecida por 1 hora a 60 °C, a mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente e gelo picado foi adicionado. Adicionou-se também cerca de 30 mL de uma solução de bicarbonato de sódio, seguido pela extração da mistura aquosa com éter dietílico (3x20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavou-se novamente com a de solução de bicarbonato de sódio, e por último com uma solução saturada de NaCl. A fase eterea foi seca com MgSO₄ anidro, o solvente removido sob pressão reduzida, levando a formação de um óleo incolor que foi transferido para o dessecador com SiO₂ e depois mantido na geladeira.

5.2.4 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)tiossemicarbazida (**48a**, TS-01)



5.2.4.1 Sob agitação magnética: em um balão de 50 mL, foram adicionados 1 mmol (0.15 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 10 mL de EtOH e 1.2 mmol (0.11 g) da tiossemicarbazida (**47a**) e uma gota de ácido acético glacial. A mistura foi mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente durante 18 horas. Após, o solvente foi removido sob pressão reduzida, gelo picado foi adicionado e o precipitado formado foi filtrado e lavado abundantemente com água destilada para remover a tiossemicarbazida remanescente. O produto foi re-cristalizado com tolueno a quente.

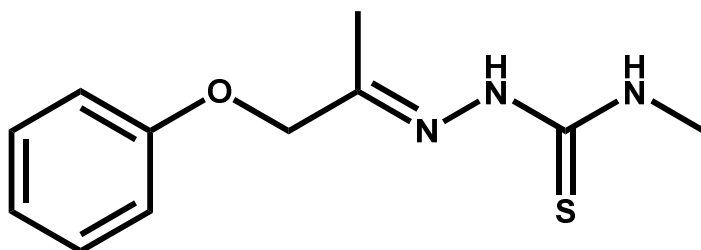
Cristais incolores; P.F.: 136 °C; Rend.: 0.16 g (71 %)

5.2.4.2 Ultrassom: em um tubo de centrifuga, foram adicionados 5 mmol (0.75 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 10 mL de EtOH e 5.2 mmol de tiossemicarbazida (**47a**) (0.50 g) e uma gota de ácido acético glacial. A mistura foi mantida sob o banho de ultrassom durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, o precipitado foi filtrado e lavado com água destilada e seco no dessecador sob vácuo. O solvente da mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e o solvente removido sob pressão reduzida até a metade e mantida no congelador, onde houve a formação de um precipitado que foi filtrado. O produto foi re-cristalizado a quente com tolueno.

Cristais incolores. Rend.: 0.87 g (78 %); P.F.: 136 °C; R_f = 0.3 (tolueno / acetato 1:1).

Análise elementar para $C_{10}H_{13}N_3SO$. Teórico: C, 53.79; H, 5.87; N, 18.82; S, 14.36. Calculado: C, 53.93; H, 5.88; N, 18.99; S, 10.06. **I.V., principais sinais** 3415 (NH_2), 3248 ($N-H$), 1586 ($C=N$) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ na presença de isômeros** 1.97 e 2.00 (s, 3H, CH_3), 4.61 e 4.85 (s, 2H, CH_2), 6.91-6.99 (m, 3H, Ar), 7.24-7.31 (m, 2H, Ar), 7.74 (s, 1H, NH_2), 8.23 (s, 1H, NH_2), 10.28 (s, 1H, NH). Os sinais com δ em 7.74, 8.23 e 10.28 ppm desaparecem após adição de D_2O . **RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ na presença de isômeros** 13.9 e 20.0 (CH_3), 65.2 e 71.1 (CH_2), 114.4 e 114.7 (CH, Ar), 121.0 e 121.27 (CH, Ar), 129.5 e 129.6 (CH, Ar), 148.37 e 149.4 ($C=N$), 157.6 e 158.0 ($C-O$), 178.9 e 179.2 ($C=S$). Obs: algumas destas atribuições foram confirmadas pelo HMBC. **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{10}H_{14}N_3SO$ $[M+H]^+$: 224.0858; encontrado 224.0859.

5.2.5 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)-4-metiltiossemicarbazida (**48b**, TS03)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 10 mmol (1.5 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 20 mL de etanol, 4-metiltiossemicarbazida (**47b**) (11 mmol, 1.1 g) e duas gotas de ácido acético glacial. O produto foi recristalizado com uma mistura de ciclohexano/tolueno a quente.

Cristais incolores; Rend.: 1.7 g (69 %); P.F.: 120 °C; R_f = 0.3 (acetato de etila / hexano 1:1)

Análise elementar para $C_{11}H_{15}N_3OS$. Teórico: C, 55.67; H, 6.37; N, 17.71; S, 13.51.

Calculado: C, 56.26; H, 6.15; N, 16.62; S, 9.32. **I.V., principais sinais** 3377 e 3206 (N–H),

2976 (C–H), 1597 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , na presença de isômeros**

1.99 (s, 3H, CH_3), 2.98 (d, 3H, N- CH_3 , acoplamento com o N–H), 4.63 (s, 2H, CH_2), 6.93–7.00 (m, 3H, Ar), 7.13–7.31 (m, 2H, Ar), 8.30 (s largo, 1H, CH_3NH), 10.17 (s largo, 1H, NH).

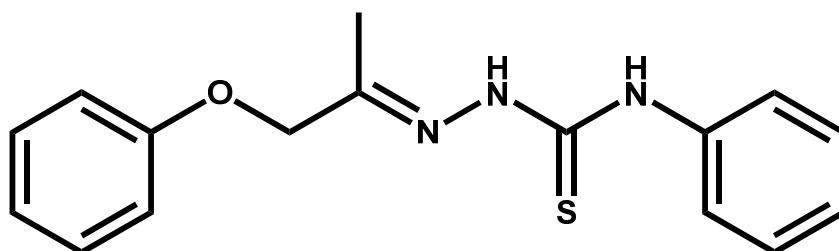
RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ na presença de isomêros 13.7 e 19.85 (CH_3), 30.6 (N-

CH_3), 65.17 e 71.2 (CH_2), 114.3 e 114.6 (CH, Ar), 120.8 e 121.1 (CH, Ar), 129.3 e 129.4

(CH, Ar), 147.7 (C=N), 157.9 (C–O), 178.9 (C=S). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{11}H_{16}N_3OS$

$[M+H]^+$: 238.1014; encontrado 238.1005.

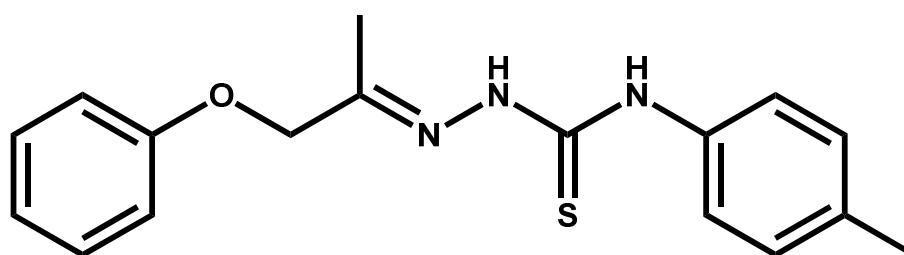
5.2.6 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)-4-feniltiossemicarbazida (**48c**, TS-02)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 10 mmol (1.5 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 4-feniltiossemicarbazida (**47c**) (11 mmol, 2.0 g), 20 mL de etanol e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado a quente com uma mistura de tolueno / ciclohexano.

Cristais incolores. Rend.: 2.4 g (80 %); P.F.: 120-122 °C; $R_f = 0.4$ (acetato de etila / hexano 1:2). **Análise elementar para $C_{16}H_{17}N_3OS$.** Teórico: C, 64.19; H, 5.72; N, 14.04; S, 10.71. Calculado: C, 64.12; H, 5.78; S, 9.51; N, 14.26. **I.V., principais sinais** 3283 (N–H), 1592 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , na presença de isômeros** 2.07 e 2.11 (s, 3H, CH_3), 4.74 e 4.95 (s, 2H, CH_2), 6.94-6.98 (t, 1H, Ar), 7.02-7.04 (m, 2H, Ar), 7.16-7.19 (t, 1H, Ar), 7.27-7.36 (m, 4H, Ar), 7.56-7.58 (m, 2H, Ar), 9.90 (s, 1H, ArNH), 10.61 (NH). Após a adição de 3 gotas de D_2O , os sinais com δ 9.90 e 10.61 ppm desaparecem. **RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ na presença de isômeros** 13.9 e 19.9 (CH_3), 65.3 e 70.7 (CH_2), 114.4 (CH, Ar), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 124.5 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 138.7 (C–N, Ar), 149.0 (C=N), 157.9 (C–O, Ar), 176.8 (C=S). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{16}H_{18}N_3SO$ $[M+H]^+$: 300.1171; encontrado 300.1185.

5.2.7 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)-4-(4-toluil)tiósemicarbazida (**48d**, TSP-01)

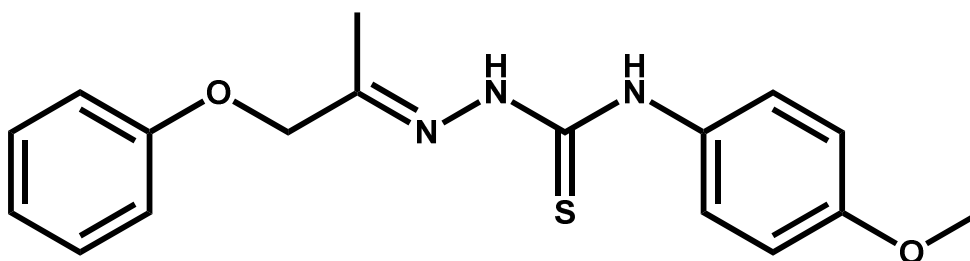


Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 3 mmol (0.45 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 4-(4-toluil)tiósemicarbazida (**47d**) (3 mmol, 0.63 g), 20 mL de etanol e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado a quente com benzeno.

Cristais incolores. Rend.: 0.6 g (66 %); P.F.: 131 °C; $R_f = 0.4$ (acetato de etila / hexano 1:2) **Análise elementar para $C_{17}H_{19}N_3SO$.** Teórico: C, 65.15; H, 6.11; N, 13.41; S, 10.23. Calculado: C, 65.20; H, 5.98; N, 13.26; S, 9.80. **I.V., principais sinais** 3283 (N–H), 1590 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , na presença de isômeros** 2.05 e 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.22 (s, 3H, CH_3), 4.70 e 4.95 (s, 2H, CH_2), 6.94-6.98 (t, 1H, Ar), 7.02-7.04 (m, 2H, Ar), 7.20 (d, 2H, J 11 Hz, Ar), 7.40 (m, 2H, Ar), 7.71 (d, 2H, J 11 Hz, Ar), 9.90 (s, 1H, ArNH), 10.63 (NH). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ na presença de isômeros** 13.9 e 19.9 (CH_3), 55.5 (CH_3), 65.3 e 70.7 (CH_2), 114.1 (CH, Ar), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 124.5 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 130 (CH, Ar), 138.7 (C–N,

Ar), 149.0 (C=N), 157.9 (C–O, Ar), 176.8 (C=S). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{17}H_{20}N_3OS$ $[M+H]^+$: 314.1327; encontrado 314.1205.

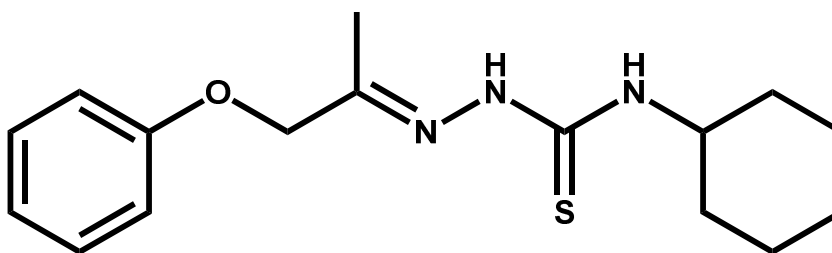
5.2.8 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)-4-(4-anisil)tiossemicarbazida (**48e**, TSA-01)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 3 mmol (0.45 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 4-(4-anisil)tiossemicarbazida (**47e**) (3 mmol, 0.66 g), 20 mL de etanol e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado a quente com tolueno.

Cristais incolores. Rend.: 0.82 g (82 %); P.F.: 117 °C; R_f = 0.5 (acetato de etila / hexano 1:2). **Análise elementar para $C_{17}H_{19}N_3SO_2$** . Teórico: C, 61.98; H, 5.81; N, 12.76; S, 9.73. Calculado: C, 62.01; H, 5.80; N, 12.51; S, 9.10. **I.V., principais sinais** 3288 (N–H), 1600 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , na presença de isômeros** 2.05 e 2.09 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, CH_3), 4.98 e 5.30 (s, 2H, CH_2), 6.93 (d, 2H, J 9.1 Hz, Ar), 6.98 (m, 3H, Ar), 7.30 (t, 2H, Ar), 7.91 (d, 2H, J 9.1 Hz, Ar), 8.93 (s largo, 2H, NH_2), 10.70 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ , na presença de isômeros** 14.0 (CH_3), 55.6 (CH_3), 65.3 e 70.7 (CH_2), 114.1 (CH, Ar), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 124.5 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 130 (CH, Ar), 138.7 (C–N, Ar), 150.1 (C=N), 157.9 (C–O, Ar), 176.8 (C=S).

5.2.9 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)-4-(ciclohexil)tiossemicarbazida (**48f**, TSC-01)

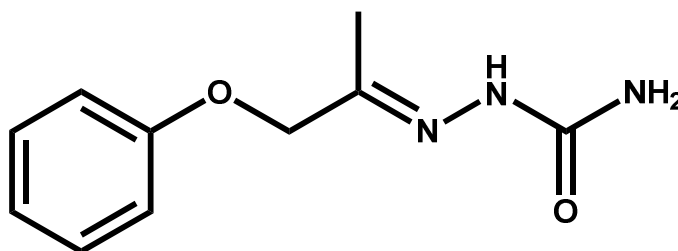


Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 2 mmol (0.30 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), 4-(ciclohexil)tiossemicarbazida (**47f**) (2 mmol, 0.44 g), 20 mL de

etanol e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado a quente com uma mistura de ciclohexano / tolueno.

Cristais incolores. Rend.: 0.4 g (65 %); P.F.: 101 °C; R_f = 0.3 (tolueno). **Análise elementar para $C_{16}H_{23}N_3SO$.** Teórico: C, 62.92; H, 7.59; N, 13.76; S, 10.50. Calculado: C, 62.71; H, 7.64; N, 13.76; S, 10.21. **I.V., principais sinais** 3288 (N–H), 1600 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ , na presença de isômeros** 1.98-2.15 (m, 9H, 3xCH₂ e 1xCH₃), 2.31-2.46 (m, 5H, CH e 2xCH₂), 4.50 e 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.93-7.00 (m, 3H, Ar), 7.13-7.31 (m, 2H, Ar), 9.80 e 10.70 (dois s, 2H, NH). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ na presença de isômeros** 14.0 (CH₃), 19.9 (CH₂), 22.1 (CH₂), 22.5 (CH₂), 29.4 (CH), 65.3 e 69.1 (CH₂), 114.1 (CH, Ar), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 124.5 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 130 (CH, Ar), 138.7 (C–N, Ar), 150.1 (C=N), 176.8 (C=S).

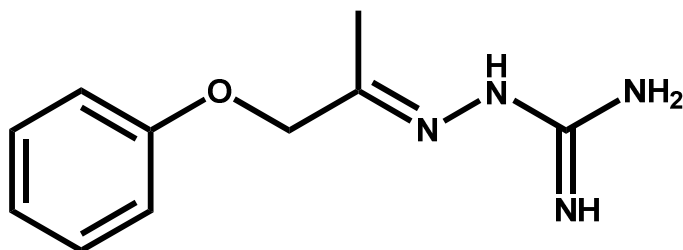
5.2.10 1-(1-Fenóxi-2-ilideno)semicarbazida (48g, TS-08)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 2 mmol (0.30 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**) cloridrato de semicarbazida (2.1 mmol, 0.23 g), 1 mmol (0.082 g) de acetato de sódio anidro em 5 mL de etanol e 1mL de água destilada. O produto foi re-cristalizado do etanol a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.35 g (85 %); P.F.: 175-177 °C; R_f = 0.2 (acetato de etila). **Análise elementar para $C_{10}H_{13}N_3O_2$.** Teórico: C, 57.96; H, 6.32; N, 20.28. Calculado: C, 58.13; H, 6.92; N, 19.90. **I.V., principais sinais** 3472 (NH₂), 3198 (N–H), 1758 (C=O), 1673 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ** 1.86 (s, 3H, CH₃), 4.56 (s, 2H, CH₂), 6.33 (s, 2H, NH₂), 6.92-6.98 (m, 3H, Ar), 7.26-7.30 (m, 2H, Ar), 9.26 (s largo, 1H, NH). Os sinais em 6.33 e 9.26 desaparecem após adição de D₂O. **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ** 14.1 (CH₃), 71.5 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 144.0 (C=N), 157.1 (C–O, Ar), 158.1 (C=O).

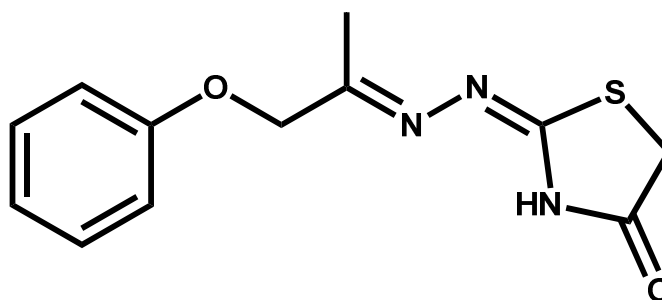
5.2.11 1-(1-Fenóxi-propil-2-ilideno)guanilhidrazina (48h, TS09)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.4.2**: 1 mmol (0.15 g) da 1-fenóxi-2-propanona (**46**), carbonato de aminoguanidina (1.2 mmol, 0.13 g), acetato de sódio anidro (1 mmol, 0.082 g) em 5 mL de etanol. Na CCD, o composto foi revelado com vapores de iodo. O produto foi re-cristalizado com etanol a quente.

Cristais amarelos. Rend.: 0.14g (64 %); P.F.:114-115 °C; $R_f = 0.1$ (acetato de etila / metanol 9.8 / 0.2). **Análise elementar para $C_{10}H_{14}N_4O$** . Teórico: C, 58.24; H, 6.84; N, 27.17. Calculado: C, 58.31; H, 6.71; N, 20.41. **I.V., principais sinais** 3315 e 3287 (N–H), 1689 (C=N), 1597 (C=N) cm^{-1} . **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6)**, δ 1.94 (s, 3H, CH_3), 4.60 (s, 2H, CH_2), 6.91-6.99 (m, 3H, Ar), 7.25 (m, 2H, Ar). **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6 + 3 gotas de D_2O)**, δ 1.94 (s, 3H, CH_3), 4.60 (s, 2H, CH_2), 6.91-6.99 (m, 3H, Ar), 7.25 (m, 2H, Ar). **RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6)**, δ 14.1 (CH_3), 71.6 (CH_2), 114.7 (CH, Ar), 120.7 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 149.9 (C=N), 158.1 (C–O, Ar), 175.0 (C=N–H).

5.2.12 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]tiazolidina-4-ona (43a, TS-1.1)



Em um balão de 250 mL sob agitação magnética, foram adicionados 5 mmol (1.12 g) do composto (**48a**), 100 mL de etanol e 15 mmol (1.2 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento por cerca de 20 minutos, foram adicionados 10 mmol (1.6 g) do 2-bromoacetato de etila (**49a**) e a reação foi então mantida sob refluxo durante 18 horas (monitorada por CCD). Após este tempo, o sal formado foi filtrado e a mistura reacional foi resfriada no congelador. O precipitado formado foi separado em funil de Büchner com filtro sinterizado e lavado com água gelada e depois foi transferido para o dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel (eluente: hexano → hexano / tolueno 1:1) e em seguida cristalizado em ciclohexano.

Cristais incolores.

Rend: 0.70 g (53 %)

P.F.: 130–131°C

$R_f = 0.4$ (acetato de etila / tolueno 1:1)

Análise elementar para $C_{12}H_{13}N_3O_2S$.

Teórico: C, 54.74; H, 4.98; N, 15.96; S, 12.18. Calculado: C, 54.42; H, 5.02; S, 11.91; N, 15.78.

I.V., principais absorções

3196 (N–H), 3006 (C–H), 1734 (C=O), 1649 e 1595 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

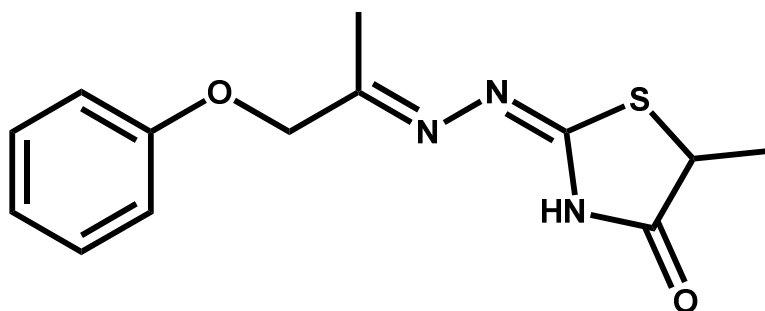
1.98 (s, 3H, CH_3), 3.83 (s, 2H, S– CH_2), 4.66 (s, 2H, CH_2), 6.92–6.99 (m, 3H, Ar), 7.28 (t, 2H, Ar), 11.90 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

14.8 (CH_3), 32.8 (CH_2 , heterociclo), 70.9 (CH_2), 114.5 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 158.1 (C=N), 161.9 (C–O, Ar), 164.1 (S–C=N), 173.9 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para $C_{12}H_{14}N_3O_2\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 286.0626; encontrado 286.0599.

5.2.13 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-5-metiltiazolidina-4-ona (43b, TS-05)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.23 g) da hidrazona (**48a**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 2.0 mmol do 2-bromopropionato de metila (**49b**) (0.35 g), 20 mL de etanol. O produto foi submetido a uma cromatografia em coluna com sílica gel (eluente: hexano → hexano \ acetato 3:1).

Cristais amarelos.

Rend: 0.11g (38%)

P.F.: 117–120 °C

R_f = 0.2 (acetato de etila \ hexano 1:1)

Análise elementar para $C_{13}H_{15}N_3SO_2$.

Teórico: C, 56.30; H, 5.45; N, 15.15; S, 11.56. Calculado: C, 56.16; H, 5.38; S, 11.21; N, 15.09.

I.V., principais bandas

3195 (N–H), 1710 (C=O), 1640 e 1602 (C=N) cm^{-1}

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

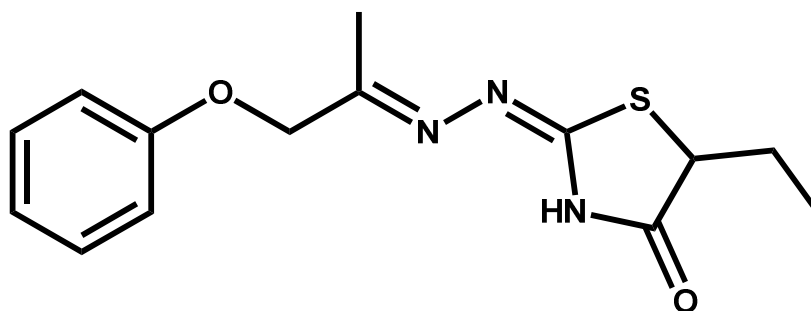
1.46 (d, 3H, J 7.8 Hz, CH_3), 2.02 (s, 3H, CH_3), 4.11 (t, 1H, J 7.8 Hz, CH), 4.66 (s, 2H, CH_2), 6.93-6.99 (m, 3H, Ar), 7.28 (t, 2H, Ar), 11.79 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.5 (CH_3), 18.6 (CH_3), 41.7 (CH), 70.9 (CH_2), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 158.0 (C=N), 161.8 (C–O, Ar), 161.9 (S–C=N), 176.5 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para $C_{13}H_{16}N_3SO_2$ $[M+H]^+$: 278.0963; encontrado 278.0995. Calculado para $[M+Na]^+$: 300.0783; encontrado 300.0581.

5.2.14 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona (43c, TS-10)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.22 g) da hidrazona (**48a**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 2 mmol do 2-bromobutanoato de etila (**49c**) (0.38 g), 20 mL de etanol. O produto foi submetido a uma cromatografia em coluna com sílica gel (eluente: hexano → hexano / tolueno 2:1).

Cristais amarelos.

Rend: 0.15 g (51 %)

P.F.: 133 °C

R_f = 0.3 (acetato de etila / tolueno 1:1)

Análise elementar para $C_{14}H_{17}N_3SO_2$.

Teórico: C, 57.71; H, 5.88; N, 14.42; S, 11.00. Calculado: C, 57.64; H, 5.69; N, 14.25; S, 10.89.

I.V., principais absorções

1715 (C=O), 1614 e 1596 (C=N) cm^{-1}

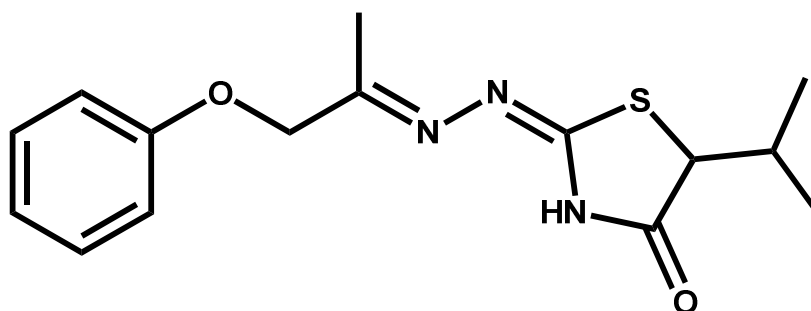
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

0.94 (t, J 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.73-1.81 (m, 1H, J 7.2 e 4.4 Hz, CH_2), 1.92-1.98 (m, 1H, J 7.2 e 4.4 Hz, CH_2), 2.02 (s, 3H, CH_3), 4.12-4.15 (q, 1H, J 7.6 e 4.4 Hz, CH assimétrico), 4.67 (s, 2H, CH_2), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.28 (t, 2H, Ar), 11.94 (s largo, 1H, NH). Obs: algumas destas atribuições foram confirmadas pelo HSQC.

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

10.1 (CH_3), 14.5 (CH_3), 25.4 (CH_2), 48.8 (CH), 70.9 (CH_2), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 158.1 (C=N), 161.9 (C-O, Ar), 162.1 (S-C=N), 175.6 (C=O).

5.2.15 2-(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona)-5-isopropiltiazolidina-4-ona (43d, TS-38)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48a**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromo-2-metilbutanoato de etila (**49d**) (0.40 g), 20 mL de etanol. O produto foi re-cristalizado com ciclohexano a quente.

Cristais incolores.

