



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

Carlos Henrique da Silva Mendes

Síntese de Novas Tiazolidin-4-onas Bioativas

Recife, PE
Julho de 2017

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MENDES

Síntese de Novas Tiazolidin-4-onas Bioativas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção
do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Cristina Lima Leite

Co-orientador: Prof^o Dr. Marcos Veríssimo de O. Cardoso

Recife, PE
Julho de 2017

M538s Mendes, Carlos Henrique da Silva.
Síntese de novas tiazolidin-4-onas bioativas / Carlos Henrique da Silva Mendes. – 2017.
81 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Compostos heterocíclicos. 2. Leishmaniose. 3. *Aedes aegypti*. I. Leite, Ana Cristina Lima (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-225)

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MENDES

Síntese de Novas Tiazolidin-4-onas Bioativas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção
do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite- UFPE
Assinatura

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira - FIOCRUZ
Assinatura

Dra. Jéssica Miranda do Nascimento - UFPE
Assinatura

Aos meus pais, família e amigos.

.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado nos caminhos corretos e aos meus pais Maria e José Carlos, pela educação a mim dispensada e apoio a todos os passos que eu decidia seguir.

Agradeço também aos meus familiares que de alguma forma sempre tiveram envolvidos direta ou indiretamente em meu crescimento pessoal durante toda a minha vida.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Ana Cristina, por todo o auxílio e compreensão durante a execução das pesquisas. Se não fosse por ela, com certeza eu não teria finalizado o projeto a tempo hábil.

Ao meu co-orientador Prof^o Dr. Marcos Veríssimo, pelos ensinamentos e suporte, principalmente nos momentos iniciais no LpQM.

A todos os meus colegas do LpQM, em especial a Gevânio, Dayane, Ignes, Juliana e Mabilly, pelo apoio nos processos de síntese e pela companhia durante a minha estadia no laboratório.

Aos meus colegas de trabalho, minha chefe Professora Tayara Soares e a Vanessa Fitipaldi, pelas palavras de apoio dispensadas e por entender as minhas ausências no LNA durante o período do mestrado.

Ao CETENE, pelas análises de caracterização estrutural, principalmente na pessoa da Júlia Campos pelo auxílio e atenção no transcorrer das análises.

Ao grupo do insetário DQF-UFPE, principalmente a Jéssica e a Professora Daniela Navarro, pela oportunidade de desenvolver os ensaios larvicidas e ajuda durante os mesmos.

A Professora Valéria da Fiocruz - CPqAM, e toda a sua equipe, pela realização dos ensaios de atividade Leishmanicida.

A Central analítica DQF, pelas caracterizações estruturais.

RESUMO

Dentre os compostos que apresentam atividade biológica relevante, os heterocíclicos apresentam um importante papel, principalmente os que possuem o anel de cinco membros. O grupo heterocíclico das Tiazolidin-4-onas tem sido estudado por apresentar plurifuncionalidades que podem ser exploradas. No presente trabalho, propõe-se sintetizar e estudar a atividade biológica (Leishmanicida e Larvicida) de 20 inéditas Tiazolidin-4onas (CH01-20). As moléculas foram sintetizadas de forma a se observar a contribuição lipofílica e do efeito indutivo dos substituintes. Para a verificação da atividade Leishmanicida, os compostos foram testados em diferentes concentrações frente à forma promastigota da *Leishmania amazonensis*, utilizando como controle positivo a Anfotericina. Já para o estudo da atividade larvicida, as tiazolidin-4-onas foram testadas frente a larvas do *Aedes aegypti* no estágio L4. Foi observado, na atividade leishmanicida, que sete compostos sintetizados apresentaram índice de seletividade maior que o controle positivo. Dentre esses, cinco apresentaram valor de IC₅₀ equiparáveis ao padrão e uma **CH18** apresentou valor de **IC₅₀ de 0,96 µM**, que é equivalente a anfotericina **1,0 µM**. O composto **CH19** apresentou o melhor índice de seletividade (**34,93**), que foi cerca de cinco vezes maior que o padrão (**7,5**). Quanto a atividade larvicida nenhuma das moléculas testadas foi ativa.

Palavras-chave: Compostos Heterocíclicos. Leishmaniose. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Among the components and human activity, heterocyclics play an important role, especially those with the five-membered ring. The heterocyclic group of Thiazolidines-4-ones has been studied because it presents multi-functionalities that can be explored. In the present work, it is proposed to synthesize and study the biological activity (Leishmanicide and Larvicide) of 20 unpublished thiazolidin-4ones (CH01-20). The molecules were synthesized in order to observe the lipophilic contribution and the inductive effect of the substituents. For a verification of the Leishmanicidal activity, the compounds thus tested in different concentrations against the promastigote form of *Leishmania amazonensis*, using as a positive control Amphotericin. For the study of larvicidal activity, such as thiazolidin-4-ones were tested against *Aedes aegypti* larvae in the L4 stage. It was observed in the leishmanicidal activity that seven synthesized compounds showed a selectivity index greater than the positive control. Among these, five had an IC₅₀ value comparable to the standard and one CH18 presented an IC₅₀ value of 0.96 μ M, which is equivalent to 1.0 μ M amphotericin. Compound CH19 had the best selectivity index (34.93), which was about five times higher than the standard (7.5). As for the larvicidal activity of the molecules tested for active.

Keywords: Heterocyclic compounds. Leishmaniasis. *Aedes aegypti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura Química de heterocíclicos utilizados como medicamentos.....	18
Figura 2-	Estrutura geral das tiazolidin-4-onas.....	19
Figura 3-	Estrutura da molécula tiazolidin-4-ona com melhor atividade antirretroviral (MURUGESAN et al., 2014)	20
Figura 4-	Estrutura da tiazolidin-4-onas substituída com melhor atividade antitumoral (SZYCHOWSKI et al., 2017)	21
Figura 5-	Estrutura química da Tiazolidin-4ona com melhor atividade antimicrobiana (DESAI et al., 2017)	21
Figura 6-	Estruturas das moléculas utilizadas em DE OLIVEIRA FILHO et al., (2015) ..	23
Figura 7-	Estrutura da tiossemicarbazona sintetizada por (DA SILVA et al., 2015) que possui melhor atividade larvicida	23
Figura 8-	Estrutura geral das Tiazoldin-4-onas sintetizadas no trabalho.....	24
Figura 9-	Processo de síntese das tiazolin-4-onas CH01-20	26
Figura 10-	Espectro de RMN ¹ H da molécula CH09.....	30
Figura 11-	Espectro de RMN ¹³ C para o composto CH09 na região de 176 a 116 ppm	31
Figura 12-	Espectro de RMN ¹³ C para o composto CH09 na região de 64 a 06 ppm	31
Figura 13-	Mosquito flebotomíneo sob a pele do ser humano.....	57
Figura 14-	Ciclo de vida do protozoário do gênero Leishmânia	58
Figura 15-	Formas dos Protozoários do Gênero Leishmânia	59

Figura 16-	Estrutura química do ftalil-tiazol sintetizado por (ALIANCA et al., 2017) com melhor atividade Leishmanicida.....	60
Figura 17-	Estrutura química da tiossemicarbazona sintetizada por DA SILVA et al. (2017), com melhor atividade Leishmanicida	61
Figura 18-	Características químicas e valores de IC50 das moléculas sem substituição no anel da tiazolidin-4-ona	66
Figura 19-	Características químicas e valores de IC50 das moléculas com substituição metílica no anel da tiazolidin-4-ona.....	67
Figura 20-	Características químicas e valores de IC50 das moléculas com substituição etílica no anel da tiazolidin-4-ona.....	68
Figura 21-	Características químicas e valores de IC50 das moléculas com substituição di-metílica no anel da tiazolidin-4-ona.....	69
Figura 22-	Características químicas e valores de IC50 das moléculas com substituição isopropílica no anel da tiazolidin-4-ona.....	70
Figura 23-	Ciclo de vida do <i>A. aegypti</i>	72
Figura 24-	Estágios larvais do <i>A. aegypti</i> (L1, L2, L3 e L4).....	73
Figura 25-	Estrutura da tiossemicarbazona que apresentou melhor atividade larvicida, segundo DA SILVA et al. (2015).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características gerais dos compostos finais e rendimento das reações.....	29
Tabela 2-	Atividade Leishmanicida das tiazolidin-4-onas.....	63
Tabela 3-	Parâmetros físico-químicos das Tiazolidin-4-onas sintetizadas.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

d- duplete

DNA- deoxyribonucleic acid

DMSO- Dimetilsulfoxido

EMAR- Espectroscopia de massas de alta resolução

FT-IR- Fourier Transformed – Infrared

HIV- Human Immunodeficiency Virus

IC₅₀ – Concentração inibitória para 50% da população

PF- ponto de fusão

m- multiplete

LC₅₀- Concentração de mortalidade de 50% das larvas

q- quarteto

RMN ¹³C- ressonância magnética nuclear de carbono -13

RMN ¹H- ressonância magnética nuclear de hidrogênio -1

s- singlete

SAR- Structure Activity Relationships

t- tripleto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVO.....	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	Capítulo 1: Planejamento, síntese e caracterização de inéditas Tiazolidin-4-onas.....	17
3.1	Revisão Bibliográfica.....	18
3.1.1	Compostos heterocíclicos	18
3.1.2	Tiazolidin-4-onas	19
3.2	Planejamento das Moléculas	22
3.3	Metodologia	25
3.3.1	Materiais e reagentes.....	25
3.3.2	Rota Sintética	26
3.3.2.1	Síntese do intermediário 1 (acetofenona)	26
3.3.2.2	Síntese do intermediário 2 (tiossemicarbazona)	27
3.3.2.3	Síntese dos compostos finais (tiazolidin-4-onas).....	27
3.3.3	Caracterização Estrutural	27
3.4	Resultados	28
3.4.1	Composto Intermediário 1.1	32
3.4.2	Composto Intermediário 2.1	32
3.4.3	Composto CH01.....	33
3.4.4	Composto CH02.....	34
3.4.5	Composto CH03.....	35
3.4.6	Composto CH04.....	36
3.4.7	Composto CH05.....	37
3.4.8	Composto Intermediário 1.2	38
3.4.9	Composto Intermediário 2.2	38
3.4.10	Composto CH06.....	39
3.4.11	Composto CH07.....	40
3.4.12	Composto CH08.....	41
3.4.13	Composto CH09.....	42

3.4.14	Composto CH10.....	43
3.4.15	Composto Intermediário 1.3	44
3.4.16	Composto Intermediário 2.3	44
3.4.17	Composto CH11.....	45
3.4.18	Composto CH12.....	46
3.4.19	Composto CH13.....	47
3.4.20	Composto CH14.....	48
3.4.21	Composto CH15.....	49
3.4.22	Composto Intermediário 1.4	50
3.4.23	Composto Intermediário 2.4	50
3.4.24	Composto CH16.....	51
3.4.25	Composto CH17.....	52
3.4.26	Composto CH18.....	53
3.4.27	Composto CH19.....	54
3.4.28	Composto CH20.....	55
4	Capítulo 2: Avaliação da atividade Leishmanicida das Tiazolidin-4-onas.....	56
4.1	Revisão da Literatura	57
4.1.1	Leishmaniose	57
4.1.2	Atividade Leishmanicida das Tiazolidin-4-onas e seus análogos.....	60
4.2	Materiais e Método	61
4.2.1	Ensaio de Citotoxicidade pelo ensaio de MTT	61
4.2.2	Atividade Biológica em formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	62
4.3	Resultados	62
4.2.1	Relação Estrutura-Atividade (SAR)	64
5	Capítulo 3: Avaliação da atividade Larvicida das Tiazolidin-4-onas.....	71
5.1	Revisão Bibliográfica.....	72
5.2	Metodologia	75
5.3	Resultados	75
6	Conclusão	77
	Referências.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os anéis Heterocíclicos figuram como um dos principais grupos de moléculas que podem atuar como fármacos, sendo a sua modificação estrutural uma das principais vias de estudo para o desenvolvimento de novos medicamentos.

O grupo das Tiazolidin-4-onas é reconhecido na literatura por ser uma molécula privilegiada, ou seja, com potencial para atuar em diversas aplicações a depender da combinação de ligantes em seu anel.

Já foi comprovado que o anel tiazolidínico possui atividade larvícida (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2015), Antiturbecular (SUBHEDAR et al., 2016), anti-inflamatória (ABDELLATIF et al., 2016), antimicrobiana (DESAI et al., 2017), antitumoral (SZYCHOWSKI et al., 2017) e antirretroviral MURUGESAN et al., (2014).

Nesse contexto, devido à versatilidade das tiazolidin-4-onas, esse grupo vem sendo alvo de diversos estudos para explorar as suas funcionalidades, sendo um grupo privilegiado de bastante interesse para a química medicinal.

A Leishmaniose é um conjunto de doenças provocadas pelo protozoário do gênero *Leishmania spp.*, uma doença de caráter endêmico, é mais observada basicamente em países de clima tropical e sub-tropical (ÖZBILGIN et al., 2017).

O Brasil figura dentre os países que apresentam o desenvolvimento dessa doença, principalmente na região norte e nordeste. Dados do ministério da saúde indicam que em 2015 foram registrados 19.395 casos de Leishmaniose Tegumentar, concentrados principalmente na região norte (8.939 casos), nordeste (5.152 casos) e centro-oeste (2.937 casos) (BRASIL, 2015).

Atualmente, para o tratamento da Leishmaniose, são utilizados os fármacos à base de Antimônio, a Anfotericina, Paromomicina e Miltefosina, porém os seus efeitos tóxicos são bastante pronunciados o que faz com que haja a busca por novas soluções farmacêuticas com melhor atividade e melhores índices de seletividade (KUMAR et al., 2017).

Já foi demonstrado na literatura em trabalhos recentes por ALIANCA et al. (2017) e DA SILVA et al. (2017) o potencial Leishmanicida das tiossemicarbazonas e tiazóis, grupos bioisostéricos das Tiazolidin-4-onas. Sendo assim, um dos objetivos desse trabalho é verificar o potencial Leishmanicida de inéditas Tiazolidin-4-onas.

O *Aedes aegypti* se tornou o foco das atenções da população, principalmente pela proliferação de doenças associadas a esse inseto. Podendo-se citar a dengue , zika, febre amarela e chikungunya (MOREIRA et al., 2016).

O aumento brusco nos casos de dengue e chikungunya no Brasil nos últimos anos levaram à busca de diversas alternativas para sanar o problema da população. Não há, atualmente, nenhum medicamento disponível para tratar essas doenças, apenas para aliviar os sintomas (febre, dores de cabeça, dores musculares). (FRANCINE et al., 2016).

Existem, nesse contexto, duas alternativas viáveis para diminuir a proliferação das doenças causadas pelo *Aedes aegypti*: a conscientização da população no sentido de evitar deixar água parada, principalmente nos quintais domiciliares, ou a busca por novos agentes larvicidas, o que impede a transformação das larvas em mosquitos na fase adulta, que é efetivamente a fase onde ocorre a transmissão das doenças.

DA SILVA et al. (2015), demonstraram a efetividade de novas tiossemicarbazonas no que diz respeito à atividade larvicida.

Norteados por esse artigo, outro objetivo desse trabalho é avaliar a atividade larvicida das Tiazolidin-4-onas sintetizadas, visto que essas são compostos bioisotéricos das tiossemicarbazonas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar inéditas Tiazolidin-4-onas com potencial atividade biológica

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar 4 derivados de Tiossemicarbazonas a partir de fenóis e bromoacetofenona;
- Ciclizar as Tiossemicarbazonas para formar vinte novas tiazolidin-4-onas;
- Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados via RMN ^1H e ^{13}C , FT-IR, MS;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das Tiazolidin-4-onas;
- Avaliar a atividade Leishmanicida das novas tiazolidin-4-onas frente a forma promastigota do *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar a atividade Larvicida das novas Tiazolidin-4-onas na fase larval L4 do *Aedes aegypti*.

3 Capítulo 1: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE INÉDITAS TIAZOLIDIN-4-ONAS

3.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1.1 COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS

Diversos tratamentos para combater ou prevenir doenças vem sendo propostos, visando melhorar a qualidade e aumentar a expectativa de vida da população. Nesse contexto, a utilização de compostos químicos apresenta-se como importante ferramenta (BARREIRO, 2001).

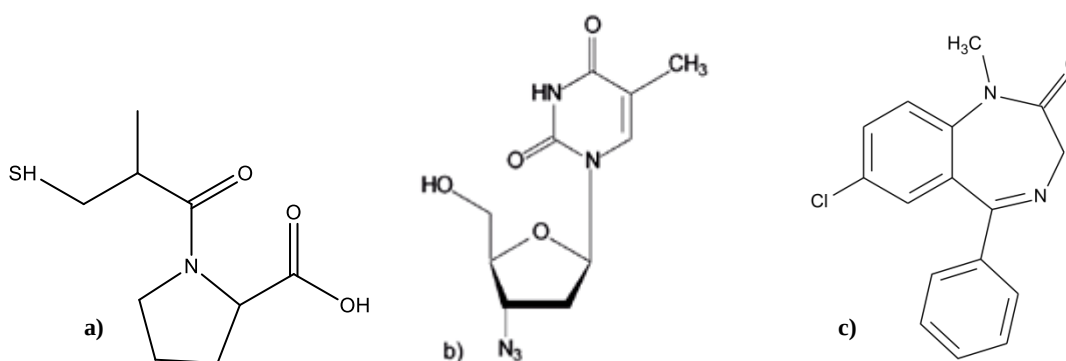
Diz-se quimioterapia, quando o tratamento da enfermidade é realizado a partir de compostos químicos que atuam sanando totalmente ou amenizando os problemas causados pela doença (OLIVEIRA, 2010).

O desenvolvimento de novos compostos com estruturas privilegiadas, ou seja, com atuação em mais de um problema, ou atuação potente em um tipo específico de doença tem norteado números pesquisas no ramo da química medicinal (BARREIRO, 2001).

Dentre os compostos que podem ser usados como quimioterápicos, pode-se destacar os heterocíclicos, que atualmente ocupam uma das posições de destaque no mercado mundial dos medicamentos (KATRITZKY, 2004). Além de atuarem como fármacos, muitas das moléculas biológicas importantes, como por exemplo, as bases nitrogenadas do DNA, algumas vitaminas e as estruturas da hemoglobina, são estruturas heterocíclicas (SILVA, 2006).

Muitos dos medicamentos em circulação possuem anéis heterocíclicos. É o caso dos antihipertensivos (Captopril, Figura 1a), antirretrovirais (Zidovudina, Figura 1b), tranquilizantes (Diazepam, Figura 1c.).

Figura 1. Estrutura Química de heterocíclicos utilizados como medicamentos. Em a) a estrutura química do Captopril, medicamento antihipertensivo. Em b) estrutura química da Zidovudina, um antirretroviral. E em c) a estrutura do Diazepam, utilizado como um tranquilizante. Fonte: Autor.



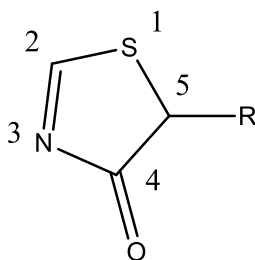
Nos exemplos apresentados na Figura 1 e em muitos outros compostos que possuem atividade biológica, nota-se a presença do nitrogênio como heteroátomo. É comum os compostos heterocíclicos apresentarem em sua cadeia cíclica os átomos de nitrogênio ou enxofre, que muitas vezes está relacionado ao seu mecanismo de ação (ZHANG et al., 2009).

As moléculas com anéis de cinco membros estão figurando como umas das principais, dentre a classe dos heterocíclicos que apresentam estrutura privilegiada. Podendo-se destacar os anéis tiazolidínicos, que vem se mostrando como um grupamento pluripotente (GILANI et al., 2016).

3.1.2 Tiazolidin-4-onas

As tiazolidin-4onas, é um grupamento derivado do tiazol, e sua estrutura geral é apresentada na Figura 2. Ela é um dos anéis heterocíclicos que vem sendo explorado ao longo dos anos devido às suas conhecidas potencialidades (GILANI et al., 2016).

Figura 2. Estrutura geral das tiazolidin-4-onas



O grupamento tiazolidínico é um anel de cinco membros, composto por um átomo de enxofre na posição 1, um nitrogênio na posição 3 e uma carbonila na posição 4 do anel. O processo de ciclização para a formação desse anel pode ser realizado de diversas formas.

SAFAEI-GHOMI et al (2016) apresentaram uma síntese *one-pot* de tiazolidin-4-onas, a partir de um aldeído, da anilina e do ácido tioglicólico, e utilizando-se nanopartículas de $\text{CdZr}_4(\text{PO}_4)_6$ como catalisador.

MURUGESAN et al. (2014) Estudaram as potencialidades de uma nova classe de tiazolidin-4-onas sintetizadas a partir de um processo reacional *one-pot* entre uma aril amina, um aldeído e o ácido mercaptoacético, utilizando-se como solvente o tolueno sob temperatura de refluxo.

HASSAN et al., (2013) propuseram um processo de síntese das tiazolidin-4-onas a partir de uma reação em etanol, sob refluxo entre uma tiossemicarbazona e o dimetil acetilenodicarboxilato.

