

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



TESE DE DOUTORADO

MIRELLY DIANNE SANTOS DE MIRANDA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVOS
DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS CANDIDATOS À
AGENTES ANTI- INFLAMATÓRIOS**

RECIFE - 2018

MIRELLY DIANNE SANTOS DE MIRANDA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVOS
DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS CANDIDATOS À
AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas na área de concentração Planejamento e Síntese de Fármacos.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves Silva

RECIFE – 2018

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M672o Miranda, Mirelly Dianne Santos de.
Obtenção, caracterização estrutural de novos derivados tiossemicarbazonas candidatos à agentes anti-inflamatórios / Mirelly Dianne Santos de Miranda. – 2018.
96 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Anti-inflamatório. 2. Inflamação. 3. Tiazóis. 4. Testes de toxicidade
5. Tiazolidinas. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-265)

MIRELLY DIANNE SANTOS DE MIRANDA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVOS DERIVADOS
TIOSSEMICARBAZONAS CANDIDATOS À AGENTES ANTI-
INFLAMATÓRIOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas na área de concentração Planejamento e Síntese de Fármacos.

Aprovada em: 22/08/2018.

PRESIDENTE EXAMINADORA INTERNA:

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (UFPE)

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA:

Profa. Dra. Rosali Maria Ferreira da Silva (UFPE)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (UEPB)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO:

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (UFPE)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO:

Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza (UAST/UFRPE)

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho ao meu avô Jahilton Pereira
(in memorian), por sempre acreditar em mim, por me
cobrar e incentivar, por ser minha inspiração. Meu Vô Ito,
muito obrigada! A dor da sua ausência não passará
jamais. Amar-te-ei para sempre.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, amor, ajuda e por me manter firme e, principalmente, motivada.

A minha orientadora **Profa. Dra. Maria do Carmo (Nena)** pela oportunidade a mim concedida, pela paciência, orientação e por todos os ensinamentos que vão além da vida acadêmica. Muito obrigada!

A **Profa. Dra. Teresinha Gonçalves** pela co-orientação, apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A **meu marido** Deivison por todo o amor, compreensão, suporte, incentivo e investimento. Obrigada por acreditar em mim e sempre me encorajar.

A **meus pais** Marta e Sergio, meus irmãos Saulo, Dayane e Natalia, e meus sobrinhos Nathasha, Nicolas, Melody, Sara e Zoey, pelas orações, força e amor tão puro.

A todos os companheiros do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (**LQIT**)-UFPE pelo convívio diário e aprendizado obtido com cada um, especialmente Aryane, Cézar, Edson Rubens, Jamerson, Keriolaine e Pedro pela ajuda imprescindível neste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (**LPFPB**)-UFPE pela ajuda na realização dos ensaios biológicos, em especial Isla Bastos e Tatiane Bezerra.

As **minhas “abusadas”** Íris Trindade e Paula Roberta pelo companheirismo, carinho, brigas, confidências, suporte acadêmico e emocional, pelo convívio dentro e principalmente fora do laboratório. Vocês

fortalecerem em mim, ainda mais, a crença na amizade de verdade. Obrigada meninas!

Ao Prof. Túlio Couto pela ajuda na análise de *docking* realizadas.

Aos amigos que **UFRPE** me proporcionou encontrar: Suelaeny, Ana Amâncio e Sávio (Padrinho), a companhia de vocês tornou os anos na Rural inesquecíveis.

Aos “**coleguinhas**” de profissão e companheiros de labuta, especialmente, Lígia, pelos momentos de descontração que nos é tão necessário em nossa rotina.

Aos **professores** que passaram por minha trajetória desde a graduação até aqui e tanto contribuíram para minha formação profissional, especialmente os professores Elinaldo Alcoforado, Analice Lima, Manoel Taperoá, Mônica Belian, Celso Amorim e Alexandre Goés. Obrigada Doutores!

Aos **queridos funcionários** da secretaria da PPGCF Rilvan, Wery, Julia e especialmente Nerilin pelo suporte dado não só a mim, mas a todos os alunos deste programa, sua competência, carinho e “puções de orelha” lhe tornam alguém tão especial.

Aos funcionários da Central Analítica do DEQ-PE, DQF-PE e CETENE pelas análises espectroscópicas e espectrométricas, em especial **Abene** e **Eliete** (DQF-PE) por sempre me “salvarem”.

Ao CNPq, Facepe e Capes pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu... é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...”

(Ana Carolina Vilela Da Costa)

RESUMO

A inflamação é um processo complexo iniciado por vários fatores como patógenos, danos físicos, autoimunes entre outros. Tem como finalidade proteger o organismo. Embora haja inúmeros fármacos com ação anti-inflamatória, os efeitos adversos associados ao uso destes medicamentos tornam necessária a busca por novas substâncias. Neste estudo, nos propomos a avaliar a ação anti- inflamatória de novos derivados tiazolidínicos. Os compostos foram obtidos segundo rota sintética linear com rendimentos que variaram de 61% a 98%. Suas estruturas foram elucidadas através de espectroscopia de ressonância nuclear e na região do infravermelho além de espectrometria de massa, que apresentaram sinais compatíveis com o das estruturas esperadas. A avaliação da toxicidade aguda dos compostos obtidos revelou não haver efeitos tóxicos severos associados aos derivados tiazolidínicos. Foram realizados testes para a verificação das atividades anti- inflamatória como bolsão de ar subcutâneo; edema de pata induzida por carragenina e permeabilidade vascular induzida por ácido acético. No teste do bolsão de ar, os derivados JF-25 (30 mg/kg e 55,0% de inibição) e JF-38 (30 mg/kg e 54,7% de inibição) apresentaram resultados significativos em relação ao controle negativo. No edema de pata os derivados JF-25 e JF-38 apresentaram atividade significativa ao longo de todo experimento, especialmente nas últimas horas sendo o composto JF-38 o como melhor atividade com 87-100% de inibição da 3h às 5h de experimento. Uma analise em diferentes doses dos compostos JF-25 e 38 mostrou uma dose-dependência quanto à expressão da ação anti-inflamatória, sendo a dose de 60 mg/kg a mais eficiente para o JF-25 e a de 30 mg/kg para o JF-38. Os testes de permeabilidade vascular sugerem que o composto JF-38 tem melhor ação em relação à migração leucocitária. A análise da interação estrutural feita por *docking* demonstrou que a estrutura privilegiada das tiazolidinas favorece a melhores respostas de inibição da COX- 2 especialmente com as porções hidrofóbicas presentes do sitio ativo, com valores de energia de ligação entre -9,08 a -10,82 kcal.mol⁻¹. Diante dos resultados obtidos, os derivados tiazolidínicos demonstram ser uma classe promissora no tratamento de patologias associadas ao processo inflamatório.

Palavras-chave: Anti-inflamatório. Tiazóis. Teste de toxicidade. Tiazolidinas.

ABSTRACT

Inflammation is a complex process due to several factors such as pathogens, physical damage, autoimmune diseases, among others. It has how to protect protect the organism. Although there are numerous anti-inflammatory drugs, opponents are responsible for the search for new substances. This study, we propose an anti-bacterial analysis of new thiazolidine derivatives. The results were based on linear synthetic route with variable yields of 61% to 98%. Their structures were elucidated by nuclear resonance spectroscopy and the infrared region in addition to mass spectrometry, which signals the alert with the expected structures. The toxicity of fatty acids associated with severe toxic effects is associated with thiazolidine derivatives. Tests were carried out to survey anti-inflammatory activities such as subcutaneous study grants; induced paw edema and vascular permeability induced by acetic acid. No defense effect, JF-25 derivatives (30 mg / kg and 55.0% inhibition) and JF-38 (30 mg / kg and 54.7% inhibition). In paw edema the JF-25 and JF-38 derivatives were the long-time of the whole experiment, especially in the last ones with JF-38 being the best activity with 87-100% inhibition from 3h to 5h of experiment. The dose of one of the two compounds analyzed is JF-25 and 38, with a dose of 60 mg / kg more effective for JF-25 and 30 mg / kg for JF-38. Vascular permeability testis can be combined JF-38 have a better action on leukocyte migration. A review of the anchorage structural hardware industry has shown that hydropower concentrations favor the best COX-2 responses especially with the hydrophobic moieties present in the site, with binding energy values between -9.08 to -10.8 kcal .mol-1. In view of the results obtained, thiazolidine derivatives have been shown to be a promising class in the treatment of pathologies process.

Keywords: Anti-inflammatory. Thiазoles. Toxicity tests.Thiazolidines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades físico-químicas e rendimentos para tiossemicarbazonas da série N-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida.	52
Tabela 2 –	Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os derivados da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.	54
Tabela 3 –	Principais deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados nos espectros de RMN ¹ H para tiossemicarbazonas da série N-(4-substituído-fenil)-hidrazina-carbotiamida.	56
Tabela 4 –	Propriedades físico-químicas e rendimentos para os derivados da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.	58
Tabela 5 –	Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os derivados da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5ilideno) acetato.	61
Tabela 6 –	Principais deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados nos espectros de RMN ¹ H para (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato substituídos	63
Tabela 7 –	Valores calculados e encontrados do íon molecular (m/z) dos derivados ésteres 4-tiazolidinas da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrazone)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.	68
Tabela 8 –	Efeito dos compostos (E)-etyl-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrazone)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato sobre parâmetros fisiológicos e índice de órgãos.	70
Tabela 9 –	Efeito dos compostos (E)-etyl-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrazone)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato sobre parâmetros hematológicos	71
Tabela 10	Efeito dos compostos (E)-etyl-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrazone)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato sobre parâmetros bioquímicos.	71
Tabela 11	Percentual de inibição do edema de pata dos derivados 4-tiazolidinas da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrazone)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.	77
Tabela 12	Média de crescimento do edema de pata dos derivados 4-tiazolidinas da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrazone)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.	77
Tabela 13	Dados do estudo de docking dos derivados JF-21, JF-25 e JF-38, interações estruturais.	81

LISTA DE ESQUEMAS

- | | | |
|-----------|--|----|
| Esquema 1 | Diagrama de síntese dos derivados tiazolidínicos sintetizados. | 42 |
| Esquema 2 | Mecanismo reacional de formação das tiossemicarbazidas. | 50 |
| Esquema 3 | Mecanismo de obtenção dos precursores dos N-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida substituídos. | 51 |
| Esquema 4 | Mecanismo de obtenção da 4-tiazolidinona por condensação com o dietilacetenocarboxilato. | 58 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo inflamatório 1) fase aguda 2) fase tardia.	21
Figura 2	Via COX/LOX da cascata do ácido araquidônico.	23
Figura 3	Estruturas químicas dos glicocorticoides dexametasona, prednisona e prednisolona, respectivamente.	25
Figura 4	Estruturas químicas de anti-inflamatórios não-esteroidais.	25
Figura 5	Perspectiva estrutural das COX-1 e COX-2.	27
Figura 6	Estruturas químicas dos coxibes: Celecoxibe, rofecoxibe e valdecoxibe.	28
Figura 7	Etapas do processo de planejamento e obtenção de um novo fármaco.	29
Figura 8	Simplificação molecular da catalpol para obtenção de novos derivados antiproliferativos.	30
Figura 9	Híbridos tiofeno-tiossemicarbazonas com atividade antitumoral.	30
Figura 10	Estrutura-base de sistemas de aromáticos presentes nos coxibes.	32
Figura 11	Proposta estrutural de análogos etoricoxibe 4,6-diaril-3-cianopiridin-2-ona.	32
Figura 12	Estrutura atividade do 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-clorofenil)-5-metil-4-tiazolidinona, 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-fluorfenil)-5-metil-4-tiazolidinona e celecoxibe.	33
Figura 13	Estrutura química de derivados heterocíclicos pentagonais.	33
Figura 14	Estrutura base da 4-tioazolidinona.	34
Figura 15	Principais metodologias sintéticas de obtenção de 4-tioazolidinona.	35
Figura 16	a) Atividade antiproliferativas de derivados 4-tizolidinona b) 3-(4-bromofenil)-2-(4-dimetilamino)fenil) tiazolidina-4-ona (4e).	36
Figura 17	Estrutura de hibridação molecular envolvendo núcleos tiazol, tiazolidinona e adamantano antimicrobianos e antifúngicos.	37
Figura 18	Sulfonamidas condensadas a 4-tiazolininonas como açãoantitumoral.	38
Figura 19	Estrutura de 5-aryliden-2-imino-4-tiazolidinas com atividade anti-inflamatória.	39
Figura 20	Estrutura química dos derivados 5-(carbamoiometoxy)benzilideno-2-oxo/tioxo-4-tiazolidinona com ação anti-inflamatória.	40
Figura 21	Estrutura química dos derivados 2-imino-4-tiazolidinona com ação anti-inflamatória.	40
Figura 22	Regiões de vibrações do IV do composto JF-13 com os principais estiramentos dos presentes na tiossemicarbazona N-H, -C=N e o grupamento C=S.	54
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H indicando os principais sinais de	

	deslocamento químico da estrutura do composto JF-13.	55
Figura 24	Ampliação do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-13 evidenciando os hidrogênios do anel aromáticos, azometílico e hidrazínico.	55
Figura 25	Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze do composto JF-13.	56
Figura 26	Espectro de massa do composto JF-13, com picos de M+1 e M+2 em destaque.	57
Figura 27	Bandas vibracionais na região do IV do composto JF-23 indicando os principais estiramentos dos grupos presentes nas tiazolidininas.	61
Figura 28	Espectro de RMN ^1H do composto JF-22 indicando os principais sinais referentes ao grupamento etil na região de carbono sp^3 , simpleto olefínico e função azometílica.	62
Figura 29	Ampliação do espectro de RMN ^1H COSY para o composto JF-22 mostrando as correlações entre hidrogênios.	64
Figura 30	Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze ($\text{RMN } ^{13}\text{C}$) do composto JF-22.	65
Figura 31	Espectro de HSQC e sua ampliação para o composto JF-22 mostrando as correlações carbono-hidrogênio ^1J .	66
Figura 32	Espectro de massa do composto JF-23, com pico do íon molecular em destaque.	68
Figura 33	Inibição do edema de pata dos derivados JF-21 a 25 e JF-36 a 38 na dose de 30 mg/kg.	72
Figura 34	Inibição do edema de pata dos derivados JF-25 e JF-38 nas doses de 15 e 60 mg/kg.	74
Figura 35	Estrutura atividade do 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-clorofenil)-5-metil-4-tiazolidinona, 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-fluorfenil)-5-metil-4-tiazolidinona e celecoxibe.	75
Figura 36	Efeito dos derivados tiazolidínicos sobre a migração leucocitária. Efeito dos compostos tiazolidinicos sobre o aumento da permeabilidade vascular.	78 79
Figura 37	Imagen 2D das interações entre os compostos JF-21, JF-25 e JF-38 com a COX-2.	83
Figura 38	Imagen 3D das interações dos compostos JF-21, JF-25 E JF-38 com a COX-2, mostrando o mapa representativo de interações hidrofóbicas e hidrofílicas.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AINE	Anti-inflamatório não esteroidais.
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidais
ALA	Alanina
ALT	Alanina aminotransferase
ARG	Arginina
AST	Aspartato aminotransferase
CCD	Cromatografia em camada delgada analítica
COX	Cicloxygenase
D	Duplo
Dd	Duplo duplo
DMSO	Dimetilsulfóxido
HETE	Ácidos graxos hidroxílicos
HPETE	Ácidos hidroxiperóxidoeicosatetraenoicos
Hz	Hertz
IL-1β	Interleucina 1-beta
ILE	Isoleucina
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LOX	Lipoxigenase
LEU	Leucina
LTB₄/LTA₄	Leucotrienos

M	Multipletos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MET	Metionina
MS	Espectrometria de massas
NOS	Óxido nítrico sintase
PGG₂	Prostaglandina G
PGH₂	Prostaglandina H
PGI₂	Prostaciclina
PHE	Fenilalanina
PLA₂	Fosfolipase A ₂
Q	Quarteto
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMNH ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	Singuleto
SER	Serina
T	Tripleto
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TSC	Tiossemicarbazonas
TXB₂	Tromboxano
TYR	Tirosina
TDZ	Tiazolidinas
TRP	Triptofano
VAL	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Objetivo geral.....	20
1.2	Objetivos específicos.....	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1	Inflamação.....	21
2.2	Mediadores químicos do processo inflamatório.....	22
2.3	Anti-inflamatórios.....	24
2.4	Cicloxygenase (COX) e os coxibes.....	26
2.5	Química medicinal e o planejamento de fármacos.....	28
2.6	Planejamento de inibidores de COX-2.....	31
2.7	Heterocíclicos pentagonais.....	33
2.8	Tiazolidinonas e sua reatividade.....	34
2.9	Atividades biológicas das tiazolidinona.....	35
2.10	Atividade anti-inflamatória das tiazolidinona.....	38
3	METODOLOGIA.....	42
3.1	Esquema geral de síntese.....	42
3.2	Materiais e métodos.....	42
3.2.1	<i>Equipamentos.....</i>	42
3.2.2	<i>Reagentes e solventes.....</i>	43
3.2.3	<i>Procedimentos sintéticos.....</i>	44
3.2.3.1	<i>Metodologia de obtenção hidrazina carbotiamida substituída</i>	44
3.2.3.2	<i>Metodologia de obtenção das tiossemicarbazonas 4-aryl-substituída.....</i>	44
3.2.3.3	<i>Metodologia de obtenção dos derivados (E)-etil-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilídeno) acetato substituídos.....</i>	44
3.3	Ensaios Biológicos.....	45
3.3.1	<i>Animais.....</i>	45
3.3.2	<i>Ensaios in vivo.....</i>	45

3.3.2.1	<i>Toxicidade aguda em dose única</i>	45
3.3.2.2	<i>Teste de edema de pata induzido por carragenina</i>	46
3.3.2.3	<i>Teste de permeabilidade vascular</i>	47
3.3.2.4	<i>Teste de bolsão de ar</i>	47
3.4	Análise de interação molecular (Docking)	48
3.4.1	<i>Preparação da estrutura do ligante</i>	48
3.4.2	<i>Preparação da estrutura protéica</i>	48
3.4.3	<i>Procedimento de docking</i>	48
3.4.4	<i>Análise estatística</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Parte química	50
4.1.1	<i>Mecanismo reacional e caracterização estrutural dos derivados N-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida substituídos</i>	50
4.1.2	<i>Mecanismo e caracterização estrutural dos derivados (E)-etil-2-((Z)-2-(E)-benzildenohidrazona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato substituídos</i>	57
4.2	Avaliação biológica	69
4.2.1	<i>Toxicidade aguda</i>	69
4.2.2	<i>Edema de pata induzido por carragenina</i>	72
4.2.3	<i>Bolsão de ar</i>	78
4.2.4	<i>Permeabilidade vascular</i>	79
4.3	Análise de docking	80
5	CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS		86

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é um dos mais antigos mecanismos de resposta imunológica do organismo frente uma infecção ou lesão tecidual e caracteriza-se por ser multifatorial. O intuito deste processo é eliminar ou limitar a propagação de um dano e promover o reparo de tecidos lesionados que pode estar envolvido em diversas patologias (COUTINHO *et. al.*, 2010). A resposta inflamatória resulta na produção e liberação de diversos mediadores químicos como as aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico entre outros, responsáveis pelas características da área inflamada. Entretanto nem sempre a resposta inflamatória inicial é eficiente e o processo pode evoluir para um estado de inflamação crônica, sendo necessária a intervenção medicamentosa (ABBAS *et. al.*, 2008; OLIVEIRA *et. al.*, 2017).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido a principal abordagem terapêutica utilizada no tratamento da inflamação. No entanto, os efeitos adversos associados ao uso destes medicamentos, tais como problemas gastrointestinais e cardiovasculares, estimulam a procura por novas moléculas potencialmente ativas que minimizem estes efeitos e sejam eficazes na ação anti-inflamatória (ABDELLATIF *et. al.*, 2015).

Incentivada a trabalhar no desenvolvimento de novos anti-inflamatórios, a comunidade científica vem realizando adequações estruturais em relação à molécula-alvo. Dentre as áreas envolvidas neste desenvolvimento, destaca-se a Química Medicinal. Este ramo da química estuda os parâmetros relacionados à estrutura-atividade dos novos compostos candidatos a fármacos, utilizando-os para o planejamento de novas substâncias biologicamente ativas que visam o combate de uma variedade de doenças que envolvem o processo inflamatório (BARREIRO *et. al.*, 2009; SUNET. *al.*, 2012).

Devido à heterogeneidade das classes terapêuticas, existem muitos compostos com perfil anti-inflamatório, dentre eles, destacam-se os heterocíclicos pentagonais, como os tiazóis. Os derivados do grupo tiazol, especificamente as tiossemicarbazonas e tiazolidinas (TZD) representam uma classe de substâncias sintéticas de grande interesse químico devido a suas

propriedades químicas e atividades biológicas diversas como antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória entre outros (JAIN *et. al.* 2012; KASHUAP *et. al.*, 2012; MANJAL *et al.* 2017).

Sinteticamente, as tiosseemicarbazonas (TSC) destacam-se por sua variabilidade de obtenção, baixo custo de síntese e principalmente sua utilização como intermediários de muitos núcleos importantes (ESPÍNDOLA, *et. al.*, 2015). Entre estes núcleos está o anel 4-tiazolidinona que possuem vários sítios de substituição proporcionando a possibilidade de um grande número de análogos estruturais. Estas modificações estruturais alteram os parâmetros físico-químicos das moléculas como efeitos eletrônicos, biodisponibilidade e interação substrato-receptor, o que interfere diretamente na sua ação farmacológica (LIESEN *et. al.*, 2008; ASATI, *et. al.*, 2014).

As tiazolidinas fazem parte de uma classe de funcionalidades que vem sendo estudadas com afinco por apresentarem propriedades farmacológicas promissoras. Neste contexto podemos ressaltar a importância desta classe de compostos bioativos presentes em uma nova molécula como candidato a protótipo para desenvolvimento de fármacos para o alívio ou tratamento dos sintomas da inflamação. Tendo em vista a necessidade de obtenção de novos compostos que sejam atuantes de maneira seletiva com os alvos biológicos e mais eficientes em sua ação farmacológica, o presente trabalho propõe a síntese de novos derivados tiazóis e a avaliação do potencial anti-inflamatório destes compostos.

1.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar estruturalmente novos derivados (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrona)-3-(4-bromofenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno)acetato substituídos (LqIT/JF), bem como a avaliar o potencial anti-inflamatórios destes compostos.

1.2. Objetivos específicos

- ✚ Sintetizar e determinar as características físico-químicas de novos derivados N-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida substituídos;
- ✚ Sintetizar e determinar as características físico-químicas de novos derivados (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato substituídos;
- ✚ Elucidar estruturalmente os compostos sintetizados através de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN¹H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN¹³C), espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM);
- ✚ Verificar a toxicidade aguda oral em dose única dos compostos sintetizados;
- ✚ Avaliar o potencial anti-inflamatório *in vivo* dos derivados (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato substituídos através do modelo de edema de pata induzido por carragenina, permeabilidade vascular e bolsão de ar;
- ✚ Estudar as interações moleculares através do *docking* dos derivados de melhor ação anti-inflamatória testada junto a COX-2.

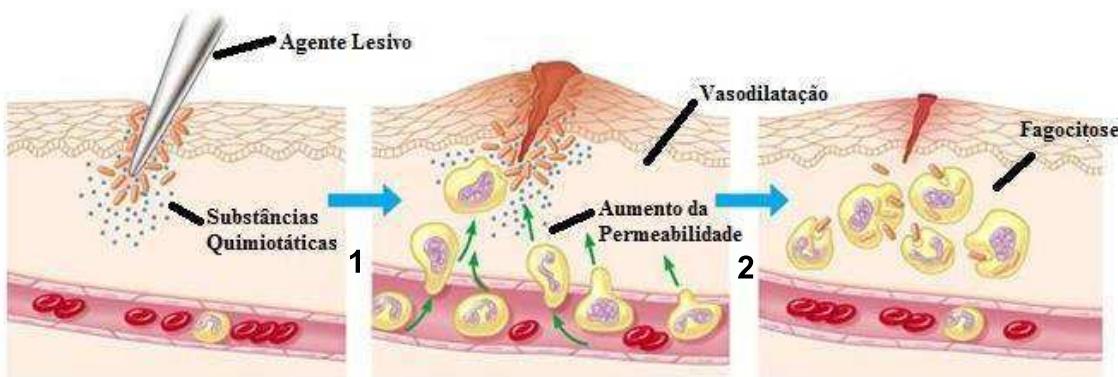
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Inflamação

A inflamação está envolvida na gênese de uma variedade de doenças e caracteriza-se por ser um processo complexo iniciado pelo corpo como resposta a lesão ou infecção, causadas por fatores químicos ou físicos (SANTIN *et. al.*, 2013). O processo inflamatório é conhecido como um dos mais antigos mecanismos de defesa do organismo e possui basicamente cinco sinais clássicos: rubor, calor, edema, dor e perda de função do tecido danificado. (HEIDLAND *et. al.* 2006; SINGH *et. al.*, 2017)

Resumidamente, a resposta inflamatória envolve três fases. A fase aguda, que se caracteriza pela vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular; a fase tardia onde ocorre a migração celular, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias; e a fase crônica, na qual há degeneração tecidual e fibrose, podendo causar dor através da ativação e sensibilização de nociceptores (Figura 1) (LEES *et. al.*, 2004; REVANKAR *et. al.*, 2017).

Figura 1. Processo inflamatório 1) fase aguda e 2) fase tardia.



(Fonte: Adaptada de Jacob, 2017)

No processo inflamatório, células como leucócitos, endoteliais, mastócitos e células do sistema nervoso periférico produzem uma série de substâncias chamadas mediadores químicos tais como, serotonina, histamina, óxido nítrico, citocinas, metabólitos da cascata do ácido araquidônico, entre

outros. Estes mediadores promovem uma alteração no organismo induzindo à expressão genética e síntese proteica em uma variedade de células que promovem a inflamação (BARROS *et. al.*, 2010; SRIVASTAVA *et. al.*, 2016).

