



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
UNIVERSITÉ DE NANTES
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE UBL
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
INSTITUT DE RECHERCHE EN SANTE 2



ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**DESENHO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS MULTIALVOS**



Recife
2018

ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**DESENHO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS MULTIALVOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco e a École Doctorale Biologie-Santé UBL da Université de Nantes como requisito final para a obtenção dos títulos de Doutor em Ciências Farmacêuticas e Docteur en Chimie Thérapeutique.

Áreas de Concentração: Síntese e Planejamento de Fármacos e Chimie Thérapeutique.

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

Orientador: Prof. Dr. Pascal Marchand

Recife
2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48d Oliveira, Arsênio Rodrigues.
Desenho estrutural, síntese e avaliação biológica de compostos heterocíclicos multialvos / Arsênio Rodrigues Oliveira. – 2018.
201 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Doenças negligenciadas. 2. Câncer. 3. Ftalimida. 4. Tiazol. I. Leite, Ana Cristina Lima (Orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-022)

ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**DESENHO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS MULTIALVOS**

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

Aprovada em: 10/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^o. Dr. Pascal Marchand (Orientador)
Université de Nantes

Prof^o. Dr. Sebastião José de Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ronaldo Nascimento de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior (Examinador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof^o. Dr. Patrice Le Pape (Examinador Externo)
Université de Nantes

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas graças recebidas diariamente, por estar e se mostrar presente sempre e pelo esplendor da vida;

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a Ana Cristina Lima Leite, pelos conselhos, ensinamentos, cobranças e empenho para o crescimento de seus alunos e do LpQM (UFPE), grupo de pesquisa que coordena;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pascal Marchand, pelo exemplo profissional a seguir, sempre buscando a excelência com entusiasmo e sabedoria;

Aos meus irmãos científicos, Lucianna Rabelo, Miria Barbosa, Gevanio Filho e Marlene Saraiva pelo ombro amigo e os valiosos raciocínios e conclusões alcançadas juntos;

Ao estudante de iniciação científica, Marcius Vinicius, pelo trabalho desempenhado na síntese e purificação de parte dos compostos;

Aos integrantes do LpQM pelo companheirismo e importantes contribuições neste período de minha formação;

A todos os membros do IICiMed pela incrível e inesquecível experiência que me proporcionaram.

A todos que contribuíram para a conclusão do intercambio, antes e durante, este que foi de absoluto aprimoramento intelectual e acima de tudo pessoal;

A François Jubert que incansavelmente esteve presente na reta final deste processo, contribuindo sem medir esforços nas traduções e nos momentos de angústia;

A todos os colaboradores que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e conclusão das publicações e pedidos de patentes já executadas ou em curso;

Aos órgãos concededores de bolsa de doutorado: CAPES (DS e PDSE), Campus France (*Bourse d'Excellence Eiffel*) e FACEPE (BFD);

Ao CNPq e a FACEPE, pelo suporte financeiro ao LpQM (UFPE).

A minha família, Maria das Graças (mãe), José (pai), Tarcyso (irmão), Ediozita (cunhada) e Letícia (sobrinha), por me apoiarem em tudo que idealizo, sempre presentes e firmes como verdadeiro porto de acolhimento, carinho e segurança;

A todos meus sinceros agradecimentos.

A CORRIDA DA VIDA

Na corrida dessa vida é preciso entender que você vai rastejar, que vai cair, vai sofrer e a vida vai lhe ensinar que se aprende a caminhar e só depois vai correr.

A vida... a vida é uma corrida, que não se corre sozinho. Que vencer não é chegar é aproveitar o caminho. Sentindo o cheiro das flores e aprendendo com as dores causadas por cada espinho.

Aprenda com cada dor, com cada decepção, com cada vez que alguém lhe partir o coração. O futuro é obscuro e às vezes é no escuro que se enxerga a direção.

Aprenda quando chorar e quando sentir saudade. Aprenda até quando alguém lhe faltar com a verdade. Aprender é um grande dom! Aprenda que até o bom vai aprender com a maldade.

Aprender a desviar das pedras da ingratidão, dos buracos da inveja, das curvas da solidão... expandindo o pensamento, fazendo do sofrimento a sua maior lição, sem parar... sem parar de aprender, aproveite cada flor, cada cheiro no cangote, cada gesto de amor, cada música dançada e também cada risada silenciando o rancor.

Experimente o mundo, prove de todo sabor, sinta o mal, o céu e a terra, sinta o frio e o calor. Sinta a sua caminhada e dê sempre uma parada, pelo caminho que for.

Pare! Pare, não tenha pressa! Não carece acelerar. A vida já é tão curta! É preciso aproveitar essa estranha corrida, que a chegada é a partida... e ninguém pode evitar.

Por isso é que o caminho tem que ser aproveitado deixando pela estrada, algo bom para ser lembrado. Vivendo uma vida plena, fazendo valer a pena, cada passo foi dado.

Aí sim... aí sim, lá na chegada onde o fim é evidente, é que a gente percebe que foi tudo de repente e aprende na despedida, que o sentido dessa vida é sempre seguir em frente (BESSA, 2017).

RESUMO

As doenças negligenciadas tropicais (DNT) e os diversos tipos de câncer são graves e antigos problemas de saúde mundial. Além dos grandes atrasos no desenvolvimento regional, econômico e humano atrelado a eles, é notória a escassez de ferramentas terapêuticas para solucionar estes agravos que epidemiologicamente apresentam dados crescentes. O desenvolvimento de novos fármacos para tais patologias é necessário e, assim como é tendência na pesquisa atual, a obtenção de moléculas multialvos surge como estratégia promissora. Neste contexto, com o objetivo de identificar novos fármacos potentes para DNT e o combate ao câncer, realizou-se o planejamento estrutural, a síntese e a purificação de derivados heterocíclicos híbridos da ftalimida e do 1,3-tiazol. Os compostos **2a-n**, **3a-i**, **4a-b**, **5a-d**, **6a1-6d7** foram obtidos por meio de reações de fácil execução, com poucas etapas de síntese e foram confirmadas suas estruturas por técnicas espectroscópica e espectrométricas. As propriedades biológicas avaliadas foram a determinação da citotoxicidade em diferentes células de mamíferos, e a capacidade de inibir parasitas de *T. cruzi*, *L. infantum* e *S. mansoni* e o crescimento de linhagens tumorais sólidas e hematológicas. Foram desenvolvidas também análises de microscopia eletrônica para melhor compreender a ação dos novos candidatos a fármacos. Os compostos mostraram baixa citotoxicidade. Como protótipo anti-*T. cruzi*, foi encontrado **2j** (4,7 μ M) com maior potência que o Benznidazol para tripomastigotas. Já para a atividade leishmanicida, **2m** (9,8 μ M) e **2j** (13,9 μ M) foram os que melhor inibiram promastigotas de *L. infantum*. Para o perfil anti-*S. mansoni*, **2i** foi ativo contra vermes adultos e esquistossômulos, apresentando um possível uso profilático. Da avaliação antineoplásica, os derivados ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis foram bastante promissores com destaque para **6a3** (5,67 μ M) e **6a6** (5,85 μ M) que apresentaram potência semelhante a Doxorrubicina para a linhagem de Melanoma Malígeno (SK-MEL-28). Com base nos diversos dados obtidos, pode-se concluir que os núcleos ftalimida e 1,3-tiazol são estruturas privilegiadas e a hibridação destes se mostrou como estratégia favorável para a obtenção de novos candidatos a fármacos antiparasitários e anticâncer, lhes podendo ser atribuído o perfil multialvos.

Palavras-chave: Doenças Negligenciadas. Câncer. Ftalimida. Tiazol.

ABSTRACT

Neglected tropical diseases (NTD) and the various types of cancer are serious and old world health problems. In addition to the great delays in the regional, economic and human development associated with them, the scarcity of therapeutic tools to solve these aggravations, which epidemiologically present increasing data, is well known. The development of new drugs for such pathologies is necessary and, as is the trend in current research, obtaining multi-target molecules is a promising strategy. In this context, the structural planning, synthesis and purification of hybrid heterocyclic derivatives of phthalimide and 1,3-thiazole were carried out in order to identify new potent drugs for NTD and the fight against cancer. The compounds **2a-n**, **3a-i**, **4a-b**, **5a-d**, **6a1-6d7** were obtained by means of easy to perform reactions with few synthesis steps and confirmed their structures by spectroscopic and spectrometric techniques. The biological properties evaluated were the determination of cytotoxicity in different mammalian cells and the ability to inhibit *T. cruzi*, *L. infantum* and *S. mansoni* parasites and the growth of solid and hematological tumor lines. Electron microscopy analyzes were also developed to better understand the action of new drug candidates. The compounds showed low cytotoxicity. As an anti-*T. cruzi* prototype **2j** (4.7 μ M) was found to have higher potency than Benznidazole for trypomastigotes. For the leishmanicidal activity, **2m** (9.8 μ M) and **2j** (13.9 μ M) were the best inhibitors of *L. infantum* promastigotes. For the anti-*S. mansoni* profile, **2i** was active against adult worms and schistosomules, presenting a possible prophylactic use. From the antineoplastic evaluation, the phthalimido-*bis*-1,3-thiazoles derivatives were very promising, highlighting **6a3** (5.67 μ M) and **6a6** (5.85 μ M), which showed a similar potency to Doxorubicin for the Malignant Melanoma (SK-MEL-28). Based on the various data obtained, it can be concluded that the phthalimide and 1,3-thiazole nuclei are privileged structures and their hybridization proved to be a favorable strategy to obtain new candidates for antiparasitic and anticancer drugs multi-target profile.

Keywords: Neglected diseases. Cancer. Phthalimide. Thiazole.

RÉSUMÉ

Les maladies tropicales négligées (MNT) et les différents types de cancer sont des problèmes de santé graves. En plus de longs retards dans le développement régional, économique et humain liés à eux, on note le manque d'outils thérapeutiques pour répondre à ces problèmes. Le développement de nouveaux médicaments pour de telles pathologies est nécessaire et, comme c'est le cas dans la recherche actuelle, l'obtention de molécules multi-cibles est une stratégie prometteuse. Dans ce contexte, en plus du but d'identifier de nouveaux médicaments puissants pour les MNT et la lutte contre le cancer, ont été exécutées la conception structurale, la synthèse et la purification de dérivés hétérocycliques hybrides de phthalimide et de 1,3-thiazole. Les composés **2a-n**, **3a-i**, **4a-b**, **5a-d**, **6a1-6d7** ont été obtenus par des réactions faciles à réaliser, avec quelques étapes de synthèse, et leurs structures ont été confirmées par des techniques spectroscopiques et spectrométriques. Les propriétés biologiques ont été évaluées par détermination de la cytotoxicité sur des cellules de mammifères, et par la capacité à inhiber les parasites *T. cruzi*, *L. infantum* et *S. mansoni* et la croissance des lignées cellulaires de tumeurs solides et hématologiques. Des analyses par microscopie électronique ont également été effectuées pour mieux comprendre l'action des nouveaux médicaments candidats. Les composés ont montré une faible cytotoxicité. Le prototype anti-*T. cruzi* **2j** (4,7 µM) s'est révélé plus actif que le Benznidazole sur les trypomastigotes. Pour l'activité leishmanicide, les meilleurs inhibiteurs des promastigotes de *L. infantum* sont **2m** (9,8 µM) et **2j** (13,9 µM). Pour le profil anti-*S. mansoni*, **2i** est actif contre les vers adultes et les schistosomules, et présente une possible utilisation prophylactique. Dans cadre des traitements anticancéreux, les phthalimido-*bis*-1,3-thiazoles se montrent prometteurs, en particulier **6a3** (5,67 µM) et **6a6** (5,85 µM) qui ont une activité similaire à la doxorubicine sur la lignée de Mélanome Malígène (SK-MEL-28). Sur la base des diverses données obtenues, nous pouvons conclure que les noyaux phthalimide et 1,3-thiazole sont des structures privilégiées et que l'hybridation est une stratégie favorable prouvée pour obtenir de nouveaux médicaments antiparasitaires et anticancéreux. Un profil multi-cible peut leur être attribué.

Mots-clés : Maladies négligées. Cancer. Phthalimide. Thiazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 –	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 2 –	Benznidazol e Nifurtimox, medicamentos antichagásicos.	26
Figura 3 –	Ciclo de vida dos parasitas do Gênero <i>Leishmania</i>	27
Figura 4 –	Antimoniais pentavalentes (Estibogluconato e Antimoniato de meglumina), Anfotericina B, Paromomicina, Pentamidina e Miltefosina, medicamentos antileishmaniais	28
Figura 5 –	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Figura 6 –	Praziquantel e Oxamniquine, medicamentos esquistossomicidas	30
Figura 7 –	Representação dos mecanismos farmacológicos de agentes antitumorais	32
Figura 8 –	Aspectos conceituais da abordagem reducionista e da polifarmacologia	34
Figura 9 –	Descoberta de fármacos e desenvolvimento de fluxo de trabalho	35
Figura 10 –	Estrutura da vitamina B1 e das Penicilinas	36
Figura 11 –	Exemplos de fármacos que contem 2-amino-1,3-tiazol	37
Figura 12 –	Exemplos de fármacos antitumorais derivados de 1,3-tiazóis	38
Figura 13 –	Análogos da Talidomida	39
Figura 14 –	Reação de obtenção das ftalimido-tiossemicarbazidas (1a-b)	67
Figura 15 –	Espectro de RMN – ^1H do composto 1a	68
Figura 16 –	Espectro de RMN – ^{13}C do composto 1a	69
Figura 17 –	Reação de obtenção dos ftalimido-1,3-tiazóis (2a-n e 3a-i)	70
Figura 18 –	Espectro de RMN – ^1H de 3b	71
Figura 19 –	Espectro de RMN – ^{13}C de 3b	72
Figura 20 –	Estruturas moleculares dos compostos 2e , 2f e 2g	73
Figura 21 –	Reação de obtenção dos ftalimido-5-acetil-1,3-tiazóis (5a-b)	74
Figura 22 –	Espectro de RMN – ^1H de 4b	75
Figura 23 –	Espectro de RMN – ^{13}C de 4b	75

Figura 24 –	Reação de obtenção dos ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (5a-d)	76
Figura 25 –	Reação de obtenção da 4-metil-3-tiossemicarbazida	76
Figura 26 –	Espectro de IV do derivado ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazol (5d)	77
Figura 27 –	Espectro de RMN – ^1H do composto ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazol (5d)	78
Figura 28 –	Espectro de RMN – ^{13}C do composto ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazol (5d)	79
Figura 29 –	Reação de obtenção dos ftalimido- <i>bis</i> -1,3-tiazóis (6a1-6d7)	80
Figura 30 –	Espectro de IV do derivado ftalimido- <i>bis</i> -1,3-tiazol (6d4)	81
Figura 31 –	Espectro de RMN – ^1H do derivado ftalimido- <i>bis</i> -1,3-tiazol (6d4)	82
Figura 32 –	Espectro de RMN – ^{13}C do derivado ftalimido- <i>bis</i> -1,3-tiazol (6d4)	83
Figura 33 –	Alterações ultraestruturais nas formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> tratadas com 6k observadas por MEV e MET	147
Figura 34 –	Índice de sobrevivência de <i>L. infantum</i> em macrófagos infectados após 24 horas de tratamento com os compostos 2j e 2m	150
Figura 35 –	Macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de <i>L. infantum</i> e tratados com os compostos 2j e 2m por 24 h	151
Figura 36 –	Eletromicrografia de promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratadas e tratadas com os compostos 2j e 2m	152
Figura 37 –	Eletromicrografia de <i>L. infantum</i> tratadas e não tratadas com os compostos 2j e 2m	153
Figura 38 –	Microscopia confocal de células não tratadas e tratadas com 2j e 2m , sujeitas a coloração com iodeto de propídio	155
Figura 39 –	Microscopia confocal de células controle e tratadas com 2j e 2m , sujeito a marcação com Rho 123	156

Figura 40 –	Atividade anti- <i>S. mansoni</i> da série 2a-n	163
Figura 41 –	Efeito do 2i <i>in vitro</i> sobre os esquistossômulos	166
Figura 42 –	Precipitação do composto 2i na concentração de 100 µg/mL em cima dos esquistossômulos	166
Figura 43 –	Atividade anti- <i>S. mansoni in vivo</i> do composto de 2i	167
Figura 44 –	Avaliação ultraestrutural de <i>S. mansoni</i> obtida de culturas estimuladas com DMSO e PZQ	169
Figura 45 –	Avaliação ultraestrutural de <i>S. mansoni</i> obtida de culturas estimuladas com composto 2i	171
Figura 46 –	Viabilidade Celular em PBMC na Concentração 10 µM	172
Figura 47 –	Viabilidade Celular em PBMC na Concentração 100 µM	173

ESQUEMAS

Esquema 1 –	Alvos terapêuticos de ftalimidas e 1,3-tiazóis.	22
Esquema 2 –	Modificações estruturais dos protótipos da série 2a-n .	41
Esquema 3 –	Rota sintética para a obtenção dos ftalimido-1,3-tiazóis substituídos em C5	42
Esquema 4 –	Séries de novos derivados ftalimido-1,3-tiazóis obtidos	43
Esquema 5 –	Mecanismo de reação proposto para a formação das ftalimidas (exemplo do composto 1a)	64
Esquema 6 –	Mecanismo de reação genérico proposto para as ciclizações dos 1,3-tiazóis (Exemplos dos compostos série 2a-n)	65
Esquema 7 –	Mecanismo de reação genérico proposto para as formações das tiossemicarbazonas (Exemplos do composto 5a)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Citotoxicidade e atividade tripanocida da série 2a-n contra epimastigotas e tripomastigotas	143
Tabela 2 -	Citotoxicidade e atividade tripanocida contra epimastigotas e tripomastigotas da série 6a-l	144
Tabela 3 -	Atividade dos compostos sobre promastitas de <i>L. infantum</i> , células Vero e macrófagos J774	148
Tabela 4 -	Atividade anti- <i>L. infantum</i> , efeito citotóxico contra macrófagos peritoneais e índice de seletividade dos compostos 2j e 2m	149
Tabela 5 -	Efeito dos compostos 2j e 2m na integridade da membrana plasmática	154
Tabela 6 -	Efeito dos compostos 2m e 2j no potencial da membrana mitocondrial	156
Tabela 7 -	Atividade anti- <i>S. mansoni</i> <i>in vitro</i> dos compostos 2h , 2i , 2j e 2m frente a forma adulta, em diferentes concentrações	164
Tabela 8 -	Atividade anti- <i>S. mansoni</i> <i>in vitro</i>	165
Tabela 9 -	Atividade do composto 2i sobre os esquistossômulos	165
Tabela 10 -	Efeito do tratamento com o composto 2i nos estágios dos ovos depositados por <i>S. mansoni</i>	168
Tabela 11 -	Viabilidade celular (%) de derivados ftalimido-1,3-tiazóis frente a linhagens neoplásicas <i>in vitro</i>	174
Tabela 12 -	Concentração Inibitória em 50% (IC ₅₀) dos compostos em MOLT-4	175
Tabela 13 -	Concentração Inibitória em 50% (IC ₅₀) dos Compostos em K562	175
Tabela 14 -	Concentração Inibitória em 50% (IC ₅₀) dos Compostos em SKMEL-28	176
Tabela 15 -	Concentração Inibitória em 50% (IC ₅₀) dos Compostos em T47-D	176
Tabela 16 -	Índice de Seletividade nas Linhagens Neoplásicas	177

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
Ar	aromático
BDZ	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração citotóxica necessária para inibir 50% de um parâmetro
CCD	cromatografia de camada delgada
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife, Brasil)
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Salvador, Brasil)
d	dubleto
DEPT	Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização
DIC	contraste diferencial de interferência
DL ₅₀	Dose necessária para matar 50% de um parâmetro
DMAP	di-metil-amino-piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	dimetilsulfóxido deuterado
DNT	Doenças Negligenciadas Tropicais
DOXO	Doxorrubicina
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
HL-60	Leucemia Promielocítica Aguda
HL-60-MX1	Leucemia Promielocítica Aguda Resistente
IC ₅₀	Concentração de inibidor necessária para inibir 50% de um parâmetro
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”
IV	Infravermelho
K562	Leucemia Mielogênica Crônica
LpQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
MC	média da intensidade de fluorescência em células não tratadas
MCF7	Adenocarcinoma de Mama
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MT	média da intensidade de fluorescência nas células tratadas

MTT	“3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”
MOLT-4	Leucemia Linfoblástica Aguda
Naf	Naftil
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PF	ponto de fusão
Ph	fenil
PI	iodeto de propídio
PM	peso molecular
ppm	partes por milhão
PZQ	Praziquantel
q	quarteto
Rend.	rendimento
R _f	razão de frente
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênios
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”
s	singleto
SI	índice de seletividade
SK-MEL-28	Melanoma Maligno
SNC	Sistema Nervoso Central
t	triplete
TMS	tetra-metil-silano
TOLEDO	Linfoma Não-Hodgkin de Células
T47D	Carcinoma Ductal de Mama
UV	Ultravioleta
VI	índice de variação
$\Delta\Psi_m$	Potencial de Membrana Mitocondrial
δ	deslocamento químico
π	ligação pi
σ	ligação sigma
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	23
2.1.1	Doença de Chagas	24
2.1.2	Leishmaniose	26
2.1.3	Esquistossomose	28
2.2	CÂNCER	31
2.3	MOLÉCULAS PRIVILEGIADAS	32
2.3.1	Atividades farmacológicas de 1,3-tiazóis	36
2.3.2	Atividades farmacológicas das ftalimidas	68
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	41
5	MATERIAL E METODOS	45
5.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS	45
5.1.1	Síntese das ftalimido-tiossemicarbazidas (1a e 1b)	45
5.1.2	Síntese das Séries de ftalimido-1,3-tiazóis (2a-n e 3a-i)	45
5.1.3	Síntese dos ftalimido-5-acetil-1,3-tiazóis (4a e 4b)	45
5.1.4	Síntese dos ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (5a-d)	46
5.1.5	Síntese dos ftalimido-<i>bis</i>-1,3-tiazóis (6a1-6d7)	46
5.2	MONITORAMENTO DAS REAÇÕES	46
5.3	BANHO DE ULTRASSOM	46
5.4	PONTOS DE FUSÃO	47
5.5	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	47
5.6	ANÁLISE DE RAIO-X	47
5.7	AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS	48
5.7.1	Ensaio de Citotoxicidade	48
5.7.1.1	Esplenócitos	48
5.7.1.2	Células Vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais	49
5.7.1.3	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMC)	50

5.7.2	Avaliação anti-<i>Trypanosoma cruzi</i>	50
5.7.2.1	Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota (<i>T. cruzi</i>)	51
5.7.2.2	Toxicidade para tripomastigotas (<i>T. cruzi</i>)	51
5.7.3	Avaliação anti-<i>Leishmania infantum</i>	52
5.7.3.1	Parasitas de <i>Leishmania infantum</i>	52
5.7.3.2	Atividade biológica em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	52
5.7.3.3	Atividade biológica <i>in vitro</i> em formas amastigotas intracelulares	53
5.7.3.4	Produção de Óxido Nítrico	53
5.7.3.5	Análise Ultraestrutural	54
5.7.3.6	Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática	54
5.7.3.7	Análise do Potencial da Membrana Mitocondrial	55
5.7.3.8	Análise Estatística	56
5.7.3.9	Considerações Éticas	56
5.7.4	Avaliação anti-<i>Schistosoma mansoni</i>	56
5.7.4.1	Animais	56
5.7.4.2	Parasitas de <i>Schistosoma mansoni</i>	56
5.7.4.3	Verme adulto	57
5.7.4.4	Esquistossômulos	57
5.7.4.5	<i>In vivo</i>	57
5.7.4.5.1	Parasitas e hospedeiros	57
5.7.4.5.2	Toxicidade aguda por via oral (OECD, Guideline 423)	58
5.7.4.5.3	Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> de vermes adultos	58
5.7.4.5.4	Porcentagem do estágio de desenvolvimento do ovo	59
5.7.4.5.5	Contagem de ovos no fígado e intestino	59
5.7.4.5.6	Avaliação morfométrica	59
5.7.4.5.7	Ensaio de hidroxiprolina	60
5.7.4.6	Análise estatística	60
5.7.5	Avaliação antineoplásica	60
5.7.5.1	Cultivo de Células	60
5.7.5.2	Citotoxicidade em Linhagens Neoplásicas	61
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	PROPOSTAS DE MECANISMOS PARA AS REAÇÕES ENVOLVIDAS	63

6.1.1	Formação das ftalimidas	63
6.1.2	Ciclização dos 1,3-tiazóis	64
6.1.3	Formação das tiossemicarbazonas	65
6.2	OBTENÇÃO E CONFIRMAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS	67
6.2.1	Ftalimido-tiossemicarbazidas (1a e 1b)	67
6.2.2	Ftalimido-1,3-tiazóis (2a-n e 3a-i)	69
6.2.3	Ftalimido-5-acetil-1,3-tiazóis (4a e 4b)	73
6.2.4	Ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (5a-d)	76
6.2.5	Ftalimido- <i>bis</i> -1,3-tiazóis (6a1-6d7)	79
6.3	DADOS ESPECTROSCÓPICOS	84
6.4	RESULTADOS BIOLÓGICOS	143
6.4.1	Atividade Anti- <i>T. cruzi</i>	143
6.4.1.1	Série 2a-n	143
6.4.1.2	Análise ultraestrutural da tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	145
6.4.2	Atividade anti- <i>L. infantum</i>	148
6.4.2.1	Atividade em promastigotas de <i>L. infantum</i>	148
6.4.2.2	Ensaio de Citotoxicidade	149
6.4.2.3	Ação dos compostos nas formas amastigotas intracelulares	150
6.4.2.4	Análise da produção de óxido nítrico	151
6.4.2.5	Análise ultraestrutural da promastigota de <i>L. infantum</i>	152
6.4.2.6	Efeito dos compostos na integridade da membrana plasmática	154
6.4.2.7	Efeito dos compostos no Potencial de Membrana Mitocondrial	155
6.4.2.8	Discussão	157
6.4.3	Avaliação anti- <i>S. mansoni</i>	162
6.4.3.1	Atividade contra as formas adultas de <i>S. mansoni</i>	162
6.4.3.2	Atividade contra o esquistossômulo	165
6.4.3.3	Determinação da toxicidade aguda do composto 2i	167
6.4.3.4	Atividade anti- <i>S. mansoni</i> <i>in vivo</i> com o derivado 2i	167
6.4.3.5	Análise de MEV das formas adultas de <i>S. mansoni</i>	168
6.4.4	Atividade anti-células tumorais	172
6.4.4.1	Citotoxicidade em Células Não Transformadas	172
6.4.4.2	Viabilidade Celular, IC ₅₀ e Índice de Seletividade	173

7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	179
7.1	CONCLUSÕES	179
7.2	PERSPECTIVAS	180
	REFERÊNCIAS	181
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: Phthalimido-thiazole as privileged scaffold: activity against immature and adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i>	187
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO: <i>In vitro</i> evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives	188
	APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: Design and synthesis of potent anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death	189
	APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO: Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of <i>Trypanosoma cruzi</i>	190
	APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO: Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties	191
	APÊNDICE F – ARTIGO SUBMETIDO: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> activities of multi-target phthalimido-thiazoles on <i>Schistosomiasis mansoni</i>	192
	APÊNDICE G – ARTIGO SUBMETIDO: <i>In silico</i> and <i>in vitro</i> evidences of anticancer and immunomodulatory effects of phthalimide derivatives on colon cancer cells	193
	APÊNDICE H – ARTIGO SUBMETIDO: Synthesis and the anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> profile of new 1,3-thiazole and 4-thiazolidinone derivatives	194
	APÊNDICE I – PEDIDO DE PATENTE: Composto ftalimido-tiazol, processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazóis e uso de composto na preparação de um medicamento para tratar esquistossomose	195

APÊNDICE J – PEDIDO DE PATENTE: Processo de obtenção	197
de derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ftalimido- <i>bis</i>-tiazóis úteis no tratamento antineoplásico	
APÊNDICE K – PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS	198

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o programa médicos sem fronteiras (MSF) propuseram uma classificação das doenças em globais, negligenciadas e extremamente negligenciadas. Segundo esta classificação: doenças globais, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e mentais (SNC) representam os alvos da maioria dos esforços de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) das empresas farmacêuticas. Já as doenças negligenciadas afetam milhões de pessoas no mundo, no entanto a terapia medicamentosa ainda é limitada e muitas vezes inadequadas. Além disso, as doenças extremamente negligenciadas afetam as pessoas que vivem em condições miseráveis, que mal têm acesso às necessidades básicas de sobrevivência¹.

Doenças negligenciadas tropicais (DNT) são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países².

A maioria destas DTN não são incluídas nos programas de P&D da indústria farmacêutica e, portanto, estão fora do mercado. Cerca de 14 milhões de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento, morrem anualmente de doenças infecciosas. De 2000 a 2011, 850 novos medicamentos foram aprovados, mas apenas 37 (4%) foi para o tratamento de doenças negligenciadas. Neste mesmo período, somente 1% dos 336 novos fármacos aprovados foram destinados a esse grupo de doenças³. Estes números não mudaram até agora e por isso há uma necessidade urgente para a concepção e síntese de novos medicamentos.

Por outro lado, mesmo fazendo parte do grupo de doenças globais, o câncer ainda é um grave problema de saúde pública que aflige a humanidade, não fazendo distinção de classe social, credo religioso ou etnia-raça. Segundo dados estatísticos fornecidos pela OMS, o número de óbitos em decorrência de algum tipo de câncer no mundo, em 2015, foi de 8,8 milhões⁴.

A OMS informa ainda que 70% das mortes ocasionadas por essa patologia ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e projeta que 22 milhões de pessoas poderão morrer de algum tipo de câncer nas próximas duas

décadas⁴. Tal projeção indica que haverá um constante aumento no número de mortes ao longo dos anos.

O câncer é uma patologia multifatorial em que estão envolvidas diversificadas vias bioquímicas e imunológicas⁴. O arsenal quimioterápico disponível para o tratamento do câncer apresenta vários problemas quanto à especificidade, potencialidade e presença de efeitos indesejados. Além desses fatores, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um elemento agravante na terapêutica do câncer⁵.

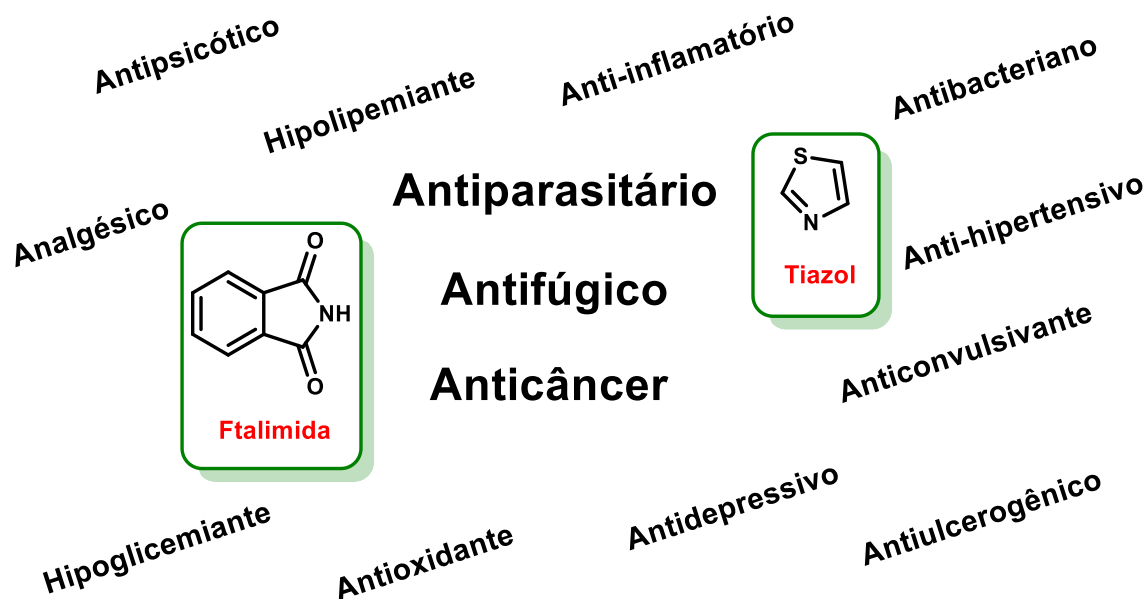
Dentre as medidas para a resolução deste grave problema, a busca por novos fármacos potentes e seletivos para introdução na terapêutica oncológica é de essencial importância, haja vista que muitos aspectos desta doença ainda permanecem sem tratamento.

Apesar do progresso considerável decorrente dos avançados métodos de rastreio, a concepção racional de fármacos não apresentou significativo aumento na última década. A estratégia para triagem buscando agentes altamente específicos com uma abordagem reducionista (único alvo) foi amplamente utilizada por algum tempo⁶.

Os recentes progressos em sistemas biológicos e as experiências em clínica global revelaram que os fármacos atuantes em um único alvo nem sempre podem induzir efeitos desejados para todo o sistema biológico, mesmo sendo gerada inibição ou ativação de alta especificidade, uma vez que os mecanismos patológicos podem encontrar caminhos de compensação⁷. Sabendo-se hoje que o desenvolvimento de doenças envolve vários aspectos e complexos mecanismos patológicos, os cientistas têm, recentemente, proposto o conceito de fármacos multialvos, o que é tendência para o desenvolvimento de medicamentos⁸.

Para a concepção de fármacos que apresentem a capacidade de se ligar em diferentes alvos terapêuticos são reconhecidos alguns grupamentos químicos privilegiados ou promíscuos⁹. Os derivados de ftalimidas e de 1,3-tiazóis se enquadram perfeitamente nesta definição¹⁰, tendo em vista seus amplos espectros de atividades, assim como está representado no **Esquema 1**.

Esquema 1 – Alvos terapêuticos de ftalimidas e 1,3-tiazóis.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante das necessidades de identificar novos candidatos a fármacos úteis no tratamento de DNT e do câncer, e por outro lado, em virtude das propriedades multialvo atribuídas aos tiazóis e as ftalimidas, este trabalho descreve o planejamento estrutural, a síntese e a avaliação farmacológica das propriedades antiparasitárias e antitumorais de derivados híbridos ftalimido-1,3-tiazóis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta tese foram utilizados os seguintes conceitos e trabalhos que fundamentam e corroboram para as conclusões alcançadas.

2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As Doenças Negligenciadas correspondem a um grupo de aproximadamente 20 doenças, sendo 17 DNT com adição das chamadas “três grandes” (malária, tuberculose e HIV/AIDS). Estima-se que chegam a 35.000 o número de mortes, por dia, causadas por estas doenças ao redor do mundo. No entanto, as entidades governamentais e a indústria farmacêutica, não demonstram a atenção necessária a estes dados¹¹. No **Quadro 1** são apresentadas as DNT e seus respectivos agentes etiológicos.

Quadro 1 – Doenças Negligenciadas Tropicais.

Doença	Agente etiológico	Classificação
Úlcera de Buruli	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Bactéria
Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protozoário
Dengue e Chikungunya	<i>Flavivirus CHIKV</i>	Vírus
Dracunculíase	<i>Dracunculus medinensis</i>	Helminto
Equinococose	<i>Echinococcus granulosus</i>	Helminto
Fasciolíase	<i>Fasciola hepática</i> <i>Fasciola gigantica</i>	Helminto
Bouba	<i>Treponema pallidum</i>	Bactéria
Doença do sono (Tripanossomíase humana Africana)	<i>Trypanosoma brucei</i>	Protozoário
Leishmaniose	Gênero <i>Leishmania</i>	Protozoário
Hanseníase	<i>Mycobacterium leprae</i>	Bactéria
Filariose	<i>W. bancrofti</i> , <i>B. malayi</i> , <i>B. timori</i>	Helminto
Oncocercose	<i>Onchocerca volvulus</i>	Helminto
Raiva	Gênero <i>Lyssavirus</i>	Vírus
Esquistossomose	Gênero <i>Schistosoma</i>	Helminto
Verminoses intestinais	<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Necator americanus</i> e <i>Ancylostoma duodenale</i>	Helmintos
Teníase/Cisticercose	<i>Taenia solium</i> <i>Taenia saginata</i>	Helminto
Tracoma	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Bactéria

Fonte: OMS

Nas seções a seguir são descritas, brevemente, as três DNTs (Doença de Chagas, Leishmanioses e Esquistossomose) estudadas nesta tese.

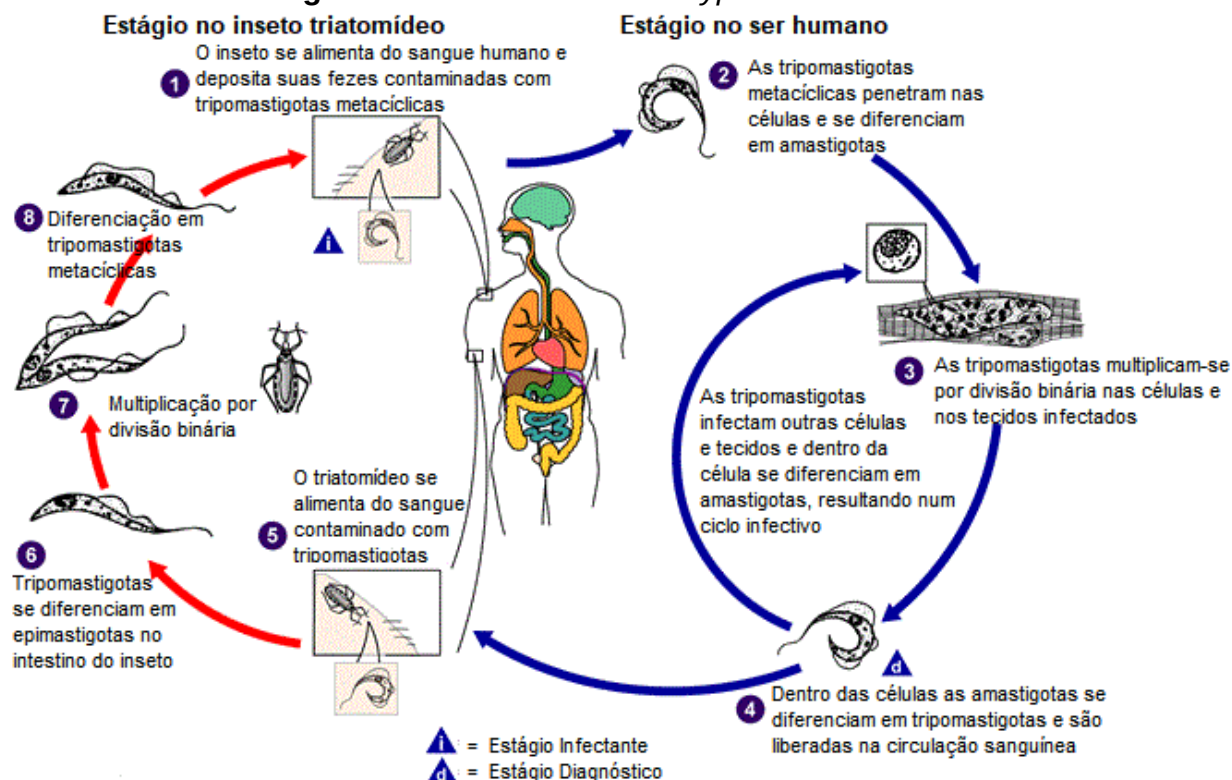
2.1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma patologia potencialmente fatal causada por um protozoário parasita flagelado, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Foi assim nomeada em homenagem ao pesquisador brasileiro Carlos Justino Ribeiro Chagas, que a descobriu em 1909¹².

Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, sendo a principal via de transmissão para humanos através do contato com insetos hematófagos do gênero *Triatoma*. A doença de Chagas ocorre principalmente na parte continental da América Latina e nas ilhas do Caribe. No entanto, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais detectado nos Estados Unidos, no Canadá, em muitos países europeus e em alguns países do Pacífico Ocidental. Isto é principalmente devido à mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo¹².

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, o tipo de heteroxênico (**Figura 1**), no qual o parasita intracelular é submetido a fase de multiplicação no hospedeiro (ser humano e outros animais) e extracelular no inseto vetor (barbeiro). O parasita passa por vários estágios de desenvolvimento nos hospedeiros mamíferos e no inseto vetor, o qual não parece ser afetado pela infecção do parasita. Tripomastigotas não replicativas e as amastigotas replicativas presentes na corrente sanguínea são formas típicas do parasita que são identificadas em hospedeiros mamíferos, enquanto epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas infectam o vetor invertebrado¹³.

Figura 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



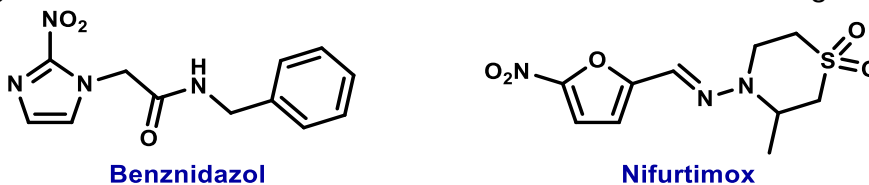
Adaptado: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> 19/12/2017

A doença tem dois estágios clinicamente definidos: a fase aguda, muitas vezes assintomática e de difícil diagnóstico, com duração de cerca de 2 meses, durante os quais o *T. cruzi* pode ser facilmente detectado por um exame de sangue, e a fase crônica, muito difícil de detectar o parasita. A fase crônica pode ser separada em dois estágios: estágio crônico indeterminado, que é encontrado na maioria dos pacientes, no qual a infecção é controlada pelo sistema imune do hospedeiro e permanece assintomática; e o estágio sintomático crônico subsequente que se desenvolve em 10-40% dos pacientes infectados, a maioria dos quais desenvolve cardiomiopatias, enquanto alguns sofrem de megasíndromes do tubo digestivo (mega-esôfago ou megacólon) ou ambos. A insuficiência cardíaca congestiva e a morte súbita continuam sendo as principais causas de morte nesses pacientes¹³.

Não há vacinas disponíveis e o arsenal terapêutico atual é limitado a dois medicamentos: benznidazol (BDZ) e nifurtimox (**Figura 2**). Estes são eficazes na fase aguda, transmissão congênita e em crianças com infecção crônica. No entanto, ensaios clínicos recentes mostraram limitações em adultos com infecção crônica e efeitos colaterais ocorrendo durante o tratamento. Neste contexto, há uma

necessidade urgente de medicamentos novos, eficazes, seguros e acessíveis para combater esta doença complexa¹⁴.

Figura 2 – Benznidazol e Nifurtimox, medicamentos antichagásicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como o alvo biológico mais promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anti-*T. cruzi* tem-se a cruzaina que é a enzima mais abundante na família das cisteínas proteases do parasita. Está é um alvo que não apresenta equivalente em humanos, porém nota-se a existência de catepsinas L e B que possuem certa similaridade estrutural¹⁵. Seus inibidores merecem atenção especial nas estratégias de design de fármacos, uma vez que este alvo está diretamente relacionado às vias metabólicas do desenvolvimento do *T. cruzi*, contribuindo para o desenvolvimento e diferenciação dos parasitos em vários estágios de seu ciclo de vida, invasão do hospedeiro e resposta imune alterada^{16–18}.

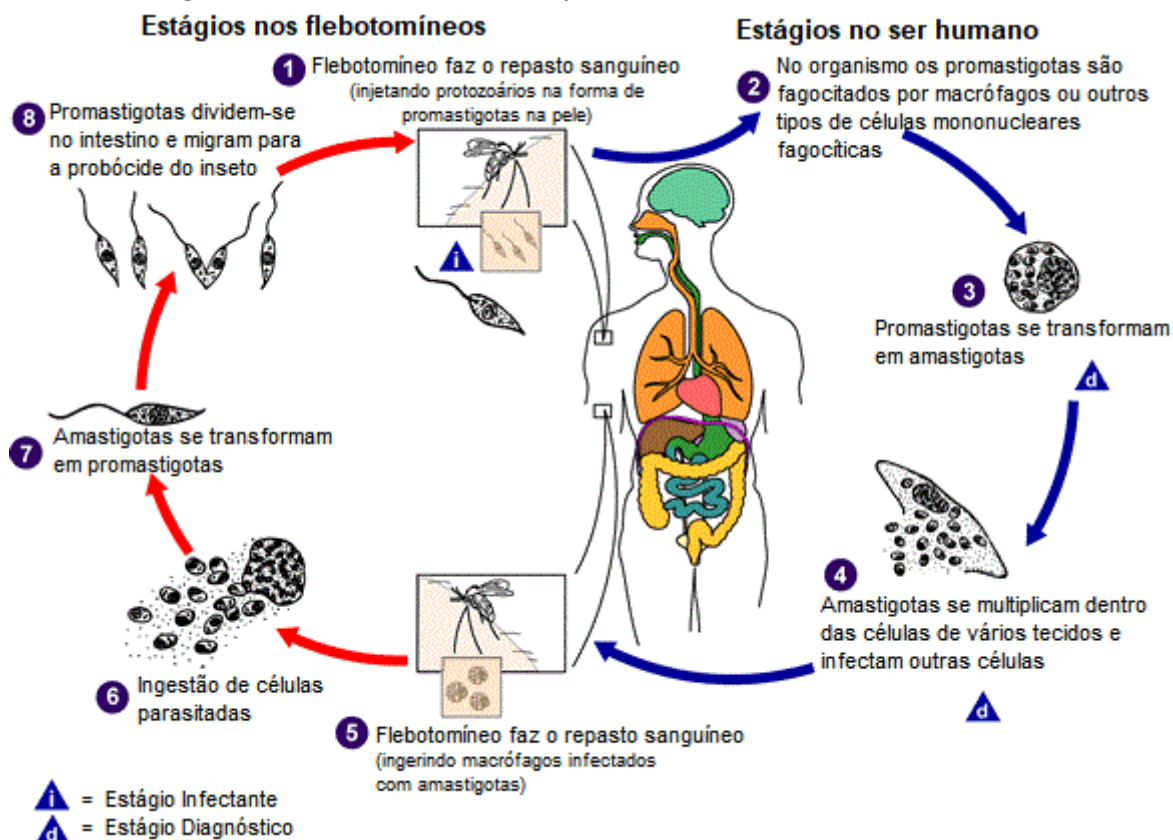
2.1.2 Leishmaniose

A leishmaniose, uma infecção parasitária crônica de humanos e mamíferos, é uma doença negligenciada que é comum em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Continua amplamente subestimada e afeta principalmente crianças e mulheres, com graves consequências clínicas. Diferentes espécies de parasitas protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* podem causar leishmaniose humana, levando a várias manifestações viscerais, cutâneas e mucocutâneas¹⁹.

A leishmaniose afeta coletivamente 12 milhões de pessoas em 98 países, e 350 milhões estão em risco. Além disso, estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes a cada ano sejam atribuídos a esta doença²⁰.

O ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania* tem dois estágios: um estágio promastigota flagelado, que se propaga extracelularmente no intestino dos flebótomos; e um estágio amastigota flagelado, que prolifera em fagócitos dentro de fagolisossomos de hospedeiros mamíferos²¹ (**Figura 3**).

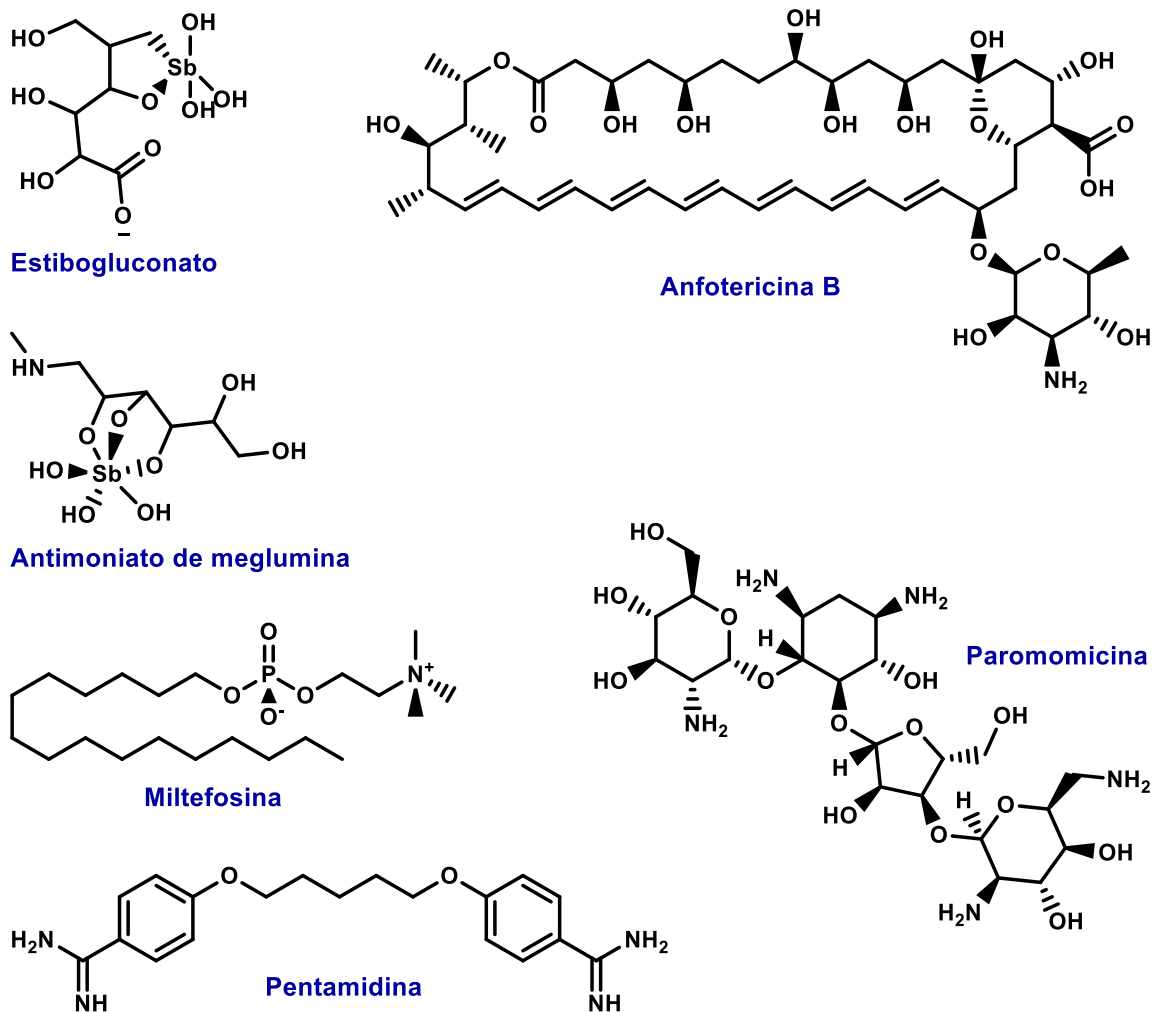
Figura 3 – Ciclo de vida dos parasitas do Gênero *Leishmania*.



Adaptado: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> 19/12/2017

Atualmente, os tratamentos utilizados para a leishmaniose são caracterizados pela ausência de vacinas e pela relativa eficácia de fármacos utilizados como antimoniais pentavalentes, anfotericina B (AmB), paromomicina, pentamidina e miltefosina (**Figura 4**). De fato, muitos desses medicamentos têm alta toxicidade e causam efeitos colaterais significativos e nos últimos anos tem se desenvolvido resistência em parasitas responsáveis por esta doença. Como resultado, há uma necessidade urgente de acelerar o desenvolvimento de novas gerações de antileishmaniais mais eficaz, com um perfil de segurança melhorado²².