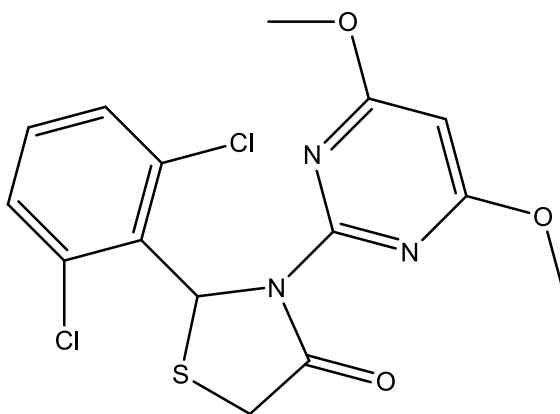
MOREIRA et al.,(2014) estudou atividade biológica de uma série de tiazolidin-4-onas que foram sintetizadas em meio etanólico, a partir da reação entre tiossemicarbazonas e α -halo ácidos, utilizando como catalisador o acetato de sódio.

Uma das formas mais comuns de obtenção das tiazoldin-4-onas, com rendimentos toleráveis, é a partir da reação de ciclização, em meio etanólico, entre as tiossemicarbazonas e um α -Haloácido a partir da catálise com uma base fraca (geralmente acetato de sódio anidro).

Diversas modificações e adaptações no anel tiazolidínico tem sido propostas, visando aumentar, descobrir ou direcionar o potencial biológico desse grupo heterocíclico (SURYAWANSHI et al., 2017).

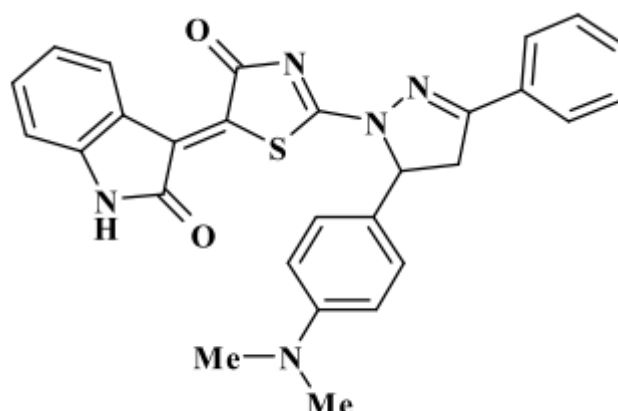
MURUGESAN et al., (2014), sintetizaram uma série de tiazolidin-4-onas com um grupamento fenil (com variadas di-substituições) na posição 4 do anel e adição de um ligante ao nitrogênio tiazolidínico. As moléculas apresentaram potenciais atividades antirretrovirais atuando como inibidor da transcriptase reversa do vírus (HIV- tipo1). A tiazoldin-4-ona apresentada na Figura 3, foi a que obteve a melhor atividade, com IC₅₀ para o HIV-1 de 70 nM e índice de seletividade de 854.

Figura 3. Estrutura da molécula tiazolidin-4-ona com melhor atividade antirretroviral. Fonte: (MURUGESAN et al., 2014)



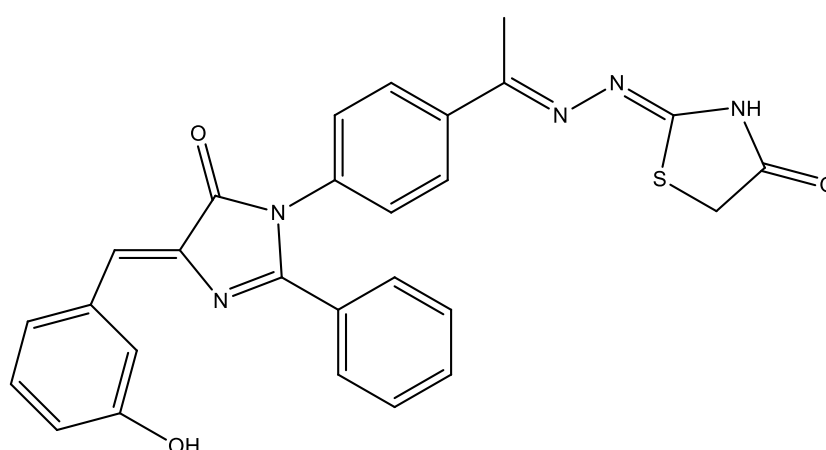
SZYCHOWSKI et al. (2017) Estudou a atividade antitumoral de algumas tiazolidin-4-onas substituídas na posição 2 e 4 por outros anéis heterocíclicos (diazóis e aneis lactamas). A melhor atividade antitumoral, frente a células SCC-15 (carcinoma) foi a da tiazolidin-4-onas substituída apresentada na Figura 4.

Figura 4. Estrutura da tiazolidin-4-onas substituída com melhor atividade antitumoral. Fonte: SZYCHOWSKI et al., (2017)



DESAI et al., (2017) estudaram a atividade antimicrobiana de uma série de tiazolidin-4-onas, frente à bactérias gram-positivas, gram-negativas e alguns tipos de fungos. As modificações do anel heterocíclico foi executada na posição 2 do anel, com um grupamento que continha 3 grupos fenil (um deles monossustituído) e outro anel heterocíclico de cinco membros. As melhores atividades antimicrobianas foram registradas pela molécula apresentada na Figura 5, que apresentou concentração mínima inibitória (MIC) cerca de 50% menor que o padrão (controle positivo), para todos os micro-organismos testados.

Figura 5. Estrutura química da Tiazolidin-4ona com melhor atividade antimicrobiana. Fonte: DESAI et al., (2017)



ABDELLATIF et al., (2016) propuseram uma nova classe de moléculas que contém o tiazolidínico e que apresenta propriedades anti-inflamatórias, inclusive apresentando seletividade pela COX-2, Os pesquisadores sintetizaram dez novas tiazolidin-4-onas, a partir da inserção de anéis tiazólicos (anel de 5 membros) e fenólicos na posição 5 do anel

tiazolidínico. A melhor molécula, obteve um IC_{50} para inibição da COX-2 de 1,9 μ M, com índice de seletividade COX-1/ COX-2 de 5,68.

Além dessas atividades, as tiazolidin-4-onas apresentam atividade tripanocida frente ao *Trypanossoma cruzi* (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2015) e (MOREIRA et al., 2014), atividade antinociceptiva (MOREIRA et al., 2017), Antiturbecular (SUBHEDAR et al., 2016).

Nesse contexto, devido à versatilidade das tiazolidin-4-onas, esse grupo vem sendo alvo de diversos estudos para explorar as suas funcionalidades, sendo um grupo privilegiado de bastante interesse para a química medicinal.

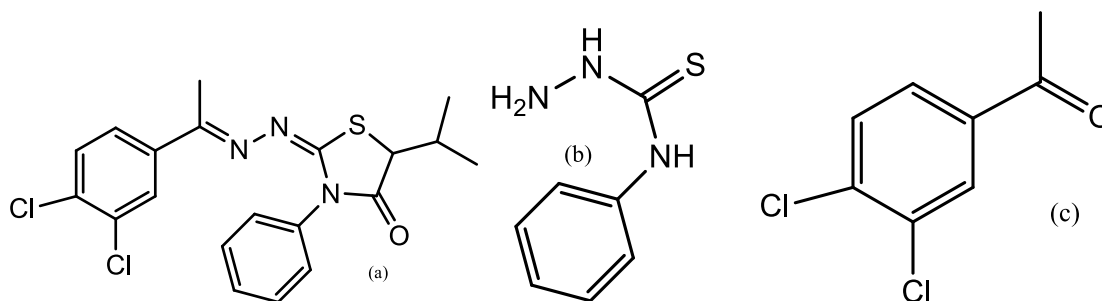
3.2 PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS

As moléculas sintetizadas nesse trabalho foram totalmente planejadas com base em resultados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa do LPqM (Laboratório de Planejamento em Química Medicinal).

A premissa da utilização do núcleo tiazolidínico veio com base na sua conhecida plurifuncionalidade como quimioterápico em diversas aplicações, assim como dos seus bioisósteros (Tiossemicarbazonas e Tiazóis). Alguns trabalhos, já conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram as atividades Antinociceptiva (MOREIRA et al., 2017), Tripanocida (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2015; MOREIRA et al., 2014), Leishmanicida (ALIANCA et al., 2017; DA SILVA et al., 2017) e Larvicida (DA SILVA et al., 2015) das Tiazolidin-4-onas e seus bioisósteros.

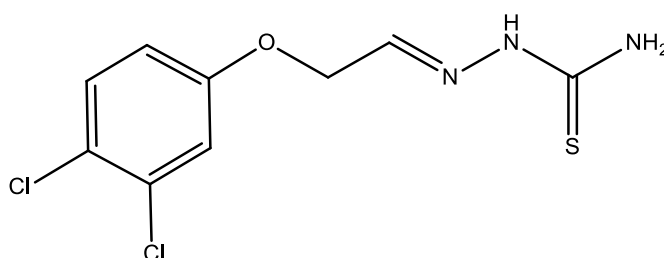
DE OLIVEIRA FILHO et al. (2015) relata o estudo da atividade tripanocida de uma série de Tiazoldin-4-onas, onde ocorre a variação da tiossemicarbazona precursora dos compostos finais e da acetofenona utilizada para a formação dessas tiossemicarbazonas. Foi constatado que a melhor atividade tripanocida, com IC_{50} para a forma tripomastigota do *T. cruzi* igual a 1,7 μ M e índice de seletividade maior que 58, foi o da molécula (Figura 6 (a)) apresentava em sua estrutura o grupo fenil, que era derivado da 4-feniltiossemicarbazona (Figura 6 (b)) e o 3,4 dicloro fenol, derivado da 3,4-dicloro acetofenona ((Figura 6 (c)). Essa foi umas das observações norteadoras do planejamento desse projeto.

Figura 6. Estruturas das moléculas utilizadas em DE OLIVEIRA FILHO et al., (2015). Em (a) estrutura da molécula com maior atividade tripanocida e índice de seletividade. Em (b) estrutura da tiossemicarbazida precursora do composto final. E em (c) estrutura da acetofenona precursora do composto final. **Fonte:** Autor.



DA SILVA et al., (2015), relataram a síntese de uma série de tiossemicarbazonas e suas respectivas atividades contra larvas do *Aedes aegypti* no estágio L4. Nesse estudo foi demonstrado o potencial larvicida da tiossemicarbazona ilustrada na Figura 7, além de apresentar que o mecanismo de ação dos compostos é, possivelmente, atuando na inibição das lipases, que são essenciais ao desenvolvimento das larvas. A relação estrutura-atividade apresentada no trabalho, confirma a ideia de que os grupos fenoxi-metil (sendo esse fenol substituído nas posições 3 e 4 pelo átomo de cloro) e os halogênios, principalmente o bromo, ligados a um anel aromático na posição –para, é importante para o papel larvicida das moléculas.

Figura 7. Estrutura da tiossemicarbazona sintetizada por (DA SILVA et al., 2015) que possui melhor atividade larvicida. Fonte: Autor

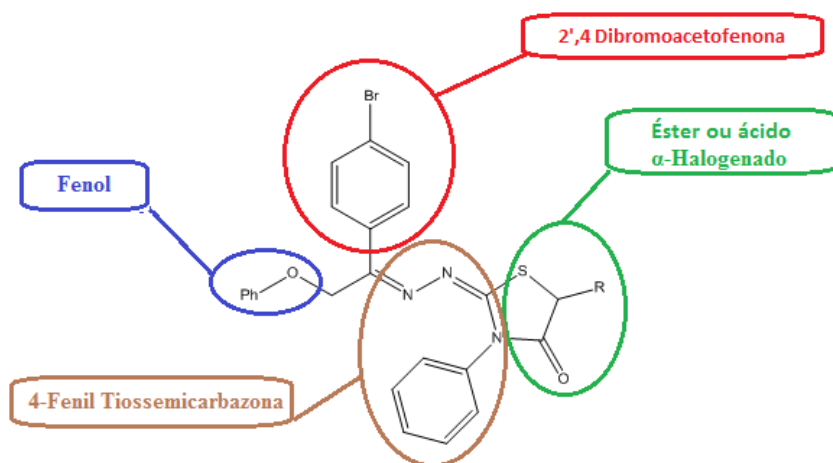


Além disso, (MOREIRA et al., 2014), que produziram uma séries de inéditas tiazolidin-4-onas, apresentaram que a melhor atividade tripanocida dentre as moléculas sintetizadas, foi ocasionada pelo o anel aromático com o bromo substituinte na posição quatro, corroborando com a importância de tal grupo na atividade biológica das tiazolidin-4-onas.

Nesse contexto, a estrutura final das moléculas propostas nesse trabalho, apresentada na Figura 8, foi elaborada a partir da junção de quatro grandes grupos que possuem atividades biológicas já conhecidas, com a intenção de verificar a se há ou não a potencialização das bioatividades dos compostos. O processo de “montagem” da molécula foi realizado a partir de várias etapas reacionais.

De forma geral, na série planejada fixou-se os grupos provenientes da 2',4 Dibromoacetofenona e da 4-fenil tiossemicarbazona e variou-se os fenóis (3-OCH₃Ph; 3-Cl-4-F Ph; 3,4-DiCl Ph e 4-CH(CH₃)₂Ph) e os grupamentos alquílicos ligados ao anel tiazolidínico (H, CH₃, CH₂CH₃, (CH₃)₂ e CH(CH₃)₂) para a obtenção de 20 novos compostos .

Figura 8. Estrutura geral das Tiazoldin-4-onas sintetizadas no trabalho. Fonte: Autor



Utilizando-se a variação dos fenóis substituídos, pode-se avaliar importância da contribuição hidrofóbica e do efeito indutivo dos grupamentos, tendo em vista que há uma variação dos grupos substituintes no anel aromático.

O grupamento “-OCH₃”, possui efeito indutivo negativo ($\sigma < 0$), ou seja, possui a propriedade de desativar o anel aromático e efeito lipofílico também negativo ($\pi < 0$), que diminui a lipofilicidade do anel aromático. Os halogênios F e Cl possuem ambos os efeitos (lipofílico e indutivo) positivos, ou seja, σ e $\pi > 0$, a diferença é que a contribuição para o aumento da lipofilicidade do anel aromático é muito mais pronunciado com o cloro atuando como substituinte do que flúor. Já o substituinte 4-isopropil, contribui com o aumento da lipofilicidade da molécula e com a desativação do anel aromático, portanto $\sigma < 0$ e $\pi > 0$.

Em relação aos grupos alquílicos ligados ao anel tiazolidínico, com a variação do tamanho e arranjo das cadeias carbônicas, pode-se avaliar o efeito estérico, além da contribuição lipofílica dos radicais, tendo em vista que, de forma geral, quando maior a cadeia alquílica, maior a sua lipofilicidade.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Materiais e reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico (P.A.), com a procedência de confiança. Os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich, Acros Orgânica ou Vetec e os Solventes utilizados foram adquiridos da Dinâmica ou Vetec. Para a realização dos RMNs foi utilizado o DMSO deuterado (DMSO-d₆) da Sigma-Aldrich.

As reações, em laboratório, foram acompanhadas a partir de cromatografia em camada delgada (CCD), na qual a fase estacionária utilizada foi a sílica-gel 60 da Alugram® com indicador fluorescente F254.

Para a visualização das placas cromatográficas foi utilizada uma câmara de radiação ultravioleta que possuía duas lâmpadas: Uma com 365 e outra com 254 nm.

O banho ultrassônico, utilizado para auxiliar nos processos reacionais, era da marca Unique EM-804, com frequência de 40 KHz (180W de potência). Já o Fusiômetro utilizado era da marca Fisatom 430D.

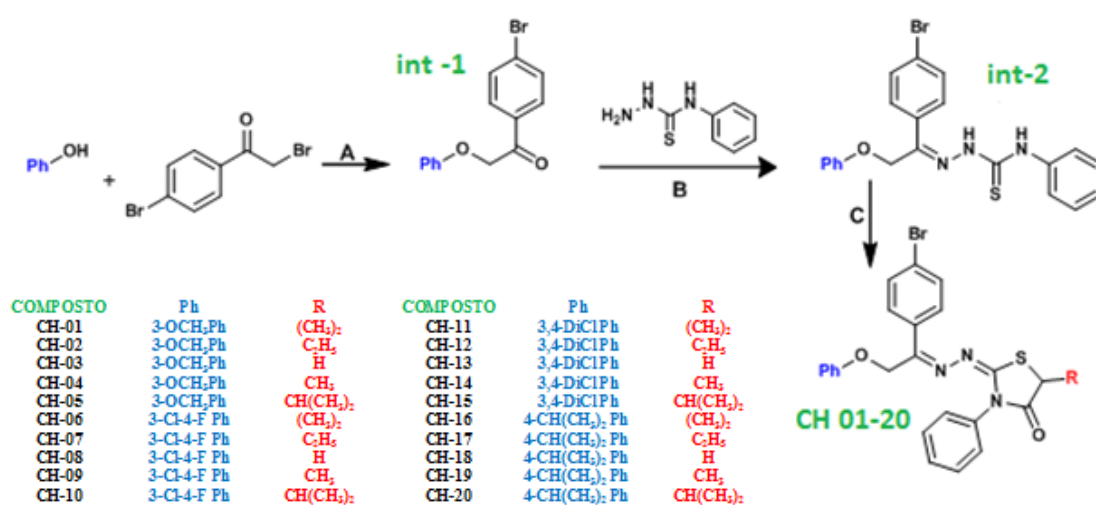
Todas as análises espectroscópicas foram realizadas em laboratórios externos. A Ressonância Magnética Nuclear (¹³C e ¹H e DEPT) foi realizada na central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, utilizando os instrumentos da Varian, modelo Unit Plus (400MHz para ¹H e 100MHz para ¹³C) e o equipamento da Bruker AMX (300 MHz para ¹H ; 75,5 MHz para ¹³C), utilizando-se o tetrametilsilano como padrão e o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆).

A análise de espectrometria de massas de alta resolução foi realizada também no CETENE.

3.3.2 Rota Sintética

Para a realização da síntese dos compostos finais, foram executadas primeiramente duas etapas reacionais: a síntese das acetofenonas e a síntese das tiossemicarbazonas, conforme é apresentado de forma resumida na Figura 9.

Figura 9. Processo de síntese das tiazolin-4-onas **CH01-20**. Reagentes e condições: (A) K_2CO_3 , KI, Acetona, T.A., 3 h; (B), Etanol, HCl (7 gotas), ultrassom, 2 h; (C) Ácidos ou ésteres α -halogenados, Etanol, AcO^+K^+ 24-48h.



3.3.2.1 Síntese do Intermediário 1 (Acetofenona)

Em um balão de fundo redondo, previamente pesado, adicionou-se 25 mL de acetona P.A., juntamente com 5,4 mmol do fenol (3-OCH₃-Ph, 3-Cl-4-F-Ph, 3,4-DiCl-Ph ou 3-iPr-PH) , 5,4 mol de K_2CO_3 (0,75 g) e uma ponta de espátula de KI sólido. Deixou-se o sistema homogeneizando, sob agitação vigorosa, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, adicionou-se à mistura 3,6 mmol de 2',4- Dibromo acetofenona (1,0 g) e então o sistema permaneceu sob agitação constante por 2h. Para verificar a formação dos produtos, realizou-se uma CCD com os reagentes e a mistura reacional, utilizando-se como eluente o Tolueno P.A..

Para obtenção do produto na forma sólida, a mistura foi rotaevaporada e o produto sólido seco foi submetido a três lavagens sucessivas com éter etílico e secagem em

evaporador rotatório. O balão foi acondicionado em dessecador por 24h e então pesado para que fossem obtidos dados de rendimento reacional.

3.3.2.2 Síntese do Intermediário 2 (Tiossemicarbazona)

Em um tubo de ensaio grande, contendo 20 mL de álcool etílico P.A., adicionou-se 1,06 mmol do intermediário 1, juntamente com 7 gotas de ácido clorídrico P.A. (usado aqui como catalisador). A mistura foi ultrassonicada até a total solubilização do sólido (cerca de 30 minutos). Após esse tempo, foi adicionado ao sistema 1,06mmol de 4-Fenil tiossemicarbazona (0,4 g) e o tubo de ensaio volta então para ultrassonicar durante 2h, com constantes homogeneizações manuais.

Para finalizar o procedimento, a mistura foi submetida à filtração à vácuo e tanto o sólido formado quando o sobrenadante são submetidos à CCD para verificar a formação de novo intermediário. Toda a porção sólida é pesada para fins de cálculo de rendimento.

3.3.2.3 Síntese dos Compostos Finais (Tiazolidin-4-onas)

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 25 mL de álcool etílico P.A., 1,06 mmol do intermediário 2 e 4,8 mmol (0,4711 g) de acetato de potássio. A mistura ficou sob homogeneização constante, com o auxílio de uma barra de agitação magnética, e sob aquecimento (cerca de 90°C), durante 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado ao sistema 2,12mmol do α - Haloácido específico para formar cada composto final. A reação foi deixada sob condições de refluxo e agitação de 24 a 48h, e então após a formação do precipitado, o sistema foi filtrado e tanto do sobrenadante quanto do precipitado foram feitas placas de CCD para verificar a formação do composto final. A massa obtida do composto foi então anotada, para posteriores cálculos de rendimento reacional.

3.3.3 Caracterização Estrutural

Para verificar a efetividade da rota sintética, os compostos finais foram submetidos às análises espectroscópicas (FTIR, MS, e RMN ^{13}C e ^1H). Além disso, foi examinado o ponto de fusão e fator de retenção das moléculas em hexano:acetato de etila 6:4.