2.2 *Mediadores químicos do processo inflamatório*

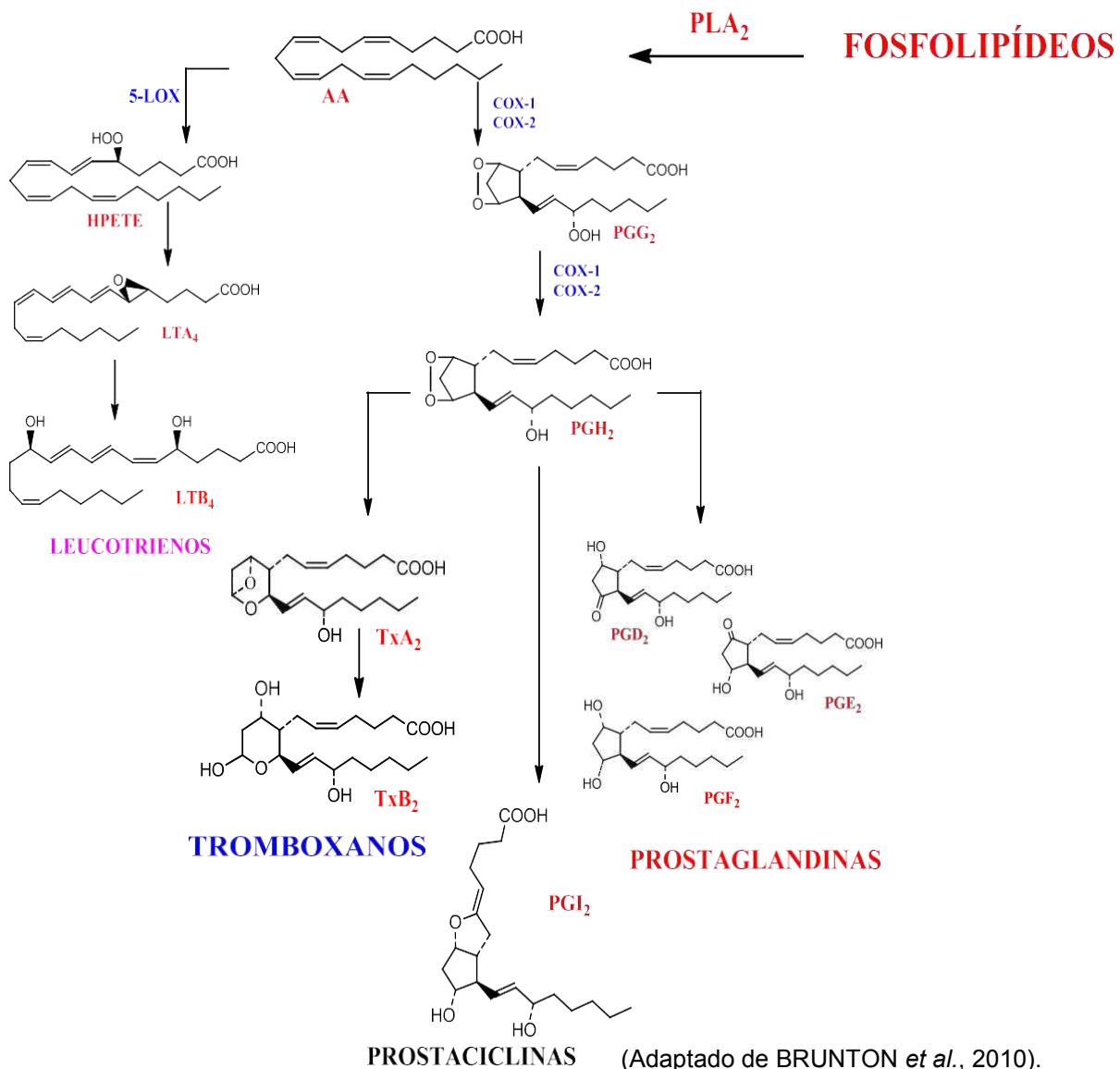
O sistema imune reconhece as agressões que desencadeiam o processo inflamatório por meio de mediadores químicos. Estes mediadores originando-se de células do tecido conjuntivo e do endotélio, leucócitos e plaquetas e ligam-se à receptores celulares, induzindo a síntese e liberação de moléculas de natureza pró-inflamatória e anti-inflamatórias. (MARIOTTO *et. al.*, 2007; MACCARI *et. al.*, 2014). As primeiras substâncias liberadas após um estímulo inflamatório são as aminas vasoativas, histamina e serotonina. Elas promovem alterações vasculares que incluem a vasodilatação e a exsudação plasmática. Em sinergia com estas substâncias, a bradicinina induz a hiperalgesia participando dos processos de nociceção bem como na formação do edema (LAVICH *et. al.*, 2003; ELEFTHERIOU *et. al.*, 2012).

Outro mediador é o óxido nítrico que é obtido a partir da catalise da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima apresenta pelo menos três isoformas: duas constitutivas NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), e um forma induzida (iNOS) liberada por meio de um estímulo como resposta inflamatória (MARIOTTO *et. al.*, 2007). Além deste, as citocinas, modulam a função de muitos tipos de células, que são determinantes para a infiltração celular e para os efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo. O conjunto inicial de reações que caracteriza a fase aguda do processo inflamatório é mediado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido lesado, dentre estas o TNF- α e IL-1 β (OLIVEIRA, 2012; MACCARI *et. al.*, 2014).

Dentre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da inflamação, formação de ácido araquidônico (AA) e seus metabólitos representa um dos mais importantes. Obtido a partir de fosfolipídeos de membranas celulares sob a atuação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), o AA é metabolizado dando origem a mediadores inflamatórios por duas vias: das cicloxygenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (SRIVASTAVA *et. al.*, 2016). A primeira via, ação da COX,

produz os endoperóxidos cílicos conhecidos como prostaglandinas G e H (PGG_2 e PGH_2). Esta por sua vez, sob ação da isomerase e sintases, realizam a transformação da PGH_2 no conjunto de prostanoïdes, composto pelas prostaglandinas (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaciclinas (PGI_2) e tromboxanos (TXA_2 e TXB_2). Na segunda via, das lipoxigenases, o AA é metabolizado em ácidos hidroxiperóxidoeicosatetraenoicos (HPETE) e estes convertidos em seus ácidos graxos hidroxílicos (HETE) levando a formação de leucotrienos (LTA_4 , LTB_4 , etc). (Figura 2) (BRUNTON *et al.*, 2010; SRIVASTAVA *et. al.*, 2016).

Figura 2. Via COX/LOX da cascata do ácido araquidônico. .



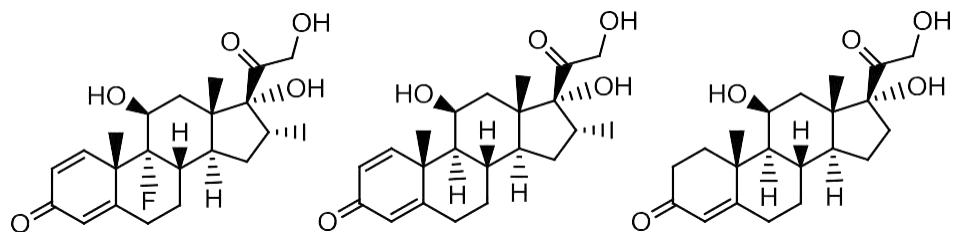
Este conjunto de mediadores, denominados eicosanoides, desempenha importante função na indução e na facilitação de patologias, principalmente as inflamatórias (SRIVASTAVA *et. al.*, 2016). Neste processo, cada um desempenha uma ação específica. As prostaglandinas são responsáveis por estimular os centros hipotalâmicos de termorregulação, vasodilatação e hiperalgesia (dor). O TXA₂ induz a síntese de citocinas inflamatórias como interleucina 1β (IL-1β) e o fator de necrose tumoral (TNF-α) as quais migram e atuam na área lesionada sinalizando a inflamação. Os leucotrienos aumentam a permeabilidade vascular atraindo os leucócitos para o sítio da lesão, favorecendo a formação do edema. A prostaglandina I₂ (prostaciclina) predomina no endotélio vascular e atua causando vasodilatação e inibição da adesão plaquetária (SANTOS, 2013; ALI *et al.*, 2017).

Juntos, estes efeitos dão origem aos sintomas clínicos normalmente presentes em patologias inflamatórias: dor, febre, vermelhidão, inchaço e até perda de função. Não obstante, o processo inflamatório caracteriza-se por ser fisiologicamente benéfico ao organismo. Entretanto, a ocorrência dos eventos associados à resposta inflamatória de forma exasperada resulta em efeitos adversos sendo necessária a intervenção por fármacos anti-inflamatórios.

2.3 *Anti-inflamatórios*

Os primeiros anti-inflamatórios a serem desenvolvidos foram os glicocorticoides, também chamados esteroidais. Estes compostos fazem parte de um grupo de hormônios cujo mecanismo envolve o bloqueio da liberação de prostaglandinas pela inibição atividade da fosfolipase A₂. Entretanto o uso prolongado destes corticoides demonstrou predisposição a infecções por seus efeitos imunossupressores além de aumento da pressão arterial, surgimento de úlceras gástricas entre outras. Exemplos de anti-inflamatórios esteroidais são a dexametasona, prednisolona e prednisona (GUERRA, 2011) (Figura 3).

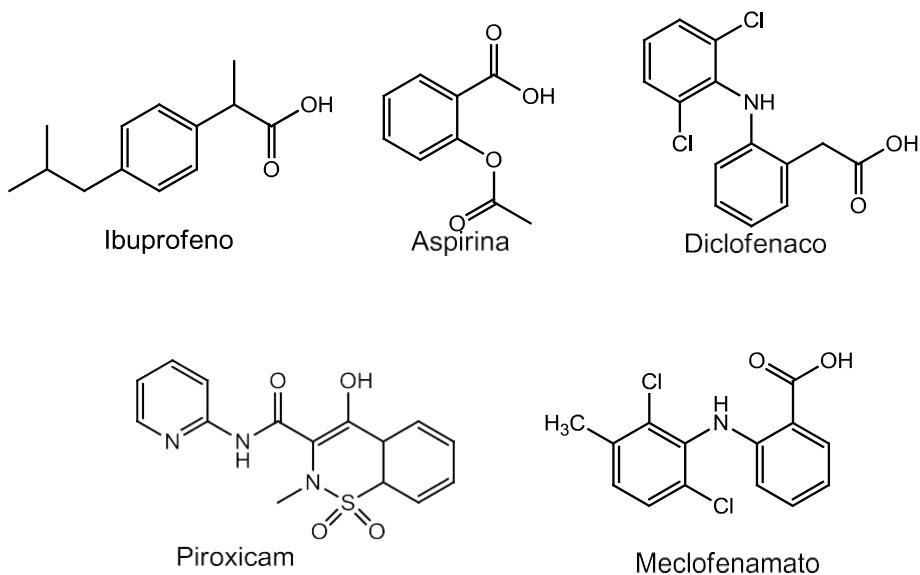
Figura 3. Estruturas químicas dos glicocorticoides dexametasona, predlisona e prednisolona, respectivamente.



(Fonte: o Autor)

Os efeitos indejados associado aos glicorticóides corroborou para o desenvolvimento dos chamados anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's). Os AINE's são um grupo quimicamente heterogêneo de ácidos orgânicos que compartilham certas ações farmacológicas tais como antipirético, analgésico e anti-inflamatório. Este grupo se caracteriza por apresentar uma inibição não seletiva da enzima COX, no qual está incluso os salicilatos (como a aspirina), derivados indolacéticos (ex. diclofenaco), derivados do ácido propiônico (ex. ibuprofeno), fenamatos (ex. meclofenamato), oxicans (ex. piroxicam) (Figura 4)(RANG *et. al.*, 2007; PALASKA *et. al.*, 2012).

Figura 4. Estruturas químicas de anti-inflamatórios não-esteroidais. (Fonte: O Autor)



(Fonte: O Autor)

Estudos apontam que os AINE's apresentam efeitos adversos tais como toxicidade gastrointestinal, renal, e efeitos no sistema nervoso central (PINHEIRO & WANNMACHER, 2010; SILVA, MENDONÇA & PARTATA, 2014). Observou-se que alguns destes efeitos, como a toxicidade gastrointestinal, estão associados à inibição das prostaglandinas que promovendo a diminuição na produção da PGE pela mucosa gastrointestinal ocasionando um processo de ulceração. Entretanto, com a descoberta da COX-2 e de que é expressa nos locais de inflamação, levantou-se a possibilidade de inibir seletivamente esta isoforma, explorando, então, os efeitos benéficos dos AINE's sem apresentarem seus efeitos colaterais (ALSAYED et. al., 2017; CHAABANet. al., 2018).

2.4 Cicloxygenase (COX) e os coxibes

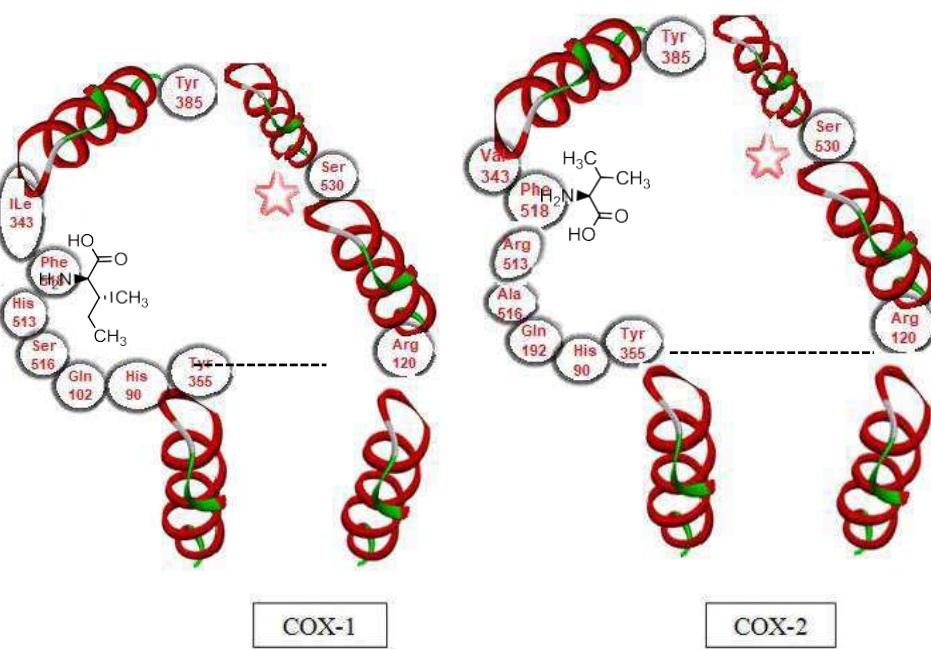
Inúmeros estudos descrevem que os efeitos indesejáveis dos AINE's são oriundos da inibição não seletiva da cicloxygenase. A COX possui três isoformas distintas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é expressa constitutivamente pela maioria das células, e leva a formação das PG's que desempenha como principais funções a citoproteção do trato gastrointestinal, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. A utilização de fármacos inibidores desta isoforma é considerada como grande responsável pelos efeitos adversos que ocorrem no trato digestivo e rins (UNGPRASERT et. al., 2015).

A COX-2 é hiper-regulada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, TNF- α , e outros mediadores nos sítios de inflamação. Entre eles estão os fatores de crescimento e endotoxinas, sendo a principal fonte dos prostanoides formados nos processos inflamatórios, algésico e térmicos. Sua expressão ocorre nas células migratórias e tecidos lesados após o estímulo inflamatório, por isso é chamada de enzima indutiva. (MALTA et. al., 2014).

A COX-3 é uma variante do gene da COX-1, através da ocorrência de um *splicing* alternativo. Sabe-se que esta isoforma é mais abundante no coração e no córtex cerebral, entretanto avanços nos estudos desta isoforma vêm sendo realizados a fim de se obter maiores informações a respeito de sua função e modulação vêm sendo realizados (COUTINHO et. al., 2010; ALI et al., 2017).

As principais isoformas da COX diferem-se quanto à sua sensibilidade à inibição através de alguns agentes anti-inflamatórios. Estruturalmente estas enzimas diferenciam-se apenas em sua composição no sítio ativo, mais especificamente onde ocorre a interação com o ácido araquidônico e os AINE's. Os diferentes resíduos de aminoácidos nas estruturas da COX 1 e 2 resultam num arranjo estrutural que proporciona diferentes regiões de reconhecimento molecular. Enquanto a COX-1 apresenta menor cavidade de interação devido ao volume molecular da isoleucina na posição 343, a COX-2 possui uma cavidade maior, uma vez que estas posições são substituídas por porções de vanilina, permitindo interações secundárias e diminuição de efeitos estéricos (ROMEIRO et. al. 2008; ABDEL-AZIZ et. al., 2016)(Figura 5).

Figura 5. Perspectiva estrutural das COX-1 e COX-2.

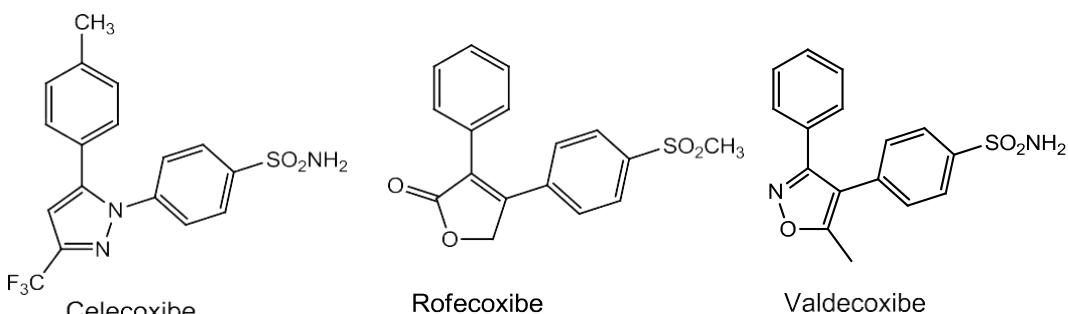


(Fonte: O autor)

A descoberta da necessidade de inibição seletiva da COX-2 para controle do processo inflamatório resultou no desenvolvimento de novos fármacos, os chamados coxibes. Estudos sugerem que estes fármacos seriam mais vantajosos quando comparados glicocorticoides e anti-inflamatórios não esteroidais, visto que a COX-2 é predominantemente expressa nos locais de

inflamação. Assim sendo, alguns inibidores seletivos de COX-2 tais como celecoxibe, rofecoxibe e valdecoxibe foram desenvolvidos e aprovados para comercialização uma vez que não há redução da PGs gastroprotetoras oriundas da COX-1, embora mantenha a eficiência anti-inflamatória (KAUR *et al.*, 2015) (Figura 6).

Figura 6. Estruturas químicas dos coxibes: celecoxibe, rofecoxibe e valdecoxibe.



(Fonte: o Autor)

Entretanto alguns estudos clínicos evidenciaram uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e tromboembólicos em usuários crônicos dos coxibes, levando a retirada de algum deles do mercado. Estes efeitos estão relacionados ao bloqueio da COX-1 que é responsável pelo síntese de tromboxanos e prostaciclinas os quais regulam o equilíbrio entre indução da coagulação (TxB_2) e ação anti-coagulante (PGI_2). Diante disto, aumentou-se a dúvida dos benefícios terapêuticos dos inibidores COX-2, sendo necessária, assim, a busca por uma nova classe de substâncias inibidoras desta isoforma e com a mesma eficiência anti-inflamatória (SHABBIR *et al.*, 2018).

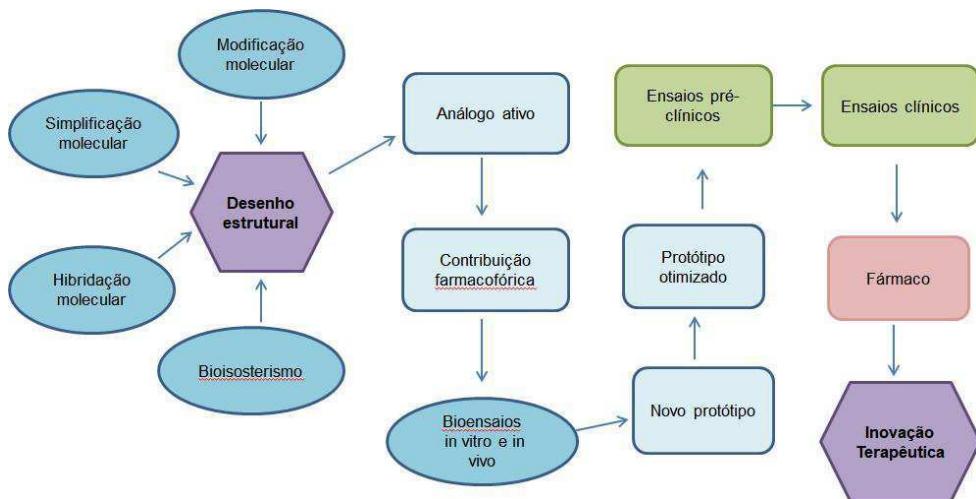
2.5 Química medicinal e o planejamento de fármacos

O planejamento de novos compostos biologicamente ativos compreende uma das mais importantes etapas para obtenção de novos medicamentos. A química medicinal é responsável por este planejamento, uma vez que envolve desde o planejamento até a preparação de fármacos (LEITE, 2016).

As fases de obtenção de novos fármacos envolvem aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas que vão desde seleção do alvo biológico até a inovação farmacológica (Figura 7). Em geral, a obtenção de um

novo composto bioativo ocorre a partir da identificação e otimização de um composto protótipo baseado na relação entre estrutura química e atividade biológica (BARREIRO, 2009; SUN et al., 2012).

Figura 7. Etapas do processo de planejamento e obtenção de um novo fármaco.

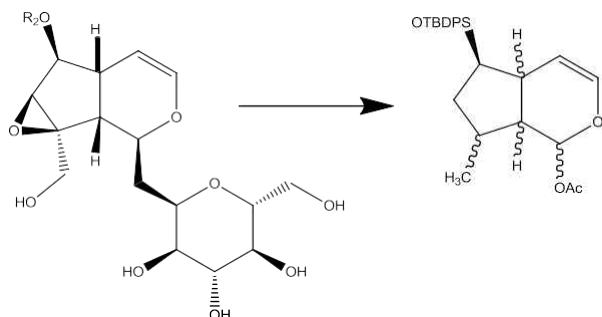


(Fonte: Adaptado de BARREIRO, 2009.)

As estratégias de planejamento molecular utilizam técnicas de modificação molecular clássicas da Química Medicinal, tais como bioisosterismo, simplificação e hibridação molecular. O bioisosterismo resulta da substituição de átomos ou grupo de átomos por outros quimicamente semelhantes em compostos ativos biologicamente. Essas alterações levam a diferentes propriedades físico-químicas que mantêm a eficiência da ação terapêutica podendo acarretar melhoria nos efeitos adversos associados (LIMA, 2007; ALI et al. 2017).

A simplificação molecular consiste modificação molecular ou otimização de fármacos e/ou protótipos, permitindo a obtenção de novos análogos ativos de estruturas mais simples em relação ao protótipo. Garcia et al., descreve a síntese de análogos simplificados da bicíclica-aglicona do catalpol, cuja ação antiproliferativa sobre a DNA polimerase mostrou-se eficiente. O bicíclico-aglicona assemelha-se estruturalmente a porção purina presente em nucleosídeos e desta forma poderia explicar a atividade observada de inibidora da DNA polimerase *Taq*(GARCIA et al., 2010)(Figura 8).

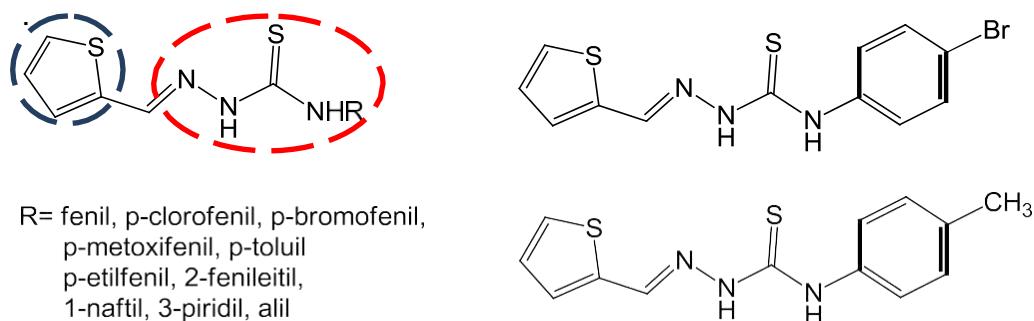
Figura 8. Simplificação molecular da catalpol para obtenção de novos derivados antiproliferativos.



(Fonte: o autor)

A hibridação molecular consiste em uma estratégia baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na composição estrutural de dois ou mais produtos bioativos. A junção dessas subunidades leva a formação de um novo híbrido mantendo as características das moléculas originais selecionadas previamente (ADDLAet. al., 2012). Oliveira e colaboradores descrevem a síntese e atividade *in vitro* de dez novos híbridos 2-tiofeno-tiossemicarbazonas frente a 11 linhagens diferentes de células tumorais. A junção dos grupos tiofenos e tiossemicarbazonas, que já se caracterizam por ação farmacológica, revelaram dois dos compostos sintetizados com inibição de 50% do crescimento celular após 48 horas de tratamento. Estes se mostraram capazes de inibir o desenvolvimento de tumor sólido de Ehrlich na dose de 30mg/kg (Figura 9) (OLIVEIRA et. al., 2015).

Figura 9. Híbridos tiofeno-tiossemicarbazonas com atividade antitumoral.



(Fonte: OLIVEIRAEt. al., 2015.)

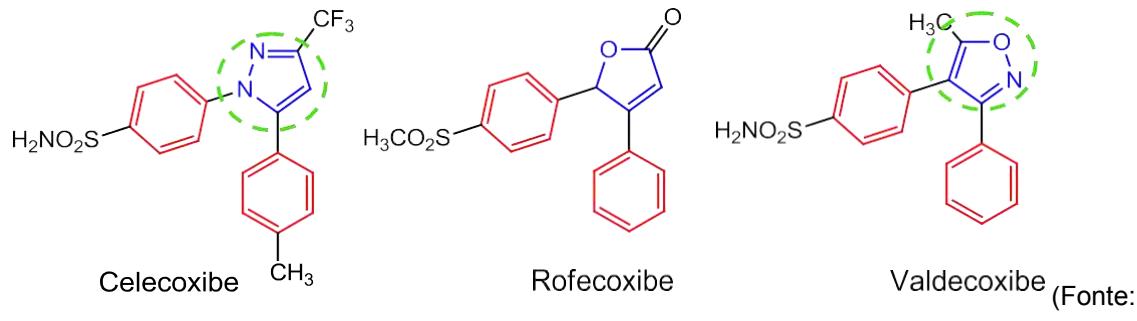
As estratégias citadas acima são comumente usadas de forma combinada. Estas são muito frequentes no planejamento de novas substâncias através de desenho de análogos. Estes desenhos são baseados nas estruturas químicas de medicamentos de ação farmacológica já difundida, e destaca-se na área de obtenção de fármacos sintéticos, pois dá origem a novas formas terapêuticas com melhores garantias de eficiência quanto à ação biológica. Esta estratégia parte de um fármaco já bem estabelecido quanto aos perfis farmacodinâmico e farmacocinético. Os análogos podem ser estruturais ou farmacológicos. Quando estruturais e farmacológicos são substâncias que possuem estrutura química e atividade farmacológica semelhante àquelas que mimetizam. A estratégia acima citada vem sendo muito utilizada para obtenção de anti-inflamatórios semelhantes estruturalmente aos coxibes. Assim, temos átomos ou grupos de átomos quimicamente semelhantes nas estruturas dos análogos que confere ação farmacológica semelhante (bioisosterismo). (SILVA, 2013).

2.6 *Planejamento de inibidores de COX-2*

Dentro das novas propostas farmacológicas com ação anti-inflamatória, inúmeros são os relatos da síntese de novas substâncias análogas asinibidoras de COX-2. A análise dos relatos da literatura sugere a presença de porções específicas nas estruturas de novos agentes anti-inflamatórios.

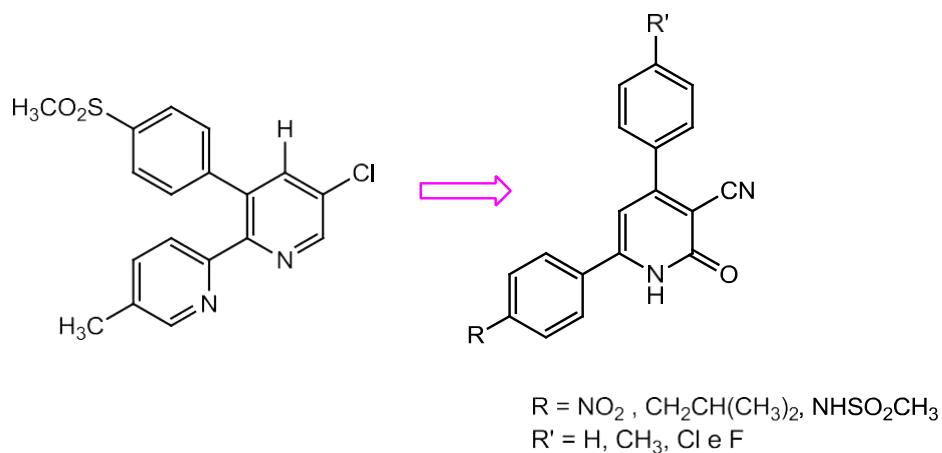
Em decorrência das diferenças estruturais da COX-1 e COX-2, a ação de anti-inflamatórios seletivos da COX-2 requer a presença de grupos estericamente capazes de passar pelo canal de entrada da COX-2, assim como interação com canais hidrofóbico e hidrofílico decorrentes da presença da valina no sítio ativo da enzima (UNSAL-TANet. al., 2012). De forma geral, os compostos planejados apresentam, entre outros, estruturas com grupos aromáticos, os quais são compostos por dois grupos aril e um anel de cinco ou seis membros, em geral oxazois, triazois e tiazóis (Figura 10). Estes grupos oferecem uma estrutura-esqueleto que permite uma interação eficaz dos seus substituintes com sítio ativo presente na COX-2 (BARREIRO e FRAGA, 2008; SRIVASTAVA et. al., 2016).