Figura 4 – Antimoniais pentavalentes (Estibogluconato e Antimoniato de meglumina), Anfotericina B, Paromomicina, Pentamidina e Miltefosina, medicamentos antileishmaniais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

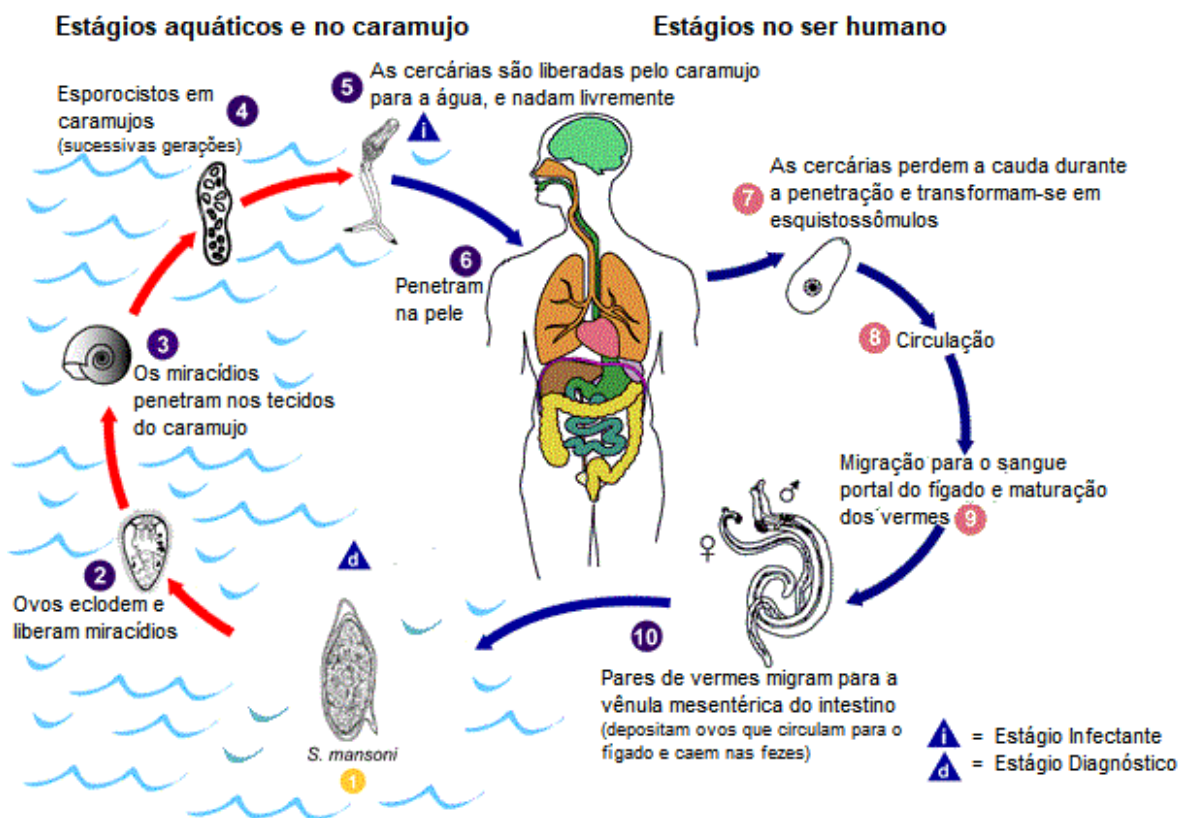
2.1.3 Esquistossomose

A esquistossomose é uma infecção parasitária aguda e crônica causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*. Seis espécies são responsáveis por infecções em humanos em 78 países da África, Américas, Oriente Médio e Sudeste Asiático²³. Esta doença ocorre entre as populações mais pobres, especialmente em locais sem acesso a água potável e condições sanitárias precárias e ocupa o segundo lugar em termos de sua importância para a saúde pública, apresentando apenas a malária a sua frente²⁴. Estima-se que 230 milhões de pessoas estejam infectadas com *Schistosoma* spp em todo o mundo e 206,5 milhões de pessoas necessitaram de tratamento para esquistossomose em 2016²³. Nas Américas, estima-se que 25

milhões de pessoas vivem em áreas de risco e 1 a 3 milhões de pessoas estão infectadas, especialmente no Brasil e na Venezuela. No Brasil, a única espécie encontrada em áreas endêmicas é o *Schistosoma mansoni*²⁵.

O *S. mansoni* apresenta um ciclo de vida complexo (**Figura 5**) que envolve hospedeiros vertebrados (muitas vezes mamíferos) e invertebrados (caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria*), nos quais ocorrem fases reprodutivas sexual e assexuada, respectivamente. Os hospedeiros mamíferos definitivos são infectados através da penetração de cercarias pela pele, que perdem a cauda bifurcada e se tornam esquistossômulos. Após 5 a 7 dias, os esquistossômulos migram para o sistema porta hepático através da corrente sanguínea e se transformam em vermes adultos. Os vermes machos e fêmeas emparelham no sistema porta hepático e migram para as veias mesentéricas para depositar cerca de 300 ovos por dia. Esses ovos ou passam para o lúmen intestinal para serem eliminados nas fezes e continuarem o ciclo de vida ou passam pelas veias mesentéricas e se alojam no fígado, onde podem causar alterações granulomatosas e fibrose, sendo que ambos são importantes contribuintes para as complicações da doença²⁶.

Figura 5 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

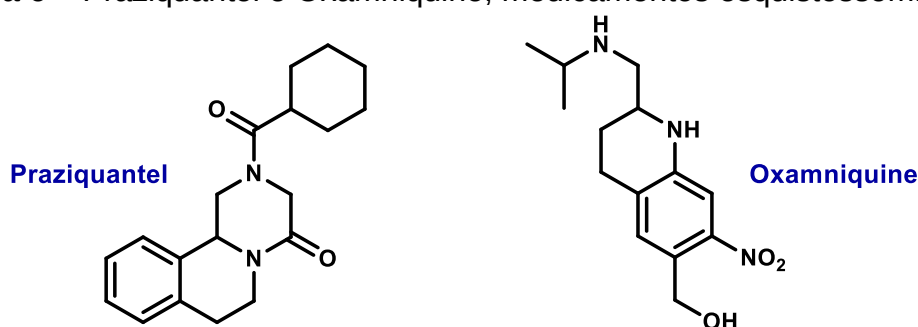


Adaptado: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html> 19/02/2018

A doença pode ser classificada como aguda, crônica ou avançada. A doença aguda ocorre como resultado das respostas imunes do hospedeiro as formas do parasita. Esta fase é geralmente assintomática em indivíduos de áreas endêmicas, mas em pessoas infectadas pela primeira vez, os sintomas incluem febre, dor de cabeça, mal-estar, dor abdominal e eosinofilia. A fase crônica da infecção é devida principalmente à reação inflamatória granulomatosa contra os ovos depositados em diferentes órgãos e tecidos. Na esquistossomose intestinal, a deposição de ovos ocorre principalmente no fígado e na parede intestinal e pode levar à formação de múltiplos granulomas e lesões teciduais nesses órgãos. Isso causa hiperplasia da mucosa intestinal, polipose, ulceração e formação de abscessos, que se manifestam clinicamente principalmente como dor abdominal, diarreia crônica e sangramento periretal. A formação de granuloma causada pela deposição de ovos no fígado resulta em uma fibrose periportal que se estende à doença avançada, com hipertensão portal e hepatoesplenomegalia. Ascite e sangramento de varizes são duas complicações graves e comuns nesta fase, que podem resultar na morte do paciente²⁷.

Os dois principais medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose são o Praziquantel (PZQ) e a Oxaminiquina (OXA) (**Figura 6**). O tratamento da esquistossomose é baseado no uso do praziquantel, um derivado pirazinoisoquinolina, que possui alta eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma* de importância clínica, além disso, possui um baixo custo de produção. A OXA é outro fármaco disponível, mas a sua utilização é limitada, não sendo eficaz contra todas as formas do parasito. Atualmente, o PZQ tem sido o fármaco de escolha para o tratamento medicamentoso no Brasil, mas seu uso extensivo, inevitavelmente, culminou em baixas taxas de cura, aparecimento de cepas de *S. mansoni* resistentes, além de terem sido observados efeitos colaterais causados por esse medicamento²⁸.

Figura 6 – Praziquantel e Oxamniquine, medicamentos esquistossomicidas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

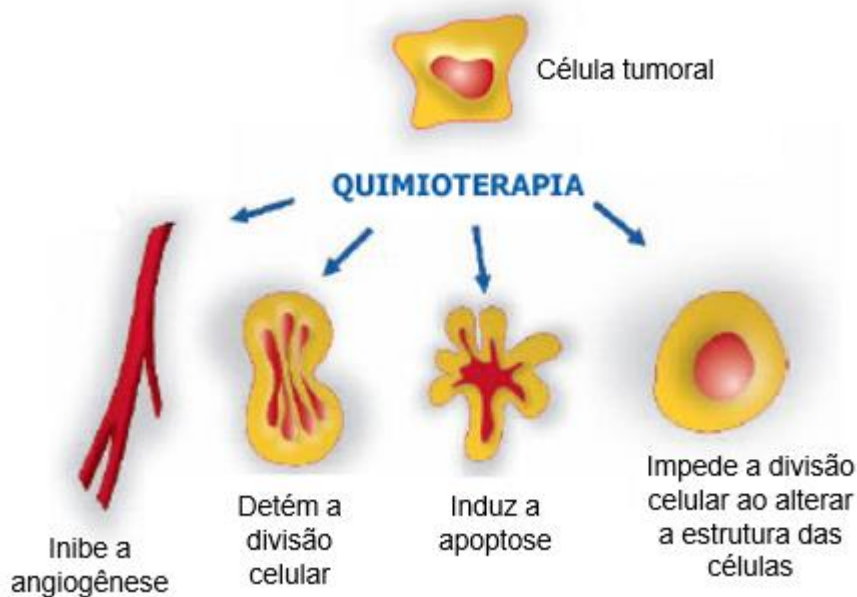
Atualmente, a busca por fármacos como agentes profiláticos também é uma necessidade urgente, sendo capaz de matar formas imaturas. Idealmente, um único medicamento deve ter ampla eficácia contra os esquistossômulos e vermes adultos. Tais fatos estimularam novos estudos em busca de tratamentos alternativos que pudessem substituir ou complementar o uso do PZQ no tratamento do *Schistosoma mansoni*²⁹.

2.2 CÂNCER

A viabilidade dos organismos multicelulares requer que as células individuais apresentem potencial de se proliferar, se diferenciar, permanecer em repouso, envelhecer, e até mesmo morrer em nome da homeostase do organismo. O controle do destino celular envolve vários níveis de complexidade, organização e sinalização hormonal. A origem de várias doenças reside no mau funcionamento e/ou perda desse controle, que conduz à perturbação da homeostasia do sistema e, finalmente, a morte. Os cânceres são os exemplos mais comuns de tais aberrações nos mecanismos que controlam o destino celular³⁰.

A resistência aos fármacos anticâncer é um processo complexo, que resulta de alterações nos alvos de ligação; desenvolvimento de vias alternativas para a ativação do crescimento; mudanças na farmacologia celular, incluindo o aumento do efluxo do fármaco; mudanças regulatórias que alteram as vias de diferenciação ou caminhos para a resposta à adversidade ambiental; alterações na fisiologia local do câncer, como o fornecimento de sangue, hidrodinâmica dos tecidos, o comportamento das células vizinhas, e resposta do sistema imunológico. Todos estes mecanismos específicos são facilitados pelas características intrínsecas do câncer, tais como heterogeneidade das células tumorais, a redundância das vias de promoção de crescimento, o aumento da taxa de mutação e/ou alterações epigenética, e a variação do comportamento dinâmico do tumor no tempo e no espaço. A contribuição relativa de cada um destes fatores e falta de modelos *in vitro* adequados que mimetizem o microambiente tumoral, torna ainda mais complicada a descoberta de novos agentes antineoplásicos³¹. Algumas estratégias avaliadas para a busca de fármacos antitumorais estão representadas na **Figura 7**.

Figura 7 – Representação dos mecanismos farmacológicos de agentes antitumorais.



Adaptado: <http://mdrcells.blogspot.com/2013/03/quimioterapia.html> 02/02/2014

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

2.3 MOLÉCULAS PRIVILEGIADAS

Como estratégia para o tratamento de DNT e do câncer, bem como de outras diversas patologias, são empregadas pequenas moléculas orgânicas as quais são ferramentas poderosas na regulação de receptores farmacológicos envolvidos em processos biológicos e médicos. Dentre os fragmentos que formam a estrutura dos fármacos estão presentes grupamentos químicos (grupos farmacofóricos) responsáveis pela ligação aos sítios presentes nos receptores, em sua maioria macromoleculares, e através desse processo, se desencadeia a atividade biológica³². Alguns destes blocos estruturais apresentam a capacidade de se ligar a vários alvos, sendo conhecidos como estruturas privilegiadas^{10,33}.

Estas estruturas, também definidas como promiscuas, estão presentes em compostos naturais e sintéticos. A sua ação pode estar relacionada a ligação em diferentes alvos do mesmo receptor ou em receptores diferentes, relacionados ou não ao mesmo mecanismo, em uma mesma doença ou em diferentes processos patológicos⁷.

A compreensão da patogênese de doenças avançou enormemente nas últimas décadas. Como consequência, o número de alvos farmacológicos estudados para o tratamento de uma mesma patologia também é algo notório. Neste contexto, a pesquisa de fármacos, que por muito tempo foi (e ainda é), voltada principalmente para a descoberta de pequenas moléculas capazes de modular a função biológica de uma única proteína alvo não se mostra tão essencial e promissora³⁴.

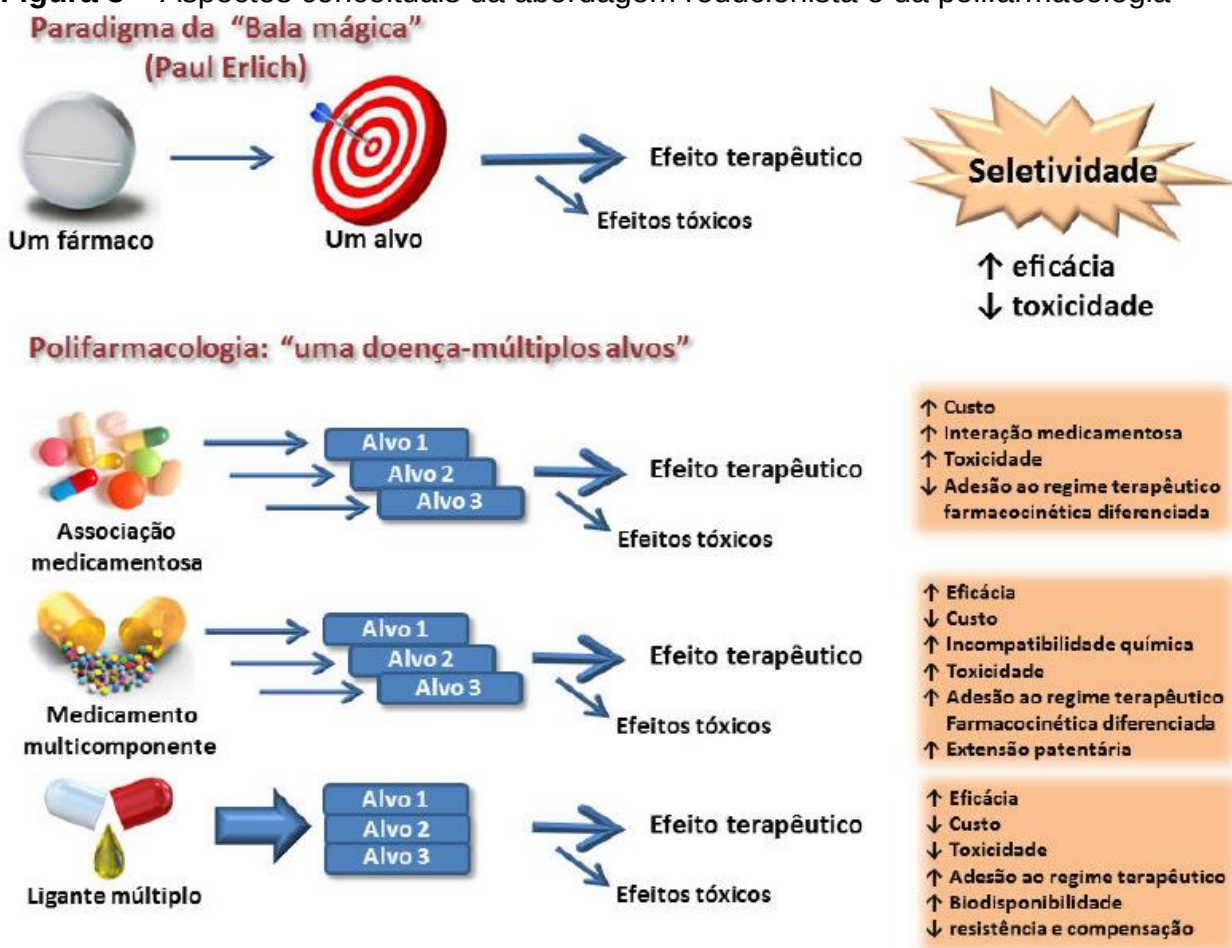
O desenvolvimento de ligantes seletivos *in vitro* foi por muito tempo buscado como única alternativa para o desenvolvimento de um medicamento. Contudo, em sua maioria, as doenças apresentam perfil multifatorial e as células podem se aproveitar desta característica e encontrar formas para compensar uma proteína (alvo) cuja atividade é afetada por um fármaco, tirando partido da redundância do sistema. Esse fator confronta químicos medicinais, levando a frustrações em pesquisas, trazendo à tona a importância do desenvolvimento de moléculas com potencial de agir em mais um alvo farmacológico⁸.

Fármacos que agem em um único alvo podem ser inadequados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças cardiovasculares, infecções e câncer, que envolvem vários fatores e mecanismos patogênicos³⁵. Diferentes abordagens farmacológicas oferecem possíveis maneiras de superar os problemas decorrentes do uso destes medicamentos. Uma polimedicação com diferentes agentes ativos pode ser uma saída, onde se combina diferentes mecanismos terapêuticos. Todavia, esta abordagem pode ser desvantajosa para o paciente, dificultando a adesão ao tratamento. Uma segunda via pode ser o uso de uma fórmula farmacêutica com a combinação de diferentes princípios ativos a fim de simplificar e melhorar os regimes de dosagem ao paciente. Finalmente, uma terceira estratégia se baseia no pressuposto de que um único composto poderá acertar vários alvos³⁶. Claramente, a terapia com um único fármaco que tenha várias propriedades biológicas teria vantagens inerentes sobre os demais esquemas. Ele evitaria o desafio

de administração de várias entidades químicas, que poderia ter diferente biodisponibilidade, farmacocinética e metabolismo³⁴ (**Figura 8**).

A descoberta de fármacos, por muito tempo se baseava na busca de um composto que somente seria adequado para seguir em estudos que fosse altamente seletivo para um alvo desencadeando um único mecanismo, segundo modelo da chave-fechadura proposto por Ehrlich a mais de um século atrás. Esse modelo não é tão eficaz, atualmente. São crescentes as evidências da polifarmacologia, ou seja, que os efeitos clínicos são muitas vezes por causa da interação de uma única ou várias moléculas com múltiplos alvos. Hoje os métodos experimentais e as abordagens computacionais apontam mudanças para modelos multialvos⁶.

Figura 8 – Aspectos conceituais da abordagem reducionista e da polifarmacologia



Fonte: DIAS, *et al.* 2015³⁷.

O desenvolvimento de um novo fármaco pode ser descrito como um processo de três passos, em que um alvo clinicamente relevante é identificado, moléculas que

modulam a sua função são testadas, e a informação é traduzida para um possível regime terapêutico³⁵ (**Figura 9**).

Figura 9 – Descoberta de fármacos e desenvolvimento de fluxo de trabalho.



Fonte: Adaptado de BENEDETTI, *et al.* 2015³⁵.

Investigações recentes têm sugerido que a eficácia da terapêutica anticâncer pode ser aumentada pela associação de fármacos que agem em diferentes alvos biológicos. Esta questão foi sondada pela avaliação do *status* clínico de protótipos antitumorais com alvos múltiplos sendo que a maior parte dos candidatos a medicamentos anticâncer aprovados (73,9%) e em fase III (75,0%), a maioria dos encontrados em fase II (62,8%) e I (53,6%), e a minoria dos que tiveram os estudos descontinuados (35,3%) apresentaram perfil *multi-target*. Isso sugere que moléculas promíscuas apresentam vantagens clínicas significativas e a busca por tais características surge como estratégia que deve ser mais amplamente explorada³⁸.

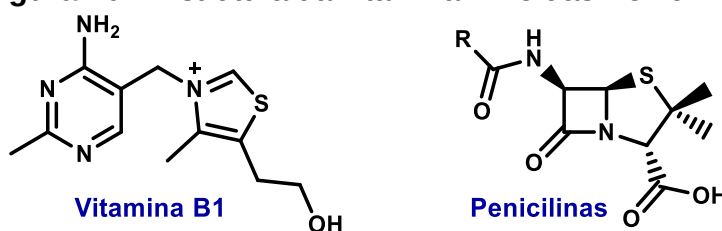
Compostos derivados de estruturas privilegiadas que apresentam eventuais ações promíscuas devem ser cuidadosamente investigados e levados em consideração os potenciais benefícios que estes podem apresentar no desenvolvimento de candidatos a fármacos. Esta investigação deve ser multidisciplinar e levar em consideração a complexidade que os processos patológicos apresentam com mecanismos variados e como estas diferentes interações serão utilizadas na terapia em estudo⁹.

Compostos aza-heterocíclicos constituem um importante grupo de moléculas orgânicas que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, devido às suas propriedades biológicas³⁹. Dentre este grupo, nesta tese, é dado destaque para os 1,3-tiazóis e as ftalimidas, núcleos estes discutidos nas sessões a seguir.

2.3.1 Atividades farmacológicas de 1,3-tiazóis

Os heterociclos contendo nitrogênio com um átomo de enxofre são uma classe importante de compostos em química medicinal. Especialmente, os tiazol e seus derivados, tais como vitamina B1 e as penicilinas⁴⁰ (**Figura 10**).

Figura 10 – Estrutura da vitamina B1 e das Penicilinas



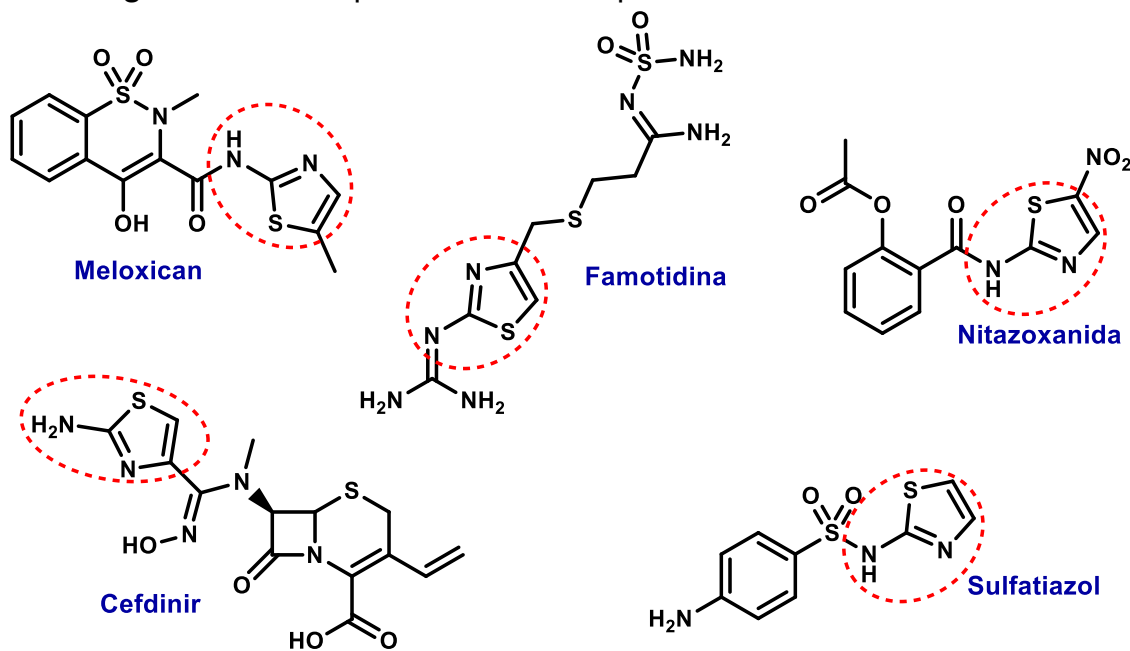
Fonte: Elaborado pelo autor.

O núcleo heterocíclico 1,3-tiazol pode ser encontrado como subunidade constituinte de diversas moléculas biologicamente ativas naturais e/ou sintéticas. Essa classe de compostos apresenta amplo espectro de atividades biológicas, tais como atividades anticâncer^{40,41} antibacteriana^{42,43}, antiparasitária^{16,44–46} e anti-inflamatória^{42,47}.

Em recente revisão da literatura⁴⁰ foram expostas as importâncias farmacofóricas, bastante utilizadas na química medicinal e na obtenção de novos protótipos a fármacos, de derivados 2-aminotiazol. A estes pode ser atribuída a propriedade de multialvo, tendo em vista que nesta revisão lhe foram atribuídas nove diferentes atividades farmacológicas, que foram: anticonvulsivante, antidiabética, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antiviral, antimicrobiana, antileishmanicida e antitumoral.

Um certo número de princípios ativos que apresentam este grupamento, já estão disponíveis no mercado para uso, como por exemplo (**Figura 11**): o Meloxicam, anti-inflamatório não-estereoidal⁴⁸; a Famotidina, um antagonista competitivo do receptor H₂ da histamina⁴⁹, o antiparasitário Nitazoxanida⁵⁰; e os antimicrobianos Cefdinir⁵¹ e Sulfatiazol⁵².

Figura 11 – Exemplos de fármacos que contem 2-amino-1,3-tiazol.

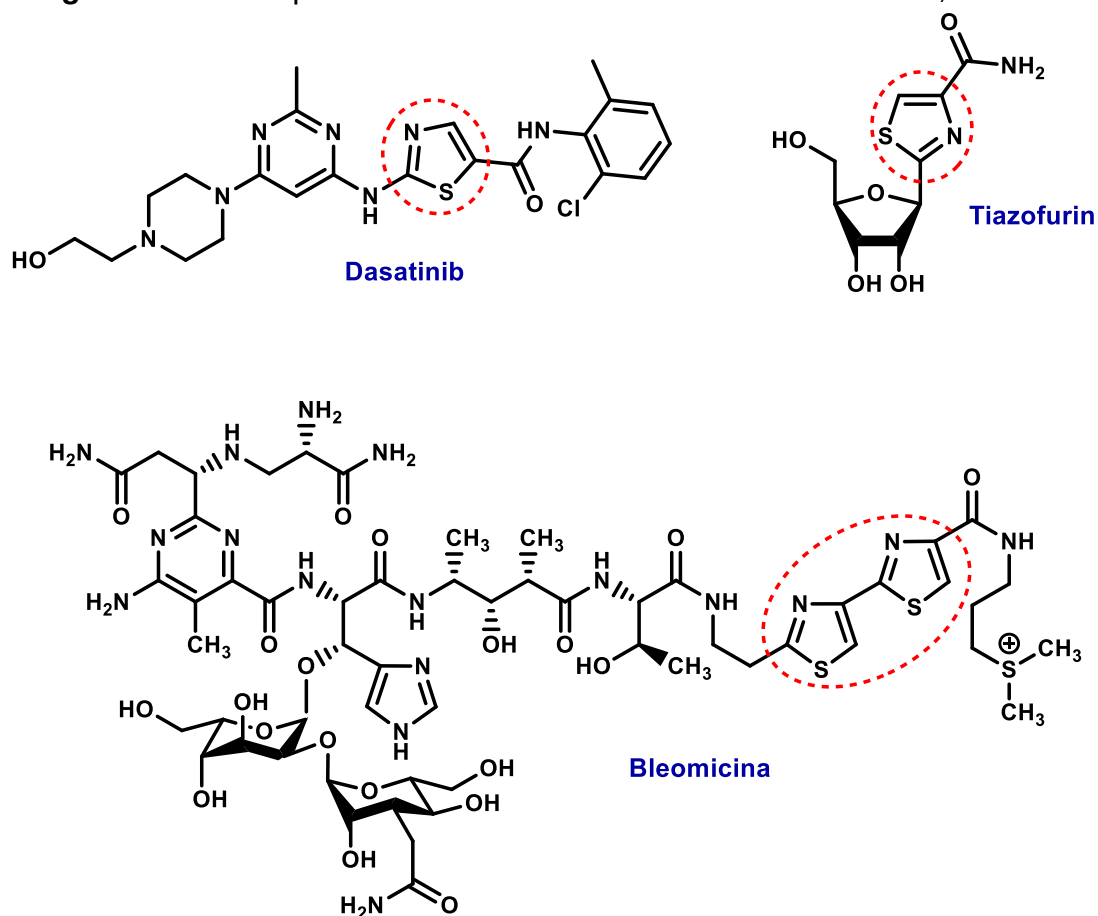


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas últimas décadas, a eficácia clínica do tiazofurin e seus análogos, e bleomicinas (MBL) salientou a importância da porção tiazol para o planejamento de candidatos a fármacos anticâncer. MBL foram clinicamente usadas para tratar vários tipos de cânceres, como carcinomas de células escamosas, linfomas malignos e câncer testicular. O radical de *bis*-tiazol de MBL tem sido demonstrado que se liga ao DNA e estudos indicam que esse é um eficaz mecanismo de sua ação antiproliferativa.

Dasatinib, um inibidor de tirosina-quinase de segunda geração, é um outro exemplo de derivado tiazol utilizado no tratamento do câncer⁵³ (**Figura 12**).

Figura 12 – Exemplos de fármacos antitumorais derivados de 1,3-tiazóis.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante destes dados de versatilidade biológica, os derivados tiazóis são fortes candidatos a fármacos potentes em diversificados alvos, sendo bastante promissora a obtenção e avaliação de novas moléculas que apresentem esse grupo em sua estrutura. Frente a este perfil, são grandes as possibilidades de descoberta de novos tratamentos para DNT e do câncer dentre outras patologias, através de um planejamento racional de derivados tiazólicos.

2.3.2 Atividades farmacológicas das ftalimidas

Quimicamente, o núcleo Ftalimida (isoindoline-1,3-dione) encontra-se na classe das imidas cíclicas. Este grupamento é aromático, bicíclico, apresentando duas carbonilas, no anel de cinco átomos, ligadas a um nitrogênio⁵⁴. Ele é bastante utilizado como importante ferramenta na síntese orgânica como protetor de reações

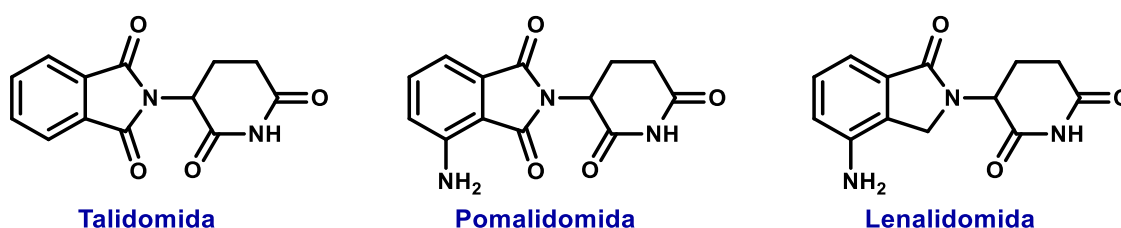
indesejadas, fato este que leva muitas equipes de pesquisa a usá-lo como uma forma de otimização da qualidade de compostos bioativos⁵⁵.

Aos derivados de ftalimidas é atribuído amplo espectro de propriedades farmacológicas, tais como anticâncer^{56,57}, analgésica⁵⁸, anticonvulsivante⁵⁹, antituberculose⁶⁰, hipolipidêmica e hipoglicemiante⁶¹, anti-inflamatória^{58,62}, antioxidante⁶³, antimicrobiana^{60,63}, antipsicótica⁶⁴ e antiparasitária^{45,65}.

Os dados da literatura apontam o núcleo ftalimida como adequado para interagir com diferentes alvos biológicos, além da porção imina destes derivados proporcionar-lhes perfil hidrofóbico que aumenta o seu potencial para atravessar membranas biológicas *in vivo*. Frente a este perfil multialvos biológicos das ftalimidas e buscando aumentar tais aspectos são desenvolvidas diversas abordagens de hibridação molecular para a introdução de diferentes subunidades farmacofóricas como hidrazonas, pirazóis, tiazóis, grupos aril, dentre outros⁶³.

Em 2013, foi aprovado pelo FDA e pela Comissão Europeia o uso de pomalidomida, um derivado das ftalimidas, para o tratamento de mieloma múltiplo refratário. Este fármaco é um derivado da talidomida, potente anti-angiogênico, e da lenalidomida (**Figura 13**), um agente imunomodulador. Através de otimização estrutural, a pomalidomida é 10 vezes mais potente e tem se mostrado eficaz em casos de terapia de pacientes com resistência a talidomida e lenalidomida⁶⁶ (**Figura 13**).

Figura 13 – Análogos da Talidomida.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Frente a um cenário de atividades tão diversificado e de suas características de estabilidade e fácil síntese, é de grande relevância o aprofundamento de estudo e a busca por novos derivados híbridos das ftalimidas. Com este núcleo podem ser desenvolvidos novos medicamentos para diversas patologias incluindo o câncer e as DNT.

3 OBJETIVOS

Para este trabalho foram estabelecidos como objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Frente a necessidade da descoberta de novos fármacos eficazes para o tratamento de DNT e do câncer, o objetivo deste trabalho é identificar inéditos compostos derivados ftalimido-1,3-tiazóis com potentes atividades biológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

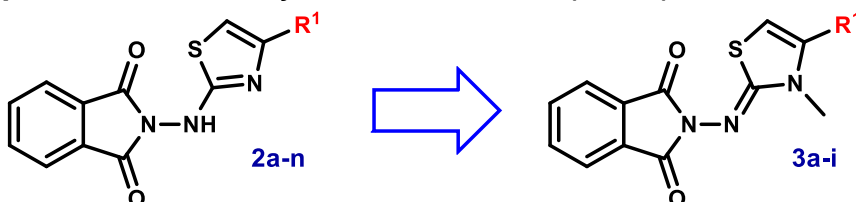
- Planejar, sintetizar e purificar séries inéditas de derivados híbridos ftalimido-1,3-tiazóis, ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis e ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis;
- Determinar as características físico-químicas – ponto de fusão, R_f , UPLC – e elucidação estrutural dos compostos através de técnicas de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H - RMN) e Carbono (^{13}C - RMN), Espectrometria de Massa de Alta Resolução (HRSM);
- Avaliar a citotoxicidade frente a células normais de mamíferos;
- Determinar as propriedades anti-*T. cruzi*, anti-*L. infantum* e anti-*S. mansoni*;
- Determinar a IC_{50} dos compostos mais ativos frente as atividades biológicas testadas;
- Avaliar a citotoxicidade frente a diferentes linhagens de celular neoplásicas;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação.

4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Recentemente, foi obtida, pelo LpQM, uma série de derivados ftalimido-1,3-tiazóis (**2a-n**) com propriedades farmacológicas multialvos. Tais compostos fazem parte deste trabalho e, suas atividades (anti-*T. cruzi*, leishmanicida e anti-*S. mansoni*) estão apresentadas, na sessão de resultados. Estas moléculas também se mostraram ativas frente a linhagens tumorais e na modulação de citocinas do processo inflamatório⁶⁷.

Frente a estes dados e buscando um aprimoramento das atividades atribuídas a série **2a-n**, uma nova série de compostos foi planejada buscando avaliar o efeito da introdução de uma metila em N3 obtendo análogos aos compostos já conhecidos. O **Esquema 2** apresenta a modificação proposta:

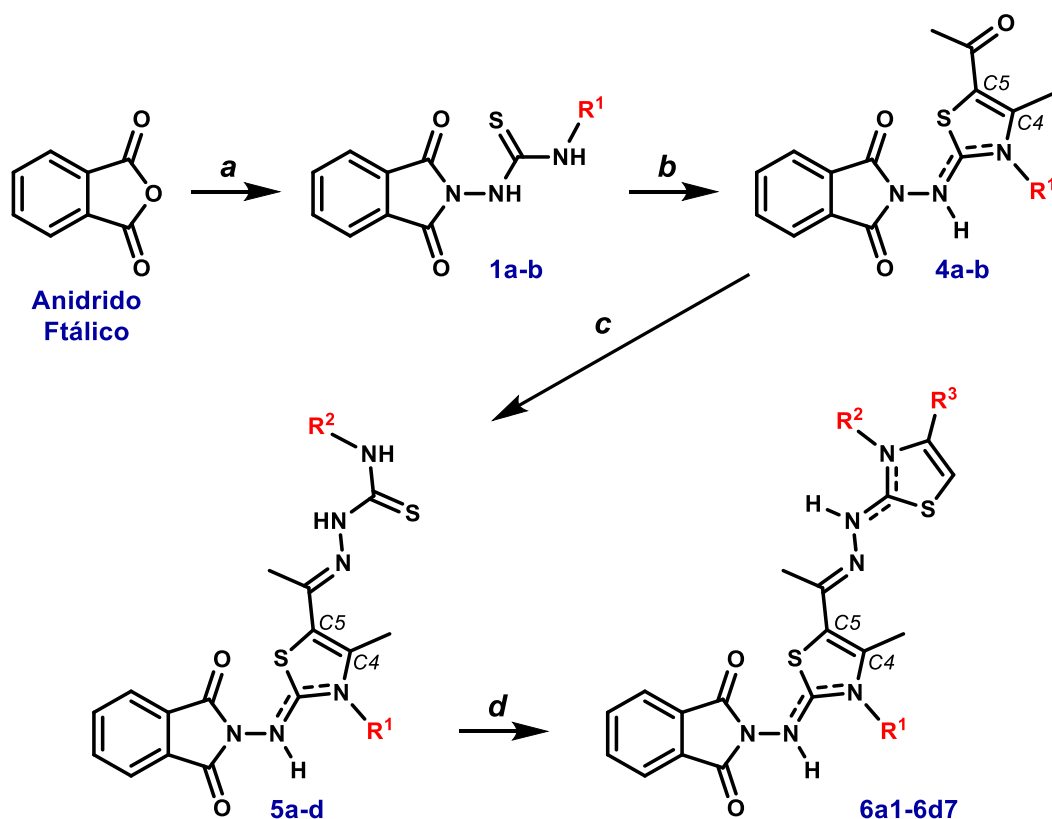
Esquema 2 – Modificações estruturais dos protótipos da série **2a-n**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, planejou-se desenvolver substituições na posição C5 do heterociclo tiazol, almejando a identificação de novos protótipos a fármacos antitumorais e no combate a DNT. Tais substituições são inovadoras no grupo de pesquisa, tendo em vista que neste se tem experiência em obtenção de derivados 1,3-tiazol substituídos em C4 e, em alguns casos, substituídos em C5 apenas com uma metila. Neste caso, foram introduzidos substituintes tiossemicarbazonas (**5a-d**). Partindo destas, desenvolveram-se também novas ciclizações com a obtenção de ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1-6d7**) com substituições diversas no novo heterociclo formado (**Esquema 3**).

Esquema 3 – Rota sintética para a obtenção dos ftalimido-1,3-tiazóis substituídos em C5.



a) Tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida, DMF, refluxo, 1h; **b)** 3-cloro-2,4-pentanodiona, propanona, 1,5h, refluxo; **c)** Tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida, etanol, H_2SO_4 ,))) ; **d)** 2-bromo-cetonas aromáticas, isopropanol,)))).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O planejamento das séries a cima possibilitou realizar estudo de relação estrutura atividade de diferentes grupamentos promissores (tiossemicarbazonas e 1,3-tiazóis) localizados na posição C5 do anel tiazólico central. Já ao nível do segundo tiazol formado nos compostos **6a1-6d7** foi explorado o efeito eletrônico de substituintes aromáticos localizados na posição C4 deste anel. Partindo da fenila como anel aromático de referência, diferentes substituintes ativadores e desativadores eletrônicos do anel fenílico foram inseridos.

No **Esquema 4** estão apresentados todos os compostos obtidos para integrar esta tese.

Esquema 4 – Séries de novos derivados ftalimido-1,3-tiazóis obtidos.

2a-n

Comp.	R ¹	R ²	Comp.	R ¹	R ²
2a	CH ₂ -Cl	H	2h	4-NO ₂ -Ph	H
2b	Ph	H	2i	4-Ph-Ph	H
2c	4-Me-Ph	H	2j	2-Naph	H
2d	4-MeO-Ph	H	2k	3-NO ₂ -Ph	H
2e	4-F-Ph	H	2l	3,4-diCl-Ph	H
2f	4-Cl-Ph	H	2m	2,4-diCl-Ph	H
2g	4-Br-Ph	H	2n	4-Br-Ph	Me

3a-i

Comp.	R ¹	Comp.	R ¹
3a	Ph	3f	4-Ph-Ph
3b	4-MeO-Ph	3g	2-Naph
3c	4-F-Ph	3h	3,4-diCl-Ph
3d	4-Cl-Ph	3i	2,4-diCl-Ph
3e	4-NO ₂ -Ph		

4a-b

Comp.	R ¹
4a	-
4b	Me

5a-d

Comp.	R ¹	R ²
5a	-	H
5b	Me	H
5c	-	Me
5d	Me	Me

6a1-6d7

R ²	R ¹			
	-	Me		
	Comp.	R ³	Comp.	R ³
-	6a1	Ph	6b1	Ph
	6a2	4-F-Ph	6b2	4-F-Ph
	6a3	4-Cl-Ph	6b3	4-Cl-Ph
	6a4	4-NO ₂ -Ph	6b4	4-NO ₂ -Ph
	6a5	4-MeO-Ph	6b5	4-MeO-Ph
	6a6	2-Naph	6b6	2-Naph
	6a7	4-Ph-Ph	6b7	4-Ph-Ph
Me	6c1	Ph	6d1	Ph
	6c2	4-F-Ph	6d2	4-F-Ph
	6c3	4-Cl-Ph	6d3	4-Cl-Ph
	6c4	4-NO ₂ -Ph	6d4	4-NO ₂ -Ph
	6c5	4-MeO-Ph	6d5	4-MeO-Ph
	6c6	2-Naph	6d6	2-Naph
	6c7	4-Ph-Ph	6d7	4-Ph-Ph

Fonte: Elaborado pelo autor.

A configuração dos heterociclos 1,3-tiazóis presentes nos compostos **4a-b**, **5a-d** e **6a1-6d7** que estão representados no **Esquema 4** deve ser interpretada como: para os compostos que não apresentam substituinte (s) metila (s) em R¹ e/ou R², a dupla ligação encontra-se endocíclica ao anel e o nitrogênio ligado na posição C2 está

ligado a um hidrogênio; para os compostos que apresentam substituinte (s) metila (s) em R¹ e/ou R², a dupla ligação encontra-se exocíclica ao anel, não estando o nitrogênio, da posição C2, ligado a um hidrogênio;

Quanto aos códigos atribuídos aos compostos da série **6a1-6d7**, estes indicam através da letra qual foi o derivado tiossemicarbazona precursor, como por exemplo: o composto **6a1** foi obtido a partir de **5a**, já o composto **6d7** teve como intermediário sintético **5d**.

Ainda referente a série **6a1-6d7**, nove destes compostos foram desenvolvidos no LpQM, sendo os demais obtidos e caracterizados no IICiMed. A decisão de expandir e completar esta série se deu frente aos promissores resultados biológicos encontrados com alguns dos compostos sintetizados inicialmente em Recife.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos e recursos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho estão descritos a seguir.

5.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Os inéditos devivados heterocíclicos sintéticos foram obtidos das seguintes formas:

5.1.1 Síntese das ftalimido-tiossemicarbazidas (**1a** e **1b**)

Em balão de 100 mL, adicionou-se 20 mmol (2,96 g) de anidrido ftálico, 20 mmol de tiossemicarbazida ou 4-metil-3-tiossemicarbazida (proporção 1:1) e aproximadamente 10 mL de DMF. Os reagentes sólidos foram previamente triturados antes da pesagem. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em refluxo (aproximadamente 200°C) durante 2 horas. Após finalizada a reação, adicionou-se água, ocorrendo a formação de um precipitado branco que foi filtrado em funil sinterizado. O produto foi seco no dessecador sob vácuo.

5.1.2. Síntese das séries de ftalimido-1,3-tiazóis (**2a-n** e **3a-i**)

Em balão de 100 mL, adicionou-se a respectiva α -halo-cetona aromática (geralmente se partiu de 2,26 mmol) e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionada proporção equivalente (1:1) do respectivo composto intermediário (**1a** ou **1b**). A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

5.1.3 Síntese dos ftalimido-5-acetil-1,3-tiazóis (**4a** e **4b**)

Em balão de 100 mL, dissolveu-se 2,26 mmol do respectivo composto intermediário (**1a** ou **1b**) em aproximadamente 10 mL de propanona e adicionou-se 2,5 mL de 3-cloro-2,4-pentanodiona. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em refluxo (aproximadamente 100 °C) durante 1,5 horas, quando ocorreu

formação de um precipitado branco (**4a**) ou amarelo (**4b**). Este foi filtrado em funil sinterizado e seco em dessecador sob vácuo.

5.1.4 Síntese dos ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (**5a-d**)

Em balão de 25 mL, adicionou-se 1 mmol do respectivo intermediário (**4a** ou **4b**) em aproximadamente 10 mL de etanol, adicionou-se 5 gotas de ácido sulfúrico e manteve-se em ultrassom por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mmol de tiosemicarbazida ou 4-metil-3-tiossemicarbazida (proporção 3:2). A mistura foi mantida sob ultrassom durante 3 horas quando, geralmente, todo o intermediário foi consumido. Os excessos de tiosemicarbazida ou 4-metil-3-tiossemicarbazida permaneceram no solvente. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado e seco em dessecador sob vácuo.

5.1.5 Síntese dos ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1-6d7**)

Em balão de 25 mL, adicionou-se o respectivo intermediário (**5a-d**) junto da respectiva α -halo-cetona aromática, em excesso, e aproximadamente 10 mL de isopropanol. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom à temperatura ambiente por 4 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco em dessecador sob vácuo.

5.2 MONITORAMENTO DAS REAÇÕES

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

5.3 BANHO DE ULTRASSOM

As reações de ciclização de tiazóis foram (exceto os compostos **4a-b**) mediadas pela irradiação no ultrassom usando modelo Unique EM-804 TGR em frequência de 40 KHz (180 W). Estes processos foram efetuados à temperatura ambiente.

5.4 PONTOS DE FUSÃO

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

5.5 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

Para todos os compostos sintetizados, foram feitas análises de RMN de ^1H e ^{13}C e quando necessário, análises bidimensionais como, DEPT. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos em instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As constantes de acoplamento foram indicadas em Hertz (Hz), e as multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: s – singleto, d – dubleto, dd – duplo dubleto, t – tripleto, q – quarteto, m – multipeto. Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr. As determinações de massas (RHSM) dos compostos foram desenvolvidas em aparelho MALDI ou UPLC-MS.

5.6 ANÁLISE DE RAIO-X

As coletas de dados de difração de raios-X foram realizadas num difratômetro Kappa CCD-Enraf-Nonius (câmara CCD 95 milímetros em κ -goniostat) usando radiação de grafite monocromada $\text{MoK}\alpha$ (0,71073 Å) à temperatura ambiente. Os dados foram coletados usando o software COLLECT⁶⁸ até 50 ° (2 θ). Os parâmetros da célula unitária finais foram baseados em reflexões 15666, 9327 e 12333 para **2e**, **2f** e **2g**, respectivamente. Integração e dimensionamento das reflexões, bem como as correções para efeitos de Lorentz e de polarização foram realizadas com o sistema de programas HKL DENZO-SCALEPACK⁶⁹. As estruturas dos compostos foram resolvidas através de métodos diretos com SHELXS-97⁷⁰. O modelo foi refinado por matriz completa com mínimos quadrados em F2 usando SHELXL-97⁷⁰. O programa ORTEP-3⁷¹ foi usado para representações gráficas, e o programa WinGX⁷² foi usada para preparar o material para publicação. Todos os átomos de H foram localizados

por considerações geométricas (C-H = 0.93 Å; N-H = 0,86 Å) e refinados usando um modelo de equitação com Uiso (H) = 1.5Ueq (C-metil) ou 1.2Ueq (outra). Um diagrama ORTEP-3 das moléculas foi gerado para cada cristal analisado. Dados cristalográficos (excluindo fatores estrutura) para as estruturas relatados neste trabalho foram depositados junto do Centro de dados cristalográficos de Cambridge como material complementar (nº CCDC 1.411.254, 1.411.262 e 1.411.263). Estas análises foram desenvolvidas e interpretadas pelo grupo do Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone do Departamento de Física e Informática, Instituto de Física, Universidade de São Paulo.

5.7. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

Os perfis de atividades biológicas frente a DNT e o câncer dos compostos obtidos foram estabelecidos através dos seguintes protocolos:

5.7.1 Ensaios de Citotoxicidade

Diferentes avaliações da toxicidade dos compostos foram desenvolvidas junto aos grupos que colaboraram para o desenvolvimento das diferentes atividades biológicas aqui apresentadas. A seguir estão descritas as metodologias empregadas onde também são indicados os grupos que as desenvolveram.

5.7.1.1 Esplenócitos

Os esplenócitos de camundongos BALB/c foram divididas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^6 células por cavidade em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado. Cada composto foi dissolvido em DMSO a uma concentração de 10 mg/mL, e, em seguida, a amostra foi diluída em série em meio RPMI-1640 suplementado com SFB a 10% a concentrações de 1.0, 5.0, 10, 25, 50 e 100 µg/mL, em triplicata. Como controle positivo, foi utilizado a saponina na concentração de 0,1 µg/mL, enquanto que o meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e DMSO foi usado como um controle negativo. Um total de 1,0 µCi de ^3H -timidina foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada durante 24 h a 37 °C, com 5% de CO_2 .

A placa foi então lida no leitor de irradiação beta (Multilabel Reader, Finlândia), e determinou-se o percentual de incorporação de timidina tritiada. As células que não foram tratadas com compostos (controles negativos) foram calculadas como 100% da incorporação de timidina tritiada (100% de células viáveis). Para as células tratadas com saponina, a viabilidade celular foi de 5%. Quando a percentagem de incorporação foi superior a 90%, a concentração do composto foi considerada como não tóxicos para os esplenócitos.

Estes testes foram desenvolvidos pelo grupo da Prof^a Dr^a Valéria Rego Alves Pereira do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

5.7.1.2 Células Vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais

Células Vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais foram utilizados para o ensaio de citotoxicidade. Estas células foram cultivadas num meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de SFB e mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Os macrófagos peritoneais foram obtidos após a injeção de 5 mL de meio RPMI-1640 contendo 20% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas.

A citotoxicidade em células de mamífero foi avaliada por meio de um ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol (MTT)⁷³. As células foram contadas em câmara de Neubauer, semeadas em placas de 96 poços na concentração de 6×10^4 células/poço e incubadas numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas nas concentrações de 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL dos compostos por 48 h. As leituras de absorbância para os cristais de formazan solúveis foram realizadas usando um leitor Benchmark Plus ELISA (Bio-Rad, Califórnia, EUA) a um comprimento de onda de 490 nm. A concentração capaz de causar 50% de perda de viabilidade celular foi determinada por análise de regressão linear. O Índice de Selectividade (IS) foi calculado como a razão entre o CC₅₀ e IC₅₀ para cada composto. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicada técnica.

Estes testes foram desenvolvidos pelo grupo do Prof. Dr. Fábio André Brayner responsável pelos: Laboratório de Imunologia Keizo Asami – LIKA/UFPE e Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

5.7.1.3 *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC)

Em razão da necessidade de coletar sangue periférico em voluntários saudáveis, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o parecer nº 74653617.0.0000.5208.

Realizado o ensaio de Citotoxicidade em Células Mononucleares do Sangue Periférico ou, em inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), foram coletados 3 tubos com heparina de voluntários saudáveis, não fumantes, que não ingeriram bebidas alcoólicas por no mínimo 2 dias antes da coleta e que não fizeram uso de medicamentos de uso contínuo, e separadas por densidade utilizando o reagente Ficoll Paque™ Plus (GE Healthcare BioSciences), em seguida foi realizada a contagem das células na câmara de Neubauer.

Após a purificação das PBMC's, foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços contendo 5×10^5 células/poço incubadas em atmosfera úmida com 5% CO₂ à 37°C por 24h. Em seguida, foram adicionados os compostos nas concentrações de 10 e 100 µM e incubado por 72h. O controle do veículo, DMSO (0,1 e 0,2%) e a Doxorubicina (10 µM). Após 24h, 20µL de MTT foram acrescentados a cada poço, retornando para a estufa. Após 3h, adicionou-se 130µL de SDS 20% para a dissolução dos cristais de formazan, guardando ao abrigo da luz por 24h. Após esse período, procedeu-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro no leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) em absorbância de 570 nm.

Estes testes foram desenvolvidos pelo grupo do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT/UFPE.

5.7.2 Avaliação anti-*Trypanosoma cruzi*

Esta parte da avaliação biológica foi desenvolvida em colaboração pelo grupo da Prof^a Dr^a Valéria Rego Alves Pereira do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

5.7.2.1 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota (*T. cruzi*)

Epimastigotas da espécie Dm28c foram distribuídas numa placa de 96 poços a uma densidade final de 10^6 células por poço. Cada composto foi dissolvido nos respectivos poços, em triplicata. O BDZ foi usado como controle positivo neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 4 dias a 27 °C. Após este tempo, alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de parasitas foi calculado numa câmara de Neubauer. Epimastigotas não tratadas com os compostos (controle negativo) foram assumidos como 100% no número de parasitas. Determinaram-se as curvas de dose-resposta, e os valores de IC_{50} foram calculados usando pelo menos cinco concentrações (pontos de dados) e uma equação não linear (*Prism*, versão 4.0).

