



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

LUCIANNA RABELO PESSOA DE SIQUEIRA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE 1,3-TIAZÓIS E 4-TIAZOLIDINONAS**

Recife
2019

LUCIANNA RABELO PESSOA DE SIQUEIRA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE 1,3-TIAZÓIS E 4-TIAZOLIDINONAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para o recebimento do título de doutora em Inovação Terapêutica.

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

Coorientadores: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego e Prof. Dr. Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso.

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Siqueira, Lucianna Rabelo Pessoa de
Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de 1,3-
tiazóis e 4-tiazolidinonas / Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira -
2019.

152 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego

Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Tiazolidinonas 2. Tiazóis 3. Compostos bioativos
I. Leite, Ana Cristina Lima (orient.) II. Rego, Moacyr Jesus Barreto de
Melo (coorient.) III. Cardoso, Marcos Veríssimo de Oliveira (coorient.)
IV. Título

615.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-136

LUCIANNA RABELO PESSOA DE SIQUEIRA

PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
1,3-TIAZÓIS E 4-TIAZOLIDINONAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 28/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

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

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª.: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª.: Michelly Cristiny Pereira (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr.: Paulo André Teixeira Moraes Gomes (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr.: Thiago André Ramos dos Santos (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho à minha mãe, por sempre estar presente em minha vida, por seu amor e incentivo aos meus planos. Ao meu marido, pela convivência, amor, apoio e companheirismo ao longo desses anos de pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a vida, experiências, sentimentos, aprendizados, pessoas. Gratidão a tudo que ele me concede e ao seu cuidado diário;

A minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Ana Cristina Lima Leite, pelas oportunidades, experiências e ensinamentos. Foram cerca de oito anos de convivência. Agradeço o crescimento proporcionado, a confiança, as palavras, carinho e todo o aprendizado.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Moacyr Barreto pela oportunidade de aprendizado em seu laboratório, os direcionamentos, as conversas e atenção ao longo desses últimos anos. Ao Prof. Dr. Marcos Cardoso, pelas ajudas que começaram desde a iniciação científica, todo apoio, simpatia e disponibilidade;

A toda a minha família, em especial a minha mãe, por todo seu apoio e amor não só durante o doutorado, mas ao longo de toda a minha vida. Ao meu marido Helton, pela compreensão, companheirismo, apoio, amor, paciência e tantas outras coisas que deixaram esse caminhar possível. Ao meu pai e meu irmão pelo apoio e ajuda. Colo de família é sem igual.

Aos amigos do laboratório de síntese da “geração atual” e também aos que parte não se encontram mais presentes, mas que permaneceram ao lado: Arsênio, Daura, Gevanio, Míria e Paulo André;

A todos do LpQM, em especial, ao mestrando Marcos Victor Gregório por todo o auxílio importantíssimo na parte da síntese e aprendizado diário enquanto éramos rotina.

A todos do LINAT, especialmente a Flaviana Alves, Eduardo Davi, Lília Galdino e Larissa Pelágia pelo compartilhamento de ensinamentos, risadas e companhia durante a realização dos experimentos da atividade biológica;

Aos meus amigos da graduação e também do colégio. Foram ótimos momentos compartilhados e são pessoas das quais irão e estão comigo para a vida inteira;

A Prof.^ª Dr.^ª Maria de Nazaré Correia Soeiro (Fiocruz – RJ) e Prof. Dr. Gevanio Bezerra pela parceria e execução dos ensaios biológicos anti-*T. cruzi*;

Aos funcionários da Central Analítica do DQF (UFPE), em especial a Eliete Barros, pelas análises espectroscópicas;

Aos funcionários do Cetene, pela realização das análises de IV e espectrometria de massas;

A FACEPE, pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (UFPE) e ao seu secretário Paulo Germano pela excelente prontidão e serviço prestado;

Ao CNPq, CAPES, FACEPE e INCT-Dengue, pelo suporte financeiro ao LpQM e LINAT.

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem (ROSA, 1994, p. 449).

RESUMO

Há uma variedade de heterociclos utilizados atualmente na terapêutica e a investigação desses núcleos têm se tornado crescente e promissora. O presente trabalho descreve a investigação de compostos bioativos utilizando-se de dois grupamentos farmacofóricos, são eles: as 4-tiazolidinonas (série **LR 01-18**) e os 1,3-tiazóis (série **DLT 01-22**). Inicialmente, planejou-se vinte e duas moléculas do tipo 1,3-tiazóis, os quais foram sintetizadas e devidamente caracterizadas. Uma série de 18 tiazolidinonas também foi utilizada nesse trabalho. As substituições realizadas nas tiazolidinonas foram nas posições N3 e C5 do anel heterociclo, enquanto que para a série dos tiazóis, explorou-se as substituições ao longo do grupo aril. As duas séries foram então avaliadas frente à atividade antineoplásica e a série dos tiazóis foi também avaliada frente à atividade anti-*T. cruzi*. Quanto à atividade anti-*T. cruzi* dos tiazóis, duas cepas foram utilizadas: cepa Y de tripomastigotas sanguíneas e as formas intracelulares da cepa Tulahuen, e a toxicidade avaliada em fibroblastos L929. As moléculas que apresentaram os melhores resultados frente à forma tripomastigota foram **DLT-02**, **DLT-03**, **DLT-04**, **DLT-11** e **DLT-13**, já frente à cepa Tulahuen, o composto **DLT-10** destacou-se na triagem e, posteriormente, teve o seu CC₅₀ calculado com o valor de 8,13 µM. Com relação à atividade neoplásica da série **LR**, realizou-se uma triagem, concentração única de 10µM, em sete linhagens neoplásicas: K562, MOLT-4, HL-60, MCF-7, SKMEL-28, PANC-1 e T47d. O controle positivo utilizado foi a Doxorubicina. Os compostos foram mais ativos nas linhagens de células hematopoiéticas quando comparados às linhagens de tumores sólidos, e, o destaque foi para o composto **LR-14**. O valor encontrado da CI₅₀ de **LR-14** frente a linhagem MOLT-4 foi de 7,97µM ± 1,04 e em K562 CI₅₀ foi de 20,96 µM ± 5,84. Nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade na dose de 100 µM em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Em leucemia mielóide crônica (K562), o composto **LR-14** induziu parada na fase celular S/G2/M nas duas concentrações testadas (20 µM e 30 µM). Os tiazóis foram avaliados em oito linhagens neoplásicas: MOLT-4, HL-60, HL-60mx1, MM1S, SKMEL-28, DU145, MCF-7 e T47d. O composto **DLT-02** apresentou valor de viabilidade celular inferior a 59% frente a MOLT-4, DU145 e HL-60mx1. Para linhagem MOLT-4, a sua CI₅₀ foi calculado em 8,03 ± 3,49 µM, já frente a DU145, revelou-se a CI₅₀ no valor de 6.04 ± 1.15 µM. Percebeu-se a capacidade do **DLT-02** em diminuir, cerca de 10%, a formação de novas colônias em células DU145, bem como a indução de morte de células, devido a presença de núcleos picnóticos. Além disso, após 72h de tratamento e utilizando a CI₅₀ e o dobro dessa concentração, verificou-se 20% a 30% de células mortas, sendo a maior parte por necrose/apoptose tardia. Com relação

ao ciclo celular, o composto parece não influenciar significativamente tanto na concentração da CI_{50} , bem como no dobro desta. Portanto, dentro da série de tializidinonas, destaca-se o composto **LR-14** frente à células K562, enquanto que para os tiazóis, o destaque vai para o composto **DLT-02** frente à células DU145 e MOLT-4.

Palavras-chave: *T. cruzi*. Câncer. Heterociclos. Compostos bioativos.

ABSTRACT

There are a variety of heterocyclic actually used in therapeutics and the research of these nucleus has become increasing and promising. The present study shows the investigation of bioactive compounds using two pharmacophoric groups: 4-thiazolidinones (**LR 01-18**) and 1,3-thiazoles (**DLT 01-22**). Initially, twenty-two 1,3-thiazoles were planned, synthesized and characterized. A series of 18 thiazolidinones were also used in this study. Substitutions at N3 and C5 positions were explored on the thiazolidinones rings, whereas for the thiazole series, the substitutions were explored along the aryl group. Two series were then evaluated against antineoplastic activity and the series of thiazoles was also evaluated against anti-*T. cruzi* activity. Regard the anti-*T. cruzi* activity on thiazoles series, two strains were used: Y strain of blood trypomastigotes and the intracellular forms of the Tulahuen strain, and the toxicity evaluated in L929 fibroblasts. Compounds **DLT-02**, **DLT-03**, **DLT-04**, **DLT-11** and **DLT-13** showed the best results against the trypomastigote form. The compound **DLT-10** was highlighted in the screening on the Tulahuen strain and subsequently had its CC₅₀ calculated with value of 8.13 μM. Regard antineoplastic activity, at single 10 μM concentration, seven tumor cell lines were screened: K562, MOLT-4, HL-60, MCF-7, SKMEL-28, PANC-1 and T47d. The positive control used to perform tests was Doxorubicin. Compounds were more active in the hematopoietic cell lines when compared to solid tumor lines, and the highlight was for the **LR-14** compound. IC₅₀ value **LR-14** against MOLT-4 cells was 7.97 μM ± 1.04, on K562 cells, IC₅₀ was 20.96 μM ± 5.84. None of the compounds showed cytotoxicity at the dose of 100 μM in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In chronic myelogenous leukemia (K562), **LR-14** compound induced arrest in the S/G2/M phase at the two concentrations tested (20 μM and 30 μM). Thiazoles were also evaluated on eight cell lines: MOLT-4, HL-60, HL-60mx1, MM1S, SKMEL-28, DU145, MCF-7 and T47d. Compound **DLT-02** showed a cellular viability of less than 59% on MOLT-4, DU145 and HL-60mx1 cells. On MOLT-4 cells, its IC₅₀ was calculated 8.03 ± 3.49 μM and against DU145 cells revealed the IC₅₀ of 6.04 ± 1.15 μM. Their ability to reduce the formation of new colonies, as well as the induction of cell death, due to the presence of pycnotic nucleus was observed. In addition, after 72 h of treatment at IC₅₀ and fold of IC₅₀, 20% to 30% of dead cells were found, most of which were due to necrosis/late apoptosis. Regard to the cell cycle, the compound does not appear to significantly influence both the at IC₅₀ concentration as well at fold of IC₅₀. Therefore, within the thiazolidinone series, the compound **LR-14** is highlighted on K562 cells, whereas for the thiazois, the highlight is for **DLT-02** on DU145 and MOLT-4 cells.

Keywords: *T. cruzi*. Cancer. Heterocyclic. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do anel tiazol	18
Figura 2 - Exemplo de fármacos que contém o tiazol em sua estrutura	19
Figura 3 - Exemplos de compostos 1,3-tiazóis. Os derivados 14 (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2017) e 1c (DE MORAES GOMES et al., 2016) com atividade anti- <i>T.cruzi</i> e os derivados 1d (DE SANTANA et al., 2018) e TP-07 (DAVID et al., 2017) como promissores agentes antitumorais.	20
Figura 4 - Estrutura do anel tiazolidinona	21
Figura 5 - Transmissão pelo vetor e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 6 - Estrutura química do Nifurtimox (1) e Benznidazol (2).....	26
Figura 7 - Estrutura da tiossemicarbazona	27
Figura 8 - Núcleo tiazolidinona e suas principais atividades biológicas	28
Figura 9 - Núcleo tiazolidinona com substituintes em posições diversas	29
Figura 10 - As formas de ressonância do anel tiazol	29
Figura 11 - Atividades biológicas dos tiazóis.....	30
Figura 12 - Protonação do anel tiazol	30
Figura 13 - Estruturas dos composto 14 e 1c.	31
Figura 14 - Estrutura de alguns dos principais protótipos a fármacos anti- <i>T. cruzi</i> do laboratório, baseados em 4- tiazolidinonas.	32
Figura 15 - Formação do câncer (simplificado)	33
Figura 16 - <i>Hallmarks</i> do câncer – principais características apresentadas por células transformadas.	34
Figura 17 - Visão reducionista versus células tumorais + microambiente.....	35
Figura 18 - Visão geral do ciclo celular.....	37
Figura 19 - Estruturas do Dasatanib e Tiazofurina.	40
Figura 20 - Estrutura do composto 9v.....	41
Figura 21 - Estruturas dos compostos 12i, MMPT e 5e.....	42
Figura 22 - Estrutura geral da série de tiossemicarbazonas e respectivo radical para molécula 9r (MAGALHAES MOREIRA et. al. 2014).....	44
Figura 23 - Planejamento estrutural para a série DLT	45
Figura 24 - Rota sintética das tiossemicarbazonas intermediárias (3a-v).....	46
Figura 25 - Rota sintética para obtenção dos tiazóis DLT 01-22.....	47
Figura 26 - Exemplo de espectro de IV, série DLT 01-22 (composto DLT-07).....	48

Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H da molécula DLT-07	49
Figura 28 - Espectro de RMN de ¹³ C da molécula DLT-07.....	50
Figura 29 - Estruturas de tiazóis com menores valores de CC ₅₀	56
Figura 30 - Estrutura do composto 1i	79
Figura 31 - Planejamento estrutural para as séries	80
Figura 32 - Rota sintética para obtenção das aril-4-tiazolinonas (LR 01-18).	81
Figura 33 - Avaliação da indução de morte do composto LR-14	85
Figura 34 - LR-14 frente ao ciclo celular de células K562.	86
Figura 35 - Gráfico concentração-resposta do composto DLT-02 em MOLT-4	91
Figura 36 - O composto DLT-02 inibe a formação de colónias de células DU145	92
Figura 37 - Efeitos do composto DLT-02 na indução da morte analisada por DAPI e Acridina/Laranja no dobro de CI ₅₀ após 72h de tratamento.....	93
Figura 38 - Efeitos do composto DLT-02 e doxorrubicina no ensaio de indução potencial de morte por citometria de fluxo em células DU145 após 48 h de tratamento.....	94
Figura 39 - A) Efeitos do composto DLT-02 e doxorrubicina no ensaio de indução potencial de morte por citometria de fluxo em células DU145 após 72 h de tratamento; B) Gráficos (plots) representativos da citometria.....	95
Figura 40 - Efeitos do composto DLT-02 e doxorrubicina na progressão do ciclo celular de células DU145 após 48 h de tratamento	96
Figura 41 - Efeitos do composto DLT-02 na migração celular em 0 h, 6 h e 12 h após o tratamento em células DU145.	97
Figura 42 - Efeitos do composto DLT-02 e amsacrina na progressão do ciclo celular de células MOLT-4 após 48 h de tratamento	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise dos critérios da regra de Lipinski e Veber calculados com SwissADME (http://swissadme.ch/)	51
Tabela 2 - Propriedades ADME dos compostos DLT 01-22	52
Tabela 3 - Avaliação da citotoxicidade da série DLT frente a fibroblastos L929 e atividade tripanocida <i>in vitro</i>	54
Tabela 4 - Citotoxicidade de tiazolidinonas em PBMCs.	82
Tabela 5 - Viabilidade celular da série LR em sete linhagens na concentração de 10 μ M.....	83
Tabela 6 - Viabilidade celular da série DLT em 4 linhagens aderentes na concentração de 10 μ M.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono;
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons;
BZD	Benznidazol
CCD	Cromatografia de camada delgada;
CI ₅₀	Concentração da droga necessária para causar 50% de inibição;
INCA	Instituto Nacional do Câncer;
IS	Índice de seletividade;
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional da Química Pura e Aplicada);
IV	Infravermelho;
MTT	do inglês 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina;
OMS	Organização Mundial de Saúde;
PBS	Tampão fosfato-salino;
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico (em inglês “peripheral blood mononuclear cell”).
PF	Ponto de fusão;
PSA	Área de superfície polar;
Rf	Fator de retenção;
REA	Relação estrutura-atividade;
SBF	Soro fetal bovino;
SDS	Dodecil sulfato de sódio;
TNF	Fator de necrose tumoral.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	23
2.1.2	Doença de Chagas – Características gerais	24
2.1.3	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> e tratamento para doença de Chagas	24
2.1.4	Núcleos de interesse: Tiossemicarbazonas.....	26
2.1.5	Núcleos de interesse: Tiazolidinonas.....	28
2.1.6	Núcleos de interesse: Tiazóis	29
2.1.7	Tiazóis e seus bioisómeros como agentes anti- <i>T. cruzi</i>	30
3	CÂNCER – GENERALIDADES E CARACTERÍSTICAS	32
3.1	CICLO CELULAR.....	38
3.2	QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER.....	38
3.2.1	Potenciais candidatos: tiazóis e tiazolidinonas.....	39
4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DA SÉRIE DE TIAZÓIS (DLT 01-22) ..	44
4.1	SÍNTESE DOS 1,3-TIAZÓIS (DLTs)	45
4.2	AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E FARMACOCINÉTICOS	45
4.2.1	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade tripanocida de 1,3-tiazóis.....	53
4.3	CONCLUSÃO	57
4.4	PARTE EXPERIMENTAL	57
4.4.1	Série dos 1,3-tiazóis.....	58
4.5	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA ANTI- <i>T. cruzi</i>	75

4.5.1	Análise tripanocida.....	75
4.5.2	Toxicidade para fibroblastos L929	76
4.5.3	Parasitas.....	76
5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE 4-TIAZOLIDINONAS E 1,3-TIAZÓIS.....	78
5.1	RESULTADOS	80
5.1.1	Compostos do tipo 4-tiazolidinonas (LR 01-18)	80
5.2	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE 4-TIAZOLIDINONAS	81
5.2.1	Avaliação de indução de morte em leucemia mielóide crônica.....	84
5.2.2	Avaliação da inibição do ciclo celular em leucemia mielóide crônica.....	85
5.2.3	Discussão.....	86
5.3	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE 1,3-TIAZÓIS.....	88
5.3.1	Ensaio Clonogênico em células de câncer de próstata DU145.....	91
5.3.2	Análise de morte celular por coloração de laranja de acridina/4', 6-diamidino-2-fenilindol.....	92
5.3.3	Avaliação de indução de morte em células de câncer de próstata.....	94
5.3.4	Avaliação da inibição do ciclo celular em células de câncer de próstata.....	95
5.3.5	Avaliação da inibição da migração celular.....	96
5.3.6	Avaliação da inibição do ciclo celular em leucemia mielóide aguda.....	97
5.4	DISCUSSÃO	98
5.5	CONCLUSÃO.....	100
5.6	PERSPECTIVAS.....	101
5.7	PARTE EXPERIMENTAL.....	101
5.7.1	Cultura e manutenção das linhagens celulares	101
5.7.2	Células oriundas de tumores sólidos.....	102

5.7.3	Células hematopoiéticas	102
5.7.4	Ensaio de toxicidade.....	102
5.7.5	Ensaio de toxicidade em células saudáveis não transformadas	103
5.7.6	Avaliação do potencial citotóxico/Triagem.....	103
5.7.7	Ensaio Clonogênico	103
5.7.8	Ensaio de migração celular (<i>Wound-Healing</i>)	103
5.7.9	Ensaio de indução de morte por laranja de acridina/DAPI.....	104
5.7.10	Avaliação da inibição do ciclo celular.....	105
5.7.11	Avaliação da indução de morte por citometria de fluxo.....	105
5.7.12	Análises estatísticas.....	106
6	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY	114
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FRONTIERS IN DRUG, CHEMISTRY AND CLINICAL RESEARCH	139
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	152

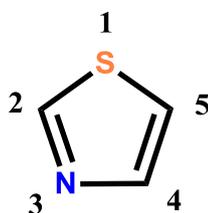
1 INTRODUÇÃO

Estruturas privilegiadas correspondem aos núcleos químicos capazes de se ligar a diferentes tipos de receptores, apresentando propriedades versáteis de ligação e gerando potentes ligantes. Tais estruturas podem ser ferramentas poderosas para impactar a biologia e medicina, sendo úteis na descoberta de fármacos e na terapêutica regulando macromoléculas relacionadas aos processos biológicos (JONES, 2017; WELSCH; SNYDER; STOCKWELL, 2010).

Os heterociclos de cinco membros, como por exemplo: tiofenos, oxazóis, benzoxazóis, tiazóis e tiazolidinonas, são considerados estruturas privilegiadas. Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos sintéticos para os sistemas heterocíclicos (HERAVI; TALAEI, 2015).

O núcleo tiazol (**Figura 1**) é um heterociclo importante em muitos compostos biologicamente ativos, por essa razão, é também um dos núcleos mais estudados e tem exercido importante papel na identificação e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (SIDDIQUI et al., 2009).

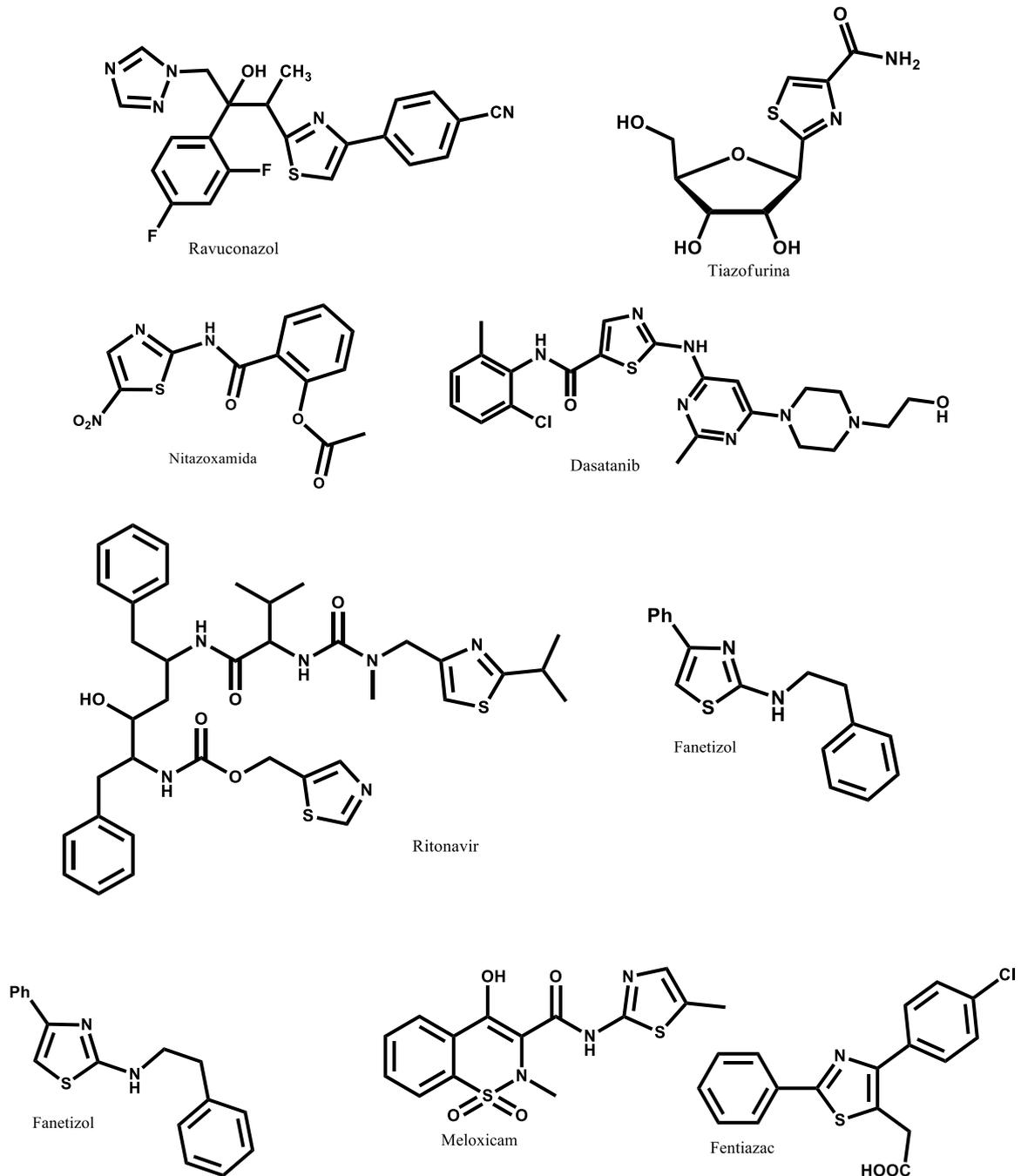
Figura 1. Estrutura do anel tiazol



Fonte: Elaborado pela autora.

Estudos apresentaram as aplicações do anel tiazol e seu importante papel na identificação de moléculas bioativas e também em sua otimização, estando presente na estrutura de diversos medicamentos já utilizados na terapêutica: Tiazofurina e Dasatinib (agentes antineoplásicos) (DAS et al., 2006), Ritonavir (Fármaco anti-HIV), Ravuconazole (agente antifúngico), Nitazoxanida (agente antiparasitário), Fanetizol, Meloxicam e Fentiazac (agentes anti-inflamatórios) (AYATI et al., 2015), como pode ser visto na **Figura 2**.

Figura 2. Exemplo de fármacos que contém o tiazol em sua estrutura

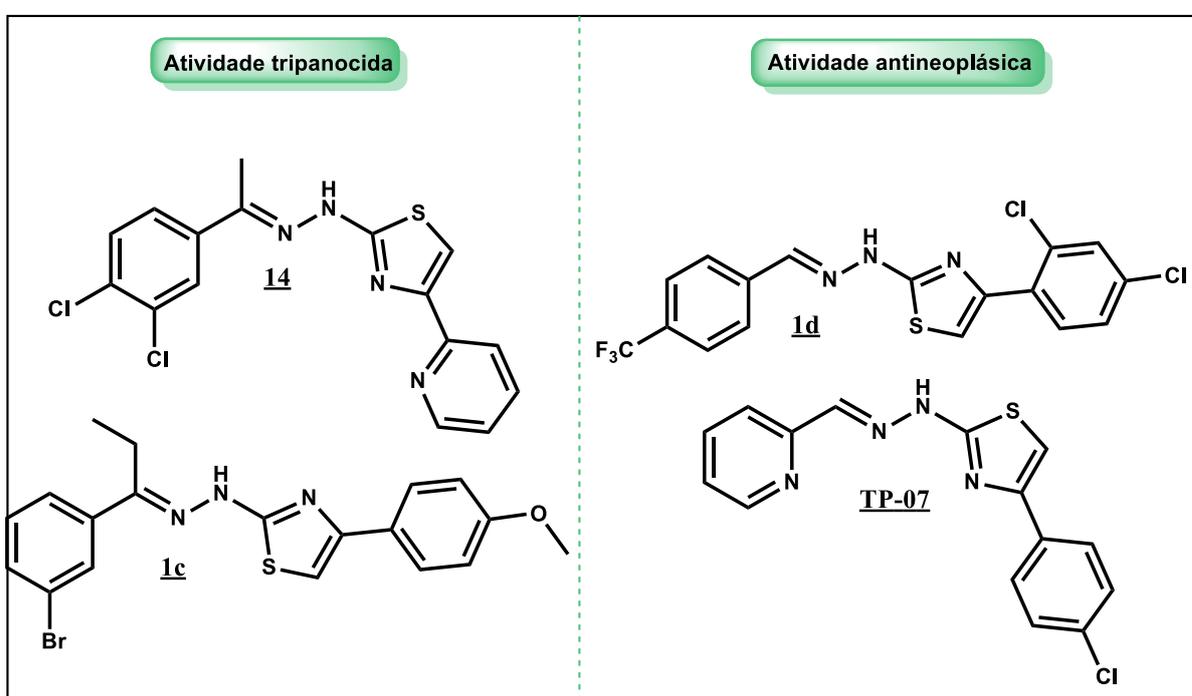


Fonte: AYATI, et al., 2015. Adaptado pela autora.

Dentro de um contexto multialvo, como visto em AYATI et al., 2015, os tiazóis têm a sua atividade anticâncer bastante explorada e os resultados além de crescentes, tem se mostrado promissores. Paralelamente, observa-se também dados interessantes frente à atividade antiparasitária. Muito dessa gama de atividades biológicas se deve a sua versatilidade química, uma vez que é um anel heterocíclico de fácil obtenção e que possibilita substituições diversas.

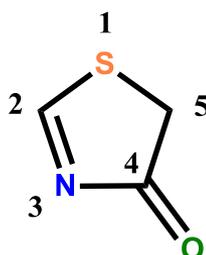
Nosso grupo tem-se dedicado à investigação desse grupo químico e na identificação de compostos promissores frente à atividade antiparasitária (CARDOSO et al., 2014; DE MORAES GOMES et al., 2016a, 2016b; DE OLIVEIRA FILHO et al., 2017) e antineoplásica (DAVID et al., 2017; DE SANTANA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2016). A **figura 3** ilustra quatro compostos com atividade antineoplásica e antiparasitária oriundos de trabalhos do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM, UFPE).

Figura 3. Exemplos de compostos 1,3-tiazóis. Os derivados **14** (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2017) e **1c** (DE MORAES GOMES et al., 2016) com atividade anti-*T.cruzi* e os derivados **1d** (DE SANTANA et al., 2018) e **TP-07** (DAVID et al., 2017) como promissores agentes antitumorais.



Fonte: Elaborado pela autora.

Outro importante núcleo que tem sido bastante explorado na literatura, bem como pelo nosso grupo de pesquisa, são as tiazolidinonas. Esse núcleo tem semelhança estrutural com o anel heterociclo tiazol, possuindo um grupo carbonila na posição 4. As 1,3-tiazolidin-4-onas são heterociclos que têm um átomo de enxofre na posição 1, um nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonilo na posição 4 (LESYK; ZIMENKOVSKY, 2004). Dentre as muitas atividades farmacológicas atribuídas às tiazolidinonas como antiviral, antineoplásica, antiparasitária, fungicida, entre outras (TRIPATHI et al., 2014), será explorado aqui a atividade antineoplásica.

Figura 4. Estrutura do anel tiazolidinona

Fonte: Elaborado pela autora.

Uma vez verificada a atividade tripanocida atribuída ao núcleo tiazol, é importante destacar a atual necessidade de identificação de novas opções terapêuticas para a doença de Chagas, já que esta apresenta, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), cerca de 6 a 7 milhões de pessoas acometidas. Além disso, o tratamento é composto apenas pelo Benznidazol que, por vezes, possui eficácia limitada. Nesse contexto, o presente trabalho descreve o planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica da atividade tripanocida de novos 1,3-tiazóis. Para esse mesmo núcleo químico, é visto também sua atividade anticâncer relatada na literatura, bem como ao núcleo químico tiazolidinona. Frente ao crescente número de novos casos de câncer ao longo dos últimos anos, assim como a existência de problemas de resistência e toxicidade dos atuais tratamentos disponíveis (INCA, 2019), o presente trabalho mostra a investigação dessas duas classes de compostos no contexto antineoplásico.

Dessa forma, os resultados do presente trabalho dividem-se em dois capítulos, os quais apresentam novos derivados 1,3-tiazóis (**DLT 01-22**), obtidos através da estratégia de bioisosterismo e sua avaliação frente à atividade tripanocida, presentes no capítulo 1. Já a avaliação frente à atividade antineoplásica da série de 1,3-tiazóis, bem como de 4-tiazolidinonas (**LR 01-18**) está exposta no capítulo 2.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Sintetizar tiazóis e investigar essas moléculas frente à atividade tripanocida e antineoplásica, bem como a avaliar a atividade antineoplásica de tiazolidinonas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar 22 compostos do tipo 1,3-tiazóis (**DLT 01-22**) e caracterizar estruturalmente essa série de compostos;
- Analisar a citotoxicidade frente a células normais das séries de tiazóis (**DLT 01-22**) e tiazolidinonas (**LR 01-18**);
- Avaliar a atividade anti-*T. cruzi* frente às formas tripomastigota e amastigota para tiazóis (**DLT 01-22**);
- Avaliar a atividade antineoplásica das tiazolidinonas (**LR 01-18**) e dos tiazóis (**DLT 01-22**).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças infecciosas negligenciadas afetam principalmente as populações que vivem em extrema pobreza e, por vezes, causam sofrimento, incapacidade permanente e morte. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 17 doenças parasitárias crônicas são classificadas como DTN (Doenças Tropicais Negligenciadas): dengue, raiva, tracoma, úlcera de Buruli (infecção por *Mycobacterium ulcerans*), treponematoses endêmicas, hanseníase (doença de Hansen), doença de Chagas (tripanossomíase americana), doença do sono (tripanossomíase africana), leishmaniose, cisticercose, dracunculíase (infecção pelo verme da guiné), equinococose, infecções por trematódeos causadas por alimentos, filariose linfática, oncocercose (cegueira dos rios), esquistossomose e helmintíases transmitidas pelo solo (OMS, 2018).

Na América Latina e no Caribe, estima-se que 46 milhões de crianças vivem em áreas de alto risco de infecção ou reinfecção com helmintos transmitidos pelo solo, enquanto cerca de 11 milhões de pessoas estão em risco de tracoma e 70,2 milhões estão em risco de doença de Chagas. Mais de 33 mil novos casos de hanseníase e mais de 51 mil casos de leishmaniose cutânea são relatados nas Américas a cada ano. Além disso, 70 milhões de pessoas na região estão em risco de doença de Chagas, 25 milhões sofrem de esquistossomose e 12,6 milhões sofrem de filariose linfática. (PAHO, 2017).

As doenças negligenciadas causam significativa morbidade e mortalidade no mundo em desenvolvimento. Dados mostrados pela Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas, DNDi (DNDi, da sigla inglesa, *Drugs for Neglected Diseases Initiative*), dos 850 novos produtos terapêuticos aprovados entre 2000 e 2011, apenas 4% (e apenas 1% de todas as novas entidades químicas aprovadas) foram indicados para doenças negligenciadas, mesmo que essas doenças representem 11% da carga global de doenças (DNDi, 2018). Desse modo, é possível perceber que os investimentos frente à novas alternativas terapêuticas na área são necessários.

O cenário de pesquisas referentes a fármacos para o tratamento da doença de Chagas tem evoluído, ainda que de maneira tímida, nos últimos anos, sobretudo, após o sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no homem (EL-SAYED et al.,

2005). Esses estudos possibilitaram a abordagem de alvos potenciais no *T. cruzi*, tais como o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas (LAVRADO et al., 2012).

2.1.2 Doença de Chagas – Características gerais

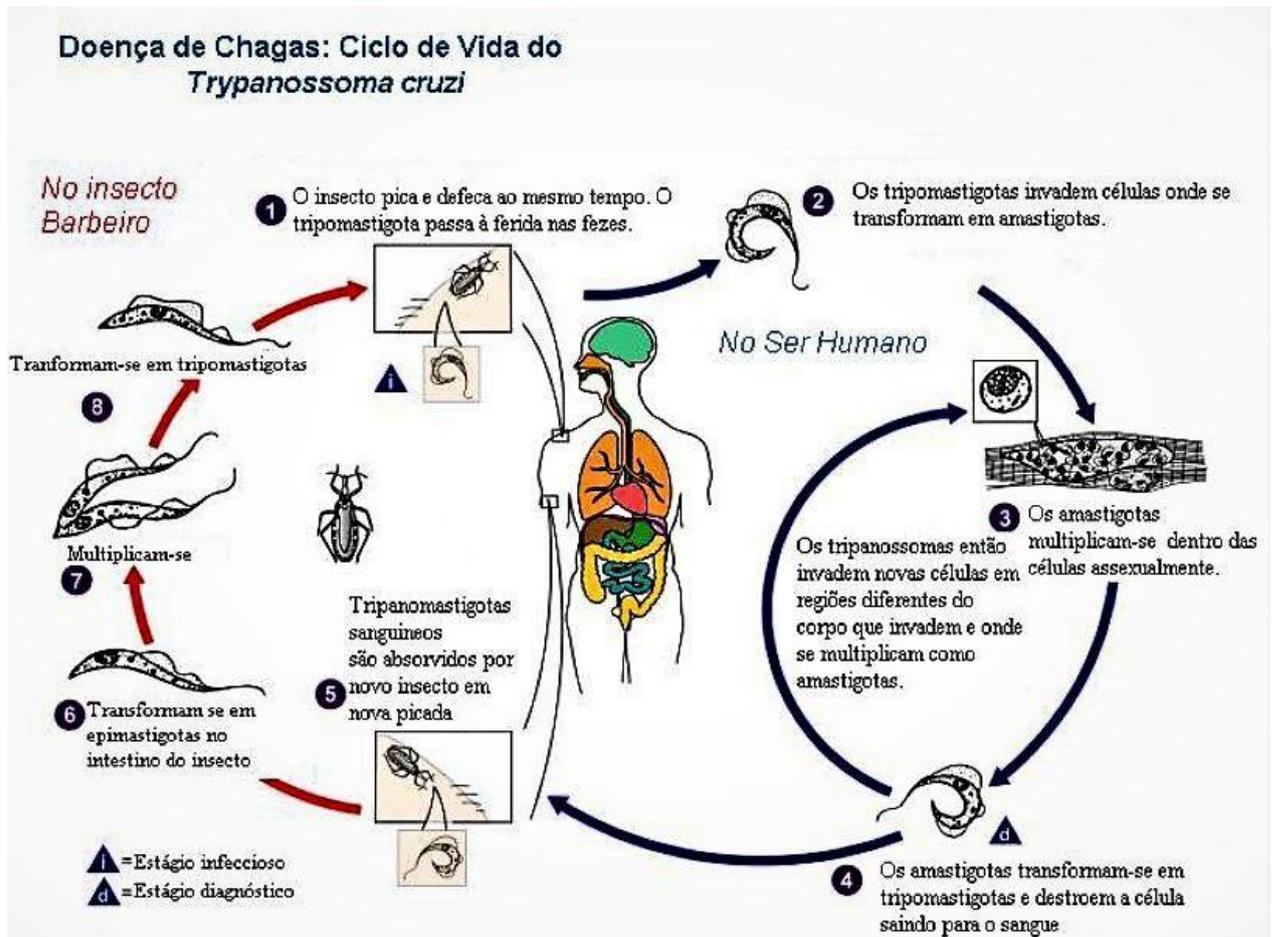
A doença de Chagas é classificada como enfermidade negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e apresenta-se em duas fases: fase aguda e crônica (WHO, 2012; WHO 2013). A distribuição espacial da doença é limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor, daí a razão de ser denominada "tripanosomíase americana". Progressivamente, no entanto, a doença tem alcançado países não endêmicos, mediante o deslocamento de pessoas infectadas e por meio de outros mecanismos de transmissão, como resultado do intenso processo de migração internacional. A OMS estima em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016).

A tripanossomíase americana é uma doença tropical parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. O *T. cruzi* é, normalmente, transmitido aos seres humanos e outros mamíferos por um inseto vetor, os insetos hematófagos da subfamília *Triatominae* (família *Reduviidae*), onde as espécies mais comuns pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (CDC, 2012). Os sintomas da doença de Chagas variam ao decorrer da infecção. No estágio inicial, conhecido como fase aguda, os sintomas produzem geralmente, no sítio da infecção, um inchaço local. A fase aguda é sensível aos tratamentos com antiparasitários, com as taxas de cura de 60 a 90%. Depois de 4 a 8 semanas, os indivíduos com infecções ativas entram na fase crônica da doença de Chagas, que é assintomática para 60 a 80% dos indivíduos durante quase toda vida (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

2.1.3 Ciclo de vida do *T. cruzi* e tratamento para doença de Chagas

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com vários estágios de desenvolvimento em insetos vetores e mamíferos hospedeiros. Tripomastigotas não replicativos, na corrente sanguínea, e amastigotas intracelulares replicativos, são as formas típicas do organismo, que são identificadas em hospedeiros mamíferos, enquanto epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos replicativos e infecciosos infectam o vetor triatomíneo (**Figura 5**) (PAHO, 2014).

Figura 5. Transmissão pelo vetor e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



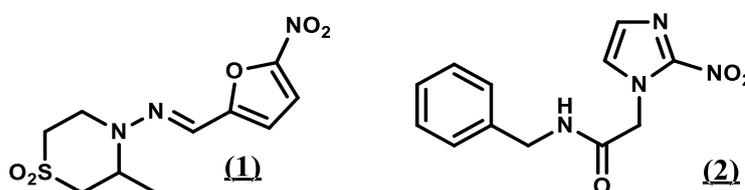
Fonte. UMESH S. PAL, 2011.

A transmissão pelo vetor acontece, inicialmente, pela penetração da membrana mucosa intacta do olho por tripomastigotas infecciosos e leva a uma reação indolor da conjuntiva, com edema unilateral de ambas as pálpebras e linfadenite do gânglio da pré-auricular (sinal de Romaña). A transmissão pode acontecer por qualquer outra parte do corpo também e geralmente pode conduzir a uma reação no tecido subcutâneo com edema local e endurecimento, congestão vascular e infiltração celular (chagoma). As tripomastigotas na célula hospedeira escapam a partir do vacúolo parasitóforo e são libertados para o citoplasma por um mecanismo não usual: tripomastigotas transformam-se em amastigotas esféricas que começam a replicação e quando a célula local fica inchada com amastigotas, transformam-se de volta para tripomastigotas com crescimento de flagelos. As tripomastigotas lisam as células infectadas, invadem os tecidos adjacentes e se espalham através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais distantes, principalmente células musculares (cardíaca, lisa e

esquelética) e as células ganglionares, onde se submetem a novos ciclos de multiplicação intracelular (PAHO, 2014). Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos potenciais para a infecção. Com o desenvolvimento da resposta imunológica, o número de parasitos nos tecidos diminui substancialmente, indicando o fim da fase aguda. No entanto, uma vez que o parasito não é completamente eliminado, a infecção de tecidos específicos, tais como o músculo ou gânglio entérico, persiste indefinidamente no organismo do hospedeiro (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Embora cerca de oito milhões de pacientes na América Latina estejam infectados com o *T. cruzi*, o tratamento farmacológico frente à doença de Chagas permanece inapropriado, mesmo após mais de 100 anos da sua descoberta. Neste contexto, há somente dois medicamentos aprovados para uso clínico, o Benznidazol (BZD) e o Nifurtimox (**Figura 6**), sendo o BZD, o fármaco disponível para tratamento no Brasil (RASSI, TRANCHESE, TRANCHESE, 1991; RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). O tratamento mostra-se mais eficaz no início da infecção e há relatos da capacidade limitada do Benznidazol em efetuar a cura parasitológica, particularmente durante a fase crônica, com efeitos colaterais frequentes que podem levar à interrupção do tratamento (CARDOSO *et al.*, 2014), são eles: dermatite alérgica, prurido, febre, intolerância gastrointestinal, entre outros (CASTRO *et al.*, 2006). Além disso, o fator geográfico com suas diferentes linhagens do *T. cruzi* podem interferir e resultar em eficácias diferentes, somado ao fato da dificuldade na prescrição de uma dose adequada (GARCIA S. *et al.*, 2005)

Figura 6. Estrutura química do Nifurtimox (1) e Benznidazol (2).



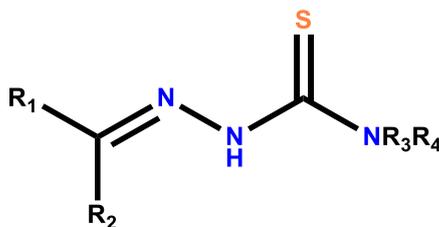
Fonte. Elaborado pela autora.

2.1.4 Núcleos de interesse: Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são compostos de interesse científico devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral (FEUN *et al.*, 2002), antibacteriana

(KASUGA et al., 2003), antiviral (TEITZ, Y. A., RONEN, D., VANSOVER, A., STEMATSKY, T., & RIGGS, 1994), antiprotozoária (BHARTI et al., 2002), citotóxica (LIMA, P. C.; AVERY, M. A.; TEKWANI, B. L.; ALVES, H.; BARREIRO, J.; FRAGA, 2002), dentre outras. A estrutura química das tiossemicarbazonas é mostrada na **Figura 7**. Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (TENÓRIO et al., 2005).

Figura 7. Estrutura da tiossemicarbazona



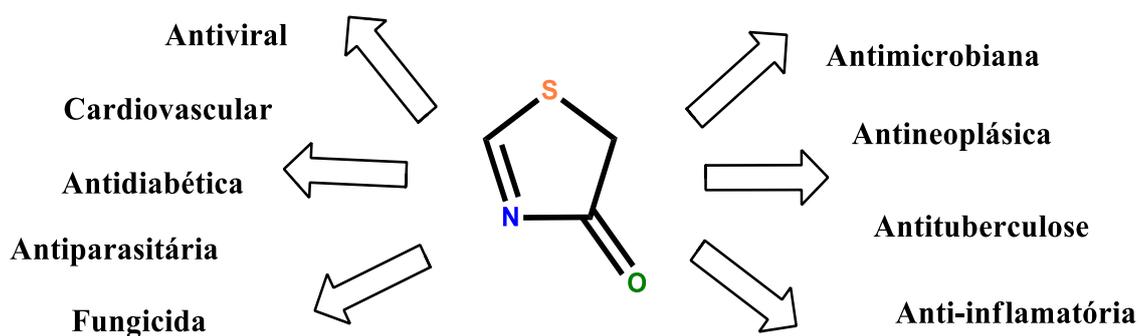
Fonte. (TENÓRIO et al., 2005). Adaptado pela autora.

As tiossemicarbazonas, em presença de compostos do tipo α -halogeno-cetonas, funcionam muito bem na síntese de tiazóis. Isto acontece porque as α -halogeno-cetonas são muito reativas frente ao grupo tioamida nucleofílico presente na estrutura das tiossemicarbazonas e, conseqüentemente, levam à ciclização para formar o heterociclo (TENÓRIO et al., 2005). Outro núcleo facilmente obtido por meio de tiossemicarbazonas são as tiazolidinonas, as quais podem ser ciclizadas juntamente com ácidos e/ou ésteres halogenados, por exemplo. As três classes de compostos citadas (tiossemicarbazonas, tiazolidinonas e tiazóis) são bastante importantes na química medicinal devido às suas atividades biológicas (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2002).

2.1.5 Núcleos de interesse: Tiazolidinonas

Os derivados de 4-tiazolidinona apresentam diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatórias, anti-proliferativas, antiviral, anticonvulsivo, anti-diabético, anti-hiperlipidêmico, cardiovascular, anti-tuberculoso, antifúngico e antibacteriano (TRIPATHI et al., 2014) (**Figura 8**).

Figura 8. Núcleo tiazolidinona e suas principais atividades biológicas



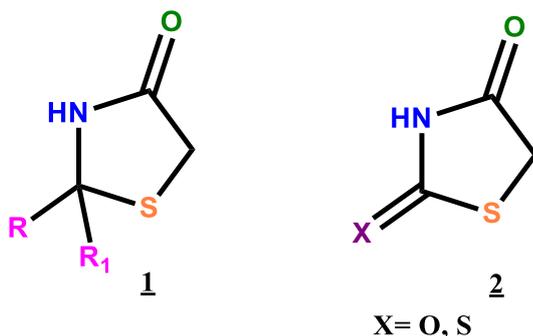
Fonte. Elaborado pela autora.

Alguns medicamentos como: Ralitolina (anticonvulsivante), etozolina (antihipertensivo), pioglitazona (hipoglicêmico) e tiazolidomicina (atividade contra espécies de *Streptomyces*), possuem o núcleo químico em questão presente nas suas estruturas e já se encontram no mercado (TRIPATHI et al., 2014).

A química das 4-tiazolidinonas foi descrita de forma detalhada em BROWN, 1961. Como já evidenciado na **Figura 4** sobre a posição e numeração dos átomos em seu anel heterociclo, podemos pontuar algumas modificações estruturais possíveis nesse anel:

- Os substituintes nas posições 2, 3 e 5 podem ser variados, mas a maior diferença nas propriedades e estrutura é exercida pelo grupo ligado ao átomo de carbono na posição 2 (R e R₁ em estrutura **1** ou X em estrutura **2**, **Figura 9**, abaixo)

Figura 9. Núcleo tiazolidinona com substituintes em posições diversas



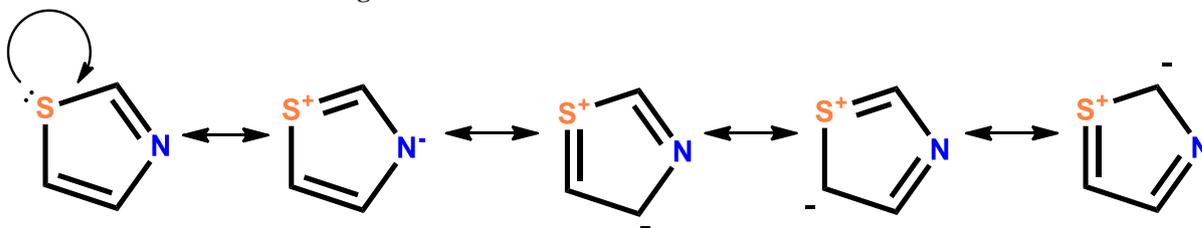
Fonte. THIPATHI et al., 2014. Adaptado pela autora.

- Variações nos substituintes ligados ao átomo de nitrogênio e o átomo do carbono metileno são possíveis para as estruturas, representado pelas estruturas **1** e **2**.
- O grupo carbonila da 4-tiazolidinona é não reativo, contudo, em alguns casos, nas reações de 4-tiazolidinonas com o reagente de Lawesson resulta no correspondente derivado 4-tiona (KATO et al., 1999).

2.1.6 Núcleos de interesse: Tiazóis

O anel tiazol é um heterociclo (**Figura 1**) importante que está presente em muitos compostos biologicamente ativos e é também um dos núcleos químicos mais estudados (SIDDIQUI et al., 2009). O anel tiazol possui uma deslocalização de um único par de elétrons do átomo de enxofre (ABELE et al., 2007) e as formas de ressonância são mostradas na **Figura 10**.

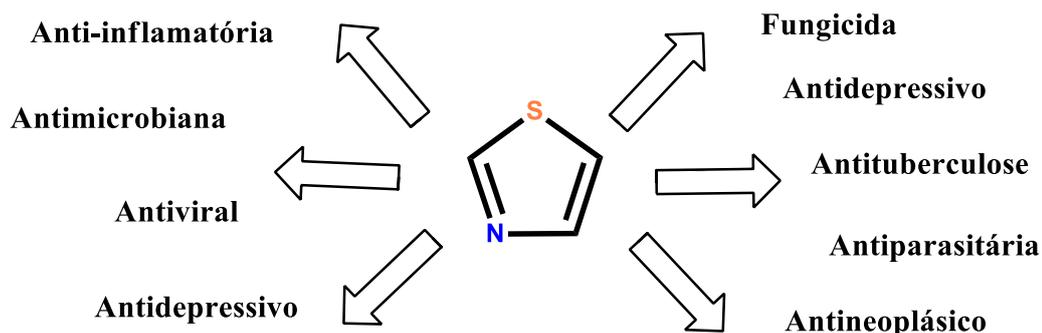
Figura 10. As formas de ressonância do anel tiazol



Fonte. (AYATI et al., 2015). Adaptado pela autora.

Os tiazóis estão relacionados com um grande número de aplicações biológicas. Dentre estas, podem-se citar atividades antimicrobiana, antifúngica, anticâncer, antiparasitária e antiinflamatória, **Figura 11** (AYATI et al., 2015; DE MORAES GOMES et al., 2016b; HOLLA et al., 2003).

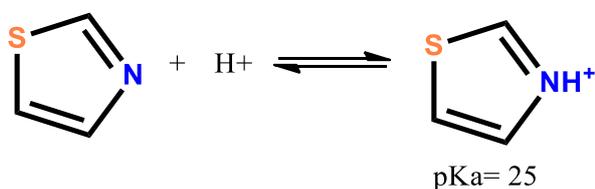
Figura 11. Atividades biológicas dos tiazóis



Fonte. Elaborado pela autora.

O caráter aromático do anel tiazol é também evidenciado por espectroscopia de RMN de ^1H . O deslocamento químico dos hidrogénios do anel é verificado entre 7,27 e 8,77 ppm, indicando um forte efeito diamagnético. O tiazol é protonado sob as condições ácidas, como ilustrado na **Figura 12**:

Figura 12. Protonação do anel tiazol



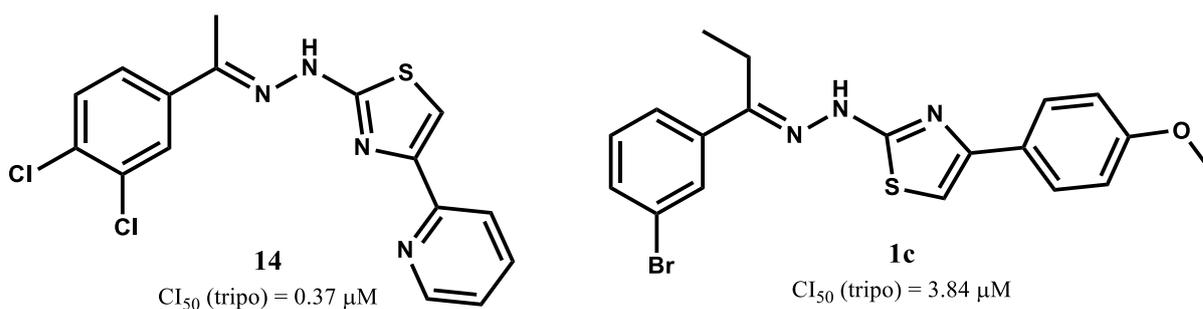
Fonte. (AYATI et al., 2015). Adaptado pela autora.

