

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

DIEGO RODRIGUES CRAVO TEIXEIRA

**PLANEJAMENTO FATORIAL E ESTUDOS PARA ESCALONAMENTO DE UM
NOVO AGONISTA PARCIAL DE PPAR γ , LPSF GQ-16**

Recife

2018

DIEGO RODRIGUES CRAVO TEIXEIRA

**PLANEJAMENTO FATORIAL E ESTUDOS PARA ESCALONAMENTO DE UM
NOVO AGONISTA PARCIAL DE PPAR γ , LPSF GQ-16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof^o. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Teixeira, Diego Rodrigues Cravo

Planejamento fatorial e estudos para escalonamento de um novo agonista parcial de PPAR γ , LPSF GQ-16 / Diego Rodrigues Cravo Teixeira - 2018.

107 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Diabetes 2. Tiazolidinadionas 3. Fármacos
I. Pitta, Ivan da Rocha (orient.) II. Título

547.594

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-299

DIEGO RODRIGUES CRAVO TEIXEIRA

**PLANEJAMENTO FATORIAL E ESTUDOS PARA ESCALONAMENTO DE UM
NOVO AGONISTA PARCIAL DE PPAR γ , LPSF GQ-16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 21/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Ivan da Rocha Pitta (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Douglas Carvalho Francisco Viana
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, pesquisador do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio e incentivo e durante a condução da dissertação.

A Profa. Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta pesquisadora do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos pela contribuição durante todo o trabalho desenvolvido.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo financiamento, pelo auxílio financeiro que operacionalizou o estudo.

Agradeço aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos.

A Paulo Germano Moreira de Brito, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pela colaboração demonstrada durante todo o curso.

A todos aqueles não mencionados que, de alguma maneira, contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

As tiazolidinonas (TZDs) são agonistas dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma gama (PPAR γ), utilizados no tratamento da diabetes mellitus, melhoram a resistência à insulina e são eficazes na prevenção da progressão de doença renal em diferentes modelos experimentais. Esta proteção parece ser secundária ao efeito anti-inflamatório das TZDs. Infelizmente, estes ligantes também apresentam efeitos indesejáveis, tais como ganho de peso, edema e cardiotoxicidade. No Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) foi desenvolvido um promissor agonista parcial de PPAR γ , o LPSF GQ-16, que apresenta atividade antidiabética semelhante a outras TZDs, mas sem induzir ganho de peso ou edema. Nesse sentido, este trabalho teve como finalidade o estudo de fatores de influência da síntese do LPSF GQ-16, analisando quais fatores influenciam de maneira positiva ou negativa no rendimento final da reação, para que futuramente este produto possa ser escalonado com os riscos minimizados. Neste estudo foi realizado um planejamento fatorial a fim de se analisar três fatores de influência no rendimento da síntese com um reduzido número de experimentos, sendo estes fatores a quantidade de solvente, quantidade de catalisador e tempo de reação. Com o resultado dos rendimentos das sínteses, foi realizada uma análise estatística a fim de se saber quais Efeitos Individuais ou Efeitos de Interação influenciam no rendimento final da síntese do LPSF GQ-16. Após as análises, apenas o Efeito Individual um, no caso a quantidade de solvente reduzida, influenciou de maneira positiva no rendimento final das sínteses, enquanto os outros dois Efeitos Individuais e os Efeitos de Interação não influenciam no rendimento da síntese. Posteriormente, com os produtos obtidos neste projeto, serão realizados ensaios toxicológicos, estudos de formulação e ensaios clínicos, já que para tais ensaios é requerido grande quantidade do composto.

Palavras Chave: Síntese. Diabetes. Planejamento Fatorial. Escalonamento.

ABSTRACT

Thiazolidinediones (TZDs) are agonists of Peroxisome Gamma Proliferator Activated Receptors (PPAR γ), used in the treatment of diabetes mellitus, improve insulin resistance and are effective in preventing the progression of renal disease in different experimental models. This protection seems to be secondary to the anti-inflammatory effect of TZDs. Unfortunately, these binders also have undesirable side effects, such as weight gain, edema and cardiotoxicity. A promising partial agonist of PPAR γ , the LPSF GQ-16, was developed in the Laboratory of Planning and Synthesis of Pharmaceuticals (LPSF), which shows similar anti-diabetic activity to other TZDs, but without inducing weight gain or edema. In this sense, the purpose of this work was to study the synthesis influence factors of LPFS GQ-16, analyzing which factors influence positively or negatively the final reaction yield, so that in the future this product can be scaled with minimized risks. A factorial design was done in order to analyze three influence factors in the yield of the synthesis with a small number of experiments, being these factors the amount of solvent, amount of catalyst and reaction time. With the result of the syntheses yields, a statistical analysis was done in order to know which Individual Effects or Interaction Effects influence the final yield of the LPSF GQ-16 synthesis. After the analyzes, only the Individual Effect one, in this case the reduced solvent amount, positively influenced the final yield of the syntheses, while the other two Individual Effects and the Interaction Effects do not influence the yield of the synthesis. Subsequently, with the products obtained in this project, toxicological tests, formulation studies and clinical trials will be performed, since for such assays a large amount of the compound is required.

Key words: Synthesis. Diabetes. Factorial Design. Scale-up.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese e processamento da insulina. A insulina é sintetizada a partir da Pré-pró-insulina. A clivagem inicial de uma sequência aminoterminal, de 23 aminoácidos, denominada sequência sinalizadora, e a formação das pontes de hidrogênio, culminam com a produção da pró-insulina. A remoção do Pectídeo C, por proteólise, produz a insulina, contendo as cadeias alfa e beta.....	20
Figura 2 – Mecanismo de ativação transcricional pelo PPAR: Requer a liberação do complexo co-repressor (atividade deacetilase da histona), feito por um ligante, e o recrutamento de complexo co-ativador (atividade acetiltransferase). O complexo PPAR:RXR ativado liga-se ao PPRE, produzindo alteração na estrutura da cromatina, originando uma estrutura transcricionalmente competente.	27
Figura 3 – Atividades Farmacológicas das TZDs	30
Figura 4 – Estruturas químicas das drogas dericados das tiazolidinadionas e seus nomes comerciais: Pioglitazona, 1 (Actos), Rosiglitazona, 2 (Avandia), Troglitazona, 3 (Rezulin) e Ciglitazona, 4.....	31
Figura 5 – Bis-heterociclos baseados em 2-4-tiazolidinadiona sintetizados por Nasreen <i>et al.</i> , 2014	32
Figura 6 – 2,4-Tiazolidinadionas com porções de arilsulfonilureia.	33
Figura 7 – Derivados de tiazolidinadionas de ação hipoglicêmica e hipolipemiante.	33
Figura 8 – Conjugados de cromonas e 2,4-tiazolidinadiona.....	34
Figura 9 – Promissor derivado tiazolidínico sintetizado por Kar <i>et al.</i> em 2014	35
Figura 10 – Fatores de influência de síntese.....	39
Figura 11 – Rota geral de síntese para obtenção do LPSF GQ-16.....	44

Figura 12 – Exemplo de reator em batelada	46
Figura 13 – Rota de síntese da Tiazolidina-2,4-diona	46
Figura 14 – Rota de síntese do LPSF IP-23.....	47
Figura 15 – Rota Síntese do LPSF GQ-01.....	47
Figura 16 – Síntese do LPSF GQ-16.	48
Figura 17 – Regiões de rejeição e não-rejeição para uma distribuição F.....	51
Figura 18 – Mecanismo de reação proposto para a síntese do LPSF GQ-16.....	54
Figura 19 – Variação dos fatores X1, X2 e X3 nos níveis menos e mais	70
Figura 20 – Efeito de Interação E12, Quantidade de Solvente (15ml e 30ml) e Tempo de Reação (3 horas e 5 horas).....	70
Figura 21 – Efeito de Interação E13, Quantidade de Solvente (15ml e 30ml) e Quantidade de Catalisador (5 gotas e 10 gotas).....	71
Figura 22 – Efeito de Interação E23, Tempo de Reação (3 horas e 5 horas) e Quantidade de Catalisador (5 gotas e 10 gotas).....	72
Figura 23 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do Composto LPSF GQ-01	81
Figura 24 – Região do anel aromático do Espectro de RMN ^1H do composto LPSF GQ-01	81
Figura 25 – Espectro COSY do composto LPSF GQ-01	82
Figura 26 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do composto LPSF GQ-01	83
Figura 27 – DEPT do composto LPSF GQ-01.....	83
Figura 28 – Cromatograma e espectro Ultra Violeta do composto LPSF GQ-01	84
Figura 29 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do Composto LPSF IP-23.....	86

Figura 30 – Região do anel aromático do Espectro de RMN ^1H do composto LPSF IP-23.....	86
Figura 31 – Espectro COSY do composto LPSF IP-23.....	87
Figura 32 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do composto LPSF IP-23.....	87
Figura 33 – DEPT do composto LPSF IP-23.....	88
Figura 34 – Cromatograma e espectro Ultra Violeta do composto LPSF IP-23	89
Figura 35 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do Composto LPSF GQ-16	90
Figura 36 – Região do anel aromático do Espectro de RMN ^1H do composto LPSF GQ-16	90
Figura 37 – Espectro COSY do composto LPSF GQ-16.....	91
Figura 38 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do composto LPSF GQ-16	91
Figura 39 – DEPT do composto LPSF GQ-16.....	92
Figura 40 – Cromatograma e espectro Ultra Violeta do composto LPSF GQ-16.	93

LISTA TABELAS

Tabela 1 –	Exemplo de matriz de planejamento.	37
Tabela 2 –	Empresas que comercializam o LPSF GQ-16 no mundo.....	41
Tabela 3 –	Planejamento fatorial de três variáveis e dois níveis utilizado no presente trabalho. As variáveis são Tempo de Reação (3 e 5 horas), Quantidade de catalizador utilizado (5 ou 10 gotas) e Quantidade de Solvente utilizado (15 ou 30 ml).....	50
Tabela 4 –	Desenho dos experimentos com as combinações entre os fatores de influência	50
Tabela 5 –	Sínteses realizadas do LPSF GQ-16 com os fatores de controle, rendimentos das sínteses planejadas e das réplicas e suas respectivas médias.....	55
Tabela 6 –	Variações -1 para +1 do fator x1, para x2 e x3 iguais	56
Tabela 7 –	Variações -1 para +1 do fator x2, para x1 e x3 iguais	57
Tabela 8 –	Variações -1 para +1 do fator x3, para x1 e x2 iguais	58
Tabela 9 –	Efeito de Interação de X1 para X2 em +1.....	59
Tabela 10 –	Efeito de Interação de X1 para X2 em -1	60
Tabela 11 –	Efeito de Interação de X1 para X3 em +1.....	61
Tabela 12 –	Efeito de Interação de X1 para X3 em -1	62
Tabela 13 –	Efeito de Interação de X2 para X3 em +1.....	63
Tabela 14 –	Efeito de Interação de X2 para X3 em -1	63
Tabela 15 –	Efeitos de interação entre os fatores X1, X2 e X3	65
Tabela 16 –	Exemplo de tabela com os dados necessários e fórmulas para calculo da Razão F.....	66

Tabela 17 – Tabela com os valores da Soma dos Quadrados, Graus de Liberdade, Quadrado Médio e Razão F para todos os efeitos individuais e de interação	68
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COSY	Espectroscopia de correlação
DEPT	Intensificação da distorção por transferência de polarização
DM	Diabetes Mellitus
E1	Efeito Principal do fator Um
E12	Efeito de Interação entre os fatores Um e Dois
E123	Efeito de Interação entre os fatores Um, Dois e Três
E13	Efeito de Interação entre os fatores Um e Três
E2	Efeito Principal do Fator Dois
E23	Efeito de Interação entre os fatores Dois e Três
E3	Efeito Principal do Fator Três
GL	Graus de Liberdade
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
INCT_if	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
NUPIT-SG	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR γ	Receptores Ativados Por Proliferadores Peroxissomais Gama
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TZD	Tiazolidinadiona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	DIABETES.....	18
3.1.1	Insulina.....	18
3.1.1.1	Síntese da Insulina	18
3.1.2	Tipos de Diabetes.....	20
3.1.3	Epidemiologia, Fatores de Risco e Prevenção	22
3.1.4	Diagnóstico e Tratamento	23
3.2	RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA (PPAR).....	25
3.2.1	Estrutura do Receptor.....	27
3.2.2	PPARγ	27
3.2.3	Mecanismo de Sensibilização à Insulina do PPARγ	28
3.3	NÚCLEO TIAZOLIDÍNICO	29
3.4	COMPOSTOS ANTIDIABÉTICOS	31
3.5	PLANEJAMENTO FATORIAL LPSF GQ-16	35
3.5.1	Parte Experimental.....	36
3.6	FATORES DE INFLUÊNCIA	38
3.7	ESCALONAMENTO	39
3.8	LPSF GQ-16 - 5-(5-BROMO-2-METOXI-BENZILIDENO)-3-(4METIL- BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA.....	40

4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	EQUIPAMENTOS E REAGENTES	43
4.2	METODOLOGIA GERAL DE SÍNTESE	43
4.3	SÍNTESE TIAZOLIDINA-2,4-DIONA	46
4.4	SÍNTESE LPSF IP-23 - ÉSTER 3-(5-BROMO-2-METOXI-FENIL)-2-CIANO-ACRÍLICO	47
4.5	SÍNTESE LPSF GQ-01 - 3-(4-METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA	47
4.6	SÍNTESE LPSF GQ-16 - 5-(5-BROMO-2-METOXI-BENZILIDENO)-3-(4-METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA	48
4.7	PLANEJAMENTO FATORIAL	49
4.7.1	Teste Exato de Fisher	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	MECANISMO DE REAÇÃO	53
5.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
5.3	ESCALONAMENTO	69
6	CONCLUSÕES	74
7	PERSPECTIVAS.....	75
8	APÊNDICE A - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	81
9	APÊNDICE B - ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA REVISTA CURRENT BIOACTIVE COMPOUNDS.....	94
10	ANEXO A - CARTA PATENTE DO GQ-16.....	107

1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas, caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. O estado de hiperglicemia crônica está associado a danos a longo termo em vários órgãos, especialmente, os olhos, nervos, rins, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2004). Pode-se classificar o DM em dois tipos: tipo 1, em que se predomina uma deficiência absoluta de insulina, advinda da destruição das células beta pancreáticas e do tipo 2, em que há resistência insulínica, com deficiência relativa de insulina (ADA, 2010).

Em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) no seu relatório global mais recente sobre diabetes, mostrou que o número de adultos vivos com diabetes quase quadruplicou desde 1980 indo de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014, sendo a prevalência em pessoas maiores de 18 anos aumentado de 4,7% para 8,5% no mesmo período. Fatores que drasticamente elevaram esse número, sendo uma grande parte do tipo 2, inclui sobrepeso e obesidade. O relatório propõe que os órgãos governamentais assegurem que as pessoas façam escolhas saudáveis e que os sistemas de saúde sejam capazes de diagnosticar, tratar e cuidar de pessoas com diabetes (WHO, 2016).

As tiazolidinonas (TZDs) ou glitazonas são moléculas que possuem anéis heterocíclicos de cinco membros que possuem átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio em sua estrutura de anel e exibem uma ampla e potente gama de atividades farmacológicas. As TZDs representam uma classe farmacológica atualmente empregada no tratamento da DM tipo 2, exercendo seus efeitos hipoglicemiantes através da redução da resistência a insulina (Sarafidis e Bakris, 2006). As TZDs apresentam, como característica de sua estrutura química, um anel diona, enquanto o restante da molécula difere entre as drogas do grupo, sendo responsável pela especificidade farmacodinâmica e farmacocinética. Atualmente, há somente dois fármacos do grupo disponíveis no mercado nacional: a pioglitazona e a rosiglitazona (Gomes, 2006).

Os conhecidos efeitos de minimizar a resistência insulínica e diminuir citocinas próinflamatórias traduzem um melhor controle glicêmico no paciente

diabético, lentificando, portanto, a progressão da nefropatia diabética (Wu *et al.*, 2009).

O 5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF GQ-16) foi desenvolvido no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e atualmente está sendo estudado por outros grupos de pesquisa da Universidade de Brasília (UNB) e UFPE com apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica – INCT_if. Estudos realizados pelo LPSF mostram que o LPSF GQ-16 é um agonista parcial de PPAR γ , com propriedades anti-diabéticas em camundongos submetidos a dietas hiperlipídicas (Amato *et al.* 2012). Ademais, chama a atenção que GQ-16 é específico para PPAR γ e não é adipogênico em cultura de células mesenquimais, sendo assim, não promove ganho de peso como a rosiglitazona e não induz a retenção de água, que por sua vez diminui os valores de hematócrito (Choi *et al.*, 2010; Amato *et al.* 2012; Martini, 2012). O LPSF vem trabalhando com derivados tiazolidínicos de atividade hipoglicêmica desde 2003, e possui bastante experiência no desenvolvimento de tais compostos (PI 0300997-1, 2003; PI 0601826-2, 2006; Silva *et al.*, 2016; Rudinick *et al.*, 2016).

Assim sendo, um planejamento fatorial foi projetado para otimizar os principais parâmetros, sendo eles a quantidade de solvente, quantidade de catalisador e tempo de reação, tendo níveis altos e baixos. Portanto, considerando estes três fatores, dezesseis experimentos foram realizados, sendo oito experimentos planejados e oito réplicas, que foram feitos de forma aleatória para minimizar a influência de condições externas como humidade e temperatura do laboratório.

Este trabalho teve como finalidade o estudo de fatores de influência na síntese do LPSF GQ-16, a partir de procedimentos multivariados de otimização experimental, destacando as vantagens e aplicações dos sistemas de planejamento fatorial que permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um reduzido número de experimentos em uma escala de laboratório, a fim de saber quais os fatores que mais influência o rendimento nas síntese, a fim de se produzir o produto em escala maior com melhor rendimento, menor custo e menor risco.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Síntese e estudo de parâmetros de influência de síntese para otimização de reação de um novo agonista parcial de PPAR γ com propriedades antidiabéticas, utilizando planejamento estatístico fatorial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Síntese e estudos de parâmetros de influência de fatores na síntese do composto 5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-16);
- ✓ Planejamento Fatorial para estudos de fatores com reduzido número de experimentos, otimização da síntese do LPSF GQ-16 e análise para escolha de condições adequadas para escalonamento;
- ✓ Determinação das características físico-químicas dos novos compostos e elucidação estrutural através das técnicas de RMN¹H, RMN¹³C, DEPT, COSY e Espectroscopia de Massa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DIABETES

3.1.1 Insulina

A insulina é um hormônio peptídico secretado do pâncreas. Em sua forma ativa, é um peptídeo de 51 aminoácidos com duas cadeias diferentes, A e B, unidas por ligações dissulfeto (Bose *et al.*, 2002). O organismo não consegue tolerar grandes mudanças no nível de glicose no sangue. A principal função da insulina é retirar a glicose do sangue através do aumento do transporte dessa glicose para as células musculares e os adipócitos. A sinalização da insulina leva ao movimento de uma proteína transportadora de glicose, chamada GLUT4, das vesículas intracelulares para a membrana celular. Uma vez na membrana, a proteína GLUT4 permite que mais glicose entre na célula, reduzindo seu nível no sangue. É por este efeito que a insulina é mais conhecida. A falha no transporte da glicose é a principal característica e o maior risco associado à diabetes (Nelson & Cox, 2014).

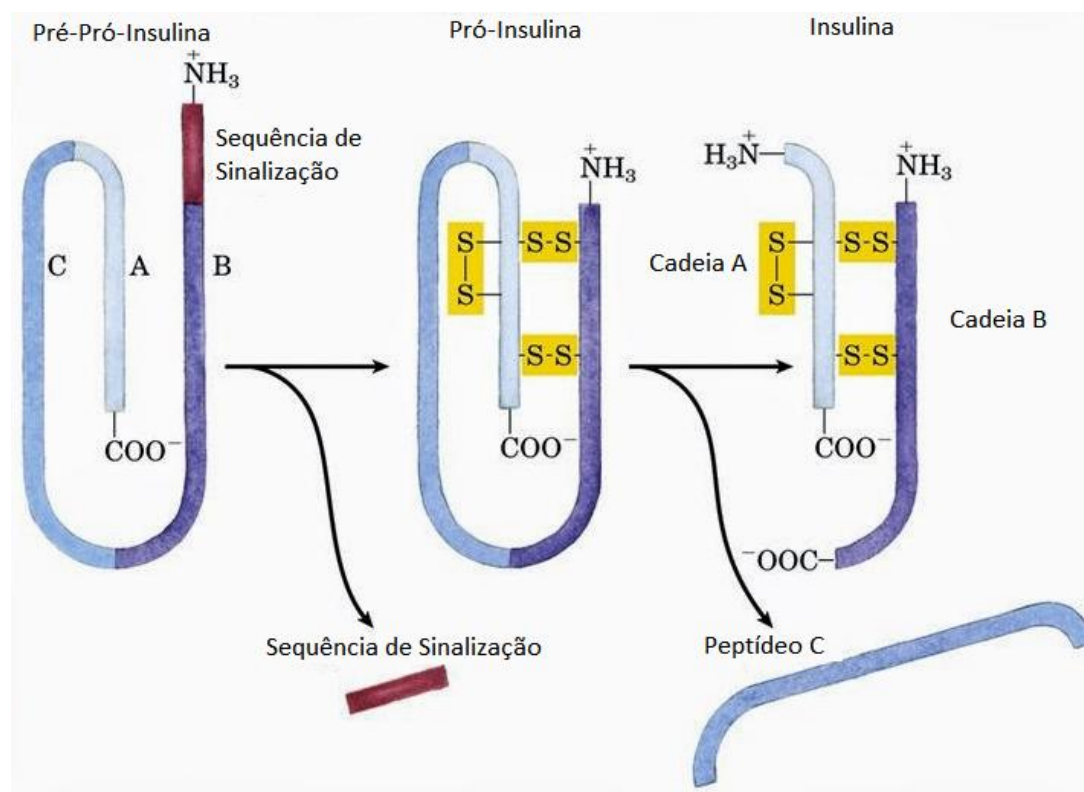
3.1.1.1 Síntese da Insulina

A insulina é produzida no pâncreas e liberada quando qualquer um dos vários estímulos é detectado. Esses estímulos incluem proteína ingerida e glicose no sangue produzido a partir de alimentos digeridos (Rhoades e Bell, 2009). Os carboidratos podem ser polímeros de açúcares simples ou os próprios açúcares simples. Se os carboidratos incluírem glicose, então a glicose será absorvida na corrente sanguínea e o nível de glicose no sangue começará a subir. Nas células alvo, a insulina inicia uma transdução de sinal, que tem o efeito de aumentar a captação e armazenamento de glicose. Finalmente, a insulina é degradada, terminando a resposta.

A insulina consiste de duas cadeias polipeptídicas, as cadeias A e B, ligadas por ligações dissulfureto. No entanto, é primeiro sintetizado como um único polipeptídeo chamado preproinsulina em células beta. A preproinsulina contém um peptídeo sinal de 24 resíduos que direciona a cadeia polipeptídica nascente para o retículo endoplasmático rugoso (RER). O peptídeo sinal é clivado à medida que o polipeptídeo é translocado para o lúmen do RER, formando proinsulina (Kahn e Weir, 2005). No RER, a pró-insulina dobra-se na conformação correta e formam-se 3 ligações dissulfureto.

A pró-insulina sofre maturação para insulina ativa através da ação de endopeptidases celulares conhecidas como convertases pró-hormônio (PC1 e PC2), bem como a exoprotease carboxipeptidase E (Stener e Oyer, 1967). As endopeptidases clivam em duas posições, liberando um fragmento chamado peptídeo-C, e deixando duas cadeias peptídicas, as cadeias B e A, ligadas por duas pontes dissulfeto. Os locais de clivagem estão localizados após um par de resíduos básicos (lisina-64 e arginina-65 e arginina-31 e -32). Após a clivagem do peptídeo C, esses dois pares de resíduos básicos são removidos pela carboxipeptidase (Creighton, 1993). O peptídeo C é a porção central da pró-insulina, e a sequência primária da pró-insulina segue a ordem "B-C-A" (as cadeias B e A foram identificadas com base na massa e o peptídeo C foi descoberto mais tarde) (Figura 1).

Figura 1 - Síntese e processamento da insulina. A insulina é sintetizada a partir da Pré-pró-insulina. A clivagem inicial de uma sequência aminoterminal, de 23 aminoácidos, denominada sequência sinalizadora, e a formação das pontes de hidrogênio, culminam com a produção da pró-insulina. A remoção do Peptídeo C, por proteólise, produz a insulina, contendo as cadeias alfa e beta.



Fonte: Nelson & Cox, 2014.

A insulina resultante é empacotada dentro de grânulos maduros, esperando que os sinais metabólicos (como leucina, arginina, glicose e manose) e a estimulação do nervo vago sejam exocitados da célula para a circulação (Najjar, 2001).

A produção endógena de insulina é regulada em várias etapas ao longo da via de síntese: Na transcrição do gene da insulina, na estabilidade do mRNA, na tradução do mRNA e nas modificações pós-traducionais.

3.1.2 Tipos de Diabetes

Na diabetes clássica, do tipo 1 (ou diabetes dependente de insulina), o indivíduo afetado não produz insulina, ou pelo menos não o suficiente. Isto normalmente é causado pela destruição das células das ilhotas de Langerhans no pâncreas por um tipo de doença autoimune. O único remédio para diabetes tipo 1 é tomar injeções de insulina.

A diabetes do Tipo 2 (ou diabetes não dependente de insulina), é caracterizada pela ausência de resposta correta das células à insulina. Nesses casos, a pessoa pode produzir uma quantidade normal do hormônio, mas este não tem efeito suficiente, ou porque não se liga adequadamente ao receptor, ou porque o receptor não transmite o segundo mensageiro corretamente. Enquanto pessoas com diabetes do tipo 1 são geralmente magras, as com diabetes do tipo 2 frequentemente são obesas.

A diabetes gestacional ocorre durante a gravidez onde, para permitir o desenvolvimento do bebê, a mulher passa por mudanças em seu equilíbrio hormonal. A placenta, por exemplo, é uma fonte importante de hormônios que reduzem a ação da insulina, responsável pela captação e utilização da glicose pelo corpo. O pâncreas, conseqüentemente, aumenta a produção de insulina para compensar este quadro. Em algumas mulheres, entretanto, este processo não ocorre e elas desenvolvem um quadro de diabetes gestacional, caracterizado pelo aumento do nível de glicose no sangue. Quando o bebê é exposto a grandes quantidades de glicose ainda no ambiente intrauterino, há maior risco de crescimento excessivo (macrossomia fetal) e, conseqüentemente, partos traumáticos, hipoglicemia neonatal e até de obesidade e diabetes na vida adulta.

Existem ainda outros tipos de diabetes, mas que têm uma incidência muito baixa. São eles:

Pré-diabetes indica uma condição que ocorre quando os níveis de glicose no sangue são mais altos que o normal, mas não são altos o suficiente para o diagnóstico de DM tipo 2. Muitas pessoas que mais tarde desenvolvem DM tipo 2 passam muitos anos em estado de pré-diabetes.

Diabetes latente auto-imune de adultos (LADA) é uma condição na qual o DM tipo 1 se desenvolve em adultos. Adultos com LADA são frequentemente

diagnosticados erroneamente como portadores de DM tipo 2, com base na idade e não na causa.

Outras formas de diabetes mellitus incluem diabetes congênita, que é devido a defeitos genéticos de secreção de insulina, diabetes relacionada à fibrose cística, diabetes esteróide induzido por altas doses de glicocorticóides e várias formas de diabetes monogênico.

A diabetes tipo MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) é um subtipo da diabetes Mellitus, caracterizado por manifestação precoce (em geral abaixo dos 25 anos de idade) e com transmissão autossômica dominante (determinada em pelo menos três gerações). Corresponde a um defeito primário na secreção da insulina, associada a disfunção na célula β pancreática.

Diabetes tipo 3 tem sido sugerido como um termo para a doença de Alzheimer, pois os processos subjacentes podem envolver resistência à insulina pelo cérebro.

3.1.3 Epidemiologia, fatores de risco e prevenção

Segundo o relatório da OMS de 2016, é estimado que 422 milhões de adultos com idade acima de 18 anos estavam vivendo com diabetes em 2014. O número de pessoas com diabetes vem aumentando nas últimas décadas, devido ao aumento populacional, aumento da idade média da população e aumento na prevalência de diabetes em cada grupo de idade. Mundialmente, o número de pessoas com diabetes aumentou de 102 milhões de pessoas, em 1980, para 422 milhões em 2014, número quase quatro vezes maior. Na última década, a prevalência de diabetes na população aumentou de maneira mais significativa em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Com o tempo, o diabetes pode danificar o coração, os vasos sanguíneos, os olhos, os rins e os nervos. Adultos com diabetes têm um aumento de dois a três vezes no risco de ataques cardíacos e derrames (Sarwar *et al.*, 2010). Combinada com a redução do fluxo sanguíneo, a neuropatia (lesão do nervo) nos pés aumenta a

chance de úlceras no pé, infecção e eventual necessidade de amputação do membro. A retinopatia diabética é uma importante causa de cegueira e ocorre como resultado de danos acumulados a longo prazo nos pequenos vasos sanguíneos da retina. 2,6% da cegueira global pode ser atribuída a diabetes (Bourne *et al.*, 2013). Diabetes está entre as principais causas de insuficiência renal (USRDS, 2014).