5.7.2.2 Toxicidade para tripomastigotas (*T. cruzi*)

Tripomastigotas da cepa Y foram recolhidas a partir de sobrenadantes de células Vero e distribuídas numa placa de 96 poços a uma densidade final de 4×10^5 células por poço. Cada composto foi adicionado às cavidades, em triplicata. O BDZ foi usado como controles positivos neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após este tempo, alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de parasitas viáveis (isto é, com a motilidade aparente) foi contado numa câmara de Neubauer. Os poços que não receberam os compostos, foram assumidos como 100% no número de parasitas viáveis. Determinaram-se as curvas de dose-resposta, e os valores de IC_{50} foram calculados por regressão não linear (*Prism*, versão 4.0), utilizando pelo menos sete concentrações (pontos de dados).

5.7.3 Avaliação anti-*Leishmania infantum*

Esta parte da avaliação biológica foi desenvolvida em colaboração pelo grupo do Prof. Dr. Fábio André Brayner responsável pelos: Laboratório de Imunologia Keizo Asami – LIKA/UFPE e Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

5.7.3.1 Parasitas de *Leishmania infantum*

As promastigotas de *Leishmania infantum* (espécie MHOM/BR/BH 46) foram mantidas a 26 °C em meio de Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) contendo 10% de SFB e 1% de solução de penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Foram usados em todos os experimentos parasitas na fase de crescimento exponencial. As formas amastigotas intracelulares foram obtidas por inoculação de promastigotas, com potencial de infecção, numa cultura de macrófagos peritoneais e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos testados.

5.7.3.2 Atividade biológica em promastigotas de *Leishmania infantum*

Para realizar a triagem inicial dos compostos com atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *L. infantum* foram coletadas, contadas e diluídas em meio de Schneider suplementado com SFB a 10% na concentração de 1×10^6 parasitas/mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença dos derivados ftalimido-1,3-tiazóis nas concentrações testadas (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) por 72 horas. Como controle foram usadas células incubadas somente com o meio de Schneider. O crescimento da cultura de células foi acompanhado por contagens diárias em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Coréia do Sul). O valor de IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento do parasita) foi determinado após 72 horas de cultura por análise de regressão linear. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicada técnica.

5.7.3.3 Atividade biológica *in vitro* em formas amastigotas intracelulares

Foram usados macrófagos peritoneais em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) contendo 10% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), para avaliar o efeito dos compostos nas formas amastigotas intracelulares. Estes foram distribuídos em placas de cultura com lamelas redondas a na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas durante 3 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* por 3 horas, com uma multiplicidade de infecção de 10:1. Após este período de infecção, as células foram tratadas com 4,9, 9,8 e 19,6 µM de **2j** e 6,9, 13,9 e 27,8 µM de **2m**, e incubadas por 24 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células foram então lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A percentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 100 células em triplicatas. O IC₅₀ foi determinado após 24 horas de cultura por análise de regressão linear. O índice de sobrevivência foi determinado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitas por célula infectada. A anfotericina B foi usada como controle.

5.7.3.4 Produção de Óxido Nítrico

Utilizou-se o reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% N-1-naftiletilenodiamina/ 2,5% H₃PO₄ (Promega, Madison, EUA) para medir o óxido nítrico (NO) produzido por células de mamíferos (células Vero e macrófagos J774) tratadas com as concentrações testadas (6,25 a 100 µg/mL) dos compostos ftalimido-1,3-tiazóis e as células não tratadas, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante e mediu-se o NO nos sobrenadantes dos experimentos para avaliar o efeito citotóxico dos compostos **2j** e **2m** em macrófagos não infectados e infectados com *L. infantum* tratados e não tratados. O sobrenadante de cultura foi incubado por 48 h e então 100 µL de reagente de Griess foram adicionados à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida com um filtro de 540 nm em um leitor Benchmark Plus ELISA (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio.

5.7.3.5 Análise Ultraestrutural

Os compostos com melhor índice de seletividade foram selecionados para análise ultraestrutural. Controles de promastigotas de *L. infantum* não tratados e tratados com concentrações de 9,8 μM e 19,6 μM (**2j**) e 13,9 μM e 27,8 μM (**2m**) dos compostos e fixaram-se durante a noite em solução contendo 2,5% de glutaraldeído / 4% de paraformaldeído em tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, e processado para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Para a MEV, foram preparadas lâminas de vidro previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) onde as promastigotas foram fixadas. Após 20 minutos, as lâminas foram lavadas no mesmo tampão para remover células não aderentes, e depois fixadas durante 1 hora numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) num tampão de cacodilato de sódio, pH 7,2. As células foram então desidratadas em uma série graduada de etanol e submetidas a secagem em ponto crítico usando um Secador de Ponto Crítico HCP-2 (Hitachi, Tóquio, Japão), revestido com 20 nm de ouro em uma sonda JFC-1100 e examinado sob microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

Para MET, os parasitas fixos foram lavados e pós-fixados por 1 hora em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. As amostras foram então desidratadas em uma série graduada de acetona, infiltradas e embebidas em EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Secções ultrafinas com cerca de 70 nm de espessura, obtidas utilizando um ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha), foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas sob microscópio eletrônico de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, EUA).

5.7.3.6 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática

Os parasitas de controle e aqueles tratados com os compostos foram incubados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio (PI) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 15 minutos. Foram utilizadas como controle positivo, células na presença de peróxido de hidrogênio por 20 minutos (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Células não tratadas também foram avaliadas. Após a incubação com a sonda, as amostras foram

analisadas utilizando um citômetro de fluxo. Os dados foram obtidos através do canal FL2-H. Foram analisados vinte mil eventos por amostra. Os resultados foram expressos como uma porcentagem de células marcadas para cada condição testada.

As amostras obtidas como descrito foram também analisadas utilizando microscopia laser confocal (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, Alemanha). Após a incubação, as amostras foram colhidas e colocadas em microplacas (Mattek Co., EUA) no momento da visualização das células em microscopia. As imagens foram adquiridas usando um laser de 488 nm.

5.7.3.7 Análise do Potencial da Membrana Mitocondrial

Para determinar o efeito do composto sob o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), foram tratadas promastigotas de *L. infantum* com 9,8 e 19,6 μM de **2j** e 13,9 e 27,8 μM de **2m** por 72 h. Após o tratamento, os parasitas tratados e o controle foram incubados com 10 $\mu\text{g/mL}$ de rodamina 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 15 minutos. Foram utilizadas como controle negativo, células na presença de metanol durante 20 minutos. Células não tratadas também foram avaliadas. Após a incubação, as amostras foram colocadas em tubos adequados para a análise do citômetro de fluxo. A coleta e análise dos resultados foram realizadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), equipado com o software Cell Quest, utilizando o canal FL1-H. Vinte mil eventos por amostra foram analisados. As alterações na polarização da membrana mitocondrial foram medidas usando o Índice de Variação (VI) obtido pela equação $(MT - MC)/MC$, onde MC é a intensidade de fluorescência mediana do controle e MT a intensidade de fluorescência mediana das células tratadas. Valores negativos para VI representam a despolarização da membrana mitocondrial⁷³.

As amostras obtidas como descrito acima foram também analisadas utilizando microscopia laser confocal (Leica SP2 AOBS, Wetzlar, Alemanha). Após a incubação, as amostras foram colocadas em micro-placas (Mattek Co., EUA) no momento da visualização das células em microscopia. As imagens foram adquiridas usando um laser de 543 nm.

5.7.3.8 Análise Estatística

A análise de regressão linear foi realizada utilizando o software SPSS 8.0 (IBM Co., New York, USA) para Windows. A análise de significância, com nível de significância de $p < 0,05$, foi realizada por ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, usando o software GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

5.7.3.9 Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/Pernambuco, protocolo número 30/2011.

5.7.4 Avaliação anti-*Schistosoma mansoni*

Esta parte da avaliação biológica foi desenvolvida em colaboração com o grupo da Prof^a Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

5.7.4.1 Animais

Foram usados camundongos Swiss, pesando cerca de 30g, como hospedeiros definitivos de *S. mansoni* os quais permaneceram no laboratório de experimentação animal do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/Pernambuco, Brasil. Estes animais foram mantidos a temperatura controlada e 12h em ciclo claro-escuro com acesso a água e comida *ad libitum*. Para os estudos *in vivo*, foram utilizados camundongos BALB/c machos pesando 20-25g, mantidos nas mesmas condições ambientais dos camundongos Swiss no laboratório experimental do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ/PE). Todos os experimentos foram autorizados pelo comitê de ética e uso de animais (CEUA-79/2015) e realizados de acordo com boas práticas animais.

5.7.4.2 Parasitas de *Schistosoma mansoni*

Foram utilizadas estirpes LE de *S. mansoni* infectando moluscos *Biomphalaria glabrata* como hospedeiros intermediários mantidos na malacologia do IAM-FIOCRUZ/PE. As cercárias foram obtidas após exposição dos caramujos à luz por 1

hora. Para estudos *in vitro*, foram obtidos vermes adultos oriundos da infecção percutânea de camundongos Swiss, com 120 cercárias, os quais foram eutanasiados e perfundidos após 55 dias.

5.7.4.3 Verme adulto

Os vermes adultos foram obtidos a partir de hospedeiros definitivos (camundongos Swiss) e mantidos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina. Após a obtenção, foram incubados a 37 °C, atmosfera úmida e 5% de CO₂. Os vermes foram separados em 3 (três) poços diferentes para cada composto testado da seguinte forma: 4 machos, 4 fêmeas e 2 casais. Os compostos foram dissolvidos em DMSO a 1,6% e solubilizados em meio RPMI completo. As concentrações utilizadas foram 5-100 µg/mL e os testes foram realizados em triplicata.

5.7.4.4 Esquistossômulos

As cercárias foram coletadas após 1 hora de exposição dos caramujos a luz. Após sua obtenção, elas foram levadas para o vortex e transformadas em esquistossômulos após centrifugações⁷⁴. Estes foram distribuídos em placas de 96 poços com cerca de 100 parasitas por poço e incubados com meio RPMI completo por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e adicionados ao meio a concentrações de 5-100 µg/mL. O controle negativo foi testado em RPMI-1640 e DMSO. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e monitorados por 72 horas no microscópio invertido e a atividade motora foi analisada.

5.7.4.5 *In vivo*

A seguir são apresentadas as metodologias utilizadas no ensaios *in vivo*.

5.7.4.5.1 Parasitas e hospedeiros

A infecção foi realizada por via percutânea, utilizando 80 (oitenta) cercárias da cepa LE (Belo Horizonte) de *S. mansoni* para cada camundongo. As formas infectantes do parasita foram obtidas de *Biomphalaria glabrata* através do Departamento de Malacologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE).

Foram utilizados ratos machos (BALB/c), com 20-25g de peso. Quarenta e cinco dias após a infecção, um exame parasitológico foi feito a partir de fezes de camundongo para avaliar a positividade da infecção. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ), autorizado pela licença nº 79/2015.

5.7.4.5.2 Toxicidade aguda por via oral (OECD, Guideline 423)

Testes orais de toxicidade aguda foram realizados seguindo o protocolo da Diretriz 423⁷⁵. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (n = 3) e em cada estágio foram utilizados três animais. A administração do composto **2i** foi realizada a uma dose de 300 mg/kg, a seguir solubilizada em cremofor a 5%. Observações comportamentais foram realizadas de acordo com triagem toxicológica em que convulsão, defecação, tremor vocal, ereção de pelos, irritabilidade, micção, olhos (aguado, exoftalmia), piloereção, ataxia de postura, perda de reflexos, resposta ao toque, resposta ao estímulo sonoro, salivação, tremor, morte e outros comportamentos atípicos. Durante as primeiras 24 horas foram observados diferentes tempos: 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas, e depois, pelo menos, a cada 24 horas, durante 15 dias. Após verificação de ausência de sinal de toxicidade na dose de 300 mg/kg, foi utilizada a dose de 200 mg/kg. Todos os procedimentos acima foram realizados para a dose mais alta. Após ausência de sinais de toxicidade, a dose de 200 mg/kg foi repetida. Após o final do 15º dia, todos os animais foram eutanasiados e os órgãos foram removidos para melhor observação macroscópica da toxicidade e posteriormente preservados em formaldeído para futuros testes histológicos.

5.7.4.5.3 Avaliação da susceptibilidade in vivo de vermes adultos

Para avaliação *in vivo* da atividade esquistossomicida do composto **2i**, foram utilizados o composto **2i** e os grupos controle constituídos por oito camundongos. A alocação de ratos para grupos experimentais foi realizada aleatoriamente. Os ratos foram tratados por via oral 45 dias após a infecção. Os grupos foram separados da seguinte forma: Grupo I (Cremophor EI a 5%); Grupo II (PZQ 400 mg/kg); Grupo III

(composto **2i** 200 mg/kg durante 5 dias consecutivos); Grupo IV (composto **2i** 400 mg/kg dose única).

Quinze dias após o tratamento com **2i**, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental (40 mg/kg). Após a anestesia, os animais foram perfundidos do sistema porta hepático para remoção dos vermes, que foram separados em placas de Petri contendo soro fisiológico a 0,85%, e os parasitos foram contados e classificados de acordo com o gênero e a vitalidade.

5.7.4.5.4 Porcentagem do estágio de desenvolvimento do ovo

Três fragmentos para porção distal ao intestino foram lavados em solução salina e levemente secos em papel absorvente. Subsequentemente, cada fragmento intestinal foi apertado entre uma lâmina e uma lamela e analisado ao microscópio para classificar as fases dos ovos. Para cada fragmento, 100 ovos foram contados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento. Os ovos foram classificados como imaturos e viáveis (1^a a 4^a etapa); maduros e viáveis; e ovos não viáveis (calcificados, com miracídio semi-transparente retraído).

5.7.4.5.5 Contagem de ovos no fígado e intestino

Fragmentos do fígado e intestino de cada camundongo submetidos a tratamento e posterior eutanásia foram removidos após a perfusão e digeridos em hidróxido de potássio a 4% (KOH).

5.7.4.5.6 Avaliação morfométrica

As amostras de fígado de cada camundongo foram fixadas em solução de formalina a 10%, incluídas em blocos de parafina, seccionadas e coradas com picrosirius vermelho. Foram selecionados dez campos microscópicos de cortes histológicos do fígado (5 µm), que apresentaram grande produção de tecido conjuntivo, e o tecido colágeno foi destacado e adquirido como uma porcentagem usando o Sistema de Análise e Análise LEICA Qwin 2.6 (Leica Cambridge, Inglaterra). O resultado da medição de cada animal foi a porcentagem média desses dez campos

microscópicos, e o resultado final foi a porcentagem média por grupo. O sistema foi calibrado para uma lente de ampliação de 10x usando um microscópio Leica DM LB2.

5.7.4.5.7 Ensaio de hidroxiprolina

As amostras de fígado foram imersas em HCl 6N a aproximadamente 120 °C por 18 h, seguido de filtração. A concentração de hidroxiprolina (Hyp) foi determinada por um ensaio colorimétrico a 558 nm como previamente descrito por Bergman e Loxley (1963) e expresso como nmol/g de fígado⁷⁶.

5.7.4.6 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk's). As diferenças foram avaliadas usando o teste One-way ANOVA com post-hoc Turkey e Two-way ANOVA para análise paramétrica. As análises estatísticas foram realizadas com o Software Prism (versão 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos) e Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram expressos como valores médios (média $\pm$ EPM).

5.7.5 Avaliação antineoplásica

Esta parte da avaliação biológica foi desenvolvida em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT/UFPE.

5.7.5.1 Cultivo de Células

Foram utilizadas oito linhagens tumorais (**Quadro 2**) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e acondicionadas no Banco de células Tumorais do LINAT/UFPE.

Quadro 2 – Linhagens de Células Neoplásicas

Linhagem Tumoral	Nome	Densidade de Inoculação	Meio de Cultura
MOLT-4	Leucemia Linfoblástica Aguda	3 x 10 ⁴	RPMI-1640
TOLEDO	Linfoma de Não - Hodgkin de Células B	10 x 10 ⁴	RPMI-1640
HL-60	Leucemia Promielocítica Aguda	4 x 10 ⁴	RPMI-1640
HL-60-MX1	Leucemia Promielocítica Aguda Resistente	2 x 10 ⁴	RPMI-1640
K562	Leucemia Mielogênica Crônica	1 x 10 ⁴	RPMI-1640
MCF7	Adenocarcinoma de Mama	1 x 10 ⁴	RPMI-1640
T47D	Carcinoma Ductal de Mama	2 x 10 ⁴	RPMI-1640
SK-MEL-28	Melanoma Maligno	1 x 10 ⁴	DMEN Low Glicose

Fonte: Adaptado de NIH, 2017.

Inicialmente, as células foram descongeladas, cultivadas e expandidas em garrafas de cultura contendo o meio de cultura, enriquecido com 10% SFB, 3g/L de bicarbonato de sódio e 200µg/mL de Penicilina/Estreptomicina. As linhagens foram mantidas em estufa úmida à 37 °C e 5% CO₂, sendo realizada a manutenção e troca do meio de cultura sempre que necessário.

5.7.5.2 Citotoxicidade em Linhagens Neoplásicas

Visando a avaliação da atividade antineoplásica dos novos derivados heterocíclicos, inicialmente foi realizando um screening em oito linhagens tumorais para seleção dos melhores compostos. Foi plaqueado em placa de 96 poços, com a quantidade de células/poço conforme sua densidade de inoculação (**Quadro 2**), controle Branco, controle DMSO 0,01% e controle positivo de Doxorubicina em triplicata de poços. Após 24h, acondicionado na estufa úmida, foram adicionados os compostos na concentração de 10 µM, incubados por mais 48h, seguido da adição da solução de MTT e após 3h foi acrescida a solução de SDS à 20%. Aguardou-se 24h para leitura da absorbância por espectroscopia a 570 nm no leitor de microplacas EL808 - Biotek®. A média da densidade ótica dos poços teste foi comparada com a média do grupo controle para a determinação da viabilidade celular.

A partir da média dos resultados de viabilidade adquiridos foi calculada a concentração de composto necessária para 50% de inibição *in vitro* (IC₅₀) e em seguida foi calculado a estimativa do índice de seletividade (IS) através da razão IC₅₀ PBMC/ IC₅₀ linhagem tumoral, foram considerados seletivos, os compostos com IS maior que 3.

5.7.5.3 Análise Estatística

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. O IC₅₀ foi calculado a partir da média dos resultados da viabilidade celular dos compostos com o auxílio do programa OriginPro8 (Originlab Corporation®, EUA).

Os resultados foram analisados por teste t (Student), utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software®, USA) considerado estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão descritos os resultados, bem como as interpretações destes, que culminaram nas conclusões deste estudo.

6.1 PROPOSTAS DE MECANISMOS PARA AS REAÇÕES ENVOLVIDAS

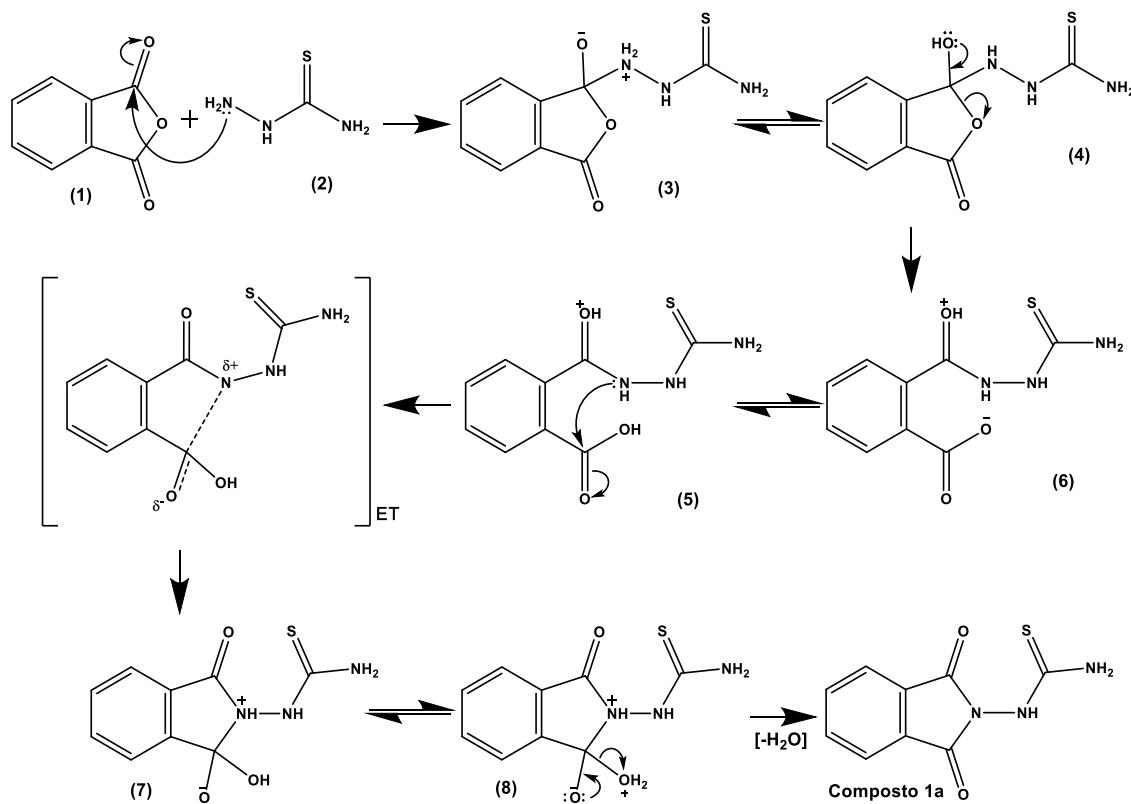
Nas seções a seguir são descritos os prováveis mecanismos reacionais atribuídos para as etapas de obtenção das séries químicas aqui estudadas.

6.1.1 Formação das ftalimidas

O mecanismo reacional proposto para as reações de formação do núcleo ftalimida, presente nos compostos ora estudados, envolve a adição do par de elétrons não ligante do nitrogênio da amina primária (NH_2) – da 4-metil-3-tiossemicarbazida e a amina mais distante da tiocarbonila, no caso da tiossemicarbazida – ao carbono carbonílico do anidrido ftálico (**1**).

O início se dá pelo rompimento da ligação π $\text{C}=\text{O}$ e a consequente formação do intermediário tetraédrico (**4**). A ligação π volta a ser estabelecida à partir do rompimento da ligação σ $\text{C}-\text{O}$, com relaxamento da tensão angular. O anel de cinco membros restaurado apresenta tensão endergônica, o que justifica a energia térmica fornecida ao sistema durante a etapa lenta da reação. Com tudo, essa restauração apenas é possível porque o nitrogênio da ligação amida formada ainda contém um par de elétrons não ligante, com adequadas geometria e distância para o desenvolvimento de um segundo ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico (sp^2) do ácido carboxílico (**5**), conduzindo ao novo intermediário tetraédrico (**7**). A reconstituição da ligação π , eliminação de uma molécula de água e formação do anel de cinco membros do grupamento ftalimida, finalizam o mecanismo proposto, conforme ilustrado no **Esquema 5**, onde é exemplificada a obtenção do composto **1a**⁷⁷.

Esquema 5 – Mecanismo de reação proposto para a formação das ftalimidas (exemplo do composto **1a).**

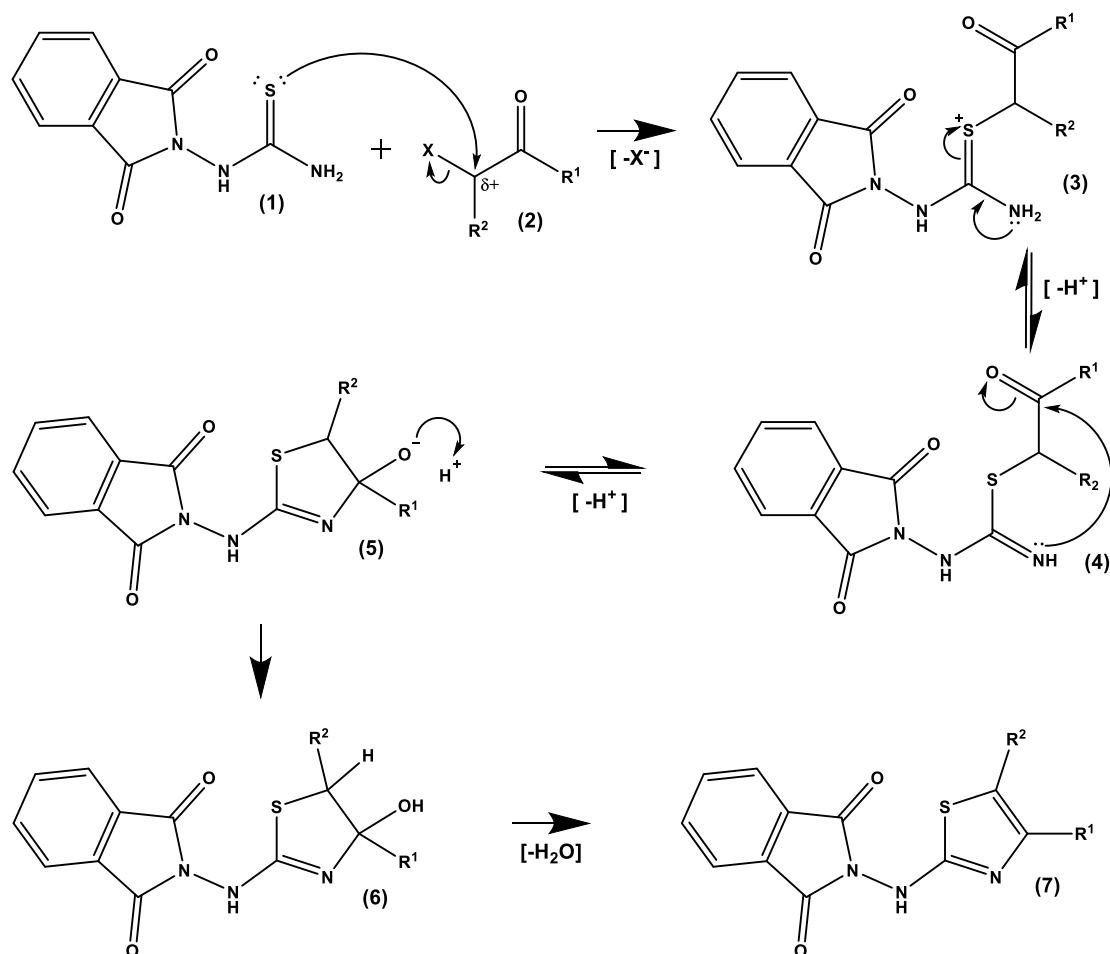


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.2 Ciclização dos 1,3-tiazóis

A obtenção dos derivados 1,3-tiazóis foi através de reações entre tioamidas e α -halo-cetonas substituídas. Neste caso, é proposto o mecanismo de reação onde acontece um ataque nucleofílico, dos elétrons não ligantes do enxofre da tioamida (**1**) ao carbono ligado ao halogênio da α -halo-cetona (**2**). Posteriormente ocorre um rearranjo eletrônico da estrutura formada, após perda do hidrogênio ligado ao nitrogênio. Segue-se com um segundo ataque nucleofílico, neste caso do nitrogênio ao carbono da carbonila. A etapa é finalizada com as perdas de uma molécula de água e de um hidrogênio pelo carbono vizinho. Resultante deste processo, ocorre a formação de uma ligação π entre carbonos e a formação do heterociclo⁶⁷ (**Esquema 6**).

Esquema 6 – Mecanismo de reação genérico proposto para as ciclizações dos 1,3-tiazóis (Exemplos dos compostos série **2a-n**).

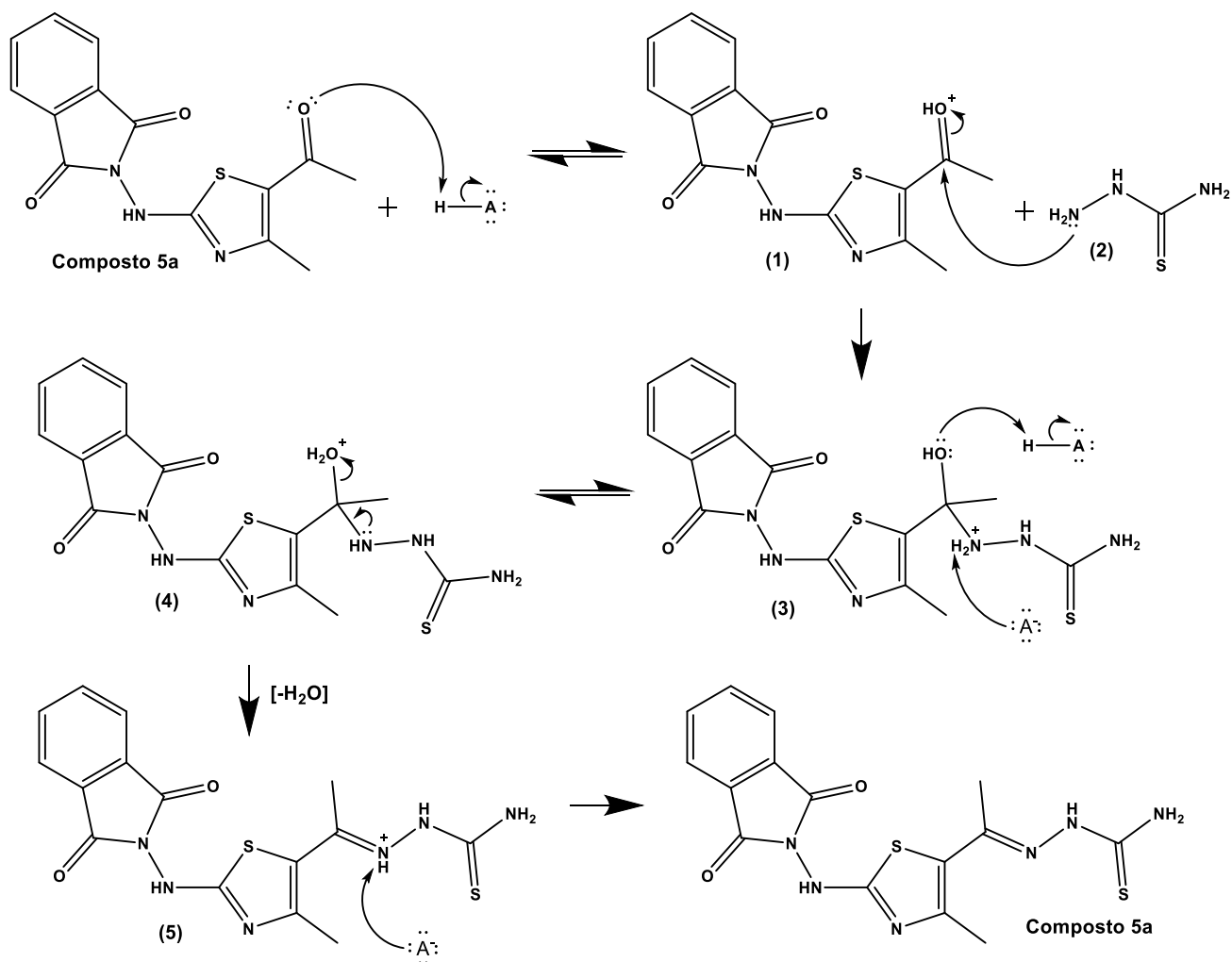


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.3 Formação das tiossemicarbazonas

Reações de condensação entre um aldeído ou uma cetona com tiossemicarbazidas, em catalise ácida, produz tiossemicarbazonas. O mecanismo está ilustrado no **Esquema 7**. A primeira etapa consiste na captação de um próton pela carbonila (1). Em seguida ocorre a adição do nitrogênio nucleofílico oriundo da amina mais distantes da tiocarbonila da tiossemicarbazona (2). A seguir, o próton ligado ao nitrogênio é removido pela base recém-formada enquanto o oxigênio é protonado (3) outra vez. Após, uma molécula de água é eliminada com formação do correspondente íon imínio (5). A última etapa consiste na remoção do outro hidrogênio ácido ligado ao nitrogênio e formação da tiossemicarbazona⁷⁸ (5a) (**Esquema 7**).

Esquema 7 – Mecanismo de reação genérico proposto para as formações das tiossemicarbazonas (Exemplos do composto **5a**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

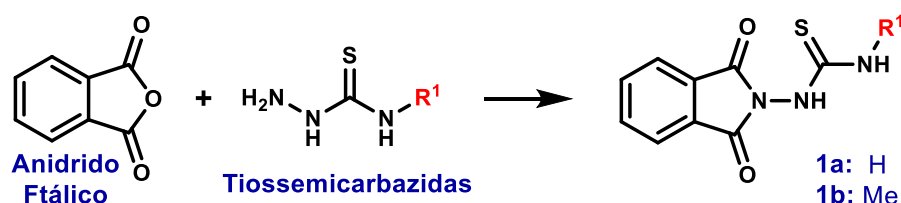
6.2 OBTENÇÃO E CONFIRMAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS

A seguir estão apresentados os resultados referentes a parte química deste trabalho.

6.2.1 Ftalimido-tiossemicarbazidas (**1a** e **1b**)

Na obtenção das séries de compostos (**2a-n**, **3a-i** e **4a-b**) foram primeiramente produzidas as duas ftalimido-tiossemicarbazidas (**1a** e **1b**). Estas foram sintetizadas partindo da condensação entre o anidrido ftálico com a tiossemicarbazida ou a 4-metil-3-tiossemicarbazida, para os compostos **1a** e **1b**, respectivamente (**Figura 14**). Estes reagentes foram adquiridos de fontes comerciais.

Figura 14 – Reação de obtenção das ftalimido-tiossemicarbazidas (**1a-b**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

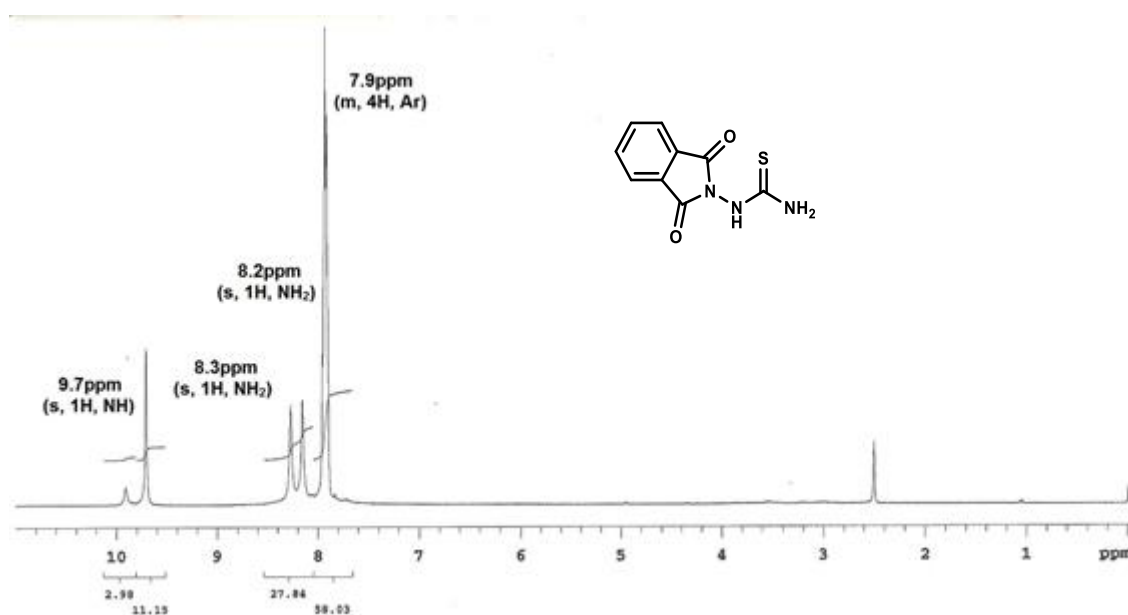
Os compostos **1a** e **1b**, derivados ftalimido-tiossemicarbazida, foram preparados sob refluxo e aquecimento, usando como solvente DMF. Os produtos obtidos, após encerradas as reações, foram precipitados com adição de água destilada obtendo-se ambos na forma de sólidos cristalinos brancos. Em seguida estes foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (IV, RMN de ^1H e ^{13}C) e espectrométrica (HRSM).

Algo que é interessante ressaltar é a otimização destas reações, tendo em vista que esta condensação foi descrita com uso de catalizador e purificação em propanona^{67,79,80}. No entanto foram obtidos rendimentos semelhantes e mesmo tempo reacional sem uso da catálise.

Os compostos **1a** e **1b** foram preparados em grandes quantidades (mais de 5g) tendo em vista que são intermediários de síntese da maioria dos compostos planejados. As reações aconteceram em torno de 4 horas e os rendimentos variaram em torno de 60%. Estes tiveram confirmadas suas estruturas e a formação do núcleo ftalimida. A seguir está exemplificada a caracterização, por RMN, do composto **1a**.

A **Figura 15** apresenta o espectro de RMN ^1H do composto **1a**. Os hidrogênios aromáticos estão localizados no multiplete localizado em 7.9 ppm. Os dois singletos localizados em 8.2 e 8.3 ppm são referentes aos dois hidrogênios da amina primária (NH_2) que estão em ambientes químicos diferentes. Este fenômeno é característico de tiossemicarbazidas não substituídas nesta posição. Por último observa-se o singlete integrando para um hidrogênio referente a amina secundária (NH).

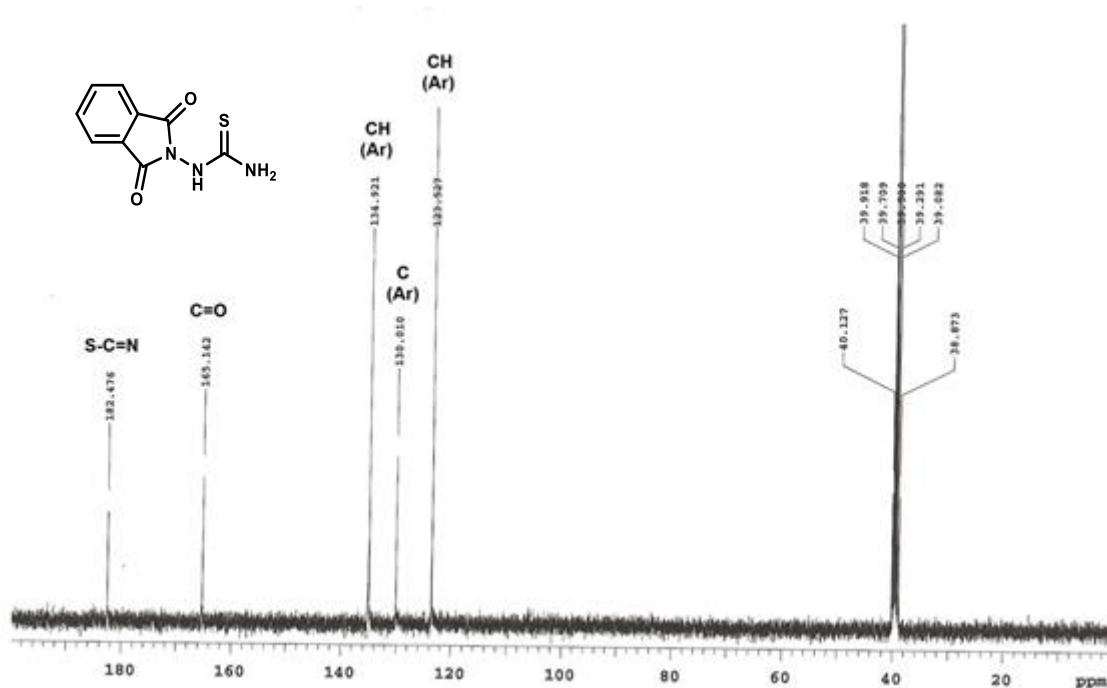
Figura 15 – Espectro de RMN – ^1H do composto **1a**.



300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 16** está representado o espectro de RMN ^{13}C do **1a**. Com auxílio do espectro de DEPT identificam-se os sinais em 123.52 e 134.92 ppm como referentes aos carbonos aromáticos ligados a um hidrogênio (carbonos metínicos). Já o sinal em 130.01 ppm é referente aos carbonos quaternários do anel aromático. Os carbonos carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$) ressoaram em 165.14 ppm ($\text{C}=\text{O}$). Finalizando esta análise identifica-se o sinal em 182.48 ppm advindo da ressonância do carbono tiocarbonílico ($\text{C}=\text{S}$).

Figura 16 – Espectro de RMN – ^{13}C do composto **1a**.



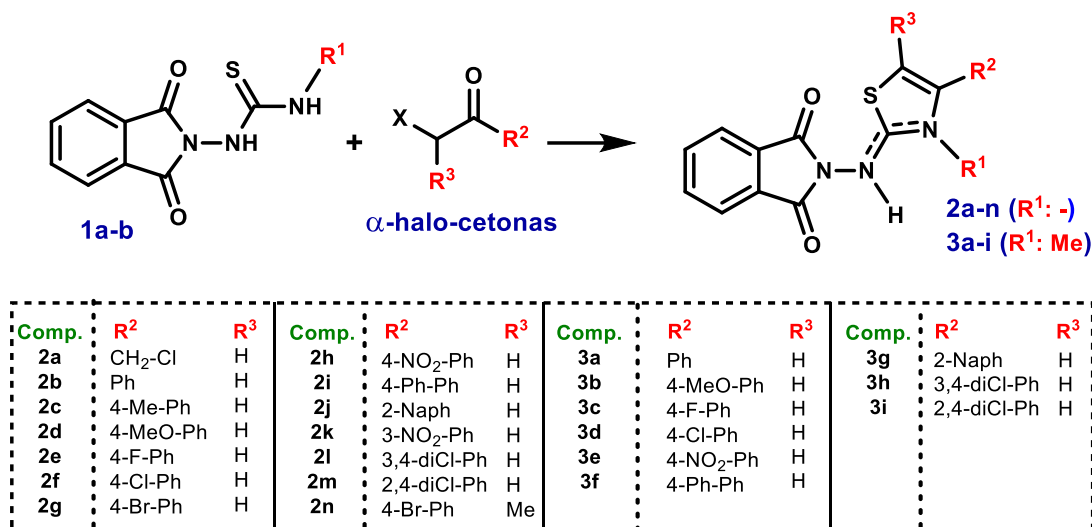
75.5 MHz, DMSO- d_6
 Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.2 Ftalimido-1,3-tiazóis (2a-n e 3a-i)

Para a obtenção de compostos derivados tiazólicos, geralmente, segue-se o protocolo desenvolvido por Hantzsch em 1887, no qual reagem tioamidas e uma α -halo-cetona-substituída⁸¹. Nesta metodologia as reações são desenvolvidas em agitação magnética sob refluxo. Esta rota é de fácil execução, apresentando bons rendimentos, além de mostrar-se compatível para o preparo de inúmeros compostos.

No entanto o nosso grupo otimizou o protocolo de Hantzsch e partindo também dos relatos de Zang *et al.* (2012) a ciclização dos tiazóis foi conduzida em um banho de ultrassom (40 MHz, 60 min), com 2-propanol como solvente, à temperatura ambiente^{82–84}. Esta mudança das condições reacionais tornou o procedimento mais rápido e com rendimentos semelhantes aos do método descrito por Hantzsch. As α -halo-cetonas utilizadas foram adquiridas de fontes comerciais (**Figura 17**).

Figura 17 – Reação de obtenção dos ftalimido-1,3-tiazóis (**2a-n** e **3a-i**).



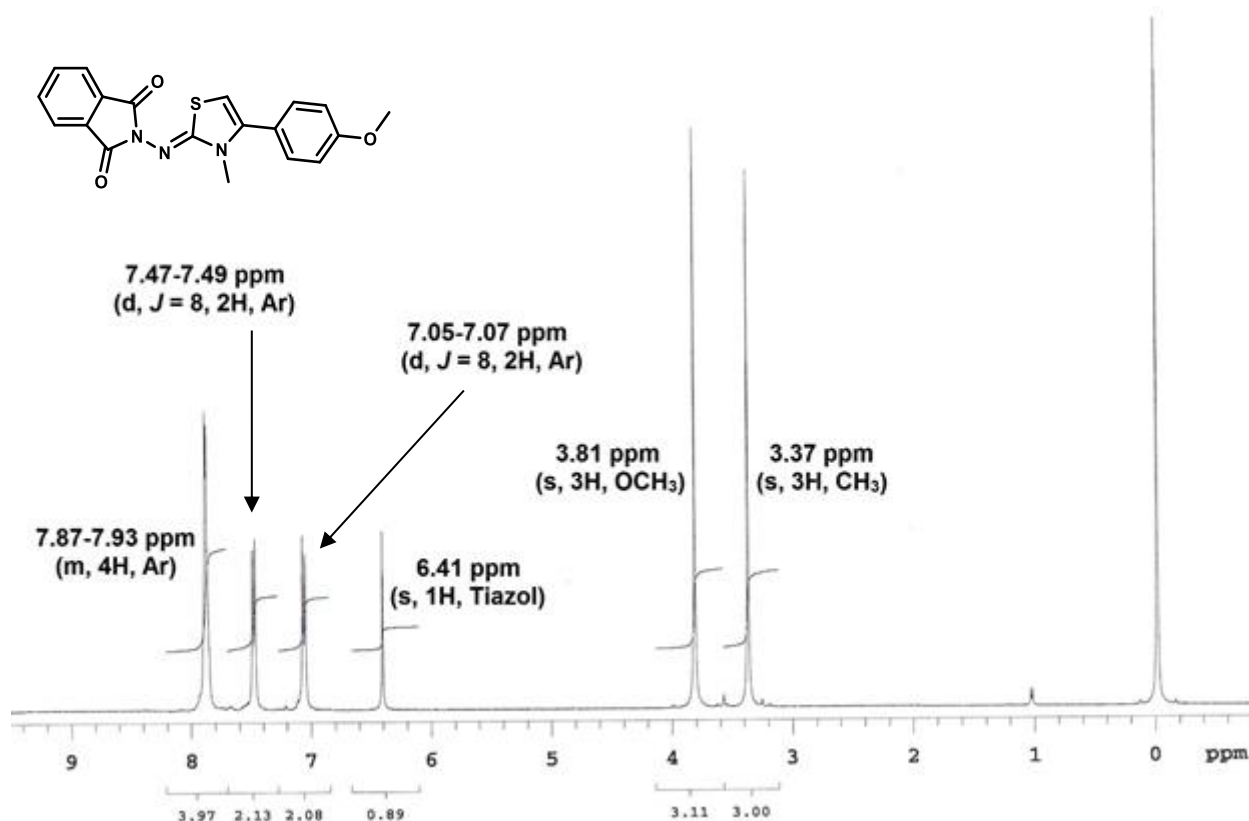
Fonte: Elaborado pelo autor.

As estruturas dos derivados ftalimido-1,3-tiazóis **2a-n** e **3a-i** foram confirmadas por IV, RMN (¹H, ¹³C e DEPT) e HRMS ou UPLC-MS. A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos permitiu verificar os sinais referentes ao metino na posição C5 do anel tiazólico, que é diagnóstico para esta classe de compostos heterocíclicos. No RMN de ¹³C, o carbono referente a este metino é de fácil localização, tendo $\delta = 95$ -117 ppm.

As **Figura 18** e **Figura 19** correspondem aos espectros de RMN ¹H e ¹³C do composto **3b**. Exemplificando os demais espectros das séries.

A **Figura 18** apresenta o espectro de RMN ¹H onde foi constatada a presença de dois singletos em 3.37 e 3.81 ppm, integrando para três hidrogênios cada um, referente a metila e a metoxila, respectivamente. Em 6.41 ppm, observa-se um singlete integrando para um hidrogênio da posição C5 do núcleo tiazol. Também estão presentes dois dubletos nos intervalos de 7.05-7.07 e 7.47-7.49 ppm, os quais apresentam constante de acoplamento $J = 8$ Hz e integram para dois hidrogênios aromáticos cada. E por fim observa-se o multipletto no intervalo de 7.87-7.93 integrando para quatro hidrogênios aromáticos.

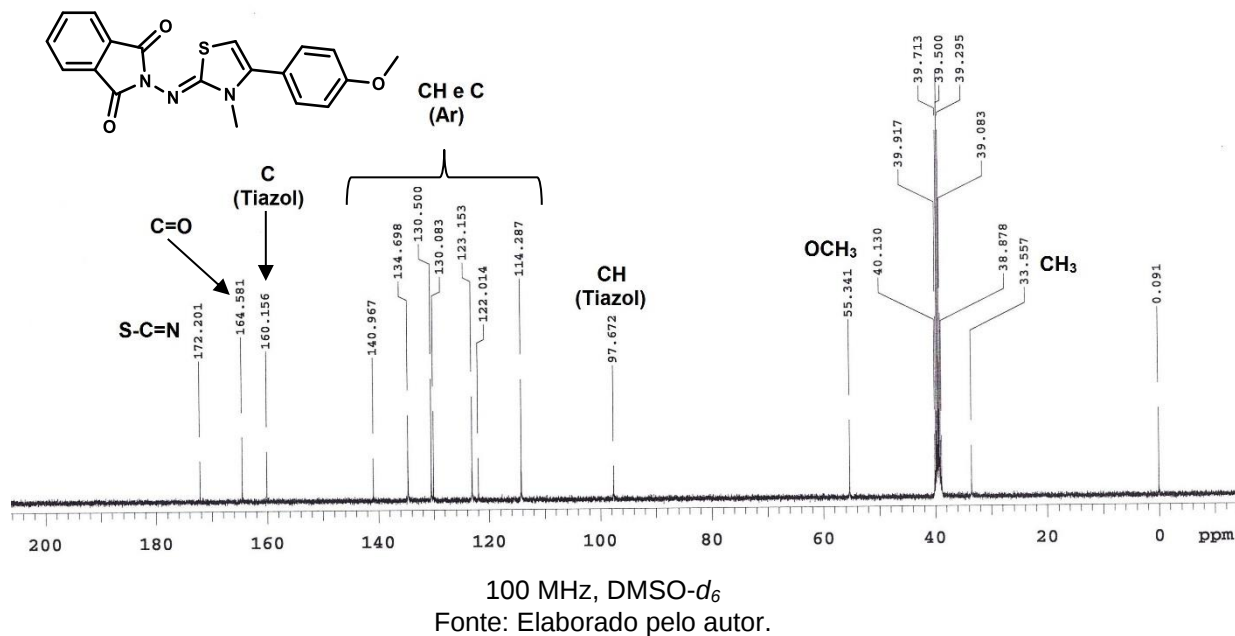
Figura 18 – Espectro de RMN – ^1H de **3b**.



400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$
 Fonte: Elaborado pelo autor.

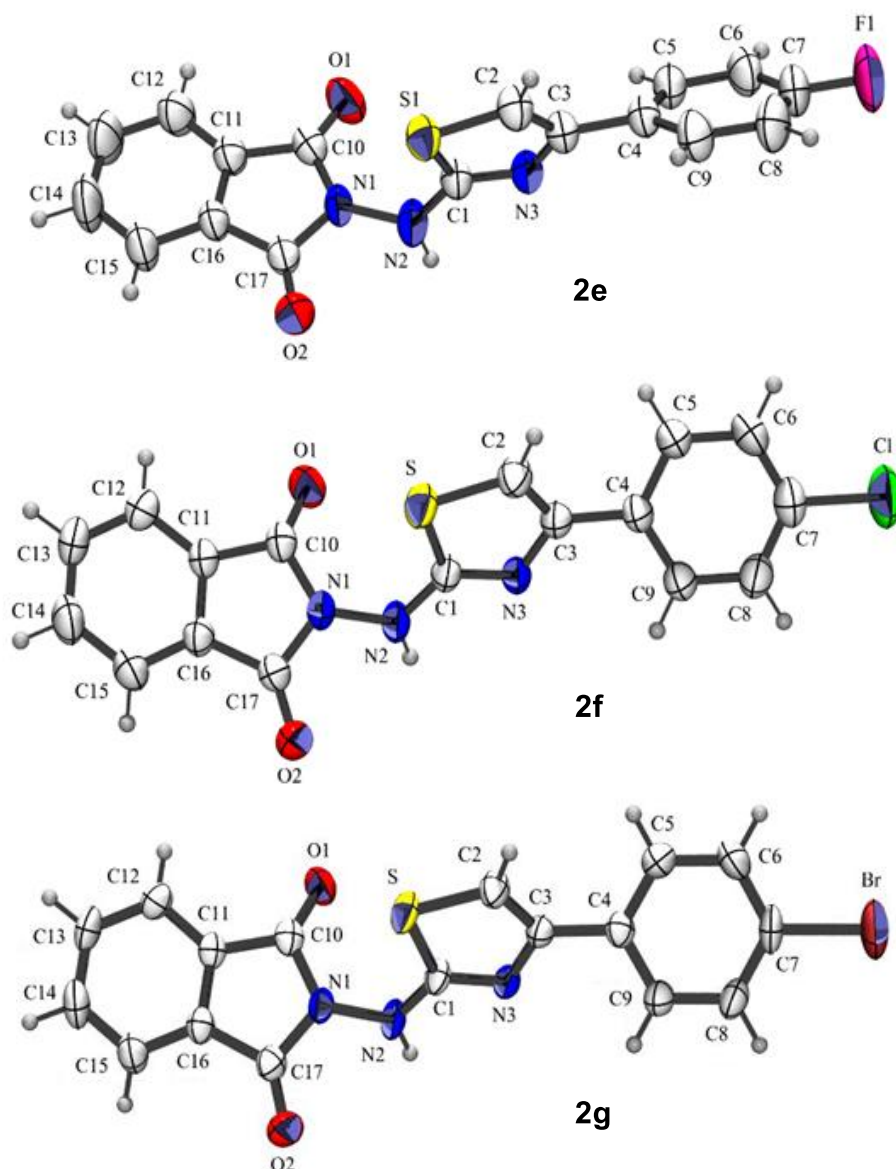
A **Figura 19** corresponde ao espectro de RMN ^{13}C no qual, com auxílio da análise do espectro DEPT, observa-se: em 33.56 ppm o sinal correspondente ao carbono da metila; em 55.34 ppm o sinal da metoxila; em 97.67 ppm o sinal de um carbono metínico que confirma a formação do anel tiazol; em 114.29, 123.15, 130.50 e 134.70 ppm estão os sinais referentes aos metinos aromáticos; em 122.01, 130.08 e 140.97 ppm os picos indicativos dos carbonos quaternários aromáticos; já em 160.16 ppm o carbono quaternário do anel tiazol; em 164.58 ppm o sinal das carbonilas ($\text{C}=\text{O}$); e por fim em 172.20 ppm o pico referente ao carbono do tiazol que está ligado ao enxofre e ao nitrogênio ($\text{S}-\text{C}=\text{N}$).