2.1.7 Tiazóis e seus bioisómeros como agentes anti-*T. cruzi*

O desenvolvimento de trabalhos frente à atividade anti-*T. cruzi*, utilizando-se de grupamentos químicos como tiazóis, tiazolidinonas e tiossemicarbazonas, têm sido cada vez

maiores. São notáveis os seus relatos de atividade antiparasitária (GAWANDE et al., 2013; MASOUD et al., 2013; MOREIRA et al., 2012; PIZZO et al., 2011). Em um estudo, foi demonstrado atividade tripanocida para uma série de 4-ariltiazolilhidrazonas (CAPUTTO et al., 2012), que tem atividade potente para todas as formas do parasita. Além disso, DU et al 2002 descreveram a 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona como uns dos mais eficazes inibidores da cruzaina com atividade tripanocida em níveis que não são tóxicos para células de mamíferos, dessa forma, DE MORAES GOMES et al. 2016c, sintetizaram tiazóis derivados da 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona, tendo o composto **1c** (**Figura 13**), frente a forma tripomastigota, atividade superior ao Benznidazol e Nifurtimox (**Figura 6**). Outro destaque com a presença do anel tiazol em sua estrutura, e, que também apresentou atividade superior ao Benznidazol e Nifurtimox foi o composto **14** (DE OLIVEIRA FILHO et. al. 2017) (**Figura 13**).

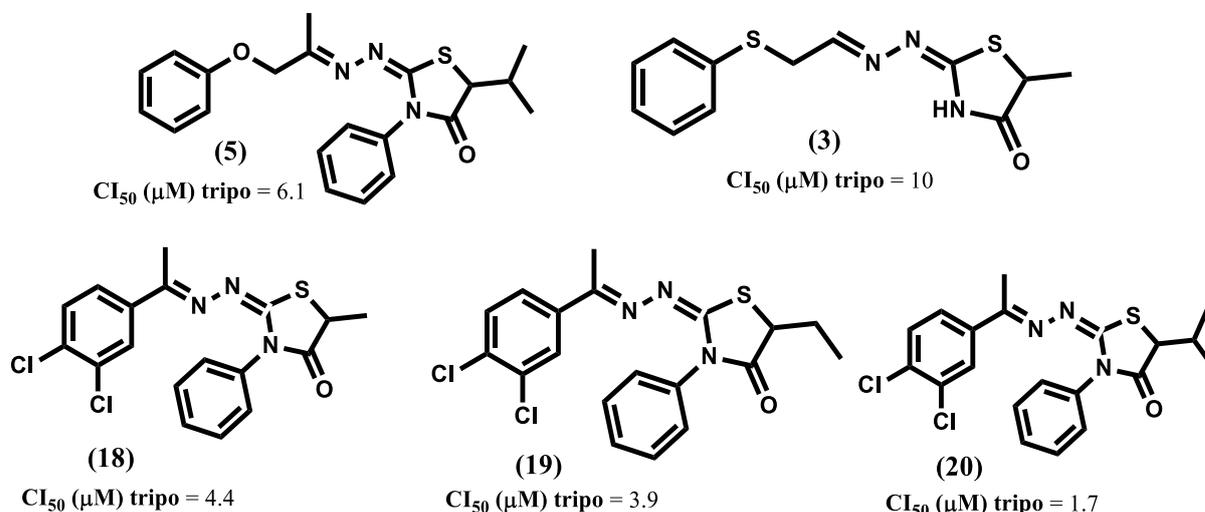
Figura 13. Estruturas dos composto **14** e **1c**.



Fonte. Elaborado pela autora.

MOREIRA et. al. avaliaram a atividade anti-*T. cruzi* de 4-tiazolidinonas e verificou-se que esses compostos promoveram a inibição da atividade da cruzaina e a proliferação das epimastigotas do *T. cruzi*, sendo fatais para a forma tripomastigota nos ensaios *in vitro* em concentrações não tóxicas para esplenócitos de ratos. Nos ensaios *in vivo*, destacou-se o composto **5** (**Figura 14**), que conseguiu reduzir a parasitemia sanguínea nos camundongos infectados. Ainda sobre as tiazolidinonas do nosso grupo de pesquisa, destaca-se também o trabalho de DE OLIVEIRA FILHO et al., 2015, onde foi possível encontrar tiazolidinonas (compostos **18-20**) (**Figura 18**), com resultados promissores frente a tripomastigotas da cepa Y, e, em macrófagos infectados, esses compostos (**18-20**) reduziram as amastigotas intracelulares, enquanto que o BZD não o fez.

Figura 14. Estrutura de alguns dos principais protótipos a fármacos anti-*T. cruzi* do laboratório, baseados em 4-tiazolidinonas.



Fonte. Elaborado pela autora.

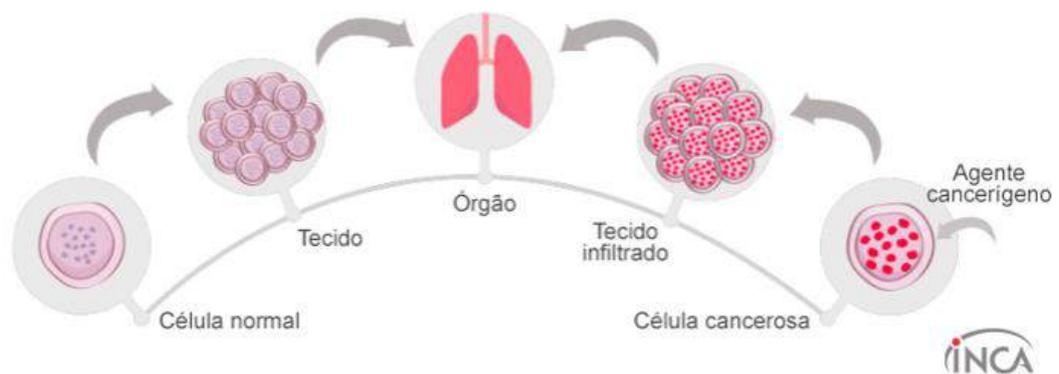
3 CÂNCER – GENERALIDADES E CARACTERÍSTICAS

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células, invadindo tecidos e órgãos (INCA, 2019). Uma vez que divide-se de maneira rápida, tais células tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Atualmente, é a principal causa de morte em todo o mundo, responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015, segundo a OMS. Em 2018, a projeção é de que o número de casos de câncer seja de cerca de 1.735.350 e 609.640 mortes por câncer nos Estados Unidos. Sobre a última década de dados, a taxa de incidência de câncer (2005-2014) foi estável em mulheres e diminuiu cerca de 2% ao ano em homens, enquanto a taxa de mortalidade por câncer (2006-2015) diminuiu cerca de 1,5% ao ano em homens e mulheres (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

O processo de formação do câncer, também conhecido como carcinogênese, pode ser divididas nas seguintes etapas: (a) iniciação, onde as células são expostas aos agentes carcinogênicos, endógenos ou exógenos, e sofrem alterações nos genes que controlam importantes vias celulares; (b) promoção, na qual o sistema de reparo do DNA não foi capaz de reverter os danos causados na etapa anterior e a célula é transformada de forma lenta e gradual

em uma célula maligna e (c) progressão, caracterizada pela multiplicação descontrolada onde a célula adquire as características de imortalidade replicativa, perda de inibição do crescimento por contato, além de poder estimular a angiogênese, apresentar inabilidade para morrer e outras alterações que conferem à célula a capacidade de invadir tecidos adjacentes (**Figura 15**) (POLLOCK, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011; CARVALHO *et. al.*, 2014). A proliferação desordenada das células é resultado de um acúmulo de mutações e alterações genéticas, promovida, por muitas vezes, a partir da ativação de vias bioquímicas que possibilitam simultaneamente a expressão de oncogenes e o silenciamento de genes supressores de tumor (HANAHAN E WEINBERG, 2000).

Figura 15. Formação do câncer (simplificado)



Fonte. INCA, 2019.

Hanahan e Weinberg em 2000, relataram seis capacidades características (Hallmarks) do câncer, que serviram de base para a melhor compreensão dessa patologia, são elas: 1) manutenção de sinalização proliferativa, 2) fuga dos supressores tumorais, 3) ativação de invasão e metástase, 4) possibilidade de imortalidade replicativa, 5) indução de angiogênese e 6) resistência à morte celular. Tais características são compartilhadas pela maioria das neoplasias humanas e dependem da manutenção de quatro habilidades: evasão do sistema imune, instabilidade gênômica, manutenção da inflamação e desregulação do metabolismo energético, propostas também pelos mesmos autores Hanahan e Weinberg em 2011. (**Figura 16**).

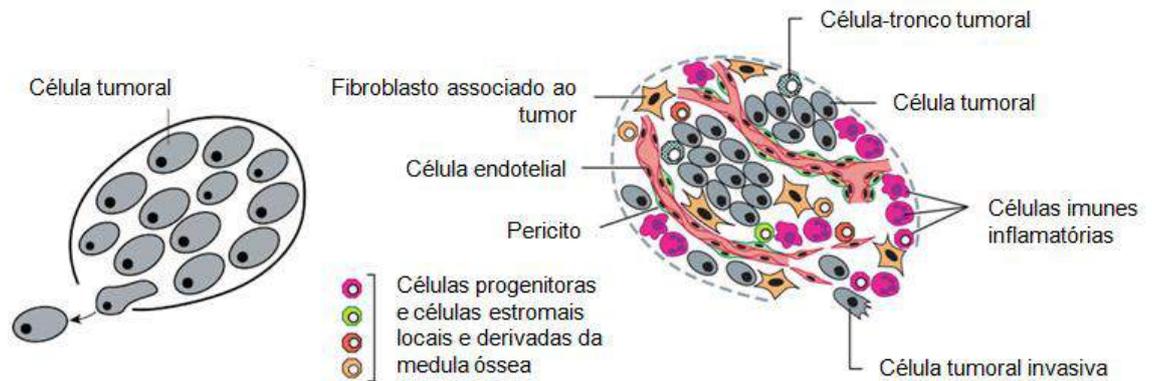
Figura 16. *Hallmarks* do câncer – principais características apresentadas por células transformadas.



Fonte: Hanahan; Weinberg, 2011. Adaptado pela autora.

Apesar de os distúrbios genéticos iniciais ocorrerem nas células propriamente neoplásicas, a análise tumoral que se limita a essas células, constituindo uma visão reducionista, vem mostrando-se cada vez mais incompleta. A percepção do câncer dentro de um microambiente tumoral, onde interagem células geneticamente alteradas, células normais (como fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos, e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea, tem se mostrado muito mais satisfatória na compreensão do desenvolvimento tumoral (**Figura 17**) (CHAMMAS, 2010).

Figura 17. Visão reducionista versus células tumorais + microambiente



Fonte. Hanahan; Weinberg, 2000, 2011. Adaptado pela autora.

De fato, estudos mostram que células não-cancerígenas têm participação significativa em diversos processos de progressão tumoral, tais como angiogênese, metástase (CONDEELIS; POLLARD, 2006) e proliferação celular (CORREA et al., 2005). Dessa forma, o tumor pode ser visto como um tecido complexo, com distorção da homeostasia tecidual original, e em que células “normais” são cooptadas a funcionar de acordo com essa nova dinâmica tecidual, ditada principalmente pelas células cancerígenas (CHAMMAS, 2010).

3.1 CICLO CELULAR

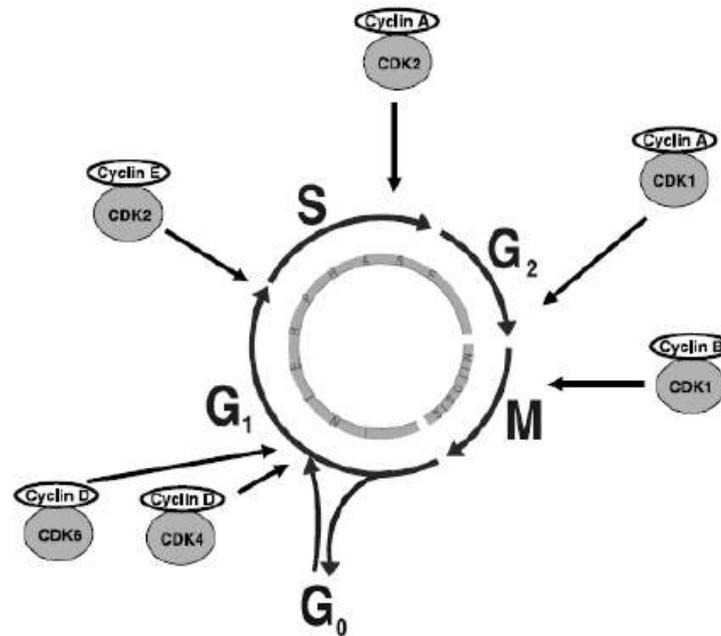
Os processos básicos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células filhas, denomina-se ciclo celular. O ciclo celular, em células eucariotas, é dividido em processos que compreendem as seguintes etapas: a interfase, que trata-se do espaço entre duas divisões sucessivas, a mitose e a citocinese, que são as divisões nuclear e citoplasmática, respectivamente (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012). Dividida em três fases, a interfase apresenta-se por: G1, S e G2. A fase G1 (do termo em inglês *gap*, que significa intervalo) é marcada pelo aumento no volume celular, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada e proteínas necessárias para a próxima fase. A fase S (do termo em inglês *synthesis*, que significa síntese) compreende a replicação do DNA, que é seguida pela fase G2, a qual ocorre nova síntese de proteínas necessárias à divisão celular. A fase G1 nem sempre é sucedida pela fase S e, por vezes, a célula é então encaminhada à fase G0, onde estão em “repouso” por não sofrerem divisão. Ao fim da interfase, a célula contém o dobro de DNA, quando comparado a sua condição inicial. A fase M (mitose) será

então iniciada e, por sua vez, é subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012; ALMEIDA 2005).

A progressão do ciclo celular depende da integração de um grande número de sistemas de sinais intra e extracelulares que se integram também com controles genéticos intrínsecos, resultando em vários checkpoints (ou pontos de restrição) em diferentes fases do ciclo. Estes checkpoints incluem o chamado pontos de verificação de dano do DNA: ponto de verificação S no posto de controle G1/S e em G2/M. Nestes pontos de verificação, a progressão através do ciclo celular pode ser induzida a parar, com o intuito de permitir que a célula repare o DNA após danos causados por irradiação ou produtos químicos, por exemplo. Nos pontos de verificação, as decisões são tomadas: células continuam a progredir através do ciclo celular ou param na fase quiescente (G0), ou, ainda, diferenciam-se ou sofrem apoptose (BOONSTRA; POST, 2004).

A regulação do ciclo celular é realizada por meio de mecanismos moleculares desempenhados pelas ciclinas e proteínas dependentes de ciclinas (CDK's) (BIRD, 2003; (BOONSTRA; POST, 2004). Estes complexos podem atuar na fosforilação de outros complexos proteicos promovendo a evolução do ciclo celular. Os complexos ciclina-CDK de mamíferos mais importantes conhecidos até agora são as ciclinas mitóticas A e B em associação com CDK1, e as ciclinas G1 D e E em complexo com CDK 4/6 e CDK2 (NIGG, 1995; REED, 1997). O primeiro complexo ciclina-CDK, para ser ativado durante a fase G1, é composto por ciclina tipo D em associação com CDK4 ou CDK6, dependendo da tipo de célula (SHERR, 1995). À medida que as células progridem através da fase G1, a ciclina E é sintetizada com um pico no final da fase G1. Ciclina E associa-se ao CDK2 e é importante para entrar no S fase (OHTSUBO et al., 1995). Quando as células entram na fase S, a ciclina E é degradado e CDK2 então se associa com a ciclina A (FOTEDAR E FOTEDAR, 1995). Finalmente, as ciclinas tipo A e B associam-se com CDK1 para promover a entrada na mitose. A ciclina A liga-se a CDK1 com um pico de atividade na fase G2 e é subitamente degradado, enquanto a entrada na mitose é desencadeada pela ciclina tipo B com a CDK1. Para sair da mitose, a destruição da ciclina B é necessária.

Figura 18. Visão geral do ciclo celular.



Fonte. VERMEULEN et al, 2003

Quanto à inibição da continuidade do ciclo celular, a literatura reporta que esta é realizada pelas proteínas conhecidas como inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKIs). Esse grupo de proteínas pode atuar na ocorrência de algum defeito no processo de divisão celular como, por exemplo, danos ao DNA, mediando a interrupção do ciclo, reparo do material genético e até a morte celular. Normalmente, as CKIs são classificados em dois grupos distintos: o específico, como p15, p16, p18 e p19 que atuam em CDKs pré-definidas, e o inespecífico que tem a capacidade de agir em em mais de um complexo de ciclina-quinases: p21, p27, p53 e p57 (JOHNSON; WALKER, 1999; SIEBERT; WILLERS; OPALKA, 1996; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). É possível também classificar um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G₀ (ALMEIDA et al., 2005). Dessa forma, o ciclo celular mostra-se importante no contexto da descoberta de novas drogas e na elucidação dos possíveis mecanismos de ação.

3.2 QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. A partir da publicação, em 1946, dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, verificou-se avanço crescente da quimioterapia antineoplásica (INCA, 2017). A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O tratamento com medicamentos anticâncer é geralmente dividido em quatro diferentes classes: quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo-específica (targeted therapy), e imunoterapia (LESTERHUIS et al., 2011).

A quimioterapia pode ser realizada utilizando-se apenas um medicamento isoladamente, em combinação com outros, ou em combinação com outros tipos de tratamento. Os quimioterápicos possuem diferentes estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação, podendo ser agrupados em:

- Agentes alquilantes (Ex.: Carboplatina, Cisplatina, Ciclofosfamida, Clorambucil, etc);
- Antimetabólitos (Ex.: 5-Fluorouracil, Citarabina, Gemcitabina, Metotrexato, etc);
- Antibióticos antitumorais (Ex.: Doxorrubicina, Epirubicina, Idarubicina, Daunorrubicina, etc);
- Inibidores da topoisomerase (Ex.: Topotecano, Irinotecano Etoposídeo, Mitoxantrona, etc);
- Inibidores mitóticos (Ex.: Docetaxel, Paclitaxel, Vinblastina, Vincristina, etc);
- Corticoesteróides (Ex.: Prednisona, Metilprednisolona e Dexametasona);

Quanto à terapia hormonal, é principalmente usada no tratamento do câncer de mama, endométrio e da próstata. Nestes cânceres, o tratamento pretende bloquear os efeitos dos hormônios masculinos (como a testosterona) no homem e os hormônios femininos (como o estrogênio) na mulher, impedindo que as células cancerígenas usem o hormônio necessário para crescer ou impedindo que o corpo produza hormônio (Exemplos: Tamoxifeno, Fulvestranto, etc) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; (NUSSBAUMER et al., 2011).

Após o melhor entendimento da ação de genes e proteínas de células tumorais surgiu a terapia alvo-específica. Trata-se de medicamentos que atuam frente à características específicas

das células cancerígenas, bloqueando assim o crescimento e a disseminação do câncer. São divididos em:

- Anticorpos monoclonais (Ex.: Trastuzumabe, Cetuximabe, Panitumumabe, Rituximabe, etc);
- Inibidores de angiogênese (Ex.: Bevacizumabe);
- Inibidores de tirosinoquinase (Ex.: Erlotinibe, Dasatinib, Dabrafenibe, Cabozantinibe, etc);
- Inibidores da via do hedgehog (Ex.: Vismodegibe).

A imunoterapia é realizada através da estimulação do próprio sistema imunológico, de modo que ele funcione de maneira eficiente para atacar as células cancerígenas, através da administração de componentes do sistema imunológico. O tratamento funciona de maneiras diferentes, estimulando o sistema imunológico do corpo de uma forma muito geral ou ajustando o sistema imunológico para atacar especificamente as células cancerígenas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Os principais tipos de imunoterapia incluem:

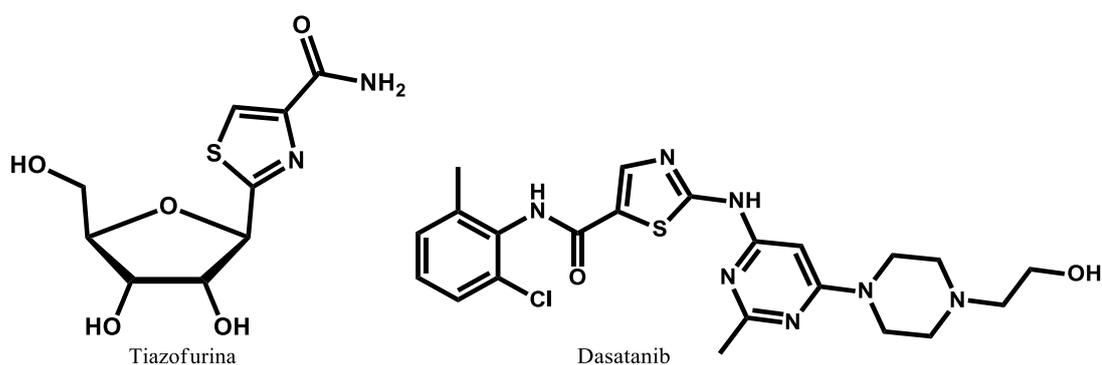
- Anticorpos monoclonais;
- Inibidores do check-point imunológico (Ação por meio de PD1 – Ex.: Pembrolizumab; Nivolumab, Cemiplimab, etc. Ação por meio de CTLA-4 – Ex.: Ipilimumab);
- Vacinas (Ex.: Sipuleucel-T (Provenge®). É a única vacina aprovada nos EUA para tratar o câncer até o momento. Utiliza-se no câncer de próstata avançado).

Dessa forma, é importante destacar que parte dos quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer exibem vários problemas quanto à especificidade, potencialidade e presença de efeitos indesejados. Além desses fatores, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um elemento agravante na terapêutica do câncer (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Portanto, a importância da química medicinal e a busca por novos fármacos potentes e seletivos para introdução na terapêutica oncológica é de essencial importância, uma vez que muitos aspectos desta doença ainda permanecem sem tratamento.

3.2.1 Potenciais candidatos: tiazóis e tiazolidinonas

A atividade antitumoral de tiazóis é bem relatada e documentada (AL-OMARY et al., 2012; CANCER; KINASE; KINASES, 2016; DOS SANTOS et al., 2016; EL-MESSERY et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2009). Há uma variedade de mecanismos para a ação antitumoral de tiazol e derivados agindo sobre alvos biológicos do câncer, como a Inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH). Um análogo nucleosídeo sintético, a Tiazofurina é um potente inibidor da inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH). A inibição dessa enzima resulta em uma diminuição na biossíntese de guanosina trifosfato (GTP) e desoxiguanosina trifosfato (dGTP), produzindo inibição da proliferação de células tumorais. A Tiazofurina exibiu importantes resultados para o tratamento de tumores pulmonares, metástases e leucemia mielóide aguda e outros análogos à sua estrutura foram planejados (AYATI et al., 2015). Além disso, a droga atualmente disponível no mercado Dasatinib, é um inibidor da tirosina quinase BCR-ABL.

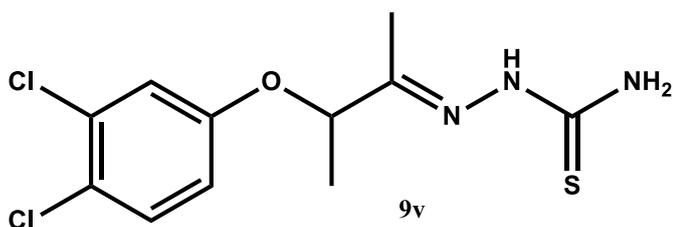
Figura 19. Estruturas do Dasatinib e Tiazofurina.



Fonte. Elaborado pela autora.

Em seu trabalho de conclusão de curso, DOS SANTOS, T. M., 2015 avaliou a série de tiossemicarbazonas intermediárias da síntese da série de 1,3 tiazóis propostas neste trabalho. Os resultados obtidos foram promissores dentro da atividade antineoplásica, onde cerca de 5 compostos apresentaram resultados inferiores a 59% de viabilidade celular em cerca de 8 linhagens tumorais, sendo uma delas multirresistente (HL-60/mx1). Além disso, um dos compostos (composto **9v**) apresentou fragmentação apoptótica na eletroforese em gel de agarose (**Figura 20**).

Figura 20. Estrutura do composto 9v.

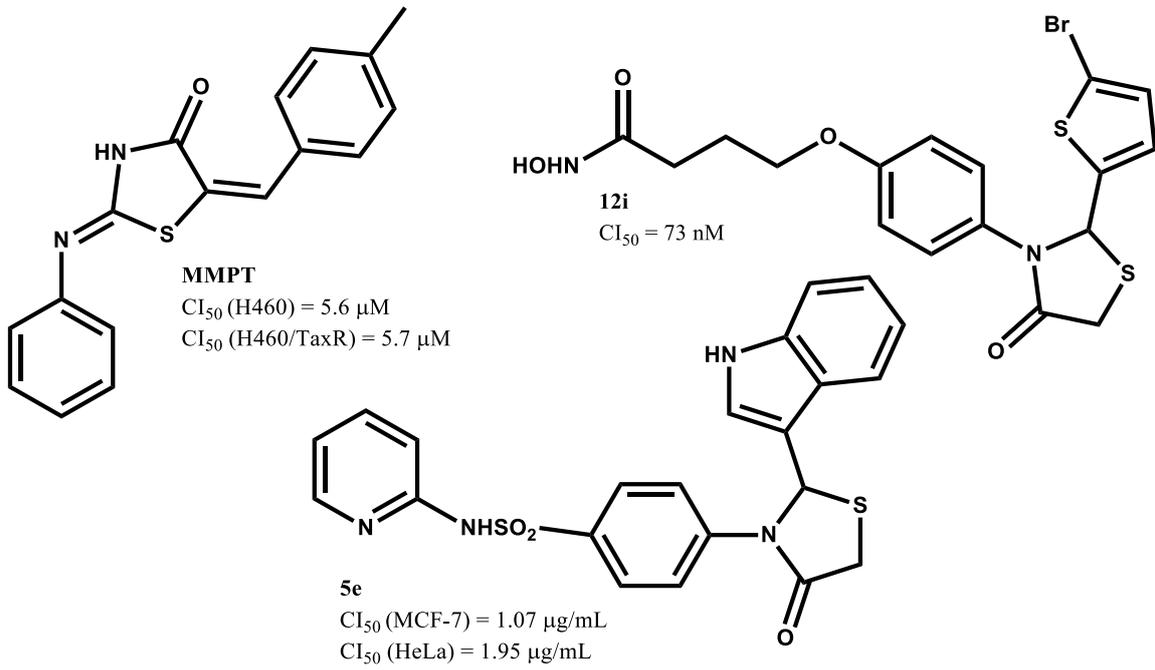


Fonte. Elaborado pela autora.

As propriedades antitumorais de 4-tiazolidinonas estão provavelmente relacionadas à sua afinidade com alvos biológicos anticancerígenos, como fator de necrose tumoral (TNF α) e biocomplexo antiapoptótico Bcl-XL-BH3 (TRIPATHI et al., 2014). Outro alvo explorado é a histona desacetilase (HDAC), o qual uma das tiazolidinonas (composto **12i**, **figura 21**) apresentou potente inibição, com seu valor de CI₅₀ em nM (YANG et al., 2016).

Diversos compostos e suas respectivas sínteses com o núcleo tiazolidinona foram relatadas em (TRIPATHI et al., 2014), onde foi apresentada a avaliação de várias estruturas em diversos alvos e linhagens tumorais. Exemplo disso, é uma promissora série de tiazolidinonas, a qual mostrou que o composto **MMPT** (**figura 21**) inibiu efetivamente o crescimento de linhagens de câncer de pulmões humanos (H460 e H460 / TaxR). KAMEL et. al. sintetizaram algumas ariltiazolidinonas, dentre elas, o composto **5e** (**figura 21**) que apresentou efeito citotóxico em carcinoma de mama da linhagem celular (MCF-7) e carcinoma do colo do útero da linhagem celular (HeLa) superior em comparação com doxorrubicina (KAMEL et al., 2010). Sugeriu-se ainda que a ação antitumoral das 4-tiazolidinonas está associada à sua afinidade com membros pró e anti-apoptóticos da família das proteínas Bcl-2 (SENKIV et al., 2016).

Figura 21. Estruturas dos compostos **12i**, **MMPT** e **5e**



Fonte. Elaborado pela autora.

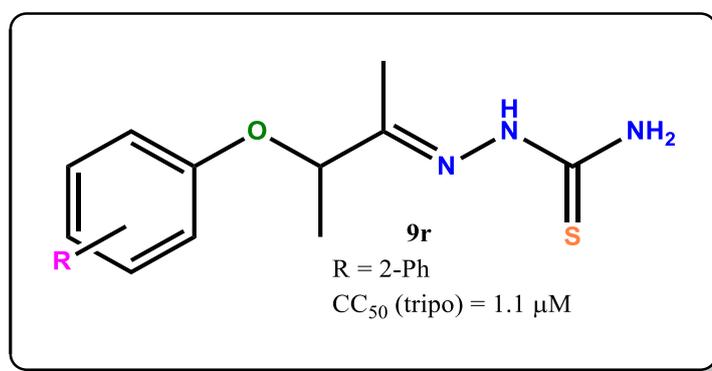
Capítulo 1

Planejamento estrutural, síntese e avaliação anti-*T. cruzi* de 1,3-tiazóis

4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DA SÉRIE DE TIAZÓIS (DLT 01-22)

O planejamento estrutural do presente trabalho frente à atividade tripanocida, se deu após os resultados obtidos por MAGALHAES MOREIRA et al., 2014, cujo esquema geral de sua série está exposto na **Figura 22**. Destacou-se o composto **9r**, que frente à forma tripomastigota, exibiu $CC_{50} = 1.1 \mu\text{M}$.

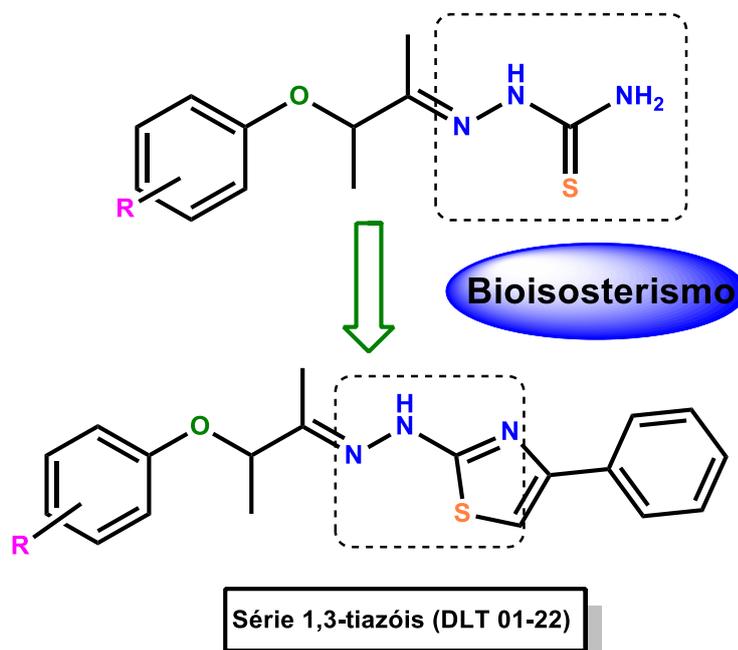
Figura 22. Estrutura geral da série de tiossemicarbazonas e respectivo radical para molécula **9r** (MAGALHAES MOREIRA et. al. 2014)



Fonte. Elaborado pela autora.

A estratégia utilizada para o planejamento e obtenção dos compostos 1,3-tiazóis do atual trabalho foi a do bioisosterismo, através da ciclização da série de tiossemicarbazonas utilizando-se a 2-bromoacetofenona (**Figura 23**). Explorou-se a inserção de substituintes diversos ao longo do anel aril ligado a porção C2 do heterociclo, sendo estes, portadores de diferentes características: lipofílicas (etil, *i*-propil, *t*-butil etc.), eletrônicas (nitro, metóxi, cloro, etc) e de volumes (fenil, *bi*-fenil, naftil). Também foram exploradas as variações das posições destes substituintes em *orto*, *meta* e *para*. Já no anel heterociclo, tem-se a fenila adicionada à posição C4. A substituição em C4 com uma fenila é proveniente de resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa, onde tal inserção foi benéfica. Com o intuito de relacionar a estruturalidade, incrementar atividade biológica e aumentar nossa quimioteca, este capítulo expõe a série de tiazóis derivados dos compostos de MAGALHAES MOREIRA et al., 2014.

Figura 23. Planejamento estrutural para a série DLT

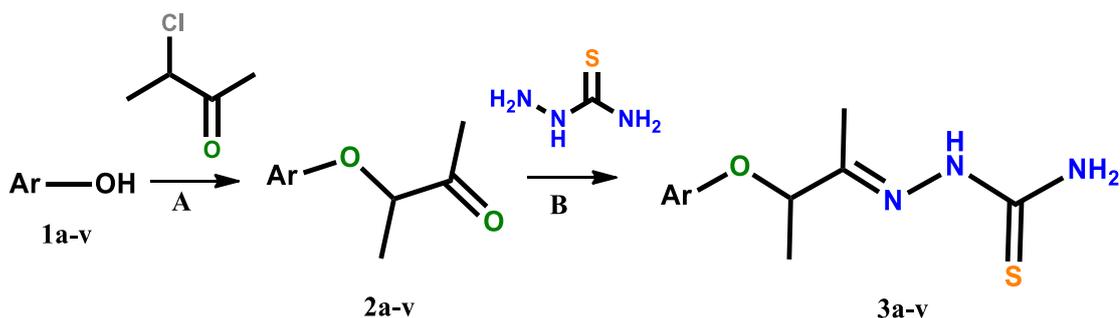


Fonte. Elaborado pela autora.

4.1 SÍNTESE DOS 1,3-TIAZÓIS (DLTs)

As tiossemicarbazonas foram sintetizadas conforme descrito em MAGALHAES MOREIRA et al., 2014. Assim, foram sintetizadas as tiossemicarbazonas intermediárias para então obtermos os tiazóis. Primeiramente, reagiu-se os derivados do fenol (**1a-v**) com a 3-cloro-2-butanona em condições básicas, sob agitação magnética, à temperatura ambiente. Após 12 h de reação, as β -cetonas (**2a-v**) foram obtidas, com rendimentos de 66 a 99%. Posteriormente, reagiu-se as ariloxicetonas (**2a-v**) com tiossemicarbazida e HCl em banho de ultrassom à temperatura ambiente. Após 2 horas, aproximadamente, as tiossemicarbazonas (**3a-v**) precipitaram na mistura reacional e foram recolhidas por uma etapa de filtração simples. Todas as tiossemicarbazonas (**3a-v**) foram recristalizadas e obteve-se uma pureza aceitável com rendimentos variando entre 36 e 98% (Figura 24). As tiossemicarbazonas foram sintetizadas conforme descrito em MAGALHAES MOREIRA et al., 2014.

Figura 24. Rota sintética das tiossemicarbazonas intermediárias (**3a-v**)



Composto	Substituinte	Composto	Substituinte	Composto	Substituinte
(a)	Ph	(i)	4-FPh	(q)	3-(Ph)Ph
(b)	4-EtPh	(j)	4-ClPh	(r)	2-(Ph)Ph
(c)	4-iPrPh	(k)	3-ClPh	(s)	4-(PhO)Ph
(d)	4-tBuPh	(l)	2-ClPh	(t)	α -naftil
(e)	4-MeOPh	(m)	4-BrPh	(u)	β -naftil
(f)	3-MeOPh	(n)	3-BrPh	(v)	3,4-diClPh
(g)	4-NO ₂ Ph	(o)	4-IPh	(w)	3-Cl,4-FPh
(h)	4-AcNHPh	(p)	4-(Ph)Ph	(x)	2,3-diClPh

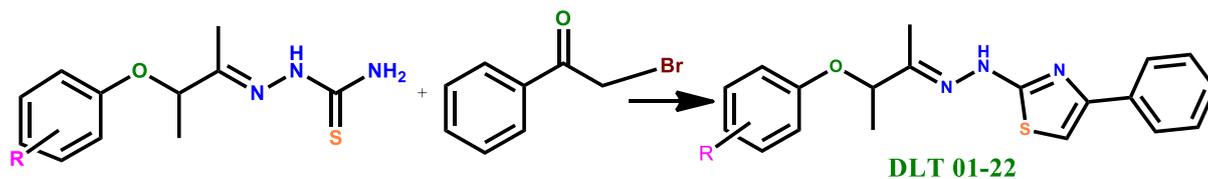
Reagentes e condições: (A) K₂CO₃, KI, butanona, temperatura ambiente, 12h, rendimento 66-99%. (B) HCl, EtOH, banho de ultrassom, durante 2h, rendimentos de 36-98%. Ph = fenil, iPr = isopropil, tBu = terc-butil.

Fonte. MAGALHAES MOREIRA et. al., 2014.

Uma vez obtidas as tiossemicarbazonas intermediárias, realizamos a síntese dos compostos tiazólicos. A reação para obtenção dos 1,3-tiazóis (**DLT 01-22**) obedeceu às seguintes condições: agitação magnética, temperatura ambiente (TA), com isopropanol como solvente, além da adição da acetofenona.

Ao longo da reação ou ao seu final, o produto reacional precipita sendo necessário apenas uma filtração para coletar o produto ao final, seguida por uma lavagem realizada com isopropanol. Os compostos foram isolados como sólidos e os rendimentos variaram de 16% a 92% (**Figura 25**)

Figura 25. Rota sintética para obtenção dos tiazóis **DLT 01-22**.

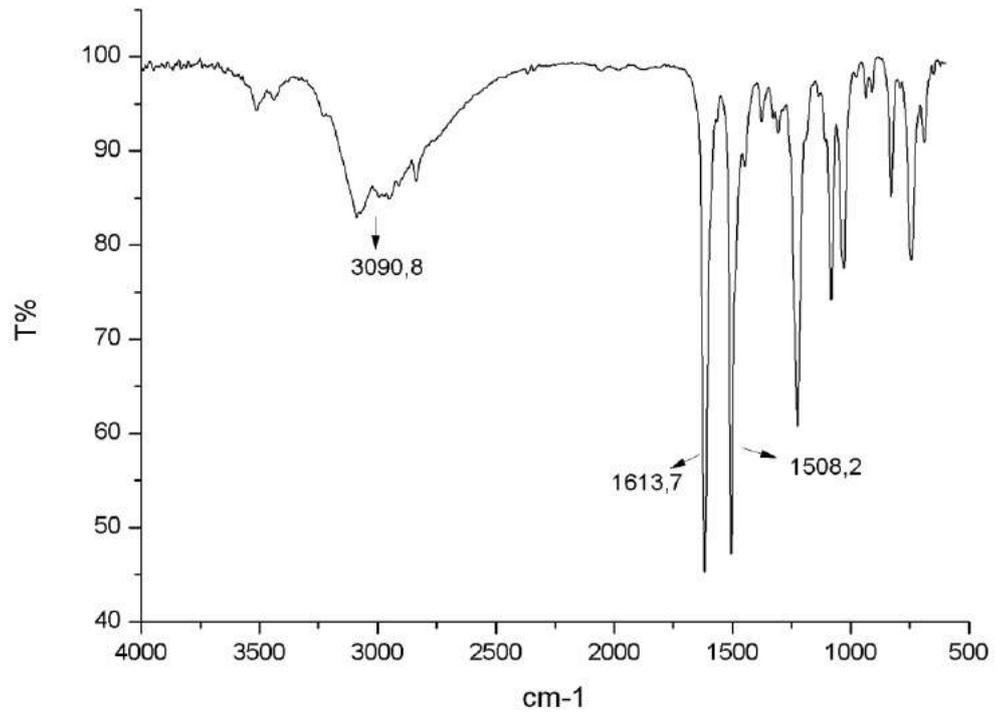


Composto	R	Composto	R	Composto	R
DLT-01	4-MeO	DLT-09	3-Cl	DLT-17	2,3-diCl
DLT-02	4-Cl	DLT-10	3-Ph	DLT-18	3-Cl,4-F
DLT-03	3-Br	DLT-11	4-NO ₂	DLT-19	β-naftil
DLT-04	4-PhO	DLT-12	3-MeO	DLT-20	α-naftil
DLT-05	4-Br	DLT-13	3,4-diCl	DLT-21	4-Et
DLT-06	4-tBu	DLT-14	4-iPr	DLT-22	4-I
DLT-07	H	DLT-15	2-Cl		
DLT-08	2-Ph	DLT-16	4-F		

Reagentes e condições: diferentes tiossemicarbazonas e a 2-Bromoacetofenona, agitação magnética, temperatura ambiente, em solvente isopropanol, cerca de 3h de reação. Fonte: Elaborado pela autora.

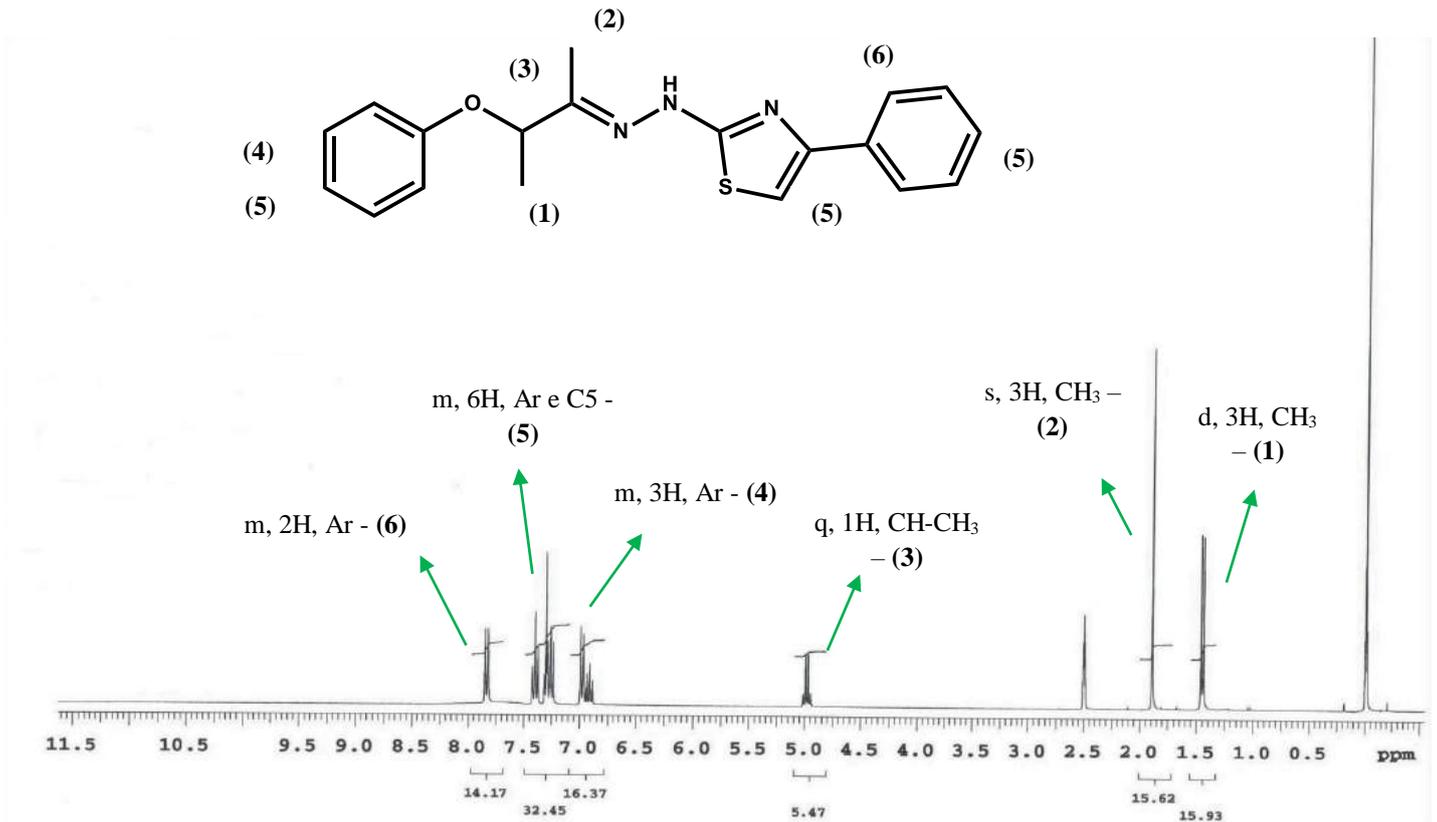
As estruturas dos aril-1,3-tiazóis (**DLT 01-22**) foram confirmadas por RMN de ¹H, ¹³C e IV. A análise espectroscópica na região do infravermelho nos fornece as principais bandas de absorção (**Figura 26**). A banda em 3090 cm⁻¹ sugere a deformação axial N-H. Já as bandas 1613 cm⁻¹ e 1508 cm⁻¹ sugerem a C=N. A análise dos espectros de RMN de ¹H dos compostos (**DLT 01-22**) confirmou a estrutura de forma geral, porém não permitiu evidenciar claramente o sinal referente ao metino localizado na posição C5 no anel heterocíclico, devido a sobreposição com sinais dos anéis aromáticos da estrutura. Então, para a confirmação da ciclização, o sinal diagnóstico para esta classe de compostos é o carbono referente a este metino, sendo de fácil localização, tendo δ = 101-117 ppm, na RMN de ¹³C.

Figura 26. Exemplo de espectro de IV, série **DLT 01-22** (composto **DLT-07**)



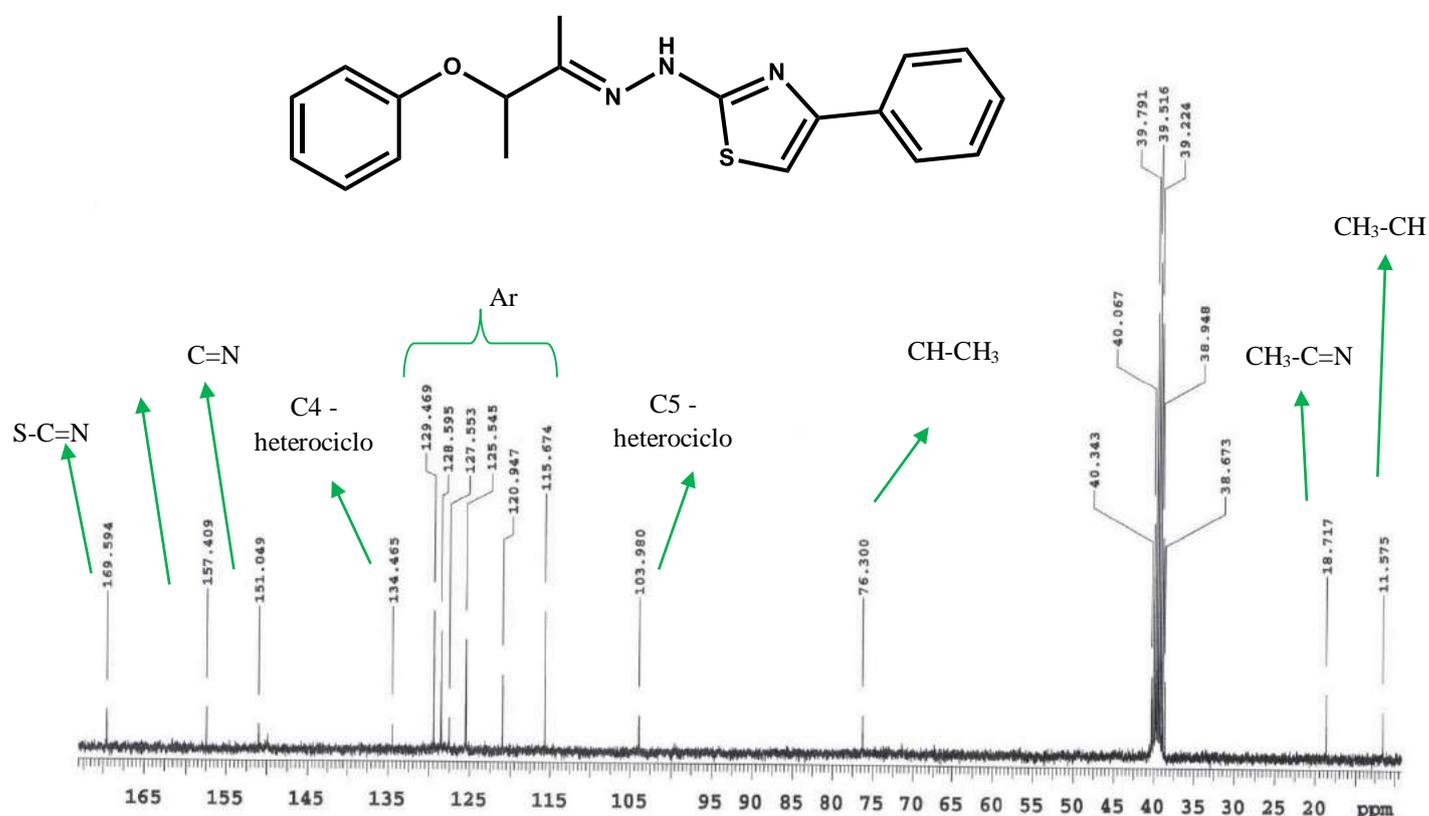
A **Figura 27** apresenta um exemplo de espectro de RMN ^1H para série **DLT 01-22**, onde foi constatada a presença de um dubleto em 1.4 ppm, sinalizado pelo número (1), integrando para três hidrogênios, referente a metila ligada ao carbono que faz ligação com o oxigênio. Em 1.8 ppm, há o sinal do singlete que integra para três hidrogênios, com identificação de número 2, que corresponde a outra metila próxima ao carbono ligado a C=N. O número 3 identifica o sinal de quadrupeto, em 4.9 ppm, integrando para 1 hidrogênio e é atribuído ao H do metino que está ligado ao oxigênio. E por fim, os sinais 4, 5, 6, em torno de 6.9 a 7.5 ppm, são os hidrogênios aromáticos juntamente com o hidrogênio do C5 do anel tiazol, os quais estão distribuídos em multipletos, além do sinal em 7.8 ppm referente a dois hidrogênios do anel aromático.

Figura 27. Espectro de RMN ^1H da molécula **DLT-07**



A **Figura 28** mostra o RMN ^{13}C do composto **DLT-07**, utilizado como referência. O pico em 169.5 ppm, corresponde ao carbono da ligação S-C=N do anel tiazol, enquanto que 157.4 ppm corresponde ao carbono aromático ligado ao oxigênio e 151.0 a ligação C=N. Já o pico em 134.4 provavelmente corresponde ao C4 heterociclo. Os picos localizados entre 115.6 ppm e 129.5 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. Em 103.9 ppm tem-se o pico que corresponde ao carbono 5 do anel heterociclo, confirmando a formação do anel tiazol. Em 76.3 ppm, há o carbono do metino ligado a CH_3 da parte alifática da molécula e, por fim em 18.7 e 11.5 ppm corresponde às duas CH_3 presentes na molécula **DLT-07**.

Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C da molécula DLT-07.



4.2 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E FARMACOCINÉTICOS

A Regra dos Cinco de Lipinski estabelece parâmetros que são importantes para a farmacocinética e o desenvolvimento de fármacos. Os compostos devem atender aos seguintes

critérios: a) peso molecular ≤ 500 Da; b) $\text{LogP} \leq 5$ (ou $\text{MLogP} \leq 4,15$); c) número de aceptadores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ; d) número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 . Considera-se que o composto que obedece a pelo menos três dos quatro critérios adere à Regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997). O PSA está relacionado com a área de superfície polar e o seu valor indica a predição da biodisponibilidade da molécula (maior biodisponibilidade quando $\text{PSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$) (VEBER et al., 2002). Portanto, as predições, *in silico*, farmacocinéticas (ADME – absorção, distribuição, metabolização e excreção) e as propriedades físico-químicas dos compostos foram calculadas. O programa SwissADME foi utilizado para o cálculo dessas predições. Trata-se de uma ferramenta da web de uso gratuito que avalia a farmacocinética e seu perfil “druglikeness” (características semelhantes do composto em relação a um fármaco). A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos e verifica-se que todos os compostos sintetizados são compatíveis com a Regra de Lipinski e Veber e mostraram PSA apropriado.