Rend: 0.14 g (38 %)

P.F.: 139 °C

R_f = 0.5 (hexano / acetato de etila 5:1)

Análise elementar para C₁₅H₁₉N₃SO₂

Teórico: C, 58.99; H, 6.27; N, 13.76; S, 10.50. Calculado: C, 59.53; H, 6.21; S, 8.69; N, 13.38.

I.V., principais absorções

2967 (C-H), 1725 (C=O), 1640 e 1580 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

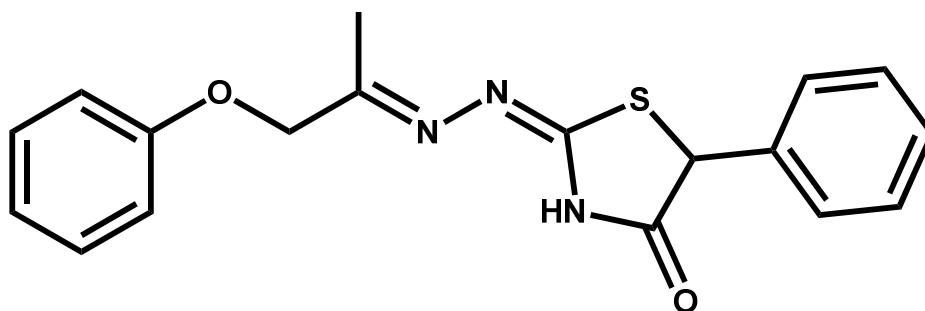
0.86 (d, 3H, *J* 4.0 Hz, CH₃), 0.96 (d, 3H, *J* 4.0 Hz, CH₃), 1.97 e 2.01 (dois s, 3H, CH₃), 2.35 (s largo, 1H, CH), 4.25 (s, 1H, CH), 4.61 e 4.67 (dois s, 2H, CH₂), 6.98 (t, 3H, Ar), 7.28 (d, 2H, Ar), 11.86 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

14.7 (CH₃), 16.2 (CH₃), 20.2 (CH₃), 29.8 (CH), 54.4 (CH), 70.9 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.4 (Ar), 158.1 (C=N), 162.1 (C), 175.2 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₂₀N₃SO₂ [M+H]⁺: 306.1276; encontrado 306.1265. Calculado para [M+Na]⁺: 328.1096; encontrado 328.1077.

5.2.16 2-[(1-Fenóxi-propil-2-ilideno)hidrazona]-5-feniltiazolidina-4-ona (43e, TS43)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48a**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 2.0 mmol do 2-cloro-2-fenilacetato de etila (**49e**) (0.39 g), 20 mL de metanol. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.14 g (41 %);

P.F.: 150 °C;

Rf = 0.5 (tolueno / acetato de etila 2:1).

Análise elementar para $C_{18}H_{17}SO_2N_3$

Teórico: C, 63.70; H, 5.05; N, 12.38; S, 9.45. Calculado: C, 64.01; N, 12.60; H, 5.60; S, 8.73.

I.V., principais absorções

3391 (N–H), 1709 (C=O), 1640 e 1599 (C=N) cm^{-1}

RMN 1H (400 MHz, acetona- d_6), δ na presença de isômeros

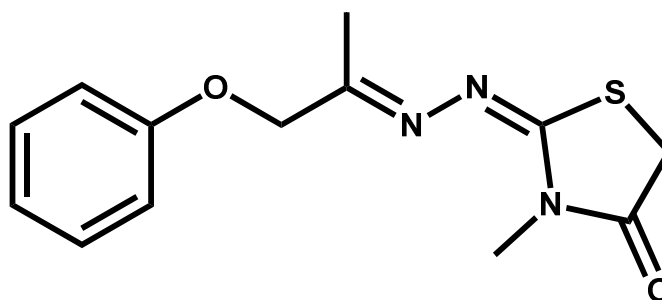
1.92 e 2.06 (s, 3H, CH_3), 3.58 (s largo, NH+HDO), 4.67 e 5.01 (s, 2H, CH_2), 5.34 (s, 1H, CH), 6.90-7.01 (m, 3H, Ar), 7.27 (s largo, 7H, Ar).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, acetona- d_6), δ na presença de isômeros

14.8 e 26.3 (CH_3), 51.4 (CH), 65.1 e 71.0 (CH_2), 114.2 (CH, Ar), 114.2 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 137.4 (C–N, Ar), 157.0 e 157.1 (C=N), 161.2 e 162.8 (C–O, Ar), 164.4 (S–C=N), 176.1 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para $C_{18}H_{18}SO_2N_3$ $[M+H]^+$: 340.1120; encontrado 340.1129. Calculado para $[M+Na]^+$: 362.0939; encontrado 362.0943. Calculado para $[M+K]^+$: 378.0679; encontrado 378.0647.

5.2.17 2-[(1-Fenóxi-2-propilideno)hidrazona]-3-metiltiazolidina-4-ona (43f, TS-13)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.24 g) da hidrazona (**48b**), acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g), 20 mL de etanol, (1.2 mmol, 0.20 g) e 1.5 mmol do 2-bromoacetato de etila (**47a**) (0.25 g). O produto foi recristalizado a quente do ciclohexano.

Cristais incolores.

Rend: 0.15 g (54%)

P.F.: 112 °C

$R_f = 0.3$ (acetato de etila / hexano 1:2)

Análise elementar para $C_{13}H_{15}N_3SO_2$.

Teórico: C, 56.30; H, 5.45; N, 15.15; S, 11.56. Calculado: C, 56.54; H, 5.40; S, 9.89; N, 14.91.

I.V., principais absorções

1721 (C=O), 1636 e 1580 (C=N) cm^{-1}

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

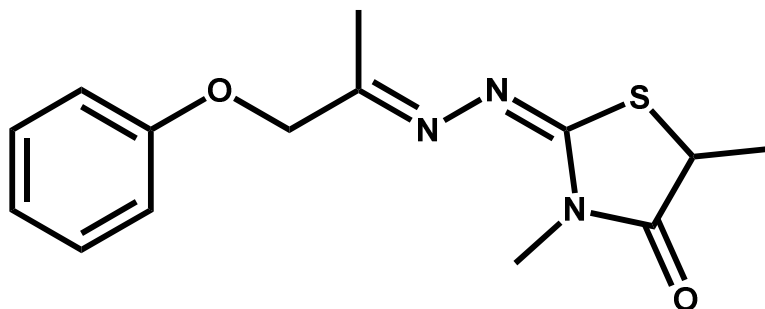
2.06 (s, 3H, CH_3), 3.13 (s, 3H, N- CH_3), 3.87 (s, 2H, CH_2), 4.70 e 5.02 (dois s, 2H, CH_2-O), 6.94-7.00 (m, 3H, Ar), 7.27-7.30 (m, 2H, Ar).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.4 e 19.4 (CH_3), 29.2 (N- CH_3), 31.9 (CH_2), 64.9 e 70.8 (CH_2), 114.2 (CH, Ar), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 158.0 (C=N), 163.1 (C), 172.0 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para $C_{13}H_{16}N_3SO_2$ $[M+H]^+$: 278.0963; encontrado 278.0995. Calculado para $[M+Na]^+$: 300.0783; encontrado 300.0581.

5.2.18 2-[(1-Fenóxi-propil-2-ilideno)hidrazona]-3,5-dimetiltiazolidina-4-ona (43g, TS-04)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.23 g) da hidrazona (**48b**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromopropionato de metila (**47b**) (0.26 g), 20 mL de etanol. O produto foi re-cristalizado a quente com tolueno.

Cristais incolores.

Rend: 0.18 g (60%)

P.F.: 67 °C

R_f = 0.3 (acetato de etila \ hexano 1:1)

Análise elementar para C₁₄H₁₇N₃SO₂.

Teórico: C, 57.71; H, 5.88; N, 14.42; S, 11.00. Calculado: C, 57.70; H, 5.91; N, 14.38; S, 11.10.

I.V., principais absorções

1722 (C=O), 1638 (C=N), 1574 (C=N) cm⁻¹

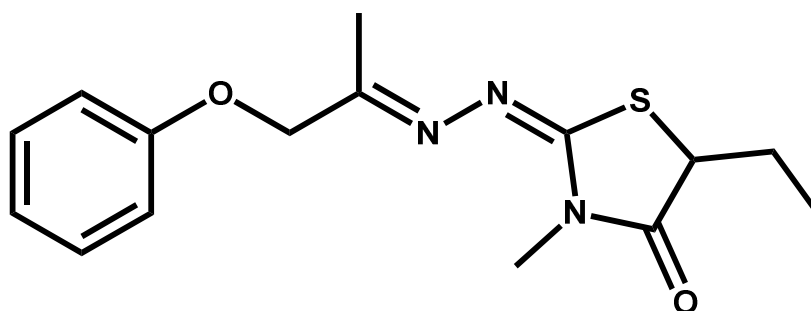
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

1.48 (d, 3H, *J* 7.2 Hz, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 3.14 (s, 3H, NCH₃), 4.16-4.23 (q, 1H, *J* 7.2 Hz, CH), 4.69 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.26-7.31 (m, 2H, Ar).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

14.6 (CH₃), 18.7 (CH₃), 29.4 (N-CH₃), 41.2 (CH), 70.8 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 158.1 (C=N), 161.9 (C-O, Ar), 163.3 (S-C=N), 175.1 (C=O).

5.2.19 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-metil-5-etiltiazolidina-4-ona (43h, TS12)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.24 g) da hidrazona (**48b**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromobutanoato de etila (**49c**) (0.28 g), 20 mL de etanol. O produto foi apenas lavado com éter etílico e obtido com pureza satisfatória.

Cristais incolores.

Rend: 0.26 g (72%)

P.F.: 129 °C

R_f = 0.4 (ciclohexano \ tolueno 1:1)

Análise elementar para C₁₅H₁₉N₃O₂S.

Teórico: C, 58.99; N, 13.76; H, 6.27; S, 10.50. Calculado: C, 59.15; H, 6.09; N, 13.32; S, 9.43.

I.V., principais absorções

1718 (C=O), 1636 e 1582 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

0.92 (t, 3H, *J* 7.5 Hz, CH₃), 1.74-1.82 (m, 1H, CH₂), 1.95-1.98 (m, 1H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 3.18 (s, 3H, N-CH₃), 4.21-4.25 (q, 1H, *J* 4.2 e 7.8 Hz, CH), 4.70 (s, 2H, CH₂), 6.93-7.01 (m, 3H, Ar), 7.26-7.32 (m, 2H, Ar).

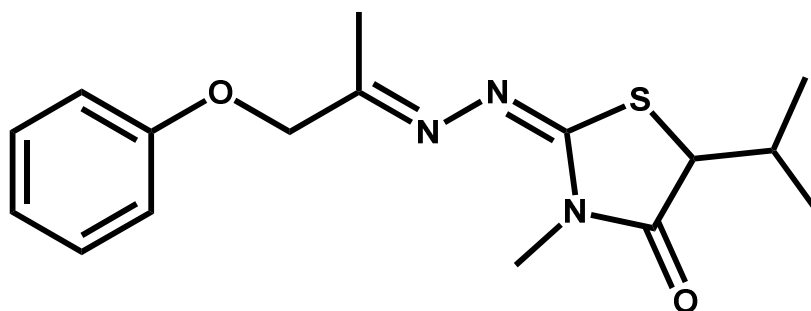
RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

10.3 (CH₃), 14.6 (CH₃), 25.5 (CH₂), 29.3 (N-CH₃), 48.2 (CH), 70.8 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 158.0 (C=N), 161.9 (C-O, Ar), 163.4 (S-C=N), 174.2 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₂₀N₃O₂S [M+H]⁺: 306.1276; encontrado 306.1283.

Calculado para [M+Na]⁺: 328.1096; encontrado 328.1111.

5.2.20 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-metil-5-isopropiltiazolidina-4-ona (43i, TS11)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48b**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromo-2-metilbutanoato de etila (**49d**) (0.31 g), 20 mL de etanol. O produto foi re-cristalizado do ciclohexano a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.25 g (70 %)

P.F.: 138 °C

R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 5:1)

Análise elementar para C₁₆H₂₁N₃SO₂

Teórico: C, 60.16; H, 6.63; N, 13.16; S, 10.04. Calculado: C, 60.40; H, 6.14; N, 13.11; S, 9.66.

I.V., principais absorções

1717 (C=O), 1634 e 1581 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

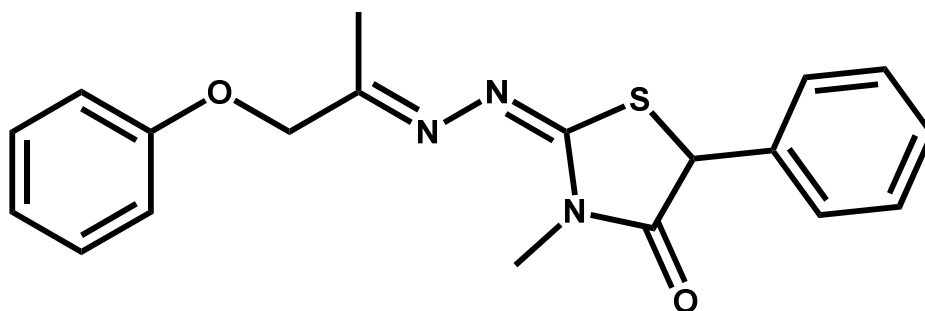
0.80 (d, 3H, *J* 6.6 Hz, CH₃), 0.97 (d, 3H, *J* 6.9 Hz, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₂), 2.39-2.42 (m, 1H, CH), 3.151 e 3.34 (s, 3H, N-CH₃), 4.31 (d, 1H, *J* 3.9 Hz, CH), 4.70 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.26-7.31 (m, 3H, Ar).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

14.5 (CH₃), 16.4 (CH₃), 20.2 (CH₃), 30.4 (CH), 39.8 (CH₃-N), 53.7 (CH), 70.8 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 158.1 (C=N), 161.9 (C-O, Ar), 163.5 (S-C=N), 173.7 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₂₂N₃SO₂ [M+H]⁺: 320.1433; encontrado 320.0915. Calculado para [M+Na]⁺: 342.1252; encontrado 343.0737.

5.2.21 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-metil-5-feniltiazolidina-4-ona (43j, TS46)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48b**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-cloro-2-fenilacetato de etila (**49e**) (0.3 g), 20 mL de metanol. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend: 0.25 g (70 %)

P.F.: 157 °C

Rf = 0.5 (tolueno / acetato de etila 2:1)

Análise elementar para C₁₉H₁₉SO₂N₃

Teórico: C, 64.57; H, 5.42; N, 11.89; S, 9.07. Calculado: C, 64.41; N, 12.01; H, 5.39; S, 9.13.

I.V., principais absorções

1716 (C=O), 1628 e 1589 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ na presença de isômeros

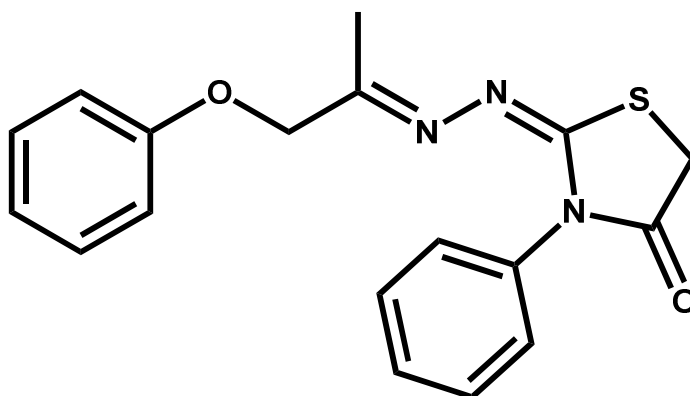
1.98 e 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.23 e 3.36 (s, 3H, N-CH₃), 4.71 (s, 2H, CH₂), 5.49 (s, 1H, CH), 6.94-7.00 (m, 3H, Ar), 7.25-7.30 (m, 3H, Ar), 7.37 (s largo, 4H, Ar).

RMN ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ na presença de isômeros

14.7 (CH₃), 26.3 e 29.8 (N-CH₃), 50.0 (CH), 70.7 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 136.5 (C-N, Ar), 158.0 (C=N), 161.5 (C-O, Ar), 163.8 (S-C=N), 172.9 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₂₀SO₂N₃ [M+H]⁺: 354.1276; encontrado 354.0728. Calculado para [M+Na]⁺: 376.1496; encontrado 376.0529.

5.2.22 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-feniltiazolidina-4-ona (43k, TS-06)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48c**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromoacetato de etila (**49a**) (0.25 g), 20 mL de etanol. O produto foi recristalizado a quente com tolueno.

Cristais incolores.

Rend: 0.18 (50%)

P.F.: 139 °C

$R_f = 0.3$ (acetato de etila \ hexano 1:2)

Análise elementar para $C_{18}H_{17}N_3O_2S$.

Teórico: C, 63.70; H, 5.05; N, 12.38; S, 9.45. Calculado: C, 63.65; H, 5.13; N, 12.28; S, 10.31.

I.V., principais bandas

3059 (C–H) 1727 (C=O), 1632 e 1580 (C=N) cm^{-1}

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

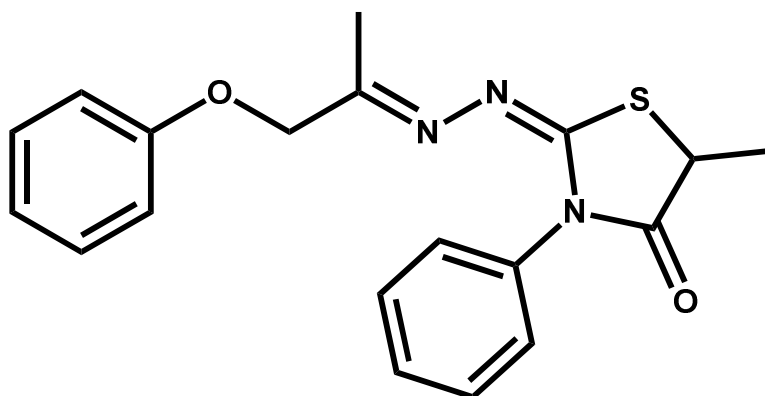
1.81 (s, 3H, CH₃), 4.05 (s, 2H, CH₂, heterociclo), 4.67 (s, 2H, CH₂), 6.91-6.98 (m, 2H, Ar), 7.23-7.30 (m, 2H, Ar), 7.30-7.51 (m, 6H, Ar).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.4 (CH₃), 32.0 (CH₂, heterociclo), 70.6 (CH₂), 114.0 (CH, Ar), 114.6 (CH, Ar), 120.8 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 134.9 (C–N, Ar), 157.5 (C=N), 162.1 (C–O, Ar), 164.3 (S–C=N), 171.4 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para $C_{18}H_{18}N_3O_2S$ $[M+H]^+$: 340.1120; encontrado 340.1109.

5.2.23 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-fenil-5-metiltiazolidina-4-ona (43l, TS-07)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48c**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromopropionato de metila (**49b**) (0.26 g), 20 mL de etanol. O produto foi re-cristalizado a quente com tolueno.

Cristais amarelos.

Rend: 0.3 g (84%)

P.F.: 138 °C

R_f = 0.5 (acetato de etila / tolueno 1:1)

Análise elementar para C₁₉H₁₉N₃SO₂.

Teórico: C, 64.57; H, 5.42; N, 11.89; S, 9.07. Calculado: C, 64.50; H, 5.39; S, 10.89; N, 11.80.

I.V., principais absorções

1722 (C=O), 1631 e 1577 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

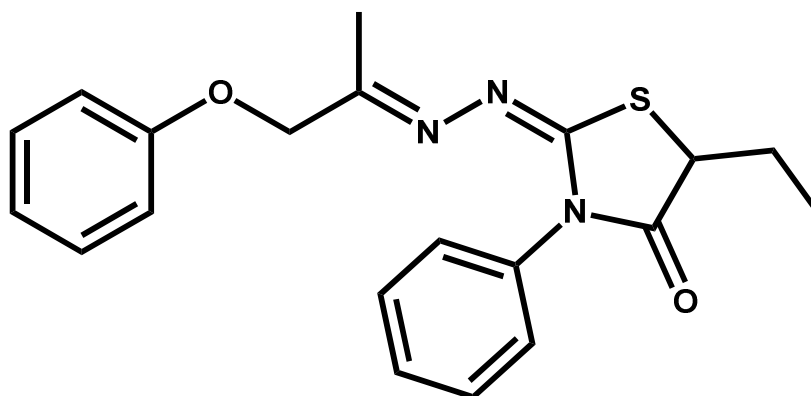
1.61 (d, 3H, *J* 7.2 Hz, CH₃), 1.80 e 1.97 (s, 3H, CH₃), 4.40 (q, 1H, *J* 7.2 Hz, CH), 4.67 (s, 2H, CH₂), 6.73 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, Ar), 6.93 (m, 1H, Ar), 7.23 (t, 2H, *J* 7.9 Hz, Ar), 7.38-7.51 (m, 5H, Ar).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

18.8 e 19.4 (CH₃), 26.2 (CH₃), 41.2 (CH), 64.5 (CH₂), 114.0 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 135.0 (C–N, Ar); 157.6 (C=N), 160.9 (C–O, Ar), 164.4 (S–C=N), 174.6 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₂₀N₃SO₂ [M+H]⁺: 354.1276; encontrado 354.1264. Calculado para [M+Na]⁺: 376.1096; encontrado 376.1089.

5.2.24 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-fenil-5-etiltiazolidina-4-ona (43m, TS24)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48c**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromobutanoato de etila (**49c**) (0.28 g), 20 mL de etanol. O produto foi re-cristalizado com uma mistura de tolueno \ ciclohexano (1:1).

Cristais incolores.

Rend: 0.26 g (70 %)

P.F.: 118 °C

R_f = 0.5 (tolueno)

Análise elementar para C₂₀H₂₁N₃O₂S.

Teórico: C, 65.37; H, 5.76; N, 11.44; S, 8.73. Calculado: C, 65.31; H, 5.64; N, 11.27; S, 8.07.

I.V., principais absorções

1728 (C=O), 1634 e 1576 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

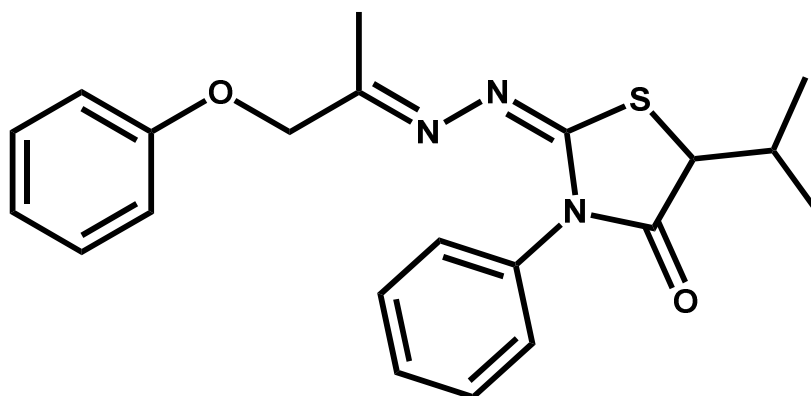
1.01 (t, *J* 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.89-1.98 (m, 1H, CH₂), 2.03-2.09 (m, 1H, CH₂), 4.38-4.41 (q, 1H, *J* 7.2 e 4.4 Hz, CH), 4.66 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.98 (m, 3H, Ar), 7.26-7.30 (m, 2H, Ar), 7.34 e 7.36 (duplo s, 2H, Ar), 7.41-7.44 (m, 1H, Ar), 7.48-7.51 (m, 2H, Ar).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

10.1 (CH₃), 14.6 (CH₃), 25.7 (CH₂), 48.1 (CH), 70.6 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 134.9 (C-N, Ar), 158.0 (C=N), 161.5 (C-O, Ar), 163.6 (S-C=N), 173.8 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado para C₂₀H₂₂N₃SO₂ [M+H]⁺: 368.1433; encontrado 368.1422. Calculado para [M+Na]⁺: 390.1252; encontrado 390.1215.

5.2.25 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-fenil-5-isopropiltiazolidina-4-ona (43n, TS-40)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48c**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromo-2-metilbutanoato de etila (**49d**) (0.31 g), 20 mL de etanol. O produto foi apenas lavado com éter etílico e obtido com pureza satisfatória.

Cristais incolores.

Rend.: 0.3 g (78 %);

P.F.: 128-130 °C;

R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 5:1).

Análise elementar para C₂₁H₂₃SO₂N₃

Teórico: C, 66.12; H, 6.08; N, 11.01; S, 8.41. Calculado: C, 66.48; N, 10.81; H, 5.70; S, 6.73.

I.V., principais absorções

1724 (C=O), 1632 e 1579 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

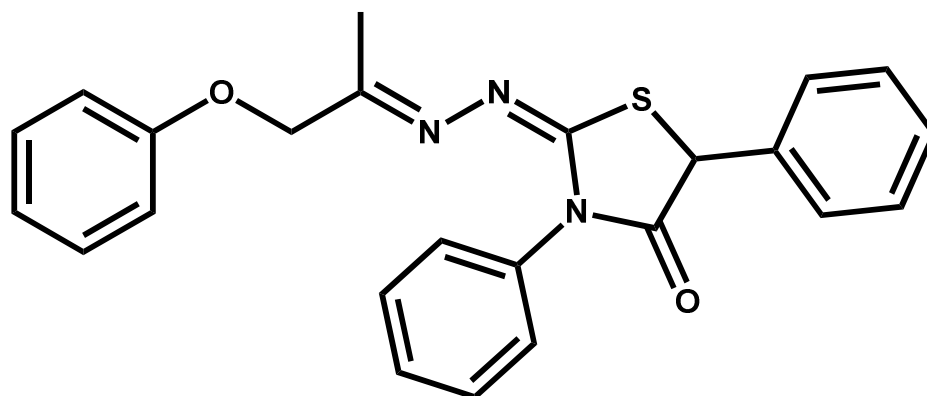
1.01 (d, 3H, *J* 4.0 Hz, CH₃), 1.08 (d, 3H, *J* 4.0 Hz, CH₃), 1.86 (s, 3H, CH₃), 2.51 (t, 1H, *J* 4.0 e 3.4 Hz, CH), 4.52 (m, 1H, *J* 3.4 Hz, CH), 4.72 (s, 2H, CH₂), 6.97-7.03 (m, 3H, Ar), 7.31-7.38 (m, 4H, Ar), 7.46-7.56 (m, 3H, Ar).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

14.6 (CH₃), 16.4 (CH₃), 20.1 (CH₃), 30.4 (CH), 53.6 (CH), 70.6 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 134.8 (C-N, Ar), 158.0 (C=N), 161.4 (C-O, Ar), 163.8 (S-C=N), 173.4 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₁H₂₄SO₂N₃ [M+H]⁺: 382.1589; encontrado 382.1580. Calculado para [M+Na]⁺: 404.1409; encontrado 404.1381.

