



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS EM PBMCs DO SANGUE PERIFÉRICO DE
VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS**

Recife
2019

SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS EM PBMCs DO SANGUE PERIFÉRICO DE
VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta - UFPE

Coorientadores: Profa. Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta – UFPE

Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira - UFPE

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Sandra Elizabeth Barbosa da

Planejamento, síntese e atividade imunomoduladora de novos derivados tiazquinolínicos em PBMCs do sangue periférico de voluntários saudáveis / Sandra Elizabeth Barbosa da Silva- 2019.

110 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientadores: Marina Galdino da Rocha Pitta e Michelly Cristiny Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos

1. Anti-inflamatório 2. Inflamação 3. Molécula híbrida I. Pitta, Ivan da Rocha (orient.) II. Pitta, Marina Galdino da Rocha (coorient.) III. Pereira, Michelly Cristiny (coorient.) IV. Título

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-346

SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS EM PBMCs DO SANGUE PERIFÉRICO DE
VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 28/08/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Augusto Vasconcelos de Freitas Ramalho (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho as gerações futuras de pesquisadores e a população. Aos pesquisadores, no intuito que possam utilizar as informações aqui presente em beneficio ao cidadão. À população, para que usufruam de novas tecnologias desenvolvidas para melhoria da qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores responsáveis do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF– por ter me dado a oportunidade de aprender e conviver com colegas que fazem o estresse da falta de sucesso da pesquisa, no primeiro ano ou mais, ser nada, quando se tem alguém para compartilhar o momento, contribuir com as experiências vivenciadas e mostrar que amanhã você poderá tentar novamente pois estarão todos no mesmo lugar para caminharem juntos.

Não posso esquecer do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, no qual faço parte há seis anos, onde obtive o apoio e compreensão de todos nesse momento. Sinto-me privilegiada, por acordar e querer ir trabalhar, pois sei que ao chegar no trabalho encontrarei colegas que fazem do ambiente um lugar de convivência agradável.

Agradeço a toda minha família pois cada um, contribuiu de alguma forma para que este trabalho pudesse acontecer. É em momentos como esse que se renova a certeza do quanto a família é importante, pois embora tenha sido meu desejo estudar, no fim tornou-se o desejo de todos, porque em determinados momentos precisei da compreensão e contribuição de muitos.

Obrigado a Paulo Germano, secretário do PPGIT, pela dedicação ao trabalho, paciência e eficiência para resolver nossos problemas.

A Hernando Filho, servidor da UFPE, lotado no LPSF, pela contribuição e paciência pela análise de caracterização dos compostos.

À profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira pela contribuição nos momentos mais atribulados, transformando-os, serenos.

A todos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) são merecedores de agradecimento pela paciência e disponibilidade em ensinar.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A síntese de moléculas híbridas é uma estratégia para obtenção de moléculas mais eficientes devido à união de núcleos farmacofóricos sabidamente relacionados a uma atividade farmacológica. Na literatura, existem trabalhos que comprovam a ação anti-inflamatória dos núcleos quinolínicos e tiazolidínicos, sozinhos e associados a outros núcleos. No tratamento para combater a inflamação é utilizado principalmente anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e glicocorticoides, relacionados a efeitos adversos, sendo os principais: dano gastrointestinal e osteoporose, respectivamente. O presente trabalho tem por finalidade o planejamento, síntese e caracterização de novos derivados tiazoloquinolínicos - híbrido com núcleo tiazolidínico e quinolínico – a elucidação estrutural dessas moléculas e a modulação de citocinas relacionadas a cascata inflamatória. A elucidação molecular de todos os compostos coube à técnicas de RMN¹H e ¹³C, IV, HPLC e MALDI-TOF/MS. Foram sintetizadas cinco novas moléculas híbridas da série LPSF/ZKD, após a elucidação estrutural das moléculas, três dessas, LPSF/ZKD2, LPSF/ZKD4 e LPSF/ZKD7, nas concentrações de 50µM e 100µM, foram aprovadas com viabilidade superior a 90%, no teste de citotoxicidade pela metodologia MTT. Esses mesmos compostos foram submetidos a testes de modulação das citocinas IFN-γ, IL-17A, IL-6 e IL-10, titulando-as no sobrenadante de cultura de 48h de PBMCs de voluntários sadios, através da técnica de ELISA sanduíche. Na etapa de modulação de citocinas os compostos tiazoloquinolínicos parecem reduzir a produção de citocinas IL-10, IL-6, IFN-γ e resultados menos expressivos para a IL-17A, nas duas concentrações, no entanto, não se encontrou significância nos valores de redução, provavelmente em decorrência da baixa amostragem, *n*=3. Os compostos LPSF/ZKD2 50µM e LPSF/ZKD4 100µM apresentaram melhores resultados de inibição em comparação ao mitógeno (CD3/CD28), sendo para IL-6 - 94% e 96%, enquanto para IFN-γ – 62% e 77%, respectivamente por composto. Sendo assim, por possuir perfil anti-inflamatório, esses compostos podem ser futuramente explorados em ensaios de amostras de PBMCs de pacientes com doenças inflamatórias e testes *in vivo* em modelo animal para uma melhor avaliação como modulador de citocinas e sua possível intervenção nessas enfermidades.

Palavras-chave: Molécula híbrida. Tiazolidinadiona. Inflamação. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

The synthesis of hybrid molecules is a strategy for obtaining more efficient molecules due to the union of pharmacophoric nuclei known to be related to a pharmacological activity. In the literature, there are studies that prove the anti-inflammatory action of the quinoline and thiazolidine nuclei, alone and associated with other nuclei. In the treatment to fight inflammation is mainly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and glucocorticoids, related to adverse effects, being the main: gastrointestinal damage and osteoporosis, respectively. The present work aims at the planning, synthesis and characterization of new thiazoquinoline derivatives - thiazolidine and quinoline nucleus hybrid - the structural elucidation of these molecules and modulation of cytokines related to the inflammatory cascade. The molecular elucidation of all compounds was performed by ^{13}C MRN and ^1H , IR, HPLC and MALDI-TOF / MS techniques. Five new hybrid molecules of the LPSF/ZKD series were synthesized after the structural elucidation of the molecules, three of them, LPSF/ZKD2, LPSF/ZKD4 and LPSF/ZKD7, at concentrations of 50 μM and 100 μM , were approved with viability greater than 90% in the MTT cytotoxicity test. These same compounds were subjected to IFN- γ , IL-17A, IL-6 and IL-10 cytokine modulation tests, titrating them to the 48h culture supernatant of PBMCs from healthy volunteers using the sandwich ELISA technique. In the cytokine modulation stage thiazoquinoline compounds appear to reduce the production of IL-10, IL-6, IFN- γ cytokines and less expressive results for IL-17A at both concentrations, however, no significance was found in the values of reduction, probably due to low sampling, $n = 3$. The compounds LPSF / ZKD2 50 μM and LPSF / ZKD4 100 μM showed better inhibition results compared to mitogen (CD3 / CD28), being for IL-6 - 94% and 96%, while for IFN- γ - 62% and 77%, respectively per compound. Therefore, due to their anti-inflammatory profile, these compounds may be further explored in PBMC sample assays from patients with inflammatory diseases and in vivo animal model tests for a better evaluation as a cytokine modulator and its possible intervention in these diseases.

Keywords: Hybrid molecule. Thiazolidinedione. Inflammation. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 – | Classificação dos compostos híbridos..... | 18 |
| Figura 2 – | Híbrido de ação anti-mutagênci..... | 19 |
| Figura 3 – | Híbrido de ação anti-tuberculosa..... | 19 |
| Figura 4 – | Híbridos de ação anti-malárica..... | 19 |
| Figura 5 – | Híbridos de ação anti-fúngica..... | 20 |
| Figura 6 – | Híbridos de ação anti-inflamatória..... | 20 |
| Figura 7 – | Tiazolidina-2,4-diona e seu derivado glitazona..... | 21 |
| Figura 8 – | Imunomodulação do análogo de TZD em PBMCs de indivíduos saudáveis..... | 21 |
| Figura 9 – | Derivados da tiazolidinadiona com substituintes nas posições 3 e 5 do anel da TZD - ação anti-inflamatória... | 24 |
| Figura 10 – | Derivados da tiazolidinadiona com substituintes na posição 5 do anel da TZD – ação anti-inflamatória..... | 24 |
| Figura 11 – | Anel quinolínico..... | 25 |
| Figura 12 – | C8S;C9R – Quinina..... | 25 |
| Figura 13 – | Híbrido com atividade anti-inflamatória..... | 26 |
| Figura 14 – | Compostos com atividade anti-inflamatória..... | 27 |
| Figura 15 – | Reconhecimento do patógeno pelo macrófago e via de sinalização..... | 31 |
| Figura 16 – | Moléculas tiazoloquinolínicas LPSF/ZKDs..... | 39 |
| Figura 17 – | Redução do MTT..... | 41 |
| Figura 18 – | Derivados tiazolidínicos semelhantes..... | 45 |
| Figura 19 – | Derivados tiazoloquinolínicos..... | 47 |
| Figura 20 – | RMN ¹ H – LPSF/GQ299..... | 51 |
| Figura 21 – | RMN ¹³ C – LPSF/GQ299..... | 52 |
| Figura 22 – | RMN ¹ H – 2-clorometilquinolina..... | 53 |
| Figura 23 – | RMN ¹ H – LPSF/ZKD7..... | 53 |
| Figura 24 – | RMN ¹³ C – 2-clorometilquinolina..... | 54 |
| Figura 25 – | RMN ¹³ C – LPSF/ZKD7..... | 55 |
| Figura 26 – | IV – LPSF/GQ208..... | 56 |
| Figura 27 – | IV – LPSF/ZKD6..... | 56 |
| Figura 28 – | Derivados quinolínicos com inibição IL-6 e TNF-γ..... | 61 |
| Figura 29 – | Derivados LPSF/ZKDs..... | 62 |
| Figura 30 – | Derivados LPSF/ZKDs..... | 64 |
| Figura 31 – | RMN ¹ H – GQ443..... | 78 |
| Figura 32 – | RMN ¹³ C – GQ443..... | 78 |
| Figura 33 – | Espectro do Infravermelho GQ443..... | 79 |
| Figura 34 – | MALDI-TOF/MS GQ443..... | 79 |
| Figura 35 – | RMN ¹ H – GQ208..... | 80 |
| Figura 36 – | RMN ¹³ C – GQ208..... | 80 |
| Figura 37 – | Espectro do Infravermelho GQ208..... | 81 |
| Figura 38 – | MALDI-TOF/MS GQ208..... | 81 |
| Figura 39 – | RMN ¹ H – GQ303..... | 82 |
| Figura 40 – | RMN ¹³ C – GQ303..... | 82 |
| Figura 41 – | Espectro do Infravermelho GQ303..... | 83 |
| Figura 42 – | MALDI-TOF/MS GQ303..... | 83 |
| Figura 43 – | RMN ¹ H – GQ296..... | 84 |
| Figura 44 – | RMN ¹³ C – GQ296..... | 84 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Figura 45 – | Espectro do Infravermelho GQ296..... | 85 |
| Figura 46 – | MALDI-TOF/MS GQ296..... | 85 |
| Figura 47 – | RMN ¹ H – GQ299..... | 86 |
| Figura 48 – | RMN ¹³ C – GQ299..... | 86 |
| Figura 49 – | Espectro de infravermelho GQ299..... | 87 |
| Figura 50 – | MALDI-TOF/MS GQ299..... | 87 |
| Figura 51 – | RMN ¹ H – GQ301..... | 88 |
| Figura 52 – | RMN ¹³ C – GQ301..... | 88 |
| Figura 53 – | Espectro de Infravermelho GQ301..... | 89 |
| Figura 54 – | MALDI-TOF/MS GQ301..... | 89 |
| Figura 55 – | RMN ¹ H – GQ307..... | 90 |
| Figura 56 – | RMN ¹³ C – GQ307..... | 90 |
| Figura 57 – | Espectro de Infravermelho GQ307..... | 91 |
| Figura 58 – | MALDI-TOF/MS GQ307..... | 91 |
| Figura 59 – | RMN ¹ H – GQ444..... | 92 |
| Figura 60 – | RMN ¹³ C – GQ444..... | 92 |
| Figura 61 – | Espectro de Infravermelho GQ444..... | 93 |
| Figura 62 – | MALDI-TOF/MS GQ444..... | 93 |
| Figura 63 – | RMN ¹ H – GQ445..... | 94 |
| Figura 64 – | RMN ¹³ C – GQ445..... | 94 |
| Figura 65 – | Espectro de Infravermelho GQ445..... | 95 |
| Figura 66 – | MALDI-TOF/MS GQ445..... | 95 |
| Figura 67 – | RMN ¹ H - 2-clorometilquinolina..... | 96 |
| Figura 68 – | RMN ¹³ C – 2-clorometilquinolina..... | 96 |
| Figura 69 – | RMN ¹ H – LPSF/ZKD2..... | 97 |
| Figura 70 – | RMN ¹³ C – ZKD2..... | 97 |
| Figura 71 – | Espectro de Infravermelho LPSF/ ZKD2..... | 98 |
| Figura 72 – | MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD2..... | 98 |
| Figura 73 – | RMN ¹ H – LPSF/ZKD4..... | 99 |
| Figura 74 – | RMN ¹³ C – LPSF/ZKD4..... | 99 |
| Figura 75 – | Espectro de Infravermelho LPSF/ZKD4..... | 100 |
| Figura 76 – | MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD4..... | 100 |
| Figura 77 – | RMN ¹ H – LPSF/ZKD5..... | 101 |
| Figura 78 – | RMN ¹³ C – LPSF/ZKD5..... | 101 |
| Figura 79 – | Espectro de infravermelho LPSF/ZKD5..... | 102 |
| Figura 80 – | MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD5..... | 102 |
| Figura 81 – | RMN ¹ H – LPSF/ZKD6..... | 103 |
| Figura 82 – | RMN ¹³ C – LPSF/ZKD6..... | 103 |
| Figura 83 – | Espectro de infravermelho LPSF/ZKD6..... | 104 |
| Figura 84 – | MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD6..... | 104 |
| Figura 85 – | RMN ¹ H – LPSF/ZKD7..... | 105 |
| Figura 86 – | RMN ¹³ C – LPSF/ZKD7..... | 105 |
| Figura 87 – | Espectro de Infravermelho LPSF/ZKD7..... | 106 |
| Figura 88 – | MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD7..... | 106 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|--------------|---|----|
| Esquema 1 – | Rota de síntese da TZD..... | 22 |
| Esquema 2 – | Rota de síntese da TZD..... | 23 |
| Esquema 3 – | Rota de síntese da TZD..... | 23 |
| Esquema 4 – | Rota de síntese da TZD..... | 23 |
| Esquema 5 – | Reação de Skraup – síntese de quinolina..... | 28 |
| Esquema 6 – | Reação de Friendlaender..... | 28 |
| Esquema 7 – | Causas, resultados fisiológicos e patológicos da inflamação..... | 30 |
| Esquema 8 – | Mediadores da inflamação derivados de fosfolípidios..... | 32 |
| Esquema 9 – | Mecanismo hipotético de reação da síntese de TZD..... | 48 |
| Esquema 10 – | Mecanismo hipotético da reação de condensação de Knoevenagel..... | 49 |
| Esquema 11 – | Mecanismo hipotético de N-alkilação..... | 50 |
| Esquema 12 – | Derivados quinolínicos com anéis nitrogenados com atividade anti-inflamatória..... | 65 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------|--|----|
| Quadro 1 – | Reagentes para síntese..... | 36 |
| Quadro 2 – | Compostos intermediários e seus respectivos aldeído.. | 38 |
| Quadro 3 – | Ensaio de otimização na síntese de TZD..... | 43 |
| Quadro 4 – | Resumo da síntese dos derivados 5-benzilideno-2,4- tiazolidinadionas | 44 |
| Quadro 5 – | Comparação do rendimento e ponto de fusão de outros estudos com derivados TZD..... | 45 |
| Quadro 6 – | Resumo da síntese dos derivados tiazoloquinolínicos..... | 46 |
| Quadro 7 – | Valores da média de viabilidade celular e desvio padrão em PBMCs dos compostos..... | 57 |
| Quadro 8 – | Valores em percentagem de inibição dos compostos em relação ao estímulo..... | 60 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 | OBJETIVOS..... | 16 |
| 1.1.1 | Geral..... | 16 |
| 1.1.2 | Específicos..... | 16 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 | MOLÉCULAS HÍBRIDAS..... | 17 |
| 2.1.1 | Núcleo tiazolidínico..... | 20 |
| 2.1.2 | Núcleo quinolínico..... | 25 |
| 2.2 | INFLAMAÇÃO..... | 28 |
| 2.2.1 | Sinais da inflamação..... | 29 |
| 2.2.2 | Mecanismo de resposta inflamatória – inflamação aguda e crônica..... | 29 |
| 2.2.3 | Citocinas da inflamação..... | 32 |
| 2.2.3.1 | Interleucina 6 - IL-6..... | 32 |
| 2.2.3.2 | Interleucina 17 - IL-17..... | 33 |
| 2.2.3.3 | Interferon- gama - INF- γ | 33 |
| 2.2.3.4 | Interleucina 10 - IL-10..... | 34 |
| 2.2.4 | Tratamento..... | 34 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 3.1 | PARTE QUÍMICA..... | 36 |
| 3.1.1 | Equipamentos e reagentes..... | 36 |
| 3.1.2 | Metodologia geral da síntese..... | 37 |
| 3.1.2.1 | Síntese de TZD..... | 37 |
| 3.1.2.2 | Síntese de 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona – compostos GQs. | 38 |
| 3.1.2.3 | Síntese das moléculas finais - Derivados tiazoloquinolínicos (LPSF/ZKDs)..... | 39 |
| 3.2 | PARTE BIOLÓGICA..... | 40 |
| 3.2.1 | Aspectos éticos..... | 40 |
| 3.2.2 | Seleção de voluntários e coleta de sangue..... | 40 |
| 3.2.3 | Isolamento das PBMCs..... | 40 |
| 3.2.4 | Ensaio de citotoxicidade..... | 40 |
| 3.2.5 | Cultura de Células para avaliação da inibição de citocinas.... | 41 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 3.2.6 | Dosagens de citocinas por ELISA..... | 42 |
| 3.2.7 | Análise estatística..... | 42 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1 | SÍNTESE QUÍMICA..... | 44 |
| 4.1.1 | Síntese de TZD..... | 44 |
| 4.1.2 | Síntese dos derivados 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona - compostos GQs..... | 44 |
| 4.1.3 | Síntese dos derivados Tiazoquinolínicos – compostos ZKDs..... | 46 |
| 4.2 | MECANISMO DE REAÇÃO..... | 47 |
| 4.3 | ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL..... | 50 |
| 4.4 | ATIVIDADE BIOLÓGICA..... | 57 |
| 4.4.1 | Ensaio de citotoxicidade..... | 57 |
| 4.4.2 | Ensaio de citocinas..... | 57 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 66 |
| 6 | PERSPECTIVAS..... | 66 |
| | REFERÊNCIAS..... | 67 |
| | ANEXO A – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 74 |
| | ANEXO B – ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL..... | 78 |
| | ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA..... | 107 |

1 INTRODUÇÃO

A química medicinal vem abordando moléculas híbridas como alternativa para síntese de novos compostos, baseado no conhecimento prévio, da existência de núcleos com determinadas atividades farmacológicas. Moléculas híbridas surgem da união de núcleos farmacofóricos para a formação de um novo composto com possível ação potencializada, diminuição do efeito colateral e toxicidade (MOHSIN; AHMAD, 2018).

Na literatura, encontram-se trabalhos com o núcleo quinolínico relacionado a atividade anti-fúngica, anti-inflamatória, anti-mutagênica, anti-tuberculosa (KUMAR, 2011; ABBAS, 2012; SANGANI, 2014; THOMAS, 2011). Assim como esse, o núcleo tiazolidínico também atende a diversas propriedades farmacológicas: hipoglicêmica, anticancerígena, anti-inflamatória, anti-microbiana (SUCHETA, 2018).

Levando em consideração o conceito de moléculas híbridas, os núcleos tiazolidínico e quinolínico, por compartilhar a atividade anti-inflamatória e compondo uma única estrutura molecular, poderá revelar promissoras moléculas anti-inflamatórias.

O núcleo de tiazolidinadiona (TZD) está presente em fármacos hipoglicemiantes, glitazonas, esses, atuam no receptor nuclear denominado receptor ativado por proliferador peroxissomal gama (PPAR γ), sendo encontrados em vários tecidos e tem um papel na regulação da homeostasia metabólica e inflamação (CARIOU; CHARBONNEL; STAELS, 2012). Estudos com derivados de TZD comprovam sua atuação no processo inflamatório. Ação observada a partir do teste de indução de edema da pata do rato, estando o melhor resultado de inibição próximo ao do medicamento padrão (RAJASHAKAR; NAGESWARRAO; ESWARAI AH, 2018).

Assim como na TZD, o núcleo quinolínico também interfere na cascata de reações que resulta na inflamação. Um trabalho de 2018, testou vários derivados quinolínicos, sendo constatada a ação anti-inflamatória desses, através do teste de indução do edema na pata do rato (CHAABAN et al., 2018). Em 2017, Sureshkumar *et al.* combinaram o núcleo quinolínico e tetracizol para a formação de um derivado híbrido resultando em um composto com atividade anti-inflamatória muito próxima ao de referência.

Encontrar trabalhos que corroboram com a hipótese de que moléculas híbridas, desses núcleos, podem desempenhar uma ação anti-inflamatória, aumenta a

probabilidade de sucesso dessa pesquisa. Por esse motivo, entender o processo da inflamação pode ser interessante para futuras pesquisas da via de atuação desses compostos.

A inflamação é um mecanismo de defesa contra patógenos, injúria tecidual e no controle homeostático (MEDZHITOV, 2018). Quando externo ao corpo, é possível observar características marcantes do processo inflamatório: edema e vermelhidão no local da inflamação. Fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir na cascata da inflamação, evitando desconforto ao indivíduo. As classes principais de medicamentos são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e glicocorticoides, que agem impedindo as enzimas ciclo-oxigenases e fosfolipase A₂, respectivamente (COUTINHO, 2009).

Entretanto, o uso desses medicamentos acompanha efeitos colaterais como: danos gastrointestinais, osteoporose, cardiovascular (BOZIMOWSKI, 2015; RHEN, 2005). A busca de novas moléculas com características farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas é o objetivo principal da comunidade científica, e nesse caso, com eficaz atividade anti-inflamatória. A inovação terapêutica pode ser responsável pela descoberta de fármacos com menos efeitos colaterais e de maior eficácia.

Não apenas estudos com derivados dos núcleos tiazolidínico e quinolínico, mais com híbridos desses grupos farmacofóricos com comprovada ação terapêutica anti-inflamatória instigaram a união desses dois núcleos, TZD e quinolínico. Com base nesse conhecimento prévio, o presente estudo, até o momento da sua elaboração, é pioneiro na síntese de híbridos moleculares tiazoloquinolínicos, referente a união do grupo TZD e quinolínico, e seu possível envolvimento na modulação de citocinas envolvidas na cascata de reação inflamatória.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Desenvolvimento de novas moléculas híbridas com promissora atividade moduladora de citocinas.

1.1.2 Específicos

- ✓ Planejamento, síntese e caracterização físico-química de cinco novos derivados tiazoloquinolínicos;
- ✓ Elucidação estrutural das moléculas sintetizadas a partir das técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN¹H e ¹³C) e espectrometria de massa (HPLC-MS);
- ✓ Avaliação *in vitro* do papel dos derivados tiazoloquinolínicos em inibir a produção das citocinas IL-10, IL-6, IL-17 e IFN- γ em culturas de PBMCs provenientes de voluntários sadios após estimulação com CD3/CD28.

2 REVISÃO DA LITERATURA

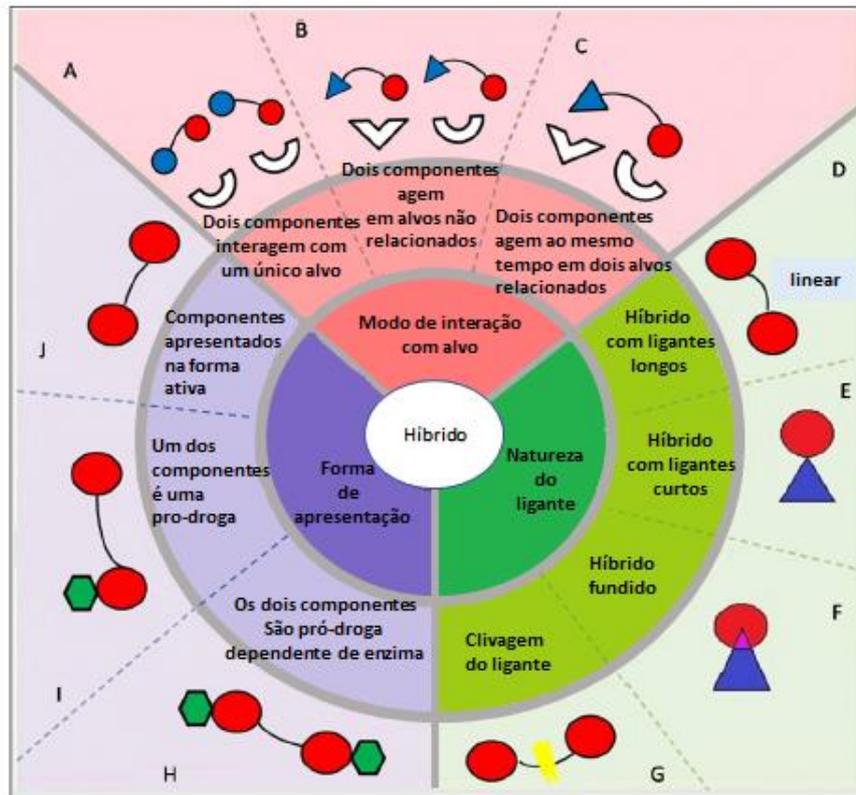
2.1 MOLÉCULAS HÍBRIDAS

A intensa busca de moléculas menos tóxicas, menos dispendiosas e mais eficientes na área de química medicinal tem focado em moléculas híbridas. As moléculas híbridas surgem dos conhecidos grupos farmacofóricos de fármacos e/ou moléculas com determinada ação farmacológica. Na literatura, as definições de híbrido molecular são muito parecidas, podendo uma complementar a outra, e na tentativa de um conceito mais abrangente, define-se como: uma nova entidade química com dois ou mais grupos farmacofóricos, de ação farmacológica diferentes ou não e unidos por ligações covalentes entre ligantes ou diretamente entre si (CHOUHDARY *et al.*, 2018; SRIVASTAVA; LEE, 2015).

As diferentes estratégias de síntese de um composto híbrido podem classificá-los com base (AGARWAL; GUPTA; AWASTHI, 2017):

- **Natureza do ligante** (figura 1): nesse caso, existe uma outra estrutura linear ou cíclica ligando os farmacóforos, podendo ser clivada ou não. Além dessas, as unidades principais podem também se aproximar ou se sobrepor para formação do novo composto.
- **Modo de interação dos grupos farmacofóricos-alvo** (figura 1): pode haver três formas de interação, a primeira quando o alvo é o mesmo para ambos grupos farmacofóricos; a outra, quando são alvos diferentes, com interação em momentos diferentes e por fim, quando a interação ocorre com alvos diferentes ao mesmo tempo.
- **Forma de apresentação do híbrido** (figura 1): este grupo de híbrido pode apresentar: (i) um dos componentes sendo uma pro-droga; (ii) ambos estão na forma ativa e (iii) quando os dois componentes são pró-droga.

Figura 1 – Classificação dos compostos híbridos



FONTE: AGARWAL; GUPTA;AWAARSTHI, 2017 - adaptado

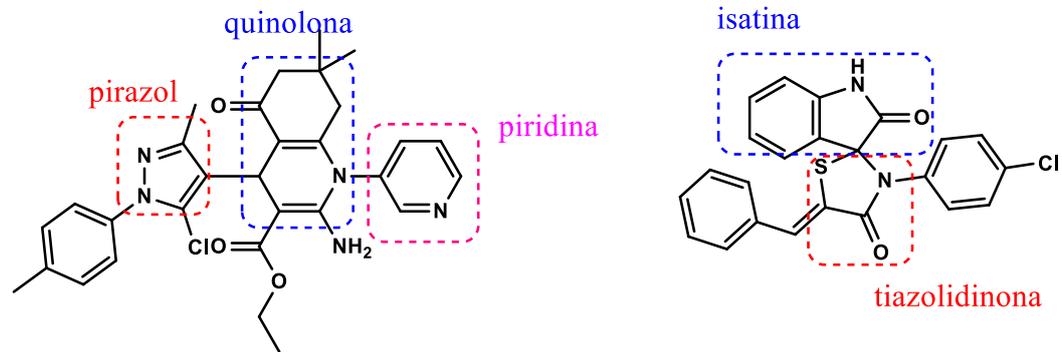
Scaffolds químicos ativos unem-se, justificável ou viabilizavelmente, na tentativa de modificar propriedades físico-químicas para uma melhor atuação. Como exemplo, uma molécula pode ter seu potencial melhorado ao conjugar-se a outra mais lipossolúvel, interferindo na solubilidade do todo, deixando o complexo mais permeável a célula.

Agarwal *et al.* (2017) abordam que as vantagens das moléculas híbridas podem ser refletidas em mudanças na solubilidade, farmacocinética, estabilidade do composto, sinergismos na atividade farmacológica, ou até mesmo, a possibilidade em atuar em vários estágios da doença, quando a mesma possuir. Esses autores durante todo o artigo trazem exemplos de trabalhos com híbridos antimaláricos, mas que no contexto geral, pode-se aplicar a moléculas que atuam em qualquer enfermidade.

Existem trabalhos que citam a atividade de moléculas híbridas como agentes anti-fúngicos, anti-maláricos, anti-cancerígeno, anti-inflamatório. Nesses, observa-se o leque de possibilidades permissíveis e com bons resultados na ligação entre unidades químicas ativas como: triazol, quinolina, imidazol, quinolona, pirazol, isatina, piperazinil, quinazolina (MISHRA; SINGH, 2016), o que favorece a proposta de hibridização molecular desse trabalho. A seguir, selecionaram-se algumas moléculas

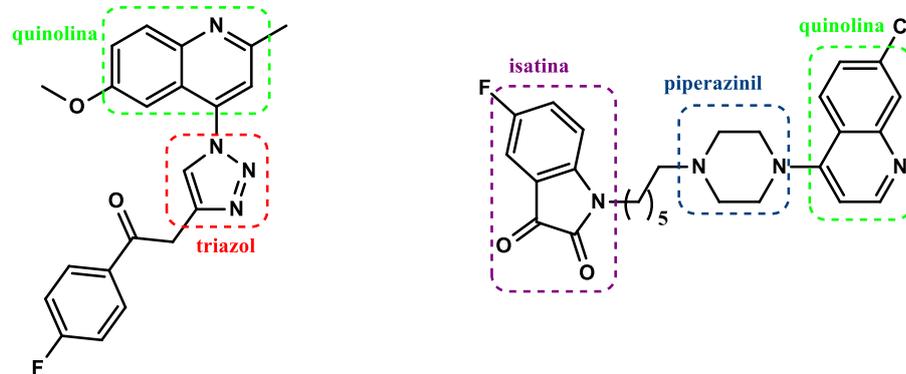
híbridas com ênfase nos núcleos quinolínicos e azóis, identificando suas respectivas atuações.

Figura 2 – Híbrido de ação anti-mutagênica



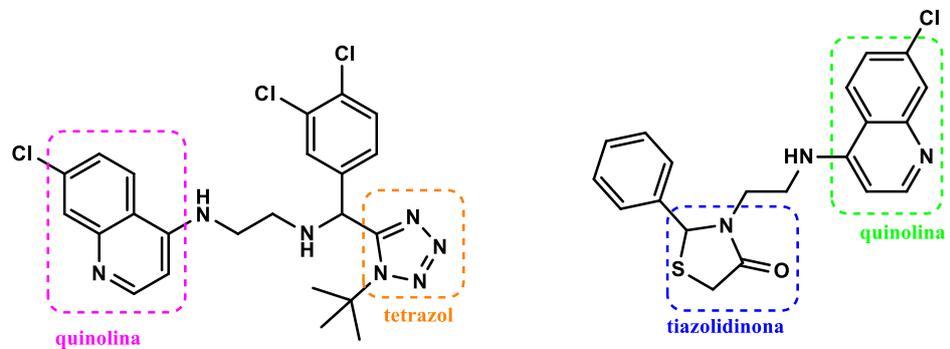
FONTE: (KAMINSKY et al., 2011; SANGANI et al., 2014)

Figura 3 – Híbrido de ação anti-tuberculosa



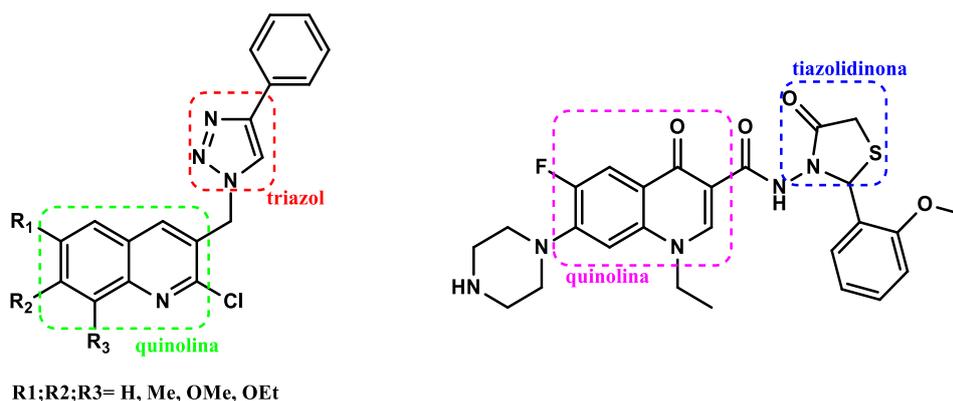
FONTE: (RAJ et al., 2014; THOMAS et al., 2011)

Figura 4 – Híbridos de ação anti-malária



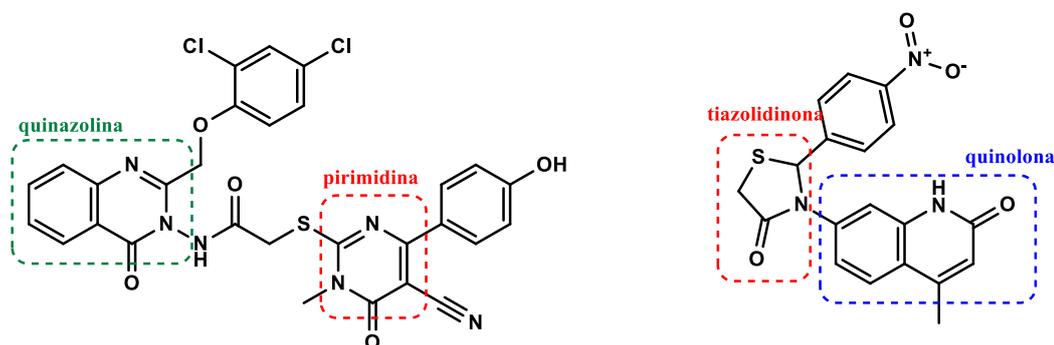
FONTE: (ROJAS et al., 2011; TUKULULA et al., 2013)

Figura 5 – Híbridos de ação anti-fúngica



FONTE:(KATEGAONKAR et al., 2010; KUMAR et al., 2011)

Figura 6 – Híbridos de ação anti-inflamatória



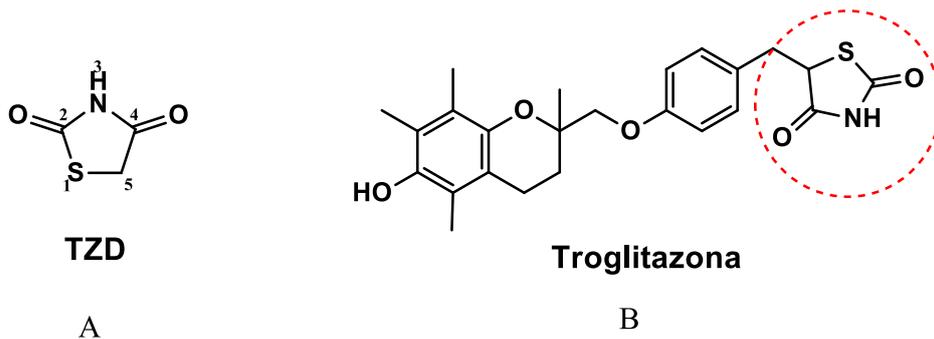
FONTE:(ABBAS et al., 2012; KUMAR et al., 2013)

Dentre os núcleos ativos nitrogenados no esqueleto de moléculas híbridas, observam-se os quinolínico, tiazolidinadiona (azol) e seus derivados, como apresentado nas moléculas acima. Esses núcleos têm as mais variadas ações farmacológicas, e dentre muitas, possuem em comum a ação anti-inflamatória.

2.1.1 Núcleo tiazolidínico

A tiazolidina-2,4-diona (TZD) (Figura 7A) é uma molécula heterocíclica que possui uma extensa variedade de derivados com as mais diversas atividades farmacológicas que compreendem: hipoglicemiante, anti-neoplásica, anti-inflamatória, dentre outras. Embora seu primeiro alvo na pesquisa tenha sido a tuberculose, em 1954, foi seu êxito com um derivado hipoglicemiante, uma glitazona (Figura 7B), que conseguiu a aprovação da *Food and Drug Administration* – FDA – em 1997 (CHADHA et al., 2015).

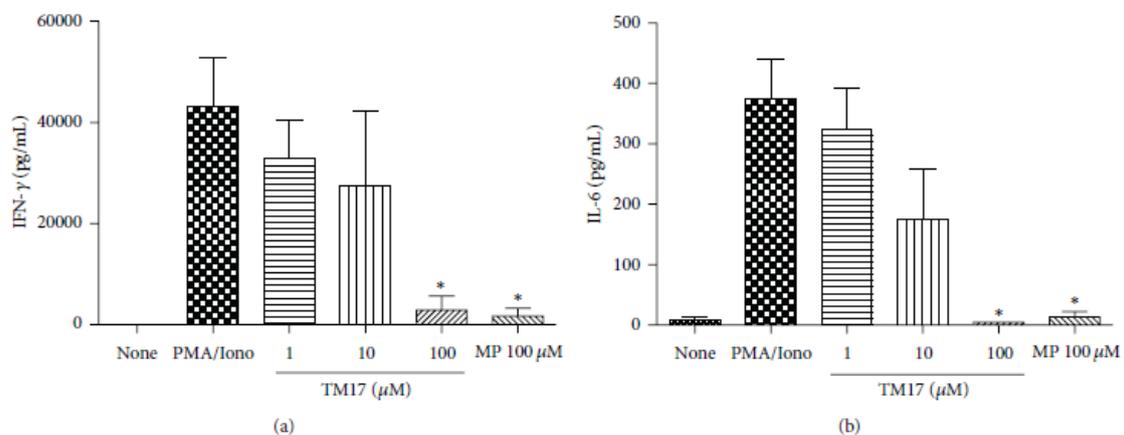
Figura 7 – Tiazolidina-2,4-diona e seu derivado glitazona

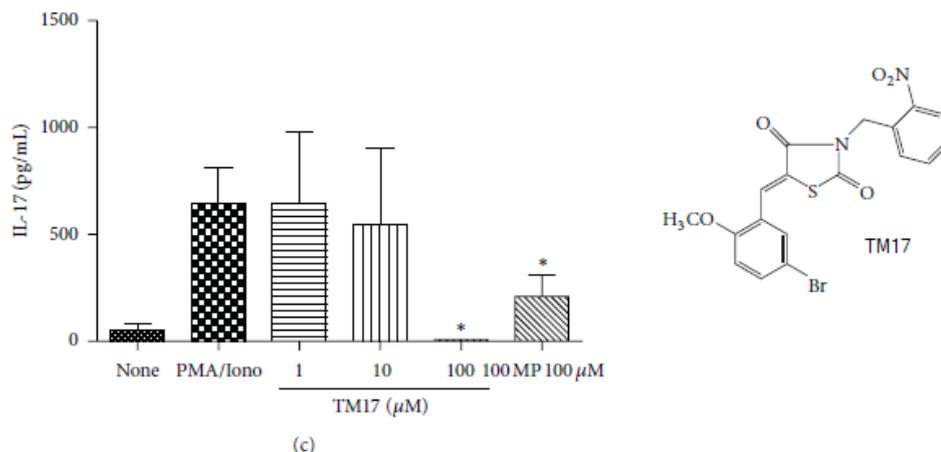


FONTE: CHADHA, 2015.

A TZD é agonista do receptor ativado por proliferador peroxissomal (PPAR). A ação hipoglicemiante dessa molécula está relacionada a sua ligação ao subtipo PPAR γ (CARIOU; CHARBONNEL; STAELS, 2012), que embora seja a ação farmacológica mais bem pesquisada, esse receptor nuclear está também envolvido na resposta inflamatória, pois observou-se um aumento da expressão desses, durante a diferenciação de monócitos a macrófagos devido a fatores pró-inflamatórios (GIAGINIS; GIAGINI; THEOCHARIS, 2009). Para endossar tal afirmação, estudo com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis (figura 8) e pacientes AR mostrou que um análogo da TZD (TM17) diminui a secreção de citocinas IL-22, IL-6, IFN γ e IL-17 envolvidas na via de sinalização do processo inflamatório, assim como a expressão de mRNA do PPAR γ (FERREIRA et al., 2013).

Figura 8 – Imunomodulação do análogo de TZD em PBMCs de indivíduos saudáveis





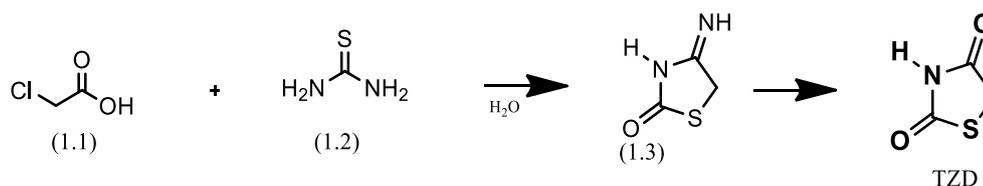
* $P < 0,05$; $n = 9$

FONTE: FERREIRA et. al., 2013.

Outro possível mecanismo de ação dos derivados tiazolidínicos, como agente anti-inflamatório, pode estar relacionado a sua inibição na COX-2. Ali e colaboradores em seu trabalho em 2007, com derivados tiazolidínicos, determinou resultados não significativos de injúria gástrica, através do teste ulcerativo em ratos, a partir desse resultado, infere-se o envolvimento da molécula na inibição de COX-2. Adicionado, a um estudo de *docking* com tal enzima, obteve-se uma alta seletividade de alguns compostos para a mesma. Esse estudo pode corroborar na possível atuação dos derivados tiazolidínicos na ciclo-oxigenase.

A síntese do núcleo de TZD pode ser realizada por diferentes vias como descrito por Chadha e colaboradores em 2015. O esquema 1 representa a via mais descrita em trabalhos. A síntese inicia com a reação entre o ácido cloroacético (1.1) e a tiourea (1.2), formando o intermediário 2-imino-4-tiazolidinona (1.3), em refluxo, após 12h de reação, a 100-110°C, obtém-se a TZD. Esta mesma reação pode ser realizada usando a técnica assistida por micro-ondas, onde a primeira etapa ocorre em baixa temperatura, enquanto que no segundo momento o intermediário recebe a radiação por 5 minutos, a 250W, obtendo assim, os cristais.