Tabela 1. Análise dos critérios da regra de Lipinski e Veber calculados com SwissADME (<http://swissadme.ch/>)

Cpt. ⁽¹⁾	R	Peso Molecular	LogP	Aceptadores de ligação H	Doadores de ligação H	Ligações rotáveis	PSA ⁽²⁾
DLT-01	4-MeO	367.46	2.66	4	1	7	83.98
DLT-02	4-Cl	387.93	3.71	3	1	6	74.75
DLT-03	3-Br	416.33	3.60	3	1	6	74.75
DLT-04	4-(PhO)	445.58	3.99	4	1	8	83.98
DLT-05	4-Br	432.38	3.82	3	1	6	74.75
DLT-06	4-tBu	393.54	3.88	3	1	7	74.75
DLT-07	Ph	337.44	2.99	3	1	6	74.75
DLT-08	2-Ph	413.53	4.08	3	1	7	74.75
DLT-09	3-Cl	371.88	3.49	3	1	6	74.75
DLT-10	3-Ph	413.53	4.08	3	1	7	74.75
DLT-11	4-NO ₂	382.44	1.96	5	1	7	120.57
DLT-12	3-MeO	367.46	2.66	4	1	7	83.98
DLT-13	3,4-diCl	406.33	3.98	3	1	6	74.75
DLT-14	4-iPr	379.52	3.66	3	1	7	74.75
DLT-15	2-Cl	371.88	3.49	3	1	6	74.75
DLT-16	4-F	355.43	3.37	4	1	6	74.75
DLT-17	2,3-diCl	406.33	3.98	3	1	6	74.75
DLT-18	3-Cl, 4F	389.87	3.87	4	1	6	74.75
DLT-19	β -naft	387.50	3.70	3	1	6	74.75
DLT-20	α -naft	387.50	3.70	3	1	6	74.75
DLT-21	4-Et	365.49	3.44	3	1	7	74.75
DLT-22	4-I	463.34	3.71	3	1	6	74.75

Notas:

(1) - composto; (2) - área de superfície polar

A **Tabela 2** apresenta o perfil ADME da série **DLT 01-22**. Com relação à biodisponibilidade, espera-se o valor de 0,55 para todos os compostos, sendo assim maior que o valor apresentado pela doxorrubicina (0,17). A maioria dos compostos apresentaram alta absorção gastrointestinal e não atravessam a barreira hematoencefálica, de acordo com o modelo preditivo BOILED-Egg (Brain Or IntestinaL EstimatedD método de permeação). Os dados *in silico* sugerem um perfil “druglikeness” adequado para os compostos do tipo 1,3-tiazóis da série **DLT**.

Tabela 2. Propriedades ADME dos compostos **DLT 01-22**

Compt.	R	Absorção gastrointestinal	Barreira hematoencefálica	Biodisponibilidade
DLT-01	4-MeO	Alta	Não	0.55
DLT-02	4-Cl	Alta	Não	0.55
DLT-03	3-Br	Alta	Não	0.55
DLT-04	4-(PhO)	Baixa	Não	0.55
DLT-05	4-Br	Alta	Não	0.55
DLT-06	4-tBu	Alta	Não	0.55
DLT-07	Ph	Alta	Não	0.55
DLT-08	2-Ph	Alta	Não	0.55
DLT-09	3-Cl	Alta	Não	0.55
DLT-10	3-Ph	Alta	Não	0.55
DLT-11	4-NO ₂	Baixa	Não	0.55
DLT-12	3-MeO	Alta	Não	0.55
DLT-13	3,4-diCl	Alta	Não	0.55
DLT-14	4-iPr	Alta	Não	0.55
DLT-15	2-Cl	Alta	Não	0.55
DLT-16	4-F	Alta	Não	0.55
DLT-17	2,3-diCl	Alta	Não	0.55
DLT-18	3-Cl, 4F	Alta	Não	0.55
DLT-19	β-naft	Alta	Não	0.55
DLT-20	α-naft	Alta	Não	0.55
DLT-21	4-Et	Alta	Não	0.55
DLT-22	4-I	Alta	Não	0.55
Doxorrubicina	-	Baixa	Não	0.17

4.2.1 Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida de 1,3-tiazóis

Nossos esforços em relação à identificação de novas moléculas anti-*T. cruzi*, desde 2006, nos levaram a desenvolver tiosemicarbazonas, 1,3-tiazóis e 4-tiazolidinonas como agentes tripanocidas. Em continuação à nossa pesquisa de moléculas bioativas, seguimos com a apresentação da atividade biológica de novos 1,3-tiazóis. Após a caracterização estrutural de todos os compostos (**DLT-01 a DLT-22**), a toxicidade celular e atividade antiparasitária foram determinadas. Os 22 compostos (**DLT-01 a DLT-22**) foram testados frente a dois tipos de linhagem celular do *T. cruzi*: tripomastigotas da cepa Y e as formas intracelulares da cepa Tulahuen (**IacZ C4**) do *T. cruzi*, uma cepa transfectada que expressa o gene da β -galactosidase. A primeira se trata de uma cepa moderadamente resistente a fármacos (Soeiro et al. 2013) e é a forma evolutiva infectante em mamíferos. Nesse ensaio, os compostos (**DLT 01-22**) foram incubados na presença de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y por vinte e quatro horas e os valores de CC_{50} (μ M) foram determinados.

A citotoxicidade desses compostos foi avaliada em células de fibroblastos L929 (fibroblastos de camundongos), sendo incubadas na presença dos compostos (**DLT 01-22**) por até noventa e seis horas. Os valores de DL_{50} (em μ M) foram determinados (**Tabela 3**). Quanto à cepa Tulahuen, os compostos foram triados a 10 μ M nestes ensaios (concentração da CC_{90} do BZD) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Avaliação da citotoxicidade da série **DLT** frente a fibroblastos L929 e atividade tripanocida *in vitro*.

Composto	R	DL _{50L929} (μM)		CC _{50tripo} (μM) 24h	CC _{90tripo} (μM) 24h	Tula (% inibição) em 10 μM	IS (24h)
		24h	96h				
DLT-01	4-MeO	>400	>200	18,33 ± 1,57	32,41 ± 12,43	1 ± 1,8	>21
DLT-02	4-Cl	>400	>200	9,44 ± 0,79	21,43 ± 3,88	0 ± 0	>42,37
DLT-03	3-Br	>400	>200	9,58 ± 0,2	12,38 ± 0,36	2,4 ± 3,4	>41,75
DLT-04	4- (PhO)Ph	>400	>200	9,86 ± 0,98	23,07 ± 3,11	6,2 ± 7,7	>40,56
DLT-05	4-Br	>400	>200	17,92 ± 2,55	27,74 ± 6,60	1,8 ± 2,5	>22,32
DLT-06	4-tBu	>400	>200	36,11 ± 6,29	>50	13,8 ± 4,4	>11,07
DLT-07	-	>400	>200	14,11 ± 7,14	18,15 ± 9,29	9,9 ± 3,5	>28,34
DLT-08	2-Ph	>400	>200	39,66 ± 4,63	>50	20,2 ± 2,3	>10
DLT-09	3-Cl	>400	>200	13 ± 5,43	17,79 ± 8,07	12,9 ± 1,7	>30,76
DLT-10	3-Ph	>400	>200	17,72 ± 0,08	23,85 ± 0,08	74 ± 5,2	>22,57
DLT-11	4-NO ₂	169,44	>200	9,95 ± 0,86	16,52 ± 6,55	5,4 ± 6,2	17,04
DLT-12	3-MeO	>400	>200	20,35 ± 2,26	33,33 ± 13,08	13,7 ± 6,5	>19,65
DLT-13	3,4-diCl	76,71	>200	9,88 ± 0,62	16 ± 5,92	5,3 ± 1,1	7,76
DLT-14	4-iPr	>400	>200	44,72 ± 2,75	>50	3 ± 1,9	>8,94
DLT-15	2-Cl	176,71	>200	13,83 ± 5,81	17,92 ± 7,86	8,2 ± 0,7	12,78
DLT-16	4-F	>400	>200	14,24 ± 5,99	22,60 ± 1,67	19,2 ± 6,8	>28,08
DLT-17	2,3-diCl	165,41	>200	10,15 ± 1	16,91 ± 6,75	9,7 ± 2,4	16,29
DLT-18	3-Cl, 4F	>400	>200	12,47 ± 3,11	21,47 ± 2,01	8,9 ± 0,2	32,07
DLT-19	β-naftil	>400	>200	15,77 ± 3,44	23,23 ± 1	10,5 ± 1,3	>25,36
DLT-20	α-naftil	>400	>200	11,68 ± 0,76	22,22 ± 0,82	7,4 ± 2,8	>34,24
DLT-21	4-Et	>400	>200	>50	>50	4,8 ± 3,8	>8
DLT-22	4-I	>400	>200	17,19 ± 2,79	23,88 ± 1,20	0,2 ± 0,3	>23,26
BZD	-	>1000	>200	8,67 ± 3,33	19,99 ± 3,54	94,5 ± 0,7	>115

Notas:

Atividade biológica com CC₅₀ e CC₉₀ em μM e índice de seletividade (IS= DL_{50L929}/CC_{50tripo}) sobre tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. Percentual de inibição em dose de 10μM sobre formas intracelulares da cepa Tulahuen do *T. cruzi* (incubação 96h). CC – concentração citotóxica; DL – dose letal; IS – índice de seletividade.; BZD – Benznidazol. Fonte. Elaborado pela autora.

Os compostos **DLT-02**, **DLT-03**, **DLT-04**, **DLT-11** e **DLT-13** apresentaram os valores, em tripomastigotas sanguíneas, mais próximos ao fármaco de referência BZD (8,67 μ M) exibindo, respectivamente, os seguintes valores de CC₅₀: 9,44 μ M / 9,58 μ M / 9,86 μ M / 9,95 μ M e 9,88 μ M. Esses compostos também apresentam resultados melhores que o tiazol não substituído em seu anel aril (**DLT-07**). As modificações estruturais presentes no anel aril dos cinco compostos em questão são: o 4-Cl (**DLT-02**), o 3-Br (**DLT-03**), 4-(fenoxi) fenil (**DLT-04**), 4-NO₂ (**DLT-11**) e 3,4diCl (**DLT-13**) e dentre eles, o composto **DLT-02** foi mais ativo. Em relação aos compostos mais ativos que o composto não substituído, além dos já citados acima, têm-se os compostos **DLT-09** (3-Cl), **DLT-15** (2-Cl), **DLT-17** (2,3diCl), **DLT-18** (3-Cl, 4-F) e **DLT-20** (β -naftil). De forma geral, verifica-se que a presença de substituintes no anel aril, independentemente da posição e natureza, foi benéfica na maioria das vezes.

Sobre a citotoxicidade desses compostos, destaca-se que em sua maioria, a viabilidade das células hospedeiras não foi afetada em concentrações de até 400 μ M, exceto para apenas quatro moléculas: **DLT-11**, **DLT-13**, **DLT-15** e **DLT-17**. Os melhores índices de seletividades (IS) obtidos foram dos compostos **DLT-02**, **DLT-03**, **DLT-04**, **DLT-09**, **DLT-18** e **DLT-20**.

Como citado anteriormente, os compostos também foram avaliados frente às formas intracelulares da cepa Tulahuen, em uma triagem com dose de 10 μ M. O destaque vai para o composto **DLT-10**, que apresentou percentual de inibição de 74%, valor relativamente próximo ao BZD. A molécula possui uma fenila na posição 3 do anel aril. Posteriormente a essa triagem, foi realizada o ensaio onde foi encontrado o valor de CC₅₀ para o **DLT-10** em cepa Tulahuen. O valor foi de 8,13 \pm 1,66 (μ M), enquanto que o BZD apresentou CC₅₀ no valor de 3,02 \pm 0,94 (μ M).

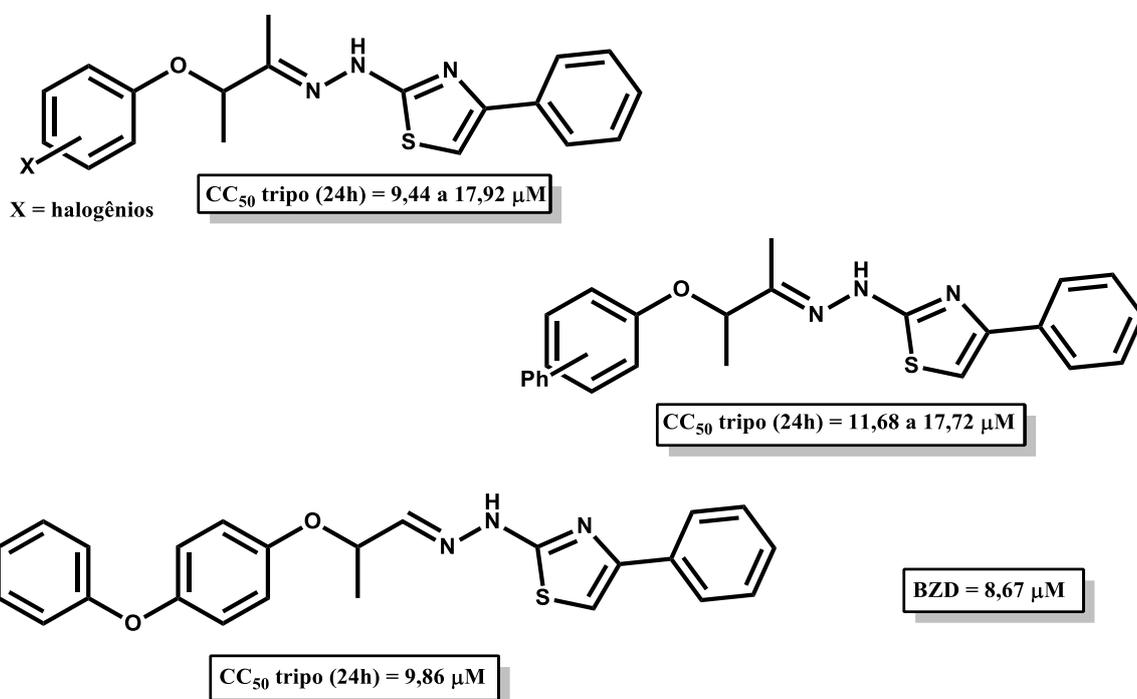
No trabalho de MAGALHAES MOREIRA et al., 2014, têm-se as tiossemicarbazonas intermediárias dos tiazóis aqui sintetizados, as quais foram testadas também em tripomastigotas, porém, as derivadas de cultura celular da cepa Y. Foi possível constatar os casos em que os compostos cíclicos foram mais ativos que os seus intermediários, são eles: **DLT-01**, **DLT-02**, **DLT-16** e **DLT-17**. Ainda sobre os compostos intermediários, verificou-se que a ciclização proporcionou a redução da citotoxicidade dos compostos. Os compostos cíclicos (**DLT 01-22**) foram avaliados frente a fibroblastos L929 e as tiossemicarbazonas intermediárias foram avaliadas frente a esplenócitos.

As variações na posição (*orto*, *meta*, *para*) do átomo de cloro ligado ao fenil proporcionaram variações na atividade anti-*T. cruzi*, na citotoxicidade e seletividade. A substituição em *para* demonstrou um melhor resultado (**DLT-02** - CC₅₀ = 9,44 μ M / LD₅₀ =

>400 / IS = >42,37). Compostos cujos os substituintes bifenil e bromo estão na posição *meta* no anel fenil apresentaram melhores valores de CC₅₀. Portanto, isto sugere que a natureza do substituinte é importante para a atividade, bem como a sua posição ao longo do anel fenil.

O efeito de substituintes doadores de elétrons ou de retiradores de elétrons para os tiazóis também foi verificado. No que diz respeito aos substituintes retiradores de elétrons, substituintes desativadores fortes, como o grupo nitro, mostrou ser ativo, no entanto, a citotoxicidade e conseqüentemente o IS não foram tão significativos. O bromo e iodo, substituintes retiradores fracos de elétrons, a depender de suas posições, apresentaram moléculas mais ativas e outras menos ativas que o nitro, e praticamente todas exibiram um melhor IS quando comparado ao nitro. Quanto aos substituintes doadores de elétrons moderados, o derivado 4-metóxi não foi um dos mais ativos e sua seletividade não está entre as melhores, enquanto a molécula com o substituinte 4-fenóxi foi uma das mais ativas da série, além de apresentar um dos melhores valores de IS. Considerando os 1,3-tiazóis que contém halogênios, fenóxi e bifenil exibiram atividade anti-*T. cruzi* mais elevada, pode-se sugerir que as propriedades hidrofóbicas, o volume e a polarizabilidade (no caso de halogênios) são possíveis fatores envolvidos na atividade observada (HERNANDES *et al.*, 2010).

Figura 29. Estruturas de tiazóis com menores valores de CC₅₀



Fonte. Elaborado pela autora.

4.3 CONCLUSÃO

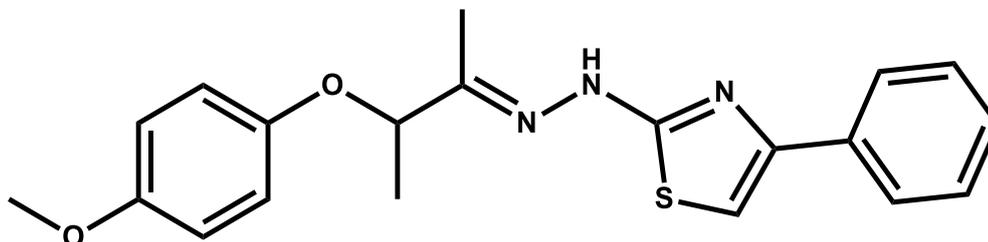
Os derivados 1,3-tiazóis foram sintetizados, elucidados por RMN ^{13}C , RMN ^1H e IV. Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados e os compostos, em sua maioria, estavam dentro dos critérios estabelecidos. Os tiazóis foram também avaliados frente à forma tripomastigota sanguínea da cepa Y e também à cepa Tulahuen. Os compostos **DLT-02**, **DLT-03**, **DLT-04**, **DLT-11** e **DLT-13** exibiram os melhores resultados em tripomastigotas sanguíneas, por apresentarem valores próximos ao BZD. Na triagem realizada frente à cepa Tulahuen, o composto **DLT-10** exibiu percentual de inibição de 74% e com valor de CC_{50} de $8,13 \pm 1,66$.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Os reagentes químicos foram adquiridos da Sigma Aldrich, Fluka, Vetec ou Acros Organics e os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. O solvente deuterado (DMSO- d_6) é da marca Sigma-Aldrich e as tiossemicarbazidas foram adquiridas também pela Sigma-Aldrich. As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F254. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm). As reações mediadas por irradiação no ultrassom foram realizadas em um ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W), com a utilização de seu aquecimento, em torno de 40°C. Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover. Para todos os compostos foram feitas as análises de RMN (^1H e ^{13}C) e DEPT. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; q / quadrupleto.

4.4.1 Série dos 1,3-tiazóis

Síntese do DLT-01, (E)-2-(2-(3-(4-metoxifenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



Em balão de fundo redondo, foram adicionados 1.1 mmols da respectiva tiossemicarbazona previamente obtida, 1.1 mmols de 2-bromoacetofenona e 30mL de álcool isopropílico, sob agitação magnética e temperatura ambiente durante 50 minutos. Um precipitado de coloração bege foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

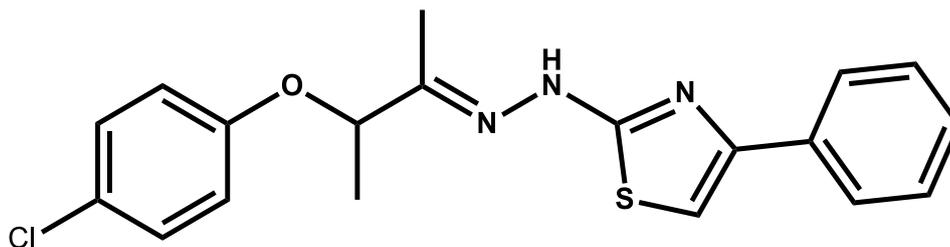
Pó de coloração branca; PF: 113-114 °C; Rend.: 68% ; Rf: 0,53 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3099 (N-H), 1615 (C=N), 1508 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 3.6 (s, 3H, O- CH_3), 4.8 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH), 6.8 (m, 4H, Ar), 7.2 (d, 1H, Ar), 7.4 (t, 2H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH_3), 18.7 (CH_3), 55.2 ($\text{CH}_3\text{-O}$), 77.0 (CH), 103.9 (C, tiazol), 114.5 (CH, Ar), 116.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 134.3 (C, Ar), 149.7 (C, Ar), 151.2 (C, tiazol), 151.5 (C, Ar), 153.6 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 368,145 [M+H] +

Síntese do DLT-02, (E)-2-(2-(3-(4-clorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior (síntese **DLT-01**). O tempo reacional foi de aproximadamente 50 minutos. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

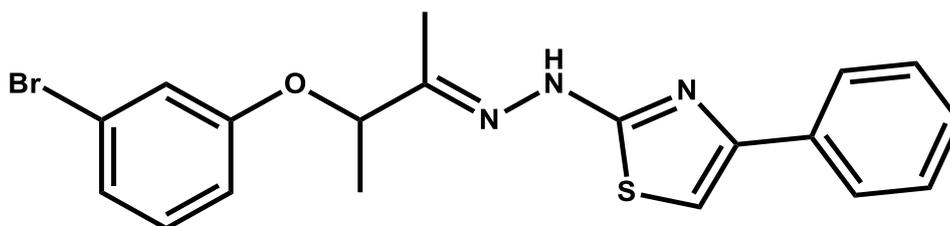
Pó de coloração amarelada; PF: 160-161 °C; Rend.: 87% ; Rf: 0,44 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3070 (NH), 1627 (C=N), 1512 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.4 (s largo, 1H, NH), 4.9 (q, $J = 6.5$ Hz 1H, CH- CH_3), 6.9 (m, 2H, Ar), 7.3 (m, 6H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH_3), 18.5 (CH_3), 76.6 (CH), 103.9 (C, tiazol), 117.4 (CH, Ar), 124.6 (ClC), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.2 (C, Ar), 134.5 (C, tiazol), 150.2 (C, Ar), 156.2 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 372,098 [M+H] +

Síntese do DLT-03, (E)-2-(2-(3-(3-bromofenoxy)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 60 minutos. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se

em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

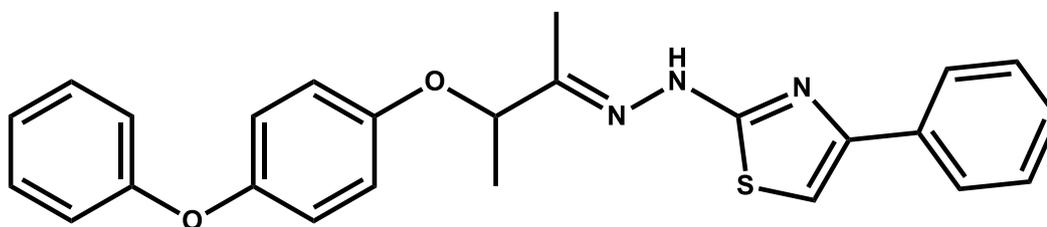
Pó de coloração amarelada; PF: 171-173 °C; Rend.: 91% ; Rf: 0,57 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1613 (C=N), 1505 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 5.0 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 6.9 (d, 1H, Ar), 7.1 (d, 1H, Ar), 7.3 (m, 5H, Ar), 7.4 (t, 2H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.4 (CH_3), 76.7 (CH), 104.0 (C, tiazol), 115.1 (CH, Ar), 118.5 (CH, Ar), 121.9 (CH, Ar), 123.8 (BrC), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 131.1 (C, Ar), 134.4 (C, tiazol), 150.1 (C, Ar), 158.3 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 416,023 [M+H] +

Síntese do DLT-04, (E)-2-(2-(3-(4-fenoxifenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 40 minutos. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

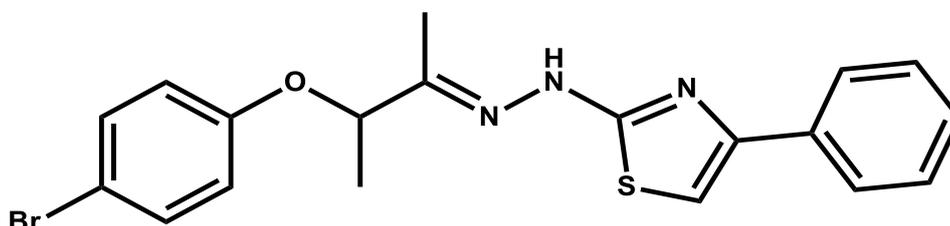
Pó de coloração amarelada; PF: 134-137 °C; Rend.: 48% ; Rf: 0,4 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N), 1505 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.3$, Hz 3H, CH_3), 1.9 (s, 3H, CH_3), 4.9 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH-CH_3), 5.9 (s largo, 1H, NH), 6.9 (m, 6H, Ar), 7.2 (m, 4H, Ar), 7.3 (m, 3H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.6 (CH_3), 76.9 (CH), 103.9 (C, tiazol), 117.1 (CH, Ar), 117.4 (CH, Ar), 120.4 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.8 (C, Ar), 134.5 (C, Ar, O-Ph), 149.8 (C, tiazol), 150.7 (C, Ar), 153.6 (C=N), 157.7 (C, Ar, O-Ph), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 430,127 [M+H] +

Síntese do DLT-05, (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 1 hora e 10 minutos. Um precipitado de coloração branca foi obtido. O precipitado foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

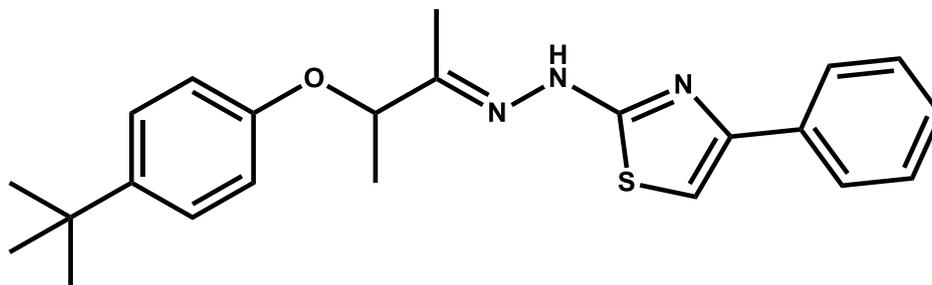
Pó de coloração branca; PF: 154-155 °C; Rend.: 91% ; Rf: 0,43 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3037 (NH), 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.9 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH-CH_3), 6.9 (m, 2H, Ar), 7.3 (m, 2H, Ar), 7.4 (m, 4H, Ar), 7.8 (m, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.5 (CH_3), 76.7 (CH), 103.9 (C, tiazol), 112.3 (BrC), 118.0 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 132.1 (C, Ar), 134.5 (C, tiazol), 150.3 (C=N), 156.6 (C, Ar), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 416,000 [M+H] +

Síntese do DLT-06, (E)-2-(2-(3-(4-(terc-butil)fenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 2 horas. Um precipitado de coloração amarelada e cristalino foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

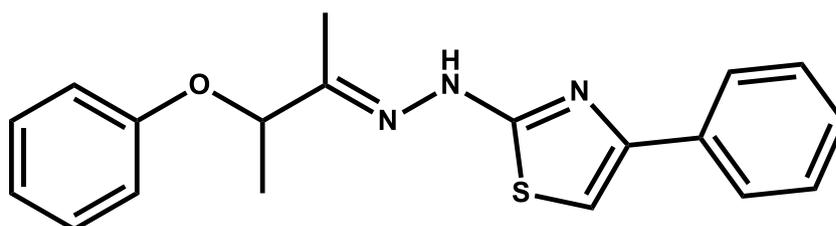
Cristal de coloração amarelada; PF: 149-151 °C; Rend.: 92% ; Rf: 0,67 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1627 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.0 (d, 3H, CH_3), 1.2 (s, 9H, CH_3 -Ar), 1.4 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.9 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 5.1 (s largo, 1H, NH), 6.9 (m, 3H, Ar), 7.3 (m, 5H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.4 (CH_3), 18.7 (CH_3), 31.2 (CH_3), 33.7 (CH), 76.6 (CH), 103.9 (C, tiazol), 115.0 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 134.6 (C, Ar), 143.0 (C=N), 155.1 (S-C=N). **HRMS:** 394,181 [M+H] +

Síntese do DLT-07, (E)-2-(2-(3-fenoxibutan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 2 horas. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

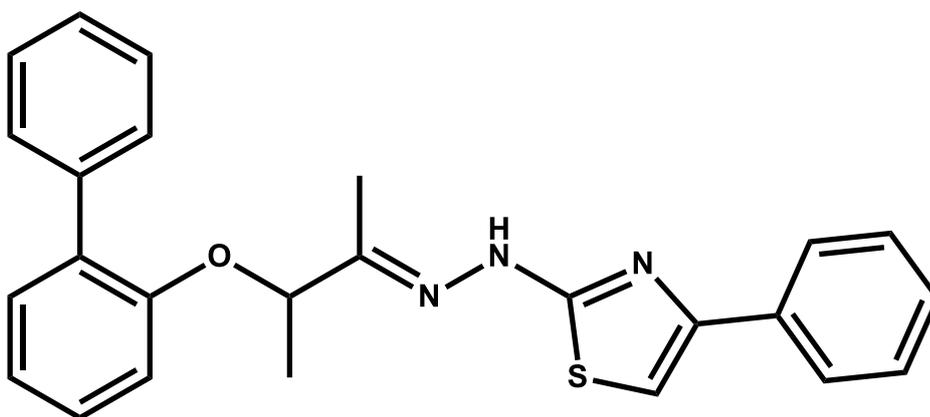
Pó de coloração branca; PF: 168-169 °C; Rend.: 42% ; Rf: 0,67 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1613 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.9 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 6.9 (m, 3H, Ar), 7.3 (m, 6H, Ar), 7.8 (m, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH_3), 18.7 (CH_3), 76.3 (CH), 103.9 (C, tiazol), 115.6 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.5 (C, Ar), 134.4 (C, tiazol), 151.0 (C=N), 157.4 (C, Ar), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 338,110 [M+H]
+

Síntese do DLT-08, (E)-2-(2-(3-([1,1'-bifenil]-2-iloxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente de 2 horas. Um precipitado de coloração rosa foi obtido. Guardou-se em

geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

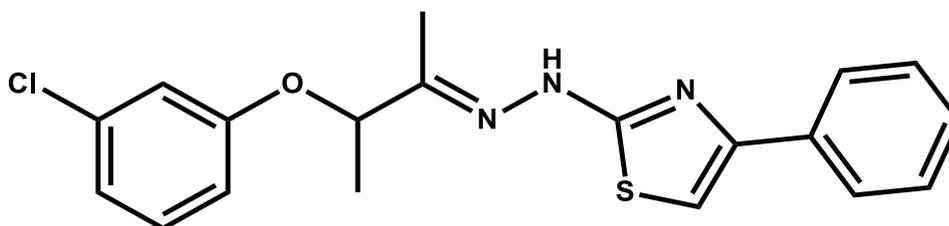
Pó de coloração branca; PF: 147-149 °C; Rend.: 76% ; Rf: 0,59 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1627 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.3 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.9 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH- CH_3), 5.6 (s largo, 1H, NH), 7.0 (t, 2H, Ar), 7.2 (d, 2H, Ar), 7.4 (m, 9H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.7 (CH_3), 18.5 (CH_3), 76.9 (CH), 103.9 (C, tiazol), 114.5 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 126.8 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 130.6 (C, Ar), 130.7 (C, Ar), 138.1 (C, tiazol), 150.7 (C, Ar), 154.0 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 414,087 [M+H] +

Síntese do DLT-09, (E)-2-(2-(3-(3-clorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 50 minutos. Um precipitado de coloração bege foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

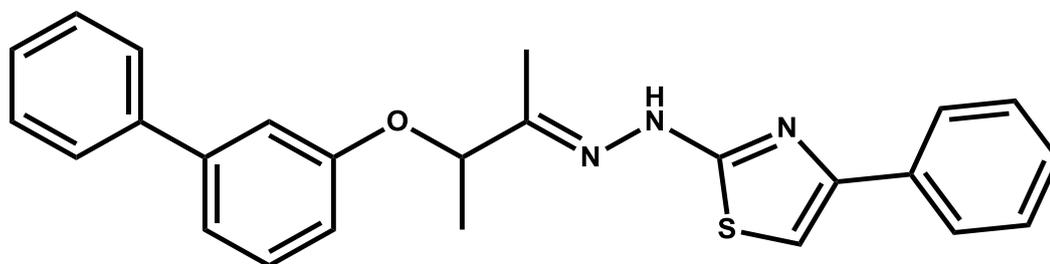
Pó de coloração branca; PF: 176-177 °C; Rend.: 93% ; Rf: 0,57 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1627 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 2.0 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 3.1 (s, 3H, CH_3), 4.2 (s largo, 1H, NH), 5.6 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 7.5 (m, 2H, Ar), 7.6 (m, 1H, Ar), 7.8 (m, 3H, Ar), 8.0 (t, 2H, Ar), 8.4 (d, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.5 (CH_3), 76.8 (CH), 104.0 (C, tiazol), 114.7 (CH, Ar), 115.7 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 130.8 (C, Ar), 133.5 (C-Cl), 134.6 (C, tiazol), 149.9 (C=N), 158.3 (C, Ar), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 372,052 [M+H] +

Síntese do DLT-10, (E)-2-(2-(3-([1,1'-biphenyl]-3-iloxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 60 minutos. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

Pó de coloração amarelada; PF: 106-109 °C; Rend.: 16% ; Rf: 0,51 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

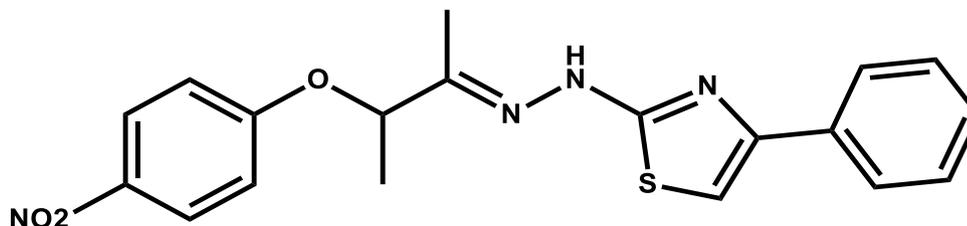
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.6 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 2.5 (s, 3H, CH_3), 4.5 (s largo, 1H, NH), 5.7 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 7.5 (d, 2H, Ar), 7.9 (m, 10H, Ar), 8.2 (d, 2H, Ar), 8.4 (d, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.4 (CH_3), 18.7 (CH_3), 76.5 (CH), 103.9 (C, tiazol), 113.6 (CH, Ar), 115.0 (CH, Ar), 116.1 (CH, Ar), 119.2 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 126.1 (CH, Ar), 126.6 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar),

134.5 (C, Ar), 139.7 (C, Ar), 141.4 (C, Ar), 150.0 (C, tiazol), 150.8 (C=N), 157.9 (C, Ar), 169.5 (S-C=N). **HRMS**: 414,110 [M+H] +

Síntese do DLT-11, (E)-2-(2-(3-(4-nitrofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 3 horas. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

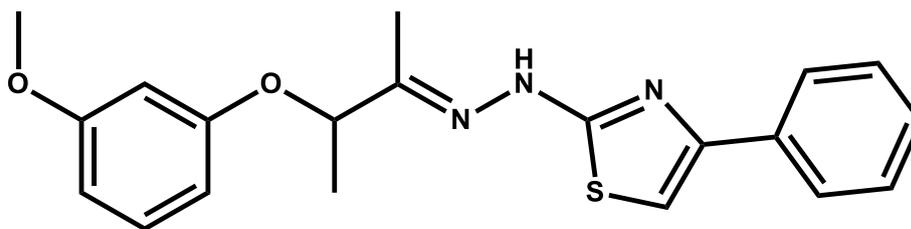
Pó de coloração amarelada; PF: 179-181 °C; Rend.: 89% ; Rf: 0,46 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1613 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.5 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.9 (s, 3H, CH_3), 4.2 (s largo, 1H, NH), 5.2 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 7.3 (m, 5H, Ar), 7.8 (d, 3H, Ar), 8.2 (m, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.9 (CH_3), 18.3 (CH_3), 77.2 (CH), 104.0 (C, tiazol), 125.4 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 133.5 (CH, Ar), 134.5 (CH, Ar), 140.9 (CH, Ar), 149.0 (C, Ar), 150.1 (C- NO_2), 162.8 (C, tiazol), 167.3 (C=N), 168.3 (Ar, C), 169.5 (S-C=N). **HRMS**: 383,110 [M+H] +

Síntese do DLT-12, (E)-2-(2-(3-(3-metoxifenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 50 minutos. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

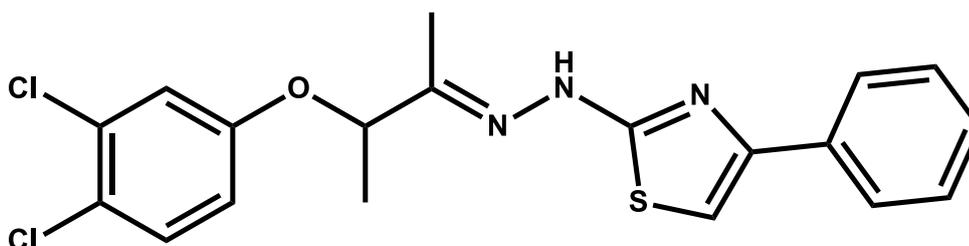
Pó de coloração branca; PF: 146-149 °C; Rend.: 90% ; Rf: 0,58 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1613 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): : 1.4 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 3.6 (s, 3H, O- CH_3), 4.8 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 6.4 (m, 3H, Ar), 7.1 (t, 2H, Ar), 7.4 (m, 4H, Ar), 7.8 (m, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.4 (CH_3), 18.7 (CH_3), 54.9 (CH), 76.3 (CH), 101.6 (CH, Ar), 103.9 (C, tiazol), 106.6 (CH, Ar), 107.8 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.5 (C, Ar), 129.8 (CH, Ar), 134.4 (C, tiazol), 151.0 (C=N), 158.6 (C, Ar), 160.3 (C, Ar), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 376,286 [M+H] +

Síntese do DLT-13, (E)-2-(2-(3-(3,4-diclorofenoxy)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 1 hora. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em

geladeira por alguns minutos e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

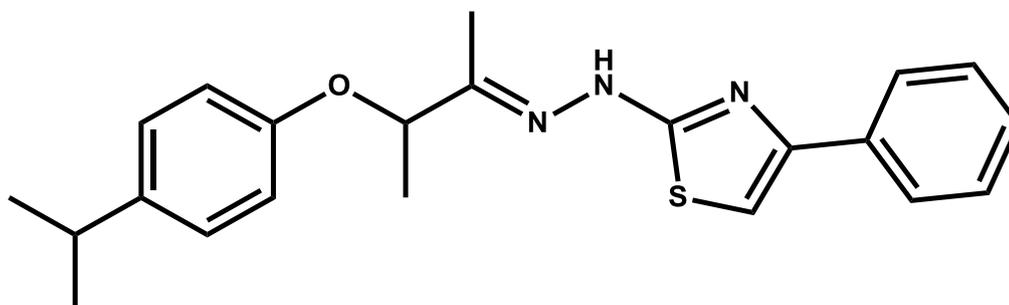
Pó de coloração branca; PF: 170-172 °C; Rend.: 91% ; Rf: 0,58 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1613 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, 3 J = 6.1 Hz, H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.4 (s largo, 1H, NH), 5.0 (q, J = 6.3 Hz, 1H, CH- CH_3), 6.9 (m, 1H, Ar), 7.4 (m, 6H, Ar), 7.8 (m, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.3 (CH_3), 76.9 (CH), 104.0 (C, tiazol), 116.6 (CH, Ar), 117.6 (CH, Ar), 122.7 (C-Cl), 125.4 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 130.9 (C, Ar), 131.4 (C-Cl), 134.4 (C, tiazol), 149.9 (C=N), 156.8 (C, Ar), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 406,019 [M+H] +

Síntese do DLT-14, (E)-2-(2-(3-(4-isopropilfenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 1 hora. Um precipitado de coloração avermelhada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

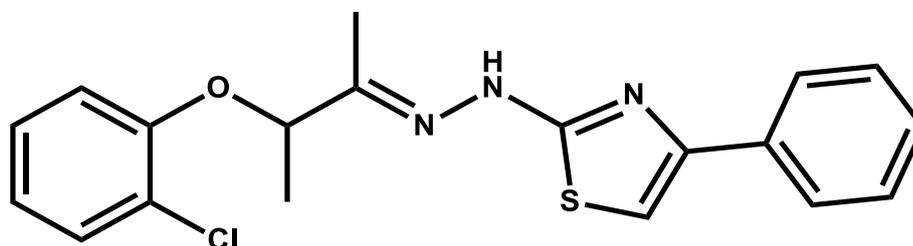
Pó de coloração avermelhada; PF: 109-113 °C; Rend.: 51% ; Rf: 0,66 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.1 (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 1.4 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 2.7 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 4.4 (s large, 1H, NH), 4.9 (q, $J = 5.7$ Hz, 1H, CH-CH_3), 6.8 (d, 2H, Ar), 7.1 (d, 2H, Ar), 7.4 (m, 4H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH_3), 18.7 (CH_3), 24.0 (CH_3), 32.5 (CH_3), 76.2 (CH), 103.9 (C, tiazol), 115.4 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 134.4 (CH, Ar), 140.8 (C, Ar), 149.9 (C, tiazol), 151.2 (C, Ar), 155.4 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 380,175 [M+H] +

Síntese do DLT-15, (E)-2-(2-(3-(2-clorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente durante 40 minutos. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

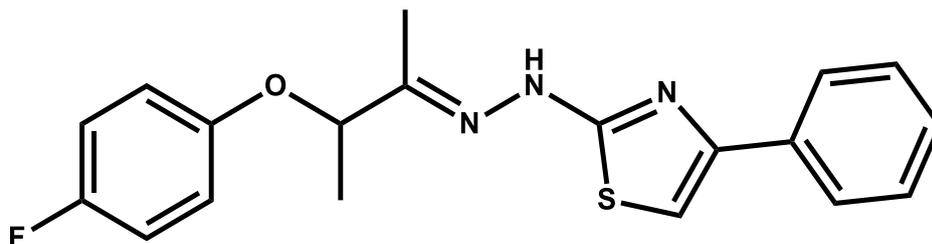
Pó de coloração branca; PF: 173-176 °C; Rend.: 90% ; Rf: 0,63 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1627 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.9 (s, 3H, CH_3), 5.0 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH-CH_3), 6.9 (m, 2H, Ar), 7.2 (m, 7H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.4 (CH_3), 77.6 (CH), 104.0 (C, tiazol), 115.9 (CH, Ar), 122.0 (CH, Ar), 122.2 (ClC), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 134.3 (C, Ar), 149.8 (C, tiazol), 150.2 (C, Ar), 152.6 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 372,092 [M+H] +

Síntese do DLT-16, (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 2 horas. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

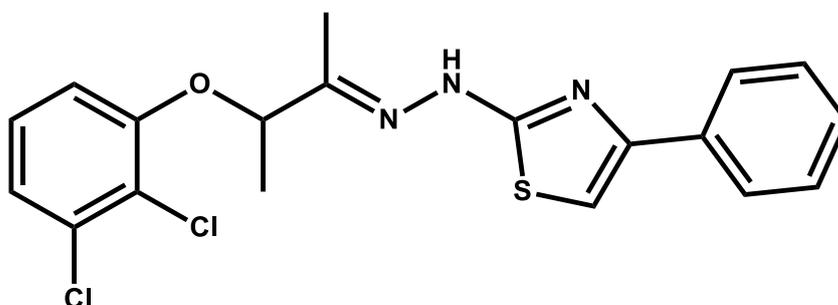
Pó de coloração amarelada; PF: 145-147 °C; Rend.: 88% ; Rf: 0,59 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.9 (s, 3H, CH_3), 4.5 (s largo, 1H, NH), 4.9 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH- CH_3), 7.0 (m, 6H, Ar), 7.4 (m, 3H, Ar), 7.8 (d, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.6 (CH_3), 77.1 (CH), 103.9 (C, tiazol), 115.6 (CH, Ar), 115.9 (CH, Ar), 117.1 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 133.7 (CH, Ar), 134.4 (C, Ar), 149.9 (C, tiazol), 150.7 (C, Ar), 151.6 (FC), 153.6 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 356,085 [M+H] +

Síntese do DLT-17, (E)-2-(2-(3-(2,3-diclorofenoxy)butan-2-ylideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 40 minutos. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

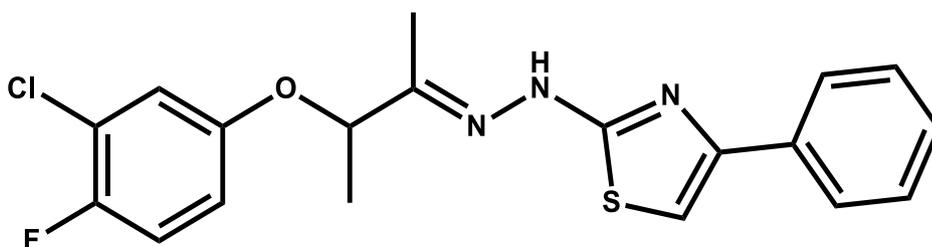
Pó de coloração branca; PF: 182-184 °C; Rend.: 87% ; Rf: 0,63 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.5 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.9 (s, 3H, CH_3), 4.9 (s largo, 1H, NH), 5.1 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH- CH_3), 7.3 (m, 7H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.7 (CH_3), 18.3 (CH_3), 77.8 (CH), 104.0 (C, tiazol), 114.1 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 122.4 (C-Cl), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (C, Ar), 132.3 (C-Cl), 134.3 (C, Ar), 149.9 (C, tiazol), 149.8 (C, Ar), 154.2 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 405,957 [M+H] +

Síntese do DLT-18, (E)-2-(2-(3-(3-cloro-4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 40 minutos. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

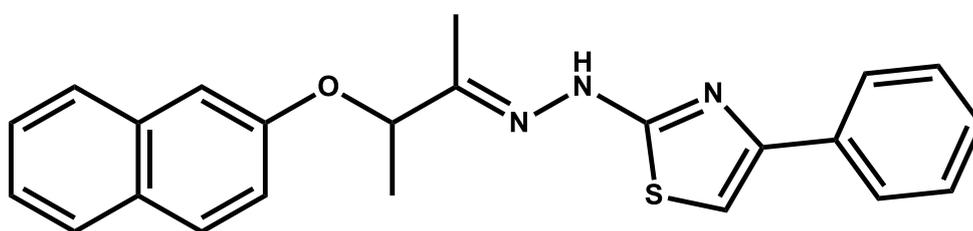
Pó de coloração branca; PF: 139-142 °C; Rend.: 83% ; Rf: 0,57 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃), 1.9 (s, 3H, CH₃), 4.9 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH-CH₃), 6.9 (m, 2H, Ar), 7.3 (m, 6H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH₃), 18.3 (CH₃), 77.4 (CH), 104.0 (C, tiazol), 116.3 (CH, Ar), 117.0 (CH, Ar), 117.2 (CH, Ar), 117.3 (CIC), 125.4 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 134.5 (C, Ar), 149.9 (FC), 150.3 (C, Ar), 153.9 (C=N), 169.5 (S-C=N). HRMS: 390,084 [M+H] +

Síntese do DLT-19, (E)-2-(2-(3-(naftalen-2-iloxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 1 hora. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

Pó de coloração branca; PF: 158-160 °C; Rend.: 82% ; Rf: 0,62 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

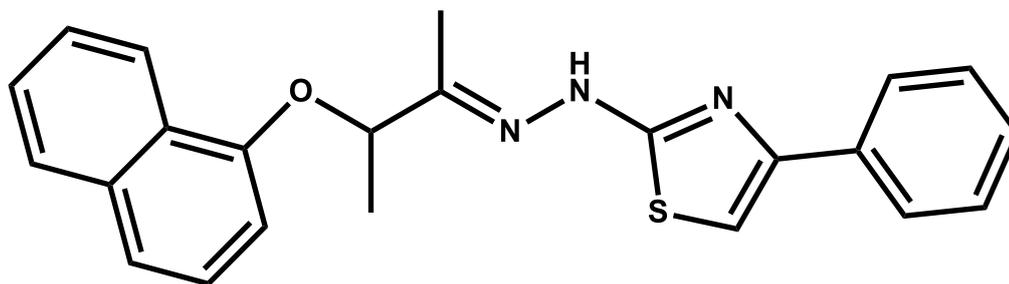
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.5 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃), 1.9 (s, 3H, CH₃), 4.2 (s largo, 1H, NH), 5.1 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH-CH₃), 7.1-7.4 (m, 10H, Ar), 7.7 (d, 1H, Ar), 7.8 (m, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH₃), 18.5 (CH₃), 76.5 (CH), 103.9 (C, tiazol), 108.8 (CH, Ar), 119.1 (CH, Ar), 123.7 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 126.4 (CH, Ar), 126.5 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 133.9 (CH, Ar), 134.5 (C, tiazol), 150.0 (C, Ar), 150.6 (C=N), 155.2 (C, Ar), 169.6 (S-C=N).

HRMS: 388,143 [M+H] +

Síntese do DLT-20, (E)-2-(2-(3-(naftalen-1-iloxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 50 minutos. Um precipitado de coloração branca foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

Pó de coloração branca; PF: 167-169 °C; Rend.: 92% ; Rf: 0,62 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

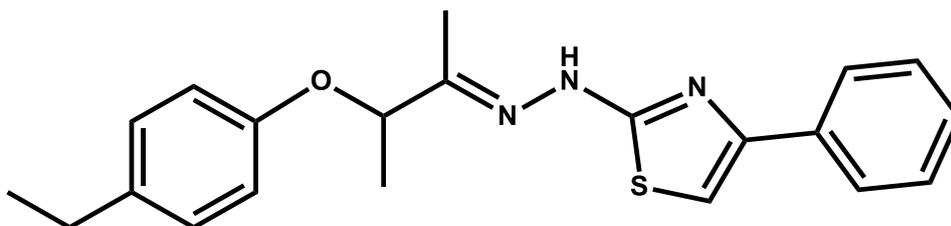
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.6 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.9 (s, 3H, CH_3), 4.5 (s largo, 1H, NH), 5.2 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH- CH_3), 7.0 (d, 1H, Ar), 7.2-7.5 (m, 9H, Ar), 7.8 (m, 2H, Ar), 8.2 (t, 1H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH_3), 18.6 (CH_3), 76.6 (CH), 104.0 (C, tiazol), 107.0 (CH, Ar), 120.2 (CH, Ar), 121.5 (CH, Ar), 125.3 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 126.4 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (C, Ar), 134.1 (C, Ar), 149.7 (C, tiazol), 151.1 (C=N), 152.6 (C, Ar), 169.5 (S-C=N).

HRMS: 388,139 [M+H] +

Síntese do DLT-21, (E)-2-(2-(3-(4-etilfenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

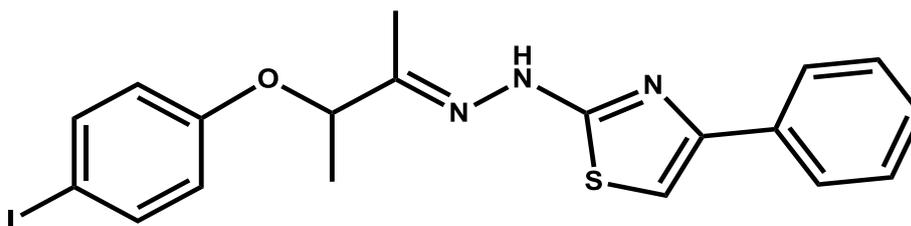
Pó de coloração amarelada; PF: 139-142 °C; Rend.: 86% ; Rf: 0,65 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1613 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.1 (t, 3H, CH_3 -Ar), 1.4 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 2.5 (q, 2H, CH_2), 4.9 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH-CH_3), 6.8 (d, 2H, Ar), 7.1 (d, 2H, Ar), 7.3 (m, 4H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar), 8.4 (s largo, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.5 (CH_3), 15.7 (CH_3), 18.7 (CH_3), 27.2 (CH_2), 76.3 (CH), 103.9 (C, tiazol), 115.5 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 134.3 (C, Ar), 136.1 (C, Ar), 149.7 (C, tiazol), 151.3 (C, Ar), 155.4 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 366,108 [M+H] +

Síntese do DLT-22, (E)-2-(2-(3-(4-iodofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol



O procedimento reacional foi semelhante ao item anterior. O tempo reacional foi de aproximadamente 50 minutos. Um precipitado de coloração amarelada foi obtido. Guardou-se em geladeira por um dia e, posteriormente, o pó foi separado do sobrenadante em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com isopropanol e depois colocado no dessecador sob vácuo.