Medidas simples de estilo de vida demonstraram ser eficazes na prevenção ou no retardamento do início da diabetes tipo 2. Para ajudar a prevenir o diabetes tipo 2 e suas complicações, as pessoas devem alcançar e manter o peso corporal saudável, ser fisicamente ativo, ter uma dieta saudável, evitando açúcar e ingestão de gorduras saturadas e evitar o uso de tabaco (WHO, 2016)

3.1.4 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico precoce pode ser realizado através de testes de açúcar no sangue (exame de glicemia).

O tratamento do diabetes envolve dieta e atividade física, além de reduzir a glicose no sangue e os níveis de outros fatores de risco conhecidos que danificam os vasos sanguíneos. A cessação do uso do tabaco também é importante para evitar complicações

Intervenções que podem minimizar custos e são viáveis nos países em desenvolvimento incluem:

- Controle glicêmico, particularmente no diabetes tipo 1. Pessoas com diabetes tipo 1 necessitam de insulina, as pessoas com diabetes tipo 2 podem ser tratadas com medicação oral, mas também podem precisar de insulina.
- Controle de pressão arterial.
- Cuidados com os pés.
- Tratamento para retinopatia (que causa cegueira).
- Controle lipídico do sangue (para regular os níveis de colesterol).

O uso de medicamentos orais e/ou de insulina na diabetes tipo 2 é adotado apenas quando o tratamento usual não é suficiente para controlar os níveis de açúcar no sangue. São inúmeros os tipos de remédios para diabetes tipo 2 disponíveis, e alguns deles podem ser usados em combinação de 2 ou mais medicamentos. Todos eles visam a redução dos níveis de glicose no sangue através de diversos mecanismos (Ada, 2015).

Diversas classes de medicamentos funcionam de maneiras diferentes para alcançar o mesmo objetivo: diminuir os níveis de glicose no sangue.

Sulfoniluréias: são uma classe de remédio para diabetes que atuam estimulando as células beta do pâncreas a liberar mais insulina. Este medicamento vem sendo usado para este fim desde a década de 1950.

Biguanidas: A metformina (Glifage®) é a biguanida mais comum adotada nos tratamentos contra diabetes tipo 2. As biguanidas atuam diminuindo os níveis de glicose no sangue através da inibição da quantidade de glicose produzida pelo fígado. Além de ajudar a reduzir os níveis de glicose sanguínea, a metformina também torna o tecido muscular mais sensível à insulina, facilitando a absorção da glicose pelas células.

Meglitinidas: As meglitinas são drogas que, assim como as sulfonilureias estimulam as células beta do pâncreas a liberar insulina. Medicamentos como Repaglinida (Prandin®) e Nateglinida (Starlix®) são meglitinas.

Tiazolidinadionas: Dentre as tiazolidinadionas mais conhecidas estão a rosiglitazona (Avandia®) e a pioglitazona (ACTOS®). Essa classe de remédios para diabetes ajuda a insulina a trabalhar melhor nos músculos e nas gorduras, além de reduzir a produção de glicose pelo fígado.

Inibidores de DPP-4: Os inibidores de DPP-4 são uma classe de medicamentos como as meglitinidas e as sulfonilureias, porém com a vantagem de não causar episódios de hipoglicemia. Esses remédios atuam impedindo a quebra de uma molécula presente naturalmente no nosso organismo, a GLP-1.

A GLP-1 é responsável por reduzir os níveis de glicose no sangue, porém ela é rapidamente quebrada para que não funcione bem quando injetada como uma droga. Ao interferir nessa quebra, os inibidores de DPP-4 permitem que a GLP-1

continue ativa no corpo por mais tempo, ou seja, diminuindo os níveis de glicose no sangue apenas quando os mesmos estiverem elevados, e não o tempo inteiro, como ocorre com as drogas que causam hipoglicemia.

Inibidores de SGLT2: A glicose na corrente sanguínea passa através dos rins, onde pode ser excretada ou reabsorvida. O transportador de glicose de sódio 2 (SGLT2) trabalha no rim para reabsorver a glicose. A classe de medicamentos de inibidores de SGLT2 bloqueia esta ação, fazendo com que todo o excesso de glicose seja eliminado na urina e não reabsorvido.

Remédios como Canagliflozin (Invokana®) e Dapagliflozina (Farxiga®) são inibidores de SGLT2 recentemente aprovados para tratar a diabetes tipo 2.

Inibidores de alfa-glucosidase: Acarbose (Precose®) e Miglitol (Glyset®) são os mais populares inibidores de alfa-glucosidade. Esses medicamentos auxiliam o organismo a diminuir os níveis de glicose no sangue através da quebra de amido presente nos pães, batatas, macarrão e no intestino. Eles também reduzem a degradação de alguns tipos de açúcares.

Sequestrantes de ácidos biliares: Os sequestrantes de ácido biliar, como o Colesevelam (Welchol), são medicamentos que reduzem o colesterol e que também reduzem os níveis de glicose no sangue. Esses remédios diminuem o colesterol LDL, que muitas vezes é alto em pacientes com diabetes, através da ligação com ácidos biliares presentes no sistema digestivo. Desta forma, o organismo utiliza o colesterol em excesso para substituir a falta de ácidos biliares, o que diminui o colesterol. Já o mecanismo pelo qual a glicose sanguínea também é diminuída ainda não é conhecido.

3.2 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA (PPAR)

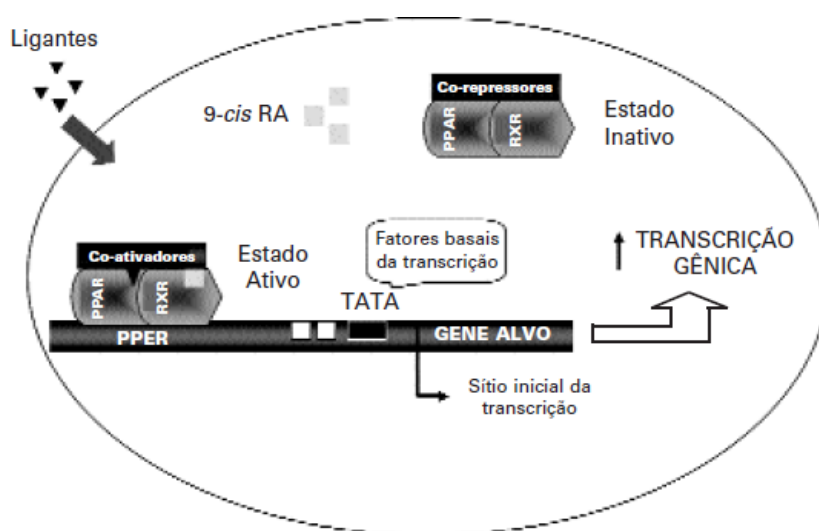
O PPAR foi originalmente identificado em 1990 com a primeira clonagem (PPAR α) ocorrendo durante a pesquisa do alvo molecular para agentes proliferadores de peroxissoma em roedores. Desde então, numerosos ácidos graxos

e derivados, incluindo uma variedade de eicosanóides e prostaglandinas, têm sido identificados como ligantes para os PPARs, tendo também sido demonstrado serem alvos para numerosas classes de compostos sintéticos, utilizados no tratamento do diabetes e dislipidemias. Portanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos destes receptores torna-se extremamente importante, quer no desenvolvimento como na utilização de drogas para o tratamento de doenças metabólicas (Isseman e Green, 1990).

PPAR são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica. Estruturalmente podem ser incluídos como membros da subfamília de receptores que incluem o receptor do hormônio da tireóide (TR), receptor do ácido retinóico (RAR) e o receptor da vitamina D3 (VDR).

Três proteínas, codificadas por genes distintos, têm sido identificadas: PPAR α , PPAR β e PPAR γ . Os PPARs são fatores de transcrição ligantes dependentes que regulam a expressão do gene-alvo pela ligação a específicos PPREs (elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma) situados em sítios regulatórios de cada gene. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcrpcionais, resultando em aumento na transcrição gênica (Figura 2) (Tavares *et al.*, 2007).

Figura 2 - Mecanismo de ativação transcrricional pelo PPAR: Requer a liberação do complexo co-repressor (atividade deacetilase da histona), feito por um ligante, e o recrutamento de complexo co-ativador (atividade acetiltransferase). O complexo PPAR:RXR ativado liga-se ao PPRE, produzindo alteração na estrutura da cromatina, originando uma estrutura transcricionalmente competente.



Fonte: Tavares *et al.*, 2007.

3.2.1 Estrutura do receptor

Os PPARs, como outros receptores nucleares, possuem estrutura modular formada por domínios funcionais: domínio A/B (NH₂-terminal), pouco conservado entre as três isoformas de PPARs, cujo estado de fosforilação contribui para a modulação da atividade do PPAR α e γ . Está localizado próximo ao sítio de ativação transcricional independente de ligante (AF-1); domínio C (ou DBD – DNA binding domain), contém os dedos de zinco, que são dois arranjos protéicos constituídos de uma α -hélice e uma folha β -pregueada, mantidas unidas por um íon de zinco na região central, que confere maior estabilidade de dobramento, permitindo associações firmes quando da ligação aos PPREs na região regulatória de genes responsivos ao PPAR; região D, importante como cofator e a região EF (COOH-terminal), a qual possui o domínio LBD (ligand binding domain) e o sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2) (Schoonjans *et al.*, 1996).

3.2.2 PPAR γ

O gene do PPAR γ foi mapeado no cromossomo 3 (Greene *et al.*, 1995), região 3p25, dando origem a três RNA mensageiros: PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3,

que diferem em sua extremidade 5', como consequência de diferentes promotores e ao splicing alternativo. O PPAR γ 1 é codificado por oito exons, compreendendo dois exons γ 1 específicos na região 5' não traduzida, A1 e A2, e seis exons comuns aos três RNA mensageiros. PPAR γ 2, codificado por sete exons, sendo o exon B específico para este receptor, codificando 28 aminoácidos na região N-terminal, e PPAR γ 3, que codifica a mesma proteína que PPAR γ 1, sendo controlado por um promotor distinto, localizado na região 5', próxima a A2 (Fajas *et al.*, 1998).

PPAR γ 1 é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço. PPAR γ 2 é expresso no tecido adiposo (Fajas *et al.*, 1997) e PPAR γ 3 tem expressão restrita a macrófagos e intestino grosso (Fajas, 1998).

3.2.3 Mecanismo de Sensibilização à Insulina do PPAR γ

PPAR γ é necessário e suficiente para diferenciar adipócitos. A introdução de PPAR γ em fibroblastos, na presença de ligantes fracos para o PPAR, induziu diferenciação destas células em adipócitos (Tontonoz *et al.*, 1994). Outros pesquisadores, trabalhando com camundongos destituídos de PPAR γ , observaram que estes apresentavam reduzida quantidade de tecido adiposo ou exibiam extrema lipodistrofia (Barak e Nelson, 1999).

Dado que PPAR γ é predominantemente expresso no tecido adiposo, a hipótese prevalente a respeito dos agonistas envolvidos na ação direta em adipócitos é que possuam, também, efeitos secundários em tecidos insulino-responsivos, tais como muscular esquelético e fígado. A perda da eficiência em reduzir os valores de glicose, pela rosiglitazone, em camundongos com severa resistência à insulina, onde o tecido adiposo está praticamente ausente, está de acordo com esta afirmação (Chao *et al.*, 2000).

Análises da expressão de RNA mensageiro em tecidos revelaram que genes contendo PPREs, induzidos no tecido adiposo, eram suprimidos no tecido esquelético. Entretanto, agonistas do PPAR γ , com ação metabólica benéfica em tecidos distantes (músculo e fígado), provavelmente estão envolvidos com efeitos

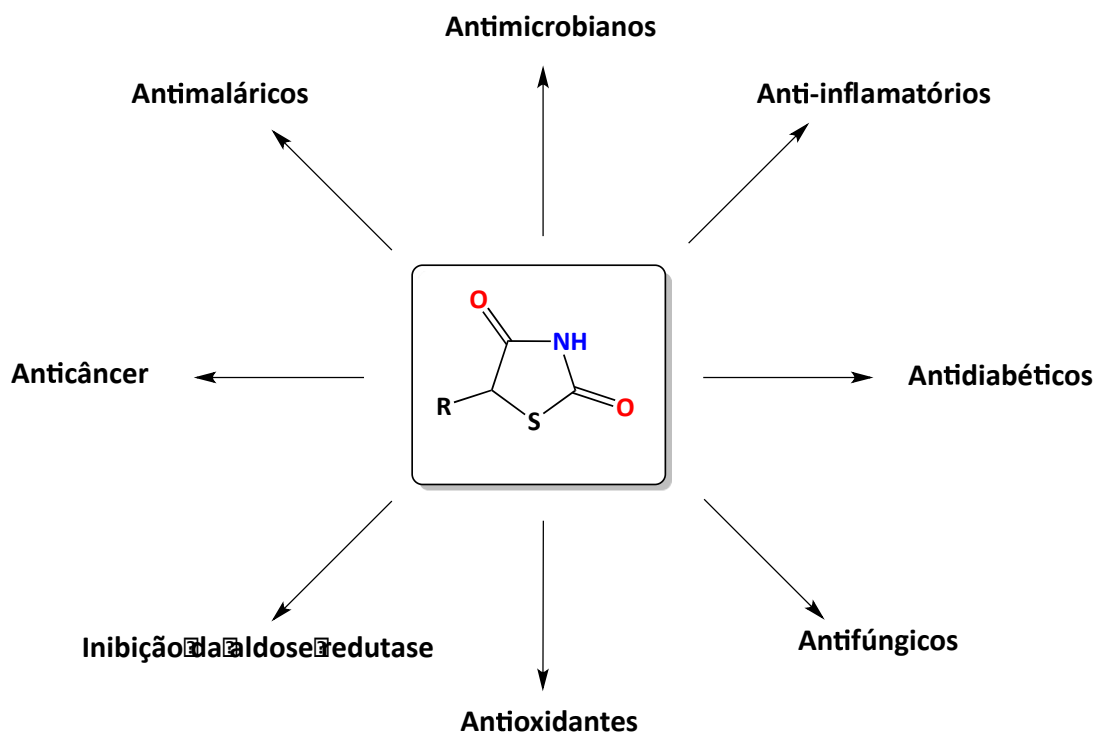
combinados, pois acentuam a captação, mediada pela insulina, no tecido adiposo, estoque e catabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de fatores derivados dos adipócitos com potencial ação sensibilizadora para a insulina e suprimem os níveis circulantes e/ou ações de fatores derivados do tecido adiposo que causam insulino-resistência, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) ou resistina (Stefan *et al.*, 2001). Portanto, a ativação do PPAR γ poderia induzir um aumento do clearance de ácidos graxos pelo tecido adiposo, com consequente diminuição na concentração plasmática e transporte para o músculo. Essa diminuição de ácidos graxos no músculo aumenta a sensibilidade à insulina (Randle *et al.*, 1991); a atividade adipogênica do PPAR γ contribui de forma importante neste efeito.

3.3 Núcleo Tiazolidínico

As tiazolidinadionas são uma classe de compostos utilizados como antidiabético oral que está disponível no mercado desde o final da década de 1990. Estas moléculas heterocíclicas de cinco membros contendo o núcleo de tiazole com o grupo carbonilo no segundo e quarto carbono, tal como derivados de 2,4-tiazolidinadiona. O sistema tiazole de cinco membros compreendendo de três átomos de carbono, um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre com dois oxigênios de ligação dupla nas posições 2 e 4 tem um interesse considerável em diferentes áreas da química medicinal (Napoleon, 2016).

Com uma variedade de substituintes no núcleo de tiazolidina-2,4-diona ou como moléculas híbridas quando combinadas com outros anéis heterocíclicos, as TZDs produzem uma ampla gama de atividades biológicas como anti-diabéticas, hipoglicemiantes, antitumorais, antimicrobianos, antiinflamatórios e antioxidantes (Figura 3). Com esta ampla diversidade no perfil de resposta biológica, pesquisadores tem voltado a sua atenção para explorar este núcleo ao seu potencial múltiplo contra várias atividades.

Figura 3 - Atividades Farmacológicas das TZDs



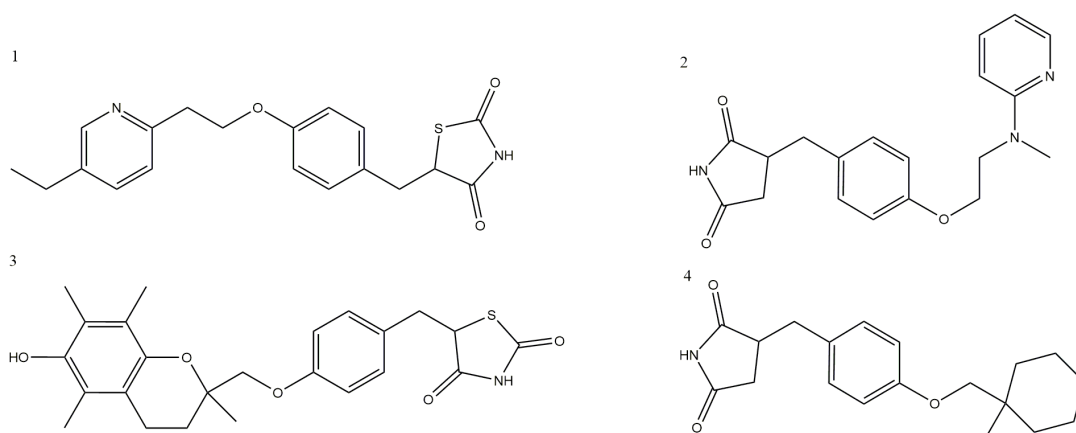
Fonte: Adaptado de Napoleon, 2016.

Recentemente, as 2,4-tiazolidinadionas estão ganhando mais importância como agentes antidiabéticos e seu mecanismo de ação é amplamente investigado. Os principais representantes desse grupo são pioglitazona (Actos) **1**, rosiglitazona (Avandia) **2**, troglitazona **3** (Rezulin) e ciglitazona **4**, que demonstram atividade antidiabética significativa (Figura 4). Entre eles, a rosiglitazona apresenta atividade anti-hiperglicêmica superior e, portanto, é usada no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. As tiazolidinadionas também conhecidas como litazonas são uma classe de medicamentos usados no tratamento do diabetes mellitus tipo 2.

Com o uso das TZDs, os pacientes diabéticos obtinham um decréscimo médio de 40 mg/dL em seus níveis de glicemia de jejum, acompanhado por uma redução da insulinemia de jejum variando de 2 a 10 $\mu\text{U/mL}$ (Stumvoll e Haring, 2002).

A prototípica 2,4-tiazolidinadiona, a ciglitazona foi descoberta pela Takeda Chemical Industries, Ltd., Japão, e tem atividade anti-hiperglicêmica em modelos de animais resistentes à insulina, camundongos KKAy e ratos Wistar gordurosos, mas sem efeito em modelos animais de diabetes deficientes em insulina. Durante estudos de relação estrutura-atividade em 2,4-tiazolidinadonas e compostos relacionados, eles descobriram compostos altamente potentes, como a pioglitazona (Figura 4). Desde a descoberta da ciglitazona, várias empresas farmacêuticas vêm avaliando novos análogos da 2,4-tiazolidinadiona como agentes para melhorar a resistência à insulina. A troglitazona (Figura 4) foi lançada em primeiro lugar no mercado, mas foi retirada por causa da toxicidade hepática e mortes relacionadas com a droga. Atualmente, dois agentes da classe das 2,4-tiazolidinadonas, pioglitazona e rosiglitazona, têm sido usados clinicamente.

Figura 4 - Estruturas químicas das drogas derivadas das tiazolidinadonas e seus nomes comerciais: Pioglitazona, 1 (Actos), Rosiglitazona, 2 (Avandia), Troglitazona, 3 (Rezulin) e Ciglitazona, 4.



Fonte: Autor (2018).

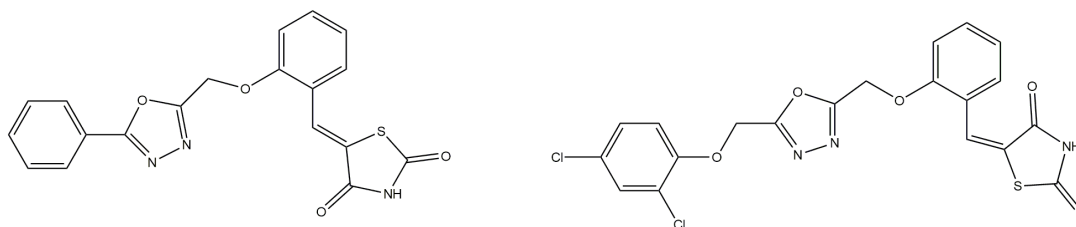
3.4 COMPOSTOS ANTIDIABÉTICOS

Os agentes antidiabéticos mais comumente utilizados são sulfoniluréias, metformina e certos inibidores de alfa glucosidase e meglitinidas. Esses agentes aumentam a secreção de insulina das células β -pancreáticas, mas algumas vezes

induzem hipoglicemia severa e ganho de peso, e sabe-se que a hiperinsulinemia é um fator de risco para doença cardíaca isquêmica.

Nasreen *et al.*, sintetizou bis-heterociclos baseados em 2-4- tiazolidinadiona com 1,3,4-oxadiazolil (Figura 5), e os compostos exibiram transativação significativa de PPAR-g de 63,78% e 64,67%, respectivamente, e efeito redutor da glicemia em comparação com drogas padrão Pioglitazona e Rosiglitazona que apresentaram 71,94% e 85,27% de ativação respectivamente. Estes compostos aumentaram a expressão do gene PPAR-g em 2,10 e 2,00 vezes, respectivamente, em comparação com os fármacos padrão Pioglitazona (1,5 vezes) e Rosiglitazona (1,0 vezes). Esses compostos não causaram ganho de peso corporal e foram encontrados livres de efeitos colaterais hepatotóxicos e cardiotoxicos. Portanto, esses compostos podem ser considerados candidatos potenciais para o desenvolvimento de novos agentes antidiabéticos (Nasreen *et al.*, 2014).

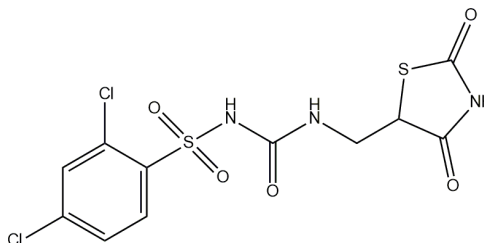
Figura 5 - Bis-heterociclos baseados em 2-4-tiazolidinadiona sintetizados por Nasreen *et al.*, 2014



Fonte: Autor (2018).

Séries de 2,4-tiazolidinadionas com porções de arilsulfonilureia foram sintetizadas por condensação de várias sulfonamidas substituídas e 5-(isocianometil) tiazolidino-2,4-diona. A isocianometil tiazolidinadiona foi obtida utilizando o rearranjo de Curtius, partindo de ácido 2,4-dioxo-5-tiazolidinoacético conhecido (Dhanaji *et al.*, 2012). Alguns dos compostos sintetizados (Figura 6), inibiram significativamente o aumento da hiperglicemia pós-prandial em 15,8 (p <0,01), 17,2 (p <0,01), 14,3 (p <0,05) e 16,5 (p <0,01)%, respectivamente em atividade anti-hiperglicêmica *in vivo* em modelo de rato carregado de sacarose com a dose de 10g / kg de peso corporal utilizando 100 mg / kg de peso corporal de medicamento antidiabético padrão metformina.

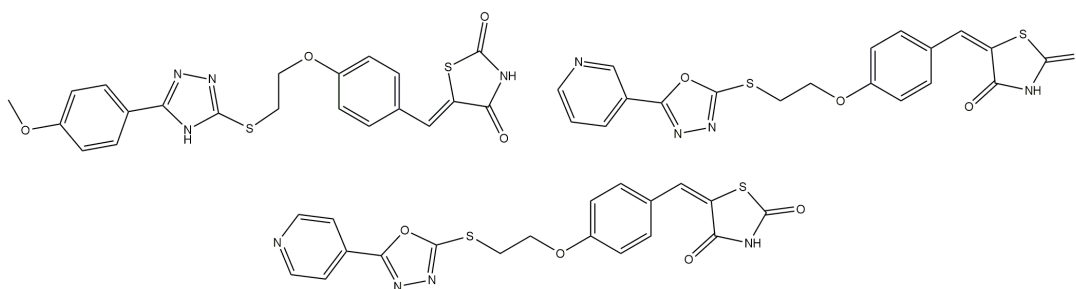
Figura 6 - 2,4-Tiazolidinadionas com porções de arilsulfonilureia.



Fonte: Autor (2018).

Mohammed Iqbal *et al.*, sintetizaram uma série de derivados de tiazolidinadionas incorporando porções heterocíclicas, substâncias de tiazol, triazol e oxadiazole farmacologicamente significantes ligadas ao anel fenil central via ligação heteroatômica com um / dois espaçadores de carbono como análogos estruturais de Pioglitazona por empregando protocolos sintéticos multipasso. Estes compostos foram pesquisados quanto às suas atividades hiperglicêmicas e hiperlipidêmicas *in vivo* em ratos wistar machos que apresentam propriedades interessantes de sensibilização à insulina. Os compostos 8, 9, 10 (Figura 7) apresentaram eficácia hipoglicêmica e hipolipemiante comparável à do padrão e diminuem significativamente a glicose plasmática e também reduzem o nível de triglicérides, o que é preferível para o tratamento da hiperglicemia e das complicações cardiovasculares (Mohammed Iqbal *et al.*, 2012).

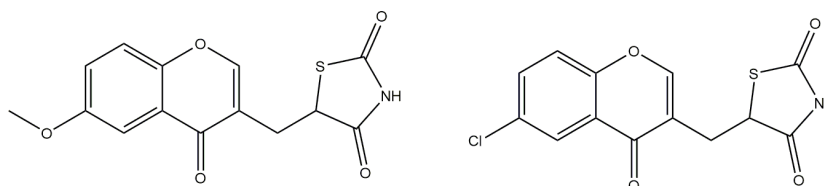
Figura 7 - Derivados de tiazolidinadionas de ação hipoglicêmica e hipolipemiante.



Fonte: Autor (2018).

Recentemente, uma biblioteca de conjugados de cromonas e 2,4-tiazolidinadiona foi sintetizada por condensação de Knoevenagel seguida de redução usando gás hidrogênio e Pd / C como catalisador. Os compostos 11, 12 (Figura 8) foram os mais eficazes na redução do nível de glicose no sangue comparável ao pioglitazona padrão da droga. O composto 11 exibiu uma potente transativação de PPAR- γ de 48,72% em comparação com a pioglitazona (62,48%). Todas as moléculas mostraram um bom escore de glide contra o alvo do PPAR- γ no estudo de docking molecular. A expressão do gene PPAR- γ foi significativamente aumentada pelo composto 5e (2,56 vezes) em comparação com a droga padrão pioglitazona. Além disso, esses compostos não causaram danos ao fígado e podem ser considerados candidatos capazes para o desenvolvimento de novos agentes antidiabéticos (Nazreen *et al.*, 2014)

Figura 8 - Conjugados de cromonas e 2,4-tiazolidinadiona

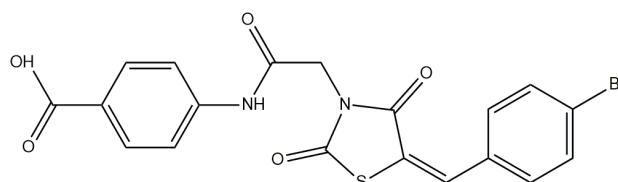


Fonte: Autor (2018).

Recentemente Kar *et al.*, relataram para uma biblioteca consistindo de algumas novas glitazonas contendo tiazolidinadiona e seus bioisosteros, estruturas anelares de rodanina e oxadiazolidina como seu suporte básico para sua atividade

antidiabética. Uma série de novas glitazonas com diversas estruturas químicas foram projetadas e sintetizadas e submetidas ao ensaio de captação de glicose *in vitro* na ausência e presença de insulina para confirmar sua atividade antidiabética usando hemidiafragma de rato (Kar *et al.*, 2014). Alguns dos compostos mostraram uma considerável atividade de captação de glicose à parte da rosiglitazona, um fármaco padrão e do composto 13 (Figura 9), exibiram melhor atividade de absorção de glucose e passam a ser o composto candidato a investigar melhor.

Figura 9 - Promissor derivado tiazolidínico sintetizado por Kar *et al.* em 2014



Fonte: Autor (2018).

3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL LPSF GQ-16

Atualmente a pesquisa científica tem promovido grandes avanços em todos os campos da ciência, gerando uma gama crescente de dados e informações, sendo que para a devida exploração e o correto entendimento, a aplicação de ferramentas estatísticas torna-se indispensável (Pereira-Filho *et al.*, 2002).

Levando em consideração que no Brasil os recursos financeiros e laboratoriais encontram-se escassos em decorrência à restrições de verbas, uma análise deve ser realizada no início de cada pesquisa científica, para a definição das condições experimentais, que permitam a aquisição de resultados confiáveis, já que a otimização de parâmetros experimentais de relevância é considerada como uma das etapas mais críticas do trabalho científico, principalmente daqueles que têm por objetivo o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala. (Peralta-Zamora *et al.*, 2005).

Normalmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de apenas uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. Estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados (BRASIL *et al.*, 2007). Uma das principais vantagens é que possibilita a obtenção de informações a respeito da significância de cada variável no método analítico, bem como as interações entre as variáveis. Além disso, resultando em um menor consumo de reagente e geração de resíduos (Tarley *et al.*, 2009).

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (Peralta-Zamora *et al.*, 2005).

O planejamento fatorial determina que fatores têm efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores. Além disso, permite estabelecer e quantificar as correlações entre os diferentes fatores (Volpato *et al.*, 2008)

3.5.1 Parte experimental

Alguns cuidados devem ser observados para que se possa obter o máximo de informações na realização do planejamento fatorial:

Replicatas – Realização de repetições dos ensaios para que se possa estimar o erro experimental. As replicatas devem ser repetições autênticas, devendo representar adequadamente o espaço experimental no qual o planejamento fatorial foi desenvolvido (Fisher, 1935).