3.4 RESULTADOS

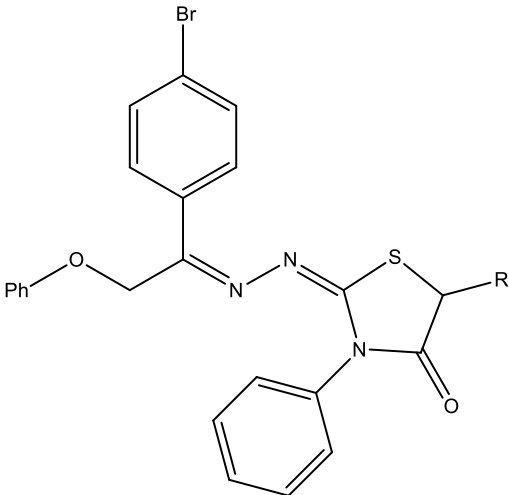
Em nenhuma das etapas reacionais houve a necessidade de realização de processos de purificação (recristalização ou cromatografia em coluna), essa conclusão foi tomada a partir da observação das placas de CCD. Isso reduziu bastante tempo total do procedimento de síntese, facilitando assim a obtenção dos compostos finais.

Na Tabela 1 estão listadas as principais propriedades dos compostos sintetizados, bem como os rendimentos reacionais que foram obtidos dos valores (em mol) dos reagentes utilizados na ultima etapa reacional, ou seja, da etapa de ciclização. O cálculo foi procedido a partir dos valores do reagente limitante, que no caso foram os intermediários 2. O valor de quantidade de mol dos ácidos ou ésteres também usados durante a ciclização foi desprezado, pois esses estavam em excesso no sistema reacional. Os rendimentos dos intermediários (1 e 2) foram na faixa de 89 a 93% . Já os compostos finais, apresentaram rendimento de 59-81%.

Todas as placas de CCD feitas a partir de 24-48h de reação (síntese das tiazolidin-4-onas) apresentaram novos pontos, o que corrobora para a formação de um composto diferente dos reagentes. E ao fim do processo reacional, os produtos foram separados do sistema por meio de filtração à vácuo, caso fosse observado a formação de um precipitado, ou por rotaevaporação caso a substância ficasse dissolvida no meio etanólico.

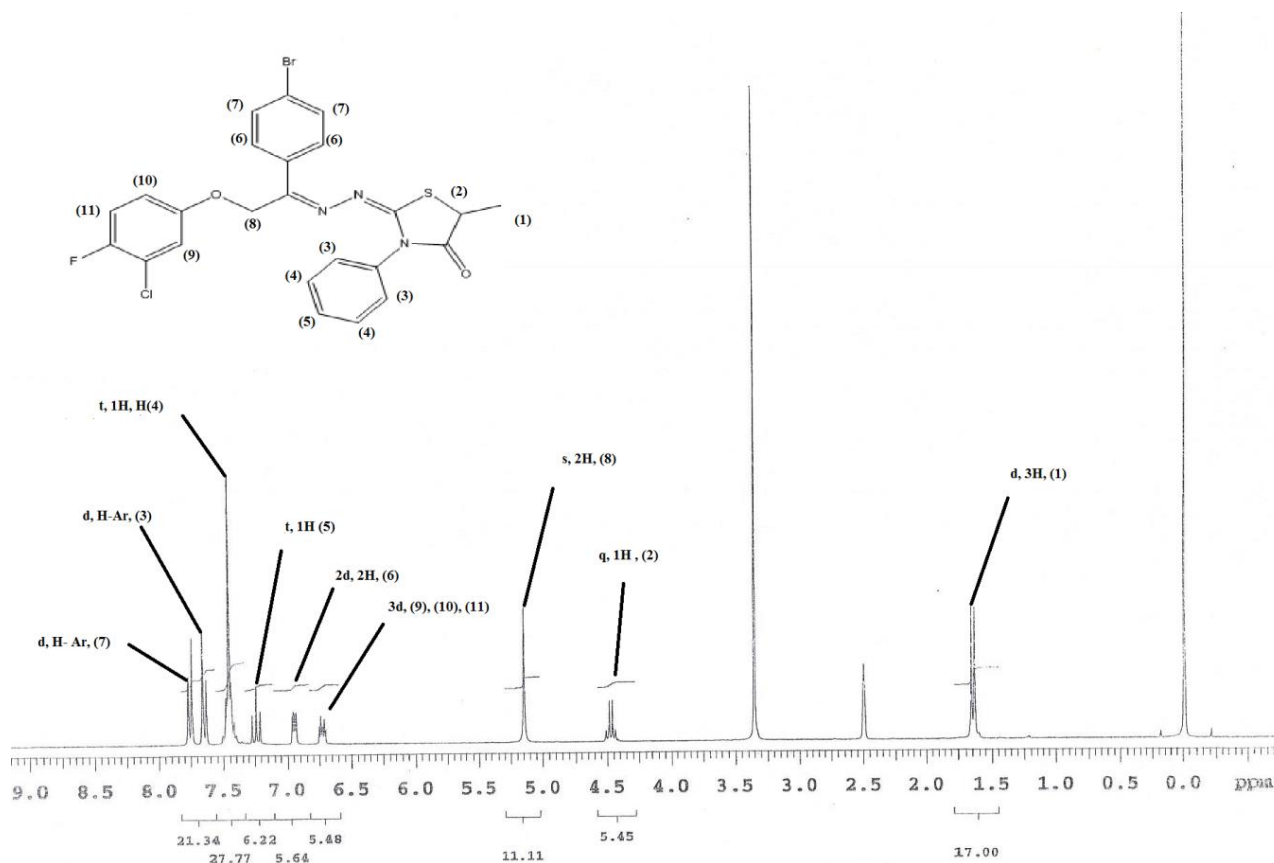
Todos os compostos finais (CH) foram obtidos na forma de um pó, a maioria amorfo, exceto os compostos CH01 e CH05 que se apresentaram na forma de cristais, sem passar por nenhum processo físico-químico para cristalização.

Tabela 1. Características gerais dos compostos finais e rendimento das reações.

Estrutura Geral da Molécula	Composto	Ph	R	PF	RF	Rendimento (%)
	CH-01	3-OCH ₃ Ph	(CH ₃) ₂	154	0,60	63
	CH-02		C ₂ H ₅	160-161	0,59	75
	CH-03		H	210-212	0,56	66
	CH-04		CH ₃	200	0,63	68
	CH-05		CH(CH ₃) ₂	233	0,60	70
	CH-06	3-F-4-Cl Ph	(CH ₃) ₂	214-216	0,68	74
	CH-07		C ₂ H ₅	222	0,64	65
	CH-08		H	228-230	0,55	69
	CH-09		CH ₃	200	0,67	81
	CH-10		CH(CH ₃) ₂	188-189	0,70	79
	CH-11	3,4-DiCl Ph	(CH ₃) ₂	224-225	0,66	77
	CH-12		C ₂ H ₅	234-236	0,68	59
	CH-13		H	230	0,74	61
	CH-14		CH ₃	210-2011	0,59	66
	CH-15		CH(CH ₃) ₂	199	0,60	69
	CH-16	4-i-Pr Ph	(CH ₃) ₂	187-188	0,70	80
	CH-17		C ₂ H ₅	199-200	0,72	74
	CH-18		H	190	0,67	77
	CH-19		CH ₃	196	0,70	71
	CH-20		CH(CH ₃) ₂	200-201	0,74	79

Os dados de espectroscopia, utilizados para verificar a efetividade do processo reacional, corroboram para a formação dos produtos planejados, haja vista os espectros demonstrados abaixo que ilustra o processo de caracterização dos compostos, a partir do exemplo da molécula CH09.

Figura 10. Espectro de RMN ^1H da molécula CH09. Fonte: Autor.



As Figuras 11 e 12 apresentam o espectro de RMN ^1H obtido para o composto CH09, onde pode-se observar em 1,66 ppm um duplete, integrando para 3 hidrogênios, referente aos H do grupamento CH_3 ligados ao anel tiazolidínico. Em 4,48 ppm nota-se um quadruplete integrando para 1 H, referente ao hidrogênio ligado ao anel heterocíclico. Já em 5,14, o singlete integrando para 2 hidrogênios é referente ao grupo $\text{CH}_2\text{-O}$ (8). Na região de 8 a 6,9 ppm, verifica-se inúmeros picos referentes aos hidrogênios aromáticos. Em 7,73 ppm e muito próximo em 7,69 ppm encontra-se dois dupletos, com integração total para 4 hidrogênios referentes ao 2 H (7) e 2 H (3). Já em 7,46 ppm o triplete é referente aos hidrogênios (4). O outro tripto, agora em 7,24 ppm, integrando para 1 hidrogênio é referente ao H (5). Os

hidrogênios (6), (9), (10), (11) aparecem como picos próximo em um duplo duplete 695 ppm e um triplo duplete em 6,73ppm.

Já no espectro de RMN de ^{13}C observa-se nas regiões mais desblindadas, os picos dos carbonos ligados aos elementos mais eletronegativos. Por exemplo, em 174,90 o pico é referente à ligação (C=O), em 163,49 (N=C-S), 150,40 (Br-C), 153,66 (C-Cl), 153,95 (C-O), 153,98(C=N), 158,63 (C-F). Na região de 134-114 ppm, pode-se observar vários picos referente aos carbonos (C-H) aromáticos. Nas regiões de campo mais baixo, encontramos basicamente os 3 últimos picos: em 61,18 referente ao C-H heterocíclico, em 41,4 referente ao $\text{CH}_2\text{-O}$ (carbono número 12) e em 18,63 referente ao grupo metila ligado ao anel tiazolidínico.

Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C para o composto CH09 na região de 176 a 116 ppm. Fonte: autor

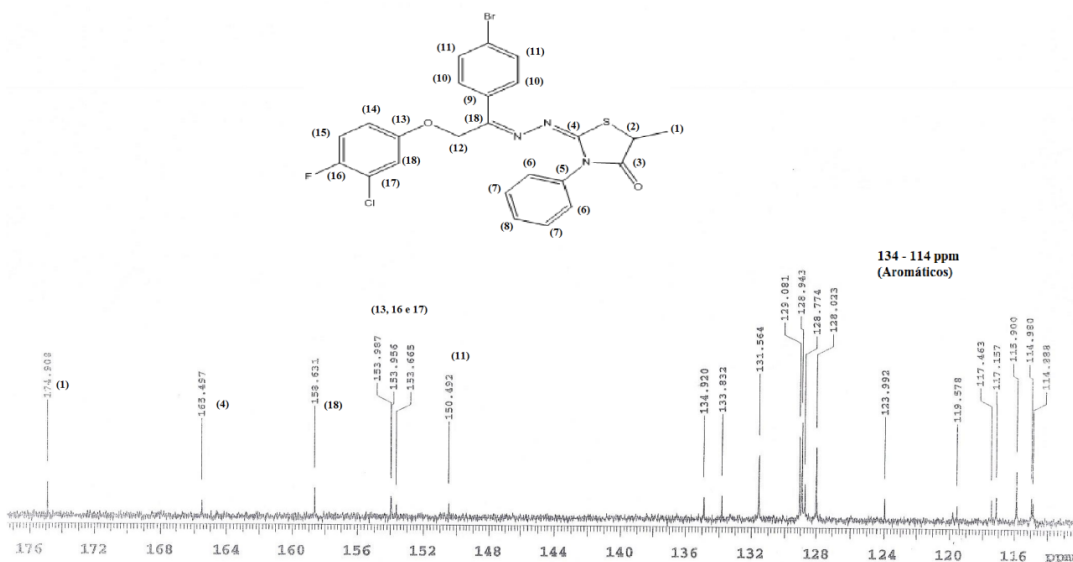
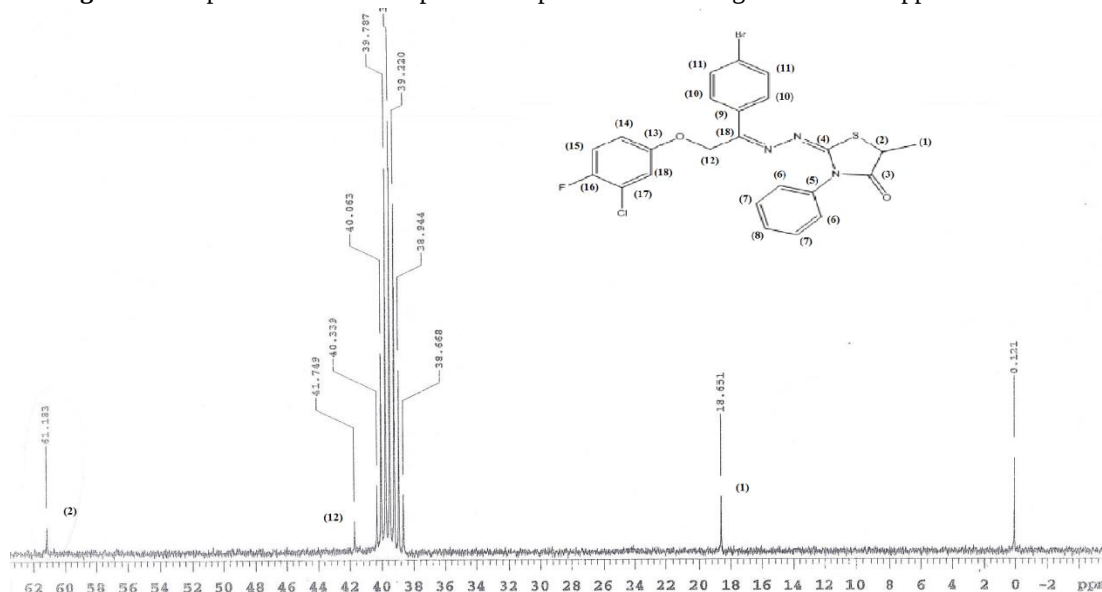
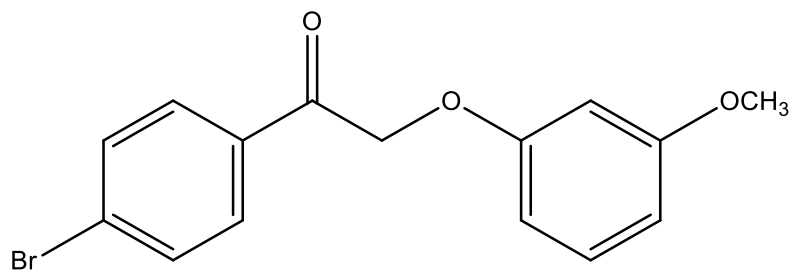


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C para o composto CH09 na região de 64 a 06 ppm. Fonte: autor



3.4.1 Composto Intermediário 1.1.:

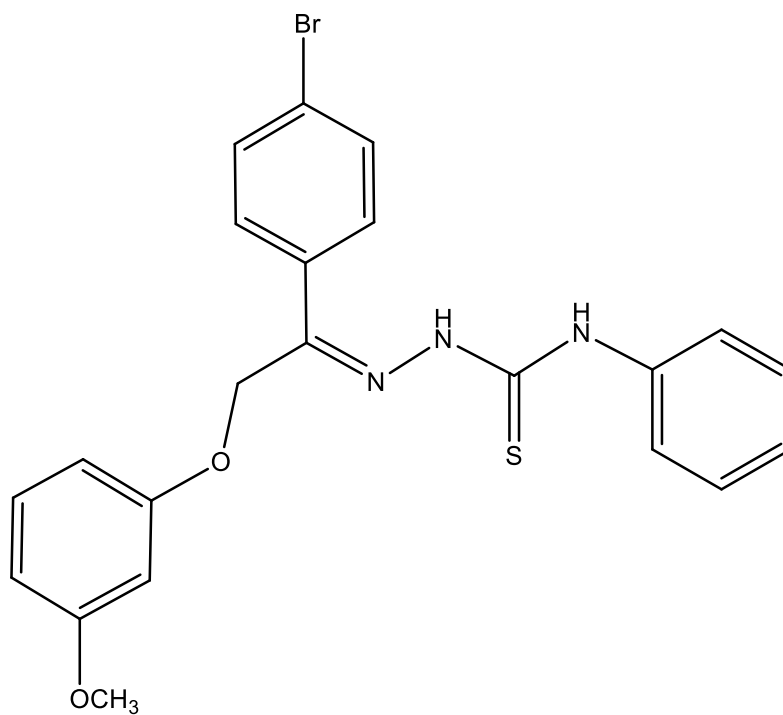


Fórmula Molecular: $C_{15}H_{14}BrO_3$

Massa Molar: 320,00 g

Principais picos no FT-IR:

3.4.2. Composto Intermediário 2.1.:

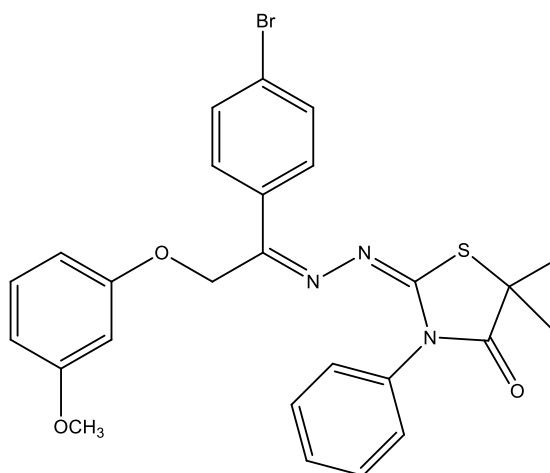


Fórmula Molecular: $C_{22}H_{20}BrN_3O_2S$

Massa Molar: 469,05 g

Principais picos no FT-IR:

3.4.3 Composto CH01:



Fórmula Molecular: C₂₆H₂₄BrN₃O₃S

Massa Molar: 537,07 g

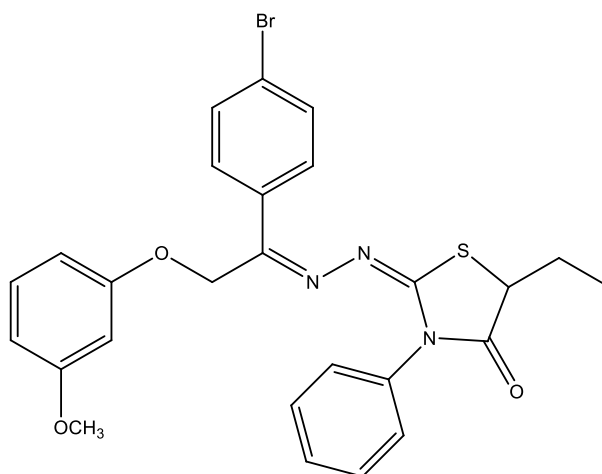
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,27(s, 3H, CH₃), 1,35(s, 3H, CH₃), 2,50 (s, 3H, CH₃-O), 3,72(CH₂-O), 7,96 (d, 1H, H-Ar), 7,89 (7,77(d,1H, H-Ar), 7,68(s, 1H, H-Ar), 7,56 (d, 2H, H-Ar), 7,39(d, 2H, H-Ar), 7,20 (t, 1H, H-Ar), 6,53(d, 2H, H-Ar),

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 10,66 (CH₃), 40,17 (CH₃-O), 55,09 (CH₂-O), 61,19(CH-Heterocíclico), 120,919 (C-Ar), 125,73(C-Ar), 126,96 (C-Ar), 127,22 (C-Ar), 127,96 (C-Ar), 128,07 (C-Ar), 129,30 (C-Ar), 131,06 (C-Ar), 129,61 (C-Ar), 131,67 (C-Ar), 132,08 (C-Ar), 149,05 (Br-C), 150,09 (C-O), 155,46(C=N), 158,71 (N=C-S), 160,41 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 538,49

3.4.4 Composto CH02:



Fórmula Molecular: $C_{26}H_{24}BrN_3O_3S$

Massa Molar: 537,07 g

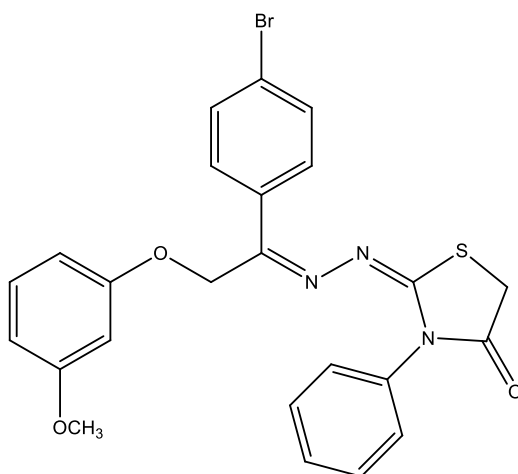
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,07(t, 3H, CH_3), 2,45(q, 2H, CH_2), 3,60 (s, 3H, CH_3 -O), 5,15(s, 2H, CH_2 -O), 6,46 (t, 1H, H-Ar), 6,48(d, 2H, H-Ar), 6,53(d, 2H, H-Ar), 7,07 (d, 2H, H-Ar), 7,44 (d, 1H, H-Ar), 7,64(s, 1H, H-Ar), 7,75(d, 1H, H-Ar), 7,82 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 10,66 (CH_3), 26,05 (CH_2), 48,93 (CH_3 -O), 55,48 (CH_2 -O), 61,05(CH-Heterocíclico), 100,919 (C-Ar), 105,33(C-Ar), 106,96 (C-Ar), 107,22 (C-Ar), 124,26 (C-Ar), 128,370 (C-Ar), 129,15 (C-Ar), 129,37 (C-Ar), 129,61 (C-Ar), 130,42 (C-Ar), 131,88 (C-Ar), 159,05 (Br-C), 160,07 (C-O), 160,84(C=N), 165,24 (N=C-S), 174,40 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+ = 538,048$