Figura 19 – Espectro de RMN – ^{13}C de **3b**.



Para três dos compostos da série **2a-n** (**2e**, **2f** e **2g**) foram obtidos cristais, os quais são apresentados na **Figura 20**: Ao analisar as estruturas obtidas pode-se concluir que os compostos desta série apresentam as estruturas planejadas, confirmando também que a conformação predominante apresenta a dupla ligação endocíclica ao anel 1,3-tiazol.

Figura 20 – Estruturas moleculares dos compostos 2e, 2f e 2g



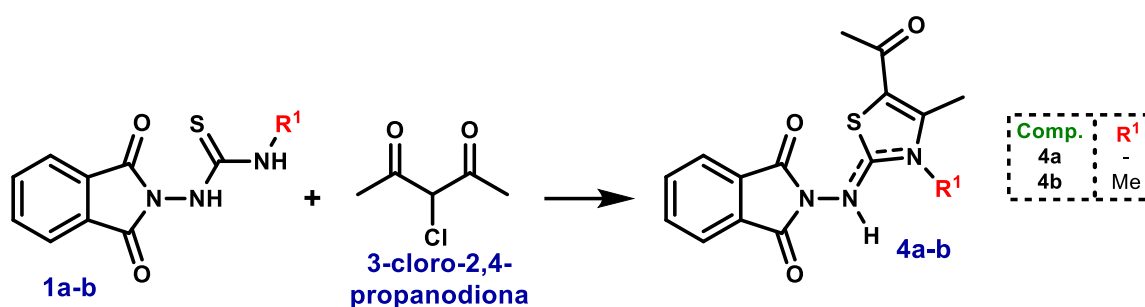
Esquema de marcação atômica e de deslocamentos elipsóides no nível de probabilidade de 50%.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.3 Ftalimido-5-acetil-1,3-tiazóis (4a e 4b)

Para as ciclizações dos 1,3-tiazóis substituídos na posição *C5* com um grupamento acetil (**4a-b**), foram utilizados os respectivos compostos **1a** ou **1b** e a 3-cloro-2,4-propanodiona, de origem comercial (**Figura 21**). Esta reação não obteve resultados satisfatórios utilizando o protocolo descrito para a obtenção dos demais tiazóis aqui estudados.

Frente a isto, seguiu-se a rota apresentada por Liaras *et al.* (2011), obtendo assim os compostos **4a** e **4b**, utilizando propanona como solvente sob refluxo e agitação magnética. Assim como reportado por estes autores, após tempo reacional de 1,5 horas o produto formado precipitou e as reações foram encerradas, sendo este filtrado e seco a vácuo⁸⁵.

Figura 21 – Reação de obtenção dos ftalimido-5-acetil-1,3-tiazóis (**5a-b**).

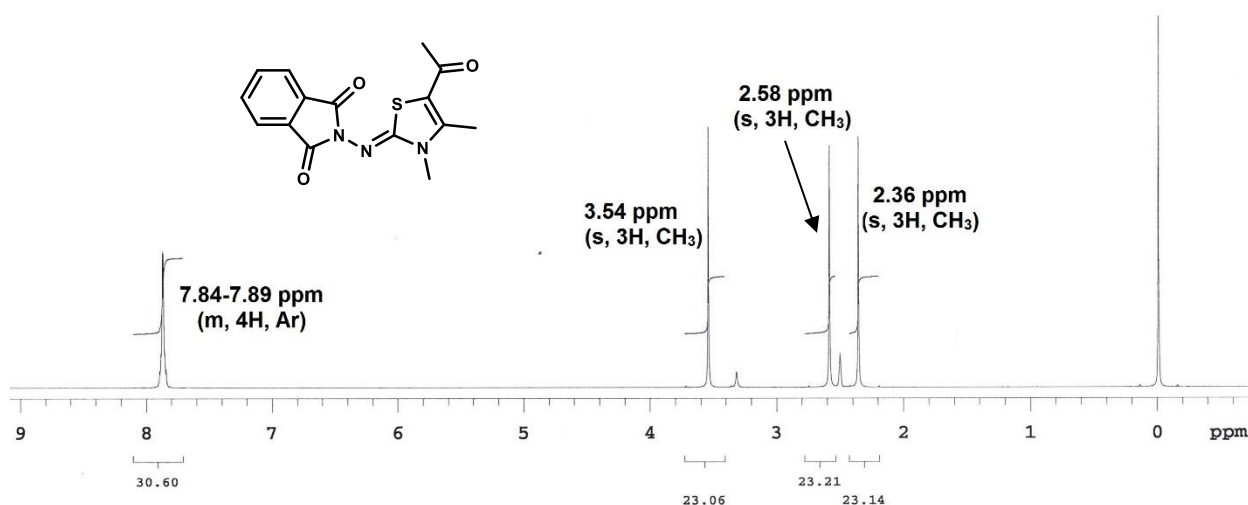


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos **4a** e **4b** também foram obtidos em maiores escalas (mais de 5g) tendo em vista que são intermediários de síntese de grande parte dos produtos planejados. As reações apresentaram rendimentos de 60 e 58%, respectivamente. Estes tiveram confirmadas suas estruturas conforme é exemplificado, a seguir com a caracterização do composto **4b**.

Na **Figura 22** pode-se constatar a presença de três singletos referentes as metilas em 2.36, 2.58 e 3.54 ppm, integrando para três hidrogênios cada um, e um multiplete, que integra para os quatro hidrogênios aromáticos, no intervalo de 7.84-7.89 ppm.

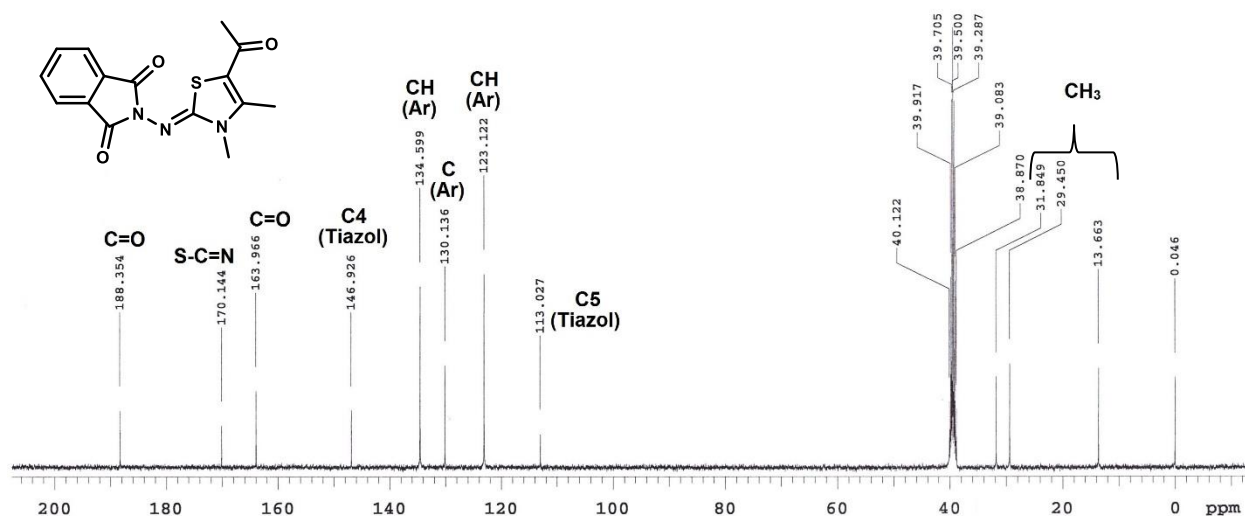
Figura 22 – Espectro de RMN – ^1H de **4b**.



400 MHz, DMSO- d_6
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 23** podem-se encontrar os sinais: das metilas em 13.66, 29.45 e 31.85 ppm; do carbono C5 do anel tiazol em 113.03 ppm; dos metinos aromáticos em 123.12 e 134.60 ppm; dos carbonos quaternários aromáticos da ftalimida em 130.14 ppm; do carbono C4 do tiazol em 146.93 ppm; das carbonilas (C=O) da ftalimida em 163.97 ppm; do carbono do tiazol que está ligado ao enxofre e ao nitrogênio (S-C=N) em 170.14 ppm; e do C=O do grupo acetil em 188.35.

Figura 23 – Espectro de RMN – ^{13}C de **4b**.

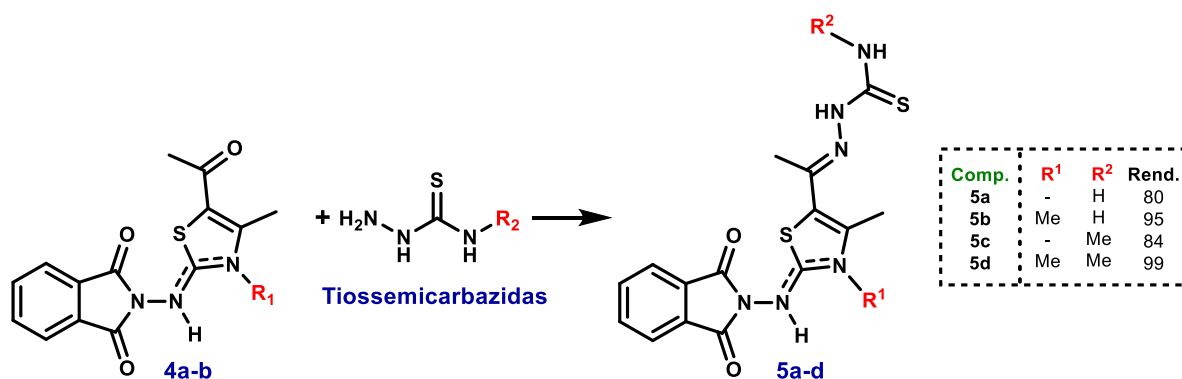


100 MHz, DMSO- d_6
 Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.4 Ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (5a-d)

A obtenção dos derivados ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (**5a-d**) foi executada partindo dos compostos **4a** e **4b** reagindo com a tiossemicarbazida ou a 4-metil-3-tiossemicarbazida (**Figura 24**), com catalise de ácido sulfúrico. As reações foram lançadas em ultrassom a temperatura ambiente.

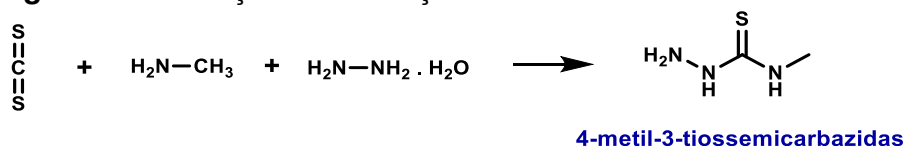
Figura 24 – Reação de obtenção dos ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (**5a-d**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A 4-metil-3-tiossemicarbazida usada para a obtenção dos compostos **5c** e **5d** foi sintetizada utilizando como reagentes dissulfeto de carbono, metilamina e hidrato de hidrazina, em meio aquoso com catálise de trietilamina⁸⁶ (**Figura 25**).

Figura 25 – Reação de obtenção da 4-metil-3-tiossemicarbazida.

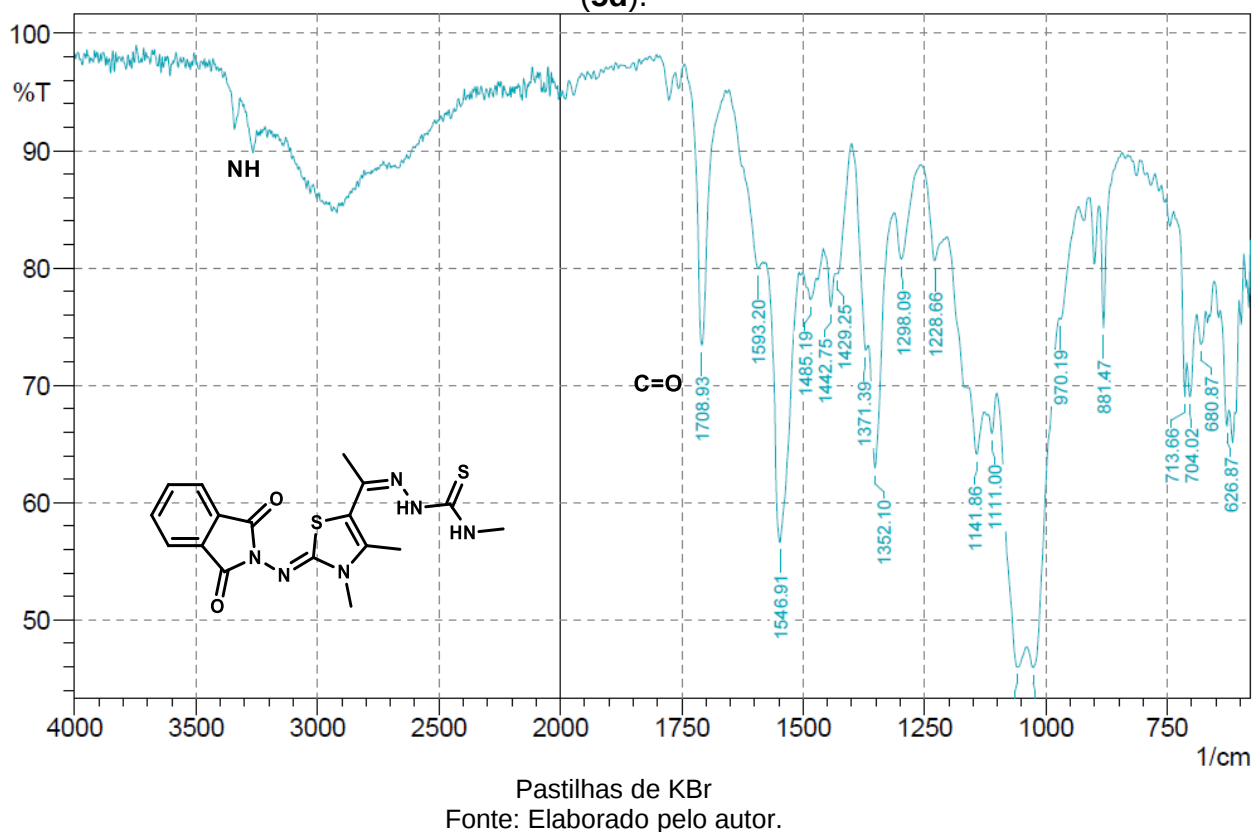


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os derivados ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazóis (**5a-d**) tiveram suas estruturas confirmadas. Como exemplo da elucidação estrutural e comprovação que a ligação hidrazônica se formou estão apresentados a seguir os espectros de IV (**Figura 26**), RMN ¹H (**Figura 27**) e RMN ¹³C (**Figura 28**) do composto **5d**.

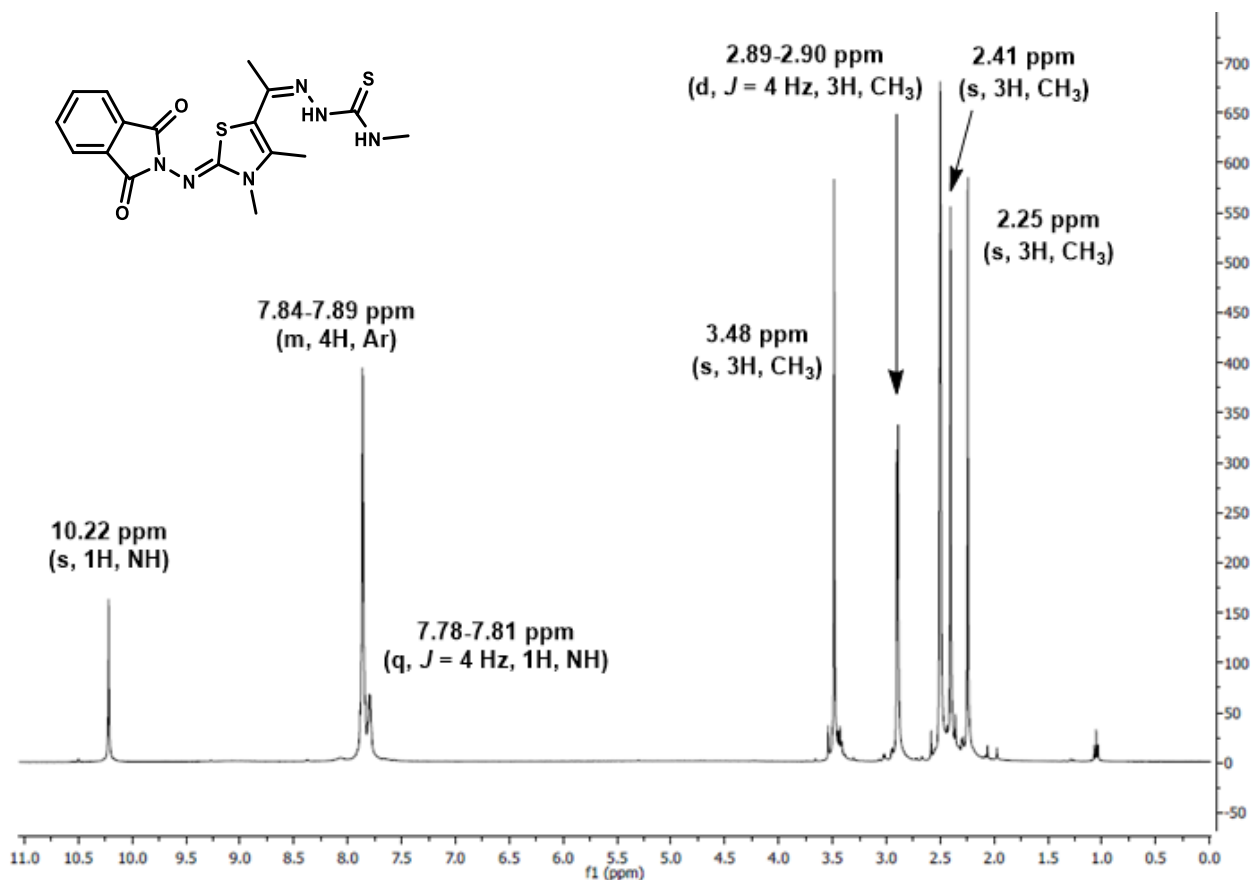
Em relação aos dados da espectroscópica na região do infravermelho da molécula **5d**, descritos na **Figura 27**, pode-se evidenciar as bandas entre 3.300 e 3400 cm^{-1} como sinais de estiramento de NH. Já na frequência de 1708.93 cm^{-1} uma banda característica do estiramento das duas carbonilas (C=O) simétricas presentes em imidas cíclicas.

Figura 26 – Espectro de IV do derivado ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazol (**5d**).



Na **Figura 27** foi constatada a presença de três singletos em 2.25, 2.41 e 3.48 ppm, integrando cada um para três hidrogênios, referente a três das metilas presentes na molécula. Os outros três hidrogênios metílicos ressoaram em forma de dubleto no intervalo de 2.89–2.90 com $J = 4$ Hz. Já no intervalo de 7.78–7.81 ppm, observa-se um quarteto, com $J = 4$ Hz, correspondente ao hidrogênio de um grupamento NH. Os quatro hidrogênios aromáticos da ftalimida estão situados no multipletto entre 7.84–7.89 ppm, que integra para quatro. Por fim é percebido um singlete em 10.22 ppm referente a outro hidrogênio NH.

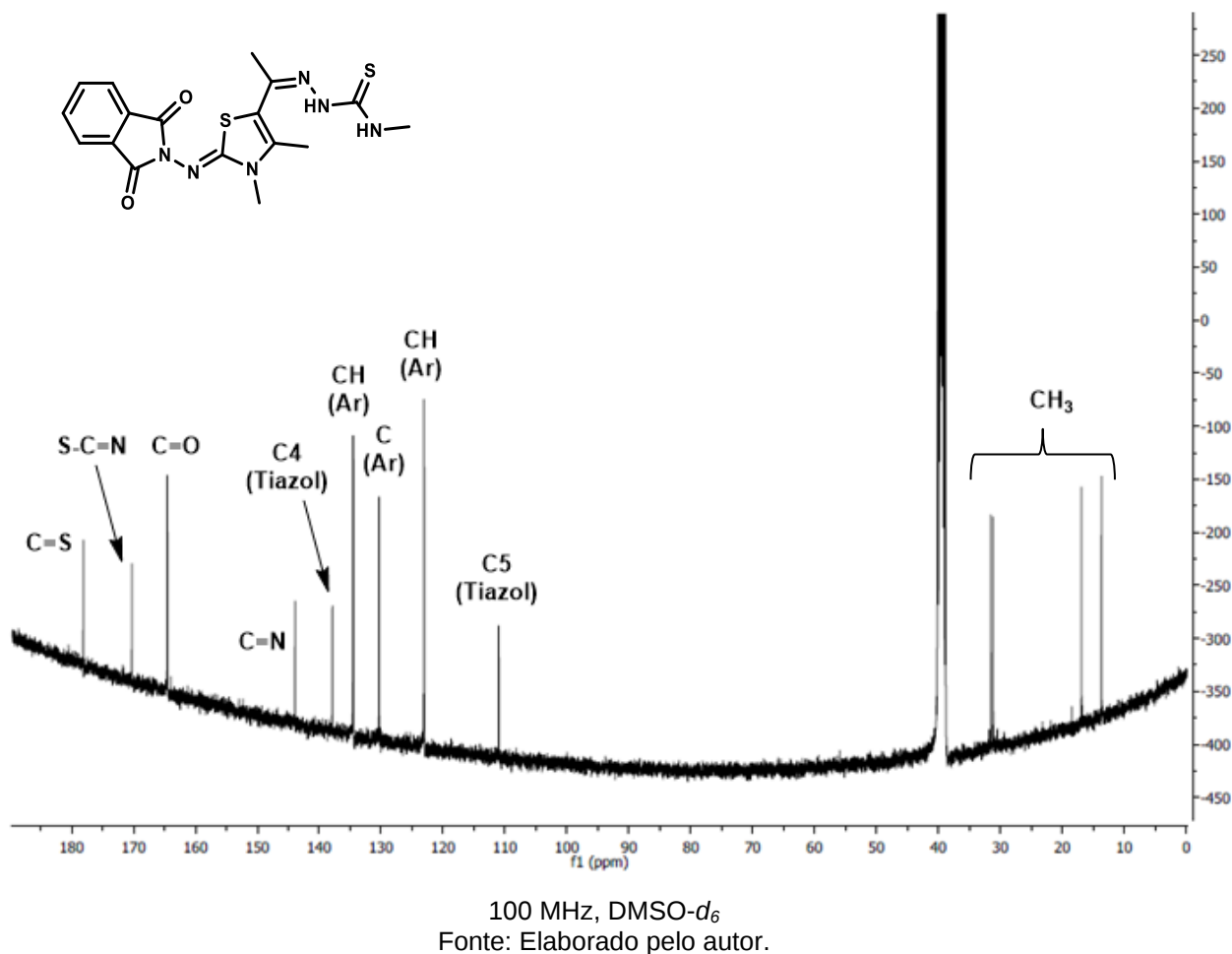
Figura 27 – Espectro de RMN – ^1H do composto ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazol (**5d**).



400 MHz, DMSO- d_6
 Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 28** corresponde ao espectro de RMN ^{13}C no qual, com auxílio da análise do DEPT, observa-se: em 13.68, 16.91, 31.16 e 31.55 ppm os sinais correspondentes às metilas; em 111.00 ppm o sinal do carbono C5 do anel tiazol; em 123.04 e 134.50 ppm estão os sinais referentes aos metinos aromáticos; em 130.33 ppm o pico indicativo de carbono quaternário aromático; em 137.87 ppm o carbono quaternário C4 do anel tiazol; em 143.91 ppm o carbono da hidrazona ($\text{C}=\text{N}$), sendo este diagnóstico da formação do produto desejado; em 164.61 ppm o sinal das carbonilas ($\text{C}=\text{O}$); em 170.25 ppm o pico referente aos carbonos C2 do tiazol ($\text{S}-\text{C}=\text{N}$); e em 178.10 ppm o sinal da tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$).

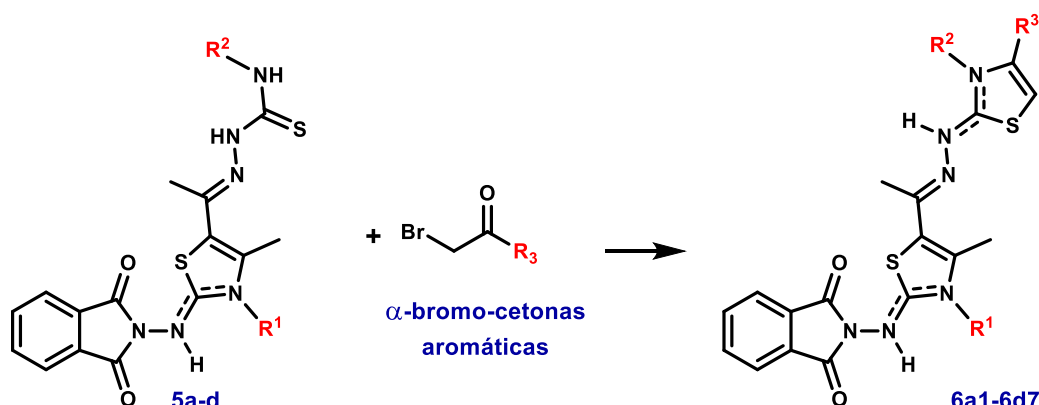
Figura 28 – Espectro de RMN – ^{13}C do composto ftalimido-5-tiossemicarbazona-1,3-tiazol (**5d**).



6.2.5 Ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1-6d7**)

Partindo dos compostos **5a-d**, foi obtida uma série contendo 28 ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1-6d7**). A nova ciclização que origina o segundo tiazol destas moléculas é estabelecida ao nível da tioamida na porção tiossemicarbazona dos compostos **5a-d**, via cicloadição com α -halo-cetonas (**Figura 29**). O solvente utilizado foi 2-propanol e as reações foram lançadas em ultrassom a temperatura ambiente. Os precipitados formados foram filtrados e seco sob vácuo.

Figura 29 – Reação de obtenção dos ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1-6d7**).

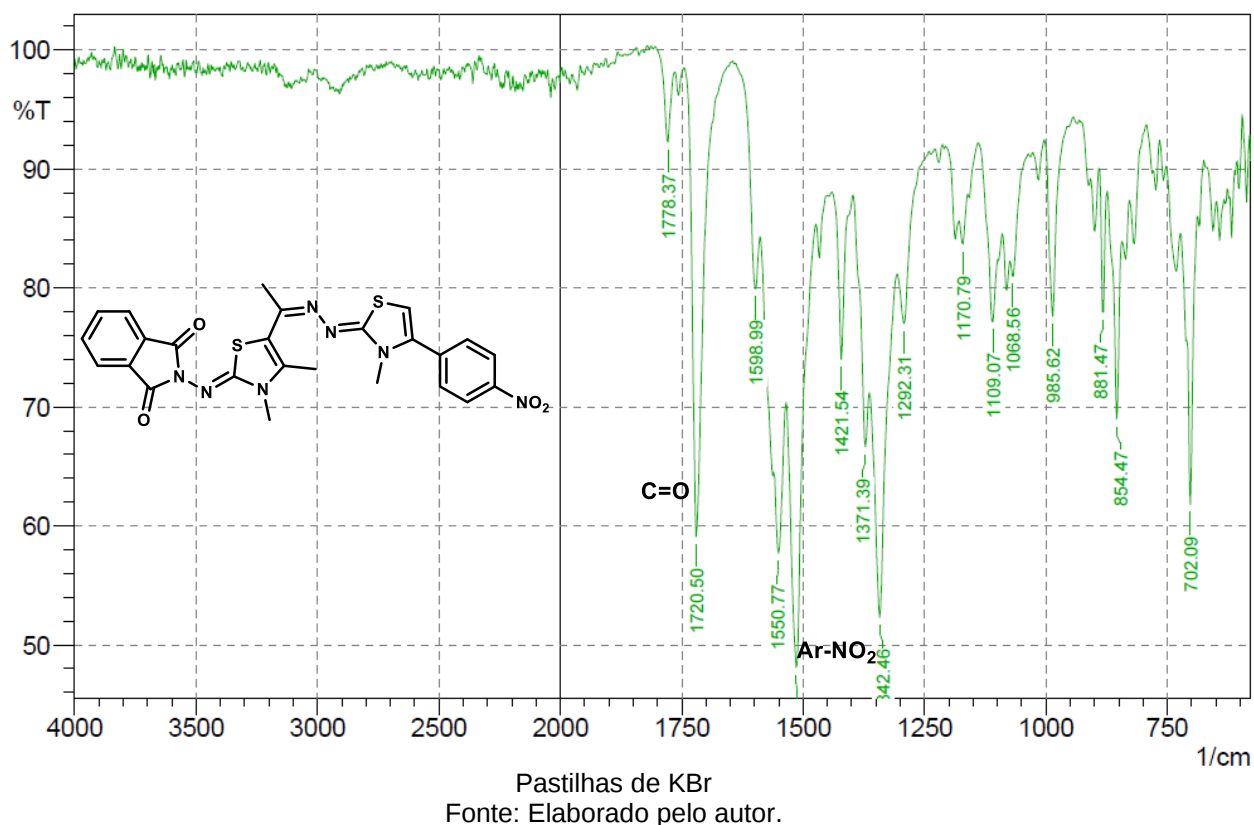


		R^1					
		-			Me		
R^2	-	Comp.	R^3	Rend.	Comp.	R^3	Rend.
		6a1	Ph	70	6b1	Ph	84
		6a2	4-F-Ph	86	6b2	4-F-Ph	87
		6a3	4-Cl-Ph	85	6b3	4-Cl-Ph	99
		6a4	4-NO ₂ -Ph	80	6b4	4-NO ₂ -Ph	98
		6a5	4-MeO-Ph	74	6b5	4-MeO-Ph	79
		6a6	2-Naph	84	6b6	2-Naph	96
		6a7	4-Ph-Ph	69	6b7	4-Ph-Ph	94
	Me	Comp.	R^3	Rend.	Comp.	R^3	Rend.
		6c1	Ph	99	6d1	Ph	72
		6c2	4-F-Ph	92	6d2	4-F-Ph	97
		6c3	4-Cl-Ph	99	6d3	4-Cl-Ph	98
		6c4	4-NO ₂ -Ph	99	6d4	4-NO ₂ -Ph	96
		6c5	4-MeO-Ph	99	6d5	4-MeO-Ph	83
		6c6	2-Naph	97	6d6	2-Naph	97
		6c7	4-Ph-Ph	95	6d7	4-Ph-Ph	96

Fonte: Elaborado pelo autor.

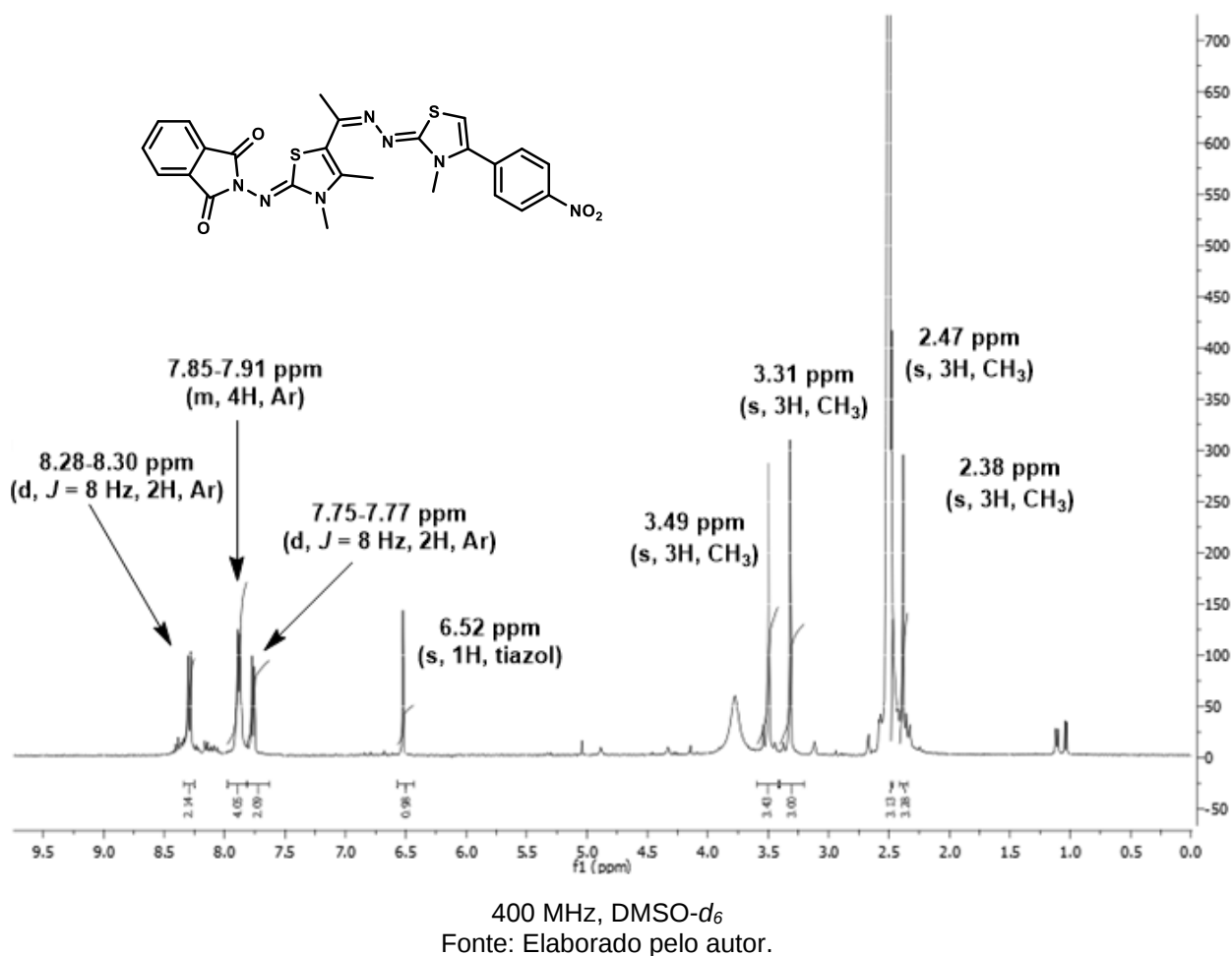
Todos os 28 novos derivados ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1-6d7**) foram sintetizados e caracterizados. Os espectros de IV, (**Figura 30**) RMN ¹H (**Figura 31**) e RMN ¹³C (**Figura 32**) do composto **6d4**, foram selecionados a título de ilustração para esta série.

Em relação aos dados da espectroscópica na região do infravermelho da molécula **6d4**, descritos na **Figura 30**, pode-se evidenciar na frequência de 1720.50 cm⁻¹ uma banda característica do estiramento das duas carbonilas simétricas presentes em imidas cíclicas. Já as bandas em 1514.12 cm⁻¹ e em 1342.46 cm⁻¹ correspondem, respectivamente, aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupamento *p*-nitro aromático.

Figura 30 – Espectro de IV do derivado ftalimido-*bis*-1,3-tiazol (**6d4**).

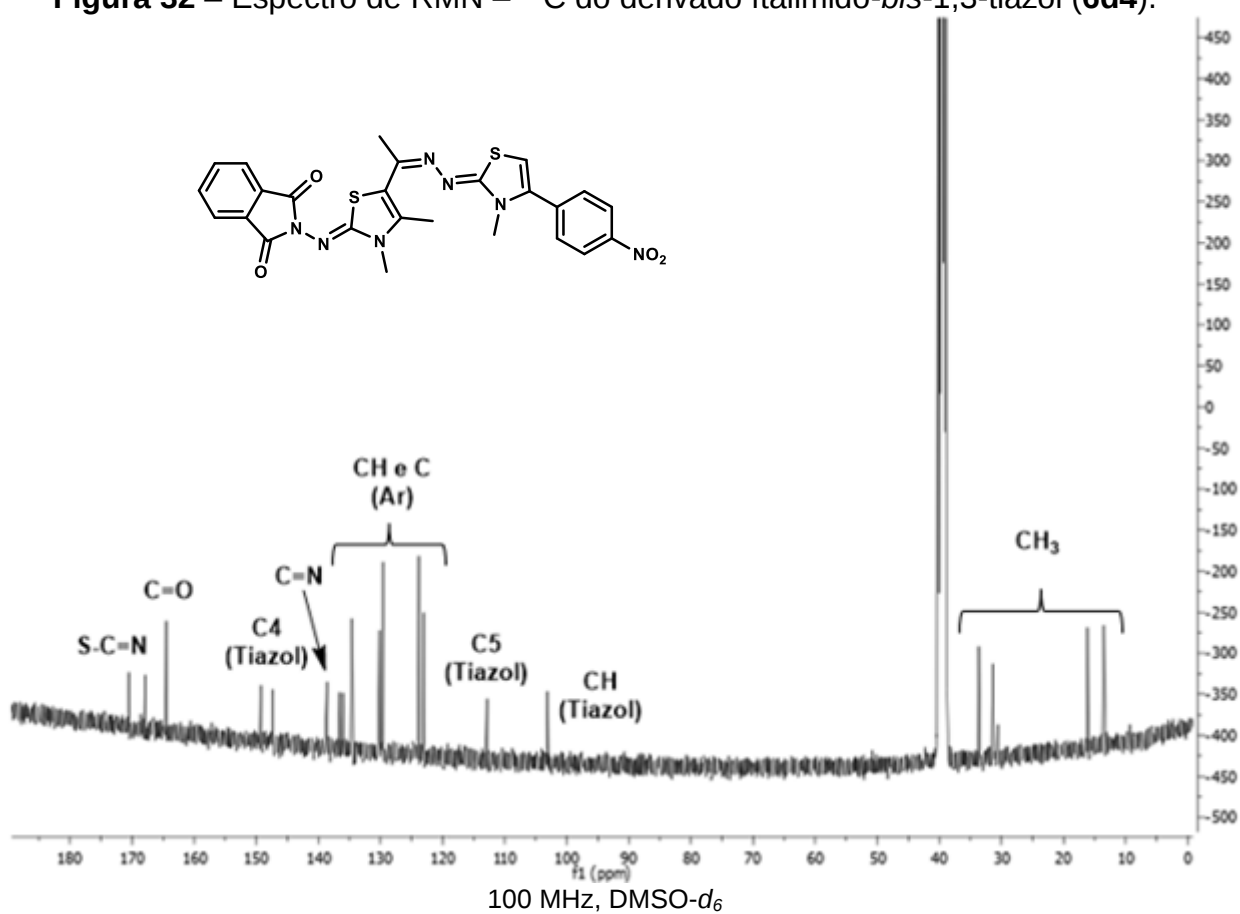
A **Figura 31** apresenta o espectro de RMN ^1H onde foi constatada a presença de quatro singletos em 2.38, 2.47, 3.31 e 3.49 ppm, integrando cada um para três hidrogênios, referente as metilas presentes na molécula. Em 6.52 ppm, observa-se um singlete integrando para um hidrogênio da posição C5 do núcleo tiazol formado na última etapa, sendo este diagnóstico da formação do produto desejado. Nos sinais entre o intervalo de 7.85–7.91 ppm, observa-se um multipeto integrando para quatro hidrogênios aromáticos do anel ftalimida. Já nos sinais em 7.76 e 8.29 são observados dois dubleto, ambos com $J = 8$ Hz, acoplando para dois hidrogênios aromáticos cada um.

Figura 31 – Espectro de RMN – ^1H do derivado ftalimido-*bis*-1,3-tiazol (**6d4**).



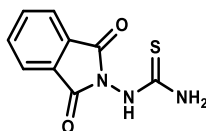
A **Figura 32** corresponde ao espectro de RMN ^{13}C no qual, com auxílio da análise do DEPT, observa-se: em 13.54, 16.17, 31.39 e 33.69 ppm os sinais correspondentes às metilas; em 103.07 ppm o sinal de um carbono metínico que confirma a formação do anel tiazol; já em 112.88 ppm o carbono quaternário C5 do anel 1,3-tiazol central da molécula; em 123.14, 123.89, 129.62, 134.61 ppm estão os sinais referentes aos metinos aromáticos; em 130.18, 136.02 e 136.56 ppm os picos indicativos de carbonos quaternários aromáticos; em 138.65 ppm o carbono da hidrazona ($\text{C}=\text{N}$); em 147.38 e 149.23 ppm os sinais referentes aos carbonos C4 dos grupamentos 1,3-tiazóis; em 164.56 ppm o sinal das carbonilas ($\text{C}=\text{O}$); e por fim em 167.96 e 170.50 ppm os picos referentes aos carbonos C2 dos tiazóis que estão ligados a enxofre e nitrogênio ($\text{S}-\text{C}=\text{N}$).

Figura 32 – Espectro de RMN – ^{13}C do derivado ftalimido-*bis*-1,3-tiazol (**6d4**).



6.3 DADOS ESPECTROSCÓPICOS

1-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)tioureia (1a)



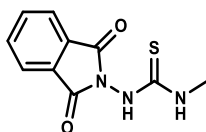
Características Físico-Químicas: Cristais brancos; PF: 210-211°C; Rend.: 58%; R_f: 0.63 (Acetato de etila / Hexano 7:3).

IV (KBr), principais sinais: 3475.39 (NH₂), 3201.18 (NH), 1727.56 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.9 (m, 4H, Ar), 8.2 (s, 1H, NH₂), 8.3 (s, 1H, NH₂), 9.7 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: δ 123.53 (C-H, Ar), 130.01 (C, Ar), 134.92 (C-H, Ar), 165.14 (C=O), 182.48 (C=S).

HRMS: 222.2530 [M+H]⁺.

1-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)-3-metiltiourea (1b)

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

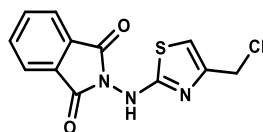
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.86 (s, 3H, CH₃), 7.91–7.97 (m, 4H, Ar), 8.55 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 30.08 (CH₃), 123.53 (C-H, Ar), 129.92 (C, Ar), 135.00 (C-H, Ar), 165.34 (C=O), 182.08 (C=S).

Massa: C₁₀H₉N₃O₂S Exact Mass: 235,0415 g/mol

HRSM: 236,1031 [M+H]⁺

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



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

Análise Elementar para C₁₂H₈ClN₃O₂S: Teórico: C, 49.07; H, 2.75; N, 14.31; S, 10.92. Calculado: C, 44.50; H, 2.81; N, 13.34; S, 10.43.

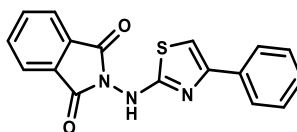
IV (KBr), principais sinais: 3119.15 (NH), 1743.24 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 4.54 (s, 2H, CH₂), 7.03 (s, 1H, tiazol), 7.93-7.99 (m, 4H, Ar), 10.54 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 41.1 (CH₂), 109.8 (CH, tiazol), 123.9 (CH, Ar), 129.4 (C, Ar), 135.4 (CH, Ar), 147.1 (C, tiazol), 165.6 (C=O), 168.3 (S-C=N, tiazol).

HRSM: 294.0097 [M+H]⁺

2-(4-feniltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2b)



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

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

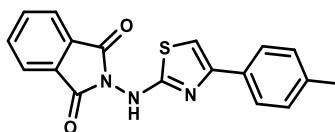
IV (KBr), principais sinais: 3123.66 (NH), 1742.23 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.38 (s, 1H, tiazol), 7.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.95-8.02 (m, 4H, Ar), 10.65 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 104.8 (CH, tiazol), 123.8 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 128.6 (CH Ar) 129.3 (C, Ar), 133.9 (C, Ar), 135.4 (CH, Ar), 149.9 (C, tiazol), 165.5 (C=O), 167.6 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 322.0619 [M+H]⁺.

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



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

Análise Elementar para C₁₈H₁₃N₃O₂S: Teórico: C, 64.46; H, 3.91; N, 12.53; S, 9.56.
Calculado: C, 63.17; H, 3.81; N, 12.18; S, 9.17.

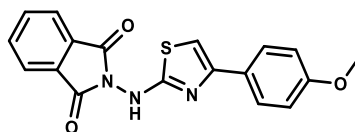
IV (KBr), principais sinais: 3117.64 (NH), 1738.51 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.26 (s, 3H, CH₃), 7.14 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, Ar), 7.30 (s, 1H, tiazol), 7.59 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, Ar), 7.99 (m, 4H, Ar), 10.41 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 20.8 (CH₃), 103.9 (CH, tiazol), 123.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.3 (C, Ar), 131.4 (C, Ar), 135.4 (C, Ar), 137.1 (C, Ar), 150.2 (C, tiazol), 165.6 (C=O), 167.5 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 336.0812 [M+H]⁺.

2-(4-(4-metoxifenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2d)



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

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

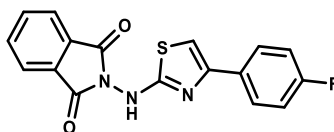
IV (KBr), principais sinais: 3232.68 (NH), 1748.64 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.025 (s, 3H, CH₃), 6.90 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H, Ar), 7.20 (s, 1H, thiazol), 7.62 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H, Ar), 7.98 (m, 4H, Ar), 10.72 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: (CH₃), 102.7 (CH, thiazol), 114.0 (CH, Ar), 123.9 (CH, Ar), 126.7 (C, Ar), 127.0 (CH, Ar), 129.4 (C, Ar), 135.4 (CH, Ar), 149.5 (C, thiazol), 158.6 (CO, Ar), 165.6 (C=O), 167.6 (S-C=N, thiazol).

HRMS: 352.0825 [M+H]⁺.

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



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

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

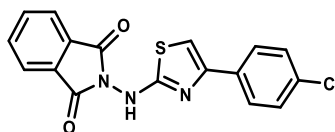
IV (KBr), principais sinais: 3130.14 (NH), 1743.63 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.17 (d, *J* = 17.6 Hz, 2H, Ar), 7.37 (s, 1H, tiazol), 7.73 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H, Ar), 7.99 (m, 4H, Ar), 10.42 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 104.6 (CH, tiazol), 115.4 (CH, Ar), 115.6 (CH, Ar), 123.9 (CH, Ar), 127.5 (CH Air) 129.3 (C, Ar), 135.4 (CH, Ar), 160.4 (C, tiazol), 162.9 (CF, Ar), 165.5 (C=O), 167.6 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 340.0566 [M+H]⁺.

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



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

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

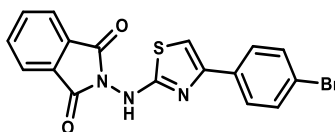
IV (KBr), principais sinais: 3119.79 (NH), 1739.00 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar), 7.46 (s, 1H, tiazol),
7.72 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar). 7.99 (m, 4H, Ar), 10.46 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 105.7 (CH, tiazol), 123.9 (CH, Ar),
127.3 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.3 (C, Ar) 132.2 (C, Ar), 132.9 (C, Ar), 135.4 (CCl,
Ar), 148.9 (C, tiazol), 165.5 (C=O), 167.7 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 356.0260 [M+H]⁺.

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



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

Análise Elementar para C₁₇H₁₀BrN₃O₂S: Teórico: C, 51.01; H, 2.52; N, 10.50; S, 8.01. Calculado: C, 51.15; H, 2.58; N, 11.62; S, 9.03.

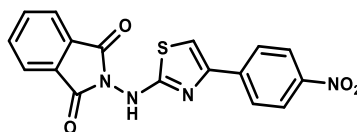
IV (KBr), principais sinais: 3117.68 (NH), 1739.19 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.47 (s, 1H, thiazol), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar), 7.96 (m, 4H, Ar), 10.46 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 105.8 (CH, thiazol), 120.8 (CH, Ar), 123.9 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 129.3 (C, Ar) 131.6 (C, Ar), 135.4 (CBr, Ar), 148.9 (C, thiazol), 165.5 (C=O), 167.7 (S-C=N, thiazol).

HRMS: 401.9764 [M+H]⁺.

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



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

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

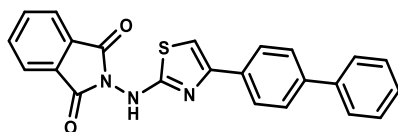
IV (KBr), principais sinais: 3309.85 (NH), 1724.82 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.77 (s, 1H, tiazol), 7.97 (m, 4H, Ar), 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar), 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar), 10.54 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 109.6 (CH, tiazol), 123.9 (CH, Ar), 124.1 (CH, Ar), 126.4 (CH, Ar), 129.3 (CN Ar), 135.4 (CH, Ar), 139.9 (C, Ar), 146.3 (C, Ar), 147.9 (C, tiazol), 165.4 (C=O), 168.0 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 367.0517 [M+H]⁺

2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2i)



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

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

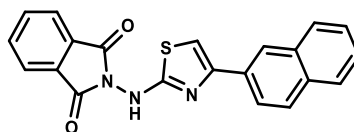
IV (KBr), principais sinais: 3324.67 (NH), 1660.10 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.35 (s, 1H, tiazol), 7.48 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, Ar), 7.63 (m, 4H, Ar), 7.72 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H, Ar), 7.82 (m, 4H, Ar) 7.96 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H, Ar), 10.65 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 103.4 (CH, tiazol), 126.5 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar) 128.9 (CH, Ar), 130.1 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 133.9 (C, Ar), 136.1 (CH, Ar), 138.9 (C, Ar), 139.7 (C Ar), 150.2 (C, tiazol), 167.6 (C=O), 168.3 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 398.0958 [M+H]⁺

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



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

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

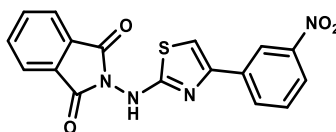
IV (KBr), principais sinais: 3169.87 (NH), 1743.89 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.47 (t, 2H, Ar), 7.53 (s, 1H, tiazol), 7.87 (d, *J* = 11.6 Hz, 4H, Ar), 8.03 (m, 4H, Ar), 8.23 (s, 1H, Ar), 10.48 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 105.5 (CH, tiazol), 123.9 (CH, Ar), 124.2 (CH, Ar), 126.1 (CH, Ar), 126.4 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.3 (C, Ar), 131.5 (C, Ar), 132.5 (C, Ar), 132.9 (C, Ar), 135.4 (CH, Ar), 150.1 (C, tiazol), 165.6 (C=O), 167.9 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 367.0517 [M+H]⁺.

2-(4-(3-nitrofenil)thiazol-2-ilamino)isoindolono-1,3-diona (2k)



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

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

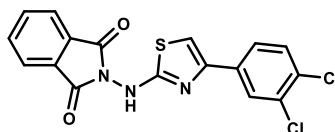
IV (KBr), principais sinais: 3287.35 (NH), 1732.47 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.65 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, Ar), 7.73 (s, 1H, tiazol),
8.00 (m, 4H, Ar), 8.13 (m, 2H, Ar), 8.48 (s, 1H, Ar) 10.36 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 107.7 (CH, tiazol), 119.9 (CH, Ar),
122.3 (CH, Ar), 123.9 (CH, Ar), 129.3 (CN, Ar) 130.3 (CH, Ar), 131.7 (CH, Ar), 135.5
(CH, Ar), 147.7 (C, Ar), 148.2 (C, tiazol), 165.5 (C=O), 168.2 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 367.0517 [M+H]⁺.

2-(4-(3,4-diclorofenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2I)



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

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

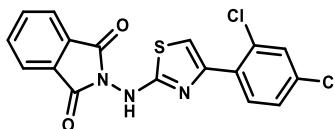
IV (KBr), principais sinais: 3337.03 (NH), 1742.53 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.52 (s, 1H, tiazol), 7.62 (s, 1H, Ar), 7.68 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.94 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, Ar), 8.00 (m, 4H, Ar), 10.51 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 107.1 (CH, tiazol), 123.9 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 129.3 (CCl, Ar), 129.5 (CH, Ar), 130.9 (CCl, Ar), 131.4 (C, Ar), 134.5 (CH, Ar), 135.4 (C, Ar), 136.0 (CH, Ar), 147.9 (C, tiazol), 165.4 (C=O), 167.9 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 356.0260 [M+H]⁺.