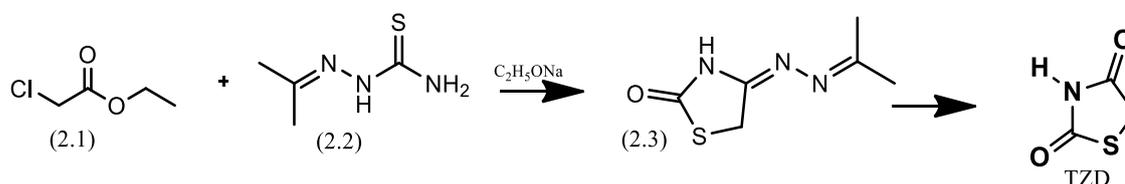
Esquema 1 – Rota de síntese da TZD



FONTE: CHADHA, et. al., 2015.

O segundo esquema conduz a síntese de TZD a partir da reação entre o éster ácido cloroacético (2.1) com a tiosemicarbazona de acetona (2.2) que na presença do etóxido de sódio, forma o intermediário 2-hidrazino-4-tiazolidinona (2.3), este reage com ácido clorídrico diluído, em refluxo, para obter o produto final.

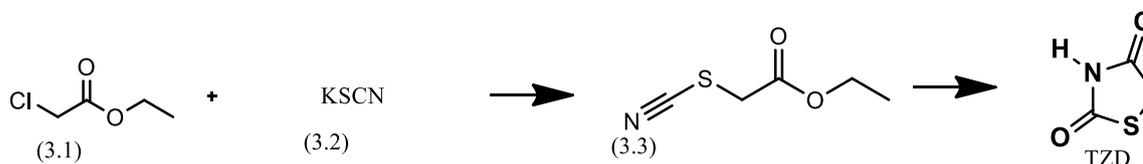
Esquema 2 – Rota de síntese de TZD



FONTE: CHADHA, et. al., 2015.

No esquema 3, o etilcloroacetato (3.1) reage com o tiocianato de potássio (3.2) para obtenção do 2-tiocianatoacetato de etila (3.3) e na presença do ácido clorídrico diluído formará a TZD.

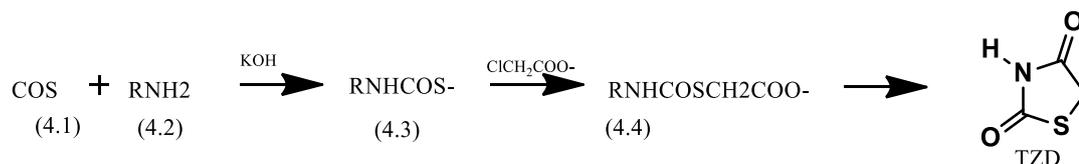
Esquema 3 – Rota de síntese de TZD



FONTE: CHADHA, et. al., 2015.

Por fim, no esquema 4, o tiocarbamato de alquila (4.3) é obtido a partir da reação entre o sulfeto de carbonila (4.1) e a amina primária (4.2) na presença do hidróxido de potássio. Entretanto esta síntese tem mais uma etapa onde o tiocarbamato de etila (4.3) reage com ácido α -haloalcanoico para formar o tiolcarbamato (4.4), o qual sofrerá ciclização para obtenção do núcleo de TZD.

Esquema 4 – Rota de síntese de TZD

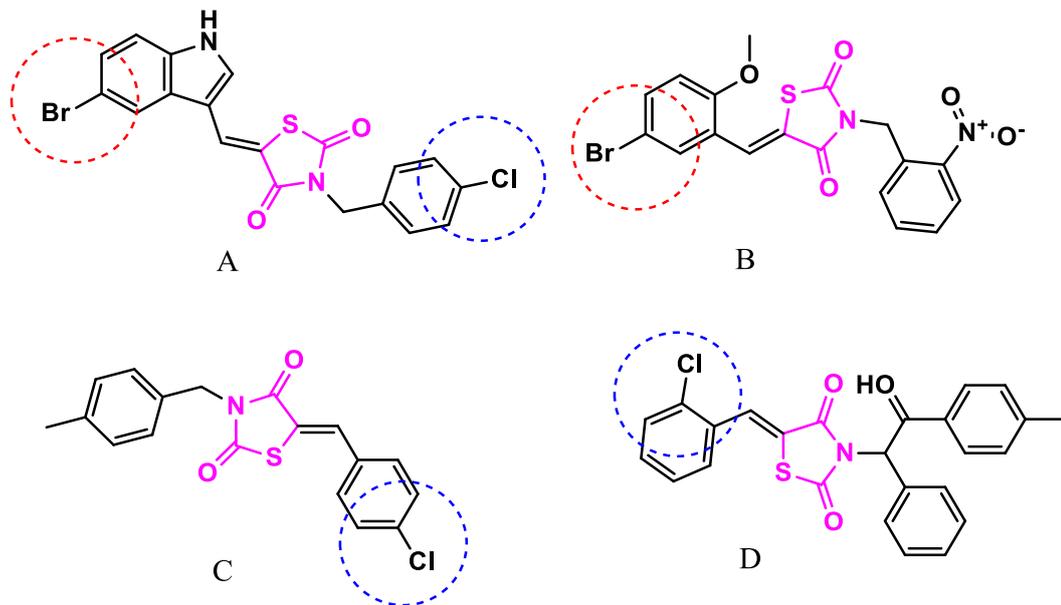


FONTE: CHADHA, et. al., 2015.

A partir do núcleo da TZD é possível formar derivados e compostos híbridos através do metileno da posição 5 ou do -NH presente na posição 3 do anel

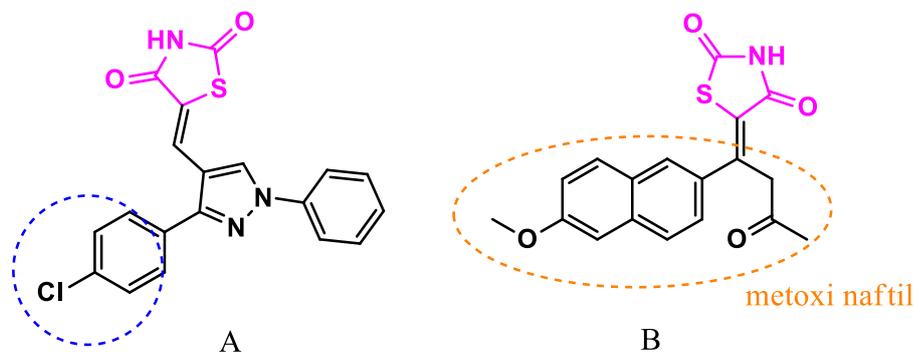
tiazolidínico, dessa forma mantém-se o núcleo íntegro (CHADHA *et al.*, 2015). Na literatura, a atividade anti-inflamatória de alguns compostos foram avaliados pelos níveis de expressão dos genes COX-2, IL-6 (figura 9A), TNF, IL-1 β (figura 9B), pIKB α (figura 9C), ou pelo efeito protetor no teste de edema da pata do rato induzido por carragenina (figura 9D). Todos apresentaram resultados de inibição, atribuindo um efeito anti-inflamatório aos compostos.

Figura 9 – Derivados da tiazolidinadiona com substituintes nas posições 3 e 5 do anel da TZD - ação anti-inflamatória



FONTE: A (CÉSAR *et al.*, 2015); B (FERREIRA *et al.*, 2013); C (GABRIELLE *et al.*, 2016); D (ALI *et al.*, 2007).

Figura 10 – Derivados da tiazolidinadiona com substituintes na posição 5 do anel da TZD – ação anti-inflamatória



FONTE: A (RAJASHAKAR; NAGESWARRAO; ESWARAI AH, 2018) ; B (PRABHAKAR *et al.*, 1998)

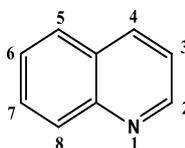
Diferentes dos compostos da figura 9, os derivados da figura 10 apenas o metileno da posição 5 foi o responsável pela diferenciação dos compostos, que

também apresentam atividade anti-inflamatória. Destacam-se nos compostos as semelhanças do uso de substituintes halogenados (figura 9 e 10A) ligados ao anel aromático e na figura 10B, o metoxi naftil, lembra o anel quinolínico, além da presença do anel da TZD, presente neste fármaco Nabumetona, considerado um AINE, reforçando a probabilidade de derivados tiazolidinadiona em possuir a atividade esperada.

2.1.2 Núcleo quinolínico

O núcleo da quinolina (Figura 11) corresponde a fusão entre os anéis benzeno e piridina. Seu peso molecular é 129,16g/mol, fórmula molecular C_8H_7N e o valor do $\log P$ é 2.04 (MARELLA et al., 2013).

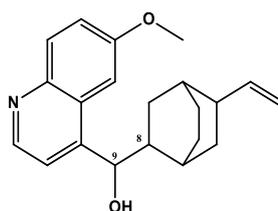
Figura 11 – Anel quinolínico



FONTE: MORELLA et. al., 2013.

Alguns compostos naturais possuem em sua estrutura o anel quinolínico e dentre os metabólitos, os alcaloides são os representantes desse grupo farmacofórico. Outrora, a infusão de partes das plantas, com conseqüente extração dos metabólitos, servia de medicamento para combater enfermidades (FIRMO et. al., 2011). Por esse motivo, por muito tempo, utilizou-se o extrato da casca da árvore Cinchona, para combater a febre dos doentes com malária, sendo mais tarde isolada, desse extrato, a quinina (Figura 12) (SINGH; SINGH, 2014).

Figura 12 – C8S;C9R - Quinina



FONTE: SINGH; SINGH, 2014.

A resistência à quinina desenvolvida pelo *Plasmodium sp.*, agente etiológico da malária, levou a busca de novos agentes antimaláricos, resultando na descoberta de

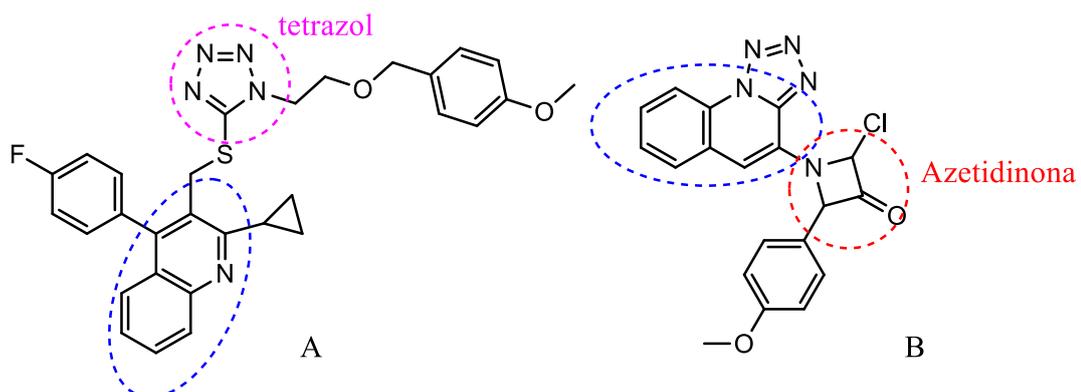
novas drogas, como a cloroquina utilizada na clínica (VANDEKERCKHOVE; MATTHIAS, 2015). Entretanto, esse fármaco não se limitou a agente antimalárico. Um artigo que descreve o uso do antimalárico, mepacrine, em 18 pacientes com lúpus, havendo dois, que estavam acometidos com AR simultaneamente, apresentou melhora em ambas as enfermidades, esse relato instigou o interesse de antimaláricos no tratamento da AR (PAGE, 1951).

A ação anti-inflamatória como MMCD dos antimaláricos, mais precisamente a cloroquina e hidroxicloroquina, envolve sua relação direta na inibição de enzimas lisossomais pelo aumento do pH. Esta conduta pode ser a principal via de inibição dos processos imunológicos, relacionados ao ambiente inflamatório, como: apresentação de antígenos, ativação celular, mediadores inflamatórios (HAŁADYJ et al., 2018).

Assim como o núcleo tiazolidinadiona, os compostos quinolínicos abarcam uma variedade de atividades farmacológicas, sendo possível encontrar exemplos com atividade antiviral, antimicrobiana, analgésica, hipoglicêmica, anti-inflamatória.

Dando preferência a atividade anti-inflamatória do núcleo farmacofórico em questão, existem na literatura vários exemplos de moléculas híbridas capazes de inibir a inflamação. Em 2017, Sureshkumar *et. al.* sintetizaram um híbrido de quinolina com tetrazol (Figura 13A), o qual apresentou atividade inibitória (74,58%) próxima ao do medicamento de referência - diclofenaco de sódio (93,46%). Outra molécula híbrida da quinolina, a azetidionona - (Figura 13B), apresentou resultado semelhante, com inibição 60,32%, ao anterior utilizando como padrão (61,41%) a mesma droga (GUPTA; MISHRA, 2016). Embora esses compostos apresentem atividade anti-inflamatória, seus valores não podem ser comparados entre si, pois utilizou-se metodologias diferentes para avaliar a atividade.

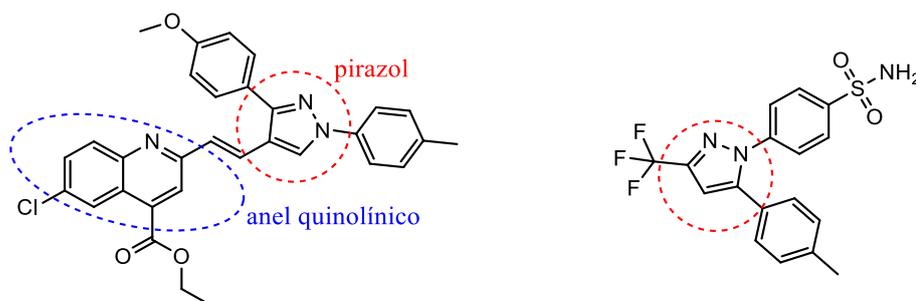
Figura 13 – Híbrido com atividade anti-inflamatória



Os AINEs são uma classe de medicamentos muito utilizados para combater a inflamação e tem o diclofenaco como exemplo, o uso contínuo dessa classe é responsável por efeitos gastro-intestinais indesejáveis. A descoberta de novas drogas, coxibes, capazes de superar esse efeito devido a sua alta seletividade pela COX-2, enzima que interfere na cascata de síntese dos mediadores da resposta inflamatória, instigou a pesquisa de novas drogas cada vez mais com mecanismo de ação específico, direcionado (TSUJIMOTO et al., 2018).

No intuito de obter seletividade para a COX-2, mas sem o efeito adverso cardiovascular relacionado aos coxibes, novos derivados quinolínicos sintéticos hibridizado com o anel pirazol foram avaliados. O híbrido com o *p*-metoxifenil ligado ao anel pirazol (Figura 14) foi o que apresentou um resultado mais promissor quando comparado ao medicamento padrão, celecoxibe (Figura 14). O celecoxibe é um anti-inflamatório seletivo COX-2 que possui um anel pirazol em sua estrutura, o qual permanece juntamente com o metilbenzil nas moléculas híbridas (CHAABAN et al., 2018).

Figura 14 – Compostos com atividade anti-inflamatória



Derivado quinolínico - apresentou atividade inibitória de 86% após 4h da aplicação no ensaio de edema da pata do rato induzido por formalina.

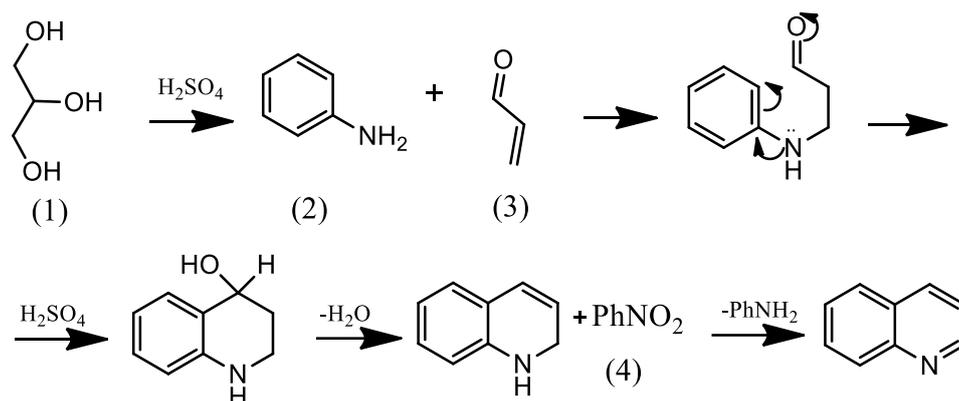
Celecoxibe - no mesmo ensaio do derivado quinolínico (molécula ao lado) apresentou 66% de atividade inibitória.

FONTE: CHAABAN, et. al., 2018.

A obtenção do núcleo quinolínico é possível a partir da Síntese de Friedlaender e Síntese de Skraup, entretanto, pode-se sintetizar o anel quinolínico com algumas substituições, através das mais variadas reações, como Síntese de Doebner-Miller, Knorr, Pfitzinger, Combes (JOSHI et al., 2016).

A síntese de Skraup (Esquema 5) ocorre entre glicerol (1), ácido sulfúrico e o aminobenzeno (2) aquecidos. O ácido sulfúrico desidrata o glicerol para síntese da acroleína (3), *in situ*, a qual reagirá com a amina para a formação do segundo anel aromático, na presença de uma agente oxidante (4), formando o núcleo quinolínico (YAMASHKIN; ORESHKINA, 2006).

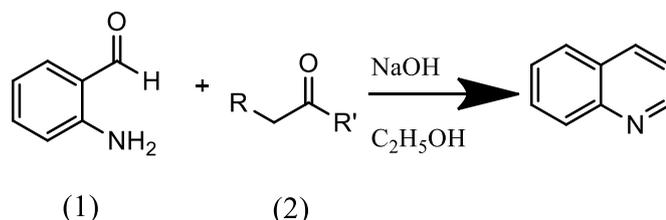
Esquema 5 – Reação de Skraup – síntese de quinolina



FONTE: YAMASHKIN; ORESHKINA, 2006.

Friedlaender sintetizou a quinolina utilizando 2-aminoaril cetona ou aldeído (1) com α -metileno cetona (2) na presença de um hidróxido de sódio (Esquema 6). Entretanto, a mudança para um catalizador ácido nessa síntese, resulta na formação de quinolina substituída (SOLEIMANI et al., 2010).

Esquema 6 – Reação de Friedlaender



FONTE: JOSHI et al, 2016.

A existência dos exemplos na literatura envolvendo os núcleos tiazolidínico e quinolínico com atuação anti-inflamatória inspirou a síntese dos híbridos tiazoquinolínicos. Por esse motivo, entender o processo da cascata inflamatória para investigações futuras de possíveis alvos e dedução do mecanismo de ação desses híbridos é imprescindível.

2.2 INFLAMAÇÃO

O corpo humano, ao sofrer com injúria física e infecção, ativa um mecanismo de defesa conhecido como inflamação. A cascata da inflamação é desencadeada no intuito de eliminar o problema, reparar o tecido e estabelecer a homeostase (FOUGÈRE, 2017).

Entretanto, Antonelli e Kushner em seu trabalho de revisão de 2017, explana a necessidade de uma definição mais abrangente, quanto ao gatilho desse mecanismo de defesa. Para tal, pontuam que a gota e doenças autoimunes não estão envolvidas com injúria física e nem infecciosa, mas que mesmo assim, desencadeiam a cascata inflamatória. Sendo assim, propõem-se uma nova definição: “Inflamação é a resposta imune inata a um estímulo prejudicial tal como patógenos, injúria e estresse metabólico.”

O processo inflamatório apresenta cinco sinais descritos na literatura e dois desses, podem ser observados sem aparato visual.

2.2.1 Sinais da inflamação

O cientista Aulus Cornelius Celsus que viveu aproximadamente entre 25 a.C. - 50 d.C., documentou que o tecido responde a estímulos prejudiciais através de quatro sinais marcantes: (1) *tumor*, (2) *rubor*, (3) *calor* e (4) *dolor*. Esses sinais estão intimamente ligados a processos fisiológicos pertinentes a cascata da inflamação: aumento da permeabilidade microvascular, hiperemia, o aumento do fluxo sanguíneo e atividade metabólica dos mediadores celulares e terminações nervosas associadas a vasos, respectivamente (LIBBY, 2007).

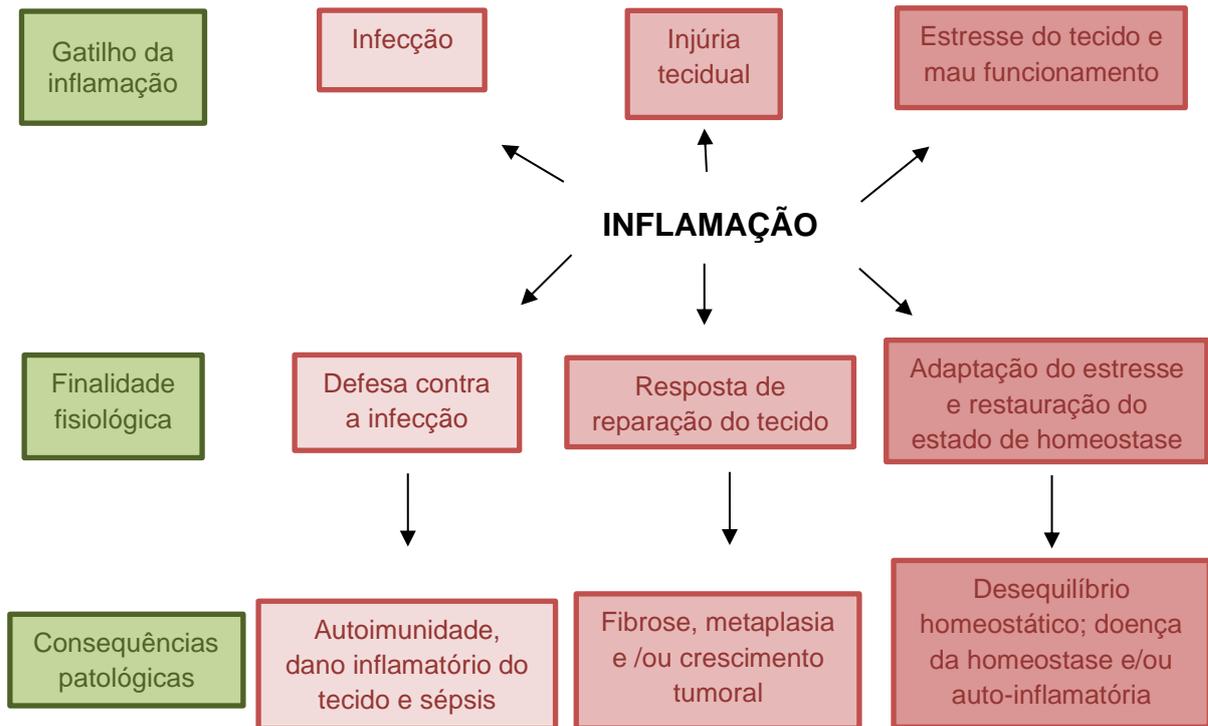
Functio laesa é o quinto sinal descrito por Rudolf Virchow (1821-1902), “pai” da patologia moderna, na década de 1850, que compreende a disfunção do órgão envolvido (LIBBY, 2007; ANTONELLI; KUSHNER, 2017).

Esses sinais se expressam após o aparecimento do “gatilho” inflamatório. A nível celular, mediadores celulares, monócitos e macrófagos, são ativados. Essas células secretam os mediadores moleculares, citocinas, responsáveis pela atuação em outras células e processos que promovem a homeostase (FOUGÈRE, 2017).

2.2.2 Mecanismo da resposta inflamatória – inflamação aguda e crônica

A inflamação responde de forma fisiológica quando inflamação aguda, mas também patológica quando, crônica. Essa última é estabelecida quando a inflamação aguda não consegue eliminar o problema. O esquema 7, mostra de forma generalizada, a atuação do processo inflamatório em respostas fisiológica e patológica relacionadas ao estímulo.

Esquema 7 – Causas, resultados fisiológicos e patológicos da inflamação



FONTE: MEDZHITOV, 2008.

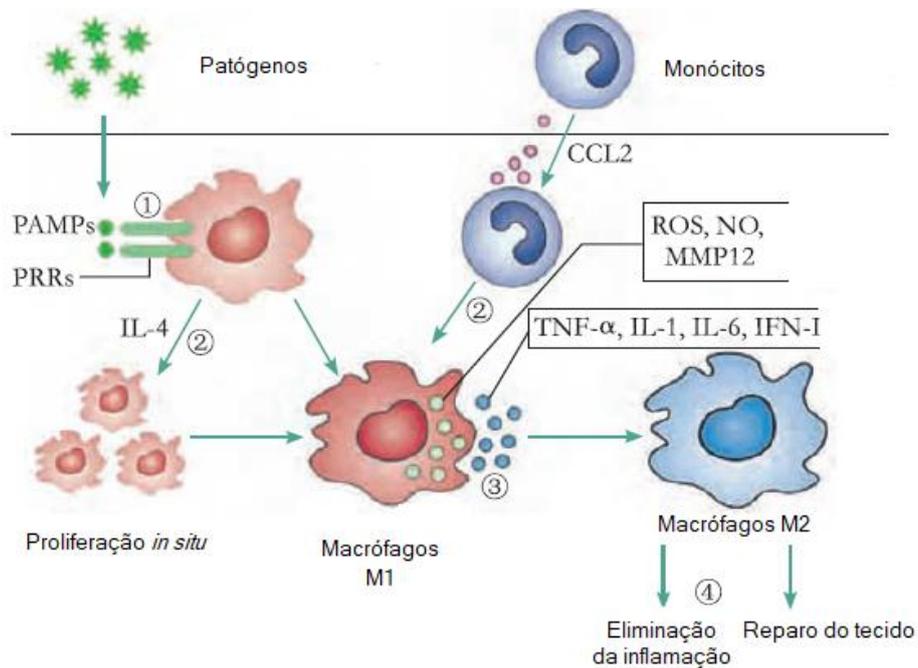
No processo celular, a resposta inflamatória independente do estímulo inicial e compartilha um mecanismo comum que compreende as seguintes etapas: o reconhecimento do estímulo prejudicial por receptor padrão de superfície celular; ativação da via inflamatória; liberação de marcadores da inflamação e recrutamento de células inflamatórias (CHEN, 2018).

As células imunes ou não possuem receptores de reconhecimento padrão codificados por linha germinativa (PRRs), esses são ativados através do padrão molecular associado a patógeno (PAMPs) e padrão molecular associado ao dano (DAMPs). O receptor *Toll-like* (TLR), uma classe de PRR, quando ativado, inicia a cascata de sinalização intracelular que pode levar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-6, IL-1 β) e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, monócitos, linfócitos e mastócitos) (LIBBY, 2007; CHEN, 2018).

A figura 15 mostra a atuação do macrófago e monócito na presença de patógenos e sua via de sinalização: 1 - o reconhecimento de PAMP pelo macrófago; 2 - o recrutamento de mais células (em resposta a CCL2) e proliferação celular (desencadeada por IL-4); 3 - diferenciação celular a macrófagos inflamatórios e 4 –

diferenciação celular a macrófagos anti-inflamatório. As via 3 e 4 são estabelecidas por atuação de diferentes citocinas. Todo o processo, quando promissor, resulta na eliminação do problema e reparo tecidual.

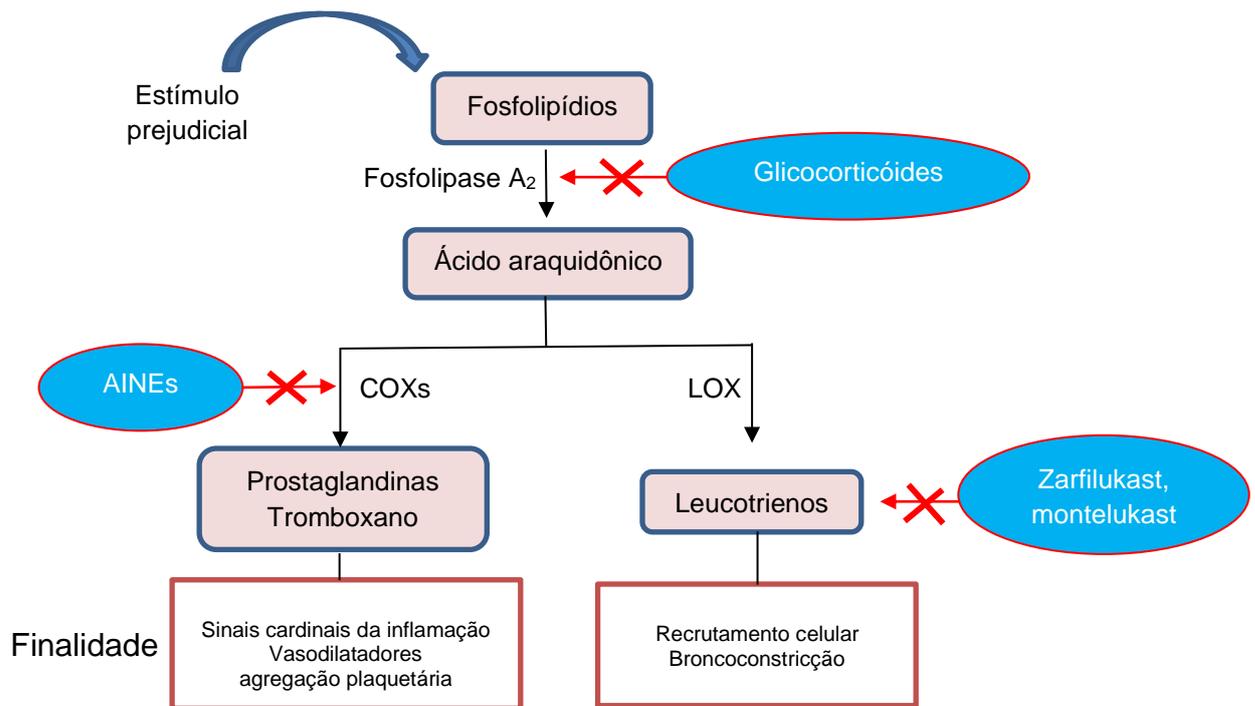
Figura 15 – Reconhecimento do patógeno pelo macrófago e via de sinalização



FONTE: ZHANG; WANG, 2014.

Outros mediadores da inflamação também podem ser produzidos a partir de estímulo físico ou através de outros mediadores: os eicosanoides. Esses são sintetizados pela via metabólica do ácido araquidônico. A fosfolipase A₂ atua nos fosfolípidios das membranas celulares liberando o ácido araquidônico, o qual é metabolizado por duas principais enzimas: ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase (LOX). Essas enzimas atuam na síntese dos principais eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (COUTINHO, 2009; RANG, 2003). O esquema 8 descreve de forma geral a síntese desses mediadores e os alvos de atuação das principais linhas de tratamento.

Esquema 8 – Mediadores da inflamação derivados de fosfolipídios



FONTE: RANG, 2003, Adaptado; DENNIS; NORRIS, 2015.

Essas vias de sinalização podem ser insuficientes para eliminação do patógeno, reparo do tecido ou retorno da homeostase, resultando na inflamação crônica característica de várias doenças: cardiovascular, aterosclerose, diabetes tipo 2, artrite reumatoide e câncer (SUGIMOTO, 2016). O desenvolvimento da inflamação nos órgãos relacionados a essas doenças inicia-se, como uma inflamação aguda, que a depender do grau do dano ao órgão e permanência do estímulo prejudicial, passa a uma inflamação crônica (CHEN, 2018).

A cascata da inflamação e a perpetuação da mesma se deve ao trabalho em conjunto, de células e citocinas. As citocinas são classificadas em dois grandes grupos, quanto a sua atuação, em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

2.2.3 Citocinas da inflamação

2.2.3.1 Interleucina 6 - IL-6

A citocina IL-6, considerado uma citocina pró-inflamatória, no indivíduo saudável, realiza a imunorregulação de células T e B, sendo responsável pela diferenciação de células T naives, inibição de células T regulatória e pela interferência na secreção de imunoglobulinas, fatos que corroboram com o seu envolvimento no

processo inflamatório.

Nas patologias que desencadeiam a inflamação, além do seu envolvimento com as células do sistema imune, essa citocina age também em células endoteliais, sinoviócitos, osteoclastos e induz a produção de proteínas de fase aguda da inflamação, a proteína-C reativa (NOACK; MIOSSEC, 2017).

2.2.3.2 Interleucina 17 - IL-17

As células T_{H17} em condições fisiológicas tem a função de proteger as superfícies do epitélio e da mucosa contra infecções causadas por fungos e bactérias. Estudo em ratos deficientes em IL-17, com a pele comprometida por *Candida albicans* obteve melhora quando administrado IL-17A, assim como essa deficiência aumenta a susceptibilidade a infecções *Staphylococcus aureus* (BERINGER; NOACK; MIOSSEC, 2016).

A família da IL-17 compreende seis citocinas: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. As IL-17A e IL-17F têm funções similares, são geneticamente semelhantes e expressão receptores de superfície IL-23R. A IL-17A/F são responsáveis pelo recrutamento, ativação e migração de neutrófilos e podem atuar em células não imunes como, fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas das vias aéreas e células epiteliais (MADDUR, 2012). As IL-17B, IL-17C e IL-17D são classificadas como pró-inflamatórias, mas seu papel no processo inflamatório ainda não foi esclarecido (BERINGER, 2016).

Em condições patológicas, as T_{H17} são consideradas fundamentais no desenvolvimento de doenças inflamatória autoimunes. A IL-23 estimula células T_{H17} a secretar IL-17 (PARADOWSKA-GORYCKA; HALADYJ, 2015), assim como o trabalho em conjunto de IL-6 e o fator de crescimento de transformação (TGF- β) (SCHINNERLING, 2017).

2.2.3.3 Interferon- gama - INF- γ

O interferon- γ (IFN- γ) é uma proteína secretada por células T_{H1} , células apresentadoras de antígenos (APC), células B. É responsável pela ativação de macrófagos, atua em APC, na diferenciação de células T e aumenta o tráfego de leucócitos para o local da inflamação. Os macrófagos ativados por IFN- γ respondem com maior eficiência frente a lipopolissacarídeos ou a DNA de bactéria. O envolvimento de IFN- γ em APC, relaciona-se ao aumento da expressão do complexo de histocompatibilidade maior tipo II (MHC-II), envolvido na resposta imune de auto-

antígeno. As células T *naives* reconhecem o complexo MHC/antígeno e se diferencia em um dos tipos de células T, dependente da prevalência de citocinas no ambiente (SCHURGERS; BILLIAU; MATTHYS, 2011).

Existem dois tipos de interferon, o tipo 1 composto por IFN- α e IFN- β e o tipo 2 formado apenas pelo IFN- γ . Os IFN- γ e IFN- β possuem funções opostas, o primeiro, responsável por estimular a inflamação enquanto que o segundo, possui propriedade anti-inflamatória. Embora o IFN- γ iniba a diferenciação de células T_{H17} e T_{H2}, o tratamento com recombinante IFN- γ em estudos com pacientes AR não apresentou resultados significativos quando comparado ao grupo controle (placebo) em inibir a doença, e nos pacientes com esclerose múltipla promoveu a exacerbação da doença (HOLTEN; PLATER-ZYBERK; TAK, 2002).

2.2.3.4 Interleucina 10 - IL-10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que age limitando a resposta excessiva de células T a patógenos, prevenindo a inflamação crônica e dano tecidual (SCHULKE, 2018).

A IL-10 é sintetizada e excretada pelas APCs e macrófagos, age como um regulador de retroalimentação negativa, inibindo as APCs de excretar a IL-12, sendo esta última responsável por estimular a T_{H1} em produzir IFN- γ (ABBAS, 2015).

O balanço entre citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatórias é responsável em manter a homeostase dos processos fisiológicos e eliminar estímulos prejudiciais ao equilíbrio. Entretanto, quando isso não acontece é necessário fazer uso de medicamentos.

2.2.4 Tratamento

Os fármacos anti-inflamatórios principais são os glicocorticoides e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).

Os AINEs inibem as enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) impedindo a formação de prostaglandinas (PGs) que são responsáveis pela dor e inflamação (esquema 8)(MOURA, 2018).

Existem três isoformas de ciclo-oxigenases – COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é responsável pela homeostase tecidual, presente em plaquetas e estômago; a COX-2 está envolvida no processo inflamatório induzindo as células inflamatórias, e

presente, constitutivamente, no cérebro e rins, enquanto que a COX-3, no coração e córtex cerebral (KHAN, 2018; COUTINHO, 2009).

Os AINEs não-seletivos para COX causam danos a mucosa gástrica, principalmente por impedir a produção de PGE₂ e PGI₂, envolvidas na citoproteção gástrica. Esta reação pode ser controlada pela utilização de inibidores das bombas de prótons (GÓMEZ-ACEBO, 2018). Fármacos conhecidos como coxibes, são seletivos COX-2 eliminando o efeito colateral gástrico, porém promovem efeito cardiovascular e renais, por esse motivo desde 2008 são vendidos apenas sobre retenção, na farmácia, da receita médica (COUTINHO, 2009).

Fármacos como aspirina, paracetamol (acetaminofeno), ibuprofeno, naproxeno, indometacina, diclofenaco são considerados AINEs não seletivos. Inibidores COX-2 seletivos Celecoxibe, rofecoxibe (RANG, 2003).

Os glicocorticoides atuam inibindo a enzima fosfolipase A₂ (esquema 8) responsável em atua nos fosfolídeos para liberar o ácido araquidônico resultando na síntese dos eicosanoides (COUTINHO, 2009).

Inibem os sinais cardinais da inflamação e afetam as várias formas da inflamação, seja ela desencadeada por estímulo físico, patógenos e as de resposta imune inadequadas. Interfere na atividade de neutrófilos, macrófagos e proliferação clonal de células T (RANG, 2003).

Exemplos de fármacos glicocorticoides são prednisolona, dexametasona, metilprednisolona (RANG, 2003). Efeitos colaterais relacionados ao uso de glicocorticoides compreendem: osteoporose, hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão (VANDEWALLE, 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PARTE QUÍMICA

3.1.1 Equipamentos e reagentes

As elucidações estruturais serão realizadas nos equipamentos existentes na Central Analítica do Núcleo de Pesquisa de Inovação Terapêutica, onde dispõem dos seguintes equipamentos: IR PRESTIGE-21 por transformada de Fourier (Espectrofotometria de absorção no infravermelho) - Shimadzu, espectrômetro de massa acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-ESI-MS(n)-Shimadzu e o determinador de ponto de fusão M-565- Buchi. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono realizada no equipamento espectrofotômetro Varian VNMR5 400 MHz foi realizada no Departamento de Química Fundamental – UFPE e o Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE) realizou análise de massa dos compostos no equipamento MALDI-TOF/MS modelo autoflex III, Bruker.

A síntese orgânica foi acompanhada por cromatografia de camada delgada sendo utilizadas placas Merck sílicagel 60 F254, com 0,25mm de espessura, utilizando luz ultra-violeta (254nm) para revelação.

Todos os reagentes utilizados para síntese e suas análises foram adquiridos das empresas Sigma (Quadro 1).

Quadro 1 – Reagentes para síntese

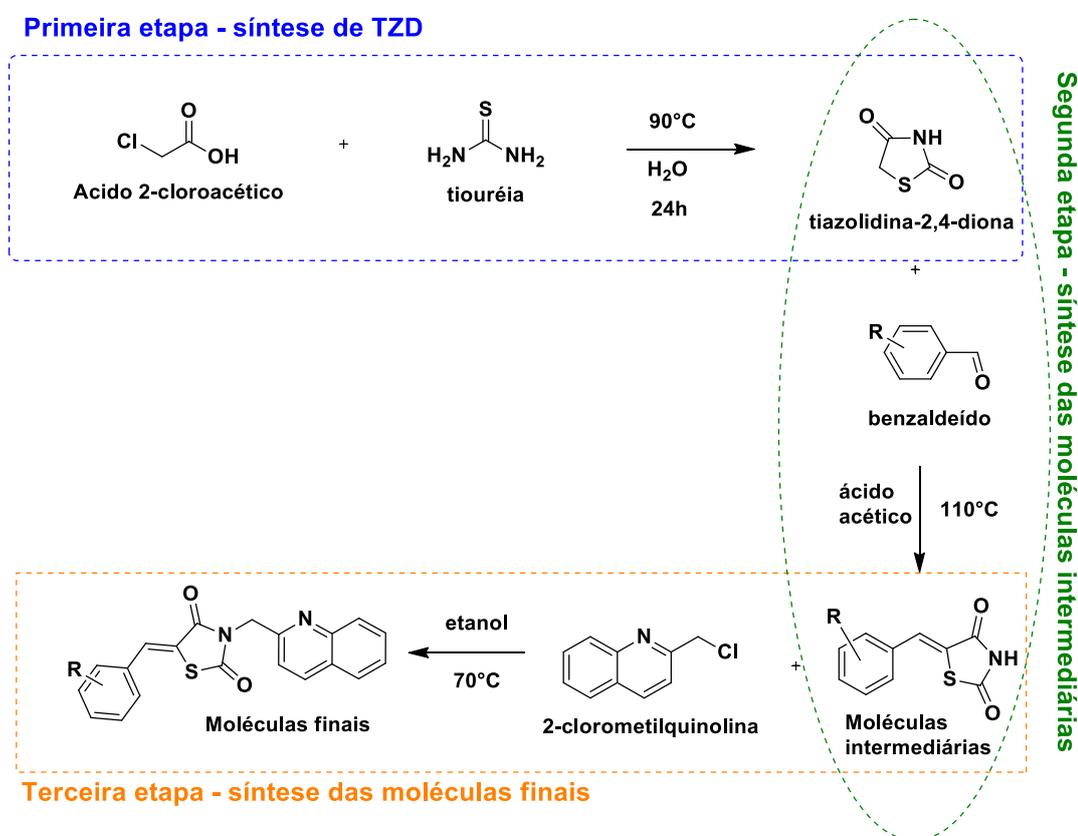
| REAGENTES | PUREZA | REAGENTES | PUREZA |
|---|--------|---|--------|
| Ácido 2-cloroacético (CAS 79-11-8) | 99% | 5-bromo-2- metoxibenzaldeído (CAS 25016-01-7) | 99% |
| Tiouréia (CAS 62-56-6) | 99% | 4-trifluorometil -benzaldeído (CAS 455-19-6) | 98% |
| 2-clorometil- quinolina (CAS 3747-74-8) | 97% | 2-cloro-6- fluorobenzaldeído (CAS 387-45-1) | 95% |
| 4- bromobenzaldeído (CAS 1122-91-4) | 99% | 4- metoxibenzaldeído (CAS 123-11-5) | 98% |
| 4-clorobenzaldeído (CAS 104-88-1) | 97% | 4-metilbenzaldeído (CAS 104-87-0) | 97% |
| 3- furanocarboxaldeído (498-60-2) | 97% | 4-dimetilamino- benzaldeído (CAS 100-10-7) | 98% |

Os procedimentos experimentais relacionados aos itens: 3.1.2.1 Síntese da TZD, 3.1.2.2 Síntese de 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona (GQs) e 3.1.2.3 Síntese dos derivados tiazquinolínicos (ZKDs) estão detalhados no Anexo I.