3.4.5 Composto CH03:



Fórmula Molecular: $C_{24}H_{20}BrN_3O_3S$

Massa Molar: 509,04 g

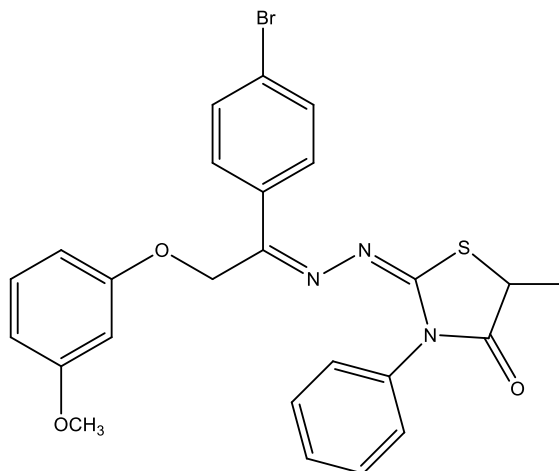
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 3,31 (s, 3H, CH_3 -O), 3,62(s, 2H, CH_2 -O), 4,14 (s, 1H, H-Heterocíclico), 7,07 (t, 1H, H-Ar), 7,20 (d, 2H, H-Ar), 7,37 (d, 2H, H-Ar), 7,40 (d, 2H, H-Ar), 7,43 (d, 1H, H-Ar), 7,45(s, 1H, H-Ar), 7,50(d,1H, H-Ar), 7,64 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 55,01 (CH_3 -O), 55,10 (CH_2 -O), 60,56(CH-Heterocíclico), 123,73 (C-Ar), 126,08(C-Ar), 127,90 (C-Ar), 128,09 (C-Ar), 128,59 (C-Ar), 128,85 (C-Ar), 128,10 (C-Ar), 129,37 (C-Ar), 129,95 (C-Ar), 131,10 (C-Ar), 131,41 (C-Ar), 158,59 (Br-C), 159,38 (C-O), 160,41(C=N), 166,44 (N=C-S), 171,80 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 509,99

3.4.6 Composto CH04:



Fórmula Molecular: C₂₅H₂₂BrN₃O₃S

Massa Molar: 523,06 g

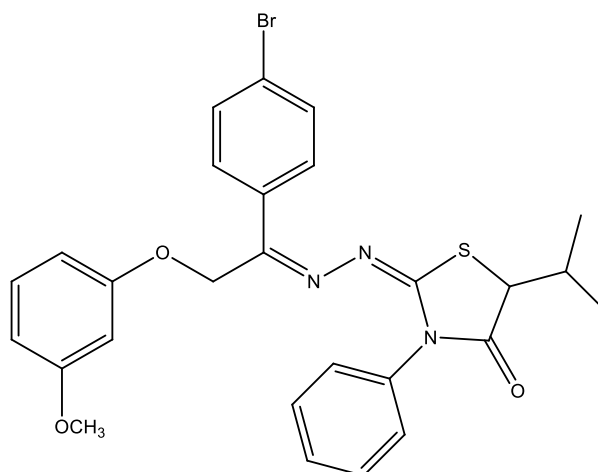
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,31(d, 3H, CH₃), 3,32 (s, 3H, CH₃-O), 3,60 (CH₂-O), 4,47 (q, 1H, H-Heterocíclico), 6,37 (t, 1H, H-Ar), 6,45 (d, 2H, H-Ar), 6,49 (d, 2H, H-Ar), 7,07 (d, 2H, H-Ar), 7,27 (d, 1H, H-Ar), 7,41 (s, 1H, H-Ar), 7,53(d,1H, H-Ar), 7,63 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 18,63 (CH₃), 41,60 (CH₃-O), 55,03 (s, 2H, CH₂-O), 74,85(CH-Heterocíclico), 124,19 (C-Ar), 124,63(C-Ar), 125,66 (C-Ar), 125,98 (C-Ar), 126,26 (C-Ar), 128,86 (C-Ar), 129,11 (C-Ar), 129,99 (C-Ar), 129,61 (C-Ar), 131,43 (C-Ar), 134,04 (C-Ar), 157,10 (Br-C), 158,30 (C-O), 159,40 (C=N), 160,38 (N=C-S), 174,85 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 524,91

3.4.7 Composto CH05:



Fórmula Molecular: $C_{27}H_{26}BrN_3O_3S$

Massa Molar: 551,09 g

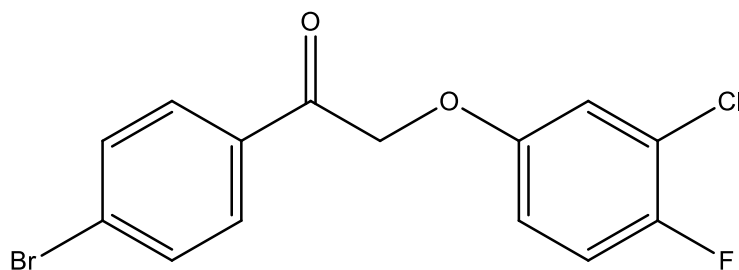
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,01(d, 3H, CH_3), 1,08 (d, 3H, CH_3), 2,5 (m, 1H, CH), 3,33 (s, 3H, CH_3 -O), 3,62 (s, 2H, CH_2 -O), 4,59 (q, 1H, H-Heterocíclico), 6,32 (t, 1H, H-Ar), 6,48 (d, 2H, H-Ar), 6,55 (d, 2H, H-Ar), 7,07 (d, 2H, H-Ar), 7,38 (d, 1H, H-Ar), 7,46 (s, 1H, H-Ar), 7,63(d,1H, H-Ar), 7,78 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 16,53 (CH_3 i-Pr), 20,09 (CH i-Pr), 53,99 (CH_3 -O), 55,02 (CH_2 -O), 60,62 (CH-Heterocíclico), 123,82 (C-Ar), 124,76(C-Ar), 125,10 (C-Ar), 126,22 (C-Ar), 127,82 (C-Ar), 128,75 (C-Ar), 128,98 (C-Ar), 129,18 (C-Ar), 129,96 (C-Ar), 131,41 (C-Ar), 133,95 (C-Ar), 134,62 (Br-C), 158,57 (C-O), 160,372 (C=N), 164,69 (N=C-S), 173,46 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 552,48

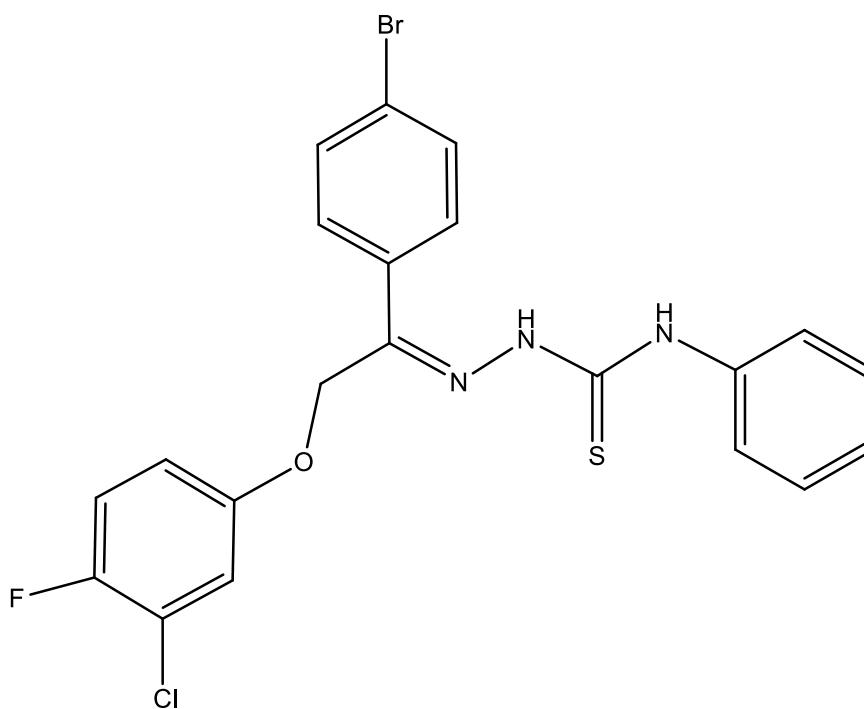
3.4.8 Composto Intermediário 1.2.:



Fórmula Molecular: $C_{14}H_{10}BrClFO_2$

Massa Molar: 341,95 g

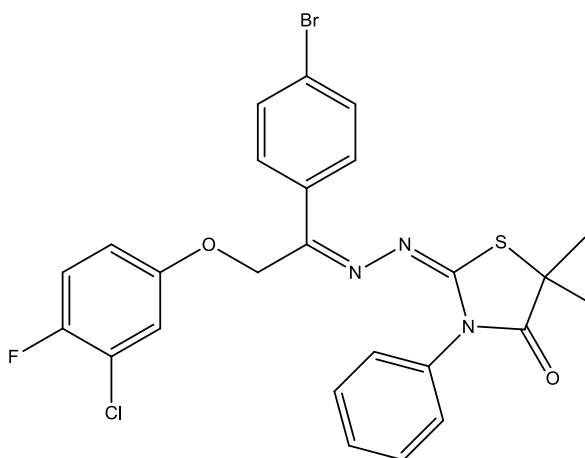
3.4.9. Composto Intermediário 2.2.:



Fórmula Molecular: $C_{21}H_{16}BrClFN_3OS$

Massa Molar: 490,99 g

3.4.10 Composto CH06:



Fórmula Molecular: $C_{25}H_{20}BrClFN_3O_2S$

Massa Molar: 559,01 g

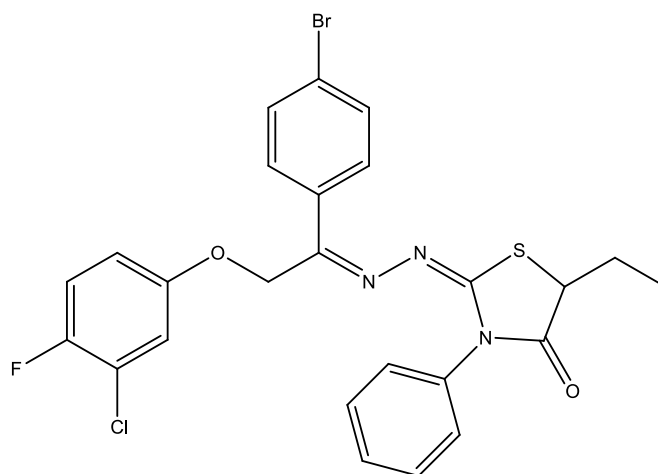
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 2,5 (s, 3H, CH_3), 3,32 (s, 3H, CH_3 -O), 5,37 (s, 2H, CH_2 -O), 6,99 (t, 1H, H-Ar), 7,35 (d, 2H, H-Ar), 7,20 (d, 2H, H-Ar), 7,38 (d, 2H, H-Ar), 7,53 (d, 1H, H-Ar), 7,60 (s, 1H, H-Ar), 7,96 (d, 1H, H-Ar), 8,08 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 22,13 (CH_3), 29,14 (CH_3), 61,66 (CH_2 -O), 70,75 (CH-Heterocíclico), 109,51 (C-Ar), 115,69 (C-Ar), 116,36 (C-Ar), 117,04 (C-Ar), 117,33 (C-Ar), 119,49 (C-Ar), 122,9 (C-Ar), 126,16 (C-Ar), 128,12 (C-Ar), 129,42 (C-Ar), 131,15 (C-Ar), 139,00 (Br-C), 140,55 (C-Cl), 143,22 (C-O), 150,65 (C=N), 160,98 (C-F), 154,27 (N=C-S), 177,41 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 560,86

3.4.11 Composto CH07:



Fórmula Molecular: C₂₅H₂₀BrClFN₃O₂S

Massa Molar: 559,01 g

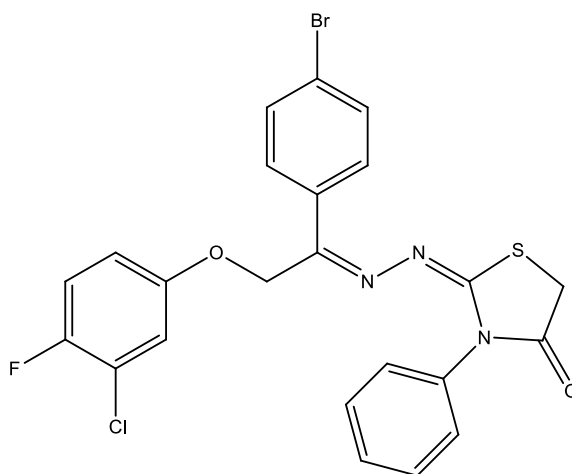
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,04(t, 3H, CH₃), 1,98 (q, 2H, CH₂), 2,11 (m, 1H, CH), 3,63 (s, 3H, CH₃-O), 4,50 (s, 2H, CH₂-O), 5,14 (d, 1H, H-Heterocíclico), 6,74 (t, 1H, H-Ar), 6,92 (d, 2H, H-Ar), 6,95 (d, 2H, H-Ar), 7,23 (d, 2H, H-Ar), 7,64 (d, 1H, H-Ar), 7,53 (s, 1H, H-Ar), 7,77(d,1H, H-Ar), 7,94 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 10,23 (CH₃), 19,17 (CH₂), 40,34 (CH₂-O), 48,57(CH-Heterocíclico), 115,88 (C-Ar), 115,90 (C-Ar), 127,93 (C-Ar), 129,09 (C-Ar), 129,39 (C-Ar), 129,90 (C-Ar), 130,91 (C-Ar), 131,88 (C-Ar), 132,12 (C-Ar), 132,42 (C-Ar), 133,45 (C-Ar), 134,60 (Br-C), 135,99 (C-Cl), 133,80 (C-O), 134,76 (C=N), 164,43 (C-F), 158,83 (N=C-S), 173,97 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 560,81

3.4.12 Composto CH08:



Fórmula Molecular: C₂₃H₁₆BrClFN₃O₂S

Massa Molar: 530,98 g

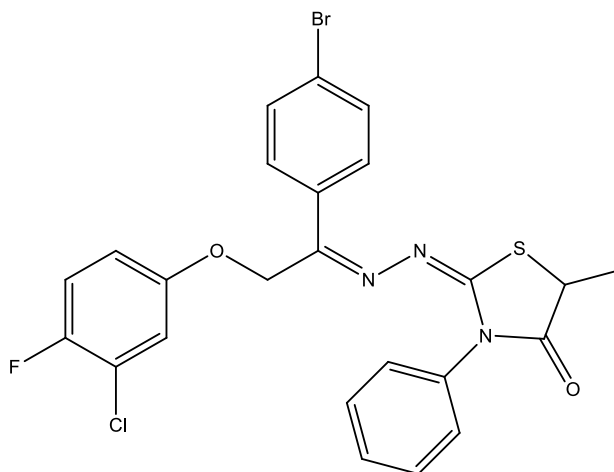
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 4,16 (s, 2H, CH₂-O), 5,15 (s, 1H, H-Heterocíclico), 6,75 (t, 1H, H-Ar), 6,93 (d, 2H, H-Ar), 6,95 (d, 2H, H-Ar), 7,24 (d, 2H, H-Ar), 7,42 (d, 1H, H-Ar), 7,46 (s, 1H, H-Ar), 7,64(d,1H, H-Ar), 7,72 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 52,46 (CH₂-O), 60,51(CH-Heterocíclico), 124,01 (C-Ar), 124,19 (C-Ar), 124,66 (C-Ar), 125,14 (C-Ar), 126,03 (C-Ar), 126,49 (C-Ar), 127,19 (C-Ar), 127,66 (C-Ar), 128,92 (C-Ar), 129,12 (C-Ar), 131,05 (C-Ar), 149,00 (Br-C), 150,35 (C-Cl), 153,72 (C-O), 158,25(C=N), 160,14 (C-F), 164,97 (N=C-S), 176,11 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺= 532,95

3.4.13 Composto CH09:



Fórmula Molecular: $C_{24}H_{18}BrClFN_3O_2S$

Massa Molar: 545,00 g

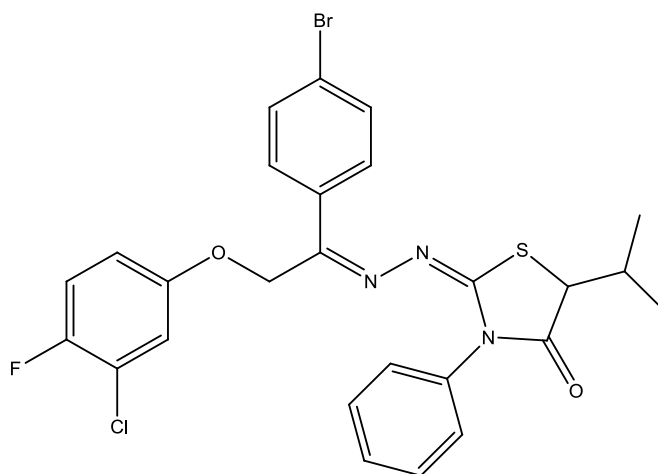
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,63 (d, 3H, CH_3), 3,37 (s, 2H, CH_2 -O), 4,48 (q, 1H, H-Heterocíclico), 6,73 (t, 1H, H-Ar), 6,75 (d, 2H, H-Ar), 6,93 (d, 2H, H-Ar), 6,96 (d, 2H, H-Ar), 7,24 (d, 1H, H-Ar), 7,46 (s, 1H, H-Ar), 7,63 (d, 1H, H-Ar), 7,77 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 18,63 (CH_3), 41,74 (CH_2 -O), 61,18 (CH-Heterocíclico), 114,88 (C-Ar), 114,98 (C-Ar), 117,15 (C-Ar), 117,46 (C-Ar), 119,57 (C-Ar), 123,99 (C-Ar), 128,02 (C-Ar), 128,77 (C-Ar), 128,94 (C-Ar), 129,08 (C-Ar), 131,56 (C-Ar), 150,40 (Br-C), 153,66 (C-Cl), 153,95 (C-O), 153,98 (C=N), 158,63 (C-F), 163,49 (N=C-S), 174,90 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+ = 546,85$

3.4.14 Composto CH10:



Fórmula Molecular: $C_{26}H_{22}BrClFN_3O_2S$

Massa Molar: 573,03 g

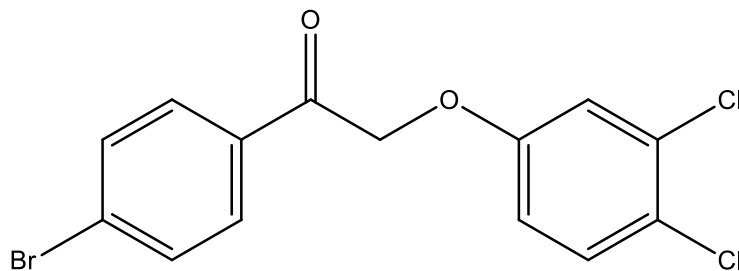
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,19 (d, 6H, CH_3), 2,5(m, 1H, CH), 4,36 (s, 2H, CH_2 -O), 5,34 (d, 1H, H-Heterocíclico), 7,27 (t, 1H, H-Ar), 7,53 (d, 2H, H-Ar), 7,55 (d, 2H, H-Ar), 7,58 (d, 2H, H-Ar), 7,61 (d, 1H, H-Ar), 7,71 (s, 1H, H-Ar), 7,73(d,1H, H-Ar), 7,97 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 28,36 (CH_3 i-Pr), 22,17(CH_3 i-Pr), 47,98 (CH_2 -O), 61,69 (CH-Heterocíclico), 115,59 (C-Ar), 115,66 (C-Ar), 116,37 (C-Ar), 117,06 (C-Ar), 117,29 (C-Ar), 119,68 (C-Ar), 122,92 (C-Ar), 125,57 (C-Ar), 126,03 (C-Ar), 128,10 (C-Ar), 129,38 (C-Ar), 139,00 (Br-C), 143,24 (C-Cl), 151,02 (C-O), 153,40 (C=N), 154,25 (C-F), 154,27 (N=C-S), 177,42 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 574,87

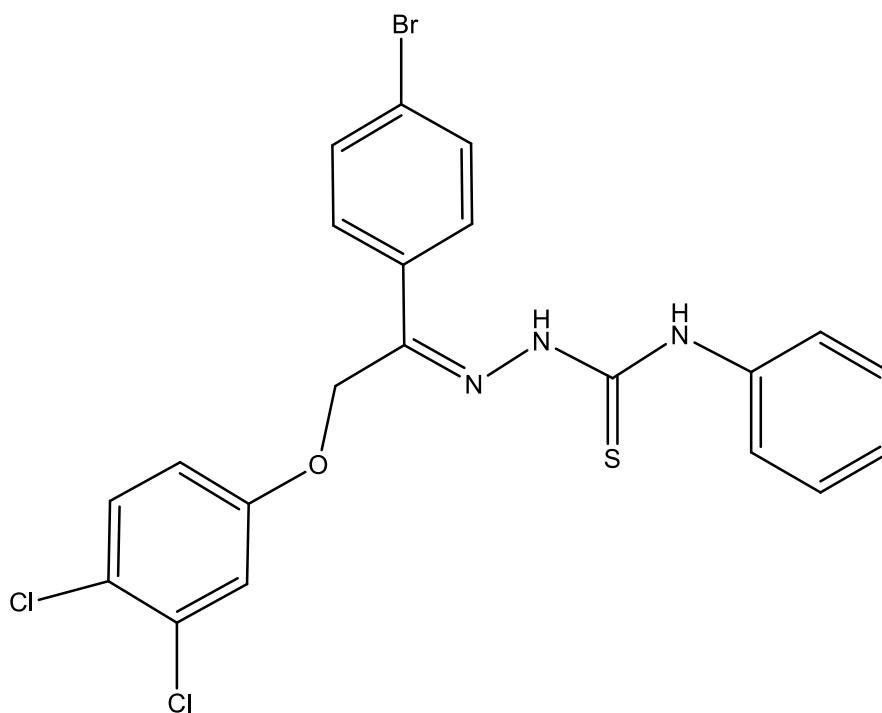
3.4.15 Composto Intermediário 1.3.:



Fórmula Molecular: C₁₄H₁₀BrCl₂O₂

Massa Molar: 357,92 g

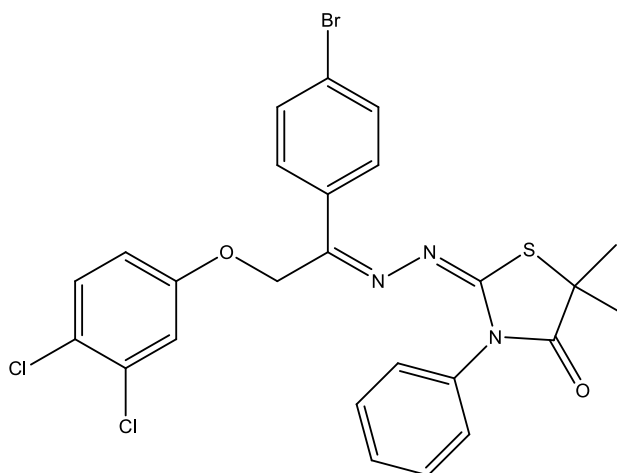
3.4.16. Composto Intermediário 2.3.:



Fórmula Molecular: C₂₁H₁₆BrCl₂N₃OS

Massa Molar: 506,96 g

3.4.17 Composto CH11:



Fórmula Molecular: C₂₅H₂₀BrCl₂N₃O₂S

Massa Molar: 574,98 g

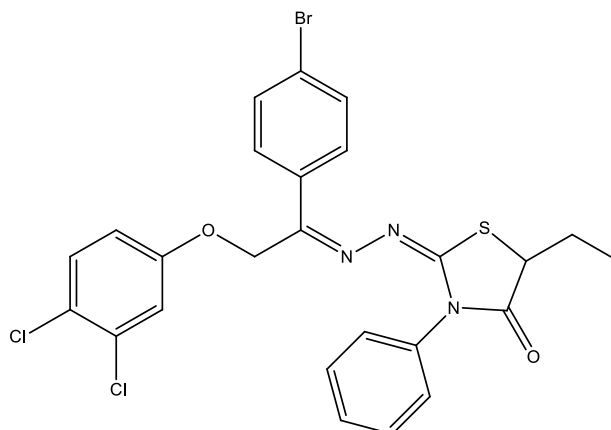
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,0 (s, 3H, CH₃), 1,16 (s, 3H, CH₃), 4,39 (s, 2H, CH₂-O), 7,22 (t, 1H, H-Ar), 7,34 (d, 2H, H-Ar), 7,38 (d, 2H, H-Ar), 7,54 (d, 2H, H-Ar), 7,56 (d, 1H, H-Ar), 7,58 (s, 1H, H-Ar), 7,6(d,1H, H-Ar), 8,00 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 18,50 (CH₃), 56,00 (CH₂-O), 61,52 (CH-Heterocíclico), 116,10 (C-Ar), 116,72 (C-Ar), 122,97 (C-Ar), 123,14 (C-Ar), 125,57 (C-Ar), 126,00 (C-Ar), 128,12 (C-Ar), 129,39 (C-Ar), 130,89 (C-Ar), 131,15 (C-Ar), 131,50 (C-Ar), 139,00 (Cl-C), 134,70 (C-O), 143,70 (C=N), 157,17 (N=C-S), 177,50 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 575,67

3.4.18. Composto CH12:



Fórmula Molecular: $C_{25}H_{20}BrCl_2N_3O_2S$

Massa Molar: 574,98 g

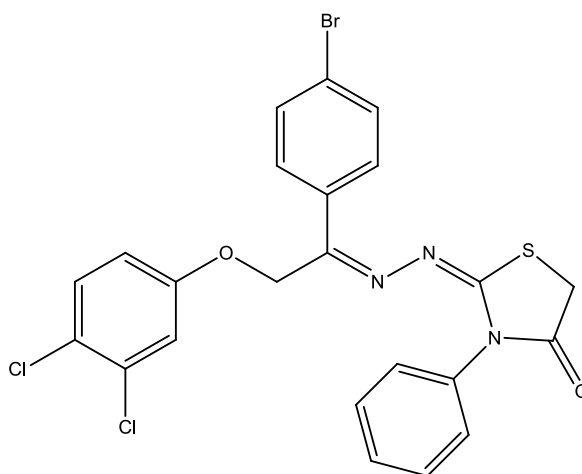
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,07 (t, 3H, CH_3), 1,60 (m, 2H, CH_2), 3,36 (s, 2H, CH_2 -O), 4,51 (t, 1H, H – Heterocíclico), 6,22 (t, 1H, H-Ar), 6,36 (d, 2H, H-Ar), 6,75 (d, 2H, H-Ar), 7,01 (d, 2H, H-Ar), 7,43 (d, 1H, H-Ar), 7,45 (s, 1H, H-Ar), 7,66 (d, 1H, H-Ar), 7,78 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 19,67 (CH_3), 25,24 (CH_2), 54,07 (CH_2 -O), 61,07 (CH-Heterocíclico), 115,30 (C-Ar), 116,18 (C-Ar), 123,00 (C-Ar), 123,91 (C-Ar), 127,91 (C-Ar), 128,65 (C-Ar), 128,86 (C-Ar), 129,03 (C-Ar), 130,99 (C-Ar), 131,38 (C-Ar), 131,53 (C-Ar), 156,88 (Br-C), 158,44 (Cl-C), 166,87 (C=N), 171,81 (N=C-S), 174,71 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 576,03

3.4.19. Composto CH13:



Fórmula Molecular: $C_{23}H_{16}BrCl_2N_3O_2S$

Massa Molar: 546,95 g

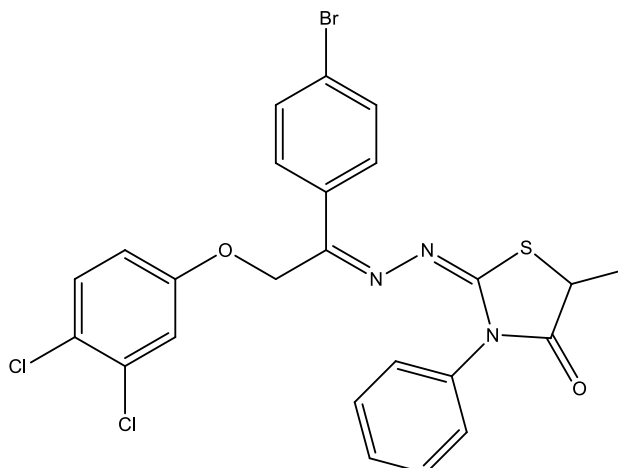
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 4,39 (s, 2H, CH_2 -O), 7,22 (t, 1H, H-Ar), 7,34 (d, 2H, H-Ar), 7,38 (d, 2H, H-Ar), 7,54 (d, 2H, H-Ar), 7,56 (d, 1H, H-Ar), 7,58 (s, 1H, H-Ar), 7,6(d,1H, H-Ar), 8,00 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 19,67 (CH_3), 25,24 (CH_2), 54,07 (CH_2 -O), 61,07 (CH-Heterocíclico), 115,30 (C-Ar), 116,18 (C-Ar), 123,00 (C-Ar), 123,91 (C-Ar), 127,91 (C-Ar), 128,65 (C-Ar), 128,86 (C-Ar), 129,03 (C-Ar), 130,99 (C-Ar), 131,38 (C-Ar), 131,53 (C-Ar), 156,88 (Br-C), 158,44 (Cl-C), 166,87 (C=N), 171,81 (N=C-S), 174,71 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+ = 547,88$

3.4.20 Composto CH14:



Fórmula Molecular: $C_{24}H_{18}BrCl_2N_3O_2S$

Massa Molar: 560,97 g

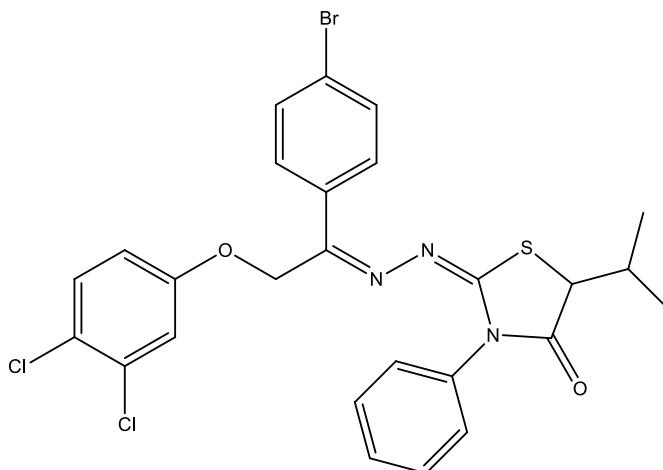
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,67 (t, 3H, CH_3), 3,32 (s, 2H, CH_2 -O), 4,50 (t, 1H, H – Heterocíclico), 6,02 (t, 1H, H-Ar), 6,46 (d, 2H, H-Ar), 6,77 (d, 2H, H-Ar), 7,02 (d, 2H, H-Ar), 7,41 (d, 1H, H-Ar), 7,46 (s, 1H, H-Ar), 7,65 (d, 1H, H-Ar), 7,72 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 19,08 (CH_3), 42,17 (CH_2 -O), 61,52 (CH-Heterocíclico), 115,77 (C-Ar), 116,66 (C-Ar), 123,49 (C-Ar), 124,40 (C-Ar), 128,40 (C-Ar), 129,14 (C-Ar), 131,44 (C-Ar), 131,98 (C-Ar), 132,01 (C-Ar), 132,99 (C-Ar), 133,13 (C-Ar), 134,21 (Br-C), 135,32 (Cl-C), 157,25 (C-O), 158,28 (C=N), 165,89 (N=C-S), 175,28 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+ = 562,93$

3.4.21 Composto CH15:



Fórmula Molecular: $C_{26}H_{22}BrCl_2N_3O_2S$

Massa Molar: 589,00 g

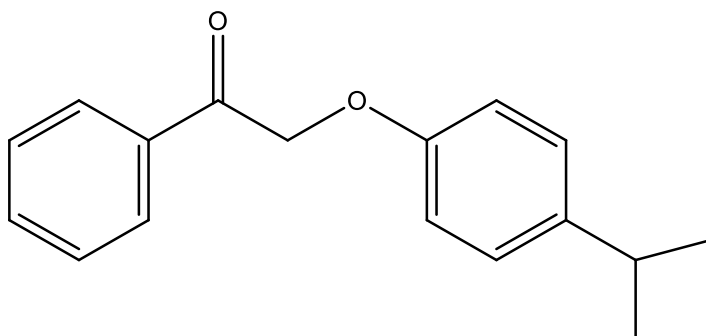
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 2,15 (d, 3H, CH_3), 2,50 (d, 3H, CH_3), 3,38 (m, 1H, CH), 4,16 (s, 2H, CH_2 -O), 5,18 (t, 1H, H – Heterocíclico), 7,41 (t, 1H, H-Ar), 7,47 (d, 2H, H-Ar), 7,44 (d, 2H, H-Ar), 7,47 (d, 2H, H-Ar), 7,64 (d, 1H, H-Ar), 7,66 (s, 1H, H-Ar), 7,74 (d, 1H, H-Ar), 7,76 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 25,71 (CH_3), 33,06 (CH), 55,09 (CH_2 -O), 61,54 (CH-Heterocíclico), 116,47 (C-Ar), 115,76 (C-Ar), 123,46 (C-Ar), 124,67 (C-Ar), 128,37 (C-Ar), 129,11 (C-Ar), 129,34 (C-Ar), 129,49 (C-Ar), 131,45 (C-Ar), 131,99 (C-Ar), 132,13 (C-Ar), 135,29 (Br-C), 157,26 (Cl-C), 158,91 (Cl-C), 167,34 (C=O), 175,00 (N=C-S), 177,98 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 590,23

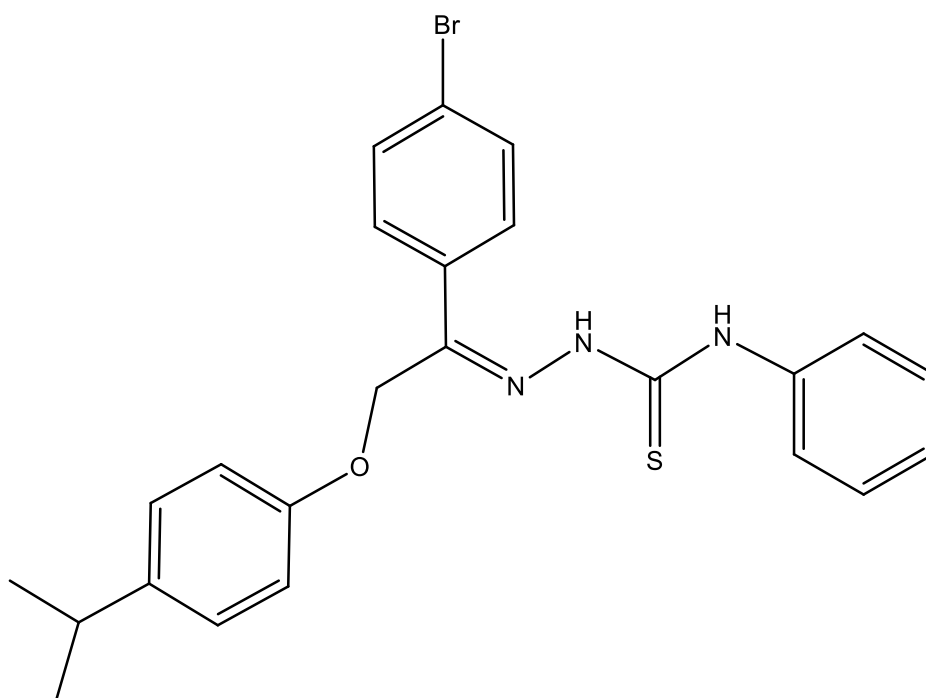
3.4.22 Composto intermediário 1.4.:



Fórmula Molecular: C₁₇H₁₈O₂

Massa Molar: 254,13 g

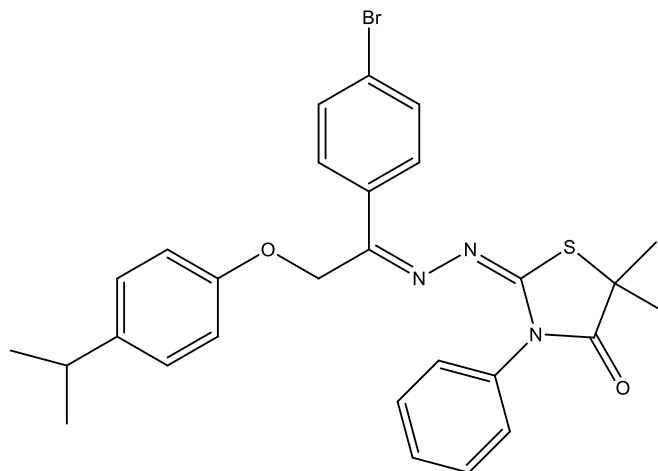
3.4.23. Composto Intermediário 2.4.:



Fórmula Molecular: C₂₄H₂₅BrN₃OS

Massa Molar: 481,08 g

3.4.24 Composto CH16:



Fórmula Molecular: $C_{28}H_{28}BrN_3O_2S$

Massa Molar: 549,11 g

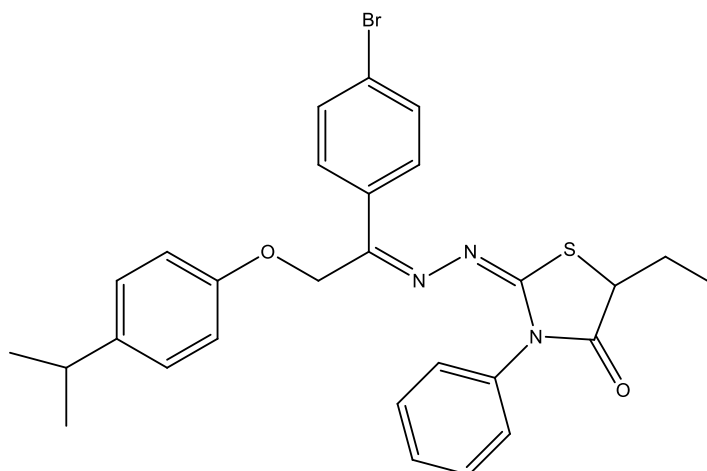
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,05 (s, 3H, CH_3 tiazolinona), 1,19 (d, 6H, CH_3), 2,85 (m, 1H, CH), 4,38 (s, 2H, CH_2 -O), 6,99 (t, 1H, H-Ar), 7,02 (d, 2H, H-Ar), 7,19 (d, 2H, H-Ar), 7,36 (d, 2H, H-Ar), 7,38 (d, 1H, H-Ar), 7,41 (s, 1H, H-Ar), 7,43 (d, 1H, H-Ar), 7,66 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 15,50 (CH_3), 22,14 (CH_3), 59,19 (CH_2 -O), 125,77 (C-Ar), 126,66 (C-Ar), 127,49 (C-Ar), 127,90 (C-Ar), 128,40 (C-Ar), 128,94 (C-Ar), 129,44 (C-Ar), 131,18 (C-Ar), 132,01 (C-Ar), 132,89 (C-Ar), 133,03 (C-Ar), 144,11 (Br-C), 150,62 (C-O), 168,38 (C=N), 170,01 (N=C-S), 176,88 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+$ = 550,18

3.4.25 Composto CH17:



Fórmula Molecular: C₂₈H₂₈BrN₃O₂S

Massa Molar: 549,11 g

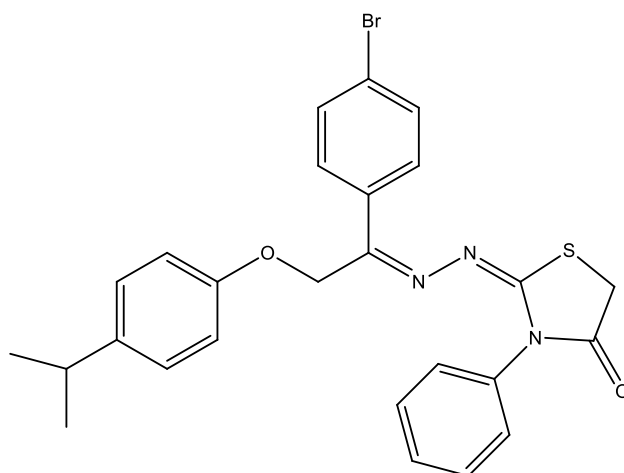
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,05 (t, 3H, CH₃ tiazolinona), 1,14 (d, 6H, CH₃), 2,01 (q, 2H, CH₂), 2,71 (m, 1H, CH), 3,36 (s, 2H, CH₂-O), 4,50 (t, 1H, H – Heterocíclico), 6,97 (t, 1H, H-Ar), 7,12 (d, 2H, H-Ar), 7,05 (d, 2H, H-Ar), 7,45 (d, 2H, H-Ar), 7,51 (d, 1H, H-Ar), 7,63 (s, 1H, H-Ar), 7,65 (d, 1H, H-Ar), 7,76 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 16,85 (CH₃), 18,99 (CH₃), 20,15 (CH), 22,18 (CH₂), 42,78 (CH₂-O), 60,14 (CH-Heterocíclico), 115,97 (C-Ar), 116,90 (C-Ar), 120,69 (C-Ar), 127,77 (C-Ar), 129,34 (C-Ar), 132,36 (C-Ar), 132,54 (C-Ar), 132,98 (C-Ar), 133,10 (C-Ar), 133,49 (C-Ar), 133,93 (C-Ar), 134,19 (Br-C), 159,15 (C-O), 160,28 (C=N), 164,95 (N=C-S), 176,78 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 550,18