2-(4-(2,4-diclorofenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (2m)



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

Análise Elementar para C₁₇H₉Cl₂N₃O₂S: Teórico: C, 52.32; H, 2.32; N, 10.77; S, 8.22.
Calculado: C, 52.25; H, 2.26; N, 10.50; S, 7.91.

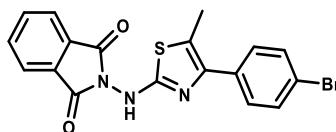
IV (KBr), principais sinais: 3130.90 (NH), 1741.75 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 7.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar), 7.45 (s, 1H, tiazol),
7.63 (s, 1H, Ar), 7.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar). 7.97 (m, 4H, Ar), 10.46 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 110.4 (CH, tiazol), 123.8 (CH, Ar),
127.5 (CH, Ar), 129.3 (CCl, Ar), 129.7 (CH, Ar), 131.5 (CCl, Ar), 131.5 (C, Ar), 132.1
(CH, Ar), 132.7 (C, Ar), 135.4 (CH, Ar), 145.4 (C, tiazol), 165.4 (C=O), 166.7 (S-C=N,
tiazol).

HRMS: 356.0260 [M+H]⁺.

2-(4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol-2-ilamino)isoindolono-1,3-diona (2n)



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

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

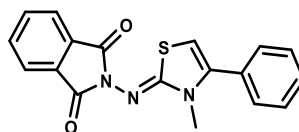
IV (KBr), principais sinais: 3188.90 (NH), 1745.97 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.36 (s, 3H, CH₃), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.96 (m, 4H, Ar), 10.23 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 12.1 (CH₃), 119.3 (CH, tiazol), 120.4 (C, Ar), 123.8 (CH, Ar), 129.3 (C, Ar), 129.8 (CH, Ar), 131.2 (CH, Ar), 133.7 (CBr, Ar), 135.3 (CH, Ar), 143.9 (C, tiazol), 163.5 (C=O), 165.5 (S-C=N, tiazol).

HRMS: 401.9764 [M+H]⁺.

2-((3-metil-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3a)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 236-237 °C; Rend.:36%.

IV (KBr), principais sinais: 1741.72 (C=O) cm^{-1} .

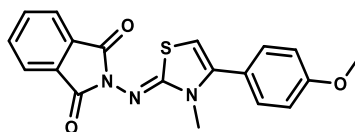
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.38 (s, 3H, CH_3), 6.46 (s, 1H, tiazol), 7.53–7.56 (m, 5H, Ar), 7.87–7.88 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.54 (CH_3), 98.20 (C-H, tiazol), 123.19 (C-H, Ar), 128.87 (C-H, Ar), 129.00 (C-H, Ar), 129.55 (C-H, Ar), 130.13 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 134.65 (C-H, Ar), 140.98 (C, tiazol), 164.58 (C=O), 172.30 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ Exact Mass: 335,0728 g/mol

MS (ESI), m/z: 336.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((4-(4-metoxifenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3b)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo claro; PF: 262-263 °C;
Rend.: 60%.

IV (KBr), principais sinais: 1743.65 (C=O) cm^{-1} .

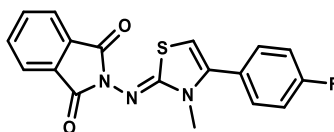
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.37 (s, 3H, CH_3), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 6.41 (s, 1H, tiazol), 7.05-7.07 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.47-7.49 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.87-7.93 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.56 (CH_3), 55.34 (OCH_3), 97.67 (C-H, tiazol), 114.29 (C-H, Ar), 122.01 (C, Ar), 123.15 (C-H, Ar), 130.08 (C, Ar), 130.50 (C-H, Ar), 134.70 (C-H, Ar), 140.97 (C, Ar), 160.16 (C, tiazol), 164.58 (C=O), 172.20 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ Exact Mass: 365,0834 g/mol

MS (ESI), m/z : 366.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((4-(4-fluor-fenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3c)



Características Físico-Químicas: Sólido cristalino amarelo; PF: 208-209 °C; Rend.: 55%.

IV (KBr), principais sinais: 1705.07 (C=O) cm^{-1} .

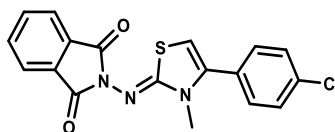
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.35 (s, 3H, CH_3), 6.44 (s, 1H, tiazol), 7.34-7.39 (m, 2H, Ar), 7.61-7.65 (m, 2H, Ar), 7.85-7.90 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.32 (CH_3), 98.03 (C-H, tiazol), 115.99 (C-H, Ar), 123.05 (C-H, Ar), 126.46 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 131.44 (C-H, Ar), 134.60 (C-H, Ar), 139.84 (C, Ar), 160.16 (C, tiazol), 164.61 (C=O), 172.23 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ Exact Mass: 353,0634 g/mol

MS (ESI), m/z: 353.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((4-(4-clorofenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolina-1,3-diona (3d)



Características Físico-Químicas: Sólido cristalino amarelo; PF: 248 °C; Rend.: 55%.

IV (KBr), principais sinais: 1745.58 (C=O) cm^{-1} .

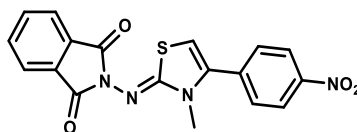
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.37 (s, 3H, CH_3), 6.41 (s, 1H, tiazol), 7.45–7.46 (d, $J = 4$ Hz, 2H, Ar), 7.65–7.66 (d, $J = 4$ Hz, 2H, Ar). 7.97–8.00 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.56 (CH_3), 97.67 (C-H, tiazol), 123.907 (C-H, Ar), 127.284 (C-H, Ar), 128.670 (C-H, Ar), 129.336 (C, Ar), 132.171 (C, Ar), 132.899 (C, Ar), 135.439 (C-Cl, Ar), 148.854 (C, tiazol), 165.506 (C=O), 167.721 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ Exact Mass: 369,0339 g/mol

MS (ESI), m/z : 370.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 368.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-((3-metil-4-(4-nitrofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3e)



Características Fisico-Químicas: Sólido cristalino alaranjado; PF: 237-238 °C; Rend.: 60%.

IV (KBr), principais sinais: 1707.00 (C=O) cm^{-1} .

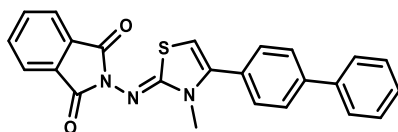
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.37 (s, 3H, CH_3), 6.41 (s, 1H, tiazol), 7.05-7.07 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.47-7.49 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.87-7.93 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.32 (CH_3), 98.03 (C-H, tiazol), 115.99 (C-H, Ar), 123.05 (C-H, Ar), 126.46 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 131.44 (C-H, Ar), 134.60 (C-H, Ar), 139.84 (C, Ar), 160.16 (C, tiazol), 164.61 (C=O), 172.23 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ Exact Mass: 380,0579 g/mol

MS (ESI), m/z: 381.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-((4-(bifenil-4-il)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3f)



Características Fisico-Químicas: Sólido cristalino alaranjado; PF: 238-249 °C; Rend.: 60%.

IV (KBr), principais sinais: 1714.72 (C=O) cm^{-1} .

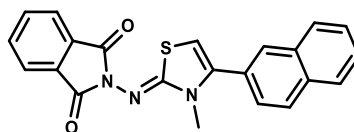
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.44 (s, 3H, CH_3), 6.52 (s, 1H, tiazol), 7.39–7.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.49–7.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar), 7.65–7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Ar), 7.73–7.75 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar), 7.81–7.83 (d, $J = 7.6$, 2H, Ar), 7.88–7.89 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.63 (CH_3), 98.26 (C-H, tiazol), 123.10 (C-H, Ar), 126.78 (C-H, Ar), 127.07 (C-H, Ar), 127.95 (C-H, Ar), 128.94 (C, Ar), 129.06 (C-H, Ar), 129.47 (C-H, Ar), 130.16 (C, Ar), 134.64 (C-H, Ar), 139.18 (C, Ar), 140.69 (C, Ar), 141.16 (C, tiazol), 164.60 (S-C=N, tiazol), 172.35 (C=O).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ Exact Mass: 411,1041 g/mol

MS (ESI), m/z: 412.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((3-metil-4-(naftalen-2-il)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3g)



Características Físico-Químicas: Sólido cristalino alaranjado; PF: 230 °C;
Rend.: 60%.

IV (KBr), principais sinais: 1703.14 (C=O) cm^{-1} .

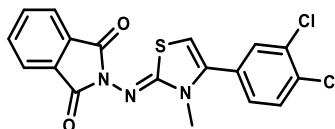
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.44 (s, 3H, CH_3), 6.55 (s, 1H, tiazol), 7.62–7.67 (m, 2H, Ar), 7.88 (s, 4H, Ar), 8.01–8.14 (m, 5H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.60 (CH_3), 98.30 (C-H, tiazol), 123.05 (C-H, Ar), 125.91 (C-H, Ar), 126.86 (C-H, Ar), 127.18 (C-H, Ar), 127.66 (C-H, Ar), 128.22 (C-H, Ar), 128.35 (C-H, Ar), 128.46 (C-H, Ar), 130.17 (C, Ar), 132.62 (C, Ar), 132.91 (C, Ar), 134.58 (C-H, Ar), 140.91 (C, tiazol), 164.60 (S-C=N, tiazol), 172.36 (C=O).

Massa: $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ Exact Mass: 385,0885 g/mol

MS (ESI), m/z: 386,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((4-(3,4-diclorofenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3h)



Características Fisico-Químicas: Sólido cristalino alaranjado; PF: 278-279 °C; Rend.: 60%.

IV (KBr), principais sinais: 1749.44 (C=O) cm^{-1} .

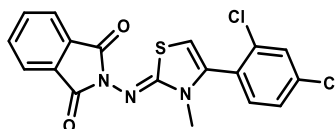
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.44 (s, 3H, CH_3), 6.55 (s, 1H, tiazol), 7.62 (s, 1H, Ar), 7.67–7.68 (d, $J = 4$ Hz, 1H, Ar), 7.93–7.94 (d, $J = 4$ Hz, 1H, Ar), 7.96–8.04 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.60 (CH_3), 98.30 (C-H, tiazol), 123.86 (C-H, Ar), 127.07 (C-H, Ar), 129.29 (C-Cl, Ar), 129.49 (C-H, Ar), 130.885 (C-Cl, Ar), 131.358 (C, Ar), 134.549 (C-H, Ar), 135.408 (C, Ar), 136.036 (C-H, Ar), 147.886 (C, tiazol), 165.421 (C=O), 167.876 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ Exact Mass: 402,9949g/mol

MS (ESI), m/z: 403.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 401.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-((4-(2,4-diclorofenil)-3-metiltiazol-2(3*H*)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (3i)



Características Fisico-Químicas: Sólido cristalino amarelo; PF: 226 °C;
Rend.: 55%.

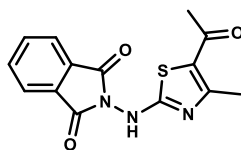
IV (KBr), principais sinais: 1710.86 (C=O) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.35 (s, 3H, CH_3), 6.44 (s, 1H, tiazol), 7.40–7.41 (d, $J = 4$ Hz, 1H, Ar), 7.62 (s, 1H, Ar), 7.64–7.65 (d, $J = 4$ Hz, 1H, Ar). 7.95–7.98 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.32 (CH_3), 98.03 (C-H, tiazol), 123.82 (C-H, Ar), 127.52 (C-H, Ar), 129.33 (C-Cl, Ar), 129.73 (C-H, Ar), 131.51 (C-Cl, Ar), 131.54 (C, Ar), 132.10 (C-H, Ar), 132.69 (C, Ar), 135.36 (C-H, Ar), 145.35 (C, tiazol), 165.44 (C=O), 166.66 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ Exact Mass: 402,9949g/mol

MS (ESI), m/z: 403.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 401.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-((5-acetil-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4a)

Características Fisico-Químicas: Cristais brancos; PF: 247-248 °C; Rend.: 60%;

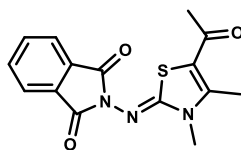
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 7.92–7.98 (m, 4H, Ar), 11.04 (sl, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 17.43 (CH₃), 29.37 (CH₃), 122.53 (C5, tiazol), 123.73 (C-H, Ar), 129.50 (C, Ar), 135.24 (C-H, Ar), 153.89 (C4, tiazol), 164.79 (C=O, ftalimida), 169.25 (S-C=N, tiazol), 189.20 (C=O, acetil).

Massa: C₁₄H₁₁N₃O₃S Exact Mass: 301.0521 g/mol

MS (ESI), m/z: 302.1 [M+H]⁺; 300.3 [M-H]⁺

2-((5-acetil-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (4b)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 228-229 °C; Rend.: 58%;

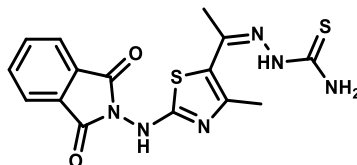
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 3.54 (s, 3H, CH₃), 7.84–7.89 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.66 (CH₃), 29.45 (CH₃), 31.85 (CH₃), 113.03 (C5, tiazol), 123.12 (C-H, Ar), 130.14 (C, Ar), 134.60 (C-H, Ar), 146.93 (C4, tiazol), 163.97 (C=O, ftalimida), 170.14 (S-C=N, tiazol), 188.35 (C=O, acetil).

Massa: C₁₅H₁₃N₃O₃S Exact Mass: 315.0678 g/mol

MS (ESI), m/z: 316.2 [M+H]⁺

2-(1-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)amino)-4-metiltiazol-5-il)etilideno)hidrazino-1-carbotioamida (5a)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 244-245 °C;
Rend.: 72%;

IV (KBr), principais sinais: 3419.79 (NH₂), 3277.06 (NH), 1714.72 (C=O) cm⁻¹.

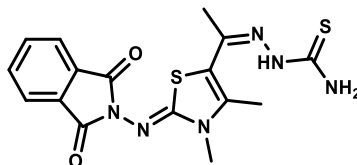
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.25 (s, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 7.20 (s, 1H, NH₂), 7.91–7.97 (m, 4H, Ar), 8.15 (s, 1H, NH₂), 10.30 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 16.25 (CH₃), 16.99 (CH₃), 123.62 (C-H, Ar), 123.76 (C5, tiazol), 129.48 (C, Ar), 135.16 (C-H, Ar), 135.31 (C4, tiazol), 145.02 (C=N), 165.12 (C=O), 166.95 (S-C=N, tiazol), 177.89 (C=S).

Massa: C₁₅H₁₄N₆O₂S₂ Exact Mass: 374.0620 g/mol

MS (ESI), m/z: 375.1 [M+H]⁺; 373.3 [M-H]⁺

2-(1-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)imino)-3,4-dimetil-2,3-dihidrotiazol-5-il)etilideno)hidrazino-1-carbotioamida (5b)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 235-236 °C;
Rend.: 95%;

IV (KBr), principais sinais: 3439.08 (NH₂), 3277.06 (NH), 1741.72 (C=O) cm⁻¹.

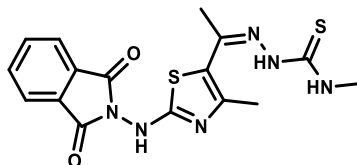
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 3.48 (s, 3H, CH₃), 7.19 (s, 1H, NH₂), 7.83–7.88 (m, 4H, Ar), 8.09 (s, 1H, NH₂), 10.32 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 13.58 (CH₃), 16.65 (CH₃), 31.50 (CH₃), 111.21 (C5, tiazol), 122.99 (C-H, Ar), 130.27 (C, Ar), 134.43 (C-H, Ar), 137.96 (C=N), 143.76 (C4, tiazol), 164.43 (C=O, ftalimida), 170.27 (S-C=N, tiazol), 178.26 (C=S)

Massa: C₁₆H₁₆N₆O₂S₂ Exact Mass: 388.0776 g/mol

MS (ESI), m/z: 389.1 [M+H]⁺; 387.2 [M-H]⁺

2-(1-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)amino)-4-metiltiazol-5-il)etilideno)-N-metilhidrazino-1-carbotioamida (5c)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 223-224 °C;
Rend.: 84%;

IV (KBr), principais sinais: 3375.43 (NH), 3147.83 (NH), 1735.93 (C=O) cm^{-1} .

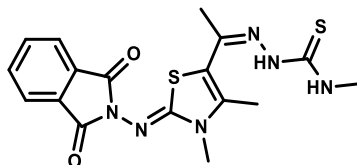
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3), 2.94–2.95 (d, $J = 4$ Hz, 3H, CH_3), 7.82–7.83 (d, $J = 4$ Hz, 1H, NH), 7.91–7.97 (m, 4H, Ar), 10.22 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.44 (CH_3), 17.02 (CH_3), 31.07 (CH_3), 123.61 (C-H, Ar), 123.73 (C5, tiazol), 129.58 (C, Ar), 135.12 (C-H, Ar), 135.24 (C4, tiazol), 144.77 (C=N), 165.09 (C=O), 165.05 (S-C=N, tiazol), 178.16 (C=S).

Massa: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 388.0776 g/mol

MS (ESI), m/z: 389.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 387.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-(1-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)imino)-3,4-dimetil-2,3-dihidrotiazol-5-il)etilideno)-N-metilhidrazino-1-carbotioamida (5d)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 169-170 °C; Rend.: 58%;

IV (KBr), principais sinais: 1708.93 (C=O) cm^{-1} .

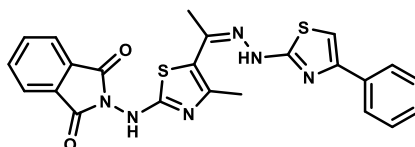
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.89–2.90 (d, $J = 4$ Hz, 3H, CH_3), 3.48 (s, 3H, CH_3), 7.78–7.81 (q, $J = 4$ Hz, 1H, NH), 7.84–7.89 (m, 4H, Ar), 10.22 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.68 (CH_3), 16.91 (CH_3), 31.16 (CH_3), 31.55 (CH_3), 111.00 (C5, tiazol), 123.04 (C-H, Ar), 130.33 (C, Ar), 134.50 (C-H, Ar), 137.87 (C4, tiazol), 143.91 (C=N), 164.51 (C=O), 170.25 (S-C=N, tiazol), 178.10 (C=S).

Massa: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 402.0933 g/mol

MS (ESI), m/z: 403.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 401.3 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-((4-metil-5-(1-(2-(4-feniltiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a1)



Características Físico-Químicas: Cristais marrons claros; PF: 252-253 °C;
Rend.: 70%;

IV (KBr), principais sinais: 3136.25 (NH), 2960.73 (NH), 1732.08 (C=O) cm^{-1} .

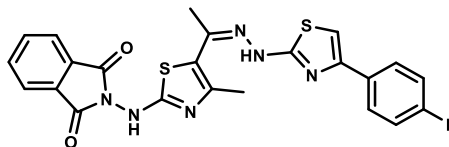
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.17 (s, 3H, CH_3), 2.21 (s, 3H, CH_3), 7.13 (s, 1H, tiazol), 7.15–7.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.25–7.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar), 7.70–7.72 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar), 7.84–7.85 (m, 4H, Ar), 8.70 (sl, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.54 (CH_3), 98.20 (C-H, tiazol), 123.19 (C-H, Ar), 128.87 (C-H, Ar), 129.00 (C-H, Ar), 129.55 (C-H, Ar), 130.13 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 134.65 (C-H, Ar), 140.98 (C, tiazol), 164.58 (S-C=N, tiazol), 172.30 (C=O).

Massa: $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 474.0933 g/mol

MS (ESI), m/z : 475.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(4-fluorofenil)thiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a2)



Características Físico-Químicas: Cristais beges; PF: 230-233 °C; Rend.: 86%;

IV (KBr), principais sinais: 3138.18 (NH), 1712.79 (C=O) cm^{-1} .

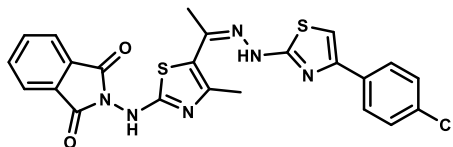
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.28 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 7.21 (s, 1H, thiazol), 7.23–7.25 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.85–7.88 (m, 2H, Ar), 7.93–7.99 (m, 4H, Ar), 9.37 (sl, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.26 (CH_3), 16.70 (CH_3), 103.71 (C-H, thiazol), 115.30 (C5, thiazol), 115.52 (C-H, Ar), 120.31 (C, Ar), 123.68 (C-H, Ar), 127.51 (C-F, Ar), 129.54 (C-H, Ar), 131.02 (C4, thiazol), 135.19 (C-H, Ar), 142.80 (C=N), 165.00 (C=O), 166.34 (S-C=N, thiazol), 169.39 (S-C=N, thiazol).

Massa: $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 492.0838 g/mol

MS (ESI), m/z : 493.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(4-clorofenil)thiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a3)



Características Físico-Químicas: Cristais marrons; PF: 250-251 °C; Rend.: 85%;

IV (KBr), principais sinais: 3329.14 (NH), 2939.52 (NH), 1726.29 (C=O) cm⁻¹.

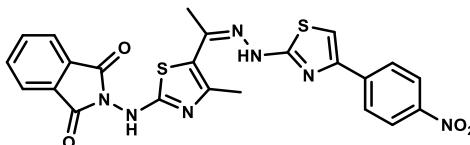
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 7.32 (s, 1H, tiazol), 7.44–7.46 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.84–7.86 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.89–8.03 (m, 4H, Ar), 9.36 (sl, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 16.35 (CH₃), 16.76 (CH₃), 104.62 (C-H, tiazol), 120.23 (C5, tiazol), 123.75 (C-H, Ar), 127.11 (C-Cl, Ar), 128.68 (C-H, Ar), 129.65 (C-H, Ar), 131.97 (C, Ar), 133.34 (C4, tiazol), 135.18 (C-H, Ar), 143.00 (C=N), 148.63 (C, Ar), 164.99 (C=O), 166.34 (S-C=N, tiazol), 169.47 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₃H₁₇ClN₆O₂S₂ Exact Mass: 508.0543 g/mol

MS (ESI), m/z: 509.1 [M+H]⁺

2-((4-metil-5-(1-(2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a4)



Características Físico-Químicas: Cristais vermelho escuro; PF: 243-244 °C; Rend.: 80%;

IV (KBr), principais sinais: 3331.07 (NH), 1732.08 (C=O) cm^{-1} .

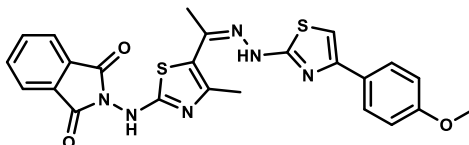
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.29 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 5.33 (sl, 1H, NH), 7.65 (s, 1H, tiazol), 7.92–8.00 (m, 4H, Ar), 8.07–8.10 (d, $J = 9$ Hz, 2H, Ar), 8.25–8.28 (d, $J = 9$ Hz, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.34 (CH_3), 16.69 (CH_3), 108.93 (C-H, tiazol), 123.75 (C-H, Ar), 124.14 (C-H, Ar), 126.31 (C-H, Ar), 129.64 (C, Ar), 135.25 (C-H, Ar), 142.91 (C=N), 146.17 (C4, tiazol), 148.37 (C4, tiazol), 165.06 (C=O), 166.42 (S-C=N, tiazol), 169.72 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2$ Exact Mass: 519.0783 g/mol

MS (ESI), m/z: 520.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 518.3 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(4-metoxifenil)thiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a5)



Características Físico-Químicas: Cristais beges; PF: 252-253 °C; Rend.: 74%;

IV (KBr), principais sinais: 3124.68 (NH), 2964.59 (NH), 1739.79 (C=O) cm^{-1} .

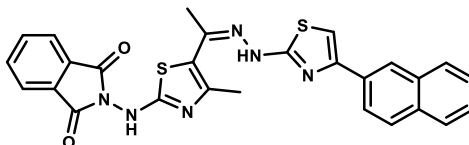
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.28 (s, 3H, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 3H, CH_3), 6.95–6.97 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.06 (s, 1H, thiazol), 7.75–7.77 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.93–7.99 (m, 4H, Ar), 10.31 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.32 (CH_3), 16.90 (CH_3), 55.13 (CH_3), 101.59 (C-H, thiazol), 114.00 (C-H, Ar), 123.70 (C-H, Ar), 126.84 (C, Ar), 127.14 (C, Ar), 129.59 (C-H, Ar), 135.13 (C-H, Ar), 142.95 (C=N), 165.16 (C=O), 166.25 (S-C=N, thiazol), 169.27 (S-C=N, thiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2$ Exact Mass: 504.1038 g/mol

MS (ESI), m/z : 505,1603 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((4-metil-5-(1-(2-(4-(naftalen-2-il)thiazol-2-il)hidrazono)etil)thiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a6)



Características Físico-Químicas: Cristais marrons claros; PF: 254-256 °C;
Rend.: 84%;

IV (KBr), principais sinais: 3147.83 (NH), 2962.66 (NH), 1739.79 (C=O) cm^{-1} .

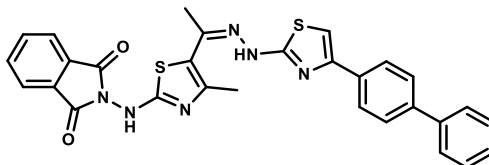
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 7.31 (s, 1H, thiazol), 7.36–7.49 (m, 3H, Ar), 7.69–7.72 (m, 3H, Ar), 7.91–7.97 (m, 5H, Ar), 8.18 (s, 1H, NH), 10.33 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.30 (CH_3), 16.83 (CH_3), 104.09 (C-H, thiazol), 123.68 (C-H, Ar), 123.72 (C-H, Ar), 126.06 (C-H, Ar), 126.45 (C-H, Ar), 126.83 (C-H, Ar), 127.49 (C-H, Ar), 128.95 (C-H, Ar), 129.62 (C, Ar), 133.39 (C, Ar), 135.21 (C-H, Ar), 135.55 (C, Ar), 139.09 (C4, thiazol), 139.57 (C4, thiazol), 142.88 (C=N), 165.04 (C=O), 169.36 (S-C=N, thiazol), 178.28 (S-C=N, thiazol).

Massa: $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 524.1089 g/mol

MS (ESI), m/z: 525.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6a7)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 264-265 °C;
Rend.: 69%;

IV (KBr), principais sinais: 3142.04 (NH), 2970.38 (NH), 1732.08 (C=O) cm⁻¹.

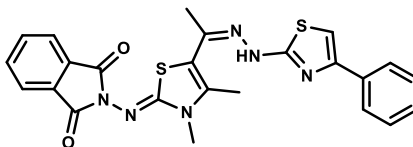
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 7.32 (s, 1H, tiazol), 7.34–7.38 (t, *J* = 8 Hz, 1H, Ar), 7.45–7.49 (t, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.62–7.76 (m, 4H, Ar), 7.87–8.02 (m, 6H, Ar).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 15.13 (CH₃), 16.33 (CH₃), 104.33 (C-H, tiazol), 120.32 (C5, tiazol), 123.72 (C-H, Ar), 126.08 (C-H, Ar), 126.42 (C-H, Ar), 126.73 (C-H, Ar), 127.40 (C, Ar), 127.88 (C, Ar), 128.87 (C, Ar), 128.91 (C-H, Ar), 129.57 (C-H, Ar), 133.35 (C, Ar), 135.23 (C-H, Ar), 139.05 (C4, tiazol), 139.60 (C4, tiazol), 142.95 (C=N), 165.06 (C=O), 166.38 (S-C=N, tiazol), 169.39 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₉H₂₂N₆O₂S₂ Exact Mass: 550.1246 g/mol

MS (ESI), m/z: 551.2 [M+H]⁺

2-((3,4-dimethyl-5-(1-(2-(4-feniltiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b1)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos alaranjados; PF: 237-238 °C; Rend.: 84%;

IV (KBr), principais sinais: 1712.79 (C=O) cm^{-1} .

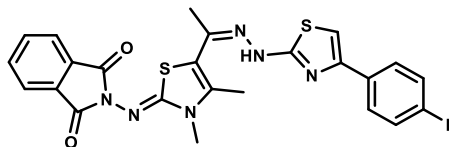
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.31 (s, 3H, CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 7.31 (s, 1H, tiazol), 7.36–7.50 (m, 2H, Ar), 7.68–7.72 (m, 3H, Ar), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar), 10.29 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.48 (CH_3), 16.61 (CH_3), 31.59 (CH_3), 104.74 (C-H, tiazol), 111.29 (C5, tiazol), 113.92 (C-H, Ar), 123.08 (C-H, Ar), 126.75 (C-H, Ar), 126.95 (C, Ar), 128.75 (C, Ar), 130.15 (C, Ar), 134.60 (C-H, Ar), 136.09 (C4, tiazol), 142.18 (C=N), 158.79 (C4, tiazol), 164.49 (C=O), 169.05 (S-C=N, tiazol), 170.12 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 488.1089 g/mol

MS (ESI), m/z: 489.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b2)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 248-249 °C;
Rend.: 87%;

IV (KBr), principais sinais: 1712.79 (C=O) cm^{-1} .

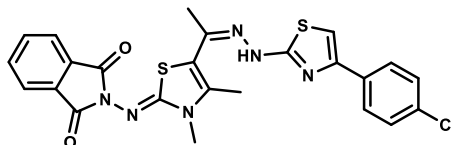
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.26 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 7.15 (s, 1H, tiazol), 7.18–7.23 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.81–7.91 (m, 6H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.45 (CH_3), 16.61 (CH_3), 31.58 (CH_3), 103.60 (C-H, tiazol), 111.35 (C5, tiazol), 115.24 (C, Ar), 115.45 (C-H, Ar), 123.15 (C-H, Ar), 127.41 (C-F, Ar), 130.18 (C-H, Ar), 134.68 (C-H, Ar), 136.21 (C4, tiazol), 142.14 (C=N), 160.35 (C, Ar), 164.54 (C=O), 169.18 (S-C=N, tiazol), 170.12 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 506.0995 g/mol

MS (ESI), m/z: 507.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(4-clorofenil)thiazol-2-il)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b3)



Características Físico-Químicas: Cristais bege escuros; PF: 270-272 °C;
Rend.: 99%;

IV (KBr), principais sinais: 1710.86 (C=O) cm^{-1} .

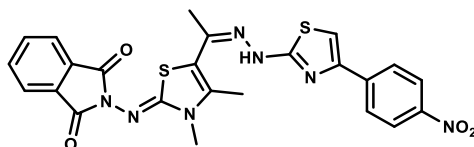
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 5.49 (sl, 1H, NH), 7.24 (s, 1H, thiazol), 7.42–7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar), 7.81–7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar), 7.86–7.91 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.48 (CH_3), 16.61 (CH_3), 31.59 (CH_3), 104.74 (C-H, thiazol), 111.29 (C5, thiazol), 123.09 (C-H, Ar), 127.13 (C-Cl, Ar), 128.55 (C-H, Ar), 130.18 (C-H, Ar), 131.92 (C, Ar), 134.61 (C-H, Ar), 136.25 (C4, thiazol), 142.10 (C=N), 148.68 (C4, thiazol), 164.48 (C=O), 169.25 (S-C=N, thiazol), 170.08 (S-C=N, thiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 522,0699

MS (ESI), m/z: 523.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 521.5 $[\text{M}-\text{H}]^+$

2-((3,4-dimetil-5-(-1-(2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b4)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo escuros; PF: 266-267 °C; Rend.: 98%;

IV (KBr), principais sinais: 1712.79 (C=O) cm^{-1} .

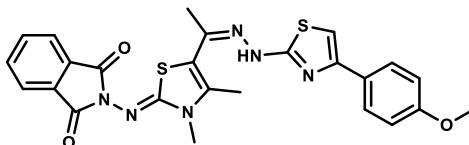
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.26 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 6.88 (sl, 1H, NH), 7.58 (s, 1H, tiazol), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar), 8.05–8.07 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 8.24–8.26 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.51 (CH_3), 16.64 (CH_3), 31.59 (CH_3), 108.99 (C-H, tiazol), 111.02 (C5, tiazol), 123.10 (C, Ar), 123.79 (C-H, Ar), 124.06 (C-H, Ar), 126.23 (C-H, Ar), 130.16 (C, Ar), 134.62 (C-H, Ar), 136.40 (C, Ar), 140.57 (C4, tiazol), 142.28 (C4, tiazol), 146.13 (C=N), 164.48 (C=O), 169.53 (S-C=N, tiazol), 170.03 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2$ Exact Mass: 533.0940 g/mol

MS (ESI), m/z : 534.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(4-metoxifenil)thiazol-2-il)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b5)



Características Físico-Químicas: Cristais laranja claros; PF: 233-235 °C;
Rend.: 79%;

IV (KBr), principais sinais: 1708.93 (C=O) cm^{-1} .

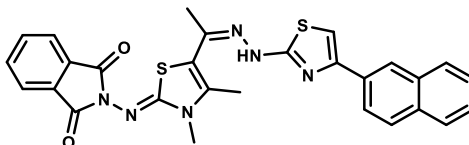
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.26 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, CH_3), 5.88 (sl, 1H, NH), 6.93–6.95 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 6.98 (s, 1H, thiazol), 7.71–7.73 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.86–7.90 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.42 (CH_3), 16.53 (CH_3), 31.51 (CH_3), 55.08 (CH_3), 101.53 (C-H, thiazol), 111.33 (C5, thiazol), 113.92 (C-H, Ar), 123.08 (C-H, Ar), 126.75 (C-H, Ar), 126.95 (C, Ar), 128.75 (C, Ar), 130.15 (C, Ar), 134.60 (C-H, Ar), 136.09 (C4, thiazol) 142.18 (C=N), 158.79 (C, Ar), 164.49 (C=O), 169.05 (S-C=N, thiazol), 170.12 (S-C=N, thiazol).

Massa: $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2$ Exact Mass: 518.1195 g/mol

MS (ESI), m/z : 519.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((3,4-dimetil-5-(1-(2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b6)



Características Físico-Químicas: Cristais cinzas; PF: 257-258 °C; Rend.: 96%;

IV (KBr), principais sinais: 3018.60 (NH), 1705.07 (C=O) cm^{-1} .

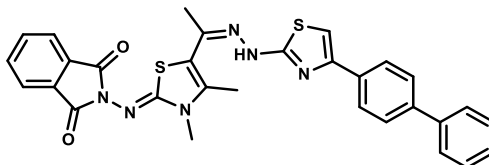
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.27 (s, 3H, CH_3), 2.45 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 7.33 (s, 1H, tiazol), 7.45–7.52 (m, 2H, Ar), 7.86–7.95 (m, 9H, Ar), 8.34 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.43 (CH_3), 16.56 (CH_3), 31.52 (CH_3), 104.58 (C-H, tiazol), 111.33 (C5, tiazol), 123.09 (C-H, Ar), 123.95 (C-H, Ar), 125.97 (C, Ar), 126.40 (C-H, Ar), 127.57 (C-H, Ar), 128.05 (C-H, Ar), 130.19 (C-H, Ar), 132.35 (C-H, Ar), 133.15 (C, Ar), 134.61 (C-H, Ar), 136.25 (C4, tiazol), 142.17 (C=N), 164.52 (C=O), 169.22 (S-C=N, tiazol), 170.16 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 538.1246 g/mol

MS (ESI), m/z: 539.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-(2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-il)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6b7)



Características Fisico-Químicas: Cristais marrom claros; PF: 243-245 °C;
Rend.: 94%;

IV (KBr), principais sinais: 1710.86 (C=O) cm^{-1} .

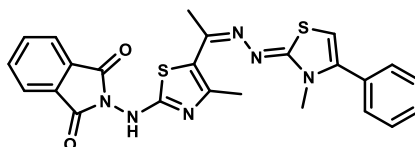
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.31 (s, 3H, CH_3), 2.45 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 3H, CH_3), 6.21 (sl, 1H, NH), 7.23 (s, 1H, tiazol), 7.34–7.38 (t, $J = 8$ Hz, 1H, Ar), 7.44–7.48 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.68–7.70 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.83–7.94 (m, 8H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.45 (CH_3), 16.60 (CH_3), 31.56 (CH_3), 104.06 (C-H, tiazol), 111.32 (C5, tiazol), 123.15 (C-H, Ar), 126.01 (C-H, Ar), 126.39 (C-H, Ar), 126.70 (C-H, Ar), 126.92 (C, Ar), 127.38 (C, Ar), 128.94 (C-H, Ar), 129.02 (C, Ar), 130.19 (C-H, Ar), 134.64 (C-H, Ar), 136.14 (C, Ar), 139.04 (C4, tiazol), 139.64 (C4, tiazol), 142.08 (C=N), 164.51 (C=O), 169.21 (S-C=N, tiazol), 170.13 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 564.1402 g/mol

MS (ESI), m/z: 565.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((4-metil-5-(1-((3-metil-4-feniltiazol-2(3*H*)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c1)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo claros; PF: 252-253 °C;
Rend.: 99%;

IV (KBr), principais sinais: 3223.05 (NH), 1695.43 (C=O) cm⁻¹.

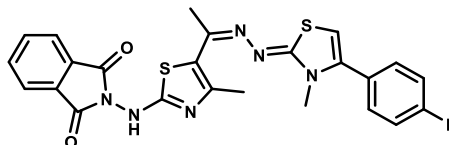
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 3.33 (s, 3H, CH₃), 6.45 (s, 1H, tiazol), 7.49 (m, 5H, Ar), 7.93–8.01 (m, 4H, Ar), 8.25 (sl, 1H, Ar).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 15.79 (CH₃), 16.62 (CH₃), 33.78 (CH₃), 103.43 (C-H, tiazol), 123.67 (C-H, Ar), 123.94 (C-H, Ar), 129.66 (C-H, Ar), 135.18 (C-H, Ar), 136.65 (C, Ar), 138.97 (C4, tiazol), 147.45 (C4, tiazol), 150.26 (C=N), 165.05 (C=O), 166.91 (S-C=N, tiazol), 167.84 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₄H₂₀N₆O₂S₂ Exact Mass: 488.1089 g/mol

MS (ESI), m/z: 489.1 [M+H]⁺; 487.4 [M-H]⁺

2-((5-(1-((4-(4-fluorofenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c2)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 253-255 °C;

Rend.: 92%;

IV (KBr), principais sinais: 1745.58 (C=O) cm^{-1} .

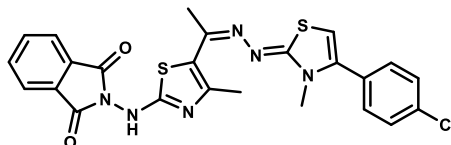
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 3.32 (s, 3H, CH_3), 6.46 (s, 1H, tiazol), 7.32–7.36 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.54–7.58 (m, 2H, Ar), 7.93–8.00 (m, 4H, Ar), 9.83 (sl, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 15.97 (CH_3), 16.40 (CH_3), 33.71 (CH_3), 101.14 (C-H, tiazol), 115.72 (C_5 , tiazol), 115.94 (C-H, Ar), 123.74 (C-H, Ar), 126.70 (C, Ar), 129.71 (C-H, Ar), 131.14 (C-F, Ar), 135.22 (C-H, Ar), 139.79 (C_4 , tiazol), 150.04 (C=N), 161.31 (C, Ar), 164.98 (C=O), 167.06 (S-C=N, tiazol), 168.28 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 506.0995 g/mol

MS (ESI), m/z : 507.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-((4-(4-clorofenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c3)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 257-258 °C; Rend.: 99%;

IV (KBr), principais sinais: 1745.58 (C=O) cm^{-1} .

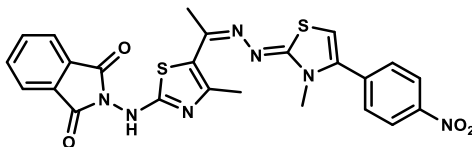
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3), 3.31 (s, 3H, CH_3), 6.46 (s, 1H, tiazol), 7.51–7.53 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.75–7.57 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.77 (sl, 1H, NH), 7.93–7.99 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 15.81 (CH_3), 16.59 (CH_3), 33.69 (CH_3), 101.24 (C-H, tiazol), 121.07 (C5, tiazol), 123.71 (C-H, Ar), 128.81 (C-Cl, Ar), 129.17 (C, Ar), 129.61 (C-H, Ar), 130.56 (C-H, Ar), 134.02 (C4, tiazol), 135.20 (C-H, Ar), 139.55 (C=N), 150.00 (C, Ar), 165.02 (C=O), 166.95 (S-C=N, tiazol), 168.16 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 522.0699 g/mol

MS (ESI), m/z: 523.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 522.2 $[\text{M}]$

2-((4-metil-5-(1-((3-metil-4-(4-nitrofenil)thiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)thiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c4)



Características Físico-Químicas: Cristais laranjas; PF: 265-267 °C; Rend.: 99%;

IV (KBr), principais sinais: 1747.51 (C=O) cm^{-1} .

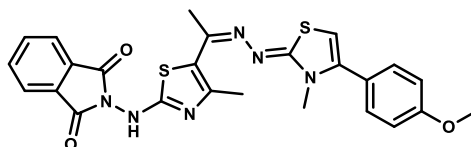
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 3.35 (s, 3H, CH_3), 6.64 (s, 1H, thiazol), 7.79–7.81 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.93–7.99 (m, 4H, Ar), 8.30–8.32 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 15.79 (CH_3), 16.62 (CH_3), 33.78 (CH_3), 103.43 (C-H, thiazol), 123.67 (C-H, Ar), 123.94 (C-H, Ar), 129.66 (C-H, Ar), 135.18 (C-H, Ar), 136.65 (C, Ar), 138.97 (C4, thiazol), 147.45 (C4, thiazol), 150.26 (C=N), 165.05 (C=O), 166.91 (S-C=N, thiazol), 167.84 (S-C=N, thiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2$ Exact Mass: 533.0940 g/mol

MS (ESI), m/z : 534.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-((4-(4-metoxifenil)-3-metiltiazol-2(3*H*)-ilideno)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c5)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 209-211 °C; Rend.: 99%;

IV (KBr), principais sinais: 3207.62 (NH), 1724.36 (C=O) cm⁻¹.

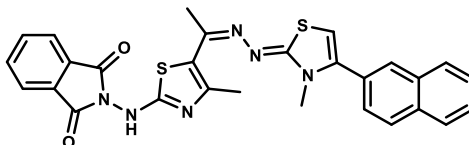
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 3.33 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, CH₃), 6.39 (s, 1H, tiazol), 7.03–7.05 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.41–7.43 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.97–7.95 (m, 4H, Ar).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 15.95 (CH₃), 16.54 (CH₃), 33.72 (CH₃), 55.27 (CH₃), 100.16 (C-H, tiazol), 114.18 (C-H, Ar), 114.28 (C5, tiazol), 122.31 (C, Ar), 123.65 (C-H, Ar), 129.63 (C-H, Ar), 130.23 (C-H, Ar), 131.45 (C, Ar), 135.14 (C, Ar), 140.71 (C=N), 149.98 (C4, tiazol), 159.92 (C4, tiazol), 164.94 (C=O), 166.98 (S-C=N, tiazol), 168.25 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₅H₂₂N₆O₃S₂ Exact Mass: 518.1195 g/mol

MS (ESI), m/z: 519.2 [M+H]⁺

2-((4-metil-5-(1-((3-metil-4-(naftalen-2-il)tiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c6)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo claros; PF: 250-252 °C;
Rend.: 97%;

IV (KBr), principais sinais: 3066.82 (NH), 1697.36 (C=O) cm^{-1} .

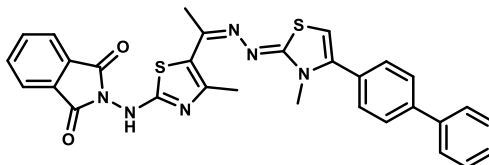
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.36 (s, 3H, CH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3), 3.39 (s, 3H, CH_3), 6.53 (s, 1H, tiazol), 7.58–7.62 (m, 2H, Ar), 7.93–8.04 (m, 8H, Ar), 8.08 (s, 1H, Ar), 8.73 (sl, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 15.94 (CH_3), 16.56 (CH_3), 33.85 (CH_3), 101.12 (C-H, tiazol), 123.59 (C-H, Ar), 125.85 (C-H, Ar), 126.72 (C, Ar), 126.98 (C, Ar), 127.57 (C-H, Ar), 127.66 (C, Ar), 127.97 (C-H, Ar), 128.10 (C-H, Ar), 128.19 (C-H, Ar), 129.59 (C-H, Ar), 132.65 (C-H, Ar), 132.80 (C-H, Ar), 135.22 (C4, tiazol), 140.69 (C4, tiazol), 150.01 (C=N), 165.02 (C=O), 166.95 (S-C=N, tiazol), 168.25 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 538.1246 g/mol

MS (ESI), m/z: 539.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-((4-(bifenil-4-il)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (6c7)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 262-264 °C; Rend.: 95%;

IV (KBr), principais sinais: 1747.51 (C=O) cm^{-1} .

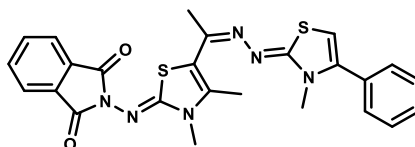
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 3.37 (s, 3H, CH_3), 6.24 (sl, 1H, NH), 6.43 (s, 1H, tiazol), 7.38–7.42 (t, $J = 8$ Hz, 1H, Ar), 7.48–7.52 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.58–7.60 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.72–7.74 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.78–7.80 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.93–7.99 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 15.88 (CH_3), 16.78 (CH_3), 33.60 (CH_3), 100.32 (C-H, tiazol), 123.64 (C-H, Ar), 126.72 (C-H, Ar), 126.97 (C-H, Ar), 127.85 (C, Ar), 129.03 (C-H, Ar), 129.03 (C-H, Ar), 129.41 (C, Ar), 129.65 (C-H, Ar), 135.16 (C-H, Ar), 139.22 (C, Ar), 140.34 (C_4 , tiazol), 140.77 (C_4 , tiazol), 149.86 (C=N), 165.07 (C=O), 168.06 (S-C=N, tiazol), 169.44 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 564.1402 g/mol

MS (ESI), m/z: 565.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((3,4-dimetil-5-(1-((3-metil-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d1)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo escuros; PF: 250-251 °C; Rend.: 72%;

IV (KBr), principais sinais: 1708.93 (C=O) cm^{-1} .

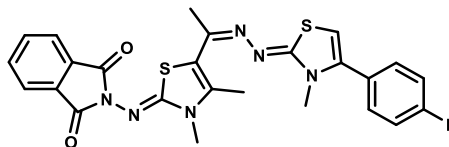
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.38 (s, 3H, CH_3), 2.48 (s, 3H, CH_3), 3.29 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 3H, CH_3), 6.32 (s, 1H, tiazol), 7.44–7.49 (m, 5H, Ar), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 33.54 (CH_3), 98.20 (C-H, tiazol), 123.19 (C-H, Ar), 128.87 (C-H, Ar), 129.00 (C-H, Ar), 129.55 (C-H, Ar), 130.13 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 134.65 (C-H, Ar), 140.98 (C, tiazol), 164.58 (S-C=N, tiazol), 172.30 (C=O).

Massa: $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 502.1246 g/mol

MS (ESI), m/z: 503.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-((4-(4-fluorofenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d2)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 241-242 °C; Rend.: 97%;

IV (KBr), principais sinais: 1708.93 (C=O) cm^{-1} .

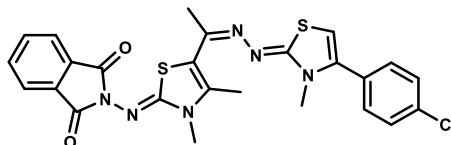
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.38 (s, 3H, CH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.28 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 3H, CH_3), 6.35 (s, 1H, tiazol), 7.29–7.33 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.50–7.53 (m, 2H, Ar), 7.83–7.90 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.50 (CH_3), 16.12 (CH_3), 31.39 (CH_3), 33.26 (CH_3), 99.99 (C-H, tiazol), 112.95 (C5, tiazol), 115.63 (C, Ar), 115.86 (C-H, Ar), 123.09 (C-H, Ar), 130.21 (C-H, Ar), 130.94 (C-F, Ar), 134.22 (C-H, Ar), 139.35 (C4, tiazol), 148.69 (C=N), 161.13 (C, Ar), 164.57 (C=O), 167.97 (S-C=N, tiazol), 170.54 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 520.1151 g/mol

MS (ESI), m/z : 521.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((5-(1-((4-(4-clorofenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d3)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 225-226 °C; Rend.: 98%;

IV (KBr), principais sinais: 1720.50 (C=O) cm^{-1} .

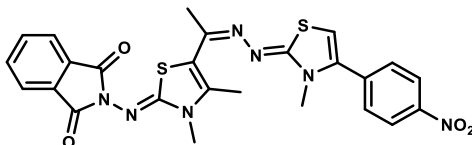
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.37 (s, 3H, CH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.27 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 6.33 (s, 1H, tiazol), 7.48–7.50 (d, $J = 8$ Hz, 4H, Ar), 7.53–7.55 (d, $J = 8$ Hz, 4H, Ar), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.56 (CH_3), 16.21 (CH_3), 31.38 (CH_3), 33.50 (CH_3), 101.02 (C-H, tiazol), 112.89 (C5, tiazol), 123.07 (C-H, Ar), 128.78 (C-Cl, Ar), 129.14 (C, Ar), 130.16 (C-H, Ar), 130.42 (C-H, Ar), 134.49 (C4, tiazol), 134.60 (C-H, Ar), 139.37 (C=N), 149.14 (C, Ar), 164.56 (C=O), 168.02 (S-C=N, tiazol), 170.49 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 536.0856 g/mol

MS (ESI), m/z: 537.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((3,4-dimethyl-5-(1-((3-metil-4-(4-nitrofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d4)



Características Físico-Químicas: Cristais laranjas; PF: 280-282 °C; Rend.: 96%;

IV (KBr), principais sinais: 1720.50 (C=O) 1514.12 (NO₂) 1342.46 (NO₂) cm⁻¹.

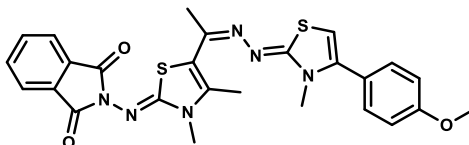
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃), 3.31 (s, 3H, CH₃), 3.49 (s, 3H, CH₃), 6.52 (s, 1H, tiazol), 7.75–7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar), 8.28–8.30 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 13.54 (CH₃), 16.17 (CH₃), 31.39 (CH₃), 33.69 (CH₃), 103.07 (C-H, tiazol), 112.88 (C5, tiazol), 123.14 (C-H, Ar), 123.89 (C-H, Ar), 129.62 (C-H, Ar), 130.18 (C, Ar), 134.61 (C-H, Ar), 136.02 (C, Ar), 136.56 (C, Ar), 138.65 (C=N), 147.38 (C4, tiazol), 149.23 (C4, tiazol), 164.56 (C=O), 167.96 (S-C=N, tiazol), 170.50 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₅H₂₁N₇O₄S₂ Exact Mass: 547.1096 g/mol

MS (ESI), m/z: 548.1 [M+H]⁺

2-((5-(1-((4-(4-metoxifenil)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d5)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo claros; PF: 222-224 °C;
Rend.: 83%;

IV (KBr), principais sinais: 1714.72 (C=O) cm^{-1} .

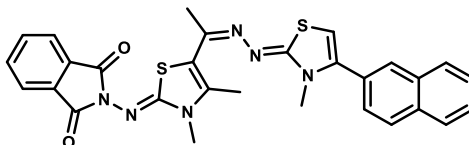
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.37 (s, 3H, CH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.27 (s, 3H, CH_3), 3.49 (s, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, CH_3), 6.21 (s, 1H, tiazol), 7.01–7.03 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.37–7.39 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar), 7.87–7.88 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.55 (CH_3), 16.25 (CH_3), 31.43 (CH_3), 33.48 (CH_3), 55.64 (CH_3), 99.46 (C-H, tiazol), 112.90 (C5, tiazol), 114.24 (C-H, Ar), 122.56 (C, Ar), 123.13 (C-H, Ar), 130.18 (C-H, Ar), 131.55 (C, Ar), 134.67 (C-H, Ar), 136.10 (C, Ar), 140.47 (C=N), 148.97 (C4, tiazol), 159.88 (C4, tiazol), 164.56 (C=O), 168.07 (S-C=N, tiazol), 170.47 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2$ Exact Mass: 532.1351 g/mol

MS (ESI), m/z: 533.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-((3,4-dimethyl-5-(1-((3-metil-4-(naftalen-2-il)tiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d6)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo escuros; PF: 258-260 °C; Rend.: 97%;

IV (KBr), principais sinais: 1720.50 (C=O) cm^{-1} .