3.1.2 Metodologia geral da síntese

A síntese de todas as moléculas finais foi realizada em três etapas. A primeira etapa corresponde à síntese de tiazolidinadiona (TZD); na segunda etapa, a TZD reage com o benzaldeído correspondente de cada molécula, obtendo as moléculas intermediárias; por fim, na terceira etapa, esta última molécula reage com a 2-clorometilquinolina para obtenção dos compostos híbridos tiazquinolínicos (ver diagrama 1).

Diagrama 1 – Etapas da síntese para obter o produto final



FONTE: Autoria própria, 2019.

3.1.2.1 Síntese de TZD

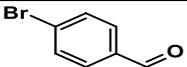
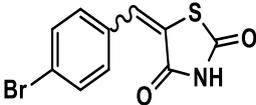
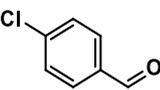
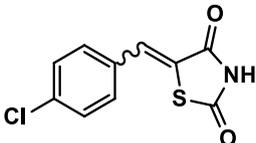
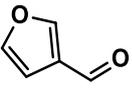
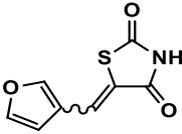
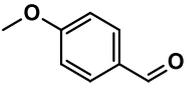
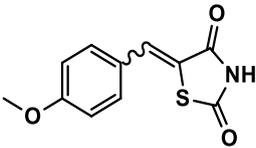
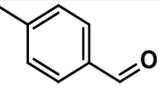
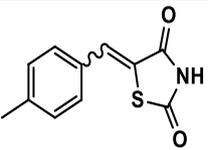
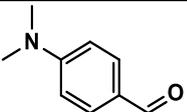
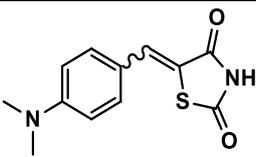
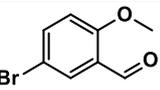
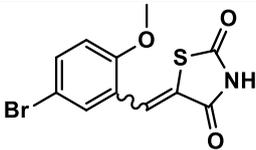
A obtenção da tiazolidina-2,4-diona ocorre devido a uma reação de ciclização entre o ácido 2-cloroacético e a tiouréia em meio aquoso aquecido.

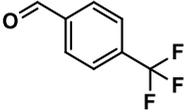
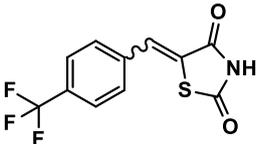
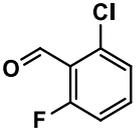
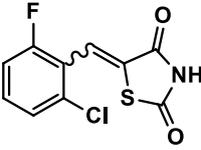
3.1.2.2 Síntese de 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona – compostos GQs

Sintetizaram-se nove moléculas nessa etapa, reagiu-se a tiazolidinadiona com os aldeídos substituídos (Quadro 2), na presença do acetato de amônio.

Partindo de dados na literatura da presença de átomos eletronegativos, grupos funcionais (metoxi, benzil, hidroxil e amina) em derivados quinolínicos e tiazolidínicos com atividade anti-inflamatória, foram escolhidos os aldeídos que participarão da molécula final. Todos os aldeídos foram adquiridos comercialmente da empresa sigma.

Quadro 2 – Compostos intermediários e seus respectivos aldeído

| Aldeídos | Intermediários | Identificação dos intermediários |
|--|---|----------------------------------|
|  4-bromobenzaldeído (CAS 1122-91-4) |  GQ443 | |
|  4-clorobenzaldeído (CAS 104-88-1) |  GQ208 | |
|  3-furanocarboxaldeído (CAS 498-60-2) |  GQ303 | |
|  4-metoxibenzaldeído (CAS 123-11-5) |  GQ296 | |
|  4-metilbenzalaldeído (CAS 104-87-0) |  GQ299 | |
|  4-dimetilamino-benzaldeído (CAS 100-10-7) |  GQ301 | |
|  5-bromo-2-metoxibenzaldeído (CAS 25016-01-7) |  GQ307 | |

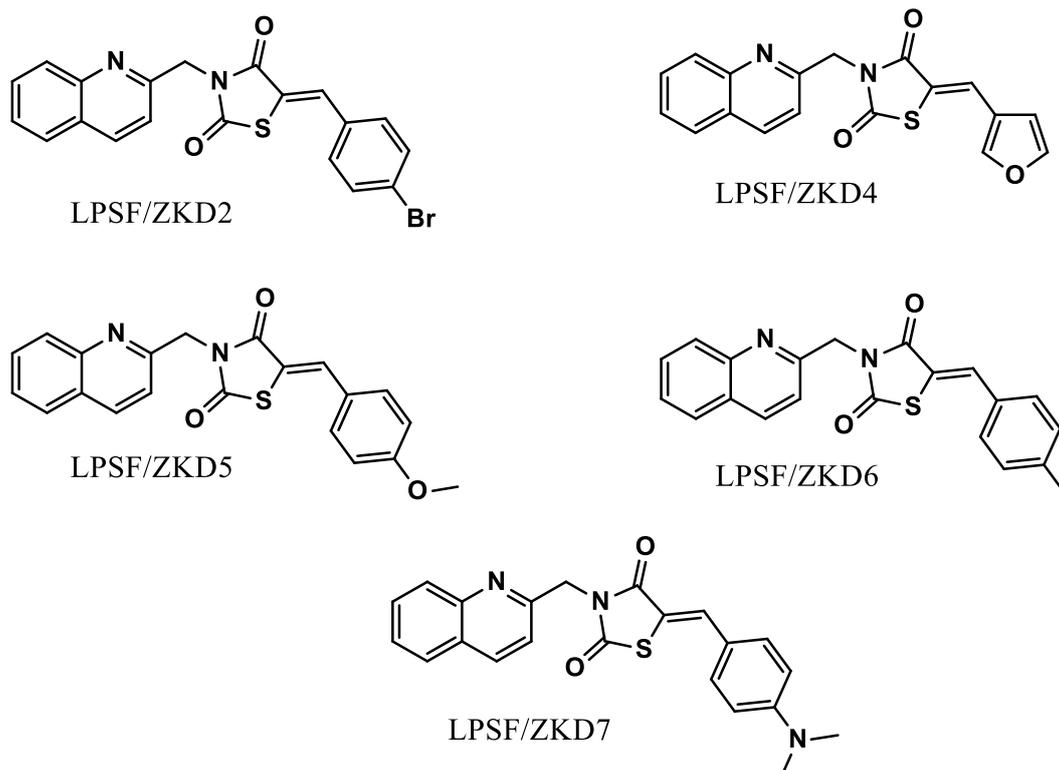
| | | |
|--|--|--------------|
|  4-trifluorometilbenzaldeído (CAS 455-19-6) |  | GQ444 |
|  2-cloro-6-fluorobenzaldeído (CAS 387-45-1) |  | GQ445 |

FONTE: Autoria própria, 2019

3.1.2.3 Síntese das moléculas finais - Derivados tiazolquinolínicos (LPSF/ZKDs)

A síntese desses compostos ocorre em duas etapas. No primeiro momento, há uma reação de ácido-base entre a unidade tiazolidinadiona do composto 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona com o hidróxido de sódio (NaOH). Por fim, uma reação de n-alquilação iniciará entre o sal formado e a molécula de 2-clorometilquinolína para formação de cinco compostos finais (Figura 16).

Figura 16 – Moléculas tiazolquinolínicas LPSF/ZKDs



3.2 PARTE BIOLÓGICA

As moléculas obtidas são, quimicamente, propensas a agirem como agentes anti-inflamatórios, de acordo com os dados da literatura, sendo assim, três compostos foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliar a citotoxicidade e efeito anti-inflamatório.

3.2.1 Aspectos éticos

A utilização de amostras humanas foi possível mediante aprovação do Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CEP/CCS/UFPE), com número de registro CAAE 03248918.8.0000.5208 (Anexo III).

3.2.2 Seleção de voluntários e coleta de sangue

Oito voluntários sadios foram selecionados para o estudo. Como critério de exclusão, os indivíduos com histórico de doenças auto-imunes, fazendo uso de medicações, fumantes e que tenha ingerido bebida alcóolica no dia anterior a coleta. Todos os indivíduos foram esclarecidos sobre o projeto e após, àqueles que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Coletaram-se 9ml de sangue em tubos contendo o coagulante natural, heparina.

Os procedimentos experimentais relacionados aos itens: 4.2.3 Isolamento das PBMCs, 4.2.4 Ensaio de citotoxicidade, 4.2.5 Cultura de células e 4.2.6 Dosagens de citocinas estão detalhados no Anexo I.

3.2.3 Isolamento das PBMCs

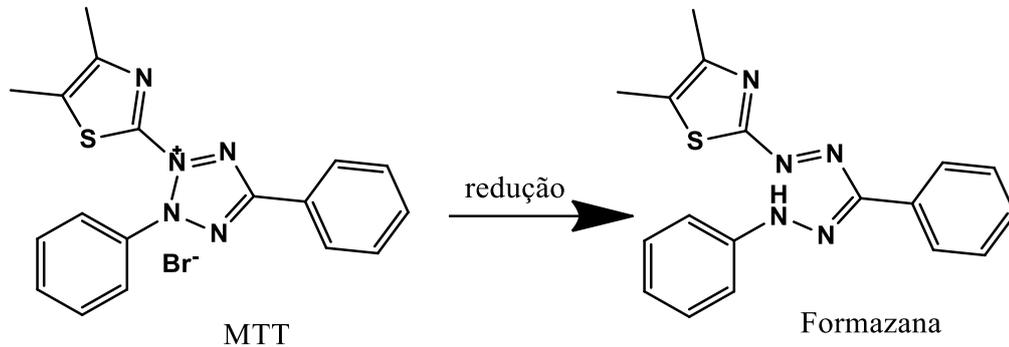
Para os ensaios *in vitro*, extraíram-se as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos voluntários sadios.

3.2.4 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade de cada composto é avaliada através do teste de viabilidade celular pela metodologia do MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromato difenil tetrazólio). Essa metodologia propõe que células ainda “funcionais”, na cultura com os

compostos, promova a redução do MTT a Formazana (Figura 17), dentro da mitocôndria pela ação da succinato desidrogenase, o que implica na mudança de coloração do meio (STOCKERT, 2012).

Figura 17 – Redução do MTT



FONTE: (STOCKERT et al., 2012)

3.2.5 Cultura de Células para avaliação da inibição de citocinas

Realizou-se uma cultura de PBMC de voluntários sadios (n=3), na presença dos compostos a 50 μ M e 100 μ M e do mitógeno CD3 (0,3 μ g/ml)/CD28(0,4 μ g/ml), utilizando como padrão o metilprednisolona (100 μ M). Dessa cultura, extraiu-se o sobrenadante com 48h para titulação de citocinas.

3.2.6 Dosagens de citocinas por ELISA

A modulação da expressão de citocinas ocasionada pelos compostos foi avaliada através do teste de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) sanduíche. Este consiste na utilização de dois anticorpos unidos pelo antígeno específico (citocina em análise).

Os kits de ELISA de IFN- γ , IL-6 e IL-10 foram adquiridos da empresa BD Biosciences e IL-17A, pela empresa Invitrogen, obedecendo os limites de detecção (LD) de cada citocina avaliada, para IFN- γ e IL-6 o LD=4,68pg/ml, para IL-17A o LD=3,9pg/ml e para IL-10 o LD=7,81pg/ml.

3.2.7 Análise estatística

No ensaio de citotoxicidade os resultados foram analisados pelo Excel, medidos a variabilidade dos dados e desvios padrão dos valores obtidos, esses

valores foram analisados no GraphPad Prism 5 obtendo o resultado de viabilidade celular. Para o ensaio de modulação de citocinas os valores foram analisados no GraphPadPrism 5 utilizando o teste t de dados não-paramétrico de Wilcoxon, sendo considerado valores significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE QUÍMICA

4.1.1 Síntese de TZD

A TZD foi obtida com rendimento 81,7%. Resultado próximo ao apresentado na literatura, 85%, entretanto para obter este valor utilizaram-se os solventes ácido clorídrico:água (1:1) no sistema reacional (DADASAHEB et al., 2017), caracterizando a síntese apresentada nesta dissertação mais atrativa, pois utilizou-se apenas água como solvente, sendo mais econômica e menos prejudicial ao meio ambiente. Em outro trabalho, obtiveram 78% de rendimento, neste, utilizou-se apenas o ácido clorídrico como solvente (ALAGAWADI; ALEGAON, 2011), esses dados podem sugerir que o maior volume de água como solvente proporciona uma melhoria no rendimento.

Pinheiro (2017) endossa tal sugestão ao demonstrar na síntese de TZD que o mesmo experimento pode obter valores de rendimentos diferentes ao mudar a proporção de ácido clorídrico ou o tempo da reação (Quadro 3). Observou-se uma perda de rendimento quando aumenta o tempo da reação (Experimentos 1 e 2) e mantendo a mesma condição do tempo, mas aumentando o volume de ácido clorídrico (Experimentos 1 e 3).

Quadro 3 – Ensaio de otimização na síntese de TZD

| Experimento | Tempo de reação | Volume de HCl | Rendimento (%) |
|---------------|-----------------|---------------|----------------|
| Experimento 1 | 10h | 60ml | 33 |
| Experimento 2 | 40h | 60ml | 15 |
| Experimento 3 | 10h | 40ml | 35 |

FONTE: (PINHEIRO et al., 2017) – ADAPTADO

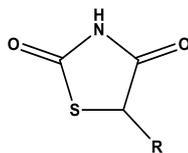
O rendimento de aproximadamente 82%, apresentado neste trabalho, foi obtido com 24h de reação em 100% de água como solvente.

4.1.2 Síntese dos derivados 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona - compostos GQs

Os compostos tiveram rendimento que variaram entre 53 - 83% (Quadro 4). Todas as sínteses foram acompanhadas por CCD. Obtiveram-se de cada produto seco o HPLC para informação da pureza, adicionado ao RMN ¹H, RMN ¹³C e IV para confirmação da estrutura (Anexo II).

O grau de pureza dos compostos variou entre 99-100% (Quadro 4). A partir desses resultados foi possível enviar os compostos para as análises de confirmação da estrutura.

Quadro 4 – Resumo da síntese dos derivados 5-benzilideno-2,4-tiazolidinonas

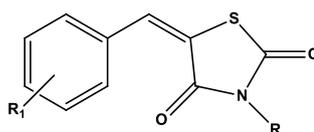


| Compostos | Peso molecular (g/mol) | Pureza (%área do pico) | R (%) | PF (°C) | R |
|-----------|------------------------|------------------------|-------|---------|---|
| GQ443 | 282,93 | 99,48 | 61,77 | 244,6 | |
| GQ208 | 238,98 | 100 | 82,64 | 232,5 | |
| GQ303 | 195,00 | 100 | 83,59 | 213,1 | |
| GQ296 | 235,03 | 100 | 74,57 | 221,8 | |
| GQ299 | 219,04 | 100 | 77,88 | 242,1 | |
| GQ301 | 248,06 | 100 | 56,26 | 291,6 | |
| GQ307 | 312,94 | 100 | 82,51 | 314,5 | |
| GQ444 | 273,01 | 100 | 53,11 | 168,1 | |
| GQ445 | 256,97 | 100 | 81,58 | 167,9 | |

R – rendimento; PF- ponto fusão
 FONTE: Autoria própria, 2019

Alguns artigos mostram dados semelhantes aos obtidos na síntese de 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona (Quadro 5), porém ao trocar o hidrogênio, por outros substituintes, ligado ao nitrogênio do anel TZD, como observados nas referências de 2004 e 2007, há uma mudança nos valores do ponto de fusão. Essa mudança é esperada devido ao aumento da molécula e existência de átomos eletronegativos; enquanto que os valores diferentes nos rendimentos, muito provável, deve-se as mudanças nas condições de sínteses em cada trabalho.

Quadro 5 – Comparação do rendimento e ponto de fusão de outros estudos com derivados TZD

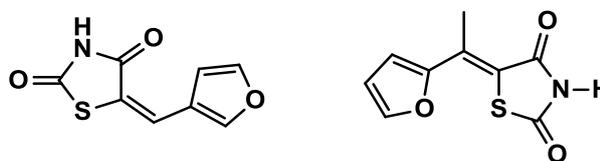


| REF | R | R1 | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|--------------------|
| | | -2F,6Cl | 4-O-CH ₃ | 4-CF ₃ | 4-CH ₃ | 4-Cl | 4-N(CH ₃) ₂ | 4-Br |
| (BRUNO et al., 2002) | -H | --- | 70% 216-218°C | 54% 206-208°C | --- | --- | --- | --- |
| (PEREIRA; SIQUEIRA; CUNICO, 2014) | -H | 80% 148-150°C | 34% 205-207°C | --- | 40% 225-226°C | 72% 228-230°C | --- | --- |
| (SHELKE et al., 2016) | -H | --- | 89% 235-237°C | 83% 234-236°C | --- | 88% 270-272°C | 83% 280-282°C | --- |
| Presente estudo | -H | 81,58% 167,9°C | 74,57% 221,8°C | 53,11% 168,1°C | 77,88% 242,1°C | 82,64% 232,5°C | 56,26% 291,6°C | 61,77% 244,6°C |
| (BHAT et al., 2004) | -CH ₂ CO ₂ Et | --- | 80% 129-131°C | --- | --- | --- | --- | --- |
| (ALI et al., 2007) | | --- | 61% 158-160°C | --- | --- | 32% 209-210°C | --- | 45,4% 207-210°C |

REF- referência

O composto GQ303 (figura 18A) obtido com 83% de rendimento, tem melhor resultado em relação ao composto semelhante [5-(1-(furan-2-il)etilideno)tiazolidine-2,4-diona], figura 18B, encontrado na literatura com 75% de rendimento (PRABHAKAR et al., 1998).

Figura 18 – Derivados tiazolidínicos semelhantes



LPSF/GQ303

A

B

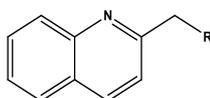
Esses resultados semelhantes aos da literatura agrega robustez na síntese desses compostos adicionados a confirmação estrutural com as técnicas pertinentes.

4.1.3 Síntese dos derivados Tiazoquinolínicos – compostos ZKDs

Os compostos tiveram rendimento que variaram entre 38 - 84% (Quadro 6). Todas as sínteses foram acompanhadas por CCD. Obtiveram-se de cada produto seco o HPLC para informação da pureza, adicionado ao RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV para confirmação da estrutura.

O grau de pureza dos compostos variou entre 96-100% (Tabela 7). A partir desses resultados foi possível enviar os compostos para as análises de confirmação da estrutura.

Quadro 6 – Resumo da síntese dos derivados tiazóquinolínicos

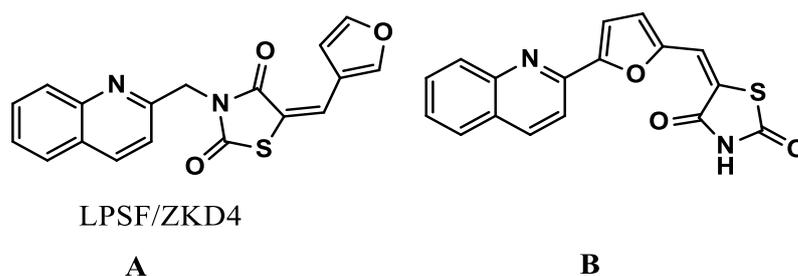


| Compostos | Peso Molecular (g/mol) | Pureza (% área do pico) | R (%) | PF (°C) | R |
|-----------|------------------------|-------------------------|-------|---------|---|
| LPSF/ZKD2 | 423,99 | 98,61 | 47,27 | 233,3 | |
| LPSF/ZKD4 | 336,06 | 100 | 63,7 | 183,3 | |
| LPSF/ZKD5 | 376,09 | 100 | 38,53 | 211,3 | |
| LPSF/ZKD6 | 360,09 | 96,27 | 84% | 292,2 | |
| LPSF/ZKD7 | 389,12 | 97,26 | 83,54 | 275,6 | |

R – rendimento; PF- ponto fusão
 FONTE: Autoria própria, 2019

Estudo de compostos quinolínicos são inúmeros na literatura, porém trabalhos que contemplem esse núcleo ligado diretamente ao da TZD e com estudo relacionado a atividade anti-inflamatória, não foi encontrado até o momento de elaboração deste trabalho. Entretanto, pode-se inferir um resultado significativo na síntese do LPSF/ZKD4 (figura 19A) com 63% de rendimento ao compará-lo com um estudo de Pomel et al., de 2006, que obteve 33% de rendimento do composto 5-((5-(quinolin-2-il)furan-2-il)metileno)tiiazolidine-2,4-diona (figura 19B) de estrutura molecular que mais se aproxima do LPSF/ZKD4.

Figura 19 – Derivados tiazolquinolínicos



Informações adicionais aos parâmetros da síntese são fornecidas através de uma análise *in silico*, no programa ChemDraw ultra, no intuito de avaliar os parâmetros que se enquadram na regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 2012). Lipinski defende que que um composto para ter sucesso como possível fármaco deve possuir quatro características: 1. Quantidade de acceptor de H em ligações hidrogênio ≤ 10 ; 2. Quantidade de doador de H em ligações hidrogênio ≤ 5 ; 3. Peso molecular ≤ 500 e 4. $\text{Log}P \leq 5$, sendo assim, haverá uma maior probabilidade de um composto conseguir permear na célula e atuar em seu local de ação.

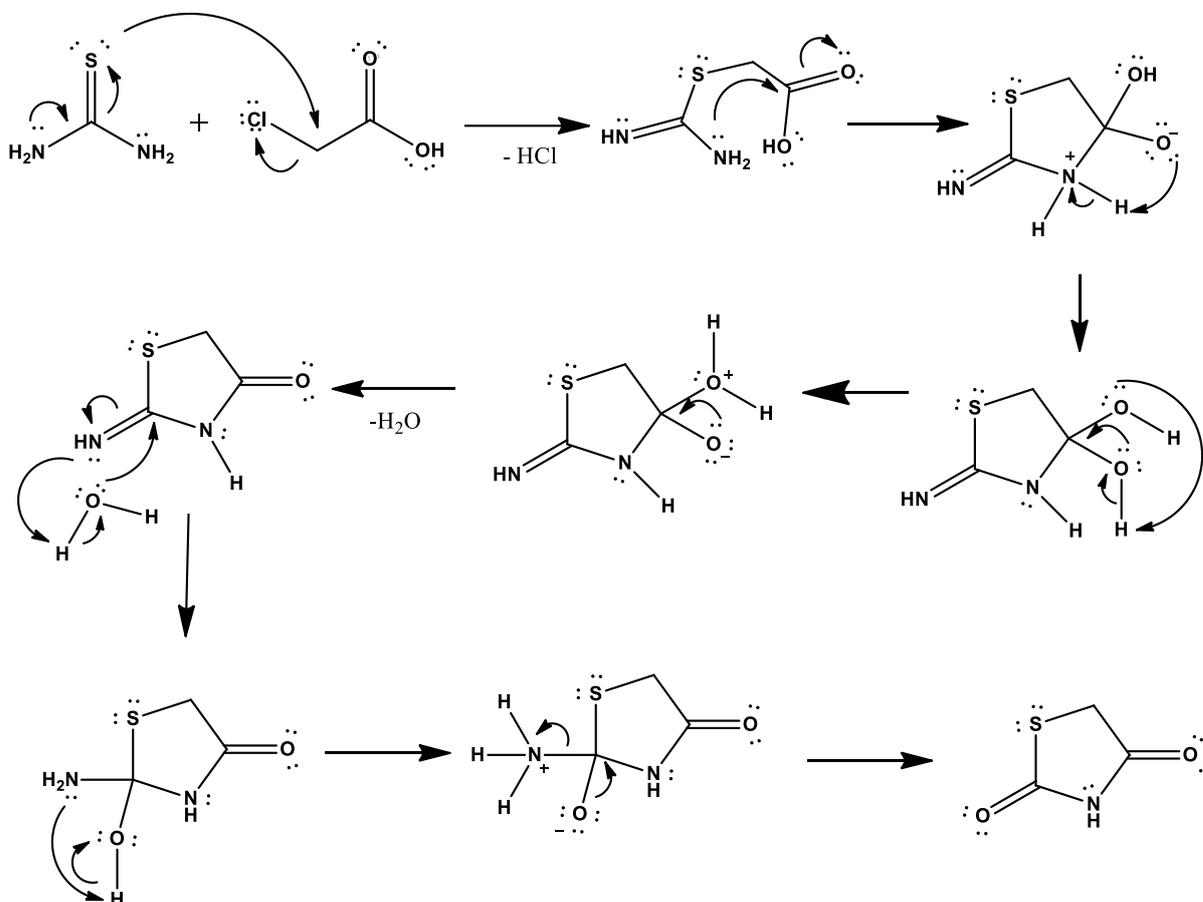
As moléculas GQs e LPSF/ZKDs são contempladas com tais regras, pois seu peso molecular variou entre 194-424g/mol, $\text{Log}P$ 1,36-4,8 e com quantidade de acceptor e doador de hidrogênio dentro do proposto.

4.2 MECANISMO DE REAÇÃO

A síntese de TZD ocorre por uma reação de ciclização. O esquema 9 exemplifica o mecanismo hipotético dessa reação. Em meio aquoso, o par de elétrons do enxofre presente na molécula de tioureia ataca o carbono metilênico do ácido cloroacético, através de uma substituição nucleofílica com saída do cloreto. O processo de

ciclização da molécula ocorre pelo ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio a carbonila, com carga parcial positiva, liberando uma molécula de água para o meio. A hidrólise na posição 2 do anel, retira o grupo imina para formação da outra carbonila, e assim, formando a molécula de tiazolidina-2,4-diona.

Esquema 9 – Mecanismo hipotético de reação da síntese de TZD



Fonte: Autoria própria, 2019

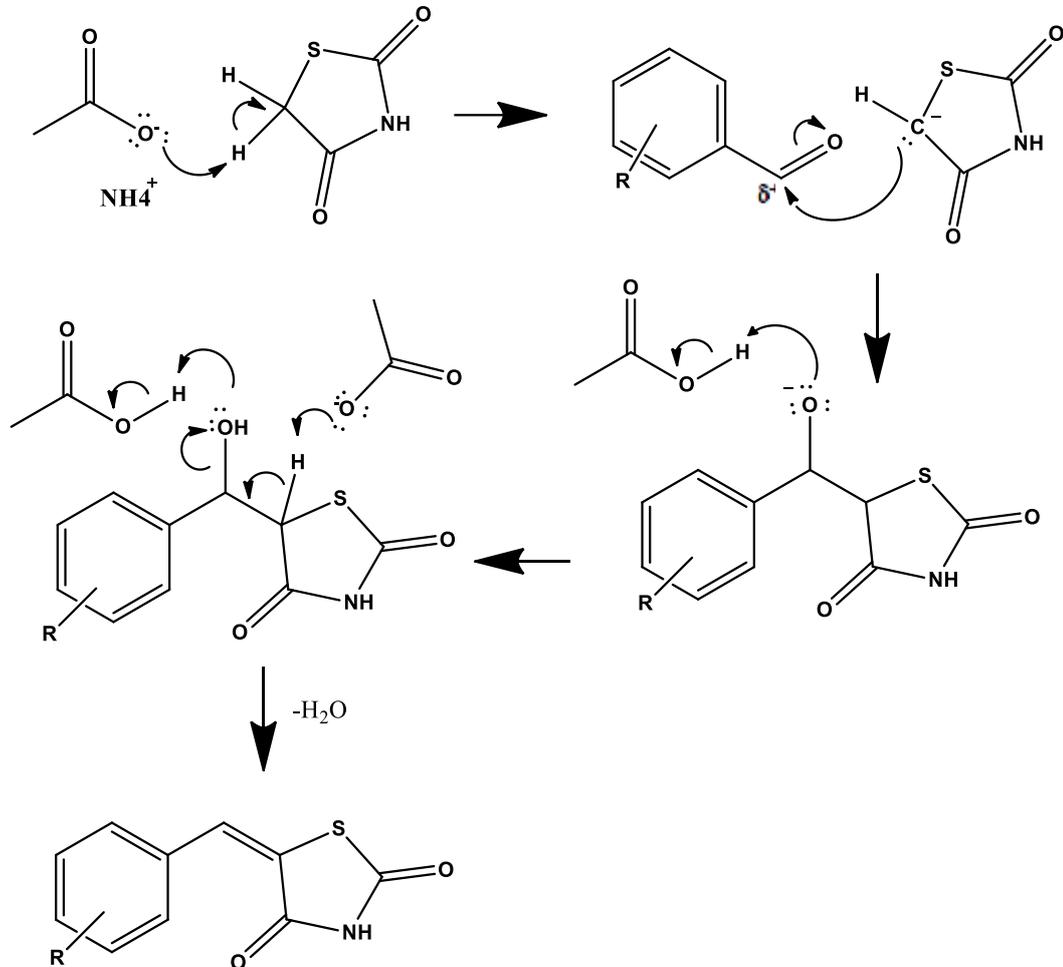
Derivados de tiazolidinadiona são sintetizados a partir de reações nas posições 3 e 5, sendo as mais comuns: reações de *N*-alquilação e condensação de Knoevenagel.

A condensação de Knoevenagel envolve uma adição nucleofílica no carbono metilênico, eliminando uma molécula de água, formando uma ligação dupla entre carbono-carbono (CUNHA; SANTANA, 2012).

No esquema 10, o mecanismo inicia com o ataque do par de elétrons do oxigênio do acetato, que é uma base forte, ao hidrogênio do carbono metilênico da TZD. O nucleófilo de TZD ataca o carbono do aldeído, conjugando ambas unidades

reacionais. A síntese do derivado da tiazolidinadiona conclui com a eliminação de água e formação da dupla ligação.

Esquema 10 – Mecanismo hipotético da reação de condensação de Knoevenagel

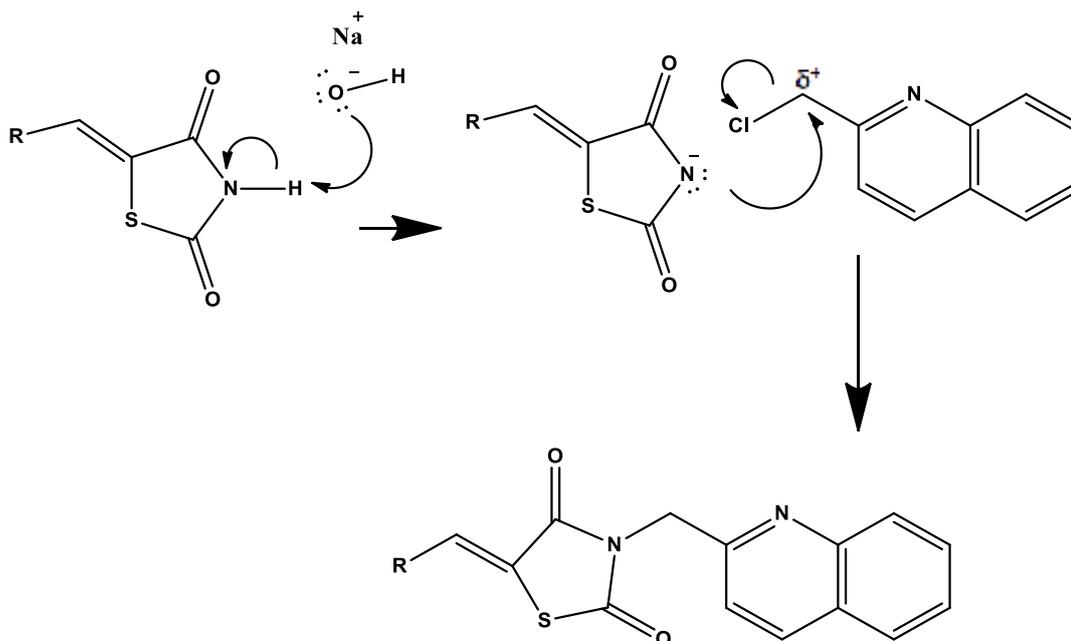


Fonte: Autoria própria, 2019

É possível acrescentar outra unidade farmacofórica na posição 5 da tiazolidinadiona através de uma reação de *N*-alquilação. Esta reação ocorre em meio alcalino utilizando um álcool como solvente, envolvendo um haleto de alquila (LIMA, 1998).

O mecanismo hipotético da reação de *N*-alquilação, esquema 11, inicia com uma reação ácido-base entre a unidade de TZD, que se comporta como ácido, e a base, hidróxido de sódio. O sal de TZD (nucleófilo) formado ataca o carbono de carga parcialmente positiva da unidade quinolínica, liberando cloreto para o meio e finalizando com a formação de um derivado de tiazolidinadiona *N*-alquilado.

Esquema 11 – Mecanismo hipotético de N-alkilação



Fonte: Autoria própria, 2019

4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Os cromatogramas de todos os compostos foram cuidadosamente avaliados, sendo utilizado o conhecimento prévio do tempo de pico de cada reagente presente nas sínteses para diferenciar e identificar o pico do produto. Além de se observar durante a síntese, os picos que eram consumidos e aquele que aumentava com o tempo. Dessa forma foi possível avaliar por HPLC a pureza de um composto finalizado.

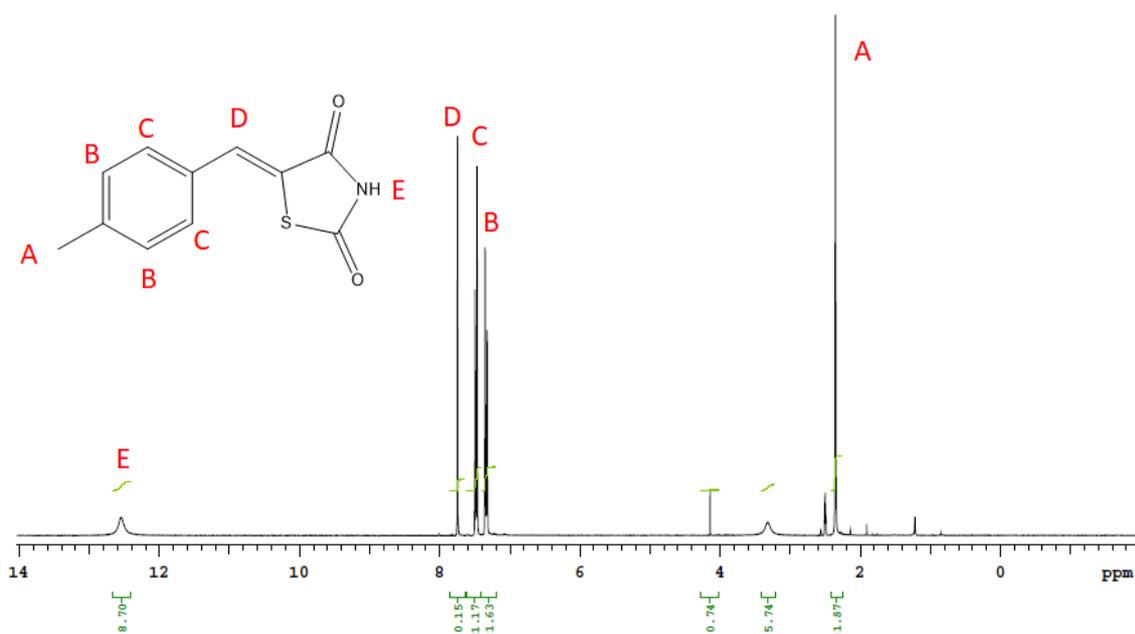
A partir da informação do grau de pureza, com mínimo aceitável de 96%, dos 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadionas e tiazoloquinolínicos, esses foram encaminhados para o RMN¹H e RMN¹³C (Anexo II).

Os espectros de RMN¹H dos 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadionas apresentaram um grau de padronização dos resultados, sugerindo confiabilidade na síntese desses compostos. Tomando como referência o espectro de RMN¹H LPSF/GQ299 (Figura 20) observa-se a presença de um pico de baixa intensidade e de base larga em 12,3 ppm que representa o hidrogênio do NH (E). Dois dubletos, devido ao acoplamento entre os hidrogênios B e C, entre 7-7,6 ppm referentes a cada H do anel benzênico. O singlete em 7,8 ppm refere-se ao metino =CH- (D) que confirma a união entre o aldeído e o anel tiazolidinadiona. Dados que coincidem com outros derivados tiazoloquinolínicos (ALAGAWADI; ALEGAON, 2011).

O singlete (A) na posição 2,3 ppm que representa $-CH_3$ (sp^3), substituído do anel benzênico variará entre 2 – 4 ppm conforme a presença de oxigênio e nitrogênio em outros compostos 5-benzilideno-2,4-tiazolquinolínicos. Assim como sua ausência nos substituintes com cloro, bromo e flúor.

O espectro de hidrogênio também fornece um valor de integração que está proporcionalmente relacionado a quantidade de hidrogênio presente no composto analisado. Observando a figura 20, abaixo de cada pico, observa-se um valor. O pico E tem valor aproximado de 10, sendo este o pico do NH, entende-se que cada hidrogênio nesse espectro corresponde a um valor de integração de dez, sendo assim, o pico D, 10 (1H); pico C, 20 (2H); pico B, 20 (2H) e pico A, 30 (3H). Logo, a análise confirma o número de hidrogênios presente na molécula, 9H.

Figura 20 – RMN¹H – LPSF/GQ299

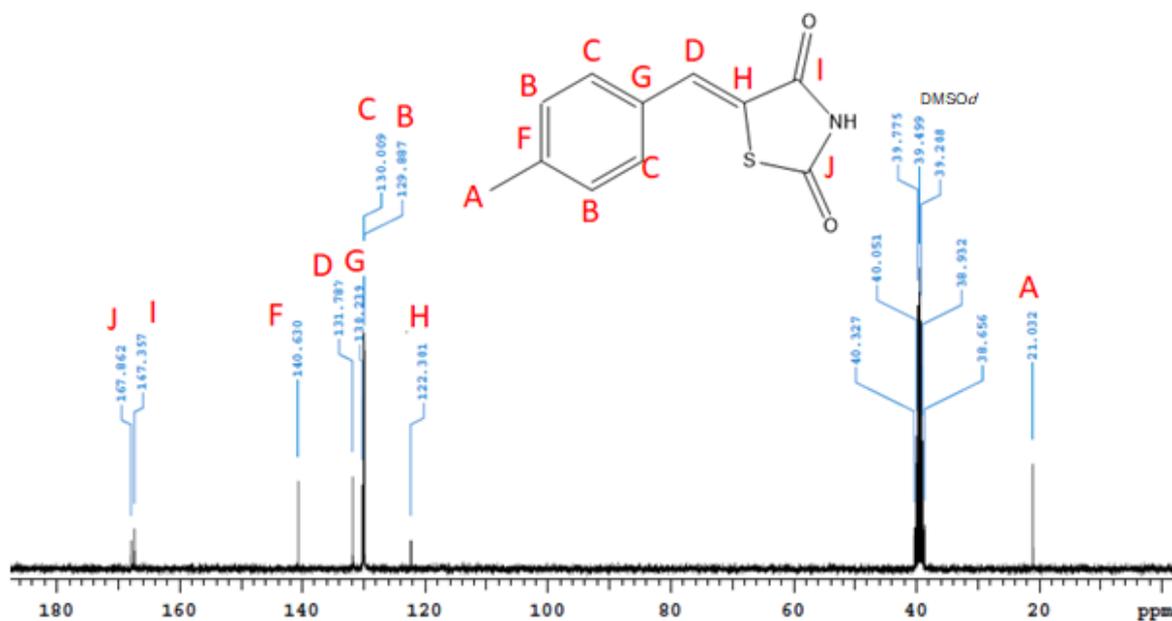


Os espectros de RMN¹³C dos 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadionas apresentaram uma repetibilidade no carbono da carbonila (C=O) aparecendo sempre entre 167-168 ppm (J e I), figura 21, assim como a metila do substituído do anel benzênico variando entre 20 – 60 ppm por motivo da proximidade de nitrogênio e oxigênio. Resultados parecidos são encontrados em Bruno et. al., 2002.

As moléculas de substituído do anel benzênico que possuem flúor e cloro, apresentaram certa complexidade no espectro de hidrogênio, por esse motivo outros espectros com informações importantes foram utilizados para esclarecer o deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios, a saber: COSY, DEPT e HSQC.

O espectro COSY identifica os acoplamentos entre hidrogênios vicinais, enquanto que o espectro HSQC, acoplamento entre carbono e hidrogênio 1J . Entretanto para identificar a presença, ausência e deslocamento químico dos carbonos CH_3 , CH_2 , CH e C das moléculas sintetizadas, usou-se o espectro DEPT.

Figura 21 – RMN^{13}C – LPSF/GQ299



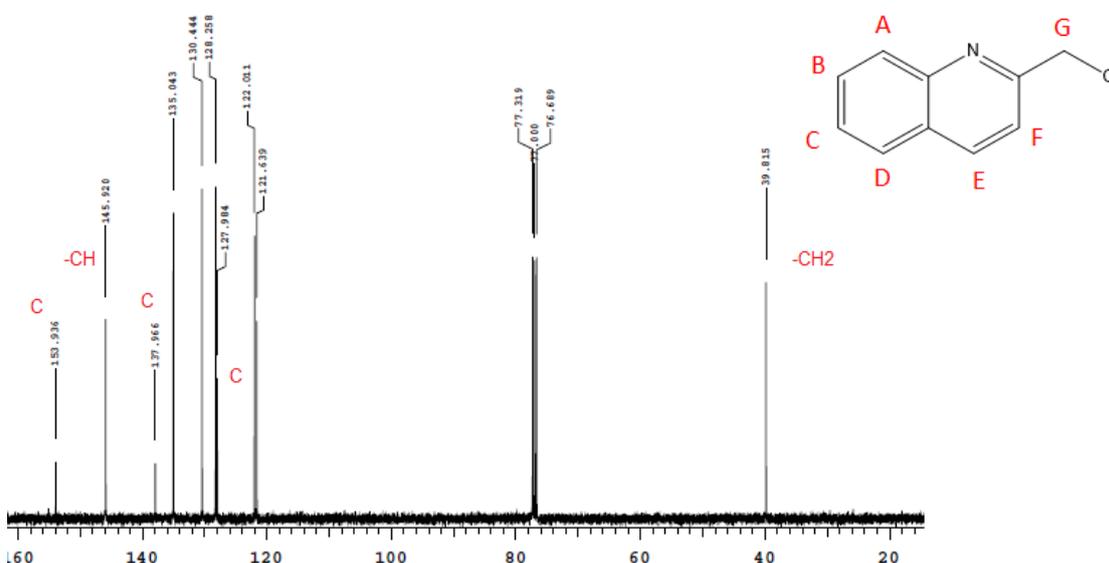
Assim como mencionado acima, os derivados tiazquinolínicos também apresentaram um grau de padronização em seus espectros, entretanto, para uma melhor compreensão, analisou-se previamente o reagente 2-clorometilquinolina (figura 22).

alquilação. Outro elemento importante é a presença de dois dubletos, de hidrogênios mais desblindados do anel quinolínico, que na figura 22 aparecem entre 8,8 - 9 ppm, e nos derivados tiazquinolínicos se repetem entre 8- 8,2 ppm (figura 23).