5.2.26 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3,5-difeniltiazolidina-4-ona (43o, TS45)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da hidrazona (**48c**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-cloro-2-fenilacetato de etila (**49e**) (0.3 g), 20 mL de metanol. O produto foi re-cristalizado do ciclohexano a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.32 g (74 %);

P.F.: 159 °C;

R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 2:1)

Análise elementar para C₂₄H₂₁SO₂N₃

Teórico: C, 69.37; H, 5.09; N, 10.11; S, 7.72. Calculado: C, 69.35; H, 5.00; N, 10.21; S, 8.01.

I.V., principais absorções

1715 (C=O), 1628 e 1590 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆), δ na presença de isômeros

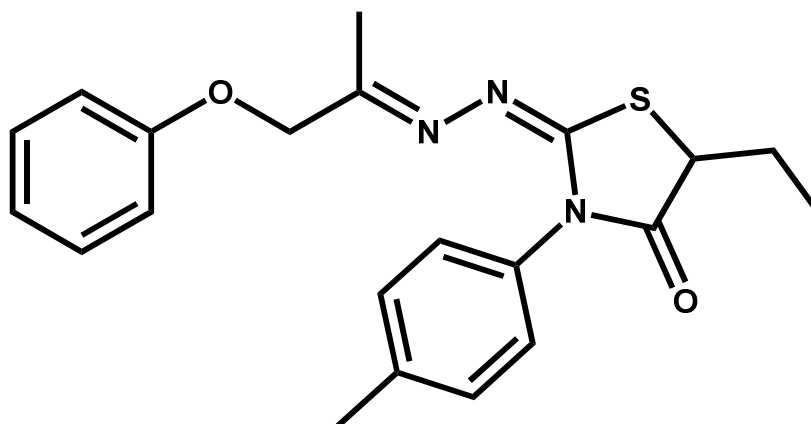
1.43 e 1.93 (s, 3H, CH₃), 4.69 e 4.81 (s, 2H, CH₂), 5.49 (s, 1H, CH), 6.91-7.03 (m, 3H, Ar), 7.24-7.30 (m, 2H, Ar), 7.35-7.39 (m, 3H, Ar), 7.41-7.756 (m, 6H, Ar).

RMN ¹³C (100 MHz, acetona-d₆), δ na presença de isômeros

14.8 e 27.5 (CH₃), 51.4 (CH), 72.0 (CH₂), 115.2 (CH, Ar), 115.7 (CH, Ar), 121.9 (CH, Ar), 129.01 (CH, Ar), 129.32 (CH, Ar), 129.38 (CH, Ar), 129.42 (CH, Ar), 129.72 (CH, Ar), 129.84 (CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 136.6 (C-N, Ar), 138.0 (C-N, Ar), 159.6 (C=N), 162.4 (C-O, Ar), 165.0 (S-C=N), 173.3 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₄H₂₂SO₂N₃ [M+H]⁺: 416.1433; encontrado 416.1419.

5.2.27 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-(4-toluil)-5-etiltiazolidina-4-ona (43p, TS52)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.31 g) da hidrazona (**48d**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromobutanoato de etila (**49c**) (0.28 g), 20 mL de etanol. O produto foi re-cristalizado com uma mistura de tolueno \ ciclohexano (1:1).

Cristais incolores.

Rend: 0.26 g (68 %)

P.F.: 140 °C

R_f = 0.5 (tolueno)

Análise elementar para C₂₁H₂₃O₂N₃S. Teórico: C, 66.12; H, 6.08; N, 11.01; S, 8.41. Calculado: C, 66.10; H, 6.01; N, 11.11; S, 9.10.

I.V., principais absorções: 1728 (C=O), 1634 e 1576 (C=N) cm⁻¹

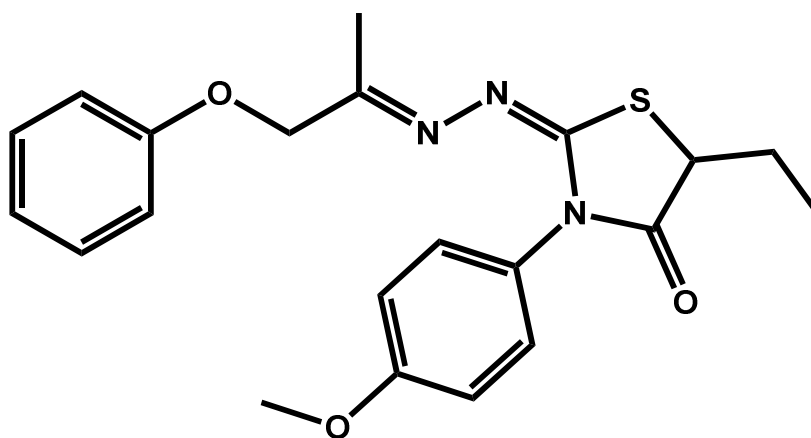
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

1.01 (t, *J* 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.89-1.98 (m, 1H, CH₂), 2.03-2.09 (m, 1H, CH₂), 2.67 (s, 3H, CH₃) 4.38-4.40 (q, 1H, *J* 7.2 e 4.5 Hz, CH), 4.66 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.98 (m, 3H, Ar), 7.20-7.27 (m, 2H, Ar), 7.29 (d, 2H, Ar), 7.60 (d, 2H, Ar).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

10.1 (CH₃), 14.6 (CH₃), 23.5 (CH₃), 25.7 (CH₂), 48.1 (CH), 70.6 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 134.9 (C–N, Ar), 158.0 (C=N), 161.5 (C–O, Ar), 163.6 (S–C=N), 174.1 (C=O).

5.2.28 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-(4-anisil)-5-etiltiazolidina-4-ona (43q, TS53)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.32 g) da hidrazona (**48e**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromobutanoato de etila (**49c**) (0.28 g), 20 mL de etanol. O produto foi recristalizado a quente com tolueno.

Cristais incolores.

Rend: 0.28 g (70 %)

P.F.: 162 °C

R_f = 0.4 (tolueno/ciclohexano)

Análise elementar para C₂₁H₂₃O₃N₃S.

Teórico: C, 63.45; N, 10.57; H, 5.83; S, 8.07. Calculado: C, 63.44; H, 5.91; N, 10.42; S, 8.99.

I.V., principais absorções:

1728 (C=O), 1630 e 1576 (C=N) cm⁻¹

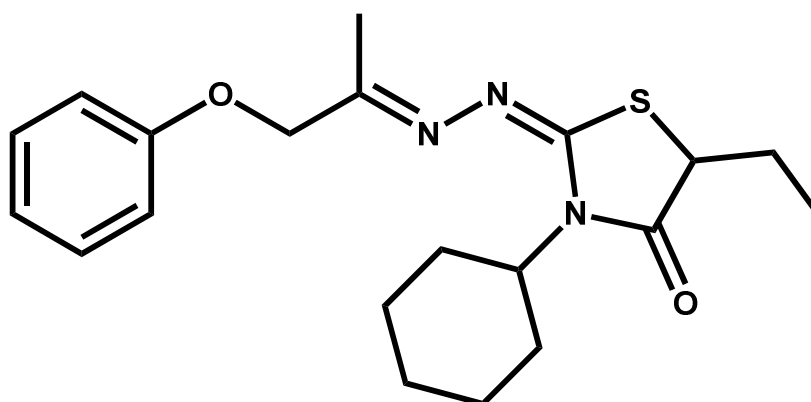
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

1.00 (t, *J* 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.89-1.98 (m, 1H, CH₂), 2.02-2.08 (m, 1H, CH₂), 3.82 (s, 3H, OCH₃) 4.38-4.40 (q, 1H, *J* 7.2 e 5 Hz, CH), 4.66 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.98 (m, 3H, Ar), 7.20-7.27 (m, 2H, Ar), 7.29 (d, 2H, *J* 9.1 Hz, Ar), 7.69 (d, 2H, *J* 9.1 Hz, Ar).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

11.0 (CH₃), 14.6 (CH₃), 25.7 (CH₂), 48.1 (CH), 54.0 (CH₃), 63.5 e 70.6 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 134.9 (C–N, Ar), 155 (C–O, Ar) 157.0 (C=N), 161.5 (C–O, Ar), 163.6 (S–C=N), 174.1 (C=O).

5.2.28 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3-(ciclohexil)-5-etiltiazolidina-4-ona (43r, TS54)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.31 g) da hidrazona (**48f**), o acetato de sódio (3 mmol, 0.25 g) e 1.5 mmol do 2-bromobutanoato de etila (**49c**) (0.28 g), 20 mL de etanol. O produto foi recristalizado a quente com ciclohexano.

Cristais incolores.

Rend: 0.26 g (71 %)

P.F.: 139-140 °C

R_f = 0.2 (tolueno/ciclohexano 7:3)

Análise elementar para C₂₀H₂₇O₂N₃S.

Teórico: C, 64.31; H, 7.29; N, 11.25; S, 8.58. Calculado: C, 64.31; H, 7.21; N, 11.39; S, 9.00.

I.V., principais absorções:

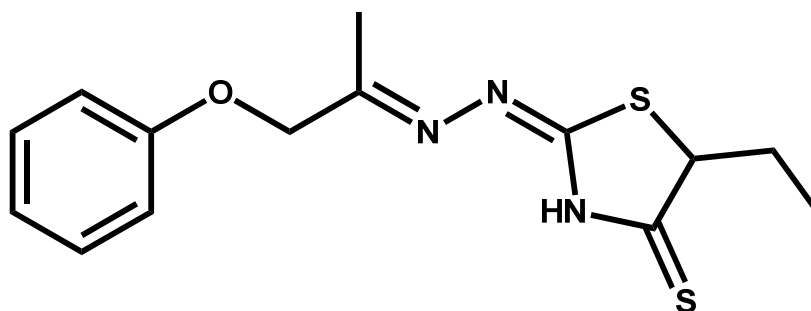
1728 (C=O), 1630 e 1576 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

1.00 (t, *J* 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.14-1.29 (m, 4H, CH₂), 1.62-1.79 (m, 4H, CH₂), 1.79 (s, 3H, 1xCH₃), 1.90-1.99 (m, 1H, CH₂), 2.02-2.08 (m, 1H, CH₂), 3.98-4.02 (m, H, CH), 4.30-4.36 (q, 1H, *J* 7.0 Hz, CH), 4.66 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.98 (m, 3H, Ar), 7.19-7.26 (m, 2H, Ar).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₀H₂₈SO₂N₃ [M+H]⁺: 374.1902; encontrado 374.1919.

5.2.29 2-[(1-Fenóxi-propil-2-ilideno)hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-tiona (43s, TS-50)



Em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL, foram adicionados 1.5 mmol (0.34 g) da tiazolinona (**43c**, **TS-10**) dissolvida em 50 mL de uma mistura de 1,4-dioxano/tolueno (1:1). A mistura foi aquecida até 60° C e mantida sob agitação magnética. Em seguida, adicionou-se 2.5 mmol (1.0 g) do reagente de Lawesson [2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiodifosfetano-2,4-ditiona] (**50**) em porções. A reação foi mantida sob agitação magnética em aquecimento brando (60 °C) durante 24 horas. Após o término da reação, a mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Adicionou-se cerca de 100 mL de água, seguido pela extração da mistura aquosa com éter dietílico (4x50 mL). Após extração e separação das fases, a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro e o solvente removido sob pressão reduzida, levando a formação de um sólido de coloração marrom que foi transferido para o dessecador com SiO₂ e mantido sob vácuo. O produto foi purificado em cromatografia em coluna com sílica gel (eluente: hexano → hexano / acetato de etila 7:3).

Cristais amarelos. Rend: 0.28 g (60 %). P.F.: 111 °C. R_f = 0.6 (acetato de etila / tolueno 1:1)

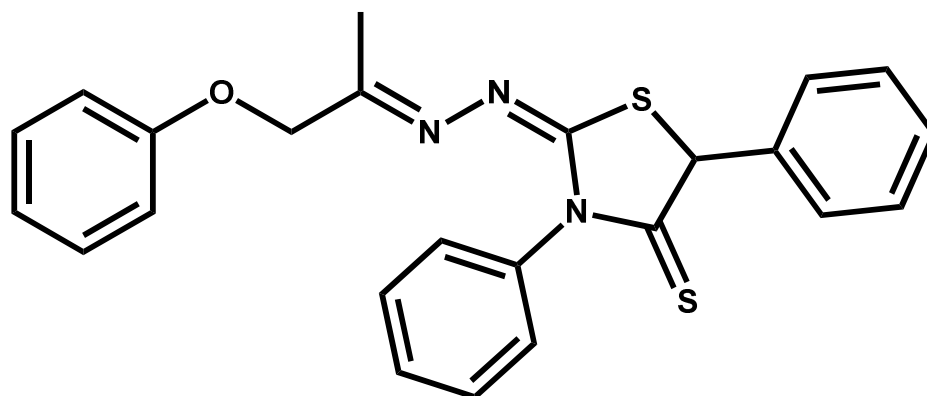
Análise elementar para C₁₄H₁₇N₃S₂O. Teórico: C, 54.69; H, 5.57; N, 13.67; S, 20.86. Calculado: C, 54.71; H, 5.60; N, 14.05; S, 19.99.

I.V., principais absorções 1620 e 1590 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ 0.92 (t, 3H, J 7.5 Hz, CH₃), 1.74-1.82 (m, 1H, CH₂), 1.95-1.98 (m, 1H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 4.20-4.24 (q, 1H, J 4.2 e 7.8 Hz, CH), 4.70 (s, 2H, CH₂), 6.93-7.00 (m, 3H, Ar), 7.26-7.32 (m, 2H, Ar).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆), δ 10.3 (CH₃), 14.6 (CH₃), 25.5 (CH₂), 49.0 (CH), 70.8 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 158.0 (C=N), 161.9 (C-O, Ar), 163.4 (S-C=N), 188.9 (C=S).

5.2.30 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazona]-3,5-difeniltiazolidina-4-tiona (43t, TS51)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.29**: 0.5 mmol (0.2 g) da 4-tiazolinona (**43o**, **TS-45**), e 1.0 mmol (0.5 g) do reagente de Lawesson (**50**) em 30 mL de tolueno / 1,4-dioxano. O produto foi purificado em cromatografia em coluna com sílica gel (eluente: hexano → hexano / acetato de etila 7:3).

Cristais amarelos.

Rend.: 0.3 g (54 %);

P.F.: 131 °C;

R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 2:1)

Análise elementar para C₂₄H₂₁S₂ON₃:

Teórico: C, 66.79; H, 4.90; S, 14.86; N, 9.74. Calculado: C, 66.81; H, 5.00; N, 15.11; S, 14.01.

I.V., principais absorções:

1620 e 1596 (C=N) cm⁻¹

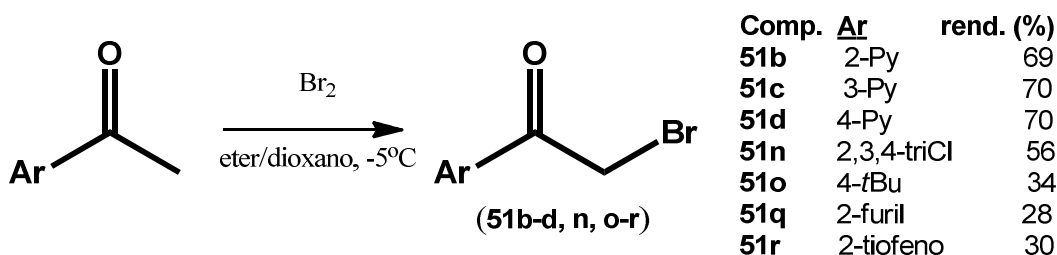
RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆), δ

1.90 (s, 3H, CH₃), 4.69 (s, 2H, CH₂), 5.40 (s, 1H, CH), 6.91-7.03 (m, 3H, Ar), 7.24-7.30 (m, 2H, Ar), 7.35-7.40 (m, 3H, Ar), 7.42-7.756 (m, 6H, Ar).

RMN ¹³C (100 MHz, acetona-d₆), δ

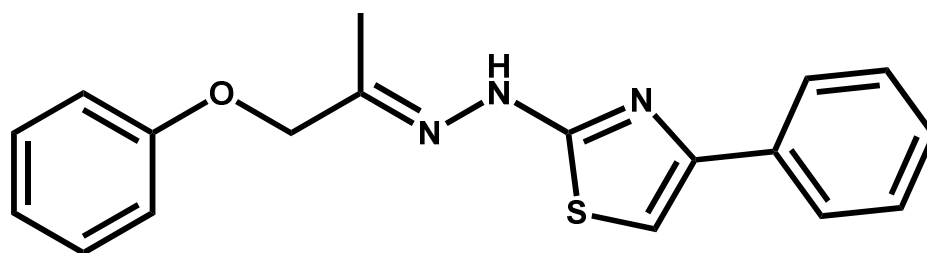
27.5 (CH₃), 56.1 (CH), 72.0 (CH₂), 115.2 (CH, Ar), 115.7 (CH, Ar), 121.9 (CH, Ar), 129.01 (CH, Ar), 129.32 (CH, Ar), 129.38 (CH, Ar), 129.72 (CH, Ar), 129.84 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 136.6 (C-N, Ar), 138.0 (C-N, Ar), 159.6 (C=N), 162.4 (C-O, Ar), 168.0 (S-C=N), 189.1 (C=S).

5.2.31 Síntese do 2-bromoacetofenonas (**51b**, **51c**, **51d**, **51n**, **51o**, **51q**, **51r**)¹¹⁴



Exemplo (**51b**): em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL, 20 mmol (2.5 g) da 2-acetilpiridina foram dissolvidos em 20 mL de éter-dioxano e a mistura foi resfriada com banho de gelo e mantida em agitação magnética. Com o auxílio de um funil de adição, 1.1 mL do bromo foi adicionado lentamente gota a gota e a reação foi mantida sob agitação magnética. Após 3 horas, mais 0.5 mL do bromo foi adicionado e a mistura foi mantida sob agitação durante 24 horas. Após o término da reação, adicionou-se cerca de 50 mL de uma solução de bissulfito de sódio, seguido pela extração da mistura aquosa com éter dietílico (4x25 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavou-se com uma solução saturada de NaCl. A fase etérea foi seca com MgSO₄ anidro, o solvente removido sob pressão reduzida até a metade do volume e depois mantida na geladeira, levando a formação de solido amarelo gema que foi filtrado e transferido para o dessecador com SiO₂ e mantido sob vacúo. O mesmo procedimento foi utilizado para as demais acetofenonas, e os produtos foram utilizados para a síntese dos 2-imino-1,3-tiazóis (**44a-t**) sem prévia purificação.

5.2.32 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-fenil-1,3-tiazol (44a, TS15)



Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1 mmol (0.24 g) da hidrazona (**48a**), 1.1 (0.21 g) mmol da 2-bromoacetofenona (**51a**) e 5 mL de 2-propanol. A mistura foi sonicada a temperatura ambiente. Após cerca de dois minutos, um precipitado róseo começou a ser formado, e o acompanhamento da reação por CCD mostrou a formação de um produto com R_f abaixo da bromoacetofenona e acima da hidrazona (**48a**). Após 30 minutos, a mistura reacional foi removida do banho de ultrassom. O precipitado formado foi resfriado na geladeira e depois filtrado em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavando-se com 2-propanol e com água gelada e em seguida transferida para o dessecador e mantido sob vácuo. O produto foi recristalizado com metanol a quente.

Cristais levemente rosea.

Rend.: 0.25 g (77 %);

P.F.: 157 °C;

$R_f = 0.4$ (tolueno)

I.V., principais sinais

1618 (C=N), cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

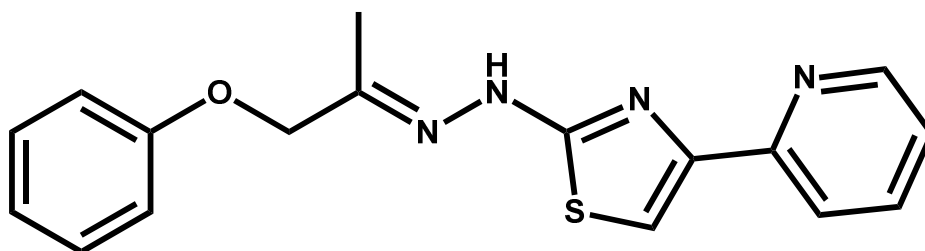
2.03 (s, 3H, CH_3), 4.63 (s, 2H, CH_2), 6.07 (s largo, 1H, N-H), 6.93-7.01 (m, 3H, 2H Ar e 1H tiazol), 7.27-7.42 (m, 6H, Ar), 7.83-7.86 (m, 2H, Ar).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.7 (CH_3), 71.8 (CH_2), 104.5 (CH, tiazol), 115.2 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 129.9 (Ar), 134.7 (Ar), 148.1 ($\text{C}=\text{CH}$, tiazol), 158.1 (C-O), 169.9 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 324.1171; encontrado 324.1206. Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 346.0990; encontrado 346.1029.

5.2.33 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(2-piridina)-1,3-tiazol (44b, TS21)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2-bromo-1-(2-piridinil)etanona (**51b**) (0.21 g). O produto foi re-cristalizado em metanol a quente.

Cristais verdes.

Rend.: 0.24 g (74 %)

P.F.: 136 °C

R_f = 0.4 (acetato de etila)

I.V., principais sinais

3364 (N–H), 1620 e 1582 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

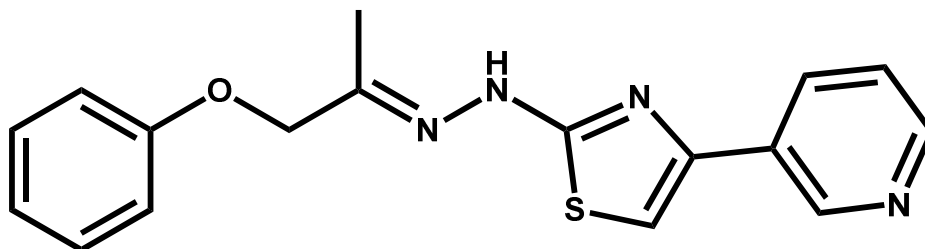
2.05 (s, 3H, CH_3), 4.65 (s, 2H, CH_2), 5.5-6.5 (s largo, 1H, NH), 6.92-7.02 (m, 3H, Ar), 7.27-7.31 (m, 2H, Ar), 7.82 (t, 1H, J 8.0 e 9.6 Hz, Ar), 8.14 (s, 1H, CH tiazol), 8.35 (d, 1H, J 10 Hz, Ar), 8.46 (t, 1H, J 10 Hz, Ar), 8.75 (d, 1H, J 8 e 9.6 Hz, Ar).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

13.0 e 14.6 (CH_3), 69.71 e 71.4 (CH_2), 114.4 (CH, tiazol), 114.8 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 123.1 (CH, Ar), 124.7 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 143.3 (CH, Ar), 143.6 (CH, Ar), 144.8 (CH, Ar), 146.4 (Ar), 149.2 ($\text{C}=\text{CH}$, tiazol), 158.0 (C=N), 158.7 (C–O, Ar), 170.0 e 170.6 (S–C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{SO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 325.1123; encontrado 325.1155. Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 347.0943; encontrado 347.0980.

5.2.34 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(3-piridina)-1,3-tiazol (44c, TS35)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2-bromo-1-(3-piridinil)etanona (**51c**) (0.21 g). O produto foi recristalizado em metanol a quente.

Cristais verdes.

Rend.: 0.2 g (61 %)

P.F.: 136 °C

R_f = 0.4 (acetato de etila)

I.V., principais sinais

1621 (C=N), 1586 (C=N) cm^{-1}

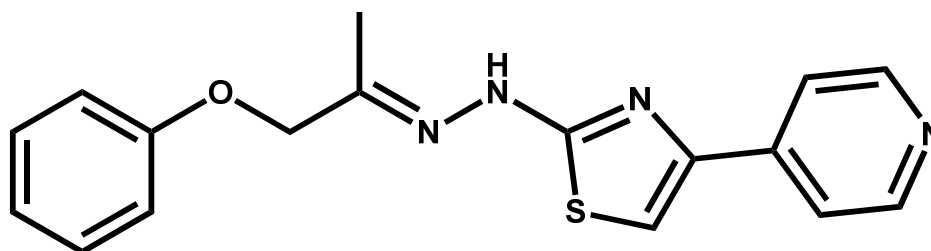
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

2.05 (s, 3H, CH_3), 4.64 (s, 2H, CH_2), 5.5-6.5 (s largo, 1H, NH), 6.92-7.02 (m, 3H, Ar), 7.27-7.30 (m, 2H, Ar), 7.82 (t, 1H, J 10 Hz, Ar), 8.14 (s, 1H, CH tiazol), 8.40 (d, 2H, J 10 Hz, Ar), 8.46 (t, 1H, J 10 Hz, Ar), 8.81 (s, 1H, Ar).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.1 (CH_3), 69.71 e 71.4 (CH_2), 114.4 (CH, tiazol), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 131.2 (Ar), 137.0 (Ar), 148.2, 149.1 (C=N), 158.0 (C-O, Ar), 169.4 (S-C=N).

5.2.35 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-piridina)-1,3-tiazol (44d, TS30)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2-bromo-1-(4-piridinil)etanona (**51d**) (0.21 g). O produto foi re-cristalizado em metanol a quente.

Cristais verdes.

Rend.: 0.23 g (70 %)

P.F.: 140 °C

R_f = 0.4 (acetato de etila)

I.V., principais sinais

3339 (N–H), 1617 e 1567 (C=N) cm^{-1}

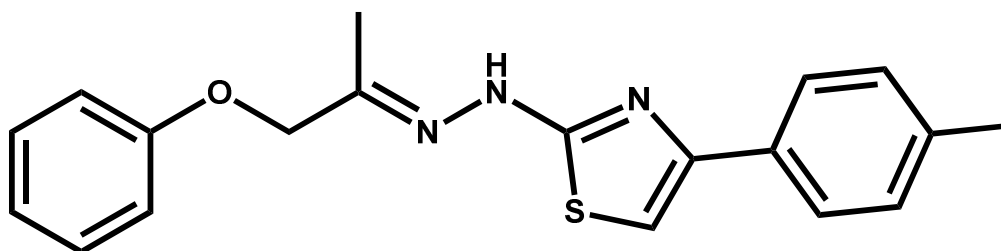
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

2.03 (s, 3H, CH_3), 4.63 (s, 2H, CH_2), 6.94-7.00 (m, 3H, Ar), 7.28 (s largo, 2H, Ar), 7.28 (d, J 9 Hz, 2H, Ar), 7.70 (d, J 9 Hz, 2H, Ar), 11.28 (s largo, 1H, NH).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.3 (CH_3), 71.2 (CH_2), 114.4 (C–S, tiazol), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 131.2 (Ar), 137.0 (Ar), 148.2, 149.1 (C=N), 158.0 (C–O, Ar), 169.4 (S–C=N).

5.2.36 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-toluil)-1,3-tiazol (44e, TS26)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 4'-metil-2-bromoacetofenona (**51e**) (0.23 g). O produto foi re-cristalizado em metanol a quente.