Realização dos experimentos – É importante que todos os ensaios e replicatas previstos no desenvolvimento do fatorial sejam realizados de forma aleatória. Esses cuidados visam evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas (Andrade *et al.*, 2000).

Nos planejamentos experimentais onde as variáveis são exploradas em 2 níveis é comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes de planejamento (Himsworth *et al.*, 1965). A partir destas considerações, o exemplo anterior pode ser representado pela Tabela 1, onde os resultados das medidas em duplicata e suas médias também são mostradas. A resposta seria, por exemplo, o rendimento de uma planta piloto industrial.

Tabela 1 - Exemplo de matriz de planejamento.

Experimento	A	B	C	Resultados	Réplica	Média
1	-	-	-	res 1	rep 1	(res1+rep1)/2
2	-	-	+	res 2	rep 2	(res2+rep2)/2
3	-	+	+	res 3	rep 3	(res3+rep3)/2
4	+	+	+	res 4	rep 4	(res4+rep4)/2
5	+	+	-	res 5	rep 5	(res5+rep5)/2
6	+	-	-	res 6	rep 6	(res6+rep6)/2
7	+	-	+	res 7	rep 7	(res7+rep7)/2
8	-	+	-	res 8	rep 8	(res8+rep8)/2

Fonte: Autor (2018).

Esta codificação de variáveis é de grande ajuda quando se realizam os cálculos para determinar qual a influência das variáveis estudadas e das suas interações no sistema em estudo (Andrade *et al.*, 2000).

3.6 FATORES DE INFLUÊNCIA

Vários fatores podem influenciar uma síntese orgânica de maneira positiva ou negativa. Na figura abaixo podemos ver alguns fatores que podem influenciar uma síntese. Certamente existem outros fatores que podem influenciar uma síntese, mas são de influência mínima e não foram considerados (Figura 10).

No escalonamento, de forma direta, não basta apenas multiplicar o que você fez em escala menor e repetir em uma escala maior. Há consequências inevitáveis quando se aumenta a escala, como por exemplo a redução da proporção da área de superfície para volume, transferência de calor, taxa de geração de calor e cinética, capacidade de remoção de calor do reator, acumulação de reagentes e energia.

Figura 10 - Fatores de influência de síntese



Fonte: Adaptado de Moser e Poggiali, 2008.

3.7 ESCALONAMENTO

Scale-up ou escalonamento é o processo de trabalho que permite passar de uma escala de laboratório ou piloto de desenvolvimento, para uma escala ampliada de produção. É também um mecanismo de seleção de equipamentos e condições de operação industrial. No escalonamento, o desenvolvimento de produtos e processos tendem a avançar em pequenos passos, indo, por exemplo, de uma escala laboratorial para uma escala de bancada, então para uma escala piloto, e finalmente para uma escala de produção. Esses passos minimizam os riscos de um grande investimento no próximo passo.

Na escala laboratorial, prova que o produto pode ser feito a partir de matéria primas, no caso, um estudo de prova de conceito. Na escala de bancada, produzir material suficiente para testar suas propriedades, aprender sobre os processos de produção e melhora na formulação. Na escala piloto, tentar produzir uma quantidade maior, antes de grandes investimentos de maior riscos, analisar possíveis problemas e pontos críticos. A escala piloto também ajuda no desenvolvimento de desenho uma planta industrial.

O aumento de escala normalmente ocorre na ordem de dez vezes, partindo por exemplo da escala de uma grama e aumentando para dez gramas, 100 gramas, um quilo, dez quilos e assim por diante. No presente trabalho foi utilizado 0,5 gramas do composto LPSF GQ-01 como ponto de partida. A próxima escala em um possível escalonamento seria a quantidade de cinco gramas do reagente LPSF GQ-01.

Apesar de não ser utilizado neste trabalho, também existe o scale-down, que é principalmente utilizado para soluções de problemas ou desenvolvimento nos processos utilizados na produção em andamento.

3.8 LPSF GQ-16 - 5-(5-BROMO-2-METOXI-BENZILIDENO)-3-(4METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco recebeu a carta patente da molécula LPSF GQ-16 com vigência até 2028 (Anexo A). Este produto está sendo comercializado mundialmente nos Estados Unidos, Europa, China e Japão para fins de pesquisa por outras empresas (Tabela 2). Carta patente número PI 0300997-1, 2018.

Tabela 2 - Empresas que comercializam o LPSF GQ-16 no mundo

Empresa	País	Faixa de Preço	Quantidade
Thomas Scientific	EUA	\$ 438,00	100mg
LypharmaTech	China	-	-
Bertin Bioreagent	França	\$ 491,64	100mg
Funakoshi	Japão	\$ 617,00	100mg
MuseChem	EUA	-	-
Biomol	Alemanha	\$ 499,63	100mg
ApexBio	China	\$ 660,36	100mg
LSBio	EUA	\$ 375,00	100mg
MedKoo Biosciences	EUA	\$ 350,00	100mg
Santa Cruz Biotechnology	EUA	\$ 950,00	100mg
Cayman Chemical	EUA	-	-
SinoStandards	China	-	-
Ark Pharm	EUA	-	-
Arspichem	EUA	\$ 855,00	100mg
Aurora Building Blocks	EUA	-	-
Chemieliva Pharmaceutical	China	-	-
Haoyuan Chemexpress	China	-	-
LabNetwork Compounds	EUA	\$ 350,00	100mg
Proactive Intermediates for R&D	EUA	-	-

Fonte: Autor (2018)

O LPSF GQ-16 é um agonista parcial de PPAR γ , com propriedades antidiabéticas em camundongos submetidos a dietas hiperlipídicas. O LPSF GQ-16 inibe a fosforilação mediada por Cdk5 invocando a adipogênese e o agonismo clássico. (Amato *et al.* 2012).

O LPSF GQ-16 também mostrou atividade agonista parcial em PPAR γ de pró-monócitos humanos U-937. O GQ-16 se difere das TZDs clássicas, pois apresentou atividade agonista parcial de PPAR, competiu pela ligação LBD do PPRA, induziu a interação entre o PPAR e o coativador SRC-1 (Coativador 1 do receptor de esteroide), além disso, a ligação do GQ-16 com o PPAR ocasionou em uma modificação conformacional do receptor de forma diferente da rosiglitazona. Esses estudos ainda mostraram bons resultados in vivo e in vitro em pesquisas de desordens metabólicas relacionadas à obesidade, diabetes mellitus e inflamação crônica (Amato, 2008; Amato *et al.*, 2012)

O LPSF GQ-16 demonstrou semelhanças consideráveis com as TZDs quanto ao aumento da sensibilidade da insulina endógena, mas não aumentou o ganho de peso; efeito adverso já descrito por tiazolidinadionas clássicas (Amato *et al.*, 2012).

Ademais, chama a atenção que LPSF GQ-16 é específico para PPAR γ e não é adipogênico em cultura de células mesenquimais, sendo assim, não promove ganho de peso como a rosiglitazona e não induz a retenção de água, que por sua vez diminui os valores de hematócrito (Choi *et al.*, 2010; Amato *et al.* 2012; Martini, 2012).

No estudo de Amato *et al.* (2012), em ensaios de diferenciação de adipócitos, o LPSF GQ-16 apresentou potencial adipogênico reduzido quando comparado à rosiglitazona, tanto em préadipócitos murinos (3T3-L1) quanto em células mesenquimais (C3H10T1/2) (105). In vivo, esses resultados foram confirmados por Coelho e colaboradores, que alimentaram camundongos com dieta hiperlipídica (60% kcal de gordura) e trataram com veículo (Tween®-20 diluído em salina 0,25%) rosiglitazona (4mg/kg/d) ou LPSF GQ-16 (40 mg/kg/d) por gavagem durante duas semanas. Ao final do tratamento, observaram que o LPSF GQ-16 reduziu o ganho de massa induzido pela dieta e a massa do tecido adiposo epididimal, a glicemia em jejum e os níveis de triglicerídeos no fígado. Esses dados sugerem que agonistas parciais de PPAR γ promovem a sensibilização à insulina sem os efeitos desfavoráveis que parecem estar associados ao agonismo completo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

A espectroscopia de ressonância nuclear de hidrogênio e carbono foi efetuada em espectrofotômetro Varian Modelo Plus 300 MHz. A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em equipamento HPLC LC-20AD Shimadzu.

Cromatografia em camada delgada será realizada em placas Merck silicagel 60 F₂₅₄, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm). Todos os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos e para suas análises pertencem às marcas Sigma/Aldrich, Merck ou Vetec.

O estudo para otimização de síntese do LPSF GQ-16 foi realizado em vidraria especial Aldrich Air Sensitive Chemistry Glass Lab Kit, partindo da escala de 0,5g do intermediário LPSF GQ-01, utilizando placa aquecedora.

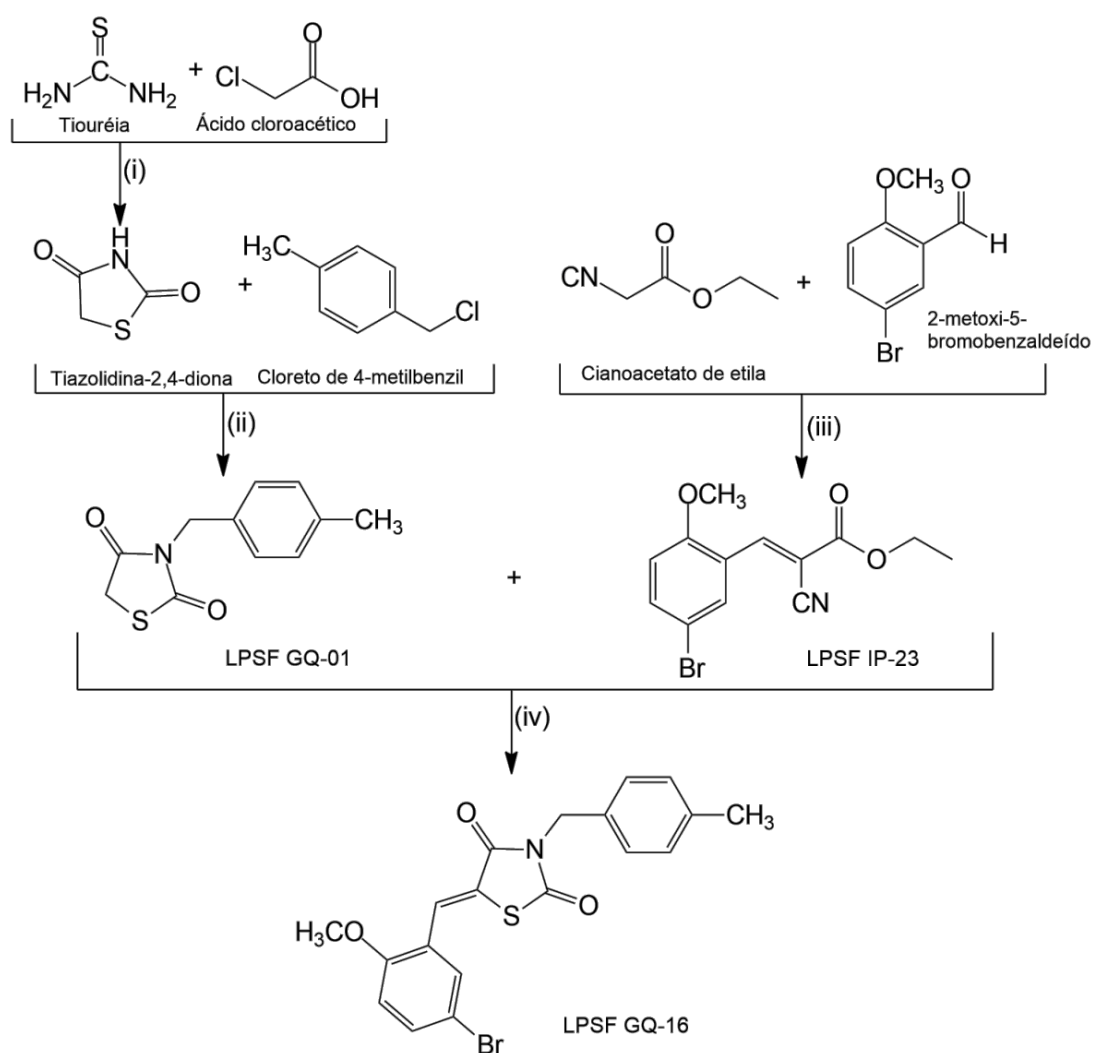
Os reagentes e catalizador utilizados para a síntese do GQ-16 foram: tiazolidina-2,4-diona, cloreto de 4-metilbenzil, hidróxido de sódio, morfolina, cianoacetato de etila, 2-metoxi-5-bromo-benzaldeído.

4.2 METODOLOGIA GERAL DE SÍNTESE

O composto final LPSF GQ-16 foi obtido através de 4 etapas reacionais. A primeira reação consistiu em uma reação de ciclização partindo da tiouréia com o ácido monocloroacético para a obtenção do anel da tiazolidina-2,4-diona. Na segunda etapa, a tiazolidina-2,4-diona foi N-alquilada na presença de cloreto de 4-metilbenzil dando origem ao intermediário 3-(4-Metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF GQ-01). Em paralelo, na terceira etapa, há a condensação de Knoevenagel entre o cianoacetato de etila com 2-metoxi-5-bromobenzaldeído, formando o éster 3-(5-bromo-2-metoxi-fenil)-2-ciano-acrílico (LPSF IP-23). Por último, reagem o LPSF

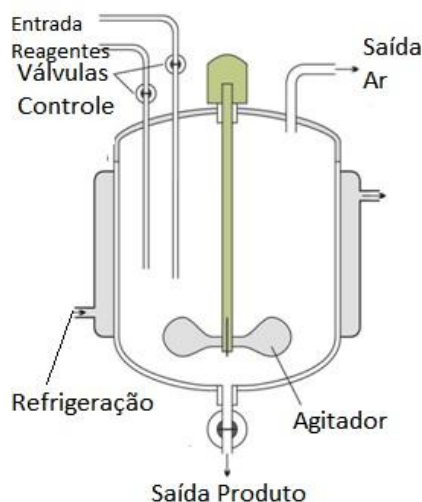
IP-23 com o LPSF GQ-01 para formar os compostos finais 5-(5-Bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF GQ-16) através de uma reação de adição de Michael (Figura 11).

Todas as quatro reações foram feitas em batelada (Figura 12), que é um processo mais comum em síntese orgânica devido a sua versatilidade, flexibilidade de produção e planejamento. A maioria dos processos nas indústrias química e farmacêutica são executadas em batelada.



Fonte: Autor (2018).

Figura 12 - Exemplo de reator em batelada

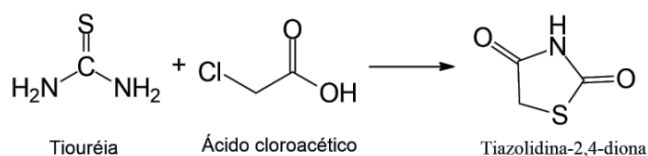


Fonte: Modificado de The Essential Chemical Industry - Online

4.3 SÍNTESE TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

A tiazolidina-2,4-diona ($C_3H_3NO_2S$, 117.30 g/mol) tem uma síntese bastante simples e consolidada no LPSF. Sua síntese consistiu na adição da cinco gramas de tiouréia solubilizado em 25 ml de água destilada e do Ácido Cloroacético também solubilizado em 25 ml de água destilada, em uma balão de 3 bocas, sem a necessidade de adição de algum catalisador. A reação foi aquecida a 80 °C, ficando sob refluxo por 24 horas. Ao fim da reação, o produto foi colocado em u Becker e levado à geladeira para cristalização. Após um dia o produto foi filtrado e posteriormente levado para o dessecador, para sua secagem (Figura 13).

Figura 13 - Rota de síntese da Tiazolidina-2,4-diona

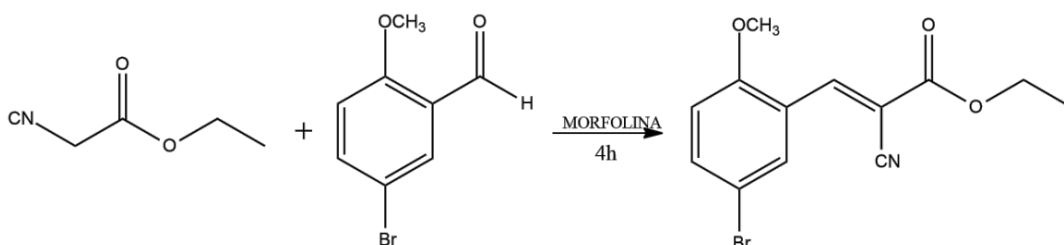


Fonte: Autor (2018)

4.4 SÍNTESE LPSF IP-23 - ÉSTER 3-(5-BROMO-2-METOXI-FENIL)-2-CIANO-ACRÍLICO

O éster de Cope LPSF IP-23 ($C_{13}H_{12}BrNO_3$, 309g/mol), foi obtido a partir da reação do cianoacetato de etila com o 2-metóxi-5-bromobenzaldeído na presença de morfolina como catalisador e tolueno como solvente. A mistura reacional foi aquecida a uma temperatura de 110 °C e mantida sob refluxo por 4 horas (Figura 14). Após este período, o produto foi filtrado e lavado à geladeira para cristalização.

Figura 14 - Rota de síntese do LPSF IP-23.

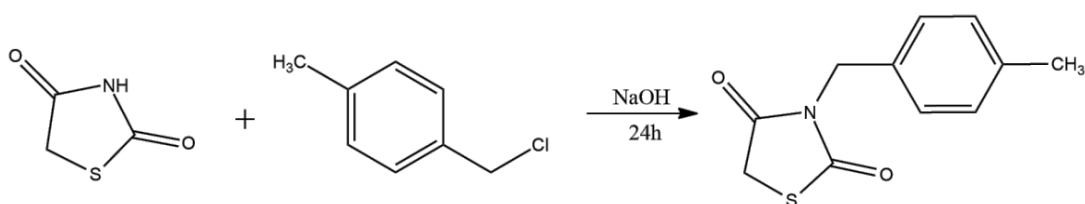


Fonte: Autor (2018)

4.5 SÍNTESE LPSF GQ-01 - 3-(4-METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

O LPSF GQ-01 ($C_{11}H_{11}NO_2S$, 221,28g/mol) foi sintetizado em balão redondo de 3 bocas SIGMA ALDRICH Air Sensitive de 100 mL foram adicionados a tiazolidina-2,4-diona e hidróxido de sódio previamente dissolvido em álcool metílico. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 20 minutos para formação do sal da tiazolidina. Passado este tempo, foi adicionado o cloreto de 4-metilbenzila e a mistura foi aquecida a 110°C até que a reação foi finalizada. O tempo de reação foi de aproximadamente 24 horas, sendo acompanhada por cromatografia em camada delgada (Figura 15).

Figura 15 - Rota Síntese do LPSF GQ-01.

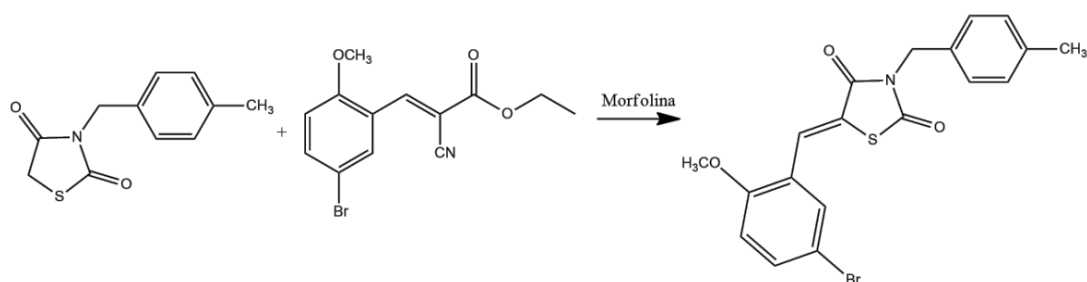


Fonte: Autor (2018).

4.6 SÍNTESE LPSF GQ-16 - 5-(5-BROMO-2-METOXI-BENZILIDENO)-3-(4METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

O LPSF GQ-16 ($C_{19}H_{16}BrNO_3S$, 419,00 g/mol) foi sintetizado em balão Sigma Aldrich Air Sensitive com capacidade para 100 ml adicionou-se 0,5 gramas do composto LPSF GQ-01 (3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona) juntamente com 0,69g do composto LPSF IP-23 (Éster 3-(5-bromo-2-metoxi-fenil)-2-ciano-acrílico). Com os dois compostos dentro o balão foram adicionados o solvente, etanol e o catalizador morfolina (Figura 16). As quantidades de solvente e catalizador dependeram do desenho do experimento. A quantidade de morfolina foi de 5 ou 10 gotas e a quantidade de etanol foi de 15 ou 30 mL. Com os dois compostos, o solvente e o catalisador dentro do balão o aquecimento foi ligado e a temperatura se manteve em 79 °C sob refluxo. A solução, inicialmente se mantém amarelada, devido à coloração do IP-23 e da morfolina. Após a temperatura se manter a 79 °C, ocorreu completa solubilização da mistura. O tempo de cada reação também variou, sendo ele de 3 ou 5 horas, dependendo do desenho da reação. Após este período, a solução foi levada para geladeira, em um béquer, para possível formação de mais cristais. Posteriormente, fez-se uma filtração simples dos cristais. Por fim, os cristais foram levados para o dessecador até completa secagem. Fez-se ainda um HPLC para verificar a pureza do produto com maior confiança.

Figura 16 - Síntese do LPSF GQ-16.



Fonte: Autor (2018).

As sínteses, tanto do LPSF GQ-16 quanto dos seus intermediários, foram realizadas em batelada. Reações em batelada são comumente utilizadas em química fina, especializada e farmacêutica, devido à sua versatilidade, flexibilidade de planejamento e produção (Figura 11). Mas por outro lado, essas reações são frequentemente difíceis de serem escalonadas por causa de problemas com o aquecimento e transferência de massa. Além disso, eles demandam uma capacidade de armazenamento significativo de intermediários entre os estágios do processo, resultando em grandes estoques de produtos químicos orgânicos e intermediários sensíveis (Campagnoni e Rossetti, 2017).

4.7 PLANEJAMENTO FATORIAL

Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas (Deming e Morgan, 1973) e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores (Eiras *et al.*, 1994). Em seguida são realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados (Brereton, 1987).

As tabelas 3 e 4 ilustram o planejamento fatorial onde foram levados em consideração três variáveis: tempo de reação, quantidade de solvente e quantidade de catalizador, sendo essas variáveis consideradas quantitativas.

Tabela 3 - Planejamento fatorial de três variáveis e dois níveis utilizado no presente trabalho. As variáveis são Tempo de Reação (3 e 5 horas), Quantidade de catalizador utilizado (5 ou 10 gotas) e Quantidade de Solvente utilizado (15 ou 30 ml)

Variáveis	Níveis selecionados	
Tempo Reação (t, horas)	3	5
Quantidade de Catalisador (k, Gotas)	5	10
Quantidade de Solvente (S, ml)	15	30

Fonte: Autor (2018).

Tabela 4 - Desenho dos experimentos com as combinações entre os fatores de influência

Experimentos	Combinações		
	t	k	S
y			
1	3	5	15
2	3	5	30
3	3	10	15
4	3	10	30
5	5	5	15
6	5	5	30
7	5	10	15
8	5	10	30

Fonte: Autor (2018).

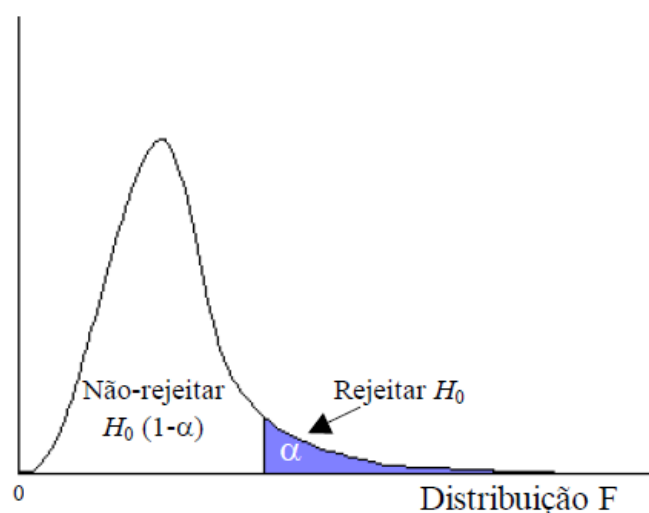
Uma das ferramentas estatísticas utilizada nos processos de otimização são os planejamentos fatoriais, em que são definidas as variáveis que serão otimizadas (k) e os níveis avaliados (n), em que n^k consistirá no número de experimentos necessários para que todas as combinações de variáveis sejam satisfeitas. Normalmente, nos métodos analíticos são escolhidos dois níveis de estudo os quais são nomeados pelo sinal (-) para o nível mais baixo e (+) para o nível mais alto. Para variáveis qualitativas, o analista define os níveis, uma vez que não existe valores altos e baixos (Teólilo & Ferreira, 2006).

A utilização do planejamento fatorial possibilita definir, com reduzido número de experimentos, quais parâmetros, dentre os selecionados, afetam de forma mais significativa a reação. Após a realização de todos os experimentos, foi feita uma análise de interações individuais e de interações entre fatores com o teste exato de Fisher, para a partir desses resultados, planejar a sua produção em escala maior.

Levine *et al.* (1998), Devor et AL. (1992) e Montgomery (1991) propõe uma metodologia para conduzir o teste de hipótese dos experimentos, começando pela formulação das hipóteses. A primeira é a Hipótese Nula (H_0), que parte do princípio que não existe nenhuma diferença significativa entre os fatores analisados de uma população e será sempre a hipótese testada no experimento. A segunda é a hipótese alternativa (H_1), e parte do princípio que será verdadeira caso a hipótese nula seja considerada falsa.

A segunda parte da metodologia seria determinar o valor crítico da estatística de teste a partir da distribuição estatística de F de Fisher, calculada com base nos resultados da amostra. O nível de significância (α) do teste estatístico deve ser de 0,1 ou menos, para determinar o tamanho da região de rejeição da hipótese nula do experimento. Com isso, os valores críticos que dividem as regiões de rejeição e não-rejeição podem ser determinados, conforme apresentado na figura 17.

Figura 17 - Regiões de rejeição e não-rejeição para uma distribuição F



Fonte: Levine et al. (1998)

4.7.1 Teste Exato de Fisher

O teste exato de Fisher foi utilizado para a análise dos resultados em detrimento do teste do qui-quadrado pois a quantidade de amostras é pequeno, devido ao planejamento fatorial de experimentos. Com grandes amostras, um teste qui-quadrado pode ser usado. No entanto, o valor de significância que ele fornece é apenas uma aproximação, porque a distribuição amostral da estatística de teste calculada é apenas aproximadamente igual à distribuição qui-quadrado teórica.

O teste exato de Fisher é um teste de significância estatística utilizado na análise de tabelas de contingência. Embora na prática seja empregado quando os tamanhos das amostras são pequenos, é válido para todos os tamanhos de amostra. Recebeu o nome de seu inventor, Ronald Fisher, e faz parte de uma classe de testes exatos, assim chamados porque a significância do desvio de uma hipótese nula pode ser calculada exatamente, em vez de depender de uma aproximação. que se torna exato no limite à medida que o tamanho da amostra cresce até o infinito, como acontece com muitos testes estatísticos (Agresti, 1992).