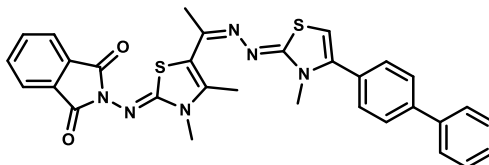
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.49 (s, 3H, CH₃), 3.34 (s, 3H, CH₃), 3.51 (s, 3H, CH₃), 6.37 (s, 1H, tiazol), 7.52–7.60 (m, 3H, Ar), 7.86–7.92 (m, 4H, Ar), 7.98–8.07 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.48 (CH₃), 16.11 (CH₃), 31.35 (CH₃), 33.50 (CH₃), 100.34 (C-H, tiazol), 112.98 (C5, tiazol), 123.05 (C-H, Ar), 125.83 (C-H, Ar), 126.73 (C-H, Ar), 126.94 (C-H, Ar), 127.58 (C-H, Ar), 127.83 (C, Ar), 127.85 (C-H, Ar), 128.10 (C-H, Ar), 128.18 (C-H, Ar), 130.17 (C, Ar), 132.61 (C, Ar), 132.72 (C, Ar), 134.57 (C-H, Ar), 135.76 (C4, tiazol), 140.42 (C4, tiazol), 148.74 (C=N), 164.54 (C=O), 168.04 (S-C=N, tiazol), 170.48 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₉H₂₄N₆O₂S₂ Exact Mass: 552.1402 g/mol

MS (ESI), m/z: 553.2 [M+H]⁺

2-((5-(1-((4-(bifenil-4-il)-3-metiltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)-3,4-dimetiltiazol-2(3H)-ylideno)amino)isoindolino-1,3-diona (6d7)



Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 249-251 °C; Rend.: 96%;

IV (KBr), principais sinais: 1707.00 (C=O) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 3.33 (s, 3H, CH₃), 3.49 (s, 3H, CH₃), 6.32 (s, 1H, tiazol), 7.37–7.41 (t, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.47–7.51 (t, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.54–7.56 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.70–7.72 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.75–7.77 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.84–7.95 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 13.48 (CH₃), 16.12 (CH₃), 31.36 (CH₃), 33.51 (CH₃), 100.18 (C-H, tiazol), 112.98 (C5, tiazol), 123.05 (C-H, Ar), 126.66 (C-H, Ar), 126.91 (C-H, Ar), 127.82 (C, Ar), 128.98 (C-H, Ar), 129.08 (C-H, Ar), 129.37 (C, Ar), 130.16 (C-H, Ar), 134.58 (C-H, Ar), 135.85 (C, Ar), 139.18 (C, Ar), 140.16 (C4, tiazol), 140.75 (C4, tiazol), 148.78 (C=N), 164.53 (C=O), 168.09 (S-C=N, tiazol), 170.48 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₃₁H₂₆N₆O₂S₂ Exact Mass: 578.1559 g/mol

MS (ESI), m/z: 579.2 [M+H]⁺

6.4 RESULTADOS BIOLÓGICOS

A seguir são apresentados e discutidos os resultados das avaliações farmacológicas desenvolvidas com os compostos aqui obtidos.

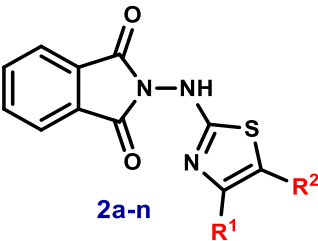
6.4.1 Atividade Anti-*T. cruzi*

O perfil anti-*T. cruzi* está exposto a seguir.

6.4.1.1 Série **2a-n**

Os compostos **2a-n** foram testados com base nas propriedades anti-*T. cruzi* descritas para os tiazóis^{44,82}. Os resultados são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Citotoxicidade e atividade tripanocida da série **2a-n** contra epimastigotas e tripomastigotas.

Código	R ¹	R ²	Citotoxicidade μM ^a	IC ₅₀ Epimastigotas (<i>T. cruzi</i>) - μM ^b	IC ₅₀ Tripomastigotas (<i>T. cruzi</i>) - μM ^c
1a	-	-	4.5	56.8	52.0
					
2a	Cl-Me	H	17.0	225.7	54.4
2b	Ph	H	3.1	70.2	107.5
2c	4-Me-Ph	H	14.9	70.4	107.0
2d	4-Me-O-Ph	H	14.2	6.4	50.3
2e	4-F-Ph	H	2.9	26.5	52.1
2f	4-Cl-Ph	H	2.8	30.6	86.2
2g	4-Br-Ph	H	2.5	14.8	89.8
2h	4-NO ₂ -Ph	H	2.7	13.3	84.9
2i	4-Ph-Ph	H	251.6	4.0	27.5
2j	2-Naph	H	269.2	8.0	4.7
2k	3-NO ₂ -Ph	H	2.7	43.2	91.1
2l	3,4-diCl-Ph	H	2.6	69.3	88.8
2m	2,4-diCl-Ph	H	12.8	10.1	22.7
2n	4-Br-Ph	Me	2.4	13.9	38.2
BDZ			96.1	48.8	6.3

^a Concentração não-tóxica mais elevada em células do baço de camundongos BALB/c.

^b Determinada 24 h após a incubação de tripomastigotas da cepa Y com os compostos.

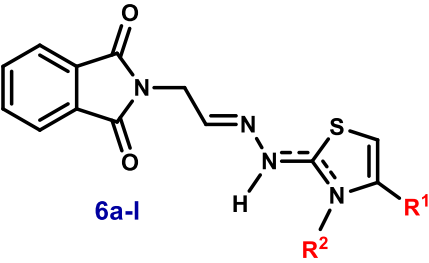
^c Determinada 11 dias após incubação de epimastigotas com os compostos. ^{a,b} Apenas valores com um desvio padrão <10% foram incluídos. ^{a,b} IC₅₀ foi calculado a partir de pelo menos cinco concentrações, em triplicata (SD < 10%). Bdz = Benznidazol.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste ensaio os compostos foram avaliados quanto a citotoxicidade frente a esplenócitos de camundongo e os compostos **2i** e **2j** foram menos tóxicos que o BDZ. Estes também se mostraram mais ativos frente a forma epimastigota e no caso do composto **2j**, foi o mais ativo para a forma tripomastigota.

Com base nos resultados obtidos com a série **2a-n** foram desenvolvidas modificações estruturais e através de um planejamento racional foi obtida a série **6a-l**, com aprimoramento da atividade anti-*T. cruzi*⁷⁹ (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Citotoxicidade e atividade tripanocida contra epimastigotas e tripomastigotas da série **6a-l**.

Código	R ¹	R ²	Citotoxicidade μM ^a	IC ₅₀ Epimastigotas (<i>T. cruzi</i>) - μM ^b	IC ₅₀ Tripomastigotas (<i>T. cruzi</i>) - μM ^c
					
6a	Cl-Me	-	73.7	85.7	2.2
6b	Ph	Ph	228.1	ND	8.8
6c	4-Me-Ph	Ph	221.2	57.8	33.3
6d	4-Me-O-Ph	Ph	213.4	ND	10.0
6e	4-F-Ph	Ph	219.1	ND	73.8
6f	4-Cl-Ph	Ph	211.4	10.6	18.4
6g	4-Br-Ph	Ph	96.6	ND	9.7
6h	4-NO₂-Ph	Ph	206.8	12.2	3.2
6i	4-Ph-Ph	Ph	194.3	44.2	98.0
6j	2-Naph	Ph	204.9	11.9	0.5
6k	3-NO₂-Ph	Ph	103.4	6.0	0.9
6l	3,4-diCl-Ph	Ph	197.1	ND	ND
BDZ			96.1	48.8	6.3

^a Concentração não-tóxica mais elevada em células do baço de camundongos BALB/c.

^b Determinada 24 h após a incubação de tripomastigotas da cepa Y com os compostos.

^c Determinada 11 dias após incubação de epimastigotas com os compostos. ^{a,b} Apenas valores com um desvio padrão <10% foram incluídos. ^{a,b} IC₅₀ foi calculado a partir de pelo menos cinco concentrações, em triplicata (SD < 10%). Bdz = Benznidazol.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esta outra série que foi obtida revelou resultados promissores, os compostos **6a**, **6h**, **6j** e **6k**. Vale destacar o composto **6j** que apresentou um índice de seletividade para a forma tripomastigota de 409,8, sendo cerca de 27 vezes mais seletivo do que

o BDZ (IS: 15,25), o fármaco padrão em uso clínico. A série **6a-l** foi obtida por outro integrante do LpQM.

6.4.1.2 Análise ultraestrutural da tripomastigota de *T. cruzi*

Com o objetivo de investigar os efeitos dos ftalimido-1,3-tiazóis na morfologia do parasito, o composto **6k**, um dos compostos mais ativos das séries avaliadas (**2a-n** e **6a-l**), foi selecionado. Os efeitos ultraestruturais do **6k** em tripomastigotas após 24h foram analisados por MET e MEV, na concentração de IC₅₀ e duas vezes o valor de IC₅₀ (**Tabela 2**), e a análise ultraestrutural apresentou várias alterações morfológicas (**Figura 33**). A metodologia empregada nesta análise foi a mesma utilizada que foi utilizada para promastigotas de *L. infantum* descrita no item 5.7.3.5.

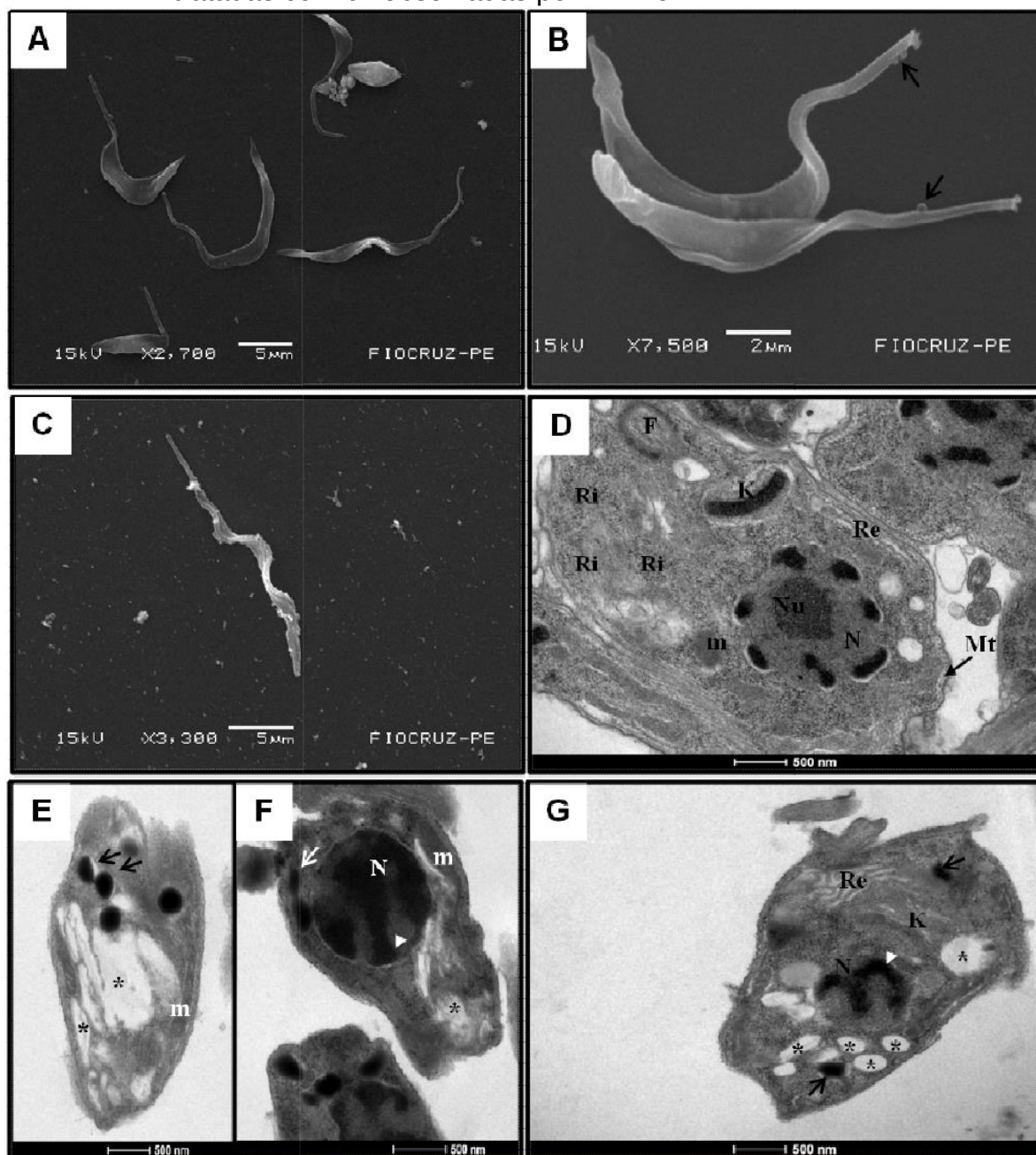
A análise MEV mostrou que o tratamento com 0,9 µM (1 x IC₅₀) e 1,8 µM (2 x IC₅₀) do composto **6k** causou bolhas e encurtamento do flagelo com uma diminuição drástica no número de parasitas, respectivamente (**Figura 33B-C**), enquanto o grupo controle manteve a sua morfologia típica (**Figura 33A**).

A análise MET revelou que os parasitos não tratados apresentaram morfologias ultraestruturais normais de organelas, tais como cinetoplasto, núcleo, nucléolos, flagelo, os ribossomos e membranas de microtúbulos (**Figura 33D**), ao passo que os parasitas tratados com 0,9 µM de **6k** mostraram alterações nos reservosomos, e um grande número de células mostrou intensa vacuolização citoplasmática. Além disso, alterações da morfologia do parasito, grandes aglomerados de cromatina nuclear que se assemelhavam aos núcleos de células apoptóticas, inchaço das mitocôndrias e perda de material citoplasmático foram observados (**Figura 33E-F**). Os parasitas tratados com 1,8µM de **6k** apresentaram alterações da morfologia do parasita, condensação da cromatina anormal, retículo endoplasmático dilatado, vacuolização intensa no citoplasma, inchaço do cinetoplasto e alterações nos reservosomos-like (**Figura 33G**).

A análise ultraestrutural foi aplicada para explorar os danos induzidos pelos compostos em parasitas tripomastigotas do *T. cruzi* e claramente mostrou alterações morfológicas graves, das quais intensa vacuolização citoplasmática, condensação da cromatina, alterações nos reservosomos-like e inchaço das mitocôndrias foram as mais freqüentes.

Estes resultados foram publicados no *European Journal of Medicinal Chemistry* (Apêndice D).

Figura 33 – Alterações ultraestruturais nas formas tripomastigotas do *T. cruzi* tratadas com 6k observadas por MEV e MET



Alterações ultraestruturais em formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com 6k como observado por MEV e MET. (A) MEV do controle de tripomastigotas não tratadas mostrando o corpo alongado típico. (B) MEV do parasita tratado com 0,9 μM de 6k mostrando bolhas no flagelo. (C) MEV do parasita tratado com 1,8 μM de 6k mostrando redução drástica no número de parasitas e encurtamento do flagelo. (D) MET de tripomastigotas não tratados mostrando a morfologia normal com cinetoplasto (K), núcleo (N), nucléolo (Nu), flagelo (F), ribossomos (Ri), mitocôndrias (m) e microtúbulos (Mt). (E e F) MET do parasita tratado com 0,9 μM de 6k mostrando alterações da morfologia do parasita, condensação anormal da cromatina (cabeça de seta) sem núcleo (N), inchaço da mitocôndria (m), alterações nos reservosomos (setas) e perda de material citoplasmático (asteriscos). (G) MET do parasito tratado com 1,8 μM de 6k mostrando alterações da morfologia do parasita, condensação anormal da cromatina (cabeça de seta), retículo endoplasmático dilatado (Re), vacuolização intensa no citoplasma (asterisco), inchaço do cinetoplasto (K) e alterações no reservosomo (setas).

Fonte: elaborado pelo autor

6.4.2 Atividade anti-*L. infantum*

O perfil anti-*L. infantum* está exposto a seguir.

6.4.2.1 Atividade em promastigotas de *L. infantum*

Neste estudo foram testados os compostos (**1a**) e os derivados da série **2a-n**⁷⁹.

Os resultados demonstraram que todos os derivados testados foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas de *L. infantum*, com um valor de IC₅₀/72h variando de 9,8 a 263,8 µM (**Tabela 3**). Os compostos que apresentaram maior inibição do crescimento foram **2j** (9,8 µM), **2m** (13,9 µM), **2n** (23,4 µM), **2i** (27,8 µM) e **2l** (28,8 µM). Oito compostos (**2b**, **2c**, **2d**, **2e**, **2f**, **2g**, **2h** e **2k**) apresentaram atividade intermediária, com valores de IC₅₀ variando entre 31,8 e 62,0 µM, enquanto os compostos **1a** (236,4 µM) e **2a** (263,8 µM) foram menos eficazes.

Tabela 3 – Atividade dos compostos sobre promastitas de *L. infantum*, células Vero e macrófagos J774

Compound	µM		IS _{vero}	µM	
	IC ₅₀	CC ₅₀ (Vero)		CC ₅₀ (J774)	IS _{J774}
1	236.4 ±9.6	883.8 ±86.3	3.7	393.3 ±7.3	1.7
2a	263.8 ±17.3	380,4 ±6.5	1.4	1582.9 ±36.8	6.0
2b	54.0 ±1.6	229.8 ±16.7	4.2	241.7 ±2.9	4.5
2c	42.0 ±0.3	159.4 ±1.9	3.7	277.1 ±5.3	6.5
2d	43.5 ±1.0	185.8 ±11.8	4.3	419.2 ±5.6	9.7
2e	57.1 ±4.9	244.1 ±9.1	4.3	206.5 ±9.6	3.6
2f	31.8 ±1.4	192.1 ±5.3	6.0	216.9 ±3.9	6.8
2g	62.0 ±1.5	161.6 ±16.3	2.6	201.9 ±3.1	3.3
2h	54.5 ±5.5	412.8 ±28.2	7.6	278.4 ±0.3	5.1
2i	27.8 ±1.6	48.8 ±0.4	1.8	112.9 ±2.8	4.1
2j	9.8 ±0.1	122.3 ±2.3	12.5	173.3 ±1.2	17.7
2k	57.2 ±2.2	181.8 ±9.1	3.2	323.7 ±13.0	5.7
2l	28.8 ±2.7	153.7 ±6.8	5.3	157.9 ±7.9	5.5
2m	13.9 ±0.8	88.9 ±12.9	6.4	176.1 ±15.8	12.7
2n	23.4 ±0.7	99.4 ±1.0	4.2	125.6 ±0.5	5.4
AmB	0.047 ±0.03	105.7 ±2.1	2270	37.6 ±1.4	808

IC₅₀: Concentração que inibe em 50% o crescimento de promastigotas de *L. infantum*

CC₅₀: Concentração capaz de causar efeito citotóxico em 50% das células de mamíferos

IS (Índice de Seletividade): CC₅₀ de células de mamíferos / IC₅₀ *L. infantum*

AmB: Anfotericina B

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da atividade dos compostos em promastigotas de *L. infantum* encontrou valores baixos de IC₅₀ apenas para **1a** e **2a**. A anfotericina B inibiu o crescimento de *L. infantum* em 100% nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 µM.

6.4.2.2 Ensaio de Citotoxicidade

Alguns compostos mostraram citotoxicidade nas concentrações testadas em células Vero e macrófagos J774. Os valores de CC_{50} para células Vero variaram de 48,8 a 883,8 μM e para macrófagos J774 de 113,0 a 1582 μM (**Tabela 3**). A análise do índice de seletividade ($SI = CC_{50}/IC_{50}$), que mede a extensão em que um composto é seletivamente tóxico ao parasita em comparação com células de mamíferos, mostrou que todos os compostos avaliados foram mais seletivos ao parasita que a células de mamíferos.

O composto que apresentou maior inibição do crescimento de promastigotas de *L. infantum* (**2j**) também apresentou o maior SI (12,5 para células Vero e 17,7 para macrófagos J774) (**Tabela 3**). Já o composto **2m** também foi eficaz na inibição do crescimento de promastigotas, com um SI de 6,4 para células Vero e 12,7 para macrófagos J774.

A análise da citotoxicidade dos macrófagos peritoneais tratados com os compostos **2j** e **2m** utilizando a técnica do MTT mostrou que concentrações citotóxicas para 50% dos macrófagos (CC_{50}) variaram de $362,7 \pm 18 \mu\text{M}$ para o composto **2j** e $263,6 \pm 19 \mu\text{M}$ para o composto **2m** (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Atividade anti- *L. infantum*, efeito citotóxico contra macrófagos peritoneais e índice de seletividade dos compostos **2j** e **2m**.

Compound	Macrophages	Intracellular amastigotes	
	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IS
2j	362.6 ± 18	15.2 ± 0.7	24
2m	263.6 ± 19	22.3 ± 0.3	12
AmB	74.7 ± 9.5	2.1 ± 0.1	36

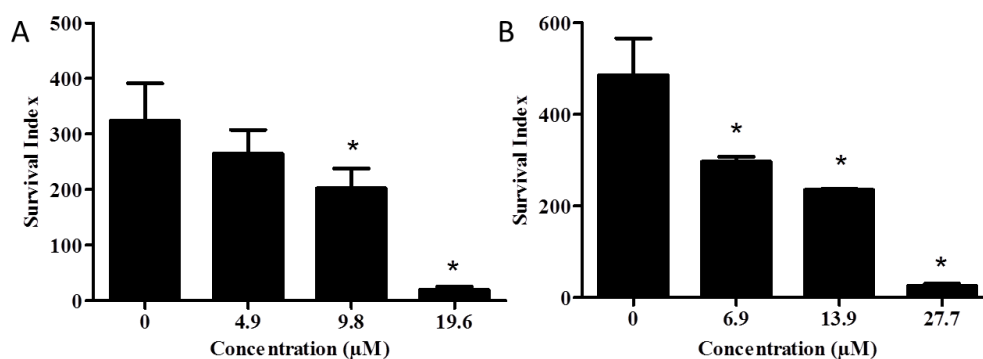
IS (Índice de Seletividade) = CC_{50}/IC_{50} . AmB= Anfotericina B

A anfotericina B mostrou ser mais tóxica para os macrófagos, com um valor CC_{50} de $74,9 \pm 9,5 \mu\text{M}$. A toxicidade dos compostos foi comparada com a atividade contra formas amastigotas para determinar o SI. Os resultados mostraram que o composto **2j** foi 24 vezes mais tóxico para amastigotas do que para células de mamíferos ($SI = 23,8$), enquanto o composto **2m** foi 12 vezes mais tóxico para amastigotas ($SI = 11,8$) (**Tabela 4**).

6.4.2.3 Ação dos compostos nas formas amastigotas intracelulares

Os dados demonstraram que os compostos inibiram significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência das formas amastigotas nos macrófagos peritoneais, com uma diminuição significativa para o composto **2j** nas concentrações de 9,8 e 19,6 μM (**Figura 34A**). Quanto ao composto **2m**, as três concentrações testadas (6,9, 13,9 e 27,7 μM) causaram uma diminuição significativa na sobrevivência de formas amastigotas (**Figura 34B**).

Figura 34 – Índice de sobrevivência de *L. infantum* em macrófagos infectados após 24 horas de tratamento com os compostos **2j** (A) e **2m** (B).

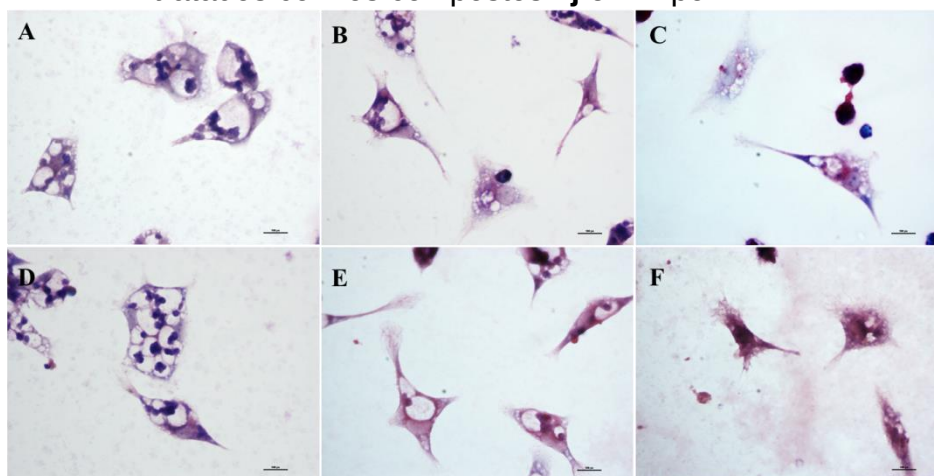


Os valores representam as médias de dois experimentos em duplicatas biológicas e quadruplicatas técnicas $\pm$ desvio padrão. * Correspondem a valores significativos $p < 0,05$.

A concentração necessária para reduzir a porcentagem de macrófagos infectados em 50% foi de 15,2 μM para **2j** e 22,3 μM para **2m** (**Tabela 4**).

A comparação dos grupos tratados e não tratados mostrou que o número médio de parasitas por macrófago diminuiu sob tratamento com ambos os compostos (**2j** e **2m**). Essa redução foi significativa na concentração de 19,6 μM para o composto **2j**. Já o composto **2m** foi capaz de reduzir significativamente o número médio de parasitas internalizados nas três concentrações testadas (6,9, 13,9 e 27,7 μM) (**Figura 35**).

Figura 35 – Macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de *L. infantum* e tratados com os compostos **2j** e **2m** por 24 h.



(A e D) Células não tratadas. (B) Células tratadas com 4,90 μM do composto **2j**. (C) Células tratadas com 19,62 μM do composto **2j**. (E) Células tratadas com 6,94 μM do composto **2m**. (F) Células tratadas com 27,74 μM do composto **2m**.

6.4.2.4 Análise da produção de óxido nítrico

Análises da produção de NO por macrófagos J774 mostraram que alguns compostos (**2d**, **2e**, **2f**, **2i**, **2k** e **2h**) foram capazes de aumentá-la pelos dois tipos de células e as diferenças do controle são consideradas significativas ($p < 0,05$).

A comparação dos macrófagos peritoneais nos grupos tratado e não tratado encontrou diferenças significativas no nível de NO nas duas maiores concentrações de **2j** testadas (270 e 135 μM) e nas três maiores concentrações de **2m** (260, 130 e 65 μM). O tratamento com Anfotericina B não induziu produção significativa de NO por macrófagos peritoneais.

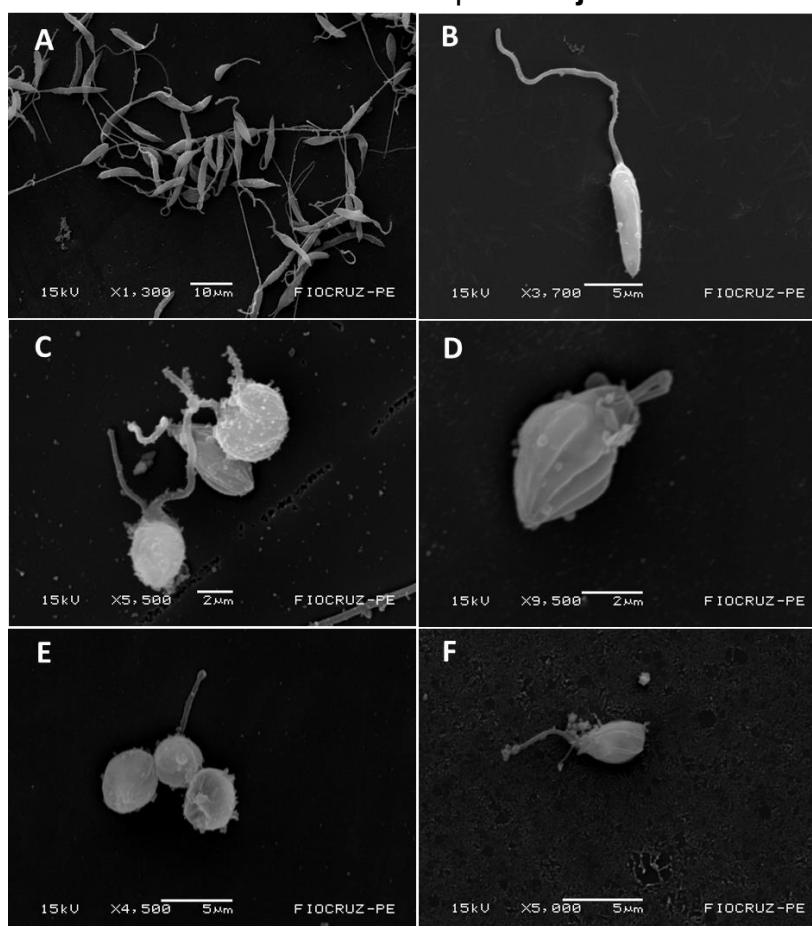
Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados por *L. infantum* entre o grupo não tratado e os grupos tratados com **2j**, **2m** e AmB, para todas as concentrações testadas.

6.4.2.5 Análise ultraestrutural da promastigota de *L. infantum*

Promastigotas de *L. infantum* tratadas e não tratadas com **2j** e **2m** foram analisadas sob microscopia eletrônica para identificação de alterações ultraestruturais.

A análise MEV mostrou promastigotas não tratadas exibindo uma morfologia de corpo fusiforme com superfície topologicamente normal e longo flagelo preservado (**Figura 36A-B**). Parasitas tratados com **2j** e **2m** nas duas concentrações testadas mostraram alterações nas células, como uma forma mais arredondada, inchaço e flagelos atrofiados (**Figura 36C-F**). Alterações na topologia, com a presença de ondulações na membrana celular, também foram encontradas (**Figura 36F**).

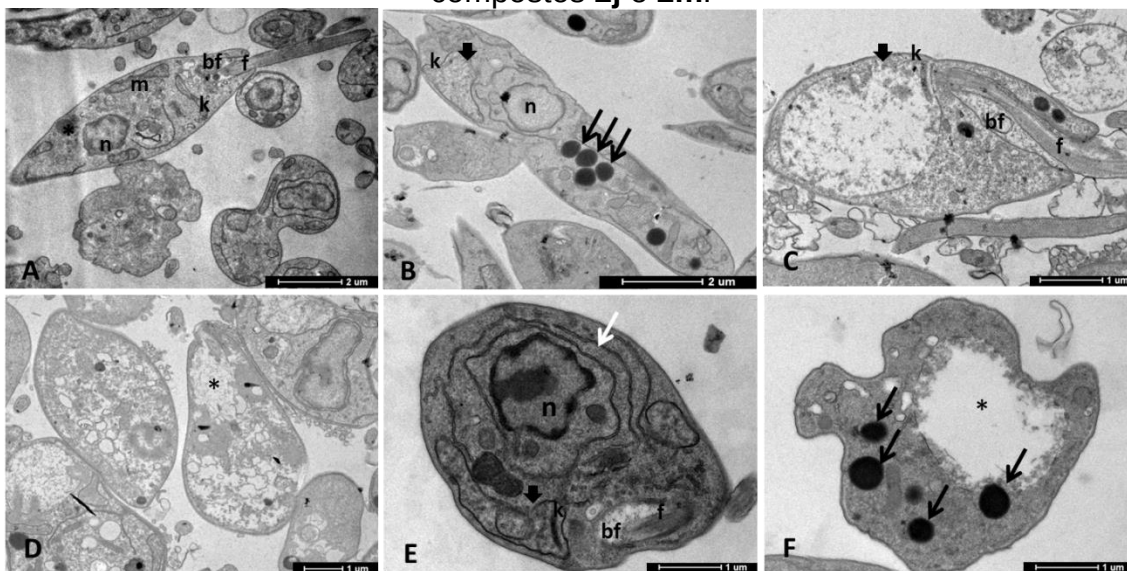
Figura 36 – Eletromicrografia de promastigotas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com os compostos **2j** e **2m**.



(A-B) Controle de promastigotas mostrando a forma fusiforme e o comprimento do flagelo normal. (B) Promastigotas tratados com 9,81 μM e (C) 19,62 μM de composto **2j** apresentando alterações de topologia celular. (D) Promastigotas tratados com 13,87 μM e (E) 27,74 μM do composto **2m** mostrando inchaço da célula.

O MET mostrou que, no grupo não tratado, a forma e a morfologia celular dos núcleos e organelas das promastigotas de *L. infantum* estavam bem preservadas (**Figura 37A**). Os grupos expostos aos compostos **2j** e **2m** exibiram alterações ultraestruturais não encontradas nas promastigotas não tratadas. O tratamento com o composto **2j** a uma concentração de 9,8 μM (IC_{50}) também conduziu a inchaço nas mitocôndrias e a presença de um grande número de inclusões elétron-densas no citoplasma (**Figura 37B**). Uma concentração de 19,6 μM ($2\times\text{IC}_{50}$) do composto **2j** causou uma extensa vacuolização do citoplasma e inchaço mitocondrial ocupando quase toda a célula (**Figura 37C-D**).

Figura 37 – Eletromicrografia de *L. infantum* tratadas e não tratadas com os compostos **2j** e **2m**.



(A) Promastigota não tratada, mostrando estrutura normal de organelas como núcleo (n), cinetoplasma (k) e bolsa flagelar (fp). (B) Promastigota tratada com 9,81 μM do composto **2j** é possível notar a presença de grânulos eletron-densados e inchaço mitocondrial. (C-D) Parasitas tratados com 19,81 μM do composto **2j**, em (C) parasitas mostrando intensa vacuolização do citoplasma (*) e (D) a seta aponta o intenso inchaço da mitocôndria (seta grande). (E) Promastigota tratada com 13,87 μM do composto de **2m** mostrando os perfis do retículo (seta) em torno do núcleo. Também é possível notar o inchaço das mitocôndrias (seta grande). (F) Promastigota tratada com 27,74 de composto de **2m**. Presença de um grande espaço eletronluscente (*) e presença de corpos eletron-densos (seta).

As promastigotas tratados com 13,9 μM (IC_{50}) do composto **2m** exibiram um retículo em torno dos núcleos e inchaço das mitocôndrias (**Figura 37E**). Em uma concentração de 27,8 μM ($2\times\text{IC}_{50}$) também houve morfologia celular irregular, grande

número de inclusões elétron-densas distribuídas no citoplasma e a presença de espaços eletrolúcidos (**Figura 37F**).

6.4.2.6 Efeito dos compostos na integridade da membrana plasmática

A coloração com iodeto de propídio (PI) foi utilizada para avaliar o efeito dos compostos **2j** e **2m** na integridade da membrana plasmática, sendo as células então analisadas por citometria de fluxo e microscopia confocal. Sob a citometria de fluxo, poucas células promastigotas não tratadas foram marcadas (0,6%), indicando a viabilidade da membrana plasmática intacta dessas células, enquanto 37,03% das células tratadas com metanol foram marcadas com PI. Nas células tratadas com os compostos **2j** e **2m**, houve um aumento na porcentagem de células marcadas com PI, que se mostrou dependente da dose, como pode ser visto na **Tabela 5**. Aproximadamente 60% das células tratadas com 19,6 μM do composto **2j** foram marcados com PI (**Tabela 5**).

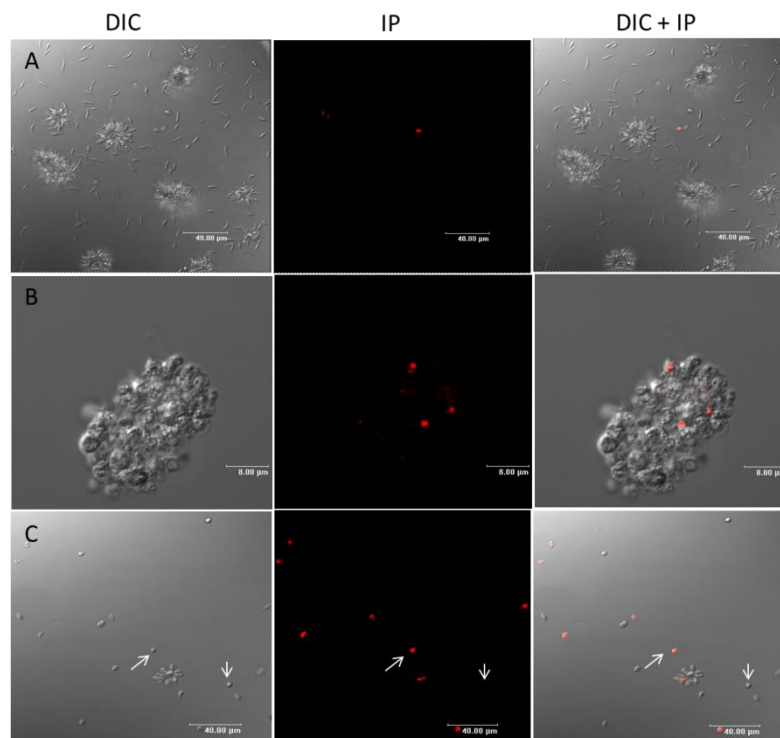
Tabela 5 – Efeito dos compostos **2j** e **2m** na integridade da membrana plasmática.

Treatment	PI+ (%)
Control	0.6
Methanol	37.0
2j (9.8 μM)	41.0
2j (19.62 μM)	58.1
2m (13.87 μM)	20.6
2m (27.74 μM)	32.8

PI+: porcentagem de células positivas para o iodeto de propídio

Os resultados obtidos por microscopia confocal corroboraram com os dados do citômetro de fluxo, mostrando alterações morfológicas em promastigotas como encurtamento do flagelo e arredondamento das células (**Figura 38C**).

Figura 38 – Microscopia confocal de células não tratadas e tratadas com **2j** e **2m**, sujeitas a coloração com iodeto de propídio.



(A) Promastigotas não tratados. (B) Promastigotas tratados com 19,62 μM de **2j**. (C) Promastigotas tratados com 27,74 μM de **2m**. Nota-se em células tratadas a presença de alterações morfológicas (seta) com baixa ou nenhuma intensidade de fluorescência de PI. DIC = contraste diferencial de interferência; PI = mancha de iodeto de propídio e DIC + PI = sobreposição das duas imagens.

6.4.2.7 Efeito dos compostos no Potencial de Membrana Mitocondrial

As alterações induzidas pelos compostos **2j** e **2m** no potencial de membrana mitocondrial são apresentadas na **Tabela 6** e na **Figura 39**. Observa-se que promastigotas de *L. infantum* tratadas com concentrações de 9,82 e 19,62 μM de **2j** e 13,87 e 27,74 μM de **2m** por 72 h diminuíram a intensidade da fluorescência da rodamina 123, demonstrando assim um decréscimo de $\Delta\Psi_m$ nas células tratadas.

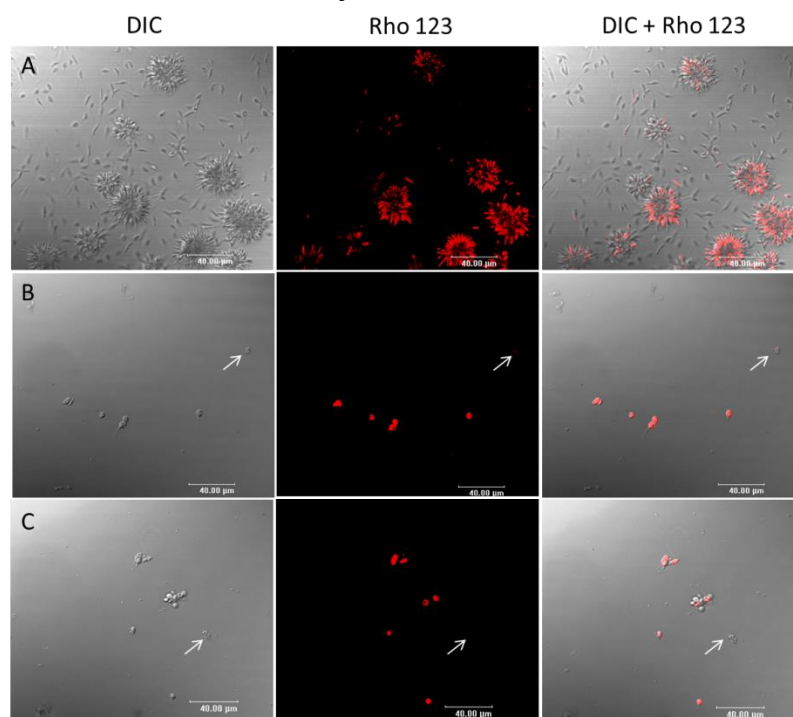
Essa redução foi quantificada pelo cálculo do Índice de Variação (VI). O VI de células tratadas com **2j** mostrou despolarização, mas não de maneira dose-dependente (-0,62 para aqueles tratados com 9,81 μM e -0,59 para aqueles tratados com 19,62 μM). Células tratadas com **2m** tiveram VI de -0,36 (13,87 μM) e -0,50 (27,74 μM) (**Tabela 6**). Valores negativos representam uma diminuição no potencial de membrana.

Tabela 6 – Efeito dos compostos 2m e 2j no potencial da membrana mitocondrial

Treatment	Rho 123**	VI
Control	588.21	0
Methanol	98.22	-0.83
2j (9.8 μ M)	220.67	-0.62
2j (19.62 μ M)	239.28	-0.59
2m (13.87 μ M)	378.55	-0.36
2m (27.74 μ M)	294,27	-0,50

VI- Índice de Variação = MT-MC / MC, onde MT é a média da intensidade de fluorescência nas células tratadas; MC é a média da intensidade de fluorescência em células não tratadas. Nota: ** Mediana da intensidade de fluorescência da rodamina 123 (Rho123).

Alterações em $\Delta\Psi_m$ também foram analisadas por microscopia confocal. As imagens dos controles e dos parasitas tratados suportam os dados de citometria de fluxo, indicando perda de intensidade de marcação de rodamina 123 em células morfológicamente alteradas (**Figura 39**).

Figura 39 – Microscopia confocal de células controle e tratadas com 2j e 2m, sujeito a marcação com Rho 123.

(A) O controle das células mostrou morfologia e intensidade de coloração com Rho123 preservada. (B) Células tratadas com 19,62 μ M de **2j**. (C) Promastigotas tratados com 27,74 μ M de **2m**. Observa-se nas células tratadas a presença de alterações morfológicas (setas) com baixa ou nenhuma marcação com Rho123. DIC = contraste diferencial de interferência; Rho123 = Rhodamina 123 e DIC + Rho123 = Sobreposição das duas imagens.

6.4.2.8 Discussão

O rastreio do efeito dos 15 compostos sintéticos em promastigotas de *L. infantum* mostrou que a maioria dos compostos têm propriedades antileishmaniais e que a atividade mais forte foi encontrada em compostos que apresentam um anel aromático na posição C4 do tiazol. Compostos sem esta substituição (**1a** e **2a**) mostraram atividade leishmanicida mais fraca, o que sugere que esse grupo esteja envolvido na atividade leishmanicida. Pinto et al. (2014), estudando o potencial de naftoquinonas contra *L. infantum*, verificaram que os compostos leishmanicidas mais promissores possuíam dois grupos fenil substituintes, conferindo ao composto uma característica hidrofóbica e facilitando assim a penetração da membrana do parasita⁸⁷.

Verificou-se também que os substituintes halogênicos (F, Cl e Br) no sistema de anel fenil alteraram a atividade leishmanicida. Segundo Hernandez et al. (2010), o uso de substituintes halogenados contribui para a estabilização da ligação do receptor ao fármaco⁸⁸. Isso pode explicar a diferença na atividade leishmanicida entre os compostos testados, como pode ser observado nas substituições duplas com cloro (**2l** e **2m**). O 3,4-dicloro (**2l**) foi menos ativo, enquanto o 2,4-dicloro (**2m**) apresentou maior atividade leishmanicida. Isso concorda com os resultados contra *T. cruzi* estudados para esta mesma série de compostos (**2a-n**)⁷⁹ os quais corroboram para afirmar que a orientação do substituinte é importante para a atividade antiparasitária.

O composto **2j**, cuja estrutura química contém um sistema 2-naftil, um substituinte volumoso, exibiu uma forte atividade leishmanicida. Curiosamente, isso corrobora com os dados anti-*T. cruzi*, que também mostram o composto **2j** como o mais ativo contra tripomastigotas⁷⁹. Da mesma forma, Manda et al. (2014), testaram alcalóides β -carbonílicos contra *Leishmania donovani* e mostraram que a estrutura de um dos compostos mais promissores contém um radical naftil (**11h**)⁸⁹.

A escolha de um composto com potencial quimioterápico deve levar em conta tanto a sua ação contra microorganismos quanto sua citotoxicidade. O presente estudo constatou que a baixa citotoxicidade dos compostos em relação às células de mamíferos teve uma influência direta sobre os valores do índice de seletividade (SI). Todos os compostos testados (**1a** e **2a-n**) foram mais seletivas para *L. infantum* em comparação com células de mamíferos. Santiago et al. (2014), testando uma série de ftalimido-1,3-tiazóis em esplenócitos de camundongos BALB/c e também encontraram

um baixo efeito citotóxico, mostrando que os compostos têm baixa citotoxicidade mesmo em diferentes tipos de células. Os autores também observaram alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitas devido à ação direta dos compostos⁴⁵.

No presente estudo, os compostos **2j** e **2m** foram selecionados para investigação adicional de seus efeitos morfológicos e ultraestruturais, uma vez que estes mostraram maior atividade leishmanicida com baixa citotoxicidade para células de mamíferos.

Apesar do potencial citotóxico dos compostos **2j** e **2m** contra macrófagos peritoneais, verificou-se que os dois compostos apresentaram menor toxicidade para células de mamíferos (CC_{50} **2j** = 362,7 μ M; CC_{50} **2m** = 263,6 μ M) em comparação com o fármaco de referência, Anfotericina B (CC_{50} AmB = 74,9 μ M). Esses dados concordam em parte com os dados de citotoxicidade para esplenócitos de camundongos BALB/c onde descobriu-se que **2j** mostrou baixa toxicidade (CC_{50} = 269,2 μ M), enquanto **2m** foi tóxico para esplenócitos (CC_{50} = 12,8 μ M)⁷⁹. A mesma série foi testada em outros tipos de células de mamíferos e os compostos **2j** e **2m** também apresentaram baixa toxicidade. Estes dados demonstram uma diferença significativa no nível de toxicidade dos compostos quando testados contra diferentes tipos de células. Mesmo com esta diferença, o composto **2j** mostrou ser menos tóxico para as várias células de mamíferos testadas, tornando este composto um candidato promissor para se tornar um fármaco com atividade leishmanicida.

É importante que a pesquisa de novos fármacos com atividade leishmanicida avalie a citotoxicidade para células de mamíferos e estude amastigotas intracelulares, uma vez que essa forma parasitária é responsável pelas manifestações clínicas da leishmaniose⁹⁰. Os resultados mostraram que os compostos **2j** e **2m** diminuíram significativamente a sobrevivência de amastigotas intracelulares após 24h de tratamento, com valores de IC_{50} de 15,20 e 22,33 μ M para **2j** e **2m**, respectivamente. Rottini et al. (2015) avaliaram o efeito do (-)- α -bisabolol em amastigotas de *Leishmania amazonensis*, descobrindo que o composto foi capaz de reduzir a sobrevivência de amastigotas intracelulares⁹¹. Marin et al. (2015) estudaram a atividade de derivados de nitroindazol em *L. infantum* e *L. braziliensis* e verificaram que os derivados tiveram efeito sobre amastigotas intracelulares⁹². Além de corroborar os achados de Rottini et al. (2015) e Marín et al. (2015), o presente estudo também encontrou que **2j** e **2m**

reduziram a sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos, mostrando que esses compostos são eficazes contra essa forma do parasita.

Macrófagos infectados com *Leishmania* spp. usam NO como um mecanismo de defesa. O NO é produzido pela indução da óxido nítrico sintase e é essencial para a morte intracelular de *Leishmania* em macrófagos⁹³. Mesmo os macrófagos não infectados são capazes de aumentar a produção de NO quando induzidos por algumas substâncias. A análise da produção de NO por macrófagos não infectados tratados com os compostos **2j** e **2m** em uma concentração superior a 65 µM mostrou aumento na produção de NO. Macrófagos infectados com *L. infantum* e submetidos ao tratamento com os compostos **2j** e **2m** em concentrações de 28 a 1,4 µM não apresentaram aumento significativo na produção de NO. No entanto, taxas reduzidas de infecção foram observadas, sugerindo que, neste caso, os compostos podem agir para eliminar parasitas intracelulares por meio de outro mecanismo de ação. Segundo Singh et al. (2012), a produção de NO não é a única forma de os macrófagos eliminarem os parasitas; outros mecanismos, como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, produção de várias citocinas Th1, lisozima e outras moléculas microbicidas são usadas para matar parasitas⁹⁴. Pode ser que derivados ftalimido-1,3-tiazóis causem um aumento na produção de NO que melhore a resposta dos macrófagos a *L. infantum*.

A MEV revelou que os parasitos tratados com os compostos **2j** e **2m** exibiram alterações como encolhimento do corpo celular e encurtamento do flagelo. Aliança et al. (2014), Gomes et al. (2016) e Oliveira et al. (2009) demonstraram que seus compostos causaram alterações semelhantes na morfologia do parasita^{73,79,95}. Muitas das alterações morfológicas que o parasito apresenta estão relacionadas à perda de viabilidade celular e morte celular⁹⁶.

A ação dos compostos **2j** e **2m** na ultra-estrutura de promastigotas foi similar, geralmente envolvendo vacuolização do citoplasma, aumentou o número de elétrons – inclusões densas, perfis de membrana (semelhantes a um retículo endoplasmático) circundando organelas e inchaço das mitocôndrias. Kaczanowski et al. (2011) descreveram alterações na morfologia celular e na vacuolização citoplasmática como características de morte celular por apoptose em organismos eucarióticos, semelhantes aos encontrados no presente estudo⁹⁷. No entanto, o este trabalho não

pôde confirmar a morte celular programada, uma vez que não foram utilizados marcadores específicos de apoptose.

Como os compostos mostraram-se promissores como fármacos leishmanicidas, foram realizadas análises para detectar possíveis alvos nas promastigotas de *L. infantum*. A coloração com PI, que é um corante que tem afinidade por ácidos nucleicos e é impermeável a células intactas, foi usada para avaliar a extensão do dano à membrana plasmática na população de parasitas tratados com compostos **2j** e **2m**. Tanto a citometria como a microscopia confocal encontraram um aumento considerável no número de células marcadas com PI. A microscopia confocal encontrou poucas células com morfologia alterada e pouca ou nenhuma coloração com PI; e células com vazamento de material citoplasmático não foram observadas. É possível que os compostos estejam atuando nas propriedades físico-químicas da membrana, interferindo na sua permeabilidade e permitindo a marcação sem ruptura das membranas. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2009), que testaram óleos essenciais de plantas utilizadas na medicina popular contra o *L. infantum* e também encontraram um aumento no número de células marcadas com PI e observaram alterações na membrana de *L. infantum* sob MET⁹⁵.

As mitocôndrias foram outro alvo investigado pelo presente estudo. Segundo Salomão et al. (2013), mudanças na permeabilidade, particularmente na membrana mitocondrial do parasita, podem levar à morte celular programada⁹⁸. O potencial de membrana mitocondrial está ligado à função da mitocôndria e sua manutenção adequada é essencial para a sobrevivência celular⁹⁹. Além disso, os tripanossomatídeos têm apenas uma mitocôndria, tornando essa organela um alvo potencial para fármacos¹⁰⁰. O dano mitocondrial foi confirmado por uma diminuição na fluorescência de rodamina 123 e consequente modificação do $\Delta\Psi_m$. É, portanto, razoável sugerir que os compostos exerçam seu efeito leishmanicida em promastigotas de *L. infantum*, afetando a função mitocondrial do parasita. Esses resultados corroboram as observações da MET. Compostos como itraconazol, paraconazol e óleo essencial de *Artemisia annua* têm propriedades leishmanicidas e estão associados à perda de potencial de membrana mitocondrial^{101,102}. No presente estudo, os compostos **2m** e **2j** também causaram despolarização da membrana mitocondrial.

Estes resultados foram publicados no *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Apêndice B).