Pó de coloração amarelada; PF: 166-168 °C; Rend.: 73% ; Rf: 0,63 (Ciclohexano / Acetato de etila 8:2).

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 1620 (C=N).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.4 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.8 (s, 3H, CH_3), 4.9 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH- CH_3), 6.8 (m, 2H, Ar), 7.4 (t, 3H, Ar), 7.5 (m, 1H, Ar), 7.8 (d, 2H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH_3), 18.5 (CH_3), 76.5 (CH), 103.9 (C, tiazol), 118.4 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 133.9 (CH, Ar), 134.5 (C, tiazol), 137.9 (CH, Ar), 150.2 (C, Ar), 157.2 (C=N), 169.5 (S-C=N). **HRMS:** 366,108 [M+H] +

4.5 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA ANTI-*T. cruzi*

Os ensaios anti-*T. cruzi* foram realizados em parceria com o Laboratório de Biologia Celular, localizado na Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Rio de Janeiro (RJ), sob a supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Maria de Nazaré Correia Soeiro.

4.5.1 Análise tripanocida

As formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y (5×10^6 por mL) foram incubadas durante 24 horas a 37 °C em RPMI na presença de diluições seriadas dos compostos (0 a 50 μM), os parasitas incubados apenas com o meio de cultura foram usados como controle.

Após a incubação do composto, as taxas de mortalidade do parasita foram determinadas por microscopia óptica através da quantificação direta do número de parasitas vivos usando uma câmara de Neubauer e a CC_{50} (concentração de composto que reduz 50% do número de parasitas) foi calculada. Além disso, o CC_{90} (concentração de composto que reduz 90% do número de parasitas) foi adicionalmente calculado nos ensaios utilizando a cepa Y (TIMM et al., 2014).

Para o ensaio em formas intracelulares, células de linhagem L929 foram utilizadas como hospedeiras para a infecção utilizando a cepa Tulahuen. Resumidamente, as culturas de L929 infectadas com Tulahuen foram expostas a 10 μM dos compostos (correspondendo ao valor CC_{90} de Bdz), conforme relatado por (TIMM et al., 2014). Após 96 h de incubação dos compostos a 37 °C, adicionou-se o glicosídeo vermelho de clorofenol (500 μM) - (Sigma Aldrich) a cada poço e a placa foi incubada por 8 h a 37°C. Em seguida, mediu-se a absorbância a 570 nm. As culturas não infectadas e infectadas com *T. cruzi* submetidas à exposição do veículo e Bdz, respectivamente, foram executadas em paralelo. Os resultados são expressos como a percentagem de inibição do crescimento de *T. cruzi* em células testadas em comparação

com as células infectadas e células não tratadas (ROMANHA et al., 2010). As amostras foram testadas em triplicata executadas na mesma placa, e pelo menos dois ensaios foram realizados para cada análise.

4.5.2 Toxicidade para fibroblastos L929

Para detectar qualquer potencial de toxicidade em relação à célula hospedeira, culturas de CM e L929 foram incubadas com estes compostos e a função metabólica celular foi medida na presença de indicadores baseados em resazurina (PrestoBlue[®] e AlamarBlue[®], respectivamente). De acordo com isto, 100 µL de DMEM contendo 6×10^4 CM por poço foram semeados em microplacas de 96 poços previamente revestidas com gelatina e incubadas durante a noite a 37 °C numa atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi substituído por soluções de cada composto em DMEM fresco e as placas foram incubadas por 24 ou 48 h nas condições acima mencionadas. Cada concentração foi avaliada em triplicata e os controles de crescimento celular foram incluídos em todas as placas. Uma vez concluída a incubação, tanto a morfologia celular quanto a capacidade de contração foram examinadas por microscopia óptica e viabilidade celular avaliadas adicionando-se 10 µL do indicador redox PrestoBlue[®] de acordo com as instruções do fabricante. Após 5 h de incubação a 37 °C numa atmosfera umidificada a de 5% de CO₂, a absorbância foi lida a 570 e 600 nm e os resultados foram expressos como a percentagem de citotoxicidade em CM (% C_{CM}) (ROMANHA et al., 2010). Além disso, a citotoxicidade sobre L929 foi realizada em placas de 96 poços semeando 4×10^3 em 100 µL de MEM por poço. A morfologia das células foi avaliada por microscopia óptica e a viabilidade celular determinada por um ensaio colorimétrico utilizando 20 µL AlamarBlue[®] (Invitrogen) adicionado a cada poço. Após incubação durante 24 ou 96 h, a absorbância foi determinada (a 570 e 600 nm) e os resultados foram determinados seguindo as instruções do fabricante (FONSECA-BERZAL et al., 2015; ROMANHA et al., 2010).

4.5.3 Parasitas

As formas tripomastigotas sanguíneas (BT) da cepa Y do *T. cruzi*, originalmente isoladas de um caso agudo humano (L. H. SILVA; NUSSENZWEIG, 1957) e a cepa Tulahuen,

estavelmente transfectadas com gene *lacZ* da *Escherichia coli* β -galactosidase (BUCKNER et al., 1996) foram utilizadas ao longo dos experimentos.

Tripomastigotas sanguíneas (BT) da cepa Y foram obtidas por punção cardíaca de camundongos suíços infectados, realizada no dia do pico de parasitemia, e depois da sua purificação, foram suspensas em meio RPMI suplementado com FBS inativado com calor a 5%. Em relação aos parasitas da cepa Tulahuen, as tripomastigotas derivadas de cultura de tecidos (TCT) desta cepa transfectada com o gene da β -galactosidase foram colhidas no sobrenadante de culturas L929 previamente infectadas com formas invasivas de *T. cruzi*, e mantidas em meio RPMIS a 37 °C numa atmosfera umidificada a 5% de CO₂ (ROMANHA et al., 2010).

O efeito contra as formas intracelulares foi investigado através da utilização de linhagens de células L929 infectadas com tripomastigotas derivadas de cultura de tecidos (cepa Tulahuen que expressa o gene da β -galactosidase de *E. coli*), utilizando uma razão parasita/célula hospedeira 10:1. A incubação com os compostos testados foi realizada durante 96 h, seguindo protocolos previamente estabelecidos (ROMANHA et al., 2010).

Capítulo 2

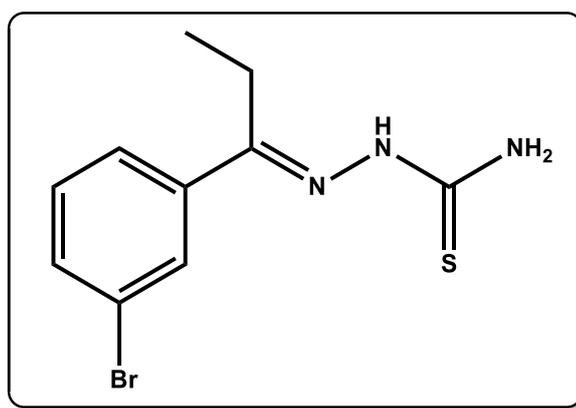
Avaliação da atividade anticâncer de 4-tiazolidinonas e 1,3-tiazóis

5 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

O planejamento dessas duas séries de compostos (tiazóis e tiazolidinonas) frente à atividade antineoplásica foi baseado em resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e também a partir de dados da literatura. Com relação à série dos tiazóis, suas tiossemicarbazonas intermediárias tiveram sua síntese publicada em MOREIRA et. al. (**Figura 23**, página 46). Posteriormente, essa série de tiossemicarbazonas teve sua atividade antineoplásica avaliada por SANTOS, T. M., 2015 e tais resultados mostraram-se promissores. Cerca de 5 compostos apresentaram resultados inferiores a 59% de viabilidade celular, na concentração única de 10 μ M, em 8 linhagens tumorais, sendo uma delas multirresistente (HL-60/mx1). Além disso, um dos compostos (composto **9v**, **Figura 20**, **página 42**) apresentou fragmentação apoptótica na eletroforese em gel de agarose. Aplicando-se a estratégia de bioisosterismo, os 1,3-tiazóis foram sintetizados, como já esquematizado anteriormente.

Quanto à série de tiazolidinonas, a sua síntese já foi realizada em trabalhos anteriores do nosso laboratório (DE SIQUEIRA, et. al., 2019). O composto **1i** é uma tiossemicarbazona, a qual deu origem ao planejamento da série de tiazolidinonas, e teve sua síntese publicada por DU et. al. 2002 (**Figura 30**).

Figura 30. Estrutura do composto **1i**

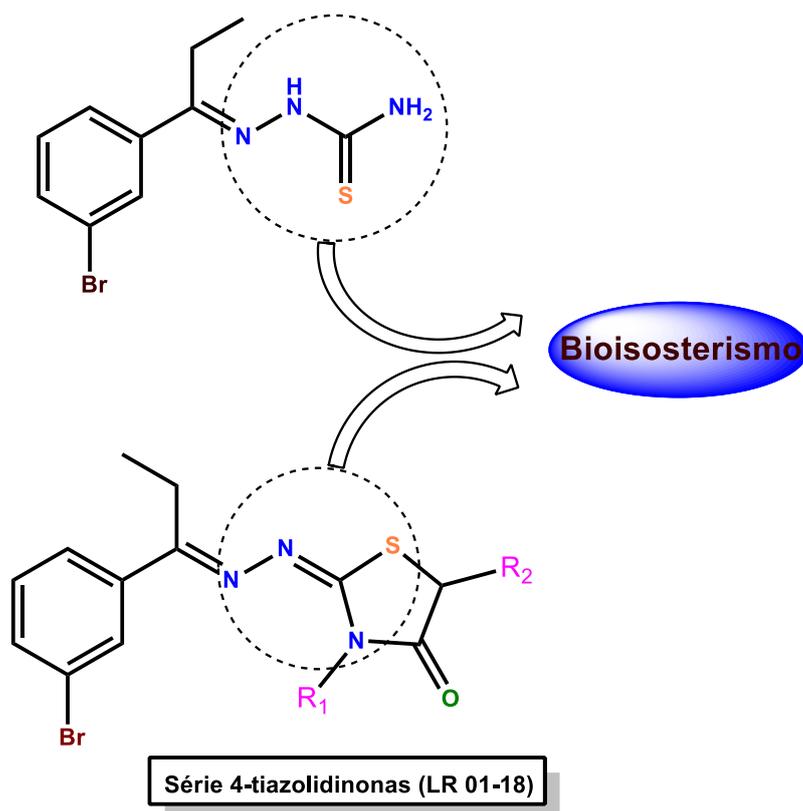


Fonte. Elaborado pela autora.

A estratégia utilizada para obtenção das tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas foi a do bioisosterismo (**figura 31**), oriunda de uma reação entre tiossemicarbazonas e diferentes ácidos e/ou ésteres halogenados. Com relação a características estruturais, explorou-

se substituições nas posições N3 e C5 do anel heterociclo, utilizando-se de grupamentos alquila de diversos volumes, bem como o anel fenila nestas posições.

Figura 31. Planejamento estrutural para as séries



Fonte: Elaborado pela autora.

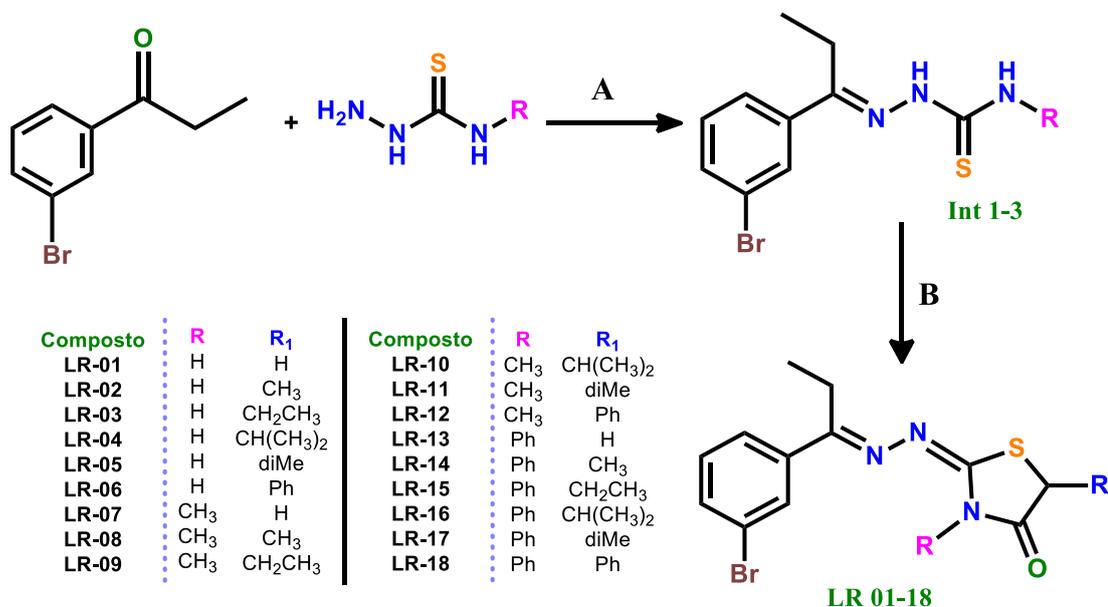
5.1 RESULTADOS

5.1.1 Compostos do tipo 4-tiazolidinonas (LR 01-18)

Uma vez que a síntese das tiazolidinonas (LR 01-18) foi realizada durante o programa de mestrado, seguiremos apenas com a exibição das estruturas químicas dessa série. As aril-4-tiazolidinonas (LR 01-18) foram sintetizadas através da reação entre a respectiva tiossemicarbazona (Int 1-3) com os respectivos acetatos α -halogenados. Estas reações foram realizadas em etanol absoluto, com excesso de acetato de sódio anidro, sob refluxo e agitação

magnética (**Figura 32**). Os sólidos obtidos variavam de cores amareladas à brancas e suas estruturas químicas foram elucidadas por RMN ^{13}C , RMN ^1H e IV.

Figura 32. Rota sintética para obtenção das aril-4-tiazolidinonas (**LR 01-18**).



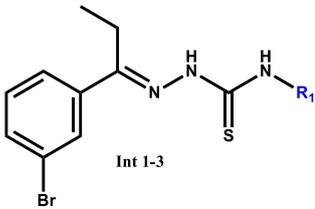
Notas:

Reagentes e condições: a) Diferentes tiossemicarbazidas, em etanol, irradiação por ultrassom, ácido clorídrico (4 gotas), 2-5 horas; b) Ácidos e ésteres halogenados, etanol, refluxo, acetato de sódio, 20-22 horas. Fonte. Elaborado pela autora.

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE 4-TIAZOLIDINONAS

Inicialmente, todos os compostos da série **LR-01 a LR-18**, bem como os compostos intermediários, foram avaliados frente às células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Número do Parecer: 3.218.926). As concentrações utilizadas foram de 10 μM e 100 μM . Como pode ser observado na **Tabela 4**, os compostos não apresentaram toxicidade, mesmo na maior concentração testada (100 μM). Além disso, é possível constatar que as tiossemicarbazonas intermediárias apresentaram os menores valores de células viáveis quando comparados aos compostos cíclicos tiazolidinonas, corroborando com o que já foi verificado em trabalhos prévios. A doxorubicina apresentou valor de apenas 7,2% de células viáveis na concentração de 10 μM .

Tabela 4. Citotoxicidade de tiazolidinonas em PBMCs.

Composto	R ₁	R ₂	Citotoxicidade PBMC (10 µM) - % em células viáveis	Citotoxicidade PBMC (100 µM) - % em células viáveis
				
Int-1	H	-	84,8	58,6
Int-2	CH ₃	-	89,8	59,3
Int-3	Ph	-	86,8	81,5
LR-01	H	H	99,5	98,3
LR-02	H	CH ₃	100	98,9
LR-03	H	CH ₂ CH ₃	97,8	94,3
LR-04	H	CH(CH ₃) ₂	>100	>100
LR-05	H	diMe	>100	99
LR-06	H	Ph	>100	>100
LR-07	CH ₃	H	96,6	78,5
LR-08	CH ₃	CH ₃	98,5	96,4
LR-09	CH ₃	CH ₂ CH ₃	97,4	96,2
LR-10	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	>100	93
LR-11	CH ₃	diMe	95,5	72,7
LR-12	CH ₃	Ph	>100	71,7
LR-13	Ph	H	94,7	91,2
LR-14	Ph	CH ₃	82,7	80,5
LR-15	Ph	CH ₂ CH ₃	90,3	90,3
LR-16	Ph	CH(CH ₃) ₂	94,6	89,8
LR-17	Ph	diMe	>100	98,1
LR-18	Ph	Ph	99	97
Doxo	-	-	7,2	-

Os valores correspondem à média de três experimentos independentes. Os valores de desvio-padrão foram menores que 10%.

Após determinação da citotoxicidade em células saudias, os compostos foram submetidos a ensaios junto a sete linhagens tumorais, em dose única de 10 µM, conforme exposto na **Tabela 5**. Foram executados os testes em três linhagens de células hematopoiéticas: MOLT-4 (Leucemia linfoblástica aguda humana), HL-60 (Leucemia promielocítica) e K562 (Leucemia mielóide crônica) e quatro linhagens de células derivadas de tumores sólidos: MCF-7 (Adenocarcinoma mamário), T47d (Carcinoma ductal de mama), SKMEL (Melanoma metastático humano) e PANC-1 (Carcinoma epitelial de pâncreas).

Tabela 5. Viabilidade celular da série LR em sete linhagens na concentração de 10 µM

Composto	SKMEL-28 (%)	T47d (%)	PANC-1 (%)	MOLT-4 (%)	MCF-7 (%)	HL-60 (%)	K562 (%)
Int-1	100	76,3	41,6	70,6	82,5	80,3	89,8
Int-2	100	77,4	63,4	76,7	86,9	74,6	100
Int-3	100	61,9	50,4	89,7	>100	73,3	100
LR-01	100	73,3	96,5	92,3	87,3	77,8	100
LR-02	100	80,2	100	97,7	>100	69	100
LR-03	100	84,3	55,1	79,5	93,1	49,8	100
LR-04	100	71,3	93,9	97,7	100	93,2	100
LR-05	100	70	100	97,3	100	84,8	1,9
LR-06	100	90,1	84,7	96,7	100	87,8	100
LR-07	100	95,7	52,3	98,8	100	83,3	100
LR-08	100	63,3	93	100	100	94,7	100
LR-09	100	67,5	97,1	100	100	88,7	100
LR-10	100	59,8	100	84,8	100	84,2	100
LR-11	99,1	54	55,4	90	100	82,6	100
LR-12	100	68,1	76	87,5	100	90,1	100
LR-13	100	63,9	77,8	94	97,5	74,8	60
LR-14	88,5	47	100	58,9	100	6,6	0,2
LR-15	97,2	72,7	100	86,4	100	76,0	>100
LR-16	100	65,1	100	94,7	100	82,3	100
LR-17	100	72,6	100	75,8	68,8	70,5	>100
LR-18	91,6	89,8	95,4	>100	81	82	>100
Doxo	NT	4,2	NT	2,9	2,7	NT	NT
Amsacrina	NT	NT	NT	NT	NT	1,0	0,9

Notas:

NT – Não testado; ■ - valores inferiores a 59%.

Quanto aos resultados obtidos nesse primeiro momento, verifica-se que dentre as linhagens de células derivadas de tumores hematopoiéticos, os compostos **LR-14** e **LR-17** em MOLT-4 apresentaram os menores valores de viabilidade celular e como semelhança estrutural, eles possuem uma fenila em N3 e grupamentos alquila em C5 (uma metila para **LR-14** e um dimetil para **LR-17**). Na linhagem hematopoiética HL-60, o melhor resultado foi apresentado pelos compostos **LR-03** e **LR-14**, os quais apresentaram resultados de viabilidade celular de 49,8% e 6,6%, respectivamente. Na terceira e última linhagem celular hematopoiética K562, destaca-se os compostos **LR-05** e **LR-14** cujos resultados foram de, respectivamente, 1,9% e

0,2%. Dessa forma, é possível constatar que o composto **LR-14** mostra um perfil interessante para as células neoplásicas hematopoiéticas.

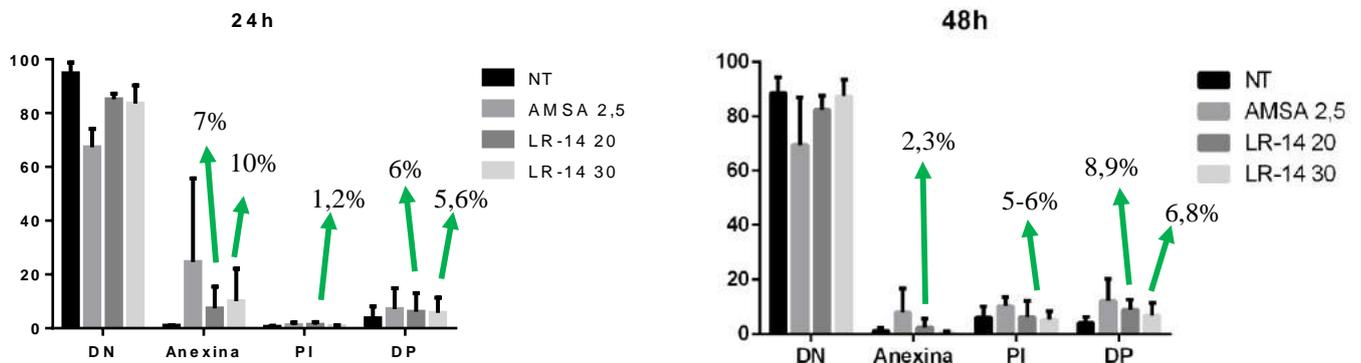
Sobre os resultados de viabilidade celular para as células de câncer de mama, MCF-7, o composto **LR-17** apresentou o menor valor de viabilidade celular que foi de 68,8%. Para a linhagem T47d, o **LR-11** e **LR-14** apresentaram os melhores resultados, 54% e 47%, respectivamente. Quanto a linhagem de melanoma, SKMEL-28, os resultados de viabilidade celular foram superiores a 88,5%.

Uma vez selecionadas as moléculas com melhores valores de viabilidade celular frente a células tumorais na concentração única de 10 μM , realizou-se o ensaio de avaliação da viabilidade celular em MOLT-4 com o composto **LR-14**. Tal composto foi exposto em crescentes concentrações, para assim elucidar o valor da concentração que reduz em 50% a viabilidade das células (CI_{50}). A redução da viabilidade celular acontece de maneira dose dependente para o **LR-14** na linhagem de leucemia MOLT-4. Na concentração de 100 μM , a viabilidade celular se situa entre 1% e 20%. A doxorrubicina é o controle positivo. Esse medicamento é um membro da família antraciclina de fármacos antineoplásicos e é utilizado como agente de primeira linha para o tratamento de vários tipos de tumores sólidos, porém, revela-se muito tóxico (PAPAGIANNAROS et al., 2006). Para o cálculo de CI_{50} em MOLT-4, foram realizados três ensaios independentes e o valor encontrado foi $7,97 \pm 1,04$ (μM). O índice de seletividade foi determinado através da seguinte razão: $\text{CI}_{50}\text{PBMC}/\text{CI}_{50}$ linhagem tumoral, segundo Kommera et. al., 2010, é preconizado que os compostos serão seletivos quando o $\text{IS} > 3$. Assim, o composto **LR-14** é classificado como seletivo, uma vez que o seu valor foi de 10,10.

Para a linhagem K562, os compostos tiveram seu valor de CI_{50} calculados, sendo $50,57 \mu\text{M} \pm 5,33$ para o **LR-05** e $20,96 \mu\text{M} \pm 5,84$ para o composto **LR-14**. Em relação a outra linhagem hematopoiética de leucemia promielocítica, HL-60, tem-se o valor de $\text{CI}_{50}=44,63 \mu\text{M}$ para o composto **LR-14**.

5.2.2 Avaliação de indução de morte em leucemia mielóide crônica

O composto **LR-14** foi avaliado frente ao ciclo celular de células de leucemia mielóide crônica (K562). Os ensaios foram realizados em duas concentrações 20 μM e 30 μM , bem como em dois tempos distintos: 24h e 48h (**Figura 33**).

Figura 33. Avaliação da indução de morte do composto **LR-14**

Notas:

DN – duplamente negativo; DP- duplamente positivo; PI – Iodeto de propídeo; NT – Não tratado; AMSA – Amsacrina. ($P>0.05$). Fonte. Elaborado pela autora.

Para o tempo de 24h, o composto **LR-14** na concentração de 20 μM induziu morte de cerca de 15%, sendo cerca de 7% positivo para apoptose e 1,2% para necrose. O percentual para apoptose tardia/necrose ficou em cerca de 6%. Já concentração de 30 μM , o composto aumentou o percentual para morte por apoptose, para cerca de 10%. O percentual para apoptose tardia/necrose sofreu menos de 1% de variação, apresentando-se em torno de 5,67%.

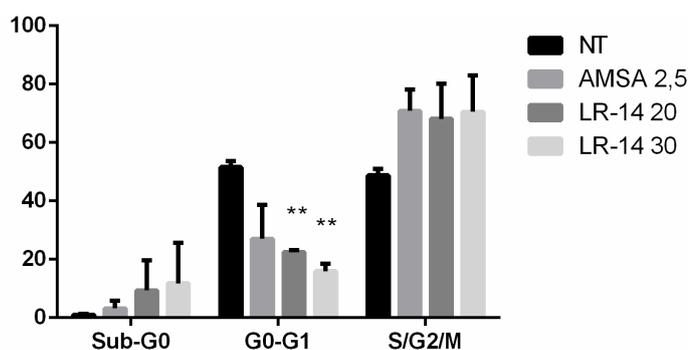
Com relação aos resultados obtidos após 48h de tratamento, observou-se que o percentual de morte, de maneira geral, apresentou-se em torno de 13-18% para ambas as concentrações. Houve um aumento do percentual de morte por necrose, comparando-se ao ensaio de 24h, de modo que o percentual situou-se em torno de 6-5%. Para a concentração de 20 μM , o percentual de morte por apoptose foi em torno de 2,39% e na concentração de 30 μM esse percentual foi reduzido para 0,48%. O percentual referente a apoptose tardia/necrose apareceu maior para a concentração de 20 μM (8,90%) do que em 30 μM (6,88%). Assim, o aumento na concentração do composto não induziu o aumento substancial de morte.

5.2.3 Avaliação da inibição do ciclo celular em leucemia mielóide crônica

O composto **LR-14** também foi avaliado frente ao ciclo celular de células K562 após 48h de tratamento. Foi possível constatar que, em ambas as concentrações utilizadas 20 μM e

30 μ M, houve parada na fase celular S/G2/M com percentuais de aproximadamente 68% e 70%, respectivamente ($P=0.1545$ e $P=0.1353$).

Figura 34. LR-14 frente ao ciclo celular de células K562.



Notas:

NT – Não tratado; AMSA – Amsacrina. **, $P=0.0028$ (20 μ M) e $P=0.0043$ (30 μ M). Fonte. Elaborado pela autora.

5.2.4 Discussão

Com o intuito de avaliar o potencial citotóxico dos compostos (**LR 01-18**), bem como otimizar a realização deste, realizou-se uma triagem racional dos compostos do presente trabalho. A triagem foi baseada nas diretrizes propostas pelo NCI-60 (United State National Cancer Institute 60 human tumour cell line). Os compostos que apresentaram valores de viabilidade celular inferior a 59%, no ensaio de concentração única de 10 μ M, seguiram para ensaios de determinação da sua CI_{50} .

A triagem foi realizada com sete linhagens, sendo três hematopoiéticas (MOLT-4, K562 e HL-60) e quatro oriundas de tumores sólidos (T47d, MCF-7, PANC-1 e SKMEL-28). Percebeu-se que os compostos revelaram melhores resultados frente às linhagens hematológicas e que, diante das sete linhagens, quatro compostos exibiram valores inferiores a 59% de viabilidade celular. O composto **LR-03** para HL-60 (49,8%), o composto **LR-05** para K562 (1,9%), o composto **LR-11** para T47d (54%), o composto **LR-14** para T47d (47%), para HL-60 (6,6%) e para K562 (0,2%). Sobre a característica estrutural desses compostos, é possível evidenciar algumas relações: os compostos **LR-03** e **LR-05** possuem em N3 um hidrogênio, enquanto que o **LR-11** e **LR-14** possuem uma metila e uma fenila, respectivamente. Quanto aos substituintes em C5, é possível perceber que todos eles possuem um radical alquila, sendo uma etila em **LR-03**, um dimetil em **LR-05** e **LR-11** e uma metila em **LR-14**.

Além disso, é possível destacar a atuação do composto **LR-14** dentro dessa série de compostos. Sua atividade destacou-se frente a uma linhagem aderida (T47d) e duas hematopoiéticas (K562 e HL-60), sendo o composto eleito a proceder com a realização de mais ensaios. Quanto à linhagem, escolheu-se K562 por, inicialmente, apresentar o menor valor de viabilidade celular em sua triagem.

Com relação a citotoxicidade dessa série de moléculas em células normais (**Tabela 4**), utilizou-se PBMCs em duas concentrações: 10 μM e 100 μM . De forma geral, os compostos não foram tóxicos e o menor valor de viabilidade celular foi em torno de 70% para a concentração mais alta, 100 μM . Com isso, é possível sugerir o índice de seletividade (IS), que trata-se de um indicador que consiste na razão entre a CI_{50} de células normais e tumorais evidenciando o potencial uso em testes clínicos. A literatura preconiza um bom IS acima de 3. Dessa forma, o IS encontrado para o **LR-14** frente a K562 foi de 3,84. Para a linhagem hematopoiética HL-60, o valor encontrado foi de 1,80 e para MOLT-4 o valor foi de 10,10. Exceto para a linhagem HL-60, o composto **LR-14** apresentou valores desejáveis, uma vez que foi superior a 3. Quanto ao composto **LR-05** na linhagem K562, o valor encontrado foi de 1,59.

Após avaliação da citotoxicidade dos compostos, buscou-se avaliar a possível indução de morte causada pelo composto, após 24h e 48h de tratamento, bem como sua atuação frente ao ciclo celular após 48h de tratamento em leucemia mielóide crônica (K562). As doses utilizadas (20 μM e 30 μM) foram baseadas no valor do CI_{50} 20,96 $\mu\text{M} \pm 5,84$. Quanto ao ensaio de indução de morte após 24h de tratamento, verificou-se que o maior percentual de células mortas foi por apoptose em ambas as concentrações. Já para o ensaio após 48h de tratamento, houve um aumento do percentual de morte por necrose, quando comparado ao ensaio de 24h. Ao aumentar a concentração do composto, percebeu-se que o percentual de morte por apoptose é reduzido, assim como para a apoptose tardia/necrose, porém os resultados não foram estatisticamente significativos. Outros estudos avaliaram o tipo de morte induzido por tiazolidinonas, dentre eles, SENKIV et al. verificou que tiazolidinonas induziu morte, por apoptose, em células de leucemia (SENKIV et al., 2016), assim como visto por SHARATH KUMAR et al. Este último evidenciou uma de suas tiazolidinonas com potencial efeito citotóxico em células de leucemia e, observou ainda, a indução de despolarização do potencial de membrana mitocondrial (SHARATH KUMAR et al., 2014).

O ciclo celular está relacionado a uma série de eventos relacionados com a divisão e a duplicação celular. Ele apresenta quatro fases distintas: G1, S (síntese), G2 fases (interfase) e M (mitose). O aproveitamento de energia e material para DNA síntese ocorre na fase G1 e a

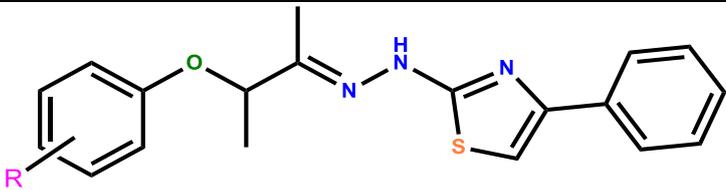
célula replica seu DNA na fase S. A fase G2 prepara a célula para a mitose em si, onde ocorre a divisão do núcleo e do citoplasma da célula (KUMBHARE et al., 2015). Devido a importância de uma possível atuação no ciclo celular, o composto **LR-14** foi submetido ao ensaio. Verificou-se a indução do aumento do arraste na fase S/G2/M, em torno de 20%, para as duas concentrações utilizadas ($P=0.1545$ e $P=0.1353$), comparando-se à condição que não recebeu tratamento (NT). Em trabalho anterior (BARBOSA et al., 2016), é possível constatar a indução de compostos do tipo tiazolidinonas na fase Sub-G1, utilizando-se a concentração de $12.5\mu\text{M}$ de composto e tendo como percentual encontrado de 15.3. Em outro trabalho, células de leucemia, tais como K562, Nalm6 e Jurkat foram avaliadas frente a compostos que possuem em sua estrutura o núcleo tiazolidinona. Verificou-se o efeito citotóxico desses compostos e também que os mesmos são responsáveis por atuar no ciclo celular de células Nalm6 após 48h de tratamento, induzindo arrasto na fase G2/M (SHARATH KUMAR et al., 2014, 2015).

De forma geral, podemos inferir que as tiazolidinonas testadas não foram tóxicas em células não transformadas (PBMCs). Os compostos mostraram melhor perfil frente à linhagens hematológicas, com destaque para o composto **LR-14**. Em leucemia mielóide crônica (K562), o composto induziu parada na fase celular S/G2/M do ciclo celular nas duas concentrações testadas. Após o tratamento de 24h, percebeu-se maior indução de morte por apoptose e já para 48h após o tratamento, foi possível constatar maior indução de morte por apoptose tardia/necrose. Uma vez que os dados não foram significativos, novos ensaios precisam ser realizados.

5.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE 1,3-TIAZÓIS

Os compostos da série **DLT** foram submetidos a ensaios frente a oito linhagens tumorais, sendo quatro hematopoiéticas (MOLT-4, HL-60, HL-60mx1 (resistente a Mitoxantrona) e MM1S) e quatro oriundas de tumores sólidos (DU145, SKMEL-28, MCF-7 e T47d), em uma única dose de $10\mu\text{M}$. Ao final do ensaio foi determinada a viabilidade celular das linhagens e os resultados estão expostos a seguir:

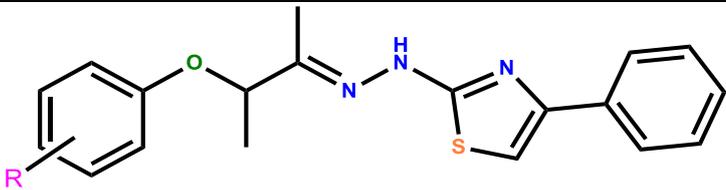
Tabela 6. Viabilidade celular da série **DLT** em 4 linhagens aderentes na concentração de 10 μ M

Composto	R	T47d (%)	MCF-7 (%)	SKMEL-28 (%)	DU145 (%)
					
DLT-01	4-MeO	94,0	100	71,6	84,8
DLT-02	4-Cl	89,0	86,9	81,5	41,5
DLT-03	3-Br	90,4	100	87,2	82,9
DLT-04	4-(PhO)Ph	78,9	100	92,1	98,9
DLT-05	4-Br	94,1	69,5	93,1	88,3
DLT-06	4-tBu	82,4	59,5	90,6	75,6
DLT-07	-	80,4	98,2	96,5	75,6
DLT-08	2-Ph	78,2	92,6	89,9	66,0
DLT-09	3-Cl	99,4	98,2	93,2	100
DLT-10	3-Ph	99,5	100	88,7	61,4
DLT-11	4-NO ₂	95,4	100	96,3	87,8
DLT-12	3-MeO	85,2	100	85,4	83,0
DLT-13	3,4-diCl	90,9	100	94,3	82,9
DLT-14	4-iPr	69,8	100	96,4	92,8
DLT-15	2-Cl	85,2	100	86,1	96,4
DLT-16	4-F	84,8	84,9	93,0	88,8
DLT-17	2,3-diCl	92,5	77,7	83,0	100
DLT-18	3-Cl, 4F	100	80,2	100	100
DLT-19	α -naftil	100	100	97,5	100
DLT-20	β -naftil	100	100	89,4	100
DLT-21	4-Et	88,1	82,2	99,0	61,8
DLT-22	4-I	90,3	100	80,6	100
Doxo	-	2,9	2,7	5,9	

Notas:

■ - Viabilidade celular inferior a 59%; Doxo – Doxorubicina. Fonte. Elaborado pela autora.

Tabela 7. Viabilidade celular da série **DLT** em 4 linhagens hematopoiéticas na concentração de 10 μ M

Composto	R	MOLT-4 (%)	HL-60 (%)	HL-60mx1 (%)	MM1S (%)
					
DLT-01	4-MeO	67,6	78,9	92,8	68,6
DLT-02	4-Cl	37,1	96,0	58,8	69,2
DLT-03	3-Br	81,6	100	88,6	85,0
DLT-04	4-(PhO)Ph	100	100	87,6	93,5
DLT-05	4-Br	95,6	100	88,6	92,3
DLT-06	4-tBu	91,6	100	84,5	94,9
DLT-07	-	89,7	79,9	92,8	85,9
DLT-08	2-Ph	90,9	93,9	91,6	88,6
DLT-09	3-Cl	99,6	98,2	90,9	99,5
DLT-10	3-Ph	95,4	97,5	84,0	ND
DLT-11	4-NO ₂	85,5	100	87,9	73,7
DLT-12	3-MeO	61,6	94,8	72,4	76,2
DLT-13	3,4-diCl	79,6	86,9	80,1	84,9
DLT-14	4-iPr	82,3	100	73,4	89,6
DLT-15	2-Cl	84,5	100	73,3	89,8
DLT-16	4-F	87,5	100	77,3	91,0
DLT-17	2,3-diCl	76,9	100	81,8	100
DLT-18	3-Cl, 4F	88,3	100	88,0	95,2
DLT-19	α -naftil	98,9	100	87,1	88,3
DLT-20	β -naftil	90,3	82,3	88,6	99,2
DLT-21	4-Et	100	98,2	89,0	87,9
DLT-22	4-I	100	100	89,0	91,0
Doxo	-	2,1	1,3	23,1	ND

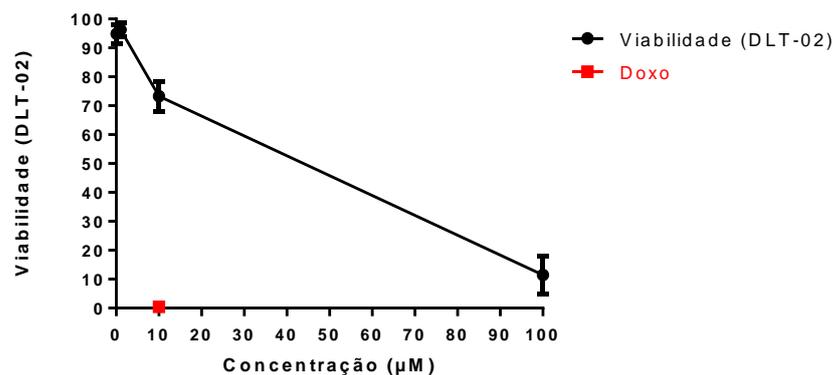
Notas:

 - Viabilidade celular inferior a 59%; Doxo – Doxorrubicina. Fonte. Elaborado pela autora.

Dentre os 22 compostos testados em células derivadas de tumores sólidos, o composto **DLT-02** apresentou resultado inferior a 59% em DU145, sendo o percentual de viabilidade celular no valor de 41,5%. Para a avaliação dos 22 compostos em células hematopoiéticas, o composto **DLT-02** também destacou-se, apresentando resultado inferior a 59% de viabilidade celular, para as linhagens MOLT-4 e HL-60mx1, cujos percentuais foram de 37,1% e 58,8%, respectivamente.

Após a triagem em células na concentração única de 10 μM , ensaios para determinação da CI_{50} do composto **DLT-02** foram realizados. Foi escolhida uma linhagem hematopoiética, MOLT-4, e uma derivada de tumor sólido, DU145. Os valores de viabilidade então obtidos para MOLT-4 foram utilizados na construção do gráfico de dose-resposta abaixo, na **Figura 35**.

Figura 35. Gráfico concentração-resposta do composto **DLT-02** em MOLT-4

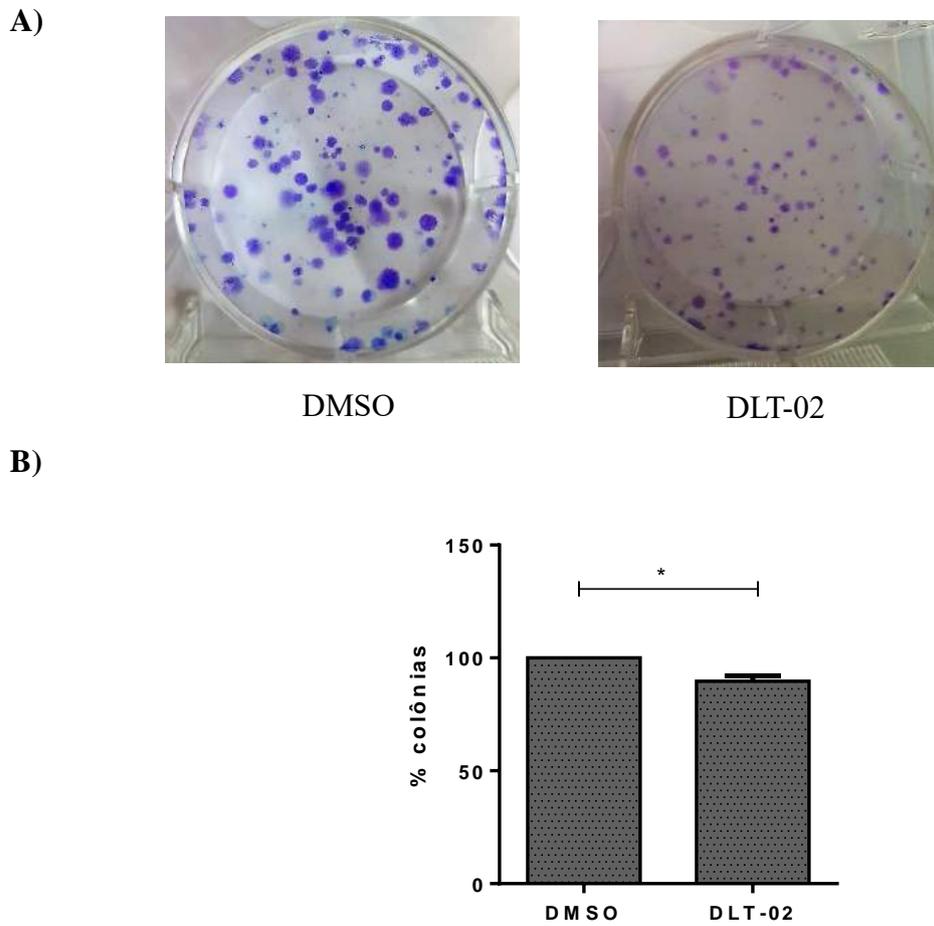


É possível verificar que a diminuição da viabilidade celular acontece de maneira dose dependente para o **DLT-02** na linhagem MOLT-4. Na concentração de 100 μM , a viabilidade celular se situa entre 1% e 20%. A doxorrubicina é o controle positivo. O valor encontrado foi de $\text{CI}_{50} = 8,03 \pm 3,49$ (μM). O valor da CI_{50} frente à células de câncer de próstata (DU145) também foi calculado e o seu valor foi de 6.04 ± 1.15 μM .

5.3.1 Ensaio Clonogênico em células de câncer de próstata DU145

Para avaliar a capacidade de uma única célula crescer em uma colônia e gerar clones, um ensaio clonogênico foi realizado com o composto **DLT-02** utilizando-se o valor de sua CI_{50} (6.04 μM) nas células DU145. O composto **DLT-02** induziu diminuição na formação de colônias com, aproximadamente em 10% de inibição de clonogenicidade e as colônias foram menos densas que as colônias controle ($P=0.0277$).

Figura 36. O composto **DLT-02** inibe a formação de colônias de células DU145



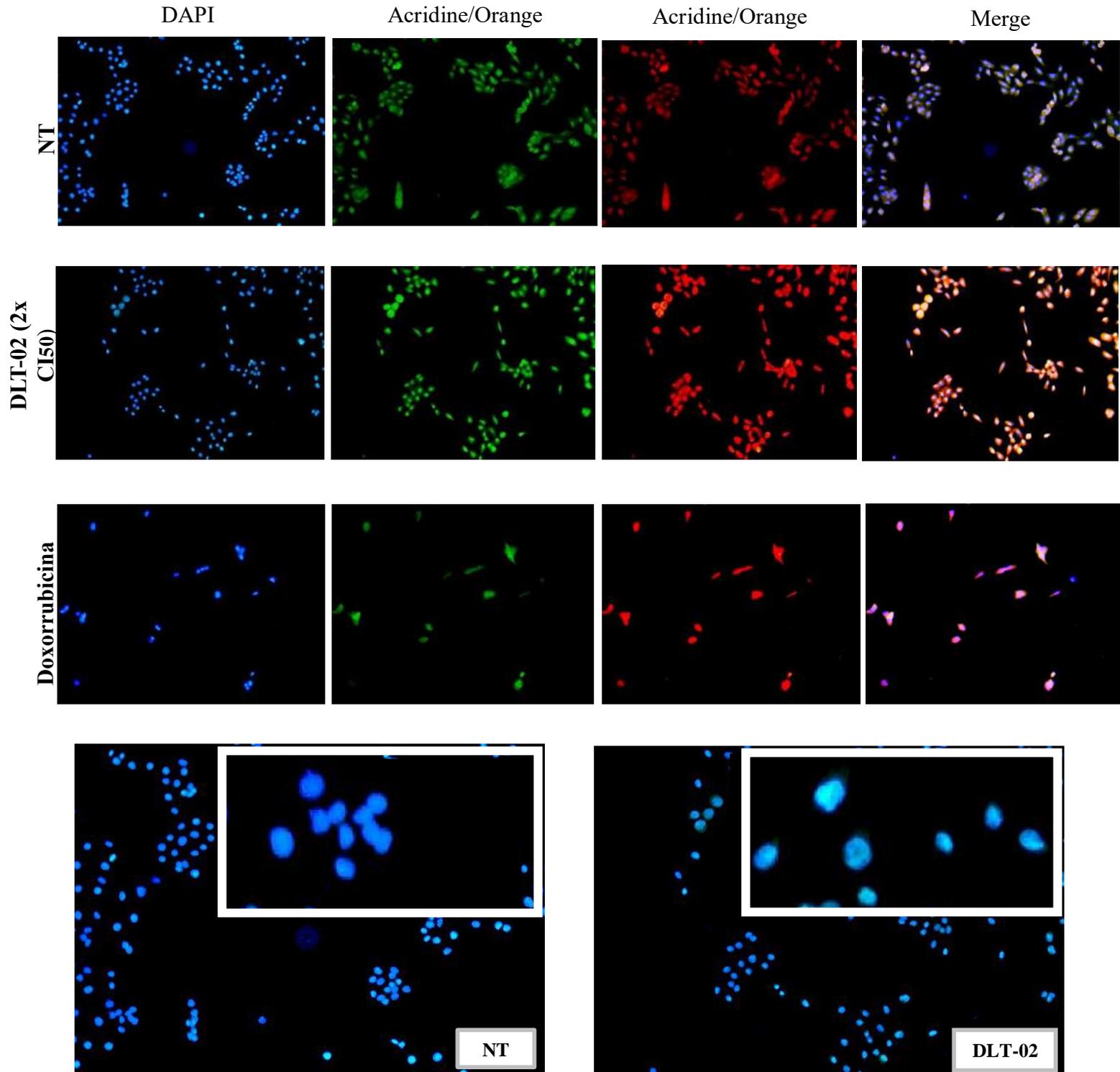
Notas:

(A) Fotografias da formação de colônias de células DU145 15 dias após o tratamento. (B) Quantificação da formação de colônias. Os resultados são expressos como porcentagens do controle. *, $P = 0,0277$.

5.3.2 Análise de morte celular por coloração de laranja de acridina/4', 6-diamidino-2-fenilindol

Evidenciando o processo de morte das células DU145 frente ao composto **DLT-02**, é possível visualizar o dano nuclear ou as alterações da cromatina e a presença de núcleos picnóticos. Percebe-se, ainda que, as células aparecem coradas de maneira mais intensa com acridina/orange comparada à condição de células não tratadas.

Figura 37. Efeitos do composto DLT-02 na indução da morte analisada por DAPI e Acridina/Laranja no dobro de CI_{50} após 72h de tratamento



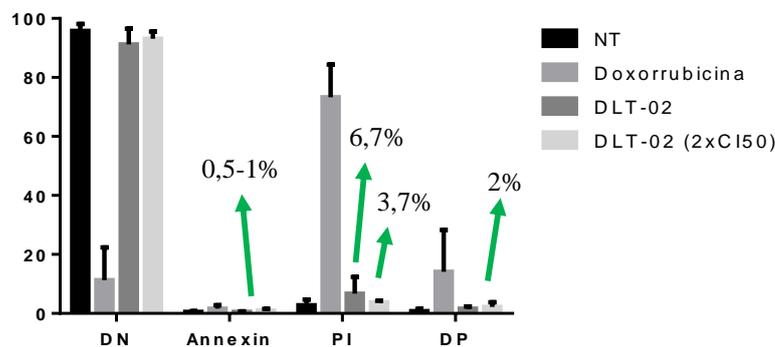
Notas:

NT – Não tratado.

5.3.3 Avaliação de indução de morte em células de câncer de próstata

Para investigar o mecanismo de efeitos inibidores do crescimento (apoptose ou necrose) do composto **DLT-02**, realizou-se a análise de citometria de fluxo com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) em células DU145. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. O ensaio realizado com o tratamento do composto em 48 h, exibiu o percentual de células mortas em torno de 10%, sendo cerca de 2% por necrose e/ou apoptose tardia para ambas as concentrações do composto utilizadas. O percentual de indução de necrose pelo composto, em sua CI_{50} , foi de aproximadamente 6.70%, enquanto que o dobro da CI_{50} exibiu percentual de 3.76%. Já para o percentual de morte por apoptose, os valores obtidos variaram de 0.50% a 1% para a CI_{50} e o dobro dessa concentração, respectivamente ($P>0.05$).

Figura 38. Efeitos do composto **DLT-02** e doxorubicina no ensaio de indução potencial de morte por citometria de fluxo em células DU145 após 48 h de tratamento



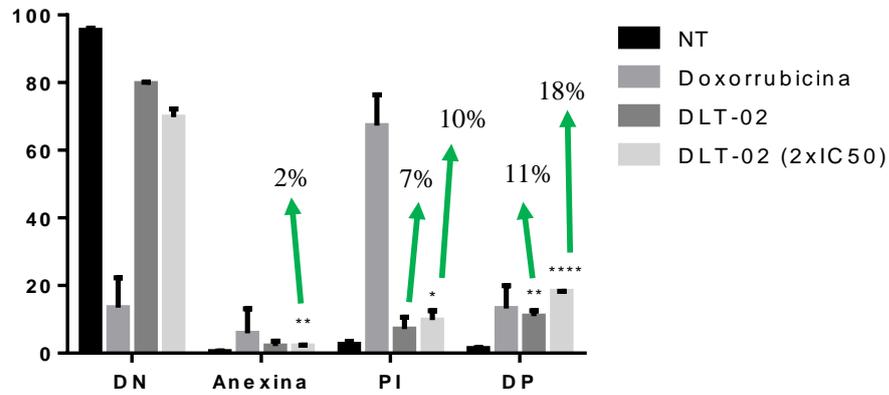
Notas:

DN – duplamente negativo; DP- duplamente positivo; PI – Iodeto de propídeo; NT – Não tratado;. ($P>0.05$). Fonte. Elaborado pela autora.