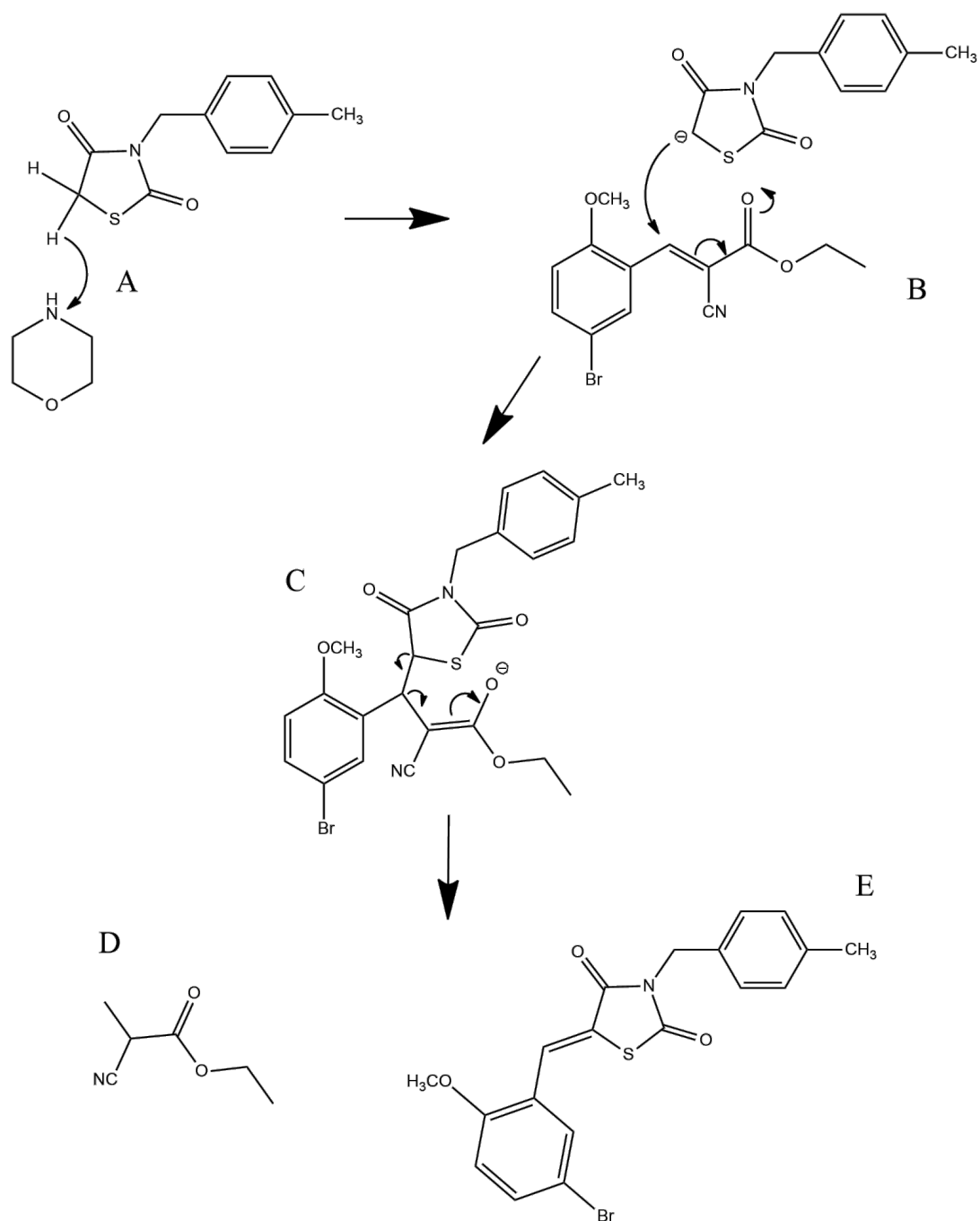
Ao fim da análise estatística, obtemos um valor da razão F para cada efeito, individual e de interação de fatores. Com este valor, podemos comparar com a tabela de dados da estatística F, sendo os graus de liberdade (GL) 1 no numerador e 8 no denominador ($V_1 = 1$; $V_2 = 8$), para um α de 5% e de 10%, temos o valor de 5.318 para um α de 5% e o valor de 3.458 para um α de 10%. Quando o resultado obtido para cada efeito individual ou de interação é superior ao valor definido para o α de 5% ou 10%, significa que o determinado efeito afeta a resposta, no caso, o rendimento da síntese.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MECANISMO DE REAÇÃO

O LPSF GQ-16 foi obtido através de uma reação de adição de Michael. O LPSF GQ-16, é o resultado da síntese do LPSF IP-23 com o LPSF GQ-01, com morfolina como catalisador. Inicialmente, a morfolina abstrai um próton alfa do LPSF GQ-01, formando um enolato (Figura 18, A). Em seguida, este enolato ataca o carbono beta do composto LPSF IP-23, formando uma ligação carbono carbono entre eles (Figura 18, B). Com a formação desta ligação, a densidade eletrônica do LPSF IP-23 se desloca para o oxigênio da carbonila, formando um novo enolato (Figura 18, C). Por último, durante a protonação, há a exclusão da parte C₆H₉NO₂ (Figura 18, D), formando o composto final LPSF GQ-16 (Figura 18, E).

Figura 18 - Mecanismo de reação proposto para a síntese do LPSF GQ-16



Fonte: Autor (2018)

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a realização das 16 sínteses, oito sínteses planejadas e oito réplicas, temos os rendimentos individuais e a média dos rendimentos entre a síntese planejada e em réplica (Tabela 5). Os experimentos foram realizados de forma aleatória para evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos.

Tabela 5 - Sínteses realizadas do LPSF GQ-16 com os fatores de controle, rendimentos das sínteses planejadas e das réplicas e suas respectivas médias

Experimento	Solvente	Tempo Reação	Catalizador	Fator de Controle			Rendimento A (%)	Rendimento B (%)	Resultado (y)	Média (%)
				x ₁	x ₂	x ₃				
1	30	3hrs	10	1	-1	1	84,09%	90,42%	y1	87,26%
2	15	3hrs	10	-1	-1	1	89,77%	90,73%	y2	90,25%
3	15	5hrs	10	-1	1	1	92,04%	89,95%	y3	91,00%
4	30	5hrs	10	1	1	1	78,40%	90,42%	y4	84,41%
5	15	3hrs	5	-1	-1	-1	91,84%	90,82%	y5	91,33%
6	30	3hrs	5	1	-1	-1	89,38%	82,65%	y6	86,02%
7	15	5hrs	5	-1	1	-1	89,91%	92,88%	y7	91,40%
8	30	5hrs	5	1	1	-1	84,39%	90,93%	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Com os experimentos feitos, podemos calcular os efeitos de variação do nível -1 para +1 de um ou mais fatores, que causam um efeito de variação na resposta. Portanto, o efeito é a variação da resposta causada pela variação (de -1 para +1) do fator ou dos fatores. Temos dois tipos de efeitos, sendo eles o Efeito Principal e Efeito de Interação. O Efeito principal é a variação média da resposta causada pela variação de um determinado fator de -1 para +1. Os Efeitos Principais são os seguintes:

E1 – Para a variação de -1 para +1 do fator 1

E2 – Para a variação de -1 para +1 do fator 2

E3 – para a variação de -1 para +1 do fator 3

Para calcular E1, usamos a seguinte fórmula, de acordo com a tabela X:

$$E1 = \frac{(y1-y2)+(y4-y3)+(y6-y5)+(y8-y7)}{4}$$

Tabela 6 - Variações -1 para +1 do fator x1, para x2 e x3 iguais

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018).

Como resultado, temos que:

$$E1 = \frac{(0,8726-0,9025)+(0,8441-0,9100)+(0,8602-0,9133)+(0,8766-0,9140)}{4}$$

$$4$$

$$E1 = -0,0465$$

Para calcular E2, foi utilizada a seguinte fórmula, de acordo com a tabela X:

$$E2 = \frac{(y4-y1)+(y3-y2)+(y7-y5)+(y8-y6)}{4}$$

Tabela 7 - Variações -1 para +1 do fator x2, para x1 e x3 iguais

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Como resultado, temos que:

$$E2 = \frac{(0,8441-0,8726)+(0,9100-0,9025)+(0,9140-0,9133)+(0,8766-0,8602)}{4}$$

4

$$E2 = -0,000975$$

Para Calcular E3, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$E3 = \frac{(y1-y6)+(y2-y5)+(y3-y7)+(y4-y8)}{4}$$

Tabela 8 - Variações -1 para +1 do fator x3, para x1 e x2 iguais

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Com isso, temos que:

$$E3 = \frac{(0,8726-0,8602)+(0,9025-0,9133)+(0,9100-0,9140)+(0,8441-0,8766)}{4}$$

4

$$E3 = -0,008725$$

De maneira simplificada, também calculamos o E1, E2 e E3 pelas seguintes fórmulas:

$$E1 = \frac{y1-y2-y3+y4-y5+y6-y7+y8}{n/2}$$

$$E2 = \frac{-y1-y2+y3+y4-y5-y6+y7+y8}{n/2}$$

$$E3 = \frac{y1+y2+y3+y4-y5-y6-y7-y8}{n/2}$$

Onde n = número de experimentos planejados.

O efeito da interação se dá entre dois ou mais fatores, que é quando o efeito do fator (na resposta) depende do nível dos outros fatores. Os efeitos de interação serão os seguintes:

E_{12} – Quando o efeitos de x_1 depende do nível de x_2

E_{13} - Quando o efeitos de x_1 depende do nível de x_3

E_{23} - Quando o efeitos de x_2 depende do nível de x_3

E_{123} - Quando o efeitos de x_1 depende do nível de x_2 e x_3

Para o E_{12} , quando o fator x_2 está no nível +1 temos:

Tabela 9 - Efeito de Interação de X_1 para X_2 em +1

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x_1	x_2	x_3		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$\begin{aligned}
 E1 \text{ (x2 em +1)} &= \frac{(y4-y3) + (y8-y7)}{2} \\
 &= \frac{-10,32\%}{2} \\
 &= -0,0516
 \end{aligned}$$

Para o E_{12} quando o fator x2 está no nível -1 temos:

Tabela 10 - Efeito de Interação de X1 para X2 em -1

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$\begin{aligned}
 E1 \text{ (x2 em -1)} &= \frac{(y1-y2) + (y6-y5)}{2} \\
 &= \frac{-8,31\%}{2} \\
 &= -0,04155
 \end{aligned}$$

Com os valores de E1 para x2 em +1 e -1, calculamos o E12:

$$E12 = \frac{E1(X2 \text{ em } +1) - E1(X2 \text{ em } -1)}{2}$$

$$E12 = \frac{-1,00\%}{2}$$

$$E12 = -0,00502$$

Para o E13, quando o fator x3 está no nível +1 temos:

Tabela 11 - Efeito de Interação de X1 para X3 em +1

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$\begin{aligned}
 E1(x3 \text{ em } +1) &= \frac{(y1-y2)+(y4-y3)}{2} \\
 &= \frac{-9,58\%}{2} \\
 &= -0,0479
 \end{aligned}$$

Para o E_{13} , quando o fator x_3 está no nível -1 temos:

Tabela 12 - Efeito de Interação de X_1 para X_3 em -1

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x_1	x_2	x_3		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$\begin{aligned}
 E1 (x_3 \text{ em } -1) &= \frac{(y_6 - y_5) + (y_8 - y_7)}{2} \\
 &= \frac{-9,05\%}{2} \\
 &= -0,04525
 \end{aligned}$$

Com os valores de $E1$ para x_3 em +1 e -1, calculamos o E_{13} :

$$\begin{aligned}
 E_{13} &= \frac{E1(X_3 \text{ em } +1) - E1(X_3 \text{ em } -1)}{2} \\
 E_{13} &= \frac{-0,27\%}{2} \\
 E_{13} &= -0,001325
 \end{aligned}$$

Para o E_{23} , quando o fator x_3 está no nível +1 temos:

Tabela 13 - Efeito de Interação de X2 para X3 em +1

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$E2 (x3 \text{ em } +1) = \frac{(y4 - y1) + (y3 - y2)}{2}$$

$$E2 (x3 \text{ em } +1) = \frac{-2,10\%}{2}$$

$$E2 (x3 \text{ em } +1) = -1,05\%$$

Para o E23, quando o fator x3 está no nível -1 temos:

Tabela 14 - Efeito de Interação de X2 para X3 em -1

Experimento	Fator de Controle			Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	1	-1	1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	y3	91,00%
4	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	y7	91,40%
8	1	1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$E2(x_3 \text{ em } -1) = \frac{(y_7 - y_5) + (y_8 - y_6)}{2}$$

$$E2(x_3 \text{ em } -1) = \frac{1,71\%}{2}$$

$$E2(x_3 \text{ em } -1) = 0,86\%$$

Com os valores de E2 para x₃ em +1 e -1, calculamos o E13:

$$E23 = \frac{E2(X_3 \text{ em } +1) - E2(X_3 \text{ em } -1)}{2}$$

$$E23 = \frac{-1,91\%}{2}$$

$$E23 = -0,009525$$

Por fim calculamos o efeito de interação E123, que é o efeito de interação entre os três fatores. O E123 pode ser calculado a partir da tabela abaixo, onde os valores + ou – são o produto da multiplicação dos fatores individuais x1, x2 e x3:

Tabela 15 - Efeitos de interação entre os fatores X1, X2 e X3

Experimento	Fator de Controle			Fator de Interação				Resultado (y)	Média (%)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁₂	x ₁₃	x ₂₃	x ₁₂₃		
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	y1	87,26%
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	y2	90,25%
3	-1	1	1	-1	-1	1	-1	y3	91,00%
4	1	1	1	1	1	1	1	y4	84,41%
5	-1	-1	-1	1	1	1	-1	y5	91,33%
6	1	-1	-1	-1	-1	1	1	y6	86,02%
7	-1	1	-1	-1	1	-1	1	y7	91,40%
8	1	1	-1	1	-1	-1	-1	y8	87,66%

Fonte: Autor (2018)

Onde:

$$E_{123} = \frac{-y_1 + y_2 - y_3 + y_4 - y_5 + y_6 + y_7 - y_8}{n/2}$$

$$E_{123} = \frac{-5,17\%}{4}$$

$$E_{123} = -0,01293$$

Com os valores de efeitos individuais e de interação já calculados, podemos calcular objetivamente sobre quais efeitos são, de fato, significativos no rendimento final das sínteses. Podemos calcular isto a partir de uma análise de variância, a partir da tabela abaixo:

Tabela 16 - Exemplo de tabela com os dados necessários e fórmulas para cálculo da Razão F

Fonte Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F
E1	S_{E1}	1	S_{E1}^2	S_{E1}^2/SR^2
E2	S_{E2}	1	S_{E2}^2	S_{E2}^2/SR^2
E3	S_{E3}	1	S_{E3}^2	S_{E3}^2/SR^2
Inter. E12	S_{E12}	1	S_{E12}^2	S_{E12}^2/SR^2
Inter. E13	S_{E13}	1	S_{E13}^2	S_{E13}^2/SR^2
Inter. E23	S_{E23}	1	S_{E23}^2	S_{E23}^2/SR^2
Inter. E123	S_{E123}	1	S_{E123}^2	S_{E123}^2/SR^2
Erro	S_R	$2^k(n-1)$	S_R^2	
Total	S_D	$n2^k-1$		

Fonte: Autor (2018).

Temos então que:

E1	=	-0,046575
E2	=	-0,000975
E3	=	-0,008725
Inter. E12	=	-0,005025
Inter. E13	=	-0,001325
Inter. E23	=	-0,009525
Inter.E123	=	-0,01293

O grau de liberdade de cada fonte de variação é calculado pela fórmula $n-1$, onde n é igual a dois, pois cada fator foi testado em dois níveis. O grau de liberdade do erro corresponde a todas as combinações de testes, no caso, 2^k multiplicado por $n-1$.

A soma dos quadrados foi calculada para cada fonte de variação pela seguinte fórmula:

$$S_E = \frac{n2^k(E)^2}{4}$$

Onde n é igual a dois, k é igual a três e E é o valor de cada efeito individual e de interação, já calculados.

Para a soma de quadrados total, utilizamos a seguinte fórmula:

$$SD = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{T^2}{nN}$$

Para a soma de quadrados do erro, utilizamos a seguinte fórmula, com base na soma de quadrados individuais das fontes de variação e a soma de quadrados total:

$$SR = SD - SE1 - SE2 - SE3 - SE12 - SE13 - SE23 - SE123$$

O quadrado médio é calculado a partir da razão entre a Soma de Quadrados e o Grau de liberdade de cada Interação. Por fim temos o calculo para o valor da Razão F, que é a razão entre o Quadrado médio de cada interação pelo quadrado médio do erro.

Após todos os cálculos, temos a seguinte tabela com os valores da Soma dos Quadrados, Graus de Liberdade, Quadrado Médio e Razão F:

Tabela 17 - Tabela com os valores da Soma dos Quadrados, Graus de Liberdade, Quadrado Médio e Razão F para todos os efeitos individuais e de interação

Fonte Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F
E1	0,008679	1	0,008679	4,82691
E2	0,000004	1	0,000004	0,00209
E3	0,000304	1	0,000304	0,16916
Inter. E12	0,000101	1	0,000101	0,05606
Inter. E13	0,000007	1	0,000007	0,00391
Inter. E23	0,000363	1	0,000363	0,20184
Inter. E123	0,000669	1	0,000669	0,37194
Erro	0,014386	8	0,001798	
Total	0,024513	15		

Fonte: Autor (2018)

Com os valores da Razão F definidos, podemos utilizar a tabela de distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% e 10% de significância. Para o nível de 5% todos os valores da teste F ficam abaixo do valor tabelado de 5,32, levando a conclusão de que nenhum dos efeitos foi significativo no rendimento da síntese do LPSF GQ-16. Para o nível de 10%, apenas o E1 fica acima do valor tabelado de 3,45, levando a conclusão de que este é o único efeito que influencia no rendimento da síntese do LPSF GQ-16.

A análise de variância, para a síntese do LPSF GQ-16, demonstra com 90% de confiança que o fator que influencia de maneira significativa o rendimento final é a quantidade de solvente menor (15ml). Para as outras variáveis, quantidade de catalisador e tempo de reação não influenciam o rendimento final do LPSF GQ-16. De acordo também com o teste F, os efeitos de interação E12, E13, E23 e E123 não apresentam significância no rendimento final da síntese.

A falta de significância dos Efeitos Individuais 2 e 3 (quantidade de catalisador e tempo de reação) e de todos os Efeitos de Interação não significa um resultado negativo, mas apenas que determinado efeito não influencia de maneira significativa no rendimento final da síntese do LPSF GQ-16. Porém, já que tais efeitos não tem significância individual nem significância entre os fatores, em um possível escalonamento, a utilização de menor tempo de reação (3 horas) e menor quantidade de catalisador (5 gotas) seria o indicado, visando uma economia no gasto de catalisador, energia e tempo.

Em comparação a outros trabalhos de fatores de influência na síntese com análise de variância, Moser e Poggiali (2008) constaram que na síntese da aspirina, o tempo de reação não influencia de maneira significativa no rendimento final da síntese. Lienard *et al.* (2017), por outro lado, avalia que para a síntese do composto SL65.0102-10, um tempo reação maior (6 horas) em relação a um tempo menor (3 horas) aumenta o rendimento final de sua síntese. Golofit *et al.* (2017), porém, observa que um maior tempo de reação influencia melhor no rendimento final da síntese. O tempo de reação, portanto, é um fator de influência que varia dependendo da síntese, podendo influenciar de maneira significativa com mais ou menos tempo.

Lee *et al.* (2015) avalia que um aumento na concentração dos reagentes, utilizando uma menor quantidade de solvente na síntese de amidas resulta em um maior rendimento final da síntese. Quel *et al.* (2017). Também observa que menor quantidade de de solvente aumenta o rendimento final na síntese de bifenol. Portanto, uma menor quantidade de solvente aumenta a concentração dos reagentes e influencia de maneira significativa o rendimento final da reação.

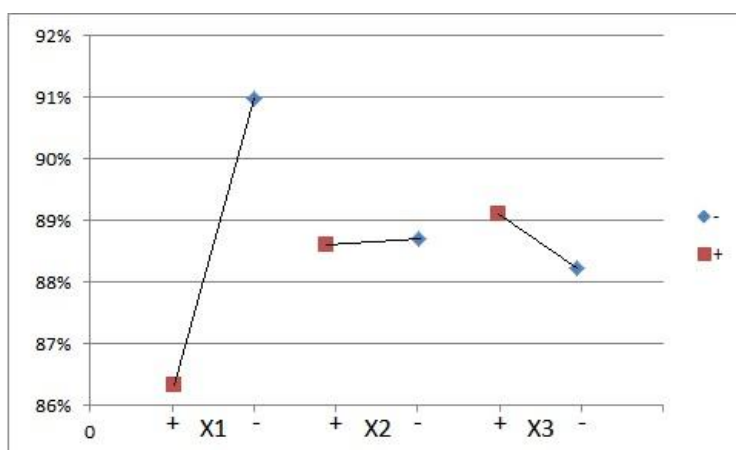
Um catalisador é uma substância que altera a taxa de uma reação química, mas permanece quimicamente inalterada posteriormente. O catalisador aumenta a taxa da reação, fornecendo um mecanismo de reação diferente para ocorrer com uma energia de ativação mais baixa. Sulman *et al.*, afirma que o aumento da quantidade de catalisador utilizado em uma reação de hidrogenação só é significativa até certo ponto, e que após isso, o aumento de catalisador passa a não influenciar de maneira significativa o rendimento final da síntese.

5.3 ESCALONAMENTO

Com os resultados obtidos, observamos que apenas o Efeito individual 1, no caso a quantidade de solvente, considerando um nível de 10%, é relevante no rendimento final da síntese do LPSF GQ-16. Observando o gráfico abaixo, o fator

menos tem um rendimento superior ao fator mais no efeito individual X1 (Quantidade de Solvente). O fator menos corresponde a utilização de 15 mL de solvente, enquanto o fator mais corresponde a utilização de 30ml de solvente, levando a conclusão de que o uso de 15ml de solvente na síntese leva a um rendimento maior do LPSF GQ-16, enquanto o uso de 30ml de solvente apresenta um rendimento inferior. Os efeitos individuais X2 (tempo de reação) e X3 (Quantidade de catalisador) possuem rendimentos muito próximos nos níveis mais e menos, levando a conclusão de que não afetam no rendimento final do LPSF GQ-16 (Figura 19).

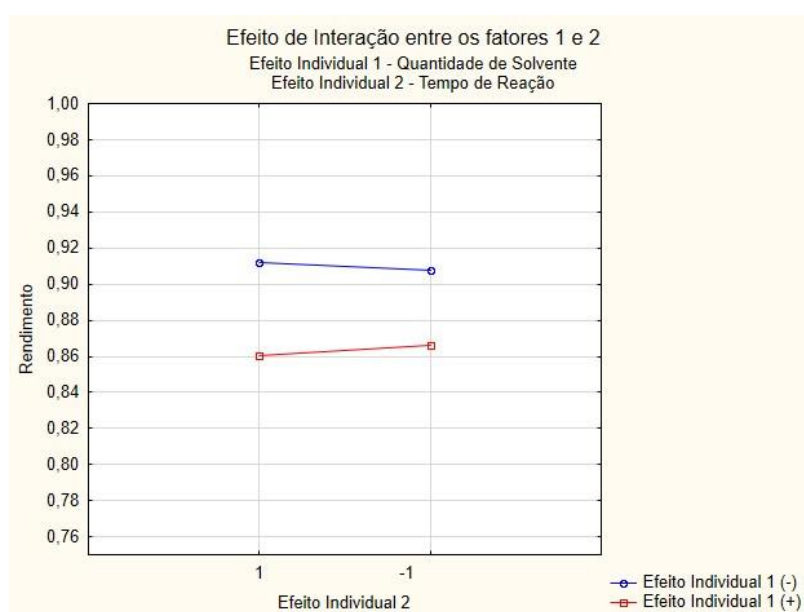
Figura 19 - Variação dos fatores X1, X2 e X3 nos níveis menos e mais



Fonte: Autor (2018)

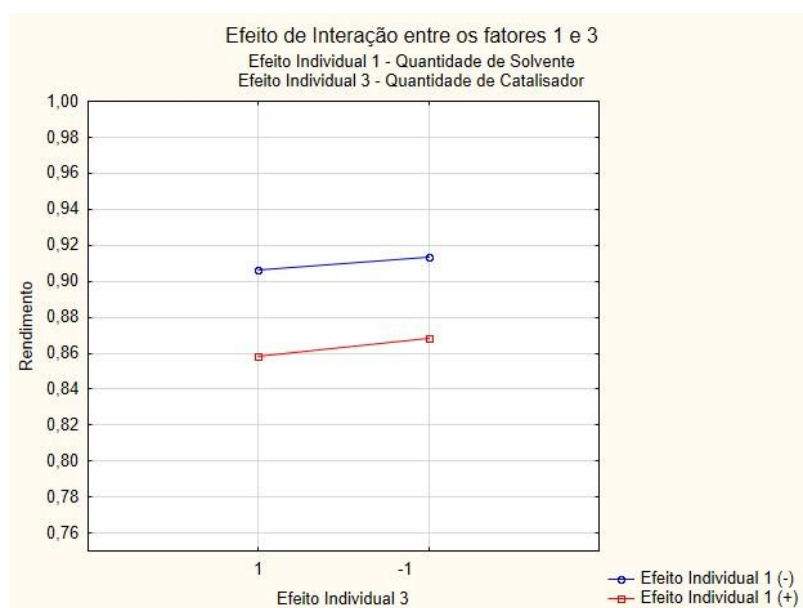
Os Efeitos de interação E12, E13, E23 e E123, não possuem efeito significativo no rendimento final da molécula LPSF GQ-16. Tal afirmação pode ser observada nas figura 21 e 22, onde não há uma diferença significativa entre as inclinações das retas (referentes aos níveis mais e menos) em nenhum dos três gráficos.

Figura 20 - Efeito de Interação E12, Quantidade de Solvente (15ml e 30ml) e Tempo de Reação (3 horas e 5 horas)



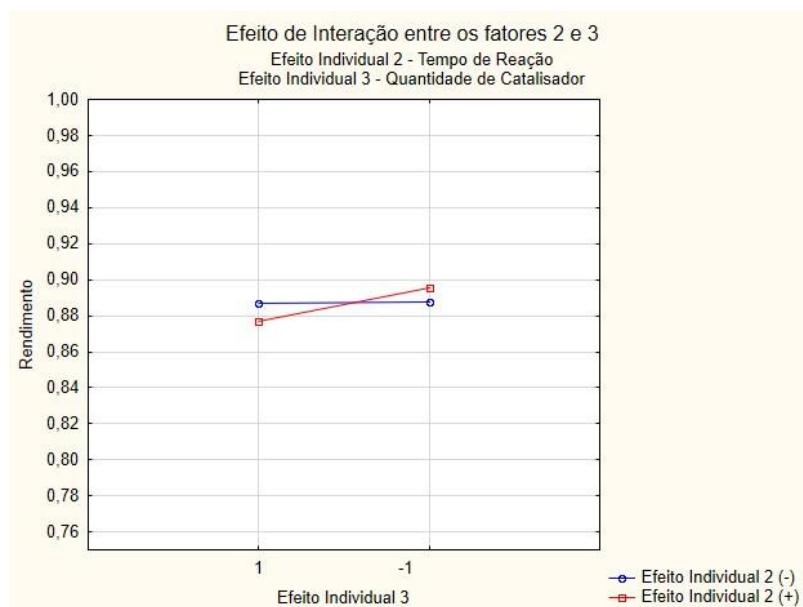
Fonte: Autor (2018)

Figura 21 - Efeito de Interação E13, Quantidade de Solvente (15ml e 30ml) e Quantidade de Catalisador (5 gotas e 10 gotas)



Fonte: Autor (2018)

Figura 22 - Efeito de Interação E23, Tempo de Reação (3 horas e 5 horas) e Quantidade de Catalisador (5 gotas e 10 gotas)



Fonte: Autor (2018)

Para um possível escalonamento, o principal fator a ser considerado seria a quantidade de solvente a ser utilizado, onde uma quantidade menor de solvente

deverá ser utilizada visando um maior rendimento em maior escala. Os outros dois fatores de influência individuais, tempo de reação e quantidade de catalisador utilizado, não tem uma influência significativa no rendimento da reação, mas considerando uma economia financeira tanto no gasto de catalisador quanto no gasto de energia, uma quantidade menor de catalisador utilizado e um menor tempo de reação deveriam ser usados. Os efeitos de interação também não se mostraram significantes no rendimento da reação, portanto não influenciariam, em um possível escalonamento, na utilização de menos catalisador, menos tempo de reação e menos quantidade de solvente.

6 CONCLUSÕES

Apesar do presente estudo se limitar à molécula LPSF GQ-16, é possível que os fatores analisados sirvam como parâmetros para as sínteses da série de moléculas GQ sintetizadas em laboratório, constituindo atualmente em mais de 400 compostos.

Após a análise estatística pela Razão F, observamos que apenas o Efeito Individual 1, no caso uma menor quantidade de solvente utilizada, afeta positivamente no rendimento final da síntese do LPSF GQ-16, mas apenas para um nível de 10%. Os outros dois Efeitos Individuais, tempo de reação e quantidade de catalisador, não possuem influência significativa no rendimento final da síntese. Os efeitos de interação E12, E13, E23 e E123 também não se mostraram significantes no rendimento final. Tais efeitos podem ser vistos na análise gráfica do capítulo anterior, onde apenas o efeito individual um possui uma inclinação, enquanto os outros dois efeitos individuais não possuem uma inclinação. Para os Efeitos de interação, a diferença entre inclinações nos níveis mais e menos evidenciaria uma significância no rendimento final da síntese, o que não é visto nos gráficos.

Para um possível escalonamento, uma menor quantidade de solvente utilizada na síntese seria o indicado, visando um maior rendimento do LPSF GQ-16. Por não apresentarem influência significativa, o uso de menos catalisador e um menor tempo de reação seriam indicados em um possível aumento de escala.

Diante do exposto, verifica-se que sem o uso de planejamentos fatoriais de experimentos e uma análise estatística adequada, os efeitos individuais e de interações entre fatores poderiam não ser detectadas ou interpretadas de maneira correta, e a otimização máxima da síntese poderia levar mais tempo para ser alcançada ou ocorreriam problemas com a síntese quando o processo for escalonado, levando a necessidade de um down-scale.

Fica evidenciado neste trabalho, confirmando que os sistemas multivariados, fundamentados em planejamento fatorial de experimentos, permitem viabilizar o reconhecimento de condições otimizadas para um possível escalonamento a partir de um reduzido número de experimentos.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras na continuação deste trabalho experimental, consistem na análise de outros fatores de influência que não eram possíveis de serem controlados com precisão pela vidraria Sigma Aldrich Air Sensitive, mas que são possíveis de serem controlados pelo mini reator Mettler Toledo Easy Max 102 e estudo de liberação de calor da reação, que é de extrema importância para quando a síntese for escalonada.

As análises de resultados demonstraram quais eram os principais fatores de influência e os níveis ótimos que satisfazem as condições de operação do processo de síntese do LPSF GQ-16. No entanto, para uma análise mais completa do processo, recomenda-se que novos experimentos sejam realizados. Neste caso, para estudar a variação da resposta (rendimento final da síntese) podem ser selecionados outros parâmetros e faixas de operação.

REFERÊNCIAS

ADA, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, 2004. 27(supplement 1): p. S5-S10.

Agresti, A. "A Survey of Exact Inference for Contingency Tables". **Statistical Science**, 2009. 7 (1): 131–153.