Cristais amarelos.

Rend.: 0.2 g (60 %)

P.F.: 160 °C

$R_f = 0.6$ (tolueno)

I.V., principais sinais

1618 (C=N), cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

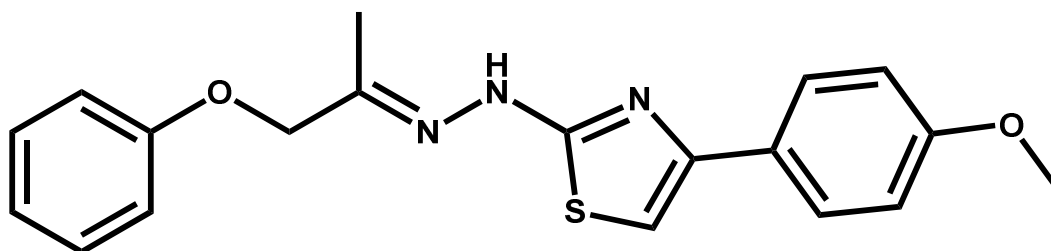
2.03 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 4.63 (s, 2H, CH_2), 6.17 (s largo, 1H, N-H), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.20-7.30 (m, 5H, 4H de Ar e 1H do tiazol), 7.71-7.74 (m, 2H, Ar).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.8 (CH_3), 21.2 (CH_3), 71.6 (CH_2), 103.6 (CH, tiazol), 115.2 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 130.1 (Ar), 137.5 (Ar), 158.5 (C-O, Ar), 169.9 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{SO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338.1327; encontrado 338.1309.

5.2.37 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-anisil)-1,3-tiazol (44f, TS19)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 4'-metóxi-2-bromoacetofenona (**51f**) (0.25 g). O produto foi re-cristalizado em etanol a quente.

Cristais levemente esverdeados.

Rend.: 0.25 g (70 %)

P.F.: 168 °C

R_f = 0.6 (hexano \ tolueno 3:2)

I.V., principais sinais

1613 (C=N), 1601 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

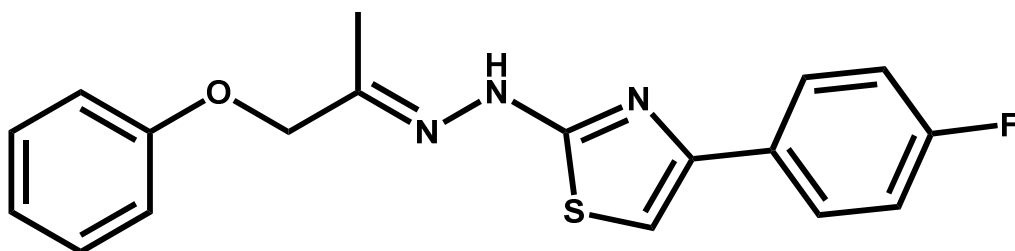
1.99 e 2.04 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.64 e 4.90 (s, 2H, CH_2), 6.91-7.01 (m, 5H, Ar), 7.17 (s, 1H, CH do tiazol), 7.24-7.32 (d, 2H, J 2.5 Hz, Ar), 7.72-7.81 (d, 2H, J 2.5 Hz, Ar), 10.55 (s largo, 1H, N-H).

RMN ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

14.6 (CH_3), 55.2 (OCH_3), 71.1 (CH_2), 102.3 (CH, tiazol), 114.1 (CH, Ar), 113.7 (CH, Ar), 114.8 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 125.8 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 146.8 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 149.6 (C=N), 158.1 (C-O, Ar), 159.2 (C-O, Ar), 169.5 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{SO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 354.1276; encontrado 354.1282. Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 376.1096; encontrado 376.1103.

5.2.38 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-flúorfenil)-1,3-tiazol (44g, TS20)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 4'-flúor-2-bromoacetofenona (**51g**) (0.23 g).

Cristais beges.

Rend.: 0.29 g (85 %)

P.F.: 157 °C

$R_f = 0.5$ (tolueno)

I.V., principais sinais

1619 (C=N), 1608 (C=N) cm^{-1}

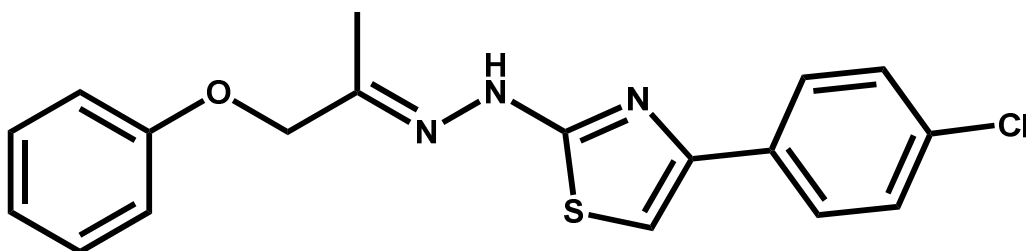
RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

1.98 e 2.03 (s, 3H, CH_3), 4.59 e 4.62 (s, 2H, CH_2), 6.89-6.97 (m, 3H, Ar), 7.20-7.30 (m, 5H, 4H de Ar e 1CH do tiazol), 7.82-7.87 (m, 2H, Ar), 10.53 (s largo, 1H, N-H). Após adição de 3 gotas de D_2O , o sinal com δ 10.53 ppm diminuiu.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

14.7 (CH_3), 71.2 (CH_2), 104.3 (CH, tiazol), 114.5 (CH, Ar), 114.8 (CH, Ar), 115.2 (CH, Ar), 121.1 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 129.8 (C-F), 130.0 (C-F), 146.7 (Ar), 146.9 ($\text{CH}=\text{C}$), 148.5 (C=N), 158.1 (C-O), 169.4 e 169.7 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{SOF}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 342.1076; encontrado 342.1099.

5.2.39 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-clorofenil)-1,3-tiazol (44h, TS16)


Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da hidrazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 4'-cloro-2-bromoacetofenona (**51h**) (0.26 g).

Cristais vermelhos.

Rend.: 0.26 g (72 %)

P.F.: 164-165 °C

R_f = 0.5 (tolueno)

I.V., principais sinais

1620 e 1586 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

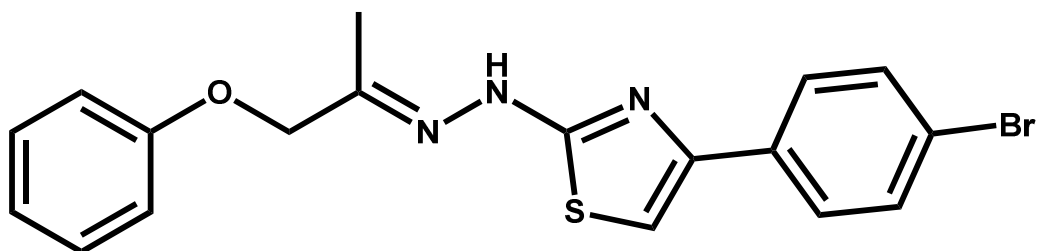
2.09 (s, 3H, CH₃), 4.63 e 4.90 (s, 2H, CH₂), 6.90-7.00 (m, 3H, Ar), 7.25-7.46 (m, 5H, 4H de Ar e 1CH do tiazol), 7.80-7.85 (d, 2H, *J* 7.8 Hz, Ar), 10.61 (s largo, 1H, N-H).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

14.6 (CH₃), 71.2 (CH₂), 104.4 (CH, tiazol), 114.8 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 133.3 (Ar), 148.3 (CH=C), 149.4 (C=N), 158.1 (C-O, Ar), 169.6 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₈H₁₇N₃SOCl [M+H]⁺: 358.0781; encontrado 358.0909.

5.2.40 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol (44i, TS42)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 3 mmol (0.72 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 20 mL de 2-propanol e 3.2 mmol da 4'-bromo-2-bromoacetofenona (**51h**) (0.84 g).

Cristais marrons.

Rend: 0.8 g (66 %)

P.F.: 171 °C

R_f = 0.5 (tolueno\ acetato de etila 5:1)

I.V., principais sinais

3317 (N–H), 1615 e 1572 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

2.02 (s, 3H, CH_3), 4.62 (s, 2H, CH_2), 6.92-7.01 (m, 3H, Ar), 7.26-7.35 (m, 2H, Ar), 7.35 (s, 1H, CH tiazol), 7.58 (d, 2H, J 7.5 Hz, Ar), 7.80 (d, 2H, J 7.5 Hz, Ar), 11.10 (s, 1H, N–H).

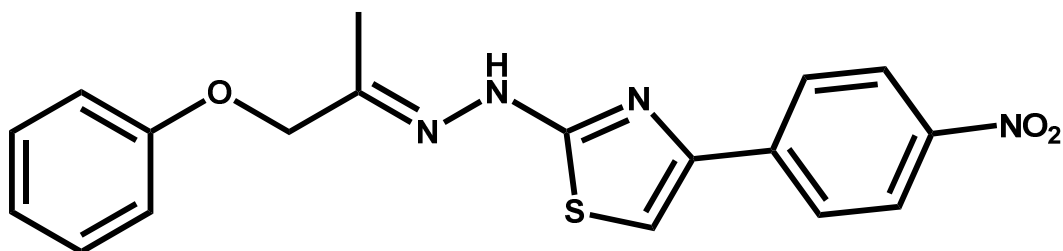
RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH_3), 71.3 (CH_2), 104.8, 114.7 (CH, Ar), 120.4 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 131.4 (CH, Ar), 133.9 (Ar), 147.1 (C=C, tiazol), 149.3 (C=N), 158.1 (C–O, Ar), 169.6 (S–C=N)

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{SOBr}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 402.0296; encontrado 402.0272.

Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 424.0095; encontrado 425.0065.

5.2.41 2-[(1-Fenóxi-propil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol (44j, TS17)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 4'-nitro-2-bromoacetofenona (**51i**) (0.27 g). O produto foi recristalizado com 2-propanol a quente.

Cristais amarelos gema.

Rend: 0.3 g (80 %)

P.F.: 171-173 °C (dec.)

R_f = 0.6 (tolueno \ acetato de etila 3:1)

I.V., principais sinais

3337 (N–H), 1598 (C=N), 1565 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

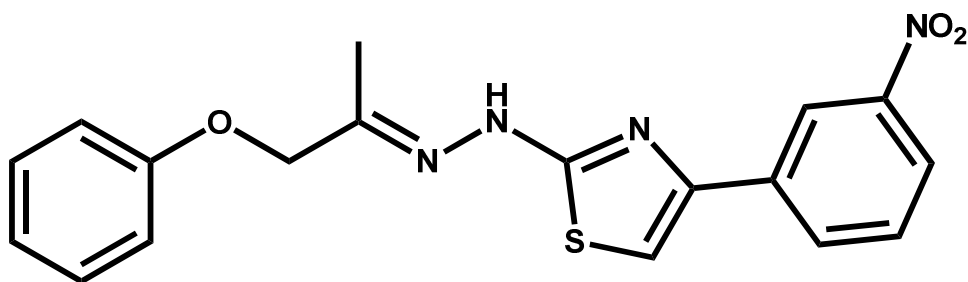
2.03 (s, 3H, CH_3), 4.63 (s, 2H, CH_2), 6.92-7.01 (m, 3H, Ar), 7.29 (t, 2H, Ar), 7.70 (s, 1H, CH do tiazol), 8.07 (d, 2H, J 8.7 Hz, Ar), 8.29 (d, 2H, J 9.0 Hz, Ar), 11.26 (s, 1H, N–H).

RMN ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

14.3 (CH_3), 71.3 (CH_2), 108.9 (CH, tiazol), 114.8 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 124.1 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 140.7 (CH, Ar), 146.1 (Ar), 147.6 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 148.5 (C=N), 158.1 (C–O), 169.9 (S–C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{SO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 369.1021; encontrado 369.1072. Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 391.0841; encontrado 391.0865.

5.2.42 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(3-nitrofenil)-1,3-tiazol (44k, TS-27)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 3'-nitro-2-bromoacetofenona (**51j**) (0.27 g). A reação foi mantida por 2 horas no banho de ultrassom. O produto foi re-cristalizado com tolueno a quente.

Sólido cristalino amarelo gema.

Rend: 0.18 g (48 %)

P.F.: 159-160 °C (dec.)

R_f = 0.4 (acetato de etila)

I.V., principais sinais

3337 (N–H), 1598 (C=N), 1565 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

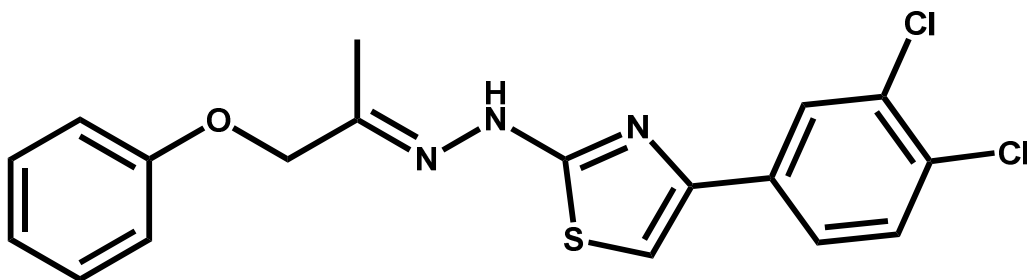
2.64 (s, 3H, CH₃), 5.15 (s, 2H, CH₂), 7.40 (t, 1H, Ar), 7.49 (d, 2H, Ar), 7.75 (t, 2H, Ar), 7.89 (s, 1H, CH do tiazol), 8.10 (t, 1H, *J* 8.0 Hz, Ar), 8.56 (d, 1H, *J* 8.0 Hz, Ar), 8.70 (d, 1H, *J* 8.0 Hz Ar), 10.58 (s largo, 1H, N–H). Após adição de 3 gotas de D₂O, o sinal δ 10.58 ppm diminuiu.

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

23.5 (CH₃), 82.0 (CH₂), 116.7 (CH, tiazol), 125.4 (CH, Ar), 130.8 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 132.3 (CH, Ar), 139.9 (CH, Ar), 140.3 (CH, Ar), 141.8 (Ar), 147.3 (Ar) 157.8 (CH=C), 159.3 (C=N), 169.2 (C–O, Ar), 180.1 (S–C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₈H₁₇N₄SO₂ [M+H]⁺: 369.1021; encontrado 369.1042. Calculado para [M+Na]⁺: 391.0841; encontrado 391.0850.

5.2.43 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(3,4-diclorofenil)-1,3-tiazol (44l, TS34)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 3',4'-dicloro-2-cloroacetofenona (**51k**) (0.24 g). O produto foi re-cristalizado do metanol a quente.

Cristais vermelhos.

Rend: 0.26 g (66 %)

P.F.: 160 °C (dec.)

$R_f = 0.5$ (hexano \ acetato de etila 5:1)

I.V., principais sinais

3338 (N–H), 1615 e 1565 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

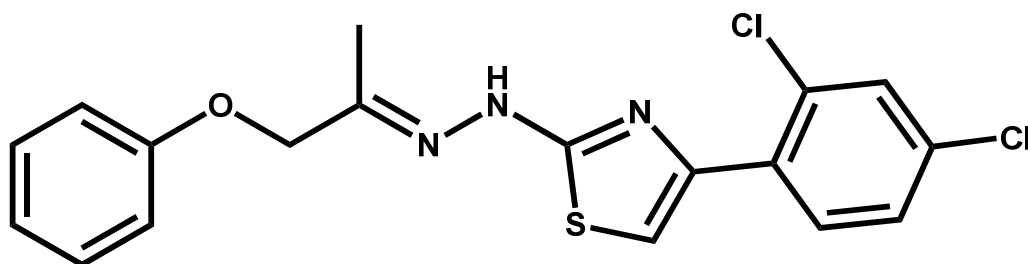
2.01 (s, 3H, CH₃), 4.61 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.26-7.30 (m, 3H, Ar), 7.50 (s, 1H, 1H tiazol), 7.64 (d, 1H, J 8 Hz, Ar), 7.82 (d, 1H, J 8 Hz, Hz, Ar), 8.07 (s, 1H, Ar), 11.10 (s largo, 1H, N–H).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH₃), 71.3 (CH₂), 106.2 (CH, tiazol), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 130.8 (CH, Ar), 131.4 (Ar), 135.2 (Ar), 147.5 (CH=C), 147.7 (C=N), 158.1 (C–O, Ar), 169.7 (S–C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₈H₁₆N₃SOCl₂ [M+H]⁺: 392.0391; encontrado 392.0378.

5.2.44 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(2,4-diclorofenil)-1,3-tiazol (44m, TS39)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2,2',4'-tricloroacetofenona (**51l**) (0.26 g). O produto foi re-cristalizado do metanol a quente.

Cristais avermelhados.

Rend: 0.17 g (55 %)

P.F.: 200 °C (dec.)

$R_f = 0.5$ (hexano \ acetato de etila 5:1)

I.V., principais sinais

1568 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

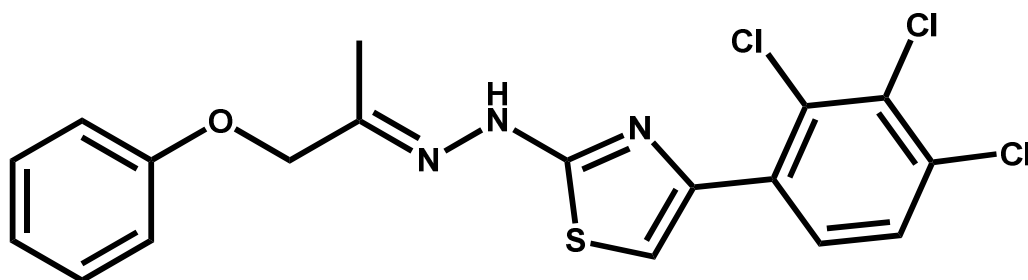
2.01 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.26-7.30 (m, 2H, Ar), 7.36 (s, 1H, CH do tiazol), 7.47- 7.49 (d, 1H, J 8.4 Hz, Ar), 7.66 (s, 1H, Ar), 7.89 (d, 1H, J 8.4 Hz, Ar), 11.25 (s largo, 1H, N-H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH₃), 71.3 (CH₂), 109.4 (CH, tiazol), 114.8 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 132.2 (CH, Ar), 132.3 (Ar), 135.2 (Ar), 145.8 (CH=C), 147.2 (C=N), 158.1 (C-O, Ar), 168.6 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₈H₁₆N₃SOCl₂ [M+H]⁺: 392.0391; encontrado 392.0378.

5.2.45 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(2,3,4-triclorofenil)-1,3-tiazol (44n, TS18)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.30**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2',3',4'-triclora-2-bromoacetofenona (**51m**) (0.33 g). O produto foi recristalizado do tolueno a quente.

Cristais marrons.

Rend: 0.24 g (50 %)

P.F.: 200 °C (dec.)

$R_f = 0.5$ (tolueno\ acetato de etila 3:1)

I.V., principais sinais

3321 (N–H), 1590 e 1557 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

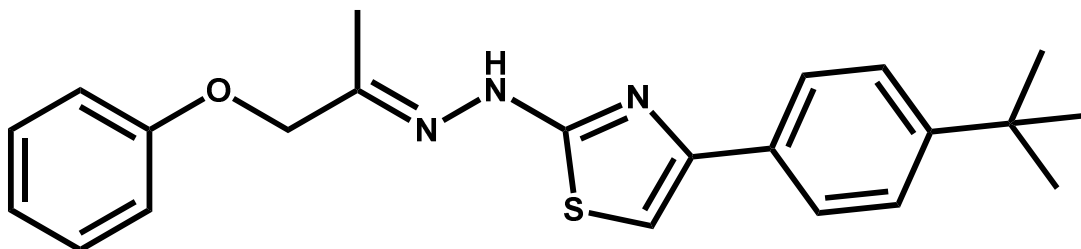
2.01 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.01 (m, 3H, Ar), 7.29 (t, 2H, Ar), 7.40 (s, 1H, CH do tiazol), 7.72 (d, 1H, J 8.5 Hz, Ar), 7.81 (d, 1H, J 8.4 Hz, Ar), 11.17 (s largo, 1H, N–H).

RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH₃), 71.3 (CH₂), 110.2 (CH, tiazol), 114.8 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 130.7 (Ar), 131.1 (Ar), 131.7 (Ar), 134.3 (Ar), 145.9 (CH=C), 147.3 (Ar), 158.1 (C–O), 168.7 (S–C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₈H₁₅N₃SOCl₃ [M+H]⁺: 426.0001; encontrado 426.7810 e 427.9306.

5.2.46 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(4-tercbutilfenil)-1,3-tiazol (44o, TS32)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 4-^tbutil-2-cloroacetofenona (**51n**) (0.23 g). O produto foi recristalizado do tolueno a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 0.3 g (79 %)

P.F.: 180-182 °C

R_f = 0.5 (tolueno\ acetato de etila 3:1)

I.V., principais sinais

1610 e 1586 (C=N) cm^{-1}

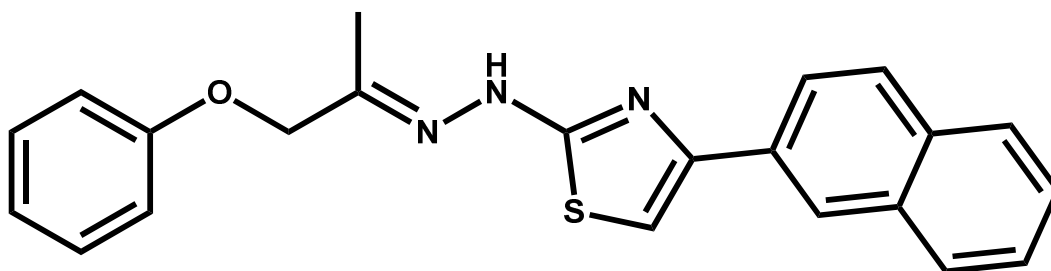
RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

1.23 (s largo, 9H, 3xCH₃), 2.00 (s, 3H, CH₃), 4.89 (s, 2H, CH₂), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.16-7.20 (d, 2H, J 7.1 Hz, Ar), 7.37-7.42 (m, 3H, 2H Ar, J 7.1 Hz, e 1H do tiazol), 7.48-7.52 (m, 2H, Ar), 10.91 (s largo, 1H, N-H).

RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH₃), 31.1 (CH₃), 32.8 (CCH₃), 71.6 (CH₂), 103.6 (CH, tiazol), 115.2 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.9 (Ar), 130.1 (Ar), 135.5 (Ar), 149.1 (C=N), 158.5 (C-O, Ar), 169.9 (S-C=N).

5.2.47 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(2-naftil)-1,3-tiazol (44p, TS33)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2-bromo-1-(naftil)etanona (**51o**) (0.27 g). O produto foi recristalizado do tolueno a quente.

Cristais marrons.

Rend: 0.26 g (70 %)

P.F.: 180-182 °C (dec.)

$R_f = 0.3$ (acetato de etila)

I.V., principais sinais

1614 e 1490 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

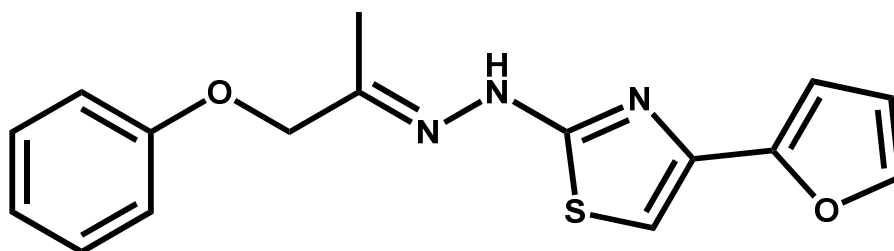
2.05 (s, 3H, CH_3), 4.64 (s, 2H, CH_2), 6.95-7.02 (m, 3H, Ar), 7.30 (s, 2H, 1H de Ar e 1H do tiazol), 7.47 (d, 3H, Ar), 7.91- 8.01 (m, 4H, Ar), 8.39 (s, 1H, Ar), 11.14 (s largo, 1H, N-H).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH_3), 71.4 (CH_2), 104.7 (CH, tiazol), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 123.9 (CH, Ar), 124.0 (CH, Ar), 125.9 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 132.3 (CH, Ar), 138.1 (Ar), 147.1 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 158.1 (C-O, Ar), 169.5 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{SO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 374.1327; encontrado 374.1270. Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 396.1147; encontrado 396.1098.

5.2.48 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(2-furanil)-1,3-tiazol (44q, TS22)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.2 mmol da 2-bromo-1-(2-furanil)etanona (**51p**) (0.23 g). O produto foi re-cristalizado do metanol a quente.

Cristais marrons.

Rend: 0.15 g (50 %)

P.F.: 210 °C

$R_f = 0.5$ (acetato de etila)

I.V., principais sinais

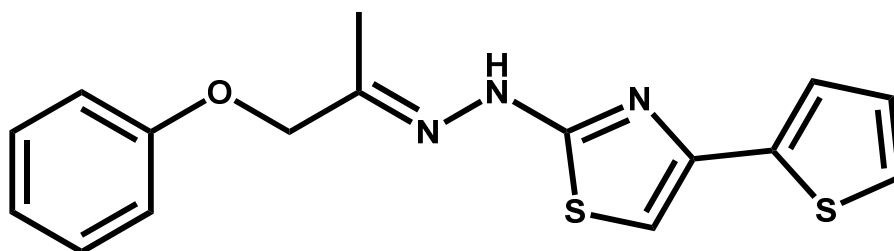
1600 e 1576 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

2.02 (s, 3H, CH_3), 4.61 (s, 2H, CH_2), 6.58 (dois s, 2H, Ar e CH tiazol), 7.00 (s largo, 4H Ar), 7.25 (d, 2H, Ar), 7.67 (s, 1H, Ar), 11.21 (s, 1H, N-H).

RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH_3), 71.3 (CH_2), 102.9 (CH, tiazol), 106.0 (CH, Ar), 111.6 (CH, Ar), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 142.4 (CH, Ar), 147.2 (C-O, Ar), 150.3 (C=N), 158.1 (C-O, Ar), 170.0 (S-C=N).

5.2.49 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-4-(2-tiofenil)-1,3-tiazol (44r, TS36)


Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.24 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.2 mmol da 2-bromo-1-(2-tiofeno)etanona (**51q**) (0.24 g). O produto foi recristalizado do metanol a quente.

Cristais levemente marrons.