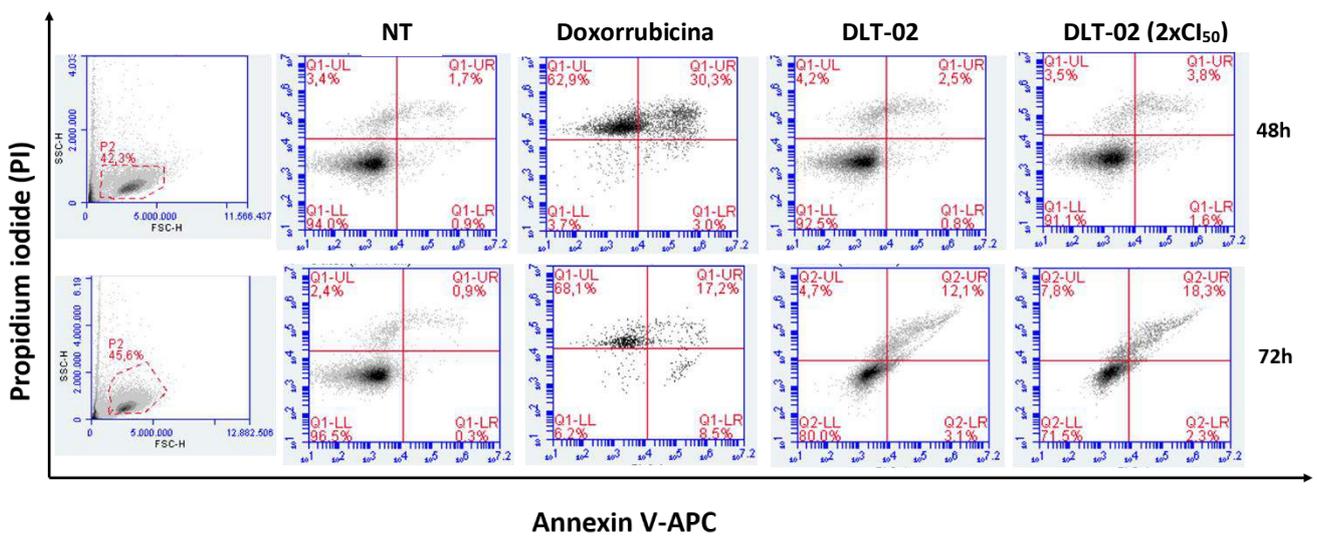
Os resultados da avaliação do potencial em 72 h mostraram que na concentração da CI_{50} , cerca de 20% das células entraram em morte, sendo aproximadamente 11% atribuído à necrose e apoptose tardia, seguido de 7% por necrose e aproximadamente 2% para morte por apoptose. Utilizando-se a concentração do dobro da CI_{50} , cerca de 30% das células morreram, sendo em torno de 18% através de necrose e apoptose tardia e quase 10% por necrose. O percentual de morte para a anexina permaneceu em torno de 2%.

Figura 39. A) Efeitos do composto **DLT-02** e doxorrubicina no ensaio de indução potencial de morte por citometria de fluxo em células DU145 após 72 h de tratamento; B) Gráficos (plots) representativos da citometria

A)



B)



Notas:

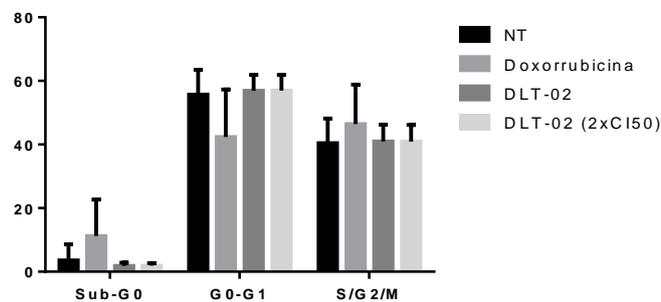
DN – duplamente negativo; DP- duplamente positivo; PI – Iodeto de propídeo; NT – Não tratado; (Anexina **, P = 0,0031; PI *, P = 0,0200; DP **, P = 0,0016; DP ****, P < 0,0001). Fonte. A) Elaborado pela autora B) Software Accuri C6.

5.3.4 Avaliação da inibição do ciclo celular em células de câncer de próstata

A distribuição do ciclo celular em células DU145 coradas com PI foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se a CI₅₀ e dobro dessa concentração. O controle positivo induziu parada na fase S/G2/M. Percebeu-se que não houve diferenças significativas entre os

resultados apresentados com o valor de CI_{50} e o dobro de sua concentração, em todas as fases do ciclo celular. Na fase G0-G1, o composto **DLT-02** induziu parada em cerca de 56.92% de células, semelhantemente ao dobro da CI_{50} com 56.94% de células. O composto **DLT-02** parece não atuar sobre o ciclo celular frente a células DU145 e o uso das concentrações do seu CI_{50} , bem como o dobro do CI_{50} , não apresentou diferenças significativas entre si ($P>0.05$).

Figura 40. Efeitos do composto **DLT-02** e doxorrubicina na progressão do ciclo celular de células DU145 após 48 h de tratamento



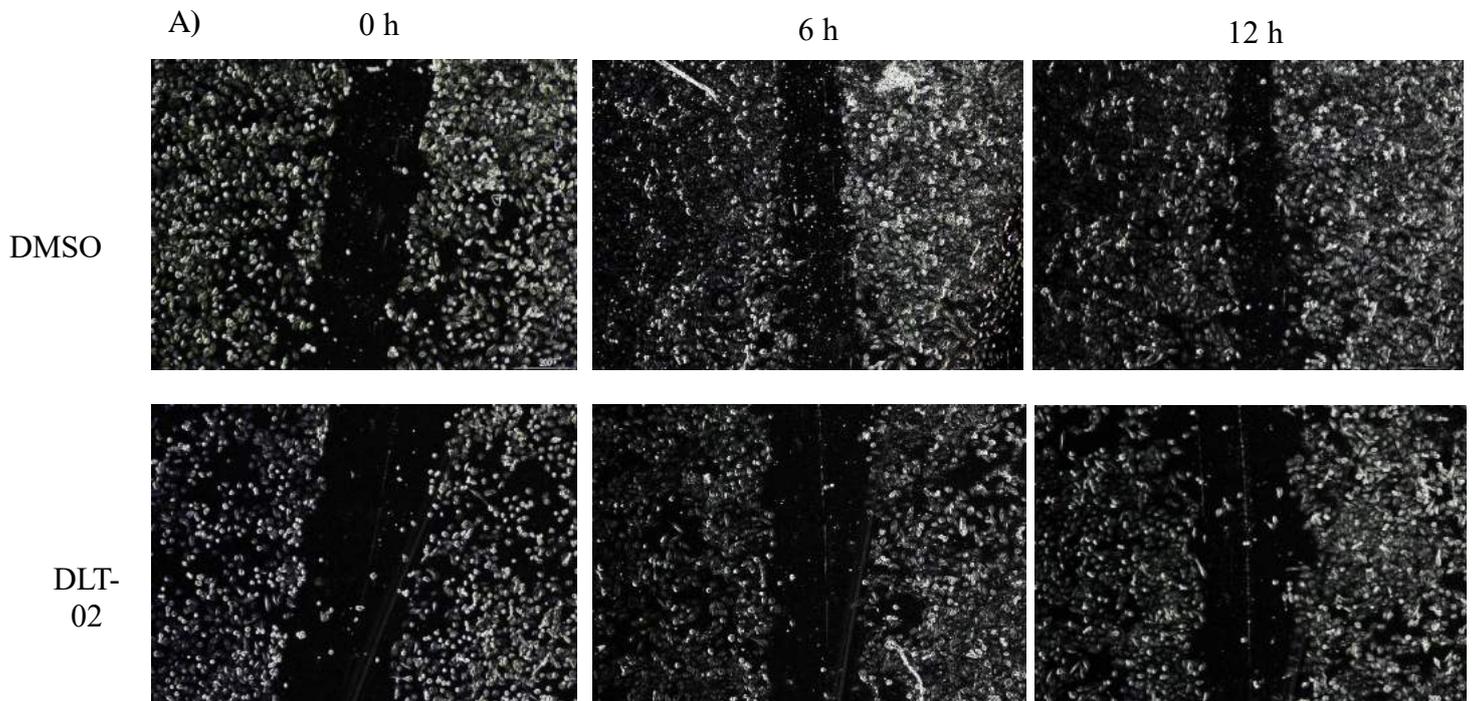
Notas:

NT – Não tratado. Fonte. Elaborado pela autora.

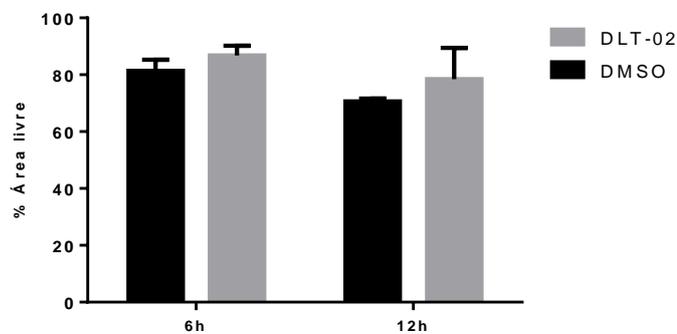
5.3.5 Avaliação da inibição da migração celular

O composto **DLT-02** foi avaliado frente a células DU145 e o seu possível efeito antimigratório através do método *Wound Healing*. A concentração utilizada no ensaio foi o dobro da sua CI_{50} . Observou-se a inibição da migração celular, porém não significativamente, em comparação com a condição com o DMSO nos tempos 6h e 12h ($P>0.05$). Os valores encontrados foram de 5% de inibição de migração para 6h e cerca de 9% de inibição no tempo de 12h.

Figura 41. Efeitos do composto **DLT-02** na migração celular em 0 h, 6 h e 12 h após o tratamento em células DU145.



B)



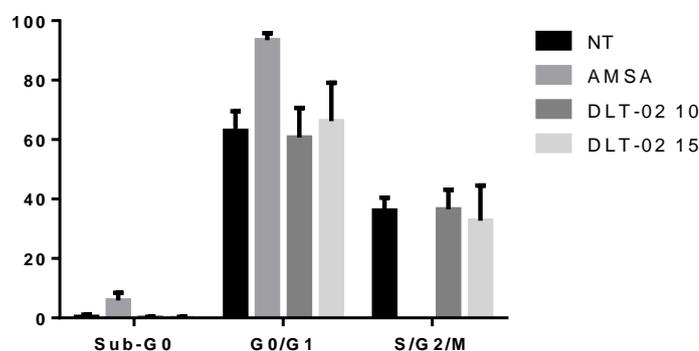
Fontes: A) programa ImageJ; B) elaborada pela autora.

5.3.6 Avaliação da inibição do ciclo celular em leucemia mielóide aguda

Os resultados citotóxicos revelaram que o composto **DLT-02** exibiu atividade significativa contra as células MOLT-4. Assim, realizamos o ensaio de ciclo celular para verificar se esta inibição do crescimento celular foi devida à parada do ciclo celular. Avaliou-se o composto **DLT-02** e o seu possível efeito 48 h após o tratamento. O composto foi utilizado nas concentrações de 10 μ M e 15 μ M. O controle positivo utilizado foi a Amsacrina na

concentração de 2.5 μM , a qual induziu parada na fase celular G0-G1 do ciclo celular em cerca de 90% de células. O composto **DLT-02** em 15 μM exibiu percentual de 66.20% de células na fase G0-G1 e 60.66% na concentração de 10 μM . Assim, o composto **DLT-02** na concentração de 15 μM induziu arrasto no ciclo celular ,com pouca diferença percentual em comparação à condição que não recebeu tratamento ($P>0.05$).

Figura 42. Efeitos do composto **DLT-02** e amsacrina na progressão do ciclo celular de células MOLT-4 após 48 h de tratamento



Notas:

NT – Não tratado; AMSA – Amsacrina. Fonte. Elaborado pela autora.

5.4 DISCUSSÃO

A triagem racional dos compostos utilizando-se uma dose única na concentração de 10 μM frente à linhagens, baseada nas diretrizes propostas pelo NCI-60, também foi realizada para a série **DLT**, assim como foi realizado para a série **LR**. Essa triagem compreendeu a utilização de oito linhagens, sendo quatro hematopoiéticas (MOLT-4, HL-60, HL-60mx1 e MM1S) e quatro linhagens derivadas de tumores sólidos (T47d, MCF-7, DU145 e SKMEL-28). O composto **DLT-02** exibiu valores de viabilidade celular inferiores a 59% para três linhagens (MOLT-4, DU145 e HL-60mx1). Como característica estrutural, esse composto apresenta na posição 4 do anel aril, um cloro. Segundo Hernandez *et al.*, a presença de halogênios em novas entidades químicas são prevalentes. A cloração dos compostos pode eventualmente resultar em compostos bioativos que são melhor acomodados no local ativo dos alvos em comparação com os não clorados. Foi descrito ainda que as subunidades portadoras de cloro podem ser acomodadas em cavidades estreitas e profundas, bem como em bolsas hidrofóbicas dos alvos

biológicos (HERNANDES et al., 2010). Além disso, provavelmente, a posição de substituição do cloro em *para*, nesse caso, foi crucial para esse valor de viabilidade, uma vez que o cloro em outras posições no anel aril não exibiu resultados inferiores a 59%.

Com o intuito de avaliar a capacidade do composto em inibir a formação de colônias, fez-se o ensaio clonogênico. O ensaio de sobrevivência de células clonogênicas determina a capacidade de uma célula proliferar indefinidamente, mantendo assim a sua capacidade reprodutiva para formar uma grande colônia ou um clone (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005). Os resultados obtidos mostram que o composto **DLT-02** reduziu, em cerca de 10%, a formação de novos clones, assim como alterou o tamanho das colônias, reduzindo-as quando comparada à condição com o controle DMSO.

Seguindo-se a investigação do composto frente à células DU145, buscou-se evidenciar o processo de morte de células induzido pelo **DLT-02**. O ensaio de coloração fluorescente com laranja de acridina/DAPI foi realizado para distinguir as células vivas e as células que estão em processo de morte. A laranja de acridina permeia células e as coram na coloração verde e vermelha, já o DAPI em cor azul. As células DU145 tratadas com o composto **DLT-02** exibiram núcleos picnóticos com um aumento da fluorescência nuclear, quando comparadas com as células não tratadas (NTC). Além disso, a coloração induzida por laranja de acridina foi mais intensa nas células tratadas com o composto em questão, quando comparadas àquelas que não receberam tratamento. Os resultados exibidos estão em concordância com parte dos resultados relatados por Guggilapu et al. em seu trabalho. Eles evidenciaram que os tiazóis são capazes de induzir morte em células DU145, confirmando tal resultado pelo ensaio de laranja de acridina (GUGGILAPU, et. al., 2017).

Com relação ao ciclo celular, o composto não influencia significativamente tanto na concentração CI_{50} , bem como no dobro desta em células de câncer de próstata DU145. Em BARBOSA et al. 2016, verificou-se que, também na concentração de aproximadamente 6 μ M, uma de suas tiazolidinonas, sendo, portanto, bioisótero do composto **DLT-02**, não interferiu no ciclo celular de células de adenocarcinoma renal humano (BARBOSA et al., 2016). Entretanto, ao utilizar o dobro dessa concentração, eles perceberam alterações no ciclo celular, o que no presente trabalho não foi constatado. Já para a avaliação da influência do composto na progressão do ciclo celular de MOLT-4. O composto na concentração de 15 μ M induziu arrasto celular na fase G0/G1, porém com pouca diferença percentual em comparação à condição que não recebeu tratamento ($P > 0.05$).

Por fim, verificou-se o tipo de morte induzido pelo composto **DLT-02** em células DU145. O ensaio foi realizado após 48h e 72h de tratamento. Os dados da análise da indução

de morte sugerem que, pelo menos em maior parte, esta aconteceu por necrose ou apoptose tardia. Por se tratar de um processo de morte mais tardio, há corpos apoptóticos e o aumento da permeabilidade da membrana, permitindo a entrada e marcação pelo iodeto de propídio na célula (SOUZA, 2013). Outra constatação é que esse processo de morte acontece de maneira tempo e dose dependentes.

Outra avaliação realizada com composto **DLT-02** em células DU145 foi o ensaio de migração. O ensaio visa mimetizar, de modo primário, a possível capacidade antimigratória do composto, sabendo-se que a metástase é um processo de múltiplas etapas que envolve motilidade e invasão de células cancerígenas. As fotos das células, após a realização do risco ou “scratches (wounds)”, foram capturados usando microscópio após 0, 6 e 12h de incubação. Como mostrado na **Figura 38**, o tratamento com composto **DLT-02** resultou em inibição da capacidade de migração de células DU145 e o efeito foi mais proeminente em torno de 12 h, contudo não teve significância estatística ($P > 0.05$).

Sabe-se que há outros processos nos quais as células podem seguir para tornarem-se inviáveis ou entrar em processo de morte, como por exemplo, a senescência ou diferenciação celular. Desse modo, estudos de investigação devem ser realizados para melhor elucidção do mecanismo de morte produzido pelo composto **DLT-02**.

5.5 CONCLUSÃO

Foram avaliados quarenta e três compostos, sendo dezoito do tipo 4-tiazolidinonas (**LR-01** a **LR-18**) e três intermediários desta mesma série (**INT-1** a **INT-3**) e vinte e dois compostos do tipo 1,3-tiazóis.

A série **LR** e seus intermediários não se mostraram tóxicas frente a células humanas sadias (PBMC) na dose máxima testada (100 μM). As linhagens de células em suspensão apresentaram melhores resultados quando compara-se às linhagens de células oriundas de tumores sólidos, e, o destaque vai para o composto **LR-14** que possui como característica estrutural uma fenila em N3 e uma metila em C5. Frente à células de leucemia mielóide crônica (K562), o composto **LR-14** apresentou o valor de CI_{50} 20,96 $\mu\text{M} \pm 5,84$. Quanto ao ensaio de indução de morte após 24h de tratamento, o maior percentual de células mortas foi por apoptose em ambas as concentrações (20 μM e 30 μM). Enquanto que no ensaio após 48h de tratamento, o maior percentual de morte foi através do processo de apoptose tardia/necrose.

Para a série **DLT**, o composto **DLT-02** destacou-se frente a 3 linhagens: DU145, MOLT-4 e HL-60mx1. A CI_{50} foi determinada para uma linhagem hematopoiética (MOLT-4) e para uma linhagem oriunda de tumor sólido (DU145). Quanto à investigação do composto **DLT-02** frente a DU145, percebeu-se a sua capacidade em diminuir a formação de novas colônias, bem como a indução de morte de células, uma vez percebida a presença de núcleos picnóticos. Constatou-se também a influência antimigratória do composto em até 12h, contudo não houve significância estatística. Com relação ao ciclo celular, o composto parece não influenciar significativamente tanto na concentração do CI_{50} , bem como no dobro desta. Os dados da análise da indução de morte sugerem que esta aconteceu por necrose ou apoptose tardia em tempo e dose dependentes. Para o ensaio de ciclo celular em células de leucemia (MOLT-4), o composto induziu arrasto celular na fase G0/G1, porém não foi possível verificar significância estatística. Ensaio de investigação de morte devem ser realizados para melhor elucidação do mecanismo de morte induzido pelo composto **DLT-02**.

5.6 PERSPECTIVAS

Quanto a série dos compostos **DLT**, estudos de investigação de morte do composto **DLT-02** frente à linhagens DU145 e MOLT-4 serão realizados para melhor descrição de sua atuação, assim como o composto **LR-14**.

5.7 PARTE EXPERIMENTAL

5.7.1 Cultura e manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas de cultura celular de poliestireno (TPP®) em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ e acompanhadas diariamente com o auxílio de um microscópio invertido. A troca do meio foi realizada sempre que havia necessidade de renovação de nutrientes ou como recomenda o *Data sheet* de cada linhagem.

5.7.2 Células oriundas de tumores sólidos

As linhagens aderentes foram obtidas pelo banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Tais células foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen®) contendo 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco®) inativado a 56°C por 1h; adicionou-se também 3g/litro de Bicarbonato do Sódio (Sigma Aldrich®) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®). Os repiques foram realizados em fluxo laminar quando as células atingiam a confluência de 80-85%. Para tal o meio foi desprezado e as células foram lavadas com PBS/EDTA (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,03 mM EDTA, pH 7,4 ajustado com HCl). As células foram deaderidas pela adição de tripsina 0,25% (Invitrogen®) por 5-10 minutos, centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos e distribuídas nas garrafas em uma concentração média de 1.10⁴ células/mL.

5.7.3 Células hematopoiéticas

As linhagens hematopoiéticas foram obtidas pelo banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Tais células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) contendo 10% Soro Fetal Bovino (Gibco®) inativado a 56°C por 1h, adicionou-se também 3g/litro de Bicarbonato de Sódio (Sigma-Aldrich®) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®). Para manutenção do meio as células foram centrifugadas por 7 minutos a 1500 rpm e distribuídas em concentração média de 1.10⁴ células/ml em garrafas contendo meio novo.

5.7.4 Ensaios de toxicidade

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços onde cada poço recebeu a quantidade de 1.10⁴ de células. Após 24h diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) e as placas incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 72h. Passado o período de incubação foi adicionado 20 µL da solução de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5- difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL diluída em PBS, as placas foram então protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 3h. A reação foi então interrompida pela adição de 130 µL de SDS 20% e a densidade óptica medida após 24 horas no comprimento de onda de

560 nm. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (EL808 - Biotek®). A média da densidade óptica dos poços teste foi comparada com a média do grupo controle para a determinação da viabilidade celular. Com base nos resultados dos ensaios de redução do MTT, foi determinada a viabilidade celular segundo a fórmula:

$$\%Viabilidade\ celular = 100 - \left[\left(\frac{(MDoCT - MDoBr)}{(MDoDMSO - MDoBrDMSO)} \right) \times 100 \right]$$

Onde:

- MDoCT equivale à média da densidade óptica da célula trada;
- MDoBr equivale à média da densidade óptica do branco;
- MDoDMSO equivale à média da densidade óptica do controle tratado com o veículo DMSO;
- MDoBrDMSO equivale à média da densidade óptica do branco tratado com o veículo DMSO.

Uma vez determinada a viabilidade celular, foram construídos gráficos de dose resposta com auxílio do software GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows (GraphPad Software®, San Diego, CA, EUA).

5.7.5 Ensaio de toxicidade em células saudáveis não transformadas

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de voluntários sadios, por centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). Para avaliar a seletividade dos compostos, foram realizados ensaios de redução do MTT com células humanas mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de sete indivíduos sadios. As PBMCs foram expostas à concentração de 100 µM de cada composto. O IS foi calculado conforme a seguinte razão: CI₅₀PBMC/CI₅₀ linhagem tumoral.

5.7.6 Avaliação do potencial citotóxico/Triagem

Com a finalidade de pré-selecionar os compostos com atividade anti-proliferativa significativa, as células foram tratadas em uma concentração única de 10 µM de cada composto.

Os compostos que apresentaram viabilidade celular inferior a 59% foram considerados ativos, segundo o NCI60.

5.7.7 Ensaio clonogênico

Colocou-se por poço 3×10^4 células de DU-145 em placas de 24 poços. Incubou-se em estufa úmida de CO₂ *overnight*. Os tratamentos foram realizados com o valor da CI₅₀ em 48 horas. Posteriormente, as células foram soltas, contadas e aproximadamente 300 células foram colocadas em placas de 6 poços e mantidas em estufa até o aparecimento de clones. Após 15 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído 7% durante 15 minutos, lavadas com PBS 1X e em seguida, coradas com cristal violeta 0,1% por 15 minutos. Os poços foram lavados com PBS 1X e mantidos a temperatura ambiente por 24 horas. Por fim, foi realizada a contagem dos clones e posterior realização das análises estatísticas.

5.7.8 Ensaio de migração celular (*Wound-Healing*)

Células DU145 foram plaqueadas utilizando-se de 3×10^4 por poço. Foram utilizadas placas de 24 poços, as quais foram posteriormente incubadas em CO₂ *overnight*. Após atingir a confluência de 90%, o meio foi aspirado e duas lavagens com PBS 1X foram realizadas. Na sequência, foram feitas duas linhas de marcação (estrias) perpendiculares utilizando uma pipeta P200. Após o procedimento de marcação das estrias, as células foram tratadas com meio completo. DMSO 0,1% (controle negativo), e o composto em sua CI₅₀. Os poços foram fotografados no microscópio invertido (Eclipse Ts2 da Nikon) nos tempos 0h, 6h e 12h. Após obtenção das fotos, a área livre final e inicial foi calculada com o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

5.7.9 Ensaio de indução de morte por laranja de acridina/DAPI

A indução de morte após o tratamento foi avaliada por dupla coloração de fluorescência com DAPI (Sigma) e laranja de acridina. As células DU145 foram tratadas com o composto

DLT-02 utilizando o dobro da sua CI_{50} e após 72h horas de tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos. Em seguida, as células foram coradas com laranja de acridina (8,5 ug /mL) e o corante nuclear DAPI (5 ug /mL) durante 15 min, com ausência de luz. Depois, lavadas novamente por 2 vezes com PBS 1x. As lâminas foram fotografadas com a objetiva na ampliação de 10x do microscópio de fluorescência Eclipse Ts2, Nikon. As células que entraram em processos de morte celular foram caracterizadas pela condensação da cromatina (núcleo picnótico).

5.7.10 Avaliação da inibição do ciclo celular

As células DU-145 e MOLT-4 foram distribuídas em placas de 6 poços numa concentração de 5×10^5 células por poço e incubadas por 24 horas. Após esse período, foram tratadas na concentração do CI_{50} dos compostos. O controle positivo utilizado foi a Doxorubicina. Após 48 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas (DU-145) e lavadas 2 vezes com PBS 1x e fixadas em álcool 70% e armazenadas a $-20^{\circ}C$. Após cerca de dez dias, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e marcadas com iodeto de propídeo (5 mg/mL)/ RNase A (0,25 mg/mL) em PBS 1x por 20 minutos no gelo e protegido da luz. O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi calculada utilizando o programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

5.7.11 Avaliação da indução de morte por citometria de fluxo

As células foram tratadas com Amsacrina ou Doxorubicina, bem como pelo composto DLT-02. Após 48h e 72 horas de tratamento, as células foram centrifugadas, lavadas 2 vezes com PBS 1x e marcadas com $100\mu M$ iodeto de propídeo (5mg/mL)/RNase A (0,25mg/mL) e $5\mu M$ de Anexina V-FITC por 20 minutos com ausência de luz, seguida pela leitura no Citômetro de Fluxo Accuri C6.

5.7.12 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados por teste t (Student), utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os valores de CI_{50} foram obtidos por regressão não linear com o programa OriginPro (8.0; OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

6 CONCLUSÃO

Vinte e dois compostos do tipo 1,3-tiazóis foram devidamente sintetizados e caracterizados. A série de tiazolidinonas tiveram suas estruturas expostas também no capítulo 2.

Realizou-se a investigação dos tiazóis frente à atividade anti-*T. cruzi* em alguns ensaios *in vitro* com as formas amastigotas e tripomastigotas. Os destaques vão para os compostos **DLT-02**, **DLT-03**, **DLT-04**, **DLT-11** e **DLT-13**, além do composto **DLT-10**.

A investigação das duas classes de moléculas (tiazolidinonas e tiazóis) para a atividade antineoplásica também foi realizada. As tiazolidinonas testadas não foram tóxicas em células não transformadas (PBMCs). Os compostos mostraram melhor perfil frente à linhagens hematológicas, com destaque para o composto **LR-14**. Em leucemia mielóide crônica (K562), o composto induziu parada na fase S/G2/M do ciclo celular. Percebeu-se maior indução de morte por apoptose em 24h, e, para 48h após o tratamento, houve maior indução de morte por apoptose tardia/necrose, entretanto, não verificou-se significância estatística.

Após triagem realizada com a série **DLT**, identificou-se o composto **DLT-02** com menor valor de viabilidade celular em três linhagens. Quanto à investigação do composto **DLT-02** frente a DU145, percebeu-se a sua capacidade em diminuir a formação de novas colônias, bem como a indução de morte de células, uma vez percebida a presença de núcleos picnóticos. Com relação ao ciclo celular, o composto parece não influenciar significativamente tanto na concentração do CI_{50} , bem como no dobro desta. Os dados da análise da indução de morte sugerem, que parte desta, aconteceu por necrose ou apoptose tardia em tempo e dose dependentes.

REFERÊNCIAS

- AL-OMARY, F. A. M. et al. Substituted thiazoles V. Synthesis and antitumor activity of novel thiazolo[2,3-b]quinazoline and pyrido[4,3-d]thiazolo[3,2-a]pyrimidine analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 65–72, 2012.
- AYATI, A. et al. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 699–718, 2015.
- BARBOSA, V. A. et al. Synthesis and evaluation of novel hybrids β -carboline-4-thiazolidinones as potential antitumor and antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 1093–1104, 2016.
- BHARTI, N. et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3475–3478, 2002.
- BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 337, n. SUPPL., p. 1–13, 2004.
- BROWN, F. C. 4-THIAZOLIDINONES review. **Chemical Reviews**, v. 61, p. 463–521, 1961.
- BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–7, Nov. 1996.
- CANCER, A.; KINASE, T.; KINASES, C. D. THIAZOLES AS AN ANTICANCER AGENT: AN OVERVIEW Prabodh V. Sapkale 1 , Avinash V. Patil 2 1 2. v. 6, n. 10, 2016.
- CAPUTTO, M. E. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylylhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 155–163, 2012.
- CARDOSO, M. V. D. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48–59, 2014.
- CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015 Antônio Carlos Silveira (in memoriam) Joffre Marcondes de Rezende (in memoriam). **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 25, p. 7–86, 2016.
- CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & experimental toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–9, Aug. 2006.
- CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment.

Revista Médica, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006.

CORREA, M. et al. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 3, p. 356–363, 2005.

DAS, J. et al. 2-Aminothiazole as a Novel Kinase Inhibitor Template. Structure–Activity Relationship Studies toward the Discovery of N -(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (Dasati). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 23, p. 6819–6832, 2006.

DAVID, T. et al. Anti-liver cancer activity in vitro and in vivo induced by 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2017.

DE MORAES GOMES, P. A. T. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46–57, 2016a.

DE MORAES GOMES, P. A. T. et al. New 1,3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 387–398, 2016b.

DE OLIVEIRA FILHO, G. B. et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 346–361, Dec. 2017.

DE SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, Jan. 2018.

DE SIQUEIRA, L. ET AL. Synthesis and anti- *Trypanosoma cruzi* profile of the novel 4-thiazolidinone and 1,3-thiazole derivatives. **Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research**, v. 2, p. 1–12, 2019.

DOS SANTOS, T. A. R. et al. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555–560, 2016.

EL-MESSERY, S. M. et al. Substituted thiazoles VI. Synthesis and antitumor activity of new 2-acetamido- and 2 or 3-propanamido-thiazole analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 615–625, 2012.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409–15, Jul. 2005.

FEUN, L. et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemotherapy**

and **Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 223–229, 2002.

FONSECA-BERZAL, C. et al. Novel solid dispersions of benznidazole: preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Experimental parasitology**, v. 149, p. 84–91, Feb. 2015.

GAWANDE, S. S. et al. Synthesis of new heterocyclic hybrids based on pyrazole and thiazolidinone scaffolds as potent inhibitors of tyrosinase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 2772–2777, 2013.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GUEDES, P. M. M. et al. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 9, n. 5, p. 609–20, May 2011.

HERAVI, M. M.; TALAEI, B. **Ketenes as privileged synthons in the syntheses of heterocyclic compounds part 2: Five-membered heterocycles**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. v. 114

HERNANDES, M. Z. et al. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. **Current drug targets**, v. 11, n. 3, p. 303–314, 2010.

HOLLA, B. S. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 313–318, 2003.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101 – acessado em 17/02/17).

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 295–312, 1999.

JONES, A. M. **Privileged Structures and Motifs (Synthetic and Natural Scaffolds)**. Third Edition ed. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 2

KAMEL, M. M. et al. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 572–580, 2010.

KASUGA, N. C. et al. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc (II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. v. 96, p. 298–310, 2003.

KATO, T. et al. Novel calcium antagonists with both calcium overload inhibition and antioxidant activity. 2. Structure-activity relationships of thiazolidinone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 16, p. 3134–3146, 1999.

KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. et al. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 197–206, 2002.

KUMBHARE, R. M. et al. Synthesis and anticancer evaluation of novel triazole linked N-(pyrimidin-2-yl)benzo[d]thiazol-2-amine derivatives as inhibitors of cell survival proteins and inducers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 3, p. 654–658, 2015.

L. H. SILVA; NUSSENZWEIG, V. 'Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco.' **Folha Clinica e Biologica**, v. 20, p. 191–207, 1957.

LAVRADO, J. et al. Antitrypanosomal and cysteine protease inhibitory activities of alkyl diamine cryptolepine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6256–6260, 2012.

LESYK, R. B.; ZIMENKOVSKY, B. S. 4-Thiazolidones: Centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, n. 16, p. 1547–1577, 2004.

LIMA, P. C.; AVERY, M. A.; TEKWANI, B. L.; ALVES, H.; BARREIRO, J.; FRAGA, C. A. M. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. **Il Farmaco**, v. 57, p. 825–832, 2002.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, Jan. 1997.

MAGALHAES MOREIRA, D. R. et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467–478, 2014.

MASOUD, G. N. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new 4-thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 2, p. 707–725, 2013.

MOREIRA, D. et al. Structural investigation of Anti-Trypanosoma cruzi 2- Iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice. **J Med Chem**, v. 55, n. 24, p. 10918–36, 2012.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. In Vitro Measures of Chemosensitivity. **Methods in molecular medicine**, v. 110, p. 21–28, 2005.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, 2011.

PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde.

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812 – acessado em 12/12/2018.

PIZZO, C. et al. Synthesis of 2-Hydrazolyl-4-Thiazolidinones Based on Multicomponent Reactions and Biological Evaluation Against Trypanosoma Cruzi. **Chemical Biology and**

Drug Design, v. 77, n. 3, p. 166–172, 2011.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–8, Mar. 2010.

SENKIV, J. et al. **5-Ene-4-thiazolidinones induce apoptosis in mammalian leukemia cells**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 117

SHARATH KUMAR, K. S. et al. Synthesis and antiproliferative effect of novel 4-thiazolidinone-, pyridine- and piperazine-based conjugates on human leukemic cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 341–349, 2014.

SHARATH KUMAR, K. S. et al. Antiproliferative and tumor inhibitory studies of 2,3-disubstituted 4-thiazolidinone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 17, p. 3616–3620, 2015.

SIDDIQUI, N. et al. Thiazoles: A Valuable Insight into the Recent Advances and Biological Activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 1, n. 3, p. 136–143, 2009.

SIEBERT, R.; WILLERS, C. P.; OPALKA, B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, v. 23, n. 5–6, p. 505–520, 1996.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.

SRAVANTHI DEVI GUGGILAPU, LALITA GUNTUKU, T. SRINIVASA REDDY, A. N.; DILEP KUMAR SIGALAPALLI, V.G.M. NAIDU, SURESH K. BHARGAVA, B. N. B. Synthesis of thiazole linked indolyl-3-glyoxylamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

TEITZ, Y. A., RONEN, D., VANSOVER, A., STEMATSKY, T., & RIGGS, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- β 4': 4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- β -4': 4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Research**, v. 35, p. 305–314, 1994.

TEN??RIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: M??todos de obten??o, aplica??es sint??icas e import??ncia biol??gica. **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

TIMM, B. L. et al. In vitro and in vivo biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3720–6, Jul. 2014.

TRIPATHI, A. C. et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52–77, 2014.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–23, Jun. 2002.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. VAN; BERNEMAN, Z. N. <REV_1997The cell cycle_a review of regulation, deregulation and .pdf>. p. 131–149, 2003.

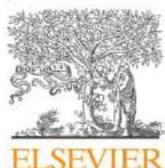
VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 2, p. 157–163, Mar. 2009.

WELSCH, M. E.; SNYDER, S. A.; STOCKWELL, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 347–361, 2010.

YANG, F. et al. A hybrid of thiazolidinone with the hydroxamate scaffold for developing novel histone deacetylase inhibitors with antitumor activities. **Org. Biomol. Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1727–1735, 2016.

APÊNDICE A

“Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues”



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Review article

Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues



Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira^{a,b}, Paulo André Teixeira de Moraes Gomes^a,
 Larissa Pelágia de Lima Ferreira^{a,b}, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^b,
 Ana Cristina Lima Leite^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisas Em Inovação Terapêutica Suelly Galdino, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2018

Received in revised form

11 February 2019

Accepted 10 March 2019

Available online 14 March 2019

Keywords:

Thiosemicarbazone

Thiazolidinone

Thiazole

Heterocyclic

Anticancer

Metastasis

ABSTRACT

Currently, cancer and its progression to metastasis result in a large number of deaths. The lack of new drugs, appropriate clinical trials for metastasis preventive drugs and incomplete understanding of the molecular machinery are the major obstacles in metastasis prevention and treatment. On the other hand, thiosemicarbazones and their bioisosteres, thiazole and thiazolidinone are recurring in a wide range of biologically active compounds that reach different targets within tumor context and represent a promising start point to access potential candidates in metastatic cancer. Therefore, the search for new lead compounds showing highest anticancer potency and less adverse effects is the major challenge in drug discovery. The search was based from 1994 to 2018, focusing on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone cores that allowed us to discuss how the three multi-target motifs have been used for the target-based design and development of anticancer agents. In the last years, thiosemicarbazone, thiazole, and thiazolidinone cores are recurrent in many approaches for cancer therapy. In our search, it was verified that due to its biodiversity and versatility the anticancer potential of such structures has been assigned to distinct mechanisms reinforcing the value of these cores in the anticancer drug development. The present article aims point out the current application of thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone cores in the design of anticancer agents within tumor progression, acting via varied targets such as cathepsins, NDRG1 gene and kinases, showing *in vitro* tests, *in vivo* tests and clinical trials. In our search it was possible to verify that thiazole is the most studied and the most important of the three structures. Therefore, we hope to provide new insights and valuable inspiration in the research of new drugs and development and contribute to the management of cancer.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	238
2. Thiosemicarbazones	238
2.1. Tumoral progression and metastasis – <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies	238
2.2. Thiosemicarbazone based compounds as cathepsins inhibitors	239
2.3. Thiosemicarbazones: target NDRG1 gene	241
2.4. Thiosemicarbazones in clinical trials	243
3. Thiazolidinones	244
3.1. Tumoral progression and metastasis – studies <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	244
4. Thiazoles	245
4.1. Tumoral progression and metastasis – <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies	245

* Corresponding author.

E-mail address: acllb2003@yahoo.com.br (A.C.L. Leite).<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.024>

0223-5234/© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

4.2. Thiazoles based compounds as kinases inhibitors	246
4.3. Thiazoles based compounds as tubulin/microtubule inhibitors	251
4.4. Thiazoles based compounds as inducers of HIF degradation	252
4.5. Thiazoles based as compounds miscellaneous inhibitors	252
4.6. Thiazoles in clinical trial	256
5. Conclusions	256
6. Prospects	256
Conflicts of interest	257
Acknowledgments	257
References	257

1. Introduction

Cancer is a public health problem, especially in underdeveloped countries. According to the World Health Organization (WHO), more than 20 million new cases are estimated to 2025. This pathology is highly complex, given heterogeneous and multifactorial causes [1]. Studies aimed to elucidate the oncogenic process have been proposed over the centuries [2].

Neoplastic cells in early tumors retain expression of the key biological phenotypes of epithelial cells, as well the lack of motility and an ability to form continuous cell sheets. These singularity contrasts starkly with those of cells present in advanced carcinomas, which arise as products of a complex succession of steps that are often termed "tumor progression". Cells of highly aggressive primary tumors display mesenchymal features, including motility and invasiveness, the latter of which is associated with metastatic dissemination [3–5].

It is worthy to mention that the epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a key step for cancer cell migration, invasion and metastasis. The metastasis is the term used to describe the propagation of cancer cells from the primary tumor to circumjacent tissues and distant organs that involves a series of sequential and interrelated steps [6–9]. Moreover, metastasis is the last and the worst consequence of cancer, reaching more than 90% of all deaths associated with solid tumors in animals and humans [10,11]. In the metastatic cascade cancer, cells must disconnect from the primary tumor, intravasate into the circulatory and lymphatic systems, evade immune attack, extravasate at distant capillary beds and invade and multiply in distant organs [12–14].

Thiosemicarbazones and their bioisosteres, thiazole and thiazolidinone (Fig. 1), possess a remarkable pharmacological profile and constitute an important class of compounds whose properties have been extensively studied in Medicinal Chemistry. These cores are found in synthetic and natural products that bind to a plethora of different targets. Such structures have been utilized to develop

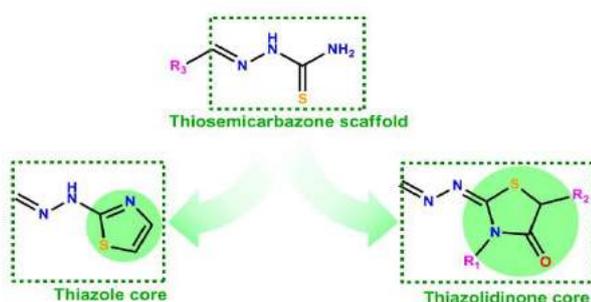


Fig. 1. Structures of thiosemicarbazones and their bioisosteres: thiazole and thiazolidinone.

synthetic drugs and drug-like molecules with a variety of pharmacological effects [15–21]. Biological evaluations and mechanisms studies of anticancer thiosemicarbazone, thiazoles and thiazolidinones displayed that these compounds target several pathways in cancer cells. A significant number of molecules containing these cores scaffolds has been described as inhibitors such as cathepsins inhibitors, novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors, kinase inhibitors. The thiazole ring should be highlighted, once this ring is present in Dasatinib currently used in anticancer therapy and also in SNS-032, currently in clinical trials. Therefore, in this review, we bring the importance of these multi-target structures in the framework development of future drugs for tumor cells, focusing on progression and metastatic stage. Also, arranged by their biological targets, we summarize the versatility of thiosemicarbazones and their bioisosteres, the SAR studies described in the literature which lead to the discovery of diverse new drugs acting against tumor progression.

2. Thiosemicarbazones

2.1. Tumoral progression and metastasis – in vitro and in vivo studies

Thiosemicarbazones has occupied a prominent place in medicinal chemistry because of their broad profile of biological activities such as antitumor [22], antibacterial [23], antifungal [24], antiviral [25], antiprotozoal [26], among others (Fig. 2). These classes of compounds present chelating properties, which favor the biochemical mechanisms, being the antineoplastic activity the most explored [23,27–30].

The anti-tumor mechanism of thiosemicarbazones could be through the inhibition of DNA synthesis [31]. Thiosemicarbazones

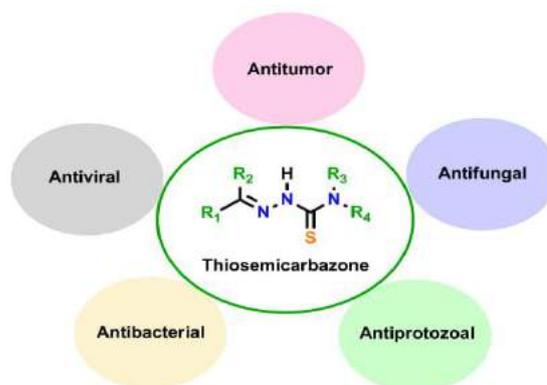


Fig. 2. Biological activity profiles of thiosemicarbazones.

could stabilize the cleavable complex between topoisomerase II and DNA through alkylation of thiol on the top II-DNA complex. In addition, thiosemicarbazones can inhibit iron-containing enzyme ribonucleotide reductase by metal ion chelation because iron has been shown to be an essential molecular target in the proliferation of cancer cells and generation of reactive oxygen species [32].

One of the most used thiosemicarbazones in medicinal chemistry is the 3-aminopyridine carboxaldehyde thiosemicarbazone, 3-AP or Triapine (**1**) (Fig. 3). This compound was synthesized and tested as a potent RR (Ribonucleotide Reductase) inhibitor for cancer treatment and has since entered Phase I and II clinical trials [30,33,34]. Triapine showed to be more active than the hydroxyurea, that was already used in clinical treatments and act after a different mechanism. *In vitro* studies showed the capability of Triapine[®] to inhibit the growth of both HU-sensitive and resistant cancer cells, including L1210 leukemia (IC₅₀ = 1.3 μM) [35,36]. Moreover, Triapine[®] demonstrated anticancer activity without marked toxicity in L1210 leukemia, M109 lung carcinoma and A2780 ovarian carcinoma xenografts in mice [37]. In addition, despite the Desferrioxamine (DFO) is clinically used for the treatment of iron overload disease, studies showed that thiosemicarbazones chelators are more effective regarding antineoplastic properties [18].

Throughout the years, innumerable derivatives from Triapine and other thiosemicarbazones types have been explored as anticancer agents. As an example, hybrid compounds of thiosemicarbazones attached to natural product derivatives were identified with potent anticancer activity. E.g.: anthraquinone-thiosemicarbazone derivatives that efficiently inhibited cancer cell growth at micromolar concentrations (HeLa, MDAMB-361, MDA-MB-453, K562, A549) [32], nopinone-based thiosemicarbazone derivatives with potent antitumor activity against three human cancer cell lines (MDA-MB-231, SMMC-7721 and Hela) [38]; mono-substituted hybrids of phenoxodiol with thiosemicarbazides with potent anti-proliferative activity against breast and brain cancer cells [31]; limonene-based thiosemicarbazones with promising cytotoxic effects against PC-3 adenocarcinoma prostate cells [39].

Based on structure-activity relationship (SAR) studies for cancer and metastasis involving thiosemicarbazones, it was observed that this structure acts not only in a single biological pathway and some of them presented a better antitumor profile than drugs already inserted in the therapeutics. Therefore, we will discuss the main pathways used by these promising chemical structures. Table 1 lists the thiosemicarbazone derivatives, the respective cancer cell line and target for which of these compounds demonstrated activity.

2.2. Thiosemicarbazone based compounds as cathepsins inhibitors

In some trials, it has been shown that two specific cysteine proteases, cathepsins L and B participate in tumor progression, angiogenesis and metastasis [40]. The cathepsins L and B belong to the papain family of lysosomal cysteine proteases that include also cathepsins like C, F, H, K and X. These cathepsins are overexpressed in some types of cancer, such as lung, prostate, gastrointestinal and breast. Studies with tumor cells have demonstrated that the location of cathepsin B and L increases and changes the level of severity of the human tumors [41]. The increase of cellular expression of the

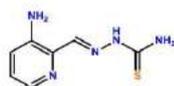


Fig. 3. Structure of 3-AP or Triapine (**1**).

cathepsin L is associated with more aggressive tumors and/or with unsuccessful clinical results [42]. Studies show that cathepsin L also acts in melanoma cells, since it has been shown that non-metastatic melanoma cells are converted into metastatic cells by expression of cathepsin L. Thus, due these implications, cathepsins appear to be promising targets for the development of new drugs [43]. In agreement, some authors explored these targets and they have found interesting results (Fig. 4).

Generally, cysteine proteases are small monomeric proteins with a mean mass of approximately 30 kDa. Structurally, the cathepsins consist of a left and a right domain with a V-shaped active site cleft located along the domain interface. This site contains two active residues, a Cys-25 located on the left domain and a His-159 located on the right domain, which together form a stable thiolate-imidazolium ion pair essential for the enzyme's activity [44].

Some benzophenone thiosemicarbazones derivatives were synthesized and their ability to inhibit the cysteine proteases cathepsin L and cathepsin B were tested [44]. Over the time, derivatives were obtained by different collaborators, as shown below. In the first series, the thiosemicarbazones possess phenolic moiety with a *meta*-bromo substituent in aryl ring system and a second aryl ring along with a variety of functional groups. Six compounds showed cathepsin L inhibitor (IC₅₀ < 85 nM) properties and some of them were selective toward the inhibition of cathepsin L versus cathepsin B, showing values of IC₅₀ > 10,000 nM. They showed a potential property to arrest or limit cancer metastasis. The 3-bromophenyl-2-fluorophenyl thiosemicarbazone (**2**) also efficiently inhibits cell invasion of the DU-145 human prostate cancer cell line [44] (Fig. 5).

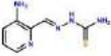
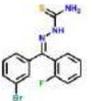
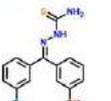
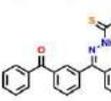
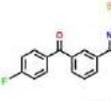
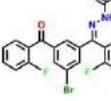
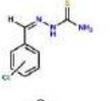
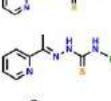
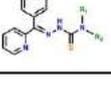
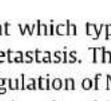
Molecular modeling of the most active analogue (**2**) with cathepsin L showed that the conformation with the most favorable relative interaction energy places the bromophenyl ring deep into the S2 pocket with the thiosemicarbazone in close proximity to the active site Cys-25. The thiosemicarbazone is oriented at the active site by two hydrogen bonds between the NH and NH₂ groups and the enzyme Asp-162 [44].

Others benzophenone thiosemicarbazones were synthesized by Kumar et al. and tried in cathepsins. The series of thiosemicarbazone analogues based on the benzophenone moiety revealed the two most potent inhibitors of cathepsin L (compounds **3** and **4**) with IC₅₀ < 135 nM value [43,45] (Fig. 5).

The benzophenone thiosemicarbazone synthesized by Charvarria and collaborators named KGP94 (**3**) showed to be a time-dependent, reversible and competitive inhibitor of cathepsin L that also prevented both migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. It is supposed that the inhibitor establishes a covalent bond between the thiocarbonyl group with the thiolate moiety of Cys25 of the active site [17]. The *in vivo* tumor model used was a C3H mouse mammary carcinoma, with female CDF1 mice, 10–14 weeks old. Tumor cells were injected in the right rear foot of mice. Experiments were performed when tumors had grown to about 200 mm³, which generally occurred 3 weeks after inoculation [46]. In this experiment, it was possible to observe a delay in tumor growth.

Sudhan et al. reported the intracardiac injection of human PC-3ML prostate cancer cells into nude mice to examine tumor cell dissemination in a preclinical bone metastasis model. Studies with the small molecule KGP94 resulted in a significant reduction in metastatic tumor burden in the bone and an improvement in overall mice survival. The Cathepsin L inhibition by KGP94 also led to a significant impairment of tumor initiated angiogenesis. Furthermore, KGP94 treatment decreased osteoclast formation and bone resorptive function, thus, perturbing the reciprocal interactions between tumor cells and osteoclasts within the bone

Table 1
Thiosemicarbazone derivatives and their activity against cancer.

Thiosemicarbazones with anti-cancer activity				
Code	Structure	Cancer cells	Action Mechanism	Reference
1		L1210, KB, L1210, M109, A2780	RR inhibition	[30,33–37]
2		DU-145	Cathepsin L inhibition	[44]
3		DU-145, MDA-MB-231, PC-3ML	Cathepsin L inhibition	[17,43,45–47]
4		DU-145	Cathepsin L inhibition	[43,45]
5		MDA-MB-231	Cathepsin L inhibition	[48]
6		MDA-MB-231	Cathepsin L inhibition	[48]
7		MDA-MB-231	Cathepsin L inhibition	[48]
9		–	Cathepsin B inhibition	[49]
10		MIAPaCa-2, PANC-1, CAPAN-2 and CFPAC-1	NDRG1 inhibition	[59]
11		MIAPaCa-2, PANC-1, CAPAN-2 and CFPAC-1	NDRG1 inhibition	[59]
12		MIAPaCa-2, PANC-1, CAPAN-2 and CFPAC-1	NDRG1 inhibition	[59]
13		SK-N-MC	NDRG1 inhibition	[23]
14		SK-N-MC	NDRG1 inhibition	[23]

microenvironment which typically result in bone loss and aggressive growth of metastasis. These functional effects were accompanied by a downregulation of NFκB signaling activity and expression of osteoclast genesis related NFκB target genes. These data indicate that KGP94 has the potential to decrease metastatic disease progression which is associated with skeletal morbidities. Therefore, it would be useful in the treatment of advanced prostate cancer patients [47].

A series of fourteen benzoylbenzophenone thiosemicarbazones were selective in inhibit the cathepsin L. The 3-benzoylbenzophenone thiosemicarbazone (**5**), 1,3-bis(4-

fluorobenzoyl)benzenethiosemicarbazone (**6**), and 1,3-bis(2-fluorobenzoyl)-5-bromobenzene thiosemicarbazone (**7**) showed the greatest potency against cathepsin L with IC₅₀ values of 9.9 nM, 14.4 nM, and 8.1 nM, respectively. Compound **7** also inhibited invasion through matrigel of MDA-MB-231 breast cancer cells by 70% at 10 μM [48] (Fig. 6).