Amato, A.A., Rajagopalan, S., Lin, J.Z.; GQ-16, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Ligand, Promotes Insulin Sensitization without Weight Gain. **Journal Biol Chemistry**, 2012. 287 (33), p 28169-28179.

Andrade, V.S., et al., A Factorial Design Analysis of Chitin Production by *Cunninghamella Elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1042-1045, 2000.

Barak Y, Nelson MC, Ong ES. PPAR is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Mol Cell**, 1999; 4:585-95.

Baylis, C., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] agonist provides superior renal protection versus angiotensin-converting enzyme inhibition in a rat model of type 2 diabetes with obesity. **Journal of Pharmacol Exp Ther**, 2003. 307(3): p. 854-60.

Brasil, J. L.; Vaghetti, J. C. P.; Santos JR , B. R. A.; Simon, N. M.; Pavan, F. A.; Dias, S. L. P.; Lima, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bio sorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bio sorvente. **Quimica Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007.

Brereton, R.G., Chemometrics in analytical chemistry. A review. **Analyst**, 1987.

Campagnoni, M.; Rossetti, I.; Chemical reaction engineering, process design and scale-up issues at the frontier of synthesis. **Flow chemistry**, 2017.

Chao L, Marcus SB, Mason MM. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. **Journal of Clin Invest**, 2000; 106:1221-8.

Choi, J.H., et al., Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. **Nature**, 2010. 466(7305): p. 451-6.

Coelho, M. S. et al. GQ-16, a TZD-Derived Partial PPAR γ Agonist, Induces the Expression of Thermogenesis-Related Genes in Brown Fat and Visceral White Fat and Decreases Visceral Adiposity in Obese and Hyperglycemic Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154310, 2016. ISSN 1932-6203.

Creighton T.E. **Proteins: Structures and Molecular Properties** (2nd ed.). W H Freeman and Company, 1993. pp. 81–83. ISBN 0-7167-2317-4.

Deming, S.N. and Morgan, S.L. Simplex Optimization of Variables in Analytical Chemistry. **Analytical Chemistry**, 45, 278A-283A. 1973.

Dhanaji VJ, Umesh RP, Neha R, Arvind KS, Ramrao AM, Synthesis and antihyperglycemic evaluation of new 2,4-thiazolidinediones having biodynamic aryl sulfonylurea moieties. **Bioorganic Medicinal ChemLett**, 2012, 22; 436–439.

Eiras, S.P., Cuelbas, C.J., Andrade, J.C. Um estudo comparativo sobre a eficiência de estratégias quimiométricas de otimização. **Química Nova**, 1994.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. **Journal of Biol Chemistry** 1997; 272:18779-89.

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **Febs Letts**, 1998;438:55-60.

Fischer, R.A., **The Design of Experiments**. Livro. 1935.

Gomes, M.d.B., Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2006. 50: p. 271-280.

Greene MF, Blumberg B, McBride OW, Yi AF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisome proliferators activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cell, and chromosomal mapping. **Gene Expr** 1995; 4:281-99.

Gołofit, T., Maksimowski, P., Szwarc, P., Ceglowski, T., Jefimczyk, J. Scale-Up Synthesis of Hexabenzylhexaazaisowurtzitane, an Intermediate in CL-20 Synthesis. **Organic Process Research and Development**, 2017.

Himsworth, F.R., Snee, R.D., Hext, G.R. Sequential application of simplex Design in Optimization and EVOP. **Technometrics**, 1962. 4, 441-461.

Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, 1990; 347:645-9.

Isshiki, K., et al., Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. **Diabetes**, 2000. 49(6): p. 1022-32.

Kahn C.R., Weir G.C. **Joslin's Diabetes Mellitus** (14th ed.), Livro, 2005. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-8493531836.

Kar K., Uma K., Mithuna, Prabhuddha B.S. Santhosh K., Anu R., Prashantha Kumar B.R., Design, synthesis and glucose uptake activity of some novel glitazones. **Bioorg Chem.**, 2014, 56; 27–33.

Lee, D., Amara, Z., Poliakoff, M., Harman, T., Reid, G., Rhodes, B., Brough, S., McNally, T., Woodward, T. Investigating Scale-Up and Further Applications of DABAL-Me₃ Promoted Amide Synthesis. **Organic Process Research and Development**. 2015, 19, 831–840.

Levine, D.M., Berenson, M.L., Stephan, D. **Estatística: Teoria e Aplicações**. Editora Livros Técnicos e Científicos (LTC), 1998, Cap. 7-12, p.329-620.

Lienard, P., Gradoz, P., Greciet, H., Jegham, S., Legroux, D. Pilot Scale Process Development of SL65.0102-10, an N-Diazabicyclo[2.2.2]-octylmethyl Benzamide. **Organic Process Research and Development**. 2017, 21, 18–22

Martini, A.G. **GQ-16, Agonista parcial de PPAR γ , diminui proliferação de células mesangiais humanas**. Tese, 2012.

Mohammed Iqbal AK, Ashraf YK, Mallikarjun BK, Ningaraddi SB, Young-Dae G, Imityaz AMK, Synthesis, hypoglycemic and hypolipidemic activities of novel thiazolidinedione derivatives containing thiazole/triazole/oxadiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2012, 53; 308-315.

Moser, R., Poggiali, D. Optimisation et scale-up de la synthèse de l'aspirine. Dissertação, 2008.

Najjar, S. "**Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes**". Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons. doi:10.1038/npg.els.0001402. ISBN 0470016175, 2001.

Napoleon, A.A., Review on Recent developments and biological activities of 2, 4-thiazolidinediones. **International Journal of PharmTech Research**, Vol.9, No.3, pp 429-443, 2016.

Nazreen, S., Mohammad, S.A., Hinna, H., Mohammad, S.Y., Abhijeet, D., Perwez, A., Pasha, M.A.Q., Sameena, B., Mohammad, M.A., Saqlain, H., Chetna, K., Yakub, A., Pillai, K.K. Thiazolidine-2,4-diones derivatives as PPAR-c agonists: Synthesis, molecular docking, in vitro and in vivo antidiabetic activity with hepatotoxicity risk evaluation and effect on PPAR-c gene expression. **Bioorg Mel ChemLett.**, 2014, 24; 3034–3042.

Nelson, D.L. and Cox, M.M., **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6a Ed., 2004. ISBN-10: 8582710720.

Peralta-Zamora, P.; Morais, J. L.; Nagata, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

Pereira-Filho, E. R., POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. **Química Nova**. v. 25, n. 2, p.246-253, 2002.

Pitta, I.R.; Galdino, S.L.; Lima, M.C.A.; Barbe, J. **Compostos arilidenotiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica** - PI 0300997-1. 2003,

Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI 0300997-1, data de depósito: 10/04/2003. Instituição financiadora: CNPq.

Pitta, I.R.; Galdino, S.L.; Lima, M.C.A.; **Compostos tiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica** - PI 0601826-2. 2006, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI 0601826-2, data de depósito: 30/03/2006. Instituição financiadora: UFPE.

Quell, T., Hecken, N., Dyballa, K., Franke, R., Waldvogel, S. Scalable and Selective Preparation of 3,3',5,5'-Tetramethyl-2,2'-biphenol. **Organic Process Research and Development**. 2017, 21, 79–84.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet** 1991;1:785- 9.

Rhoades RA, Bell DR (2009). **Medical physiology : principles for clinical medicine** (3rd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 644–47. ISBN 978-0-7817-6852-8.

Rudnicki, M., Tripodi, G., Ferrer, R., Boscá, L., Pitta, M.G., Pitta, I.R., Abdalla, D.; New thiazolidinediones affect endothelial cell activation and angiogenesis. **European Journal of Pharmacology**, 2016. 782: p. 98-106.

Sarafidis, P.A. and G.L. Bakris, Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside. **Kidney Int**, 2006. 70 (7), p. 1223-33.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **J Lipid Res** 1996;37:907-25.

Schrier, R.W., **Diseases of the Kidney and Urinary Tract**. 8 ed. Vol. 3. 2007, Philadelphia: LWW.

Silva, J.C., César, F.A., Oliveira, E.M., et al., New PPAR partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Pharmacol. Res.**, 2016. 104: p.49-60.

Stefan N., Fritsche A, Haring H, Stumvoll M. Effect of experimental elevation of free fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity in healthy carriers of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferators-activated receptor-γ2 gene. **Diabetes** 2001;50:1143-8.

Steiner D.F., Oyer P.E. (February 1967). "The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 57 (2): 473–80.

Stumvoll, M. and H.U. Haring, Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. **Ann Med**, 2002. 34(3): p. 217-24.

The Essential Chemical Industry Online. **Chemical Reactors**. Disponível em <<http://www.essentialchemicalindustry.org/processes/chemical-reactors.html>> Acesso em 31 jul. 2018.

Tarley, C.R.T.; Silveira, G.; Santos, W.N.L., et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchem. J.** 2009. 92: p. 58-67.

Tavares, V., Hirata, R.C., Hirata M.H., Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol.51, 2007.

Teófilo, R.F.; Ferreira, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 2006. 29 (2): p. 338-350.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid activated transcription factor. **Cell** 1994;79:1147-56.

Volpato, N., Cunico, M. W. M.; Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Zawadzki, S. F.3; Peralta-Zamora, P.; Planejamento Fatorial: Uma Ferramenta Estatística Valiosa Para A Definição De Parâmetros Experimentais Empregados Na Pesquisa Científica. **Periódico Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1 (2008).

World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>> Acesso: 8 de junho de 2016.

Wu, J., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors and renal diseases. **Front Biosci**, 2009. 14: p. 995-1009.

Yki-Jarvinen H, Thiazolidinediones. **N Engl J Med**, 2004. 351(11): p. 1106-18.

8 APÊNDICE A - CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

LPSF GQ-01 - 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Figura 23 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do Composto LPSF GQ-01

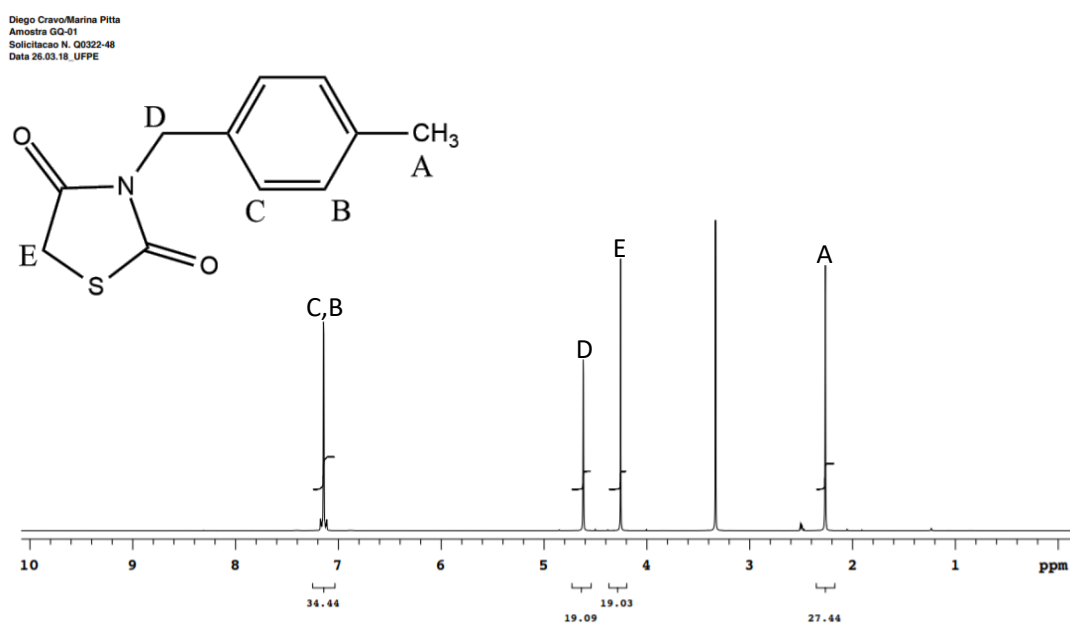
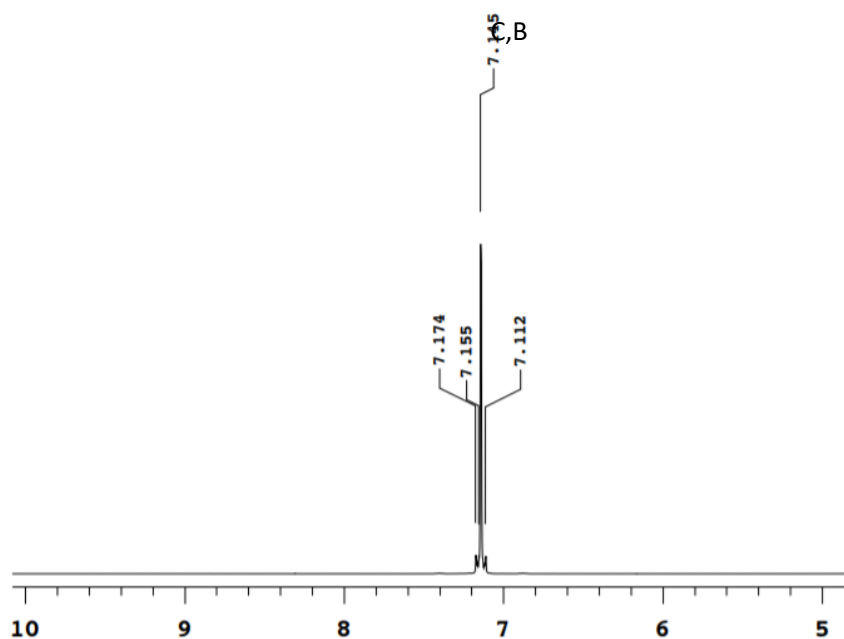


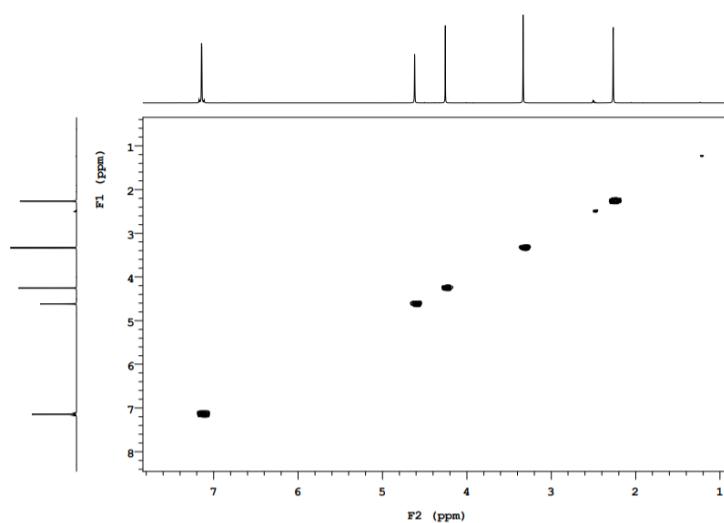
Figura 24 - Região do anel aromático do Espectro de RMN ^1H do composto LPSF GQ-01



RMN H1 (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2,26ppm (s, 3H, -CH₃, A); 4,25ppm (s, 2H, -CH₂, E); 4,61ppm (s, 2H, -NCH₂, D); 7,11-7,17ppm (m, 4H, H-Ar, C,B).

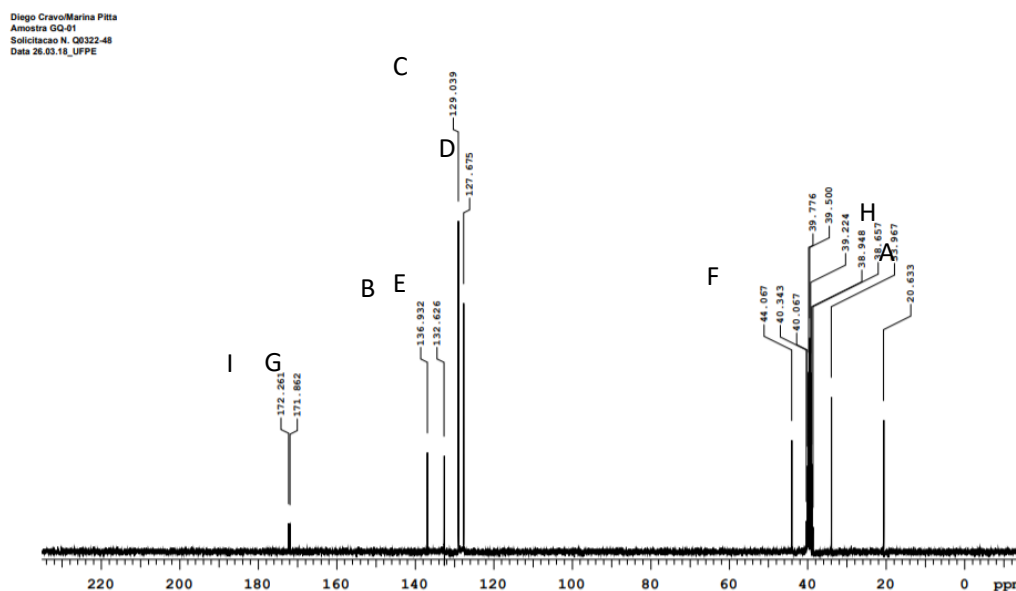
Espectroscopia de correlação (COSY)

Figura 25 - Espectro COSY do composto LPSF GQ-01



Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C)

Figura 26 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do composto LPSF GQ-01

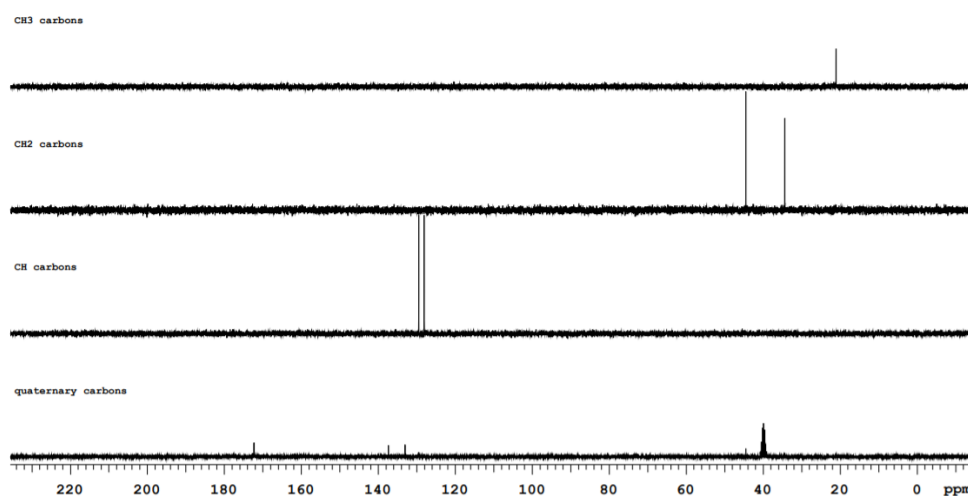


RMN C13 (300 MHz, DMSO-d 6) δ 20,63 (-CH₃, A); 33,97 (-CH₂, H); 44,07 (-CH₂, F); 127,68 (-CH, D); 129,04 (CH, C); 132,62 (-C, E); 136,93 (-C, B); 171,87 (C=O, G); 172,27 (C=O, I).

Intensificação da distorção por transferência de polarização (DEPT C13)

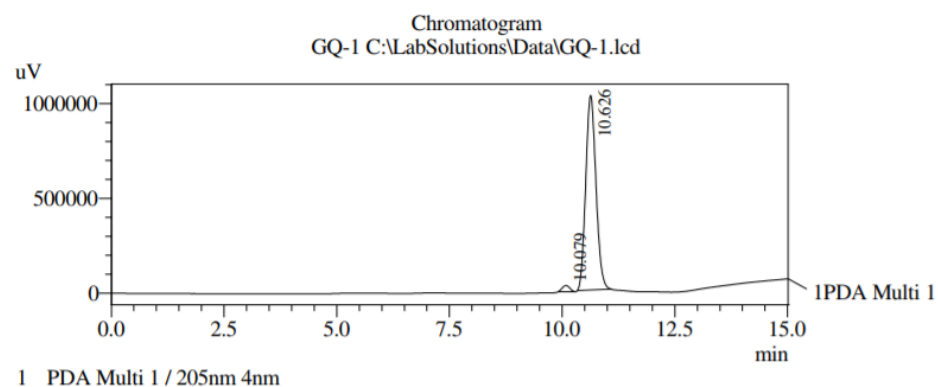
Figura 27 - DEPT do composto LPSF GQ-01

Diego Cravo/Marina Pitta
 Amostra GQ-01
 Solicitacao N. Q0322-48
 Data 26.03.16_UFPE



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Figura 28 - Cromatograma e espectro Ultra Violeta do composto LPSF GQ-01

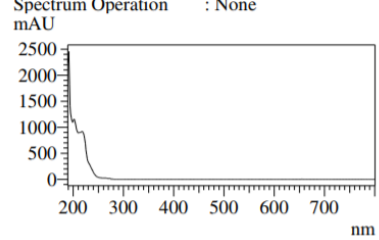


PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.079	388479	33294	2.335	3.139
2	10.626	16248134	1027478	97.665	96.861
Total		16636612	1060773	100.000	100.000

<Target Spectrum>
ID# : 2
Retention Time : 10.626
Compound Name : GQ-1
Spectrum Operation : None



LPSF IP-23 - Éster 3-(5-bromo-2-metoxi-fenil)-2-ciano-acrílico

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Figura 29 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do Composto LPSF IP-23

Diego Cravo/Marina Pitta
Amostra IP-23
Solicitação N. 00322-46
Data 26.03.18_UFPE

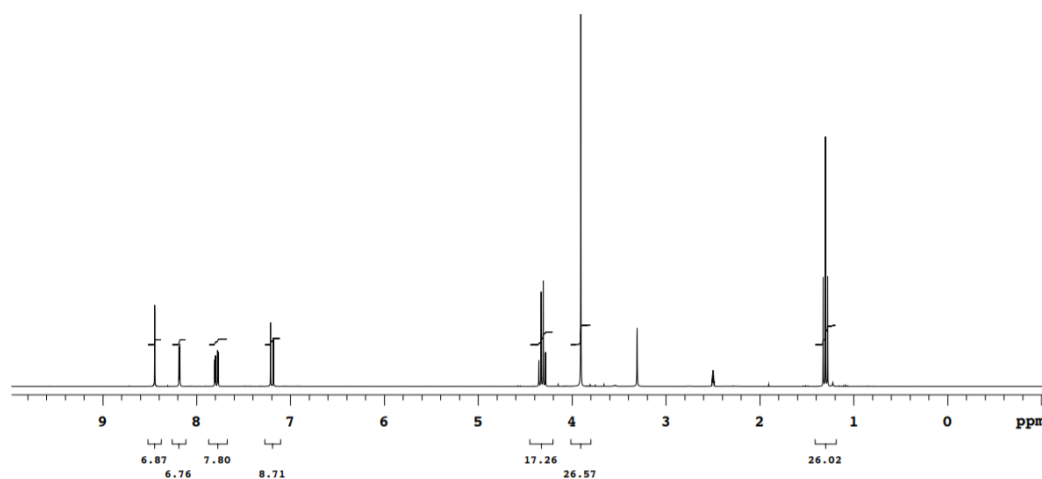
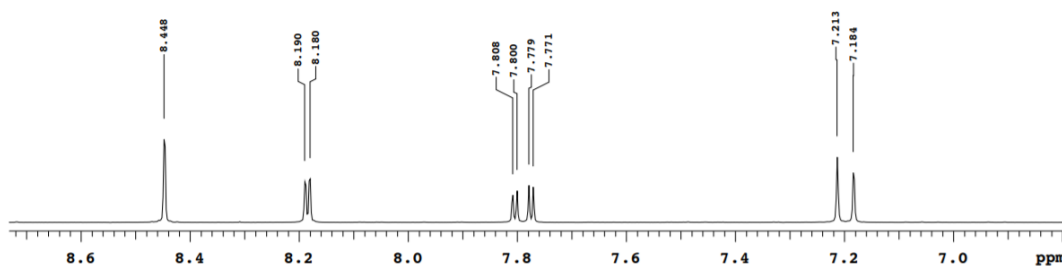


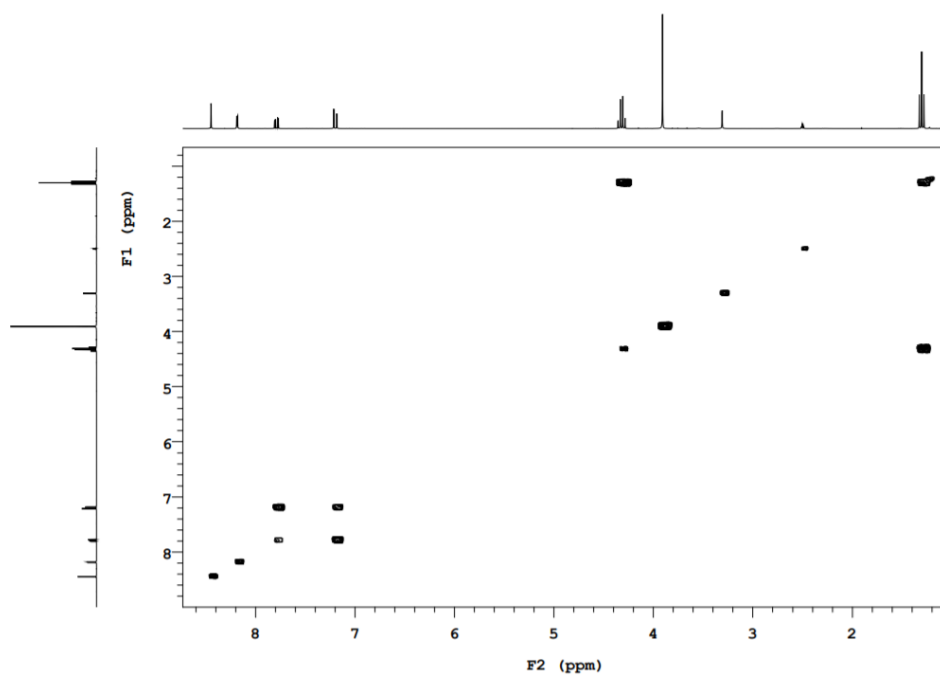
Figura 30 - Região do anel aromático do Espectro de RMN ^1H do composto LPSF IP-23



RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1,30 (t, 3H, $J=7,2\text{Hz}$, $-\text{CH}_3$, A); 3,91 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$, G); 4,31 (q, 2H, $J=7,2\text{Hz}$, $-\text{CH}_2$, B); 7,19 (d, 1H, $J=8,7\text{Hz}$, H-Ar, E); 7,79 (dd, 1H, $J=8,7\text{Hz}$, $j=2,4\text{Hz}$, H-Ar, F); 8,19 (d, 1H, $j=3\text{Hz}$, H-Ar, D); 8,45 (s, 1H, $=\text{CH}$, C).

Espectroscopia de correlação (COSY)

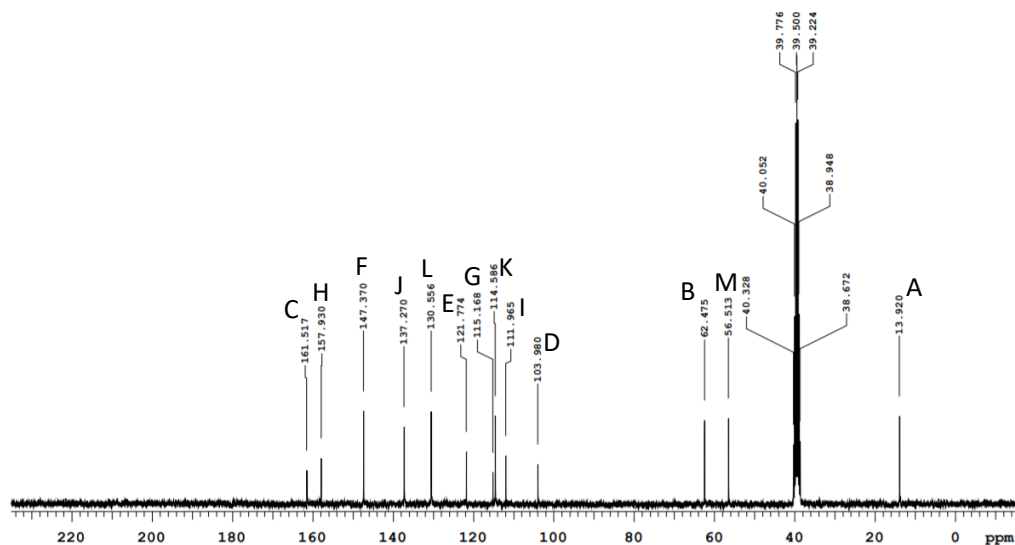
Figura 31 - Espectro COSY do composto LPSF IP-23



Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C)

Figura 32 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do composto LPSF IP-23

Gilson/Paulo
Amostra GB-104
Solicitação N. Q0322-3
Data 26.03.18_UFPE

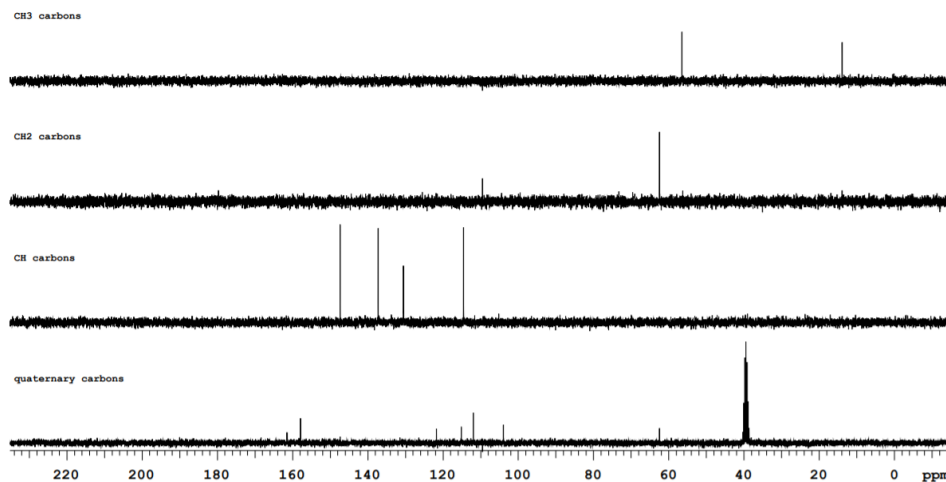


RMN C13 (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,92 (-CH₃, A); 56,51(-CH₃, M); 62,47 (-CH₂, B); 103,99 (C=C, D); 111,96 (-CH, I); 114,58 (=C, K); 115,17 (=C, G); 121,77 (CN, E); 130,57 (-CH, L); 137,27 (-CH, J); 147,37 (-CH, F); 157,93 (C-O, H); 161,52 (C=O, C).