Rend: 0.15 g (53 %)

P.F.: 190-191 °C

R_f = 0.4 (acetato de etila)

I.V., principais sinais

1620 e 1590 (C=N) cm^{-1}

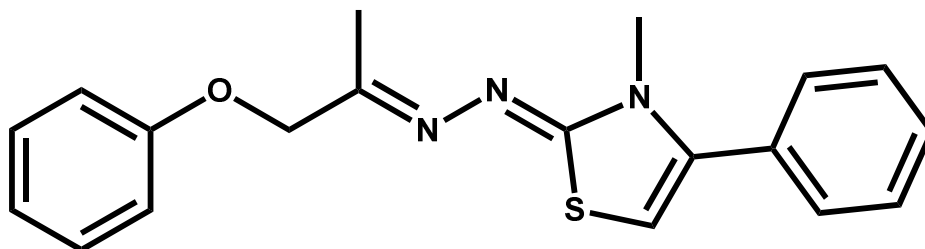
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

2.02 (s, 3H, CH_3), 4.61 (s, 2H, CH_2), 6.58 (dois s, 2H, Ar e CH tiazol), 7.00 (s largo, 4H Ar), 7.25 (d, 2H, Ar), 7.67 (s, 1H, Ar), 10.53 (s, 1H, N-H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.2 (CH_3), 71.3 (CH_2), 104.0 (CH, tiazol), 106.0 (CH, Ar), 111.6 (CH, Ar), 114.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 141.3 (CH, Ar), 142.4 (CH, Ar), 147.2 (C-O, Ar), 150.3 (C=N), 158.1 (C-O, Ar), 170.0 (S-C=N).

5.2.50 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-3-metil-4-fenil-1,3-tiazol (44s, TS28)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.25 g) da tiossemicarbazona (**48b**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2-bromoacetofenona (**51a**) (0.21 g). O produto foi recristalizado com tolueno a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 0.25 g (73 %)

P.F.: 135 °C

$R_f = 0.6$ (tolueno \ acetato de etila 3:1)

I.V., principais sinais

1591 (C=N) cm^{-1}

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ

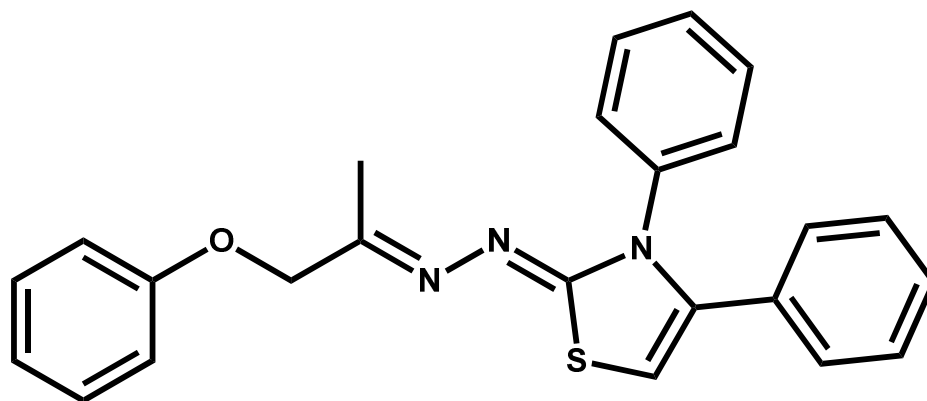
2.03 e 2.16 (s, 3H, CH_3), 3.47 (s, 3H, N- CH_3), 4.76 e 5.07 (s, 2H, CH_2), 6.91-6.99 (m, 3H, Ar), 7.02 (s, 1H, S-CH), 7.25-7.31 (m, 2H, Ar), 7.52 (m, 6H, Ar).

RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ

15.4 (CH_3), 35.4 (N- CH_3), 70.6 (CH_2), 114.3, 114.8, 121.0 (Ar), 128.9 (Ar), 129.1, 129.2, 129.5, 129.7, 129.8, 141.8 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 158.0 (C=N), 158.7 (C-O, Ar), 169.6 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{SO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338.1327; encontrado 338.1326. Calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 360.1147; encontrado 360.1164.

5.2.51 2-[(1-Fenóxiopropil-2-ilideno)hidrazinil]-3,4-difenil-1,3-tiazol (44t, TS-23)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.32**: 1 mmol (0.29 g) da tiossemicarbazona (**48a**), 5 mL de 2-propanol e 1.1 mmol da 2-bromoacetofenona (**51a**) (0.21 g).

Cristais amarelos.

Rend: 0.3 g (75 %)

P.F.: 136 °C

R_f = 0.6 (acetato de etila)

I.V., principais sinais

1622 (C=N), 1587 (C=N) cm^{-1}

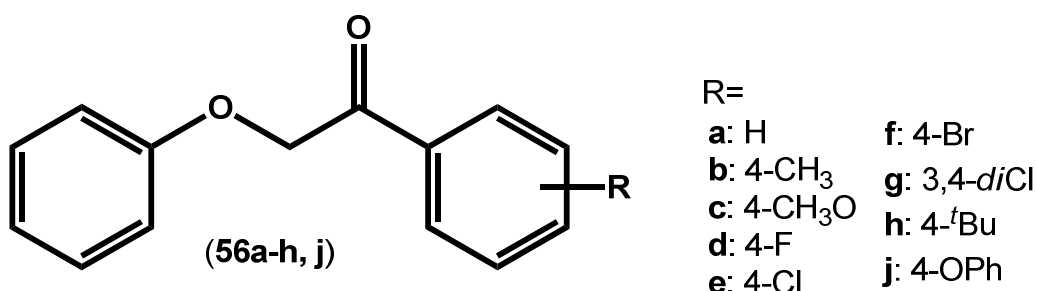
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ

1.84 (s, 3H, CH_3), 4.63 (s, 2H, CH_2), 6.58 (s, 1H, CH tiazol), 6.92-7.00 (m, 3H, Ar), 7.15 (d, 2H, Ar), 7.22-7.35 (m, 10H, Ar).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ

14.6 (CH_3), 71.2 (CH_2), 101.3 (CH, tiazol), 114.7 (CH, Ar), 120.7 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.20 (CH, Ar), 128.28 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 130.8 (Ar), 137.6 (Ar), 139.3 ($\text{C}=\text{CH}$), 156.9 (C=N), 158.2 (C-O, Ar), 168.6 (S-C=N).

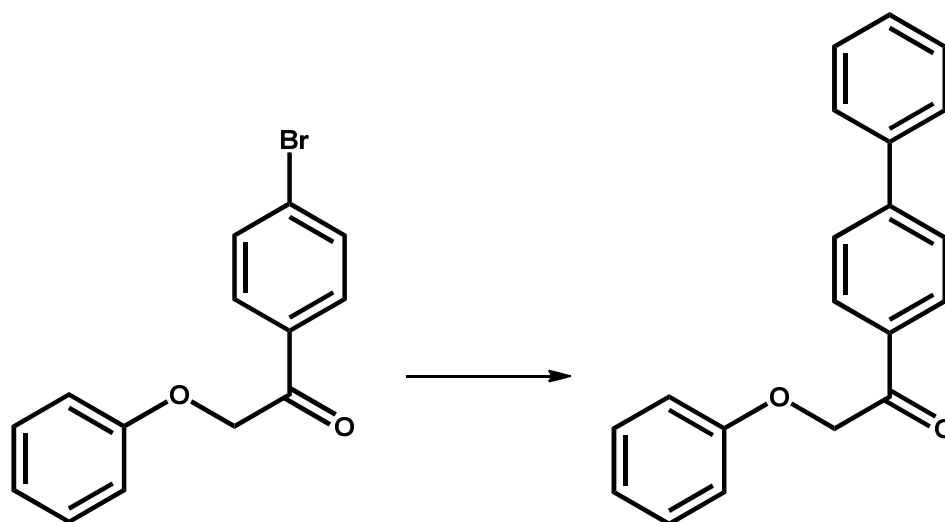
5.2.52 Procedimento geral para a síntese das 1-fenóxi-2-acetofenonas (**56**)¹³²



Em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL, foram adicionados 10 mmol (0.94 g) do fenol (**45**), 50 mL de butanona e 10 mmol (1.3 g) de carbonato de potássio pulverizado. A mistura foi aquecida e mantida sob agitação magnética. Após 10 minutos, 9 mmol da respectiva 2-bromoacetofenona (**51**) foi adicionada em porções. A reação foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 80 °C durante 5-10 horas. Após o término da reação, a mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente e o sólido formado foi filtrado. O solvente foi removido sob pressão reduzida. Adicionou-se cerca de 50 mL de água, seguido pela extração da mistura aquosa com éter dietílico (2x50 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavou-se com uma solução de NaOH (10%) sucessivas vezes até a fase orgânica adquirir uma coloração amarela, e por último com uma solução saturada de NaCl. A fase etérea foi seca com MgSO₄ anidro, o solvente removido sob pressão reduzida, levando a formação de um óleo de coloração amarela que foi transferido para o dessecador com SiO₂ e mantido sob vácuo até cristalização. Quando necessário, o produto foi cristalizado com metanol ou etanol.

2-Fenóxi-1-feniletanona (**56a**): cristais incolores; rend. 69%; P.F. de 48 °C, R_f de 0.6 (hexano / tolueno 1:1). 2-Fenóxi-1-(4-toluil)etanona (**56b**): cristais incolores; rend. 65%; R_f de 0.5 (hexano / tolueno 1:1). 1-(4-Metóxfenil)-2-fenóxi-1-etanona (**56c**): cristais amarelos; rend. 72%; P.F. de 59 °C, R_f de 0.6 (hexano / tolueno 1:1). 1-(4-Flúorfenil)-2-fenóxi-1-etanona (**56d**): cristais incolores; rend. 70%; P.F. de 91 °C, R_f de 0.6 (hexano / tolueno 1:1). 1-(4-Clorofenil)-2-fenóxi-1-etanona (**56e**): cristais incolores; rend. 60%; P.F. de 100 °C, R_f de 0.5 (hexano / tolueno 1:1 v/v). 1-(4-Bromofenil)-2-fenóxi-1-etanona (**56f**): cristais marrons; rend. 70%; P.F. de 108 °C, R_f de 0.6 (hexano / tolueno 1:1 v/v). 1-(3,4-Diclorofenil)-2-fenóxi-1-etanona (**56g**): cristais incolores; rend. 69%; P.F. de 74-76 °C, R_f de 0.4 (hexano / tolueno 1:1 v/v). 1-(4-Tercbutilfenil)-2-fenóxi-1-etanona (**56h**): cristais incolores; rend. 50%; P.F. de 62 °C, R_f de 0.7 (hexano / tolueno 1:1). 2-Fenóxi-1-(4-fenóxfenil)etanona (**56j**): cristais amarelos; rend. 48%; P.F. de 108 °C, R_f de 0.5 (hexano / tolueno 1:1).

5.2.53 Síntese da 1-[4-fenil(4'-fenil)]-2-fenóxietaona (**56i**)¹³³



Em um tubo de schlenk, foram adicionados 0.1 mmol (0.02 g) do acetato de paládio, 0.2 mmol (0.09 g) da trifenilfosfina e 10 mL de metanol e a mistura foi mantida sob agitação magnética em atmosfera de nitrogênio por 15 minutos. Adicionou-se em seguida 5 mmol (1.4 g) da 1-(4-bromofenil)-2-fenóxietaona (**56f**) previamente solubilizados em 30 mL de 1,4-dioxano, seguida pela adição de 7 mmol (0.85 g) do ácido fenilborônico e 10 mmol (1.35 g) do fosfato de potássio. A mistura foi aquecida (90° C) e mantida sob agitação magnética por 20 horas. Após o término da reação, a mistura foi resfriada até temperatura ambiente e o sólido formado foi filtrado. Adicionou-se cerca de 50 mL de água, seguido pela extração da fase aquosa com tolueno (3x50 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavou-se com uma solução de bicarbonato de sódio (10%) e por último com uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, o solvente removido sob pressão reduzida, levando a formação de um óleo de coloração vermelha que foi diluído com metanol e mantido na geladeira até cristalização.

Cristais marrons.

Rend.: 0.63 g (50 %);

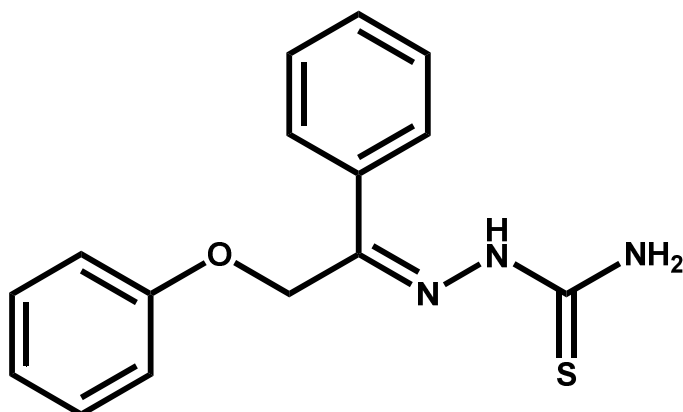
P.F.: 136 °C;

R_f = 0.6 (acetato de etila \ hexano 3:7)

I.V., principais sinais 1730 (C=O) cm⁻¹.

EMAR (ESI) Calculado para C₂₀H₁₇O₂ [M+H]⁺: 289.1229; encontrado 289.0790. Calculado para [M-H]⁺: 287.1072; encontrado: 287.0763.

5.2.54 1-(2-Fenóxi-1-feniletilideno)tiossemicarbazida (57a, TSM-02)



Em um balão de 100 mL foram adicionados 5 mmol (1.1 g) da 2-fenóxi-1-feniletanona (**56a**), 50 mL de EtOH, 5.2 mmol (0.49 g) da tiossemicarbazida (**47a**) e uma gota de ácido acético glacial. A mistura foi mantida em agitação magnética em refluxo durante 2 horas. Após esse tempo, o volume do solvente foi reduzido até a metade sob pressão reduzida. A mistura reacional foi então resfriada, onde observou-se a formação de um sólido, que foi filtrado em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavando-se abundantemente com água gelada. Após seco no dessecador, o produto foi recristalizado com tolueno a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 1.0 g (70 %)

P.F.: 190 °C

R_f = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3345 e 3398 (NH₂), 3258 (N–H), 1599 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

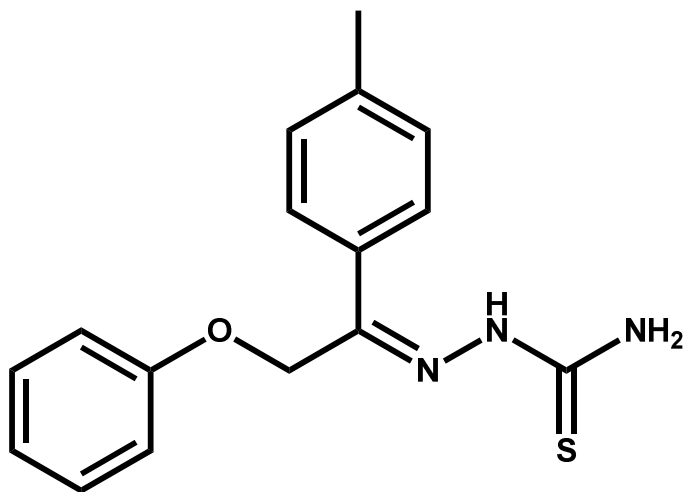
5.00 e 5.33 (dois s, 2H, CH₂), 6.99 (d, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.39 (s largo, 3H, Ar), 7.92 (s, 2H, Ar), 8.09 e 8.49 (dois s, 2H, NH₂), 10.80 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

61.2 (CH₂), 114.8 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 179.1 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₆SON₃ [M+H]⁺: 286.1014; encontrado 286.1000.

5.2.55 1-[1-(4-Toluil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (57b, TSM-07)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 1 mmol (0.23 g) da 1-(4-metilfenil)-2-fenóxiellanona (**56b**), e 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida (**47a**), 50 mL de EtOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 0.25 g (83 %)

P.F.: 149-150 °C

R_f = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3416 e 3397 (NH₂), 3255 (N–H), 1608 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

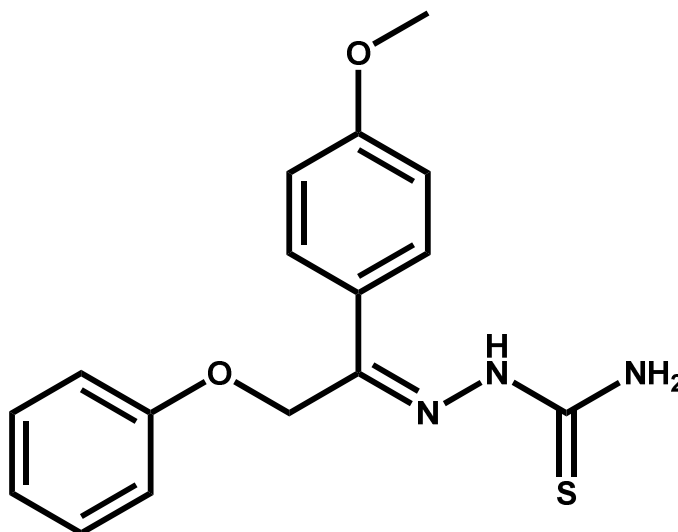
2.23 (s, 3H, CH₃), 4.97 e 5.29 (dois s, 2H, CH₂), 6.97 (d, 3H, Ar), 7.20 (d, 2H, *J* 7.7 Hz, Ar), 7.33 (t, 2H, Ar) 7.82 (d, 2H, *J* 7.8 Hz, Ar), 8.07 e 8.46 (dois s, 2H, NH₂), 10.74 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

55.2 (CH₃), 61.1 (CH₂), 114.8 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 132.8 (Ar), 139.0 (Ar), 144.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 178.9 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₈N₃SO [M+H]⁺: 300.1171; encontrado 300.1165.

5.2.56 1-[1-(4-Anisil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (57c, TSM-04)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 1 mmol (0.25 g) da 1-(4-metóxi-fenil)-2-fenóxi-etanona (**56c**), 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida (**47a**) 50 mL de EtOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado com etanol a quente.

Cristais incolores.

Rend: 0.23 g (75 %)

P.F.: 170-172 °C

R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

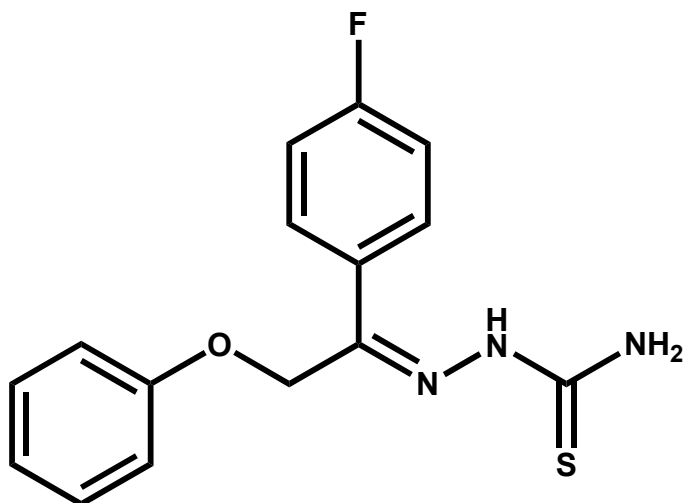
3453 (NH₂), 3304 (N–H), 1597 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.98 e 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.93 (d, 2H, *J* 8.3 Hz, Ar), 6.98 (m, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.91 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.70 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

55.2 (CH₃), 61.3 e 70.5 (CH₂), 113.6 (CH, Ar), 114.7 (CH, Ar), 114.8 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 144.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 160.3 (C–O, Ar), 178.9 (C=S).

5.2.57 1-[1-(4-Flúorfenil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (57d, TSM-06)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 1 mmol (0.29 g) da 1-(4-flúorfenil)-2-fenóxiellanona (**56d**), 50 mL de EtOH e 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida (**47a**) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais incolores.

Rend: 0.24 g (80 %)

P.F.: 190 °C

R_f = 0.4 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3413 e 3341 (NH₂), 3243 (N–H), 1601 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

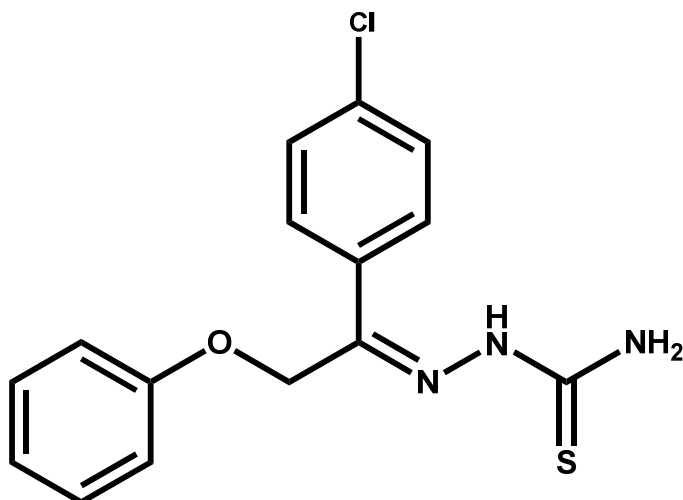
5.31 (s, 2H, CH₂), 6.97 (t, 3H, Ar), 7.20 (t, 2H, *J* 8.8 Hz, Ar), 7.30 (t, 2H, *J* 7.6 Hz, Ar), 7.91 (m, 2H, Ar), 8.12 e 8.46 (dois s, 2H, NH₂), 10.79 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

61.6 (CH₂), 115.2 (CH, Ar), 115.46 e 115.67 (C–F), 121.8 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 131.6 (CH, Ar), 132.6 (Ar), 143.8 (C=N), 157.9 (C–O, Ar), 179.6 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₅SON₃F [M+H]⁺: 304.0920; encontrado 304.0948. Calculado para [M+Na]⁺: 326.0739; encontrado 326.0773.

5.2.58 1-[1-(4-Clorofenil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (57e, TSM-03)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 2 mmol (0.60 g) da 1-(4-clorofenil)-2-fenóxi-etanona (**56e**), e 2.1 mmol (0.20 g) da tiossemicarbazida (**47a**), 50 mL de EtOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado com benzeno a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 0.50 g (78 %)

P.F.: 199-201 °C

R_f = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3420 e 3343 (NH₂), 3252 (N–H), 1596 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

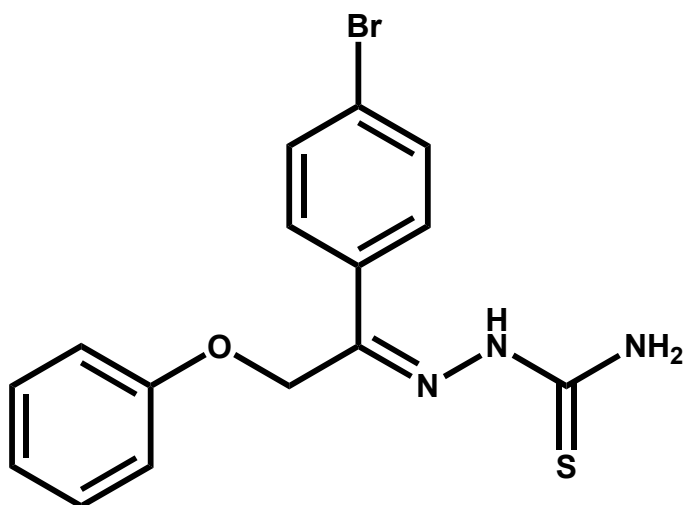
5.31 (s, 2H, CH₂), 6.97 (t, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.42 (d, 2H, *J* 8.8 Hz, Ar), 7.96 (d, 2H, *J* 8.8 Hz, Ar), 8.15 e 8.49 (dois s, 2H, NH₂), 10.85 (s, 1H, NH). Após a adição de D₂O, os sinais com δ em 8.15, 8.49 e 10.85 ppm diminuem.

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

60.9 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 133.9 (Ar), 134.5 (Ar), 143.1 (C=N), 157.4 (C–O, Ar), 179.2 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₅SON₃Cl [M+H]⁺: 320.0624; encontrado 320.0615.

5.2.59 1-[1-(4-Bromofenil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (57f, TSM-10)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 1 mmol (0.3 g) da 1-(4-bromofenil)-2-fenóxiellanona (**56f**), 30 mL de EtOH e 1.1 (0.1 g) mmol de tiossemicarbazida (**47a**) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 0.19 g (55 %)

P.F.: 200-202 °C

R_f = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3398 e 3330 (NH₂), 3257 (N–H), 1599 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

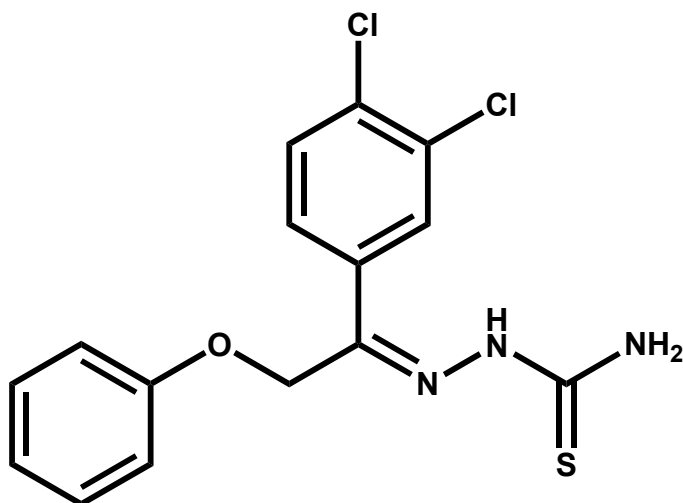
4.98 e 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.94 (t, 2H, Ar), 7.26-7.35 (m, 3H, Ar), 7.56 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, Ar), 7.89 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, Ar), 8.10 e 8.53 (dois s, 2H, NH₂), 10.09 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

60.03 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 122.0 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 131.1 (Ar), 134.9 (Ar), 143.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 179.2 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₅N₃SOBr [M+H]⁺: 364.0119; encontrado 364.0150.

5.2.60 1-[1-(3,4-Diclorofenil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (57g, TSM-09)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 2 mmol (0.64 g) da 1-(3,4-diclorofenil)-2-fenóxietylideno (56g), 50 mL de EtOH e 2.1 mmol de tiossemicarbazida (47a) (0.2 g) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado com etanol a quente.

Cristais amarelos.

Rend: 0.39 (56 %)

P.F.: 189 °C

R_f = 0.4 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3398 e 3345 (NH₂), 3257 (N–H), 1599 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

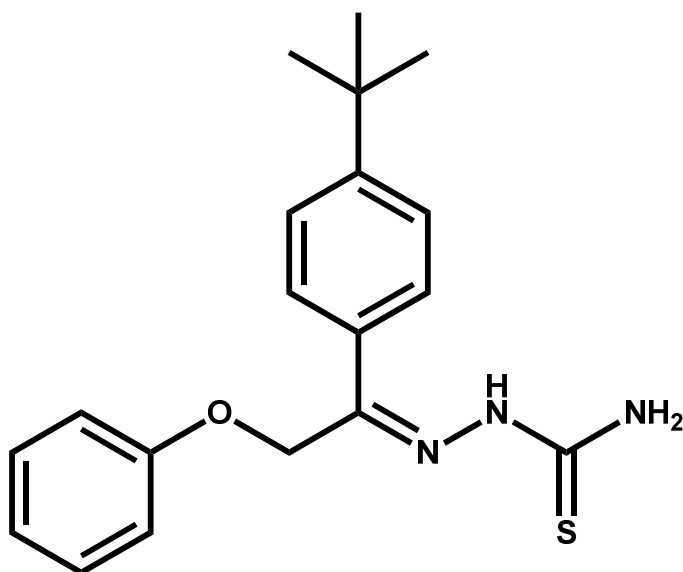
5.32 (s, 2H, CH₂), 6.94-7.00 (m, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.60 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, Ar), 7.86 (dd, 1H, *J* 8.7 e 1.8 Hz, Ar), 8.28 (d, 1H, *J* 1.8 Hz, Ar) 8.36 e 8.59 (dois s, 2H, NH₂), 10.95 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

60.7 (CH₂), 114.8 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 131.4 (Ar), 131.7 (Ar), 136.2 (Ar), 141.9 (C=N), 157.4 (C–O, Ar), 179.2 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₄N₃SOCl₂ [M-H]⁺: 352.0078; encontrado 352.1129.