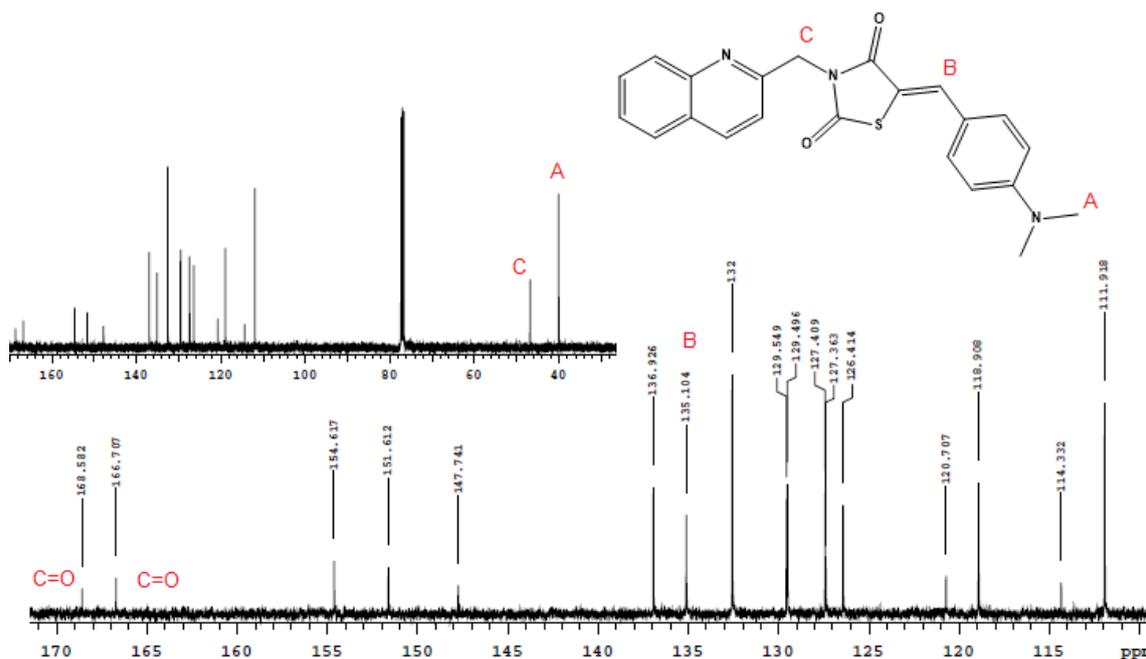
A multiplicidade dos sinais relacionada ao anel quinolínico entre 7,8-8,2 ppm na figura 22, faz-se presente nos compostos tiazquinolínicos misturados ao dubletos do anel benzênico ligado a TZD. Dentre esses sinais, no exemplo da figura 23, é perceptível dois tripletos, reforçando a presença do anel quinolínico no composto analisado, somado a presença do metino em 7,8ppm.

Um pico marcadamente presente nos derivados tiazquinolínicos em 7,2 ppm (figura 23) também se faz presente em 2-clorometilquinolina (figura 22 – 7,2ppm). Analisando todos os espectros desse reagente, não há acoplamento entre carbonos e hidrogênios do reagente com este pico, concluindo como impureza do reagente.

Figura 24 – RMN¹³C – 2-clorometilquinolina



No espectro de RMN¹³C de 2-clorometilquinolina se observa a presença do carbono CH₂ (*sp*³)(40ppm), é possível também identificar os carbonos CH (*sp*²) (metino) e C quaternários (figura 24). Entretanto, dois picos relacionados as duas carbonilas (C=O) estão presentes nos derivados tiazquinolínicos e 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona (figuras 25 e 21). Outro ponto interessante é a constatação dos carbonos metila (presente em LPSF/ZKD7 e LPSF/ZKD6 – Anexo II) e metileno nos derivados tiazquinolínicos.

Figura 25 – RMN¹³C – LPSF/ZKD7

A espectroscopia do infravermelho (IV) é muito utilizada para confirmar alguns grupos funcionais na estrutura molecular. No Anexo II estão todos os espectros de infravermelho dos compostos.

Nos espectros IV dos derivados 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadionas, nota-se a presença da banda de absorção que representa o NH entre 3090 – 3200cm⁻¹. No exemplo abaixo, figura 26, aparece em 3158cm⁻¹. Ainda em relação a unidade de TZD observa-se as bandas de absorção da carbonila (C=O) entre 1690 – 1750 cm⁻¹. A reação entre o aldeído e a TZD formou um alceno conjugado =CH- que na figura 26 está representado pela banda de absorção em 1610 cm⁻¹.

No caso dos derivados tiazóquinolínicos (figura 27) a ausência da banda de absorção do NH e a presença dos mesmos grupos mencionados no parágrafo anterior são indícios de sucesso na síntese.

Figura 26 – IV – LPSF/GQ208

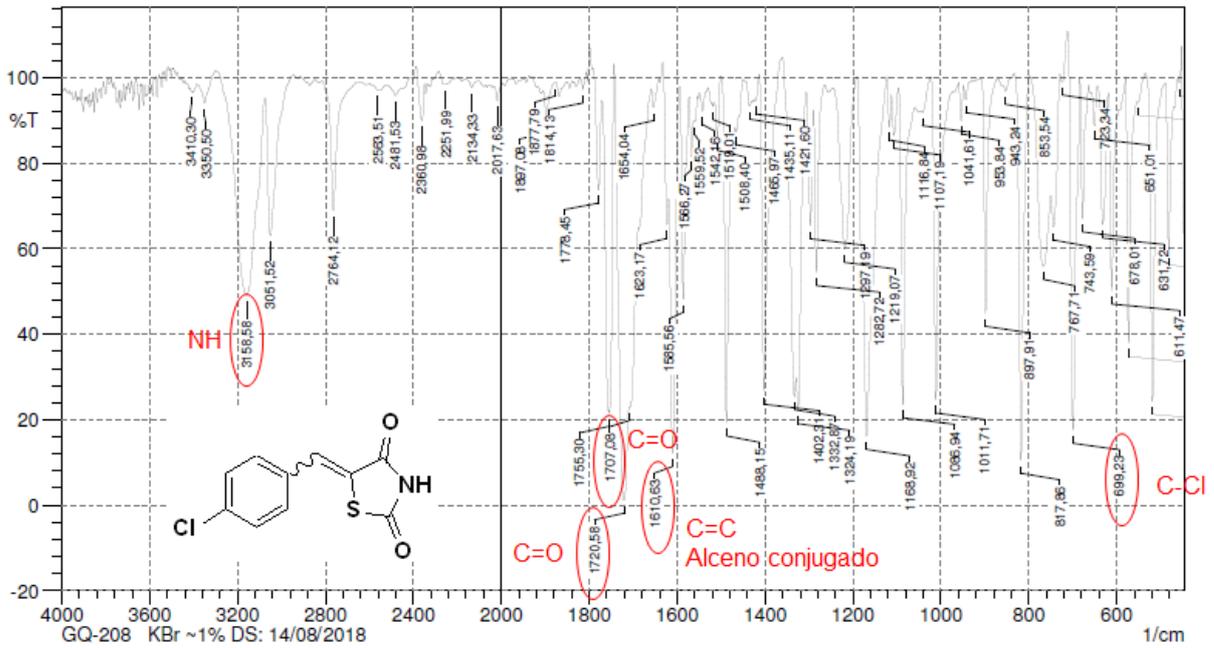
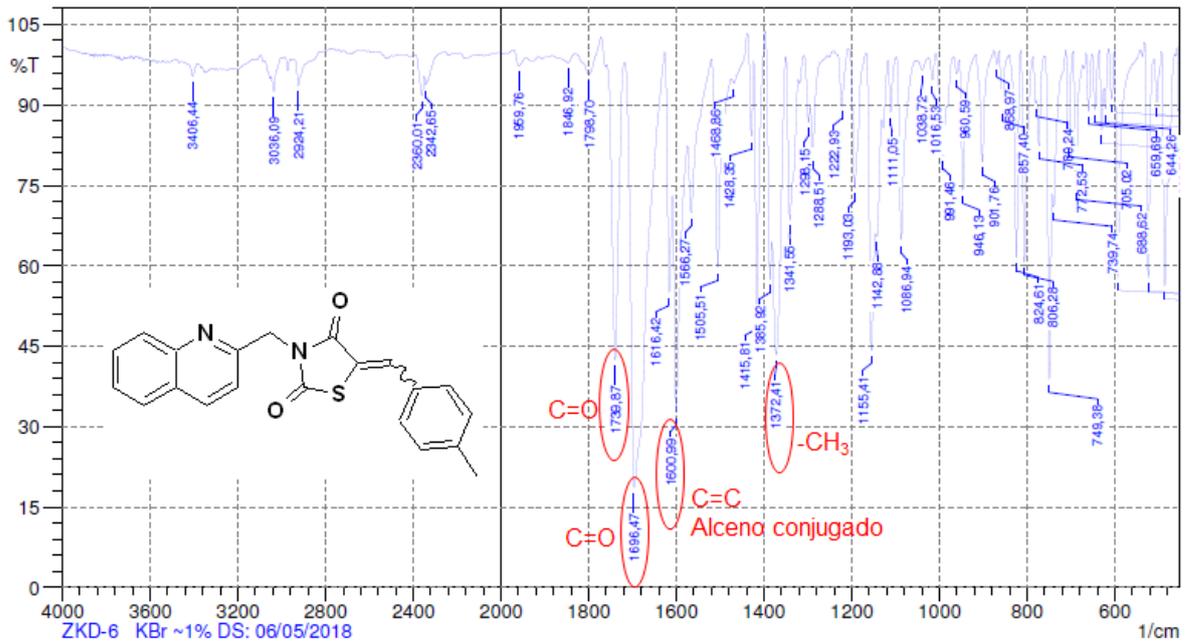


Figura 27 – IV – LPSF/ZKD6



4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.4.1 Ensaio de citotoxicidade

Nessa etapa, selecionaram-se os compostos finais que são solúveis no DMSO, que tiveram maior facilidade de síntese e com resultados de RMN¹H e ¹³C disponíveis.

Os compostos LPSF/ZKD2, LPSF/ZKD4 e LPSF/ZKD7 foram avaliados nas concentrações de 50µM e 100µM em ensaios independentes em triplicata. Os resultados da viabilidade celular foram acima de 92% (quadro 7).

No intuito de garantir a confiabilidade do ensaio, para cada voluntário, avaliaram-se a integridade das PBMCs e a integridade da cultura na presença do solvente dos compostos, dimetilsufóxido - DMSO 0,1%. De acordo com os resultados, o solvente não provocou nenhum efeito citotóxico e as PBMCs, ausentes de solventes e compostos, apresentaram 100% de viabilidade celular.

Quadro 7 – Valores da média de viabilidade celular e desvio padrão em PBMCs dos compostos

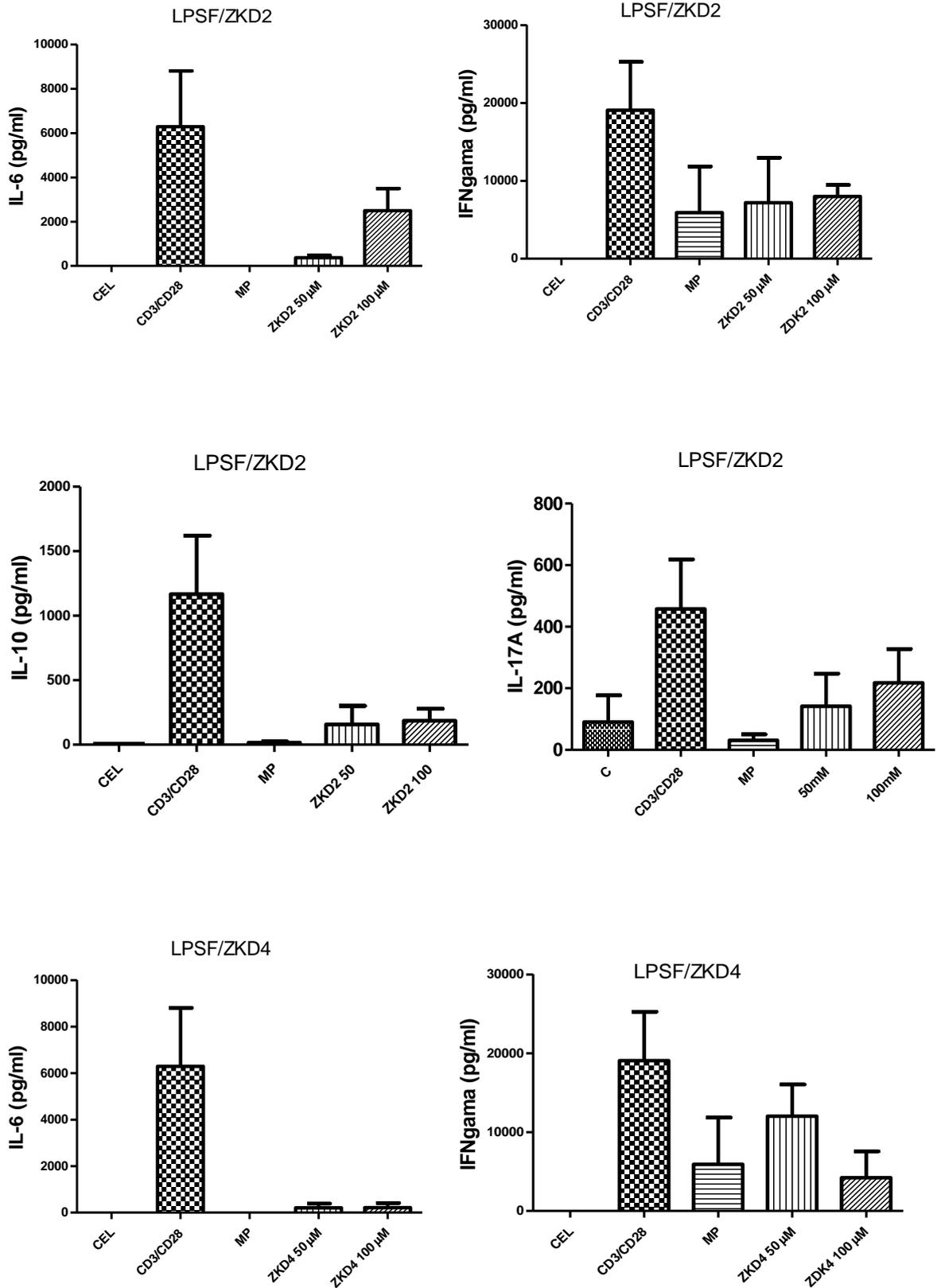
| Concentração | LPSF/ZKD2 | LPSF/ZKD4 | LPSF/ZKD7 |
|--------------|------------|-------------|--------------|
| 50µM | 100 ± 2,17 | 95,6 ± 3,26 | 92,75 ± 4,37 |
| 100µM | 100 ± 3,67 | 96,6 ± 2,75 | 96,40 ± 6,82 |

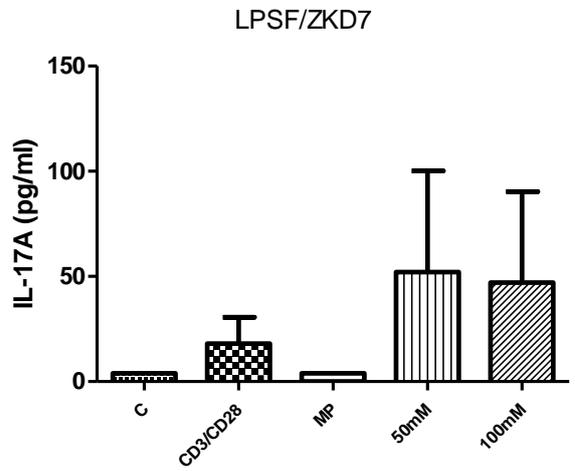
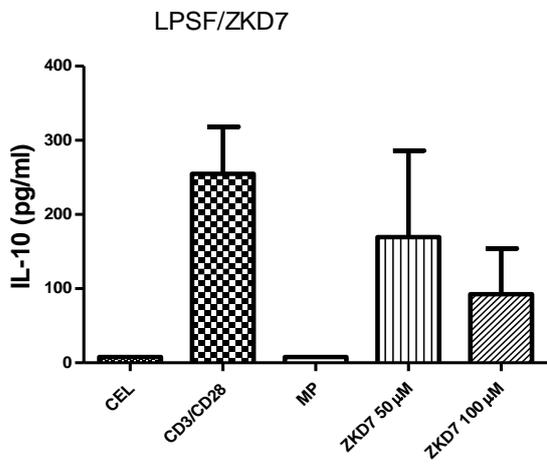
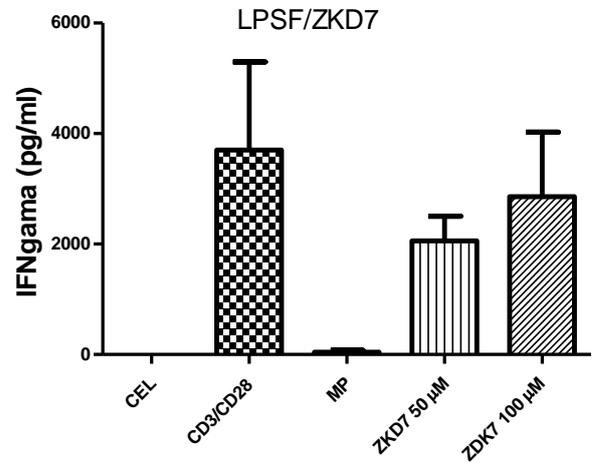
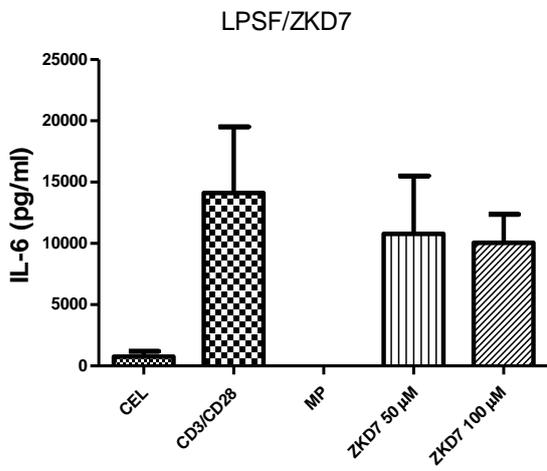
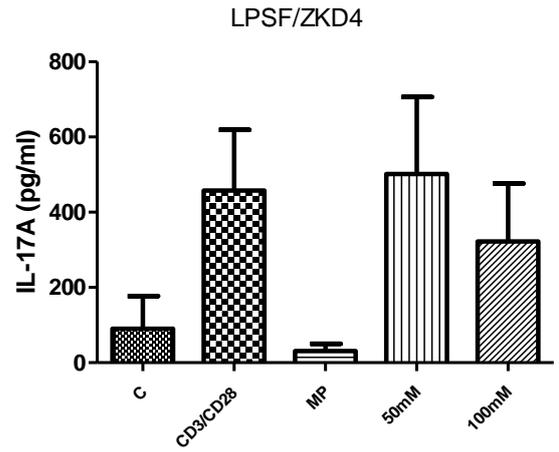
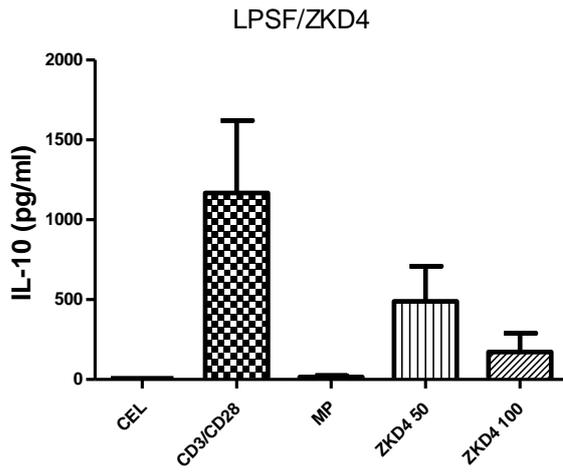
4.4.2 Ensaio de citocinas

No gráfico 1 expõem-se a resposta inibitória dos compostos tiazquinolínicos em relação as citocinas IL-6, IL-17A, IL-10 e IFN-γ. Embora a estatística não tenha sido significativa, provavelmente devido à baixa amostragem, $n=3$, esses resultados instigam uma melhor investigação. Todos os compostos LPSF/ZKD2, LPSF/ZKD4 e LPSF/ZKD7 apresentaram inibição de secreção das citocinas quando comparado ao estímulo, entretanto quando comparado ao resultado do controle positivo (metilprednisolona), o LPSF/ZKD4 e o LPSF/ZKD2 obtiveram resultados próximos ao controle.

Avaliando a atuação de cada composto em inibir determinada citocina o LPSF/ZKD2 apresentou melhor resultado para IL-6 a 50µM; o LPSF/ZKD4 atuou melhor no IL-6 e IL-10, enquanto que o LPSF/ZKD7 teve melhor desempenho ao inibir IL-10 na concentração de 100µM e observa-se também, uma tendência desse último composto, em inibir com melhor desempenho em concentrações menores a 50µM, o que pode ser investigado.

Gráfico 1 – Resultados da modulação das citocinas IL-17A, IL-6, IL-10 e IFN- γ





O quadro 8 apresenta o percentual de inibição da avaliação da modulação de citocinas, baseado na média das concentrações, promovida pelos compostos. Isoladamente os melhores resultados compreendem a inibição do LPSF/ZKD2 em 94,17% para IL-6, 69,06% para IL-17A, o LPSF/ZKD4 em 96,82% para IL-6 e 77,88% para IFN- γ e na inibição da citocina regulatória, IL-10, o LPSF/ZKD7 exibiu 33,41%.

Quadro 8 – Valores em porcentagem de inibição dos compostos em relação ao estímulo

| Compostos | IL-6 | IFN- γ | IL-17A | IL-10 |
|-----------------------|--------|---------------|--------|--------|
| LPSF/ZKD2 50 μ M | 94,17% | 62,28% | 69,06% | 98,50% |
| LPSF/ZKD2 100 μ M | 60,36% | 58,12% | 52,40% | 84,11% |
| LPSF/ZKD4 50 μ M | 96,82% | 36,94% | --- | 58,11% |
| LPSF/ZKD4 100 μ M | 96,69% | 77,88% | 29,54% | 85,26% |
| LPSF/ZKD7 50 μ M | 23,72% | 44,45% | --- | 33,41% |
| LPSF/ZKD7 100 μ M | 28,88% | 22,77% | --- | 63,71% |

Em verde, valores acima de 60% de inibição; em vermelho, não houve inibição; em amarelo, valores abaixo de 30% de inibição.

Resultados semelhantes são observados no trabalho de 2013, uma série de compostos com anel quinolínico, os quais foram avaliados sua ação anti-inflamatória a partir da inibição de TNF- α e IL-6. Foram realizados testes de ELISA do sobrenadante de 24h, de cultura de células THP-1, estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*. Os derivados com melhor atuação, a 10 μ M inibiu a IL-6 entre 80-96%, compostos na figura 28 (KECHE, 2013).

Em 2015, Wen *et. al.* sintetizaram vários derivados quinolínicos. Aquele que melhor respondeu a testes de inibição de atividade anti-inflamatória e não apresentou citotoxicidade celular no teste de MTT, passou para uma avaliação imunomoduladora, composto na figura 28. Em cultura de RAW264.7 estimuladas com LPS de *Escherichia coli*, em sobrenadante de 24h, foi realizado ELISA de TNF- α e IL-6 de rato. O gráfico 2 mostra a inibição de TNF- α e IL-6 nas concentrações de 10 μ g/ml, 20 μ g/ml e 40 μ g/ml, sendo a maior concentração responsável por inibir em maior quantidade as citocinas. Embora não apresentado no artigo, mas levando em consideração apenas as informações no gráfico, o resultado de inibição pode ser próximo de 42% (40 μ g/ml) para IL-6, em relação ao estímulo.

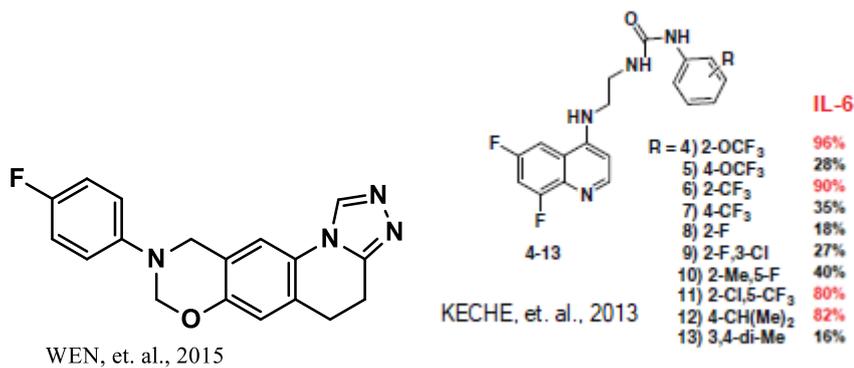
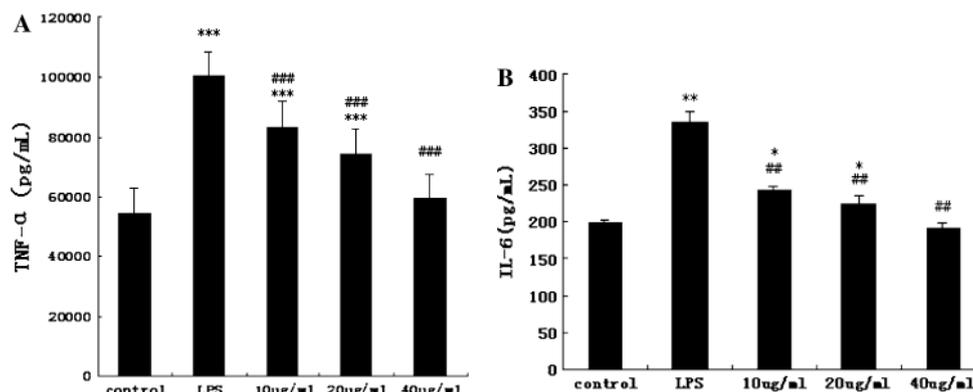
Figura 28 – Derivados quinolínicos com inibição IL-6 e TNF- γ 

Gráfico 2 – Resposta imunomoduladora do derivado quinolínico



FONTE: WEN, et. al., 2015

Os compostos tiazoloquinolínicos responsáveis pela melhor atuação em inibir as citocinas IL-6, IFN- γ e IL-10 foram o LPSF/ZKD2 a 50 μ M e o LPSF/ZKD4 a 100 μ M com valores de 94%, 62%, 98% e 96%, 77%, 85%, respectivamente por citocina e composto. Enquanto para a IL-17A, o composto LPSF/ZKD2 a 50 μ M apresentou a melhor resposta (quadro 8).

A interessante atuação dos derivados tiazoloquinolínicos em inibir IL-6 e IFN- γ se sobressai a aparente resposta negativa vista com o baixo nível de IL-10, citocina de ação anti-inflamatória. A princípio, pensa-se que um bom composto deve atuar bem em citocinas pró-inflamatórias e não agir nas anti-inflamatórias, entretanto, como algumas vias de respostas a estímulos são interligadas, em um teste *in vitro* não poderia ser diferente.

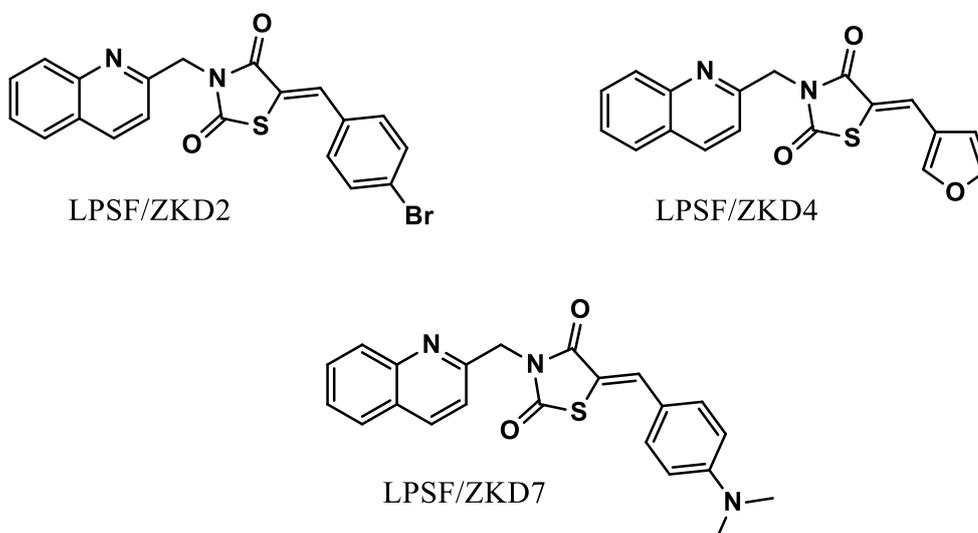
De alguma forma, esses compostos atuaram na via de sinalização relacionada ao IFN- γ , IL-6 e IL-10, observado pela baixa concentração de IFN- γ e IL-6, entretanto, sua interferência na concentração da IL-10 pode ocorrer, possivelmente, de forma

indireta, ao diminuir a excreção de citocinas pró-inflamatórias no meio celular, as células por sua vez, diminuem a resposta do *feedback* negativo relacionada a atuação da IL-10, por consequência haverá uma diminuição da concentração dessa citocina.

Outros resultados encontrados na literatura de compostos quinolínicos adicionados a anéis nitrogenados e com atividade anti-inflamatória, dão robustez aos resultados aqui apresentados. O esquema 12 traz apenas os trabalhos com núcleos nitrogenados, para contextualizar a importância do anel tiazolidinadiona, por esse ser constituído de um anel de cinco membros nitrogenado (SILVA, 2017).

A parte estrutural das moléculas LPSF/ZKD2, LPSF/ZKD4 e LPSF/ZKD7 compreendem um anel quinolínicos, um anel de cinco membros nitrogenado (TZD), elementos eletronegativos, anel benzil substituído ou não e furano (figura 29).

Figura 29 – Derivados LPSF/ZKDs



No esquema 12, encontram-se as estruturas moleculares de alguns derivados quinolínicos que obtiveram resultados anti-inflamatórios. Esses derivados apresentam em sua estrutura molecular elementos presentes nos LPSF/ZKDs como: anel benzil, átomos eletronegativos (O, Cl, F, Br) e o nitrogênio marcadamente (CHAABAN, 2018; EL-FEKY, 2014; ALAM, 2011).

Embora nenhum trabalho apresentado tenha utilizado a mesma metodologia que os LPSF/ZKDs, para avaliar a atividade anti-inflamatória, esses resultados mostram exemplos de moléculas, com núcleo quinolínicos e anéis nitrogenados com atividade anti-inflamatória, induzindo novas pesquisas com possível descoberta de um fármaco.

A maioria dos exemplos dos compostos no esquema 12 utilizaram o teste de edema da pata do rato induzido por carragenina, diferindo entre si o último horário de obtenção de dados. A metodologia utilizada pelos compostos LPSF/ZKDs avaliou a imunomodulação de citocinas envolvidas na cascata da inflamação, através de cultura de PBMCs e quantificou as citocinas pelo método de ELISA, mas que embora metodologias diferentes, pontua-se características estruturais em comum, que podem favorecer a atividade.

Quando se analisa os mesmos compostos, por exemplo, no trabalho de Gupta e Mishra (2016), os derivados do **tetrazol** (anel de cinco membros com quatro nitrogênios) conjugado a quinolina, possuem resultados melhores quando os substituintes são oxigenados; enquanto que a mudança para cloro (49%) e bromo (30%) contribuem para um efeito de inibição moderado, em relação aos maiores índices de inibição (60%, 59%) (esquema 12). Resultados semelhantes são atribuídos ao LPSF/ZKD4 a 100µM (IL-6 – 96%) que possui o furano como substituinte, apresentando melhor efeito modulador, seguido do LPSF/ZKD2 a 100µM (IL-6 – 60%) com substituinte bromobenzil e por fim o LPSF/ZKD7 a 100µM (IL-6 – 28%) com a amina.

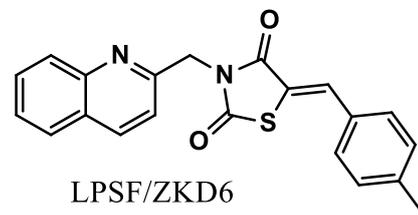
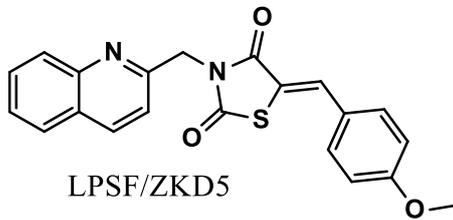
Outra característica interessante é observada no trabalho de Alam e colaboradores (2011), com derivados do **triazol** (anel de cinco membros com três nitrogênios) onde percebe-se que os compostos benzil-substituídos apresentaram atividade melhores (75%, 72%, 71%) do que aquele não substituído (19%) (esquema 12).

A mudança de posição do mesmo substituinte no anel benzil parece não surtir efeito sobre a atividade inibitória, como apresentado pelos compostos do trabalho de El-Feky *et.al.* (2014) em derivados **benzimidazol** (esquema 12). Os substituintes *para*-metóxibenzil e *orto*-metóxibenzil inibiram a atividade inflamatória em 55%, entretanto a mudança da saída do elemento eletronegativo no composto *para*-metilbenzil diminui o resultado para 52%.

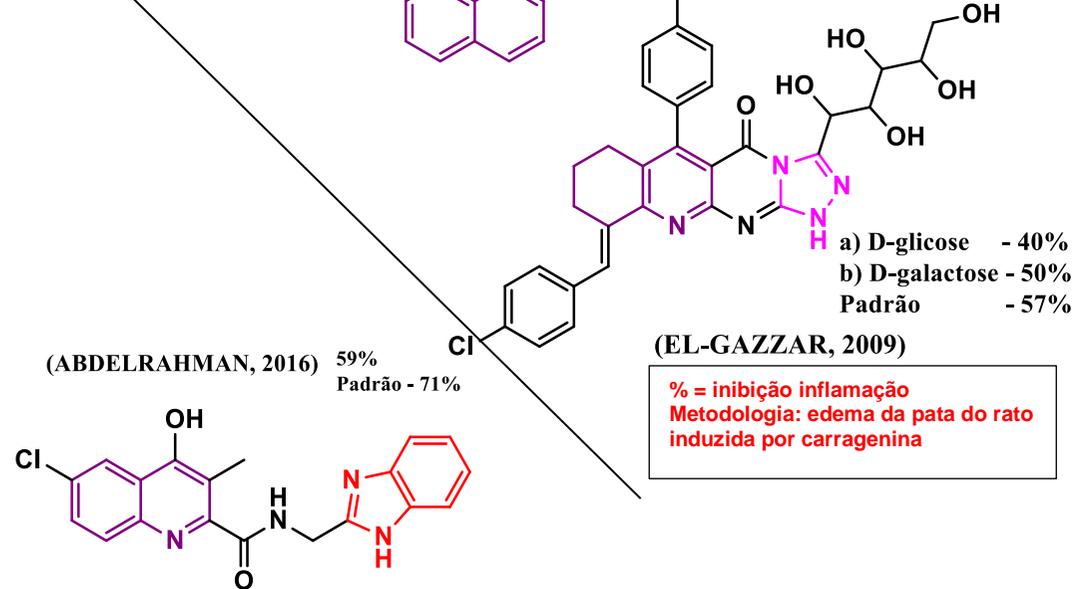
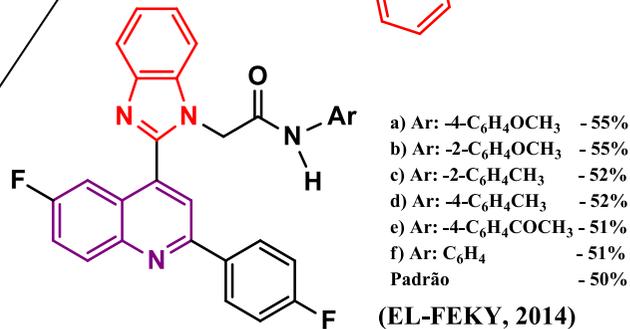
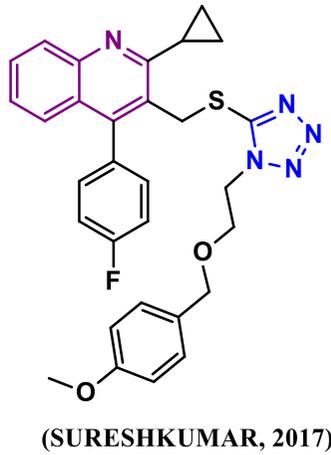
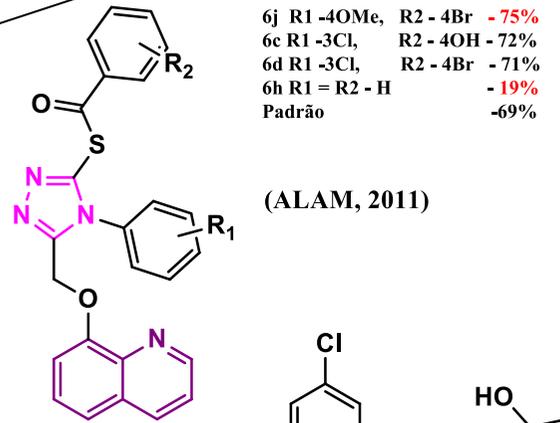
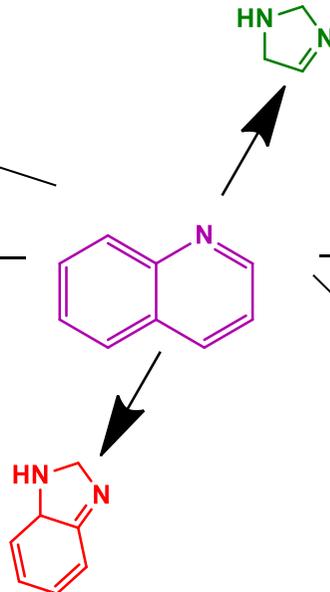
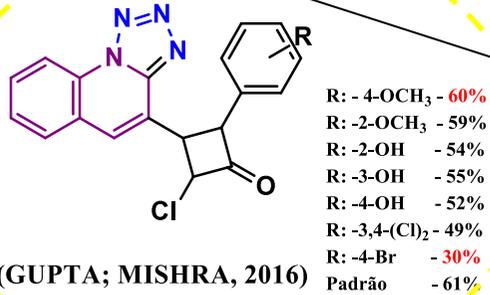
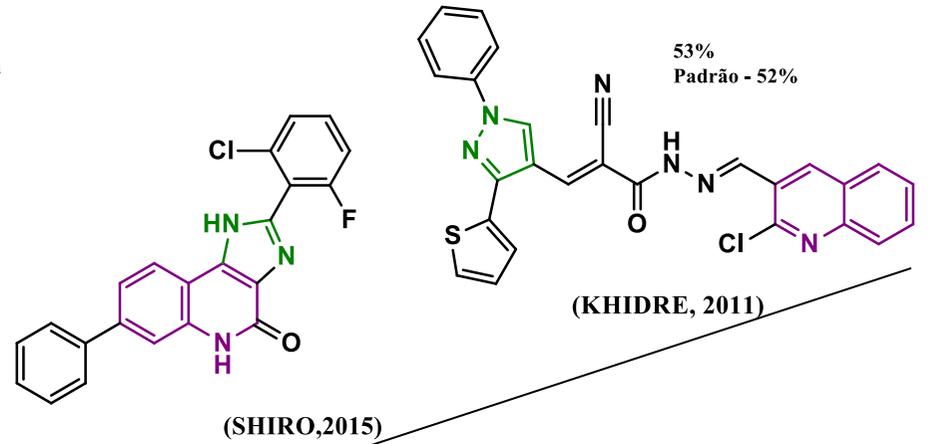
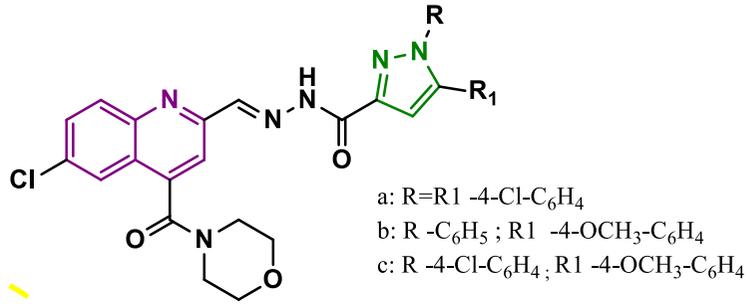
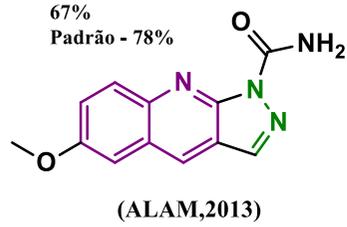
Partindo desse princípio, os compostos LPSF/ZKD5 e LPSF/ZKD6 (figura 30) contemplam tais características, sendo propensos apresentar um efeito modulador em citocinas relacionadas a vias de sinalização da inflamação. Entretanto, os resultados entre eles podem diferir devido sua estrutura, pois como relevantes as características dos compostos do esquema 12, infere-se que o LPSF/ZKD5 obterá um resultado

melhor, possivelmente, devido seu substituinte metóxi no anel benzil do que o LPSF/ZKD6 que possui o metil como substituinte no anel benzil.

Figura 30 – Derivados LPSF/ZKDs



Esquema 12 – Derivados quinolínicos com anéis nitrogenados com atividade anti-inflamatória



% = inibição inflamação
Metodologia: edema da pata do rato induzida por carragenina

5 CONCLUSÕES

Sintetizaram-se todos os compostos com valores de rendimento que variaram entre 38 - 84% e suas estruturas químicas foram validadas através das técnicas espectroscópicas de RMN¹H e ¹³C e IV.

Os compostos LPSF/ZKD2, LPSF/ZKD4 e LPSF/ZKD7 não se mostraram tóxicos em PBMCs de voluntários sadios, com viabilidade acima de 90%.

Resultados preliminares indicam que os derivados tiazoloquinolínicos podem modular a expressão das citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ e talvez, menos enfática em IL-17A, apresentando um resultado mais expressivo os compostos ZKD2 50 μ M e ZKD4 a 100 μ M.

6 PERSPECTIVAS

Ampliar o “n” de voluntários saudáveis para confirmar os dados do efeito dos derivados tiazoloquinolínicos na imunomodulação.

Avaliar as moléculas LPSF/ZKD5 e LPSF/ZKD6 quanto a citotoxicidade e, se não tóxica, avaliar a resposta dessas moléculas na modulação das citocinas citadas.