Intensificação da distorção por transferência de polarização (DEPT C13)

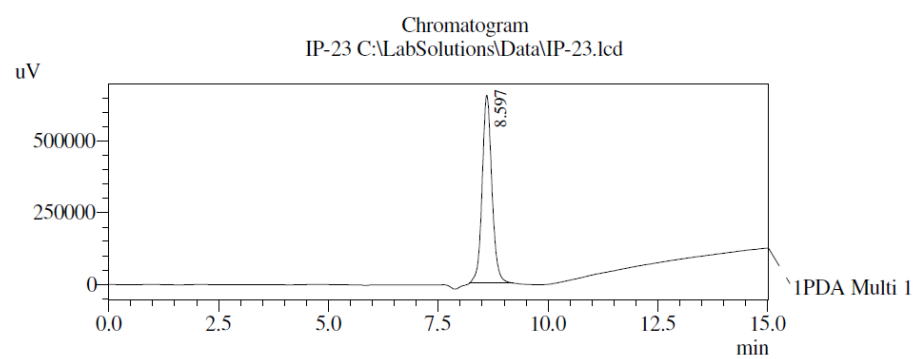
Figura 33 - DEPT do composto LPSF IP-23

Diego Cravo/Marina Pitta
Amostra IP-23
Solicitação N. Q0322-46
Data 26.03.18_UFPE



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Figura 34 - Cromatograma e espectro Ultra Violeta do composto LPSF IP-23



1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

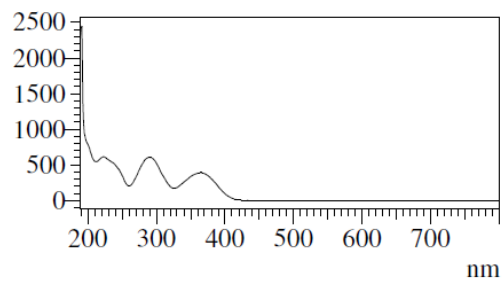
PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.597	10089801	654078	100.000	100.000
Total		10089801	654078	100.000	100.000

<Target Spectrum>

ID# : 1
Retention Time : 8.597
Compound Name : IP-23
Spectrum Operation : None
mAU



LPSF GQ-16 - 5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Figura 35 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do Composto LPSF GQ-16

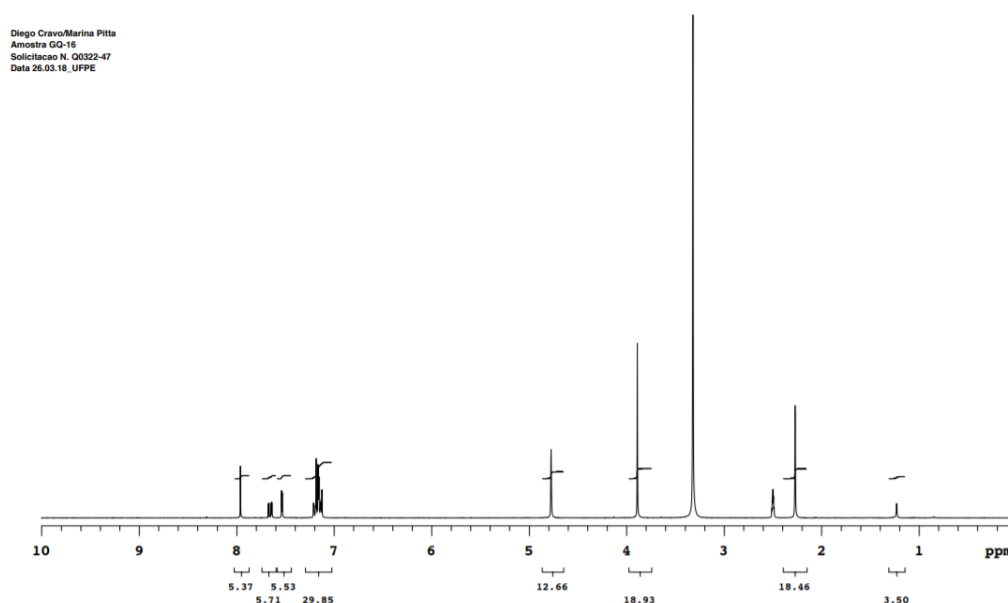
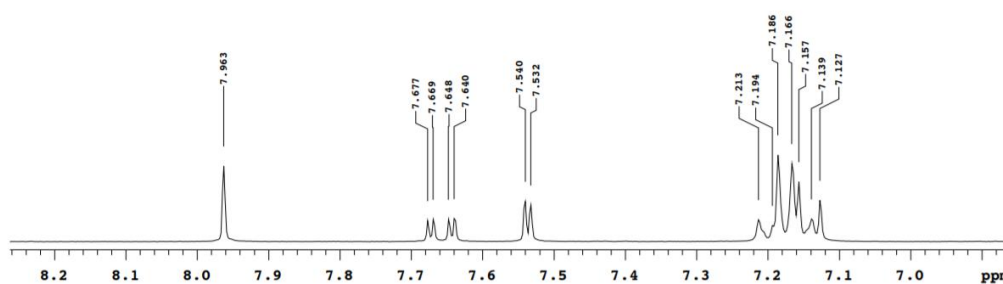


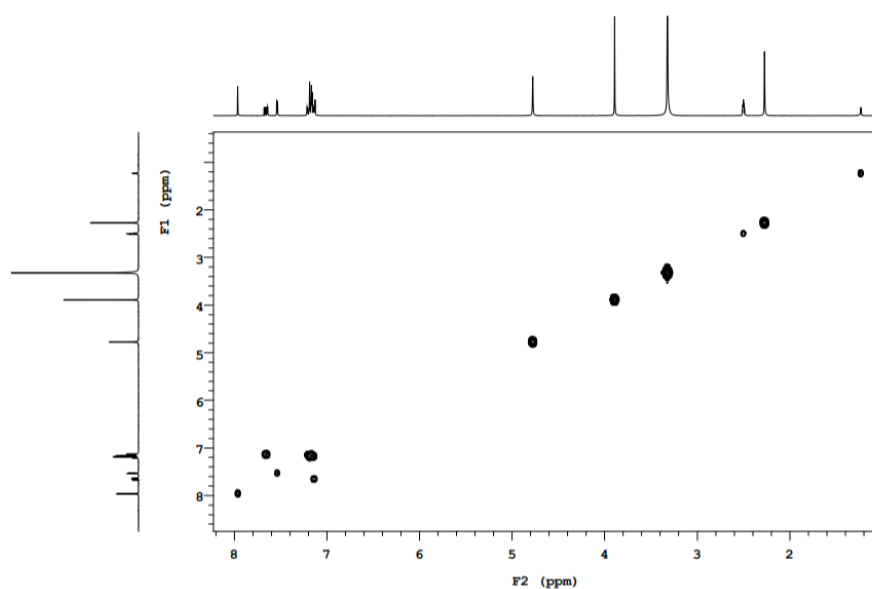
Figura 36 - Região do anel aromático do Espectro de RMN ^1H do composto LPSF GQ-16



RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2,27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, A); 3,90 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, I); 4,78 (s, 2H, $-\text{CH}_2$, D); 7,21 – 7,13 (m, 5H, H-Ar, G, C, B); 7,54 (d, 1H, H-Ar, $j=2,4\text{Hz}$, F); 7,66 (dd, 1H, H-Ar, $J=11,1\text{Hz}$, $j=2,4\text{Hz}$, H); 7,96 (s, 1H, $=\text{CH}$, E).

Espectroscopia de correlação (COSY)

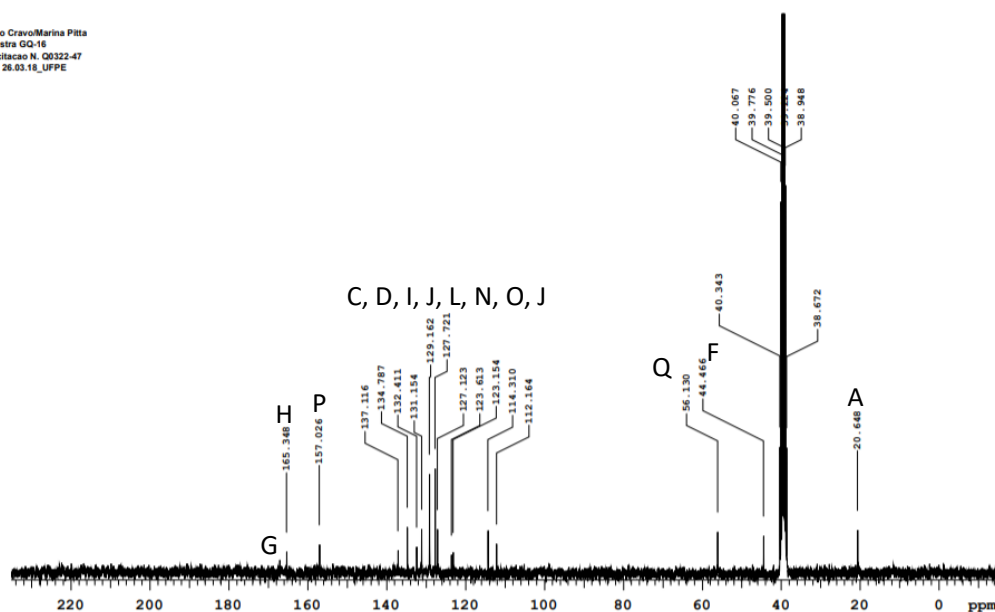
Figura 37 - Espectro COSY do composto LPSF GQ-16



Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C)

Figura 38 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do composto LPSF GQ-16

Diego Cravo/Marina Pitta
 Amostra GQ-16
 Solicitação N. Q0322-47
 Data 26.03.18_UFPE

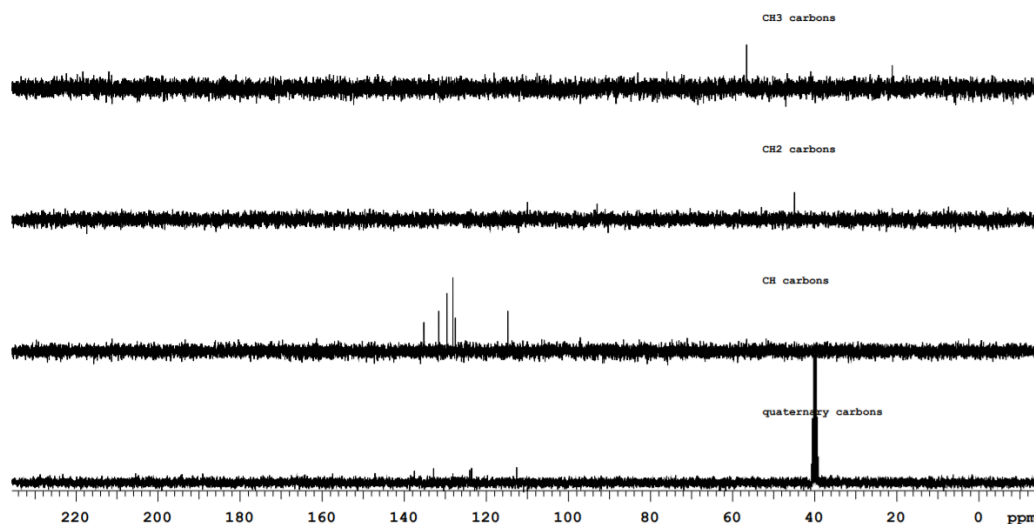


RMN C13 (300 MHz, DMSO-d 6) δ 20,65 (-CH₃, A); 44,47 (-CH₂, F); 56,13 (-CH₃, Q); 112,16 – 137,11 (-CH, C, D, I, J, L, N, O); 157,03 (C-O, P); 165,35 (C=O, H); 167 (C=O, G).

Intensificação da distorção por transferência de polarização (DEPT C13)

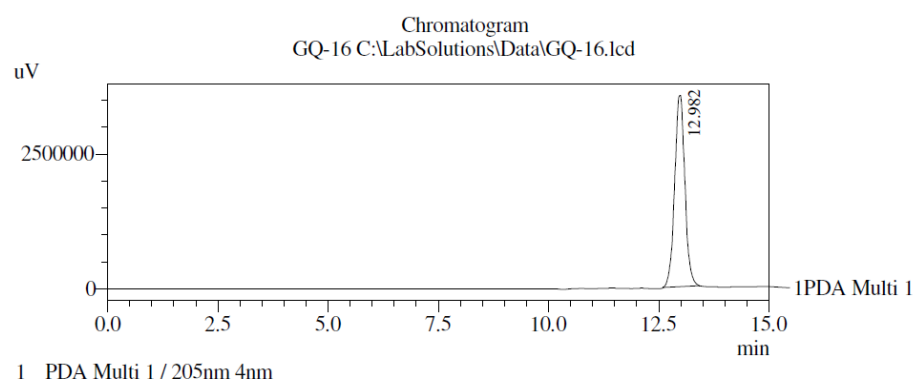
Figura 39 - DEPT do composto LPSF GQ-16.

Diego Cravo/Marina Pitta
 Amostra GQ-47
 Solicitação N. Q0322-47
 Data 26.03.18_UFPE



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

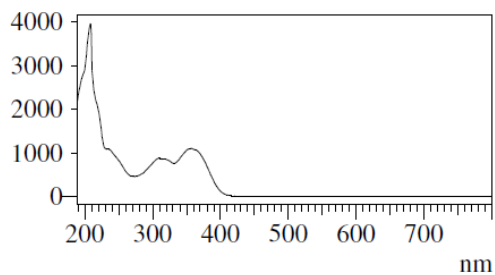
Figura 40 - Cromatograma e espectro Ultra Violeta do composto LPSF GQ-16.



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	12.982	57364453	3549303	100.000	100.000
Total		57364453	3549303	100.000	100.000

<Target Spectrum>
ID# : 1
Retention Time : 12.982
Compound Name : GQ-16
Spectrum Operation : None
mAU



9 APÊNDICE B - ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA REVISTA CURRENT BIOACTIVE COMPOUNDS

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Bioactive Compounds 2017, 13, 000-000

1

REVIEW ARTICLE

The Role of Oxazolidine Derivatives in the Treatment of Infectious and Chronic Diseases

Jeann F. Branco-Junior^a, Diego R.C. Teixeira^a, Michelly C. Pereira^b, Ivan R. Pitta^a and Marina R. Galdino-Pitta^{a*}

^aNucleus of Research in Therapeutical Innovation Suely Galdino, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, CEP: 50670-901 Recife, Brazil; ^bImmunomodulation and New Therapeutic Approaches Laboratory, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, CEP: 50670-901 Recife, Brazil

Abstract: Background: Despite being known for their antibacterial activity, the oxazolidines are molecules with wide pharmacological action and may act as anticonvulsants, anti-inflammatory and antineoplastic agents. However, such activities have been poorly explored and only two oxazolidinic derivatives hit the market until now. Therefore, this review covers the main biological activities of oxazolidines, indicating which of the classes and substituents have the best biological results as well as the synthesis methodology used to obtain them.

Methods: The search for bibliographic data was made using a question focused on the oxazolidine structure and their respective activities, besides using inclusion/exclusion criteria clearly defined. The selected papers were subjected to qualitative content analysis methodology to be used in this review.

Results: The oxazolidines remain excellent candidates for antibacterial, presenting three compounds in clinical testing phase (Radezolide, Cadezolide and Sutezolide), besides being a good candidate as antitubercular agents. Other less explored activities have niches with a great therapeutic potential such as the oxazolidines acting on 5-HT receptors (anticonvulsant) and Zolmitriptan (anti-migraine), and also mefloquine-oxazolidine derivatives which may act as antineoplastic and antitubercular agents.

Conclusion: This review summarizes the versatility and great therapeutic potential that oxazolidines can offer, reinforcing the need for further studies and investments for this class of molecules.

Keywords: Oxazolidine, chronic diseases, infectious diseases, anticonvulsants, antibacterial, anticancer, anti-inflammatory.

1. INTRODUCTION

Chronic non-communicable diseases (CNCDs) and infectious diseases are global health problems. According to the World Health Organization (WHO), 38 Millions of people die each year due to complications of CNCDs, with cardiovascular disease and cancer being the most leading among them [1]. Despite the lower impact, infectious diseases have also generated major damage to the public health. A good example is tuberculosis, which only in 2014 made 9.6 million victims and left 1.5 million dead [2]. WHO data shows that there is a strong upward trend in these rates due to change in dietary habits of the population and stressful routine of contemporary society [1].

Currently, most drugs available to treat these diseases have many limitations and side effects. Anticonvulsants, for example, are extremely useful in epilepsy treatment, however, many patients have also developed resistance to more

commonly used drugs, and the reason for this resistance remains unknown to the scientific community [3]. Anti-inflammatory drugs as well as anticancer are also quite efficient, but they may cause serious side effects, being a high risk to the patient health [4, 5]. The antimicrobial has a wide range of treatment options, being applied according to the infectious agent. However, due to antibiotic misuse and misdiagnosis of infection, many bacterial species have shown resistance to many of the antibiotics marketed as *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, resistant to carbapenem, or *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin [6].

Due to changes in people's lifestyle and the limited drugs available for market feature, it is crucial to invest in the development of a more potent and selective drug with fewer side effects, so patients with these diseases get a more effective and secure treatment. With this proposal, the oxazolidines - molecules which present a heterocyclic pentameric ring with an oxygen atom at position 1 and other nitrogen at position 3 [7] (Fig. 1) - appear as a class of alternative molecules having a wider therapeutic spectrum of activity, acting not only as antimicrobial (his best-known activity) [8], but also as anticonvulsant, anti-inflammatory and anticancer [9-11]. This class of compounds is commonly classified according

*Address correspondence to this author at the Nucleus of Research in Therapeutical Innovation Suely Galdino, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, CEP: 50670-901 Recife, Brazil; Tel: +55(81)98586-1986; E-mail: marinagaldinopitta@gmail.com

to the amount and position of carbonyl groups present in the ring. It is called oxazolidine when there is none; oxazolinidine-2-one (or oxazolidinone) when it has a carbonyl at position 2; and oxazolidine-2,4-dione (or oxazolidinedione) when there are two carbonyls, one at position 2 and one at position 4. In addition, it can also be called 2-thioxo-oxazolidinone when the ring has a double bond to a sulfur atom at position 2 and a carbonyl in position 4 (Fig. 1).

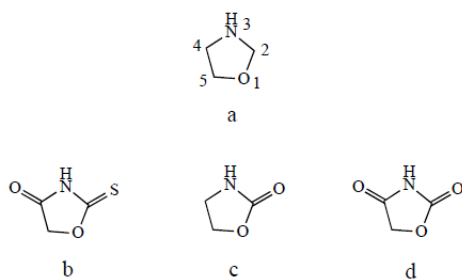


Fig. (1). Classification of oxazolidines. (a) oxazolidine; (b) 2-thioxo-oxazolidin-4-one; (c) oxazolidinone (or oxazolidine-2-one); (d) oxazolidine-2,4-dione.

Facing the beneficial impact of oxazolidinones on human health a lot has been invested in the development of a simpler, faster and secure synthesis method. Currently there are numerous methodologies for the synthesis of oxazolidines, among them are: setting CO_2 in chlorine or bromoethanamines [12] for the formation of oxazolidinones; cyclization of potassium thiocyanate with formaldehyde [13,14] to form

thioxo-2-oxazolidinones; and the three most used methods for oxazolidinediones synthesis, such as transformations on the heterocyclic ring, cyclization of α -hydroxy ester with urea, or isocyanate, and cyclization of α -hydroxy amides with carbonates or chloroformates [15] (Fig. 2).

Thus, this paper aims to highlight the biological activities that oxazolidines can trigger, detailing their mechanism of action as well as the substituents that contribute to increase the compound activity. It will also be discussed in this paper the synthesis methods currently used for the production of oxazolidines, describing, in general, the reaction steps required for the formation of the final active molecules.

2. OXAZOLIDINES ANTICONVULSANT EFFECTS

During the last decades a lot of progress has been made in the development of new therapeutic approaches for the treatment of epilepsy due to the approval of new drugs with anticonvulsant activities [16]. However, the search for more effective drugs and with fewer severe side effects remains the object search of many scientists. Many oxazolidine derivatives have long been described in the literature as molecules with great anticonvulsant potential for presenting some structural similarities (such as a nitrogen heteroatom and carbonyl groups) with consecrated drugs on the market, such as phenytoin, phenobarbital and ethosuximide [17] (Fig. 3).

The first oxazolidine derivative to arrive on the market was the trimethadione (Fig. 3). In 1946s the Food and Drug Administration (FDA) approved its commercialization as specific antiepileptic for treating absence seizures [18]. However, due to its voltage-dependent calcium channels blocking action, it was not useful in treating generalized seizures. Moreover, it could cause serious side effects such as

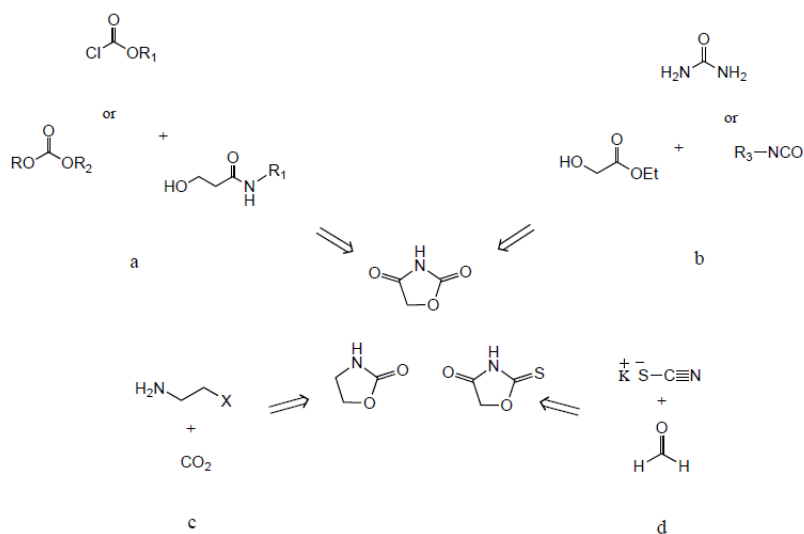


Fig. (2). Main routes of synthesis for obtaining oxazolidine derivatives. (a) Reaction between chloroformates or carbonates and α -hydroxy amides; (b) Reaction between urea or isocyanate and α -hydroxy esters; (c) Reaction between chlorine or bromoethanamine and carbon dioxide; (d) Reaction between potassium thiocyanate and formaldehyde.

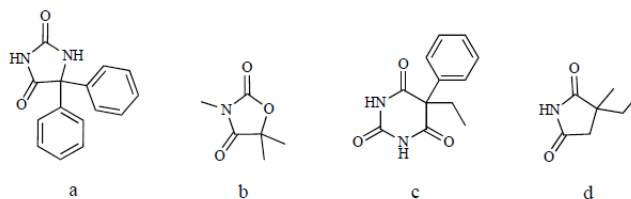


Fig. (3). Oxazolidine-2,4-dione similar molecules with anticonvulsant activity. (a) Phenytoin; (b) Trimethadione; (c) Phenobarbital; (d) Ethosuximide.

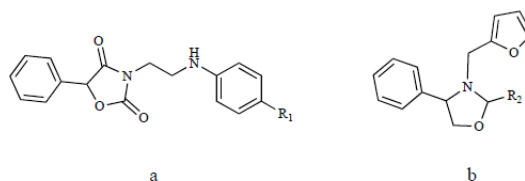


Fig. (4). New oxazolidine derivatives with anticonvulsant activity. (a) aniline substituted oxazolidine-2,4-dione; (b) 3,4-disubstituted oxazolidine ($R_1=OH, Cl$; $R_2=2-OCH_3-C_6H_4OH, 4-NO_2-C_6H_5, C_6H_4OH, Indole$).

fetal trimethadione syndrome (characterized by intrauterine growth retardation and fetus malformations), which limited its therapeutic applications in a progressive way until it disappeared from the market in some countries, being released for sale by FDA just as 150mg tablets [16-19]. Currently, low voltage-activated T-type Ca^{2+} blockers, such as trimethadione and ethosuximide, has been considered as candidates to analgesics and to Parkinson's disease treatment, since it has shown good results *in vitro* and *in vivo* [20-22].

Over time, other studies demonstrate the influence of serotonin receptors (5-HT_{1A} / 2A) for triggering myoclonic seizures in mice, suggesting that the use of molecules capable of stimulating 5-HT_{1A} receptor inhibit receptor 5-HT_{2A} or even perform these two functions simultaneously could represent an alternative way to treat epilepsy [23-25]. Some drugs as carbamazepine and phenytoin already used as part of therapy increase basal levels of serotonin (5-HT). Recent studies have shown that oxazolidine derivatives may act as potent antiepileptic agents because, according to tests in rats and mice, they are capable of stimulating 5-HT_{1A} presynaptic receptors and inhibit 5-HT_{2A} postsynaptic receptors, protecting them from induced seizures, but without showing signs of neurotoxicity [26,27].

Still according to studies, the synthesis of molecules can occur from two methodologies: by reaction between acetamide linked to a molecule of piperazine with aniline or an oxazolidine-2,4-dione or by cyclization of the ethyl ester of the hydroxyl-phenyl-acetic acid using epoxide urea followed by *N*-alkylation with alkyl halogenates and replacing it with piperazine derivatives or aniline with the molecules 3-[2-(4-chloro-phenylamino)-ethyl]-5-phenyl-oxazolidine-2,4-dione and 3-[2-(4-hydroxy-phenylamino)-ethyl]-5-phenyl-oxazolidine-2,4-dione (Fig. 4) the most active. They not only act as an agonist of the 5-HT_{1A} presynaptic recep-

tors but as antagonists of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} postsynaptic, and are therefore considered good candidates to anticonvulsant drugs, particularly aniline-substituted.

Previous studies conducted by Dinakaran and collaborators in 2010, showed that simple molecules without the carbonyl grouping in position 2 or 4 of the oxazolidine ring may also be useful in the treatment of tonic-clonic seizures (the patient's muscles start to contract and relax) [28].

The synthesis of these molecules yield from the formation of the intermediate 2-amino-2-phenylethanol from the reaction of phenylglycine and sodium borohydride, followed by its conversion into a Schiff base by reaction with furfural, solubilized in toluene. After this stage, the Schiff base was reduced and then reacted with aromatic aldehydes with and without heteroatom. Using Phenytoin as standard, it was found that the molecules with 2-methoxyphenol substituents, 3-nitrophenyl, phenol and indole bonded to carbon at 2-position of the oxazolidine ring showed the best rates of protection against seizures induced at a dose of 50 mg / kg (Fig. 4) [28].

The oxazolidinone derivatives, therefore, have a great anticonvulsant potential to be explored, but further research is still needed to elucidate the mechanism of action of this class of drugs and to evaluate their possible side effects. Until now no clinical studies using this class of molecules was conducted to test its effects in people with epilepsy. However, phase 4 clinical trials using the oxazolidine derivative zolmitriptan in patients with acute migraine showed excellent results [29]. Approved by FDA for the marketing in 1997 [30], this drug acts as 5-HT_{1B/1D} and 5-HT_{1A/1F} selective receptor agonists, this selectivity has been provided by changes in serotonin molecule, in which a hydroxyl group at position 5 was replaced by 2-oxazolidinone (increasing its agonist activity) and the ethylamine at position 3 was replaced by dimethylethylamine. Thus, it was found that zol-

mitriptan does not interact with adrenergic, muscarinic, histaminic, dopaminic or other serotonergic receptors [31]. Its mechanism of action in the migraine treatment is based on three routes: cranial vasoconstriction; inhibition of the release of vasoactive neuropeptides from perivascular trigeminal sensory neurons; and decrease of pain signal transmission through trigeminocervical complex [31, 32]. With such selectivity and efficiency, the zolmitriptan may represent the beginning of new discoveries about the oxazolidinones mechanism of action on the Central Nervous System (CNS) (Table 1).