The synthesis of substituted semicarbazones and thiosemicarbazones and their effects on lysosomal cysteine protease, cathepsin B were demonstrated [49]. Previously, inferred thiosemicarbazones and semicarbazones were able to inhibit endogenous proteolytic activity. Thus, they also showed that

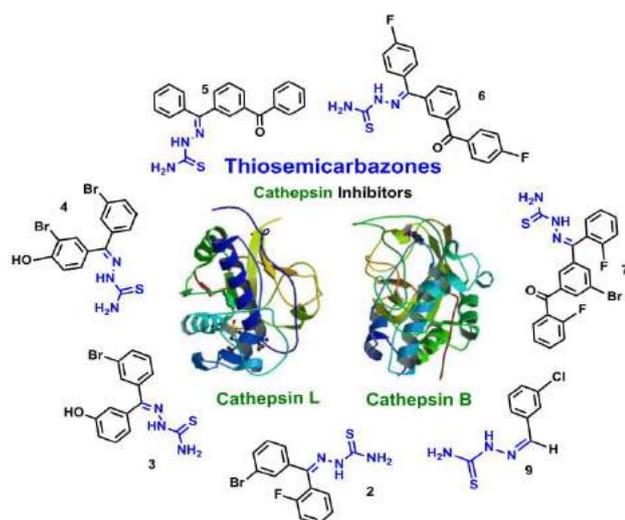


Fig. 4. Thiosemicarbazones with cathepsin inhibition activity. Source of Cathepsin structures: Cathepsin L (<http://www.rcsb.org/structure/2XU1>); Cathepsin B (<http://www.rcsb.org/structure/3A18>).

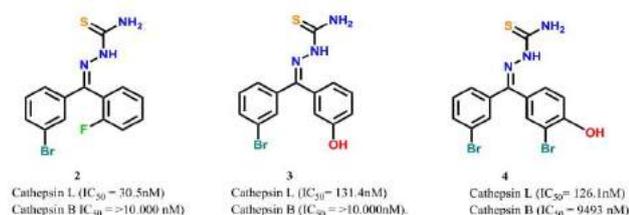


Fig. 5. Structures and activities of benzophenone thiosemicarbazone derivatives.

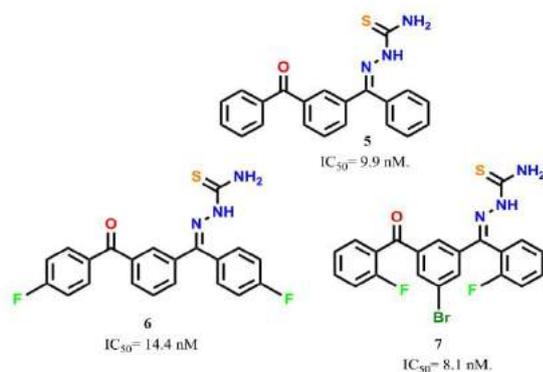


Fig. 6. Structures of cathepsin L inhibitors.

thiosemicarbazones were better than the semicarbazones in inhibit the cathepsin B. Among ten semicarbazones and ten thiosemicarbazones, the chloro-phenyl derivatives, compounds **8** and **9**, have been found to inhibit cathepsin B most effectively. The maximum inhibition was found to be 30% with the K_i value of 1.16×10^{-4} M for the *o*-chlorobenzaldehyde semicarbazone (**8**) and was up to 90% with K_i value 1.48×10^{-5} M for *o*-chlorobenzaldehyde thiosemicarbazone (**9**) (Fig. 7).

Thiosemicarbazones are shown to be effective in inhibiting both

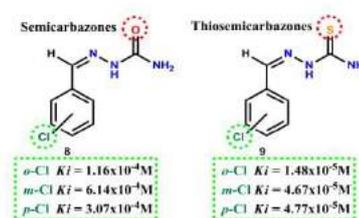


Fig. 7. Inhibitors to cathepsin B.

cathepsins, with emphasis on the compound KGP94 (**3**), which displayed the importance of bi-phenyl moiety substituted by a *meta*-Br and a second OH-*meta* in the aryl ring systems. The *in vivo* tests were performed with compound **3** and promising results were obtained on cathepsin L, which is related to the most aggressive tumors.

The presence of certain structural features is important to the maintenance of the biological activity against cathepsin L. For example, compounds that possess aromatic rings substituted by a bromine in *meta* position, were the most active. Besides, the presence of a fluorine atom in *ortho* position resulted in compounds with IC_{50} values of 30.5 nM (compound **2**) to 8.1 nM (compound **7**) toward cathepsin L inhibition (Fig. 8). Thus, the insertion of halogens atoms into the structure of drug candidates is shown to be an important strategy, as was already evidenced by Hernandez et al. [50].

2.3. Thiosemicarbazones: target NDRG1 gene

The N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is well known as a metastatic suppressor in some human cancers, also acting in a number of physiological processes such as cellular differentiation and cell cycle. The NDRG1 acts through on a variety of cellular signaling pathways, including the TGF- β pathway, protein kinase B (AKT)/PI3K pathway, RAS, etc. [51,52]. It is a potent, iron-regulated [53,54] growth and metastasis suppressor that was found to be negatively correlated with cancer progression in a number of tumors, including prostate, pancreatic, breast and colon cancers [52]. Studies with patients related to higher levels of NDRG1 showed a more positive outcome when compared to those with lower levels of NDRG1 [55–57]. It is important to highlight the role of NDRG1 in cancer types and their inhibitors, such as thiosemicarbazones [58] (Fig. 9).

Kovacevic et al. revealed that some Triapine derivatives, called Dp44mT (di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone), compound **10**, and DpC (di-2-pyridylketone-4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone), compound **11** (Fig. 10), showed

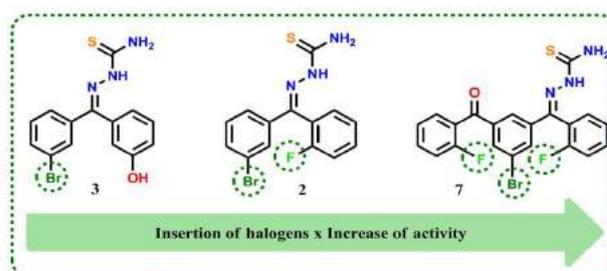


Fig. 8. Structures with insertion halogens Br and F (compounds **3**, **2** and **7**) and cathepsin L inhibitor.



Fig. 9. Thiosemicarbazones with NDRG1 up-regulate activity. Source of NDRG1 structure (<http://www.rcsb.org/structure/2XMR>).



Fig. 10. Triapine derivatives: Dp44mT (**10**) and DPC (**11**).

in vitro and *in vivo* activity, in the increase of growth expression and metastasis suppressor NDRG1. The results showed that the anti-proliferative activity for pancreatic cancer cells (MIAPaCa-2, PANC-1, CAPAN-2 and CFPAC-1) was significantly higher *in vitro* than gemcitabine, already used in the clinical treatment of pancreatic cancer, and 5-fluorouracil, as shown in Table 2. These agents also increased the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1/WAF1, while decreasing cyclin D1 in pancreatic cancer cells. Besides compound DpC (**11**) inhibited the growth of pancreatic cancer xenografts without evidence of marked changes in normal tissue histology [59].

Wangpu et al. highlighted the role of the ROCK1/pMLC2 pathway in the NDRG1-mediated antimetastatic signaling network and the therapeutic potential of iron chelators at inhibiting metastasis. They established the NDRG1 overexpression and knockdown models using the DU145 and HT29 cancer cell lines to investigate the molecular basis by which NDRG1 exerts its inhibitory effect on cell migration. It was demonstrated that NDRG1 overexpression inhibits cell migration by preventing actin-filament polymerization, stress, fiber assembly and formation. In contrast, NDRG1 knockdown promotes the opposite effect. The phosphorylation of MLC2 is a key process in inducing stress fiber contraction and this was shown to be markedly affected (decrease or increase) by NDRG1 overexpression or knockdown, respectively. The mechanism involved in the inhibition of MLC2 phosphorylation by NDRG1 was mediated by a significant decrease in ROCK1 expression, a key kinase involved in MLC2 phosphorylation. The ability of these thiosemicarbazones to inhibit cell migration and progression could be mediated, at least in part, through the FAK/paxillin pathway, that was tested through immunofluorescence [60].

Chelators inhibit the TGF- β -induced EMT via process consistent with NDRG1 up-regulation and elucidate the mechanism of activity. Transforming growth factor- β (TGF- β) regulates the EMT and the metastasis suppressor gene, N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1), could play a role in regulating the TGF- β pathway.

The NDRG1 expression is markedly increased after chelator-mediated iron depletion via hypoxia-inducible factor 1 α -dependent and independent pathways [53]. The study demonstrated that iron chelators could inhibit the EMT via NDRG1 up-regulation. Moreover, desferrioxamine and di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT – **10**), inhibited the TGF- β -induced EMT by maintaining E-cadherin and β -catenin, at the cell membrane. It was then established stable clones between NDRG1 overexpression and knockdown in HT29 and DU145 cells [29].

According to Richardson et al. the effects of Dp44mT (**10**) in prostate cancer take place via selective targeting of the PI3K/AKT, TGF- β and ERK pathways. The Dp44mT increased levels of tumor-suppressive PTEN and decreased phosphorylation of ERK1/2 and SMAD2L, which are regulated by oncogenic Ras/MAPK signaling. The effects of Dp44mT on NDRG1 and p-SMAD2L expression were more marked in prostate cancer cells than normal prostate epithelial cells. This may partly explain the anti-tumor selectivity of this agent. Silencing NDRG1 expression increased phosphorylation of tumorigenic AKT, ERK1/2 and SMAD2L and decreased PTEN levels, whereas NDRG1 overexpression induced the opposite effect. Furthermore, NDRG1 silencing significantly reduced the ability of Dp44mT to suppress p-SMAD2L and p-ERK1/2 levels [61].

Some metals, like iron and copper act as potent metastasis suppressors due to their ability to up-regulate the metastasis suppressor gene, NDRG1 target. They demonstrated that their anti-cancer activity is because metals are chelators with thiosemicarbazones, bis-thiosemicarbazones and di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. In addition, DpC (**11**) has the ability to overcome resistance to currently used chemotherapeutics. The compound DpC is entered clinical trials in 2016, demonstrating the potential of exploiting redox cycling metal ions as an important strategy for novel anti-cancer chemotherapeutics [37].

Recent studies showed a novel approach for the treatment of tumors resistant to traditional epidermal growth factor receptor EGFR inhibitors. The role of NDRG1 on the EGFR and other members of the ErbB family, called human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and human epidermal growth factor receptor 3 (HER3) were examined. They demonstrated that NDRG1 markedly decreased the expression and activation of EGFR, HER2 and HER3 in response to the epidermal growth factor (EGF) ligand, while also inhibited the formation of EGFR/HER2 and HER2/HER3 heterodimers. In addition, NDRG1 also decreased activation of the downstream MAPKK in response to EGF. Compound **10** and **11**, which markedly up-regulate NDRG1, were found to inhibit EGFR, HER2, and HER3 expression and phosphorylation in cancer cells. However, the mechanism involved appeared dependent on NDRG1 for **10** but was independent of this metastasis suppressor for **11**. Therefore, the small structural changes in thiosemicarbazones resulted in marked alterations in molecular targeting [52].

Yu et al. demonstrated that Fe chelation alone is not enough to generate compounds with pronounced antitumor efficacy. The structure-activity relationships studies demonstrated that chelators containing hard electron donors such as oxygen typically lead to ligands that bind Fe^{III} with high affinity that lack of antitumor efficacy. In contrast, ligands with soft donors such as sulfur and nitrogen lead to compounds that can redox cycle and induce a

Table 2
IC₅₀ values after 72-h incubation (\pm S.D. (three to five experiments)).

Cells lines	Dp44mT (10) μ M	DPC (11) μ M	Gemcitabine μ M	5-Fluorouracil μ M
MIAPaCa-2	0.001 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.016 \pm 0.005	24.267 \pm 6.345
PANC-1	0.004 \pm 0.001	0.030 \pm 0.002	10.988 \pm 0.799	62.303 \pm 6.536
CAPAN-2	0.001 \pm 0.001	0.020 \pm 0.008	40.791 \pm 4.723	54.247 \pm 17.129
CFPAC-1	0.200 \pm 0.054	0.203 \pm 0.155	0.022 \pm 0.020	41.221 \pm 1.069

“double punch”, namely, marked chelation and redox activity. Such compounds include the thiosemicarbazone chelators such as 3-AP (compound **1**), DpT (di-2-pyridylketone thiosemicarbazone, compounds **10**, **11** and **12**), the ApT (2-acetylpyridine thiosemicarbazone, compound **13**) and BpT (2-benzoylpyridine thiosemicarbazone, compound **14**) series (Fig. 11).

Four of the six ApT chelators demonstrated potent antiproliferative activity in the human SK-N-MC neuroepithelioma cell line ($IC_{50} = 0.001–0.002 \mu M$) and demonstrated Fe chelation efficacy similar to that of the most effective BpT and DpT ligands. The examination of BpT series through *in vitro* assays revealed that BpT analogues possess greater antiproliferative activity than the corresponding DpT analogues. Detailed investigations of the thiosemicarbazone of ligands have demonstrated that they are highly effective chelators that, besides RR, also target a range of other molecules including NDRG1 which contribute to their anticancer effects [23].

In the review “expanding horizons”, novel thiosemicarbazone as chelators, acting by a “double punch” mechanism was investigated. These compounds are able to bind intracellular iron and promote redox cycling reactions displaying marked potency and selectivity *in vitro* and *in vivo* against some tumors. The general mechanisms by which iron chelators selectively target tumor cells through the sequestration of intracellular iron, fall into the following categories: (1) inhibition of cellular iron uptake/promotion of iron mobilization; (2) inhibition of ribonucleotide reductase, the rate-limiting, iron-containing enzyme for DNA synthesis; (3) induction of cell cycle arrest; (4) promotion of localized and cytotoxic reactive oxygen species production by copper and iron complexes of thiosemicarbazones (e.g., Triapine[®] and Dp44mT); and (5) induction of metastasis and tumor suppressors. Pieces of evidence indicate that chelators can damage more cancer phenotype via inhibiting the epithelial-mesenchyme transition that is critical for metastasis and by modulating ER stress [62].

It is possible to notice, through the cited studies, that NDRG1 is involved in the neoplastic context in several ways: protein kinase B (AKT)/PI3K pathway, RAS, etc. Therefore, thiosemicarbazones, with or without the presence of chelators, are related in different ways to the biological targets mentioned but converge to increase NDRG1 levels. The Triapine derivatives (DpC, DpM44T, ApC and others) have shown promise results in this biological target (Fig. 12).

2.4. Thiosemicarbazones in clinical trials

Some thiosemicarbazones are in clinical trials, in particular, Triapine (**1**). Table 3 presents the synopsis of the clinical trials using Triapine (Fig. 3).

Feun et al. showed a Phase I study with the 3-AP and the pharmacokinetic profile was analyzed using a single intravenous dose schedule that ranged from 5 mg/m² to 105 mg/m². Blood and urine samples were collected and 3-AP was measured by HPLC. The serum concentration peak of 3-AP increased linearly with dose. No tumor responses were observed in this heavily pretreated

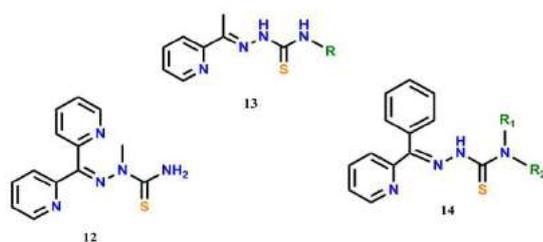


Fig. 11. Structures of the thiosemicarbazone chelators DpT (**12**), ApT (**13**) and BpT (**14**).

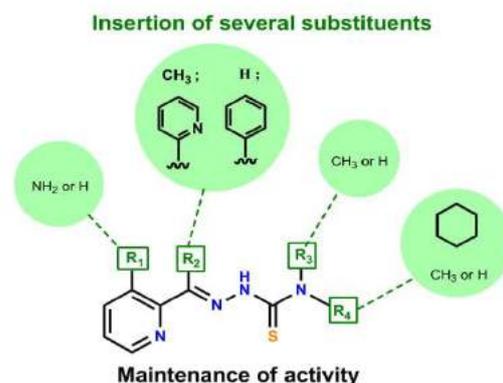


Fig. 12. The common pharmacophore of NDRG1 inhibitors.

population, although eight patients presented tumor stabilization. Therefore, relevant tumor inhibitory concentrations were achieved without significant toxicity using doses up to 105 mg/m² on this single intravenous dose schedule [33].

In other Phase I study, Feun et al. tested the 3-AP in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. They concluded that 3-AP at 105 mg/m² infused over 2–4 h followed by gemcitabine at 1000 mg/m² on days 1, 8, and 15 schedules every 28 days was generally well-tolerated and had a toxicity profile similar to that of gemcitabine alone. This combined therapy promoted antitumor activity and merits further exploration in phase II trials [63]. Another trial of phase II study was done by using 3-AP and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma and in advanced non-small-cell lung cancer. In this two-step phase II trial, patients with advanced pancreatic adenocarcinoma had not received prior chemotherapy for advanced disease. Both drugs were given on days 1, 8 and 15 of a 28-day cycle. The combination of 3-AP and gemcitabine is associated with moderate toxicity in patients with advanced pancreatic cancer. This two-stage trial was stopped after stage I due to the lack of antitumor activity. On the basis of this clinical trial, the combination of gemcitabine and 3-AP at this dose and schedule does not warrant further study in this patient population [64]. Further development of 3-AP in lung cancer is challenged by its potential of causing methemoglobinemia and hypoxia, which could be problematic in patients with compromised pulmonary reserves [65].

The Phase I study of the 3-AP in combination with a high dose of cytarabine in patients with advanced myeloid leukemia was made by Odenike et al. Twenty-five patients with relapsed or refractory myeloid leukemia were enrolled to three dose levels of 3-AP. The 3-AP infusion preceded the start of the cytarabine infusion by 4 h. In general, the toxicities observed with the combination were similar to the expected toxicity profile for cytarabine when utilized as a single agent. The combined therapy of 3-AP and cytarabine gave on this schedule is feasible in advanced myeloid leukemia. The recommended Phase II trial, the dose is 75 mg/m²/day of 3-AP on days 2–5 given prior to cytarabine administered at a dose of 1000 mg/m²/day over 5 consecutive days. The methemoglobinemia is a common toxicity of this combination and requires close monitoring [66].

Other phase II study with 3-AP but now with metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). The HNSCC treatment options are limited with response rates to cytotoxic chemotherapy of 30% and median survival of 6 months; thirty patients were assessable for response and toxicity. The 3-AP Triapine as a single agent, at this dose 96 mg/m², daily for 4 days every 14 days and schedule, was well tolerated but exhibited low efficacy [67].

Metastatic renal cell carcinoma (RCC), the 3-AP was tested in

Table 3
Summary of the clinical trials using Triapine (3-AP).

Clinical trial	Therapy	Tumor type	Outcome	Reference
Phase I	Single intravenous dose range 5 mg/m ² to 105 mg/m ²	Advanced cancer	No tumor responses, tumor stabilization	Feun, 2002
Phase I	105 mg/m ² of 3-AP given over 2 h, gemcitabine 1000 mg/m ² on days 1, 8 and 15 of a 28-day cycle.	Advanced cancer	3-AP- well tolerated. Antitumor response	Yen, 2004
Phase II	105 mg/m ² of 3-AP given over 2 h, gemcitabine 1000 mg/m ² was given over 30 min.	Pancreatic carcinoma and in advanced non-small-cell lung cancer	Moderate toxicity in patients with advanced pancreatic cancer. Lack of antitumor activity	Mackenzie, 2007
Phase I	3-AP in combination with high dose of cytarabine	Advanced myeloid leukemia	Toxicities similar to the expected for cytarabine as a single agent	Odenike et al., 2008
Phase II	75 mg/m ² /day of 3-AP on days 2–5 given prior to cytarabine administered at a dose of 1000 mg/m ² /day over 5 consecutive days	Advanced myeloid leukemia	Methemoglobinemia toxicity, requires close monitoring	Odenike et al., 2008
Phase II	75 mg/m ² /day of 3-AP on days 2–5	Metastatic head and neck squamous cell carcinoma	Well tolerated but exhibited low efficacy	Nutting, 2009
Phase I	96 mg/m ² , 2-h infusion daily × 4 repeated every 2 weeks	Metastatic renal cell carcinoma	Fail in minimal efficacy criteria	Knox, 2007
Phase I	Estimated the maximum tolerated dose (MTD) and oral bioavailability	Advanced-stage solid cancers	Oral 3-AP was well tolerated; benefit rate of 25%	Chao, 2012
Phase II	Radiochemotherapy associated with 3-AP (25mg/m ²) and cisplatin (40mg/m ²)	Stage IB2–IVB cervical or stage II–IV vaginal cancers	Tolerable and produced high rates of clinical and metabolic responses	Kunos, 2013

was given at a schedule of 96 mg/m², 2-h infusion daily × 4 repeated every 2 weeks in patients with recurrent RCC. The study closed at the end of stage 1 as it did not meet the minimal efficacy criteria to proceed. Further evaluation of Triapine at this dose and schedule in patients with advanced kidney cancer is not recommended [34].

In advanced-stage solid cancers, the Phase I study with the 3-AP was designed to estimate the maximum tolerated dose (MTD) and oral bioavailability of 3-AP in patients with advanced-stage solid tumors. The oral 3-AP was well tolerated and presented an MTD similar to its intravenous form after accounting for the oral bioavailability. The oral 3-AP was associated with a modest clinical benefit rate of 25% in the treated patient population [30].

The radiochemotherapy associated with 3-AP was analyzed by Kunos et al. Brachytherapy followed (40 Gy). 3-AP radiochemotherapy achieved clinical responses in 24 (96% [95% confidence interval: 80–99%]) of 25 patients (median follow-up 20 months, range 2–35 months). 23 (96% [95% confidence interval: 80–99%]) of 24 patients had 3-month post-therapy PET/CT scans that recorded metabolic activity in the cervix or vagina equal or less than that of the cardiac blood pool, suggesting complete metabolic responses. The association of 3-AP to cisplatin radiochemotherapy was tolerable and produced high rates of clinical and metabolic responses in women with cervical and vaginal cancers. Future randomized phase II and III clinical trials of 3-AP radiochemotherapy are warranted [68].

About a locally advanced cervical cancer, it was used in Phase I Trial of Pelvic Radiation, weekly cisplatin, and 3-AP, concluded that 3-AP was well tolerated at three times weekly i.v. 25 mg/m² doses during cisplatin and pelvic radiation. No change in RNR activity was found on day 1 versus day 10 in six early complete responders, whereas elevated RNR activity was seen on day 10 as compared with day 1 in four late complete responders ($P = 0.02$). Ten (100%) patients with stage IB2 to IVB cervical cancer achieved complete clinical response and remained without disease relapse with a median 18 months of follow-up (6–32 months).

3. Thiazolidinones

3.1. Tumoral progression and metastasis – studies *in vitro* and *in vivo*

The 4-thiazolidinones represent a class of compounds of great

interest in medicinal chemistry. This class of compounds presents a variety of chemical properties and biological activities, such as anticancer, antiviral, anticonvulsant, cardiovascular, anti-inflammatory, analgesic, antidiabetic, antihyperlipidemic, antimicrobial, antituberculosis, antiparasitic, antiparasitic, among others [17,28,55–57] (Fig. 13). Some 4-thiazolidinones derivatives such as Ritalin (anticonvulsant) and Etozoline (antihypertensive) are now on the pharmaceutical market [69].

Concerning the antineoplastic activity, our approach will focused regarding its anti-invasive, antimigratory and antimetastatic activity, which seems to be until now relatively few explored, when compared to their bioisosteric groups thiosemicarbazone and thiazoles. Table 4 lists the thiazolidinone derivatives, the respective cancer cell line and target for which these compounds demonstrated activity.

Wu et al. synthesized thiazolidinone series and evaluated their effect in proliferation in two cells lines: A549 (human lung cancer) and MDAMB- 231 (human breast cancer). In the two migration assays, such the wound healing and transwell migration models, compound 15 showed the best result with an IC₅₀ = 0.01–0.05 μM. The compound 16 suppressed tumor growth and metastasis *in vivo* and promoted survival rate [70].

Thiazolidinone scaffold has been reported to regulate the cellular movements and strongly inhibit tumor growth and

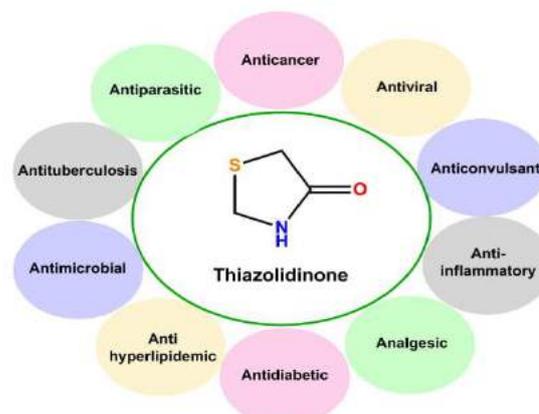


Fig. 13. Biological profile of 4-thiazolidinone.

Table 4
Thiazolidinone derivatives and their activity against cancer.

Thiazolidinones with anti-cancer activity				
Code	Structure	Cancer cells	Action Mechanism	Reference
15		A549 and MDAMB- 231	–	[70]
16		A549 and MDAMB- 231	–	[70]
17		A549	HDAC1 inhibition	[72]
18		AMDC-S and AMDC-AS	–	[73]

metastasis and offers the promising possibility of the discovery of potent HDAC inhibitors [71,72]. It was synthesized a series of novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors and some compounds showed potent HDAC1 inhibition with nM IC₅₀ values. The compound **17** showed better anti-metastatic effects than Vorinostat (SAHA - approved by the FDA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) in 2006) against migration of A549 cell line.

The anticancer effect of HDAC inhibitors could be also assessed by their potency in inducing hyper-acetylation of histone H3 or H4, therefore, compound **17** showed significantly upregulated the level of acetylated histone H3 and H4 in a dose-dependent manner. Compound **17** inhibits metastasis by means of modulating the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Western blot analysis displayed the up-regulation of epithelial markers (E-cadherin and β -catenin) and a downregulation of a mesenchymal marker (vimentin) after treatment. Since the regulation of tubulin acetylation was closely related to cell motility, it was tested that compound **17** was found to induce the acetylation level of α -tubulin significantly. Therefore, anti-metastasis activity via modulating the EMT, upregulating the acetylation of alpha-tubulin and showed inhibitory activity against HDAC1 with IC₅₀ = 73 nM [72]. Among compounds **15**, **16** and **17** the presence of halogens is observed and the best results can be attributed to those having Br atom. The substitution in the thiazolidinone ring at the N3 position with bulky groups can also be seen in all three compounds, suggesting an important feature in planning future molecules (Fig. 14).

Gandalovicová et al. showed the importance of working and develop antimetastatic and anti-invasion drugs since both are missing. Then the term "migrastatics" for involved drugs in with all modes of cancer cell invasion and metastasis was created. They ascertained the actin polymerization and contractility as a mechanism for migrastatics and review candidate migrastatic [73]. It was possible to identify the thiazolidinone ring in a set of a variety of chemical compounds. The compound **18**, called "Latrunculin A" presents in its structure a 14 or 16-membered macrolide base attached to a 2-thiazolidinone moiety and was selected as a migrastatic candidate drug. This compound exhibited >95% inhibition of invasiveness at 100 ng/mL in AMDC-S and AMDC-AS cell

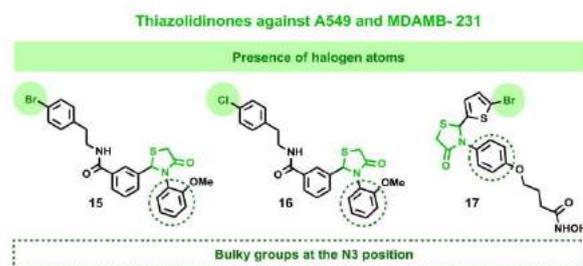


Fig. 14. Structure-activity relationship of thiazolidinones **15**, **16** and **17**.

lines [73] (Fig. 15).

It is well known that thiazolidinone ring shows several biological activities in the literature. Regarding the cancer progression, the pharmacophoric group demonstrates good activities; although a limited number of studies were found. Therefore, it is important to deepen the studies about the results obtained so far and to analyze new series containing the thiazolidinone ring with several substitutions to increase the structure-activity relationship.

4. Thiazoles

4.1. Tumoral progression and metastasis – in vitro and in vivo studies

The thiazole ring has been reported as an important core, present in several active heterocycle compounds [74]. Moreover, due to its versatility in the synthesis and wide pharmacological effects, this nucleus has displayed attention in medicinal chemistry, acting as a multitarget scaffold in several natural and synthetic compounds. Over the years some biological activities of thiazole derivatives have been pointed out (Fig. 16) like antimicrobial [75], antibacterial [76], antifungal [76], anti-HIV [77], anti-inflammatory [78], antiparasitic activity against *S. mansoni* worms [79]

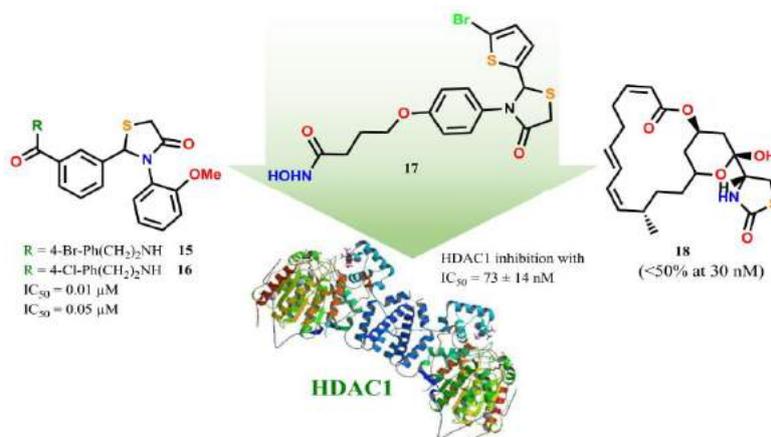


Fig. 15. Structure of compounds **15**, **16**, **17** and **18**. Source of HDAC1 structure (<http://www.rcsb.org/structure/5ICN>).

antitubercular [80] and antitumor activity [74,81].

Some drugs that already are on the market including the recent entry Dasatinib, possess thiazoles nucleus. In addition currently, the antitumor drug SNS-032, is in the clinical trial [82]. Table 5 lists the thiazole derivatives, the respective cancer cell line and target for which these compounds demonstrated activity.

4.2. Thiazoles based compounds as kinases inhibitors

Kinase signaling pathways have been shown to drive many of the hallmark phenotypes of tumor biology, including proliferation, survival, motility, metabolism, angiogenesis and evasion of anti-tumor immune responses. Kinases represent a large proportion of actionable, cancer gene alterations and in the past decade, a significant progress in generating novel therapeutic inhibitors took place [83] (Fig. 17).

The thiazole nucleus is quite explored and promising toward this biological target. Indeed, the drug currently available in the market Dasatinib is an oral inhibitor of the tyrosine kinase BCR-ABL.

In the last ten years, it is possible to enumerate many works

showing thiazole nucleus acting in kinases. Dae-Kee Kim et al. showed a series of 5-(pyridin-2-yl)thiazoles containing a *meta*- or *para*-carbonitrile- or carboxamide substituted phenylmethylamino moiety at the 2-position of the thiazole ring. This series was evaluated for their ALK5 inhibitory activity. The ALK5 inhibitor works by preventing autophosphorylation of ALK5 and through inhibition of the TGF- β pathway. The compound **19**, inhibited TGF- β -induced ALK5 activity 98, 96, and 78% at 0.1 μM in luciferase reporter assays using HaCaT cells transiently transfected with p3TP-luc reporter construct, ARE-luciferase reporter construct, and SBE-luciferase reporter constructs, respectively [84]. The carboxamide at the *meta*-position was crucial to such result (Fig. 18 and Fig. 19).

These same authors tested another benzylamino-4(5)-(6-methylpyridin-2-yl)-5(4)-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl) thiazoles series. The compound **20** inhibited ALK5 phosphorylation with an IC_{50} value of 7.01 nM and showed 61% inhibition at 30 nM in a luciferase reporter assay using HaCaT cells permanently transfected with p3TP-luc reporter construct [85]. Structure-activity relationship (SAR) studies of this series revealed that the substitutions in C4 and C5 of thiazole ring, and specifically the insertion of an amide group, a fluorine atom in *meta*-position of phenyl ring were pivotal to maintain the biological activity (Fig. 20).

A series of 2,7-diamino-thiazolo[4,5-d]pyrimidines analogues showed modest to potent EGFR inhibition, with IC_{50} values ranging from micromolar to single digit nanomolar. SAR studies of this series revealed that the preferred substituent on the 7-anilino was a halogen atom such as chlorine or bromine at the *meta*-position, while the 2-anilino group tolerated substitution with various groups [86] (Fig. 21).

The c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway is one of the major signaling cassettes of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. It functions in the control of a number of cellular processes, including proliferation, embryonic development and apoptosis.

Significant attention has been given towards the identification of c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitors, as can be seen in Ngoei et al. work [87]. They performed a silicon screen of commercially available chemical databases to identify JNK1-interacting compounds and also evaluated the *in vitro* JNK inhibitory activity. They founded that compound 4'-methyl-N2-3-pyridinyl-4,5'-bi-1,3-

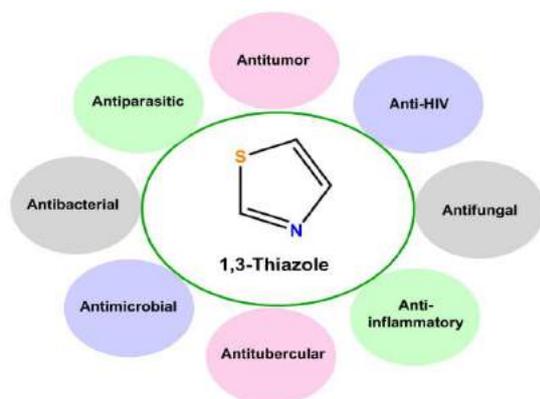
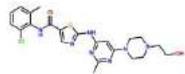
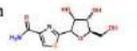
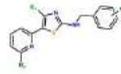
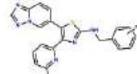
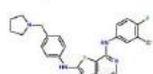
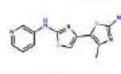
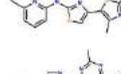
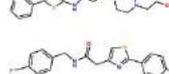
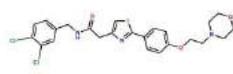
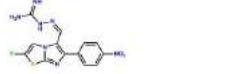
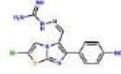
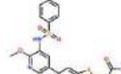
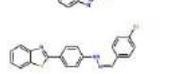
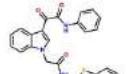
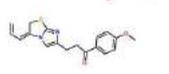
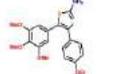


Fig. 16. Biological profiles of 1,3-thiazole.

Table 5
Thiazole derivatives and their activity against cancer.

Thiazoles with anti-cancer activity				
Code	Structure	Cancer cells	Action Mechanism	Reference
Dasatanib		–	BCR-ABL inhibition	[82]
Thiazofurin		K562, HL-60, Jurkat and HeLa	IMPDH inhibition	[106]
19		–	ALK5 inhibition	[84]
20		–	ALK5 inhibition	[85]
21		–	EGFR inhibition	[86]
22		–	JNK1 inhibition	[87]
23		–	–	[87]
24		SHSY5Y and K562	c-Src inhibition	[89]
25		NIH3T3/c-Src527F and SYF/c-Src527F	c-Src inhibition	[90]
26		NIH3T3/c-Src527F and SYF/c-Src527F	c-Src inhibition	[90]
27		–	RSK2 inhibition	[91]
28		–	RSK2 inhibition	[91]
29		–	PI3Ks and mTORC1 inhibition	[92]
30		HepG2	EGFR inhibition	[93]
31		DUI45	inhibition of tubulin polymerization	[96]
32		MDA MB-231	Microtubule assembly inhibition	[99]
33		MDA MB-231	Microtubule assembly inhibition	[99]
34		HCT116, SMMC-7221, A2780s, HepG2 and SK-OV-3	Microtubule destabilizing	[100]

(continued on next page)

Table 5 (continued)

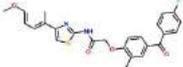
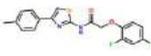
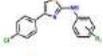
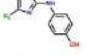
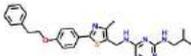
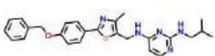
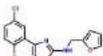
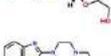
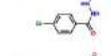
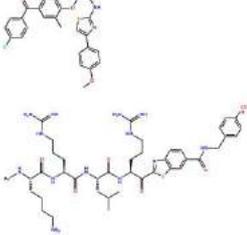
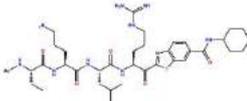
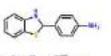
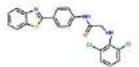
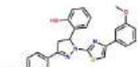
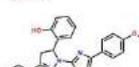
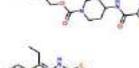
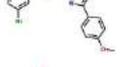
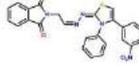
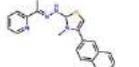
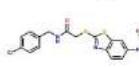
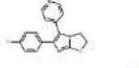
Thiazoles with anti-cancer activity				
Code	Structure	Cancer cells	Action Mechanism	Reference
35		A549, MCF-7 and SCC-9	HIF-1 α inhibition	[101]
36		A549, MCF-7, EAC, MDA MB-468 and DLA	HIF-1 α inhibition	[101]
37		HeLa	VCP inhibitor	[102]
38		HeLa	VCP inhibitor	[102]
39		MCF7, HCC1954 and HCC1806	–	[103]
40		MCF7, HCC1954 and HCC1806	–	[103]
41		MCF-7 and MDA-MB-231	–	[104]
42		MCF-7 and MDA-MB-231	–	[104]
43		Antiangiogenic activity	–	[105]
44		Antiangiogenic activity	–	[105]
45		K562, HL-60, Jurkat and HeLa	IMPDH inhibition	[106]
46		K562, HL-60, Jurkat and HeLa	IMPDH inhibition	[106]
47		DLA	–	[107]
48		EAC	VEGF-A inhibition	[101]
49		HGFA, Matriptase, Hepsin, Thrombin and Factor Xa	–	[108]
50		HGFA, Matriptase, Hepsin, Thrombin and Factor Xa	–	[108]
51		HeLa DH	–	[109]
52		MCF7 and MDA-MB-468	hMAcL inhibition	[110]

Table 5 (continued)

Thiazoles with anti-cancer activity				
Code	Structure	Cancer cells	Action Mechanism	Receference
53		MCF7 and MDA-MB-468	hMAGL inhibition	[110]
54		MCF7	MMP-2/MMP-8 inhibition	[111]
55		MCF7	MMP-2/MMP-8 inhibition	[111]
56		–	ATX inhibitor	[112]
57		HT-29 and Jurkat	–	[22]
58		HT-29 and Jurkat	–	[22]
59		HT-29 and Jurkat	–	[22]
60		CT26, 4T1, LLC, B16, MethA, A549, HeLa, DU145, MM3MG, HK2 and LO2	RhoGDI inhibition	[113]
61		MDA-MB-435	VEGF	[117]
62		MCF-7 and MDA-MB-435	Cdk2, Cdk7 and Cdk9 inhibition	[117–119]

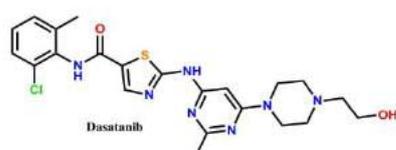


Fig. 17. Dasatinib structure.



Fig. 19. Structure compound 19.

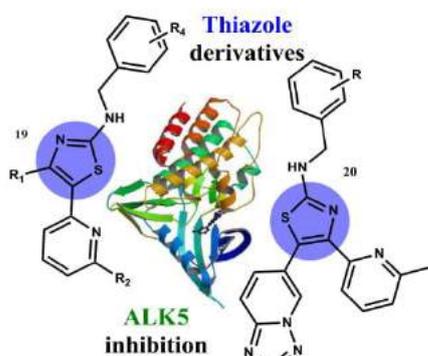
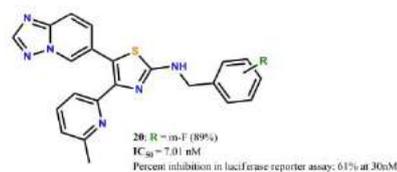
Fig. 18. Thiazoles with ALK5 inhibition activity. Source of ALK5 structure: <http://www.rcsb.org/structure/3HMM>.

Fig. 20. Structure compound 20.

thiazole-2,2'-diamine (**22**), inhibited JNK1 activity towards a range of substrates. Instead, the related compound (4'-methyl-N2--(6-methyl-2-pyridinyl)-4,5'-bi-1,3-thiazole-2,2'-diamine (**23**), did not exhibit such activity. The presence of a methyl group and the position of the substitution in pyridine ring influence the activity in such kinases. Molecular docking, saturation transfer difference NMR experiments and enzyme kinetic analyses revealed both ATP-



Fig. 21. Structure compound 21. Source of EGFR structure: <http://www.rcsb.org/structure/5CAV>.

and substrate-competitive inhibition of JNK by **22**. In characterizing **22** further, they noted its ATP-competitive inhibition of the related p38- γ MAPK. Further screening of a broad panel of kinases using 10 μ M **22** identified inhibition of kinases including protein kinase B β (PKB β /Akt β) (Fig. 22).

Another crucial kinase in the pathogenesis of cancer is Src. The c-Src is overexpressed or hyperactivated in a variety of solid tumors and is most likely a strong promoting factor for the development of metastasis. Francini et al. described the synthesis of new 2-aminothiazole derivatives and the *in vitro* evaluation as SFK (Src family kinases) inhibitors [88] (Fig. 23).

Two human tumor cell lines, the neuroblastoma cell line SHSY5Y and the leukemia cell line K562, which have been previously described as being dependent on SFKs for their proliferation and the test against kinase was performed. The compound **24** (Fig. 24) was the most active inhibitor ($IC_{50} = 0.097 \mu$ M). The target kinase was assayed within the Rottapharm *in vitro* screening department, using a Z'-LYTE technology kit [89].

Another work with c-Src was performed by Fallah-Tafti et al. that showed a N-benzyl substituted (2-morpholinoethoxy) phenyl thiazol-4-yl)acetamide and evaluated for Src kinase inhibitory activity. The compounds retained Src kinase inhibitory activities at low micromolar range (1.34 e 13.02 μ M) in NIH3T3/c-Src527F and SYF/c-Src527F cells. Structure-activity relationship studies revealed that the presence of a substituent at position 4 of benzyl ring (4-fluoro or 3,4-dichloro) is critical for maximum anticancer activity (**25** and **26**) [90] (Fig. 25).

A series of imidazo[2,1-b]thiazole guanylylhydrazones as inhibitors of p90 ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) was tried. A small subset of compounds showed both potent inhibition of RSK2 kinase activity and tumor cell growth *in vitro*. Detailed study of the most active compounds **27** and **28** indicates that a high degree of selectivity for inhibition of RSK2 kinase compared to a spectrum of other related kinases [91]. The most active compounds display in

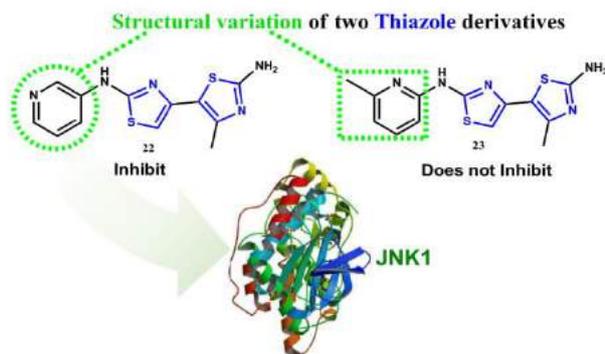


Fig. 22. Structures compounds **22** and **23**. Source of JNK1 structure: <http://www.rcsb.org/structure/3PZE>.

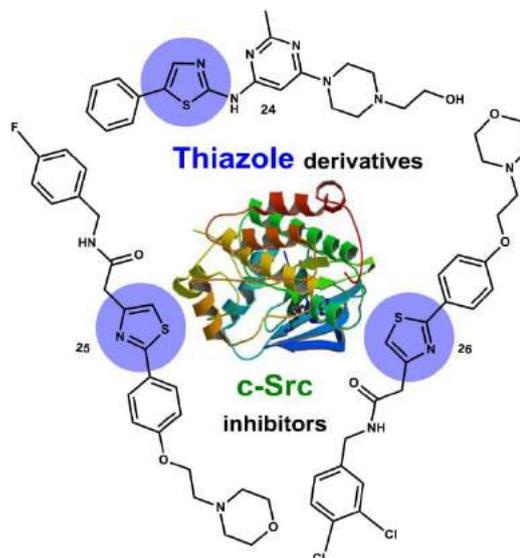


Fig. 23. Thiazoles with c-Src inhibition activity. Source of c-Src structure (<http://www.rcsb.org/structure/4U5J>):

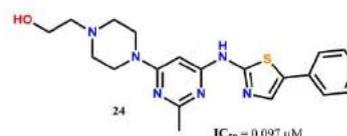


Fig. 24. Structure compound **24**.

their structures halogens such as F (**27**) and Br (**28**), showing the importance of polarizability in the structure. Hernandez et al. [50] pointed out the effect of polarizability property in bioactive structures and still comments the occurrence of several drugs currently available in therapeutics, that possess F and Br atoms in their structures (Fig. 26).

A study suggested that 1-(2-dialkylaminoethyl)-3-(6-(2-methoxy-3-sulfonylamino)pyridin-5-yl)benzo[d]thiazol-2-yl)urea derivatives can provide potent PI3K inhibitors and anticancer agents with low toxicity. The compounds with potent anti-proliferative activity were tested for their acute oral toxicity and inhibitory activity against PI3Ks and mTORC1. The results indicated that the compound **29**, that attached a 2-(dialkylamino)ethylurea moiety at 2-position of benzothiazole can retain the anti-proliferative and inhibitory activity against PI3K and mTOR. The acute oral toxicity reduced dramatically and, moreover, compound **29** can effectively inhibit tumor growth in a mice S180 homograft model [92] (Fig. 27).

Recently, Lamie et al. tested a thiazole series and reported the compound **30** that inhibited human hepatic adenocarcinoma (HepG2) with an $IC_{50} = 0.027 \mu$ M values. The EGFR % inhibition of compound **30**, at 10 μ M, was 47.28%. Results obtained using

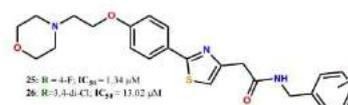


Fig. 25. Structures compounds **25** and **26**.

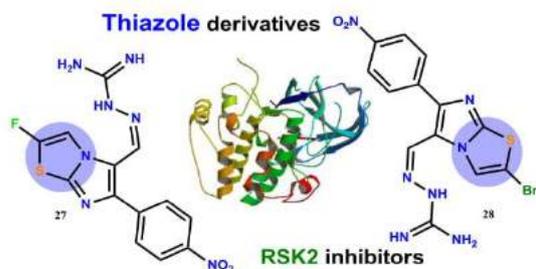


Fig. 26. Structures compounds 27 and 28. Source of RSK2 structure: <http://www.rcsb.org/structure/4EL9>.

caspsases suggested that compound 30 promote apoptosis due to the activation of caspase-3 and caspase-9. The cell cycle analysis showed cycle arrest at G2/M phase. In view to ascertaining these results, both Bax and Bcl-2 expression levels were measured in HepG2 treated with 30. The results showed that there was up-regulation in the proapoptotic protein, Bax. Besides, it was verified that down-regulation was in antiapoptotic Bcl-2 protein [93](Fig. 28).

In general, it is verified that the presence of an NH bound to the C2 of the heterocycle thiazole is a widely used strategy and offers promising results. This structural feature is also in Dasatinib (Fig. 17). Another trend is the presence of halogens, such as F, Cl and Br in most of the structures shown here.

4.3. Thiazoles based compounds as tubulin/microtubule inhibitors

Polymers of α - and β -tubulin or microtubules are involved in

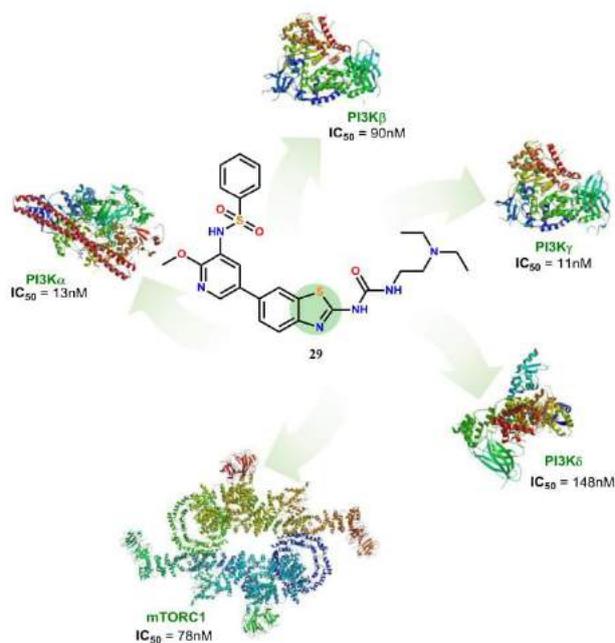


Fig. 27. Structure compound 29. Source of structures: PI3K alpha (<http://www.rcsb.org/structure/5ITD>); PI3K beta (<http://www.rcsb.org/structure/3T8M>); PI3K gamma (<http://www.rcsb.org/structure/4FJY>); PI3K delta (<http://www.rcsb.org/structure/5VLR>) and mTORC1 (<http://www.rcsb.org/structure/5H64>).

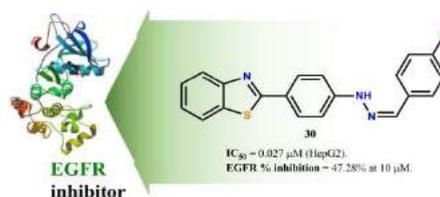


Fig. 28. Structure compound 30. Source of EGFR structure: <http://www.rcsb.org/structure/5CAV>.

many roles in cells, including the organelles motion, intracellular transportation, cell shape formation and maintenance [94,95]. Interferences in this target will lead to an increase in the number of cells in metaphase arrest. Therefore, tubulin has become an attractive target for the development of compounds useful in anticancer chemotherapy [96–98] (Fig. 29). A series of thiazole linked to indolyl-3-glyoxylamide derivatives were synthesized and were further evaluated for their *in vitro* anticancer potentials by Guggilapu et al. [96]. Initially, a screening was performed against human cancer cell lines such as DU145 (prostate), PC-3 (prostate), A549 (lung) and HCT-15 (colon). In MTT assay, the compound 31 was found to be the most active against DU145 cell lines ($IC_{50} = 93$ nM). The treatment of DU145 cells with 31 led to inhibition of cell migration ability at 100, 200 and 400 nM concentration into the scratch area by 74.8% (0 h incubation), 44.0% (12 h incubation) and 34.8% (24 h incubation). Further studies suggested compound 31 induced apoptosis in DU145 cells. The cell cycle analysis confirmed G2/M phase of cell cycle arrest in a dose-dependent manner from 25.88% (control) to 30.15%, 34.07% and 50.9% after treatment with 31 at 100, 200 and 400 nM. There was a 68.5% inhibition of tubulin polymerization compared to control at 5 μ M.

Moreover, the treatment with compound 31 promoted the collapse of mitochondrial membrane potential and elevated intracellular ROS levels in DU145 cells. The molecular modeling studies provided insight about the binding mode of the synthesized compounds in the active site of tubulin (Fig. 30).

A series of benzo[d]imidazo[2,1-b]thiazole-chalcone conjugates were synthesized and evaluated against a panel of human cancer

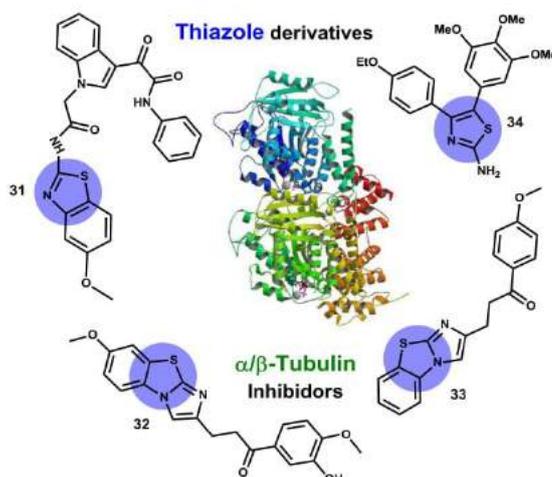


Fig. 29. Thiazoles with α/β -tubulin inhibition activity. Source of α/β -tubulin structure: <http://www.rcsb.org/structure/4UJ3>.

cell lines like lung (A-549), breast (MDA MB-231), prostate (DU-145) and colon cancer (HT-29). Two compounds were highlighted, **32** and **33**, because they exhibited IC_{50} values of 1.3 and 1.2 μ M respectively against MDA MB-231. Additionally, flow cytometric, tubulin polymerization assay, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and annexin V-FITC/PI assays were performed to investigate the action mode of these compounds on MDA MB-231 cancer cells. The results suggest that **32** and **33** induce apoptosis and effectively inhibit microtubule assembly. Conjugates **32** and **33**, at 3 μ M concentration, significantly inhibited tubulin polymerization by 59.16% and 61.38% respectively, whereas nocodazole (reference compound) inhibited it by 58.31% [99].