Elaborar um artigo para tornar mais visível os resultados aqui encontrados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, E. et al. New quinazolinone e pyrimidine hybrids : Synthesis , anti inflammatory , and ulcerogenicity studies. **European journal of medicinal chemistry**. v. 53, 2012.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Editora: Elsevier, 8ª edição, 2015.
- ABDELRAHMAN, M. H., YOUSSEF, B. G. M., ABDELGAWAD, M. A. et al. Synthesis, biological evaluation, docking study and ulcerogenicity profiling of some novel quinoline-2-carboxamides as dual COXs/LOX inhibitors endowed with anti-inflammatory activity . **European Journal of Medicinal Chemistry**, p 1-14, 2016.
- AGARWAL, D.; GUPTA, R. D.; AWASTHI, K. Are Antimalarial Hybrid Molecules a Close Reality or a Distant Dream ? **Antimicrobial Agents and chemotherapy**. v. 61, n. 5, p. 1–12, 2017.
- ALAGAWADI, K. R.; ALEGAON, S. G. Synthesis , characterization and antimicrobial activity evaluation of new 2 , 4-Thiazolidinediones bearing imidazo [2 , 1- b][1 , 3 , 4] thiadiazole moiety. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 465–472, 2011.
- ALAM, M. M., SHAHARYAR, M., HAMID, H. et al. Synthesis of novel 8-hydroxy quinolin based 1,3,4-oxadiazoles and S-substituted 1,2,4-triazole derivatives and evaluation of their anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and anti-microbial activities. **Med Chem**, 7(6), p 663-73, 2011.
- ALAM, M. M., MORELLA, A., AKHTAR, M. et al. Microwave assisted one pot synthesis of some pyrazole derivatives as a safer anti-inflammatory and analgesic agents. **Acta Pol Pharm**, 70(3), p 435-41, 2013.
- ALI, A. M. et al. Synthesis and Three-dimensional Qualitative Structure Selectivity Derivatives As COX2 Inhibitors. **Arch Pharm Res**, v. 30, n. 10, p. 1186–1204, 2007.
- ANTONELLI, M.; KUSHNER, I. It's time to redefine inflammation. **The FASEB journal**. vol 31, 2017.
- BERINGER, A.; NOACK, M.; MIOSSEC, P. IL-17 in Chronic Inflammation : From Discovery to Targeting. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 230–241, 2016.
- BHAT, B. A. et al. Synthesis and antihyperglycemic activity profiles of novel thiazolidinedione derivatives q. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6534, p. 5857–5864, 2004.
- BOZIMOWSKI, G. A Review of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **AANA journal**, v. 83, n. 6, p. 425–33, 2015.
- BRUNO, G. et al. Synthesis and Aldose Reductase Inhibitory Activity of. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. October 1999, p. 1077–1084, 2002.

CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists : time for a reassessment. **Trends in endocrinology and metabolism**. 23, n. 5, p. 205–215, 2012.

CÉSAR, F. A. et al. New indole-thiazolidine attenuates atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 174–180, 2015.

CHAABAN, I. et. al. Bioorganic chemistry synthesis, anti-inflammatory screening, molecular docking, and COX-1,-2/-5-LOX inhibition profile of some novel quinoline derivatives. **Bioorganic chemistry**, v. 78, p. 220-235, 2018.

CHADHA, N. et al. Thiazolidine-2 , 4-dione derivatives : Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 2953–2974, 2015.

CHEN, L. et. al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, vol 9, n 6, 2018.

CHOUDHARY, S. et al. Success stories of natural product-based hybrid molecules for multi- factorial diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 62–97, 2018.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciados agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.** vol1, n 3 , 241- 256, 2009.

CUNHA, S.; SANTANA, L. L. B. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de Meldrum em água: uma aula experimental de química orgânica verde. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 23–32, 2012.

DADASAHEB, K. et al. Design synthesis and evaluation of novel thiazolidinedione derivatives as antidiabetic agents. **The Pharma Innovation Journal**, v. 6, n. 12, p. 390–398, 2017.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature reviews - immunology**. vol 15, 2015.

EL-FEKY, S. A., THABET, H. K., UBEID, M. T. Synthesis, molecular modeling and anti-inflammatory screening of novel fluorinated quinoline incorporated benzimidazole derivatives using the Pfitzinger reaction. **Journal of Fluorine Chemistry**, 161, p. 87–94, 2014.

EL-GAZZAR, A. B. A., HAFEZ, H. N., NAWWAR, G. A. M. New acyclic nucleosides analogues as potential analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-microbial derived from pyrimido[4,5-b]quinolines. **Eur J Med Chem**, 44(4), p 1427-36, 2009.

FERREIRA, L. et al. 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 Research International**, v. 2013, 2013.

FIRMO, W. C. A, et. al. Contexto histórico, uso popular e concepções científicas sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. especial, dez. 2011

FOUGÈRE, B.; BOULANGER, E.; NOURHASHÉMI, F.; GUYONNET, S.; CESARI, M. Chronic inflammation: accelerator of biological aging. **Journal of gerontology: Medical Sciences**. vol 72, n 9, 2017.

GABRIELLE, A. et al. Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and atherosclerosis development in LDLr^{-/-} mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, n. June, p. 622–631, 2016.

GAN, S. D., PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Investigative Dermatology**, p 133, 2013.

GIAGINIS, C.; GIAGINI, A.; THEOCHARIS, S. Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 160–169, 2009.

GÓMEZ-ACEBO, I. et al. Epidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs consumption in Spain. The MCC-Spain study. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1134, 79, 2018.

GUPTA, S. K.; MISHRA, A. Synthesis, Characterization & Screening for Anti-Inflammatory & Analgesic Activity of Quinoline Derivatives Bearing Azetidiones Scaffolds. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, p. 31–43, 2016.

HAŁADYJ, E. et al. Antimalarials – are they effective and safe in rheumatic diseases ? **Reumatologia**, p. 164–173, 2018.

HAMBURG, J. P. VAN; TAS, S. W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 87, p. 69–81, 2018.

HOLTEN, J. VAN; PLATER-ZYBERK, C.; TAK, P. P. Interferon- β for treatment of rheumatoid arthritis ? **Arthritis Research**, v. 4, n. 6, p. 346–352, 2002.

JOSHI, S. D. et al. Quinoline: a promising and versatile scaffold for future. **Indo Americam Journal of Pharmaceutical Research**. v. 6, n. 4, 2016.

KAMINSKY, DANYLO ; KHLYUK , DMYTRO; VASYLENKO , OLEXANDR ; ZAPRUTKO, LUCJUSZ; LESYK, R. A Facile Synthesis and Anticancer Activity Evaluation of spiro[thiazolidinone-isatin] conjugates. **Scientia Pharmaceutica**. 79, 763-777, 2011.

KATEGAONKAR, A. H. et al. Synthesis and biological evaluation of new 2-chloro-3-derivatives via click chemistry approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 3142–3146, 2010.

KHAN, Y. S.; GUTIÉRREZ-DE-TERÁN, H.; ÅQVIST, J. Molecular Mechanisms in the Selectivity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1236–1248, 2018.

KECHE, A. P.; HATNAPURE, G. D.; TALE, R. H.; BIRAJDAR, S. S.; KAMBLE, V. M. Synthesis anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of novel N1-(quinolin-4yl)ethane-1,2-diamine phenyl urea derivatives. **Medicinal chemistry research**, 22: 1480-1487, 2013.

KHIDRE, R. E., ABDEL-WAHAB, B. F., BADRIA, F. A. New Quinoline-Based Compounds for Analgesic and Anti-Inflammatory Evaluation. **Letters in Drug Design & Discovery**, 8, p. 640-648, 2011.

KUMAR, S. et al. Novel quinolone substituted thiazolidin-4-ones as anti-inflammatory, anticancer agents : Design , synthesis and biological screening. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 589–602, 2013.

KUMAR, V. et al. Synthesis and antimicrobial activity of thiazolidinone norfloxacin hybrids. v. 50, n. October, p. 1496–1503, 2011.

LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutrition Reviews**. vol 65. n12, 2007.

LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Revista Universidade Rural Ser. Ciênc. Exatas e da Terra**, v. vol 18, p. 1–8, 1998.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings i. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 2012.

MADDUR, M. S.; MIOSSEC, P.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. Biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases and therapeutic strategies. **The american journal of pathology**, vol 181, n1, 2012.

MARELLA, A. et al. Quinoline : A versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol 454. 2008.

MISHRA, S.; SINGH, P. Hybrid molecules : The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 500–536, 2016.

MOHSIN, A.; AHMAD, M. Hybrid organic molecules as antiinflammatory agents ; a review of structural. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 42, p. 1–20, 2018.

MOURA, M. D. G. et. al. Use of steroid and nonsteroidal anti-inflammatories in the treatment of rheumatoid arthritis. **Medicine**, 97 (41), 2018.

NOACK, M.; MIOSSEC, P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 4, p. 365–383, 2017.

PAGE, F. Treatment of Lupus erythematosus with mepacrine. **The Lancet**, p. 755–758, 1951.

PARADOWSKA, A. et al. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 329–334, 2007.

PEREIRA, C. M. P.; SIQUEIRA, G. M.; CUNICO, W. Sonochemistry : A good , fast and clean method to promote the synthesis of 5-arylidene-2 , 4-thiazolidinediones. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1615–1617, 2014.

PINHEIRO, D. S. et al. Optimized synthesis and characterization of thiazolidine-2 , 4-dione for pharmaceutical application. **MOJ Bioorganic & Organic Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 122–126, 2017.

POMEL, V. et. al. Furan-2-ylmethylene Thiazolidinediones as Novel, Potent, and Selective Inhibitors of Phosphoinositide 3-Kinase γ . **J. Med. Chem**, 49, 3857-3871, 2006.

PRABHAKAR, C. et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Thiazolidinediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2725–2730, 1998.

RAJ, R. et al. 7-Chloroquinoline – isatin Conjugates : Antimalarial , Antitubercular , and Cytotoxic Evaluation. p. 622–629, 2014.

RAJASHAKAR, V.; NAGESWARRAO, S.; ESWARAIHAH, M. C. SYNTHESIS OF NOVEL PYRAZOLYL-2,4-THIAZOLIDINEDIONES AS ANTI INFLAMMATORY AND ANTI DIABETIC ACTIVITY. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 533–540, 2018.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; MOORE, P.K. Farmacologia. Editora: Elsevier, 5ª edição, 2004.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

ROJAS, F. A. et al. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 15, p. 4562–4573, 2011.

SANGANI, C. B. et al. Design , synthesis and molecular modeling of pyrazole e quinoline e pyridine hybrids as a new class of antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 549–557, 2014.

SCHINNERLING, K.; AGUILLÓN, J. C.; CATALÁN, D.; SOTO, L. The role of interleukin-6 signalling and its therapeutic blockag in skewing the T cell balance in rheumatoid arthritis. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, 189, 12-20, 2017.

SCHULKE, STEFAN. Induction of interleukin-10 producing dendritic cell as a tool to suppress allergespecific T helper 2 responses. **Frontiers in immunology**, 2018.
SCHURGERS, E.; BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Collagen-Induced Arthritis as an Animal Model for Rheumatoid Arthritis : Focus on Interferon- g. **JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH**, v. 31, n. 12, 2011.

SHELKE, K. F. et al. A facile and efficient synthesis of 5-arylidene 2 , 4-thiazolidinedione catalyzed by acidic ionic liquid. **Scholars Research Library**, v. 8, n. 5, p. 72–75, 2016.

SHIRO, T., FUKAYA, T., TOBE, M. The chemistry and biological activity of heterocycle-fused quinolinone derivatives: A review. **Eur J Med Chem.** ,97, p 397-408, 2015.

SILVA, S. E. B.; ALMEIDA, M. L.; PITTA, I. R.; PITTA, M. G. R. et al. Quinolininas: promissores scaffolds para futuros agentes antiinflamatórios. In: ANAIS DO 5º ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA, 2017, Recife. **Anais eletrônicos**. Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/ebit/ebit-2017/trabalhos/quinolininas%3A-promissores-scaffolds-para-futuros-agentes-antiinflamatorios>>. Acesso em: junho 2019.

SINGH, S. K.; SINGH, S. A Brief History of Quinoline as Antimalarial Agents. v. 25, n. 50, p. 295–302, 2014.

SOLEIMANI, E. et al. An Efficient Approach to Quinolines via Friedländer Synthesis Catalyzed by Cuprous Triflate. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, n. 2, 2010.

SRIVASTAVA, V.; LEE, H. Chloroquine-based hybrid molecules as promising novel chemotherapeutic agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 472–486, 2015.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability : Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 785–796, 2012.

SUCHETA, S. T.; VERMA, P. K. Synthesis, SAR and in vitro therapeutic potencial of thiazolidine-2,4-diones. *Chemistry central journal*, 12:129, 2019.

SUGIMOTO, M. A.; SOUSA, L.P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: what controls its onset? **Frontiers in immunology**, vol 7, 2016.

SURESHKUMAR, K., MAHESHWARAN, V., RAO, T. D, THEMILIA, K., PONNUSWAMY, M. N., KADHIRVEL, S., DHANDAYUTHAM S. Synthesis, characterization, crystal structure, in-vitro antiinflammatory and molecular docking studies of 5-mercapto-1-substituted tetrazole incorporated quinoline derivative. **Journal of Molecular Structure**, 1146, p. 314-323, 2017.

TAK, P. P. IFN-BETA IN RHEUMATOID ARTHRITIS. **Frontiers in Bioscience**, n. 7, p. 3242–3247, 2004.

- THOMAS, K. D. et al. Amidopiperazines as potential antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2503–2512, 2011.
- TSUJIMOTO, S. et al. The prevalence of endoscopic gastric mucosal damage in patients with rheumatoid arthritis. **Journal PLOS ONE**, p. 1–11, 2018.
- TUKULULA, M. et al. Synthesis and in Vitro and in Vivo Pharmacological Evaluation of New 4 - Aminoquinoline-Based Compounds. **Medical chemistry Letters**, p. 1198–1202, 2013.
- WEN, X.; WANG, Shi-Ben.; LIU, Da-Chuan.; GONG, Guo-Hua.; QUAN, Zhen-Shan. Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory activity of quinoline derivatives. **Med chem Res**, 24:2591-2603, 2015.
- VANDEKERCKHOVE, S.; MATTHIAS, D. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 5098–5119, 2015.
- VANDEWALLE, J. et al. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42–54, 2018.
- YAMASHKIN, S. A.; ORESHKINA, E. A. Traditional and modern approaches to the synthesis of quinoline systems by the skraup and doebner – miller methods. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 42, n. 6, p. 701–718, 2006.
- ZHANG, L.; WANG, C. Inflammation response of macrophages in infection. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, vol 13, n 2, 2014.

ANEXO A – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1 SÍNTESE DE TZD

1.1 PROCEDIMENTO

Misturou-se a tioureia (0,13mol) e 80ml de água em um balão de fundo redondo, sobre agitação a temperatura ambiente até completa solubilidade do reagente. Após, acrescentou-se o ácido 2-cloroacético (0,13mol) e completou o volume do solvente para 200ml. Ligou-se o aquecimento até atingir e estabilizar em 90°C.

Esta síntese permaneceu por 24h. Terminado o tempo, desligou-se a chapa e verteu-se todo o conteúdo para um becker identificado, à medida que a temperatura baixava, os cristais foram se formando. Deixou-se o becker na geladeira, pois a baixa temperatura do solvente aumenta a formação dos cristais.

No dia seguinte, filtraram-se e lavaram-se os cristais com água gelada. Esperou-se secar os cristais para realizar o teste de pureza no HPLC. Após confirmar o alto grau de pureza, pesa-se para calcular o rendimento e em seguida, confirma-se a estrutura a partir de RMN ¹H e ¹³C, infra-vermelho e espectro de massa.

2 SÍNTESE DOS DERIVADOS 5-BENZILIDENO-2,4-TIAZOLIDINADIONA - GQs

2.1 PROCEDIMENTO GERAL

Misturou-se em um balão de fundo redondo de duas bocas, a TZD (1,2eq), os aldeídos correspondentes (1eq) e o volume de ácido acético calculado pela proporção de 1mmol de reagente – 4ml solvente. Deixou-se sobre agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, acrescentou-se a acetato de amônio (1eq) e ligou-se o aquecimento para atingir e permanecer a 110°C, sobre refluxo por 6-18h.

Todas as sínteses foram acompanhadas por CCD e HPLC. O sistema CCD utilizado foi hexano:acetato de etila (7:3).

3 SÍNTESE DOS TIAZOQUINOLÍNICOS - ZKDs

3.1 PROCEDIMENTO GERAL

Misturou-se em um balão de fundo redondo, o composto intermediário (1eq), o hidróxido de sódio (5eq) e 10 ml de etanol, sobre agitação, a temperatura ambiente por 20 minutos. Após os vinte minutos, acrescentou-se o 2-clorometil-quinolina (1eq) (fotossensível) e ligou-se o aquecimento para atingir e estabilizar a 70°C, permanecendo sobre refluxo por h. Toda a reação foi realizada na ausência de luz.

Todas as sínteses foram acompanhadas por CCD e HPLC. O sistema CCD utilizado foi hexano:acetato de etila (8:2).

4 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Coletou-se o sangue periférico de voluntários saudáveis em tubos de coleta com heparina. Em tubos Falcon de 50ml (BD Falcon TM), contendo 15ml de Ficoll-Hypaque PLUS TM(Amersham Biosciences) foi adicionado lentamente o sangue, na proporção de 1:1 (sangue:Ficoll), de forma inclinada com ângulo aproximado de 45° para criar a separação entre o sangue e o Ficoll. Centrifugou-se por 45 minutos, a 450g, 20°C. Ao término, os tubos apresentaram 4 camadas bem definidas, a saber (de cima para baixo): soro, PBMC (anel leucocitário, branco e pouco espesso), Ficoll e hemácias.

As células foram isoladas e lavadas por centrifugação por duas vezes em PBS 1X, por 7 minutos a 1500g. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 10ml de meio RPMI 1640 (Sigma TM) suplementado (10%SBF), HEPES 10mM (Gibco), penicilina (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 µg/ml), em seguida as células foram contadas na câmara de Neubauer utilizando o corante de azul de Trypan (Sigma TM) em uma diluição 1:4 (40µL do corante, 20µL de PBS 1x e 20µL de células). O valor obtido foi ajustado para a concentração desejada de 10⁶ células/ml.

5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM PBMCs

As PBMCs foram incubadas em placas de 96 poços a 37°C, 5% CO₂, por 48h, na presença dos compostos ZKD2, ZKD7 e ZKD4 com concentrações de 50µM e 100µM por composto. Os compostos foram testados em três ensaios independentes e em triplicata. Após o tempo de incubação, acrescentaram-se 20µL de MTT, protegido da luz. Aguardaram-se mais três horas de incubação, acrescentaram-se 130µL de SDS (duodecil sulfato de sódio). A absorbância foi medida no Espectrofotômetro BioTek EL808, a 570nm.

A citotoxicidade dos compostos nas células foi avaliada pelo valor da absorbância comparado ao grupo controle na presença do solvente dos compostos. Todos os experimentos o grupo controle apresentou > 98% de viabilidade.

6 CULTURA DE CÉLULAS PBMCs PARA AVALIAR A INIBIÇÃO DE CITOCINAS

As PBMCs isoladas e ressuspensas no meio de cultura foram incubadas em placas de 24 poços a 37°C, 5% CO₂, por 48h, na presença dos compostos ZKD2, ZKD7 e ZKD4 com concentrações de 50µM e 100µM por composto. As células foram estimuladas pelos mitógenos com 0,6 µL de CD3 (0,3µg/ml) e 0,8µL de CD28 (0,4µg/ml) por poço. Os compostos foram testados em triplicata. O controle positivo utilizado foi a metilprednisolona (100µM).

Todo o sobrenadante de 48h foi transferido para tubo de 1,5ml identificados e estocados a -80°C para análise, em outro momento, de modulação de citocinas.

7 AVALIAÇÃO DE MODULAÇÃO DE CITOCINAS ATRAVÉS DE ELISA SANDUÍCHE

As citocinas presentes no sobrenadante da cultura celular de 48h foram avaliadas, separadamente, pelo procedimento de Elisa sanduíche. Os kits utilizados para cada citocina seguem uma metodologia padrão, sendo específicos, por citocina pesquisada, os padrões e seus anticorpos.

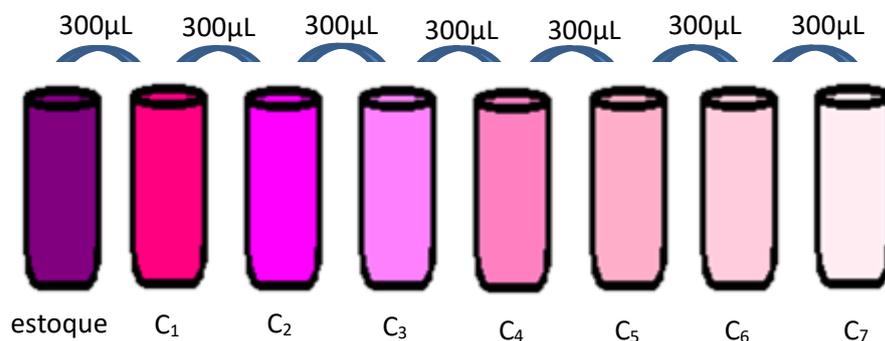
Um plano de placa foi elaborado para identificar cada amostra por poço. Placas com 96 poços foram utilizadas.

PROCEDIMENTO:

Os poços foram preenchidos com 50µL do anticorpo de captura em solução tampão *overnight* a 4°C. No dia seguinte, descartou-se toda a solução e lavou a placa com *wash buffer* (solução de PBS 1X com tween 20 a 0,05%) por três vezes. Preencheu-se com 100µL os poços com *diluent* 1x deixando 1h a temperatura ambiente. Descartou-se o diluente e lavou a placa por duas vezes com o *wash buffer*.

Nota: Enquanto espera, providenciar a solução padrão (estoque) e diluições de acordo com cada kit.

Preparar a curva padrão. Fazer a diluição em cascata do padrão, seguir modelo:



Primeiro reconstituir a solução estoque do padrão conforme o fabricante. Colocar 150µL do diluente em todos os frascos com exceção do frasco estoque. Começar a diluição em cascata, como na figura, sempre do mais concentrado (C₁) para o mais diluído (C₇). Homogeneizar a solução antes de pipetar o volume.

Após decorrido o tempo de 1h e com as diluições do padrão preparadas.

Colocaram-se 50µL de cada padrão nos poços correspondente, 50µL de diluente no branco e 50µL das amostras (sobrenadante da cultura) em cada poço conforme plano de placa.

Plano de placa:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Padrão | Padrão | branco | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | branco | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | branco | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Padrão | Padrão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Incubou-se a placa por 2h a temperatura ambiente. Após, descartou-se todo o sobrenadante e solução padrão, lavou a placa três vezes com *wash buffer*. Acrescentaram-se 50µL do anticorpo de detecção em cada poço e incubou-se por 1h a temperatura ambiente.

Transcorrido o tempo, descartou-se e lavou a placa cinco vezes com *wash buffer*. Acrescentaram-se 50µL de Estreptavidina-HRP em cada poço e incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Após, lavou a placa sete vezes com *wash buffer*.

Acrescentaram-se 50µL de tetrametilbenzidina (TBM) em cada poço e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, parar a reação com 25µL de solução *STOP* (H₂SO₄ 2N).

Leu a placa em um leitor de ELISA a 450nm – 570nm.

ANEXO B – ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

1 DERIVADOS 5-BENZILIDENO-2,4-TIAZOLIDINADIONA - GQs

1.1 COMPOSTO GQ443 - 5-(4-bromobenzilideno)thiazolidina-2,4-diona

Figura 31 – RMN¹H – GQ443

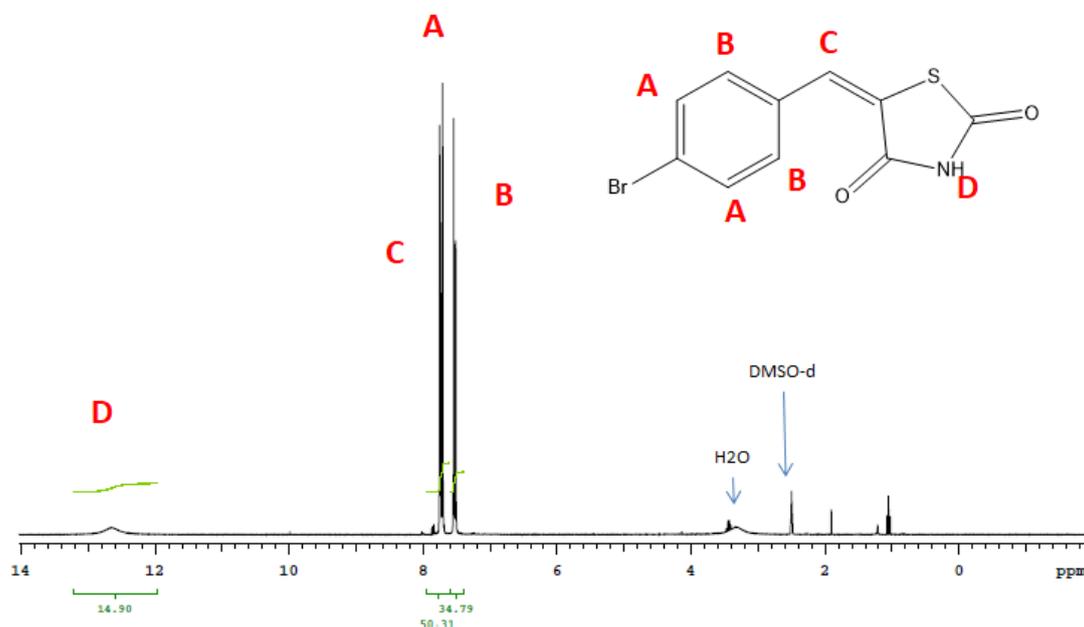
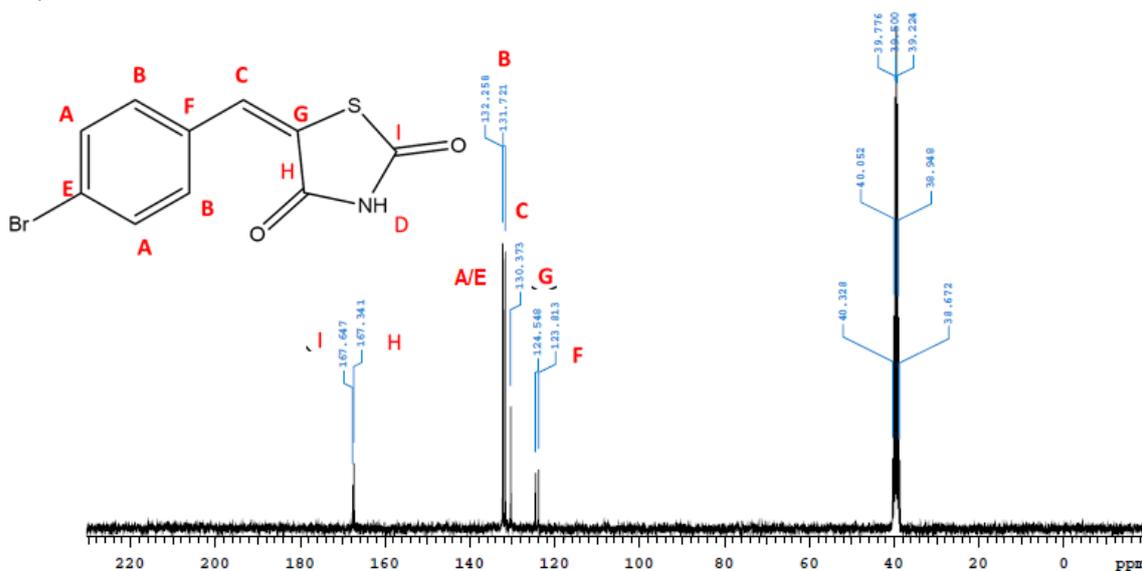


Figura 32 – RMN¹³C – GQ443



RMN¹H (300MHz- DMSO_d₆) : δ = 7,54 (d, 2H, CH aromático); δ = 7,71 (d, 2H, CH aromático); δ = 7,73 (s, 1H, CH); δ = 12,64 (s, 1H, NH). **RMN¹³C** (300MHz – DMSO_d₆): δ = 123,81 (C); δ = 124,54 (C); δ = 130,37 (CH); δ = 131,72 (CH); δ = 132,25 (CH,C); δ = 167,34 (C); δ = 167,64 (C). **Ponto de fusão:** 244,6°C **HPLC:** 8,74 minutos (99,48%).

Figura 33 – Espectro do Infravermelho GQ443

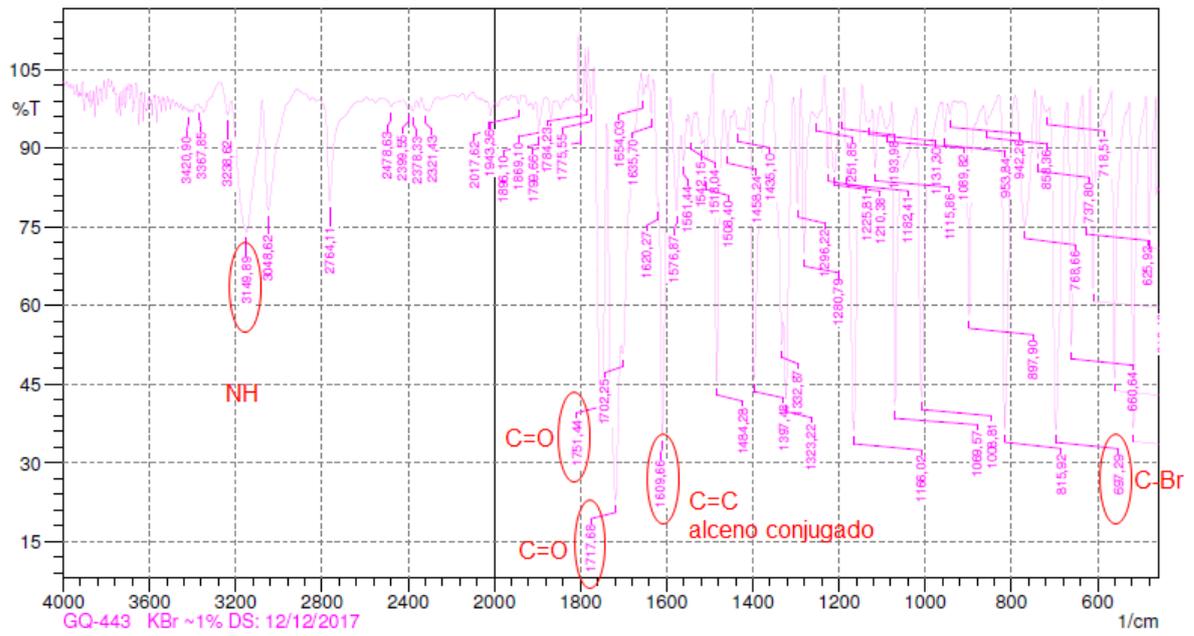
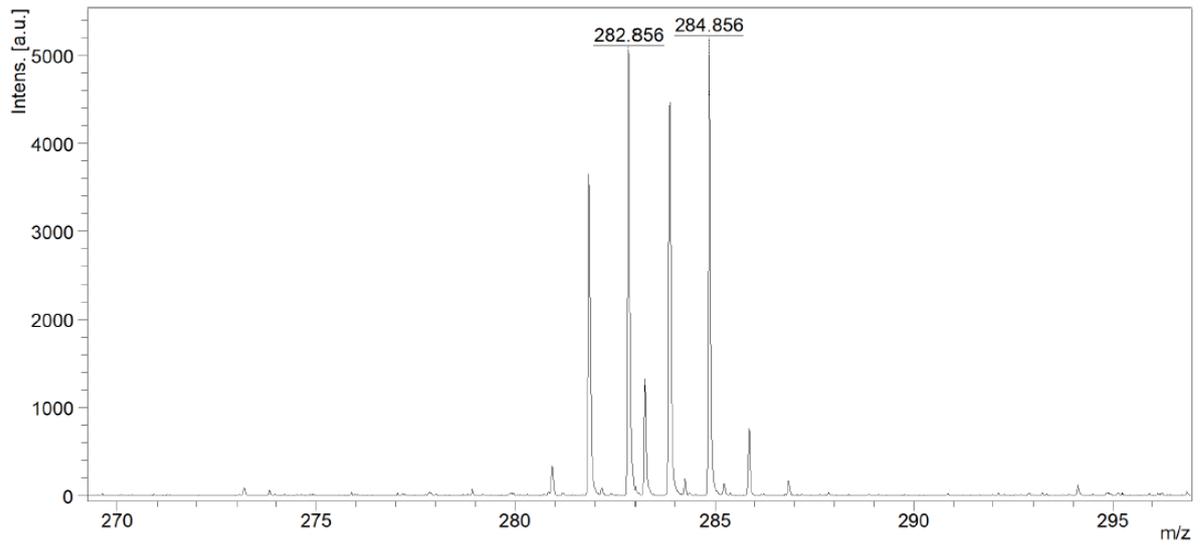


Figura 34 – MALDI-TOF/MS GQ443

Comment 1 Massa molar: 282,9303g/mol
 Comment 2 Isótopos Br: 78,9183 (100%); 80,9163 (97,3%)



1.2 COMPOSTO GQ208 - 5-(4-clorobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona
 Figura 35 – RMN¹H – GQ208

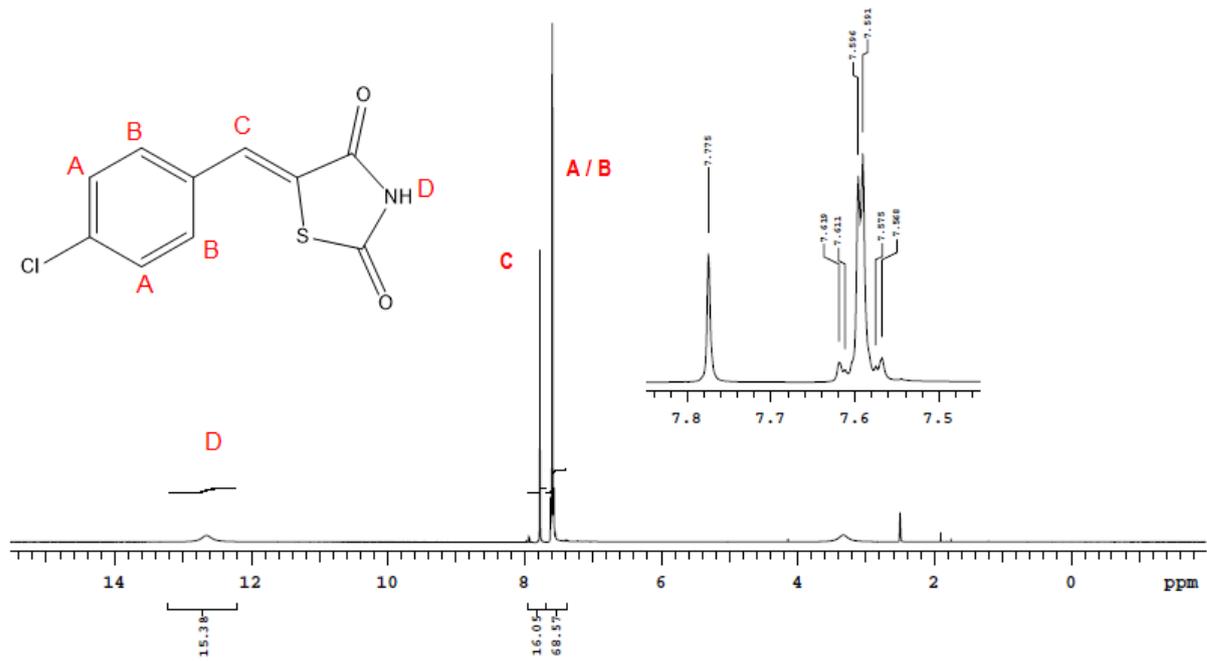
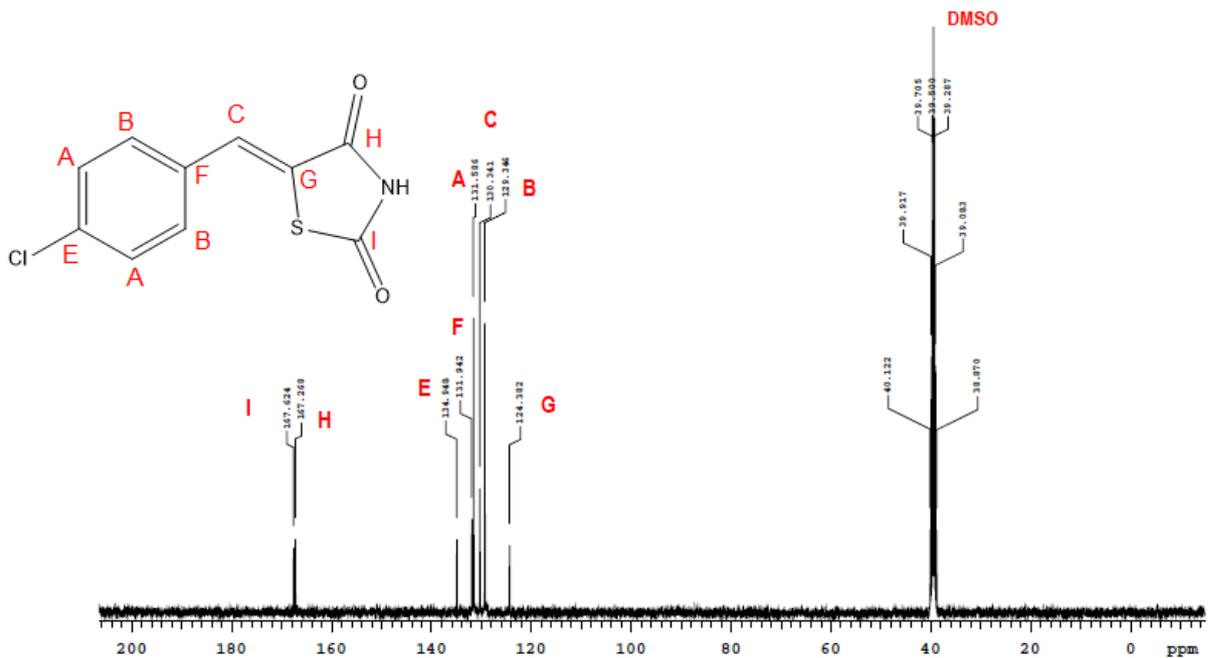


Figura 36 – RMN¹³C – GQ208



RMN¹H (300MHz- DMSO_d₆) : δ= 7,6 (s, 1H, CH) ; δ = 7,77 (s, 1H, CH); δ= 12,65 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C** (300MHz – DMSO_d₆): δ = 124,38 (C); δ = 129,34 (CH); δ = 130,34 (CH); δ = 131,58 (CH); δ = 131,94 (C); δ = 134,94 (C); δ = 167,26 (); δ = 167,62 (C).
Ponto de fusão: 232,5°C **HPLC:** 9,11 minutos (99,26%).

Figura 37 – Espectro do Infravermelho GQ208

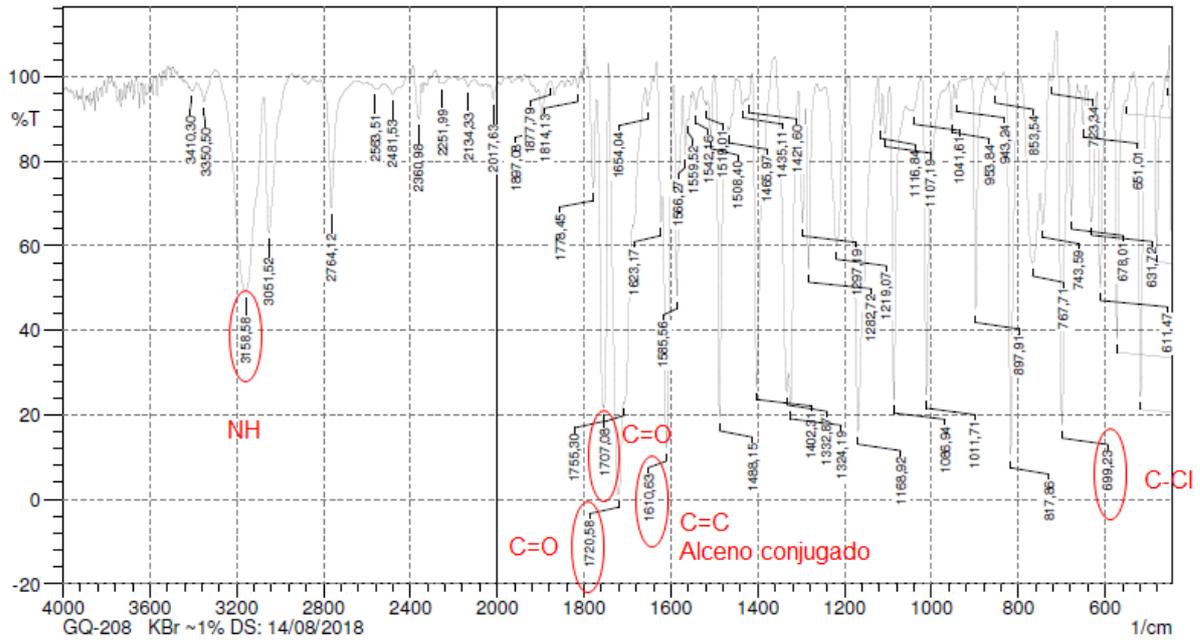
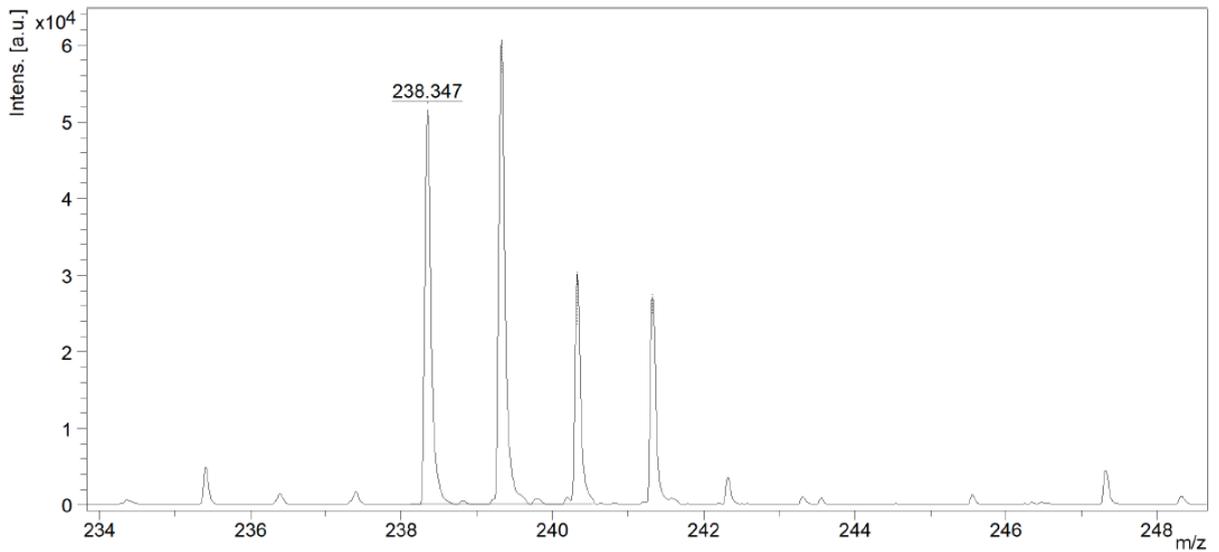
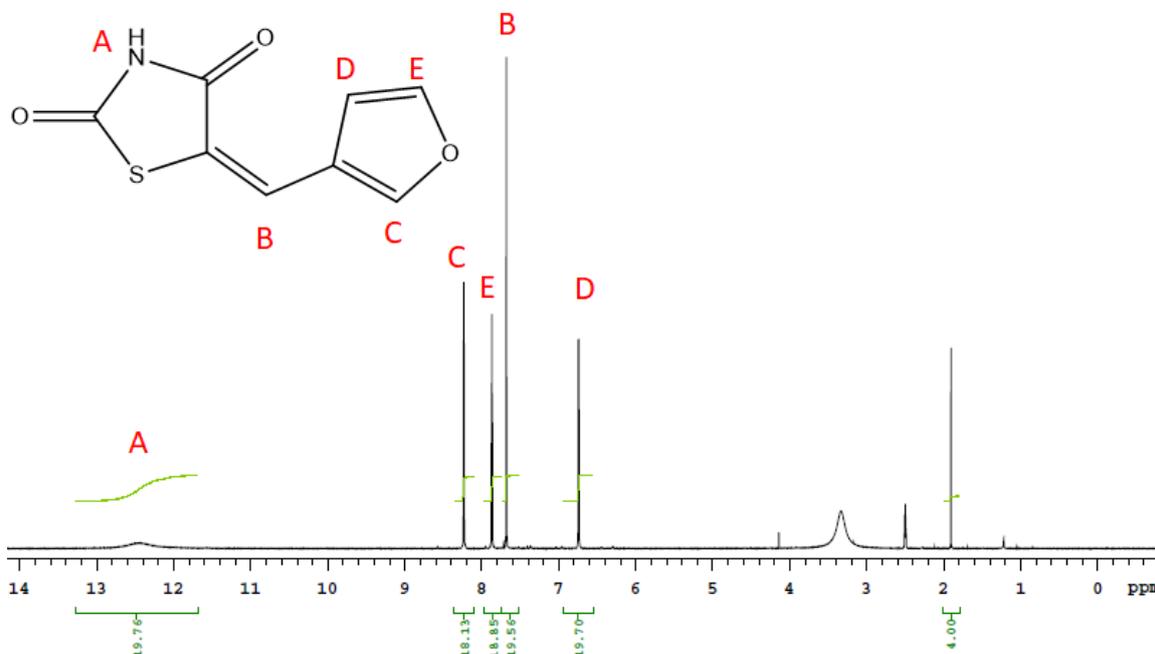
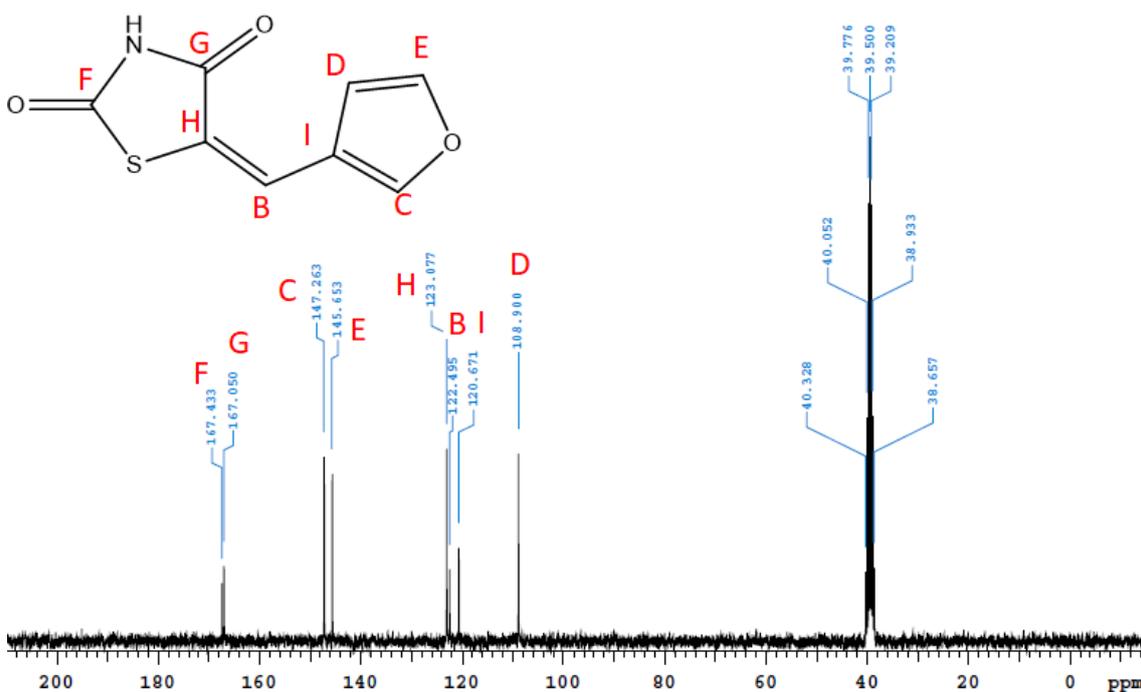


Figura 38 – MALDI-TOF/MS GQ208

Comment 1 Massa molar: 238,9808g/mol



1.3 COMPOSTO GQ303 - 5-(furan-3-ilmetileno)tiazolidina-2,4-diona

Figura 39 – RMN¹H – GQ303Figura 40 – RMN¹³C – GQ303

RMN ¹H (300MHz- DMSO_d₆) : δ = 6,744 (d, 1H, CH); δ = 7,601 (s, 1H, CH); δ = 7,867 (d, 1H, CH); δ = 8,235 (s, 1H, CH); δ = 12,445 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C** (300MHz – DMSO_d₆): δ = 108,9 (CH); δ = 120,67 (C); δ = 122,49 (CH); δ = 123,07 (C); δ = 145,65 (CH); δ = 147,26 (CH); δ = 167,05 (C); δ = 167,43 (C). **Ponto de fusão:** 213,1°C. **HPLC** – 8,03 minutos(100%).