Figura 10.Estrutura-base de sistemas de aromáticos presentes nos coxibes.



Recentemente, estudo relata o planejamento e síntese de novos anti-inflamatórios cujos desenhos estruturais baseiam-se nos coxibes, os quais apresentaram inibição significativa quando comparados aos coxibes padrões. Alsayedet. al., descreveram o planejamento e síntese de análogos etoricoxibe (4,6-diaryl-3-cianopiridine-2-one) (Figura 11).

Figura 11. Proposta estrutural de análogos etoricoxibe 4,6-diaril-3-cianopiridin-2-one.



(Fonte: Adaptado de ALSAYED *et. al.*, 2017.)

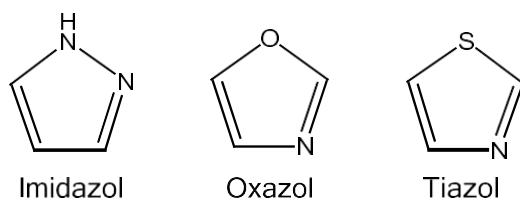
Neste estudo, os compostos sintetizados demonstraram alta seletividade frente a COX-2 (S.I. = 4.14–6.98 μM) e índices de inibição inflamatória (% inibição do edema= 60.5– 64.5 %) semelhantes quando comparados ao coxibe padrão (S.I.= 7.29 μM; % inibição de edema = 60%). Estruturalmente, a piridina central do etoricoxibe foi substituída pelo grupo 1,2-di-hidro-2-oxopiridina para

aumentar o número de ligações polares. O cloro na posição 5 foi substituído pelo grupo ciano acarretando um aumento no número de ligações de hidrogênio. Os grupos aril foram mantidos e seus substituintes alterados para grupos volumosos que assim garantem maior interação com os resíduos hidrofóbicos dentro do sítio ativo da COX-2, como o metilsulfônico, que é um dos principais responsáveis pela seletividade com a COX-2 (ALSAYED et. al., 2017).

2.7 Heterocíclicos pentagonais

Os compostos heterocíclicos pentagonais têm um papel crucial na obtenção de novas moléculas assim como no nosso sistema biológico. Estes heterocíclicos estão presentes em diversos candidatos a medicamentos como antibióticos, antitumorais, antiviral, antimicrobiano, antifúngico, antidiabético e anti-inflamatório (TRIPATHI et. al., 2014; CHADHA et. al., 2015). Dos grupos heterocíclicos, os derivados tiazóis tem se destacado por sua potencial aplicação em síntese orgânica, podendo ser utilizada em reações de condensação, oxidação, transformação de grupos funcionais e formação de ligação carbono-carbono. Os tiazóis são membros dos heterocíclicos azóis que incluem imidazóis e oxazóis (Figura 13) (KASHYAP et. al., 2012).

Figura 13. Estrutura química de derivados heterocíclicos pentagonais.



(Fonte: o autor)

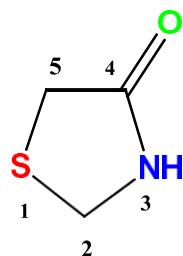
Dos derivados tiazóis, as tiazolidinas destacam-se por apresentar um amplo perfil farmacológico tais como agente antitumoral (KASHUAP et. al., 2012), antiinflamatório (TAGELDINet. al., 2018) antimicrobiana (MANJAL et al., 2017), antiprotozoária (CARDOSO et.al., 2014), dentre outras. Diante disto,

este núcleo está sendo continuamente explorado no planejamento e síntese novos possíveis fármacos, no combate dos efeitos da inflamação.

2.8 Tiazolidinas e sua reatividade

As tiazolidinas (TZD), quimicamente, são compostos consistem em um anel de cinco membros contendo dois heteroátomos, um átomo de enxofre (posição 1) e um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonila na posição 4, podendo apresentar diversos grupos químicos em geral como substituintes nas posições 2, 3 e 5 (Figura 14) (LIESEN *et. al.*, 2008; TRIPATHI *et. al.*, 2014).

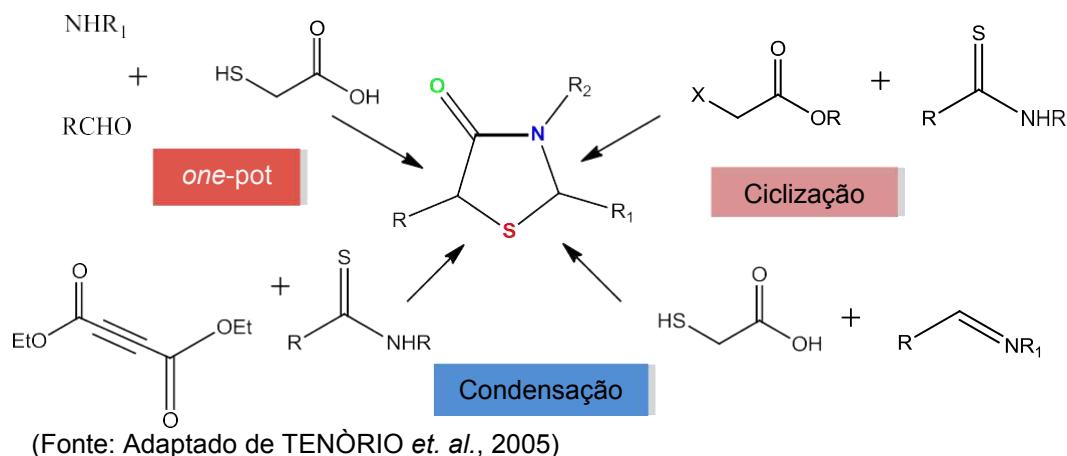
Figura 14. Estrutura base da 4-tioazolidinona.



(Fonte: O autor)

Dentre os processos de síntese de 4-tiazolidinas descritos na literatura, destacam-se as reações de condensação entre ácido α -mercaptoproacético, aminas primárias e aldeídos, do tipo “one-pot” e reações de ciclização envolvendo 1) ácidos α -haloacéticos; 2) ácido α -mercaptoproacético com tiossemicarbazonas; 3) entre moléculas que apresentam ligação dupla ou tripla conjugada com o grupo carbonila, como anidrido maléico ou acetilenodicarboxilato de dimetila e compostos que apresentam a função tioamida, como as tiossemicarbazonas (Figura 15). (LAURENT *et. al.*, 2004; YADAV *et.al.*, 1994; TENÓRIO *et. al.*, 2005; JAIN *et. al.*, 2012).

Figura 15. Principais metodologias sintéticas de obtenção de 4-tiazolidinona.



Dentre as diversas reações que envolvem o anel 4-tiazolidinona destacam-se os processos quimiosseletivos que ocorrem nas posições 1 (enxofre) em reações de oxidação; 3 (nitrogênio) em reações de *N*-alquilação e em reações de Mannich; 4 (carbonila) em reações de tionação via reagente de Lawesson e 5 (carbono metilênico) em reações de condensação com aldeídos, cetonas ou com sais de diazônio (LIESEN et. al., 2008; ALI et al., 2017).

2.9 Atividades biológicas das tiazolidinas

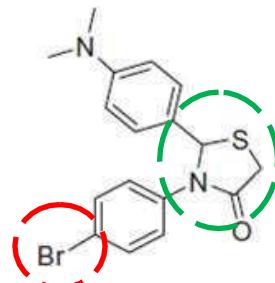
As tiazolidinas representam uma classe de compostos muito importantes na Química medicinal, devido a sua versatilidade biológica tais como antibacteriana (OYA et. al., 2007; FELISE et.al., 2008; JAIN et. al., 2010), antioxidante (SWANTH et.al., 2012), antitripanosomal (LEITE et.al., 2007), anti-retroviral (RAWAL et.al., 2005), anti-inflamatória (BARROS et. al., 2010; TRIPATHI, 2014) e analgésica (VIGORITA et. al., 2001), antitumoral (GUDUDURU et. al. 2005; KUMAR, et.al., 2015), anti-convulsivante (AMINet. al., 2018) dentre outras.

Kumar e colaboradores, em 2010, relatam a síntese de derivados de 4-tiazolidinona com ação antiproliferativa, nos quais a presença do grupo tiazolidinona demonstrou ser significativo para atividade em questão. As moléculas foram testadas quanto à sua citotoxicidade contra linhas de células leucêmicas. O composto 3-(4-bromofenil)-2-(4-dimetilamino)fenil) tiazolidina-4-

ona (**4e**) (Figura 16) com substituinte doador de elétrons em posição *parado* anel fenil exibiu considerável citotoxicidade contra células Reh e Nalm6 com valores de IC₅₀ de 11,9 e 13,5 µM, respectivamente. Além disso, o composto **4e** foi testado para estudos de regressão de tumores induzidas por EAC em rato albino suíço. Tanto *in vitro* quanto *in vivo* os resultados sugerem significativa atividade antiproliferativa, mostrando áreas multifocais de necrose e numerosas de células apoptóticas.

Figura 16. a) Atividade antiproliferativas de derivados 4-tiazolidinona b) 3-(4-bromofenil)-2-(4-dimetilamino)fenil tiazolidina-4-ona (**4e**).

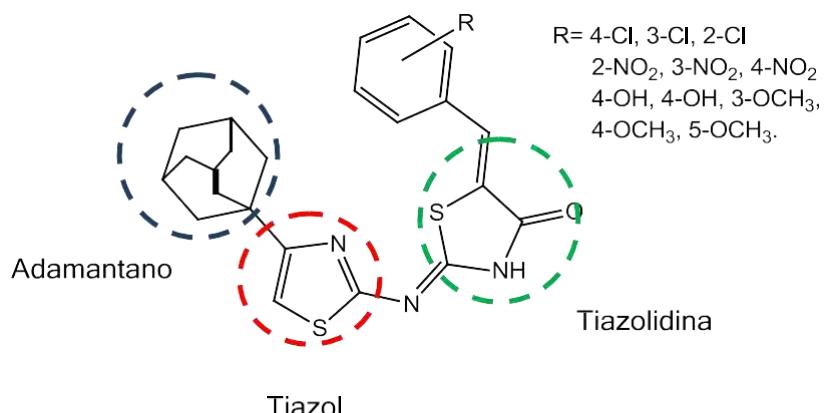
Compostos	Linhagem celular (IC ₅₀ em µM)		
	Reh	Nalm6	HEK293T
4 ^a	>100	>100	-
4b	>100	49.8	-
4c	>100	93.4	-
4d	29.6	42.6	-
4e	11.9	13.2	>80
4f	69.4	>100	-
4g	>100	82.9	-
4h	>100	>100	-
4i	>100	>100	-
4j	>100	>100	-



(Fonte: Kumar et al., 2010)

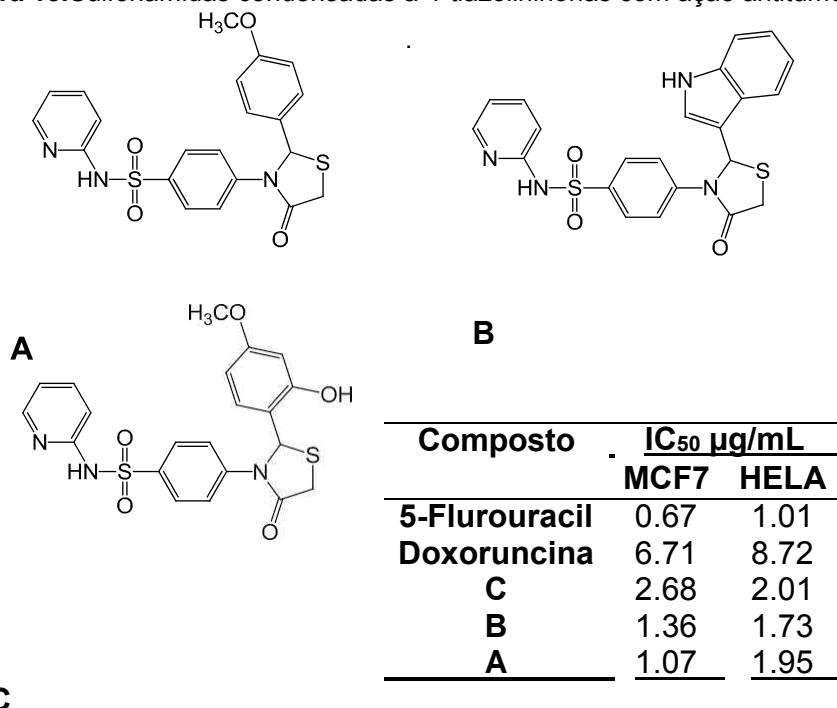
Em 2010, Omar e colaboradores propõem um estudo de novos agentes antimicrobianos e antifungicos, com derivados 4-tiazolidinona numa estratégia de hibridação molecular incorporando três núcleos bioativos conhecidos: tiazol, tiazolidinona e adamantano (Figura 17). A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica demonstrou que os compostos apresentaram resultados melhores do que os medicamentos padrão (cetoconazol) frente a bactérias Gran positivas e negativas (*B. cereus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* e etc.), e fungos (*A. versicolor*, *F. flavum*, *P. ochrochloron*), sendo assim candidatos promissores para novos fármacos.

Figura 17. Estrutura de hibridação molecular envolvendo núcleos tiazol, tiazolidinona e adamantano antimicrobianos e antifúngicos.



(Fonte: Omar et. al., 2010)

Kamel *et. al.* desenvolveu derivados de sulfonamida-4-tiazolidinona (77-82) testando contra a linhagem celular de carcinoma cervical (HELA) e as linhas celulares de carcinoma de mama (MCF7). O 5-fluorouracilo e a doxorrubicina foram utilizados como fármacos de referência. Os compostos que se destacaram ligados a tiazolidinona foram: derivado p-metoxifenilo **A**, derivado indol **B** e o derivado o-hidroxi-p-metoxifenilo **C** (Figura 18). Verificou-se que os compostos de modo geral apresentaram atividades antitumorais significativas. A ação antitumoral foi atribuída à presença do anel de fenil na fração de sulfapiridina proporcionando uma melhor afinidade em relação com a enzima devido à força da atração eletrostática entre a porção fenil e a sítio alvo das células tumorais (KAMEL *et. al.*, 2010).

Figura 18.Sulfonamidas condensadas a 4-tiazolininonas com ação antitumoral

(Fonte: Kamel et. al., 2010)

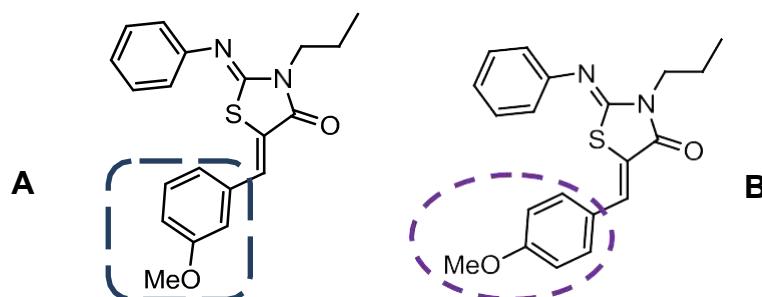
2.10 Atividade anti-inflamatória das tiazolidinas

Muitos estudos acerca da atividade anti-inflamatória das tiazolidinas têm sido relatados por diversos grupos de pesquisa relacionados à Química Medicinal. Entre eles destacam-se, a síntese de análogos não esteroidais, assim como os coxibes. Como já citado, os inibidores seletivos de COX-2 chegaram ao mercado farmacêutico como solução para os efeitos secundários causados pelos AINE's, tais como toxicidade gástrica e renal, no tratamento inflamatório. Entretanto, um aumento da incidência de eventos cardiovasculares associados aos coxibes, tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa na tentativa de obtenção de novos anti-inflamatórios, bem como estruturalmente semelhantes aos coxibes (LORENS *et. al.*, 2002; DI NUNNO *et. al.*, 2014).

Uma série de 5-arilideno-2-imino-4-tiazolidinas foi sintetizada por Ottaná e colaboradores e mostraram significativa atividade anti-inflamatória utilizando como modelos de inflamação aguda edema de pata e pleurisia em ratos swiss. O composto 5- (3-metoxifenileno) -2-fenilimino-3-propil-4- tiazolidina (**A**) apresentou 85% de inibição (3h) semelhante à da indometacina (Figura 19).

Fazendo uma análise estrutural os pesquisadores observaram que a troca do grupo metoxi em *para* para a posição *meta*, bem como a substituição deste pelos grupos -SCH₃ e -SO₂CH₃ foi um prejudicial para a atividade anti-inflamatória. O composto 5- (4-metoxifenil) metilideno-2-fenilimino-3-propil-4-tiazolidinona (**B**) revelou altos níveis de inibição nos teste de edema de pata induzido por carragenina, quando comparados aos da indometacina. No estudo de Docking o composto B mostrou que a fração 4-metoxibenzoíleno pode facilmente ocupar a vizinhança do bolso secundário da COX-2 e fazer a interação do tipo ligações de hidrogênio com Arg513, Arg120 e Tyr355 (OTANNA et.al., 2005; JAIN et. al. 2012).

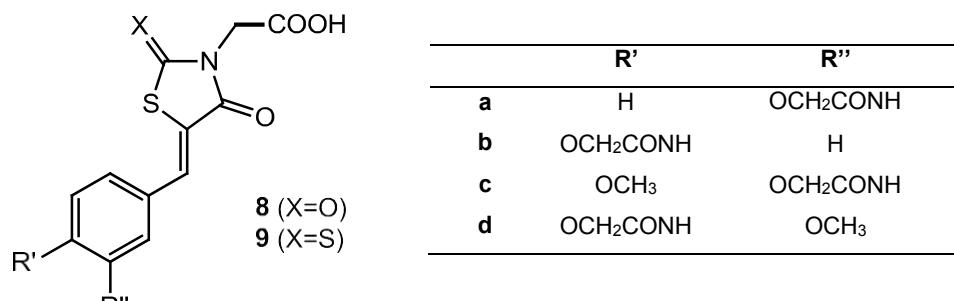
Figura 19. Estrutura de 5-aryliden-2-imino-4-tiazolidinas com atividade anti-inflamatória.



(Fonte: JAIN et. al. 2012)

Uma série de derivados de 5- (carbanoilmétoxi) benzilideno-2-oxo / tioxo-4-tiazolidinona (8e9) foram sintetizados e avaliados quanto a capacidade inibitórias da enzima aldose redutase (AR), que desempenha um papel crucial no desenvolvimento de complicações do diabetes, bem como nos processos inflamatórios associados tanto ao diabetes mellitus como a outras patologias. A atividade inibidora *in vitro* indicou que os compostos, em geral, apresentam bons inibidores de AR. Os derivados do ácido acético **8-a** ed e **9-a** ed mostraram-se os melhores inibidores enzimáticos entre os compostos testados, dotados de níveis significativos de capacidade inibitória, atingindo valores de IC₅₀ submicromolares (Figura 20) (MACCARI et. al., 2014).

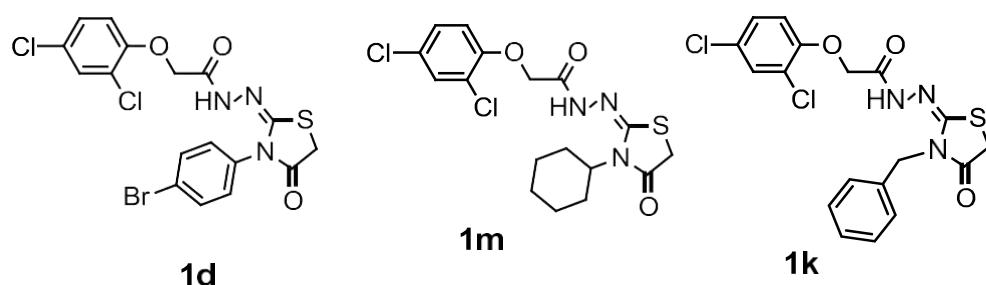
Figura 20. Estrutura química dos derivados 5-(carbamoilmethoxy)benzilideno-2-oxo/tioxo-4-tiazolidinona com ação anti-inflamatória.



(Fonte: MACCARI *et. al.*, 2014)

Recentemente, Ali *et. al.*, descreveu a síntese de quatorze derivados de 2-imino-4-tiazolidinona (1a-1n) avaliados quanto ao perfil antiinflamatório *in vivo* e o efeito na expressão *ex-vivo* de COX-2 e TNF- α . Os compostos *p*-bromo fenil (**1d**), benzil (**1k**) e ciclohexil (**1m**) ligados ao anel aromático A (Figura 21) exibiram inibição *in vivo* de 72,22%, 81,14% e 78,80% respectivamente após 5 h em comparação com a indometacina que mostrou 76,36% de inibição. O composto **1k** apresentou redução de 68,32% no nível de COX-2 em comparação com a indometacina que exibiu 66,23% de inibição de COX-2. Os compostos **1k** e **1m** suprimiram significativamente a concentração de TNF- α para 70,10% e 68,43% em comparação com a indometacina que exibiu 66,45% de supressão (ALI *et. al.*, 2017).

Figura 21. Estrutura química dos derivados 2-imino-4-tiazolidinona com ação anti-inflamatória.



(Fonte: Adaptado de ALI *et. al.*, 2017).

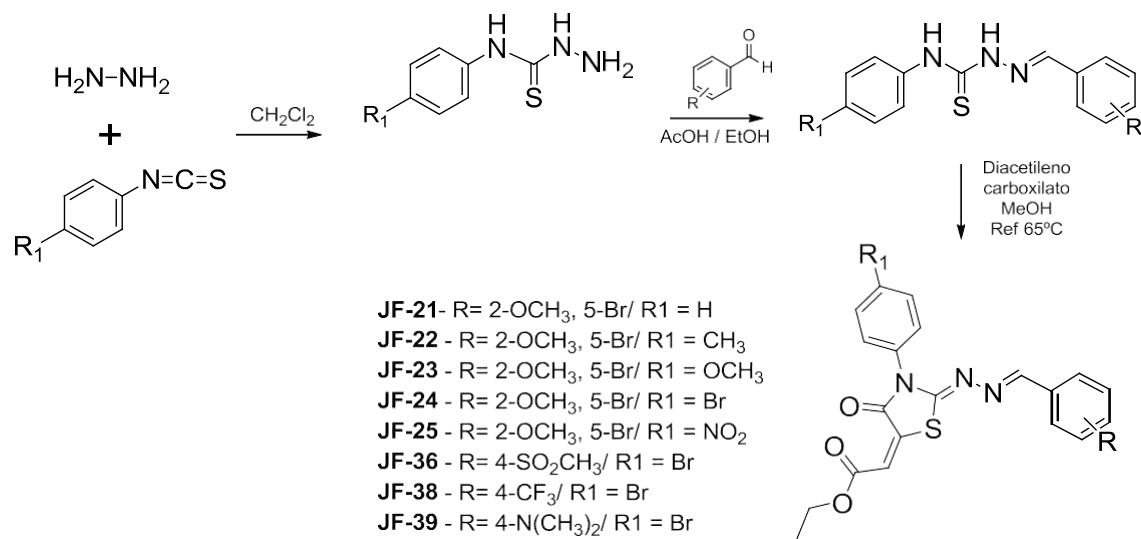
Diante dos diversos relatos sobre as atividades biológicas atribuídas as tiazolidinas, especialmente anti-inflamatórias, o presente trabalho relata a síntese de novas tiazolidinas a partir de tiossemicarbazonas e o estudo de sua ação anti-inflamatória através da análise dos modelos de edema de pata induzido por carragenina, permeabilidade vascular e bolsão de ar. Além disso, foi realizada uma análise estrutural da interação dos compostos com melhores resultados *in vivo*, com a COX-2 .

3. METODOLOGIA

3.1 Esquema geral de síntese

A síntese dos derivados tiazolidínicos inicia-se pela obtenção dos intermediários tiossemicarbazônicos seguindovia de síntese plena e linear (Esquema 1). Segundo metodologia sintética já consolidada pela literatura e o grupo de pesquisa, através de síntese de adição clássica entre isotiocianatos correspondentes e hidrazina, obtiveram-se as tiossemicarbazidas. A partir das mesmas, seguiu-se com metodologia de condensação com aldeídos sintéticos para obtenção de novas tiossemicarbazonas. Estas foram utilizadas numa ciclização, a fim de obter-se derivados 4-tiazolidinicos substituídos com a função éster na posição 5. Os derivados sintetizados diferem-se pelos substituintes presentes nos grupos aromáticos, a fim de realizar análise comparativa da resposta inflamatória destes compostos.

Esquema 1. Diagrama de síntese dos derivados tiazolidínicos sintetizados.



3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Equipamentos

A caracterização estrutural dos compostos foi realizada através da espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), em espectrofotômetro

FTIR Modelo IFS 66 (Bruker®, Alemanha), pastilhas de KBr cujos os comprimentos de onda foram expressos em cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) e carbono 13 (RMN^{13}C) foram efetuados em espectrofotômetro Varian® Modelo Plus 400-300 MHz utilizando-se como solvente DMSO-d6. Nos espectros de ressonância magnética nuclear, os deslocamentos químicos estão expressos em ppm. A multiplicidade dos sinais está representada por: simpleto (s), duplo (d), duplo duplo (dd), triplo (t) e multipleto (m) e as constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hz (Hertz).

Os pontos de fusão foram medidos no equipamento FISATOM®, Modelo 431D Série 1511035.

Os espectrômetros de massa foram realizados no aparelho MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics®, Billerica, MA, USA).

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica gel 60 F254 da MERCK® de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 ou 366 nm.

3.2.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram: 5-bromo-2-metoxi-benzaldeído (CAS 25016-01-7), 4-metilsulfonil-benzaldeído (CAS 3446-89-7), 4-trifluorometil-benzaldeído (CAS 455-19-6), 4-dimetilamino-benzaldeído (CAS 100-10-7), hidrato de hidrazina 80% (CAS 302-01-2), dietil acetilenodicarboxilato (CAS 762-21-0), isotiocianatos substituídos (4-metoxifenil-isotiocianato (CAS 2284-20-0), 4-bromofenil-isotiocianato (CAS 1985-12-2), 4-nitrofenil-isotiocianato (CAS 2131-61-5), 4-toluil-isotiocianato (CAS 622-59-3), fenil-isotiocianato (CAS 103-72-0), etanol absoluto (CAS 64-17-5), diclorometano (DCM) (CAS 75-09-2), *n*-hexano(CAS 110-54-3), ácido acético glacial (CAS 64-19-7), acetato de etila (CAS 141-78-6). Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos e para suas análises pertencem às marcas Sigma, Aldrich, Merck, ou Vetek.

3.2.3 Procedimentos sintéticos

3.2.3.1 Metodologia de obtenção hidrazina carbotiamida substituída

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1,0 g (4,6 mmol) do isotiocianato correspondente em 30 mL de diclorometano e a mistura deixada sob agitação a temperatura ambiente até solubilização. Em seguida, foram adicionados 0,3 mL (9,3 mmol/ 2 eq.) de hidrato de hidrazina. A mistura foi mantida sob agitação por 1h sendo, após o tempo decorrido, filtrada e lavada com n-hexano(SETH et al., 1996).

3.2.3.2 Metodologia de obtenção das tiossemicarbazonas 4-aryl-substituídas

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2,0 mmol de 5-bromo-2-metoxibenzaldeído em 20 mL de etanol. À solução etanólica foi adicionado ácido acético glacial em quantidade catalítica, e a mesma deixada sob agitação magnética até solubilização. Em seguida, foram adicionados 2,5mmol da tiossemicarbazida correspondente e a mistura reacional mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1h. Ao término do referido tempo, a mistura foi filtrada e obtido um sólido branco amorfo que foi cristalizado em sistema EtOH/H₂O(CUNHA & SILVA, 2009).