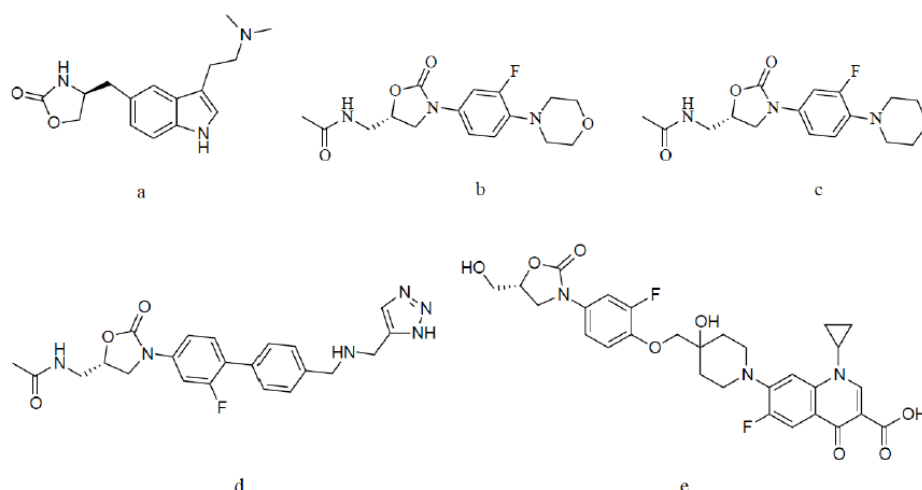
3. OXAZOLIDINES ANTIBACTERIAL EFFECT

The antimicrobial activity of oxazolidine derivatives is the oldest and best known of their clinical applications, being first considered by Wikstrom and Wold in 1961, when they used compounds derived from 1-aryl-amino-1-deoxy-*D*-fructopyranose. However, their bactericidal action was not observed due to the low solubility of oxazolidine crystals in water. Since then, many efforts have been made in the development of new molecules of this compound class, but

only in 1987 it could be developed oxazolidine derivatives for this purpose: DUP-721 and DuP-105 molecules (Fig. 5) [33, 34]. However, despite the excellent results in cultures of gram positive bacteria, the search was suspended because of the high toxicity presented by both molecules, *in vivo* tests, which stimulated the scientific community to continue the search for a molecule with a lower level of toxicity.

In the 1990s, researchers at the Institute of Pharmacy and Upjohn pharmaceutical company developed a new oxazolidine compound which featured a similar spectrum of activity to vancomycin, but with low levels of toxicity when compared to the DUP-721 and DUP-105 molecules: Linezolid (Fig. 5). This was the first and only oxazolidine derivative with antimicrobial activity approved for marketing by the FDA (Food and Drug Administration) until now [34]; and it is indicated for the treatment of Gram-positive bacteria and bacteria resistant to infection, and was recently been suggested as an alternative treatment for tuberculosis [35,36]. Their mechanism of action, like any other derivative belonging to this class, is based on protein synthesis inhibition of microorganisms. Studies have shown that linezolid

Table 1. Compounds, biological activity, clinical study phase, approval date and chemical structure of some oxazolidine derivatives.



Biological Activity	Compound	Phase	Approval Date	Chemical Structure	References
Central Nervous System	Zolmitriptan	Clinical studies- Phase 4	1997	a	[29, 30]
Antimicrobials	Linezolid	Clinical studies- Phase 4	2000	b	[40, 41]
	Sutezolid (PNU-100480)	Clinical studies- Phase 1	-	c	[55]
	Radezolid	Clinical studies- Phase 2	-	d	[51, 52]
	Cadazolid	Clinical studies- Phase 2	-	e	[43]

Source: clinicaltrials.gov; fda.gov

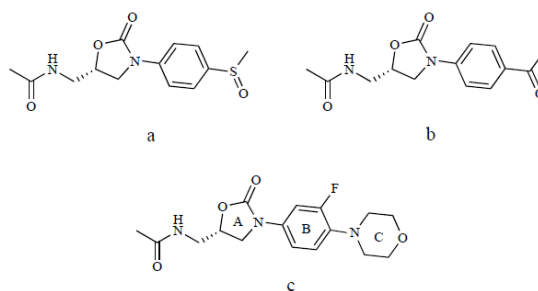


Fig. (5). (a) DuP 105, (b) DuP 721 and (c) Linezolid.

binds to the 50S subunit of the bacterial ribosome and prevents binding of *N*-formylmethionine (fMet) to tRNA, inhibiting the formation of fMet-tRNA-ribosome complex and subsequently inhibiting protein synthesis [37,38]. Thus, linezolid appears to act by a mechanism distinct from that of antimicrobial agents such as chloramphenicol and lincomycin, while antibiotics act by inhibiting the end of protein synthesis, the oxazolidinone derivatives target the initiation phase of protein synthesis [39].

However, after more extensive clinical trials, it was observed that prolonged use of linezolid could result in reversible myelosuppression (anemia, leukopenia, pancytopenia and thrombocytopenia), damage to the optic nerve, peripheral neuropathy irreversible and lactic acidosis, and may also inhibit Monoamine Oxidase enzyme (MAO), not being indicated their simultaneous administration with adrenergic and serotonergic drugs due to the high risk of drug interactions [40-42]. Consequently, many scientists sought for alternatives to reduce the side effects of oxazolidinone derivatives and, in addition, tried to increase their antibacterial spectrum making it thereby more effective against Gram negative bacteria.

According to Michalska *et al.* since the approval of this drug by the FDA in 2000, many simple and economic methods were used to synthesize oxazolidinone derivatives that met the requirements of researchers. The production of similar Linezolid was the most adopted methodology and may be performed in 4 ways: (I) adding heterocyclic substituents or open chains to the C5 oxazolidinone ring; or (II) making modifications in the ring "A"; (III) "B"; or (IV) "C" Linezolid (Fig. 5) [8].

Besides these changes, the formation of a hybrid molecule of oxazolidinone with another class of molecules is also a very interesting strategy to increase their antimicrobial spectrum and is attracting more and more interest from the scientific community [8]. An example of this methodology was adopted by the pharmaceutical industry ACTELION that synthesized a hybrid molecule from the combination of a quinolone and oxazolidinone and today lead clinical studies with cadazolid for the treatment of infection by *Clostridium difficile*, in Phase 3 trials (Table 1) [43].

The addition of substituents on C5 of the oxazolidinone ring has been extensively explored, mainly in compounds that

have an acetamide in this position. According to studies of structure-activity relationship (SAR) it participates directly in the molecule binding to the ribosome bacterial as a donor of hydrogen bonds, and it is essential for optimum antibacterial activity [44]. The substituent attached to this acetamide, or carbonate, can be an open or closed chain.

A successful example of oxazolidinone derivatives synthesized from this methodology can be represented by Paget *et al.* who in 2006 developed analogs of linezolid with various substituents at the C5 position, with and without acetamide, and replacing the ring "C" by a ring of piperidine. The results from tests on bacterial cultures showed that the molecule that possessed only acetamide as a replacement of C5 was the most active, with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) twice smaller than linezolid against the bacteria *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, sensitive *S. aureus* and methicillin resistant *S. aureus* (Fig. 6). Furthermore, according to the SAR studies, it was found that the higher the C5 substituent and the lipophilicity of the molecule greater will be its MIC, and thereby lower its therapeutic action [45].

Despite the fairly recent discoveries regarding the role of acetamide in antimicrobial activity, the pharmaceutical company AstraZeneca has shown that compounds having substituents bonded to ether in place of acetamide may also play an important role in the treatment of infectious diseases. More than 50 molecules using five or six membered rings as C5 substituents were synthesized by various methodologies. The results showed that those molecules which have pentameric rings as substituents (especially isoxazole) showed greater efficiency, reaching activity 2-4 times greater than linezolid against strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* (Fig. 6). This proves that other substituents in addition to the acetamide, without the donor function of hydrogen bonds, can also play a powerful antibacterial activity [46].

In relation to the modifications of the aromatic rings of linezolid analogs, few are performed in the ring "B", since fluorine in the 3-position has an important role in the activity of the molecule [47]. But changes in the "A" ring have given good results, for example, derivatives of *N*-chloro-oxazolidinone reported by Shiao *et al.* in 2011, have shown an excellent activity in treating topical infections such as otitis, conjunctivitis and skin infections. Synthesized from a

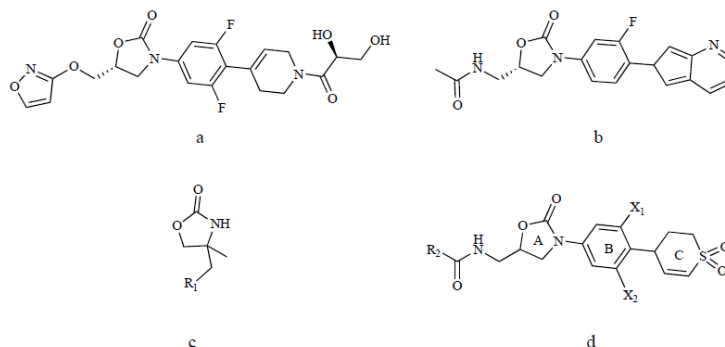


Fig. (6). Antibacterial Oxazolidine derivatives with modifications at (a,b) C5 and rings (c) "A", (d) "B" and "C" ($R_1 = \text{NMe}_2\text{Et} + \text{Cl}$; $R_2 = \text{CHCl}_2, \text{CHF}_2$; $X_1 = \text{H}, \text{F}$; $X_2 = \text{H}, \text{F}$).

variety of substitution reactions and *N*-chlorinating reagent using 4-(chloromethyl)-4-methyloxazolidine-2-one, the molecules showed considerable activity against *E. coli* and *S. aureus* (Fig. 6) [48].

There are many changes that can be made in the "C" ring, since the modification of their atoms and substituents until the merger with the "B" ring [8]. A molecule that has been highlighted is the PNU-141659, which has a sulfonyl group in place of the oxygen atom of the morpholine ring "C", which, according to Genin and colleagues (2000), can bring greater activity against Gram negative bacteria due to the presence of unsaturation [49]. Based on this, Renslo in 2006, synthesized analogues of PNU-141659, by varying the substituents of the C5 (using an acetamide) and having a fluorine atom in position 3 and / or 5 in "B" ring. Tested against Gram positive and Gram negative fastidious, the molecules with dichloromethane substituent attached to the acetamide had the best results with the most significant efficacy against *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*, coming to be four times more active than linezolid, while molecules with difluoromethane substituents showed eight times more activity against Gram positive bacteria (Fig. 6) [50]. Other successful examples of this approach are the Radezolid (skin infections and pneumonia) [51-53], Cadazolid (*Clostridium difficile* infections) [43,54] and Sutezolid [55,56], all in clinical trial phase (Table 1).

Although antibiotic activity of the oxazolidine derivatives is best known for their effectiveness in inhibition of microorganisms commonly found in the population, they also have great potential in the treatment of infections caused by more resistant bacteria such as *Mycobacterium sp.* [57].

The indiscriminate use of antibiotics, the large amount of drugs needed for the treatment of tuberculosis and undue interruption of treatment by the patient have favored the increase in bacterial resistance genus *Mycobacterium sp.*, complicating the treatment of the disease by conventional chemotherapy methods. Thus, in 2011, Kamal *et al.* developed an oxazolidine derivative conjugated to different benzothiadiazine substituents and arylsulphonamides, known to have antimicrobial activity. The synthesis was based on the reaction between the oxazolidine compounds (*S*)-*N*-[[3-(3-

fluoro-4(morpholinyl/thiomorpholinyl/piperziny)phenyl)-2-oxo-5-oxazolidinyl]methyl] amine (analogues of linezolid with changes in the "C" ring) with 1,1-dioxide-3-chloro-4-(alkyl/aryl)-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine or the arylsulfonyl chloride to form the oxazolidine derivatives conjugated to benzothiadiazines or arylsulfonyl amides respectively. The results of the tests showed that *Mycobacterium tuberculosis* linked to the aryl sulfonamide compounds in position 5 of the ring and oxazolidine benzothiadiazine in the 4-position of "C" ring showed better activity (Fig. 7) than those benzothiadiazine conjugated to position 5. They were selected for the cytotoxicity test performed with MTT technique in human fibroblasts, which showed low toxicity. Moreover, they presented log P less than 5, what gives greater efficiency to overcome the bacterial cell wall, showing that oxazolidines may represent a new and efficient therapeutic approach to tuberculosis [58].

Another study by the same author in 2013 suggests the addition of a diarylpyrrole substituent quite similar to the intermediate used in the previous study, differing only in the presence of the nitrogen atom in place of the oxygen atom of "C" ring of linezolid and the presence of the group C4 azide connected to "A" ring. The first reaction step is the reaction between the intermediate *N*-[[3-(3-fluoro-4-(piperziny)phenyl)-2-oxo-5-oxazolidinyl]methyl]azide and diarylpyrrole derivatives. The resulting molecule had their azide group cyclized via the "Click Chemistry" using aryl or heteroaryl acetylenes in the presence of copper sulfate and sodium ascorbate. Some of diarylpyrrole substituted molecules reduced their azide group to form an amine, being held later acylation to this group with acetyl chloride to form acetamides [59].

The synthesized molecules were tested in strains of *Mycobacterium sp.* of high virulence (H37Rv), resistant to Rifampicin (RifR) and extremely resistant to strains (XDR-TB) showing excellent results, especially the compound 3-(3-fluoro-4-(4-((1-(4-fluorophenyl)-2-methyl-5-(*o*-tolyl)-1*H*-pyrrol-3-yl)methyl)piperazin-1-yl)phenyl)-5-((4-(1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)oxazolidin-2-one which showed larger efficiency in the fight against these strains (Fig. 7). Their antibacterial activity was also tested where the compounds that had a pyridyl group at the

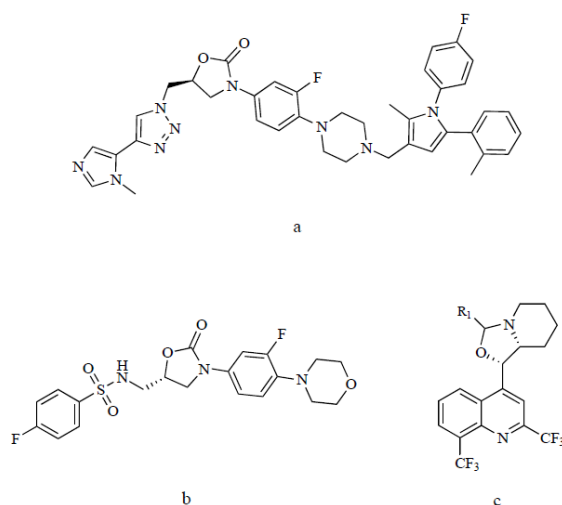


Fig. (7). Antitubercular Oxazolidine derivatives. (a) Diarylpyrrole-oxazolidinone; (b) Arylsulfonamide-oxazolidinone; (c) Mefloquine-oxazolidine derivatives ($R_1 = 2\text{-OCH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$, $3\text{-NO}_2\text{-C}_5\text{H}_2\text{S}$).

4-position of the pyrazole ring or an acetamide in the 5-position of the oxazolidine ring showed a greater efficiency in the inhibition of various strains of species, especially Gram positive. The compounds with higher activity were evaluated by their cytotoxicity by MTT technique in a strain of mice macrophages (J-774) displaying low cytotoxicity and high selectivity [59].

Still in 2013, Kamal *et al.* performed a very similar methodology as mentioned above to form oxazolidine derivatives conjugated to sulfonamide at position 5 of the ring and also obtained promising results. Compounds with a thiophene linked to a sulfonamide showed greater antimicrobial activity, being effective even against Gram negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. However, none of the compounds showed any antimycobacterial activity, not being useful for the treatment of tuberculosis [60].

Another group of interest for the treatment of tuberculosis are quinolone derivatives, in particular mefloquine. This molecule is already known for their efficiency in the treatment and prevention of malaria [61], but it has recently called attention to their antimycobacterial action. To enhance their effect, Gonçalves *et al.* in 2010, promoted the formation of hybrid molecules derived from mefloquine-oxazolidine by the reaction between mefloquine and benzaldehydes in toluene with the help of Dean-Stark (glass attachable to the condenser to remove moisture) [62].

Through tests conducted with ATCC 27294 strain of *M. tuberculosis* with Multiple Antigen Blot Assay (MABA) technique, it was possible to conclude that the introduction of the oxazolidine ring in the mefloquine molecule increased up to 2.6x its effectiveness in inhibiting the growth of bacterial cells when compared with the use of mefloquine unconjugated, and the compound 4-[3-(2-methoxyphenyl)-hexahydro[1,3]oxazolo[3,4-a]pyridin-1-yl]-2,8-

dimethylquinoline was the most active among the synthesized molecules (Fig. 7) [62].

Another study using the same methodology with arenaldehydes conducted by Gonçalves *et al.* in 2012, confirmed the importance of mefloquine-oxazolidine derivatives to demonstrate their effectiveness in inhibiting the growth of strains of *M. tuberculosis* multidrug-resistant, being more effective than ethambutol and Mefloquine [63].

There are many methods available to synthesize oxazolidinones derivatives with effective antimicrobial activity against Gram positive bacteria. However, the addition of electrons donor substituents as acetamides and sulfonamides to carbon 5 of the oxazolidinone capable of making hydrogen bonds with the ribosome binding site has been shown to be very efficient in enhancing the antibacterial activity, even being more effective than modifications in the rings of linezolid analogs, except for the addition of the sulfonyl "C" ring, which considerably increased the spectrum of activity of this class of molecules against fastidious Gram negative.

As for antitubercular activity, despite the simple methodology, good yields and considerable antimycobacterial activity, mefloquine-oxazolidine derivatives still have MIC above of oxazolidine-aryl sulfonamide derivatives, which are therefore considered better substituents for the synthesis of candidate molecules to antimycobacterial drugs.

4. OXAZOLIDINES ANTITUMORAL EFFECT

Characterized by the uncontrolled proliferation and reduction of cell differentiation, cancer can present a great invasive potential and can affect other distant tissues from their place of origin, thus compromising its functions [4]. According to the World Health Organization, in 2012 only about 14 million people had cancer around the world, and from these, 8.2 million died due to complications during

treatment or due to aggressive disease [1]. With the change of the population habits is expected that the number of people affected by the disease 2030 will reach 27 million, which is considered a disease of global public health problem [64].

Currently, the leading form of cancer treatment is chemotherapy, which can be aided by radiotherapy and/or surgery. However, considering the impact this disease has on global health and due to the large amount of side effects that the available chemotherapeutic presents, much has been invested in the development of new methods to treat this disease, especially with the design and synthesis of new chemotherapeutic drugs that may be more effective and less toxic than many existing treatments. There are countless molecules and studied therapeutic targets, but oxazolidine derivatives have attracted the interest of the scientific community due to their low toxicity and their wide range of therapeutic targets [65].

One of the therapeutic targets that have drawn attention is the prostatic enzyme 17β -hydroxysteroid dehydrogenase which is very expressed in the case of prostate cancer. This enzyme is directly linked to the biosynthesis of steroid hormones, which have great influence on the development of this type of cancer, and is responsible for the conversion of 4-androstene-3,17-dione (Δ^4 dione) to testosterone or dihydrotestosterone through a C17 redox reaction in the molecule [66]. Two studies by Harada *et al.* in 2012, showed that oxazolidine derivatives might act as potent inhibitors of this enzyme, especially oxazolidinediones and 2-thioxo-oxazolidinediones [67,68].

In these studies, the synthesis of 2-thioxo-oxazolidinones and oxazolidinediones were made by cyclization reaction followed by Knoevenagel condensation. The cyclization was performed with arylamines or arylisocyanates with glycolate ester to give a corresponding carbamate, followed by addition of catalytic sodium methoxy and azeotropic removal from the alcohol produced by refluxing, forming N-substituted oxazolidine derivatives. Subsequently, through the Knoevenagel condensation reaction between a benzaldehyde and the oxazolidinic derivative, the final di-aryl substituted molecule was formed [67,68]. Thus, the most potent compounds were those with small donor or electron withdrawing groups in position 4 of the aromatic ring, such as fluorine, methyl, trifluoromethyl, methoxy and dimethylamine (Fig. 8).

Although the compounds have been tested for their ability to inhibit three types of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, they demonstrated great effectiveness only in the type 3, which shows their high selectivity. Reinforcing such data, it was observed that the compounds did not activate/inhibit nuclear receptors of androgen, estrogen and glucocorticoids.

Despite the success in inhibiting 17β -hydroxysteroid dehydrogenase recent studies showed that oxazolidine derivatives are quite effective in the combat of prostate cancer without necessarily changing the levels of this enzyme. In 2014, Naresh *et al.* merged the chemical structure of linezolid with the cytozone or *epi*-cytozone, varying only the carbon 4 substituent, thereby forming a hybrid structure. The first step of the synthesis consisted in an *N*-oscillation cytozone or *epi*-cytozone using 4-(2-fluoro-4-iodophenyl)

morpholine and copper iodide (CuI) as a catalyst. Then, the substituent group at 4-carbon was oxidized and reduced to originate other molecules. The compound 5-ethyl-3-(3-fluoro-4-morpholinophenyl)-4-(4-methoxyphenyl)oxazolidin-2-one showed the highest cytotoxicity against prostate cancer cells (DU145) causing even detachment of the plate cells and the inhibition of colony formation (Fig. 8) [65].

Furthermore, it was observed that these compounds generates accumulation of cells in G1 phase and release of cytochrome C by mitochondria with consequent activation of caspases 3 and 9, and thus, capable of inducing cell death by apoptosis by the intrinsic pathway. However, it was not observed large amount of dead cells, but senescent, which indicates that the synthesized derivatives have greater potential cytostatic than pro-apoptotic [65].

As shown by Naresh, a previous study done by Derevkova in 2011 had proven cytostatic action of oxazolidinone derivatives by using the apoptosis PARP molecular marker in HeLa (cervical cancer) and H1299 (non-small lung carcinoma cells) besides showing the trend of these compounds in generating an accumulation of cells in the G1 phase of the cell cycle. It was also observed that these derivatives are capable of causing the accumulation of p53 protein, directly interfering with cell proliferation, but was not observed any cytotoxic activity, only cytostatic [11].

Despite the cytostatic activity of the oxazolidinones derivatives be more widespread, in 2014, Pitta developed 2-thioxo-oxazolidinone derivatives with high cytotoxic activity. Using a commercial 3-ethyl-2-thioxo-oxazolidinone, a Michael addition reaction was performed with Cope esters and morpholine as a catalyst to obtain 2-thioxo-5-substituted oxazolidinones (Fig. 8). All derivatives showed cytotoxic activity against strains of acute promyelocytic leukemia (HL-60) and T-cell leukemia (Jurkat). However, the molecule that presented the substituent 4-piperidin-1-yl-benzylidene grouping at 5-position of the oxazolidine ring also inhibit, to some degree, the growth of acute lymphoblastic leukemia cells (CCRF-CEM), glioblastoma (NG97), breast cancer (T47D) and Burkitt's lymphoma (Raji) and are therefore considered the most active compound. Furthermore, none of these derivatives showed cytotoxicity against Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from healthy patients, which enables their administration in humans [69].

Just as mefloquine-oxazolidinone derivatives are useful in combating tuberculosis, this class of molecules has also showed to be very effective in the fight against cancer. The same research group that developed mefloquine derivatives with antimycobacterial activity started from the same principle and methodology to develop candidate molecules to anti-cancer drugs. The compounds were tested on leukemia cells (HL-60), colon (HCT-8), ovarian cancer (OVCAR-8) and glioblastoma (SF-295). The most active compounds were those with donor groups of electrons as substituents, such as 2-OH (more effective against SF-295 strain) 4-Cl (more effective against HL-60 strain) and 4-MeO (more effective against OVCAR-8 lines and HCT-8) (Fig. 8). In this way, mefloquine can be considered a very good lead, useful in the fight against tuberculosis and cancer. Thus, the mefloquine-

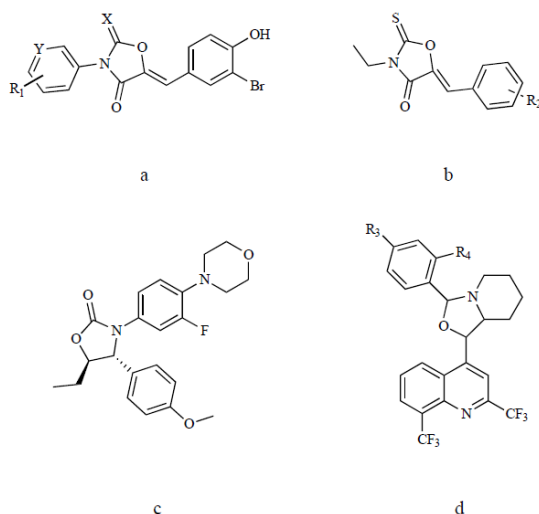


Fig. (8). Anticancer oxazolidine derivatives. **(a)** 3,5-diaryl-substituted oxazolidine; **(b)** 3-ethyl-5-aryl-substituted 2-thioxo-oxazolidinone; **(c)** linezolid-epi-citoxazone hybide; **(d)** mefloquine-oxazolidine derivatives (R₁= 3-OCH₃, 4-NMe₂, 4-F; 4-Me, 4-CF₃; R₂= 4-Cl-C₆H₄, 4-Br-C₆H₄, 4-NC₄H₄-C₆H₄, 4-NC₅H₅-C₆H₄, 3,4-bis-benziloxo-C₆H₄; R₃= OCH₃, Cl; R₄= OH, H; Y= C, N; X= O, S).

oxazolidine derivatives are considered to be useful leads for the rational design of new antitumor agents [70].

As observed, the oxazolidine derivatives may represent a new, more efficient therapeutic alternative, once a lot of investments are being made and new therapeutic targets are being discovered. Recent studies, as shown by Sarkar *et al.* 2014, showed that the complex formed by an oxazolidinone and a metal like palladium, cooper or platinum, presented a considerable cytotoxicity against breast adenocarcinoma (MCF-7), lung adenocarcinoma (A549) and low cytotoxicity against mice embryonic fibroblast (NIH3T3) [71]. However, Because of the relatively new discover of the antitumor activity of the oxazolidine derivatives and the need of more profound studies for a better understanding of their action mechanisms, no clinical study has yet been conducted with this class of compound and cancer patients.

5. OXAZOLIDINES ANTI-INFLAMMATORY EFFECT

Inflammation is a complex process involving immune cells, production of chemical mediators and local or systemic physiological alterations to combat any injurious agent, physical or biological, that may cause tissue damage. Among these chemical mediators there are many enzymes as for example, cyclooxygenase [72,73].

There are two isoforms of this enzyme: type I (COX-1), which converts arachidonic acid into prostaglandins, important for cell homeostasis; and type II (COX-2) which produces pro-inflammatory prostaglandins and is known to be the main target of the anti-inflammatory class more used: nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) [74]. Despite being extremely efficient, many drugs belonging to this

group are not specific for COX-2 and therefore also inhibit COX-1, causing severe side effects such as renal dysfunction, gastrointestinal bleeding and coagulation disorders.

With this, the scientific community began to seek more selective drugs or new therapeutic target with fewer side effects. In the search for the ideal molecule, it was discovered the anti-inflammatory activity of oxazolidine derivatives that had their first reports in 1973, when Welstead Jr and colleagues synthesized aminoethylloxazolidinones (Fig. 9) from the *N*-alkylation of an amine using 5-(2-chloroethyl)-2-oxazolidinone and tested in rats by "Carrageenan-Induced Paw Edema Assay". The results showed that these compounds were capable of inhibiting by 39% edema induced formation, being more efficient than phenylbutazone (positive control), which showed 27% inhibition [75]. Despite the good results, there were few molecules derived from oxazolidine developed for this purpose between 1970 and 2000.

However, before the widespread use of NSAIDs by the population and the serious damage resulting from their lack of selectivity, it became even more evident the need to develop new anti-inflammatory molecules that presented greater specificity for COX-2 as an alternative for the treatment of disorders associated with inflammation. Thinking about this, in 2011 Zaghi synthesized 2,3 and 2,3,5-substituted oxazolidinones derived by reaction between equimolar concentrations of benzylamine, 4-methylthio-benzaldehyde and an appropriate carboxylic acid, followed by oxidation of the resulting molecule by H₂O₂ to form the final molecule, assessing their ability of inhibiting the cyclooxygenase by *in vitro* tests. The results showed that all compounds, with and without substituent at the 5-position of the ring, presented excellent inhibition of COX-2 (enzymes

directly responsible for the production of inflammatory prostaglandins), but only the 2,3-substituted compounds showed higher specificity for COX-2, with IC_{50} for COX-1 almost 50 times higher, indicating that the 5-position substituent may have great influence on the efficiency of these compounds [76] (Fig. 9).

Shankarananth *et al.* in 2011, also synthesized other oxazolidine derivatives, this time presenting two carbonyls at 2 and 4-position. The compounds, which possessed a methyl group in the 5-position and an aryl substituent at the 3-position, were synthesized from the condensation of 5-methyl-1,3-oxazolidine-2,4-dione with various reagents possessing one or more aromatic rings in its structure. The anti-inflammatory activity of the synthesized molecules was evaluated by the Rat Paw Edema Carrageenan-Induced Assay, which showed moderate to good activity when compared to the positive control (diclofenac) [77].

Given the good results obtained in this study, Shankaranath synthesized in 2012, new derivatives that besides methyl, had another aromatic substituent at the 5-position of the ring. These compounds were the result of the reaction between ethyl lactate and a guanidine molecule followed by acid hydrolysis to form the oxazolidine-2,4-dione, which in turn was subjected to carbon 5 alkylation. The method of assessing anti-inflammatory activity of the molecules was the same used in the previous study, and the result was quite similar to the previous study. Thus, it is possible to note that compounds with aromatic substituent in 3 or 5-position can be considered great candidates for anti-inflammatory drugs [78] (Fig. 9).

Recently a protease called Human Neutrocytic Elastase (HNE) has raised the interest of scientists because of the key role it plays in the modulation of chronic inflammatory diseases such as cystic fibrosis and chronic obstructive pulmo-

nary disease. In these diseases HNE leaves the azurophilic granules of neutrophils and go into the extracellular environment where they hydrolyze proteins such as collagen and elastin, causing tissue damage [79,80].