3.4.26 Composto CH18:



Fórmula Molecular: C₂₆H₂₄BrN₃O₂S

Massa Molar: 521,08 g

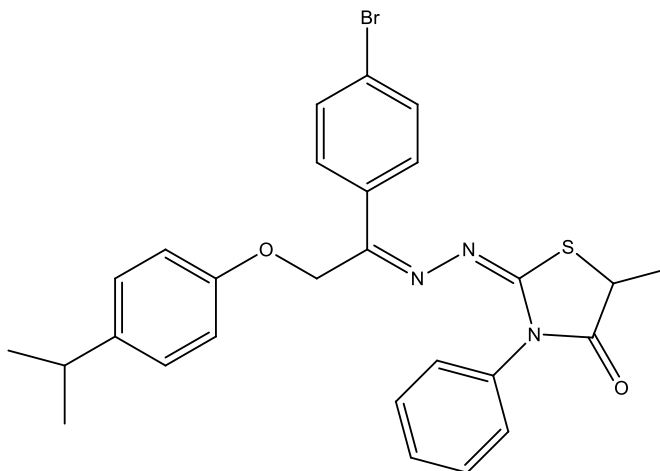
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,01 (d, 6H, CH₃), 2,44 (m, 1H, CH), 4,11 (s, 2H, CH₂-O), 4,36 (s, 1H, H – Heterocíclico), 6,81 (t, 1H, H-Ar), 6,86 (d, 2H, H-Ar), 6,90 (d, 2H, H-Ar), 6,95 (d, 2H, H-Ar), 6,99 (d, 1H, H-Ar), 7,41 (s, 1H, H-Ar), 7,59 (d, 1H, H-Ar), 7,73 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 18,50 (CH₃), 20,04 (CH₃), 55,99 (CH₂-O), 60,99 (CH-Heterocíclico), 114,17 (C-Ar), 123,72 (C-Ar), 127,09 (C-Ar), 127,95 (C-Ar), 128,62 (C-Ar), 128,89 (C-Ar), 129,10 (C-Ar), 131,40 (C-Ar), 134,16 (C-Ar), 134,95 (C-Ar), 135,09 (C-Ar), 140,91 (Br-C), 155,53 (C-O), 159,48 (C=N), 166,45 (N=C-S), 171,84 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 522,03

3.4.27 Composto CH19:



Fórmula Molecular: $C_{27}H_{26}BrN_3O_2S$

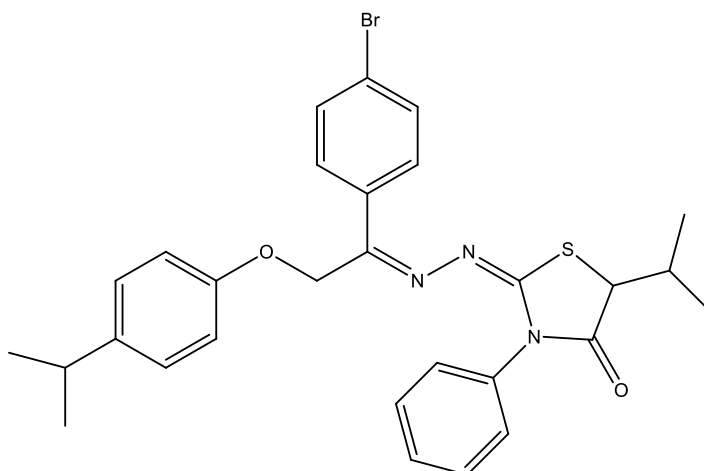
Massa Molar: 535,09 g

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz): 1,14 (d, 6H, CH_3), 2,01 (s, 3H, CH_3), 2,784 (m, 1H, CH), 3,36 (s, 2H, CH_2 -O), 4,50 (s, 1H, H – Heterocíclico), 6,65 (t, 1H, H-Ar), 6,86 (d, 2H, H-Ar), 7,05 (d, 2H, H-Ar), 7,45 (d, 2H, H-Ar), 7,51 (d, 1H, H-Ar), 7,63 (s, 1H, H-Ar), 7,65 (d, 1H, H-Ar), 7,76 (d, 2H, H-Ar)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz): 19,09 (CH_3), 24,48 (CH), 42,07 (CH_2 -O), 60,49 (CH-Heterocíclico), 114,62 (C-Ar), 120,17 (C-Ar), 124,21 (C-Ar), 127,56 (C-Ar), 128,44 (C-Ar), 129,11 (C-Ar), 129,31 (C-Ar), 129,54 (C-Ar), 131,86 (C-Ar), 134,59 (C-Ar), 135,44 (C-Ar), 141,37 (Br-C), 155,97 (C-O), 159,91 (C=N), 165,47 (N=C-S), 175,30 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

$[M-H]^+ = 536,03$

3.4.28 Composto CH20:

Fórmula Molecular: C₂₉H₃₀BrN₃O₂S

Massa Molar: 563,12 g

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 1,14 (d, 6H, CH₃), 2,11 (d, 6H, CH₃), 2,48 (m, 1H, CH), 2,784 (m, 1H, CH), 3,46 (s, 2H, CH₂-O), 4,61 (s, 1H, H – Heterocíclico), 6,85 (t, 1H, H-Ar), 6,96 (d, 2H, H-Ar), 7,15 (d, 2H, H-Ar), 7,40 (d, 2H, H-Ar), 7,49 (d, 1H, H-Ar), 7,53 (s, 1H, H-Ar), 7,64 (d, 1H, H-Ar), 7,75 (d, 2H, H-Ar)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 10,24 (CH₃), 18,24 (CH₃), 24,00 (CH), 25,60 (CH), 48,48 (CH₂-O), 60,58 (CH-Heterocíclico), 114,17 (C-Ar), 120,17 (C-Ar), 123,77 (C-Ar), 127,09 (C-Ar), 127,93 (C-Ar), 128,91 (C-Ar), 129,11 (C-Ar), 131,39 (C-Ar), 132,46 (C-Ar), 134,09 (C-Ar), 134,84 (C-Ar), 140,92 (Br-C), 155,50 (C-O), 159,66 (C=N), 164,84 (N=C-S), 173,93 (C=O).

Principais sinais na EMAR (espectrometria de massas de alta resolução):

[M-H]⁺ = 564,77

4 **Capítulo 2:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS TIAZOLIDIN-4-ONAS

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

4.1.1 Leishmaniose

A palavra Leishmaniose indica um conjunto de doenças causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que são transmitidos para o ser humano a partir da picada de flebotomíneos fêmea infectadas (ÖZBILGIN et al., 2017). Uma vez dentro do corpo humano, os parasitos invadem as células, principalmente os macrófagos e lá se instalam e se reproduzem, fato que acarreta danos severos e crônicos ao indivíduo infectado (KUMAR et al., 2017).

A doença, possui caráter endêmico e característico de regiões tropicais e sub-tropicais, que são os locais com maior facilidade de proliferação do vetor. Estima-se que 12 milhões de pessoas no mundo sofrem dessa doença (MONTEIRO et al., 2017).

Os flebotomíneos (Figura 13), também conhecidos como mosquito palha ou birigui, são insetos que tem, de forma geral, de 2 a 3 mm de comprimento, possuem a parte externa do seu corpo totalmente recoberta por cerdas, e tem ciclo de vida variando entre 1 a 3 meses a depender da espécie observada e das condições ambientais em que os mesmos se encontram (DUTRA REGO, 2013).

Figura 13. Mosquito flebotomíneo sob a pele do ser humano.

Fonte: <http://www.unigrancapital.com.br/uniblog/noticias.php?id=914>



As fêmeas, quando em período reprodutivo, possuem hábitos hematofágicos, usando como fonte sanguínea diversas espécies de vertebrados. Justamente por apresentar essa característica é que esses insetos possuem a capacidade proliferativa da leishmaniose (BASTOS, 2012).

O ciclo de vida do parasito, esquematizado na Figura 14, apresenta diversos estágios de desenvolvimento, e de forma geral, inicia-se quando o vetor (flebotomíneos contaminados) ao praticar o processo hematofágico transmite o protozoário para o ser humano na sua forma promastigota (Figura 15 a). O protozoário, já na corrente sanguínea, invade ou é fagocitado pelos macrófagos, onde lá, internamente são convertidos na forma aflagelada, ou amastigota (Figura 15 b) e inicia o seu processo de reprodução por divisão simples. Após a reprodução excessiva no interior dos macrófagos, essas células sofrem rupturas e então os protozoários são liberados para a corrente sanguínea e passam a infectar novos macrófagos. Quando um flebótomo se alimenta do sangue de algum hospedeiro infectado, ele pode ingerir macrófagos contaminados ou formas amastigotas livres na corrente sanguínea, e então os protozoários ao chegarem no intestino do inseto são convertidos na sua forma promastigota e inicia a sua reprodução. Após isso, as formas promastigotas são regugitadas e migram para a região da probócida do inseto, onde conclui o ciclo ao contaminar outro mamífero através da hemofagia.

Figura 14. Ciclo de vida do protozoário do gênero *Leishmânia*.

Fonte: <http://obiologoricardohisamoto.blogspot.com.br/2017/03/o-ciclo-de-vida-dos-parasitos.html>

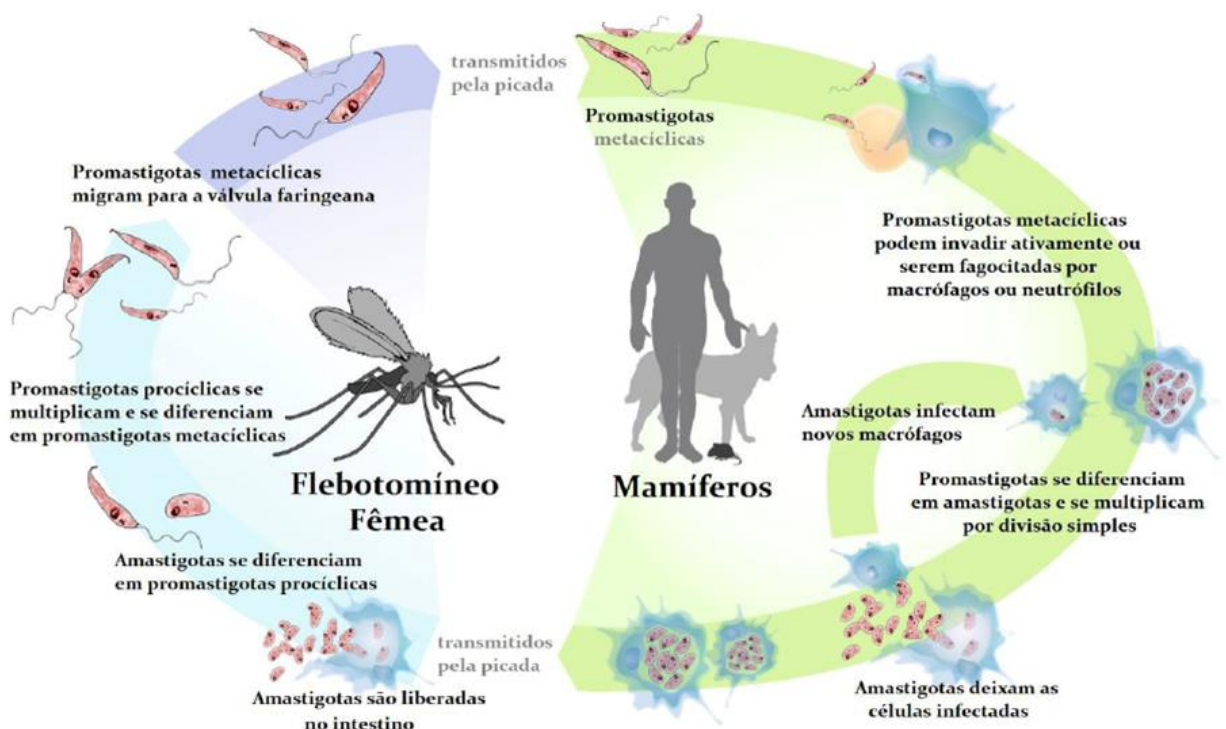
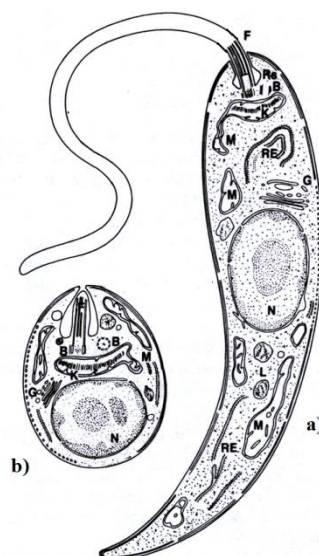


Figura 15. Formas dos Protozoários do Gênero *Leishmânia*. Em a) forma promastigota (flagelada) e em b) a forma amastigota (aflagelada).

Fonte: <http://alunoonline.blogspot.com.br/2011/03/leishmaniose.html>



Existem, de forma geral, três tipos de Leishmanioses, que variam de acordo com o protozoário infectante: a Leishmaniose Cutânea, a Leishmaniose Visceral e a Leishmaniose Muco-Cutânea (DUTRA REGO, 2013).

A leishmaniose tegumentar, ou cutânea, é causada por diversos parasitos, onde pode-se citar os da espécie *brasiliensis* e *amazonensis*. As principais características da doença é o surgimento de lesões cutâneas com formatos arredondados ou ovalados na face, no pescoço e nos membros (BRASIL, 2010).

A leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é causada normalmente pelo *Leishmania infantum* e é uma das formas mais perigosas da doença (ASFARAM et al., 2017). Na fase aguda, os sintomas da LV podem incluir febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutânea e hepatoesplenomegalia (aumento da região do baço e fígado). Caso não seja tratada corretamente, a LV pode evoluir para casos mais graves e causa icterícia, hemorragia e edemas nos membros inferiores, podendo causar a morte do indivíduo (BRASIL, 2006).

Atualmente, os tratamentos para a leishmaniose incluem o uso do fármaco à base de antimônio como primeira escolha e Anfotericina B, Paromomicina e Miltefosina como segunda escolha. A problemática da doença é que os medicamentos disponíveis para o uso possui uma toxicidade relevante, o que causa problemas no tratamento terapêutico (KUMAR

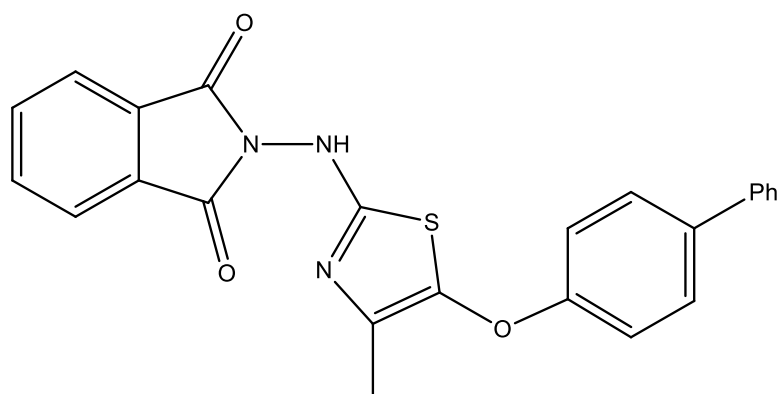
et al., 2017). Nesse contexto, a descoberta de novos fármacos mais potentes e menos tóxicos se faz necessária para melhorar a qualidade de vida da população acometida de Leishmaniose.

4.1.2 Atividades leishmanicida das Tiazolidin-4-onas e seus análogos

Os principais bioisósteros do anel tiazolidínico, os tiazóis e tiossemicarbazonas já se encontram na literatura sendo utilizados como potenciais leishmanicidas.

ALIANÇA et al. (2017), avaliaram o potencial leishmanicida de uma série Ftalil-Tiazóis, e obtiveram excelentes resultados, como o IC_{50} de 9,8 μM para o *Leishmania infantum*, da molécula representada na Figura 16.

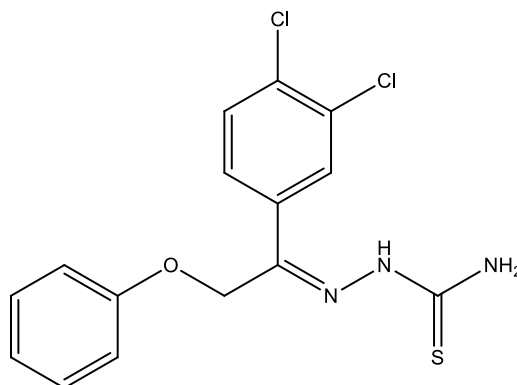
Figura 16. Estrutura química do ftalil-tiazol sintetizado por (ALIANCA et al., 2017) com melhor atividade Leishmanicida.



DA SILVA et al., (2017) estudaram a atividade Leishmanicida de uma série de tiossemicarbazonas e obtiveram bons resultados. Uma das moléculas (Figura 17) apresentou IC_{50} para a forma promastigota da *L. amazonensis* de 3,6 μM , sendo atóxico nas concentrações estudadas, ou seja, com um alto índice de seletividade.

Com os dois recentes bem sucedidos trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa do LPqM, percebe-se que os bioisósteros dos anéis tiazolidínicos apresentaram uma relevante atividade Leishmanicida, o que leva-se a acreditar que há a necessidade dos estudos das atividades leishmanicidas das tiazolidin-4-onas.

Figura 17. Estrutura química da tiossemicarbazona sintetizada por DA SILVA et al. (2017), com melhor atividade Leishmanicida.



4.2 MATERIAIS E MÉTODO

4.2.1 Ensaio de citotoxicidade pelo ensaio de MTT

Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que deve ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância.

As células da linhagem RAW foram plaqueadas em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Poços apenas com meio de cultura foram utilizados como controle.

Foi realizada também, incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 3h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A

concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.2 Atividade Biológica em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Visando realizar um “screening” inicial dos compostos com atividade leishmanicida, formas promastigotas foram contadas e diluídas em meio Schneider’s (Sigma) suplementado com 10% de SFB a 1×10^6 células/mL.

Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações das tiazolidin-4-onas (0,19 a 100 µg/mL) por 96h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Anfotericina B foram utilizados como controle negativo e positivo respectivamente. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos.

O crescimento celular foi avaliado e a IC₅₀/96h foi determinada por análise de regressão. As concentrações usadas para a determinação da IC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitas) foram: 0.19, 1.56, 6.25, 25 e 100 µg/mL. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

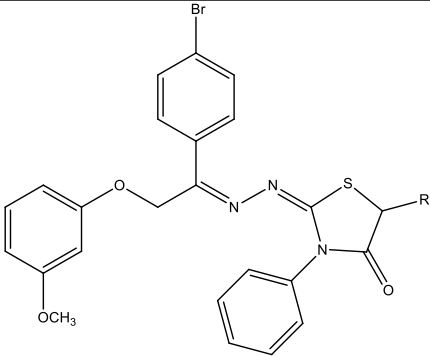
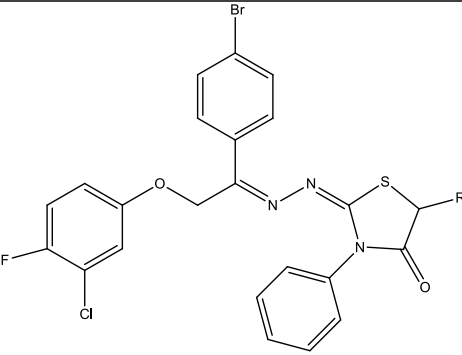
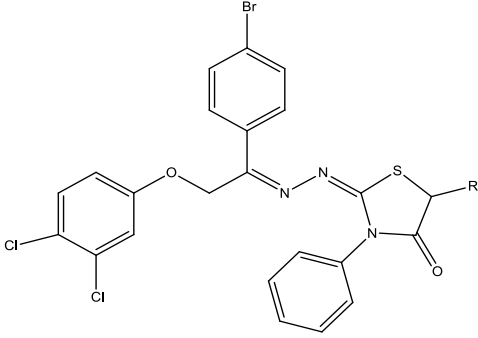
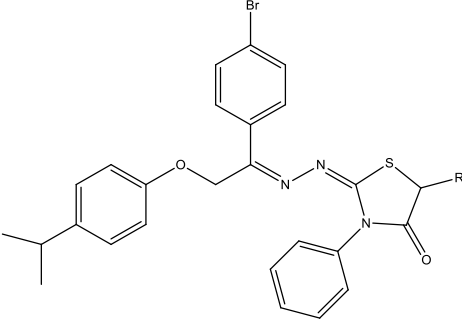
4.3 RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta os valores de IC₅₀ e citotoxicidade dos 20 compostos testados. Dentre as moléculas testadas, sete apresentaram índice de seletividade maior do que o composto padrão. Entre essas, cinco apresentaram valor de IC₅₀ equiparáveis e uma apresentou IC₅₀ menor que a Anfotericina.

As melhores atividades ficaram distribuídas dentre o grupo das moléculas que continha o fenol substituído pelo grupamento Isopropil. A melhor atividade Leishmanicida foi da molécula CH18, com IC₅₀ igual a 0,96 µg/mL. Já a molécula com melhor índice de seletividade foi a CH20, com valor de IS igual a 34,93, cerca de cinco vezes maior que a seletividade da Anfotericina.

De forma geral, todas as moléculas apresentaram valores de citotoxicidade menores que o controle positivo, o que é uma vantagem, visto que o que se observa como potencial atividade biológica na molécula não é apenas o seu efeito no alvo, mas também as possíveis interações com as células sadias (o que traz efeitos colaterais).

Tabela 2. Atividade Leishmanicida das tizolidin-4-onas.

Molécula Base	Molécula	IC ₅₀ ^a	Citotoxicidade ^b	IS ^c	ISR ^d
	CH01	1,82	35,18	19,32	> 2,5
	CH02	8,66	>100*	>11,54	>1,5
	CH03	8,68	21,22	2,44	<3,0
	CH04	2,93	ND**	-	-
	CH05	5,75	ND	-	-
	CH06	1,16	10,43	8,99	>1,2
	CH07	8,19	ND	-	-
	CH08	5,32	13,86	2,60	<2,88
	CH09	ND	37,04	-	-
	CH10	1,18	8,32	7,05	<1,06
	CH11	9,81	32,37	3,29	<2,27
	CH12	3,65	ND	-	-
	CH13	1,65	21,48	13,01	>1,73
	CH14	2,70	12,62	4,67	<1,60
	CH15	29,16	30,40	1,04	<7,15
	CH16	34,6	53,06	1,63	<4,6
	CH17	12,47	18,04	1,44	<5,18
	CH18	0,96	14,03	14,61	>1,94
	CH19	2,01	48,90	24,35	>3,24
	CH20	1,62	56,59	34,93	>4,65
Anfotericina (Controle Positivo)	-	1,0	7,5	7,5	-

^a = IC₅₀ em µg/mL para a forma promastigota da *Leishmania amazonensis*^b = Citotoxicidade por MTT^c = Índice de seletividade calculado por: citotoxicidade/IC₅₀^d = Índice de Seletividade relativo. Relação entre o IS dos compostos e o IS da Anfotericina (padrão)

* Atóxico nas concentrações estudadas

** ND= valores não determinados, pois mesmo tendo os resultados individuais nas concentrações estudadas, não foi possível obter os dados de regressão na curva analítica.