3.2.3.3 Metodologia de obtenção dos derivados(*E*)-etyl-2-((*Z*)-2-(*E*)-benzilideno hidrazona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno acetato substituídos

Em um balão de fundo redondo, foi adicionado 1mmol de tiossemicarbazonas correspondentes em 10 ml de etanol. A mistura foi submetida à agitação magnética em sistema de refluxo (65°C) até solubilização. Em seguida, foi adicionado, em quantidade equimolar o dietil acitlenodicarboxilato e a mistura reacional mantida sob agitação e refluxo por 2h, sendo a progressão reacional acompanhada por CCDA. Após o tempo decorrido a mistura foi filtrada e o sólido amarelo obtido recristalizado em diclorometano/hexano(DAREHKORDIA, SAIDIB & ISLAMIB, 2007).

3.3 Ensaios Biológicos

Os testes foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos – LBPF, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos de acordo com as normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e com as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.019618/2016-31.

3.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos albinos swiss (*Mus musculus*), pesando entre 30 e 35g provenientes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais (n= 180) foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento.

3.3.2 Ensaios *in vivo*

3.3.2.1 Toxicidade aguda em dose única

Foi avaliado quanto à toxicidade aguda os derivados 4-tiazolidinicos utilizando metodologia recomendada pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2001).

A avaliação de toxicidade ocorre pela administração da dose de 2000mg/ kg dos derivados em estudo. Foram utilizados grupos contendo 3 animais (fêmeas) cada, sendo o experimento realizado em duplicata. Os derivados tiazolidínicos JF-21/22/23/24/25/36/38/39 foram solubilizados em uma mistura de solução salina e tween a 5% e o terceiro grupo recebeu apenas o veículo (salina/tween 5%). Após a administração (gavagem), os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24h durante 14 dias para verificação de qualquer alteração comportamental, nas atividades fisiológicas ou mortalidade. Os parâmetros comportamentais observados foram: agitação, atividade motora, locomoção, resposta ao toque, piloereção, ptose, cianose, movimentos estereotipados, sonolência, frêmito vocal, ataxia, contorções, agressividade, convulsões, micção, defecação, diarreia. Também foi observado o consumo de água e ração. No 15º dia os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para avaliação hematológica e em seguida eutanasiados para coleta dos órgãos para avaliação (fígado, rins, baço e estômago) para observação macroscópica de lesões e cálculo do índice dos órgãos.

3.3.2.2 *Teste de Edema de pata induzido por carragenina*

Foram utilizados camundongos albinos swiss machos (n=5) os quais foram tratados por via oral com os derivados 4-tiazolidínicos JF-21/22/23/24/25/36/38/39 na dose de 30 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) 1h antes da injeção da carragenina. O edema foi induzido pela injeção de 0,05 mL de carragenina a 1% (v/v) na região subplantar da pata posterior direita (WINTER, RISLEY & NUSS, 1962). O volume da pata foi medido antes e nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção de carragenina pelo pleismômetro (Ugo Basile ®). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (V_f) e o volume inicial (V_i).

3.3.2.3 Teste de permeabilidade vascular

Os efeitos dos derivados 4-tiazolidinicos JF-23, JF-25 e JF-38 na permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos foram realizados de acordo com o método descrito por Whittle, 1964. Cada amostra foi administrada por via oral. Para os animais (n=5) pertencentes ao grupo controle, foi administrado o veículo (salina/ tween 5%). Após uma hora, cada animal foi anestesiado com solução de ketamina e xilazina (8 : 2) por via intraperitoneal. Imediatamente, foi injetado no plexo retro-orbital 0,2 mL/ animal do corante Azul de Evans a 1% (Sigma®, St. Louis, Missouri, USA). Em seguida, administrou-se 0,5 mL da solução de ácido acético 1% na cavidade peritoneal. Após um intervalo de 30 minutos, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de salina. O exsudato foi coletado e centrifugado, e distribuído em microplaca de 96 poços em triplicata. As absorbâncias foram medidas a 630 nm e a concentração de *Evans blue* foi calculada usando uma curva-padrão.

3.3.2.4 Teste de bolsão de ar

A indução da bolsa de ar no dorso dos camundongos foi feita através da injeção de ar estéril. No primeiro dia injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio os animais receberam, por via oral, os derivados 4-tiazolidínicos JF-25 e JF-38 na dose de 30 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) e um grupo controle recebeu o veículo (salina + tween 5%). Para indução da inflamação foi injetado 1,0 mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar uma hora após a administração dos compostos. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as bolsas lavadas com 3,0 mL de solução salina contendo EDTA como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60 (KIM et al., 2006; GUERRA et al., 2011). Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante guardado a -20°C.

3.4 Análise de interação molecular (*Docking*)

Estes foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Simulação Computacional da UFRPE.

3.4.1 Preparação da estrutura do ligante

As estruturas dos compostos de teste (JF-21, JF-25 e JF-38) foram obtidas com o software Avogadro 1.2.0 (HANWELL et al., 2012) e totalmente otimizadas com o método PM6 semi-empírico (Stewart et al., 2007) implementado no MOPAC2016 (MOPAC, 2016). As estruturas otimizadas foram salvas como arquivos pdb. Usando AutoDockTools-1.5.6, os hidrogênios não polares foram fundidos com os carbonos correspondentes, e então a carga parcial dos átomos foi calculada usando o procedimento Gasteiger implementado no pacote AutoDockTools. As ligações rotacionais dos ligantes foram definidas, e as estruturas foram salvas como pdbqt e usadas para estudos de *docking*.

3.4.2 Preparação da estrutura protéica

As estruturas cristalinas de Celecoxib co-cristalizado para COX-2 (PDB ID: 3LN1) foram recuperadas do RCSB Protein Data Bank. Com o uso do Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer (versão 16.1.0.15350) (BIOVIA, 2016), sendo moléculas de água e outros heteroátomos removidos. Em seguida, usando AutoDockTools, os hidrogênios não polares foram fundidos e os hidrogênios polares foram adicionados à estrutura da proteína. As cobranças de Kollman foram adicionadas e a estrutura foi salva como pdbqt para os estudos de *docking*.

3.4.3 Procedimento de *docking*

O grid 3D foi criado pelo Auto Graph Algorithm® para gerar o arquivo de parâmetros. O espaçamento do *grid* foi de 0,0375 nm em cada dimensão, e cada mapa de grade consistiu de um ponto de grade de $70 \times 70 \times 70$. O centro da grade foi ajustado para a posição do aglutinante co-cristalizado localizado na Corrente A em cada caso. O algoritmo genético Lamarckiano no AutoDock 4.2.2 foi aplicado para buscar a melhor conformação e orientação dos ligantes.

A otimização global foi iniciada com uma população de 150 indivíduos posicionados aleatoriamente com um máximo de 2500.000 avaliações de energia e um máximo de 27.000 gerações. Durante cada experiência de encaixe 100 jogadas foram realizadas. As poses de encaixe resultantes foram analisadas usando AutoDockTools e Discovery Studio Visualizer. Para validar o procedimento de acoplamento, o celecoxib ligante co-cristalizado foi pré-acoplado a cada proteína. Nesse caso, um mapa de grade de 126 x 126 x 126 foi usado e 250 execuções foram realizadas.

3.4.4 Análise estatística

Os dados obtidos experimentalmente foram expressos como a média através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância e representados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Os dados foram obtidos utilizando o Software GraphPad Prism®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

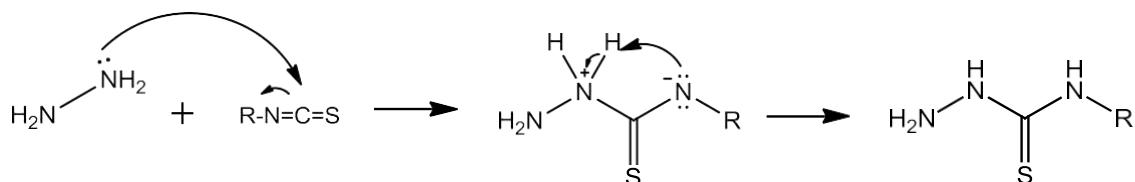
4.1 Parte química

As rotas sintéticas seguidas para obtenção dos compostos anteriormente citados mostraram-se eficazes. Os compostos foram obtidos com bons rendimentos não sendo necessária purificação por cromatografia em coluna, apenas por lavagens e cristalização em solventes adequados. A rota sintética proposta inicia-se pela síntese de tiossemicarbazidas a partir de hidrazina e isotiocianatos substituídos. Das tiossemicarbazidas foram obtidas tiossemicarbozonas que servirão como precursoras para classe de interesse, as tiazolidinas.

4.1.1 Mecanismo reacional e caracterização estrutural dos derivados *N*-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida substituídos.

A primeira etapa consiste na síntese de tiossemicarbazidas pela reação de isotiocianatos com hidrato de hidrazina através de uma reação de adição nucleofílica. Após o ataque nucleofílico, ocorre a quebra da ligação pi e os elétrons migram para o nitrogênio devido a sua alta eletronegatividade. Posteriormente, há um equilíbrio e balanço de cargas, resultando na tiossemicarbazida de interesse (Esquema 2) (OLIVEIRA, 2015 *Apud* Tenório et al., 2005).

Esquema 2. Mecanismo reacional de formação das tiossemicarbazidas.

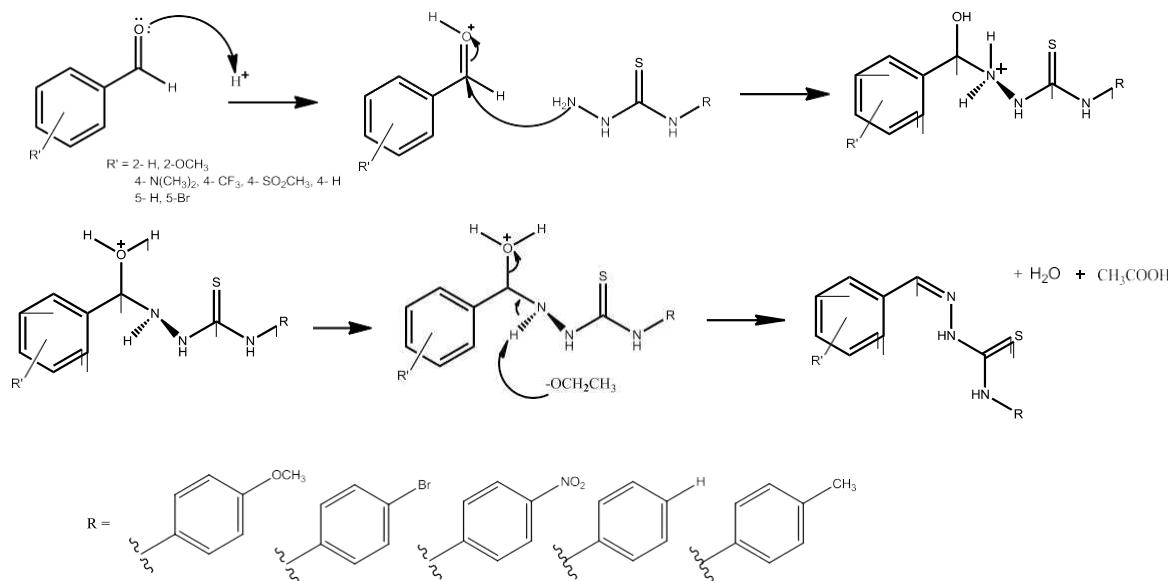


(Fonte: o autor)

A etapa seguinte, para obtenção das tiossemicarbozonas, caracteriza-se por uma reação onde ocorre a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do

nitrogênio N1 da tiosseemicarbazida, através de um processo bimolecular, gerando o intermediário hemiaminal N-protonado correspondente. Por fim, uma transferência de próton do nitrogênio para o oxigênio (prototropismo), acompanhada de uma desidratação e seguida neutralização, desloca o equilíbrio para a formação da imina (Esquema 3).

Esquema 3. Mecanismo de obtenção dos precursores dos N-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida substituídos.



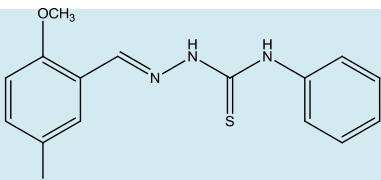
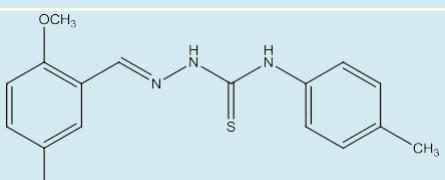
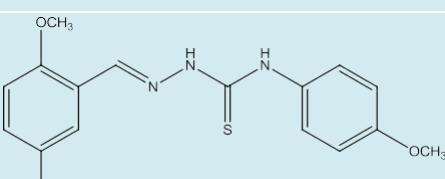
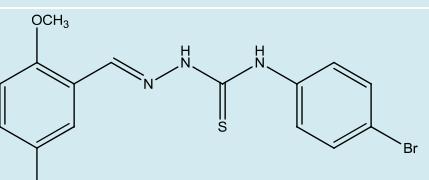
(Fonte: o autor)

Na obtenção das tiosseemicbazonas, a ligação dupla azometínica podem adotar configurações Z ou E. Geralmente, as TSC são obtidas como misturas de isômeros Z e E no estado sólido. Entretanto, em solução, há isomerização da configuração Z para E. Essa isomerização é influenciada pela presença de um ácido no meio reacional e pela natureza dos grupos substituintes ligados ao carbono azometina, bem como pelos substituintes ligados ao nitrogênio da tioamida (N-4). Através dos relatos da literatura, é possível perceber a existência de um consenso sobre configuração E ser predominantemente formada devido a sua maior estabilidade termodinâmica (TENÓRIO *et. al.*, 2005). Na análise da cromatografia em camada delgada (CCD), é possível perceber a presença de uma só mancha, sugerindo a formação de um único isômero. Para determinar que tipo de isômero formado, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H)

revela-se um recurso importante por apresentar sinais característicos referentes ao hidrogênio da ligação azometínica E. Em geral, os compostos com isomeria Z exibem sinal de N=CH em torno de 14 – 15ppm, enquanto que os que assumem configuração E exibem o sinal entre 9 – 12ppm (LEITE, 2017 *apud* SERDA *et. al.*, 2013). Estes dados nos sugere que os compostos sintetizados neste trabalho possuem configuração E.

As características físico-químicas e rendimentos das tiosseemicbazonas sintetizadas estão descritas na tabela abaixo. Os compostos JF-16, JF-18 e JF-20 são as únicas substâncias não inéditas, as quais foram obtidas do banco de moléculas do LQIT-UFPE. Sua elucidação estrutural foi feita nos dados da literatura (LEITE, 2016).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e rendimentos para tiosseemicbazonas da série N-(4-fenil)-hidrazina-carbotiamida.

Compostos	Formula molecular	Rend. (%)	PF °C	Eluente /Rf
 JF-11	C ₁₅ H ₁₄ BrN ₃ OS	92	196-197	Hex.:AcOEt (7:3) / 0,45
 JF-12	C ₁₆ H ₁₆ BrN ₃ OS	95	189-191	Hex.:AcOEt (7:3) / 0,61
 JF-13	C ₁₆ H ₁₆ BrN ₃ O ₂ S	91	212-214	Hex/AcoEt (9 : 1) / 0,55
 JF-14	C ₁₅ H ₁₃ Br ₂ N ₃ OS	93	211-213	Hex/AcoEt (9 : 1) 0,63
				Continua...

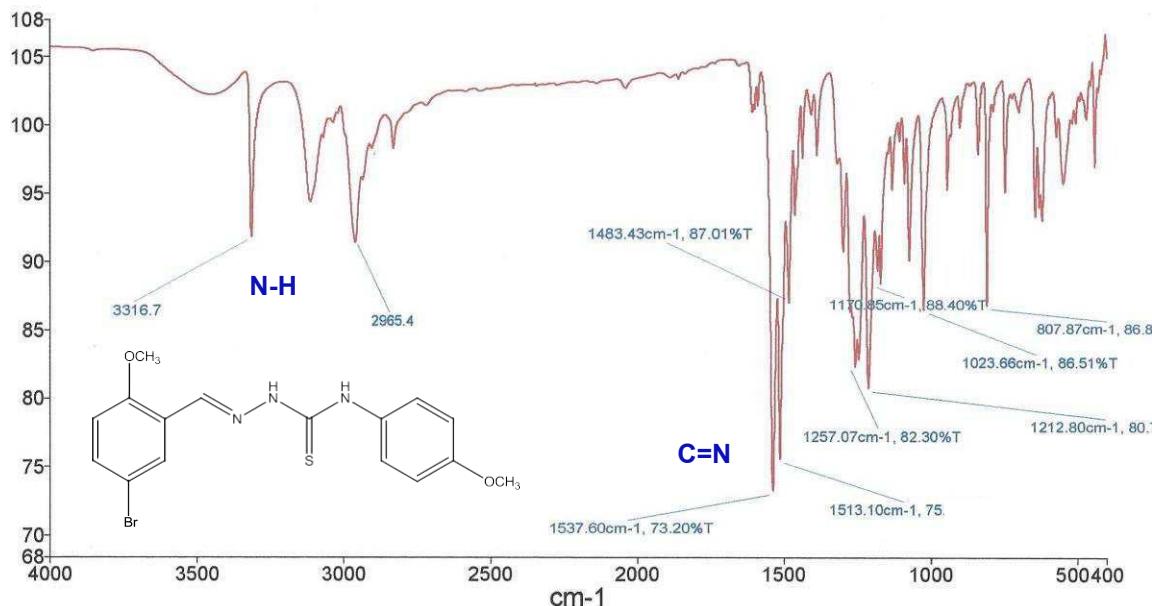
	C ₁₅ H ₁₃ BrN ₄ O ₃ S	83	202-204	Hex.:AcOEt (8:2) / 0,43
	C ₁₅ H ₁₄ BrN ₃ O ₂ S ₂	90	220-222	Hex.:AcOEt (4,5:5,5) / 0,62
	C ₁₅ H ₁₁ BrN ₃ F ₃ S	77	199-200	Hex.:AcOEt (8:2) / 0,44
	C ₁₆ H ₁₇ BrN ₄ S	75	200-201	Hex.:AcOEt (7:3) / 0,42

Fonte: Autor

Para a caracterização estrutural das moléculas, foram utilizadas técnicas espectroscópicas e espectrométricas, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C além de Infravermelho (IV) e Espectroscopia de Massas (MS). Estas técnicas nos permitem confirmar estruturalmente as substâncias obtidas pelos métodos reacionais propostos.

No espetro na região do infravermelho é possível observar bandas características aos estiramentos presentes na estrutura molecular. Bandas em 3316,7 cm⁻¹ referente ao estiramento N-H, bandas em 1537,6 cm⁻¹ oriunda das vibrações do estiramento C=N e uma banda em 1513,1 cm⁻¹ característica de estiramentos C=S que evidenciam a formação das tiossemicarbazonas. Além destes, as bandas em 1413 e 3100 cm⁻¹ são compatíveis com regiões descritas na literatura para os estiramentos C=C e C-H (Figura 22). A tabela 2 traz os valores vibracionais na região de infravermelho dos compostos sintetizados e suas principais bandas.

Figura 22. Regiões de vibrações do IV do composto JF-13 com os principais estiramentos dos presentes na tiossemicarbazona N-H, -C=N e o grupamento C=S.



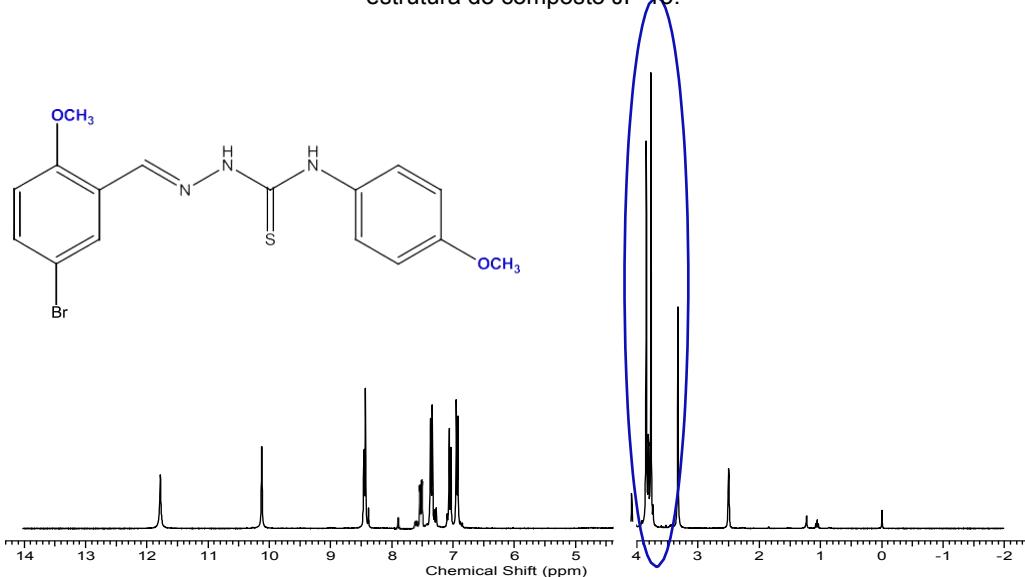
(Fonte: O autor)

Tabela 2. Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os derivados da série (E)-etyl-2-(Z)-2-(E)-benzilideno hidrazona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilídeno acetato.

Compostos	C=S	(C=N)	(N-H)	OCH ₃	R
JF-11	1496	1519	1513	1009	-----
JF-12	1544	1527	1570	1110	CH ₃
JF-13	1513	1537	1606	1069	OCH ₃ 1069
JF-14	1504	1543	1480	1091	Br
JF-15	1510	1529	1563	1023	NO ₂

A análise dos hidrogênios dos compostos através da espectroscopia de RMN de ¹H permitiu-nos elucidar estruturalmente os diferentes hidrogênios presentes nos derivados tiossemicarbazonicos (Figura 23). O espectro de RMN de ¹H corresponde ao composto JF-13. Na região de campo alto é possível observar dois simpletos em 3,71 e 3,81 ppm correspondente aos hidrogênios do grupo metóxi (OCH₃).

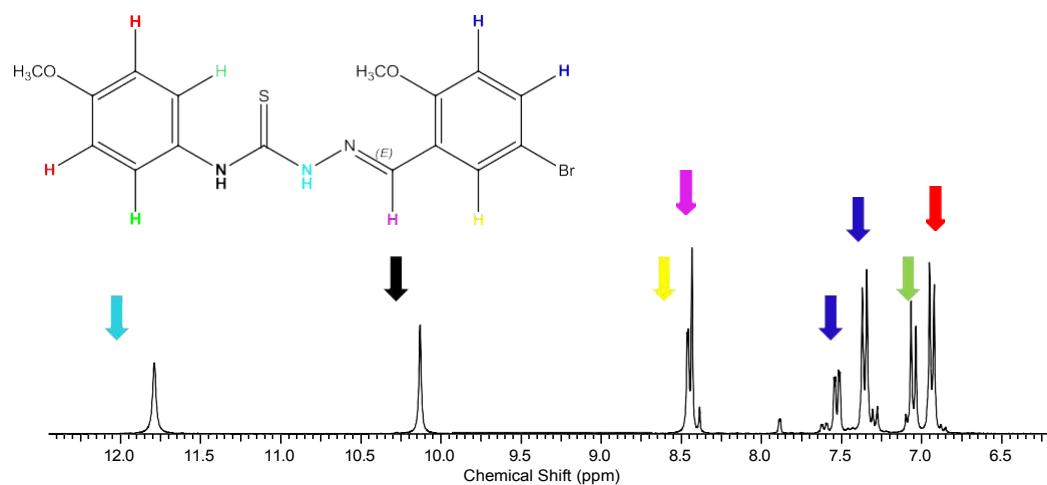
Figura 23. Espectro de RMN de¹H indicando os principais sinais de deslocamento químico presentes na estrutura do composto JF-13.



(Fonte: o Autor)

Na região de campo baixo, sinais entre 6.94 e 7.52 ppm são encontrados cujos deslocamentos correspondem aos hidrogênios aromáticos fenílicos e benzilidênicos, os quais podem ser diferenciados por seus valores de constante de acoplamento, $J = 9,3$ Hz e $J = 8,7$ Hz, respectivamente. A confirmação da formação das tiosemicarbazonas é observada pelo sinal em 8,43 ppm correspondente à ligação -HC=N-, em razão do efeito de desblindagem dos átomos eletronegativos próximos. Por fim, simplesmente relativos aos hidrogênios de "NH" estão presentes em 10.11 e 11.70 ppm com suas respectivas integrações para um hidrogênio (Figura 24).

Figura 24. Ampliação do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-13 evidenciando os hidrogênios do anel aromático, azometínico e hidrazínico.(Fonte: o Autor)



Os espectros de RMN de ^1H das tiosseemicarbazonas sintetizadas apresentam sinais e valores de constante de acoplamento semelhantes aos do composto JF-13, entretanto observa-se a ausência de um dos sinais referentes metoxila, substituído pelos Br, NO₂, CH₃ e H em *para* do anel fenílico. Os valores de deslocamento químico são dados na tabela 3.

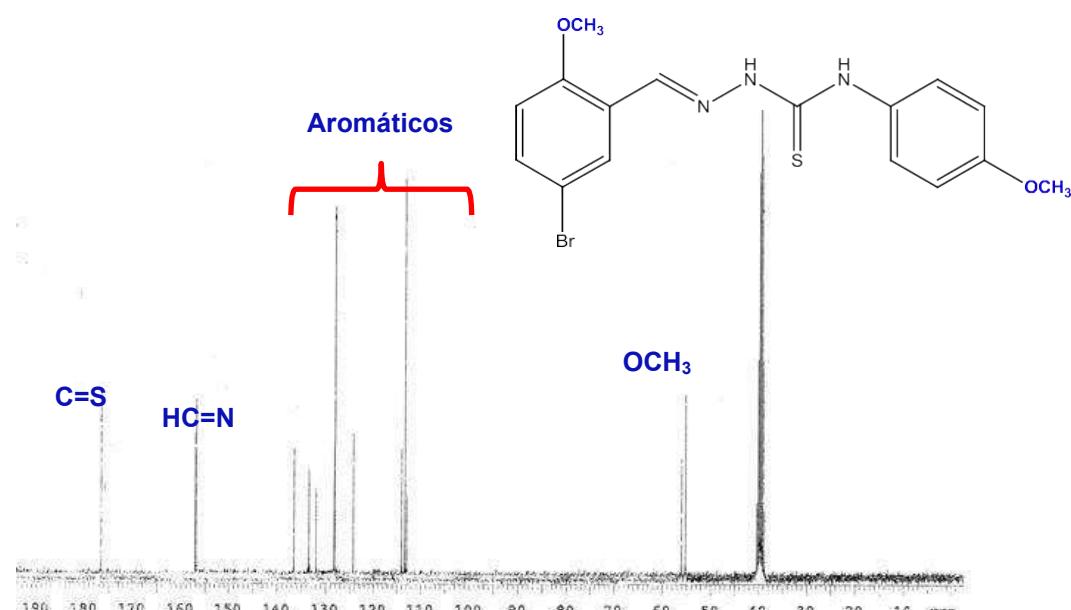
Tabela 3. Principais deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados nos espectros de RMN de ^1H para tiosseemicarbazonas da série N-(4-substituído-fenil)-hidrazina-carbotiamida.

Compostos	NNH	NH-Ar	N=CH	H (Ar)	Outros (R)
JF-11	11.98	10.22	8.31	6.87 – 7.16	1.41 (CH ₃)
JF-12	11.69	10.23	8.51	7.06 – 7.41	-----
JF-13	11.71	10.11	8.46	6.91 – 7.45	3.81 (OCH ₃) 3.70 (OCH ₃)
JF-14	11.93	10.21	8.45	7.05- 7.51	3.84 (OCH ₃)
JF-15	12.01	10.35	8.46		-----NO ₂

Fonte: Autor

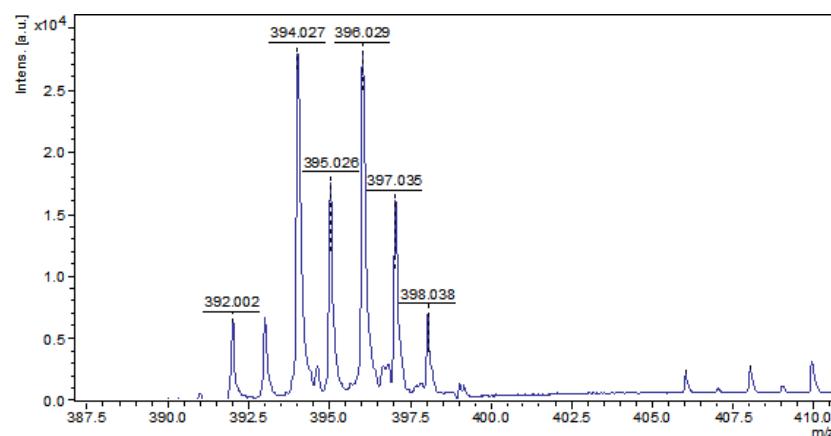
O espectro de RMN de ^{13}C mostra sinais entre δ 55-56 ppm referentes a carbonos sp³, as metoxilas, entre δ 115-135 ppm correspondentes aos carbonos aromáticos, sinais em δ 157,4 e 176,6 correspondentes ao estiramento C=N e tiocarbonila, respectivamente (Figura 25).