5.2.61 1-[1-(4-*Terc*butilfenil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (57h,TSM-12)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 1 mmol (0.27 g) da 1-(4-*terc*butilfenil)-2-fenóxielanona (**56h**), 30 mL de EtOH e 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida (**47a**) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.25 g (73 %);

P.F.: 145-147 °C

R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 7:3)

I.V., principais absorções

3453 (NH₂), 3304 (N-H), 1596 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

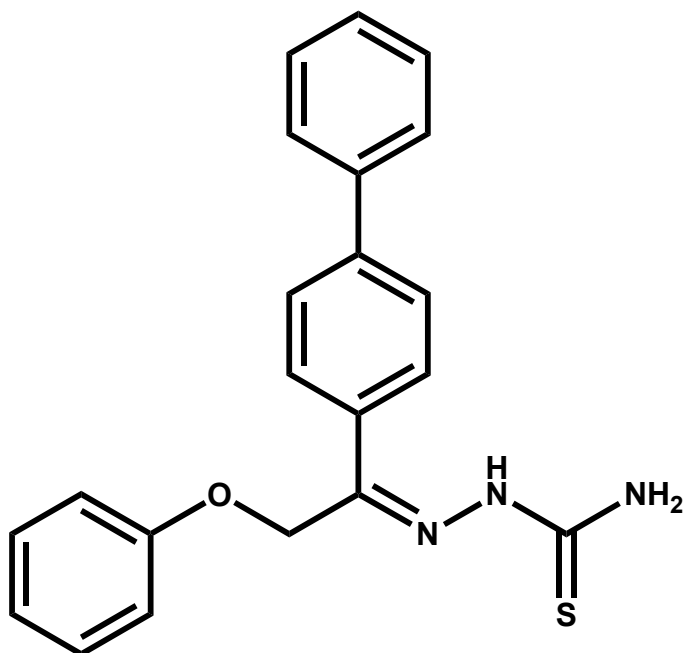
1.24 (s largo, 9H, 3xCH₃), 5.29 (s, 2H, CH₂), 6.90 (m, 2H, Ar), 7.31 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, Ar), 7.39 (d, 3H, *J* 8.4 Hz, Ar), 7.93 (s largo, 2H, Ar), 8.08 e 8.47 (dois s, 2H, NH₂), 10.74 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

31.2 (CH₃), 33.8 (C-CH₃), 61.4 (CH₂), 114.2 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 143.6 (Ar), 144.2 (C=N), 155.2 (C-O, Ar), 179.0 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₂₄N₃SO [M+H]⁺: 342.1640; encontrado 342.1663. Calculado para [M+Na]⁺: 364.1460; encontrado 364.1493.

5.2.62 1-[1-(1,1'-Bifenil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (57i, TSM-33)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 1.5 mmol (0.43 g) da 1-[4-fenil(4'-fenil)-2-fenóxi]etanona (**56i**), 30 mL de EtOH e 1.6 mmol de tiossemicarbazida (**47a**) (0.14 g) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais amarelos. Rend: 0.30 g (55 %);

P.F.: 210 °C;

R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

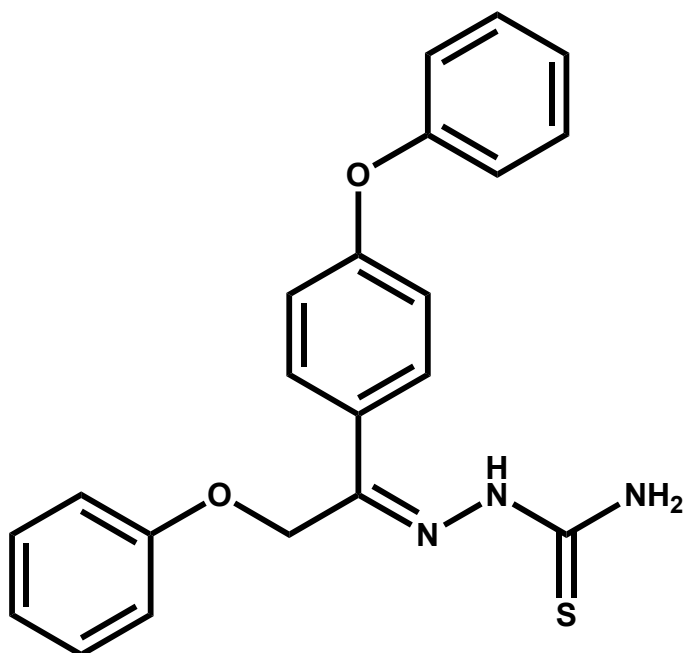
3418 e 3351 (NH₂), 3243 (N–H), 1600 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

5.36 (s, 2H, CH₂), 6.97-7.02 (m, 3H, Ar), 7.31 e 7.40 (dd, 2H, *J* 8.4 e 1.2 Hz, Ar), 7.48 (t, 3H, Ar), 7.72 (t, 4H, Ar), 8.04 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, Ar), 8.17 e 8.52 (dois s, 2H, NH₂), 10.85 (s, 1H, NH). Após a adição de D₂O, os sinais com δ 8.17, 8.52 e 10.85 diminuem.

EMAR (ESI) Calculado para C₂₁H₂₀N₃OS [M+H]⁺: 362.1327; encontrado 362.1319.

5.2.63 1-[1-(4-Fenóxifenil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (57j, TSM-08)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.54**: 2 mmol (0.60 g) da 1-(4-fenóxifenil)-2-fenóxiellanona (**56j**), 2.1 mmol (0.2 g) da tiossemicarbazida (**47a**), 50 mL de MeOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi recristalizado do tolueno a quente. Cristais incolores. Rend.: 0.42 g (55 %);

P.F.: 210-213 °C;

R_f = 0.3 (tolueno).

I.V., principais absorções

3414 e 3339 (NH₂), 3253 (N–H), 1609 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

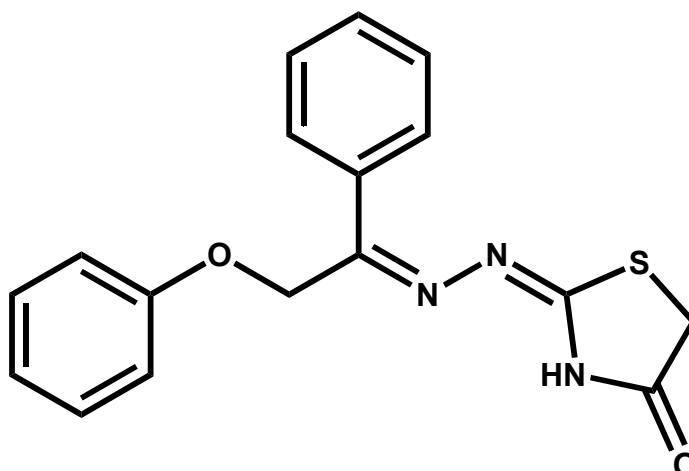
5.39 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.95 (m, 2H, Ar), 6.99-7.10 (m, 5H, Ar), 7.32-7.42 (m, 5H, Ar), 7.91-7.94 (m, 2H, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.73 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

61.9 (CH₂), 116.6 (CH, Ar), 117.3 (CH, Ar), 120.3 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 150.2 (C–O, Ar), 153.3 (C–O, Ar), 157.6 (C–O, Ar), 179.1 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₁H₂₀N₃O₂S [M+H]⁺: 378.1276; encontrado 378.1302. Calculado para [M+Na]⁺: 400.1096; encontrado 400.1126.

5.2.64 [2-Fenóxi-1-feniletilideno]hidrazona]tiazolidina-4-ona (59, TSM-23)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.29 g) da tiossemicarbazona (**57a**, **TSM-02**), 2.5 mmol (0.5 g) do 2-bromoacetato de etila (**49a**), 2 mmol (0.19 g) de acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi recristalizado do benzeno a quente.

Cristais amarelos.

Rend.: 0.16 g (45 %)

P.F.: 139 °C

R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

1715 (C=O), 1631 e 1620 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

3.92 (s, 2H, CH₂), 5.41 (s, 2H, CH₂), 6.91-6.95 (m, 3H, Ar), 7.27 (t, 2H, Ar), 7.41-7.44 (m, 3H, Ar), 7.80-7.84 (m, 2H, Ar), 12.12 (s largo, 1H, NH).

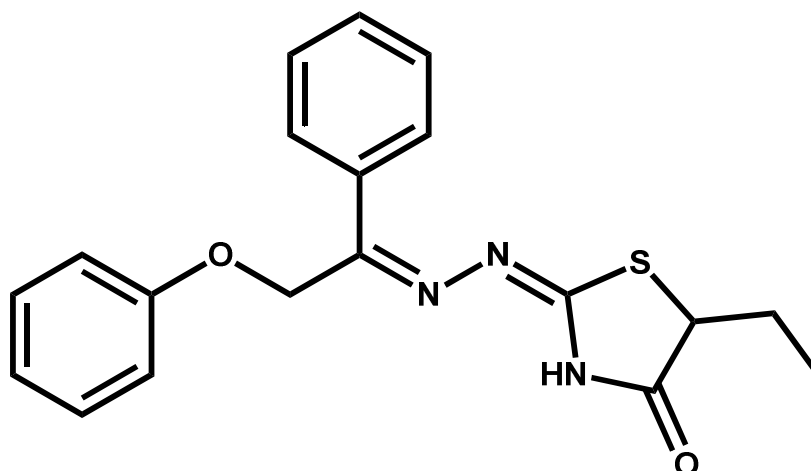
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

33.6 (CH₂), 61.3 (CH₂), 115.0 (CH, Ar), 121.7 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 136.0 (Ar), 158.5 (C=N), 159.2 (C-O, Ar), 167.7 (S-C=N), 174.7 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₇H₁₆N₃O₂S [M+H]⁺: 326.0963; encontrado 326.0984.

Calculado para [M+K]⁺: 364.0522; encontrado 364.0554.

5.2.65 [(2-Fenóxi-1-feniletilideno)hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona (58a, TSM14)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.29 g) da tiossemicarbazona (**57a**, **TSM-02**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) de acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.25 g (70 %)

P.F.: 170-172 °C

R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

3208 (N–H), 1707 (C=O), 1629 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

0.96 (t, 3H, *J* 7.2 Hz, CH₃), 1.79-1.84 (m, 1H, CH₂), 1.87-1.99 (m, 1H, CH₂), 4.26 (q, 1H, *J* 4.5 e 7.8 Hz, CH), 5.40 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.94 (m, 3H, Ar), 7.24-7.29 (m, 2H, Ar), 7.42-7.44 (m, 3H, Ar), 7.82-7.85 (m, 2H, Ar), 12.12 (s largo, 1H, NH).

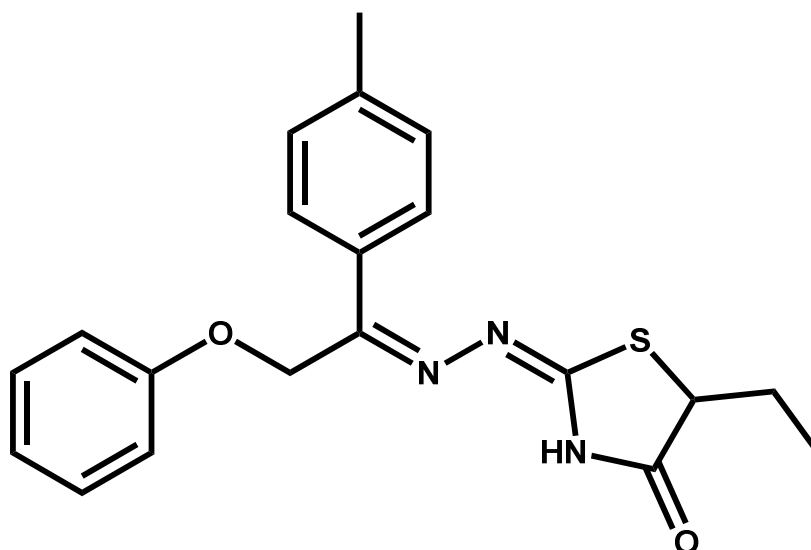
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.1 (CH), 60.6 (CH₂), 114.3 (CH, Ar), 121.0 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 135.2 (Ar), 157.8 (C=N), 158.7 (C–O, Ar), 165.1 (S–C=N), 175.8 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₂₀N₃O₂S [M+H]⁺: 354.1276; encontrado 354.1294.

Calculado para [M+Na]⁺: 376.1096; encontrado 376.1111.

5.2.66 [2-Fenóxi-1-(4-toluil)etilideno)hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58b**, TSM18)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da tiossemicarbazona (**57b**, TSM-07), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do ciclohexano a quente.

Cristais incolores;

Rend.: 0.26 g (71 %);

P.F.: 150 °C;

R_f = 0.5 (tolueno)

I.V., principais absorções

1699 (C=O), 1620 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

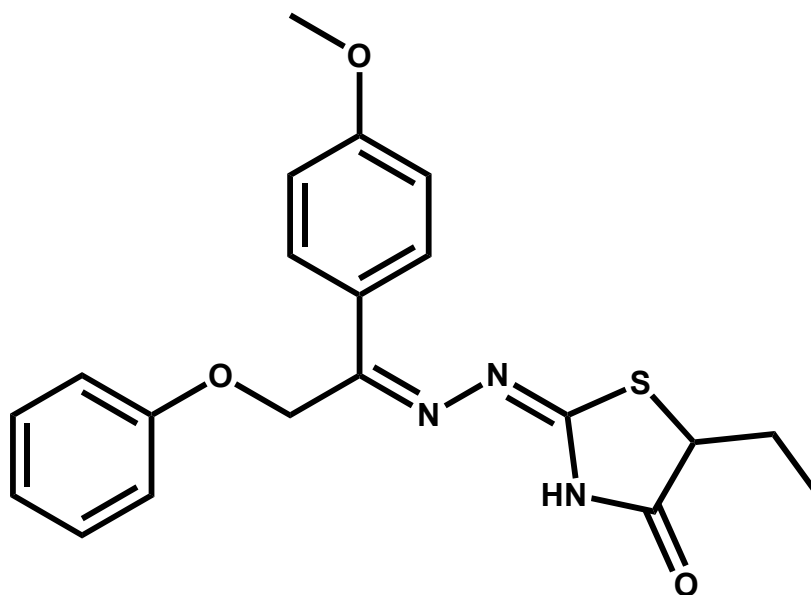
0.96 (t, 3H, *J* 7.2 Hz, CH₃), 1.76-1.97 (m, 1H, CH₂), 1.99-2.03 (m, 1H, CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 4.24 (q, 1H, *J* 7.2 e 4.2 Hz, CH), 5.37 (s, 2H, CH₂), 6.90-6.95 (m, 3H, Ar), 7.22-7.25 (m, 2H, Ar), 7.29 (d, 2H, *J* 8.1 Hz, Ar), 7.73 (d, 2H, *J* 8.1 Hz, Ar), 12.09 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

11.0 (CH₃), 21.6 (CH₃), 27.1 (CH₂), 49.7 (CH), 63.1 (CH₂), 115.0 (CH, Ar), 121.6 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 130.2 (Ar), 133.2 (Ar), 140.4 (Ar), 158.6 (C=N), 159.3 (C-O, Ar), 165.3 (S-C=N), 176.5 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₀H₂₀N₃O₂S [M-H]⁺: 366.1276; encontrado 366.1289.

5.2.66 [2-Fenóxi-1-(4-anisil)etilideno]hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58c**, TSM16)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.31 g) da tiossemicarbazona (**57c**, **TSM-04**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila, 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.29 g (75 %);

P.F.: 157 °C;

R_f = 0.5 (tolueno)

I.V., principais absorções

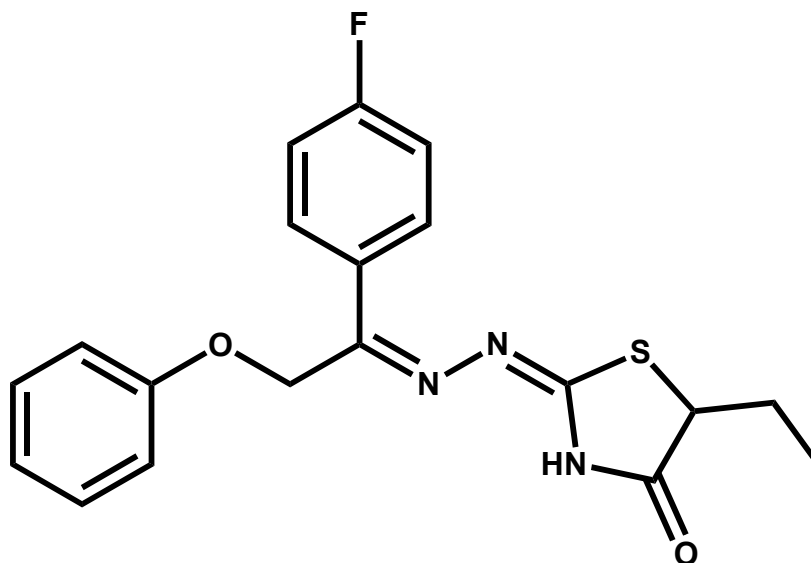
1700 (C=O), 1622 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.96 (t, 3H, *J* 7.4 Hz, CH₃), 1.78-1.97 (m, 1H, CH₂), 1.98-2.01 (m, 1H, CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 4.23 (q, 1H, *J* 7.2 e 4.2 Hz, CH), 5.37 (s, 2H, CH₂), 6.90-6.94 (m, 3H, Ar), 6.96 (dd, 2H, *J* 9.0 e 1.9 Hz, Ar), 7.27 (t, 2H, Ar), 7.80 (dd, 2H, *J* 9.0 e 1.8 Hz, Ar), 12.05 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.0 (CH), 55.2 (OCH₃), 60.5 (CH₂), 113.8 (CH, Ar), 114.3 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 127.6 (Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 157.9 (C=N), 158.1 (C-O, Ar), 160.7 (C-O, Ar), 164.0 (S-C=N), 175.8 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₀H₂₀N₃O₃S [M-H]⁺: 382.1225; encontrado 382.1242.

5.2.67 [2-Fenóxi-1-(4-flúorfenil)etilideno]hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58d**, TSM17)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.3 g) da tiossemicarbazona (**57d**, **TSM-06**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.3 g (81 %);

P.F.: 159-160 °C;

R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

1702 (C=O), 1620 e 1599 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ

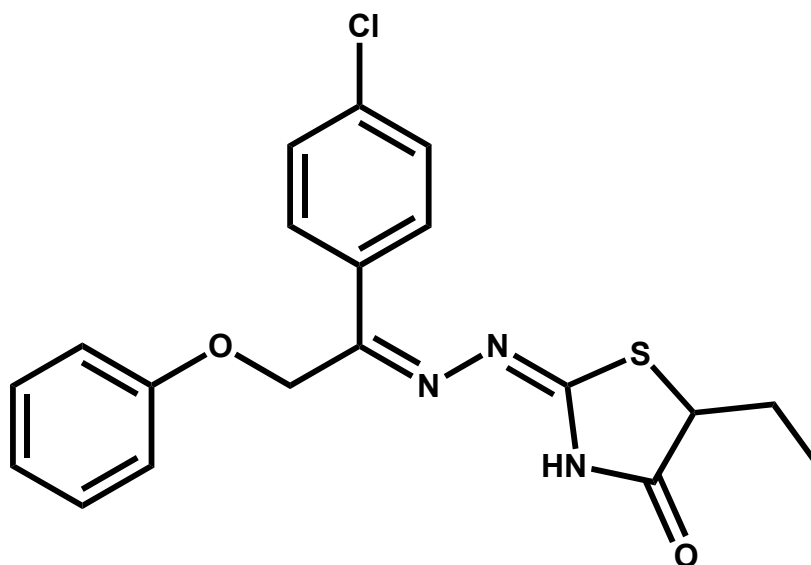
0.96 (t, 3H, *J* 7.2 Hz, CH₃), 1.79-1.97 (m, 1H, CH₂), 1.98-2.02 (m, 1H, CH₂), 4.26 (q, 1H, *J* 7.5 e 4.4 Hz, CH), 5.40 (s, 2H, CH₂), 6.91-6.95 (m, 3H, Ar), 7.24-7.30 (m, 4H, Ar), 7.85-7.90 (m, 2H, Ar), 12.08 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ

10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.1 (CH), 60.6 (CH₂), 114.3 (Ar), 115.3 (Ar), 115.5 (Ar), 121.1 (Ar), 129.3 (Ar), 129.4 (Ar), 129.6 (Ar), 131.73 (Ar), 131.77 (Ar), 157.7 (C=N), 161.5 (C-O, Ar), 164.8 e 165.2 (S-C=N) 175.9 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₁₇N₃O₂SF [M-H]⁺: 370.1026; encontrado 370.1039.

5.2.68 [2-Fenóxi-1-(4-clorofenil)etilideno]hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58e**, TSM15)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.32 g) da tiossemicarbazona (**57e**, **TSM-03**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) de acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.27 g (70 %);

P.F.: 162-164 °C;

R_f = 0.4 (tolueno)

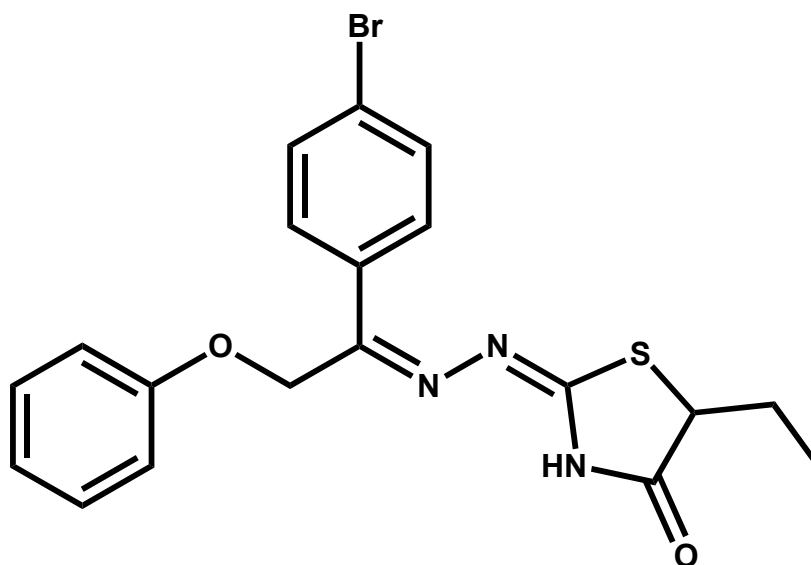
I.V., principais absorções 1703 (C=O), 1622 e 1583 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.96 (t, 3H, CH₃), 1.79-1.84 (m, 1H, CH₂), 1.95-1.98 (m, 1H, CH₂), 4.26 (s largo, 1H, CH), 5.40 (s, 2H, CH₂), 6.90-6.93 (m, 3H, Ar), 7.26 (t, 2H, Ar), 7.50 (d, 2H, *J* 10 Hz, Ar), 7.83 (d, 2H, *J* 10 Hz, Ar), 12.16 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10.3 (CH₃), 25.3 (CH₂), 49.2 (CH), 114.3 (CH, Ar), 121.1 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 134.0 (Ar), 134.7 (Ar), 157.7 e 157.8 (C), 165.7 (S-C=N), 175.9 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₁₉N₃O₂SCl [M+H]⁺: 388.0887; encontrado 388.0895. Calculado para [M+Na]⁺: 410.0706; encontrado 410.0708. Calculado para [M+K]⁺: 426.0445; encontrado 426.0456.

5.2.59 [2-Fenóxi-1-(4-bromofenil)etilideno]hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58f**, TSM19)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.35 g) da tiossemicarbazona (**57f**, TSM-10), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.2 g (48 %);

P.F.: 177-178 °C;

R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

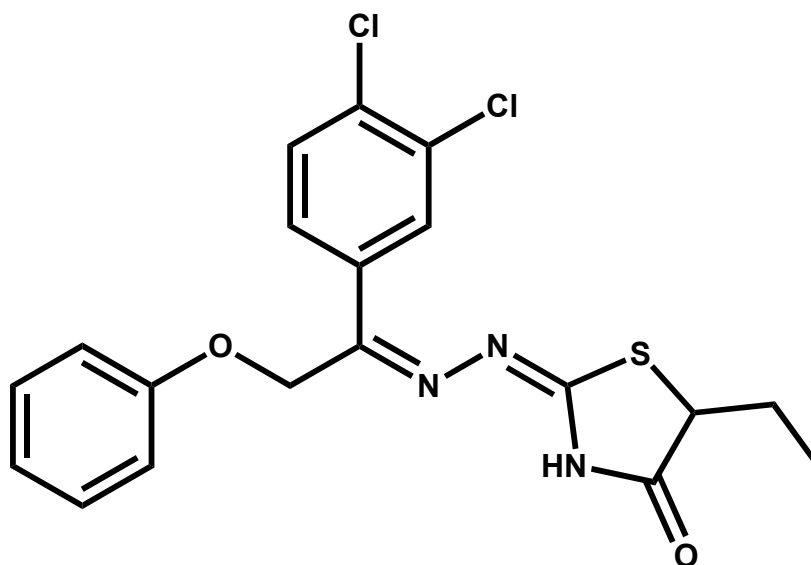
1702 (C=O), 1621 e 1590 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.96 (t, 3H, CH₃), 1.74-1.86 (m, 1H, CH₂), 1.97-2.01 (m, 1H, CH₂), 4.24-4.28 (s largo, 1H, CH), 5.06 e 5.40 (dois s, 2H, CH₂), 6.90-6.95 (m, 3H, Ar), 7.26 (t, 2H, Ar), 7.64 (d, 2H, J 8.4 Hz, Ar), 7.75 (d, 2H, J 8.5, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.1 (CH), 61.1 (CH₂), 115.6 (CH, Ar), 117.4 (CH, Ar), 120.5 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 127.0 (Ar), 128.3 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 135.3 (Ar), 149.9 (C=N, Ar), 154.1 (C=N), 157.7 (C–O, Ar), 158.5 (C–O, Ar), 165.1 (C–O, Ar), 175.8 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₁₉N₃O₂SBr [M+H]⁺: 432.0381; encontrado 432.0390.