Compounds **32** and **33** exhibited similar activities profile even though compounds **32** and **33** possess structural differences. Compound **32** possesses a methoxy group at the phenyl ring fused to thiazole and a hydroxyl group in *meta* position in the second phenyl ring (Fig. 31).

A series of 4,5-diarylthiazole derivatives were synthesized by Wang et al. based on chemical modification of Combrestatin A-4 (CA-4). The antiproliferative activity was evaluated and some compounds were identified as new microtubule destabilizing agents. The compound **34** with 3,4,5-trimethoxyphenyl group at the C-4 position and 4-ethoxyphenyl group at the C-5 position of 2-amino substituted thiazole showed the most potent inhibitory activity of all series. Compound **34** exhibited the IC_{50} values of 8.4–26.4 nM in five human cancer cell lines (HCT116, SMMC-7221, A2780s, HepG2 and SK-OV-3). Moreover, **34** showed potency as a tubulin polymerization inhibitor, with colchicine site binding ability and comparable extent of inhibition against the growth of P-glycoprotein over-expressing multidrug resistant cell lines. The microtubule assembly IC_{50} = 2.736 μ M, while the CA-4 is IC_{50} = 5.097. Studies revealed that **34** could block the progression of cell cycle in the G2/M phase and result in cellular apoptosis in cancer cells [100] (Fig. 32).

In α - and β -tubulin or microtubules target, some structural feature of inhibitors can be highlighted, like steric volume, lipophilicity as well the presence of electronegative atoms. In addition to the hydrophobic interactions, the hydrogen bonds also appear to be relevant in this target.

4.4. Thiazoles based compounds as inducers of HIF degradation

Activation of HIF-1 α plays a critical role in promoting tumor angiogenesis and metastasis. Since its expression is positively correlated with poor prognosis for cancer patients, HIF-1 α is one of the most convincing anticancer targets. Thirusangu et al. in their work [101] showed that **35** is a compound with promising anti-angiogenic effects and antiproliferative activity. The *in vitro* and *in vivo* assays of **35** on hypoxia provide strong pieces of evidence that **35** enhance HIF-1 α proteasomal degradation by activating p53/MDM2 ubiquitination pathway. Further findings on HIF-1 α downstream signaling concluded that **35** downregulates the VEGF-A, Flt-1, MMP-2 and MMP-9 which are predominant in tumor angiogenesis. Subsequently, the same research group synthesized active



Fig. 30. Structure compound **31**.



Fig. 31. Structures compounds **32** and **33**.



Fig. 32. Structure compound **34**.

4-phenyl-2-phenoxyacetamide thiazoles moiety using different aryl acids holding active groups: fluoro, difluoro, chloro, nitro, bromo etc, and a phenyl thiazole backbone. It has been expected that the combination of these bioactive groups in the new molecular design would lead to better antitumor agents.

The *in vitro* assays against cancer cells such as MCF-7, A549, EAC and DLA cells were performed and revealed that compound **36** presents potential cytotoxic efficacy with an average IC_{50} value of 13 μ M. The compound **36** postulated the angiogenic inhibitory modulation in various rVEGF165 induced model as assessed by CAM and corneal vascularization and it was further assessed for antitumor studies, both in ascites and solid tumor models *in vivo*, which revealed the regressed tumor activity. The compound **36** acts against the tumor cells by repressing HIF-1 α by p53/MDM-2 mediated degradation. The molecular gene studies inferred involvement of HIF-1 α up-regulation and stabilization of p53, which are interlinked in signaling as conferred by immunoblot analysis.

Compounds that act on this target have as structural similarity to the presence of substituents at the C2 position of the thiazole ring, having an amide between the spacer groups. In addition, at the C4 position of the thiazole ring, the presence of bulky groups is noted (Fig. 33).

4.5. Thiazoles based compounds miscellaneous inhibitors

Valosin-containing protein (VCP; also known as p97) exhibits antiapoptotic function and metastasis via activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway. Bursavich et al. identified 2-anilino-4-aryl-1,3-thiazoles (**37** and **38**) as potent drug-like inhibitors of this enzyme. An assay utilized an ubiquitin-tagged Luciferase reporter (Ub-G76 V Luciferase) as VCP that has been shown to play a role in targeting ubiquitinated fusion constructs for degradation. Several of the potent thiazole-based VCP inhibitors cause stabilization of the reporter construct in HeLa cells after a 24 h treatment with low micromolar to nanomolar cellular activity [102] (Fig. 34).

Santos et al. synthesized 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo [1,2-c]thiazoles that showed activity for the triple-negative breast cancer, the most challenging tumors in clinical practice. These compounds were assayed for their *in vitro* cytotoxicity on several human breast cancer cell lines (MCF7, HCC1954 and HCC1806 cell lines). The 4-hydroxyphenyl derivative proved to be the most promising compound regarding HCC1806 cell line, a triple-negative

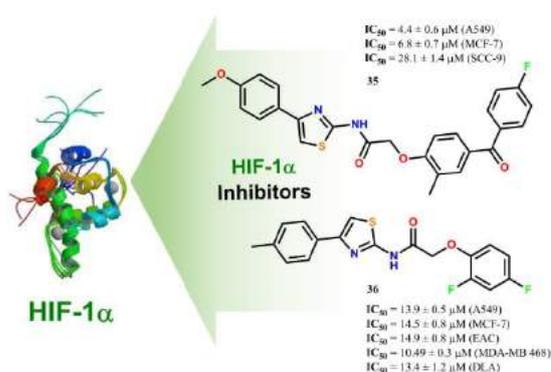


Fig. 33. Structures compounds 35 and 36. Source of HIF-1 α structure: <http://www.rcsb.org/structure/1L3E>.

breast cancer. The presence of a hydroxyphenyl group at C-3 seems to improve the anti-cancer activity for the TN cell line. Both cell lines are sensitive to compounds 39 and 40 being the TN cell line HCC1806 survival the most affected/reduced. The viability also decreased and cell death-related proteins p53, Bax and Bcl-2 are significantly altered, occurring cell cycle blockage mainly in S-phase and cell death mostly by late apoptosis and necrosis. The results indicate that these compounds may induce DNA damage [103] (Fig. 35).

In another approach toward triple-negative breast cancer, Zhou et al. synthesized and optimized a series of hybrids 2,4-diaminopyrimidine and thiazoles derivatives (41 and 42). These compounds showed anti-proliferative properties against two breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA-MB-231. Several of these compounds also exhibited potent activities against tumor cell colony formation in dose-dependent manner and inhibitory activity against MDA-MB-231 cell migration. The results suggested that the new series of hybridization of arylthiazoles and aminopyrimidines could be a new strategy against the triple-negative breast cancer as well as metastatic one [104] (Fig. 36).

Two structurally superimposable scaffolds—4H-thiochromeno [4,3-d]thiazol-2-amine and 5,6-dihydro-4H-benzo [6,7]cyclohepta [1,2-d]thiazol-2-amine derivatives—, synthesized by Liu et al., yielded low-micromolar inhibitors, and two among them, compounds 43 and 44 also exhibited antiangiogenic activity in an endothelial tube formation assay. Thus, 43 and 44 can serve as leads to develop a novel class of antiangiogenic agents [105] (Fig. 37).

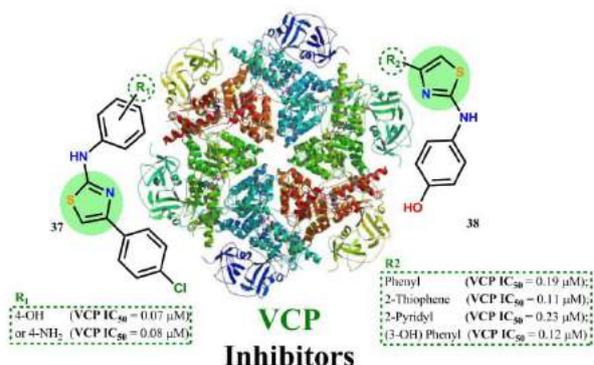


Fig. 34. Structures compounds 37 and 38. Source of VCP structure <http://www.rcsb.org/structure/3CF3>.

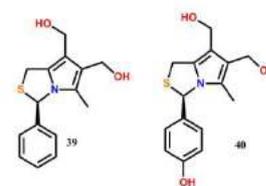


Fig. 35. Structures compounds 39 and 40.

The known Tiazofurin stereoisomer and two new tiazofurin analogues (45 and 46) have been synthesized and evaluated for their *in vitro* antitumor activity against some human neoplastic cell lines (K562, HL-60, Jurkat, Raji, HeLa and MRC-5). Compounds 45 and 46 demonstrated submicromolar activities toward four tumor cell lines (K562, HL-60, Jurkat and HeLa). The derivatives 45 and 46 were more active than tiazofurin against all tested cells. Flow cytometry data suggest that cytotoxic effects of analogue 45 in K562 might be mediated by apoptosis, in opposite to tiazofurin, which did not induce apoptosis of K562 cells after 24 h. The results suggest a mechanism of action through the inhibition of IMPDH [106] (Fig. 38).

Piperazine-benzothiazole derivatives were analyzed for cytotoxicity effect against DLA (Dalton's lymphoma ascites) cells under *in-vitro* for 48 h to check the cytotoxicity by using Trypan blue, MTT and LDH release assays. The compound 47 emerged as a potent cytotoxic activity. More assays were performed, such as *in-vivo* proliferation and angiopreventive effect of compound 47 on tumorigenic and non-tumorigenic models. Tumor inhibition in murine ascites on treatment with 6c showed regression of the tumor reflected in the decreased secretion of the ascites up to 55.6% and three-fold decreases in cell number. Compound 47 exhibited also a significant angiolysis in tumor-induced peritoneum than the control peritoneum which was highly vascularized. About SAR, the study indicated the importance of Bromine atom in the phenyl ring [107] (Fig. 39).

A series of 2-(4-benzoyl-phenoxy)-N-(4-phenyl-thiazol-2-yl)-acetamides were synthesized by Prashanth et al. The study revealed that the potent tumor inhibition of compound 48 is related to its capacity for inhibition of VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) and potent cytotoxic activity against EAC cells. The IC₅₀ values are in Fig. 40. The authors suggest that the effect of 48 could be due to methyl, fluoro and methoxy groups which are attached to phenoxy, benzoyl and the phenyl ring of thiazole respectively. Compound 48 inhibits the tumor progression *in vivo* with a dose-dependent decrease of tumor upon treatment with compound 48 intraperitoneally. This effect was reflected in the decreased cell count and ascites volume. The results revealed the abrogated VEGF secretion with 5 fold decrease at protein level after compound 48 treatment. The protein expression of VEGF-A was analyzed by immunoblot, which strongly indicated the potency of compound 48 in VEGF inhibition [101].

The new class of ketobenzothiazole serine protease inhibitors

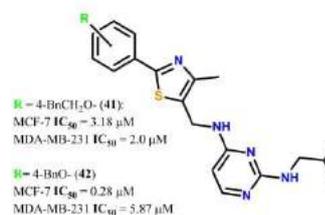


Fig. 36. Structures compounds 41 and 42.



Fig. 37. Structures compounds 43 and 44.

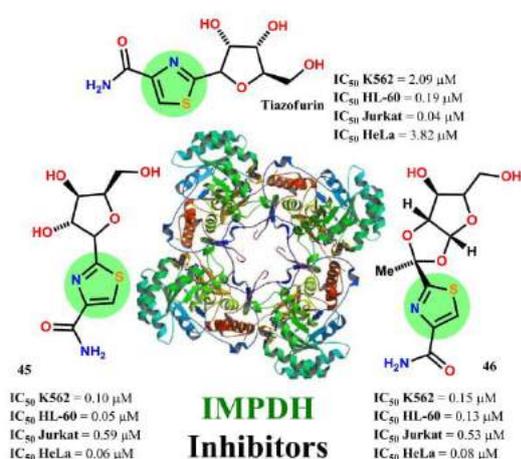
Fig. 38. Structures compounds 45, 46 and Tiazofurin. Source of IMPDH structure: <http://www.rcsb.org/structure/5K4Z>.

Fig. 39. Structure compound 47.

which span the P1–P1' cleavage site of trypsin-like protease substrates was developed. The P1' benzothiazole was constructed with a variety of amide substituents designed to interact specifically in the S3' subsites of HGFA, matriptase, and hepsin. They identified key structural elements that help to improve selectivity among HGFA, matriptase and hepsin as well as selectivity over Factor Xa and thrombin. Analogues such as **49** and **50** are promising leads for further optimization into preclinical candidates to treat and prevent metastasis of multiple tumor types [108] (Fig. 41).

Mao et al. showed that 2-(4-aminophenyl) benzothiazole (**51**) treatment suppresses the invasive and metastasis potential of HeLa DH cervical cells through up-regulation of E-cadherin expression. HeLa DH cervical cells were cultured with 5, 10, 15, 20, 25 and 30 μ M concentrations of compound **51** for 48 h. The benzothiazole treatment did not induce any cytotoxic effect on HeLa DH cells after 48 h of incubation. The results from wound healing assay revealed that potential migration of HeLa DH cells was reduced to 4% on treatment with 20 μ M concentration of benzothiazole compared to 99% in the control cells. The invasion potential of HeLa DH cells was

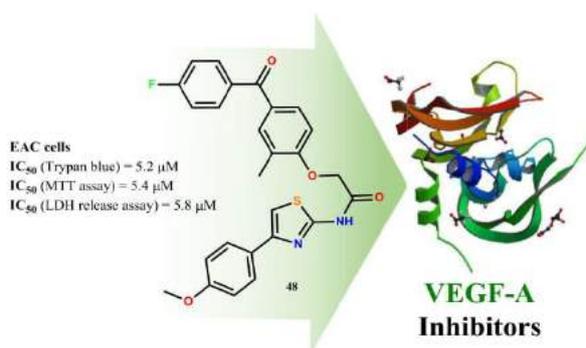
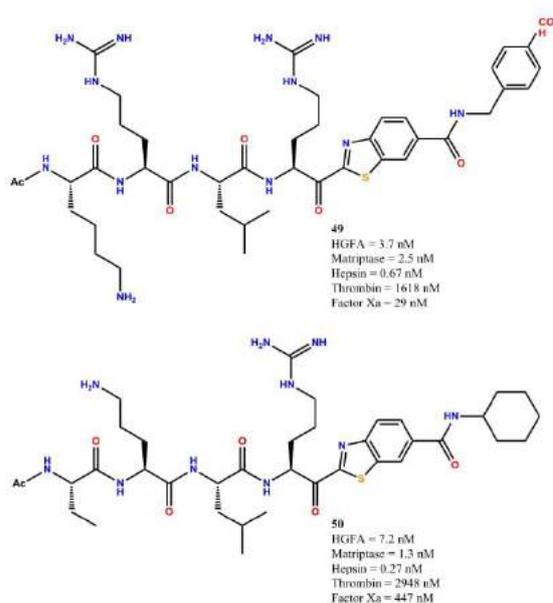
Fig. 40. Structure compound 48. Source of VEGF-A structure: <http://www.rcsb.org/structure/3QTK>.

Fig. 41. Structures 49 and 50.

reduced to 13% on treatment with 20 μ M concentration of benzothiazole. Inhibition of HeLa DH cell migration was also significantly ($p < 0.002$) higher in the benzothiazole treated cell cultures compared to the control cells. HeLa DH cervical cancer cells on treatment with various concentrations of benzothiazole for 48 h showed a significant ($p < 0.05$) increase expression of E-cadherin in a dose-dependent manner. Among the various concentrations of benzothiazole used, western blot assay revealed that the increased expression of E-cadherin was maximum at 20 μ M [109] (Fig. 42).

Some compounds were tested for their ability to inhibit human monoacylglycerol lipase (hMAGL). The halogen substituted aniline derivatives **52** and **53** were found to be the most active among all the synthesized compounds exhibiting IC_{50} values 9 nM and 8 nM respectively. Compounds **52** (NSC: 780167) and **53** (NSC: 780168) were the most potent detected in one dose anticancer screening. With regard to the sensitivity against individual cell lines, both the compounds **52** and **53** were found to be most active against MCF7 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines. The GI_{50} (Growth inhibition of 50%) value of 32.5 nM (MCF7) and 23.8 nM (MDA-MB-468) was observed for compound **52**. Compound **53** showed GI_{50} values

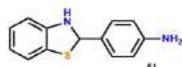


Fig. 42. Structure of 2-(4-aminophenyl) benzothiazole (**51**).

of 37.1 nM against MCF7 breast cancer cell line and 25.1 nM against MDA-MB-468 breast cancer cell line. The results obtained from the Developmental Therapeutics Program, NCI, for compounds **52** and **53** were compared with the standard drug Fluorouracil. In terms of MID GI50 value, both the compounds were found to be comparable with 5-FU, while in terms of MID TGI and MID LC50, both showed greater potency. The overall study confirmed that pharmacological inhibition of MAGL function may confer significant therapeutic benefits and a better safety profile over existing treatments for cancer [110] (Fig. 43).

MMP-2/MMP-8 is established as one of the most important metalloenzymes for targeting cancer. A series of dihydropyrazothiazole derivatives (E1-E18) bearing a salicylaldehyde group linked to Pyrazole ring were designed, synthesized, and evaluated for their pharmacological activity as MMP-2/MMP-8 inhibitors. Compound **54** exhibited the most potent inhibitory activity ($IC_{50} = 2.80 \mu\text{M}$ for MMP-2 and $IC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$ for MMP-8), compared to the positive drug CMT-1 ($IC_{50} = 1.29 \mu\text{M}$). Most of them exhibited more anti-proliferative activities than positive control drugs Gefitinib and Celecoxib, with a highlight for compounds **54** and **55** [111] (Fig. 44).

4-phenyl-thiazole compounds were designed, synthesized and evaluated for their ATX inhibitory activity using FS-3 and human plasma assays. The autotaxin-lysophosphatidic acid (ATX-LPA) signaling pathway is involved in several human diseases such as cancer. In the FS-3 assay, compound **56** significantly inhibited the ATX at low nanomolar level ($IC_{50} = 2.19 \text{ nM}$). Inhibitory activity of **56** was found to be slightly better than PF-8380 ($IC_{50} = 2.80 \text{ nM}$), which is one of the most potent ATX inhibitors reported till date. Furthermore, **56** displayed higher potency ($IC_{50} = 14.99 \text{ nM}$) than the first clinical ATX inhibitor, GLPG1690 ($IC_{50} = 242.00 \text{ nM}$) in the human plasma assay. Molecular docking studies were carried out to explore the binding pattern of newly synthesized compounds within the active site of ATX. Good ATX inhibitory activity of **56** was attributed to the hydrogen bonding interactions with Asn230, Trp275 and active site water molecules; electrostatic interaction with catalytic zinc ion and hydrophobic interactions with amino acids of the hydrophobic pocket [112] (Fig. 45).

Leite et al. showed that 1,3-thiazoles derivatives compounds not only exhibited cytotoxicity in cancer cells but were also able to promote irreversible cancer cell damage by inducing necrosis and apoptosis. Moreover, these compounds regulated immune factors such as interleukin 10 and tumor necrosis factor, possible by



Fig. 43. Structures of **52** and **53**. Source of hMAGL structure: <http://www.rcsb.org/structure/6BQ0>.

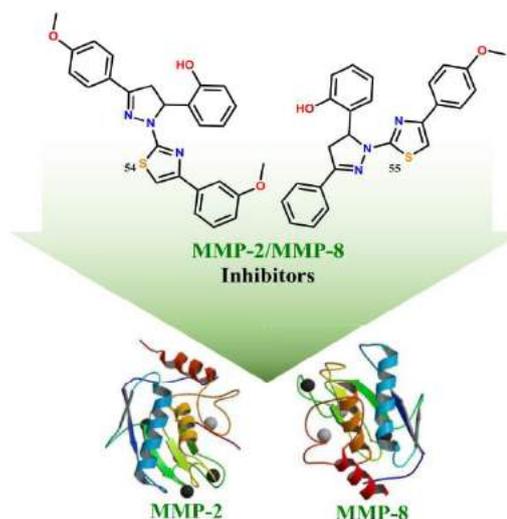


Fig. 44. Structures of **54** and **55** compounds. Source of MMP structures: MMP-2 (<http://www.rcsb.org/structure/3AYU>); MMP-8 (<http://www.rcsb.org/structure/2OY4>).

directing the immune system in favor of modulating cancer cell proliferation. Therefore, they were able to identify new potent and selective anticancer compounds: **57**, **58** and **59** [22] (Fig. 46).

Compound **60** was synthesized and its effects treatment on primary breast cancer and pulmonary metastasis in 4T1 mice model were performed. MTT experiment showed compound **60** had significant anti-cancer activity on diverse cancer cells: C126 (Mouse colon carcinoma cell line), 4T1 (Mouse mammary tumor cell line), LLC (Mouse Lewis lung carcinoma cell line), B16 (Mouse melanoma cell line), MethA (Mouse fibrosarcoma cell line), A549 (Human lung carcinoma cell line), HeLa (Human cervical cancer cell line), DU145 (Human prostate cancer cell line), MM3MG (Mouse mammary normal epithelial cell line), HK2 (Human normal kidney cell line), LO2 (Human normal liver cell line). Furthermore, **60** significantly suppressed the proliferation of 4T1 cells by colony formation assay from 364 ± 46.4 in the untreated 4T1 cells to 189 ± 35.2 and 56 ± 12 , respectively, in 1.25 and 2.5 μM compound **60** [113].

The *in vivo* results displayed that the compound could inhibit the growth and metastasis in the 4T1 model. Histological analysis revealed that **60** treatment induced apoptosis, inhibited *in vivo*

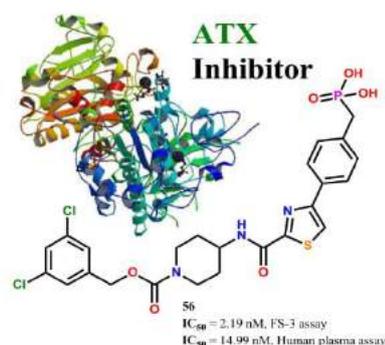


Fig. 45. Structure of compound **56**. Source of ATX structure: <http://www.rcsb.org/structure/5L0K>.

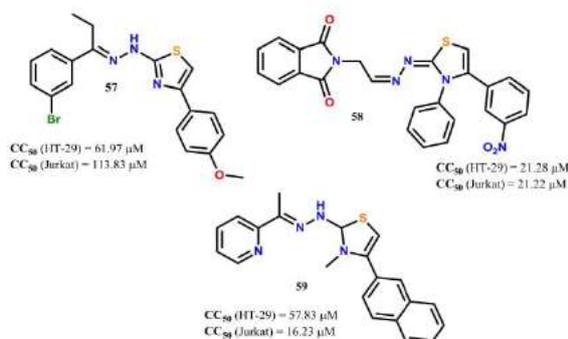


Fig. 46. Structures of 57, 58, 59.

proliferation and angiogenesis [113].

The untreated group had a median of 40.5 metastases/lungs (range, 28–56 metastases). The median of 50 mg/kg compound **60** treated group was only 19.5 metastases/lungs (range, 13–27 metastases). Furthermore, mice treated with 100 mg/kg compound **60** had a median of 6 metastases/lungs (range, 0–8 metastases) and 3 mice with no visible lung metastases were observed in the group treated with 100 mg/kg compound **60**. In addition, compound **60** did not contribute to obvious drug-associated toxicity during the whole study. Molecular mechanism showed that **60** could inhibit RhoGDI, activate caspase-3 and decrease phosphorylated Akt [113] (Fig. 47).

4.6. Thiazoles in clinical trial

Bearing thiazole core, dasatinib is an anticancer drug produced by Bristol-Myers Squibb and sold under the trade name Sprycel [114]. Shah et al. [115] have studied long-term follow-up of dasatinib in a phase-3 study on chronic myeloid leukemia (CML) patients and they demonstrated that imatinib-resistant/intolerant patients with CML-CP can experience long-term benefit with dasatinib therapy. Moreover, there are several studies relating various solid tumors to the use of dasatinib alone, or in combination with another drug. Preclinical studies in a wide variety of solid tumor cell lines, including prostate, breast and glioma, have shown that dasatinib acts as a cytostatic agent, inhibiting the processes of cell proliferation, invasion and metastasis. Dasatinib also inhibits the activity of osteoclasts, which have a major role in the development of metastatic bone lesions [116].

Another compound in phase 1 study is compound **61**, called PTC299 (6-(4-fluorophenyl)-2,3-dihydro-5-(4-pyridinyl)imidazo(2,1-b)thiazole) (Fig. 48). It was postulated that compound **61**, will be tolerable when administered orally and can reduce VEGF in combination with anastrozole (Arimidex[®]), letrozole (Femara[®]) or exemestane (Aromasin[®]) in women with metastatic breast cancer. Another compound is the SNS-032 (**62**) that appears in phase I clinical trials, that is a potent and selective cyclin-dependent kinases (Cdks) inhibitor of Cdk2, Cdk7 and Cdk9 [117]. Xie et al. [118] examined the viability of MCF-7 and MDA-MB-435 breast cancer cells in the presence of SNS-032 and observed a dose-dependent inhibition of cellular proliferation in both cell lines. Moreover, SNS032 is in clinical trial for the treatment of chronic lymphoid leukemia along with multiple myeloma by the intravenous way [119].

5. Conclusions

Privileged motifs are a recurring subject in a wide set of biologically active compounds that achieve different pharmaceutical targets and route. They could represent an appropriate start point

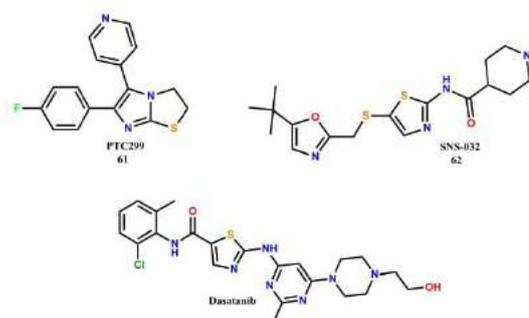
Fig. 47. Structure of compound **60**. Source of RhoGDI structure: <http://www.rcsb.org/structure/1CC0>.

Fig. 48. Thiazoles in clinical trials.

to access potential candidates. Our report was focused on three small privileged motifs that attempt to act on multiple targets and properties known. Thiosemicarbazones, thiazoles and thiazolidinones nucleus has also been utilized to develop synthetic drugs. In the last years, these fragments have been successfully used as the core structures for synthesis in the cancer field. In our search, focusing on metastasis stage, it was possible to observe that they reach several targets such as cathepsins, SRC, TGF- β , EGFR, among others that have also been shown.

Thiosemicarbazones fragments were identified targeting preferentially NDRG1 and Cathepsins B and L, which is involved in diverse tumor pathways. Triapine, a pyridine-thiosemicarbazone derivative, is currently found in clinical trial. This fact, corroborate the value of pyridine-thiosemicarbazone derivatives in cancer therapies. Besides, it is worthy to mention that, the presence of halogen atom, mainly bromine and fluorine, in thiosemicarbazones derivatives allowed to compounds with IC_{50} values in nM order. Regarding the thiazolidinone ring, studies are more limited and in less advanced stages in tumor progression context. The majority of the structures present a N-3 substitution which allowed to $IC_{50} = 0.05 \mu$ M values.

Concerning the thiazole nucleus, it was observed that this nucleus acts in diverse cancer targets and represents the most versatile structure. Thiazole is present in Dasatinib which is already used in cancer therapy, and compound SNS-32, that is currently in clinical trial. In our search, it was possible to verify that thiazole is the most studied and the most important of the three structures. Among the compounds described, several seem to be promising drug candidates, targeting different pathways in cancer cells and seem to be very promising overcoming drug resistance in the field of cancer therapy. Besides, could serve as a valuable inspiration in the search for new effective therapies for cancer in the metastasis stage.

6. Prospects

It is evident from the present review that thiosemicarbazones,

thiazolidinones and thiazoles serve as promising and effective research area with a bright future and can serve as inspiration for future molecules planning. Triapine is an example of this strategy because several compounds synthesized later were inspired by its chemical skeleton. The strategy of bioisosterism between thiosemicarbazones and thiazolidinone and thiazole heterocycles may be useful for the SAR construction in order to find a lead compound, less toxic and more active. The literature also reports that the synthesis of thiazoles and thiazolidinones from thiosemicarbazones is relatively simple and allow to satisfactory yields. It is also noticed that the presence of halogens in the thiosemicarbazones and thiazoles rings were recurrent, as well as the presence of electronegative atoms, collaborating with the improvement of pharmacokinetic properties.

Multi-targeting drugs can act as an important complement or even replace therapeutic treatments that have drug combinations. Multi-target drugs have therapeutic advantages over single-target drugs due to their synergistic effects, making possible a more simplified therapeutic treatment. The importance and necessary care of adverse reactions from the anti-target interactions of these compounds is also highlighted. Faced with complexity and risk, it is necessary to combine the efforts of various areas such as medicinal chemistry, computational chemistry, biochemistry, proteomics, etc. to explore the advantages presented by multi-target drugs. The combination of different areas and disciplines are certainly necessary for the success of this strategy.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

Acknowledgments

Ana Cristina Lima Leite is receiving a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) senior fellowship. Luciana Rabelo holds a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) doctoral scholarship. Paulo A. T. M. Gomes holds a FACEPE researcher fixation scholarship.

References

- [1] B.L. Brücher, I.S. Jamall, Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm, *BMC Canc.* 14 (2014) 331, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-331>.
- [2] H. Rubin, Cancer as a Dynamic Developmental Disorder Cancer as a Dynamic Developmental Disorder, *Cancer Res.* 1985, pp. 2935–2942.
- [3] A.D. Rhim, E.T. Mirek, N.M. Aiello, A. Maitra, J.M. Bailey, F. McAllister, M. Reichert, G.L. Beatty, A.K. Rustgi, R.H. Vonderheide, S.D. Leach, B.Z. Stanger, EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation, *Cell* 148 (2012) 349–361, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>.
- [4] A.P. Morel, G.W. Hinkal, C. Thomas, F. Fauvet, S. Courtois-Cox, A. Wierincx, M. Devouassoux-Shisheboran, I. Treilleux, A. Tissier, B. Gras, J. Pourchet, I. Puisieux, G.J. Browne, D.B. Spicer, J. Lachuer, S. Ansieau, A. Puisieux, EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice, *PLoS Genet.* 8 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002723>.
- [5] X. Ye, R.A. Weinberg, Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression, *Trends Cell Biol.* 25 (2015) 675–686, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.012>.
- [6] D. Tarin, Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance, *Semin. Canc. Biol.* 21 (2011) 72–82, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.12.006>.
- [7] I.J. Fidler, The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited, *Nat. Rev. Canc.* 3 (2003) 453–458, <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.
- [8] Y. Lazebnik, What are the hallmarks of cancer? *Nat. Rev. Canc.* 10 (2010) 232–233, <https://doi.org/10.1038/nrc2827>.
- [9] D. Tarin, Comparisons of metastases in different organs: biological and clinical implications, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1923–1925, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5259>.
- [10] S. Schwitalla, Tumor cell plasticity: the challenge to catch a moving target, *J. Gastroenterol.* 49 (2014) 618–627, <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0943-1>.
- [11] N. Defamie, A. Chepied, M. Mesnil, Connexins, Gap junctions and tissue invasion, *FEBS Lett.* 588 (2014) 1331–1338, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.012>.
- [12] E. Lever, D. Sheer, The role of nuclear organization in cancer, *J. Pathol.* 220 (2010) 114–125, <https://doi.org/10.1002/path>.
- [13] P.S. Steeg, Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges, *Nat. Med.* 12 (2006) 895–904, <https://doi.org/10.1038/nm1469>.
- [14] N.C. Kasuga, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, S. Nakano, N. Shimada, C. Koumo, K. Nomiya, Synthesis, Structural Characterization and Antimicrobial Activities of 12 Zinc (II) Complexes with Four Thiosemicarbazone and Two Semicarbazone Ligands, vol. 96, 2003, pp. 298–310.
- [15] A. Verma, S.K. Saraf, 4-Thiazolidinone - a biologically active scaffold, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 897–905, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.07.017>.
- [16] N. Siddiqui, M.F. Arshad, W. Ahsan, M.S. Alam, Thiazoles, A valuable insight into the recent advances and biological activities, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 1 (2009) 136–143, www.ijpsdr.com.
- [17] G.E. Chavarria, M.R. Horsman, W.M. Arispe, G.D.K. Kumar, S. Chen, T.E. Strecker, E.N. Parker, D.J. Chaplin, K.G. Pinney, M. Lynn, European Journal of Medicinal Chemistry Initial evaluation of the antitumor activity of KGP94, a functionalized benzophenone thiosemicarbazone inhibitor of cathepsin L, *Eur. J. Med. Chem.* 58 (2012) 568–572, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.039>.
- [18] M. Serda, D.S. Kalinowski, N. Rasko, E. Potučková, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, J.G. Malecki, M. Sajewicz, A. Ratuszna, A. Muchowicz, J. Gola, T. Simunek, D.R. Richardson, J. Polanski, Exploring the anti-cancer activity of novel thiosemicarbazones generated through the combination of retro-fragments: dissection of critical structure-activity relationships, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110291>.
- [19] D.R. Magalhaes Moreira, A.D.T. De Oliveira, P.A. Teixeira De Moraes Gomes, C.A. De Simone, F.S. Villela, R.S. Ferreira, A.C. Da Silva, T.A.R. Dos Santos, M.C.A. Brelaz De Castro, V.R.A. Pereira, A.C.L. Leite, Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death, *Eur. J. Med. Chem.* 75 (2014) 467–478, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.001>.
- [20] P.A.T. De Moraes Gomes, M. De Oliveira Barbosa, E. Farias Santiago, M.V. De Oliveira Cardoso, N.T. Capistrano Costa, M.Z. Hernandez, D.R.M. Moreira, A.C. Da Silva, T.A.R. Dos Santos, V.R.A. Pereira, F.A. Brayner Dos Santos, G.A. Do Nascimento Pereira, R.S. Ferreira, A.C.L. Leite, New 1,3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on Trypanosoma cruzi, *Eur. J. Med. Chem.* 121 (2016) 387–398, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.050>.
- [21] G.B. de Oliveira Filho, M.V. de Oliveira Cardoso, J.W.P. Espíndola, L.F.G.R. Ferreira, C.A. de Simone, R.S. Ferreira, P.L. Coelho, C.S. Meira, D.R. Magalhaes Moreira, M.B.P. Soares, A.C. Lima Leite, Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against Trypanosoma cruzi, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 7478–7486, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.048>.
- [22] T.A.R. dos Santos, A.C. da Silva, E.B. Silva, P.A.T. de Moraes Gomes, J.W.P. Espíndola, M.V. de Oliveira Cardoso, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells, *Biomed. Pharma* 82 (2016) 555–560, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.
- [23] Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Sifakak, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5271–5294, <https://doi.org/10.1021/jm900552r>.
- [24] V. Opletalova, D.S. Kalinowski, M. Vejsova, J. Kunes, M. Pour, J. Jampilek, V. Buchta, D.R. Richardson, Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 1878–1889, <https://doi.org/10.1021/tx800182k>.
- [25] J.L. Teitz, Y.A. D. Ronen, A. Vansover, T. Stematsky, Riggs, Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-β-4': 4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-β-4': 4'-diallylthiosemicarbazone, *Antivir. Res.* 35 (1994) 305–314, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.004>.
- [26] N. Bharti, K. Husain, M.T. Gonzalez Garza, D.E. Cruz-Vega, J. Castro-Garza, B.D. Mata-Cardenas, F. Naqvi, A. Azam, Synthesis and in vitro antiprotzoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 3475–3478, [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00703-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00703-5).
- [27] H. Beraldo, Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos, *Quim. Nova* 27 (2004) 461–471, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300017>.
- [28] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, V. Richardson, P.C. Sharpe, D.B. Lovejoy, M. Islam, P.V. Bernhardt, 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones are potent iron chelators and antiproliferative agents: redox activity, iron complexation and characterization of their antitumor activity, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1459–1470, <https://doi.org/10.1021/jm801585u>.
- [29] Z. Chen, D. Zhang, F. Yue, M. Zheng, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, The iron chelators Dp44mT and DFO inhibit TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of N-Myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1), *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 17016–17028, <https://doi.org/10.1074/>

- jbcm1112.350470.
- [30] J. Chao, T.W. Synold, R.J. Morgan, C. Kunos, J. Longmate, H.J. Lenz, D. Lim, S. Shibata, V. Chung, R.G. Stoller, C.P. Belani, D.R. Gandara, M. McNamara, B.J. Gitlitz, D.H. Lau, S.S. Ramalingam, A. Davies, I. Espinoza-Delgado, E.M. Newman, Y. Yen, A phase I and pharmacokinetic study of oral 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in the treatment of advanced-stage solid cancers: a California Cancer Consortium Study, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69 (2012) 835–843, <https://doi.org/10.1007/s00280-011-1779-5>.
 - [31] E.M.H. Yee, M.B. Brandl, D. Stc, O. Vittorio, N. Kumar, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Synthesis of isoflavene-thiosemicarbazone hybrids and evaluation of their anti-tumor activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 27 (2017) 2454–2458, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.002>.
 - [32] B. Janovi, L. Joksovi, M. Vuj, N. Todorovi, *European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis*, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone e thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group Violeta Markovic san Sladi 64 (2013) 228–238, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.071>.
 - [33] L. Feun, M. Modiano, K. Lee, J. Mao, A. Marini, N. Savaraj, P. Plezia, B. Almassian, E. Colacino, J. Fischer, S. MacDonald, Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50 (2002) 223–229, <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0480-0>.
 - [34] J.J. Knox, S.J. Hotte, C. Kollmannsberger, E. Winquist, B. Fisher, E.A. Eisenhauer, Phase II study of Triapine® in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the national cancer institute of Canada clinical trials group (NCIC IND.161), *Investig. New Drugs* 25 (2007) 471–477, <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9044-9>.
 - [35] R.A. Finch, M.C. Liu, A.H. Cory, J.G. Cory, A.C. Sartorelli, Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity, *Adv. Enzym. Regul.* 39 (1999) 3–12, [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(98\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(98)00017-X).
 - [36] J.G. Cory, A.H. Cory, G. Rappa, A. Lorico, M.C. Liu, T.S. Lin, A.C. Sartorelli, Inhibitors of ribonucleotide reductase. Comparative effects of amino- and hydroxy-substituted pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 335–344, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90105-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90105-8).
 - [37] D.S. Kalinowski, C. Stefani, S. Toyokuni, T. Ganz, G.J. Anderson, N.V. Subramaniam, D. Trinder, J.K. Olynyk, A. Chua, P.J. Jansson, S. Sahni, D.J.R. Lane, A.M. Merlot, Z. Kovacevic, M.L.H. Huang, C.S. Lee, D.R. Richardson, Redox cycling metals: pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 727–748, <https://doi.org/10.1016/j.bbmc.2016.01.026>.
 - [38] Y. Wang, W. Gu, Y. Shan, F. Liu, X. Xu, Y. Yang, Q. Zhang, Y. Zhang, H. Kuang, Z. Wang, S. Wang, Design, synthesis and anticancer activity of novel nopinone-based thiosemicarbazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 27 (2017) 2360–2363, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.024>.
 - [39] S. Rodrigues, R.I. De Ávila, P.L. Benficia, L.P. Bringel, C. Maria, A. De Oliveira, F. Vandresen, C. Conceição, M.C. Valadares, 4-Fluorobenzaldehyde limonene-based thiosemicarbazone induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells, *Life Sci.* (18) (2018) S0024–S3205, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.024>, 30205–4.
 - [40] H.N. Higgs, K.J. Peterson, Cathepsin B regulates the intrinsic angiogenic threshold of endothelial cells, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 1–13, <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>.
 - [41] D. Kuester, H. Lippert, A. Roessner, S. Krueger, The cathepsin family and their role in colorectal cancer, *Pathol. Res. Pract.* 204 (2008) 491–500, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2008.04.010>.
 - [42] J.M. Lankelma, D.M. Voorend, T. Barwari, J. Koetsveld, A.H. Van der Spek, A.P.N.A. De Porto, G. Van Rooijen, C.J.F. Van Noorden, Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.* 86 (2010) 225–233, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.11.016>.
 - [43] G.D.K. Kumar, G.E. Chavarria, A.K. Charlton-Sevcik, G.K. Yoo, J. Song, T.E. Strecker, B.G. Siim, D.J. Chaplin, M.L. Trawick, K.G. Pinney, Functionalized benzophenone, thiophene, pyridine, and fluorene thiosemicarbazone derivatives as inhibitors of cathepsin L, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 20 (2010) 6610–6615, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.026>.
 - [44] G.D.K. Kumar, G.E. Chavarria, A.K. Charlton-sevcik, W.M. Arispe, M.T. Macdonough, T.E. Strecker, S. Chen, B.G. Siim, D.J. Chaplin, M. Lynn, K.G. Pinney, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Design, synthesis, and biological evaluation of potent thiosemicarbazone based cathepsin L inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 20 (2010) 1415–1419, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.090>.
 - [45] J. Song, L.M. Jones, G.D.K. Kumar, E.S. Conner, L. Bayeh, G.E. Chavarria, A.K. Charlton-Sevcik, S.E. Chen, D.J. Chaplin, M.L. Trawick, K.G. Pinney, Synthesis and biochemical evaluation of thiochromanone thiosemicarbazone analogues as inhibitors of cathepsin L, *ACS Med. Chem. Lett.* 3 (2012) 450–453, <https://doi.org/10.1021/ml200299g>.
 - [46] R. Murata, M.R. Horsman, Tumour-specific enhancement of thermoradiotherapy at mild temperatures by the vascular targeting agent 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid, *Int. J. Hyperth.* 20 (2004) 393–404, <https://doi.org/10.1080/02656730310001619370>.
 - [47] S. Pathogens, HHS Public Access 1848 (2016) 3047–3054, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.02.010.Cationic>.
 - [48] * Erica N. Parkera, Jiangli Songa, G. D. Kishore Kumara, Samuel O. Odutolab, Gustavo E. Chavarriaa, Amanda K. Charlton-Sevcika, Tracy E. Strecker, Ashleigh L. Barnes, Dhivya R. Sudhanc, Thomas R. Wittenborne, W. Dietmar, d Siemannc, Michael R. Horsman, Da, Synthesis and Biochemical Evaluation of Benzoylbenzophenone Thiosemicarbazone Analogues as Potent and Selective Inhibitors of Cathepsin L, vol. 23, 2016, pp. 1780–1789, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.05.020.Osteoarthritis>.
 - [49] N. Raghav, R. Kaur, Synthesis and evaluation of some semicarbazone- and thiosemicarbazone-based cathepsin B inhibitors, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 4669–4679, <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1036-7>.
 - [50] M.Z. Hernandez, S.M.T. Cavalcanti, D.R.M. Moreira, W.F. de Azevedo Junior, A.C.L. Leite, Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design, *Curr. Drug Targets* 11 (2010) 303–314, <https://doi.org/10.2174/138945010790711996>.
 - [51] D.-H. Bae, P.J. Jansson, M.L. Huang, Z. Kovacevic, D. Kalinowski, C.S. Lee, S. Sahni, D.R. Richardson, The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers, *J. Clin. Pathol.* 66 (2013) 911–917, <https://doi.org/10.1136/clinpath-2013-201692>.
 - [52] Z. Kovacevic, S.V. Menezes, S. Sahni, D.S. Kalinowski, D.H. Bae, D.J.R. Lane, D.R. Richardson, The metastasis suppressor, N-MYC downstream-regulated gene-1 (NDRG1), down-regulates the ErbB family of receptors to inhibit downstream oncogenic signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 1029–1052, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689653>.
 - [53] N.T. V Le, D.R. Richardson, Iron Chelators with High Antiproliferative Activity Up-Regulate the Expression of a Growth Inhibitory and Metastasis Suppressor Gene: a Link between Iron Metabolism and Proliferation, vol. 104, 2017, pp. 2967–2976, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1866.Supported>.
 - [54] Z. Kovacevic, S. Chikhani, G.Y.L. Lui, S. Sivagurunathan, D.R. Richardson, The iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 targets NEDD4L, PTEN, and SMAD4 and inhibits the PI3K and Ras signaling pathways, *Antioxidants Redox Signal.* 18 (2013) 874–887, <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4273>.
 - [55] S. Bandyopadhyay, S.K. Pai, S.C. Gross, S. Hirota, S. Hosobe, K. Miura, K. Saito, T. Commes, S. Hayashi, M. Watabe, K. Watabe, The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer, *Cancer Res.* 63 (2003) 1731–1736, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12702552.
 - [56] B. Strzelczyk, A. Szulc, R. Rzepko, A. Kitowska, J. Skokowski, A. Szutowicz, T. Pawelczyk, Identification of high-risk stage II colorectal tumors by combined analysis of the NDRG1 gene expression and the depth of tumor invasion, *Ann. Surg. Oncol.* 16 (2009) 1287–1294, <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0381-0>.
 - [57] Y. Maruyama, M. Ono, A. Kawahara, T. Yokoyama, Y. Basaki, M. Kage, S. Aoyagi, H. Kinoshita, M. Kuwano, Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis, *Cancer Res.* 66 (2006) 6233–6242, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0183>.
 - [58] B.A. Fang, Z. Kovacevic, K.C. Park, D.S. Kalinowski, P.J. Jansson, D.J.R. Lane, S. Sahni, D.R. Richardson, Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Canc.* 1845 (2014) 1–19, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.11.002>.
 - [59] Z. Kovacevic, S. Chikhani, D. Lovejoy, D. Richardson, Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy, *Mol. Biol.* 80 (2011) 598–609, <https://doi.org/10.1124/mol.111.073627>.
 - [60] X. Wangpu, J. Lu, R. Xi, F. Yue, S. Sahni, K.C. Park, S. Menezes, M.L.H. Huang, M. Zheng, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, Targeting the metastasis suppressor, N-myc downstream regulated gene-1, with novel di-2-pyridylketone thiosemicarbazones: suppression of tumor cell migration and cell-collagen adhesion by inhibiting focal adhesion kinase/paxillin signaling, *Mol. Pharmacol.* 89 (2016) 521–540, <https://doi.org/10.1124/mol.115.103044>.
 - [61] K.M. Dixon, G.Y.L. Lui, Z. Kovacevic, D. Zhang, M. Yao, Z. Chen, Q. Dong, S.J. Assinder, D.R. Richardson, Dp44mT targets the AKT, TGF-β and ERK pathways via the metastasis suppressor NDRG1 in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells, *Br. J. Canc.* 108 (2013) 409–419, <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.582>.
 - [62] D.J. Lane, T.M. Mills, N.H. Shafie, A.M. Merlot, R. Saleh Moussa, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, Expanding horizons in iron chelation and the treatment of cancer: role of iron in the regulation of ER stress and the epithelial–mesenchymal transition, *BBA - Rev. Canc.* 1845 (2014) 166–181, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.005>.
 - [63] Y. Yen, K. Margolin, J. Doroshov, M. Fishman, B. Johnson, C. Clairmont, D. Sullivan, M. Szol, A phase I trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone in combination with gemcitabine for patients with advanced cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54 (2004) 331–342, <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0821-2>.
 - [64] M.J. Mackenzie, D. Saltman, H. Hirte, J. Low, C. Johnson, G. Pond, M.J. Moore, A phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium, *Investig. New Drugs* 25 (2007) 553–558, <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9066-3>.
 - [65] B. Ma, B.C. Goh, E.H. Tan, K.C. Lam, R. Soo, S.S. Leong, L.Z. Wang, F. Mo, A.T.C. Chan, B. Zee, T. Mok, A multicenter phase II trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine?) and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer with pharmacokinetic evaluation using