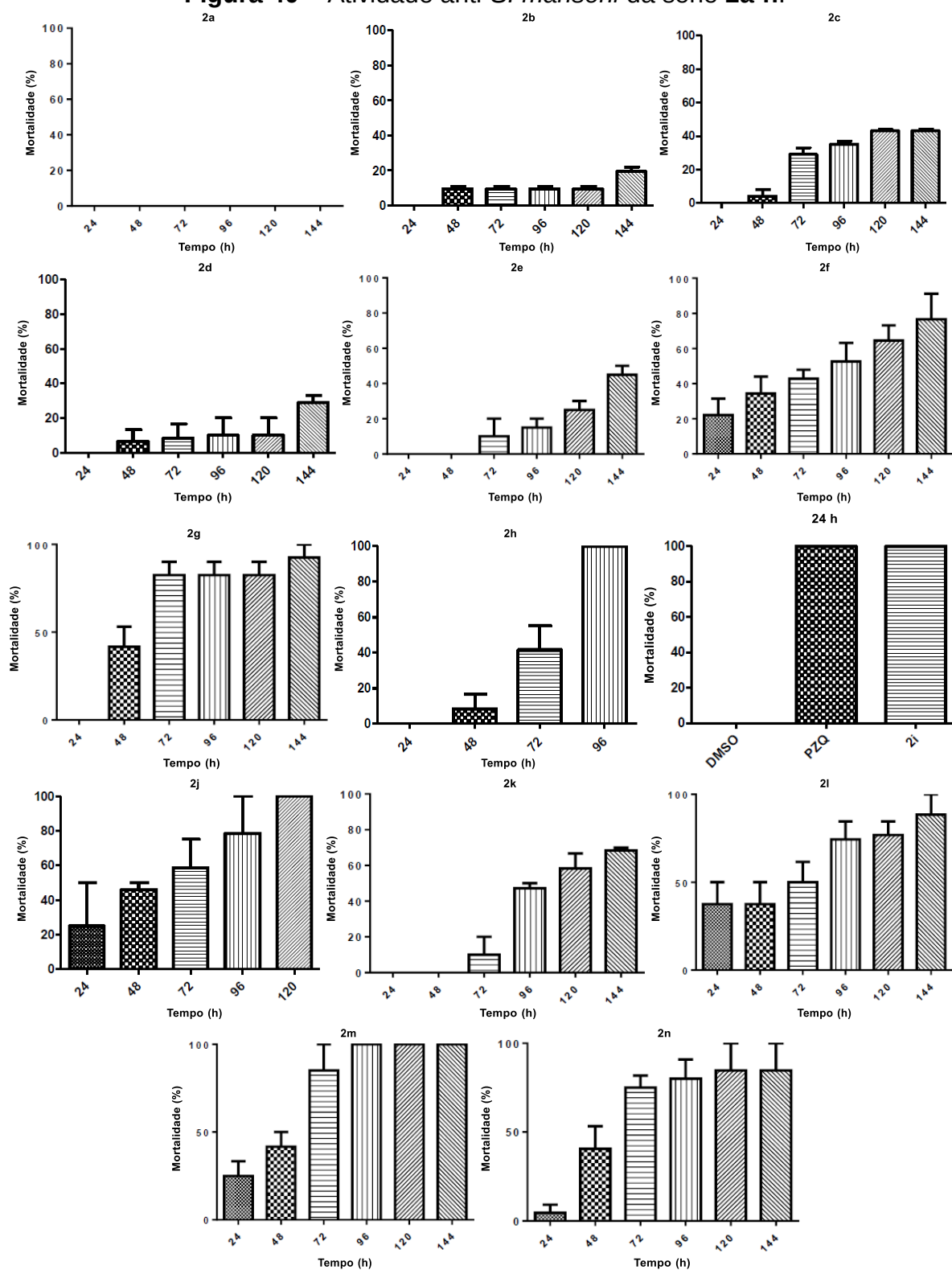
6.4.3 Avaliação anti-*S. mansoni*

O perfil anti-*S. mansoni* está exposto a seguir.

6.4.3.1 Atividade contra as formas adultas de *S. mansoni*

A atividade anti-*S. mansoni* foi estabelecida pela análise e avaliação da taxa de mortalidade, motilidade, oviposição e alterações no tegumento dos vermes. Inicialmente, os compostos (**2a-n**) foram avaliados na concentração de 100 µg/mL (**Figura 40**). O composto **2i** eliminou todos os parasitas em menos de 24 horas. Os compostos **2h** e **2m** produziram 100% de mortalidade após 96 horas e o **2j** após 120 horas. Além disso, com apenas 24 horas de contato das soluções dos compostos com os vermes, todas os compostos da série promoveram a separação dos casais, a inibição da oviposição e algumas modificações no tegumento do parasita.

Figura 40 – Atividade anti-*S. mansoni* da série 2a-n.



Valores representam médias $\pm$ DP de um experimento realizado em duplicata.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para os 4 compostos que revelaram uma atividade esquistossomicida superior a 80% nos ensaios em 100 µg/mL, foi procedida a continuidade dos testes utilizando diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 80 e 100 µg/mL) (**Tabela 7**). O composto **2i** mostrou uma atividade antiparasitária de 100% em 24 horas a concentrações de 80 e 100 µg/mL. Em concentrações menores de **2i** (40 µg/mL), foi necessário mais tempo (144 horas) para atingir 100% de mortalidade. O composto **2h** apresentou 100% de mortalidade na concentração de 80 µg/mL (120 h). O derivado **2j** demonstrou 100% de eficácia em concentrações mais baixas (40 µg/mL) em 144 horas. Já o derivado **2m** induziu a mortalidade total de vermes de *S. mansoni* em concentrações superiores a 40 µg/mL com o tempo de 144 horas e inibiu completamente a oviposição.

Tabela 7 – Atividade anti-*S. mansoni* *in vitro* dos compostos **2h**, **2i**, **2j** e **2m** frente a forma adulta, em diferentes concentrações.

Composto	Tempo	Mortalidade (%) (µg.mL ⁻¹)					
		100	80	40	20	10	5
2h	24 h	0	0	0	0	0	0
	48 h	8.35	0	0	0	0	0
	72 h	41.65	8	0	0	0	0
	96 h	100	58	0	0	0	0
	120 h	-	100	0	0	0	0
	144 h	-	-	16.7	0	0	0
2i	24 h	100	100	25	0	0	0
	48 h	-	-	41.7	8	0	0
	72 h	-	-	69.5	8	8	0
	96 h	-	-	79	16.7	16.7	8
	120 h	-	-	100	50	25	8
	144 h	-	-	-	50	25	8
2j	24 h	0	0	0	0	0	0
	48 h	25	25	8.35	0	0	0
	72 h	46	50	16.5	16.7	25	8
	96 h	58.5	50	55.35	16.7	33	16.7
	120 h	78.5	83	81	33	33	16.7
	144 h	100	100	100	44	33	16.7
2m	24 h	25	20.8	16.7	10.5	0	0
	48 h	66.7	60.4	54.2	25	0	0
	72 h	75	75	75	50	0	0
	96 h	100	90.3	83.3	50	0	0
	120 h	100	91.7	91.7	50	0	0
	144 h	100	100	92.3	52.6	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o composto **2i** foi estabelecida a EC₅₀ e o índice de seletividade que estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Atividade anti-*S. mansoni* in vitro.

Composto	Citotoxicidade μM ^a	EC ₅₀ (μM)	IS ^b
2i	251,60	49,36	5,09

^a Concentração não-tóxica mais elevada em células do baço de camundongos BALB/c.

^b IS (Índice de Seletividade): CC₅₀ de células de mamíferos / IC₅₀ *S. mansoni*

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação das propriedades anti-*S. mansoni* foi dada continuidade com o composto **2i** por ter se mostrado o mais promissor no *screening* inicial.

6.4.3.2 Atividade contra esquistossômulos

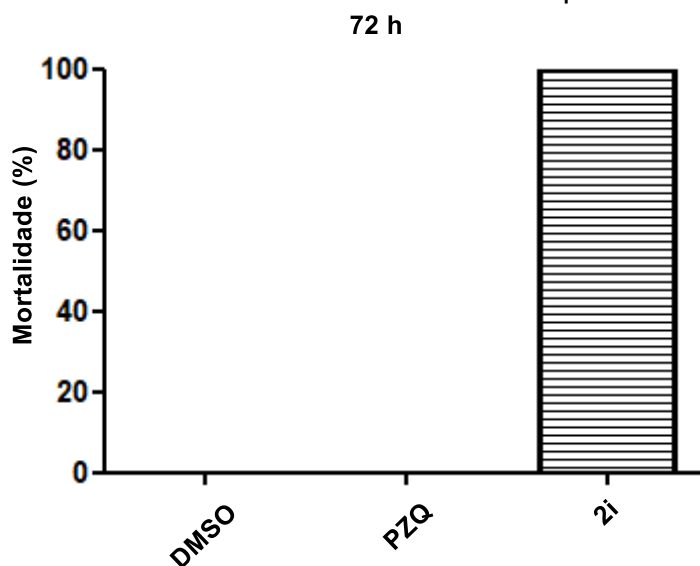
Tendo o composto **2i** apresentado a mais promissora atividade frente aos vermes adultos, este foi avaliado sobre as formas imaturas do *S. mansoni*. O composto foi avaliado na concentração máxima de 100 μg/mL em um primeiro momento e mostrou-se eficaz. Após este resultado o mesmo foi avaliado nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100 μg/mL a fim de identificar a menor concentração eficaz sobre a forma imatura do *S. mansoni* (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Atividade do composto **2i sobre os esquistossômulos.**

Composto	Tempo	Mortalidade (%) (μg.mL ⁻¹)					
		100	80	40	20	10	5
2i	24 h	100	100	100	100	100	100
	48 h	100	100	100	100	100	100
	72 h	100	100	100	100	100	100

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 41** demonstra que o composto **2i** apresentou atividade sobre os esquistossômulos na concentração mais baixa (5 μg/mL), causando 100% de mortalidade nas primeiras 24h. Por sua vez o PZQ e o grupo tratado com DMSO não foram capazes de causar mortalidade no parasito após 72h de avaliação.

Figura 41 – Efeito do **2i** *in vitro* sobre os esquistossômulos.

Mortalidade após 72h de incubação com DMSO a 1,66%,
PZQ na concentração de 3 µg/mL e **2i** na concentração de 5 µg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O composto **2i** apresentou um efeito diferenciado sobre os parasitos, demonstrando cristalização deste, em concentrações mais elevadas. No entanto, os cristais se acumularam nos esquistossômulos (**Figura 42**), demonstrando uma seletividade pelo parasito. É comum acontecer esse tipo de cristalização de compostos em concentrações altas, porém em outros estudos realizados pelo grupo foi observado que a deposição se dava na própria placa.

Figura 42 – Precipitação do composto **2i** na concentração de 100 µg/mL em cima dos esquistossômulos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

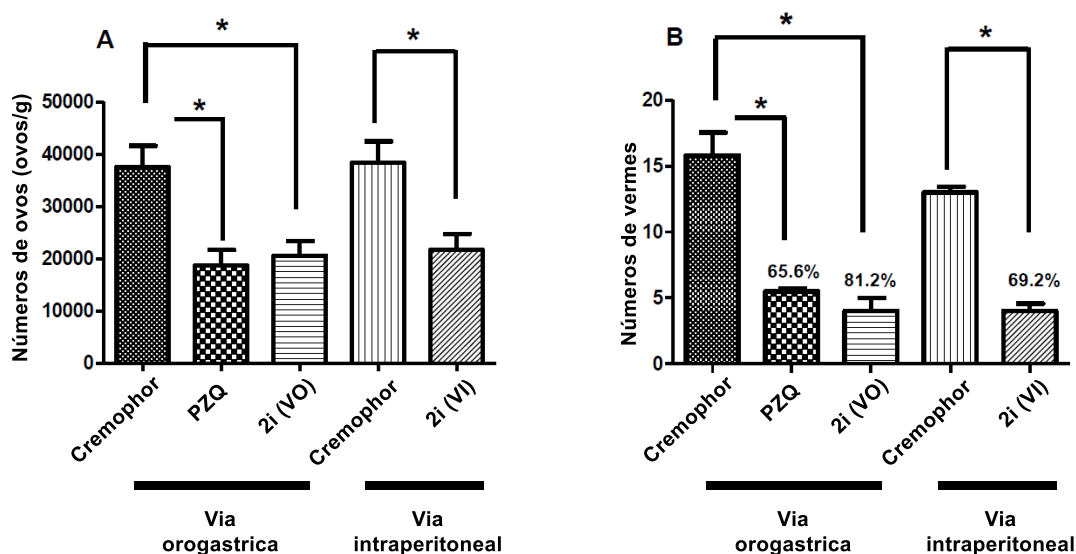
6.4.3.3 Determinação da toxicidade aguda do composto **2i**

Em relação aos camundongos tratados com o composto **2i**, não foi observada mortalidade em 5 dias de avaliação. Os animais não apresentaram tremores, ataxia ou quaisquer outros sinais ou comportamentos anormais. Além disso, nenhuma alteração macroscópica foi observada durante a necropsia. Segundo o Guia 423 (OECD, 2001), em um teste de toxicidade aguda em que não mais do que um dos seis animais é morto após uma dose de 2000 mg/kg, o valor de DL_{50} deve ser considerado maior que 2000 mg/kg e menor de 5000 mg/kg. Estes resultados demonstram que **2i** é seguro para administração oral em camundongos a uma dose de 400 mg/kg (dose escolhida para tratamento no modelo experimental).

6.4.3.4 Atividade anti-*S. mansoni* in vivo com o derivado **2i**

O número de ovos nos intestinos dos ratos que foram tratados com o derivado **2i** foi semelhante aos resultados no grupo experimental positivo (**Figura 43A**). A redução no número de ovos foi semelhante nas duas vias testadas (oral e intraperitoneal); alterações na significância estatística foram observadas em comparação com os animais de controle tratados com Cremophor EL. Não foram observadas diferenças no número de ovos encontrados no tecido hepático em nenhum dos grupos avaliados.

Figura 43 – Atividade anti-*S. mansoni* in vivo do composto de **2i**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito do tratamento com o **2i** em diferentes estágios dos ovos de *S. mansoni* está descrito na **Tabela 10**. Os tratamentos foram capazes de reduzir a porcentagem de ovos imaturos: 22,5% (VO) e 7,5% (VI). Além disso, os compostos ainda foram capazes de aumentar a porcentagem de ovos inviáveis: 53,8% (**2i** VO) e 75,1% (**2i** VI).

Tabela 10 – Efeito do tratamento com o composto **2i** nos estágios dos ovos depositados por *S. mansoni*

Grupos	Redução no número de ovos imaturos	Estágios dos ovos		
		Imaturos (%)	Maduros (%)	Inviáveis (%)
Cremophor (VO)		72.5± 3.1	20.8± 2.0	6.7± 0.4
PZQ (VO)	66,1%	6.4±3.0*	25.5± 3.5	68.1± 10.3
2i (VO)	50,1% ^a	22.5± 4.0*	23.7± 1.1	53.8± 3.9
Cremophor (VI)		73.6±2.3	14.3± 2.8	12.1± 0.8
2i (VI)	66,1% ^b	7.46±1.1*	17.4± 1.8	75.1± 2.2

Foram avaliados 7-10 animais por grupo.

^a redução comparada ao controle intraperitoneal (VO)

^b Redução comparada ao controle orogástrico (VI)

* p <0,001 em relação aos grupos controle (Chremophor)

Fonte: Elaborado pelo autor.

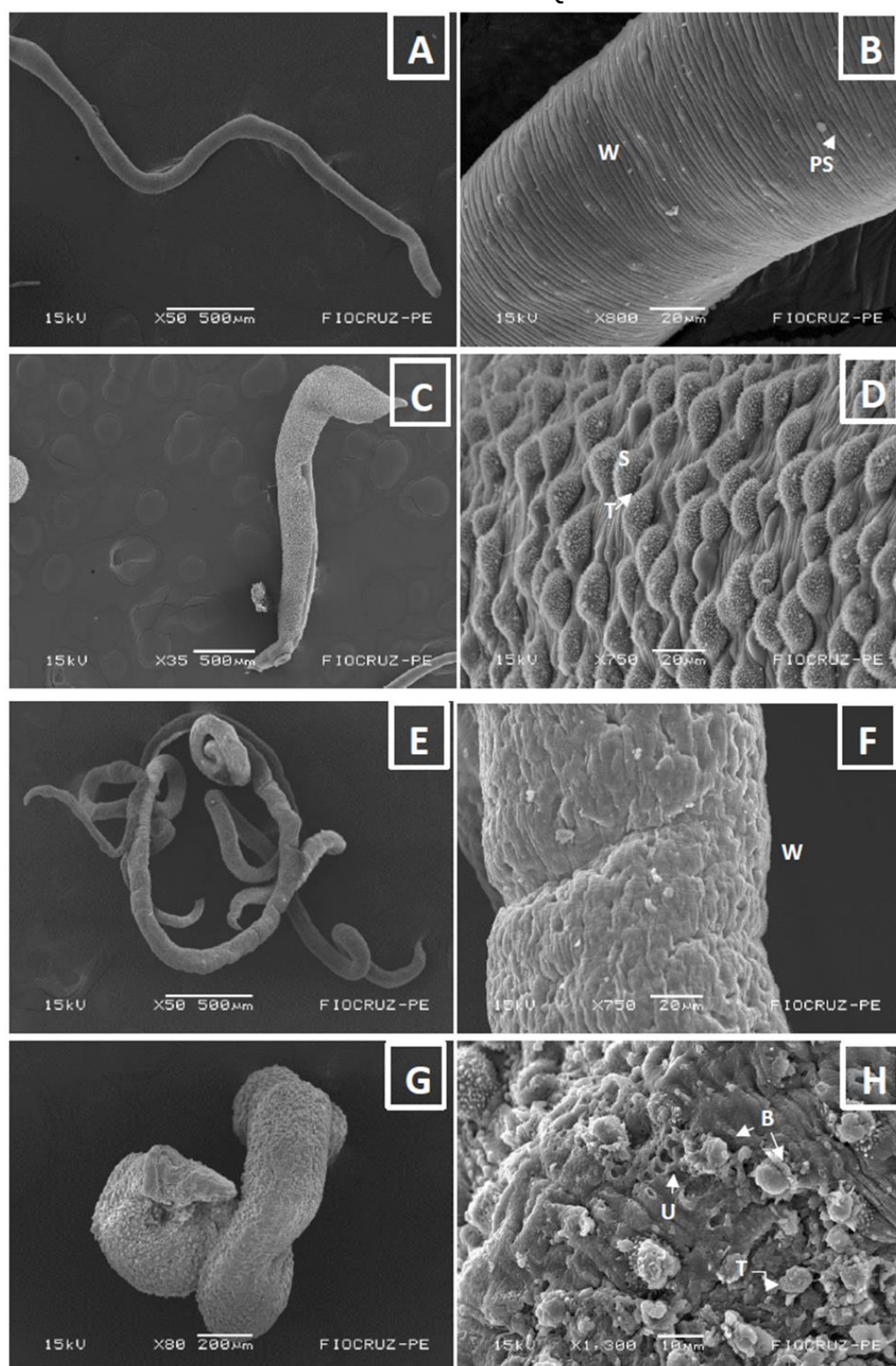
A **Figura 43B** mostra o número médio de vermes coletados do sistema portal mesentérico de camundongos dos grupos que foram tratados com o composto **2i** (OV e IV). O derivado **2i** (OV) apresentou menor carga parasitária (81,2%) do que animais tratados com PZQ (65,6%). Camundongos tratados com IV apresentaram os mesmos resultados entre os grupos tratados com **2i** (69,2%) e PZQ.

6.4.3.5 Análise de MEV das formas adultas de *S. mansoni*

Para a avaliação ultraestrutural dos parasitas cultivados com o derivado **2i** (100 µg/mL) foram feitas coletas após 2 e 22 horas de exposição aos compostos. Como controle negativo, o DMSO (1,66%) foi avaliado às 22 horas (**Figura 44A-D**), e como controle positivo o PZQ a 3 µg/mL por 2 horas (**Figura 44E-H**).

As imagens do controle negativo mostram fêmeas de *S. mansoni* com papilas tegumentares e sensoriais integrais (**Figura 44A-B**) e machos com tegumento (**Figura 44C**), tubérculos e pontas inteiras (**Figura 44D**). Vermes tratados com PZQ demonstraram alterações características causadas pelo fármaco, como contração total e enrugamento de parasitas fêmeas (**Figura 44E-F**) e machos (**Figura 44G**). Parasitas machos também mostraram destruição de tegumento e tubérculos, com presença de bolhas e ulcerações (**Figura 44H**).

Figura 44 – Avaliação ultraestrutural de *S. mansoni* obtida de culturas estimuladas com DMSO e PZQ.



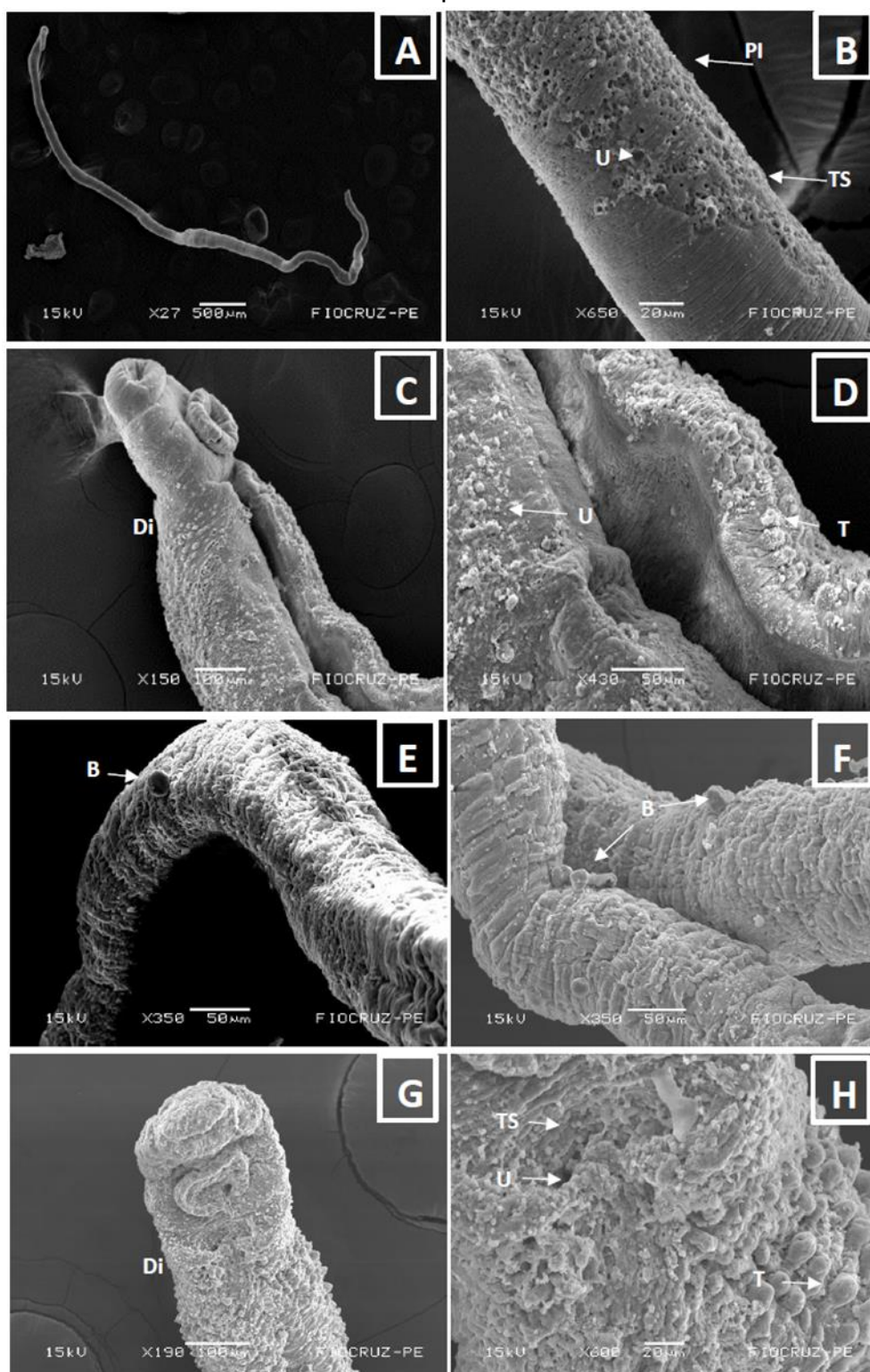
Após 22 horas de incubação com 1,66% de DMSO (controle negativo) (A-D) e duas horas com PZQ (3 μg/mL) (controle positivo) (E-H). (A e B): mostram fêmeas de *S. mansoni* com o tegumento (W) e papilas sensoriais intactas (PS). (C e D): vermes machos sem alterações no tegumento, tubérculos (T)

e espículas (S). (E e F): fêmeas mortas com tegumento enrugado (W). (G e H): machos contorcidos com presença de bolhas (B), ulcerações (U) e destruição de tubérculos (T).

O composto **2i** foi capaz de induzir danos aos parasitas duas horas após a exposição, causando ulcerações e destruindo o tegumento que expõe o epitélio subtegumentar das fêmeas (**Figura 45A-B**), formando bolhas, ulcerações e causando uma destruição parcial dos tubérculos em machos (**Figura 45C-D**). Nos parasitas oriundos da cultura após 22 horas de contato com o composto, o tegumento da fêmea mostrou-se enrugado com uma presença perceptível de bolhas (**Figura 45E-F**). Os vermes machos apresentaram desintegração do tegumento, expondo o epitélio subtegumentar; destruição de tubérculos e espículas e apresentando também ulcerações (**Figura 45G-H**).

Com base nestes resultados, foi realizado pedido de patente junto ao INPI (**Apêndice I**) e submetido artigo ao *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (**Apêndice F**) o qual encontra-se em análise.

Figura 45 – Avaliação ultraestrutural de *S. mansoni* obtida de culturas estimuladas com composto 2i.



Após 2 h (A-D) e 22 h (E-H) de incubação com o composto 2i. (A e B): mostram fêmeas de *S. mansoni* com descamação do tegumento (PI), exposição do epitélio subtegumentar (TS) e ulcerações (U). (C e D): vermes machos com desintegração do tegumento (Di), tubérculos (T) destruídos e ulcerações (U). (E e F): fêmeas mortas com presença de bolhas (B).

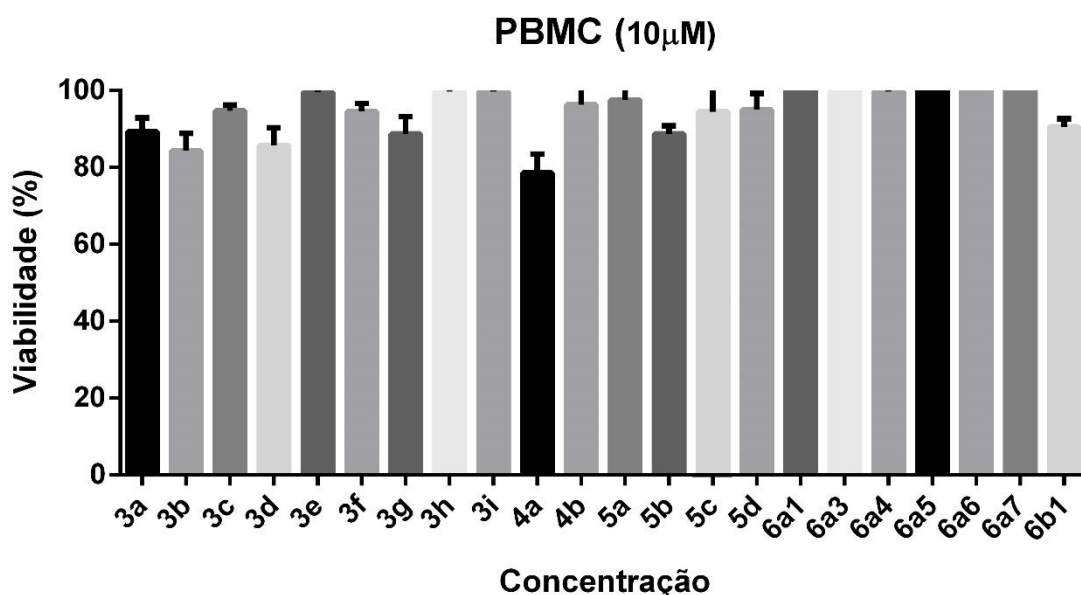
6.4.4 Atividade anti-células tumorais

O perfil anticâncer está exposto a seguir.

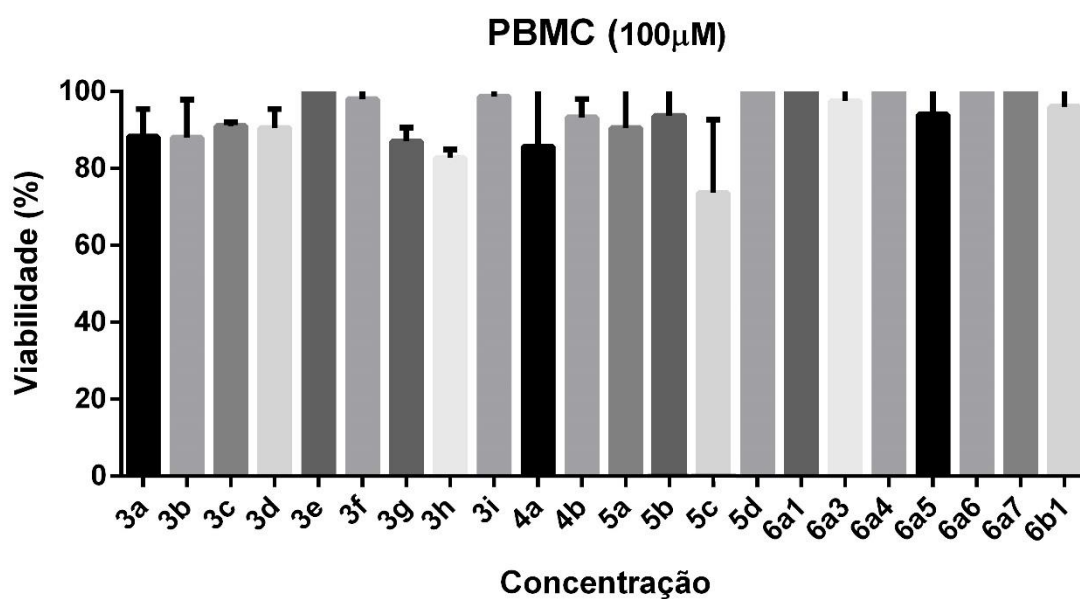
6.4.4.1 Citotoxicidade em Células Não Transformadas

Foi avaliado, neste estudo, o potencial seletivo dos compostos **3a-i**, **4a-b**, **5a-d** e seis derivados da série de ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis (**6a1**, **6a3**, **6a4**, **6a5**, **6a6**, **6a7** e **6b1** – os demais compostos da série estão sendo testados dando continuidade ao estudo) frente a células não transformadas. Por esta razão, as células não tumorais foram expostas ao tratamento com os novos compostos e com o controle positivo, doxorrubicina (DOXO). A viabilidade dos compostos testados na concentração de 10 μM variou de 78,5 a 100% (**Figura 46**) e na concentração de 100 μM variaram de 73,5 a 100% (**Figura 47**). Verificou-se que todos os compostos sintetizados apresentaram valores de $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$, na dose máxima testada de 100 μM , em PBMC's, enquanto que o valor de IC_{50} da doxorrubicina foi de $6,6 \pm 1,08 \mu\text{M}$. Estes resultados demonstram que os compostos testados não apresentam citotoxicidade frente as células não transformadas.

Figura 46 – Viabilidade Celular em PBMC na Concentração 10 μM .



DOXO IC_{50} $6,6 \pm 1,08 \mu\text{M}$
 Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 47 – Viabilidade Celular em PBMC na Concentração 100 μ M

DOXO IC₅₀ 6,6 $\pm$ 1,08 μ M
 Fonte: Elaborado pelo Autor

6.4.4.2 Viabilidade Celular, IC₅₀ e Índice de Seletividade

Foi realizado um *screening*, onde foram testados os 22 compostos em oito linhagens tumorais (**Tabela 11**), na concentração de 10 μ M, para determinação do potencial antineoplásico dessas amostras. O controle positivo utilizado foi a DOXO na concentração de 10 μ M.

Tabela 11 – Viabilidade celular (%) de derivados ftalimido-1,3-tiazóis frente a linhagens neoplásicas *in vitro*

	MOLT-4	TOLEDO	HL-60	HL-60 MX1	K562	MCF-7	T47-D	SK-MEL-28
DOXO	1	30	0,3	46	18		21	6
3a	86	65	96	100	100	90	100	100
3b	77	66	90	100	100	93	97	100
3c	90	88	100	100	100	92	100	100
3d	92	100	100	100	100	#	82	97
3e	100	86	100	100	100	100	100	100
3f	68	46	82	79	100	95	85	91
3g	66	100	60	90	100	96	100	100
3h	67	72	100	90	100	#	86	100
3i	100	100	100	100	100	100	100	100
4a	100	54	100	100	100	100	100	94
4b	98	100	100	94	100	100	98	100
5a	90	81	100	97	100	98	100	100
5b	93	74	100	89	100	#	96	100
5c	30	1	100	34	96	63	58	64
5d	88	100	90	72	100	#	100	100
6a1	9	70	0,4	96	100	43	77	100
6a3	5	27	6	7	23	55	56	21
6a4	28	79	0,3	100	47	57	59	100
6a5	42	30	0,8	11	30	54	75	100
6a6	23	15	2	5	26	59	59	46
6a7	13	2	2	76	70	45	61	100
6b1	89	90	91	87	100	#	85	100

#Compostos não testados

Fonte: Elaborado pelo Autor

O ensaio de citotoxicidade é um parâmetro importante na detecção da atividade antineoplásico, onde os compostos que são capazes de reduzir a viabilidade celular a valores inferiores a 59% foram submetidos a novos ensaios para determinação do IC₅₀. Para os tumores hematológicos, esta condição foi obedecida para os respectivos compostos: na linhagem de Leucemia Linfoblástica Aguda (MOLT-4), 7 compostos (**5c**, **6a1**, **6a3**, **6a4**, **6a5**, **6a6** e **6a7**); para a linhagem de Linfoma Não-Hodgkin de Células B (TOLEDO), 7 compostos (**3f**, **4a**, **5c**, **6a3**, **6a5**, **6a6** e **6a7**); na linhagem de Leucemia Promielocítica Aguda (HL-60), 6 compostos (**6a1**, **6a3**, **6a4**, **6a5**, **6a6** e **6a7**); na linhagem de Leucemia Promielocítica Aguda Resistente (HL-60-MX1), 4 compostos (**5c**, **6a3**, **6a5** e **6a6**); e em células da linhagem de Leucemia Mielogênica Crônica (K562), 4 compostos (**6a3**, **6a4**, **6a5** e **6a6**).

Já para os tumores sólidos os seguintes compostos foram capazes de reduzir a viabilidade celular a valores inferiores a 59%: na linhagem de Adenocarcinoma de Mama (MCF-7), 6 compostos (**6a1**, **6a3**, **6a4**, **6a5**, **6a6** e **6a7**), não foram testados 05 compostos (**3d**, **3h**, **5c**, **5d** e **6b1**) para esta linhagem; para a linhagem de Carcinoma Ductal de Mama (T-47D), 1 composto (**6a3**); e na linhagem de Melanoma Maligno (SK-MEL-28), 2 compostos (**6a3** e **6a6**).

A partir desse ensaio, foram selecionados para realização das determinações da IC₅₀ duas linhagens de tumores hematológicos (MOLT-4 e K562) nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µM, exceto **5c** que em MOLT-4 foi testado nas concentrações de 0,1, 1, 2,5, 5 e 10 µM devido a saturação do composto; e duas linhagens de tumores sólidos (SK-MEL-28 e T47D) nas concentrações de 1, 10 e 100µM.

Em MOLT-4, foram obtidos valores de IC₅₀ que variaram entre 5,8 e 7,12 µM para os compostos testados. Os compostos **5c** (6,04±0,04 µM), **6a3** (5,94±0,79 µM), **6a5** (5,99±0,03 µM) e **6a6** (5,8±0,42 µM), apresentaram valores de IC₅₀ inferiores ao fármaco utilizando como padrão, a DOXO (6,37±0,3 µM) (**Tabela 12**).

Tabela 12 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos compostos em MOLT-4

Composto	IC ₅₀ MOLT (µM)
DOXO	6,37±0,3
5c	6,04±0,04
6a1	7,1±0,95
6a3	5,94±0,79
6a4	7,12±0,59
6a5	5,99±0,03
6a6	5,8±0,42
6a7	6,9±0,87

Fonte: Elaborado pelo Autor

Em K562, os valores de IC₅₀ variaram entre 6,98 e 11,97 µM. O composto **6a3** (6,98±0,74 µM) apresentou perfil aproximado a IC₅₀ da DOXO (6,52±0,21 µM). (**Tabela 13**)

Tabela 13 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em K562

Composto	IC ₅₀ K562 (µM)
DOXO	6,52±0,21
6a3	6,98±0,74
6a4	11,97±1,54
6a5	7,74±2,47
6a6	8,48±1,82

Fonte: Elaborado pelo Autor

Em SK-MEL-28, foram obtidos valores de IC₅₀ de 5,67±0,38 µM (**6a3**) e 5,85±1,81 µM (**6a6**), ambos os valores próximos, mas abaixo do IC₅₀ da DOXO (6,52±0,21µM) (**Tabela 14**).

Tabela 14 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em SKMEL-28

Composto	IC ₅₀ SKMEL-28 (µM)
DOXO	6,52±0,21
6a3	5,67±0,38
6a6	5,85±1,81

Fonte: Elaborado pelo Autor

Já em T-47D, o IC₅₀ (11,97±1,83 µM) foi superior ao IC₅₀ da DOXO (6,36±0,27 µM), utilizada como controle positivo (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em T47-D

Composto	IC ₅₀ T47-D (µM)
DOXO	6,36±0,27
6a3	11,97±1,83

Fonte: Elaborado pelo Autor

O índice de seletividade (IS) é o indicador que consiste na razão entre o IC₅₀ de células normais e tumorais, sugerindo o potencial uso em testes clínicos. O IS dos compostos avaliados está exposto na **Tabela 16**. Quanto maior for a proporção, maior será a seletividade com células tumorais. Isso significa menor toxicidade em células normais, sugerindo maior proteção às mesmas e redução dos efeitos colaterais.

Tabela 16 – Índice de Seletividade nas Linhagens Neoplásicas.

Composto	IC₅₀ PBMC Estimado (µM)	IC₅₀ MOLT-4 (µM)	IS Estimado
5c	>100	6,04	>16,56
6a1	>100	7,1	>14,08
6a3	>100	5,94	>16,86
6a4	>100	7,12	>14,04
6a5	>100	5,99	>16,69
6a6	>100	5,8	>17,24
6a7	>100	6,9	>14,49
Composto	IC₅₀ PBMC Estimado (µM)	IC₅₀ K562 (µM)	IS Estimado
6a3	>100	6,98	>14,33
6a4	>100	11,97	>8,35
6a5	>100	7,74	>12,92
6a6	>100	8,48	>11,79
Composto	IC₅₀ PBMC Estimado (µM)	IC₅₀ SK-MEL-28 (µM)	IS Estimado
6a3	>100	5,67	>17,64
6a6	>100	5,84	>17,09
Composto	IC₅₀ PBMC Estimado (µM)	IC₅₀ T-47D (µM)	IS Estimado
6a3	>100	11,97	>8,35

Fonte: Elaborado pelo Autor

Os compostos testados apresentaram resultados promissores nas diversas linhagens tumorais avaliadas. Em MOLT-4, foi estimado valores entre 14,08 e 17,24. Em K562, variaram de 8,4 a 14,33. Em SKMEL-28, apresentaram valores de 17,09 e 17,64. E T-47D estimou-se 8,35 o índice de seletividade.

As moléculas mais ativas apresentam grande peso molecular. Estas também se mostraram menos tóxico nos ensaios de PBMC e mais seletivas em comparação aos demais compostos testados revelando-se estruturas promissoras. Em termos estruturais, tais compostos são derivados *bis*-1,3-tiazóis nos quais não há substituição nos nitrogênios *N3* dos núcleos tiazólicos.

Pode-se verificar que os derivados ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis e o composto **5c** revelaram menores valores em termos de percentual de viabilidade celular nas diversas linhagens tumorais avaliadas.

Entre os compostos avaliados pode-se prever que o esqueleto base que apresenta três heterociclos (uma ftalimida e dois 1,3-tiazóis) é promissor para o desenvolvimento de protótipos a fármacos antitumorais. Sendo que, com os resultados já disponíveis, tem-se um indicativo que a substituições em *N3* do tiazol

central a molécula é prejudicial a atividade quando se avalia dos dados obtidos a partir do composto **6b1**. Conclusões mais consistentes quanto a este aspecto serão possíveis após a obtenção dos resultados dos demais compostos da série **6a1-6d7** que se encontram em fase de testes.

Com base nestes resultados, foi realizado pedido de patente junto ao INPI (**Apêndice J**), e este se encontra em revisão.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 CONCLUSÕES

- Os compostos planejados das séries **2a-n**, **3a-i**, **4a-b**, **5a-d** e **6a1-6d7** foram sintetizados e purificados por rotas sintéticas que, após serem otimizadas, se mostram de fácil execução com obtenção de rendimentos superiores a 50%;
- As propriedades físico-químicas e estruturais foram bem estabelecidas, tendo-se confirmado a obtenção de 57 derivados heterocíclicos híbridos da ftalimida e do 1,3-tiazol;
- A citotoxicidade *in vitro* foi desenvolvida para a série **2a-n** em esplenócitos de camundongos BALB/c, células Vero, macrófagos J774 e macrófagos peritoneais, onde os compostos mais promissores desta série (**2i**, **2j** e **2m**) não se mostraram tóxicos para células de mamíferos. Os compostos das séries **3a-i**, **4a-b**, **5a-d** e alguns da série **6a1-6d7** foram avaliados frente a PBMC's e foi demonstrado que todos não apresentam citotoxicidade frente a células não transformadas;
- Para a série **2a-n**, foram determinadas as propriedades:
 - anti-*T. cruzi*, sendo o composto **2j** (4,7 µM) o mais promissor e a partir do estudo desta série foi planejada e estudada a série **6a-l** que permitiu a identificação do composto **6j** (0,5 µM) com índice de seletividade de 409, sendo cerca de 27 vezes mais seletivo que o BDZ. O possível mecanismo de ação foi estudado e não é decorrente de processos clássicos de morte celular sendo possível que diminuam a viabilidade do parasito decorrente de alterações da organização do citosol;
 - anti-*L. infantum*, onde os composto **2j** (9,8 µM) e **2m** (13,9 µM) foram os mais potentes em inibir promastigotas, induzir a produção de NO e provocar alterações celulares no parasita, o que há razoável indício de ser decorrente de alterações na função mitocondrial do parasita;
 - anti-*S. mansoni*, através da qual o composto **2i** (49,36 µM) surge como um forte candidato a fármaco esquistossomicida já que apresenta ação *in vitro* frente a vermes adultos e esquistossômulos, perfil este diferenciado do PZQ, podendo se vir a ser usado na profilaxia da

doença, algo ainda inexistente na terapêutica. Como possível mecanismo de ação, ficaram evidentes alterações que acontecem no tegumento do parasita provocadas pelo composto **2i**;

- Para as séries **3a-i**, **4a-b**, **5a-d** e alguns compostos da série **6a1-6d7** foram avaliadas as propriedades em inibir tumores sólidos e hematológicos, onde se destacaram os derivados ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis, dentre os quais os **6a3** (5,67 μ M) e **6a6** (5,85 μ M) foram mais potentes que a Doxorubicina para a linhagem de Melanoma Maligno (SK-MEL-28) estudada;
- Frente aos perfis anti-*T. cruzi*, anti-*L. infantum*, anti-*S. mansoni* e antitumoral encontrados para os compostos aqui obtidos e estudados pode-se afirmar que os núcleos ftalimida e 1,3-tiazol são estruturas privilegiadas, corroborando com o que é descrito na literatura, e que a hibridação destes núcleos vem a ser uma promissora estratégia para o desenvolvimento de fármacos multialvos;
- Os dados já obtidos possibilitaram a publicação de dois artigos (*European Journal of Medicinal Chemistry* e *European Journal of Pharmaceutical Sciences*) e o pedido de duas patentes executadas junto ao INPI, fato que contribui para o aprimoramento científico e tecnológico nacional e regional.

7.2 PERSPECTIVAS

- Aprofundar o estudo da série **2a-n** buscando o desenvolvimento de ensaios *in vivo* e melhor esclarecimento dos mecanismos de suas diversas propriedades;
- Estudar os mecanismos de ação antitumoral dos derivados ftalimido-*bis*-1,3-tiazóis que já foram testados e se mostraram promissores;
- Finalizar as avaliações biológicas para as séries **3a-i**, **4a-b**, **5a-d** e **6a1-6d7** (anti-tumoral) bem como buscar novos alvos biológicos para avaliação. Estes compostos já encontram-se sendo estudados quanto as propriedades anti-*Candida albicans* – com o grupo do Prof. Dr. Patrice Le Pape do *Département de Parasitologie et Mycologie Médicale*, Université de Nantes – e anti-*T. cruzi* – com o grupo do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, do Laboratório de Inovação Tecnológica em Desenvolvimento de Medicamentos e Cosméticos, Universidade Estadual de Maringá;
- Redigir os artigos científicos com as séries **3a-i**, **4a-b**, **5a-d** e **6a1-6d7**.

REFERÊNCIAS

- (1) Santos, C. S.; Souza, F. S. Social Representations of Health Professionals on Negligenced Diseases. **2017**, 21 (1), 1–9.
- (2) Conteh, L.; Engels, T.; Molyneux, D. H. Neglected Tropical Diseases 4 Socioeconomic aspects of Neglected Tropical Diseases. *The Lancet* **2010**, 375 (9710), 239–247.
- (3) Pedrique, B.; Strub-Wourgaft, N.; Some, C.; Oliaro, P.; Trouiller, P.; Ford, N.; Pécou, B.; Bradol, J. H. The Drug and Vaccine Landscape for Neglected Diseases (2000–11): A Systematic Assessment. *Lancet Glob. Health* **2013**, 1 (6), 371–379.
- (4) World Health Organization. Cancer <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Apr 25, 2018).
- (5) Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2018: Incidência de câncer No Brasil*; 2018.
- (6) Giulianotti, M. A.; Welmaker, G. S.; Houghten, R. A. Shifting from the Single to the Multitarget Paradigm in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, 18, 495–501.
- (7) Namasivayam, V.; Hu, Y.; Balfer, J.; Bajorath, J. Classification of Compounds with Distinct or Overlapping Multi-Target Activities and Diverse Molecular Mechanisms Using Emerging Chemical Patterns. *J. Chem. Inf. Model.*, **2013**, 53 (6), 1272–1281.
- (8) Lu, J.; Pan, W.; Hu, Y.; Wang, Y. Multi-Target Drugs: The Trend of Drug Research and Development. *PLoS ONE*, **2012**, 7 (6).
- (9) Silva Jr, F. P.; Senger, M. R.; Dantas, R. F.; Fraga, C. A. M.. Filtering Promiscuous Compounds in Early Drug Discovery: Is It a Good Idea? *Drug Discov. Today* **2016**, 21 (6), 868–872.
- (10) Leite, A. C. L.; Espíndola, J. W. P.; Cardoso, M. V.; de Oliveira Filho, G. B. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. *Curr Med Chem.* **2018**, 1–30.
- (11) Cohen, J. P.; Sturgeon, G.; Cohen, A. Measuring Progress in Neglected Disease Drug Development. *Clin. Ther.* **2014**, 36 (7), 1037–1042.
- (12) World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed Dec 20, 2017).
- (13) Chatelain, E.; Ioset, J.-R. Phenotypic Screening Approaches for Chagas Disease Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2018**, 13 (2), 141–153.
- (14) Paucar, R.; Moreno-Viguri, E.; Pérez-Silanes, S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. *Curr. Med. Chem.* **2016**, 23 (28), 3154–3170.
- (15) da Silva, E. B.; Pereira, G. A. do N.; Ferreira, R. S. Trypanosomal Cysteine Peptidases: Target Validation and Drug Design Strategies. In: Müller, S.; Cerdan, R.; Radulescu, O.; Selzer, P. M. (Eds.) *Comprehensive Analysis of Parasite Biology: From Metabolism to Drug Discovery*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. **2016**, 121–145.
- (16) da Silva, E. B.; Oliveira e Silva D. A.; Oliveira, A. R.; Mendes, C.H. da S.; dos Santos, T. A.; da Silva, A. C.; de Castro, M. C.; Ferreira, R. S.; Moreira, D. R.; Cardoso, M. V.; de Simone, C. A.; Pereira, V. R.; Lima Leite, A. C. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 130, 39–50.
- (17) Mckerrow, J. H.; Doyle, P. S.; Engel, J. C.; Podust, L. M.; Robertson, S. A.; Ferreira, R.; Saxton, T.; Arkin, M.; Kerr, I. D.; Brinen, L. S.; et al. Two Approaches to Discovering and Developing New Drugs for Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, 104, 263–269.
- (18) Branquinho, M. H.; Oliveira, S. S. C.; Sengenito, L. S.; Sodre, C. L.; Kneipp, L. F.; D'Ávila-Levy, C. M.; Santos, A. L. S. Cruzipain: An Update on Its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Med. Chem.* **2015**, 22 (18), 2225–2235.
- (19) Al-kamel, M. A. N. Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. *Clinl Skin Cancer.* **2017**, 2, 54–58.

- (20) World Health Organization. Leishmaniasis <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- (21) Jain, V.; Jain, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discov. Today*. **2018**, *23*, 161-170.
- (22) Sangshetti, J. N.; Khan, F. A. K.; Kulkarni, A. A.; Arote, R.; Patil, R. H.; Online, V. A. RSC Advances Antileishmanial Drug Discovery : Comprehensive Review of the Last 10 Years. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 32376–32415.
- (23) World Health Organization. Schistosomiasis [who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/) (accessed Sep 11, 2017).
- (24) Neves, B. J.; Braga, R. C.; Bezerra, J. C. B.; Cravo, P. V. L.; Andrade, C. H. *In Silico* Repositioning-Chemogenomics Strategy Identifies New Drugs with Potential Activity against Multiple Life Stages of *Schistosoma* *Mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9* (1).
- (25) Casavechia, G. M.; Melo G de, de A.; Silva Fernandes ACB, D.; Castro, D. K.; Silva Santos, D. T.; Juarez Vieira Teixeira, J.; Teresinha Gomes Casavechia, M.; Claudia Bekner Da Silva Fernandes, A.; Reinhold De Castro, K.; Bocchi Pedroso, R.; et al. Systematic Review and Meta-Analysis on *Schistosoma mansoni* Infection Prevalence, and Associated Risk Factors in Brazil. *Parasitology*. **2018** *3*, 1-15.
- (26) Colley, D. G.; Bustinduy, A. L.; Secor, W. E.; King, C. H. Human Schistosomiasis. *The Lancet*, **2014**, *383*, 2253–2264.
- (27) Weerakoon, K. G. A. D.; Gobert, G. N.; Cai, P.; Mcmanus, P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **2015**, *28* (4), 939–967.
- (28) da Silva, V. B. R.; Campos, B. R. K. L.; de Oliveira, J. F.; Decout, J. L.; Alves de Lima, M. do C. Medicinal Chemistry of Antischistosomal Drugs: Praziquantel and Oxamniquine. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (13), 3259–3277.
- (29) Oliveira, S. A.; Barbosa, M. O.; Miranda, C. A. L.; Oliveira, A. R.; Sousa, F. A.; Santiago, E. F.; de Oliveira Filho, G. B.; Gomes, P. A. T de M.; Conceição, J. M.; Brayner, F. A.; Alves, L. C.; Leite, A. C. L. Phthalimido-Thiazole as Privileged Scaffold : Activity against Immature and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **2018**.
- (30) Feitelson, M. A.; Arzumanyan, A.; Kulathinal, R. J.; Blain, S. W.; Holcombe, R. F.; Mahajna, J.; Marino, M.; Martinez-chantar, M. L.; Nawroth, R.; Sanchez-garcia, I.; et al. Seminars in Cancer Biology Sustained Proliferation in Cancer : Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, 25–54.
- (31) Gottesman, M. M.; Lavi, O.; Hall, M. D.; Gillet, J.-P. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 85–102.
- (32) Hu, Y. Molecular Scaffolds with High Propensity to Form Multi-Target Activity Cliffs. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 500–510.
- (33) Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. Privileged Scaffolds for Library Design and Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (3), 347–361.
- (34) Prati, F.; Uliassib, E.; Bolognesi, M. L. Two Diseases, One Approach: Multitarget Drug Discovery in Alzheimer's and Neglected Tropical Diseases. **2014**, *5* (7), 853–861.
- (35) Biology, C.; Benedetti, R.; Conte, M.; Iside, C.; Altucci, L. The International Journal of Biochemistry Epigenetic-Based Therapy : From Single- to Multi-Target Approaches. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *69*, 121–131.
- (36) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Perspecti V e Multi-Target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. **2008**, *51* (3).
- (37) Paula, D.; Junior, V.; Lago, T. L.; Costa, C. M.; Vaz, S. M.; Rafael, P.; Lima, L. M. S. De; Jr, V. Recent Applications of the Multi-Target Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Revista Virtual de Quimica* **2015**, *7* (2).
- (38) Tao, L.; Zhu, F.; Xu, F.; Chen, Z.; Yang, Y.; Zong, Y. Co-Targeting Cancer Drug Escape Pathways Confers Clinical Advantage for Multi-Target Anticancer Drugs. **2015**, *102*, 123–131.