Figura 25. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze do composto JF-13.



A análise dos espectros de massa corrobora com os dados obtidos de RMN e IV para caracterização dos compostos tiossemicarbazônicos sintetizados. A espectrometria de massas é uma técnica analítica que separa e mede a relação m/z de íons e é usada como principal técnica para determinação de massa molecular com elevada exatidão. Todos os compostos sintetizados apresentaram pico do íon molecular (m/z) semelhante a massa molecular calculada no software ChemBioDraw Ultra 12.0. A figura 13 mostra o espectro de massa obtido para o composto JF-13 no qual é possível observar o pico base com m/z= 394,02 (M + 1) confirmando os dados computacionais de massa molar (Figura 26).

Figura 26. Espectro de massa do composto JF-13, com picos de M+1 e M+2 em destaque.



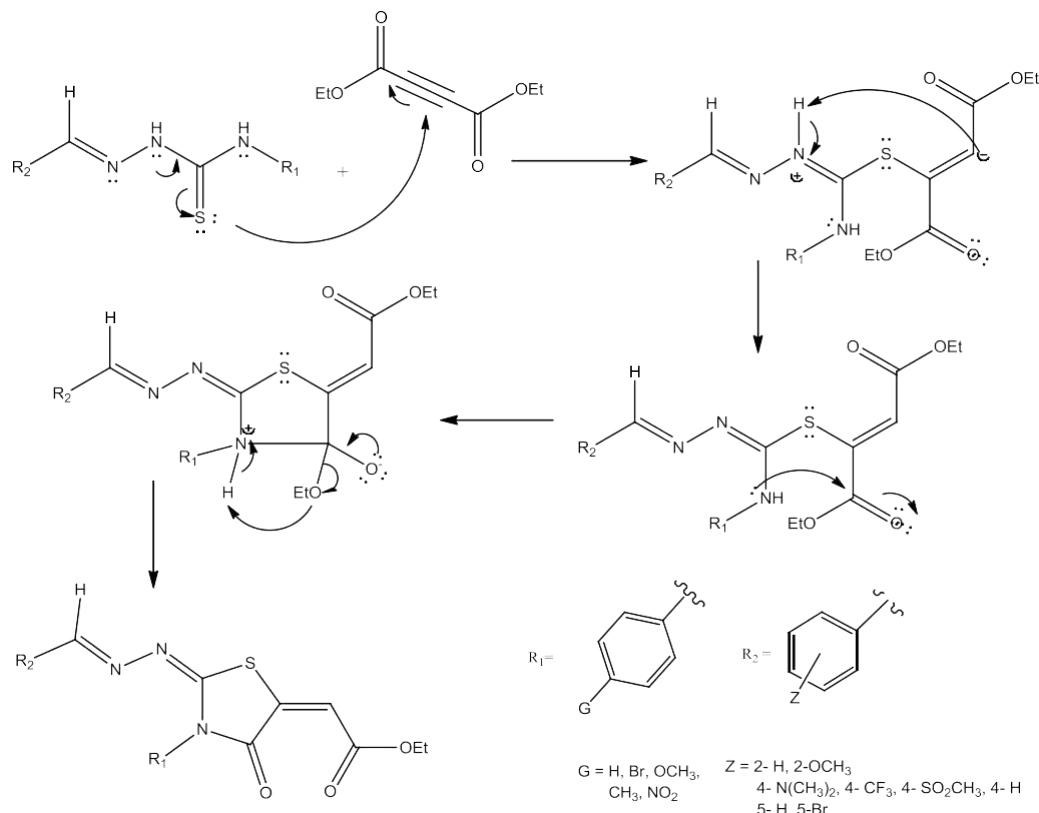
(Fonte: o autor)

4.1.2 Mecanismo e caracterização estrutural dos derivados (*E*)-etil-2-((*Z*)-2-(*E*)-benzilidenohidrazona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilídeno) acetato substituídos.

A segunda etapa consiste na síntese dos compostos 4-tiazolidinona. A obtenção destes compostos foi realizada seguindo rota sintética a fim de obter 4-tiazolidinonas-5-substuiúdas. A síntese envolve um mecanismo de condensação do enxofre com o dietil acetileno carboxilato através carbono spna posição 4, no qual ocorre um ataque nucleofílico. Após um rearranjo eletrônico, ocorre um ataque nucleofílico intramolecular,nacarbonila da função ester, e saída do grupo etóxi para formação da 4- tiazolidinona 5-substituída (Esquema 4). Os compostos foram sintetizados segundo a metodologia descrita

acima e suas características físico-químicas e rendimentos das reacionais estão descritas na tabela abaixo.

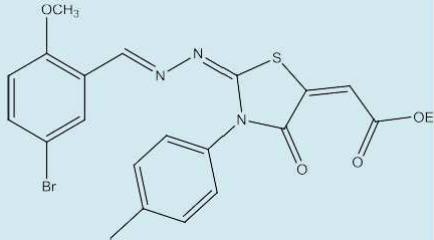
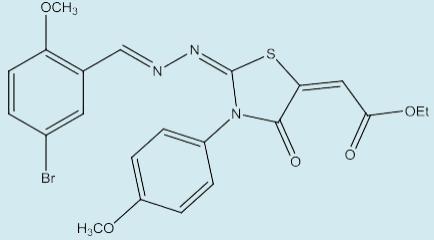
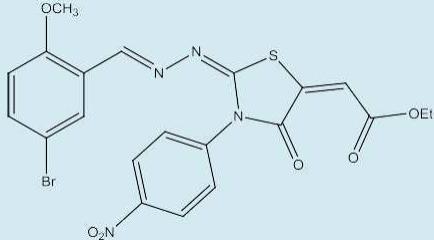
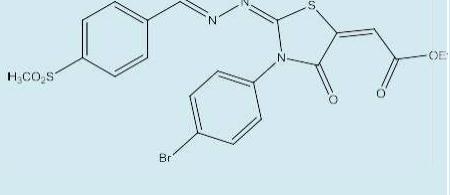
Esquema 4. Mecanismo de obtenção da 4-tiazolidinona por condensação das tiossemicarbazonas com o dietilacetilenocarboxilato.

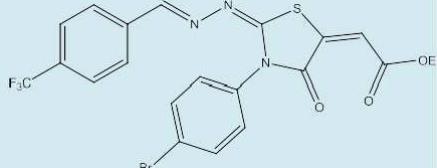
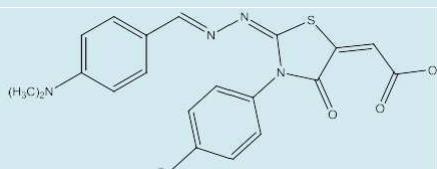


(Fonte: o autor)

Tabela 4. Propriedades físico-químicas e rendimentos para os derivados da série (E)-etil-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazona)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.

Compostos	Formula molecular	Rend (%)	PF °C	Eluente/Rf
 JF-21	C ₂₁ H ₁₈ BrN ₃ O ₄ S	70	185-187	Hex.:AcEtO (8:2) / 0,55 Continua...

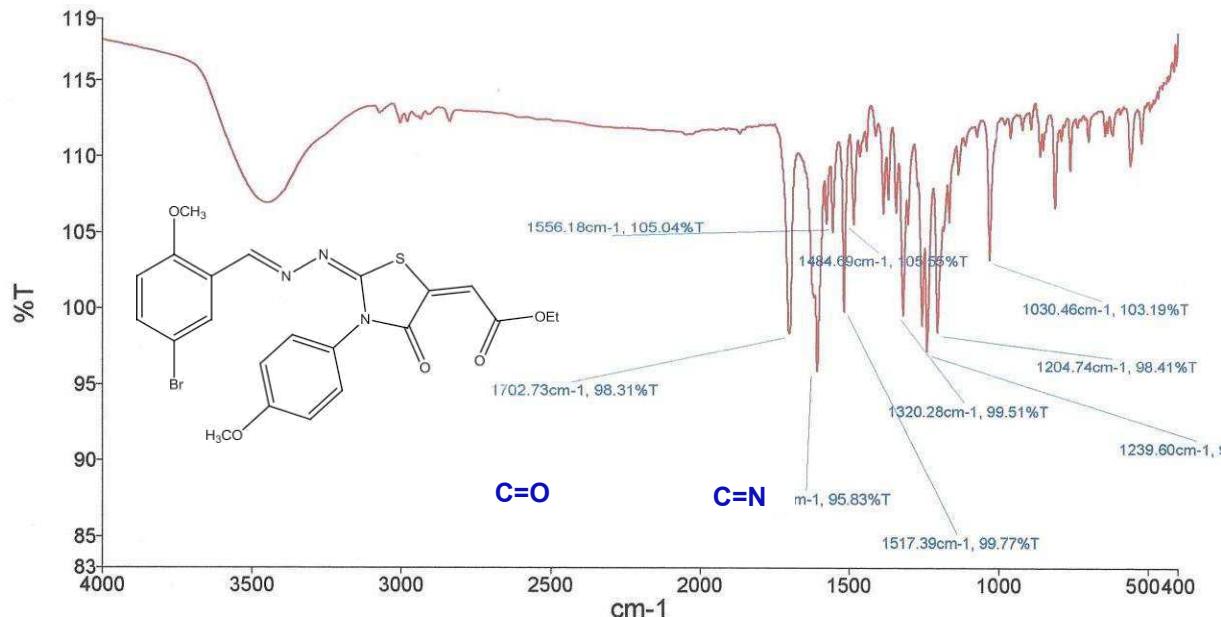
 JF-22	<chem>C22H20BrN3O4S</chem>	89	211-213	Hex/AcoEt (7 : 3) / 0,61
 JF-23	<chem>C22H20BrN3O5S</chem>	87	236-238	Hex/AcoEt (7 : 3) / 0,69
 JF-24	<chem>C21H17Br2N3O4S</chem>	82	270-272	Hex/AcoEt (7 : 3) / 0,83
 JF-25	<chem>C21H17BrN4O6S</chem>	61	248-249	Hex/AcoEt (8 : 2) / 0,72
 JF-36 (LEITE, 2016)	<chem>C21H18BrN3O5S2</chem>	76	246-248	<i>n</i> -hex.:AcEtO (6:4) / 0,44
				Continua...

 JF-38 (LEITE, 2016)	C₂₁H₁₈BrN₃O₅S	63	204-205	<i>n</i> -hex.:AcEtO (9:1) / 0,40
 JF-39 (LEITE, 2016)	C₂₂H₂₁BrN₄O₃S	79	220-221	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,50

(Fonte: o autor)

Com intuito de elucidar estruturalmente as substâncias sintetizadas, a espectroscopia na região do infravermelho foi aplicada, mostrando as principais funções orgânicas de ocorrência dos novos 4-tiazolidina éster substituído. Para análise estrutural, foi escolhido o composto JF-22 uma vez que os demais derivados apresentam semelhança estrutural. Na figura 27, a análise do espectro de infravermelho do JF-22 nos mostra o desaparecimento das bandas referentes aos estiramentos N-H, primeira das evidências de ciclização. Além disto, podemos observar um estiramento médio em 1606 cm^{-1} pertencente ao estiramento C=N bem como do surgimento de banda em 1702 cm^{-1} que evidencia a formação do estiramento lactamas (C=O), sinal que comprova a formação do anel tiazolidínico. Podemos observar as bandas típicas de função éster e demais funções para as TZD's sintetizadas, descritas em maiores detalhes na tabela 5.

Figura 27. Bandas vibracionais na região do IV do composto JF-23 indicando os principais estiramentos dos grupos presentes nas tiazolidinas.



(Fonte: o autor)

Tabela 5. Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os derivados da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilideno hidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.

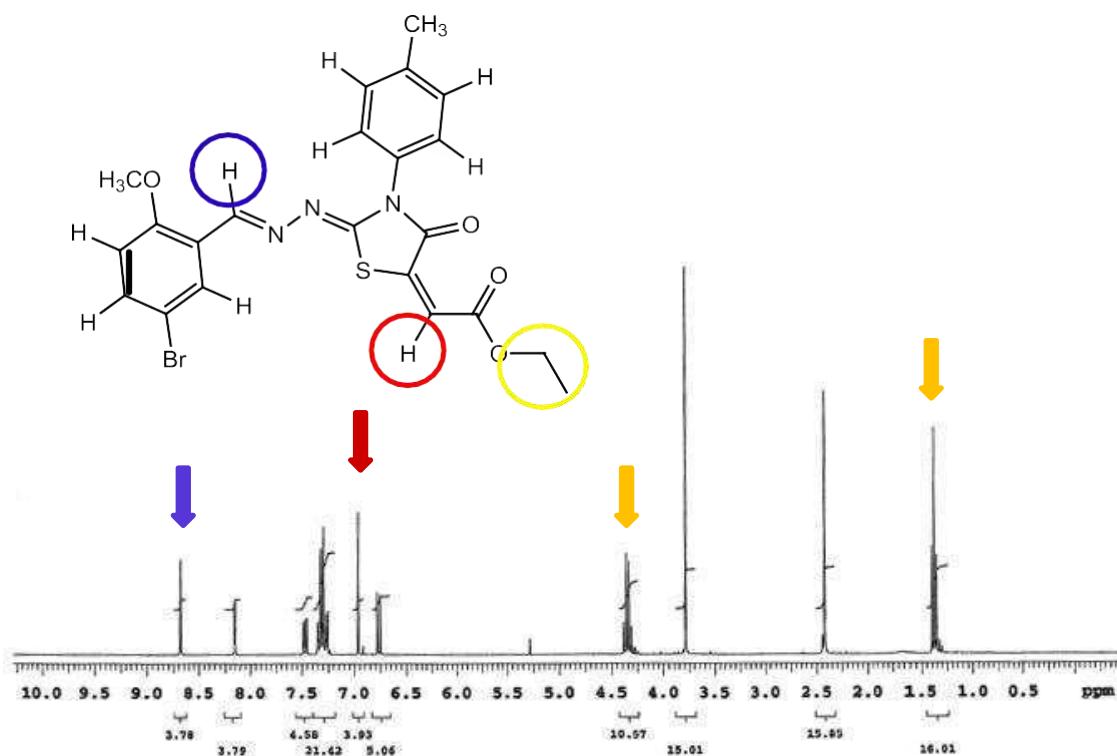
Compostos	C=O lactama	(CCO)	(C=N)	R
JF-21	1699	1025	1513	-----
JF-22	1702	1204	1606	OCH ₃
JF-23	1722	1030	1570	CH ₃
JF-24	1688	1201	1480	Br
JF-25	1704	1018	1563	NO ₂

(Fonte: o autor)

Na análise do espectro de RMN de ¹H do JF-22, um triplete em δ1,30 ppm bem como um quarteto em δ4,70 ppm evidenciam a condensação com dietilacetilenocarboxilato com sinais característicos dos grupos CH₃ e CH₂, respectivamente. Um simpleto em δ6,91 ppm caracteriza a presença de hidrogênio olefínico uma vez que ligados ao carbono α,β-carbonila tem

deslocamento químico em campo baixo. Por fim, os sinais entre δ 7,20 e 7,43 ppm bem como valores de constante de acoplamento entre 8,7-9,0 Hz caracterizam hidrogênios fenílicos e benzilidênicos. Os sinais do anel fenílico apresentam-se como dupletos com integração para dois hidrogênios, uma vez que substituição na posição *para* confere simetria molecular e por consequência equivalência química. Além deste, um simpleto encontrado em 8,62 ppm correspondente ao hidrogênio azometínico, confirmando a formação da 4-tiazolidina. (Figura 28)

Figura 28. Espectro de RMN de¹H do composto JF-22 indicando os principais sinais referentes ao grupamento etil na região de carbono sp³, simpleto olefínico e função azometínica.



(Fonte: o autor)

Os espectros de RMN de¹H das 4-tiazolidonas sintetizadas apresentam sinais e valores de constante de acoplamento semelhantes aos do composto JF-22, entretanto observa-se a ausência de um dos sinais referentes metoxila, substituído pelos Br, NO₂, CH₃ e H em *para* do anel fenílico. De forma semelhante, os sinais na região dos aromáticos apresentam mudanças devido às diferentes posições de substituição do anel benzilidênico, como o composto

38. Os valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento de todas as 4-tiazolidinas obtidas são dados na tabela 6.

Tabela 6.Principais deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados nos espectros de RMN ^1H para (*E*)-etil-2-((*Z*)-2-(*E*)-benzildienohidrazone)-3-(4-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato substituídos.

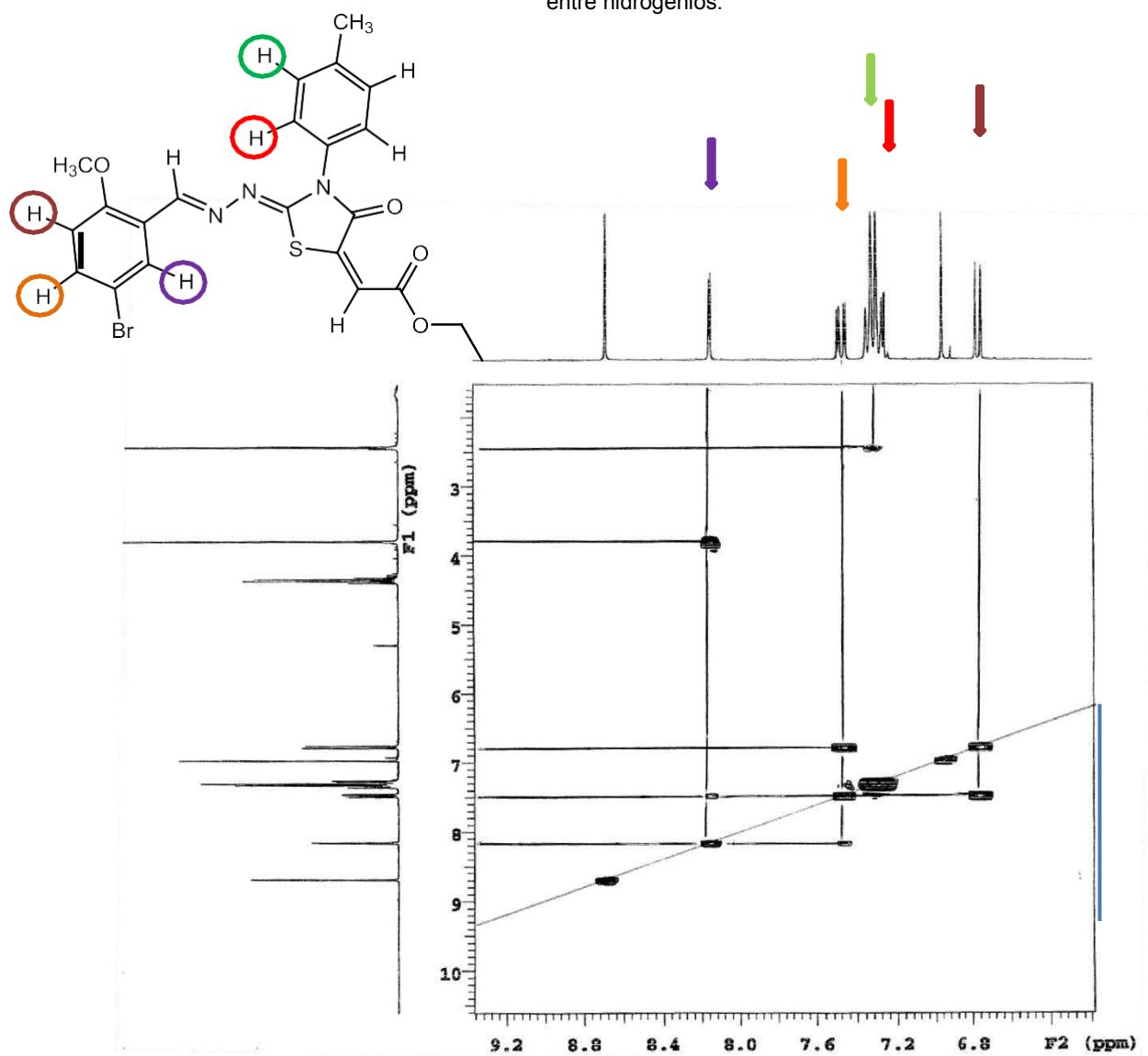
Compostos	N=CH	C=CH	CH ₂	Aromáticos	CH ₃	Outros (R)
JF-21	8.61	6.90	4.30, <i>q</i> J=7,0	6.73, <i>d</i> , J=9,3 7.40 - 7,53, <i>m</i> 7.54 – 7.57, <i>m</i> , J=8,7 8.11, <i>d</i> , J=2,4	1.31, <i>t</i> J=6,9	3.70 (OCH ₃)
JF-22	8.62	6.91	4.70, <i>q</i> J=7,2	6.70, <i>d</i> , J=9,0 7.20-7.31, <i>dd</i> , J=8,7 7.41-7.43, <i>dd</i> , J=8,7 8.12, <i>d</i> , J=2,4	1.30, <i>t</i> J=7,0	2.40 (Ph-CH ₃) 3.70 (OCH ₃)
JF-23	8.50	6.79	4.30, <i>q</i> J=7,2	7.05, <i>d</i> , J=8,7 7.41-7.42, <i>d</i> , J=8,7 7.65, <i>d</i> , J=8,7 7.93, <i>d</i> , J=2,3	1.30, <i>t</i> J=7,1	3.82, 6H (OCH ₃)
JF-24	8.61	6.90	4.30, <i>q</i> J=6,9	6.80, <i>d</i> , J=9,0 7.30, <i>d</i> , J=9,0 7.40-7.61, <i>dd</i> , J=8,7 8.10, <i>d</i> , J=2,3	1.38, <i>t</i> J= 7,0	3.81 (OCH ₃) -----Br
JF-25	8.66	7.01	4.36, <i>q</i> J=7,2	6.75, <i>d</i> , J=8,7 7.47-7.50, <i>dd</i> , J=8,7 7.62, <i>d</i> , J=9,0 8.20, <i>d</i> , J=2,4	1.38, <i>t</i> J=7,0	3.83 (OCH ₃) -----NO ₂

(Fonte: o autor)

Na intenção de confirmar os acoplamentos entre os hidrogênios tiazolidínicos, foi utilizada a técnica de COSY (homonuclear COrrelation SpectroscopY) pela qual se estabelece as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^{2-3}\text{J}_{\text{H,H}}$ (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2007).

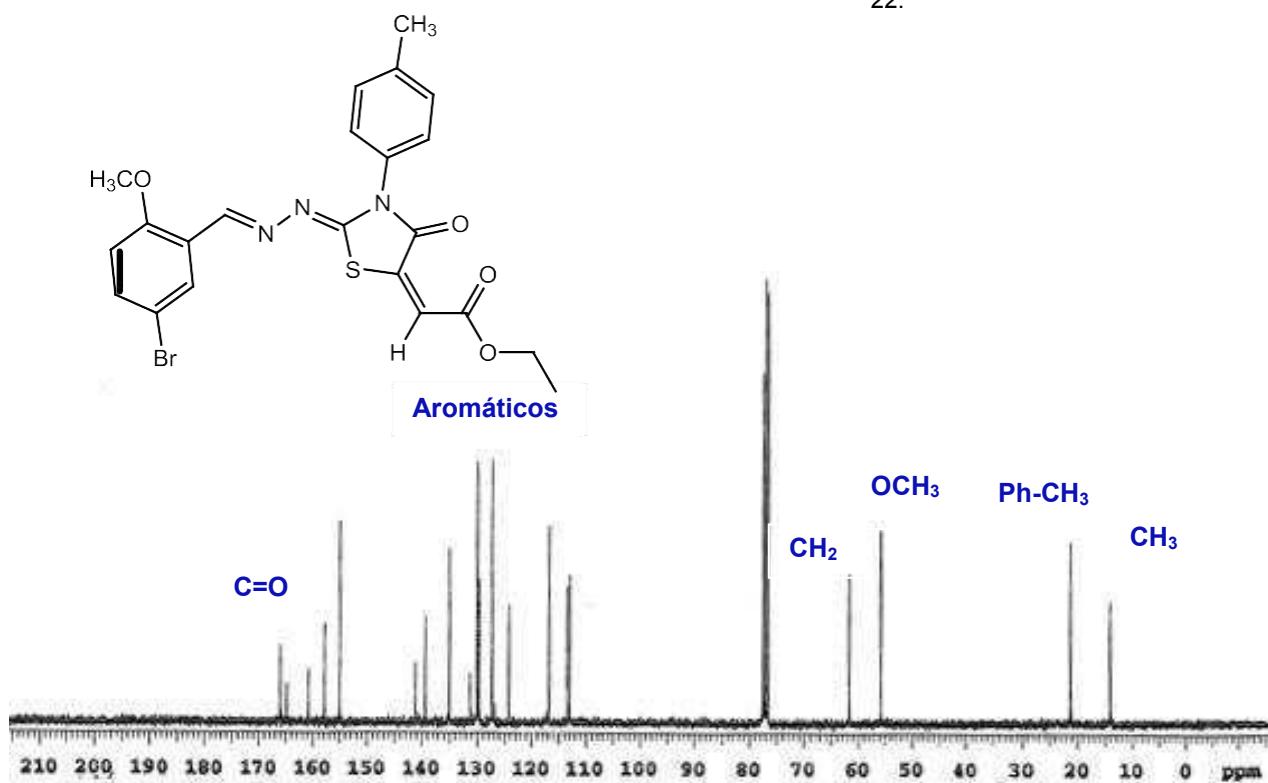
Observou-se que o acoplamento entre os hidrogênios do grupo etila (CH_2 e CH_3), devido à presença de uma correlação mútua entre os sinais referentes à esses hidrogênios. Como esperado, os simpletos presentes na estrutura do composto JF-22 não apresentaram correlações com outros hidrogênios. Nos hidrogênios benzilidênicos, foi possível verificar que o sinal em δ 7.41 ppm possuía duas correlações com os hidrogênios em δ 6.70 e 8.12 ppm, cujos valores de constante de acoplamentos foram 8,7 Hz e 2,4 Hz, confirmando sua posição *ortho* em relação a um e *meta* em relação ao outro. Da mesma forma, a ampliação evidencia acoplamento entre os hidrogênios fenílicos pela correlação estabelecida entre os hidrogênios em δ 7.20 ppm com os do grupo metila em δ 2,4 ppm (Figura 29).

Figura 29. Ampliação do espectro de RMN de ^1H COSY para o composto JF-22 mostrando as correlações entre hidrogênios.



A análise para confirmação da quantidade e tipos de carbonos presentes na estrutura dos compostos JF-21 a 39 foram realizadas utilizando a análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN de¹³C) e DEPT. O espectro de RMN de¹³C do composto JF-22 apresenta diferentes tipos de carbonos presentes no derivado tiazolidínico, sendo que destes, quatro foram encontrados abaixo da escala de 100 ppm e os demais, acima desta mesma escala (Figura 30). Os sinais em δ 14.22 e 21,30 ppm, correspondem aos carbonos CH₃ e PhCH₃, respectivamente. Além destes, foram encontrados sinais em δ 55.70 e 61.71 ppm correspondentes os grupos metoxila e metíleno, comprovados através do DEPT. No intervalo de δ 112.90 a 141.21 foram encontrados picos referentes aos carbonos aromáticos e em δ 154.91 ppm do grupo azometínico em campo baixo. Por fim, foi evidenciada a formação do composto JF-22 pelo surgimento de sinais referentes a carbonos quaternários em δ 166.1 ppm característico de grupos carbonila.