5.2.60 [2-Fenóxi-1-(3,4-diclorofenil)etilideno]hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona (58g, TSM20)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.34 g) da tiossemicarbazona (**57g**, **TSM-09**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores.

Rend.: 0.26 g (60 %);

P.F.: 175 °C;

R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

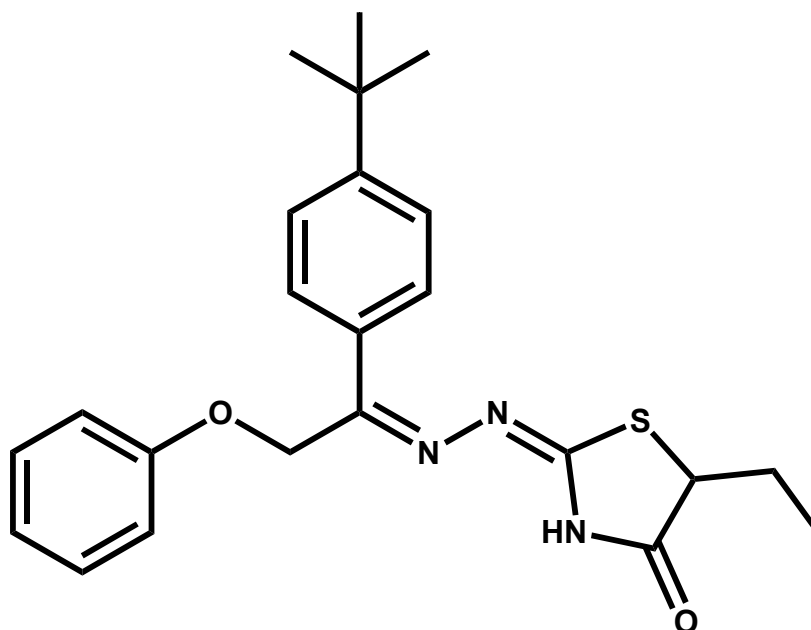
1725 (C=O), 1633 e 1579 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.95 (t, 3H, *J* 7.0 Hz, CH₃), 1.78-1.87 (m, 1H, CH₂), 1.95-2.02 (m, 1H, CH₂), 4.25-4.4.29 (m, 1H, CH), 5.41 (s, 2H, CH₂), 6.90-6.98 (m, 3H, Ar), 7.27 (t, 3H, Ar), 7.76 (q, 2H, *J* 8.7 Hz, Ar), 7.99 (s, 1H, Ar), 12.22 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10.2 (CH₃), 25.2 e 26.3 (CH₂), 49.2 (CH), 60.5 (CH₂), 114.3 (CH, Ar), 121.2 (CH, Ar), 127.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 131.2 (Ar), 132.5 (Ar), 135.8 (Ar), 156.7 (C=N), 157.6 (C–O, Ar), 166.6 (S–C=N), 175.9 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₁₈N₃O₂SCl₂ [M+H]⁺: 422.0497; encontrado 421.9887 e 424.9180. Calculado para [M-H]⁺: 420.0340; encontrado: 419.9904.

5.2.61 [2-Fenóxi-1-(4-tercbutilfenil)etilideno)hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona (58h, TSM21)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.34 g) da tiossemicarbazona (**57h**, **TSM-12**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de MeOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.3 g (73 %); P.F.: 139-142 °C; R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

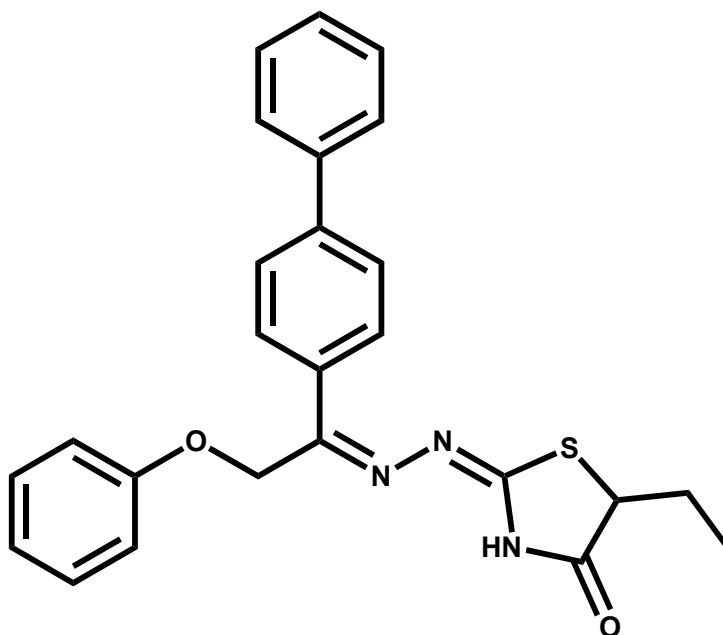
1703 (C=O), 1619 e 1581 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.97 (t, 3H, J 6.0 Hz, CH₃), 1.23 (s largo, 9H, 3x CH₃), 1.77-1.87 (m, 1H, CH₂), 1.95-2.04 (m, 1H, CH₂), 4.26 (q, 1H, J 7.1 e 4.4 Hz, CH), 5.29 e 5.38 (s, 2H, CH₂), 6.86-6.91 (m, 3H, Ar), 7.5 (t, 2H, Ar), 7.42 (m, 2H, Ar), 7.85 (m, 2H, Ar), 12.11 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ 11.1 (CH₃), 27.1 (CH₂), 30.2 (C), 33.9 (CH₃), 49.7 (CH), 61.1 (CH₂), 114.0 (CH, Ar), 121.6 (CH, Ar), 126.7 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 131.2 (Ar), 131.9 (CH, Ar), 133.2 (Ar), 144.4 e 145.8 (Ar), 157.6 (C=N), 159.3 (C-O, Ar), 165.1 (S-C=N), 176.5 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₃H₂₈N₃O₂S [M+H]⁺: 410.1902; encontrado 410.1971.

5.2.62 [2-Fenóxi-1-(1,1'-bifenil)etilideno]hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58i**, TSM26)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 0.5 mmol (0.20 g) da tiossemicarbazona (**57i**, **TSM-33**), 1 mmol (0.2 g) do 2-bromobutanoato de etila, 1 mmol (0.09 g) do acetato de potássio e 30 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.12 g (60 %); P.F.: 159-162 °C; R_f = 0.6 (tolueno)

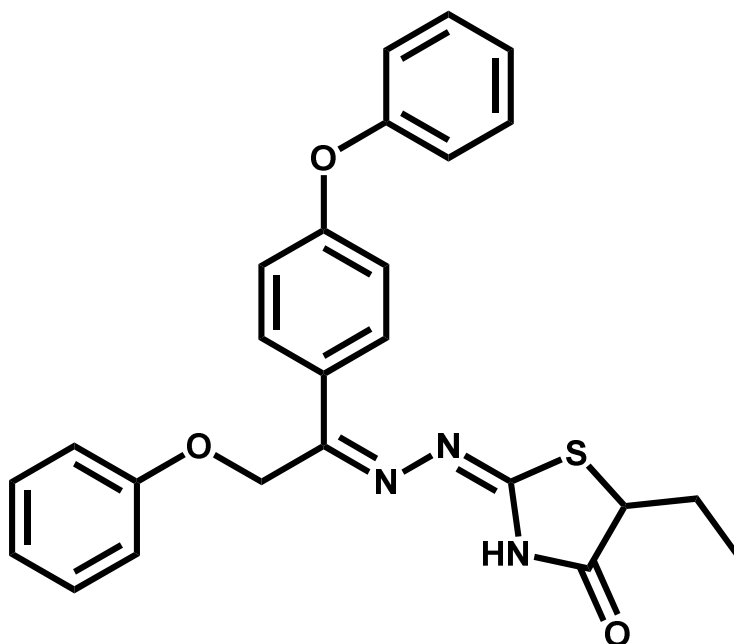
I.V., principais absorções

1730 (C=O), 1640 e 1596 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.96 (t, 3H, J 6.8 Hz, CH₃), 1.80-1.85 (m, 1H, CH₂), 1.97-1.99 (m, 1H, CH₂), 4.24 (s largo, 1H, CH), 5.40 (s, 2H, CH₂), 6.90-7.05 (m, 5H, Ar), 7.06-7.10 (m, 2H, Ar), 7.32-7.43 (m, 5H, Ar), 7.86 (s largo, 2H, Ar), 12.10 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.1 (CH), 61.1 (CH₂), 115.6 (CH, Ar), 117.4 (CH, Ar), 120.5 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 127.0 (Ar), 128.3 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 135.3 (Ar), 149.9 (C=N, Ar), 154.1 (C-O, Ar), 157.7 (C-O, Ar), 158.5 (C-O, Ar), 165.1 (S-C=N), 175.8 (C=O).

5.2.63 [2-Fenóxi-1-(4-fenóxifenil)etilideno)hidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona
(**58j**, TSM22)



Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **5.2.12**: 1 mmol (0.38 g) da tiossemicarbazona (**57j**, **TSM-08**), 1.5 mmol (0.28 g) do 2-bromobutanoato de etila (**49b**), 2 mmol (0.19 g) do acetato de potássio e 50 mL de EtOH. O produto foi re-cristalizado do ciclohexano a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.38 g (80 %); P.F.: 180 °C; R_f = 0.3 (tolueno)

I.V., principais absorções

1731 (C=O), 1640 e 1596 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 0.96 (t, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.80-1.85 (m, 1H, CH₂), 1.97-1.99 (m, 1H, CH₂), 4.24 (s largo, 1H, CH), 5.40 (s, 2H, CH₂), 6.90-7.05 (m, 5H, Ar), 7.06-7.10 (m, 2H, Ar), 7.32-7.43 (m, 5H, Ar), 7.86 (s largo, 2H, Ar), 12.10 (s largo, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.1 (CH), 61.1 (CH₂), 115.6 (CH, Ar), 117.4 (CH, Ar), 120.5 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 127.0 (Ar), 128.3 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 135.3 (Ar), 149.9 (C=N, Ar), 154.1 (C-O, Ar), 157.7 (C-O, Ar), 158.5 (C-O, Ar), 165.1 (S-C=N), 175.8 (C=O).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₅H₂₄N₃O₃S [M+H]⁺: 446.1538; encontrado 446.1570. Calculado para [M+K]⁺: 484.1097; encontrado 484.1123.

5.3 Protocolos da avaliação farmacológica

5.3.1 Animais: 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). Para os experimentos de infecção *in vitro* e *in vivo*, camundongos BALB/c foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM, Salvador, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentação e água à vontade. Os experimentos foram aprovados pelos comitês de ética da FIOCRUZ.

5.3.2 Células, enzimas e inibidores químicos: o baço de camundongo foi macerado e o sobrenadante foi lavado em meio RPMI-1640. O número de esplenócitos foi determinado com o auxílio de um microscópio óptico e ajustado de acordo com o ensaio. Para os ensaios de infecção *in vitro*, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram sensibilizados com tioglicolato de sódio (3 %) e lavados em meio RPMI-1640 por duas vezes e a densidade celular foi ajustada com o auxílio de um microscópio óptico. Epimastigotas da cepa Y foram coletadas e mantidas em meio axênico usando o meio de cultura "liver infusion triptose" contendo 10% de SBF, 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas sob 26° C. Tripomastigotas circulantes da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas. Os parasitas foram então mantidos em ambiente axênico usando o meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF, 1 % de hemina, 1 % de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina em estufa sob 37 °C e 5 % de CO₂. Cruzaína recombinante foi expressa e purificada seguindo o protocolo descrito por McKerrow e col.¹¹⁶ e gentilmente fornecida pelo Prof. James H. McKerrow do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia (São Francisco, CA, EUA). Catepsinas L e S foram adquiridas da Invitrogen (Bethesda, Maryland, EUA). Benznidazol foi fornecido pelo LAFEPE (Recife, Brasil), Nifurtimox foi gentilmente cedido pela Dr^a. Julieta Rubio do Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (Cidade do México, México). Anfotericina B e saponina foram adquiridos na Cultilab (Campinas, Brasil). Cloridrato de Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (registro no Chemical Abstracts Service: 65147-22-0) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

5.3.3 Inibição da enzima cruzaína: cruzaína recombinante foi ativada com DTT e então dissolvida em tampão acetato (0.1 M; pH 5.5) A enzima foi ajustada para obter uma

concentração final de 0.005 μM nos ensaios. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. O meio reacional utilizado foi tampão fosfato contendo NaCl, ditioneitol, e 0.001 % de EDTA. No ensaio de competição não covalente, 490 μL de uma solução do inibidor químico (20 μM) e 10 μL do substrato Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (4.0 μM) foram adicionados na placa. Cada inibidor químico foi testado em duplicata. A reação enzimática foi iniciada com a adição de 10 μL de uma solução da cruzaina contendo 5 mM de DTT. Já para o ensaio de competição covalente, 150 μL de uma solução de cada inibidor químico (40 μM) e 10 μL da enzima em 5 mM de DTT foram adicionados nos respectivos poços e a reação foi incubada por 10 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 340 μL do substrato Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (3 μM) e a reação foi incubada por 5 minutos. Em ambos os experimentos, a placa foi incubada a temperatura ambiente e lida (λ excitação = 355 nm e λ emissão = 450 nm) em diferentes tempos reacionais. A porcentagem de inibição da cruzaina foi calculada usando a equação $100 - (A1/A \times 100)$, onde **A1** corresponde a fluorescência relativa (RFU) da enzima na presença do inibidor químico (20 ou 100 μM) e **A** corresponde a RFU da enzima na ausência do inibidor químico (tampão e DMSO) e a média de cada duplicata foi calculada. Para os inibidores químicos que apresentaram inibição > 40 %, os experimentos foram repetidos e uma curva dose-resposta foi determinada (competição covalente com 10 minutos de pre-incubação), variando as concentrações do inibidor químico entre 1.5 nM até 100 μM . A curva dose-resposta foi determinada usando ao menos oito pontos e a CI_{50} foi estimada usando regressão não linear no Origin (versão 8.8) usando o "logistic fit".

5.3.4 Inibição das enzimas catepsinas L e S: a amostra liofilizada da catepsina L ou S recombinante foi dissolvida em tampão acetato (0.1 M; pH 5.5) contendo DTT (5 mM) e sonicada em banho de ultrassom durante 1 hora. Após ativação, a enzima foi ajustada para obter uma concentração final de 0.03 μM nas reações. Para a preparação das soluções contendo os inibidores químicos e para o substrato da catepsina (Cbz-Phe-Arg-*p*-nitroanilida hidrocloreto, ZFR-pNA), preparou-se um tampão fosfato de sódio (pH 6.0) contendo 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% de albumina bovina sérica e 0.01 % de Tween. Os inibidores químicos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em tampão fosfato, sendo que a concentração final de DMSO na solução foi de 3 %. As reações foram feitas em uma placa de 24 poços, onde adicionou-se 90 μL do inibidor químico e 10 μL da respectiva catepsina. Cada inibidor químico foi testado em duplicata. A placa foi incubada por 45 minutos na temperatura ambiente. Adicionou-se 100 μL do o substrato da enzima (concentração final de 50 μM) e a placa foi incubada por 5 minutos e então lida no

espectrofotômetro de emissão seguindo as especificações do fabricante do substrato da enzima (λ excitação = 360 nm e λ emissão = 450 nm). A porcentagem de inibição da enzima foi calculada como descrito no item 5.3.3, e a CI_{50} foi estimada usando regressão não linear no Origin (versão 8.8) usando o "logistic fit" para uma curva dose-resposta contendo ao menos nove concentrações do respectivo inibidor químico adicionado.

5.3.5 Toxicidade para esplenócitos: esplenócitos de camundongos BALB/c foram distribuídos em placa de 96 poços com uma densidade de 5×10^6 células por poço em meio RPMI-1640. Cada inibidor químico foi solubilizado em DMSO na concentração de 10 mg/mL e em seguida a amostra foi diluída serialmente em meio RPMI-1640 nas concentrações de 1.0, 10 e 100 μ g/mL, em triplicata. Como controle positivo, usou-se a saponina na concentração de 0.1 μ g/mL, enquanto que como controle negativo, os poços receberam somente meio RPMI-1640 e DMSO. A placa foi então cultivada por 24 horas na temperatura de 37° C e 5% CO_2 . Então adicionou-se 1.0 μ Ci de 3H -timidina em cada poço e a placa foi incubada por 6 horas. A placa foi então lida no contador de irradiação beta (Multilabel Reader, Finland) e a porcentagem de incorporação de timidina tritiada foi determinada. Para as células que não foram tratadas com os compostos (controle negativo), calculou-se como 100% de incorporação de timidina tritiada (100% de viabilidade celular). Para as células tratadas com saponina, a viabilidade celular foi de 5%. Quando o percentual de incorporação foi maior que 90%, a concentração do composto foi considerada como atóxica para os esplenócitos.

5.3.6 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota: epimastigotas das cepas Y ou Dm28c foram distribuídas em uma placa de 96 poços em uma densidade final de 10^6 células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos como descrito no item 5.3.5, foram adicionadas nos respectivos poços em triplicatas. Bdz (1) e Nfx (2) foram usados como controles positivos neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 11 (cepa Y) ou 5 dias (cepa Dm28c) sob 26° C e 5% de CO_2 . Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas foi calculado em uma câmara de Neubauer. Para as epimastigotas não tratadas com os inibidores químicos (controle negativo), assumiu-se como 100% do número de parasitas. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI_{50} foram calculados usando ao menos cinco concentrações ("data-points") usando uma equação não-linear (Prism, versão 4.0).

5.3.7 Toxicidade para a forma tripomastigota: tripomastigotas da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ e distribuídas em uma placa de 96 poços para uma densidade final de 4×10^5 células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos

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

5.3.8 Infecção de tripomastigotas em macrófagos: macrófagos coletados do exsudado peritoneal de camundongos BALB/c foram distribuídos em uma placa de 24 poços para uma densidade final de 2×10^5 células por poço, contendo meio RPMI em 10 % de SBF. A placa foi cultivada por 24 horas para obter adesão celular. Em seguida, adicionou-se 2×10^6 tripomastigotas suspensas em meio RPMI em cada poço. A placa foi mantida por 2 horas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse tempo, a placa foi lavada com soluções de salina, para remover tripomastigotas extracelulares. Logo em seguida, os inibidores químicos foram adicionados na concentração de 10 µM (previamente dissolvidos em DMSO e meio RPMI) em duplicatas. Bdz (1) foi usado como controle positivo. Após a adição dos inibidores químicos, a placa foi incubada por 6 horas, então o meio de cultivo foi substituído por um meio de cultivo "fresh", e a placa foi mantida em estufa por 96 horas. As células foram fixadas com metanol e observadas em microscópio ótico (Olympus, Tóquio, Japão). A taxa de macrófagos infectados foi contada em cada poço. O percentual de inibição da infecção da cultura tratada com os inibidores foi comparado com o controle negativo. Para a contagem de amastigotas, alíquotas de cada poço foram marcadas com uma solução de Giemsa e as lâminas foram observadas em um microscópio ótico (Olympus, Tóquio, Japão). O número de amastigotas / macrófagos foi determinado pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por cada lâmina analisada. O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da CI₅₀, usando ao menos cinco concentrações diferentes de cada inibidor químico. Foram realizados dois experimentos independentes para os cálculos da CI₅₀.

5.3.9 Invasão de tripomastigotas em macrófagos: macrófagos da linhagem BALB/c foram incubados em placa de 24 poços em uma concentração de 10^5 células/poço em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, os macrófagos foram infectados com 10^7 tripomastigotas/poço, seguida pela adição dos inibidores químicos na concentração de 50 µM, em duplicata. Anfotericina B foi usada como inibidor

de referência. Após 2 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas cinco vezes com salina estéril para remover o excesso de tripomastigotas extracelulares. Após as lavagens, as células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por um tempo adicional de 2 horas. Os poços foram lavados com salina, fixados com metanol por 10 minutos a -4°C e corados com Giemsa por 30 min. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por cada lâmina marcada com uma solução de Giemsa.

5.3.10 Atividade antiproliferativa em esplenócitos estimulados com concanavalina A:

200 µL de esplenócitos de camundongos BALB/c suspensos em meio RPMI-1640 foram dispersos em placa de 24 poços com uma densidade de 5×10^6 células/mL. Em seguida, 100 µL de uma solução de concanavalina A (2.0 µg/mL) em tampão HEPES foi adicionada em cada poço. Adicionou-se 100 µL de uma solução contendo os inibidores químicos nos respectivos poços nas concentrações de 0.002, 0.02, 0.2, 2.0, 20 e 200 µM, em triplicata. Como controle positivo, usou-se a ciclosporina A (Sigma-Aldrich, Maryland, EUA) nas concentrações 0.01 e 0.001 µg/mL, enquanto que como controle negativo, os poços receberam somente concanavalina A. A placa foi cultivada por 72 horas na temperatura de 37° C e 5% CO₂. Logo após, 10 µL de AlamarBlue® (Invitrogen, EUA) foi adicionado em cada poço e a placa foi novamente incubada por 5 horas. A placa foi lida em um leitor de fluorescência com filtro em 590 nm. A porcentagem de inibição da proliferação celular foi calculada em comparação aos poços que receberam somente concanavalina A. Os valores das CI₅₀ foram calculados no Origin (versão 8.8) usando regressão não linear. Foram realizados dois experimentos independentes.

5.3.11 Infecção de tripomastigotas em camundongos BALB/c:

fêmeas entre 6-8 semanas foram infectadas com 10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y (suspensas em 100 µL de uma solução salina) por inoculação intraperitoneal. Os animais foram divididos em grupos com $n = 6$, incluindo o grupo controle (que recebeu somente salina mais 20 % de DMSO). A infecção foi acompanhada pela quantificação da parasitemia sanguínea. No quinto dia após infecção, os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, com os inibidores químicos durante cinco dias consecutivos. Os inibidores químicos, incluindo o Bdz (**1**), foram administrados na concentração de 250 µmol/kg. Nos dias 5, 8, 10 e 12, a parasitemia sanguínea foi monitorada diariamente em todos os animais através da coleta de 5 µL de sangue da veia lateral da cauda. A quantidade de tripomastigotas viáveis (motilidade) foi determinada em cada grupo de animais. Calculou-se o número médio de parasitas em cada grupo tratado e a análise estatística foi feita em comparação com os

diferentes grupos (comparação múltipla). Foram realizados dois experimentos independentes. Para o cálculo da porcentagem de inibição da parasitemia, utilizamos a seguinte equação: $[(\text{média da parasitemia no grupo controle}) - (\text{média da parasitemia no grupo tratado}) / (\text{média da parasitemia no grupo controle})] \times 100$.

5.3.13 Análise estatística: para os itens 5.3.8 e 5.3.9, a análise estatística foi calculada usando o teste ANOVA "one-way". Para o item 5.3.11, os testes de ANOVA "one-way" e a comparação heterogênea e múltipla de Bonferroni foram aplicados. As variáveis com $P < 0.05$ foram considerados com diferença estatística significativa.

6.0 CITAÇÕES E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases: update 2011. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502870_eng.pdf, ultimo acesso: Fevereiro 2012.

²Pink, R.; Hudson, A.; Mouries, M. A.; Bendig, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 727–740.

³Boone, L. R.; Koszalka, G. W. Antiretroviral drug development for HIV: Challenges for the future. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. **2010**, 11, 863–67.

⁴Renslo, R. A.; McKerrow, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 701–710.

⁵Khatami, A.; Firooz, A.; Gorouhi, F.; Dowlati, Y. Treatment of acute old world cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, 57, 335.e1–e29.

⁶Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C.; McNamara, C. W.; Fidock, D. A.; Nagle, A.; Nam, T. G.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynn, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P. G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y.; Chatterjee, A.; Diagana, T. T.; Winzeler, E. A. Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science*, **2011**, 334, 1372–1377.

⁷Steverding, D. The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasit Vectors*. **2010**, 3, 1–9.

⁸Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet* **2010**, 375, 1388–402.

⁹Barrett, M. P.; Burchmore, R. J.; Stich, A.; Lazzari, J. O.; Frasch, A. C.; Cazzulo, J. J.; Krishna, S. The trypanosomiasis. *Lancet* **2003**, 362, 1469–1480.

¹⁰Coura, J. R.; Borges, J. P. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **2011**, 106, 641–645.

¹¹Bern, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 364, 2527–2234.

- ¹²Hasslocher-Moreno, A. M.; do Brasil, P. E.; de Sousa, A. S.; Xavier, S. S.; Chambela, M. C.; da Silva, G. M. S. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *65*, 1261–1266.
- ¹³Pinazo, M. J.; Muñoz, J.; Posada, E.; López-Chejade, P.; Gállego, M.; Ayala, E.; del Cacho, E.; Soy, D.; Gascon, J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4896–4899.
- ¹⁴Marin-Neto, J. A.; Rassi Jr, A.; Avezum Jr, A.; Mattos, A. C.; Rassi, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2009**, *104*, 319–324.
- ¹⁵Marin-Neto, J. A.; Rassi Jr, A.; Morillo, C. A.; Avezum, A.; Connolly, S. J.; Sosa-Estani, S.; Rosas, F.; Yusuf, S.; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am. Heart J.* **2008**, *156*, 37–43.
- ¹⁶Mitch, L. Drug developers finally take aim at a neglected disease. *Science* **2011**, *333*, 933–935.
- ¹⁷El-Sayed, N.M.; Myler, P.J.; Bartholomeu, D.C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.N.; Ghedin, E.; Worthey, E.A.; Delcher, A.L.; Blandin, G.; Westenberger, S.J.; Caler, E.; Cerqueira, G.C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Åslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D.A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J.F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P.T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A.C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M.J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C.R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J.C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J.L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S.L.; Sanchez, D.O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A.J.; Sisk, E.; Tammi, M.T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P.N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C.M.; Stuart, K.D.; Andersson, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, **2005**, *309*, 409–415.
- ¹⁸Alvarez, V. E.; Niemirowicz, G. T.; Cazzulo, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica Biophysica Acta* **2012**, *1824*, 195–206.