Figura 41 – Espectro do Infravermelho GQ303

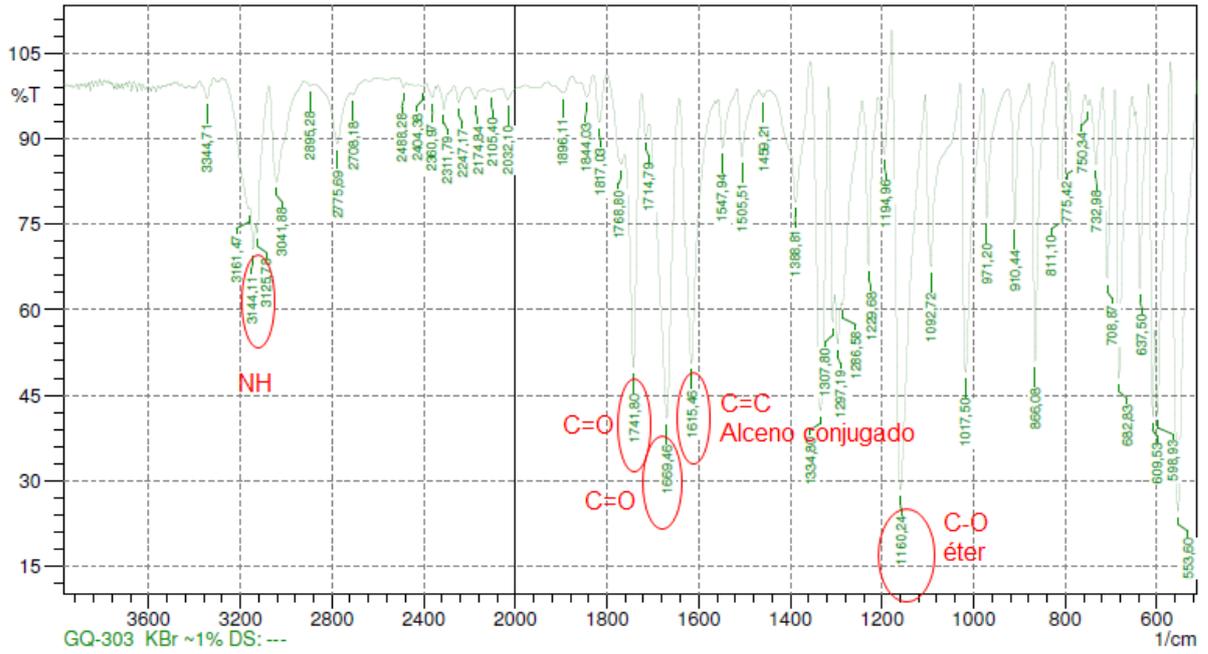
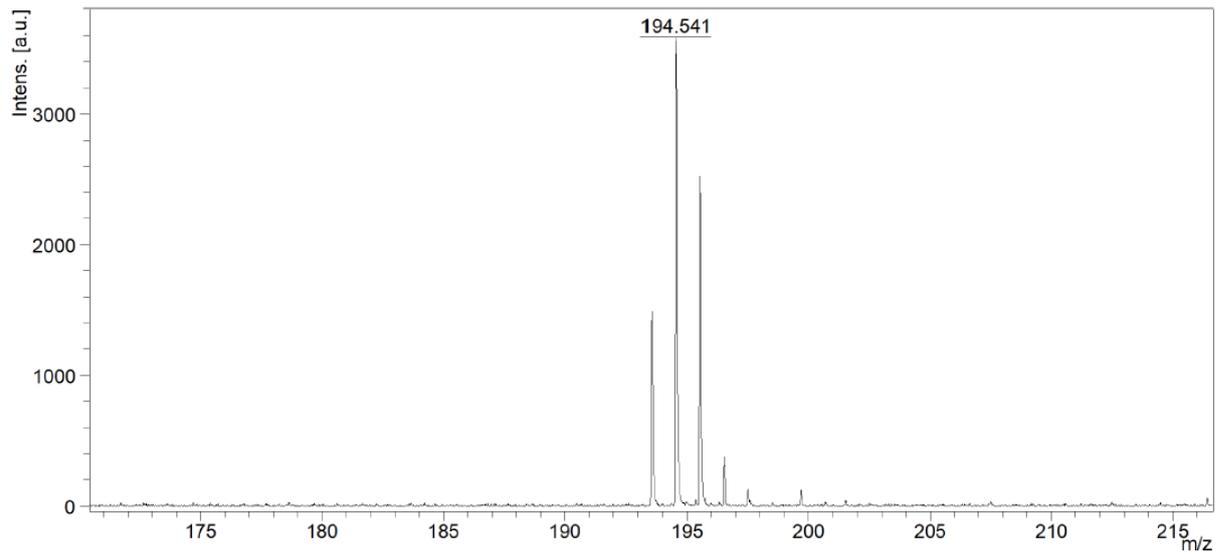
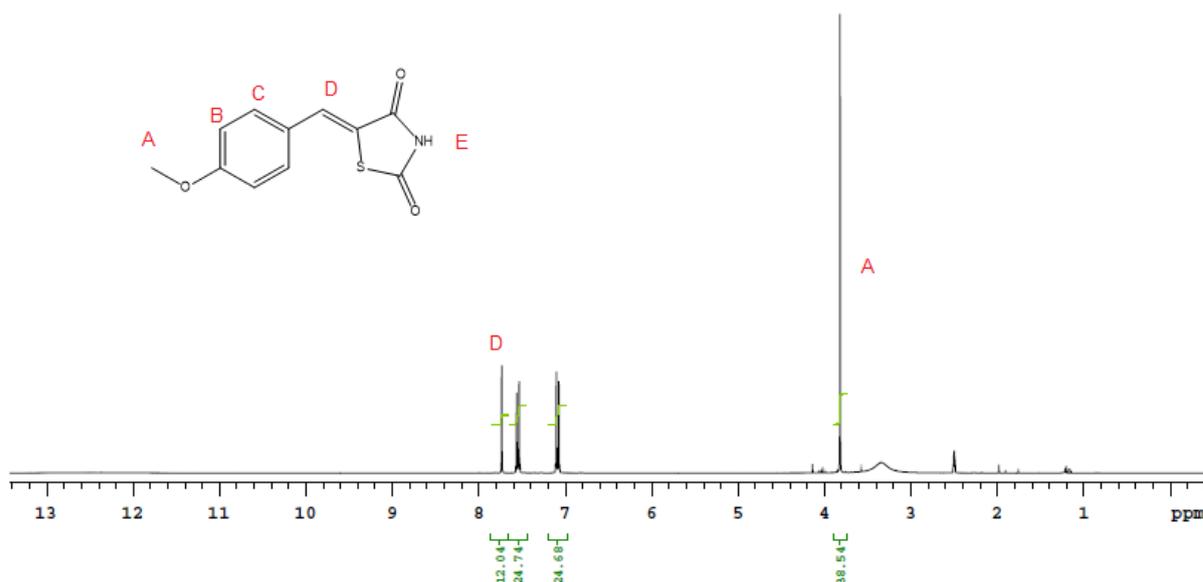
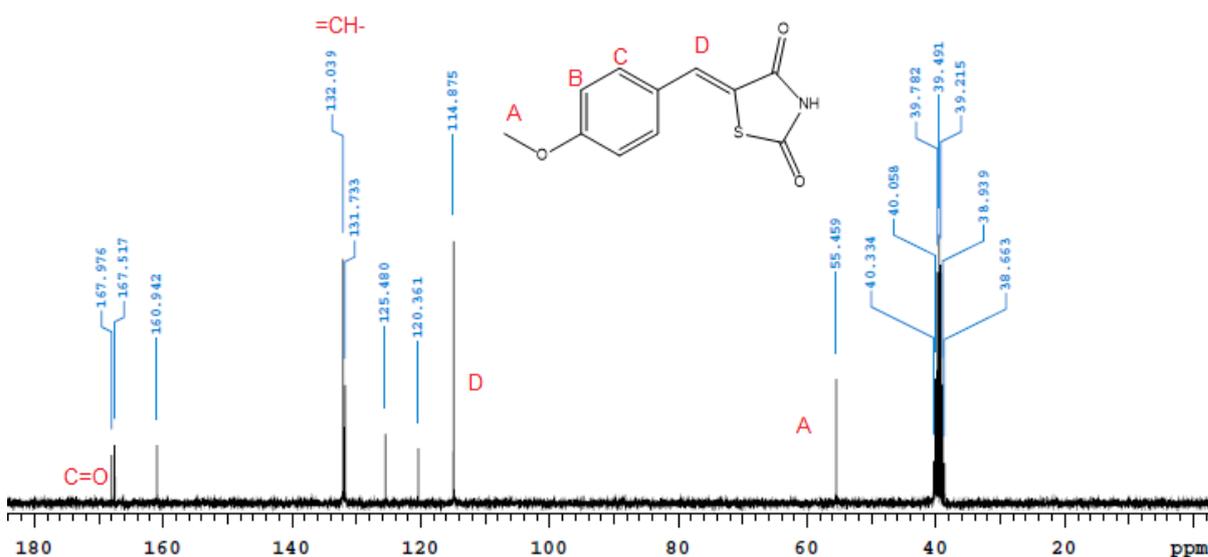


Figura 42 – MALDI-TOF/MS GQ303

Comment 1 Massa molar: 194,999g/mol



1.4 COMPOSTO GQ296 - 5-(4-metoxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona

Figura 43 – RMN¹H – GQ296Figura 44 – RMN¹³C – GQ296

RMN ¹H (300MHz- DMSO*d*₆): δ= 3,8 (s, 3H, CH₃); δ= 7,08 (d, 1H, CH); δ= 7,5 (d, 1H, CH); δ= 7,7 (s, 1H, CH). **RMN ¹³C** (300MHz – DMSO*d*₆): δ = 55,45 (CH₃); δ = 114,8 (CH); δ= 120,3 (C); δ= 125,4 (C); δ= 131,7 (CH); δ= 132,0 (CH); δ= 160,9 (C); δ= 167,5 (C=O); δ= 167,9 (C=O).

Figura 45 – Espectro do Infravermelho GQ296

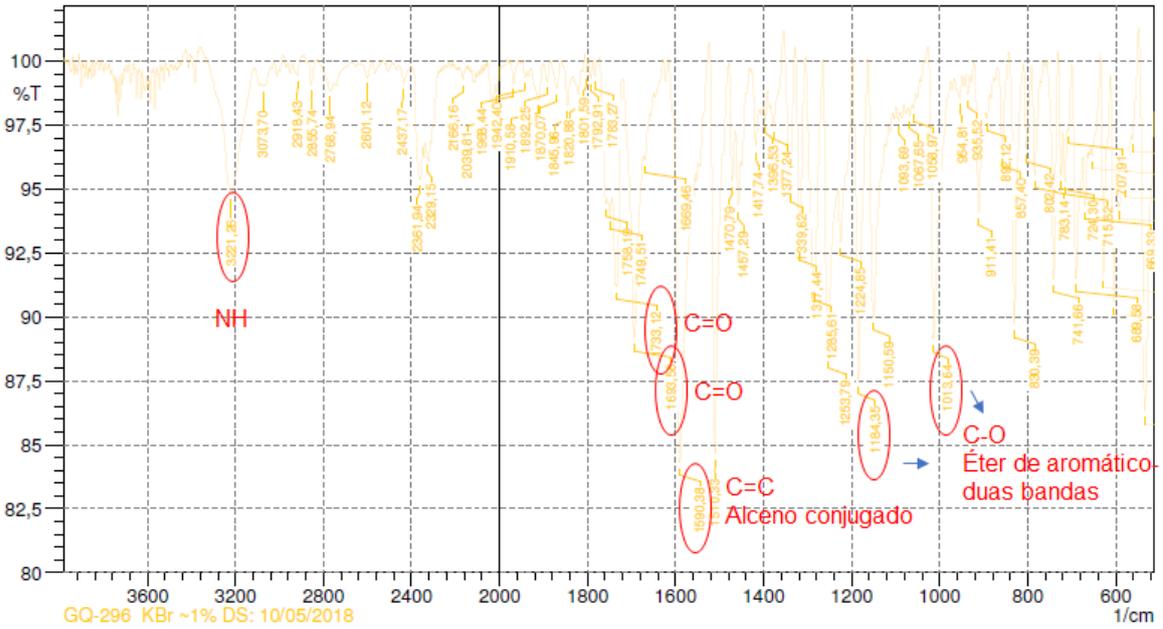
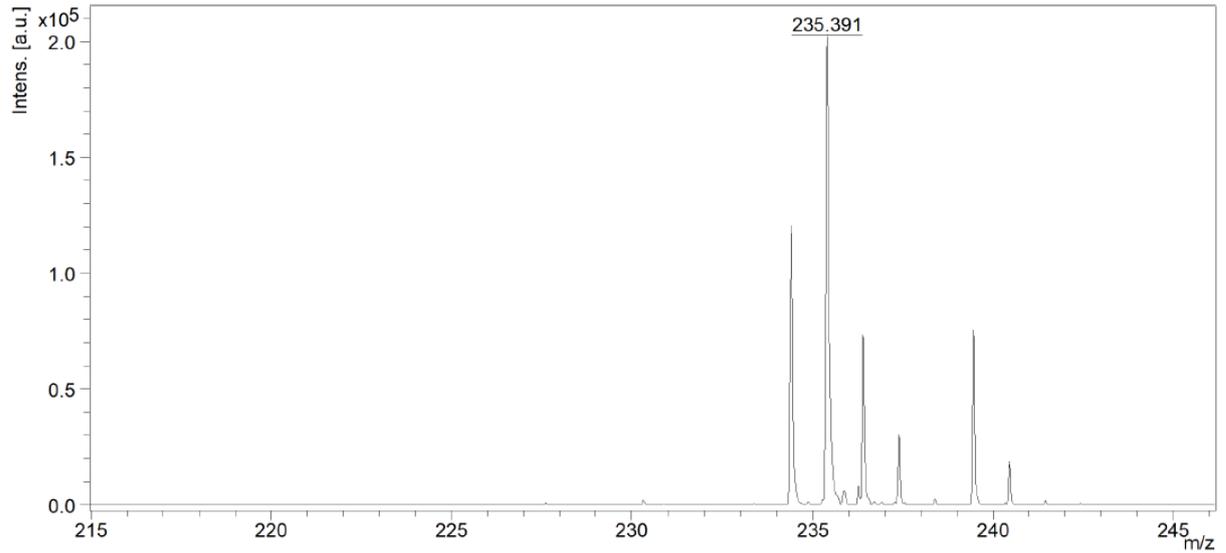
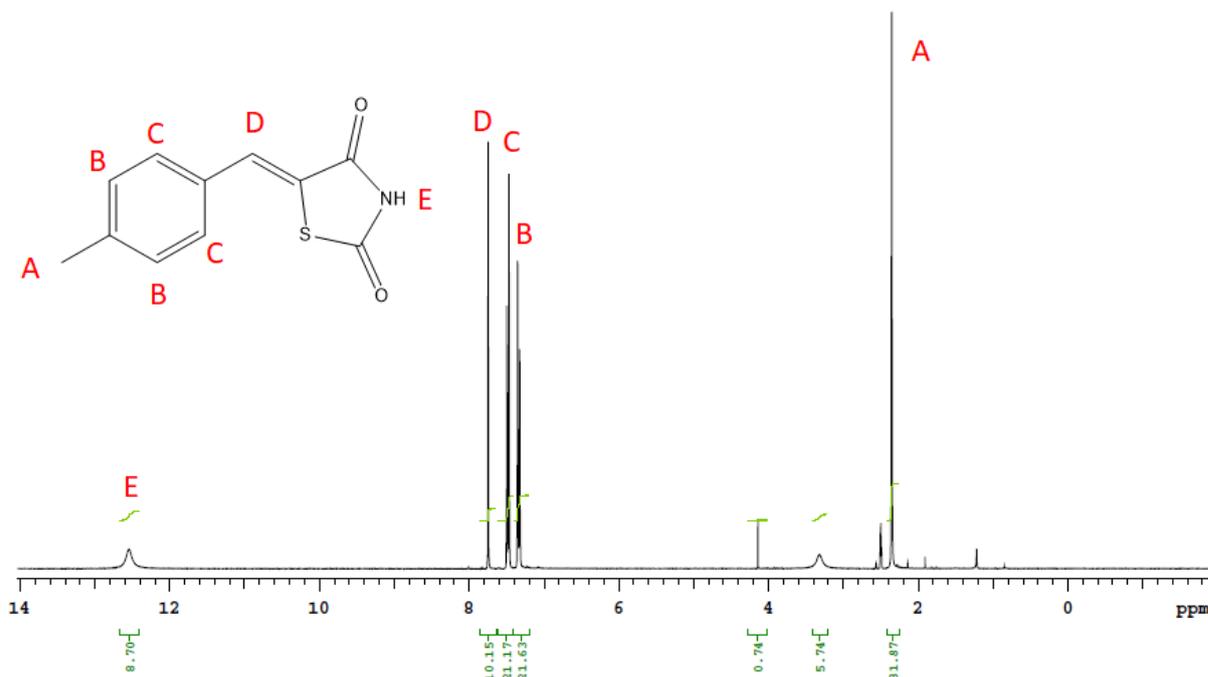
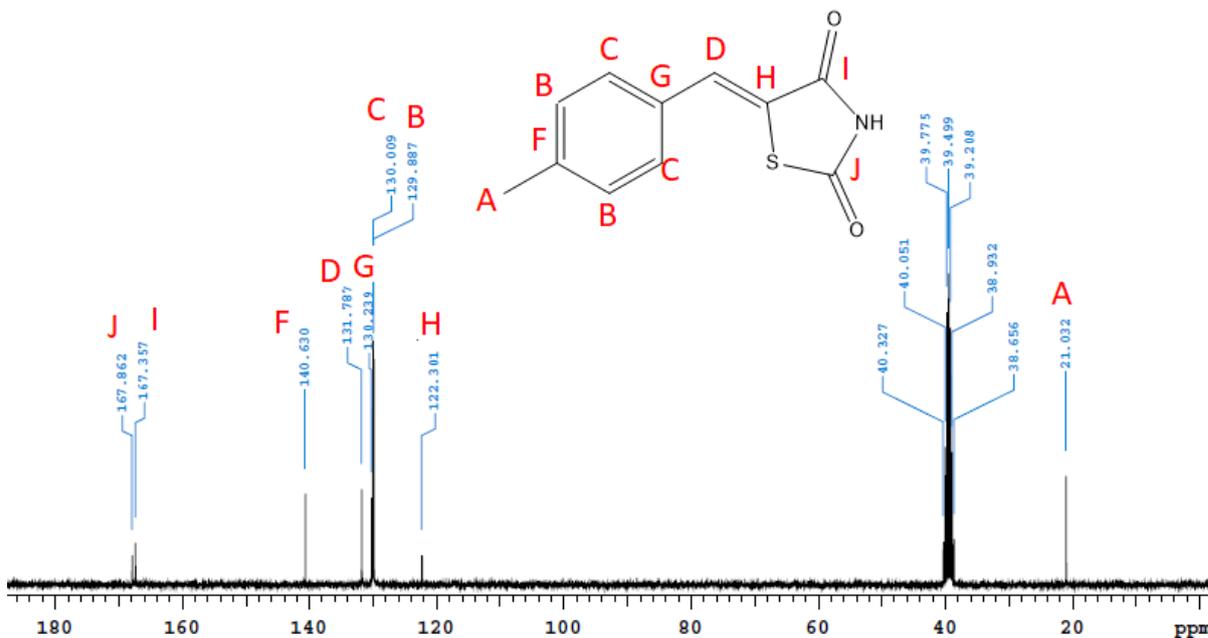


Figura 46 – MALDI-TOF/MS GQ296

Comment 1 Massa molar: 235,0303



1.5 COMPOSTO GQ299 - 5-(4-metilbenzilideno)tiazolidina-2,4-diona

Figura 47 – RMN¹H – GQ299Figura 48 – RMN¹³C – GQ299

RMN ¹H (300MHz- DMSO_d₆): δ = 2,353 (s, 3H, CH₃); δ = 7,338 (d, 2H, CH aromático); δ = 7,481 (d, 2H, CH aromático); δ = 7,746 (s, 1H, CH); δ = 12,545 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C** (300MHz – DMSO_d₆): δ = 21,032 (CH₃); δ = 122,301 (C); δ = 129,897 (CH); δ = 130,009 (CH); δ = 130,219 (C); δ = 131,787 (CH); δ = 140,63 (C); δ = 167,357 (C); δ = 167,062 (C). **Ponto de fusão:** 242,9°C. **HPLC:** 8,926 minutos (100%).

Figura 49 – Espectro de infravermelho GQ299

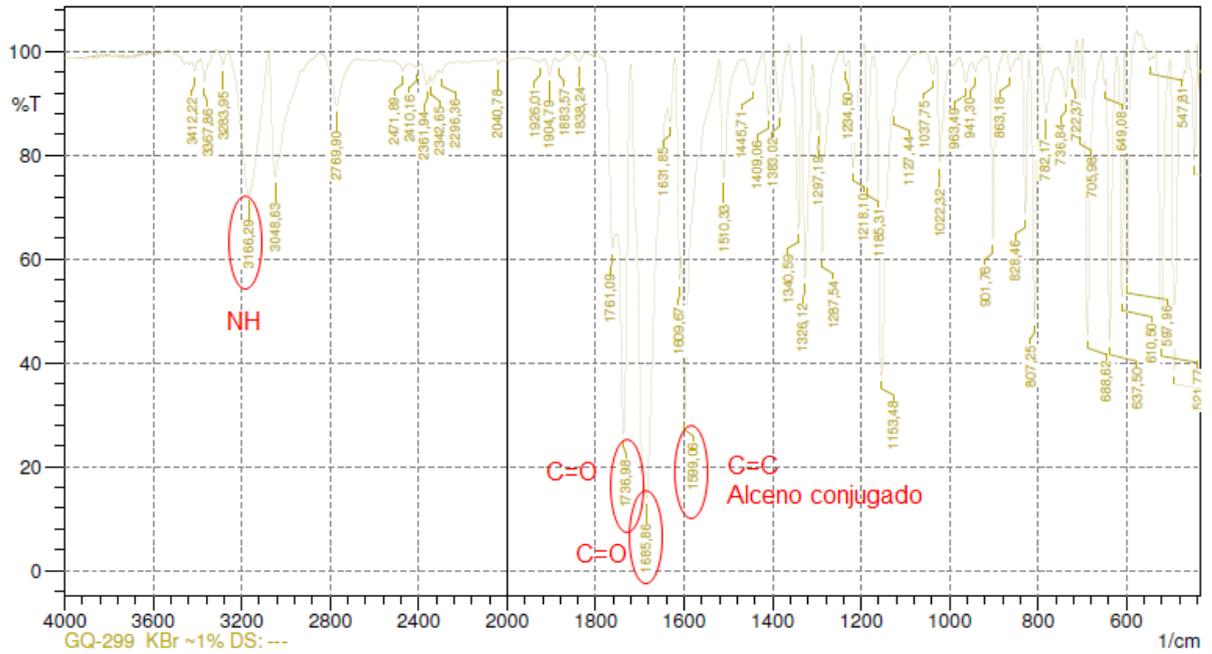
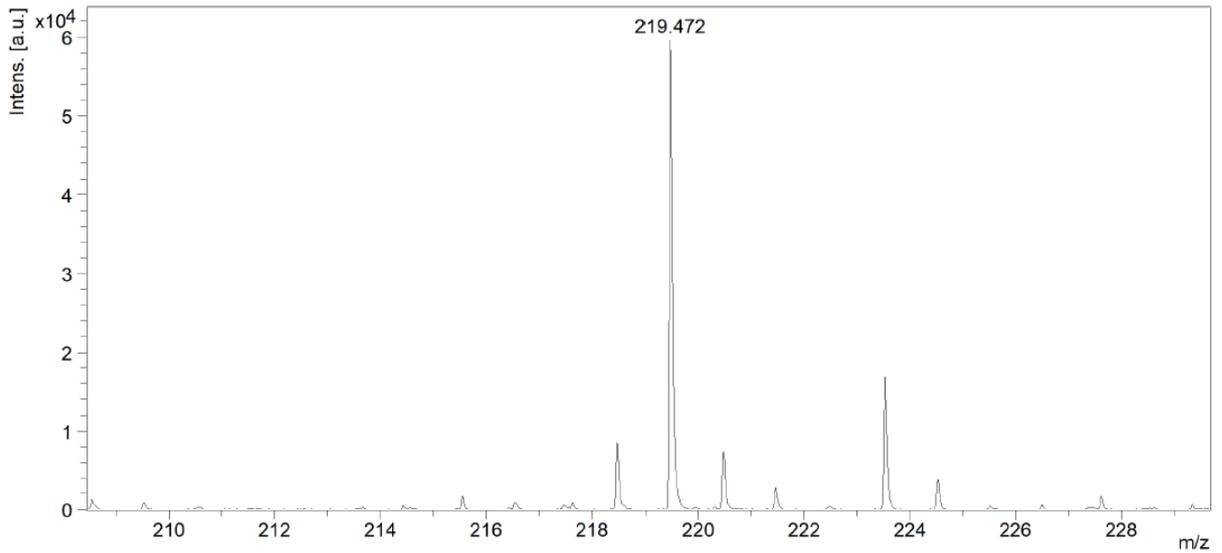
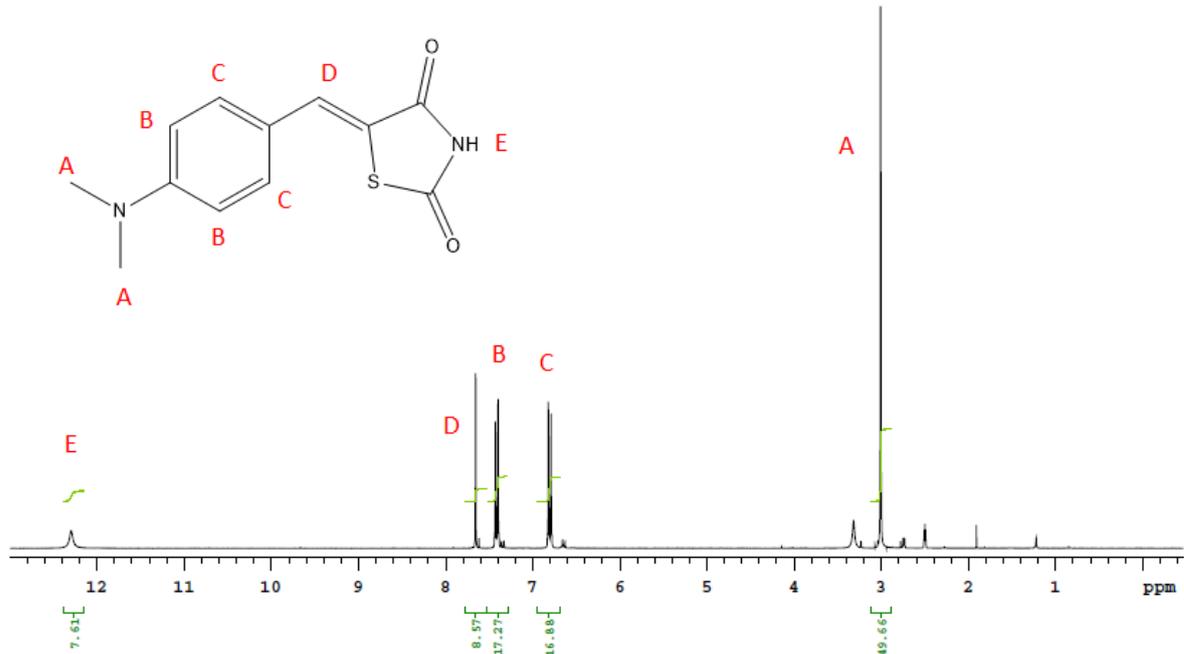
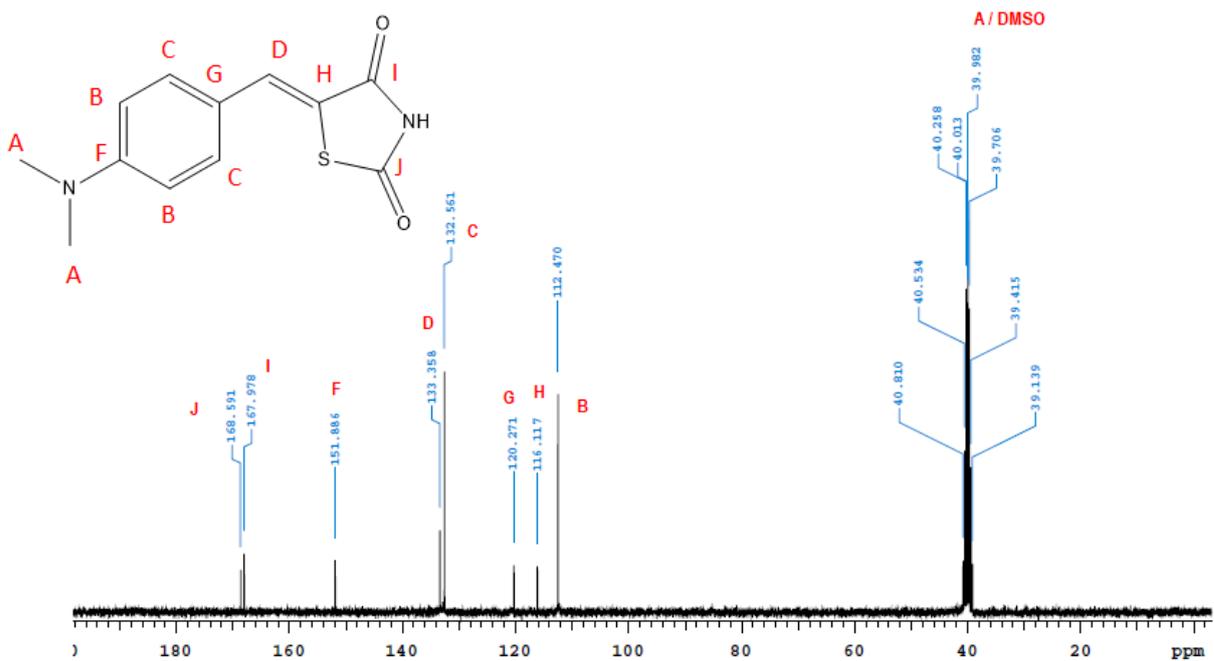


Figura 50 – MALDI-TOF/MS GQ299

Comment 1 Massa molar: 219,0354g/mol



1.6 COMPOSTO GQ301 - 5-(4-(dimetilamino)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona

Figura 51 – RMN¹H – GQ301Figura 52 – RMN¹³C – GQ301

RMN ¹H (300MHz- DMSO_d₆): δ = 3,00 (s, 6H, CH₃); δ = 6,8 (d, 2H, CH aromático); δ = 7,4 (d, 2H, CH aromático); δ = 7,65 (s, 1H, CH); δ = 12,29 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C** (300MHz – DMSO_d₆): δ = 40,01(CH₃); δ = 112,47 (CH); δ = 116,11 (C); δ = 120,27 (C); δ = 132,56 (CH); δ = 133,35 (CH); δ = 151,88 (C); δ = 167,97 (C); δ = 168,59 (C). Ponto de Fusão: HPLC: 8,81 (100%).

Figura 53 – Espectro de Infravermelho GQ301

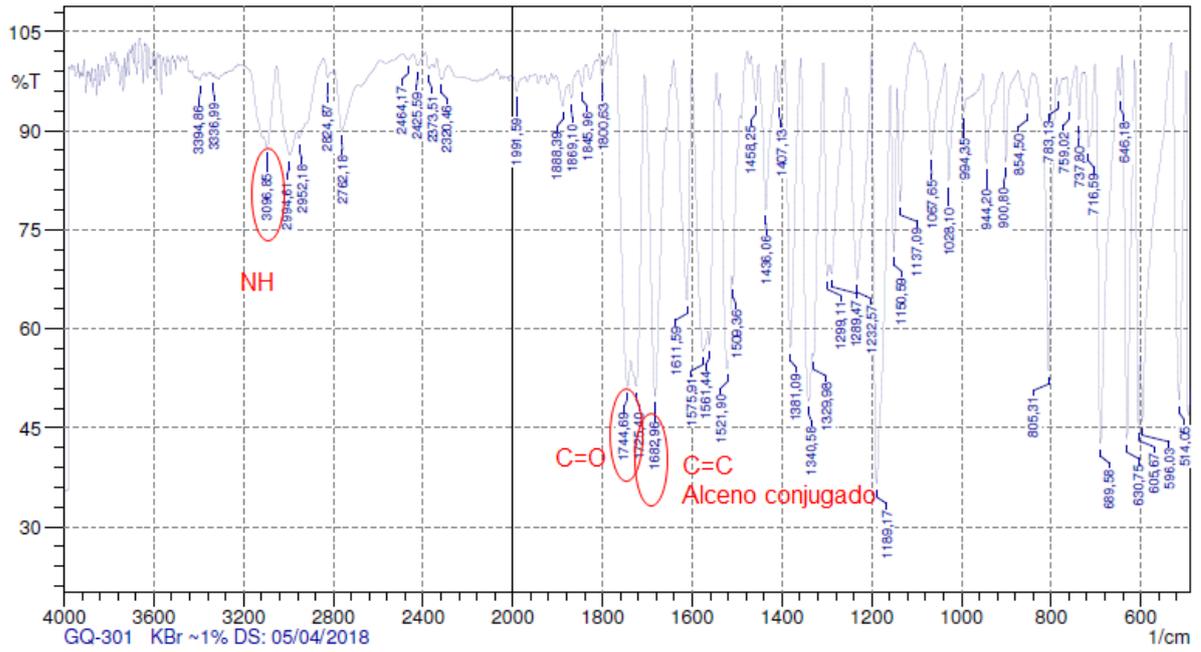
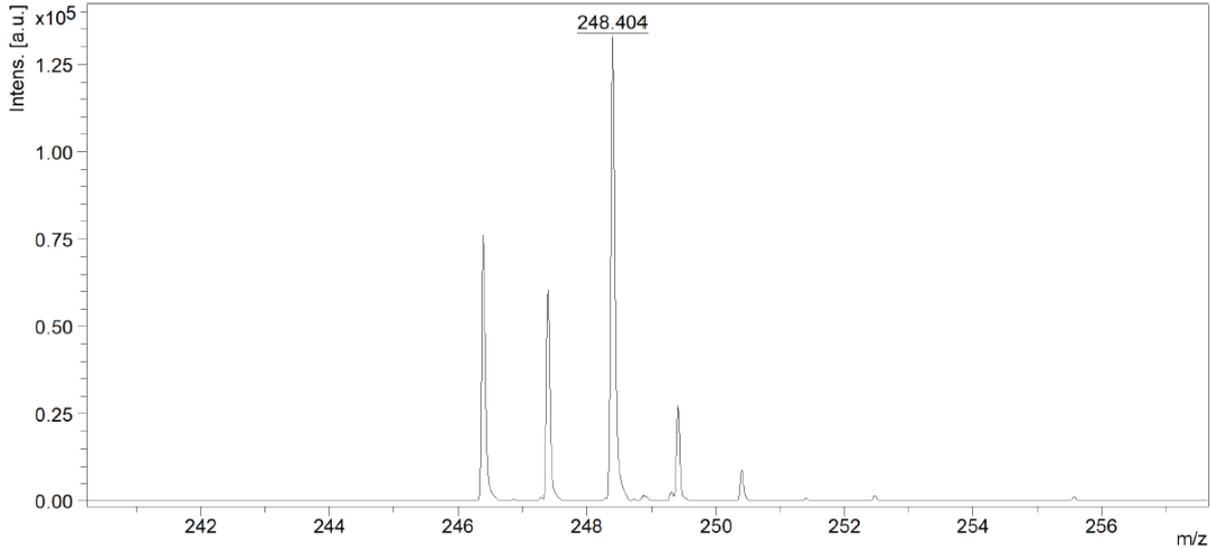
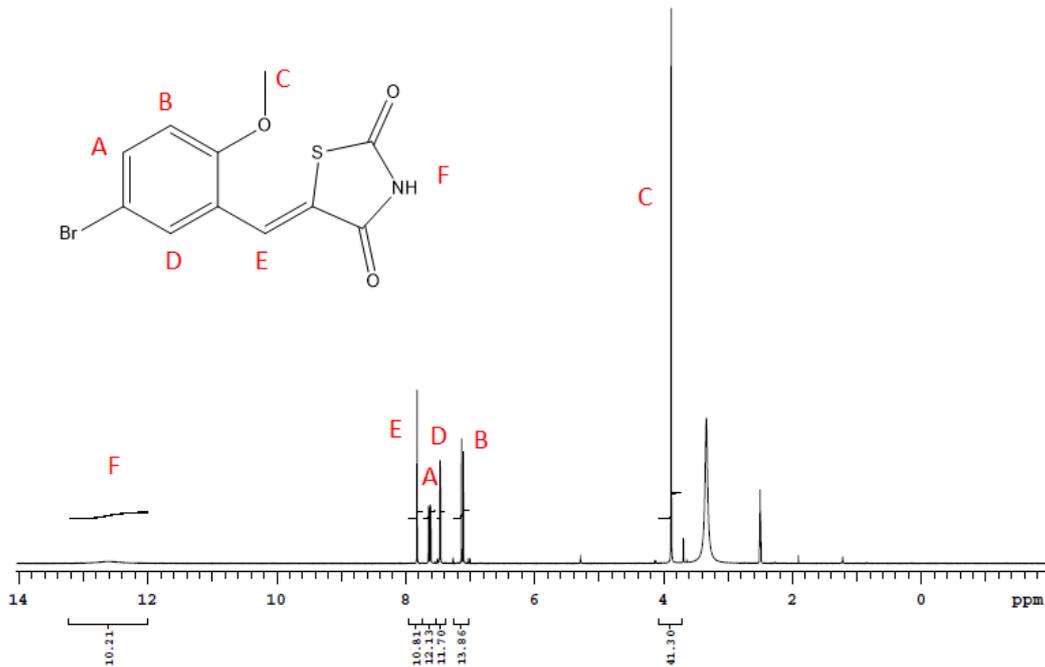
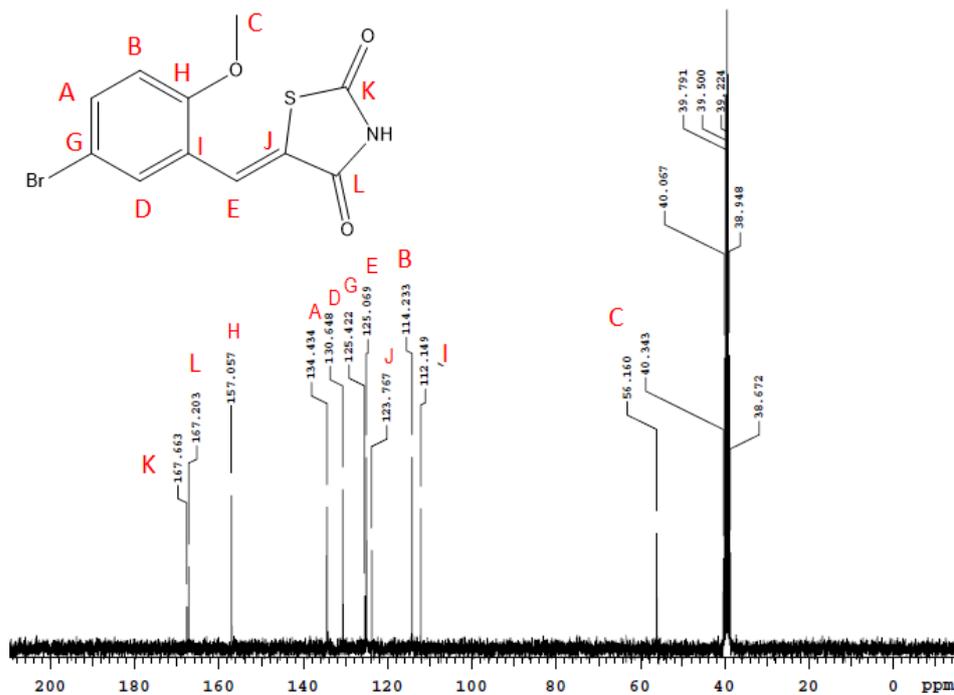