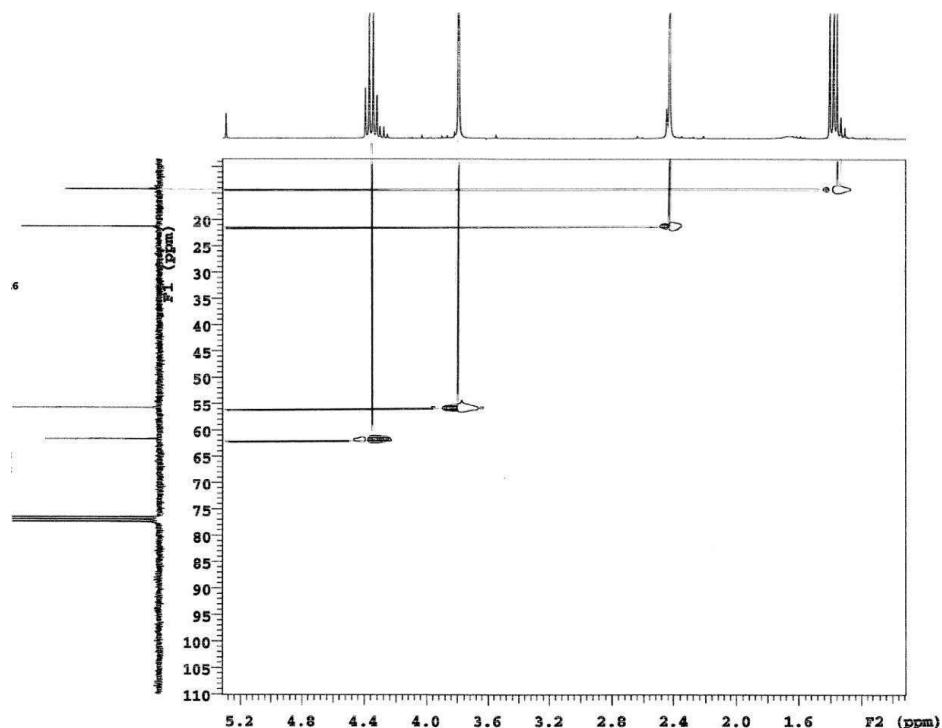
Figura 30. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN de¹³C) do composto JF-22.

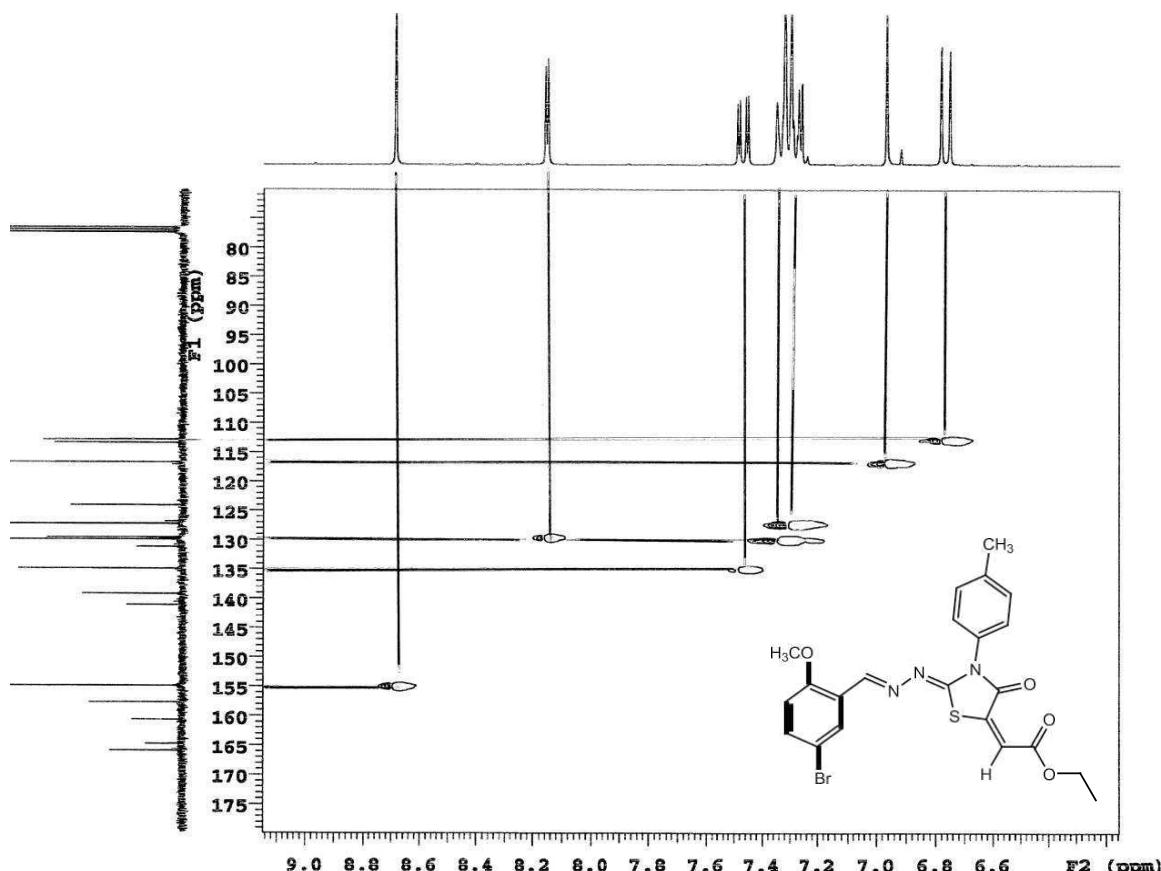


(Fonte: o autor)

Para otimizar a elucidação estrutural do derivado JF-22 foi utilizada a técnica espectroscópica de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*). Com este experimento foi possível identificar os carbonos ligados aos seus respectivos hidrogênios, pois a técnica depende dos acoplamentos $^1\text{J}_{\text{C},\text{H}}$. Desta forma, o carbono em δ 14,21 ppm está ligado ao hidrogênio em δ 1.30 ppm, da mesma forma que o carbono δ 6.70 ppm está ligado ao hidrogênio δ 4.70 ppm, evidenciando a formação da porção éster das tiazolidinas (Figura 31a). O carbono olefínico δ 116.2 ppm apresenta correlação com o hidrogênio em δ 6.70 ppm. A confirmação do carbono azometílico se deu através desta técnica espectroscópica, onde foi possível verificar a correlação existente entre o carbono em δ 154.90 ppm e o hidrogênio em δ 8.62 ppm (Figura 31b). Além destes, a ausência de correlação acima de 160 ppm confirma os picos atribuídos às carbonilas formadas após a ciclização.

Figura 31. Espectro de HSQC e sua ampliação para o composto JF-22 mostrando as correlações carbono-carbono.





Os espectros de massa, utilizando a técnica TOF (*time of flight*), corrobora com os dados obtidos de RMN e IV para caracterização dos compostos tiazolidínicos sintetizados. A espectrometria de massas é uma técnica analítica que separa e mede a relação m/z de íons e é usada como principal técnica para determinação de massa molecular com elevada exatidão. Todos os compostos sintetizados apresentaram pico do íon molecular (m/z) semelhante a massa molecular calculada no software *ChemBioDraw Ultra 12.0* (Tabela 7). A figura 33 mostra o espectro de massa obtido para o composto JF-23 no qual é possível observar o pico base com m/z= 517,8 confirmando os dados computacionais de massa molar (Figura 32).

Figura 32. Espectro de massa do composto JF-23, com pico do íon molecular em destaque.

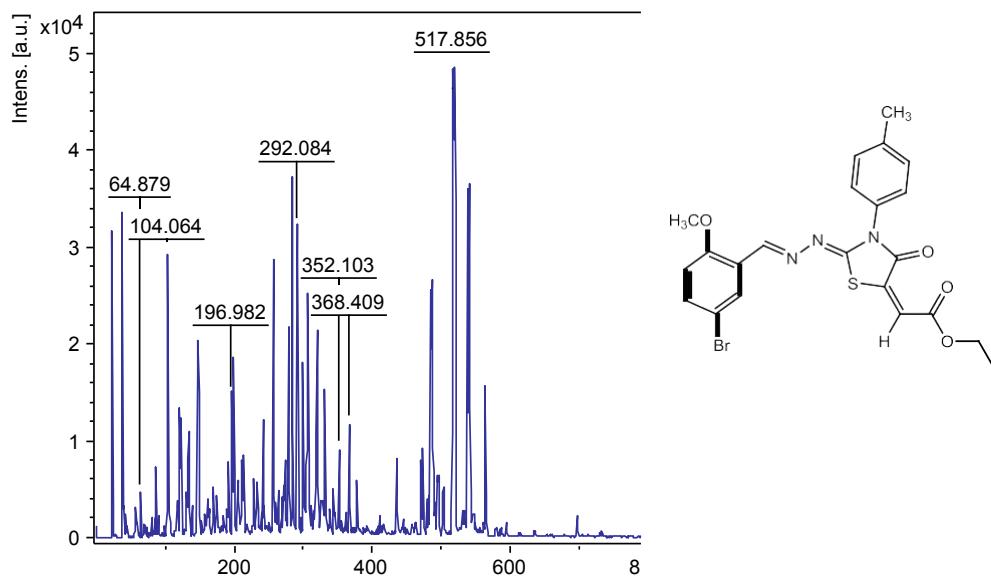


Tabela 7. Valores calculados e encontrados do íon molecular (m/z) dos derivados ésteres 4-tiazolidinas da série (E)-etyl-2-(Z)-2-(E)-benzilideno hidrona-3-(4-bromofenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.

Compostos	m/z calculado	m/z encontrado
JF-21	503,87	503,81
JF-22	501,91	501,87
JF-23	517,90	517,85
JF-24	566,86	566,89
JF-25	532,87	532,81

Fonte: Autor.

4.2 Avaliação biológica

4.2.1 Toxicidade aguda

A administração oral dos compostos tiazolidínicos não induziram efeitos toxicológicos severos. Durante a avaliação de screening hipocrático os grupos tratados apresentaram ptose e sonolência logo após a gavagem (1h). Entretanto não foi verificado óbito durante o experimento, nem mudanças nos parâmetros fisiológicos tais como consumo de água e ração além dos aspectos macroscópicos dos órgãos (Tabela 8). Entretanto uma pequena alteração no peso do fígado pode representar uma alteração nas funções hepáticas para alguns dos compostos (JF). Entretanto a análise estatística demonstrou não serem significativas às alterações observadas.

Para aferir alteração nas funções hepáticas e renais foram avaliados os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Como mostra a Tabela 9, os parâmetros hematológicos não apresentaram alteração significativa. Os parâmetros bioquímicos avaliados demonstram não haver comprometimento das funções renais (uréia e creatinina), porém os valores de ALT e AST mostraram-se alterados (Tabela 10). A alanina aminotransferase(ALT) é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim, coração e musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente plasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática. A aspartato aminotransferase(AST) é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado e músculo esquelético. Está presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo. Dentre outras causas de aumento dos níveis de AST estão a exposição à substâncias tóxicas para o fígado e diminuição do fluxo sanguíneo hepático (isquemia hepática)(SCHUMANN et. al, 2002). Embora tenham sido observadas alterações dos parâmetros hepáticos, não foram evidenciadas lesões significativas, sendo necessária análise histológica para investigação da ocorrência de danos severos.

Tabela 8. Efeito dos compostos tiazolidínicos sobre parâmetros fisiológicos e índice de órgãos.

Grupo	Índice (mg/Kg)			Consumo		Peso Corporal (g)	
	Fígado	Baço	Rim	Ração (g)	Água (mL)	Inicial	Final
Controle	46,99 ± 5,16	5,42 ± 0,52	12,01 ± 1,45	19,07 ± 5,37	40,83 ± 8,49	32,63 ± 2,88	33,97 ± 3,33
JF-21	38,15 ± 1,24*	4,98 ± 1,37	10,24 ± 0,84	27,46 ± 6,94*	45,76 ± 7,38	41,36 ± 2,40*	40,16 ± 1,42*
JF-22	56,35 ± 6,70*	5,69 ± 1,39	11,24 ± 0,41	17,90 ± 2,66	35,30 ± 9,92	27,80 ± 2,85	34,01 ± 3,63
JF-23	53,11 ± 8,05*	6,01 ± 0,95	11,82 ± 1,03	17,48 ± 3,12	31,12 ± 10,60	31,20 ± 1,46	33,47 ± 3,33
JF-24	54,23 ± 8,11*	6,32 ± 0,28	11,18 ± 0,78	18,29 ± 3,03	35,07 ± 10,15	27,80 ± 2,85	33,60 ± 4,35
JF-25	51,03 ± 8,33	5,93 ± 1,04	10,89 ± 0,62	31,40 ± 4,41*	37,50 ± 11,86	39,73 ± 1,83*	36,18 ± 3,99
JF-36	46,88 ± 6,80	5,29 ± 0,65	10,45 ± 0,24	33,03 ± 4,85*	37,41 ± 11,89	41,20 ± 2,06*	39,81 ± 1,63*
JF-38	55,13 ± 6,75*	6,29 ± 0,69	11,31 ± 0,53	17,30 ± 2,90	31,30 ± 13,44	31,90 ± 1,92	33,65 ± 3,02
JF-39	54,78 ± 3,75*	5,21 ± 0,59	11,24 ± 0,72	28,70 ± 8,59*	42,10 ± 8,73	36,43 ± 1,88	37,98 ± 1,86

Valores expressos em média ± DP. (N = 6). *p < 0,05 vs controle. ANOVA, teste de Bonferroni. Índice dos órgãos = peso do órgão (mg) / peso corporal final

Tabela 9. Efeito dos compostos tiazolidínicos sobre parâmetros hematológicos.

Parâmetros	Controle	JF-21	JF-22	JF-23	JF-24	JF-25	JF-36	JF-38	JF-39
Hemárias ($10^6/\text{mm}^3$)	13,0± 0,90	13,21±0,60***	12,63 ± 0,58	11,9±1,02*	11,3±0,76*	13,13± 0,72	10,25±1,99*	13,26±1,30	12,25±0,73
Hemoglobina (g/dL)	14,5± 0,60	15,58 ± 0,32	15,86± 0,42	14,8 ± 0,72	13,9 ± 0,73	15,34± 0,43	14,56±0,78	13,26± 1,61	14,88± 0,53
Hematócrito (%)	73 ± 4,24	44,42±1,33***	46,20 ± 1,82	66 ± 5,87	61 ± 6,21**	42,78±1,91***	51,60± 5,08	44,16±0,66***	43,4±1,64***
VCM (μg)	57 ± 3,01	51± 1,22*	50,80± 0,83*	55 ± 2,04	55 ± 3,81	49,4± 0,89*	53,6 ± 1,94	52,52±0,83	50,00±2,54*
HCM (pg)	11,2± 0,53	17,74± 0,56**	17,30±0,32**	12,4 ± 1,13	12,7 ± 1,29	17,89± 0,62**	15,60±2,03*	16,94±0,57**	17,68±0,68**
CHCM (%)	19,5± 0,88	34,78± 0,78**	34,66±0,89**	22,5± 2,15*	35,38±0,80**	23,1± 2,17*	23,62±1,81*	34,18±0,17**	35,12±0,68**
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	9,97± 4,64	8,90 ± 0,07	13,03± 0,52*	10,3 ± 2,48	14,20±1,03*	9,17±0,31	13,26±2,06*	11,47± 1,88	14,88±0,52**

Valores expressos em média ± D.P. (n=6). *p < 0,05; **p < 0,01, ***p< 0,001 vs controle. ANOVA,teste de Bonferroni. HCM - Hemoglobina corpuscular média;CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular;VCM - Volume corpuscular médio.

Tabela 10. Efeito dos compostos tiazolidínicos sobre parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Controle	JF-21	JF-22	JF-23	JF-24	JF-25	JF-36	JF-38	JF-39
Creatinina (mg/dL)	0,25 ±0,05	0,33±0,07	0,37±0,05	0,27 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,32 ±0,07	0,40±0,01	0,45±0,02	0,43±0,05
Uréia (mg/dL)	49,5 ±6,28	44,66±8,08	49,33±6,42	54 ± 5,20	57,33 ± 1,53	52,00±5,29	66,67±1,07*	52,33±8,08	47,88±5,09
AST (U/L)	87 ± 8,85	128±1,31****	127,33±21,76	91 ± 3,53	73,33±5,11	84,0±8,18	108,33±10,01***	75,33±1,91	109,66±10,7***
ALT (U/L)	38 ± 2,89	50,66±2,51**	46,0±4,58	61±6,35***	52 ± 2,57**	58,33±2,67**	40,0±2,64	34,0±6,24	35,46±3,60

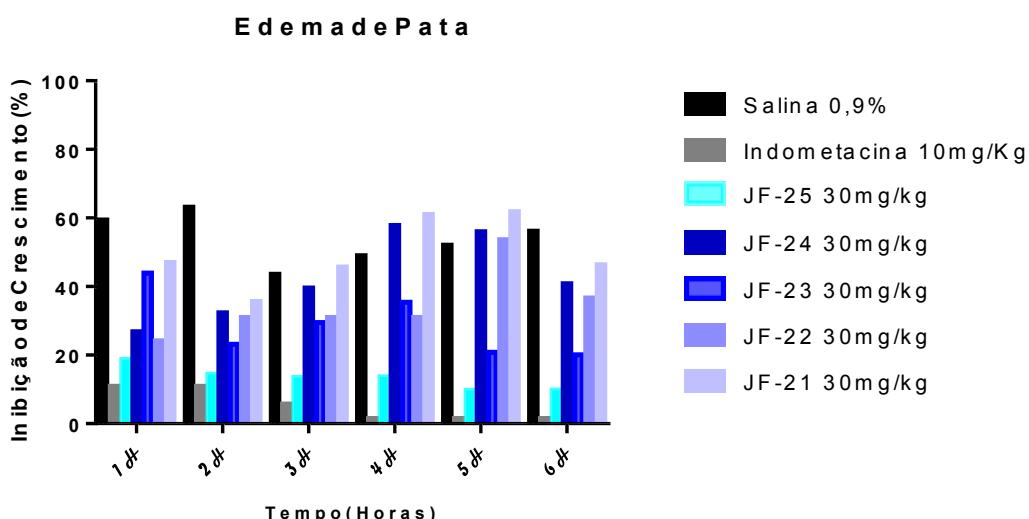
Valores expressos em média ± D.P. (n=6). **p < 0,01;***p< 0,001;****p < 0,0001 vs controle.
ANOVA, teste de Bonferroni.

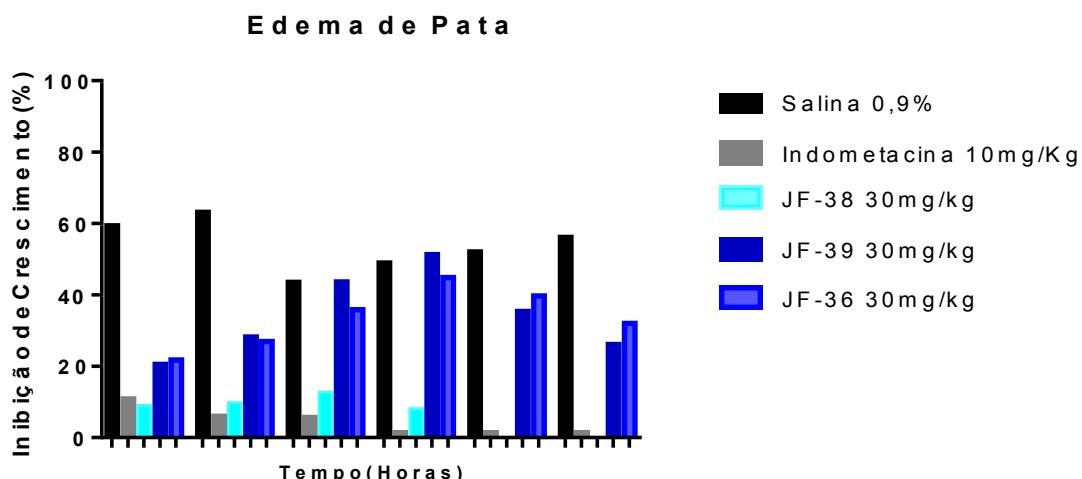
4.2.2 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema de pata em camundongos tem sido bastante utilizado na pesquisa como triagem na seleção de novas drogas. A inflamação induzida pela carragenina é um ensaio que revela a atividade anti-inflamatória de compostos submetidos à triagem farmacológica avaliando a ação de mediadores no processo inflamatório (PUTTASWAMY *et al.*, 2018). A reação inflamatória aguda induzida pela carragenina é caracterizada pela exsudação de proteínas fluidas e plasmáticas e demonstra indução progressiva do edema atingindo seu máximo dentro de 3 h (MATSUMOTO *et al.*, 2015). Os primeiros 90 minutos ocorrem à liberação associada de histamina e serotonina; a segunda fase (até 150 minutos) é iniciada pela liberação de cininas que induzem aumento na permeabilidade vascular; enquanto na terceira fase, de 150 minutos em diante, caracteriza-se pela liberação de PGs com um pico máximo na terceira - quarta hora (ocorrendo infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares) (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; MOTA, 2013).

A figura 33 mostra o gráfico de dados obtidos no teste de edema de pata induzido por carragenina dos derivados tiazolidínicos. Dentre os compostos testados os compostos JF-25 e JF-38 apresentaram os melhores resultados na ação anti-inflamatória. A dose de 30 mg/kg causou inibição do edema ao longo das 6 horas da resposta inflamatória, com resultados estatisticamente similares ao da indometacina.

Figura 33. Inibição do edema de pata dos derivados JF-21 a 25 e JF-36 a 38 na dose de 30 mg/kg.





Dados representam a média ± DPvolume do edema(mL) nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção de carragenina a 1% (N=5);

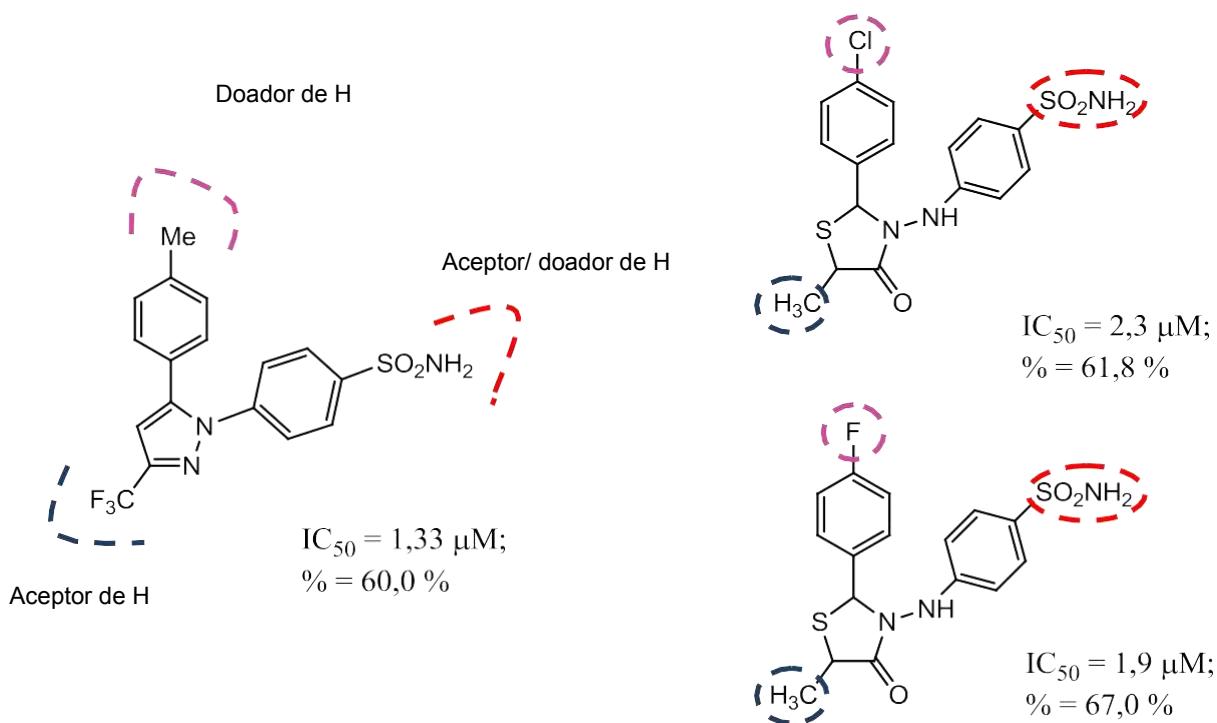
Os compostos JF-25 e JF-38 apresentaram valores de inibição do edema variando entre 52,26 a 71,0% (JF-25) e 75,35% a 100% (JF-38) (Tabela 12). O composto JF-23 mostrara significância da 5h e 6h, sendo a 6º hora a de maior expressão do efeito antiedemotogênico com 55,52%. Os compostos JF-22 mostrou percentual de inibição significativa entre 47,64% a 51,42% da 2º hora a 4º hora, o que pode sugerir ação sobre os mediadores que agem nas primeiras horas do processo inflamatório. Quanto aos compostos JF-21, 36 e 39 não demonstrou supressão relevante ao longo de todo o experimento. A análise dos dados de inibição do edema de pata sugere a ação dos compostos tiazolidínicos principalmente sobre os mediadores inflamatórios de segunda fase provenientes da COX-2. A inibição da indução do processo anti-inflamatório da substância foi estimada em termos de percentual de inibição, calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Percentual de Inibição do Processo Anti-inflamatório (\%)} = [(n-n')/n] \times 100$$

Onde, n e n' indicam a média ± erro padrão do volume do edema nos grupos controle negativo e grupo teste de cada composto testado em cada hora, respectivamente (LEITE, 2016 *apud*PALASKA et al., 2002).

Em 2016, Abdellatif *et al.*, relataram a importância de derivados 4-tiazolidinona com substituintes halogenados na obtenção de novos anti-inflamatórios. De acordo com seus estudos, os grupos tiazolidinas fornecem uma estrutura-base capaz de fornecer aceptores de hidrogênio, bem como ligar-se a estruturas aromáticas substituídas que participam especificamente com os sítios ativos. Dos derivados sintetizados, os compostos 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-clorofenil)-5-metil-4-tiazolidinona e 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-fluorofenil)-5-metil-4-tiazolidinona foram os que mostraram melhores resultados de IC₅₀ (Cl= 2,3 μM; F= 1,9 μM) frente a COX-2 (Figura 35). Os testes de edema de pata induzido por carragenina revelaram o potencial anti-inflamatório destes compostos (Cl= 61,8%; F= 67,0%) uma vez que foram obtidos percentuais maiores que o fármaco padrão na terceira hora de experimento (celecoxibe = 60,1%).

Figura 35. Estrutura atividade do 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-clorofenil)-5-metil-4-tiazolidinona, 3-(4-aminosulfonilfenilamino)-2-(4-fluorofenil)-5-metil-4-tiazolidinona e celecoxibe.

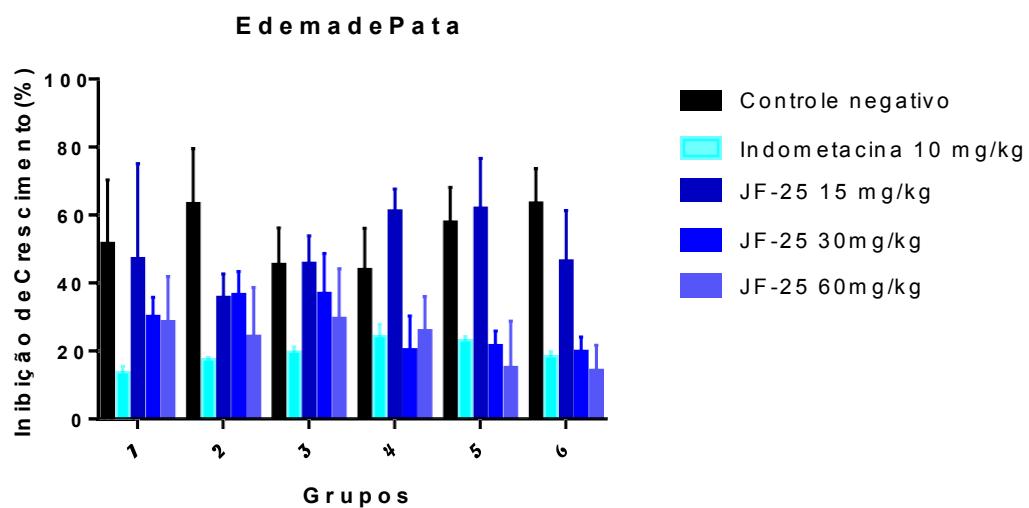


(Fonte: Adaptado de ABDELLATIF *et. al.*, 2016.)