- ¹⁹ McKerrow, J. H.; Caffrey, C.; Kelly, B.; Loke, P.; Sajid, M. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **2006**, *1*, 497–536.
- ²⁰ Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1780*, 1236–1248.
- ²¹ Hall, B. S.; Wu, X.; Hu, L.; Wilkinson, S. R. Exploiting the drug activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *54*, 1193–1199.
- ²² Castro, J. A.; de Mecca, M. M.; Bartel, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* **2006**, *25*, 471–479.
- ²³ de Oliveira, R. B.; Vaz, A. B.; Alves, R. O.; Liarte, D. B.; Donnici, C. L.; Romanha, A. J.; Zani, C. L. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 169–173.
- ²⁴ Eberle, C.; Burkhard, J. A.; Stump, B.; Kaiser, M.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. Synthesis, inhibition potency, binding mode, and antiprotozoal activities of fluorescent inhibitors of trypanothione reductase based on mepacrine-conjugated diaryl sulfide scaffolds. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2034–2044.
- ²⁵ Wenzel, I. N.; Wong, P. E.; Maes, L.; Müller, T. J.; Krauth-Siegel, R. L.; Barrett, M. P.; Davioud-Charvet, E. Unsaturated Mannich bases active against multidrug-resistant *Trypanosoma brucei brucei* strains. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 339–351.
- ²⁶ Cavalli, A.; Lizzi, F.; Bongarzone, S.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R. L.; Bolognesi, M. L. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3031–3035.
- ²⁷ Schenkman, S.; Ferguson, M. A.; Heise, N.; de Almeida, M. L.; Mortara, R. A.; Yoshida, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by *trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *59*, 293–303.
- ²⁸ Schenkman, S.; Eichinger, D.; Pereira, M.E., and Nussenzweig, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma trans*-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 499–523.
- ²⁹ Schenkman, R. P. F.; Vandekerckhove, F.; Schenkman, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 898–902.
- ³⁰ Fontanella, G. H.; De Vusser, K.; Laroy, W.; Daurelio, L.; Nocito, A. L.; Revelli, S.; Contreras, R. Immunization with an engineered mutant *trans*-sialidase highly protects mice

from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. *Vaccine* **2008**, *26*, 2322–2334.

³¹Neres, J.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T. Rational drug design in parasitology: *trans*-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 110–117.

³²Damager, I.; Buchini, S.; Amaya, M. F.; Buschiazzi, A.; Alzari, P.; Frasch, A. C.; Watts, A.; Withers, S. G. Kinetic and mechanistic analysis of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase reveals a classical ping-pong mechanism with acid/base catalysis. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3507–3512.

³³Vasconcelos, J. R.; Hiyane, M. I.; Marinho, C. R.; Claser, C.; Machado, A. M.; Gazzinelli, R. T.; Bruña-Romero, O.; Alvarez, J. M.; Boscardin, S. B.; Rodrigues, M. M. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and *trans*-sialidase. *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 878–886.

³⁴Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Farady, C. J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K. C.; Caffrey, C. R.; Legac, J.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Craik, C. S.; Rosenthal, P. J.; Brinen, L. S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25697–25703.

³⁵Yong, V.; Schmitz, V.; Vannier-Santos, M. A.; de Lima, A. P.; Lalmanach, G.; Juliano, L.; Gauthier, F.; Scharfstein, J. Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 47–59.

³⁶Souto-Padron, T.; Campetella, O. E.; Cazzulo, J. J.; Souza, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.* **1990**, *96*, 485–490.

³⁷Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Hsieh, I.; Greenbaum, D. C.; McKerrow, J. H.; Engel, J. C. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *Plos Pathog.* **2011**, *7*, e1002139.

³⁸Monteiro, A. C.; Schmitz, V.; Svensjo, E.; Gazzinelli, R. T.; Almeida, I. C.; Todorov, A.; de Arruda, L. B.; Torrecilhas, A. C.; Pesquero, J. B.; Morrot, A.; Bouskela, E.; Bonomo, A.; Lima, A. P.; Müller-Esterl, W.; Scharfstein, J. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 6325–6335.

³⁹Andrade, D.; Serra, R.; Svensjö, E.; Lima, AP.; Ramos-Jr, E. S.; Fortes, F. S.; Morandini, A. C.; Morandi, V.; Soeiro, M. N.; Tanowitz, H. B.; Scharfstein, J. *Trypanosoma cruzi*

invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1333–1347.

⁴⁰Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785–799.

⁴¹Priotto, S.; Sartori, M. J.; Repossi, G.; Valentich, M. A. *Trypanosoma cruzi*: participation of cholesterol and placental alkaline phosphatase in the host cell invasion. *Exp Parasitol.* **2009**, *122*, 70–73.

⁴²Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 311–318.

⁴³Silva, D. T.; de Nazareth, S. L.; de Meirelles, M.; Almeida, D.; Urbina, J. A.; Pereira, M. C. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2006**, *27*, 530–537.

⁴⁴Bucker, F. S.; Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *625*, 61–80.

⁴⁵Ferella, M.; Li, Z. H.; Andersson, B.; Docampo, R. Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Exp Parasitol.* **2008**, *119*, 308–12.

⁴⁶Balliano, G.; Dehmlow, H.; Oliaro-Bosso, S.; Scaldaferrri, M.; Taramino, S.; Viola, F.; Caron, G.; Aebi, J.; Ackermann, J. Oxidosqualene cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi*, *Pneumocystis carinii* and *Arabidopsis thaliana* expressed in yeast: a model for the development of novel antiparasitic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 718–723.

⁴⁷Lepesheva, G. I.; Ott, R. D.; Hargrove, T. Y.; Kleshchenko, Y. Y.; Schuster, I.; Nes, W. D.; Hill, G. C.; Villalta, F.; Waterman, M. R. Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1283–1293.

⁴⁸Lepesheva, G. I.; Hargrove, T. Y.; Anderson, S.; Kleshchenko, Y.; Furtak, V.; Wawrzak, Z.; Villalta, F. Waterman MR. Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 25582–25590.

⁴⁹Chen, C. K.; Leung, S. S.; Guilbert, C.; Jacobson, M. P.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M. Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*

bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *Plos Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e651.

⁵⁰Pereira, M. G.; Nakayasu, E. S.; Sant'Anna, C.; De Cicco, N. N.; Atella, G. C.; de Souza, W.; Almeida, I. C.; Cunha-e-Silva, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. *Plos One.* **2011**, *6*, e22359.

⁵¹Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Otomo, T.; Hiyoshi, H. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2379–2387.

⁵²Urbina, J. A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Lira, R.; Romanha, A. J. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2003**, *21*, 27–38.

⁵³Chong, C. R.; Sullivan Jr, D. J. New uses for old drugs. *Nature* **2007**, *448*, 645–646.

⁵⁴Filardi, L. S.; Brener, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1982**, *76*, 293–297.

⁵⁵Lages-Silva, E.; Filardi, L. S.; Brener, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1990**, *85*, 401–405.

⁵⁶Salomão, K.; de Souza, E. M.; Carvalho, S. A.; da Silva, E. F.; Fraga, C. A. M.; Barbosa, H. S.; de Castro, S. L. *In vitro* and *in vivo* activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megalozol against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2023–2031.

⁵⁷Maya, J. D.; Bollo, S.; Nuñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; Repetto, Y.; Morello, A.; Périé, J.; Chauvière, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochem Pharmacol.* **2003**, *65*, 999–1006.

⁵⁸Chauvière, G.; Bouteille, B.; Enanga, B.; de Albuquerque, C.; Croft, S. L.; Dumas, M.; Périé, J. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megalozol, a trypanocidal lead. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 427–440.

⁵⁹Carvalho, S. A.; da Silva, E. F.; Santa-Rita, R. M.; de Castro, S. L.; Fraga, C. A. M. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, designed as non-mutagenic megalozol analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, *14*, 5967–5970.

- ⁶⁰Carvalho, S. A.; Lopes, F. A.; Salomão, K.; Romeiro, N. C.; Wardell, S. M.; de Castro, S. L.; da Silva, E. F.; Fraga, C. A. M. Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem.* **2008**, *16*, 413–421.
- ⁶¹Zanatta, N.; Amaral, S. S.; Dos Santos, J. M.; de Mello, D. L.; Fernandes, L. S.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A.; Andricopulo, A. D.; Borchhardt, D. M. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(N'-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10236–10243.
- ⁶²Ifa, D. R.; Rodrigues, C. R.; Alencastro, R. B.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. *J. Mol. Struct.* **2000**, *505*, 11–17.
- ⁶³Caffrey, C. R.; Schanz, M.; Nkemngu, N. J.; Brush, M.; Hansell, E.; Cohen, F. E.; Flaherty, T.M.; McKerrow, J. H.; Steverding, D. Screening of acyl hydrazide proteinase inhibitors for antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2002**, *19*, 227–233.
- ⁶⁴Vera-Divaio, M. A.; Freitas, A. C.; Castro, H. C.; de Albuquerque, S.; Cabral, L. M.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; Martins, R. C.; Henriques, M. G.; Dias, L. R. Synthesis, antichagasic in vitro evaluation, cytotoxicity assays, molecular modeling and SAR/QSAR studies of a 2-phenyl-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-acrylic acid benzylidene-carbohydrazide series. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 295–302.
- ⁶⁵Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J. J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorg Med Chem.* **2008**, *16*, 6995–7004.
- ⁶⁶Romeiro, N. C.; Aguirre, G.; Hernández, P.; González, M.; Cerecetto, H.; Aldana, I.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 641–652.
- ⁶⁷dos Santos-Filho, J. M.; Leite, A. C. L.; de Oliveira, B. G.; Moreira, D. R. M.; Lima, M. S.; Soares, M. B. P.; Leite, L. F. C. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-*N*-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *18*, 6682–6691.
- ⁶⁸Bettiol, E.; Samanovic, M.; Murkin, A. S.; Raper, J.; Buckner, F.; Rodriguez, A. Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against

intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening. *Plos Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e384.

⁶⁹Andriani, G.; Chessler, A. D.; Courtemanche, G.; Burleigh, B. A.; Rodriguez, A. Activity *in vivo* of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening. *Plos Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1298.

⁷⁰Diaz-Gonzalez, R.; Kuhlmann, F. M.; Galan-Rodriguez, C.; da Silva, L. M.; Saldivia, M.; Karver, C. E.; Rodriguez, A.; Beverley, S. M.; Navarro, M.; Pollastri, M. P. The susceptibility of trypanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. *Plos Negl. Trop. Dis.* **2011**, *8*, e1297.

⁷¹Zeiman, E.; Greenblatt, C. L.; Elgavish, S.; Khozin-Goldberg, I.; Golenser, J. Mode of action of fenarimol against *Leishmania spp.* *J. Parasitol.* **2008**, *94*, 280–286.

⁷²Keenan, M.; Abbott, M. J.; Alexander, P. W.; Armstrong, T.; Best, W. M.; Berven, B.; Botero, A.; Chaplin, J. H.; Charman, S. A.; Chatelain, E.; von Geldern, T. W.; Kerfoot, M.; Khong, A.; Nguyen, T.; McManus, J. D.; Morizzi, J.; Ryan, E.; Scandale, I.; Thompson, R. A.; Wang, S. Z.; White, K. L. Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4189–41204.

⁷³Rodríguez, G.; Duque, A.; Castellsague, J.; Pérez-Gutthann, S.; Stricker, B. H. A cohort study on the risk of acute liver injury among users of ketoconazole and other antifungal drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *48*, 847–852.

⁷⁴Nikkels, A. F.; Nikkels-Tassoudji, N.; Piérard, G. E. Oral antifungal-exacerbated inflammatory flare-up reactions of dermatomycosis: case reports and review of the literature. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2006**, *7*, 327–331.

⁷⁵Chambers, W. M.; Millar, A.; Jain, S.; Burroughs, A. K. Terbinafine-induced hepatic dysfunction. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2001**, *13*, 1115–1118.

⁷⁶Hucke, O.; Gelb, M. H.; Verlinde, C. L. M. J.; Buckner, F. S. The protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5415–5418.

⁷⁷Venet, M.; End, D.; Angibaud, P. Farnesyl protein transferase inhibitor ZARNESTRA R115777: history of a discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1095–1102.

⁷⁸Kraus, J. M.; Verlinde, C. L. M. J.; Karimi, M.; Lepesheva, G. I.; Gelb, M. H.; Buckner, F. S. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1639–1647.

- ⁷⁹Kraus, J. M.; Tatipaka, H. B.; McGuffin, S. A.; Chennamaneni, N. K.; Karimi, M.; Arif, J.; Verlinde, C. L. M. J.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H. Second generation analogues of the cancer drug clinical candidate tipifarnib for anti-Chagas disease drug discovery. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3887–3898.
- ⁸⁰Hanada, K.; Tamai, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Seki, T.; Tanaka, I. Antimicrobial peptides from *Aspergillus* species. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 529–536.
- ⁸¹Sumiya, S.; Kitamura, K. Kim, M. J.; Yamamoto, D.; Matsumoto, K.; Inoue, M.; Ishida, T.; Mizuno, H. Crystal structure of papain-E64-c complex. Binding diversity of E64-c to papain S2 and S3 subsites. *Biochem. J.* **1992**, *287*, 797–803.
- ⁸²Roush, W. R.; González, F. V.; McKerrow, J. H.; Hansell, E. Design and synthesis of dipeptidyl α',β' -epoxy ketones, potent irreversible inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2809–2812.
- ⁸³Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D. Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193–3196.
- ⁸⁴Roush, W. R.; Cheng, J.; Knapp-Reed, B.; Alvarez-Hernandez, A.; McKerrow, J. H.; Hansell, E.; Engel, J. C. Potent second generation vinyl sulfonamide inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *11*, 2759–2762.
- ⁸⁵Jaishankar, P.; Hansell, E.; Zhao, D. M.; Doyle, P. S.; McKerrow, J. H.; Renslo, A. R. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 624–628.
- ⁸⁶Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3932–3939.
- ⁸⁷Barr, S. C.; Warner, K. L.; Kornreic, B. G.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L.; McKerrow, J. H. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 5160–5161.
- ⁸⁸Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695–2707.
- ⁸⁹Greenbaum, D. C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Chibale, K. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium*

falciparum, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3212–3219.

⁹⁰Leite, A. C. L.; de Lima, R. S.; Moreira, D. R.; Cardoso, M. V. O.; Gouveia, A. C.; Santos, L. M.; Hernandez, M. Z.; Kiperstok, A. C.; de Lima, R. S.; Soares, M. B. P. Synthesis, docking, and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3749–3457.

⁹¹Leite, A. C.; Moreira, D. R.; Cardoso, M. V. O.; Hernandez, M. Z.; Pereira, V. R. A.; Silva, R. O.; Kiperstok, A. C.; Lima, M. S.; Soares, M. B. P. Synthesis, cruzain docking, and *in vitro* studies of aryl-4-oxothiazolylhydrazones against *Trypanosoma cruzi*. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1339–1345.

⁹²Hernandes, M. Z.; Rabello, M. M.; Leite, A. C. L.; Cardoso, M. V. O.; Moreira, D. R. M.; Brondani, D. J.; Simone, C. A.; Reis, L. C.; Souza, M. A.; Pereira, V. R.; Ferreira, R. S.; McKerrow, J. H. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 7826–7835.

⁹³Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: a Useful Strategy for Molecular Modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 23–49.

⁹⁴Leite, A. C. L.; Soares, M. B. P.; Moreira, D. R. M. Dados não publicados, 2010.

⁹⁵Brak, K.; Doyle, P. S.; McKerrow, J. H.; Ellman, J. A. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6404–6410.

⁹⁶Bu, X.; Jing, H.; Wang, L.; Chang, T.; Jina, L.; Liang, Y. Organic base catalyzed *O*-alkylation of phenols under solvent-free condition. *J. Mol. Catalysis A* **2006**, 258, 121–124.

⁹⁷Wong, R.; Dolman, S. J. Isothiocyanates from tosyl chloride mediated decomposition of *in situ* generated dithiocarbamic acid salts. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3969–3971.

⁹⁸Klayman, D. L.; Bartosevich, J. F.; Griffin, T. S.; Mason, C. J.; Scovill, J. P. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 855–862.

⁹⁹Leite, A. C. L.; Moreira, D. R. M.; Coelho, L. C. D.; de Menezes, F. D.; Brondani, D. J. Synthesis of aryl-hydrazones via ultrasound irradiation in aqueous medium. *Tetrahedron. Lett.* **2008**, 49, 1538–1541.

¹⁰⁰García-Tojal, Urtiaga, M.K.; Cortes, R.; Lezama, L.; Arriortua, M. I.; Rojo, T. Synthesis, structure, spectroscopic and magnetic properties of two copper(II) dimers containing pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazionate (L), $[\{\text{CuL}(\text{X})\}_2](\text{X} = \text{Cl or Br})$. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 2234–2238.

- ¹⁰¹Casas, J. S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 197–126.
- ¹⁰⁴Eliel, E. L.; Fisk, M. T.; Prosser, T. α -Chlorophenylacetic acid. *Org. Synth. Coll.* **1963**, vol. 4, p.169.
- ¹⁰⁵Vicini, P.; Geronikaki, A.; Anastasia, K.; Incertia, M.; Zani, F. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3859–3864.
- ¹⁰⁶Pizzo, C.; Saiz, C.; Talevi, A.; Gavernet, L.; Palestro, P.; Bellera, C.; Blanch, L. B.; Benítez, D.; Cazzulo, J. J.; Chidichimo, A.; Wipf, P.; Mahler, S. G. Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2011**, *77*, 162–177.
- ¹⁰⁷Cardoso, M. V. O. Síntese e avaliação de tiossemicarbazonas e tiazolinonas como inibidores da protease cruzaina do *Trypanosoma cruzi* (TCC). Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas; Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, **2008**.
- ¹⁰⁸Cardoso, M. V. O.; Moreira, D. R. M.; Leite, A. C. L.; Simone, C. A. Dados não publicados, **2010**.
- ¹⁰⁹Zhu, X.; Giordano, T.; Yu, Q. S.; Holloway, H. W.; Perry, T. A.; Lahiri, D. K.; Brossi, A.; Greig, N. H. Thiothalidomides: novel isosteric analogues of thalidomide with enhanced TNF- α inhibitory activity. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5222–5229.
- ¹¹⁰Erian, A. W.; Sherif, S. M.; Gaber, H. M. The chemistry of α -haloketones and their utility in heterocyclic synthesis. *Molecules* **2003**, *8*, 793–865.
- ¹¹¹Chimenti, F.; Bizzarri, B.; Maccioni, E.; Secci, D.; Bolasco, A.; Chimenti, P.; Fioravanti, R.; Granese, A.; Carradori, S.; Tosi, F.; Ballario, P.; Vernarecci, S.; Filetici, P. A Novel histone acetyltransferase inhibitor modulating gcn5 network: cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 530–536.
- ¹¹²Zhang, 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. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19*, 475–478.
- ¹¹³Güven, O. O. Synthesis and characterization of some novel 4-furyl substituted 3-imidazoline 3-oxides. *Arkivoc* **2007**, *15*, 142–147.
- ¹¹⁴Romanha, A. J.; de Castro, S. L.; Soeiro, M. N. C.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C. L.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia,

M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M. B. P.; Andrade, S. M.; Armstrong, T.; Degrave, W.; Andrade, Z. A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 233–238.

¹¹⁵Matsuo, A. L.; Silva, L. S.; Torrecilhas, A. C.; Pascoalino, B. S.; Ramos, T. C.; Rodrigues, E. G.; Schenkman, S.; Caires, A. C.; Travassos, L. R. *In Vitro* and *in vivo* trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3318–3325.

¹¹⁶Ferreira, R.S.; Bryant, C.; Ang, K. K.; McKerrow, J.H.; Shoichet, B.K.; Renslo, A. R. Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure-activity series. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5005–5058.

¹¹⁷Messeder, J. C.; Tinoco, L. W.; Figueroa-Villar, J. D.; Souza, E. M.; Rita, R. S.; de Castro, S. L. Aromatic guanyl hydrazones: synthesis, structural studies and *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 3079–3084.

¹¹⁸Rebolledo, A. P.; Vieites, M.; Gambino, D.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Zani, C. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Teixeira, L. R.; Batista, A. A.; Beraldo, H. Palladium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: spectral characterization, structural studies and cytotoxic activity. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 698–706.

¹¹⁹Roffe, E.; Rothfuchs, A. G.; Santiago, H. C.; Marino, A. P. M. P.; Ribeiro-Gomes, F. L.; Eckhaus, M.; Antonelli, L. R. V.; Murphy, P. M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunology*, **2012**, *188*, 649–660.

¹²⁰Casini, A.; EDAFE, F.; Erlandsson, M.; Gonsalvi, L.; Ciancetta, A.; Re, N.; Ienco, A.; Messori, L.; Peruzzini, M.; Dyson, P. J. Rationalization of the inhibition activity of structurally related organometallic compounds against the drug target cathepsin B by DFT. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 5556–5563.

¹²¹Mura, P.; Camalli, M.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Messori, L. *Trans-cis-cis*-[RuCl₂(DMSO)₂(2-amino-5-methyl-thiazole)₂], (PMRu52), a novel ruthenium(II) compound acting as a strong inhibitor of cathepsin B. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 111–117.

¹²²Fricker, S. P.; Mosi, R. M.; Cameron, B. R.; Baird, I.; Zhu, Y.; Anastassov, V.; Cox, J.; Doyle, P. S.; Hansell, E.; Lau, G.; Langille, J.; Olsen, M.; Qin, L.; Skerlj, R.; Wong, R. S.; Santucci, Z.; McKerrow, J. H. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1839–1845.

¹²³Vieites, M.; Smircich, P.; Parajón-Costa, B.; Rodríguez, J.; Galaz, V.; Olea-Azar, C.; Otero, L.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Gómez-Barrio, A.; Garat, B.; Gambino,

D. Potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. *J. Inorg. Biol. Chem.* **2008**, *13*, 723–735.

¹²⁴Pérez-Rebolledo, A.; Teixeira, L. R.; Batista, A. A.; Mangrich, A. S.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Hernández, P.; Ferreira, A. M.; Speziali, N. L.; Beraldo, H. 4-Nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant *in vitro* anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 939–948.

¹²⁵Maldonado, C. R.; Marín, C.; Olmo, F.; Huertas, O.; Quirós, M.; Sánchez-Moreno, M.; Rosales, M. J.; Salas, J. M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal evaluation of nickel complexes with an azapurine derivative against *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 6964–6972.

¹²⁶Silva, J. J. N.; Guedes, P. M. M.; Zottis, A.; Balliano, T. L.; Silva, F. O. N.; França, L. G. L.; Ellena, J.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; Franco, W. D.; Silva, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 260–269.

¹²⁷Brak, K.; Kerr, I. D.; Barrett, K. T.; Fuchi, N.; Debnath, M.; Ang, K.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H.; Doyle, P. S.; Brinen, L. S.; Ellman, J. A. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1763–1773.

¹²⁸Zaldini, M. Z.; Rabello, M. Dados não publicados, **2012**.

¹²⁹Donnici, C. L.; Araújo, M. H.; Oliveira, H. S.; Moreira, D. R. M.; Pereira, V. R. A.; Souza, M. de A.; Castro, M. C. A. B. de; Leite, A. C. L. Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: synthesis, biological characterization and structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5038–5043.

¹³⁰Vieites, M.; Buccino, P.; Otero, L.; Gonzalez, M.; Piro, O. E.; Delgado, R. S.; Sant`anna, C. R. M.; Barreiro, E. J.; Cerecetto, H.; Gambino, D. Chemo-selective hydrolysis of the iminic moiety in salicylaldehyde semicarbazone promoted by ruthenium. *Inorg. Chimica Acta* **2005**, *358*, 3065–3074.

¹³¹Sukanya, D.; Evans, M. R.; Zeller, M.; Natarajan, K. Hydrolytic cleavage of Schiff bases by [RuCl₂(DMSO)₄]. *Polyhedron* **2007**, *26*, 4314–4320.

¹³²Aveniente, M.; Pinto, E. F.; Santos, L. S.; Rossi-Bergmann, B.; Barata, L. E. S. Structure–activity relationship of antileishmanials neolignan analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7337–7343.

¹³³Allan, G. M.; Vicker, N.; Lawrence, H. R.; Tutill, H. J.; Day, J. M.; Huchet, M.; Ferrandis, E.; Reed, M. J.; Purohit, A.; Potter, B. V. L. Novel inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: templates for design. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4438–4456.

7.0 Apêndice

7.1 Produção científica durante o doutorado

- ◆ Hernandez, M. Z.; Cavalcanti, S. M. T.; Moreira, D. R. M.; de Azevedo-Junior, W. F.; Leite, A. C. L. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr. Drug Targets*. **2010**, vol. 11, n. 3, p. 303-314.
- ◆ Bahl, D.; Athar, F.; Soares, M. B. P.; de Sá, M. S.; Moreira, D. R. M.; Srivastava, R. M.; Leite, A. C. L.; Azam, A. Structure–activity relationships of mononuclear metal–thiosemicarbazone complexes endowed with potent antiplasmodial and antiamoebic activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, v. 18, p. 6857–6864.
- ◆ MOREIRA, D. R. M. ; SOARES, M. B. P. ; SANTOS, R. R. ; LEITE, A. C. L. . Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr. Drug Targets*, **2009**, v. 10, p. 212–231.
- ◆ Moreira, D. R. M.; Costa, S. P. M.; Hernandez, M. Z.; Rabello, M. M.; Melo, C. M. L.; Rocha, L. F.; de Simone, C. A.; Ferreira, R. S.; Meira, C. S.; Guimarães, E. T.; Srivastava, R. M.; Pereira, V. R. A.; Soares, M. B. P.; Leite, A. C. L. Structural investigation of anti-*Trypanosoma cruzi* 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice. Aceito para publicação no Journal of Medicinal Chemistry, **2012**.

7.2 Produção científica durante o estágio de doutorado sandwich

- ◆ Emileh, A.; Tuzer, S. F.; Abrams, C. F.; Lalonde, J. M.; Bewley, C. A.; Chaiken HAIKEN, I. M.; Moreira, D. R. M. Molecular dynamics simulation of peptide-triazole HIV entry-inhibitor binding to gp120 hydrophobic core and design of a peptide/gp120 covalent conjugate. *In: Structural Biology Related to HIV /AIDS 2012*, 2012, Bethesda, Estados Unidos da América. Book abstract Structural Biology Related to HIV /AIDS **2012**.
- ◆ Kantharaju, Bailey, L.; Moreira, D. R. M.; Tuzer, S. F. ; Contarino, M. R.; Duffy, C.; Schon, A.; Chaiken, I. M. Small non-natural peptide triazole inhibitors of HIV entry. *In: Structural Biology Related to HIV/AIDS*. Bethesda, Estados Unidos da América. Book abstract Structural Biology Related to HIV /AIDS **2012**.
- ◆ Bastian, A. R.; Holmes, A.; Freedman, K.; Jacobson, J. ; Moreira, D. R. M.; Kantharaju, Contarino, M. R. ; McFadden, K.; Hoxie, J.; Chaiken, I. M. Understanding the mechanism of inactivation and virolysis of HIV-1 by a sulfhydryl peptide triazole inhibitor before host cell

exposure. *In*: Structural Biology Related to HIV /AIDS 2012, Bethesda, Estados Unidos da América. Book abstract Structural Biology Related to HIV /AIDS, **2012**.

♦ Ali Emileh, Ferit Tuzer, Herman Yeh, Muddegowda Umashankara, Diogo R. M. Moreira, Judith M. LaLonde, Carole A. Bewley, Cameron F. Abrams, Irwin M. Chaiken. A model of the peptide-triazole entry inhibitors binding to HIV-1 gp120 core and mechanism of bridging sheet disruption. Aceito para publicação no Biochemistry, **2012**.