Em alguns compostos não foi possível determinar o valor de IC_{50} , nem da Citotoxicidade, pois mesmo tendo os resultados individuais nas concentrações estudadas, não foi possível obter os dados de regressão na curva analítica.

4.3.1. Relação Estrutura-Atividade (SAR)

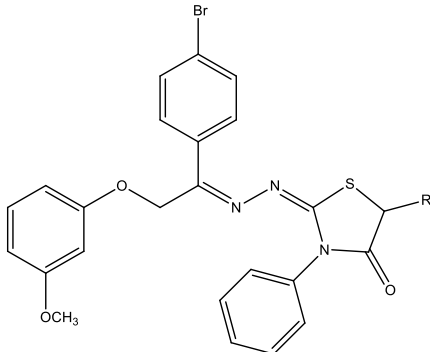
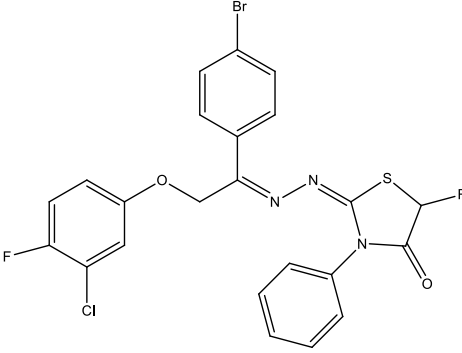
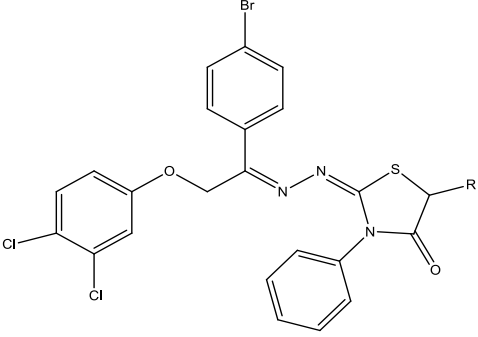
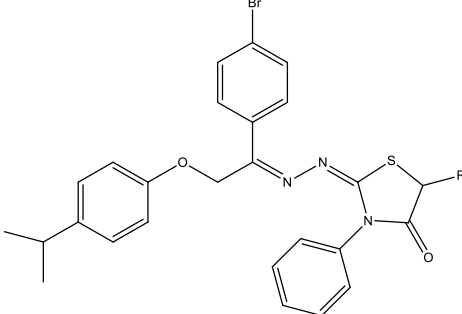
Para a avaliação da SAR, primeiro foi realizada uma busca no site SWISSADME, para a observação dos principais parâmetros das moléculas sintetizadas. Os Parâmetros observados durante a pesquisa no site foram: logP (médio), área de superfície polar, número de ligação rotáveis, número de aceptores de ligação de hidrogênio, número de doadores de ligação de hidrogênio, e refratividade molar. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos na busca.

Dentre os parâmetros observados, nenhum diferencia bastante nas moléculas finais, a ponto de servir como objeto de estudo para a SAR, exceto o logP. Portanto, a nossa avaliação da relação entre a estrutura final e atividade leishmanicida dos compostos será baseada nas mudanças de logP das moléculas, com a variação dos substituintes das mesmas.

A observação desse parâmetro será realizada a partir do coeficiente de lipofilicidade dos substituintes ligado ao anel aromático (π), quando o valor de π dos substituintes é maior que zero, os mesmos aumentam a lipofilicidade do composto final, já quando o valor de π é menor que zero, eles atuam na diminuição da lipofilicidade da molécula final.

Além da lipofilicidade, será avaliada a contribuição do efeito indutivo dos substituintes no anel aromático (σ). Quando o valor de σ é maior que zero, quer dizer que o grupamento é retirador de elétrons. Já quando o substituinte possui valor de σ menor que zero, ele atua como doador de elétrons.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das Tiazolidin-4-onas sintetizadas.

Molécula Base	R	logP ^a	TPSA ^b	NLR ^c	LH-AC ^d	LH-DO ^e	MR ^f
	(CH ₃) ₂	5,60	88,79	8	5	0	145,10
	C ₂ H ₅	5,61	88,79	8	5	0	145,36
	H	4,24	88,79	7	5	0	135,74
	CH ₃	4,98	88,79	7	5	0	145,05
	CH(CH ₃) ₂	5,92	88,79	7	5	0	150,16
	(CH ₃) ₂	6,38	79,56	6	5	0	143,87
	C ₂ H ₅	6,43	79,56	7	5	0	143,83
	H	5,82	79,56	6	5	0	134,22
	CH ₃	6,03	79,56	6	5	0	139,03
	CH(CH ₃) ₂	6,73	79,56	7	5	0	148,64
	(CH ₃) ₂	6,58	79,56	6	4	0	148,92
	C ₂ H ₅	6,65	79,56	7	4	0	148,19
	H	6,09	79,56	6	4	0	139,17
	CH ₃	6,28	79,56	6	4	0	144,08
	CH(CH ₃) ₂	6,92	79,56	7	4	0	153,69
	(CH ₃) ₂	6,53	79,56	7	4	0	153,48
	C ₂ H ₅	6,54	79,56	8	4	0	153,49
	H	6,19	79,56	7	4	0	143,83
	CH ₃	6,32	79,56	7	4	0	148,64
	CH(CH ₃) ₂	6,77	79,56	8	4	0	158,25

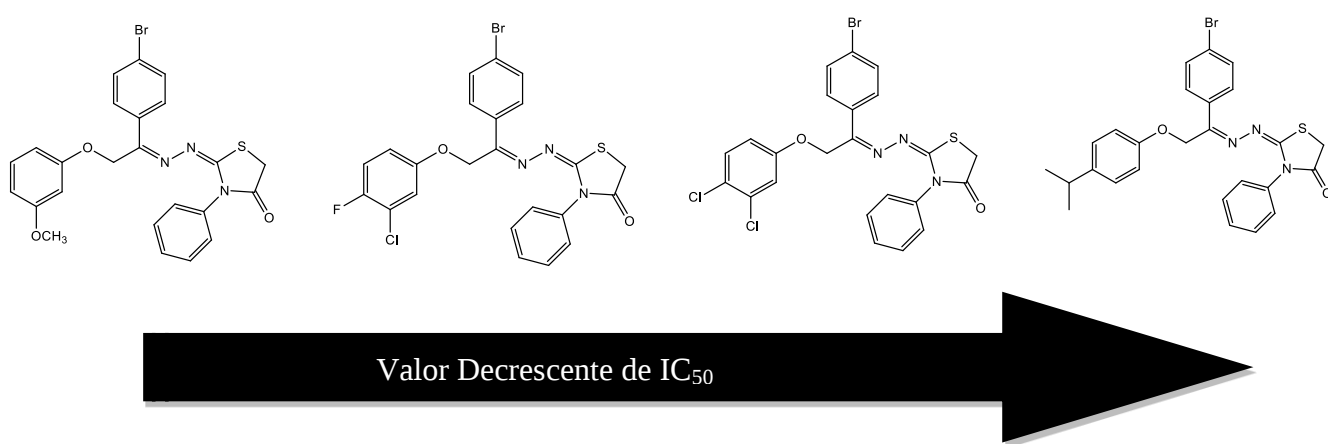
^a = Valor médio do logP^b = Área de superfície polar em Å^c = Número de ligações rotáveis^d = Número de átomos doador de ligação de hidrogênio^e = Número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio^f = Refratividade molar

Para facilitar a visualização, a avaliação da SAR será dividida em casos.

Caso 1- Anel tiazolidínico sem substituintes: Neste caso iremos avaliar a influência dos substituintes no grupo fenólico na ausência das substituições alquílicas no anel tiazolidínico.

A Figura 18 apresenta, de forma resumida, as características das moléculas sem substituintes no anel tiazolidínico e os dados de IC_{50} e índice de seletividade para as mesmas.

Figura 18. Características químicas e valores de IC_{50} das moléculas sem substituição no anel da tiazolidin-4-ona.



CH03	CH08	CH13	CH18
$\sigma < 0$ e $\pi < 0$	$\sigma > 0$ e $\pi > 0$	$\sigma > 0$ e $\pi > 0$	$\sigma < 0$ e $\pi > 0$
LogP = 4,98	LogP = 5,82	LogP = 6,09	LogP = 5,93
IC_{50} = 8,68	IC_{50} = 5,32	IC_{50} = 1,65	IC_{50} = 0,96
IS = 2,44	IS = 2,60	IS = 13,01	IS = 14,61

Observa-se que, quando há um aumento da lipofilicidade, há uma melhora na atividade biológica. No caso do efeito indutivo não nota-se alterações coerentes com os valores de IC_{50} , como por exemplo, a molécula CH03 e CH18 ambas possuem $\sigma < 0$, mas valores de atividades bem diferentes. Nesse contexto, pode-se concluir que a atividade leishmanicida depende principalmente do parâmetro lipofílico.

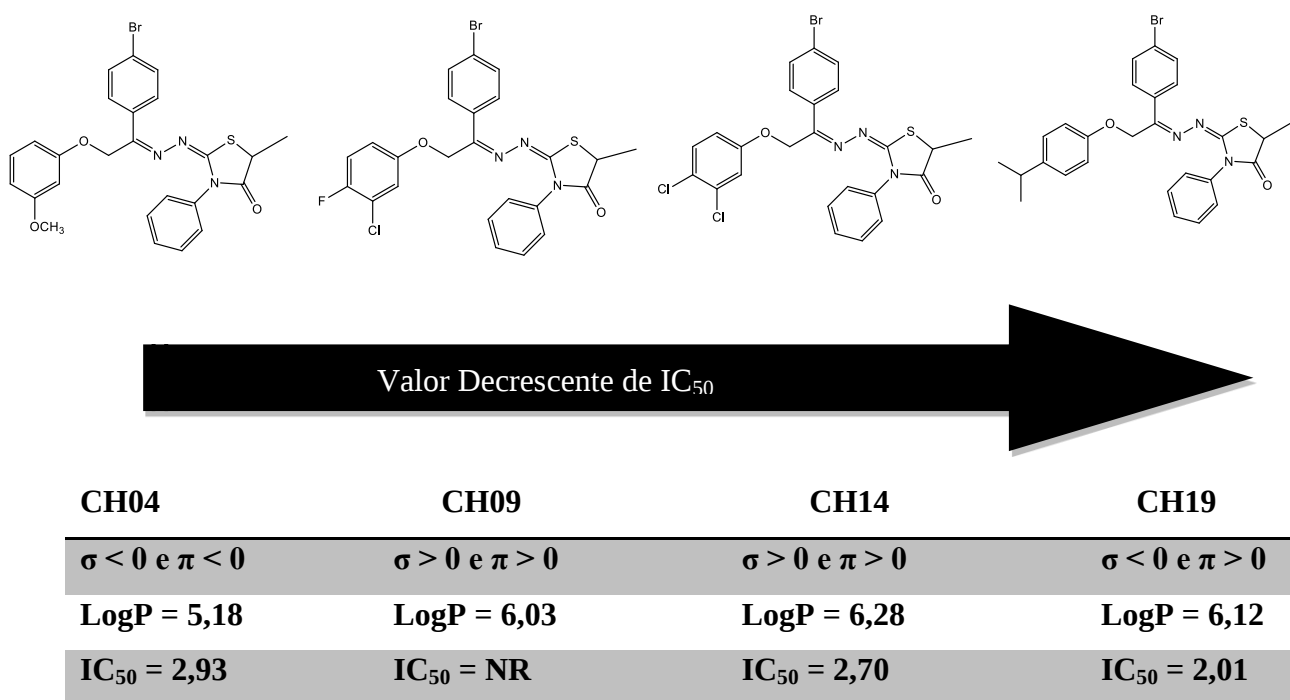
Dentre as moléculas cujos substituintes aumentam a lipofilicidade, as que possuem átomos de halogênio possuem menor atividade, o que pode ser ocasionado pelo impedimento da passagem para o interior da membrana que normalmente deve ocorrer para que a molécula atue corretamente.

Outra proposição que pode ser feita é que o grupamento isopropil no fenol (como na molécula CH18) pode ser um importante ponto de interação com o alvo molecular. Isso pode ser concluído porque, em comparação do CH18 com a molécula CH13, há uma diminuição da lipofilicidade, e sendo assim, esperaríamos uma diminuição da atividade, que não acontece, pois tal fato pode ser compensado pela afinidade da porção isopropil com o possível alvo.

Caso 2- Grupo metílico substituindo no anel tiazolidínico: Neste segundo caso poderemos avaliar a influência dos substituintes no grupo fenólico na presença da substituição de um grupo metil no anel tiazolidínico.

A Figura 19 apresenta, de forma resumida as características das moléculas com o (-CH₃) substituinte no anel tiazolidínico e os dados de IC₅₀ e índice de seletividade para as mesmas.

Figura 19. Características químicas e valores de IC₅₀ das moléculas com substituição metílica no anel da tiazolidin-4-ona.



Observa-se novamente que, de forma geral, quando há um aumento da lipofilicidade das moléculas pela inserção dos grupamentos, há uma melhora na atividade biológica.

Pode-se notar que há um aumento médio no valor da lipofilicidade desse grupo de compostos, o que reflete negativamente nos valores de IC₅₀, principalmente nas atividades compostos CH14 e CH19, que diminuíram com relação ao anel não substituído. Uma das explicações plausíveis é que ao aumentar um pouco mais a lipofilicidade (pela inserção de um

grupamento metila ao invés do hidrogênio), as moléculas passem a interagir mais com a membrana celular e então menos moléculas conseguem atingir o alvo, que normalmente é intracelular.

O grupamento isopropil no fenol (molécula CH19), assim como no caso 1, melhora atividade Leishmanicida, mesmo com o pequeno decréscimo do valor de logP, o que mais uma vez corrobora a importância desse grupo químico para a atividade biológica da molécula.

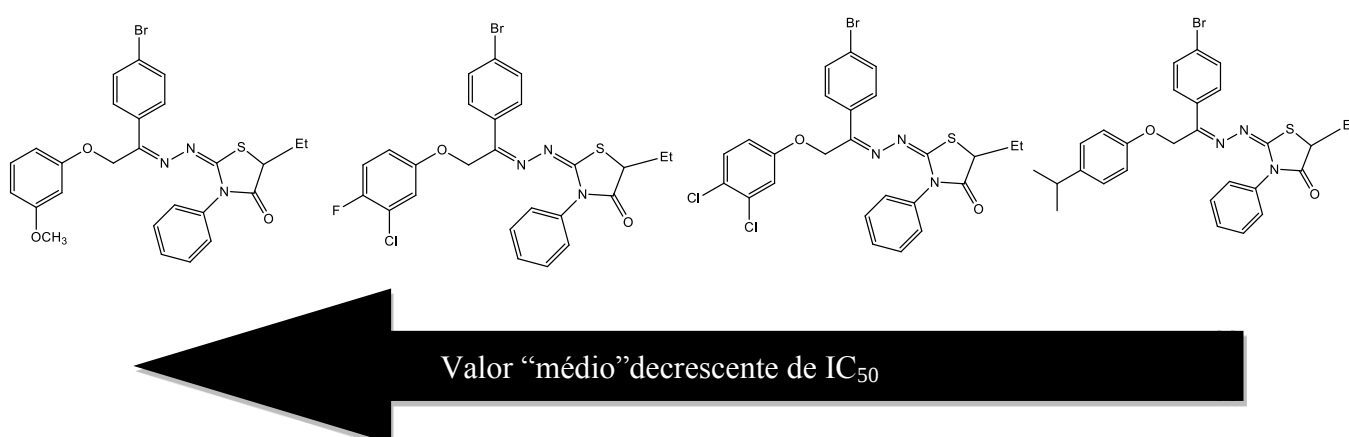
Caso 3- Grupo etílico substituindo no anel tiazolidínico: Neste caso, iremos avaliar a influência dos substituintes no grupo fenólico, na presença da substituição de um grupo etil no anel tiazolidínico.

A Figura 20 apresenta, de forma resumida, as características das moléculas com o (-CH₂CH₃) substituinte no anel tiazolidínico e os dados de IC₅₀ e índice de seletividade para as mesmas.

Observa-se nesses casos que, de forma geral, há um processo inverso ao observado nos casos 1 e 2, ou seja, o aumento da lipofilicidade com a inserção de grupos $\pi > 0$, tende a diminuir o valor do IC₅₀, com exceção do grupo etil, no composto CH12.

Continua-se ainda a ter a melhor atividade biológica a molécula que tem maior logP, porém como o grupo etil tem um maior coeficiente de lipofilicidade (que aumentou o logP em média de 8-10%), o valor de IC₅₀ diminuiu em comparação com as moléculas anteriores.

Figura 20. Características químicas e valores de IC₅₀ das moléculas com substituição etílica no anel da tiazolidin-4-ona.



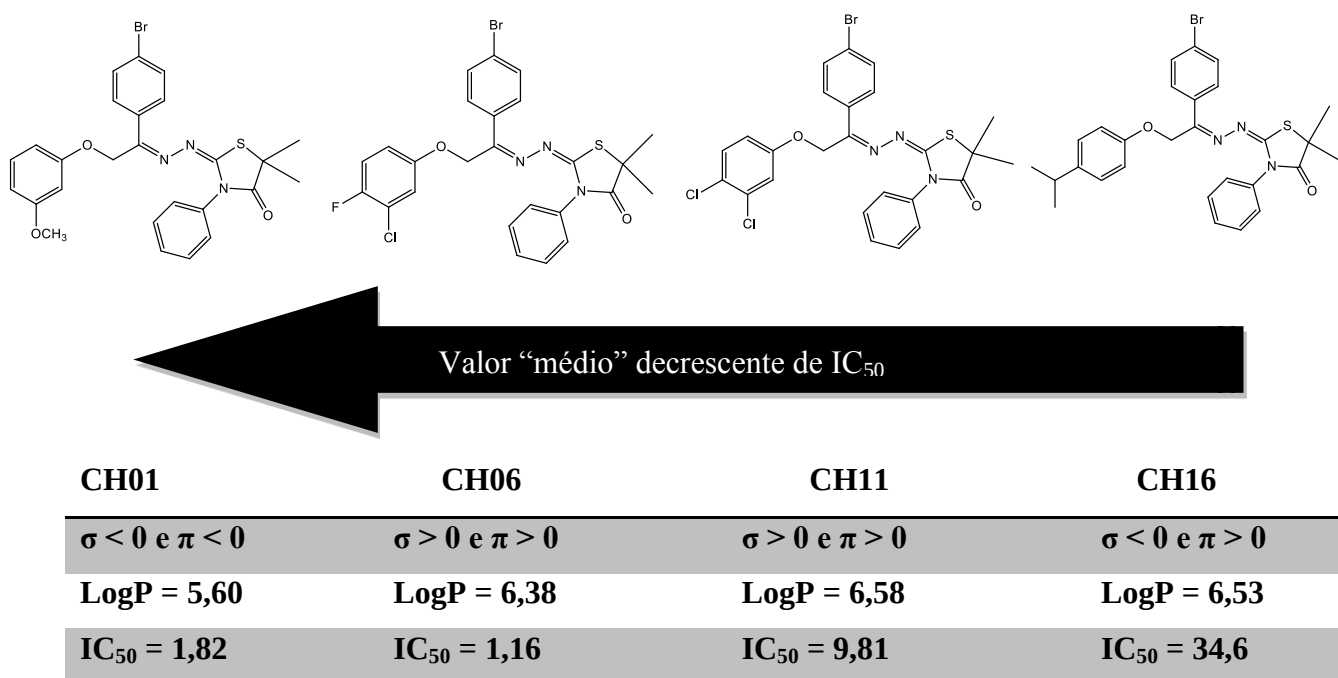
CH02	CH07	CH12	CH17
$\sigma < 0$ e $\pi < 0$	$\sigma > 0$ e $\pi > 0$	$\sigma > 0$ e $\pi > 0$	$\sigma < 0$ e $\pi > 0$
LogP = 5,61	LogP = 6,43	LogP = 6,65	LogP = 6,54
IC ₅₀ = 8,66	IC ₅₀ = 8,19	IC ₅₀ = 3,65	IC ₅₀ = 12,47

O fato do grupo isopropil na molécula CH17 ter diminuído a atividade pode ser explicado por algum tipo de impedimento estérico, visto que mesmo com o aumento do logP não houve aumento no potencial leishmanicida. O grupo etil então, por ocupar um volume maior do que o etil, e possibilitar a maior possibilidade de estados rotacionais, traria um aumento de volume na molécula, prejudicando sua conexão com o alvo biológico.

Caso 4- Grupo di-metílico substituindo no anel tiazolidínico: Nesse caso, iremos avaliar a influência dos substituintes no grupo fenólico, na presença da substituição de um grupo di-metil no anel tiazolidínico.