Figura 54 – MALDI-TOF/MS GQ301

Comment 1 Massa molar: 248,0619g/mol



1.7 COMPOSTO GQ307 - 5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona

Figura 55 – RMN¹H – GQ307Figura 56 – RMN¹³C – GQ307

RMN ¹H (300MHz- DMSO_d₆): δ = 3,82 (s, 3H, CH₃); δ = 7,12 (d, 1H, CH aromático); δ = 7,46 (s, 1H, CH aromático); δ = 7,61(s, 1H, CH aromático); δ = 7,82 (s, 1H, CH); δ = 12,58 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C** (300MHz – DMSO_d₆): δ = 56,16 (CH₃); δ = 112,14 (C); δ = 114,23 (CH); δ = 123,76 (C); δ = 125,06 (CH); δ = 125,42 (C); δ = 130,64 (CH); δ = 134,43 (CH); δ = 157,05 (C); δ = 167,20 (C); δ = 167,66 (C). **Ponto de Fusão:** HPLC: 8,8 minutos (100%)

Figura 57 – Espectro de Infravermelho GQ307

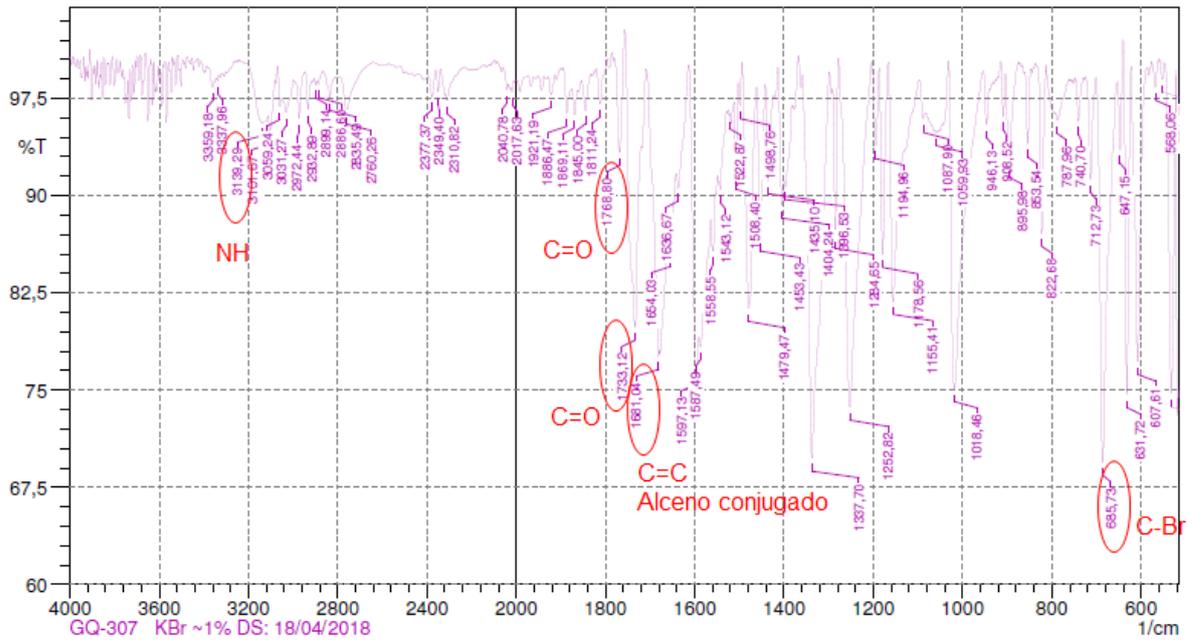
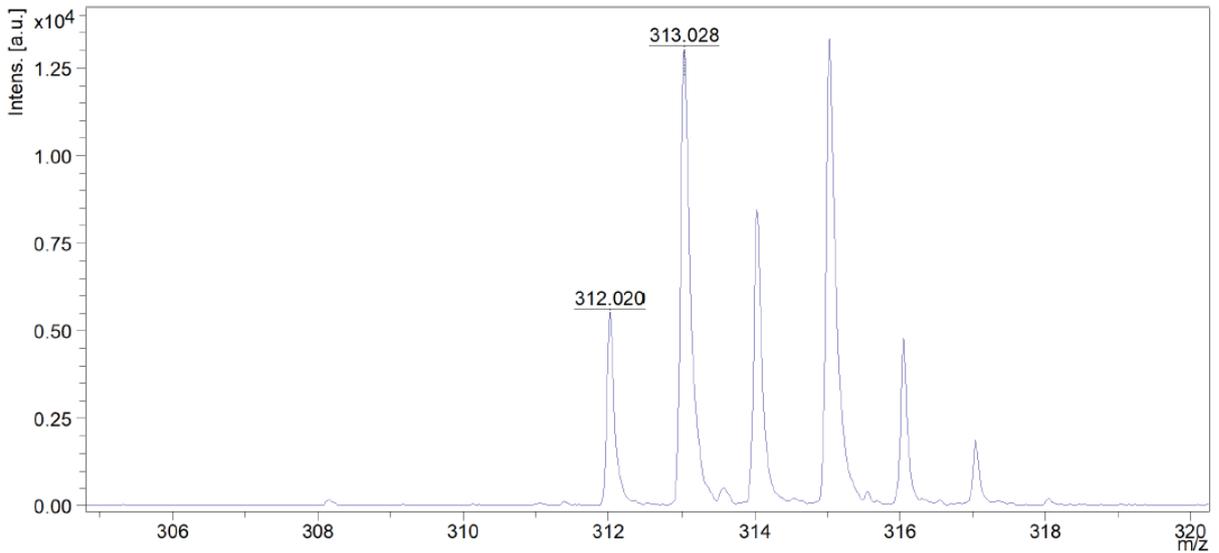
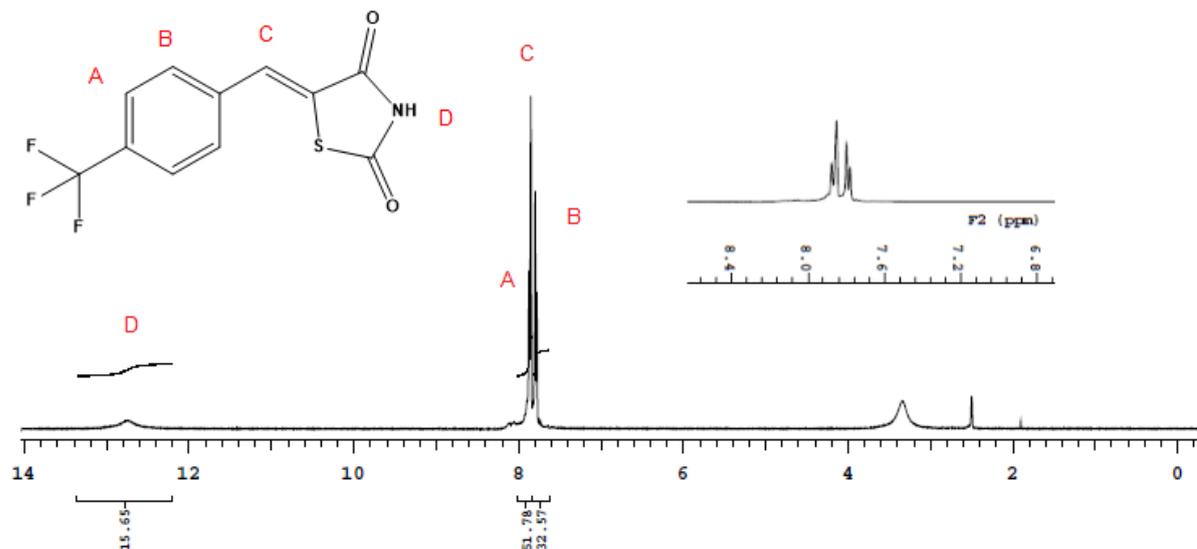
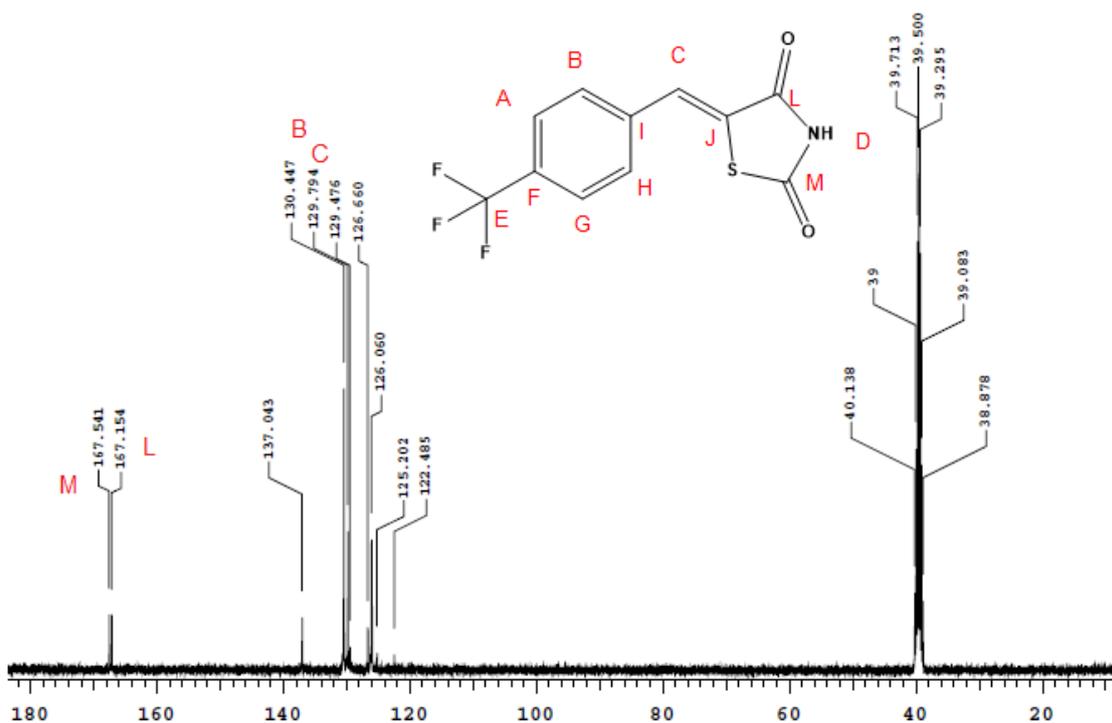


Figura 58 – MALDI-TOF/MS GQ307

Comment 1 Massa molar: 312,9408g/mol



1.8 COMPOSTO GQ444 - 5-(4-(trifluorometil)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona

Figura 59 – RMN¹H – GQ444Figura 60 – RMN¹³C – GQ444

RMN ¹H (300MHz- DMSO_d₆) : δ= 7,7 (d, 1H, CH – aromático); δ= 7,9 (d, 1H, CH – aromático); δ= 7,9 (d, 1H, CH) δ = 12,74 (s,1H, NH). **RMN ¹³C** (400MHz – DMSO_d₆): δ = 129 (CH); δ = 130 (CH - aromático); δ = 167,15 (C=O); δ = 167,54 (C=O). **Ponto de fusão:** 168,1°C; **HPLC:** 8,2 minutos (100%).

Figura 61 – Espectro de Infravermelho GQ444

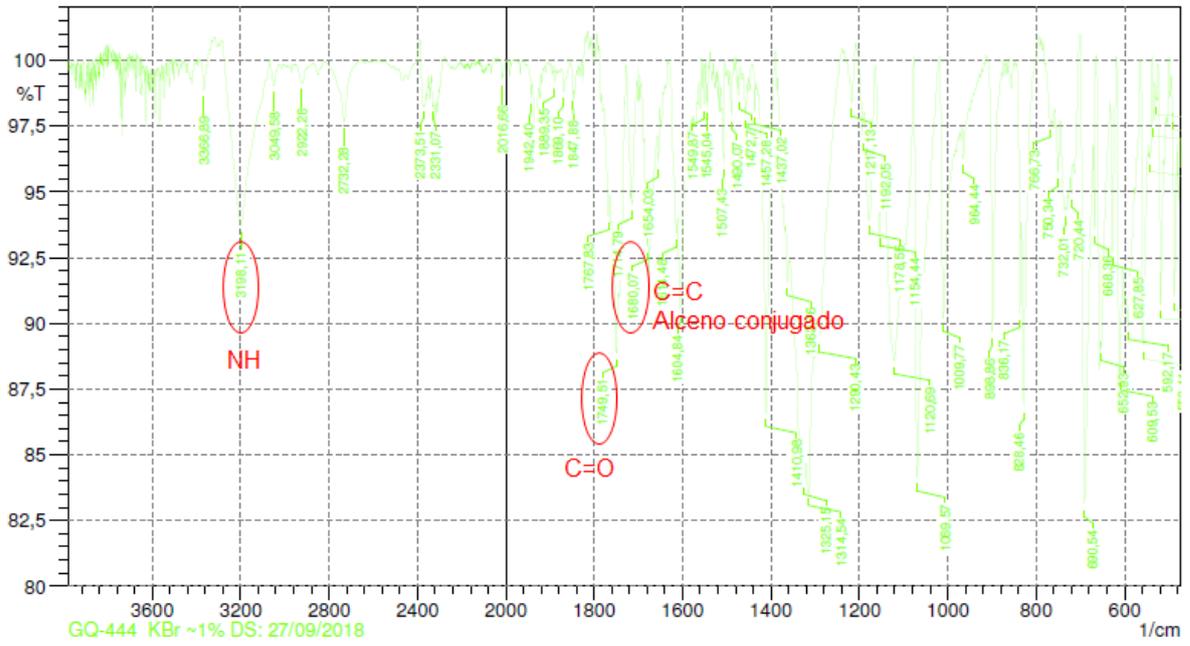


Figura 62 – MALDI-TOF/MS GQ444

Comment 1 Massa molar: 273,0071g/mol

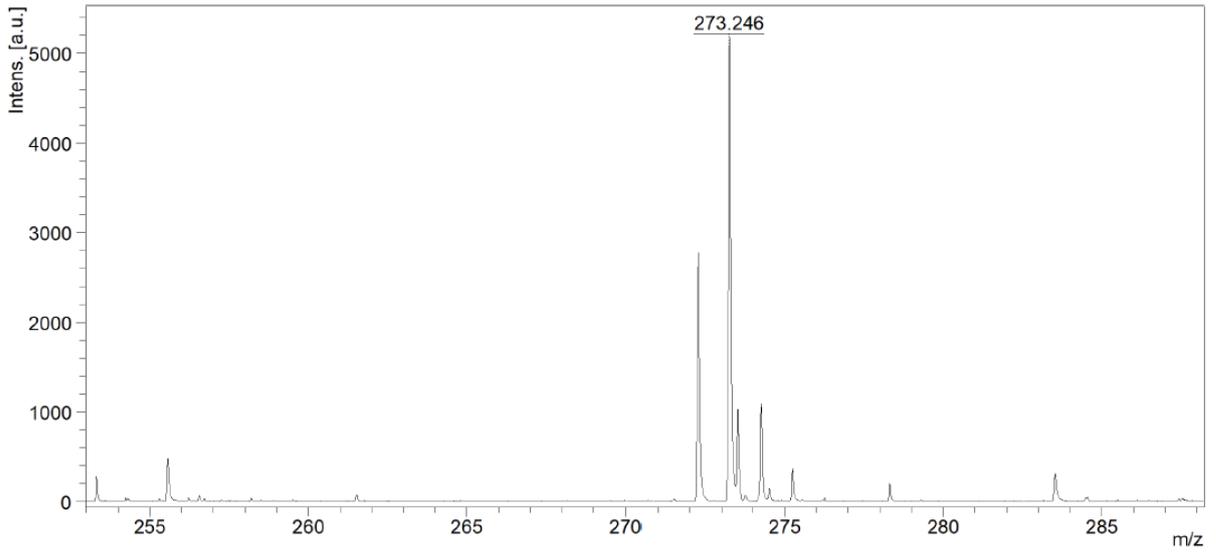


Figura 65 – Espectro de Infravermelho GQ445

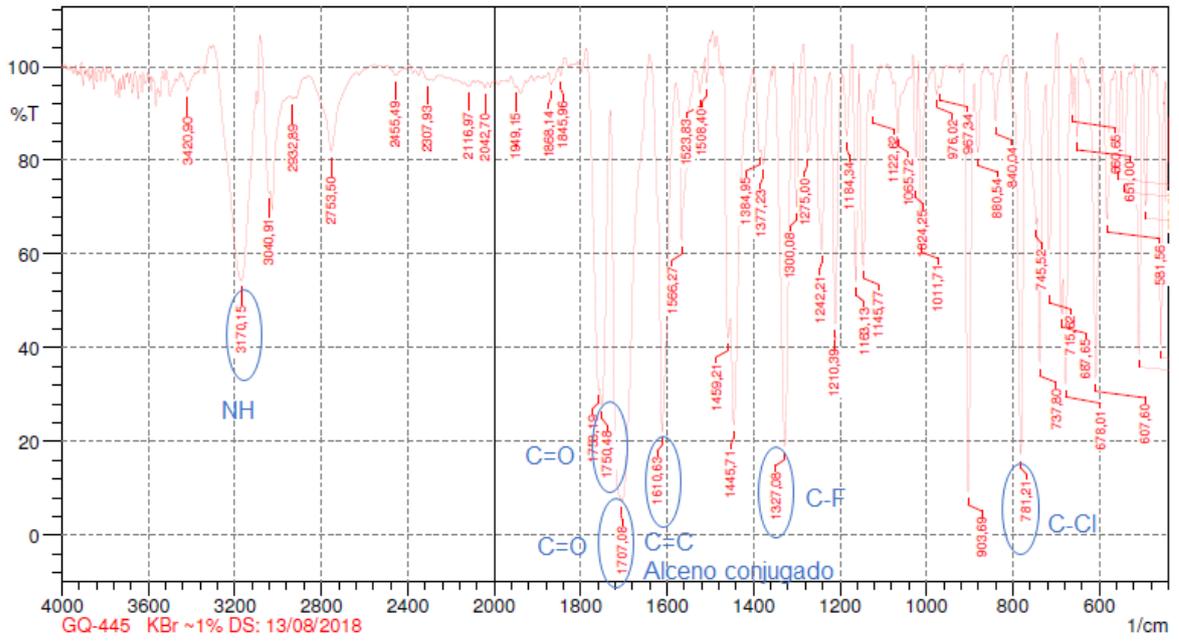
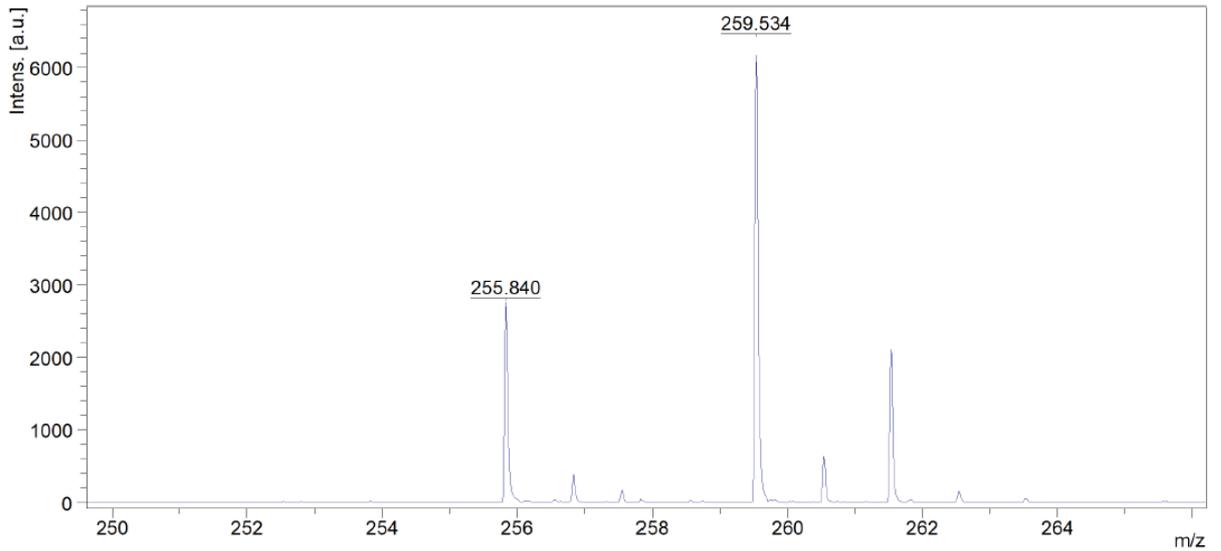


Figura 66 – MALDI-TOF/MS GQ445

Comment 1 Massa molar: 256,9711g/mol



2 REAGENTE PARA SÍNTESIS DOS DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS: 2-clorometilquinolina

Figura 67 – RMN¹H - 2-clorometilquinolina

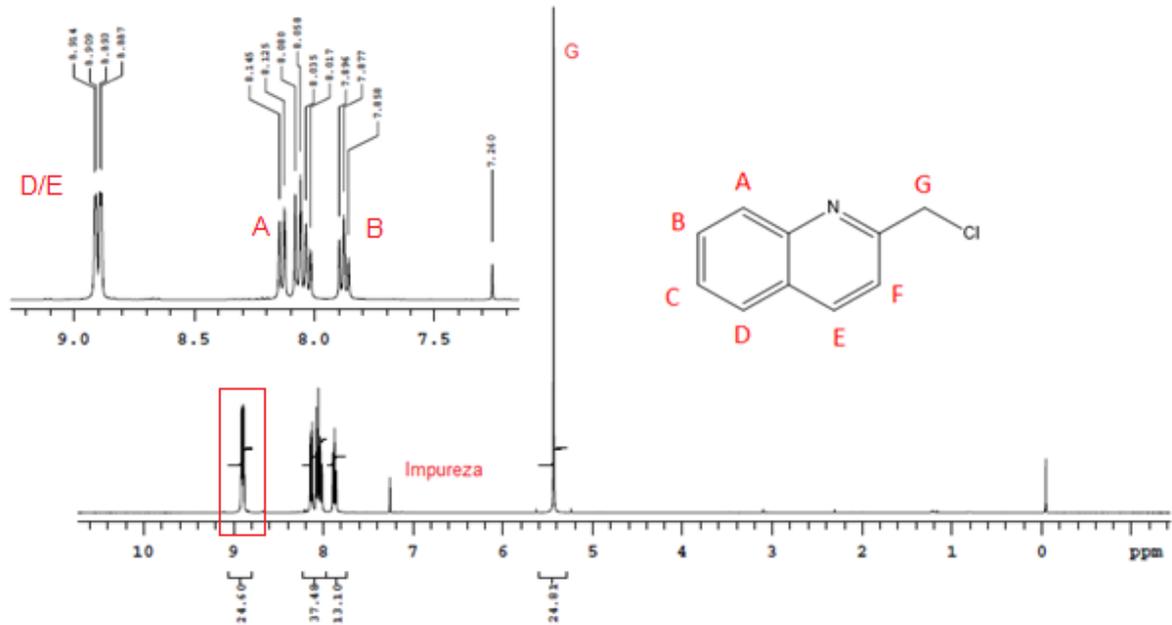
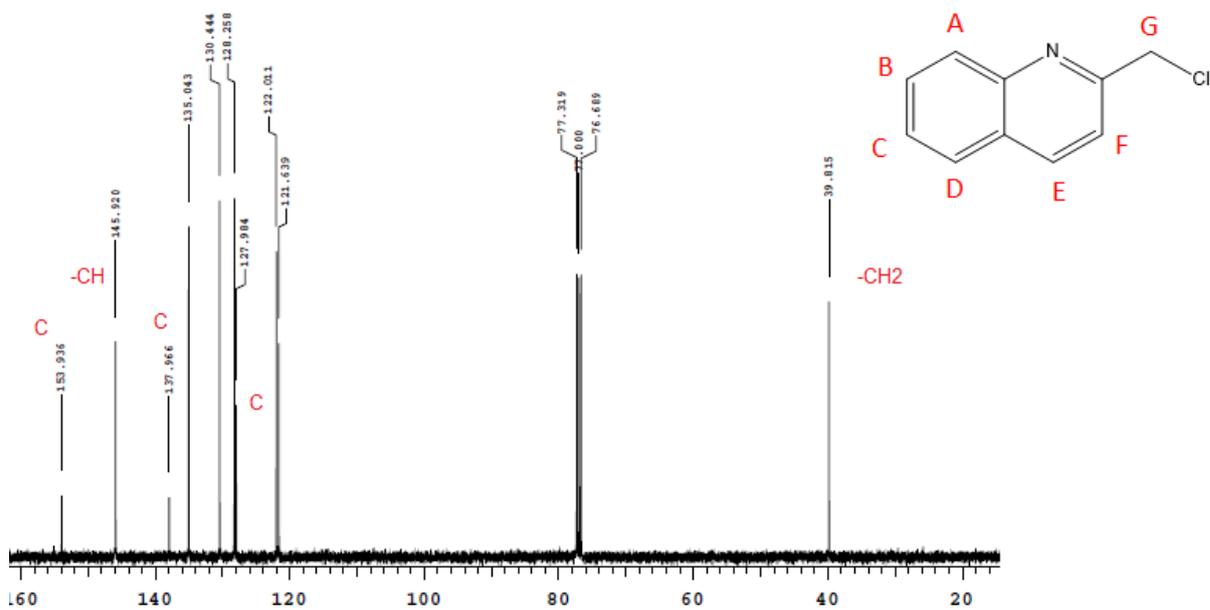


Figura 68 – RMN¹³C – 2-clorometilquinolina



RMN ¹H (400MHz- CdCl₃): δ = 5,43 (s, 2H, CH₂); δ = 7,87 (t, 1H, CH); δ= 8,1(d, 1H, CH). **RMN ¹³C** (400MHz – CdCl₃): δ = 39,81 (CH₂); δ = 145,92 (CH - aromático); δ = 153,93 (C); δ = 137,96(C); δ = 127,98 (C). **HPLC**: 8,89 minutos (100%).

3 DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS – LPSF/ZKDs

3.1 LPSF/ZKD2 – 5-(4-bromobenzilideno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona

Figura 69 – RMN¹H – LPSF/ZKD2

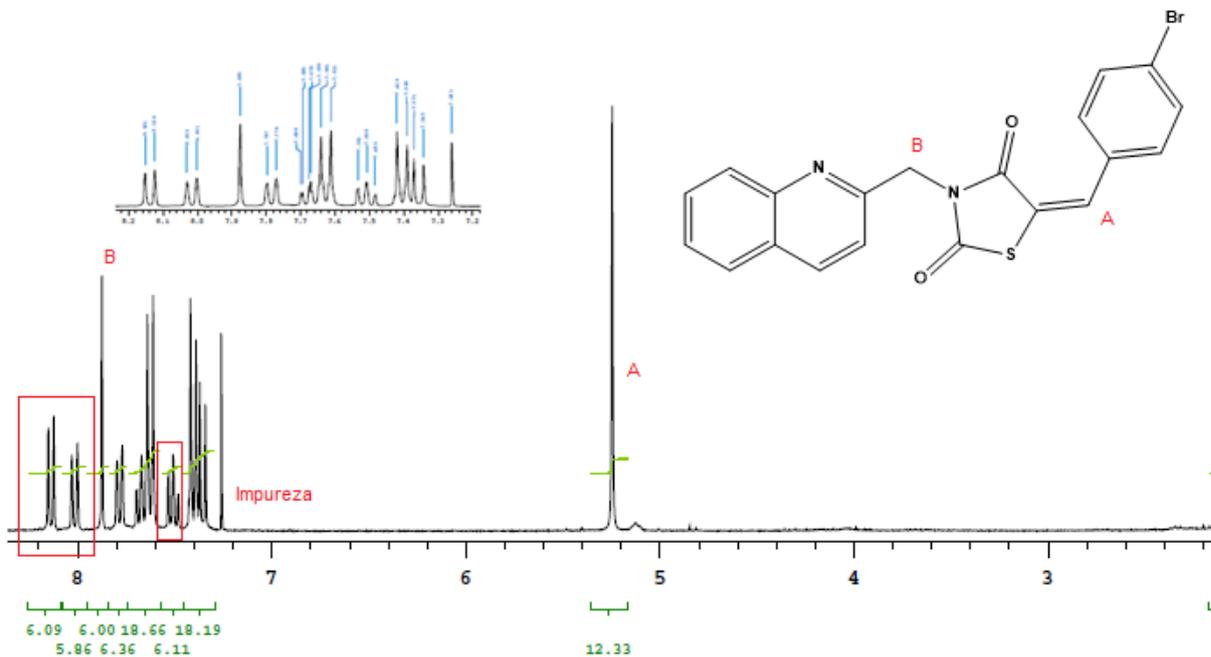
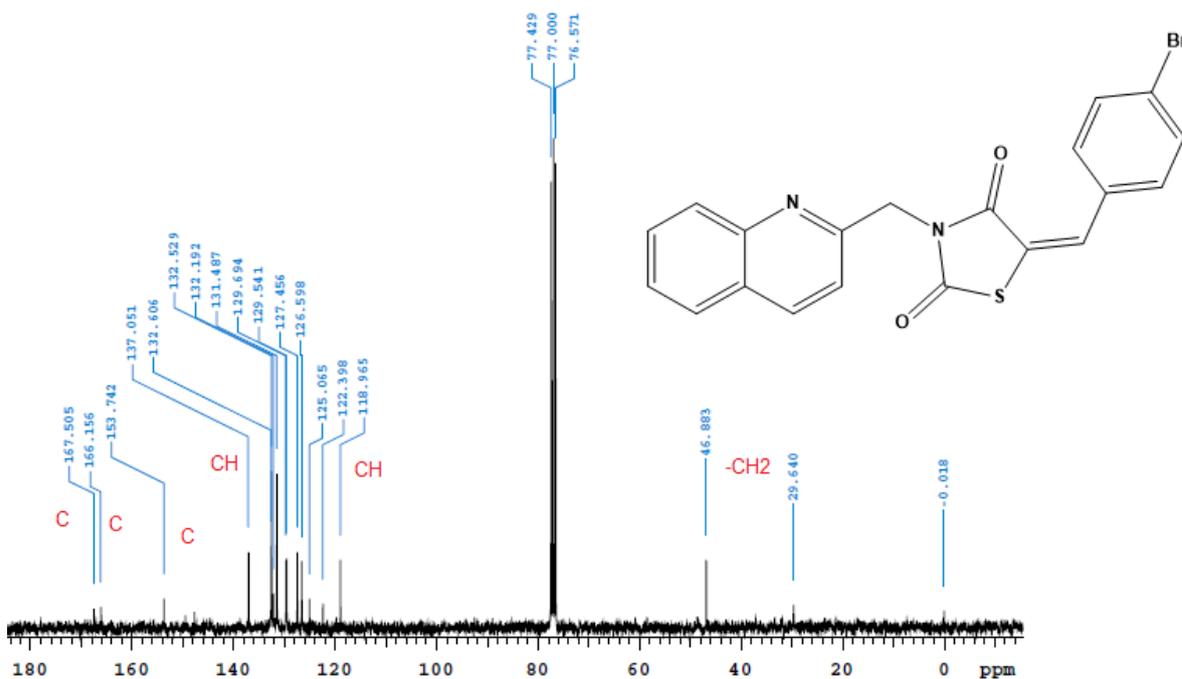


Figura 70 – RMN¹³C – ZKD2



RMN ¹H (300MHz- CdCl₃): δ = 5,2 (s, 2H, CH₂); δ = 7,34-7,41 (m, CH do benzeno); δ = 7,48-7,79 (m, CH do grupo quinolinico); δ = 7,87 (s, 1H, CH); δ = 8-8,15 (m, CH do grupo quinolinico). **RMN ¹³C** (300MHz – CdCl₃): δ = 46,88 (CH₂); δ = 153,74 (C); δ = 166,15(C); δ = 167,5(C). **HPLC**: 9,5 minutos (98,6%).

Figura 71 – Espectro de Infravermelho LPSF/ ZKD2

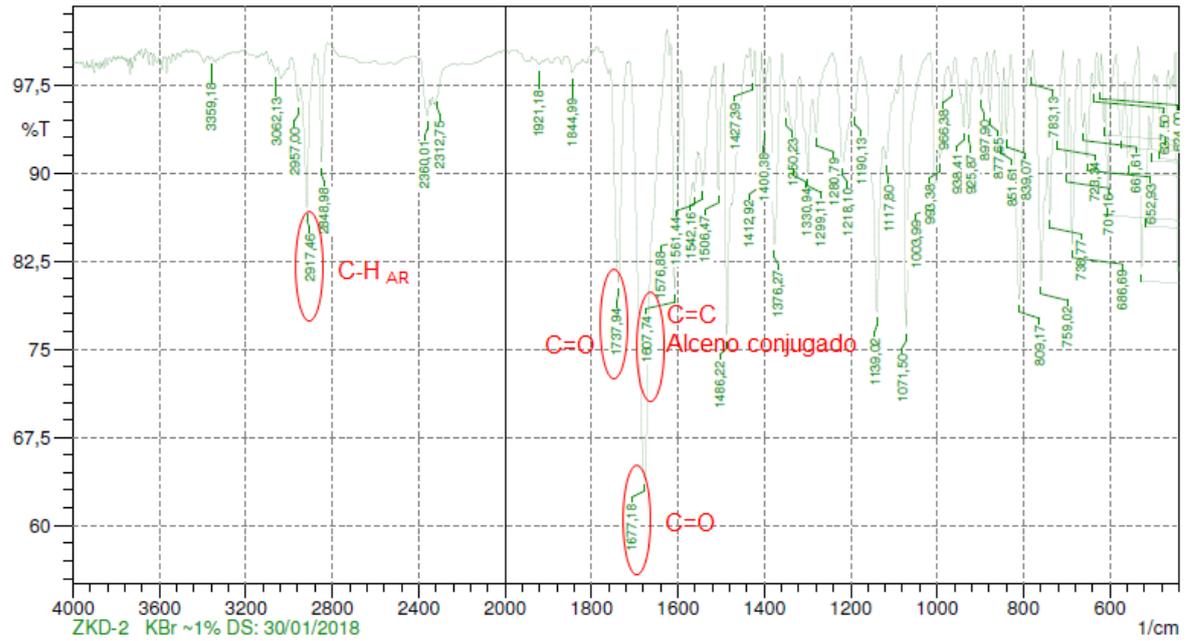
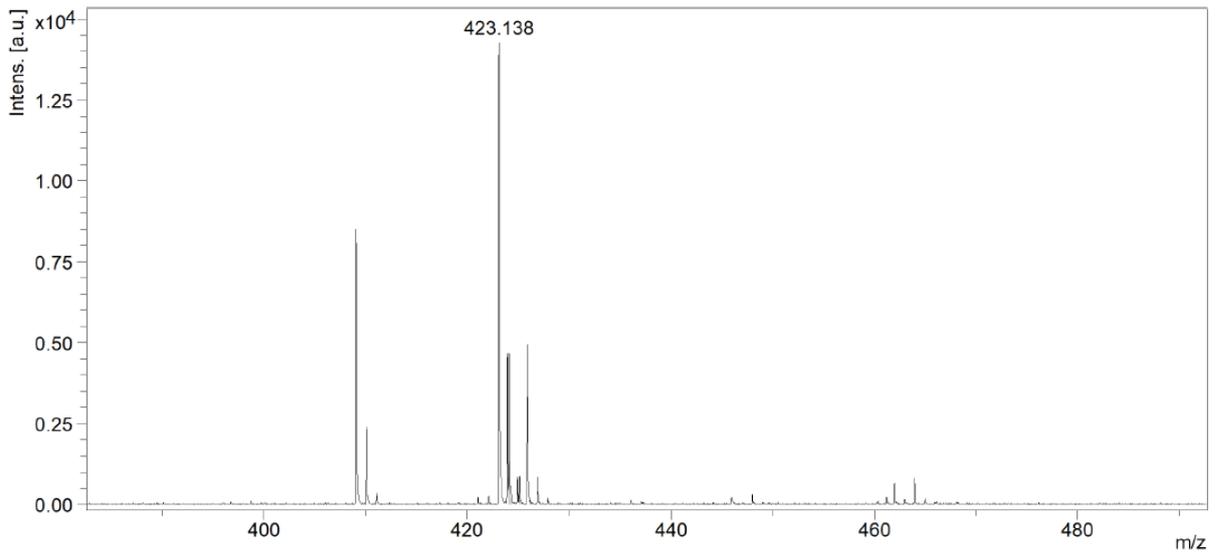
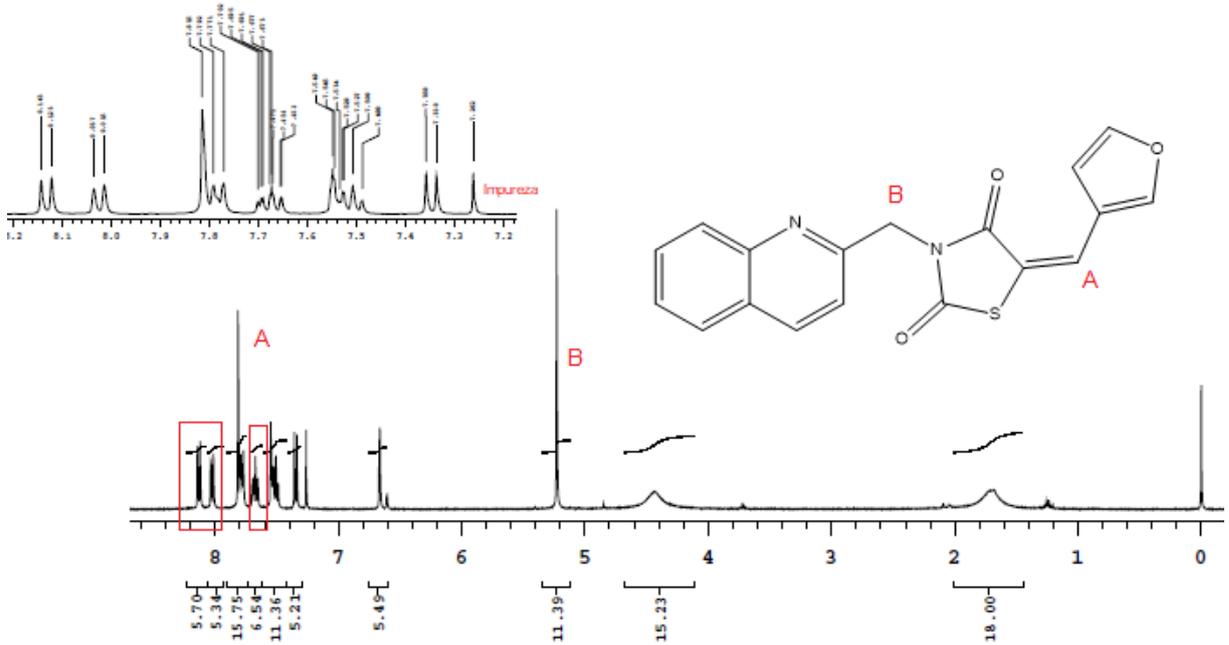
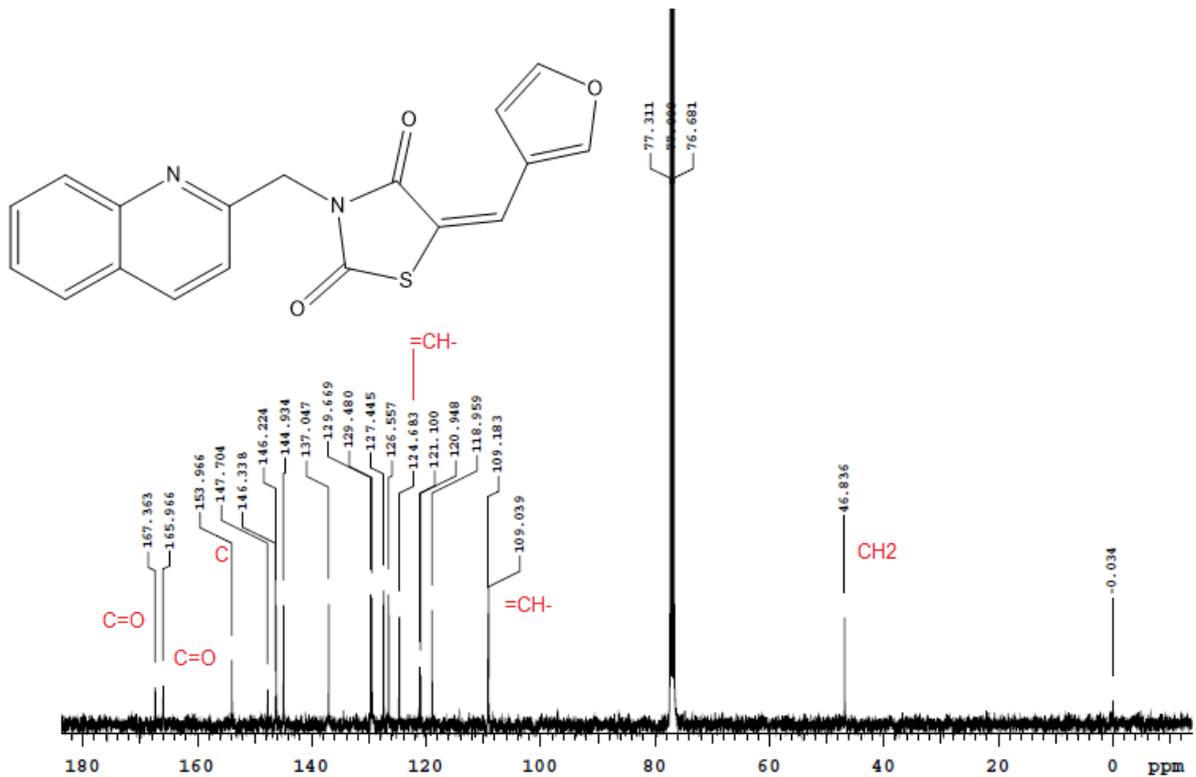


Figura 72 – MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD2

Comment 1 Massa molar: 423,9881g/mol



3.2 LPSF/ZKD4 – 5-(furan-3-ilmetileno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiiazolidina-2,4-diona

Figura 73 – RMN¹H – LPSF/ZKD4Figura 74 – RMN¹³C – LPSF/ZKD4

RMN ¹H (400MHz- CdCl₃): δ = 5,23 (s, 2H, CH₂); δ= 6,6 (s, 1H, CH); δ =7,3 (d, CH do furano); δ= 7,5-7,8 (m, CH do grupo quinolinico); δ= 8,0 (d, 1H, CH do grupo quinolinico); δ= 8,1 (d, CH do furano). **RMN ¹³C** (400MHz – CdCl₃): δ = 46,83 (CH₂); δ = 153,96 (C); δ = 165,96(C=O); δ = 167,36(C=O). **HPLC**: 9,3 minutos (100%).