A fim de avaliar a relação dose-dependência dos derivados JF-25 e JF-38, estes foram testados utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina nas doses de 15 mg/kg e 60 mg/kg. O composto JF-25 apresentou crescente inibição conforme aumentada dose, sendo os melhores percentuais de inibição observados da 4^º a 6^º hora. Desta forma, o experimento nos revela que, quando administrado na dose 60 mg/kg, o JF-25 apresenta melhor efeito antiedemogênico. Em contra partida, o composto JF-38 embora mostre redução no percentual de inibição na dose de 15 mg/kg, não demonstrou diferença estatística entre as doses de 30 e 60 mg/kg, com percentuais de inibição de 89,45% e 92,14%, respectivamente.

Embora sejam inúmeras as causas de diferentes respostas anti-inflamatórias para distintas doses administradas, Batista et al. assim como Dutra et al., descrevem que solubilidade e via de administração, que por sua vez interferem na biodisponibilidade e metabolização de compostos bioativos, são fatores importantes para ação biológica de novas drogas (DUTRA et al., 2006; BATISTA et al., 2016).

Figura 34. Inibição do edema de pata dos derivados JF-25 e JF-38 nas doses de 15 e 60 mg/kg.



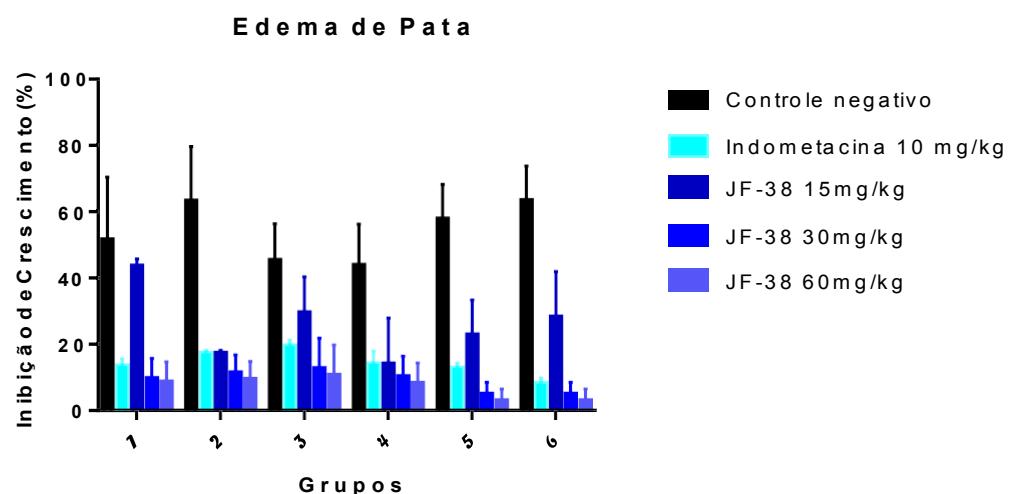


Tabela 11. Percentual de inibição do edema de pata dos derivados 4-tiazolidinas da série (E)-etil-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrona)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.

Horas	Indometacina10mg/Kg	JF-21 30mg/Kg	JF-22 30mg/Kg	JF-23 30mg/Kg	JF-24 30mg/Kg	JF-25 30mg/Kg	JF-38 30mg/Kg	JF-36 30 mg/kg	JF-39 30 mg/Kg
1	81,73%	36,94%	27,81%	29,48%	14,03%	52,26%	83,14%	26,17%	29,19%
2	82,37%	44,06%	37,64%	43,57%	27,58%	59,06%	84,51%	16,62%	15,79%
3	86,85%	0,32%	35,04%	30,04%	27,94%	52,82%	75,35%	12,47%	24,73%
4	97,14%	13,6 %	21,42%	52,54%	13,68%	65,53%	87,50%	9,34%	32,22%
5	97,30%	27,94%	21,82%	46,89%	17,97%	71,00%*	100%**	27,55%	38,21%
6	97,50%	17,15%	38,69%	55,52%	19,04%	67,63%	100%**	9,72%	32,62%*

Tabela 12. Média de crescimento do edema de pata dos derivados 4-tiazolidinas da série (E)-etil-2-((Z)-2-(E) benzilidenohidrona)-3-(4-R-fenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato

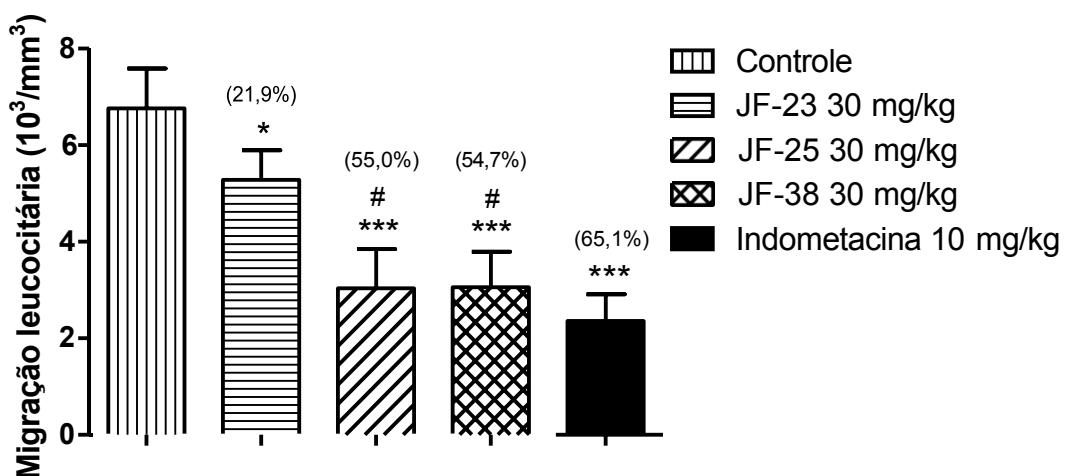
Horas	Salina 0,9%	Indom. 10mg/Kg	JF-25 30mg/Kg	JF-24 30 mg/kg	JF-23 30mg/Kg	JF-22 30mg/Kg	JF-21 30mg/Kg	JF-36 30mg/Kg	JF-38 30mg/Kg	JF-39 30mg/Kg
1	59,39 ± 10,59	10,8 ± 2,7	18,67 ± 2,6***	26,77 ± 3,41	43,91 ± 2,4	36,9 ± 5,0*	46,97 ± 8,6****	29,91 ± 3,15	8,73±3,5***	30,76 ± 1,98
2	63,09 ± 7,32	10,8 ± 0,0	14,34 ± 3,7**	32,32 ± 4,18	23 ± 6,8****	36,1 ± 8,1**	35,66 ± 3,7**	34,35 ± 2,98	9,45± 4,1**	28,21 ± 2,55
3	43,53 ± 5,06	5,7 ± 2,6	13,44 ± 7,6	39,52 ± 2,50	29,47 ± 5,8	30,9 ± 6,0	45,59 ± 3,0	42,84 ± 1,55	12,40± 7,2	43,59 ± 3,29
4	48,96 ± 6,59	1,4 ± 1,4	13,65± 3,5**	57,83 ± 2,82*	35,33 ± 4,3*	23,7 ± 7,2**	60,98 ± 5,7	49,87± 2,53	7,76± 3,0*	51,28 ± 3,37
5	52,03 ± 6,53	1,4 ± 1,4	9,71 ± 6,0***	55,93 ± 0,89***	20,82 ± 5,1**	53,6 ± 2,8***	61,82 ± 8,2	43,74± 3,53**	0	37,18±3,44***
6	56,13 ± 7,17	1,4 ± 1,4	9,81 ± 2,8****	40,78 ± 4,62	20,07 ± 4,4	36,6 ± 4,7****	46,29 ± 8,6	32,05 ± 0,53	0	29,64 ±2,14*

4.2.3 Bolsão de ar

O modelo experimental de bolsão de ar é um importante teste para estudar a inflamação aguda. A administração de carragenina por via subcutânea, na bolsa de ar, induz uma rápida resposta inflamatória caracterizada pelos altos níveis de prostaglandinas e leucotrienos no exsudato presente. Este agente flogístico é amplamente utilizada por induzir a migração de neutrófilos e por ter uma intensa ação quimiotática. Além disso, desencadeia uma inflamação aguda associada à hiperalgesia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas e tromboxanos (MOTA, 2013; ROCHA et al., 2007).

Os compostos JF-25 e JF-38 apresentaram melhores resultados no teste de edema de pata, em razão disso foi realizada avaliação sobre o efeito desses compostos sobre a migração leucocitária. Os compostos demonstraram significativa atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparados ao controle. A dose testada de 30 mg/kg apresentou-se estatisticamente semelhantes ao fármaco padrão, a indometacina (Figura 35).

Figura 36. Efeito dos derivados tiazolidínicos sobre a migração leucocitária.

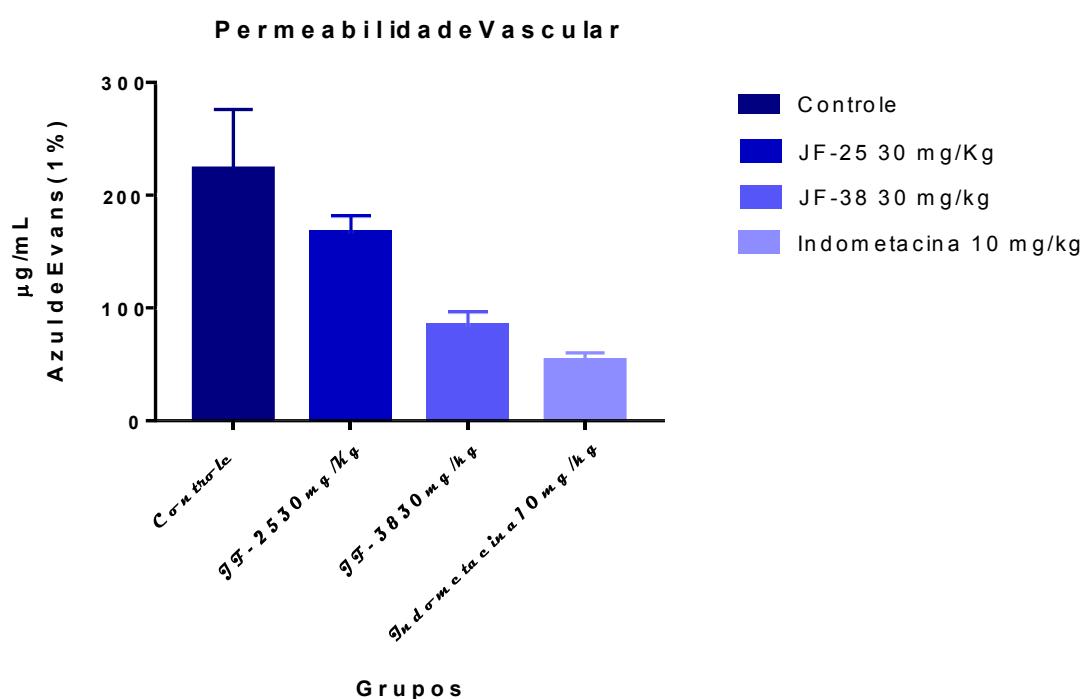


Dados representados como média ±desvio padrão da migração de polimorfonucleares. * $P<0,05$ vs controle. *** $P<0,001$ vs controle. # - não significativo em comparação à indometacina.

4.2.4 Permeabilidade vascular

Com o intuito de avaliar a participação de aminas vasoativas (histamina, bradicinina, serotonina) e formação de edema na resposta anti-inflamatória dos derivados, utilizou-se o teste de permeabilidade vascular induzida por ácido acético. O aumento da permeabilidade vascular acarretou extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular, característica esta fundamental da inflamação aguda. A perda de proteína do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta à pressão osmótica no fluido intersticial. Os compostos JF-25 e JF-38 produziram uma inibição da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em relação ao grupo controle. Dentre os derivados, o JF-38 apresentou maior inibição sendo estatisticamente semelhante à indometacina (Figura 36). Os resultados do bolsão de ar corroboraram com os dados obtidos no edema de pata, uma vez que nas primeiras horas o JF-38 apresentou maiores valores de inibição de edema.

Figura 36. Efeito dos compostos tiazolidinicos sobre o aumento da permeabilidade vascular.



Dados representam a média ± DP(N=5); **P<0,01; ****P<0,0001 v.s Controle. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.3 Análise de Docking

O docking molecular é uma técnica computacional que nos permite obter um *screening* virtual de substâncias que apresentem promissora interação com o sítio ativo característico de uma dada atividade biológica. Comumente é usada como etapa inicial no desenvolvimento de novos fármacos, entretanto vem sendo usado, entre outras coisas, como ferramenta para determinar a orientação de um bioativo com seu alvo, calcular afinidade ligante – receptor, simular as interações possíveis entre um alvo molecular e moléculas bioativas além do gasto energético envolvido nestas interações (BARROS, 2015; RATHORE *et al.*, 2017).

A análise de docking nos permite prever quais interações possíveis das moléculas bioativas testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo. Os resultados são dados em termos da energia de ligação, dessa forma, a quantidade de energia necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo molecular reflete na atividade biológica desta molécula. Quanto mais fácil for a interação entre o composto e o alvo, ou seja, quanto mais estável for o complexo formado, menor será a energia necessária para que esta interação ocorra em geral isso reflete num melhor atividade biológica. Entretanto nem sempre há coincidência entre a melhor atividade biológica de uma molécula e sua melhor interação com seu receptor, uma vez que na análise de docking inúmeros confôrmeros das moléculas testadas são avaliadas quanto sua interação com sítio ativo (LI *et al.*, 2017; OMAR *et al.*, 2018b).

A fim de analisar as interações entre os derivados tiazolidínicos obtidos neste trabalho com seu receptor, foi realizado um estudo de docking dos compostos JF-25 e JF-38 com COX-2, uma vez que os dados experimentais obtidos usando modelos anti-inflamatórios demonstram melhor ação destes compostos via inibição da síntese de prostaglandinas. O composto JF-21 foi analisado por docking a fim de analisar a contribuição dos substituintes aromáticos na formação do complexo ligante-receptor. A COX-2 (3LN1) utilizada contém quatro cadeias simétricas com diferentes ligantes. A cadeia A

foi empregado para estudos atuais de docking dos JF's. Para realização dos estudos, o ligante Celecoxibe foi retirado da estrutura cristalográfica do complexo COX-2/ celecoxibe.

A análise estrutural do complexo indicou interação seletiva do coxibe, principalmente com os aminoácidos Arg106, Val509, Ala513, Leu338 e Tyr341. Os compostos JF-21, JF-25 e JF-38 apresentaram interações semelhantes às observadas no celecoxibe para conformação com menor energia de ligação de -10.82 kJ/mol, -10.38 kJ/mol e -9.08 kJ/mol, respectivamente como mostra a tabela 13.

Tabela 13.Dados do estudo de docking dos derivados JF-21, JF-25 e JF-38, interações estruturais.

Composto	Energia de ligação kcal mol ⁻¹	Interações				
		Ligação de Hidrogênio	π-alquil Alquil	π-sigma	π-stacking	Outros
JF-21 Ar ₁ = 2-OCH ₃ /5-Br Ar ₂ = H	-10.82	Arg ¹⁰⁶ Tyr ³⁴¹	Leu ³³⁸ ,Leu ³⁴⁵ Tyr ³⁷¹ ,Leu ⁵¹⁷ Ala ⁵¹³ ,Ala ⁵⁰² Val ³³⁵ , ILe ³³¹ Trp ³⁷³ ,Val ¹⁰²	Val ⁵⁰⁹		Ser ³³⁹
JF-25 Ar ₁ = 2-OCH ₃ /5-Br Ar ₂ = NO ₂	-10.38	Arg ¹⁰⁶ Tyr ³⁴¹ Ser ⁵¹⁶	Leu ³³⁸ ,Phe ⁵⁰⁴ Tyr ³⁷¹ ,Leu ⁵¹⁷ Ala ⁵¹³ , Val ³³⁵	Val ⁵⁰⁹		Met ⁵⁰⁸
JF-38 Ar ₁ = CF ₃ Ar ₂ = Br	-9.08	Arg ¹⁰⁶ Tyr ³⁴¹ Ser ⁵¹⁶	Leu ⁵¹⁷ Leu ⁵²⁰ Ala ⁵¹³ Tyr ³³⁴	Val ⁵⁰⁹ Leu ³³⁸ Ser ³³⁹ Val ³³⁵	Leu ³³⁸	Met ⁵⁰⁸ (Br) Tyr ³⁴¹ (S)

Fonte: O autor

O modo de ligação do confôrmero JF-21 com o sítio ativo da COX-2 ocorre, principalmente, através de ligações de natureza hidrofóbicas, presentes entre a região dos aromáticos e grupos alquilicos. Além destas podemos observar ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do anel metóxi e os aminoácidos Arg106 e Tyr341 (Figura 38). Para este composto, a análise de

docking mostra que ligação molécula–receptor ocorre através interações fracas, embora possua menor energia de ligação, o que poderia justificaria sua baixa eficácia quanto à ação anti-inflamatória obtido *in vivo*.

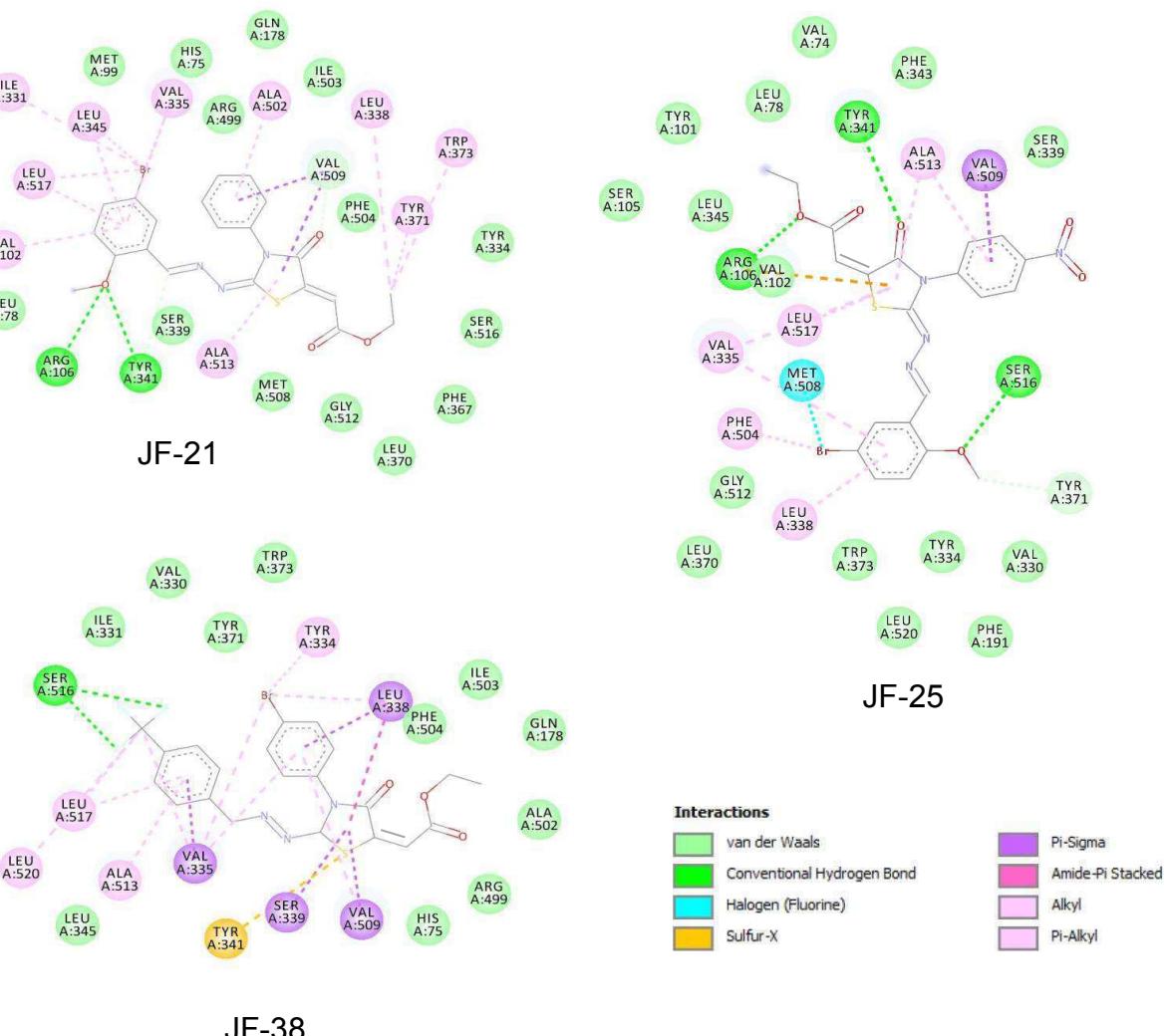
O conformero JF-25 apresenta modo de ligação com menores interações hidrofóbicas com sítio ativo da COX-2 sendo observadas interações π -aquilica entre aminoácidos Leu338, Phe540, Val335, Leu 517 e Ala513. Em contrapartida são formadas três ligações de hidrogênio entre a substância e o receptor. Uma ligação entre o grupo metóxi do anel benzildênico com o aminoácido Ser516, uma ligação entre a porção éster com o aminoácido Arg106 e uma entre a carbonila do anel tiazolidínico com o aminoácido Tyr341 (Figura 38). É possível perceber que a análise de docking evidencia que a porção NO₂ não estabelece interação com sítio ativo do receptor. Em 2017, Rathore et al., descreve um estudo de docking no qual o grupo nitro expressa melhores interações com o sítio ativo da COX-2 quando ocupa a posição *ortho* em comparação a posição *para*. Embora apresente menos interações que o composto JF-21, o derivado JF-25 apresenta interações mais significativas, o que pode justificar sua eficácia relativa na ação anti-inflamatória.

As interações estabelecidas entre o receptor e o derivado JF-38 demonstram serem melhores quando comparadas as dos compostos JF-21 e JF-25. Dos compostos testados, o JF-38 é que apresenta semelhança de estrutural com o celecoxibe, uma vez que ambos apresentam dois anéis aromáticos e um heterocíclico pentagonal, cujos substituintes se assemelham. Da mesma forma que no celecoxibe, a presença do grupo CF₃ demonstrou ser significativa, pois através do qual foi estabelecida ligação de hidrogênio dos átomos de flúor com o aminoácido Ser516. A região dos aromáticos foi responsável por estabelecer a interações com o bolsão hidrofóbico da COX-2 através dos resíduos de aminoácido Leu517, Leu520, Ala513 e Tyr334. Verifica-se quatro interações π -stacking estabelecida entre o anel tiazolidínicos e os aminoácidos Leu338, Val509, Ser339 e Val335 (Figura 37).

A análise dos modos de ligação dos derivados tiazolidínicos com a COX-2 demonstra semelhança de interação com o sítio ativo quando comparados ao celecoxibe, fato este que corroboram com dados obtidos experimentalmente

para ação anti-inflamatória, o que demonstra a importância dos derivados tiazolidinicos na estrutura de promissores fármacos anti-inflamatórios.

Figura 37. Imagem 2D das interações entre os compostos JF-21, JF-25 e JF-38 com a COX-2.

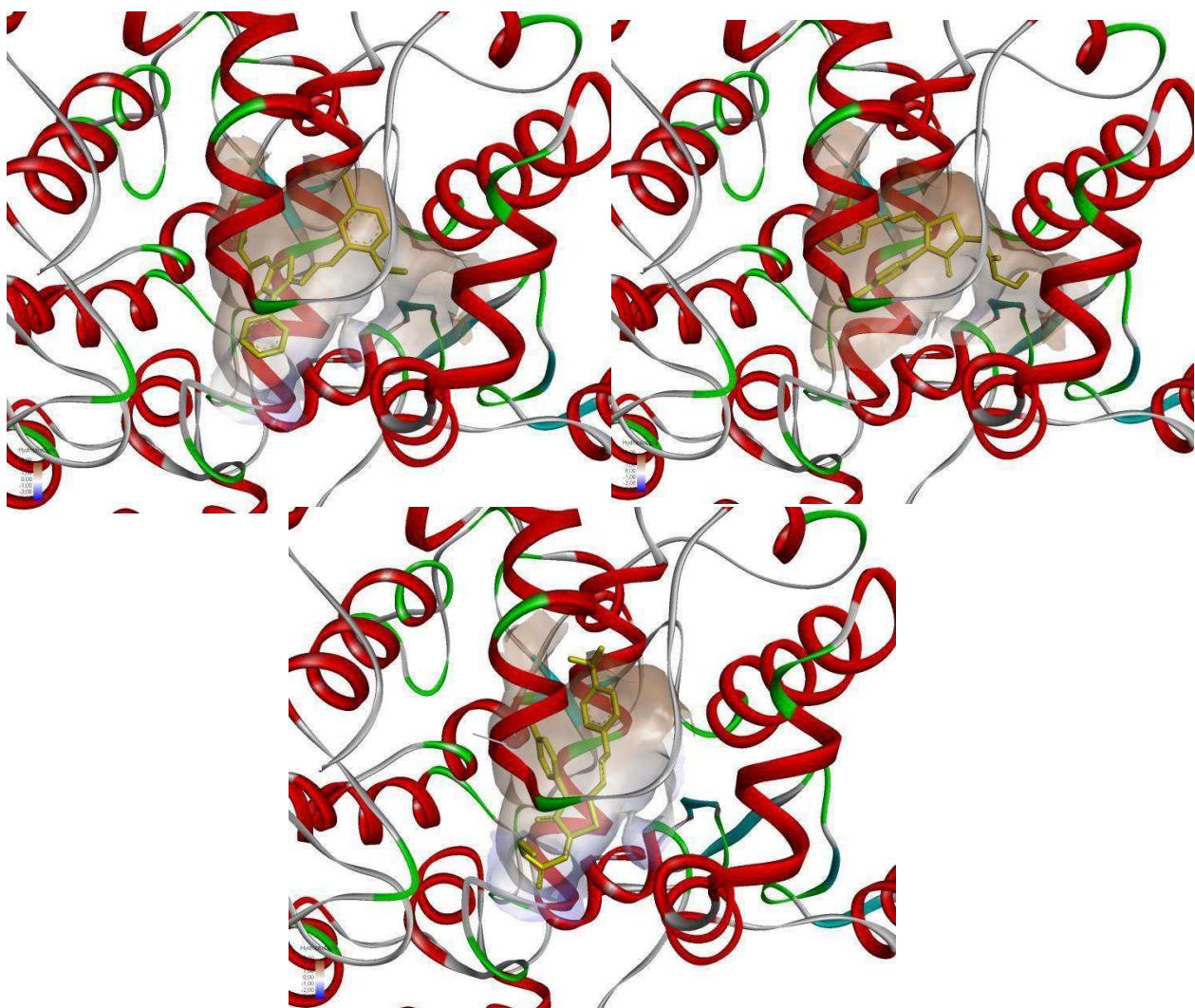


Fonte: O autor

De maneira geral o estudo de docking nos permite observar a importância do design de moléculas cujo alvo seja inibição do COX-2. A presença de substituintes específicos, tais como o grupo CF_3 e a presença de halogênios como relata estudos anteriores (ABDELLATIF et al., 2016; ALI et al., 2017). A presença do anel tiazolidínico conjugado ao sistema demonstra um favorecer mais e melhores interações. Estas por sua vez poderão acarretar numa melhor resposta anti-inflamatória via COX-2. As interações hidrofóbicas são predominantes nas três substâncias analisadas como pode-se observar na

projeção 3D do JF-21, JF-25 E JF-38 com a COX-2, como mostra a figura 38. O mapa de cores nos permite visualizar que interações hidrofóbicas (marrom) quando comparadas as interações hidrofílicas (azul) ocorrem nas mesmas regiões para os tres derivados. Embora exista outros mecanismos envolvidos no processo inflamatorio, sabe-se que o via COX representa um dos mais importantes. Sendo assim, os derivados tiazolidínicos, como mostra a literatura e os estudos realizados este trabalho, são de suma importância na síntese de novos anti-inflamatorios sendo necessário maiores investigações quanto ao seus mecanismos de ação.