A Figura 21 apresenta, de forma resumida as características das moléculas como o $-(CH_3)_2$ substituinte no anel tiazolidínico e os dados de IC_{50} e índice de seletividade para as mesmas.

Figura 21. Características químicas e valores de IC_{50} das moléculas com substituição di-metílica no anel da tiazolidin-4-ona.



Observa-se novamente que, de forma geral, quando o grupo substituinte da tiazolinona tem um caráter lipofílico maior que o hidrogênio ou metil, há uma diminuição das atividades dos compostos que possuem no anel fenólico também maiores valores de π . Ou seja, pode-se

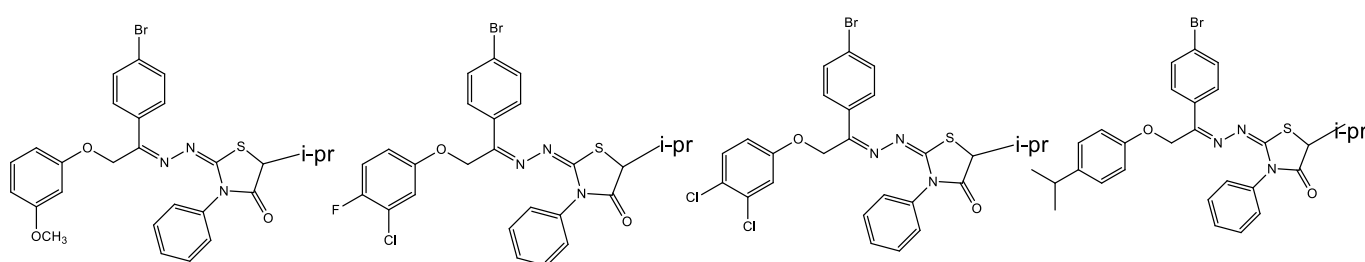
inferir que os grupos com valor de π menores (ligados ao grupo fenol), contribuem de forma a “balancear” o aumento da lipofilicidade do anel tiazolidínico.

Observa-se também que, em comparação com o caso 3, os valores de log de P são muito similares, porém o valor de IC_{50} é melhorado nesses grupos de moléculas é, em alguns casos menor.

Caso 5- Grupo Isopropil substituindo no anel tiazolidínico: Nesse caso, iremos avaliar a influência dos substituintes no grupo fenólico, na presença da substituição de um grupo Isopropil no anel tiazolidínico.

A Figura 22 apresenta, de forma resumida as características das moléculas como o (-CH(CH₃)₂) substituinte no anel tiazolidínico e os dados de IC_{50} e índice de seletividade para as mesmas.

Figura 22. Características químicas e valores de IC_{50} das moléculas com substituição isopropílica no anel da tiazolidin-4-ona.



CH05	CH10	CH15	CH20
$\sigma < 0$ e $\pi < 0$	$\sigma > 0$ e $\pi > 0$	$\sigma > 0$ e $\pi > 0$	$\sigma < 0$ e $\pi > 0$
LogP = 5,92	LogP = 6,73	LogP = 6,92	LogP = 6,77
IC_{50} = 5,75	IC_{50} = 1,18	IC_{50} = 29,19	IC_{50} = 1,62

Nesse último caso nota-se um aumento de todos os valores de logP em comparação com o caso 4, haja vista o maior caráter lipofílico do grupo isopropílico (i-Pr) em comparação com o grupo di-metilico.

Pode-se notar que, os grupos químicos substituintes que possuem $\pi < 0$, auxiliam na atividade geral da molécula, pois balanceam o caráter extremamente lipofílico do (-i-pr), exceto no caso do CH20, que possui um valor de IC_{50} igual a 1,62. Mais uma vez, o fato de apresentar o grupamento isopropil traz benefícios para a molécula, mesmo o excesso do caráter hidrofóbico. O real motivo dessas atividades (incluindo a função do grupo i-Pr) será estudado em breve por *docking* molecular.

5 Capítulo 3: Avaliação da Atividade Larvícida das TIAZOLIDIN-4-ONAS

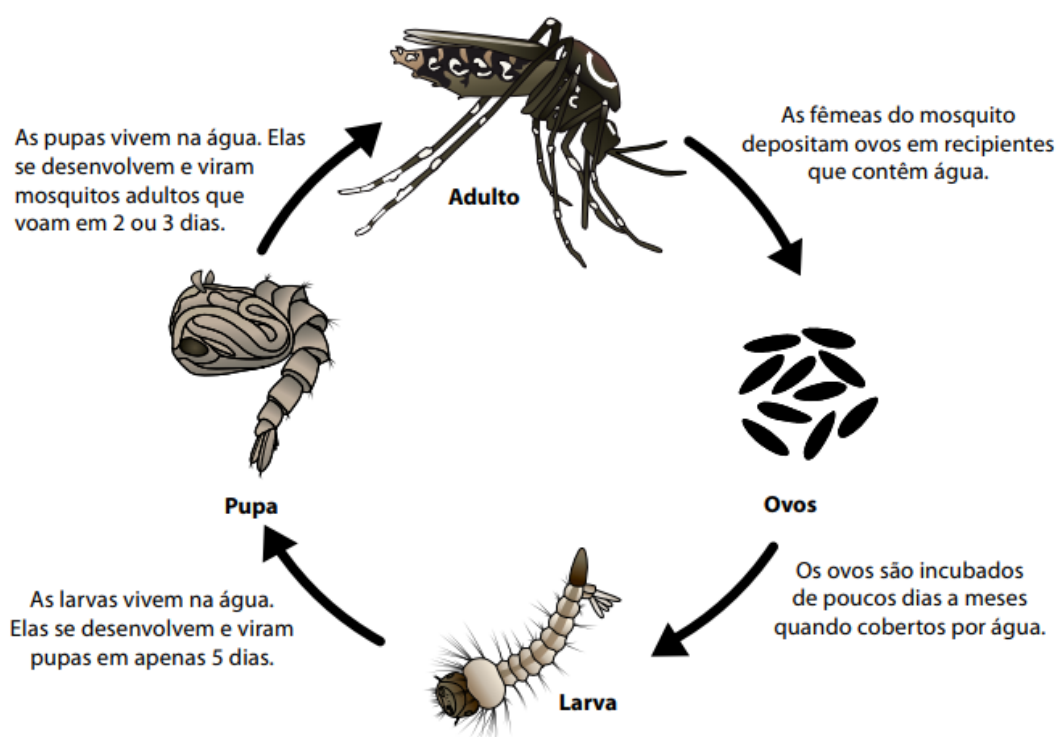
5.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O *Aedes aegypti* se tornou o foco das atenções da população, principalmente pela proliferação de doenças associadas a esse inseto. É um mosquito de hábitos diurnos e noturnos, tem menos de 1 cm de tamanho e uma de suas principais características é a coloração preta com a presença de listras brancas nas patas (NATAL, 2002).

O ciclo de vida do *A. aegypti* conta, basicamente, com 4 fases: ovos, larva, pupa e fase adulta (mosquito), como ilustrado na Figura 23.

Figura 23. Ciclo de vida do *A. aegypti*.

Fonte: https://portugues.cdc.gov/img/cdc/PT_47941.pdf



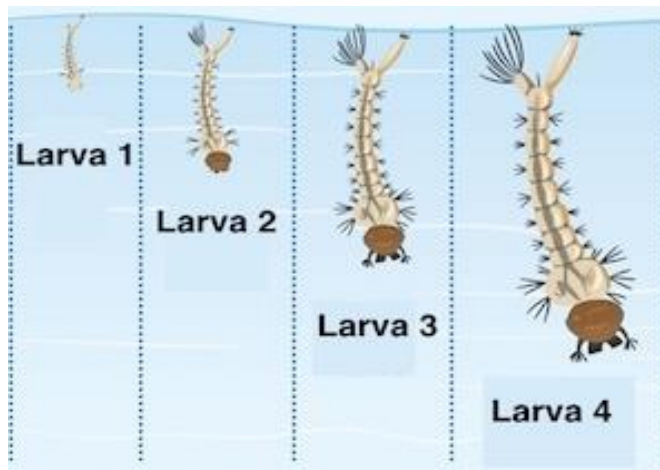
Normalmente, os ovos são depositados pelas fêmeas em locais com água parada, e, durante o período de acasalamento e postura é necessário para a fêmea a hemofagia para a manutenção e crescimento dos ovos, fato esse que acarreta na transmissão das doenças associadas ao mosquito (SOUSA, 2013).

Após a eclosão dos ovos o *A. aegypti* atinge a sua fase larval, que é bastante móvel em meio aquoso, é o período destinado principalmente à alimentação e consequente aumento de tamanho. e apresenta 4 estágios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4) onde há uma variação de tamanho e forma das larvas, conforme ilustrado na Figura 24. Após cerca de 5 dias (em

condições normais) nessa fase, a larva no estágio L4 passa para a fase de pupa (MAFIA, 2015).

Figura 24. Estágios larvais do *A. aegypti* (L1, L2, L3 e L4).

Fonte: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/> (Adaptado)



A pupa, que tem uma forma de vírgula, é um dos estágios mais curtos de todos, de forma geral, não há alimentação, e ela se mantém quase todo o tempo na superfície, já para que haja a formação do inseto e o mesmo saia para o ambiente externo. Essa é a principal fase de transição meio aquático-meio atmosférico (MAFIA, 2015).

A última transformação de fase resulta na formação do mosquito, já na fase conhecida como adulta que dura cerca de 30 dias. Essa é a fase reprodutora, onde há a proliferação da espécie. As fêmeas se alimentam, de forma geral, de sangue de animais vertebrados, mas apresenta certa preferência pelo sangue humano (GARCIA NETO, 2011).

A necessidade da hemofagia, traz como consequência a proliferação de algumas doenças já conhecidas e associadas ao *A. aegypti*: febre amarela, dengue, zika e chikungunya (MOREIRA et al., 2016).

Para se observar a notoriedade dessas doenças atualmente, segundo o ministério da saúde, em 2016 foram 1.500.535 casos notificados de dengue clássica no Brasil, levando a 176 óbitos (BRASIL, 2017a).

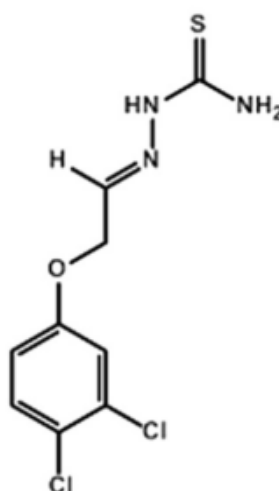
Com relação à febre amarela, de dezembro de 2016 a maio de 2017, 393 municípios notificaram casos, sendo 729 casos confirmados (BRASIL, 2017)

Atualmente não há nenhum tratamento específico para essas doenças, apenas a administração de medicamentos para sanar os problemas por elas causados, como por exemplo, para a redução da febre e dores de cabeça. Assim, o controle do vetor (*A. aegypti*) é

o principal meio de combate (FRANCINE et al., 2016). Esse controle pode se dar a partir da conscientização da população em evitar deixar água parada ou pode advir da busca por novas moléculas com atividade larvicida.

DA SILVA et al. (2015), propuseram a síntese de uma série de tiossemicarbazonas, compostos bioisósteros das Tiazolidin-4-onas, e avaliaram a sua capacidade larvicida. Um dos compostos sintetizados apresentou LC₅₀ (concentração que levou à morte 50% das larvas) de 5,8 ppm (composto ilustrado na Figura 25), o que demonstra ser um resultado promissor.

Figura 25. Estrutura da tiossemicarbazona que apresentou melhor atividade larvicida, segundo DA SILVA et al. (2015)



Nesse contexto, o objetivo desse capítulo é avaliar a capacidade larvicida das 20 Tiazolidin-4-onas sintetizadas no trabalho.

5.2 METODOLOGIA

Os testes de atividade larvícida foram desenvolvidos no insetário do Departamento de Química Fundamental da UFPE, sob a coordenação da Professora Dra. Daniela Navarro.

Inicialmente, pesou-se 0,0050g de cada composto final e intermediários 2 e com essa massa preparou-se uma solução aquosa (solução-mãe) com volume total de 50 mL, perfazendo assim uma concentração do composto igual a 100mg/L. Antes da mistura do composto com água, os mesmos foram dissolvidos em 2mL de DMSO ou Tween80, para então ser completado o volume com a fase aquosa. Esse procedimento foi necessário porque, de forma geral, as moléculas são bastante insolúveis em meio aquoso.

A partir da solução-mãe, para cada composto testado foram preparadas 3 novas soluções e colocados em copos plásticos pequenos (capacidade 80mL). Cada copo continha um total de 20 larvas do *Aedes aegypti* no estágio L4, previamente separada das larvas nos demais estágios de desenvolvimento.

No primeiro copo descartável, foram adicionados 2 mL da solução-mãe e 18 mL de água destilada, atingindo uma concentração do composto igual a 10 mg/L. No segundo copo, foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de solução-mãe, perfazendo então uma concentração de 50mg/L. E por fim, no copo número três, foram adicionados 20mL apenas da solução-mãe (concentração de 100 mg/mL).

Para cada dia de análises, foram feitos separadamente dois brancos, ou seja, nos copos descartáveis havia apenas os solventes utilizados (Tween80 ou DMSO e água) com as 20 larvas no estágio L4.

A partir da inserção das soluções nos copos com as larvas, foram observadas as mortalidades das mesmas nos tempos de 24 e 48h.

5.3 RESULTADOS

Nenhum dos compostos apresentou atividade larvícida, ou seja, no intervalo de 48h de exposição das Larvas do *A. aegypti* no estágio L4 aos compostos não foi observada nenhuma mortalidade.

A tentativa de encontrar a atividade larvícida das Tiazolidin-4-onas foi principalmente norteadada pelo trabalho de DA SILVA et al., (2015), que apresentou a atividade larvícida de Tiossemicarbazonas, moléculas bioisósteras das tiazolidin-4-onas. É citada nesse trabalho algumas características moleculares que torna os compostos potencialmente larvicidas, dentre

elas pode-se citar a presença de cabeças polares, certa hidrofobicidade, e um grupo espaçador ($\text{O-CH}_2\text{-C=}$), características essas encontradas nas moléculas sintetizadas nesse trabalho.

Segundo os autores, o principal mecanismo de ação das moléculas sintetizadas é a partir da inibição da proteína carreadora de esterol 2 (AeSCP-2), uma proteína essencial para o *A. aegypti*, visto que para a sua síntese de esteroides ele se utiliza de colesterol obtido pela alimentação, pois não pode produzi-lo. Nesse contexto, uma molécula que venha a inibir a AeSCP-2 tende a causar a mortalidade do inseto. Os estudos de docking realizado no trabalho, demonstraram uma grande afinidade entre as moléculas e a AeSCP-2.

Provavelmente a ausência de atividade larvicida das Tiazolidin-4-onas sintetizadas, se deve ao tamanho das moléculas em comparação com as moléculas sintetizadas no trabalho supracitado. Mesmo apresentando grupos funcionais similares, as moléculas propostas nesse trabalho apresenta um tamanho muito grande, o que pode dificultar a entrada na AeSCP-2, ou até mesmo na membrana celular do *A. aegypti*, impossibilitando assim sua ação.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C , e Espectrometria de massas de alta resolução, pode-se afirmar que as 20 Tiazolidin-4-onas foram efetivamente formadas a partir do processo reacional proposto no trabalho.

Todos os compostos tiveram testada a sua atividade larvícida e Leishmanicida, bem como a Citotoxicidade.

Dentre as moléculas testadas para atividade leishmanicida, sete apresentaram índice de seletividade maior do que o composto padrão (anfotericina) e a melhor atividade Leishmanicida foi a da molécula CH18, com IC₅₀ igual a 0,96 $\mu\text{g/mL}$. Já a molécula com melhor índice de seletividade foi a CH20, com valor de IS igual a 34,93, cerca de cinco vezes maior que a seletividade da Anfotericina.

De forma geral, a maioria as moléculas sintetizadas apresentaram valores de citotoxicidade menores que a Anfotericina, o que é uma vantagem principalmente com relação aos efeitos colaterais a partir da administração das moléculas como medicamento.

As Tiazolidin-4-onas não apresentaram atividade larvícida, provavelmente devido ao seu elevado tamanho molecular, o que impede a entrada nas células das larvas ou o acoplamento e consequente inibição das proteínas.

REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, K. R. A. et al. Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. **Bioorganic Chemistry**, v. 64, p. 1–12, 2016.

ALIANCA, A. S. DOS S. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. January, p. 1–10, 2017.

ASFARAM, S. et al. Asymptomatic human blood donors carriers of *Leishmania infantum* : potential reservoirs for visceral leishmaniasis in northwestern Iran. **Transfusion and Apheresis Science**, 2017.

BARREIRO, E. J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 4–9, 2001.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.]. v. 1^a edição

BRASIL. Incidência de Dengue . Brasil , Grandes Regiões e Unidades Federadas , 1990 a 2016. v. 2016, p. 2012–2013, 2017a.

BRASIL. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE FEBRE AMARELA. 2017b.

BRASIL, M. DE S. DO. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [s.l: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. **Sinan/SVS/MS**, p. 2015, 2015.

DA SILVA, A. C. et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 57–65, 2017.

DA SILVA, J. B. P. et al. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162–175, 2015.

DE OLIVEIRA FILHO, G. B. et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 23, p. 7478–7486, 2015.

DESAI, N. C. et al. A new synthetic approach and in vitro antimicrobial evaluation of novel imidazole incorporated 4-thiazolidinone motifs. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S589–S599, 2017.

DUTRA REGO, F. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. **Fundação Oswaldo Cruz Centro**, v. 22, p. 1–151, 2013.

FRANCINE, T. N. et al. Larvicidal activities of hydro-ethanolic extracts of three Cameroonian medicinal plants against *Aedes albopictus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 931–936, 2016.

GARCIA NETO, L. J. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ EFEITO RESIDUAL DO Diflubenzuron SOBRE LARVAS DE *Aedes* LABORATÓRIO FORTALEZA – CEARÁ. 2011.

GILANI, S. J. et al. Benzothiazole incorporated thiazolidin-4-ones and azetidin-2-ones derivatives: Synthesis and in vitro antimicrobial evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1523–S1531, 2016.

HASSAN, A. A. et al. A convenient and efficient synthesis of thiazolidin-4-ones via cyclization of substituted hydrazinecarbothioamides. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 0–5, 2013.

KATRITZKY, A. R. Introduction : Heterocycles. v. 104, n. 5, 2004.

KUMAR, V. et al. Biochemical and inhibition studies of glutamine synthetase from *Leishmania donovani*. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 164–174, 2017.

MAFIA, P. D. E. O. Universidade Federal de Ouro Preto Instituto de Ciências Exatas e Biológicas Departamento de Biodiversidade , Evolução e Meio Ambiente Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais AVIFAUNA EM FRAGMENTOS DE MATA CILIAR E ÁREAS ADJACENTES NO BAIXO RIO GRAN. 2015.

MONTEIRO, L. M. et al. Targeting Leishmania amazonensis amastigotes through macrophage internalisation of a hydroxymethylnitrofurazone nanostructured polymeric system. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 1, p. 88–92, 2017.

MOREIRA, A. S. N. et al. Larvicidal activity of Ramalina usnea lichen against Aedes aegypti. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 4, p. 530–532, 2016.

MOREIRA, D. R. M. et al. Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-Trypanosoma cruzi activity. **ChemMedChem**, v. 9, n. 1, p. 177–188, 2014.

MOREIRA, D. R. M. et al. Structural improvement of new thiazolidinones compounds with antinociceptive activity in experimental chemotherapy-induced painful neuropathy. **Chemical Biology & Drug Design**, n. January, p. 1–11, 2017.

MURUGESAN, V. et al. Rational design and synthesis of novel thiazolidin-4-ones as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3159–70, 2014.

NATAL, D. Bioecologia do Aedes aegypti. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205–207, 2002.

OLIVEIRA, L. A. DE. A Química na medicina : Quimioterapia no tratamento do câncer. [s.d.].

ÖZBILGIN, A. et al. Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania donovani in Turkey. **Acta Tropica**, v. 173, n. May, p. 90–96, 2017.

SAFAEI-GHOMI, J.; NAVVAB, M.; SHAHBAZI-ALAVI, H. One-pot sonochemical synthesis of 1,3-thiazolidin-4-ones using nano-CdZr₄(PO₄)₆ as a robust heterogeneous catalyst. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 102–106, 2016.

SILVA, L. E. DA. Heterociclos Aromáticos Nitrogenados – Síntese e Potencial Quimioterápico. 2006.

SOUSA, N. A. DE. Controle de ovos de *Aedes aegypti* com *Metarhizium anisopliae* IP 46 por diferentes técnicas. p. 49, 2013.

SOUZA AZEREDO BASTOS ORIENTADOR, T.; FONTGALLAND COELHO LINHARES, G. Estudos Introdutórios Sobre Flebotomíneos. 2012.

SUBHEDAR, D. D. et al. Facile synthesis of 1,3-thiazolidin-4-ones as antitubercular agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1704–1708, 2016.

SURYAWANSHI, R. et al. Evaluation of 4-thiazolidinone derivatives as potential reverse transcriptase inhibitors against HIV-1 drug resistant strains. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 211–218, 2017.

SZYCHOWSKI, K. A. et al. Study of novel anticancer 4-thiazolidinone derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 262, p. 46–56, 2017.

ZHANG, Z. et al. An expeditious aqueous Suzuki-Miyaura method for the substituted aryl heterocyclics. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. S65–S68, 2009.