Figura 75 – Espectro de Infravermelho LPSF/ZKD4

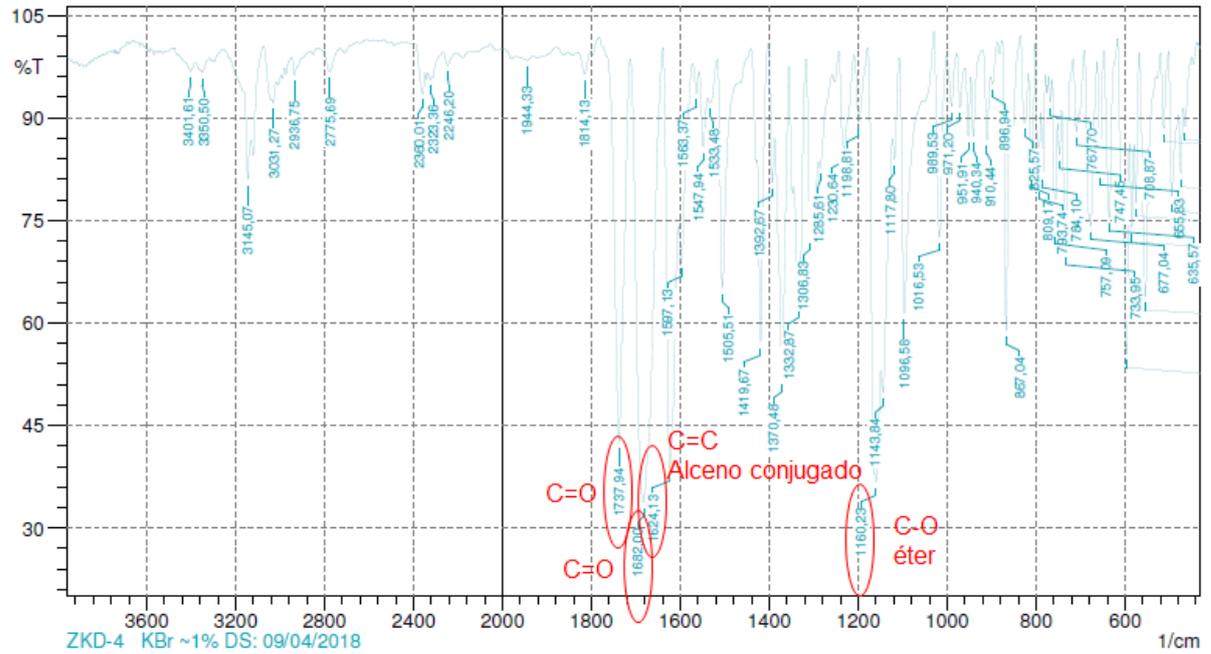
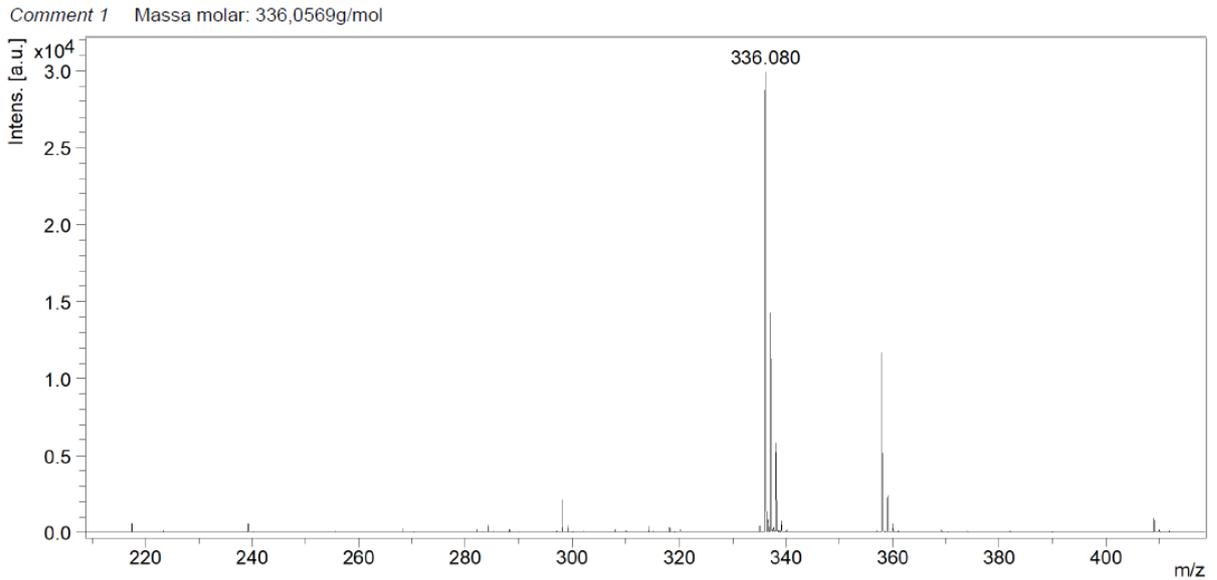
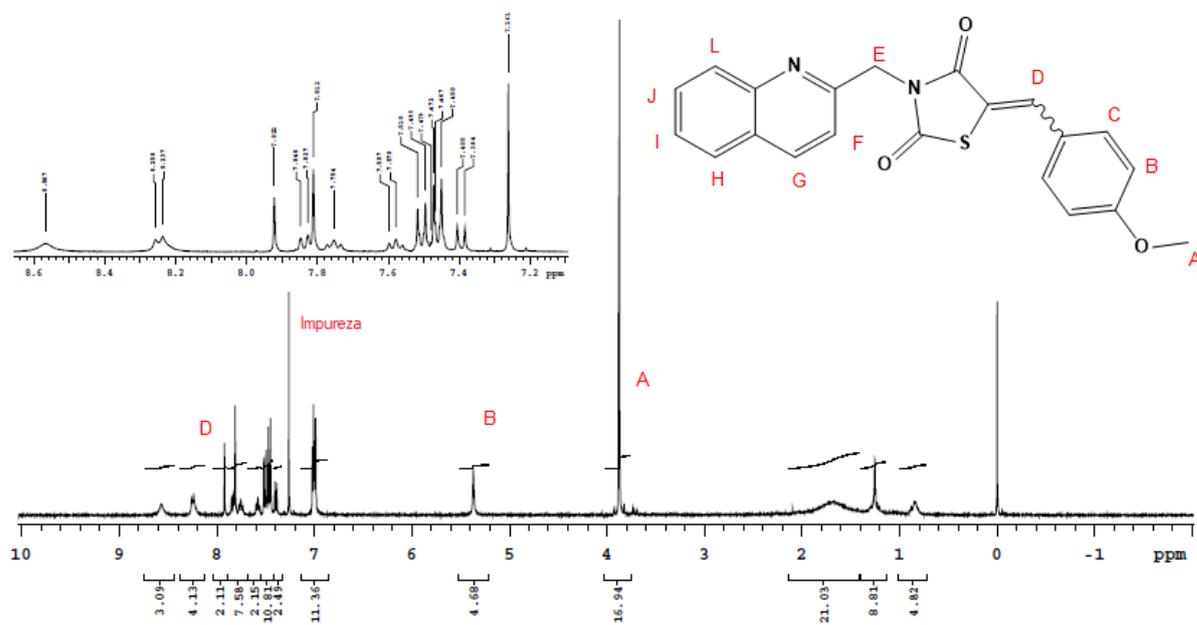
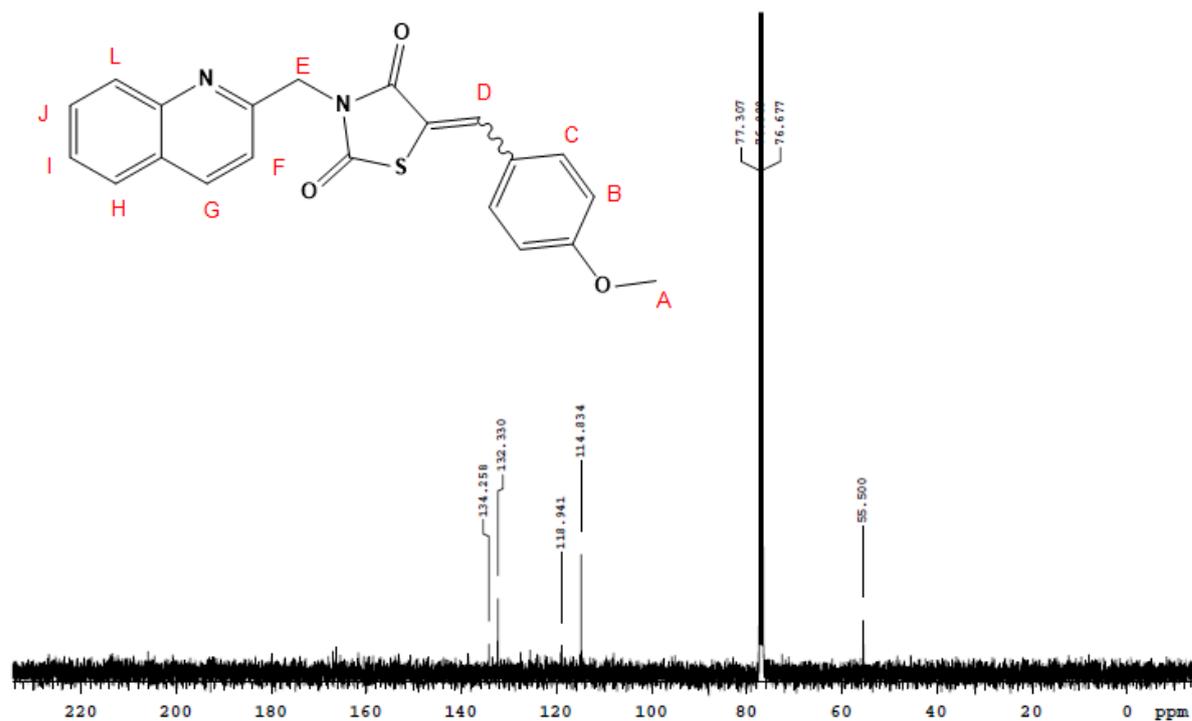


Figura 76 – MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD4



3.3 LPSF/ZKD5 – 5-(4-metoxibenilideno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiiazolidina-2,4-diona

Figura 77 – RMN¹H – LPSF/ZKD5Figura 78 – RMN¹³C – LPSF/ZKD5

RMN ¹H (400MHz- CdCl₃): δ = 3,8 (s, 3H, CH₃); δ = 5,23 (s, 2H, CH₂); δ= 7,92 (s, 1H, CH). RMN ¹³C (400MHz – CdCl₃): δ = 55,5 (CH₃). HPLC: 9,06 minutos (100%).

Figura 79 – Espectro de infravermelho LPSF/ZKD5

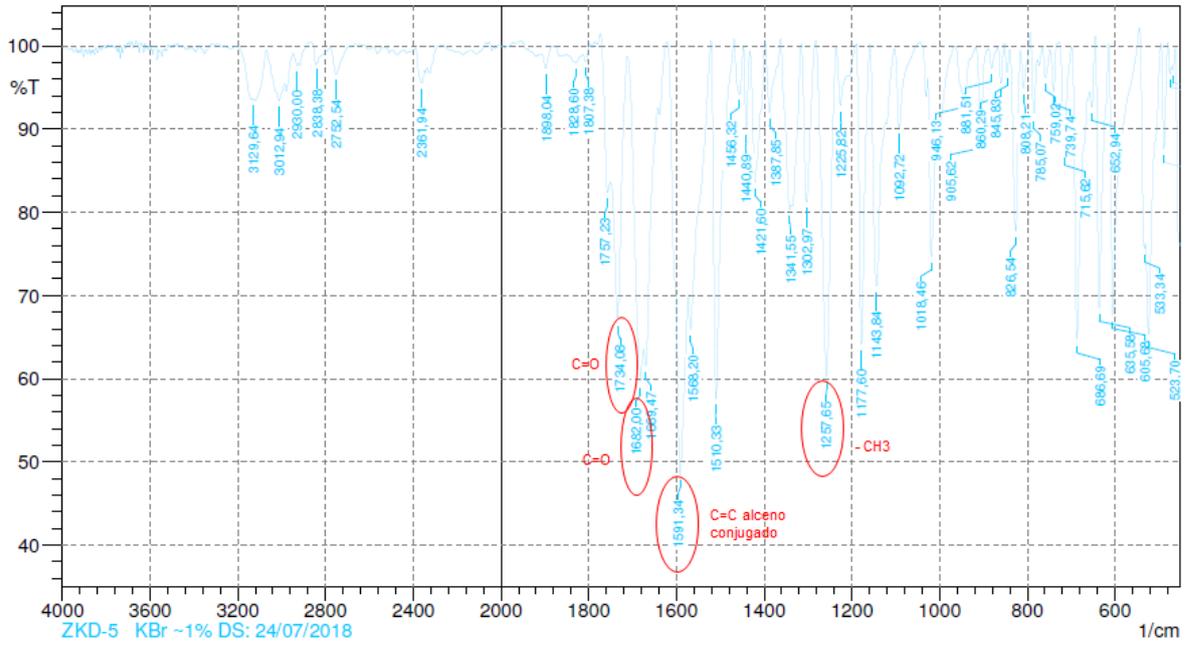
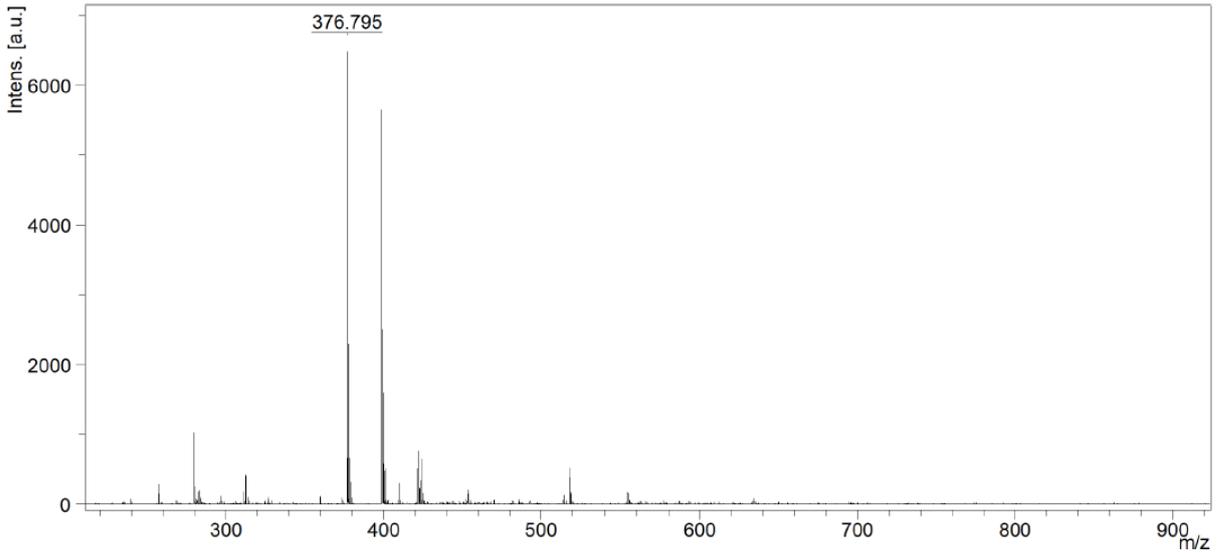
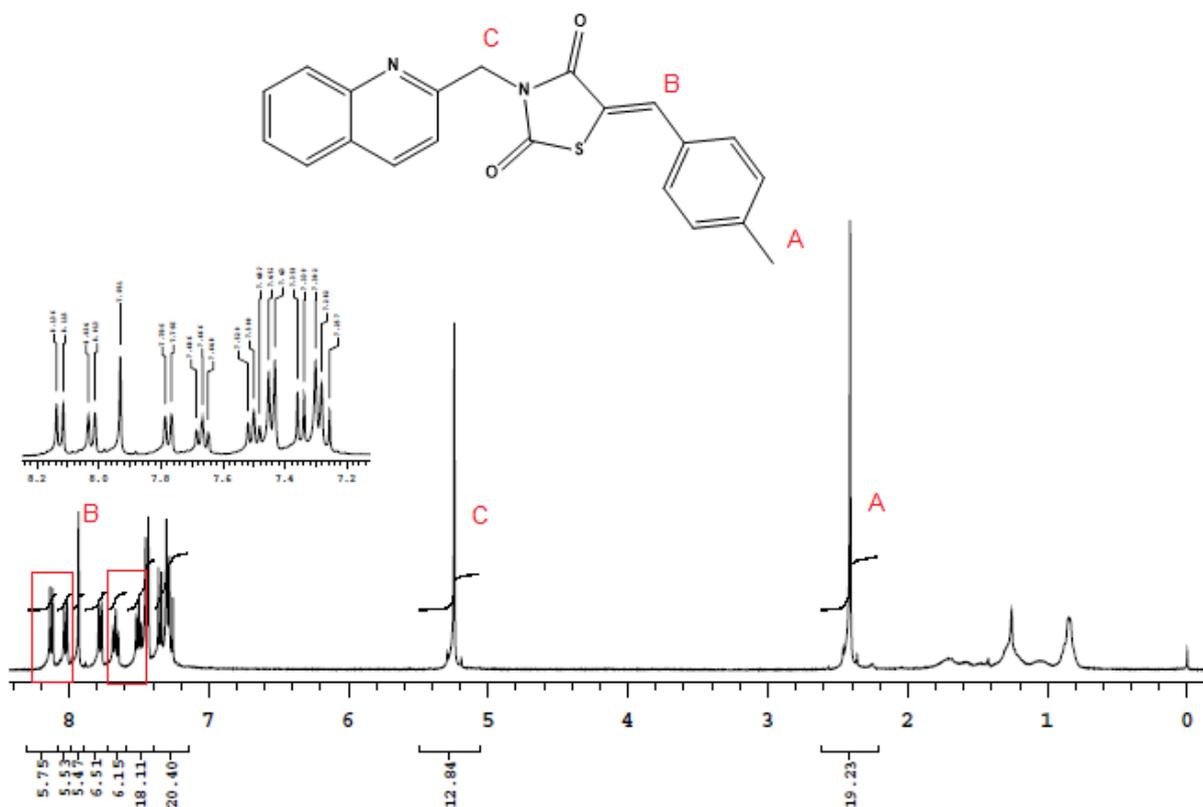
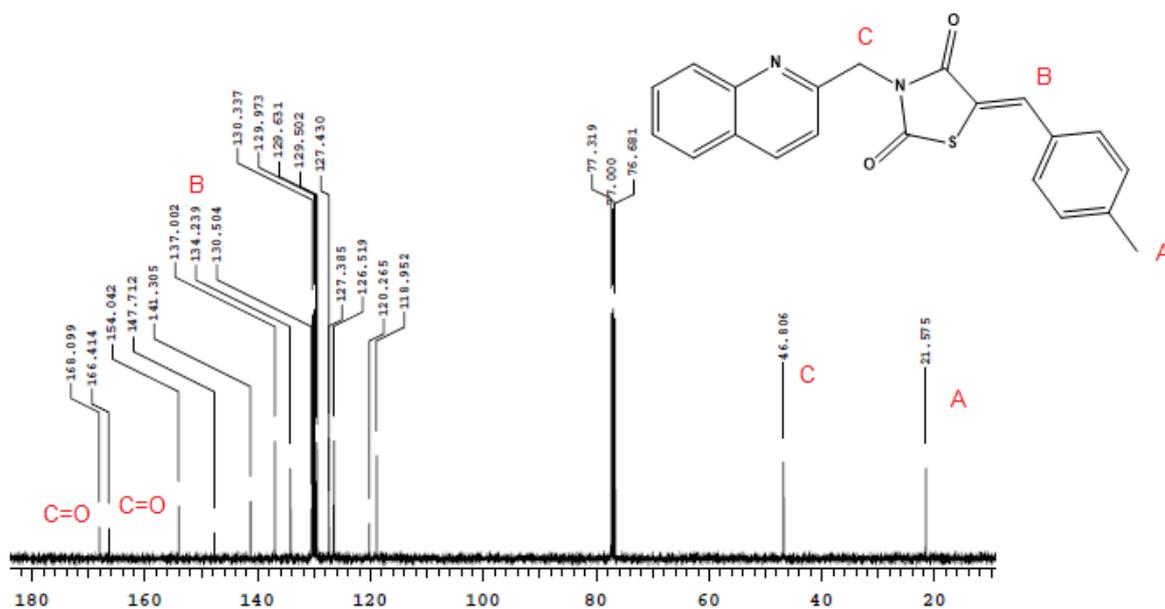


Figura 80 – MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD5

Comment 1 Massa molar: 376,4283g/mol



3.4 LPSF/ZKD6 – 5-(4-metilbenzilideno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiiazolidina-2,4-diona

Figura 81 – RMN¹H – LPSF/ZKD6Figura 82 – RMN¹³C – LPSF/ZKD6

RMN ¹H (400MHz- CdCl₃): δ = 2,41 (s, 3H, CH₃); δ= 5,24 (s, 2H, CH₂); δ =7,9 (s, 1H, CH). **RMN ¹³C** (400MHz – CdCl₃): δ = 21,57 (CH₃); δ = 46,83 (CH₂); δ = 166,4(C=O); δ = 168,0(C=O). **HPLC**: 8,8 minutos (96,27%).

Figura 83 – Espectro de Infravermelho LPSF/ZKD6

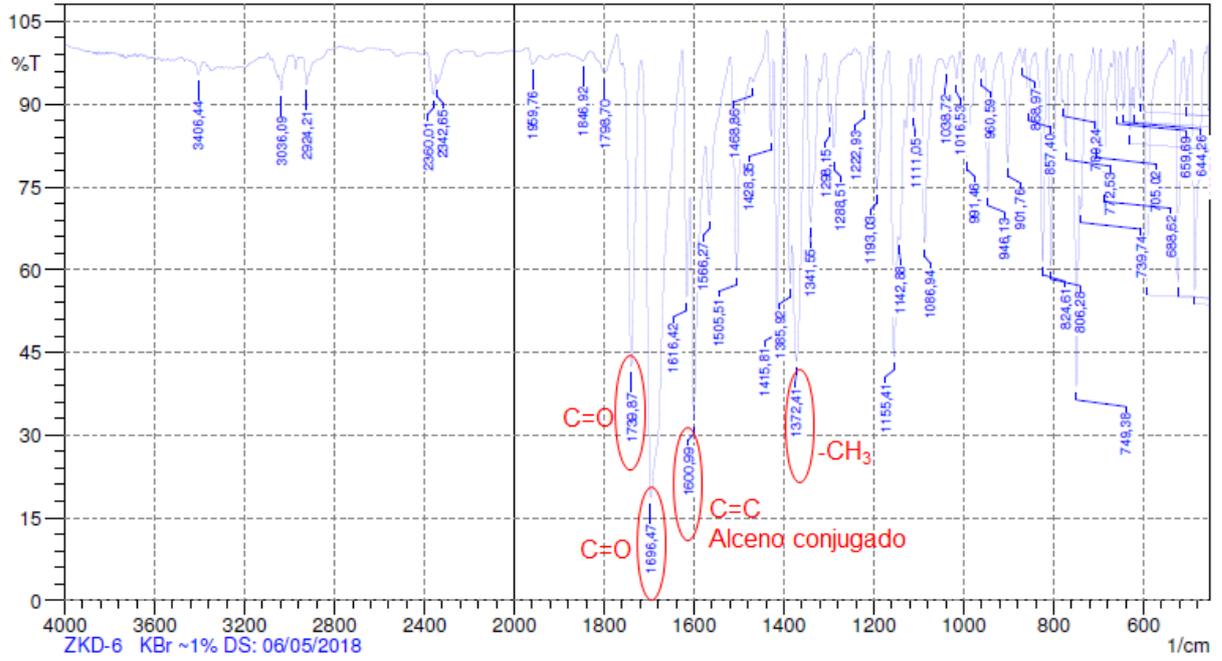
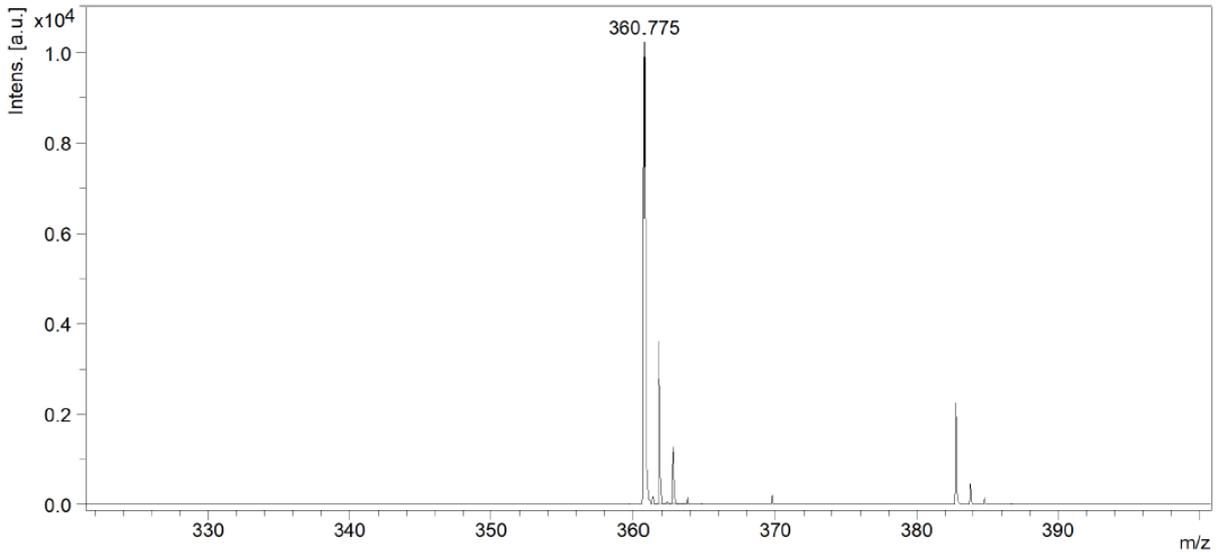


Figura 84 - MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD6

Comment 1 Massa molar: 360,0932g/mol



3.4 LPSF/ZKD7 – 5-(4-(dimetilamino)benzilideno)-3-(quinolin-2-ilmetil)tiiazolidina-2,4-diona

Figura 85 – RMN¹H – LPSF/ZKD7

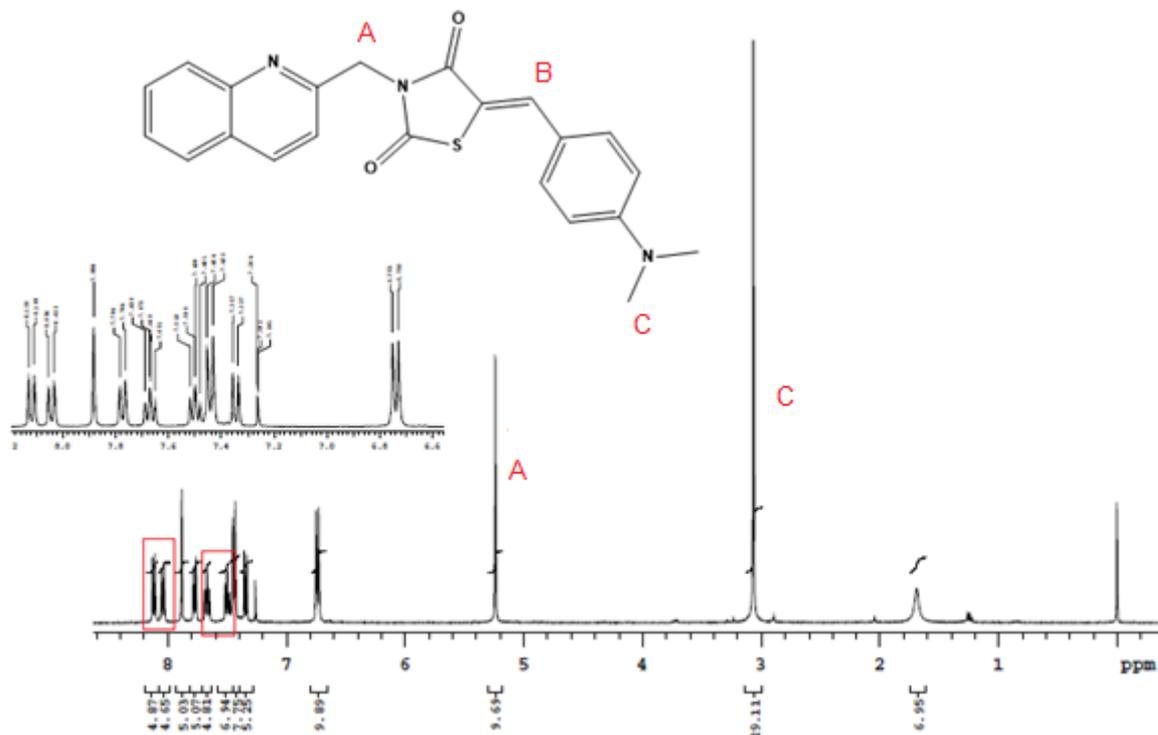
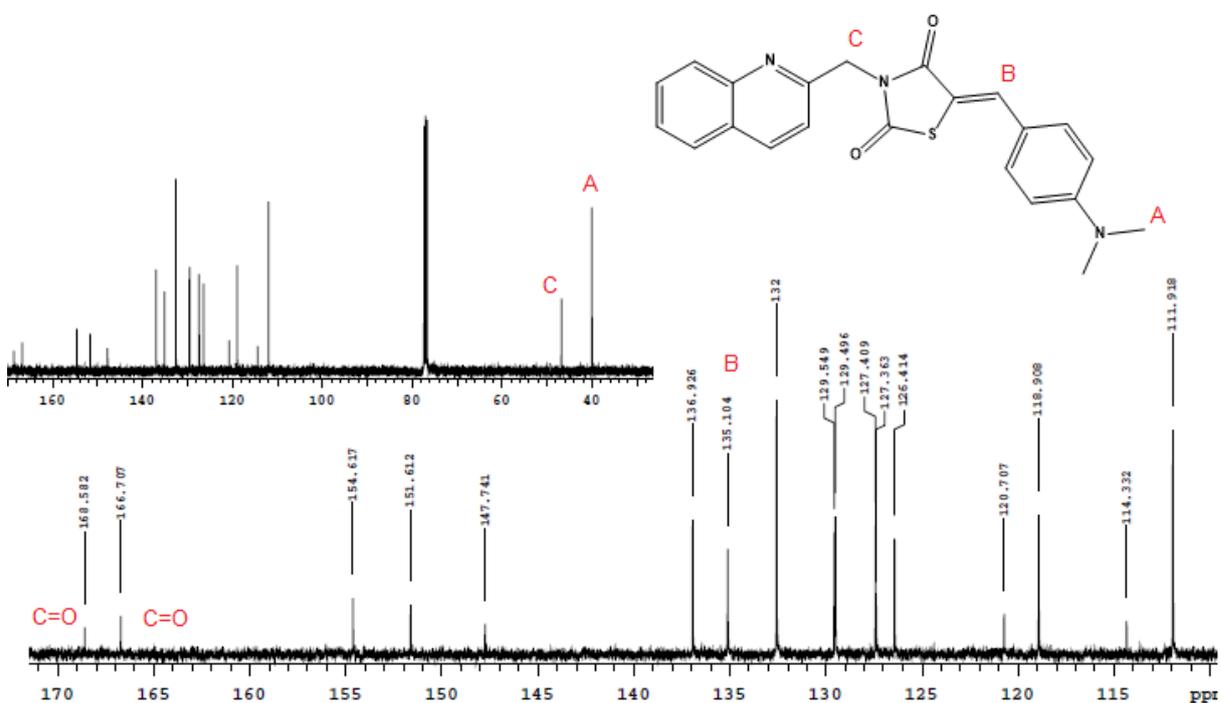


Figura 86 – RMN¹³C – LPSF/ZKD7



RMN ^1H (400MHz- CdCl_3): $\delta = 3.06$ (s, 6H, CH_3); $\delta = 5,2$ (s, 2H, CH_2); $\delta = 7,88$ (s, 1H, CH). **RMN ^{13}C** (400MHz – CdCl_3): $\delta = 40$ (CH_3); $\delta = 46,78$ (CH_2); $\delta = 135,10$ (CH); $\delta = 166,7$ ($\text{C}=\text{O}$); $\delta = 168,5$ ($\text{C}=\text{O}$). **HPLC**: 9,3 minutos (97,23%).

Figura 87 – Espectro de Infravermelho LPSF/ZKD7

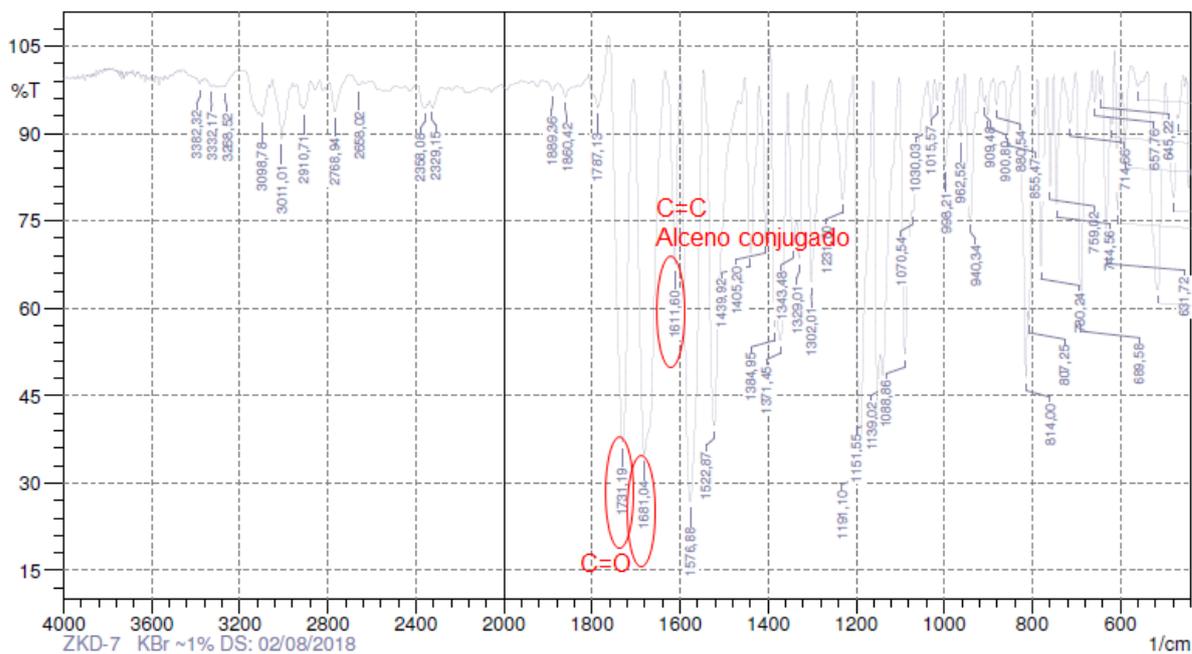
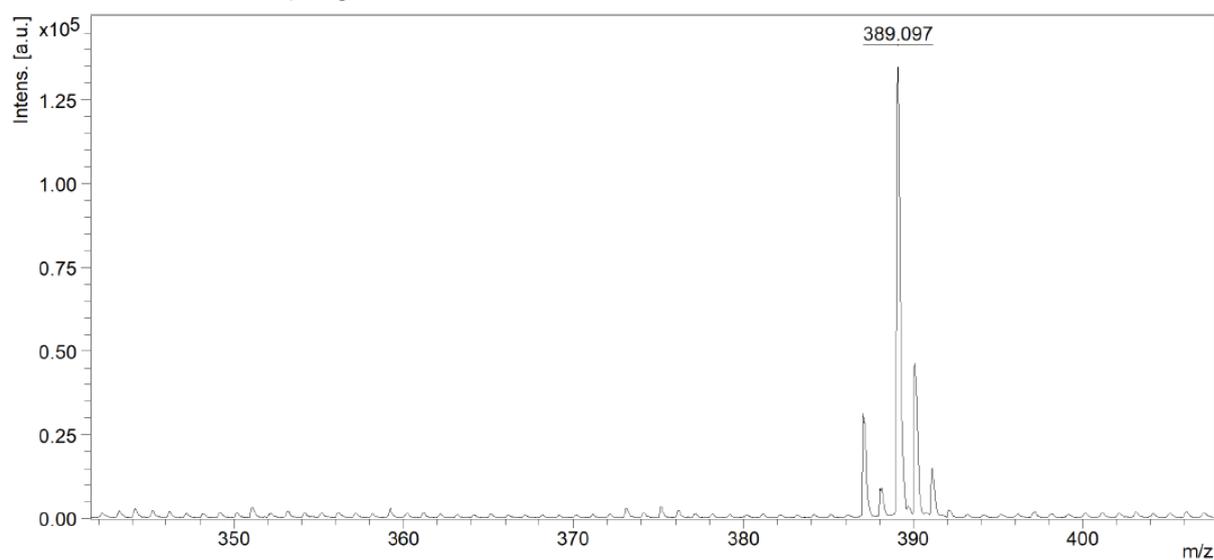
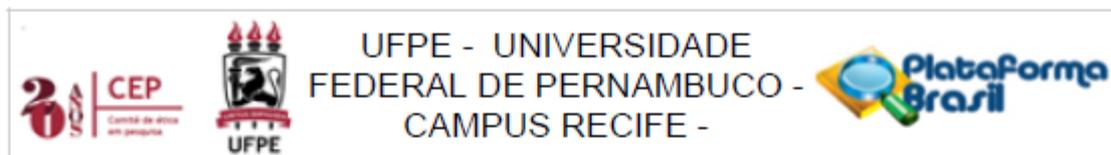


Figura 88 – MALDI-TOF/MS LPSF/ZKD7

Comment 1 Massa molar: 389,1198g/mol



ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS TIAZOQUINOLÍNICOS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIRREUMÁTICOS.

Pesquisador: SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03248918.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.135.350

Apresentação do Projeto:

O projeto "Planejamento, síntese e atividade anti-inflamatória de novos derivados tiazquinolínicos candidatos a fármacos antirreumáticos" trata-se de um projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da UFPE, de Sandra Elizabeth Barbosa da Silva, tendo como orientador, o Prof. Dr. Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, professor do Departamento de Antibióticos da UFPE e co-orientadoras as Profas Dras Marina Galdino da Rocha Pitta e Michelly Cristiny Pereira. Neste estudo serão sintetizadas e caracterizadas novas moléculas, sendo avaliadas sua ação em inibir algumas citocinas presentes no processo inflamatório apresentado na artrite reumatóide. Primeiro as moléculas passarão por teste para avaliar a sua citotoxicidade, aquelas que não forem tóxicas para células saudáveis irão passar pelo teste para avaliar a inibição de citocinas em um ambiente que simula o processo inflamatório.

Objetivo da Pesquisa:

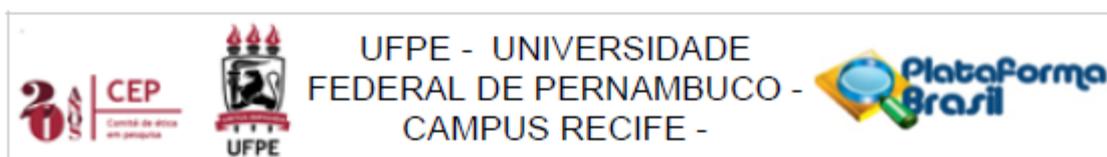
Objetivo Geral:

Desenvolver novas alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras para o tratamento da artrite reumatoide.

Objetivos Específicos:

- Planejar, sintetizar e realizar caracterização físico-química de novos derivados tiazquinolínicos.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.350

- Realizar elucidação estrutural das moléculas a serem sintetizadas.
- Avaliar o papel dos derivados tiazquinolínicos em inibir a produção de IL-17, IL-22, IL-6 e IFN- em esplenócitos de camundongos BALB/c após estimulação com mitógenos.
- Realizar a avaliação in vitro do papel dos derivados tiazquinolínicos em inibir a produção de citocinas das vias Th1, Th17 e Th22 em PBMCs provenientes de voluntários sadios após estimulação com PMA e Ionomicina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os voluntários serão submetidos a coleta de sangue e esta pode ser um pouco desconfortável ao voluntário e o braço apresentar um pequeno hematoma. Após a coleta, a fim de diminuir este risco, os participantes serão orientados a não realizarem movimentos bruscos durante 2-5 minutos para que haja adequada cicatrização. A coleta sanguínea será realizada por profissional especialista em flebotomia.

Benefícios:

Os benefícios da pesquisa não serão diretos para os voluntários. Os voluntários, ao doar o sangue para as análises, estarão contribuindo para um projeto de pesquisa importante cujo objetivo é avaliar moléculas inéditas candidatas a futuros fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa está fundamentado na literatura pertinente. Para este estudo serão coletados 15mL do sangue periférico de dez voluntários, em tubo contendo o anticoagulante heparina. Os voluntários selecionados serão indivíduos saudáveis, sem histórico de doenças autoimunes ou qualquer infecção e que não tenham ingerido álcool pelo menos 24h antes da coleta. Através da cultura de células será avaliada a citotoxicidade das moléculas e em seguida, aquelas que forem aprovadas para a próxima etapa, serão submetidas a avaliação da inibição da liberação de citocinas no meio. Todas as despesas serão custeadas pela pesquisadora responsável pelo projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora responsável anexou Folha de Rosto assinada pela coordenadora do Programa de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.350

Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e Declaração de vínculo no Mestrado do referido programa; Carta de Anuência do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT; projeto de pesquisa; TCLE para maiores de 18 anos ou emancipados, Termo de Compromisso e Confidencialidade assinado pela pesquisadora responsável e os currículos de todos os pesquisadores envolvidos no projeto.

Recomendações:

Os objetivos devem ser escritos com verbos no infinitivo.

Revisar erros de digitação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.350

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|---|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1255816.pdf | 22/11/2018 11:44:30 | | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadeRosto.pdf | 22/11/2018 11:43:01 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEMaiores18_SANDRA.doc | 22/11/2018 11:41:30 | SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Comite_SANDRA.doc | 22/11/2018 11:41:03 | SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA | Aceito |
| Outros | LattesMichellyCristinyPereira.pdf | 21/11/2018 00:22:52 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| Outros | carta_de_anuencia.pdf | 14/11/2018 20:09:08 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| Outros | termodeconfidencialidade.pdf | 14/11/2018 20:08:50 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| Outros | LattesSandraElizabethBarbosa.pdf | 14/11/2018 20:08:31 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| Outros | LattesMarinaGaldinodaRochaPitta.pdf | 14/11/2018 20:07:41 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| Outros | LatteslvandaRochaPitta.pdf | 14/11/2018 20:07:22 | SANDRA ELIZABETH | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | DECLARACAODEVINCULO.pdf | 14/11/2018 19:56:25 | SANDRA ELIZABETH BARBOSA DA SILVA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 07 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br