Previous studies had shown that inhibition of the enzyme is an excellent way to prevent tissue damage [81], a research group at the University of Lisbon invested in the development of new molecules with this capacity and found that oxazolidine derivatives are a class of molecules with great inhibitory potential of HNE (Fig. 9). Based on this, in 2012, the same research group developed oxazolidines-2,4-dione *N*-acyl and *N*-sulfonyl-substituted from the reaction between 2-hydroxy esters and urea in the presence of sodium methoxide followed by *N*-acylation or *N*-sulfonylation using 4-methoxybenzoyl chloride or 4-methylbenzene-sulfonyl chloride [82]. Those compounds that presented a sulfonyl or acyl group with a 4-methoxy attached to the aromatic ring showed the highest inhibitory activity of HNE enzyme, reaching an inhibition rate close to 100%.

Another therapeutic target that has aroused the interest of the scientific community is the family of nuclear receptors PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), particularly the α and γ subtypes. The PPAR α is present in tissues with high rate of fat acid and modulates the lipid metabolism when activated, while the PPAR γ increases the insulin sensibility and improve the glucose control – and modulates the expression of inflammatory genes, regulating cytokine levels such as IL-6, IL-17, IL-22 e IFN- γ [83-86]. Although the thiazolidines and fibrates are the main PPAR agonists – the fibrates (*e.g.* fenofibrate and genfibrozil) are used as α -subtype agonists and the thiazolidines as γ -subtype agonists – the oxazolidines also proved to be capable of activating these receptors [87]. Fresno *et al.* developed oxazolidinones with a polar head, a linker and a nonpolar tail

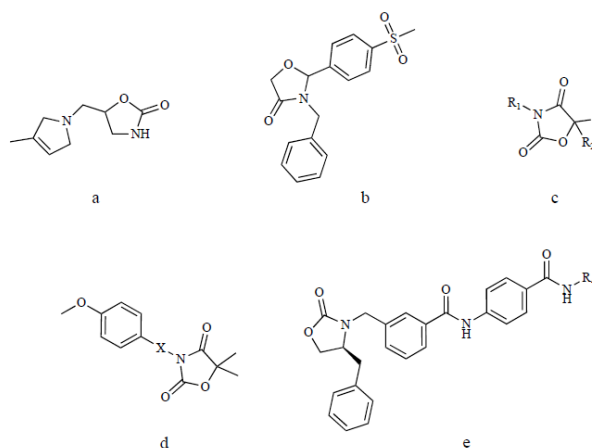


Fig. (9). Anti-inflammatory oxazolidine derivatives. (a) The first oxazolidine with anti-inflammatory activity; (b) 2,3-substituted oxazolidinone with higher activity; (c) 3,5-substituted oxazolidine-2,4-dione; (d) oxazolidinedione derivatives with Human Neutrophil Elastase inhibitory activity; (e) Oxazolidinone derivatives with PPAR- γ agonist activity (R_1 =4-phenylacetamide, $CO(C_5H_4N)$; R_2 = $CH_2(CH_2)_2CH_3$, $CH_2(CH_2)_6CH_3$, H; R_3 = CH_3 ; H; R_4 = $CH_2(CH_2)_3CH_3$, 4-*t*-C(CH_3)₃-C₆H₄; X= SO_2 ; CO).

portion, being the 4-carbon of the oxazolidine a chiral carbon, and may present absolute configuration *S* or *R*. To synthesize these compounds, the intermediates were obtained by cross-alkylation reaction or nucleophilic substitution between commercial oxazolidines (*R*)-4-benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinone and (*S*)-4-benzyl-2-oxazolidinone and *t*-BuOK or halogenate alkyl, respectively. The resulting oxazolidines were subjected to a final reaction (with the aid of microwave) with a variety of amines, mediated by a trimethylaluminum complex to give the final compounds [87, 88].

Those compounds having an absolute rating *R* and substituent at the hydrophobic tail 4-tert-butylbenzene and pentane showed higher activity, acting as dual agonists of PPAR α and PPAR γ receptor, with EC₅₀ <1 μ M, it is considered the ideal to minimize side effects of the specific molecule agonist of each receptor.

It is well known that the oxazolidines are great candidates for anti-inflammatory drugs, particularly the 1,3-substituted oxazolidinones with electron donor groups such as sulfonyl, as well as being very effective in inhibiting COX-2, they are extremely selective, with higher dosages necessary to inhibit COX-1. Oxazolidinones, in turn, have also shown very significant anti-inflammatory activity, in particular some molecules synthesized by Santana *et al.* 2012, which may represent an alternative way to treat chronic diseases related to inflammation. In the same way oxazolidinones developed by Fresno *et al.* showed great therapeutic potential, they are more effective than the drugs available in the clinic due to its double agonist action. However, these candidates for drugs still need to go through many tests *in vitro* and *in vivo* before reaching the clinical studies, since little is known about the performance of oxazolidine derivatives in the human immune system and their possible side effects.

CONCLUSION

In this context, a variety of studies evidence the great therapeutic potential of the oxazolidine family, in particular the ones with antibacterial activity, since a considerable amount of molecules are undergoing the clinical study phase (sutezolid, radezolid and cadezolid) and many others are under development (linezolid analogs), presenting excellent results. But is not only the antibacterial activity that has been highlighted, the anticonvulsant activity also. Although the side effects at high doses, the trimethadione can become an alternative for the treatment of Parkinson's disease, as well as the zolmitriptan may represent the beginning of the development of new oxazolidines class of drugs, which act as antimigraine and anticonvulsant agents through the serotoninergic receptors. Though anticancer and anti-inflammatory data are quite scarce, the obtained results until the moment are encouraging, which reinforce its potential and stimulate research in the area.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), the INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica), the PPGIT (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica) and the UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

REFERENCE

- [1] World Health Organization. Noncommunicable diseases. who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/ (Accessed May 28, 2016).
- [2] World Health Organization. Tuberculosis. who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/ (Accessed May 28, 2016).
- [3] Löscher, W.; Klitgaard, H.; Twyman, R.E.; Schmidt, D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, 12(10), 757-776.
- [4] Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*, 2005, 28(1), 118-129.
- [5] Patrono, C.; Rocca, B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Past, present and future. *Pharmacol. Res.*, 2009, 59(5), 285-289.
- [6] Bebell, L.M.; Muir, A.N. Antibiotic Use and Emerging Resistance: How Can Resource-Limited Countries Turn the Tide? *Global Heart*, 2014, 9(3), 347-358.
- [7] Bergmann, E.D. The Oxazolidinones. *Chem. Rev.*, 1953, 53(2), 309-352.
- [8] Michalska, K.; Karpiuk, I.; Król, M.; Tyski, S. Recent development of potent analogues of oxazolidinone antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21(3), 577-559.
- [9] Moreira, R.; Santana, A.B.; Iley, J.; Neres, J.; Douglas, K.T.; Horton, P.N.; Hursthouse, M.B. Design, synthesis and enzymatic evaluation of N1-acyloxyalkyl- and N1-oxazolidin-2,4-dione-5-yl-substituted β -lactams as novel inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.*, 2005, 48(15), 4861-4870.
- [10] Galliani, G.; Rindone, B.; Saliu, F. Synthesis of 3-alkyloxazolidin-2,4-diones using 2-chloroacetamides, carbon dioxide and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undecene (DBU). *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50(36), 5123-5125.
- [11] Derevkova, V.A.; Balalaeva, I.V.; Papina, R.I.; Korepin, A.G.; Glushakova, N.M.; Terent'ev, A.A. Cytostatic action of triazole and oxazolidinone derivatives. *Russ. Chem. Bull.*, 2011, 60(6), 1166-1171.
- [12] Niemi, T.; Buceta, J.E.P.; Fernández, I.; Alakurti, S.; Rantala, E.; Repo, T. Direct Assembly of 2-Oxazolidinones by Chemical Fixation of Carbon Dioxide. *Chemistry*, 2014, 20(29), 8867-8871.
- [13] Elmore, D.T.; Ogle, J.R. Acyl thiocyanates: on the nature of Clemmensen and Heitman's "Glycolyl and lactyl thiocyanates". *Tetrahedron*, 1958, 3(3), 310-311.
- [14] Chen, S.; Chen, L.; Le, N.T.; Zhao, C.; Sidduri, A.; Lou, J.P.; Michoud, C.; Portland, L.; Jackson, N.; Liu, J.J.; Konzelmann, F.; Chi, F.; Tovar, C.; Xiang, Q.; Chen, Y.; Wen, Y.; Vassilev, L.T. Synthesis and activity of quinolinyl-methylene-thiazolinones as potent and selective cyclin dependent kinase 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17(8), 2134-2138.
- [15] Chen, G.; Fu, C.; Ma, S. A novel synthesis of oxazolidine-2,4-diones via an efficient fixation of CO₂ with 3-aryl-2-alkynamides. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 105-110.
- [16] Pastore, V.; Sabatier, L.; Enrique, A.; Marder, M.; Bruno-Blanch, L.E. Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21(4), 841-846.
- [17] Wong, M.G.; Defina, J.; Andrews, P.R. Conformational analysis of clinically active anticonvulsant drugs. *J. Med. Chem.*, 1986, 29(4), 562-572.
- [18] Food and Drug Administration. Trimethadione. Available online <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=SearchDrugDetails> (Accessed June 8, 2016).

- [19] Macdonald, R.L.; Kelly, K.M. Antiepileptic Drug Mechanisms of Action. *Epilepsia*, 1995, 36(2), 2-16.
- [20] Barton, M.E.; Eberle, E.L.; Shannon, H.E. The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur. J. Pharmacol.*, 2005, 521(1-3), 79-85.
- [21] Follett, J.; Darlow, B.; Wong, M.B.; Goodwin, J.; Pountney, D.L. Potassium Depolarization and Raised Calcium Induces α -Synuclein Aggregates. *Neurotox. Res.*, 2013, 23(4), 378-392.
- [22] Rcom-H'cheo-Gauthier, A.; Goodwin, J.; Pountney, D.L. Interactions between Calcium and Alpha-Synuclein in Neurodegeneration. *Biomolecules*, 2014, 4(3), 795-811.
- [23] Bonnycastle, D.D.; Giarnan, N.J.; Paasonen, M.K. Anticonvulsant compounds and 5-hydroxytryptamine in rat brain. *Brit. J. Pharmacol.*, 1957, 12(2), 228-231.
- [24] Peroutka, S.J.; Sleight, A.J.; McCarthy, B.G.; Pierce, P.A.; Schmidt, A.W.; Hekmatpanah, C.R. The clinical utility of pharmacological agents that act at serotonin receptors. *J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.*, 1989, 1(3), 253-262.
- [25] Welsh, J.P.; Placantonakis, D.G.; Warselsky, S.I.; Marquez, R.G.; Bernstein, L.; Aicher, S.A. The serotonin hypothesis of myoclonus from the perspective of neuronal rhythmicity. *Adv. Neurol.*, 2002, 89, 307-329.
- [26] Dhanawat, M.; Das, N.; Shrivastava, S.K. Design, synthesis, anticonvulsant screening and 5HT1A/2A receptor affinity of N(3)-substituted 2,4-imidazolidinediones and oxazolidinediones. *Drug Discov. Ther.*, 2011, 5(5), 227-237.
- [27] Dhanawat, M.; Banerjee, A.G.; Shrivastava, S.K. Design, synthesis, and anticonvulsant screening of some substituted piperazine and aniline derivatives of 5-phenyl-oxazolidin-2,4-diones and 5,5-diphenylimidazolidin-2,4-diones. *Med. Chem. Res.*, 2012, 21(10), 2807-2822.
- [28] Dinakaran, V.S.; Perumal, P.; Kaitheri, S.K. Synthesis and anticonvulsant activity of 2-substituted-1, 3-Oxazolidines. *J. Pharm. Res.*, 2010, 3(6), 1308-1311.
- [29] Clinical Trials. Zolmitriptan. clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01211145?term=oxazolidinone&rank=18 (Accessed May 28, 2016).
- [30] Food and Drug Administration. Zolmitriptan. [fda.gov/ohrtms/dockets/ac/05/slides/2005-4152s1_07_zemplan%20%20omig%20%20trusopt%20%20arava.pdf](https://www.fda.gov/ohrtms/dockets/ac/05/slides/2005-4152s1_07_zemplan%20%20omig%20%20trusopt%20%20arava.pdf) (Accessed June 4, 2016).
- [31] Lionetto, L.; Casolla, B.; Mastropietri, F.; D'Alonzo, L.; Negro, A.; Simmaco, M.; Martelletti, P. Pharmacokinetic evaluation of zolmitriptan for the treatment of migraines. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2012, 8(8), 1043-1050.
- [32] Bird, S.; Derry, S.; Moore, R.A. Zolmitriptan for acutemigraine attacks in adults (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2014, (5), CD008616.
- [33] Ford, C.W.; Hamel, J.C.; Stapert, D.; Moerman, J.K.; Hutchinson, D.K.; Barbachyn, M.R.; Zurenko, G.E. Oxazolidinones: new antibacterial agents. *Trends Microbiol.*, 1997, 5(5), 196-200.
- [34] Moellering, R.C. Jr. A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria. *Ann. Intern. Med.*, 1999, 130(2), 155-157.
- [35] Rodríguez, J.C.; Ruiz, M.; López, M.; Royo, G. *In vitro* activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2002, 20(6), 464-467.
- [36] Pandit, N.; Singla, R.K.; Shrivastava, B. Current updates on oxazolidinone and its significance. *Int. J. Med. Chem.*, 2012, 2012, 1-24.
- [37] Diekema, D.J.; Jones, R.N. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*, 2001, 358(9297), 1975-1982.
- [38] Zurenko, G.E.; Gibson, J.K.; Shinabarger, D.L.; Aristoff, P.A.; Ford, C.W.; Tarpley, W.G. Oxazolidinones: a new class of antibacterials. *Curr. Opin. Pharm.*, 2001, 1(5), 470-476.
- [39] Fung, H.B.; Kirschenbaum, H.L.; Ojofetimi, B.O. Linezolid: An Oxazolidinone Antimicrobial Agent. *Clin. Ther.*, 2001, 23(3), 356-391.
- [40] Clinical Trials. Linezolid. clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00572559?term=linezolid+clinical+phase+4&rank=4 (Accessed May 28, 2016).
- [41] Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Approval Package Linezolid. [accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21130_Zyvox_approv.PDF](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21130_Zyvox_approv.PDF) 4 (Accessed May 28, 2016).
- [42] Renslo, A.R. Antibacterial oxazolidinones: emerging structure-toxicity relationships. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2010, 8(5), 565-574.
- [43] Clinical Trials. Cadazolid. clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01983683?term=Cadazolid&rank=1 (Accessed May 28, 2016).
- [44] Barbachyn, M.R.; Ford, C.W. Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, 42(8), 2010-2023.
- [45] Paget, S.D.; Boggs, C.M.; Foleno, B.D.; Goldschmidt, R.M.; Hlasta, D.J.; Weidner-Wells, M.A.; Werblood, H.M.; Bush, K.; Macielag, M.J. Antibacterial activity of pyrrolopyridine-substituted oxazolidinones: synthesis and *in vitro* SAR of various C-5 acetamide replacements. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16(17), 4537-4542.
- [46] Gravestock, M.B.; Acton, D.G.; Betts, M.J.; Dennis, M.; Hatter, G.; McGregor, A.; Swain, M.L.R.; Wilson, G.; Woods, L.; Wookey, A. New Classes of Antibacterial Oxazolidinones with C-5, Methylene O-Linked Heterocyclic Side Chains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13(23), 4179-4186.
- [47] Ippolito, J.A.; Kanyo, Z.F.; Wang, D.; Franceschi, F.J.; Moore, P.B.; Steitz, T.A.; Duffy, E.M. Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. *J. Med. Chem.*, 2008, 51(12), 3353-3356.
- [48] Shiao, T.P.; Turtle, E.D.; Francavilla, C.; Alvarez, N.J.; Zuck, M.; Friedman, L.; O'mahony, D.J.R.; Low, E.; Anderson, M.B.; Najafi, R.; Jain, R.K. Novel 3-chlorooxazolidin-2-ones as antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 21(10), 3025-3028.
- [49] Genin, M.J.; Allwine, D.A.; Anderson, D.J.; Barbachyn, M.R.; Emmert, D.E.; Garmon, S.A.; Graber, D.R.; Grega, K.C.; Hester, J.B.; Hutchinson, D.K.; Morris, J.; Reischer, R.J.; Ford, C.W.; Zurenko, G.E.; Hamel, J.C.; Schaadt, R.D.; Stapert, D.; Yagi, B.H. Substituent effects on the antibacterial activity of nitrogen-carbon-linked (azolylphenyl)oxazolidinones with expanded activity against the fastidious gram-negative organisms Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis. *J. Med. Chem.*, 2000, 43(5), 953-970.
- [50] Renslo, A.R.; Luehr, G.W.; Lam, S.; Westlund, N.E.; Gómez, M.; Hackbarth, C.J.; Patel, D.V.; Gordeev, M.F. Synthesis and structure-activity studies of antibacterial oxazolidinones containing dihydrothiopyran or dihydrothiazine C-rings. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16(13), 3475-3478.
- [51] Clinical Trials. Radezolid. Skin Infection. clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00646958?term=radezolid&rank=2 1 (Accessed May 28, 2016).
- [52] Clinical Trials. Radezolid, Pneumonia. Available online: clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00640926?term=radezolid&rank=1 (Accessed May 28, 2016).
- [53] Lemaire, S.; Tulkens, P.M.; Bambeke, F.V. Cellular Pharmacokinetics of the Novel Biarylloxazolidinone Radezolid in Phagocytic Cells: Studies with Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, 54(6), 2540-2548.
- [54] Baldoni, D.; Gutierrez, M.; Timmer, W.; Dingemans, J. Cadazolid, a novel antibiotic with potent activity against Clostridium difficile: safety, tolerability and pharmacokinetics in healthy subjects following single and multiple oral doses. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, 69(3), 2540-2548.
- [55] Clinical Trials. Sutezolid (PNU100-480), Pulmonary Tuberculosis. clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01225640?term=sutezolid&rank=3 (Accessed May 28, 2016).
- [56] Mallocci, G.; Vargiu, A.V.; Serra, G.; Bosin, A.; Ruggerone, P.; Ceccarelli, M. A Database of Force-Field Parameters, Dynamics, and Properties of Antimicrobial Compounds. *Molecules*, 2015, 20(8), 13997-14021.
- [57] Shankarananth, V.; Ranganayakulu, D.; Sridhar, C.; Rajasekhar, K.K. Synthesis and Antitubercular activity of Some Oxazolidinone Dione Derivatives. *Int. J. Pharm. Arch.*, 2012, 47-51.
- [58] Kamal, A.; Shetti, R.V.; Azeza, S.; Swapna, P.; Naseer, M.; Khan, A.; Khan, I.A.; Sharma, S.; Abdullah, S.T. Anti-tubercular agents. Part 6: Synthesis and antimycobacterial activity of novel arylsulfonylamido conjugated oxazolidinones. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46(3), 893-900.
- [59] Kamal, A.; Swapna, P.; Shetti, R.V.; Shaik, A.B.; Rao, N.M.; Sultana, F.; Khan, I.A.; Sharma, S.; Kalia, N.P.; Sunil, K.; Chandrakant, B. Anti-tubercular agents. Part 7: A new class of diarylpyr-

- role of oxazolidinone conjugates as antimycobacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *64*, 239-251.
- [60] Kamal, A.; Swapna, P.; Shetti, R.V.; Shaik, A.B.; Rao, M.P.N.; Gupta, S. Synthesis, biological evaluation of new oxazolidinone-sulfonamides as potential antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *62*, 661-669.
- [61] Khim, N.; Andriananjaka, V.; Popovici, J.; Kim, S.; Ratsimbaoa, A.; Benedit, C.; Barnadas, C.; Durand, R.; Thellier, M.; Legrand, E.; Musset, L.; Menegon, M.; Severini, C.; Nour, B.Y.; Tichit, M.; Bouchier, C.; Mercereau-Puijalon, O.; Ménard, D. Effects of mefloquine use on *Plasmodium vivax* multidrug resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, **2014**, *20*(10), 2-9.
- [62] Gonçalves, R.S.B.; Kaiser, C.R.; Lourenço, M.C.S.; Souza, M.V.N.; Wardell, J.L.; Wardell, S.M.S.V.; Silva, A.D. Synthesis and antitubercular activity of new mefloquine-oxazolidine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*(12), 6095-6100.
- [63] Gonçalves, R.S.B.; Kaiser, C.R.; Lourenço, M.C.S.; Bezerra, F.A.F.M.; Souza, M.V.N.; Wardell, J.L.; Wardell, S.M.S.V.; Henriques, M.G.M.O.; Costa, T. Mefloquine-oxazolidine derivatives, derived from mefloquine and arenecarbaldehydes: *In vitro* activity including against the multidrug-resistant tuberculosis strain T113. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*(1), 243-248.
- [64] Instituto Nacional do Câncer. 2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencia/noticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014 (Accessed May 28, 2016).
- [65] Nareish, A.; Rao, M.V.; Kotapalli, S.S.; Ummanni, R.; Rao, B.V. Oxazolidinone derivatives: Cytosazole-Linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *80*, 295-307.
- [66] Poirier, D. Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*(6), 453-477.
- [67] Harada, K.; Kubo, H.; Abe, J.; Haneta, M.; Conception, A.; Inoue, S.; Okada, S.; Nishioka, K. Discovery of potent and orally bioavailable 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*(10), 3242-3254.
- [68] Harada, K.; Kubo, H.; Tanaka, A.; Nishioka, K. Identification of oxazolidinediones and thiazolidinediones as potent 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*(1), 504-507.
- [69] Pitta, I.R. Novos derivados 2-tioxo-oxazolidinônicos potencialmente úteis na terapia anticâncer. BR. Patent 20150160607 July 07, 2015.
- [70] Rodrigues, F.A.R.; Bomfim, I.S.; Cavalcanti, B.C.; Pessoa, C.; Gonçalves, R.S.B.; Wardell, J.L.; Wardell, S.M.S.V.; Souza, M.V.N. Mefloquine-Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2014**, *83*(1), 126-131.
- [71] Sarkar, A.; Bhattacharyya, S.; Dey, S.K.; Karmakar, S.; Mukherjee, A. Structure and properties of metal complexes of a pyridine based oxazolidinone synthesized by atmospheric CO₂ fixation. *New J. Chem.*, **2014**, *38*, 817-826.
- [72] Hawkey, C.J. COX-1 e COX-2 inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **2001**, *15*(5), 801-820.
- [73] Michelin, A.F.; Ferreira, A.A.P.; Bitar, V.G.; Lopes, L.C. Toxicidade Renal De Inibidores Seletivos Da Ciclooxygenase-2: Celecoxib e Rofecoxib. *Rev. Cienc. Med.*, **2012**, *15*(4), 321-332.
- [74] Mateos, J.M. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2), celecoxib and parecoxib: a systematic review. *Drugs Today*, **2010**, *46*, 1-25.
- [75] Welstead Jr, W.J.; Helsley, G.C.; Taylor, C.R.; Turnbull, L.B.; Da Vanzo, J.P.; Funderburk, W.H.; Alphin, R.S. 5-(2-Aminoethyl)-2-oxazolidinones with central nervous system depressant and anti-inflammatory activity. *J. Med. Chem.*, **1973**, *16*(10), 1129-1132.
- [76] Zarghi, A.; Arefi, H.; Dadras, O.G.; Torabi, S. Design and synthesis of new 2-aryl, 3-benzyl-(1,3-oxazolidine or 1,3-thiazolidine)-4-ones as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Med. Chem. Res.*, **2010**, *19*(8), 782-793.
- [77] Shankarananth, V.; Ranganayakulu, D.; Sridhar, C.; Rajasekhar, K.K.; Bhaskar, S. Synthesis and biological evaluation of 5-methyl-N-aryl substituted-1,3-Oxazolidine dione derivatives. *Int. J. Pharm. Arch.*, **2011**, *4*(10), 3821-3823.
- [78] Shankarananth, V.; Ranganayakulu, D.; Sridhar, C.; Rajasekhar, K.K. Synthesis and Antiinflammatory activity of some oxazolidinedione derivatives. *J. Pharm. Res.*, **2012**, *5*(3), 1633-1635.
- [79] Lucas, S.D.; Costa, E.; Guedes, R.C.; Moreira, R. Targeting COPD: Advances on low-molecular-weight inhibitors of human neutrophil elastase. *Med. Res. Rev.*, **2012**, *33*, 1-29.
- [80] Korkmaz, B.; Horwitz, M.S.; Jenne, D.E.; Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.*, **2010**, *62*(4), 726-759.
- [81] Powers, J.C.; Asgari, J.L.; Ekici, O.D.; James, K.E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*(12), 4639-750.
- [82] Santana, A.B.; Lucas, S.D.; Gonçalves, L.M.; Correia, H.F.; Cardote, T.A.F.; Guedes, R.C.; Iley, J.; Moreira, R. N-Acyl and N-sulfonyloxazolidine-2,4-diones are pseudo-irreversible inhibitors of serine proteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*(12), 3993-3997.
- [83] Cariou, B.; Charbonnel, B.; Staels, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2012**, *23*(5), 205-215.
- [84] Rocha Junior, L.F.; Régio, M.J.B.M.; Cavalcanti, M.B.; Pereira, M.C.; Galdino-Pitta, M.R.; Oliveira, P.S.S.; Gonçalves, S.M.C.; Duarte, A.L.B.P.; Lima, M.C.A.; Pitta, I.R.; Pitta, M.G.R. Synthesis of a Novel Thiazolidinedione and Evaluation of Its Modulatory Effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 Production in PBMCs from Rheumatoid Arthritis Patients. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, *2013*, 1-9.
- [85] Wright, M.B.; Bortolini, M.; Tadayyon, M.; Bopst, M. Challenges and Opportunities in Development of PPAR Ligands. *Mol. Endocrinol.*, **2014**, *28*(11), 1756-1758.
- [86] Liu, Z.M.; Hu, M.; Chan, P.; Tomlinson, B. Early investigational drugs targeting PPAR- α for the treatment of metabolic disease. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **2015**, *24*(5), 611-621.
- [87] Fresno, N.; González, M.M.; Zaguirre, A.T.; Cuevas, M.R.; Camacho, P.S.; Elguero, J.; Pavón, F.J.; Fonseca, F.R.; Goya, P.; Fernández, R.P. Novel Oxazolidinone-Based Peroxisome Proliferator Activated Receptor Agonists: Molecular Modeling, Synthesis, and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*(16), 6639-6652.
- [88] Fresno, N.; Fernandez, R.P.; Goya, P.; Jimeno, M.L.; Alkorta, I.; Elguero, J.; Taboada, L.M.; Granda, S.G. Oxazolidinone cross-alkylation during Evans' asymmetric alkylation reaction. *Tetrahedron*, **2011**, *67*(47), 9104-9111.

10 ANEXO A - CARTA PATENTE DO GQ-16

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0300997-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0300997-1

(22) Data do Depósito: 10/04/2003

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/05/2005

(51) Classificação Internacional: C07D 277/34; C07D 417/06; A61K 31/427; A61P 3/10; A61K 31/426

(54) Título: COMPOSTOS ARIIDENOTIAZOLIDINADIÔNICOS COM ATIVIDADE HIPOGLICÊMICA

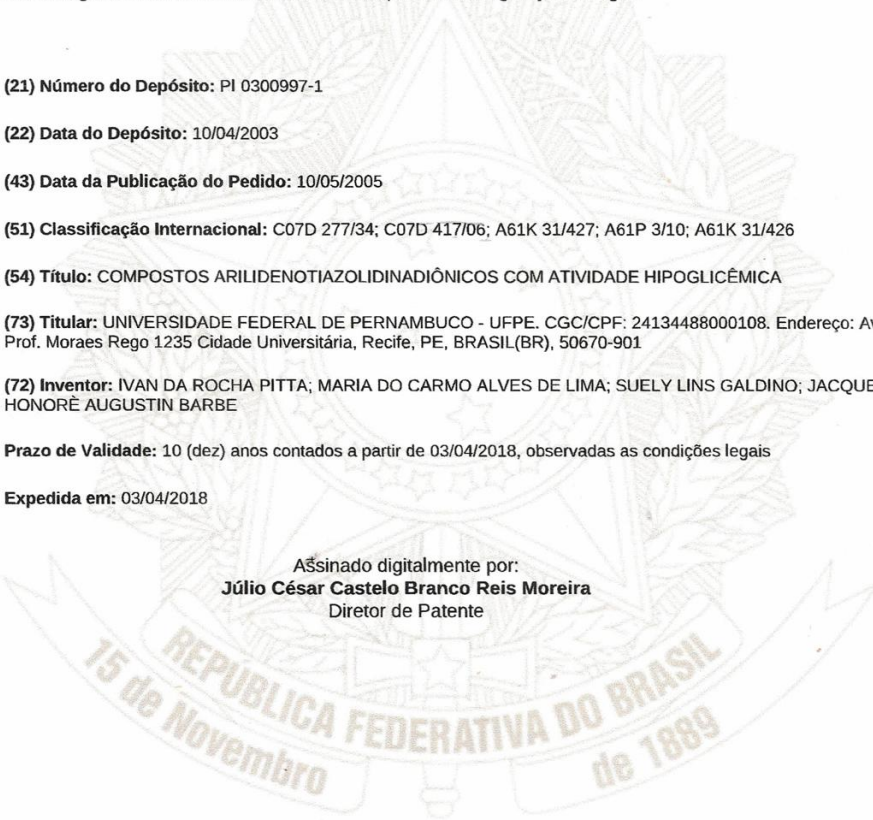
(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE. CGC/CPF: 24134488000108. Endereço: Av. Prof. Moraes Rego 1235 Cidade Universitária, Recife, PE, BRASIL(BR), 50670-901

(72) Inventor: IVAN DA ROCHA PITTA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; SUELY LINS GALDINO; JACQUES HONORÉ AUGUSTIN BARBE

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 03/04/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 03/04/2018

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889