Figura 38. Imagem 3D das interações dos compostos JF-21, JF-25 E JF-38 com a COX-2, mostrando o mapa representativo de interações hidrofóbicas e hidrofílicas.



Fonte: O autor

5 CONCLUSÃO

Os derivados obtidos da série (E)-etyl-2-((Z)-2-(E)-benzilidenohidrazona)-3-(4-bromofenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno)-acetato substituídos (JF-21/22/23/24/25/36/38/39) foram sintetizados com êxito através de uma boa rota sintética, obtendo-se rendimentos reacionais satisfatórios. Além disso, todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas de espectroscopia espectral (RMN ^1H , RMN ^{13}C , IV, EM) demonstrando a eficácia da rota reacional escolhida em comum reproduzibilidade.

A avaliação da atividade anti-inflamatória revelou a importância de substituintes aceptores de elétrons, tais como $-\text{CF}_3$ e Br, ligados aos aromáticos e da estrutura esqueleto das tiazolidinas na inibição dos mediadores do processo inflamatório, especialmente da COX-2, uma vez que os derivados JF-25 e JF-38 apresentaram maiores valores de inibição do edema de pata induzido por carragenina. Estes derivados ainda demonstraram uma relação dose-dependência na qual o crescimento do edema provou ser inversamente proporcional a dose administrada para composto JF-25 e não revelando significância entre as doses de 30 e 60 mg/kg. Também, os resultados obtidos no teste de bolsão de ar destes derivados sugerem uma ação inibitória da migração leucocitária e aminas vasoativas, mostrando eficiência no combate à inflamação.

Na análise de *docking* dos derivados JF-21, 25 e 38 foi possível observar interações predominantemente hidrofóbicas com o sítio ativo da COX-2, em decorrência do sistema de aromáticos ligados ao anel tiazolidínico e seus substituintes. Tais fatos corroboram com os dados obtidos *in vivo* sobre a ação sobre a COX-2 em relação aos compostos sintetizados, evidenciando a promissora ação farmacológica destes derivados tiazóis. Desta forma a realização de testes *in vitro* com a COX-2 assim como determinação do mecanismo de ação destes derivados torna-se parte essencial para que possivelmente sejam alcançados ensaios de maior proporção com os derivados sintetizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Trad. Farias, A. S.). **Imunologia Celular e Molecular**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
- ABDELLATIF, K. R. A.; MOHAMED, A. ABDELGAWAD M. A.; ELSHEMY H. A. H; ALSAYED, S. S. R.; **Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile.** *Bioorganic Chemistry*, vol. 64, p. 1–12, 2016.
- ABDEL-AZIZ, A. A.-M, EL-AZAB, A. S., ABOU-ZEID, L. A., ELTAHIR, K. E. H., ABDEL-AZIZ, N. I., AYYAD, R. R., AL-OBAID, A. M. **Synthesis, anti-inflammatory, analgesic and COX-1/2 inhibition activities of anilides based on 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione scaffold: Molecular docking studies.** *Euro. J. Med. Chem.*, vol. 115, p. 121-131, 2016.
- ADDLA, D.; SRIDHAR, B.; DEVI, A.; KANTEVARI, S. **Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 1-benzyl 2-butyl-4-chloroimidazole embodied 4-azafluorenones via molecular hybridization approach.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 22, Issue 24, p. 7475-7480, 2012.
- ALSAYED, S. S.R. HEBA A.H. ELSHEMY, MOHAMED A. ABDELGAWAD, MAHMOUD S. ABDEL-LATIF , KHALED R.A. ABDELLATIF. **Design, synthesis and biological screening of some novel celecoxib and etoricoxib analogs with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile.** *Bioorganic Chemistry* vol. 70, p.173–183, 2017.
- ALI, Y., SARWAR, M.; ALAM, HAMID, H.; HUSAIN, A.; DHULAP, A.; BANO, S.; C. KHARBANDA. **Novel 2,4-dichlorophenoxy acetic acid substituted thiazolidin-4-ones as anti-inflammatory agents: Design, synthesis and biological screening.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017.
- AMIN, K. M.; RAHMAN, D. E.; AL-ERYANI, Y. A. **Synthesis and preliminary evaluation of some substituted coumarins as anticonvulsant agents.** *BioorganicMedicinal Chemistry*., vol. 16, p. 5377, 2008.
- AQUINO, T. M.; LIESEN, A. P.; LIMA, J. G.; SILVA, R. E. A.; LIMA, V. T.; ARAÚJO, J. M.; GOÉS, A. J. *Resumos da 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2006.
- ASATI, V.; MAHAPATRA, K. D.; BHARTI, S. K. **Thiazolidine-2,4 diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 87, p. 814-833, 2014.

BARROS, MARIA ESTER DE SÁ BARRETO. **Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4**, Tese de Doutorado – UFPE, 2015.

BARREIRO, E. J.; SILVA, J. F. M. and FRAGA, C.A.M. **Noções básicas do metabolismo de fármacos**. *Química Nova*, vol. 19, p. 641-650, 1996.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal, As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, 2^a ed; Artmed: São Paulo, Brasil, 2008.

BARREIRO, ELIEZER J. **A Química Medicinal e o Paradigma do Composto-Protótipo**. *Revista Virtual de Química*, vol.1, p. 26-34, 2009.raja

BARROS, C.D.; AMATO, A.A.; OLIVEIRA, T.B.; IANNINI, K.B.R.; SILVA, A.L.; SILVA, T.G.; LEITE, E.S.; HERNANDES, M.Z.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; NEVES, F.A.R.; PITTA, I.R. **Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene thiazolidine-2,4-dione as PPAR ligands**. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. vol. 18; p. 3805 e 3811; 2010.

BATISTA, E.K.F.; TRINDADE, H.I.; LIRA, S.R.S.; MULLER, J.B.B.S.; SILVA, L.L.B.; BATISTA, M.C.S. **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de Luehea divaricata**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.18, n.2, p.433-441, 2016.

BRUNTON, LAURENCE L. ET AL (EDT.). **Goodman & Gilman manual de farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010.

CARDOSO, M.V. O.; SIQUIERA, L.R.P., SILVA, E.B.; COSTA, L.B.; LEITE, A.C.L. **2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.86, p. 48-59, 2014.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. **Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório**. *Rev. Virtual Quim.* Vol1., No. 3, p. 241-256, 2010.

CHAABAN, I.; O.H. RIZK, T.M. IBRAHIM, S.S. HENEN, E.M. EL-KHAWASS, A.E. BAYAD, I.M. EL-ASHMAWY, H.A. NEMATALLA. **Synthesis, anti-Inflammatory screening, molecular docking, and COX-1,2/-5-LOX inhibition profile of some novel quinoline derivatives**. *Bioorganic Chemistry*, 2018.doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.023>

CHADHA, N.; BAHIA,M.S.; KAUR, M.; SILAKARI, O. **Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions**. *BioorganicMedicinal Chemistry*, vol. 23 (13) p. 2953–2974, 2015.

CUNHA, S.; SILVA, T.L..**One-pot and catalyst-free synthesis of thiosemicarbazones via multicomponent coupling reactions.***Tetrahedron Letters*. v.50, n.18 p.2090–2093, 2009.

DAREHKORDIA, A.; SAIDIB, K.; ISLAMIB, M.R. **Preparation of heterocyclic compounds by reaction of dimethyl anddiethyl acetylene dicarboxylate (DMAD, DEAD) with thiosemicarbazone derivatives.***ARKIVOC*.v.(i), p.180-188, 2007.

DI NUNNO L.; VITALE P.; SCILIMATI A.; TACCONELLI S.; PATRIGNANI P; J.**Novel synthesis of 3,4-diarylisoazole analogues of valdecoxib: reversal COX-2 selectivity by sulfonamide group removal.***Medicinal Chemistry*. vol. 47, p. 4881–4890, 2004.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. **Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.***Journal of Pathology*, v. 104, p. 15–29. 1971.

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. **Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.16, p. 460-474, 2006.

ELEFTHERIOU, P. ; GERONIKAKI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA , D. ; VICINI , P. ; FILZ , O.; FILIMONOV , D.; POROIKOV , V.; CHAUDHAERY , S. S.; ROY, K. K. ; SAXENA, A. K. **Fragment-based design, docking, synthesis, biological evaluation and structureactivity relationships of 2-benzo/benzisothiazolimino-5-arylidene-4 thiazolidinones as cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitors.** *European Journal Medicinal Chemistry*, vol. 47, p. 111-124, 2012.

ESPINDOLA, J. W. P.; CARDOSO,M. V. O.; OLIVEIRA FILHO, G.B.; SILVA, D. A. O.; LEITE, A. C. L. **Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain.***European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.101, p. 818-835, 2015.

FELISE, H. B.; NGUYEN, H. V.; PFUETZNER, R. A.; BARRY, K. C.; JACKSON, S. R.; BLANC, M. P.; BRONSTEIN, P. A.; KLINE, T.; MILLER, S. I.**An Inhibitor of Gram-Negative Bacterial Virulence Protein Secretion.***Cell Host Microbe*, vol. 4, p. 325, 2008.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P. **Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-**

carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother Pharmacol.* Vol.50 p. 223-9, 2002.

GARCÍA, C.; LEÓN, L. G.; PUNGITORE, C. R.; RÍOS-LUCI, C.; DARANAS, A. H.; MONTERO, J. C.; PANDIELLA, A.; TONN, C. E.; MARTÍN, V. S.; JOSÉ M. PADRÓN, J.M. **Enhancement of antiproliferative activity by molecular simplification of catalpol.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol.18, p. 2515–2523, 2010.

GERONIKAKI A.A., LAGUNIN A.A., HADJIPAVLOU-LITINA D.I., ELEFTHERIOU P.T., FILIMONOV D.A., POROIKOV V.V., ALAM I. AND SAXENA A.K. **Computer-Aided discovery of anti-inflammatory thiazolidinones with dual cyclooxygenase/lipooxygenase inhibition.** *Journal Medicinal Chemistry*, vol. 51, 1601-1609, 2008.

GREENBAUM, D.C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C.R.; LEHMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K.; **Synthesis and structureactivity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi,** *Journal Medicinal Chemistry*. vol. 47; p. 3212 - 3219; 2004.

GUDUDURU, V.; HURH, E.; DALTON, T. J.; MILLER, D. D.; **Synthesis and antiproliferative activity of 2-aryl-4-oxo-thiazolidin-3-yl-amides for prostate cancer.** *Journal Medicinal Chemistry*. vol. 48,p. 2584; 2005.

GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, B. M.; COLAÇO.N. C.; LIMA, M. C.; SILVA, T. G. **Anti-inflammatory and antinociceptive activities of índole-imidazolidine derivatives.** *International Immunopharmacology*,v. 11, p. 1816-22, 2011.

HANWELL, M.D., CURTIS, D.E., LONIE, D.C., VANDERMEERSCHD, T., ZUREK, E., HUTCHISON, G.R. **Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform.** *Journal Cheminform.* vol.4, p. 17,2012.

HEIDLAND, A.; KLASSEN, A.; RUTKOWSKI, P.; BAHNER, U. **The contribution of Rudolf Virchow to the conceotp of inflammation: what is still of importance?** *Journal of Nephrology*. vol. 19, p. 102-109, 2006.

JAIN A. K.; VAIDYA A.; RAVICHANDRAN V.; KASHAW S. K.; AGRAWAL R. K. **Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review.** *Bioorganic Medicinal Chemistry*, vol. 20; p. 3378–3395, 2012.

KAMEL, M.M.; ALI,H.I.; ANWAR,M.M.; MOHAMEDA,N.A.; SOLIMAN, A. M.**Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives.***European Journal Medicinal Chemistry*. vol. 45 (2), p. 572–580, 2010.

KASHYAP, S. J.; GARG, V. K.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; DUDHE, R.; GUPTA, J. K. **Thiazoles: having diverse biological activities.***Medicinal Chemistry Research*. v. 21, n. 8, p. 2123-2132, 2012.

KAUR, K.; KUMAR, V.; GUPTA, G. K. **Trifluoromethylpyrazoles as anti-inflammatory and antibacterial agents: A review.***Journal of Fluorine Chemistry*; V. 178, p. 306–326; 2015.

KIM, J.Y.; HWANG, Y.P.; KIM, D.H.; HAN, E.H.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H.; JEONG, H.G. **Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of Platycodon grandiflorum on Carrageenan-Induced Inflammation.***Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 70, n. 4, p. 858–864, 2006.

KUMAR, K. S. S.; HANUMAPPA, A.; VETRIVEL, M.; HEGDE M.; GIRISH Y. R.; BYREGOWDA, T. R.; RAO, S.; RAGHAVAN, S. C.; RANGAPPA, K. S.**Antiproliferative and tumor inhibitory studies of 2,3 disubstituted 4-thiazolidinone derivatives.***Bioorganic Meicinal Chemistry Letter*, vol. 25; p. 3616–3620; 2015.

LAURENT, D. R. ST.; GOA, Q.; WU, D.; SERRANO-WU, M. H. **Regioselective synthesis of 3-(heteroaryl)-iminothiazolidin-4-ones.***Tetrahedron Letters*, vol. 45, p. 1907-1910, 2004.

LAVICHA, T. R., R. S.B. CORDEIROA , J. B. CALIXTO , P. M.R. E SILVA , M. A. MARTINS. **Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats.***European Journal of Pharmacology*, vol. 462, p. 185 – 192, 2003.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest.***Journal Veterinary of Pharmacology and Therapeutics*, v.27, p.479-490, 2004.

LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R.M.; CARDOSO, M. V. O.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A.; SILVA, R. O.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, M. S.; SOARES, M. B. P. **Syntheses, cruzain docking, and in vitro studies of Aryl-4-oxothiazolylhydrazones against trypanosoma cruzi.** *Journal Medicinal Chemistry*. vol. 2; p. 1339-1345, 2007.

LEITE, N. M. S. Dissertação de mestrado: **Síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade antiinflamatória de novas 2-imino-tiazolidin-4-ona.** Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

LI, J.; LI, D.; Y. XU, Z. GUO, X. LIU, H. YANG, L. WU, L. WANG. **Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of chalcone derivatives as anti-inflammatory agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 27, p. 602–606, 2017.

LIESEN A. P., AQUINO, T. M. DE GÓES, A. J. S. LIMA, J. G. DE, FARIA, A. R. DE E ALVES, A. J. **Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas.** *Quim. Nova*, Vol. 31, n. 2, p. 369-376, 2008.

LORENS, O.L., J.J. PEREZ, A. PALOMER, D. MAULEON, J. **Differential binding mode of diverse cyclooxygenase inhibitors** *Mol. Graph. Model*, vol. 20 p. 359 371, 2002.

MACCARI, R.; VITALE, R. M.; OTTANÀ, R.; ROCCHICCIOLI, M.; MARAZZO, A.; CARDILE, V. GRAZIANO, A. C. E.; AMODEO, P.; MURA, U.; DEL CORSO, A. **Structureactivity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. vol. 81 p. 1-14, 2014.

MALONE M.H.; ROBICHAUD R.C.; **A Hippocratic screen for pure and crude drug materials.** *Lloydia*, vol. 25; p. 320–332, 1962.

MALTA, D. J. N.; ARAÚJO, L. C. C.; CARRAZONI, A. S. G.; MOTA, F. V. B.; SILVA, S. C.; CARMINO, M. A. S.; LIMA, M. C. A.; IVAN DA ROCHA PITTA, I. R.; SILVA, T. G. **Anti-inflammatory, Antiarthritic and Antinociceptive Activities of 3,5-Disubstituted Thiazolidine Derivatives.** *British Journal of Pharmaceutical Research*. v. 4 n. 8; p. 992-1003; 2014.

MARIOTTO S., SUZUKI Y, PERSICHINI T, COLASANTI M, SUZUKI H, CANTONI O. **Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation.** *Current Medicinal Chemistry* vol.14, n.18, p.1940-1944, 2007.

MATSUMOTO, K.; OBARA, S.; KURODA, Y.; KIZU, J. **Anti inflammatory effects of linezolid on carrageenan-induced paw edema in rats.** *Journal Infectology Chemother*, vol. 21, p. 889- 891, 2015.

MANJAL, S. K.; KAUR, M.; BHATIA, R.; KUMAR, K.; SINGH, V.; SHANKAR, V; KAUR, R.; RAWA, R. K. **Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review.** *Bioorganic Chemistry*, vol. 75, p. 406-423, 2017.

MOTA, F. V. B. Dissertação de Mestrado. **Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolina-acilhidrazonas.** Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.

MOPAC2016, JAMES, J.P. STEWART, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2016 <http://openMOPAC.net>.

OECD. **Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals.** Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, p.14, 2001.

OLIVEIRA, T. B. Dissertação de mestrado: **Avaliação toxicidade e atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca *Chrysobalanus icaco L.*** Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

OLIVEIRA, J. F.; SILVA, A. L.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; AMORIM, C. A. C.; CAMPOS, J. F.; RIBEIRO, A. G.; MOURA, R. O.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; LIMA, M. C. A. **Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 104, p. 148-156, 2015.

OLIVEIRA, J. F.; NONATO, F. R.; ZAFRED, R. R. T.; LEITE, N. M. S.; RUIZ, A.L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SILVA, A. L.; MOURA, R. O.; LIMA, M. C. A. **Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2 ylmethylene)-thiosemicarbazone.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 80, p. 388-392, 2016.

OLIVEIRA, J.F.; LIMA, T.S.; VENDRAMINI-COSTA, DE.B.; S.C.B. DE LACERDA PEDROSA, E.A. LAFAYETTE, R.M.F. DA SILVA, S.M.V. DE ALMEIDA, R.O. DE MOURA, A.L.T.G. RUIZ, J.E. DE CARVALHO, M.D.C.A. DE LIMA. **Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay,** *European Journal of Medicinal Chemistry European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 136, p. 305-314, 2017.

OMAR, K.; GERONIKAKI, A.; ZOUMPOULAKIS, P.; CAMOUTSIS, C.; SOKOVIC, M.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J. **Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 18, p. 426-432, 2010.

OMAR, Y. M.; HAJJAJ ABDU-ALLAH, H.M.; S. G. ABDEL-MOTY. **Synthesis, biological evaluation and docking study of 1,3,4- thiadiazolethiazolidinone hybrids as anti-inflammatory agents with dual inhibition of COX-2 and 15-LOX.** *Bioorganic Chemistry* vol. 80, p. 461–471, 2018.

OTTANA R., CAROLTI S., MACCARI R., LANDINI I., CHIRICOSTA G., CARIAGLI B., VIGORITA M.G. AND MINI E. ***In vitro antiproliferative activity against human colon cancer cell lines of representative 4-thiazolidinones.*** Part I. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters.*, vol.15, p. 3930-3933, 2005.

OTTANA, R.; MACCARI, R.; BARRECA, M. L.; BRUNO, G.; ROTONDO, A.; ROSSI, A.; CHIRICOSTA, G.; PAOLA, R.; SAUTEBIN, L.; CUZZOCREA, S.; VIGORITA, M. G. **Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents.** *Bioorganic Medicinal Chemistry*, vol.13, p 4243, 2005.

OYA, B.; OZEN, O.; ARZU, M.; ENGIN, K.; RAHMIYE, E. **Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives.** *Bioorganic Medicinal Chemistry*, vol. 15; p. 6012 - 6017, 2007.

PINHEIRO, R.M., WANNMACHER, L.. **Uso Racional de Anti-inflamatórios Não Esteroides.** Uso racional de medicamentos: Temas selecionados. Brasil, n.5, p:1-15, 2010.

PUTTASWAMY, N.; MALOJIAO, V. H.; MOHMMED, Y. H. E; SHERAPURA, A.; PRABHAKAR, B. T.; KHANUM, S. A. **Synthesis and amelioration of inflammatory paw edema by novel benzophenone appended oxadiazole derivatives by exhibiting cyclooxygenase-2 antagonist activity.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 103, p. 1446–1455, 2018.

RATHORE A.; SUDHAKAR, R. M. J. AHSAN, A. ALI, N. SUBBARAO, S. S. JADAV, S. UMAR, M. S.R YAR. **In vivo anti-inflammatory activity and docking study of newly synthesized benzimidazole derivatives bearing oxadiazole and morpholine rings.** *Biorganic Chemistry*, vol.70, p. 107-117, 2017.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Trad.Do Nascimento, A. P.); **Farmacologia**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

RAJANARENDAR, E.; NAGI REDDY, M.; RAMA KRISHNA, S.; RAMA MURTHY, K.; REDDY, Y. N.; RAJAM, M. V. **Design, synthesis, antimicrobial, antiinflammatory and analgesic activity of novel isoxazolyl pyrimido[4,5-b]quinolines and isoxazolyl chromeno[2,3-d] pyrimidin-4-ones.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.55, p. 273-283. 2012.

RAWAL, R. K.; PRABHAKAR, Y. S.; KATTI, S. B.; DE CLERCQ, E. **Design, synthesis, and evaluation of 2-aryl-3-heteroaryl-1, 3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents.** *Bioorganic Medicinal Chemistry*, vol. 13; p. 6771; 2005.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S. **Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central.** *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 57, p. 94-105. 2007.

ROMEIRO, N. C.; SANT'ANNA, C. M. R.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. **NSAIDs revisited: Putative molecular basis of their interactions with peroxisome proliferator-activated gamma receptor (PPAR γ).** *European Journal of Medicinal Chemistry*; vol. 43; p. 1918 - 1925; 2008.

REVANKAR, H. M.; BUKHARI, S. N. A.; KUMAR, G. B.; QIN, H.L. **Coumarins scaffolds as COX inhibitors.** *Bioorganic Chemistry*, vol. 71, p. 146–159, 2017.

SANTOS. S. A. Dissertação de Mestrado. **Novos agentes anti-inflamatórios tiazolidínicos: síntese, elucidação estrutural e efeitos biológicos.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2013.

SANTIN, J. R., F. D.T. UCHOA, M. C. A. LIMA, M. M. RABELLO, I. D. MACHADO, M. Z. HERNANDES, A. A. AMATO, F. A. MILTON, P. WEBB, F. A. R. NEVES, S. L. GALDINO,I. R. PITTA, S. H.P. **Farsky. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.48, p. 689–697, 2013.

SETH, S., BISWAS, A., BANERJEE, A., CHATTOPADHYAY, S.K., GHOSH, S. **Biological activity of 4-(4-bromophenyl)-thiosemicarbazide.** *Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications.* India, vol. 52, 2377-9, 1996.

SHABBIRA, A.; BATOOLD, S. A.; BASHEERB, M. I.; SHAHZAD, M., SULTANA, K.; TAREENE, R. B.; IQBALD, I.; SAEED-UL-HASSAN. **Ziziphora clinopodioides ameliorated rheumatoid arthritis and inflammatory paw edema in different models of acute and chronic inflammation.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 97, p. 1710–1721, 2018.

SINGH, J., SAINI, V., KUMAR,A., BANSAL, R. **Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some newer 2-substituted-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-6-phenylpyridazin-3(2H)-ones as potential anti-inflammatory and analgesic agents.** *Bioorganic Chemistry*, v. 71, p. 201–210, 2017.

SILVA, J.M., MENDONÇA, P.P., PARTATA, A.K. **Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais.** *Revista Científica do ITPAC.* Araguaína, v.7, n.4, 2014.

SILVA, T. F. **Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos.** *Revista Virtual Química*, vol. 5 (5), p. 921-933, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7a ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007.

SINGH, J.; SAINI, V.; KUMAR, V.; BANSAL, R. **Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some newer 2-substituted-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-6-phenylpyridazin- 3(2H)-ones as potential anti-inflammatory and analgesic agentes.** *Bioorganic Chemistry*, vol. 71 p. , 201–210, 2017.

SRIVASTAVA, P.; VYAS, V. K.; VARIYA, B.; PATEL, P.; QURESHI, G.; GHAT, M. **Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives.** *Bioorganic Chemistry*, vol. 67, p. 130-138, 2016.

STEWART, J.J.P. **Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements.** *Journal Molecule Model.* vol.13, p. 1173-1213,2007.

SWATHI, N.; RAMU, Y.; SUBRAHMANYAM, C.V.S.; SATYANARAYANA, K. **Synthesis quantum mechanical calculation and biological evaluation of 5-(4-substitutedaryl/hetero aryl methyldene)-1,3-thiazolidine-2,4-diones.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol.4, p. 561 - 566, 2012.

SUN,L., ZHU,L., QIAN, K., QIN, B., HUANG, L., CHEN, C. H., LEE, K. H., XIE, L. **Design, Synthesis, and Preclinical Evaluations of Novel 4- Substituted-1,5-Diarylanilines as Potent HIV- 1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI) Drug Candidates.** *Journal Medicinal Chemistry*, vol.5, p. 7219–7229, 2012.

TAGELDIN, G.N.; FAHMY, S. M.; ASHOUR, H. M.; KHALIL, M. A.; NASSRA, R. A.; LABOUTA, I. M. **Design, synthesis and evaluation of some pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives bearing thiazolidinone moiety as anti-inflammatory agentes.** *Bioorganic Chemistry*, vol. 80, p. 164–173, 2018.

TENÓRIO, R. P.; CARVALHO, C. S.; PESSANHA, C. S.; LIMA, J. G.; DE FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; MELO, E. J. T.; GÓES, A. J. S. **Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivates and their *in vitro* anti-*Toxoplasma gondii* activity.** *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, p. 2575; 2005.

TRIPATHI, A.C., GUPTA, S.J., GUPTA, G.N., SONAR, P.K., VERMA, A., S.K. SARAF. **4-Thiazolidinones: the advances continue...Journal MedicinalChemistry.** vol. 72 p.52–77, 2014.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. **Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas Importância Biológica.** *Química Nova*, vol. 28, p. 1030-1037, 2005.

UNGPRASERT, P.; SRIVALI, N.; KITTANAMONGKOLCHAI, W. **Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of heart failureexacerbation: A systematic eview and meta-analysis.** *European Journal of Internal Medicine*, vol. 26; p. 685–690; 2015.

UNSL-TAN, O.; OZADALI, K.; PISKIN, K., BALKAN, A. **Molecular modeling, synthesis and screening of some new 4 thiazolidinone derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, p. 59-64, 2012.

VERMA A.; SARAF S.K.; SONAR P.K.; FATIMA G.N.; GUPTA S.J.; TRIPATHI A.C. **4-Thiazolidiones: The advances continue...** *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 72, p. 52–77, 2014.

VIGORITA, M. G.; OTTANÀ, R.; MONFORTE, F.; MACCARI, R.; TROVATO, A.; MONFORTE, M. T.; TAVIANO, M. F. **Synthesis and anti-inflammatory, analgesic activity of 3,3'-(1,2-Ethanediyl)-bis[2-aryl-4-thiazolidinone] chiral compounds: Part 10** *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, vol. 11, p. 2791; 2001.

VIGORITA, M.G., A. CHIMIRRI, S. GRASSO, G. FENECH. **α/β -Mercaptoalkanoic acids: versatile synthons in the syntheses of fused ring 4-thiazolidinones/thiazolinones/thiazinanones ring system.** *Journal Heterocyclic Chemistry*, vol. 16 p 257 e 261, 1979.

WEISSMAN, G. **Inflammation: historical perspectives.** In: Gallin J. L. et .al. ED. New York: Raven Press, p. 05, 1992.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. **Carrageenin .induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs.** *Proceedings of the Society forExperimental Biology and Medicine*, v.111, p.544-547, 1962.

WHITTLE, B. A.. **The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics.** *British journal of pharmacology chemotherapy*, vol. 22, p. 246-253, 1964.