- (39) Akhtar, J.; Khan, A. A.; Ali, Z.; Haider, R.; Yar, M. S. European Journal of Medicinal Chemistry Structure-Activity Relationship (SAR) Study and Design Strategies of Nitrogen-Containing Heterocyclic Moieties for Their Anticancer Activities. **2017**, 125.
- (40) Das, D.; Sikdar, P.; Bairagi, M. Recent Developments of 2-Aminothiazoles in Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**.
- (41) Popsavin, M.; Koji, V. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and in Vitro Antitumour Activity of Tiazofurin Analogues with Nitrogen Functionalities at the C-2 Position. **2016**, 111, 114–125.
- (42) Khloya, P.; Kumar, S.; Kaushik, P.; Surain, P.; Kaushik, D.; Sharma, P. K. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazolylthiazole Carboxylic Acids as Potent Anti-Inflammatory – Antimicrobial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (6), 1177–1181.
- (43) Sharifzadeh, B.; Mahmoodi, N. O.; Mamaghani, M.; Tabatabaeian, K.; Salimi, A.; Nikokar, I. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Facile Regioselective Synthesis of Novel Bioactive Thiazolyl-Pyrazoline Derivatives via a Three-Component Reaction and Their Antimicrobial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (2), 548–551.
- (44) Cardoso, M. V. de O.; Siqueira, L. R. P. de; Silva, E. B. da; Costa, L. B.; Hernandez, M. Z.; Rabello, M. M.; Ferreira, R. S.; da Cruz, L. F.; Magalhães Moreira, D. R.; Pereira, V. R. A.; et al. 2-Pyridyl Thiazoles as Novel Anti-Trypanosoma Cruzi Agents: Structural Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 86 (1), 48–59.
- (45) De Farias Santiago, E.; De Oliveira, S. A.; De Oliveira Filho, G. B.; Magalhaes Moreira, D. R.; Teixeira Gomes, P. A.; Da Silva, A. L.; De Barros, A. F.; Da Silva, A. C.; Ramos Dos Santos, T. A.; Alves Pereira, V. R.; et al. Evaluation of the Anti-Schistosoma Mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58 (1), 352–363.
- (46) Bekhit, A. A.; Hassan, A. M. M.; Abd, H. A.; Razik, E.; El-miligy, M. M. M.; El-agroudy, E. J.; Bekhit, A. E. A. European Journal of Medicinal Chemistry New Heterocyclic Hybrids of Pyrazole and Its Bioisosteres: Design , Synthesis and Biological Evaluation as Dual Acting Antimalarial-Antileishmanial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 94, 30–44.
- (47) Kamble, R. D.; Meshram, R. J.; Hese, S. V; More, R. A.; Kamble, S. S.; Gacche, R. N.; Dawane, B. S. Synthesis and in Silico Investigation of Thiazoles Bearing Pyrazoles Derivatives as Anti-in Fl Ammatory Agents. *Comput. Biol. Chem.* **2016**, 61, 86–96.
- (48) Martínez-araya, J. I.; Glossman-mitnik, D. The Substituent Effect from the Perspective of Local Hyper-Softness . An Example Applied on Normeloxicam , Meloxicam and 4-Meloxicam : Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, 618, 162–167.
- (49) Favoretto, L. B.; Souza, J. M. O.; Bonfilio, R.; Azevedo, R. de C. P.; Araújo, M. B. de. Validação de Método Espectrofotométrico Na Região Do Uv Para Quantificação de Famotidina Em Cápsulas. *Quim Nova* **2010**, 33 (7), 1585–1589.
- (50) El-desoky, H. S.; Ghoneim, M. M.; Abdel-galeil, M. M. Stripping Voltammetric Methods for Determination of the Antiparasitic Drug Nitazoxanide in Bulk Form, Pharmaceutical Formulation and Human Serum. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21 (4), 669–679.
- (51) Singh, B. K.; Parwate, D. V.; Srivastava, S.; Shukla, S. K. Selective and Non-Extractive Spectrophotometric Determination of Cefdinir in Formulations Based on Donor-Acceptor Complex Formation. *Quim Nova* **2010**, 33 (7), 1471–1475.
- (52) Cruz, M. N. S. De; Soares, R. F.; Marques, S. F. Development and Validation of Analytical Method for Sulfonamide Residues in Eggs by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Based on the Comission Decision 2002/657/EC. **2011**, 22 (3), 454–461.
- (53) Turan-Zitouni, G.; Altintop, M. D.; Ozdemir, A.; Kaplancıklı, Z. A.; Çiftçi, G. A.; Temel, H. E. Synthesis and Evaluation of Bis-Thiazole Derivatives as New Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 107, 288–294.
- (54) Kumar, C. S. C.; Loh, W.; Chandrāju, S.; Win, Y.; Tan, W. K.; Quah, C. K.; Fun, H.-K. Synthesis , Structural and Antioxidant Studies of Some Novel N -Ethyl Phthalimide Esters. *PLoS ONE* **2015**, 1–23.

- (55) Sharma, U.; Kumar, P.; Kumar, N.; Singh, B. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and Their Therapeutic Potential. *Mini Rev Med Chem.* **2010** *10* (8). 678-704
- (56) Veríssimo, M.; Cardoso, D. O.; Rodrigo, D.; Bezerra, G.; Filho, O.; Melo, S.; Cavalcanti, T.; Pontes, W.; Rubio, L.; Cunha, L.; et al. European Journal of Medicinal Chemistry Design , Synthesis and Structure e Activity Relationship of Phthalimides Endowed with Dual Antiproliferative and Immunomodulatory Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 491–503.
- (57) Michel, P.; Ferreira, P.; Marçal, P.; Costa, D. A.; Costa, A. D. E. M.; Jereissati, D.; Lima, B. Cytotoxic and Toxicological Effects of Phthalimide Derivatives on Tumor and Normal Murine Cells. **2015**, *87*, 313–330.
- (58) Alanazi, A. M.; El-Azab, A. S.; Al-Suwaidan, I. A.; ElTahir, K. E. H.; Asiri, Y. A.; Abdel-Aziz, N. I.; Abdel-Aziz, A. A.-M. Structure-Based Design of Phthalimide Derivatives as Potential Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors: Anti-Inflammatory and Analgesic Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 115–123.
- (59) Kaminski, K.; Obniska, J.; Wiklik, B.; Atamanyuk, D. Synthesis and Anticonvulsant Properties of New Acetamide Derivatives of Phthalimide , and Its Saturated Cyclohexane and Norbornene Analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4634–4641.
- (60) Akgün, H.; Karamelekoğlu, İ.; Berk, B.; Kurnaz, I.; Sarıbiyık, G.; Öktem, S.; Kocagöz, T. Synthesis and Antimycobacterial Activity of Some Phthalimide Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (13), 4149–4154.
- (61) Abdel-aziz, A. A.; El-azab, A. S.; Attia, S. M.; Al-obaid, A. M.; Al-omar, M. A.; El-subbagh, H. I. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Cyclic-Imides as Hypoglycaemic , Anti-Hyperlipidemic Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (9), 4324–4329.
- (62) Letícia, M.; Barbosa, D. C.; José, T.; Ramos, F.; Carolina, A.; Arantes, S. De; Martins, M. A.; Machado, P.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Phenyl Sulfonamide Derivatives Designed as Modulators of Pulmonary Inflammatory Response. *Molecules.* **2012**, *1454*, 14651–14672.
- (63) Lamie, P. F.; Philoppes, J. N.; El-Gendy, A. O.; Rarova, L.; Gruz, J. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as in Vitro Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* **2015**, *20* (9), 16620–16642.
- (64) Williams, R.; Manka, J. T.; Rodriguez, A. L.; Vinson, P. N.; Niswender, C. M.; Weaver, C. D.; Jones, C. K.; Conn, P. J.; Lindsley, C. W.; Stauffer, S. R. Synthesis and SAR of Centrally Active MGlU5 Positive Allosteric Modulators Based on an Aryl Acetylenic Bicyclic Lactam Scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (5), 1350–1353.
- (65) Singh, A. K.; Rajendran, V.; Pant, A.; Ghosh, P. C.; Singh, N.; Latha, N.; Garg, S.; Pandey, K. C.; Singh, B. K.; Rathi, B. Design , Synthesis and Biological Evaluation of Functionalized Phthalimides : A New Class of Antimalarials and Inhibitors of Falcipain-2 , a Major Hemoglobinase of Malaria Parasite. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (8), 1817–1827.
- (66) Ding, H. X.; Leverett, C. A.; Kyne, R. E.; Liu, K. K.; Fink, S. J.; Flick, A. C.; Donnell, C. J. O. Synthetic Approaches to the 2013 New Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (9), 1895–1922.
- (67) Oliveira, A. R. Obtenção de novos Ftalil-Tiazóis e Avaliação das Atividades Antitumoral e Imunomodulatória *in vitro*, UFPE, 2014.
- (68) E.-N. Collect, Nonius BV, D. The Netherlands. 1997.
- (69) Otwinowski, Z.; Minor, W. [20] Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- (70) G. Sheldrick, S.-97 and S.-97. Program for X-Ray Crystal Structure Solution and Refinement. Univ. Göttingen 1997.
- (71) Farrugia, L. J. ORTEP-3 for Windows - A Version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30* (5), 565.
- (72) Farrugia, L. J. WinGX Suite for Small-Molecule Single-Crystal Crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32* (4), 837–838.

- (73) Dos Santos Aliança, A. S.; Dos Anjos, K. F. L.; De Vasconcelos Reis, T. N.; Higino, T. M. M.; Brelaz-De-Castro, M. C. A.; Bianco, É. M.; De Figueiredo, R. C. B. Q. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota Mertensii* against *Leishmania Amazonensis*. *Molecules* **2014**, *19* (9), 14052–14065.
- (74) Ramalho-Pinto, F. J.; Gazzinelli, G.; Howells, R. E.; Mota-Santos, T. A.; Figueiredo, E. A.; Pellegrino, J. *Schistosoma mansoni*: *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Exp Parasitol.* **1974**, *36* (3):360-72.
- (75) CHEMICALS, O. G. F. T. O. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/fedddocs/oced/oced_gl423.pdf (accessed Feb 20, 2016).
- (76) Bergman, I.; Loxley, R. O. Y. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. **1963**, *4*, 1961–1965.
- (77) Barbosa, M. L. de C. Otimização Do Protótipo LASSBio-68: Planejamento, Síntese e Caracterização Do Perfil Anti-Inflamatório, UFRJ: Rio de Janeiro, 2009.
- (78) Virtual, R.; Issn, D. Q.; Cas, H.; Oliveira, V. G.; Oliveira, P. H. R. De; Tolentino, N. M. C. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **2015**, *7* (4), 1570–1578.
- (79) Gomes, P. A. T. de M.; Oliveira, A. R.; Cardoso, M.V. de O.; Santiago, E. de F.; Barbosa, M. de O.; de Siqueira, L. R. P.; Moreira, D. R. M.; Bastos, T. M.; Brayner, F. A.; Soares, M. B. P.; Mendes, A.P. de O.; de Castro, M. C. A. B.; Pereira V. R. A.; Lima Leite, A. C. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *111*, 46-57.
- (80) Pessoa, C.; Ferreira, M. P.; Lotufo, V. C.; Moraes, M. O. De; Cavalcanti, M. T.; Coplho, C. D.; Hernandez, M. Z.; Leite, C. L.; Simone, C. A. De; Costa, V. M. A.; et al. Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. *ChemMedChem.* **2010**, *5* (4), 523-528
- (81) De Souza, M. V. N.; Ferreira, S. B.; Mendonça, J. S.; Costa, M.; Rebello, F. R. Métodos de Obtenção e Aplicações Sintéticas de Tiazóis, Uma Importante Classe de Compostos Heterocíclicos. *Química Nova* **2005**, *28* (1), 77–84.
- (82) Gomes, P. A. T.; De Oliveira Barbosa, M.; Farias Santiago, E.; De Oliveira Cardoso, M. V.; Capistrano Costa, N. T.; Hernandez, M. Z.; Moreira, D. R. M.; Da Silva, A. C.; Dos Santos, T. A. R.; Pereira, V. R. A.; et al. New 1,3-Thiazole Derivatives and Their Biological and Ultrastructural Effects on *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 387–398.
- (83) Cardoso, M. V. D. O.; Moreira, D. R. M.; Filho, G. B. O.; Cavalcanti, S. M. T.; Coelho, L. C. D.; Espíndola, J. W. P.; Gonzalez, L. R.; Rabello, M. M.; Hernandez, M. Z.; Ferreira, P. M. P.; et al. Design, Synthesis and Structure–activity Relationship of Phthalimides Endowed with Dual Antiproliferative and Immunomodulatory Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 491–503.
- (84) Zhang, D. N.; Li, J. T.; Song, Y. L.; Liu, H. M.; Li, H. Y. Efficient One-Pot Three-Component Synthesis of N-(4-Arylthiazol-2-Yl) Hydrazones in Water under Ultrasound Irradiation. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19* (3), 475–478.
- (85) Apostolidis, I.; Liaras, K.; Geronikaki, A.; Gavalas, A.; Sokovic, M.; Glamoc, J. Synthesis and Biological Evaluation of Some 5-Arylidene-2-(1,3-Thiazol-Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 532–539.
- (86) Patil, S. A.; Naik, V. H.; Kulkarni, A. D. Spectroscopic, DNA Cleavage and Antimicrobial Studies of Co (II), Ni (II) and Cu (II) Complexes of Sulfur Donor Schiff Bases. *Journal of Sulfur Chemistry.* **2014**, 37–41.
- (87) Pinto, E. G.; Santos, I. O.; Schmidt, T. J.; Borborema, S. E. T.; Ferreira, V. F.; Rocha, D. R.; Tempone, A. G. Potential of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]-Naphthoquinones against *Leishmania* (L.) *infantum*: Biological Activity and Structure-Activity Relationships. *PLoS ONE* **2014**, *9* (8).
- (88) Hernandez, M. Z.; Cavalcanti, S. M. T.; Moreira, D. R. M.; de Azevedo Junior, W. F.; Leite, A. C. L. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11* (3), 303–314.

- (89) Manda, S.; Khan, S. I.; Jain, S. K.; Mohammed, S.; Tekwani, B. L.; Khan, I. A.; Vishwakarma, R. A.; Bharate, S. B. Synthesis, Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of N-Substituted Tetrahydro-??-Carbolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (15), 3247–3250.
- (90) Kima, P. E. The Amastigote Forms of Leishmania Are Experts at Exploiting Host Cell Processes to Establish Infection and Persist. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37* (10), 1087–1096.
- (91) Rottini, M. M.; Amaral, A. C. F.; Ferreira, J. L. P.; Silva, J. R. de A.; Taniwaki, N. N.; Souza, C. da S. F. de; d'Escoffier, L. N.; Almeida-Souza, F.; Hardoim, D. de J.; Gonçalves da Costa, S. C.; et al. In Vitro Evaluation of (-)??-Bisabolol as a Promising Agent against Leishmania Amazonensis. *Exp. Parasitol.* **2015**, *148*, 66–72.
- (92) Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Rosales, M. J.; Muro, B.; Reviriego, F.; Navarro, P.; Arán, V. J.; Sánchez-Moreno, M. In Vitro Leishmanicidal Activity of 1,3-Disubstituted 5-Nitroindazoles. *Acta Trop.* **2015**, *148*, 170–178.
- (93) de Mello, T. F. P.; Bitencourt, H. R.; Pedroso, R. B.; Aristides, S. M. A.; Lonardoni, M. V. C.; Silveira, T. G. V. Leishmanicidal Activity of Synthetic Chalcones in Leishmania (Viannia) Braziliensis. *Exp. Parasitol.* **2014**, *136* (1), 27–34.
- (94) Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K. Leishmaniasis: Current Status of Available Drugs and New Potential Drug Targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, *5* (6), 485–497.
- (95) Oliveira, V. C. S.; Moura, D. M. S.; Lopes, J. A. D.; De Andrade, P. P.; Da Silva, N. H.; Figueiredo, R. C. B. Q. Effects of Essential Oils from Cymbopogon Citratus (DC) Stapf., Lippia Sidoides Cham., and Ocimum Gratissimum L. on Growth and Ultrastructure of Leishmania Chagasi Promastigotes. *Parasitol. Res.* **2009**, *104* (5), 1053–1059.
- (96) Menna-Barreto, R. F. S.; Salomão, K.; Dantas, A. P.; Santa-Rita, R. M.; Soares, M. J.; Barbosa, H. S.; de Castro, S. L. Different Cell Death Pathways Induced by Drugs in Trypanosoma Cruzi: An Ultrastructural Study. *Micron Oxf. Engl.* **2009**, *40*, 157–168.
- (97) Kaczanowski, S.; Sajid, M.; Reece, S. E. Evolution of Apoptosis-like Programmed Cell Death in Unicellular Protozoan Parasites. *Parasit. Vectors* **2011**, *4* (1), 44.
- (98) Salomão, K.; De Santana, N. a; Molina, M. T.; De Castro, S. L.; Menna-Barreto, R. F. S. Trypanosoma Cruzi Mitochondrial Swelling and Membrane Potential Collapse as Primary Evidence of the Mode of Action of Naphthoquinone Analogues. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 196.
- (99) Fidalgo, L. M.; Gille, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (11), 2758–2770.
- (100) Ribeiro, G. A.; Cunha-Júnior, E. F.; Pinheiro, R. O.; da-Silva, S. A. G.; Canto-Cavalheiro, M. M.; da Silva, A. J. M.; Costa, P. R. R.; Netto, C. D.; Melo, R. C. N.; Almeida-Amaral, E. E.; et al. LQB-118, an Orally Active Pterocarpanquinone, Induces Selective Oxidative Stress and Apoptosis in Leishmania Amazonensis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68* (4), 789–799.
- (101) De Macedo-Silva, S. T.; Urbina, J. A.; De Souza, W.; Rodrigues, J. C. F. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against Leishmania Amazonensis. *PLoS ONE* **2013**, *8* (12).
- (102) Islamuddin, M.; Chouhan, G.; Tyagi, M.; Abdin, M. Z.; Sahal, D.; Afrin, F. Leishmanicidal Activities of Artemisia Annua Leaf Essential Oil against Visceral Leishmaniasis. *Front. Microbiol.* **2014**, *5* (November), 626.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: Phthalimido-thiazole as privileged scaffold: activity against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*

Parasitology Research
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5897-4>

ORIGINAL PAPER



Phthalimido-thiazole as privileged scaffold: activity against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*

Sheilla Andrade de Oliveira¹ · Miria de Oliveira Barbosa^{1,2} · Carlos André Laranjeira Miranda Filho² · Arsênio Rodrigues Oliveira² · Fabiano Amaro de Sousa² · Edna de Farias Santiago¹ · Gevanio Bezerra de Oliveira Filho² · Paulo André Teixeira de Moraes Gomes² · Juliana Maria da Conceição² · Fábio André Brayner³ · Luiz Carlos Alves³ · Ana Cristina Lima Leite²

Received: 11 January 2018 / Accepted: 25 April 2018
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Phthalimide, 1,3-thiazole, and thiazolidinone cores are considered privileged scaffolds and represent an attractive starting point to design new bioactive compounds for neglected tropical disease (NTD). Schistosomiasis is a NTD, caused by *Schistosoma* worms which praziquantel (PZQ) is the only drug used to treat humans, but the decrease in the effect after treatment has been reported. Recently, some phthalimide-thiazole derivatives exhibited in vitro antischistosomal activity against adult worms with significant ultrastructural changes and a lower cytotoxic effect on splenocytes. This new biological phthalimido-thiazole profile has motivated us to evaluate a new generation of such molecules in immature and adult worms. Thus, a phthalimido-thiazolidinone derivative, (3c), and three phthalimido-thiazoles (6c, 7a, and 7h) were evaluated concerning their in vitro activity on schistosomulae and adult worms. The results showed that these compounds brought a significant reduction on the mortality, inhibited oviposition, and then induced mortality in immature and adult worms alike. According to scanning electron microscopy, the tegument was the principal target for 7a and 7h and revealed gradual damage to the tegument surface, inducing destruction and decomposition of the tegument in the same areas and exposition of subtegumental tissue and of muscle tissue. Furthermore, they caused less toxicity in splenocytes than PZQ. Compounds 7a and 7h revealed to possess promising activity against larval forms. According to the present study, the privileged structure phthalimido-thiazoles act as a molecular framework that has antischistosomal activity and most form the basis to the next pre-clinical tests.

Keywords *Schistosoma mansoni* · Phthalimido-thiazole · Privileged scaffold · Schistosomiasis

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5897-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ana Cristina Lima Leite
acllb2003@yahoo.com.br

- ¹ Department of Immunology, Laboratory of Immunopathology and Molecular Biology, IAM/FIOCRUZ, Recife, PE CEP: 50670-420, Brazil
- ² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, S/N—Campus da UFPE, Recife, PE CEP: 50740-520, Brazil
- ³ Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Av. Professor Moraes Rego, S/N—Campus da UFPE, Recife, PE CEP: 50670-420, Brazil

Introduction

Schistosomiasis *mansoni* is an acute and chronic parasitic disease caused by blood flukes (trematode worms) of the genus *Schistosoma*. It is included in the neglected diseases list by the World Health Organization (WHO). It is estimated that at least 206.5 million of people required preventive treatment in 2016. Schistosomiasis transmission has been reported from 78 countries; however, only 52 endemic countries with moderate-to-high transmission have access to preventive chemotherapy for schistosomiasis (WHO 2018). Over the last several decades, praziquantel (PZQ) has been the chemotherapeutic of choice for the control and treatment of schistosomiasis. However, the lack of efficacy in the drug to prevent reinfection and the

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO: *In vitro* evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives

European Journal of Pharmaceutical Sciences 105 (2017) 1–10



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps



In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives



Amanda Silva dos Santos Aliança^{a,c,1}, Arsênio Rodrigues Oliveira^{b,*,1},
Ana Paula Sampaio Feitosa^a, Karla Raíza Cardoso Ribeiro^a,
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^{d,e}, Ana Cristina Lima Leite^b, Luiz Carlos Alves^a,
Fábio André Brayner^{a,c}

^a Laboratório de Imunologia Keizo Asami-LIKA/UFPE and Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, PE CEP: 50670-420, Brazil

^b Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences (UFPE), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE CEP: 50740-520, Brazil

^c Post Graduate Program in Tropical Medicine (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE CEP: 50670-901, Brazil

^d Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, PE CEP: 50670-420, Brazil

^e Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Pernambuco-CAV, Vitória de Santo Antão, PE CEP: 55608-680, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leishmaniasis
Visceral Leishmaniasis
Leishmania infantum
Thiazoles
Phthalimide derivatives

ABSTRACT

It is estimated that the worldwide prevalence of leishmaniasis is around 12 million individuals in 80 countries, with 400,000 new cases per year. In the search for new leishmanicidal agents, the hybrid phthalimido-thiazoles have been identified as an important scaffold for drug design and discovery. The present study thus reports the *in vitro* activity of a series of phthalimido-thiazole derivatives. Cytotoxicity against a strain of *L. infantum*, Vero cells, J774 macrophages and peritoneal macrophages was evaluated, as well as nitric oxide (NO) production. Activity against amastigote and promastigote forms of *L. infantum* and microscopic changes in the parasite and intracellular targets of the parasite were achieved. The results show that the compounds arising from hybridization of phthalimide and 1,3-thiazole exhibit promising leishmanicidal activity. Compounds 2j and 2m were the most potent of the series tested and the parasites treated with these compounds exhibited ultrastructural changes, such as cell body shrinkage, loss of cellular membrane integrity, vacuolization of cytoplasm, membrane profiles surrounding organelles and swelling of mitochondria. The data showed that these compounds reduced the survival of intracellular amastigotes and presented low toxicity for mammalian cells. The compounds produced increased NO production compared to untreated cells in non-infected macrophages. Treated promastigote forms showed an increase in the number of cells stained with propidium iodide. The compounds brought about significant changes in mitochondrial membrane potential. According to the present study, phthalimido-thiazole compounds exhibit leishmanicidal activity and could be used to develop novel antileishmaniasis drugs and explore potential molecular targets.

1. Introduction

Leishmania infantum is the etiological agent of Visceral Leishmaniasis in the Americas, Europe and parts of Africa. The disease affects individuals of all age-groups and can lead to death if not treated (da Silva et al., 2012).

The first treatment of choice for leishmaniasis has been based on pentavalent antimonials (Marín et al., 2015). Second choice drugs include Amphotericin B, Pentamidine and Miltefosine (Cavalli and

Bolognesi, 2009; Espuelas et al., 2012; Santos et al., 2008; Srividya et al., 2012). Most treatments are inadequate owing to factors such as low therapeutic index leading to high toxicity and side effects, emergence of resistant parasites, high costs beyond the means of affected countries, and others. These disadvantages, together with the lack of an effective vaccine, indicate the need to investigate new drugs (Cavalli and Bolognesi, 2009; Espuelas et al., 2012).

The literature reports that the 1,3-thiazole nucleus is widely found in a variety of pharmacologically active substances and in some

* Corresponding author.

E-mail address: arsenio3000@hotmail.com (A.R. Oliveira).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>

Received 12 January 2017; Received in revised form 7 April 2017; Accepted 3 May 2017

Available online 04 May 2017

0928-0987/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: Desing and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death

European Journal of Medicinal Chemistry 130 (2017) 39–50



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Desing and synthesis of potent *anti-Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death



Elany Barbosa da Silva ^{a,b}, Dayane Albuquerque Oliveira e Silva ^a,
 Arsênio Rodrigues Oliveira ^a, Carlos Henrique da Silva Mendes ^a,
 Thiago André Ramos dos Santos ^c, Aline Caroline da Silva ^c,
 Maria Carolina Acioly de Castro ^{c,d}, Rafaela Salgado Ferreira ^b,
 Diogo Rodrigo Magalhães Moreira ^e, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso ^f,
 Carlos Alberto de Simone ^g, Valéria Régio Alves Pereira ^c, Ana Cristina Lima Leite ^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420, Recife, PE, Brazil

^d Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^e Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 40296-750, Salvador, BA, Brazil

^f Colegiado de Nutrição, Campus Petrolina, Universidade de Pernambuco, 56328-903, Petrolina, PE, Brazil

^g Departamento de Física e Informática, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2016

Received in revised form

9 February 2017

Accepted 10 February 2017

Available online 16 February 2017

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Nonclassical bioisosterism

Thiazoles

Pyridine derivatives

Apoptosis

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the kinetoplastid protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, remains a relevant cause of illness and premature death and it is estimated that 6 million to 7 million people are infected worldwide. Although chemotherapy options are limited presenting serious problems, such as low efficacy and high toxicity, *T. cruzi* is susceptible to thiazoles, making this class of compounds appealing for drug development. Previously, thiazoles resulted in an increase in *anti-T. cruzi* activity in comparison to thiosemicarbazones. Here, we report the structural planning, synthesis and *anti-T. cruzi* evaluation of new thiazoles derivatives (**3a-m** and **4a-m**), designed from molecular hybridization associated with non-classical bioisosterism. By varying substituents attached to the phenyl and thiazole rings, substituents were observed to retain, enhance or greatly increase their *anti-T. cruzi* activity, in comparison to the corresponding thiosemicarbazones. In most cases, electron-withdrawing substituents, such as bromine, 3,4-dichloro and nitro groups, greatly increased antiparasitic activity. Specifically, new thiazoles were identified that inhibit the epimastigote proliferation and were toxic for trypomastigotes without affecting macrophages viability. These compounds were also evaluated against cruzain. However, inhibition of this enzyme was not observed, suggesting that the compounds work through another mechanism. In addition, examination of *T. cruzi* cell death showed that these molecules induce apoptosis. In conclusion, except for compounds **3h** and **3k**, all thiazoles derivatives evaluated exhibited higher cytotoxic activity against the trypomastigote forms than the reference medicament benznidazole, without affecting macrophages viability. Compounds **4d** and **4k** were highlights, CC50 = 1.2 e 1.6 μ M, respectively. Mechanistically, these compounds do not inhibit the cruzain, but induce *T. cruzi* cell death by an apoptotic process, being considered a good starting point for the development of new *anti-Chagas* drug candidates.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease, caused by the kinetoplastid protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), remains a relevant cause of illness and premature death with 6 million to 7 million people estimated to be

* Corresponding author.

E-mail address: acfb2003@yahoo.com.br (A.C.L. Leite).

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO: Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*

European Journal of Medicinal Chemistry 111 (2016) 46–57



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Research paper

Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*



Paulo André Teixeira de Moraes Gomes^a, Arsênio Rodrigues Oliveira^a,
Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso^a, Edna de Farias Santiago^a,
Miria de Oliveira Barbosa^a, Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira^a,
Diogo Rodrigo Magalhães Moreira^b, Tanira Matutino Bastos^b, Fábio André Brayner^c,
Milena Botelho Pereira Soares^{b,d}, Andresa Pereira de Oliveira Mendes^e,
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^e, Valéria Rego Alves Pereira^e,
Ana Cristina Lima Leite^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

^b Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CEP 40296-710 Salvador, BA, Brazil

^c Laboratório de Imunologia Keizo Asami-LIKA/UFPE, CEP, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^d Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Avenida São Rafael, 2152, São Marcos, CEP 41253-190, Salvador BA, Brazil

^e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, CEP, 50670-420 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2015

Received in revised form

21 December 2015

Accepted 9 January 2016

Available online 11 January 2016

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Thiazole

Hydrazone

Phthalimide

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic infection caused by protozoan *Trypanosoma cruzi* that affects approximately 6–7 million people worldwide. Benznidazole is the only drug approved for treatment during the acute and asymptomatic chronic phases; however, its efficacy during the symptomatic chronic phase is controversial. The present work reports the synthesis and anti-*T. cruzi* activities of a novel series of phthalimido-thiazoles. Some of these compounds showed potent inhibition of the trypomastigote form of the parasite at low cytotoxicity concentrations in spleen cells, and the resulting structure-activity relationships are discussed. We also showed that phthalimido-thiazoles induced ultrastructural alterations on morphology, flagellum shortening, chromatin condensation, mitochondria swelling, reservoirs alterations and endoplasmic reticulum dilation. Together, these data revealed, for the first time, a novel series of phthalimido-thiazoles-structure-based compounds with potential effects against *T. cruzi* and lead-like characteristics against Chagas disease.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Approximately 6–7 million people are estimated to be infected worldwide, mostly in Latin America, where Chagas disease is endemic [1].

Despite the efforts of many investigators to research new anti-Chagas drugs, only one drug is currently used in therapy, benznidazole (Bdz) [2,3]. Current chemotherapy for Chagas disease is unsatisfactory due to the limited efficacy of Bdz, particularly during

the chronic phase, with frequent side effects that can lead to discontinuation of treatment [4].

One pragmatic way to improve the quality of both the candidate drugs and screening collections is by improving the quality of the building blocks (reagents) that are used to synthesize them. Our strategic program focused on substructures and properties that are known to have imparted biological activity and good 'drug-like' properties previously. Among the chemical groups explored for anti-Chagas activity, thiazolyl hydrazones are noteworthy because of their wide biological, especially anti-parasitic, activities [5–8]. Caputo et al. have demonstrated trypanocidal activity for a series of 4-arylthiazolylhydrazones [9], which have broad and potent activities for all forms of the parasite.

Our efforts toward new antichagasic drugs since 2006 have led

* Corresponding author.

E-mail address: acllb2003@yahoo.com.br (A.C.L. Leite).

APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO: Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties



MedChemComm

CONCISE ARTICLE

View Article Online
View Journal | View Issue

Novel phthalimide derivatives with TNF- α and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties

Cite this: *Med. Chem. Commun.*, 2014, 5, 758

Lucas Cunha Duarte Coêlho,^a Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso,^a Diogo Rodrigo Magalhães Moreira,^a Paulo André Teixeira de Moraes Gomes,^a Suellen Melo Tibúrcio Cavalcanti,^a Arsenio Rodrigues Oliveira,^a Gevanio Bezerra de Oliveira Filho,^a Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira,^a Miria de Oliveira Barbosa,^a Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba,^b Teresinha Gonçalves da Silva,^b Belinda Kaskow,^c Mahdad Karimi,^c Lawrence J. Abraham^d and Ana Cristina Lima Leite^{*a}

Modulation of the immune system is an emerging concept in the control of tumor growth. Bearing in mind the pharmacological properties of thalidomide and its phthalimide derivatives, we describe here the structural design, synthesis and pharmacological evaluation of *N*-acylhydrazones derived from phthalimide. The ability of these *N*-acylhydrazones in inhibiting the secretion of TNF- α in stimulated cells as well as in inhibiting the transcription of the TNF- α gene was evaluated. We identified *N*-acylhydrazones **6b** and **9c**, which substantially impaired TNF- α secretion, expression and reduced IL-1 β production similar to thalidomide or Revlimid. *N*-Acylhydrazone **9c** was also able to induce apoptosis in Jurkat cells, however it does not have either antiproliferative properties or cytotoxicity for mouse splenocytes. Beyond that, we have assayed the ability of these compounds to induce cell death and a number of them are able to induce apoptosis.

Received 19th February 2014
Accepted 28th March 2014

DOI: 10.1039/c4md00070f

www.rsc.org/medchemcomm

Introduction

The immune system's role in cancer involves many different mechanisms, such as minimizing metastasis by attenuating the expression of pro-angiogenic factors. Another aspect is the enhancement of antitumor immunity facilitated by interferons and interleukins. Overall, reducing inflammation by modulating the immune response is important over the course of cancer. In light of these possibilities, the identification of immunomodulating agents is a task that is receiving a great deal of attention. In this way, a variety of cytokines, including IL-1 and tumor necrosis factor (TNF), play different roles as regulators of immune, inflammatory, and growth responses.¹ IL-1 ligands (IL-1 α and IL-1 β , collectively referred to as IL-1) are pluripotent, proinflammatory cytokines that orchestrate inflammatory and host defense responses in the body.² IL-1

increases T-cell responses to mitogens (and indirectly activates B cells), increases expression of vascular adhesion molecules, and induces a number of other proinflammatory cytokines, chemokines, and inflammation-associated molecules that form an amplifying cascade to stimulate an immune response.² Tumor necrosis factor (TNF) can kill cells by apoptosis, and this ability to induce apoptosis is presently the most intensely studied area of TNF research.³

A series of recent papers has provided new hope that TNF could yet be useful as an anti-tumor cytokine.^{4–8} The manipulation of signaling pathways downstream of TNF receptor (TNF-R) activation showed that TNF negatively regulates its own ability to induce apoptosis. However, despite considerable incentives, viable leads for analogous small-molecule inhibitors of TNF have not been reported.⁸

Phthalimide derivatives have been attracting considerable attention since 1979 when Chapman Jr *et al.* showed that *N*-substituted phthalimides possess hypolipidemic activity.⁹ Two years later, Hall *et al.* examined 12 imide analogs and proposed that phthalimides are able to inhibit acetyl CoA carboxylase activity.¹⁰ The same group investigated 10 *N*-aryl-phthalimides and found that *o*-(*N*-phthalimido)acetophenone lowered both serum cholesterol and triglyceride levels by 57% and 44% after 16 and 14 days of treatment in Swiss white mice.¹¹ This class of compounds is also endowed with anti-

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil. E-mail: acilb2003@yahoo.com.br

^bDepartamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

^cThe School of Chemistry & Biochemistry, The University of Western Australia, Crawley, WA 6009, Australia

^dSchool of Pathology & Laboratory Medicine, The University of Western Australia, Crawley, WA 6009, Australia

APÊNDICE F – ARTIGO SUBMETIDO: *In vitro* and *in vivo* activities of multi-target phtalimido-thiazoles on Schistosomiasis mansoni

05/06/2018

AAC01171-18



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

PUBLICATIONS EVENTS SCIENCE SKILLS CAREERS MEMBERSHIP PUBLIC POLICY

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

Manuscript Submission
and Peer Review System

Home Help for Authors Help for Reviewers Contact Us Logout

Manuscript #	AAC01171-18
Current Revision #	0
Submission Date	2018-06-05 13:28:15
Current Stage	Initial QC
Title	In vitro and in vivo activities of multi-target phtalimido-thiazoles on <i>Schistosomiasis mansoni</i> .
Running Title	Phtalimido-thiazoles on <i>Schistosomiasis mansoni</i> .
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Experimental Therapeutics
Corresponding Author	Sheilla ANDRADE DE Oliveira (Instituto Aggeu Magalhães)
Contributing Authors	Sheilla ANDRADE DE Oliveira (corr-auth), Carlos André Laranjeira Miranda Filho, Ms. Miria de Oliveira Barbosa, Arsênio Rodrigues Oliveira, Mrs. Edna de Farias Santiago, Ms. Veruska Cintia Alexandrino de Souza, Camila Juliet Barbosa Fernandes, Ignes Regina dos Santos, Renata Lins Carneiro Leão, Fábio André Brayner dos Santos, Mr. Luiz Carlos Alves, Valéria Rego Alves Pereira, Roni Evêncio de Araújo, Prof. Ana Cristina Lima Leite
Abstract	Schistosomicidal activity of six phtalimido-thiazoles derivatives with substitutions at the position three of the thiazole ring were analyzed in an experimental model. The substituents biphenyl (2i) and 2- naphthyl (2j) at a concentration of 80 µg/mL caused 100% mortality of the parasite in culture after 24 hours and 48 hours respectively. An evaluation of ultrastructural parasites showed damage in the tegument, formation of bubbles and partial destruction of the tubercles. The in vivo anti-parasitic activity with the derivate 2i was performed by administering it orally and intraperitoneally in a 400mg/kg/5days regimen. Decreases in the number of eggs in the gut (45.1%) and a reduction of the percentage of mature (23.7%) and unviable (53.8%) eggs were observed. Our results also showed a reduction in the number of recovered worms after treatment with 2i (oral administration: 81, 25%). The results demonstrated that the prototypes which were tested had a significant anti-schistosomal effect against <i>S. mansoni</i> , suggesting that these derivatives are promising candidates for further research into the chemotherapy of schistosomiasis.
Editor	Not Assigned
Suggested Reviewers to Include	Milena Botelho Pereira Soares (Instituto Gonçalo Muniz / FIOCRUZ), David L. Williams (Illinois State University), Mitermayer Galvão dos Reis (Instituto Gonçalo Muniz / FIOCRUZ)
Suggested Reviewers to Exclude	N/A
Keywords	Schistosomiasis mansoni, Chemotherapy, phtalimido-thiazoles, experimental model, In vitro, in vivo
Research Areas	Parasitology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Preprint Server	No
Biorxiv Preprint	No
Funding Sources	No Funders
Data Citation	Are the data sets and/or code used in the experiments and studies described in this submission identified and cited in the manuscript and reference list in accord with ASM's Data Citation Policy ? Yes

Manuscript Items

1. Author Cover Letter (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(94KB\)](#)
2. Manuscript Text File (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(132KB\)](#)
3. Merged File containing manuscript text, 6 Figure files and 4 Table files. (last updated: 06/01/2018 14:19:08) [PDF \(2820KB\)](#)
- a. Manuscript Text File (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(132KB\)](#)
- b. Figure - 1 (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(162KB\)](#)
- c. Figure - 2 (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(373KB\)](#)
- d. Figure - 3 (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(945KB\)](#)
- e. Figure - 4 (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(858KB\)](#)
- f. Figure - 5 (last updated: 06/01/2018 14:19:29) [PDF \(859KB\)](#)
- g. Figure - 6 (last updated: 06/01/2018 14:19:30) [PDF \(161KB\)](#)
- h. Table - 1 (last updated: 06/01/2018 14:19:30) [PDF \(270KB\)](#)
- i. Table - 2 (last updated: 06/01/2018 14:19:30) [PDF \(159KB\)](#)
- j. Table - 3 (last updated: 06/01/2018 14:19:30) [PDF \(430KB\)](#)
- k. Table - 4 (last updated: 06/01/2018 14:19:30) [PDF \(147KB\)](#)

More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)
[Check Status](#)

HELP FOR AUTHORS

Submission Instructions
Instructions to Authors
Ethics Portal
Contact Staff

HELP FOR REVIEWERS

Review Process
Reviewer Guidelines
Contact an Editor

ABOUT ASM

Governance

ASM PRESS

MEETINGS

Microbe
Biothreats
Clinical Virology Symposium

ASMCUE

ABRCMS
ASM Conferences

MANAGE YOUR PROFILE

SIGN UP

COURSES & PROGRAMS

Biology Scholars
Hospital Infections Course
Young Ambassadors
Careers in Microbial Sciences
Program
Distinguished Lecturers
Culture of Responsibility

BLOGS

bLog phase
Zika Diaries

CONNECT WITH ASM

Facebook
 Twitter
 Instagram
 LinkedIn
 International Groups
 YouTube
 iTunes

CONTACT ASM

Staff Directory
Find a local branch
Find a BioResource Center
Find your Country
Ambassador

APÊNDICE G – ARTIGO SUBMETIDO: *In silico* and *in vitro* evidences of anticancer and immunomodulatory effects of phthalimide derivatives on colon cancer cells

Manuscript Details

Manuscript number	BIOPHA_2018_3005
Title	In silico and in vitro evidences of anticancer and immunomodulatory effects of phthalimide derivatives on colon cancer cells.
Article type	Research Paper

Abstract

Cancer remains a major cause of death worldwide and was the cause of 8.8 million deaths in 2015, and colorectal cancer is the third most prevalent. Development of small molecules with biological activity is important because it provides new alternatives for cancer treatment. Thalidomide is a synthetic compound most known for its involvement in a big pharmacological disaster, after its use for morning sickness by pregnant women. Despite this notorious episode involving teratogenesis, thalidomide was rediscovered, and now is used for the treatment of several diseases. Notably, thalidomide structure may serve as an interesting scaffold for the development of new phthalimide derivatives, and it presents a diverse amount of pharmacologic effects, including anti-neoplastic, epigenetic, anti-angiogenic and anti-inflammatory properties. The aim of this work was to evaluate a series of thalidomide analogs for its antitumor effects and immunomodulatory properties through in vitro and in silico approaches. The series concern 14 molecules, which have a common phthalimide core and vary in some substituents. Cytotoxic effects were assessed with colon cancer cell lines and Vero cells by MTT assay. Cytometric Bead Array (CBA) was used to detect Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles in supernatants of mice splenocytes stimulated with each compound at CC50 after 24 h, 48 h, 72 h and six days of incubation. Compounds tested revealed toxicity and selectivity to tumor cells when compared to thalidomide, with CC50 values between 25 μ L e 274.9 μ L. Compounds also shown remarkable immunomodulatory effects, especially in the modulation of TNF and IL-10, key cytokines in development and progression of colorectal cancer. In order to evaluate a possible correlation between in vitro effects and the IKK β protein, an important player in NF- κ B signaling pathway, we performed molecular docking calculations with IKK β as target. Through molecular docking was possible to describe the molecular interactions between compounds from AS series and amino acid residues in the active site of the protein IKK β , which demonstrated good correlation with in vitro results. After analyzing all results, compound 2k stood out, with the better toxicity, high selectivity and high induction of decrease TNF production when compared to the other series compounds. Results corroborate the expected anticancer and immunomodulatory activities of thalidomide analogs, with a possible interaction with IKK β protein.

Keywords	Colon Cancer; Immunomodulation; Phthalimide; IKK β protein.
Manuscript region of origin	South America
Corresponding Author	Thiago Santos
Corresponding Author's Institution	Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães.
Order of Authors	Thiago Santos, Aline Silva, Arsênio Oliveira, Marcelo Montenegro Rabello, Marcelo Zaldini Hernandez, Ana Leite, Valéria Rêgo Alves Pereira
Suggested reviewers	Alireza Aliabadi, Nara Quintão, Chung-Hang Leung

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]	
Cover letter_TARS.pdf [Cover Letter]	
Research_paper_TARS.docx [Manuscript File]	

APÊNDICE H – ARTIGO SUBMETIDO: Synthesis and the anti-*Trypanosoma cruzi* profile of new 1,3-thiazole and 4-thiazolidinone derivatives

Elsevier Editorial System(tm) for Arabian
Journal of Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Synthesis and the anti-*Trypanosoma cruzi* profile of new 1,3-thiazole and 4-thiazolidinone derivatives

Article Type: Original Article

Keywords: Chagas disease; Anti-T. cruzi agents; thiosemicarbazone; 1,3-thiazoles; 4-thiazolidinone.

Corresponding Author: Dr. Ana Cristina Lima Leite, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco

First Author: Lucianna Siqueira

Order of Authors: Lucianna Siqueira; Míria O Barbosa; Arsênio R Oliveira; Paulo André T Gomes; Ighes R Santos; Marcos V O Cardoso, Ph.D.; Valéria R Pereira; Aline C Santos; Policarpo A Sales Júnior; Alvaro J Romanha; Ana C Leite

Abstract: Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a serious public health problem in Brazil and worldwide. Currently, about 7 million people are infected mostly in the Americas. The only drug used to treat this disease is benznidazole, however, this drug is only effective in the acute phase of the disease. This paper reports the synthesis and the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 4-thiazolidinone and 1,3-thiazole derivatives of thiosemicarbazones previously described as a potent trypanocidal agent, planned through the bioisosterism strategy. Therefore, the synthesis of 28 aryl-4-thiazolidinones (2a-r and 3a-j) was achieved, which aryl ring possesses halogens atoms in meta and para positions, and the heterocyclic system had lipophilic substituents. These compounds were thus evaluated as anti-T. cruzi agents against epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of T. cruzi. Compounds were also tested its toxicity in L929 fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. In view to investigate a bioisosteric relationship between 1,3-thiazoles and 4-thiazolidinones, eighteen 1,3-thiazoles derived from trifluoromethyl thiosemicarbazone (4a-r) were also tested in the same model. It was possible to show that between the 36 tested compounds, those that possess a bromine (2a-r) atom showed better activity compared to compounds substituted by a fluorine (3a-j) and to 1,3-thiazole derivatives (4a-r), which were inactive. In general, the 2a-r series showed low toxic profile in the two cells line tested. Besides, compound 2h was the most active of then when compared to the standard benznidazole.

Suggested Reviewers: Albert Chan
bcachan@inet.polyu.edu.hk

Thomas Huhn
thomas.huhn@uni-konstanz.de

APÊNDICE I – PEDIDO DE PATENTE: Composto ftalimido-tiazol, processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazóis e uso de composto na preparação de um medicamento para tratar esquistossomose



07/06/2017 870170038620
12:07

00.000.2.2.16.0651563.7

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 012060 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Pernambuco

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSTO FTALIMIDO-TIAZOL, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS FTALIMIDO-TIAZÓIS E USO DE COMPOSTO NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAR ESQUISTOSSOMOSE

Resumo: Novos compostos ftalimido-tiazóis representando substâncias de efeitos farmacológicos ativos, com atividade esquistossomicida, e seu uso terapêutico como drogas dotadas de ação contra o *Schistosoma mansoni*.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 07/06/2017 às 12:07, Petição 870170038620

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8**Nome:** ANA CRISTINA LIMA LEITE**CPF:** 38794101434**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Setúbal, nº 1245, apto. 502, Boa Viagem**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 51030-010**País:** BRASIL**Telefone:** (81) 212 68511**Fax:****Email:** acllb2003@yahoo.com.br**Inventor 2 de 8****Nome:** ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA**CPF:** 08257290416**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** Rua Professor Chaves Batista, nº 382, apto. 101, Várzea**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50740-030**País:** BRASIL**Telefone:** (81) 996 727334**Fax:****Email:** arsenio3000@hotmail.com**Inventor 3 de 8****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 07/06/2017 às 12:07, Petição 870170038620

APÊNDICE J – PEDIDO DE PATENTE: Processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ftalimido-*bis*-tiazóis úteis no tratamento antineoplásico



POSITIVA
DIRETORIA DE INOVAÇÃO

Universidade Federal de Pernambuco
Diretoria de Inovação

COMPROVANTE DE RECEBIMENTO DE DOCUMENTOS

Declaro para os devidos fins que esta diretoria recebeu hoje, dia 03/04/2018, Comunicado de Invenção da solicitação para depósito do Pedido de Patente de título: “Processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ftalimidos-*bis*-tiazóis úteis no tratamento antineoplásico”.

Para:

- (X) estudo por esta diretoria;
- (X) busca prévia;
- (X) análise e emissão de parecer de patenteabilidade;
- (X) depósito dos documentos para Pedido de Patente de Invenção.

A presente solicitação pertence a um grupo tendo como inventora vinculada à UFPE Ana Cristina Lima Leite, portadora do RG: 2.649.103 SSP/PE e CPF: 387.941.014-34, nascida em Pernambuco, estado civil: separado. A referida é professora da UFPE, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde.

Os outros membros do Grupo, coinventores da tecnologia são: Larissa Pelágia de Lima Ferreira , Arsênio Rodrigues Oliveira , Luciana Rabelo Pessoa de Siqueira , Marcius Vinicius de Oliveira Silva , Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego , Flaviana Alves dos Santos , Maíra Galdino da Rocha Pitta.

Recife, 03 de abril de 2018.

Atenciosamente,

Ana Carolina Borba Fernandes Padrão
Assistente em Administração
SIAPE 2156155
UFPE

APÊNDICE K – PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS



Natal, 26 a 29 de maio de 2014

ATESTADO

Atestamos que o trabalho "Avaliação antichagásica e citotóxica de novos derivados ftalil-tiazóis", autoria de Oliveira, A. R.; Silva, E. B.; Siqueira, L. R. P.; Barbosa, M. O.; Espíndola, J. W. P.; Gonzalez, L. R.; Silva, T. G. J.; Gomes, P. A. T. M.; Silva, A. C.; Moreira, D. R. M.; Pereira, V. R. A.; Leite, A. C. L. foi apresentado na forma de pôster durante a 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Natal, 29 de maio de 2014.

Vitor F. Ferreira
Presidente da SBQ
37ª Reunião Anual da SBQ

Aldo J. G. Zarbin
Presidente da Comissão Organizadora
37ª Reunião Anual da SBQ



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SÉRIE INÉDITA DE COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE Leishmania infantum.

Tendo como autores: **Amanda Silva dos Santos Aliança, ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA, ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA, CAMILA MARQUES QUEIROZ, ANA CRISTINA LIMA LEITE, LUIZ CARLOS ALVES, FÁBIO ANDRÉ BRAYNER**, foi apresentado no 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, como **Pôster** na categoria Doenças por protozoários.

Fortaleza, 17 de junho de 2015.

Mitermayer Galvão dos Reis
Presidente da SBMT

Ivo Castelo Branco Coelho
Presidente do Congresso

Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti
Presidente da Comissão Científica



Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse o link <http://medtrop2015.gninus.com.br/certificado> e informe o código: 07075492



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado

Chagas disease in Brazil: analysis of hospitalizations, acute cases and chronological series of mortality in the last 15 years

dos autores

Gevanio Bezerra de Oliveira Filho; Ulisses José Felix Tenório Oliveira; Arsênio Rodrigues Oliveira; Miria de Oliveira Barbosa; Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira; Marcius Vinícius de Oliveira Silva; Ana Cristina Lima Leite

foi apresentado na área de Doenças de Chagas

na forma de Poster durante o 52º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, realizado no período de 21 a 24 de agosto, no Centro Cultural e de Exposição Ruth Cardoso em Maceió/AL.

Maceió, 24 de agosto de 2016.


Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda
 Presidente da Sociedade
 Brasileira de Medicina Tropical


Fernando de Araújo Pedrosa
 Presidente do 52º MedTrop

4º EBIT



ENCONTRO BRASILEIRO PARA
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CERTIFICADO

REALIZAÇÃO



ISG
Instituto
Suely Galdino

PPG
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Certificamos que L. P. L. FERREIRA, A. R. OLIVEIRA, L. R. P. de SIQUEIRA, M. O. BARBOSA, M. V. O. SILVA, F. A. dos SANTOS, M. G. R. PITTA, M. J. B. M. RÊGO e A. C. L. LEITE apresentaram o trabalho intitulado AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS HÍBRIDOS DE FTALIMIDA E TIAZOL na modalidade pôster, no 4º Encontro Brasileiro para Inovação.

Jaboatão dos Guararapes, 19 de Novembro de 2016.

APOIO





Presidente
Maira Galdino da Rocha Pitta



SECRETARIA DE
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO

MINISTÉRIO DA
SAÚDE

GP2A | **25th Annual Medicinal
2017 Chemistry Conference**

This is to confirm that

Arsênio Rodrigues Oliveira

Attended the 25th GP2A Annual Medicinal Chemistry
Conference in Liverpool (31st August-1st September 2017)

Susan E. Matthews

Dr Susan E. Matthews

(on behalf of the organising committee)



INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

Université d'Orléans - CNRS - UMR 7311

The organising committee of the YRFM 2018
Mail : young.medchem@sct-asso.fr

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

The organising committee of the YRFM 2018 certifies that :
Arsênio RODRIGUES OLIVEIRA
participated in the 25th Young Research Fellows meeting, 5-7 March 2018

Orléans, March 5th 2018

Samia Aci-Sèche
For the organizing committee of the YRFM 2018