- peripheral blood mononuclear cells, *Investig. New Drugs* 26 (2008) 169–173, <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9085-0>.
- [66] O.M. Odenike, R.A. Larson, D. Gajria, M.E. Dolan, S.M. Delaney, T.G. Karrison, M.J. Ratain, W. Stock, Phase I study of the ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AP) in combination with high dose cytarabine in patients with advanced myeloid leukemia, *Investig. New Drugs* 26 (2008) 233–239, <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9115-6>.
- [67] C.M. Nutting, C.M.L. van Herpen, A.B. Miah, S.A. Bhide, J.-P. Machiels, J. Buter, C. Kelly, D. de Raucourt, K.J. Harrington, Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma, *Ann. Oncol.* 20 (2009) 1275–1279, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn775>.
- [68] C.A. Kunos, T. Radivoyevitch, S. Waggoner, R. Debernardo, K. Zanotti, K. Resnick, N. Fusco, R. Adams, R. Redline, P. Faulhaber, A. Dowlati, Radiochemotherapy plus 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in advanced-stage cervical and vaginal cancers, *Gynecol. Oncol.* 130 (2013) 75–80, <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.04.019>.
- [69] A.C. Tripathi, S.J. Gupta, G.N. Fatima, P.K. Sonar, A. Verma, S.K. Saraf, 4-Thiazolidinones, The advances continue, *Eur. J. Med. Chem.* 72 (2014) 52–77, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.017>.
- [70] J. Wu, L. Yu, F. Yang, J. Li, P. Wang, W. Zhou, L. Qin, Y. Li, J. Luo, Z. Yi, M. Liu, Y. Chen, Optimization of 2-(3-(arylalkyl amino carbonyl) phenyl)-3-(2-methoxyphenyl)-4-thiazolidinone derivatives as potent antitumor growth and metastasis agents, *Eur. J. Med. Chem.* 80 (2014) 340–351, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.068>.
- [71] B.J. Nolen, N. Tomasevic, A. Russell, D.W. Pierce, Z. Jia, C.D. McCormick, J. Hartman, R. Sakowicz, T.D. Pollard, Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex, *Nature* 460 (2009) 1031–1034, <https://doi.org/10.1038/nature08231>.
- [72] F. Yang, S. Peng, Y. Li, L. Su, Y. Peng, J. Wu, H. Chen, M. Liu, Z. Yi, Y. Chen, A hybrid of thiazolidinone with the hydroxamate scaffold for developing novel histone deacetylase inhibitors with antitumor activities, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 1727–1735, <https://doi.org/10.1039/C5OB02250A>.
- [73] A. Gandolovicová, D. Rosel, M. Fernandes, P. Veselý, P. Heneberg, V. Čermák, L. Petruželka, S. Kumar, V. Sanz-Moreno, J. Brábek, Migrastatics—anti-metastatic and anti-invasion drugs: promises and challenges, *Trends in Cancer* 3 (2017) 391–406, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.008>.
- [74] A. Ayati, S. Emami, A. Asadipour, A. Shafiee, A. Foroumadi, Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 699–718, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.015>.
- [75] M.A. Gouda, M.A. Berghot, G.E.A. El-ghani, A.M. Khalil, *European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and antimicrobial activities of some new thiazole and pyrazole derivatives based on 4, 5, 6, 7-tetrahydrobenzothioephene moiety*, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1338–1345, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.020>.
- [76] S.K. Bharti, G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, *European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2, 4-disubstituted thiazole ring*, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 651–660, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.008>.
- [77] Z. Xu, M. Ba, H. Zhou, Y. Cao, C. Tang, Y. Yang, *European Journal of Medicinal Chemistry 2, 4, 5-Trisubstituted thiazole derivatives: a novel and potent class of non-nucleoside inhibitors of wild type and mutant HIV-1 reverse transcriptase*, *Eur. J. Med. Chem.* 85 (2014) 27–42, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.072>.
- [78] R.S. Giri, H.M. Thaker, T. Giordano, J. Williams, D. Rogers, V. Sudersanam, K.K. Vasu, *1-(3-aryl-3H-quinazolin-4-one derivatives as inhibitors of NF- κ B and AP-1 mediated transcription activation and as potential anti-inflammatory agents*, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2184–2189, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.10.031>.
- [79] E.D.F. Santiago, A. De Oliveira, B. De Oliveira, R. Magalhaes, *Evaluation of the Anti-Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles 58* (2014) 352–363, <https://doi.org/10.1128/AAC.01900-13>.
- [80] S.R. Shiradkar, M. G. Venkata, S. Kumar, V. Dasai, S. Tatikonda, ChakravarthyAK, *Clubbed thiazoles: a novel approach to antitubercular drugs*, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 807–816.
- [81] M. Reig, R. Bosque, C. Calvis, R. Messegueur, L. Baldomà, J. Badía, D. Velasco, C. López, *A study of the properties, reactivity and antitumor activity of novel N-methylated-3-thiazolyl or 3-thienyl carbazoles and their Pd(II) and Pt(II) complexes*, *J. Inorg. Biochem.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.008>. #pagerange#.
- [82] D. Das, P. Sikdar, M. Bairagi, *Recent developments of 2-aminothiazoles in medicinal chemistry*, *Eur. J. Med. Chem.* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.022>.
- [83] S. Gross, C. Lengauer, K.P. Hoefflich, S. Gross, R. Rahal, N. Stransky, C. Lengauer, K.P. Hoefflich, *Targeting Cancer with Kinase Inhibitors Find the Latest Version: Targeting Cancer with Kinase Inhibitors*, vol. 125, 2015, pp. 1780–1789, <https://doi.org/10.1172/JCI76094.genomically>.
- [84] D. Kim, J.H. Choi, J. An, H. Soon, *Synthesis and biological evaluation of 5-(pyridin-2-yl) thiazoles as transforming growth factor- β type I receptor kinase inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 18 (2008) 2122–2127, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.01.084>.
- [85] M. Krishnaiah, C. Hua, D. Sreenu, V. Bala, K. Sudhakar, D. Son, H. Park, S. Won, Y. Yhong, D. Kim, *Synthesis and biological evaluation of 2-benzylamino-4(5)-(6-methylpyridin-2-yl)-5(4)-([1,2,4]triazolo[1,5-a]-pyridin-6-yl)thiazoles as transforming growth factor- β type I receptor kinase inhibitors*, *Eur. J. Med. Chem.* 57 (2012) 74–84, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.011>.
- [86] R. Lin, S.G. Johnson, P.J. Connolly, S.K. Wetter, E. Binnun, T.V. Hughes, W. V. Murray, N.B. Pandey, S.J. Moreno-mazza, M. Adams, A.R. Fuentes-pesquera, S.A. Middleton, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters analogues as antitumor epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 19 (2009) 2333–2337, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.067>.
- [87] K.R.W. Ngoei, D.C.H. Ng, P.R. Gooley, D.P. Fairlie, M.J. Stoermer, M.A. Bogoyevitch, *Biochimica et Biophysica Acta Identification and characterization of bi-thiazole-2, 2'-diamines as kinase inhibitory scaffolds*, *BBA - Proteins Proteomics* 1834 (2013) 1077–1088, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.02.001>.
- [88] C.M. Francini, L. Fallacara, R. Artusi, L. Mennuni, A. Calgani, A. Angelucci, S. Schenone, M. Botta, *Identification of Aminoimidazole and Aminothiazole Derivatives as Src Family Kinase Inhibitors*, vol. 2, 2015, pp. 2027–2041, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500428>.
- [89] Y. Jia, C.M. Quinn, S. Kwak, R.V. Talanian, *Current in Vitro Kinase Assay Technologies: the Quest for a Universal Format*, 2008, pp. 59–69.
- [90] A. Fallah-tafti, A. Foroumadi, R. Tiwari, A. Nasrolahi, D.G. Hangauer, Y. Bu, T. Akbarzadeh, K. Parang, A. Sha, *European Journal of Medicinal Chemistry Thiazolyl N-benzyl-substituted acetamide derivatives: Synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities* 46 (2011) 4853–4858, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.050>.
- [91] A. Andreani, M. Graniola, A. Leoni, A. Locatelli, R. Morigi, M. Rambaldi, L. Varoli, D. Lannigan, J. Smith, D. Scudiero, S. Kondapaka, R.H. Shoemaker, *Imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones as RSK2 inhibitors* [1], *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4311–4323, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.001>.
- [92] X. Xie, H. Li, J. Wang, S. Mao, M. Xin, S. Lu, Q. Mei, S. Zhang, *Synthesis and anticancer effects evaluation of*, *Bioorg. Med. Chem.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.013>.
- [93] M.B. Labib, J.N. Philoppes, P.F. Lamie, E.R. Ahmed, *Bioorganic Chemistry Azole-hydrazone derivatives: design, synthesis, in vitro biological evaluation, dual EGFR/HER2 inhibitory activity, cell cycle analysis and molecular docking study as anticancer agents*, *Bioorg. Chem.* 76 (2018) 67–80, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.016>.
- [94] L.A. Amos, C.H.S. Aylett, J. Lo, *New Insights into the Mechanisms of Cytomotive Actin and Tubulin Filaments*, first ed., Elsevier Inc., 2011 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386033-0.00001-3>.
- [95] K.H. Downing, E. Nogales, *Tubulin Structure: Insights into Microtubule Properties and Functions*, 1998, pp. 785–791.
- [96] A.N. Sravanthi Devi Guggilapu, Lalita Guntuku, T. Srinivasa Reddy, B.N.B. Dileep Kumar Sigalappali, V.G.M. Naidu, Suresh K. Bhargava, *Synthesis of thiazole linked indolyl-3-glyoxyamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors*, *Eur. J. Med. Chem.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.025>.
- [97] D. Van Damme, *The Role of Dynamic Instability in Microtubule Organization*, vol. 5, 2014, pp. 1–10, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00511>.
- [98] M.O.S. Andrea E. Prota, Katja Bargsten, Didier Zurwerra, Jessica J. Field, José Fernando Díaz, Karl-Heinz Altmann, *Molecular Mechanism of Action of Microtubule-Stabilizing Anticancer Agents* 339 (2013) 587–591.
- [99] F. Sultana, S. Reddy, V.G. Reddy, V.L. Nayak, R. Akunuri, S. Rani, A. Alarifi, M.S. Kumar, A. Kamal, *Bioorganic Chemistry Synthesis of benzo [d] imidazo [2 , 1 - b] thiazole-chalcone conjugates as microtubule targeting and apoptosis inducing agents*, *Bioorg. Chem.* 76 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.019>.
- [100] F. Wang, Z. Yang, Y. Liu, L. Ma, Y. Wu, L. He, M. Shao, K. Yu, W. Wu, Y. Pu, C. Nie, L. Chen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Synthesis and biological evaluation of diarylthiazole derivatives as antimetabolic and antivascular agents with potent antitumor activity*, *Bioorg. Med. Chem.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.055>.
- [101] Y. Hussein, E. Mohammed, V.H. Malojirao, P. Thirusangu, M. Al-ghorbani, B.T. Prabhakar, S.A. Khanum, *Graphical abstract SC*, *Eur. J. Med. Chem.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.082>.
- [102] M.G. Bursavich, D.P. Parker, J.A. Willardsen, Z. Gao, T. Davis, K. Ostanin, R. Robinson, A. Peterson, D.M. Cimbroa, J. Zhu, B. Richards, *Bioorganic & medicinal chemistry letters protein (VCP or p97)*, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 20 (2010) 1677–1679, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.058>.
- [103] K. Santos, M. Laranjo, A. Margarida, A.F. Brito, C. Gonçalves, A. Bela, S. Ribeiro, M.F. Botelho, M.L.L. Soares, A.S.R. Oliveira, T.M.V.D. Pinho, *European Journal of Medicinal Chemistry Targeting triple-negative breast cancer cells with 6, 7-bis (hydroxymethyl) -1 H , 3 H -pyrrolo [1 , 2 - c] thiazoles*, *Eur. J. Med. Chem.* 79 (2014) 273–281, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.008>.
- [104] W. Zhou, A. Huang, Y. Zhang, Q. Lin, W. Guo, Z. You, Z. Yi, M. Liu, Y. Chen, *European Journal of Medicinal Chemistry Design and optimization of hybrid of 2, 4-diaminopyrimidine and arylthiazole scaffold as anticancer cell proliferation and migration agents*, *Eur. J. Med. Chem.* 96 (2015) 269–280, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.027>.
- [105] S. Bhat, J. Sup, J.O. Liu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Tricyclic thiazoles are a new class of angiogenesis inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 23 (2013) 2733–2737, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.067>.
- [106] V. Kojic, M. Svirc, G. Bogdanovic, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and in Vitro Antitumour Screening of 2-(B - D -xylofuranosyl)*

- Thiazole- 4-carboxamide and Two Novel Tiazofurin Analogues with Substituted Tetrahydrofurodioxol Moiety as a Sugar Mimic, vol. 22, 2012, pp. 6700–6704, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.093>.
- [107] M. Al-ghorbani, G.S. Pavankumar, P. Naveen, P. Thirusangu, B.T. Prabhakar, S.A. Khanum, Correspondence Author , Bioorg. Chem. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.02.006>.
- [108] Z. Han, P.K.W. Harris, P. Karmakar, T. Kim, B.Y. Owusu, S.A. Wildman, L. Klampfer, J.W. Janetka, A -ketobenzothiazole serine protease inhibitors of aberrant HGF/c-MET and MSP/RON kinase pathway signaling in, *Cancer* 1 (2016) 585–599, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500600>.
- [109] W. Liu, X. Zhang, J. Zhao, J. Li, Z. Cui, X. Mao, Inhibition of cervical cancer cell metastasis by benzothiazole through up-regulation of E-cadherin expression, *Microb. Pathog.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.050>.
- [110] O. Afzal, S. Akhtar, S. Kumar, R. Ali, M. Jaggi, S. Bawa, AC SC, *Eur. J. Med. Chem.* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.038>.
- [111] Z. Wang, F. Shen, M. Yang, L. Xia-you, Dihydropyrazothiazole as potential MMP-2/MMP-8 inhibitors for cancer therapy, *Bioorg. Med. Chem. Lett* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.004>.
- [112] A. Balupuri, D.Y. Lee, M.H. Lee, S. Chae, E. Jung, Y. Kim, J. Ryu, N.S. Kang, Design, synthesis, docking and biological evaluation of 4-phenyl-thiazole derivatives as autotaxin (ATX) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.022>.
- [113] X. Hu, S. Li, Y. He, P. Ai, S. Wu, Y. Su, Antitumor and antimetastatic activities of a novel benzothiazole- 2-thiol derivative in a murine model of breast cancer 8 (2017) 11887–11895.
- [114] J. Das, P. Chen, D. Norris, R. Padmanabha, J. Lin, R. V Moquin, Z. Shen, L.S. Cook, A.M. Doweiko, S. Pitt, S. Pang, D.R. Shen, Q. Fang, H.F. De Fex, K.W. McIntyre, D.J. Shuster, K.M. Gillooly, K. Behnia, G.L. Schieven, J. Wityak, J.C. Barrish, 2-Aminothiazole as a Novel Kinase Inhibitor Template . Structure - Activity Relationship Studies (Dasatinib , BMS-354825) as a Potent pan -Src Kinase Inhibitor, 2006, pp. 6819–6832, <https://doi.org/10.1021/jm060727j>.
- [115] N.P. Shah, F. Guilhot, J.E. Cortes, C.A. Schiffer, P. Coutre, H. Brümmendorf, H.M. Kantarjian, A. Hochhaus, P. Rouselot, Long-term Outcome with Dasatinib after imatinib Failure in Chronic-phase Chronic Myeloid Leukemia: Follow-Up of Phase 3 Study, 2018, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532341>.
- [116] J. Araujo, C. Logothetis, Dasatinib, A potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors, *Cancer Treat Rev.* 36 (2010) 492–500, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.02.015>.
- [117] E.I. Heath, K. Bible, R.E. Martell, D.C. Adelman, P.M. Lorusso, A Phase 1 Study of SNS-032 (Formerly BMS-387032), a Potent Inhibitor of Cyclin-dependent Kinases 2 , 7 and 9 Administered as a Single Oral Dose and Weekly Infusion in Patients with Metastatic Refractory Solid Tumors, vol. 032, 2008, pp. 59–65, <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9090-3>.
- [118] G.U.I.E. Xie, H. Tang, S. Wu, J. Chen, J. Liu, C.A.N. Liao, The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor SNS-032 Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells via Depletion of Mcl-1 and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein and Displays Antitumor Activity in Vivo, 2014, pp. 804–812, <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2467>.
- [119] W. Tong, R. Chen, W. Plunkett, D. Siegel, R. Sinha, R.D. Harvey, A.Z. Badros, L. Popplewell, S. Coutre, J.A. Fox, K. Mahadocon, T. Chen, P. Kegley, U. Hoch, W.G. Wierda, Phase I and pharmacologic study of SNS-032 , a potent and selective Cdk2 , 7 , and 9 inhibitor, in: Patients with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia and Multiple Myeloma, 2010, p. 28, <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.1347>.

APÊNDICE B

Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi profile of the novel 4-thiazolidinone and 1,3-thiazole derivatives

Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* profile of the novel 4-thiazolidinone and 1,3-thiazole derivatives

de Siqueira LRP¹, de Oliveira Barbosa M¹, Oliveira AR¹, de Moraes Gomes PAT¹, de Oliveira Filho GB^{1,2}, de Oliveira Cardoso MV³, Pereira VRA⁴, da Silva Santos AC⁴, Júnior PAS⁵, Romanha AJ⁵ and Leite ACL^{1*}

¹Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

²Coordenação do Curso de Farmácia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada-PE, Brazil

³Laboratório de Prospecção de Moléculas Bioativas, Universidade de Pernambuco, 56328-903, Petrolina, PE, Brazil

⁴Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420, Recife, PE, Brazil

⁵Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30.190-002, MG, Brazil

Abstract

Chagas disease is a serious public health problem in Brazil and world. Caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, it is estimated 6-7 million people infected worldwide. The only drug used to treatment is Benznidazole, but this drug is only effective in the acute phase of the disease. This paper reports the synthesis and the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 4-thiazolidinone and 1,3-thiazole derivatives based in thiosemicarbazones previously described as potent trypanocidal agent, planned through the bioisosterism strategy. Therefore, the synthesis of 28 aryl-4-thiazolidinones (**2a-r** and **3a-j**) was achieved, which aryl ring possesses halogens atoms in *meta* and *para* positions, and the heterocyclic system had lipophilic substituents. These compounds were thus evaluated as anti-*T. cruzi* agents against epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. Compounds were also tested its toxicity in L929 fibroblasts. In view to investigate a bioisosteric relationship between 1,3-thiazoles and 4-thiazolidinones, eighteen 1,3-thiazoles derived from trifluoromethyl thiosemicarbazone (**4a-r**) were also tested in the same model. It was possible to show that between the 46 tested compounds, those that possess a bromine (**2a-r**) atom showed better activity compared to compounds substituted by a trifluoromethyl group (**3a-j**) and to 1,3-thiazole derivatives (**4a-r**), which were inactive. In general, the **2a-r** series showed low toxic profile in the cell line tested. Besides, compound **2h** was the most active of then all when compared to the standard Benznidazole.

Introduction

Chagas disease or American Trypanosomiasis is a serious disease resulting from parasitic infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and triatomine insects as vectors [1,2]. About 7 million people are infected worldwide and Latin America countries are endemic areas. It is estimated that 30% of chronically infected people develop cardiac disorders and up to 10% develop digestive, neurological or mixed changes that may require special treatment [1-3].

Currently, the only drugs used in Chagas disease therapy are Benznidazole (BZD) and nifurtimox, which are effective in the acute phase of the disease, but less effectivity in patients in the chronic phase, presenting only palliative effect [2,4-7]. Furthermore, BZD is not considered a suitable drug, since exhibits serious side effects such as hypersensitivity, rash, gastrointestinal disorder etc., leading to a large number of patients interruption the treatment [2,8]. Therefore, the search for new drugs and bioactive molecules more selective is pivotal.

Among the chemical structures studied for anti-*T. cruzi* activity, hydrazones and 4-thiazolidinones are notable because of their extensive biological activity [9-18], especially anti-parasitic activities [10,16-20]. Some papers already published investigated bioactive compounds against Chagas disease, however, a noticeable paper published by 21, identified twenty aryl thiosemicarbazones as potent anti-*T. cruzi* drug prototypes, with IC₅₀ values below 200 nM for *T. cruzi* cruzain [21]. Among these compounds previously evaluated, 3'-bromopropiophenone-

thiosemicarbazone (**1i**) and 3-(trifluoromethyl)thiosemicarbazone (**3d**) were identified as leading compounds (Figure 1).

In this context, it is well noticed that several drugs and drug candidates in clinical development possess halogen atoms in their structures [7,22]. In fact, they contribute favorably through a molecular interaction in the stabilization of the protein-ligand complex. In addition, synthesis of fluorine, chlorine, and bromine derivatives are well known in industrial scale and possess desirable stability and cost [23].

In the last few years, our research group had been used the building-block strategy in view to optimize the antiparasitical profile. Recently, the 1,3-thiazole core was obtained from 3'-bromopropiophenone-thiosemicarbazone and trifluoromethyl-thiosemicarbazone in view to access new lead generation of anti-*T.*

*Correspondence to: Ana Cristina Lima Leite, Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil, E-mail: acllb2003@yahoo.com.br

Key words: chagas disease, Anti-*T. cruzi* agents, thiosemicarbazone, 1,3-thiazoles, 4-thiazolidinones

Received: January 25, 2019; **Accepted:** February 15, 2019; **Published:** February 20, 2019

cruzi agents. In fact, most of these compounds exhibited antiparasitic activity similar to BZD [24] (Figure 1).

Bearing in mind the bioisosteric relationship between 1,3-thiazole and 4-thiazolidinone cores and by the promising results obtained by Moraes (2016) and Du (2002), in this work, our group presents two series of 4-thiazolidinones, derived by 3'-bromopropiophenone-thiosemicarbazone and 3-(trifluoromethyl)thiosemicarbazone (**2a-r** and **3a-j**, respectively), in view to achieve novel and more selective candidates against *T. cruzi*. In this approach, 28 compounds were synthesized with variations lipophilic groups inserted at N3 and C5 positions of the 4-thiazolidinone ring. In addition, these compounds were evaluated for their trypanocidal potential in the epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of the parasite, and their cytotoxicity was tested in L929 fibroblast cells. Analyzing the activity against the three *T. cruzi* forms is important in an attempt to clarify the mechanism of action of compounds. In view to make a structure-activity biological profile between 1,3-thiazole and 4-thiazolidinone nucleus, we also evaluated the anti-*T. cruzi* properties of eighteen 1,3-thiazoles derived from (trifluoromethyl)thiosemicarbazone (**4a-r**).

Results and discussion

Chemistry

For the synthesis of the desired compounds, the procedures previously reported by 10,25 were followed. First, the thiosemicarbazones **1d** and **1e** were prepared by reacting commercially available thiosemicarbazide or methyl thiosemicarbazide, with 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (1:1 mol ratio) using ethanol, under reflux, in the presence of catalytic amount of hydrochloric acid, for 3 hours. After the final reaction, water was added for precipitation of the compounds. This reaction led to a

satisfactory yield (85% for compound **1d** and 94% for compound **1e**). The thiazolidin-4-ones (**3a-j**) were prepared by cyclization of compounds **1d** or **1e** and respective acid/ester, under reflux for 24 hours. The precipitate was filtered in Büchner funnel, washed with cold ethanol, and then dried over SiO₂. The yields were satisfactory (>40%). The synthesis of **4a-r** series is described by [25].

In view to set up the structural planning of the 4-thiazolidinone series **2a-r** and **3a-j**, the aimed perspectives were based on followed points: a) the choice of the halogen (bromine or fluorine), positions to be inserted (*meta* or *para*) in the aryl ring, employing 3-bromophenyl propanone or 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde; b) the lipophilic and steric profile of the substituents at C5 position, adopting different esters; c) attachment of a methyl or phenyl group at nitrogen N3 by applying 4-methyl or 4-phenyl-thiosemicarbazide. About the ethyl group present at R₂ position in the series **2a-r** coming from the ketone used (Scheme 1). Therefore, two thiazolidinones series were synthesized: **2a-r** and **3a-j**. For synthesis of desired compounds (Scheme 1), it was followed procedures previously described by [10].

Regarding 1,3-thiazole series (**4a-r**), variations were made in the group linked to 4 position of the thiazole ring, through the insertion of aromatic rings with different substitutions in ortho, meta and para positions (Figure 2). The synthesis of series **4a-r** followed the procedures described by de Oliveira [26], and is described by 25. The chemical structures of compounds were determined by nuclear magnetic resonance (NMR, ¹H, and ¹³C), infrared (I.R.) and mass spectra (HR-MS), while purity was determined by elemental analysis (EA).

Biological evaluation

The *in vitro* anti-*T. cruzi* activity of compounds for epimastigote, trypomastigote and amastigote *T. cruzi* forms was evaluated, and

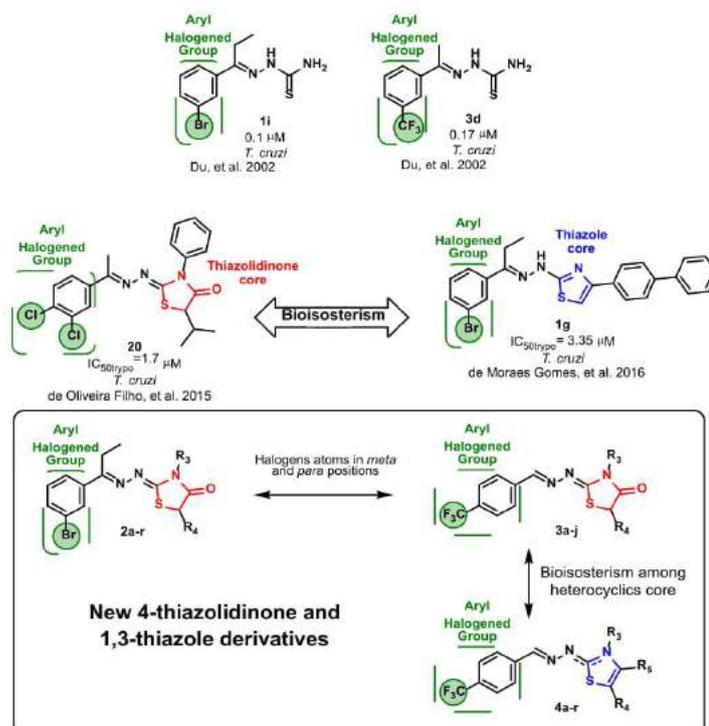
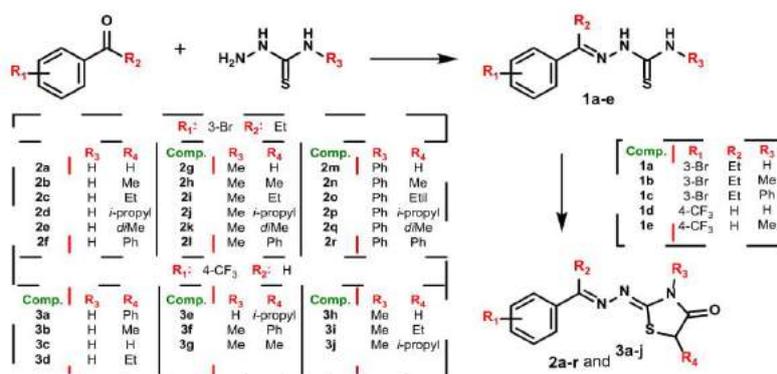


Figure 1. The influence of halogen groups in the anti-*T. cruzi* activity and proposed compounds in this work (**2a-r**, **3a-j** and **4a-r**). [10,21,23,24]



Scheme 1. Synthetic procedures of 4-thiazolidinones derivatives

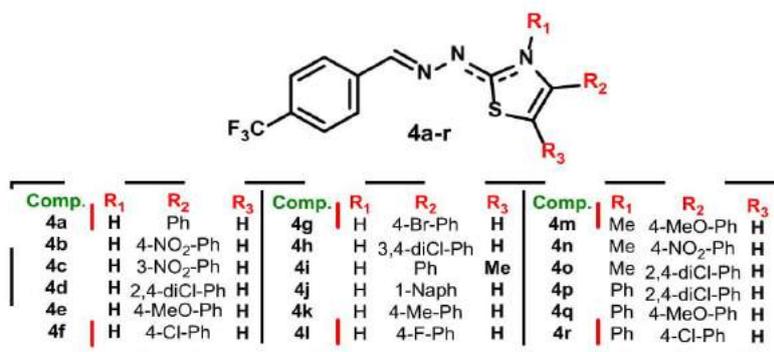


Figure 2. Series 4a-r, variations in the group linked to 4 position of the thiazole ring

their toxicity was evaluated in L929 fibroblasts. Among the tested compounds, the series 2a-r showed the best results when compared with 3a-j series. The 2a-r series possess a bromine atom at the position 3 of the aryl ring system and the 3a-j series possess a trifluoromethyl group at position 4 of aryl ring system.

In recent studies [24] a series of 1,3-thiazoles derived from 3-(bromopropiophenone) thiosemicarbazone were synthesized and their results demonstrated similar activity to BZD (*T. cruzi* trypomastigote form). Furthermore, compounds possessing halogens in their structure (fluorine and bromine), in general, exhibit interesting biological activities and interactions [23] in perspective of these promising outcomes, we decided to explore the anti-*T. cruzi* potential of bromine (series 2a-r) and trifluoromethyl group (series 3a-j) 4-thiazolidinone derivatives.

Considering the trypanocidal activity of the intermediates 1a-e, and the series 2a-r and 3a-j, for trypomastigote form, the intermediate thiosemicarbazones 1b and 1c, with IC₅₀ = 5.0 μM and IC₅₀ = 2.3 μM, respectively, presented the best results of all tested compounds. Regarding the series 2, compounds 2n (IC₅₀ = 3.7 μM), 2l (IC₅₀ = 7.9 μM), and 2d (IC₅₀ = 8.1 μM) draw attention, all of them had anti-*T. cruzi* activity against trypomastigote form similar to BZD, however, no correlation of structural features can be drawn.

For series 3, which possesses the core thiazolidine-4-one, the compound 3d (IC₅₀ = 7.8 μM) was the most active of 3 series. The insertion of an group containing halogen at the para position (series

3a-j), was not beneficial for the activity against the trypomastigote form when compared to series 2a-r.

Considering the inhibitory activity of amastigote forms for the entire series, only compound 2h was active, being more potent than BZD, with an IC₅₀ = 2.4 μM. The notable feature of compound 2h is, besides Br atom present at the position 3 of the aryl ring, 4-thiazolidinone ring, possess a methyl group in N3 position and a methyl group in C5.

About the substitutions in N3 it was noticed that the insertion of the methyl group was responsible for the increase the activity. Also, between the compounds 2a, 2g, and 2m, it was possible to verify that the methyl group is pivotal to the reduction of IC₅₀.

The compounds 1a-e, thiosemicarbazones that originated the respective 4-thiazolidinones, can be observed that intermediates 1a and 1d, which possess H in R₃, presented the best IC₅₀ values for amastigote form, suggesting that the presence of hydrogen bonds donors in the structure may be of interest for improving the biological activity in the amastigote form.

When we compare the trypanocidal activity in amastigote, the cyclic 4-thiazolidinone derivatives 2g (IC₅₀=12.2μM) and 2h (IC₅₀=2.4μM) were about 4 and 21-folds respectively more active than intermediate compound 1b (IC₅₀=51.1μM). The same trend was observed to compound 2p (IC₅₀=48.5μM) approximately 2-folds more potent than intermediate 1c (IC₅₀=89.1μM).

In general, the compounds substituted at the N3 position of the 4-thiazolidinone ring with methyl, for the sub-series 2, were active against amastigote form (2g, 2h, 2j, 2k). It is interesting to note that, in contrast to our previous work [10], the 4-thiazolidinones of the present work, with phenyl in the N3 position were not the most active, with the exception of compound 2n ($IC_{50\text{trypo}} = 3.7 \mu\text{M}$), which has a methyl group in C5 of the heterocyclic ring.

Described by [23], within the class of drugs that present halogen atom in their structure, those that possess a fluoride, are in greater quantity since the fluorination changes the physical, chemical and conformational parameters. This feature could eventually result in optimized pharmacological properties. The fluorine chemistry provides

good opportunities for enhancing the binding affinity of potential drug candidates. These features have made the trifluoromethyl (CF_3) useful chemical groups in the contemporary drug design [27]. Within this observation, we can say that the molecules which present trifluoromethyl (CF_3) group in their structure (1d-e and 3a-j), were not the most active, as expected when compared to the series presenting the halogen bromine (1a-c and 2a-r).

In the sub-series 3, five compounds were active against trypomastigote form: 3b ($IC_{50} = 61.9 \mu\text{M}$), 3c ($IC_{50} = 22.4 \mu\text{M}$), 3d ($IC_{50} = 7.8 \mu\text{M}$), 3e ($IC_{50} = 39.3 \mu\text{M}$) and 3j ($IC_{50} = 59.3 \mu\text{M}$), with highlight 3d compound. In the amastigote form, three compounds were active: 3a ($IC_{50} = 43.2 \mu\text{M}$), 3c ($IC_{50} = 121.8 \mu\text{M}$) and 3j ($IC_{50} = 22.4 \mu\text{M}$). Contrary to

Table 1. Determination of cytotoxicity in *T. cruzi* and fibroblast cells

Cpd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Epimastigote IC ₅₀ [μM] ¹	Trypomastigote IC ₅₀ [μM] ²	Amastigote IC ₅₀ [μM] ³	Fibroblast CC ₅₀ [μM]	SI
1a	3-Br	Et	H	-	28.7	31.8	5.7	70.1	12.2
1b	3-Br	Et	Me	-	ND	5.0	51.1	267.5	5.2
1c	3-Br	Et	Ph	-	6.8	2.3	89.1	110.7	1.2
1d	4-CF ₃	H	H	-	ND	20.2	<10.11	80.89	>8
1e	4-CF ₃	H	Me	-	ND	191.4	-	-	Inactive
1f	4-CF ₃	H	Ph	-	20.0	13.8	45.77	61.85	1.4
2a	3-Br	Et	H	H	82.6	146.9	-	-	Inactive
2b	3-Br	Et	H	Me	ND	33.7	80.2	235.9	2.9
2c	3-Br	Et	H	Et	66.8	23.8	-	-	Inactive
2d	3-Br	Et	H	<i>i</i> -propyl	ND	8.1	-	-	Inactive
2e	3-Br	Et	H	<i>dt</i> Me	65.2	89.0	13.3	< 226.6 ^b	< 17
2f	3-Br	Et	H	Ph	140.7	17.8	89.5	199.4	2.2
2g	3-Br	Et	Me	H	ND	23.7	12.2	117.9	9.6
2h	3-Br	Et	Me	Me	ND	18.8	2.4	56.6	23
2i	3-Br	Et	Me	Et	ND	55.5	-	-	Inactive
2j	3-Br	Et	Me	<i>i</i> -propyl	46.0	113.9	79.5	< 524.8 ^b	< 6.6
2k	3-Br	Et	Me	<i>dt</i> Me	69.6	46.3	175.7	217.9	1.2
2l	3-Br	Et	Me	Ph	119.7	7.9	-	-	Inactive
2m	3-Br	Et	Ph	H	78.0	15.3	-	-	Inactive
2n	3-Br	Et	Ph	Me	ND	3.7	-	-	Inactive
2o	3-Br	Et	Ph	Et	42.2	60.1	-	-	Inactive
2p	3-Br	Et	Ph	<i>i</i> -propyl	ND	ND	48.5	< 112.8 ^b	< 2.3
2q	3-Br	Et	Ph	<i>dt</i> Me	12.4	50.3	168.7	> 186.4 ^b	> 1.1
2r	3-Br	Et	Ph	Ph	ND	53	-	-	Inactive
3a	4-CF ₃	H	H	Ph	ND	ND	43.2	55	1.3
3b	4-CF ₃	H	H	Me	ND	61.9	-	-	Inactive
3c	4-CF ₃	H	H	H	ND	22.4	121.8	139.2	1.1
3d	4-CF ₃	H	H	Et	ND	7.8	-	-	Inactive
3e	4-CF ₃	H	H	<i>i</i> -propyl	ND	39.3	-	-	Inactive
3f	4-CF ₃	H	Me	Ph	ND	ND	-	-	Inactive
3g	4-CF ₃	H	Me	Me	ND	ND	-	-	Inactive
3h	4-CF ₃	H	Me	H	ND	ND	-	-	Inactive
3i	4-CF ₃	H	Me	Et	ND	ND	-	-	Inactive
3j	4-CF ₃	H	Me	<i>i</i> -propyl	22.4	59.3	22.4	58.2	2.6
BZD	-	-	-	-	48.8	6.3	3.8	2381	625

Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$): ^b < 50; ¹⁰ < 80; ¹⁰⁰ > 80; ¹⁰⁰⁰ > 200. IC₅₀: Concentration that inhibit by 50% the growth of *T. cruzi*. CC₅₀: Concentration capable of causing cytotoxic effect on 50% of mammalian cells. CC₅₀ and IC₅₀ values were calculated using concentrations in triplicate and experiment was repeated, only values with a standard deviation < 10% mean were considered. SI¹¹ (Selectivity Index): CC₅₀ of mammalian cells / IC₅₀ *T. cruzi*. BZD: Benznidazole; Inactive: Compound was not active at any tested dose

series 2, structural characteristic is a methyl in N3 is not beneficial for series 3. The sub-series 2 had the most active compounds substituted in N3 by a methyl, generally, the most active compound being **2h** (Table 1).

Regarding the 1,3-thiazole series, three compounds had lower IC_{50} values for the amastigote form of *T. cruzi*, compounds **4b** (IC_{50} = 9.9 μ M), **4d** (IC_{50} = 5.3 μ M) and **4h** (IC_{50} = 8.9 μ M), they have very electronegative groups attached to the aromatic ring bound to the 1,3-thiazole as a characteristic, however, all compounds presented a very low selectivity index (Table 2). Two of these compounds (**4d** and **4h**) have in common the presence of two chlorines in the aromatic ring bound to the 1,3-thiazole. One at 2 and 4 positions (**4d**) and the other at 3 and 4 positions (**4h**), which may indicate that di-substitution with

halogens in the aromatic ring may be beneficial for anti-*T. cruzi* activity, this data corroborates with that recently observed by 10,26.

Figure 3 below summarizes the pharmacological structure-activity relationships observed in this work.

Physicochemical properties

We also evaluated the physicochemical properties to determine if they are compliant with the Lipinski's rule [28,29]. This rule has important determinants to providing better pharmacokinetics and analyses promising future drug development. For this purpose, physicochemical and ADME properties were calculated using the SwissADME (a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-

Table 2. Determination of cytotoxicity in *T. cruzi* and fibroblast cells

Cpd	R ₁	R ₂	R ₃	Epimastigote IC_{50} [μ M] ¹	Trypomastigote IC_{50} [μ M] ²	Amastigote IC_{50} [μ M] ³	Fibroblast CC_{50} [μ M]	SI
4a	H	Ph	H	24.3	83.06	-	-	Inactive
4b	H	4-NO ₂ -Ph	H	79.1	71.75	9.93	25.48	2.6
4c	H	3-NO ₂ -Ph	H	32.7	80.87	13.50	50.97	3.8
4d	H	2,4-diCl-Ph	H	10.6	53.84	5.28	12.01	2.3
4e	H	4-MeO-Ph	H	6.9	9.65	52.99	>105.99	>2
4f	H	4-Cl-Ph	H	25.0	42.76	19.64	>209.53	>10.7
4g	H	4-Br-Ph	H	8.5	80.33	17.82	46.92	2.6
4h	H	3,4-diCl-Ph	H	29.6	40.75	8.88	24.02	2.7
4i	H	Ph	Me	10.9	79.36	-	-	Inactive
4j	H	1-Naph	H	24.4	88.70	-	-	Inactive
4k	H	4-Me-Ph	H	27.5	78.53	-	-	Inactive
4l	H	4-F-Ph	H	10.6	32.98	22.71	54.74	2.4
4m	Me	4-MeO-Ph	H	18.6	57.52	51.09	>51.09	>1
4n	Me	4-NO ₂ -Ph	H	83.7	169.66	49.21	>196.86	>4
4o	Me	2,4-diCl-Ph	H	NT	NT	11.62	<22.24	<1.9
4p	Ph	2,4-diCl-Ph	H	NT	NT	10.11	<20.22	<2
4q	Ph	4-MeO-Ph	H	NT	NT	-	-	Inactive
4r	Ph	4-Cl-Ph	H	NT	NT	-	-	Inactive
BZD	-	-	-	48.8	6.3	3.8	2381	626.6

Concentration (μ g/ μ L): ⁱ < 50; ⁱⁱ < 80; ⁱⁱⁱ > 80; ^{iv} < 200. IC_{50} : Concentration that inhibit by 50% the growth of *T. cruzi*, CC_{50} : Concentration capable of causing cytotoxic effect on 50% of mammalian cells, CC_{50} and IC_{50} values were calculated using concentrations in triplicate and experiment was repeated, only values with a standard deviation < 10% mean were considered. SI^v (Selectivity Index): CC_{50} of mammalian cells / IC_{50} *T. cruzi*
 BZD: Benznidazole; Inactive: Compound was not active at any tested dose

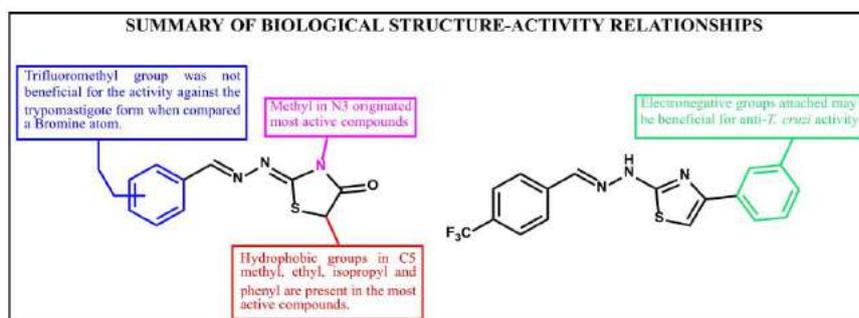


Figure 3. Below summarizes the pharmacological structure-activity relationships observed in this work

likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules). Compound obeying at least three of the four criteria are considered to adhere the Lipinski Rule [29]. All synthesized compounds are compatible with Lipinski Rule. Another interesting property is the number of rotatable bonds and the polar surface area (PSA). A large number of rotatable bonds (≥ 10) has been associated with poor oral bioavailability [30]. Compounds with a low PSA ($\leq 140 \text{ \AA}^2$) tend to have higher oral bioavailability [30,31]. All synthesized compounds have appropriate PSA and number of rotatable bonds (Table 3 and Table 4).

As demonstrated in Table 5, the most active compounds shown variable permeability based on gastrointestinal absorption (GI), according to the BOILED-Egg predictive model (Brain Or Intestinal EstimateD permeation method). Three compounds showed high gastrointestinal absorption (1a, 2h and 2n). With respect to oral bioavailability, it's expected 0.55 of the probability of oral bioavailability score $> 10\%$ in the rat for all compounds, similar to BZD. All these data, suggests a good in silico drug-likeness profile and great chemical stabilities for all compounds synthesized.

Conclusion

This study has synthesized, characterized and identified 46 new heterocyclic compounds, based on previous results. These compounds

were assayed against epimastigote, trypomastigote, and amastigote forms of *T. cruzi*, as well as their toxicity in L929 fibroblasts. For epimastigote form, the most active compound was 4e. Towards trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, the most active heterocycle compounds identified in this study were 2n (most active against trypomastigote form) and 2h (most active against amastigote form). The findings of this research provide insights into valuable strategies of synthesis and Structure-Activity relationships (SAR) for the planning of new anti-*T. cruzi* drugs candidates.

Experimental

General

Most the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Berlin, Germany) or Alfa-Aesar (Massachusetts, USA). Reactions in ultrasound bath were performed in a Unique EM-804 TGR instrument, with a frequency of 40 kHz and a nominal power of 180 W, without external heating. Precoated aluminum sheets (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) were used for thin layer chromatography (TLC) and spots were visualized under UV light. IR spectra in KBr pellets were acquired at Bruker FT-IR spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR were recorded on a UnityPlus 400 MHz and Bruker AMX-300 MHz spectrometer, using DMSO-d₆ as a solvent and tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. Splitting patterns were defined as s,

Table 3. Physicochemical property profile of thiazolidinone derivatives, calculated by Property Calculator (<https://mucle.com/apps/property-calculator/>)

Cpd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MW (g/mol) <500	Log P o/w <5	H-bond donors <5	H-bond acceptors <10	Violation Lipinski Rule of 5	Rotatable bonds <10	*PSA (Å ²) ≤140
1a	3-Br	Et	H	-	258.14	2.71	2	3	0	4	82.50
1b	3-Br	Et	Me	-	272.17	2.66	2	3	0	5	68.51
1c	3-Br	Et	Ph	-	334.24	4.23	2	3	0	6	68.51
1d	4-CF ₃	H	H	-	247.24	2.96	2	3	0	4	82.50
1e	4-CF ₃	H	Me	-	261.27	2.91	2	3	0	5	68.51
2a	3-Br	Et	H	H	326.21	3.11	1	4	0	3	79.12
2b	3-Br	Et	H	Me	340.24	3.50	1	4	0	3	79.12
2c	3-Br	Et	H	Et	354.27	3.89	1	4	0	4	79.12
2d	3-Br	Et	H	<i>i</i> -propyl	368.29	4.14	1	4	0	4	79.12
2e	3-Br	Et	H	<i>di</i> Me	354.27	3.88	1	4	0	3	79.12
2f	3-Br	Et	H	Ph	402.31	4.85	1	4	0	4	79.12
2g	3-Br	Et	Me	H	340.24	3.06	0	4	0	3	70.33
2h	3-Br	Et	Me	Me	354.27	3.45	0	4	0	3	70.33
2i	3-Br	Et	Me	Et	368.29	3.84	0	4	0	4	70.33
2j	3-Br	Et	Me	<i>i</i> -propyl	382.32	4.09	0	4	0	4	70.33
2k	3-Br	Et	Me	<i>di</i> Me	368.29	4.02	0	4	0	3	70.33
2l	3-Br	Et	Me	Ph	416.34	4.80	0	4	0	4	70.33
2m	3-Br	Et	Ph	H	402.31	4.76	0	4	0	4	70.33
2n	3-Br	Et	Ph	Me	416.34	5.15	0	4	1	4	70.33
2o	3-Br	Et	Ph	Et	430.36	5.54	0	4	1	5	70.33
2p	3-Br	Et	Ph	<i>i</i> -propyl	444.39	5.79	0	4	1	5	70.33
2q	3-Br	Et	Ph	<i>di</i> Me	430.36	5.54	0	4	1	4	70.33
2r	3-Br	Et	Ph	Ph	478.41	6.51	0	4	1	5	70.33
3a	4-CF ₃	H	H	Ph	363.36	4.33	1	4	0	4	79.12
3b	4-CF ₃	H	H	Me	301.29	2.98	1	4	0	3	79.12
3c	4-CF ₃	H	H	H	287.26	2.59	1	4	0	3	79.12
3d	4-CF ₃	H	H	Et	315.32	3.36	1	4	0	4	79.12
3e	4-CF ₃	H	H	<i>i</i> -propyl	329.34	3.61	1	4	0	4	79.12
3f	4-CF ₃	H	Me	Ph	377.39	4.28	0	4	0	4	70.33
3g	4-CF ₃	H	Me	Me	315.32	2.93	0	4	0	3	70.33
3h	4-CF ₃	H	Me	H	301.29	2.54	0	4	0	3	70.33
3i	4-CF ₃	H	Me	Et	329.34	3.32	0	4	0	4	70.33
3j	4-CF ₃	H	Me	<i>i</i> -propyl	343.37	3.56	0	4	0	4	70.33

Table 4. Physicochemical property profile of thiazole derivatives, calculated by Property Calculator (<https://mcule.com/apps/property-calculator>)

Cpd	R1	R2	R3	MW (g/mol) <500	Log P o/w <5	H-bond donors <5	H-bond acceptors <10	Violation Lipinski Rule of 5	Rotatable bonds <10	*PSA (Å²) ≤140
1d	H	-	-	247.24	2.06	2	3	0	4	82.50
1e	Me	-	-	261.27	2.91	2	3	0	5	68.51
1f	Ph	-	-	323.34	4.49	2	3	0	6	68.51
4a	H	Ph	H	349.38	4.80	1	3	0	5	65.52
4b	H	4-NO ₂ -Ph	H	392.36	5.78	1	6	1	6	111.34
4c	H	3-NO ₂ -Ph	H	392.36	5.78	1	6	1	6	111.34
4d	H	2,4-diCl-Ph	H	416.25	6.00	1	3	1	5	65.52
4e	H	4-MeO-Ph	H	377.39	4.71	1	4	0	6	74.75
4f	H	4-Cl-Ph	H	381.80	5.35	1	3	1	5	65.52
4g	H	4-Br-Ph	H	426.26	5.46	1	3	1	5	65.52
4h	H	3,4-diCl-Ph	H	416.25	6.00	1	3	1	5	65.52
4i	H	Ph	Me	361.39	5.01	1	3	1	5	65.52
4j	H	1-Naph	H	397.42	5.85	1	3	1	5	65.52
4k	H	4-Me-Ph	H	361.39	5.01	1	3	1	5	65.52
4l	H	4-F-Ph	H	365.35	4.84	1	3	0	5	65.52
4m	Me	4-MeO-Ph	H	391.41	4.72	0	4	0	5	67.12
4n	Me	4-NO ₂ -Ph	H	406.38	5.14	0	6	1	5	103.71
4o	Me	2,4-diCl-Ph	H	430.27	6.01	0	3	1	4	57.89
4p	Ph	2,4-diCl-Ph	H	492.34	7.47	0	3	1	5	57.89
4q	Ph	4-MeO-Ph	H	453.48	6.17	0	4	1	6	67.12
4r	Ph	4-Cl-Ph	H	457.90	6.81	0	3	1	5	57.89

Table 5. ADME properties of most active compounds

Compound	*BBB permeant	**GI absorption	Bioavailability Score
1a	No	High	0.55
2h	Yes	High	0.55
2n	Yes	High	0.55
4d	No	Low	0.55
BZD	No	High	0.55

*BBB - blood-brain barrier. **GI - Gastrointestinal absorption

singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet. Chemical shift values were given in, ppm. DEPT was employed to confirm the carbon assignment. Melting points were measured using capillaries on a Thomas device Hoover.

Synthesis of intermediate thiosemicarbazones. Example for 3-bromophenyl propylidene hydrazine carbothioamide (1a)

In a round bottom flask for 50 mL, the 3-bromophenyl propanone (0.45 g, 2.12 mmol) was dissolved in 8 mL EtOH, following by the addition of catalytic HCl. The flask was placed in an ultrasound bath (40 kHz, 180 W) and under sonication, 0.23 g (2.12 mmol) of thiosemicarbazide was added in the reaction. After 3 h, distilled water was added, and the precipitate formed was cooled at 0° C and the precipitate was filtered in a Büchner funnel with a sintered disc filter, washed with ethanol and then dried over SiO₂. Colorless crystals were formed in a yield of approximately 70%.

2-(1-(3-bromophenyl)propylidene)hydrazinecarbothioamide (1a)

Yellow crystals; Yield 68%; m.p.(°C) 140-143; Rf: 0.71 (Hexane/ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 3416 (NH), 3202 and 3147 (NH₂), 1598 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 1.01 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃), 2.83 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 7.34 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.52

(d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 8.12 (s, 1H, Ar), 8.34 (s, H, NH), 10.32 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 10.8 (CH₃), 19.1 (CH₂), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 129.0 (CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 133.0 (CH, Ar), 136.2 (CH, Ar), 150.2 (C=N), 179.1 (C=S).

2-(1-(3-bromophenyl)propylidene)-*N*-methylhydrazinecarbothioamide (1b)

Yellow crystals; Yield 81%; m.p.(°C) 143-146; Rf: 0.72 (Hexane/ethyl acetate 8:2). IR (KBr, cm⁻¹): 3290 and 3192 (NH), 1551 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 1.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 2.83 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 3.45 (d, 3H, CH₃-NH), 7.34 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.12 (s, 1H, Ar), 8.51 (br.s, 1H, NH), 10.42 (br.s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: δ 10.7 (CH₃), 19.1 (CH₂), 31.1 (N-CH₃), 122.1 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.2 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 131.7 (CH, Ar), 138.8 (C, Ar), 149.9 (C=N), 178.6 (C=S).

2-(1-(3-bromophenyl)propylidene)-*N*-phenylhydrazinecarbothioamide (1c)

Yellow crystals; Yield 70%; m.p.(°C) 150-151; Rf: 0.60 (Hexane/ethyl acetate 8:2). IR (KBr, cm⁻¹): 3307 and 2971 (NH), 1522 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 1.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 2.90

(q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), 7.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.32 (m, 3H, Ar), 7.53 (m, 3H, Ar), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 8.21 (s, 1H, Ar), 10.12 (s, 1H, NH), 10.73 (s, 1H, ArNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ , ppm: 10.8 (CH₃), 19.4 (CH₂), 122.0 (CH, Ar), 125.4 (CH, Ar), 125.9 (BrC, Ar), 126.1 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 131.9 (CH, Ar), 138.6 (C, Ar), 139.1 (C=N, Ar), 151.1 (C=N), 177.2 (C=S).

4-(trifluoromethylphenyl)methylidene]amino]thiourea (1d)

White crystals; Yield 85%; m.p.(°C) 166-170; Rf:0,41 (hexane/ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 3272.63 (NH), 1698.36 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ , ppm: 3.35 (s, 2H, NH₂), 7.67 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Ar), 7.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Ar), 8.30 (s, 1H, HC=N), 11.60 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ , ppm: 125.3 (C, Ar), 125.3 (C, Ar), 127.7 (C, Ar), 130.0 (C, Ar), 134.5 (C, Ar), 138.1 (C, Ar), 140.2 (C=N), 178.3 (C=S).

3-methyl-1-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]aminothiourea (1e)

White crystals; Yield 94%; m.p.(°C) 234-236; Rf:0,75 (hexane/ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 3158.76 (NH), 1539.93 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ , ppm: 3.02 (d, $J = 4.2$ Hz, 3H, CH₃), 7.76 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Ar), 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 8.69 (s, 1H, HC=N), 11.69 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ , ppm: 30.9 (CH₃), 125.5 (C, Ar), 127.7 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 138.8 (C=N), 177.9 (C=S).

Synthesis of aryl-thiazolinones (2a-2r). Example: 3-bromophenyl propylidene hydrazone - 3,5-dimethylthiazolidin-4-one: (2h):

In a round bottom flask for 50 mL, was added the compound INT-2 (0.61 g, 2.12 mmol), 20 mL of ethanol and anhydrous sodium acetate (0.71 g, 8.28 mmol). After heating for about 15 minutes, methyl 2-bromopropionate was added (0.65 g, 4.24mmol) and the reaction was stirred and refluxed (120° C) for approximately 20 hours (monitored by TLC). The reaction was cooled at 0° C for two days and, subsequently, the powder was separated from the supernatant Buchner funnel with a sintered disc filter, washed with ethanol and then transferred to a desiccator under vacuum. There was obtained a yellow coloured powder with a yield of 92%.

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hydrazono)thiazolidin-4-one (2a)

Recrystallization in toluene afforded white crystals, yield = 22%. M.p. (° C): 142-144. Rf: 0.66 (Toluene/ethyl acetate 7:3). IR (KBr): 3201 (NH), 1601 (C=O), 1507 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 0.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 2.93 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.93 (s, 2H, CH₂), 7.32 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ar), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ar), 7.91 (s, 1H, Ar), 11.92 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): 11.6 (CH₃), 20.7 (CH₂), 32.8 (CH₂, heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.6 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.3 (CH, Ar), 138.8 (C, Ar), 163.5 (C=N), 165.5 (S-C=N), 173.9 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hydrazono)-5-methylthiazolidin-4-one (2b)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 49%. M.p. (° C): 119-121. Rf: 0.68 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 3409 (NH), 1722 (C=O), 1565 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1.02 (t, $J = 7.65$ Hz, 3H, CH₃), 1.53 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃-C5), 2.92

(q, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH₂), 4.14 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.43 (t, $J = 7.95$ Hz, 1H, Ar), 7.62 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, Ar), 7.92 (s, 1H, Ar), 11.82 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): 11.6 (CH₃), 18.6 (CH₂), 20.6 (CH₃, heterocycle), 41.9 (CH, heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.6 (BrC, Ar), 126.2 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 130.8 (CH, Ar), 133.2 (C, Ar), 150.6 (C=N), 163.6 (S-C=N), 176.7 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hydrazono)-5-ethylthiazolidin-4-one (2c)

Recrystallization in toluene afforded yellowish crystals, yield = 58%. M.p. (°C): 116-118. Rf: 0.70 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1714 (C=O), 1613 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 0.93 (m, 6H, CH₃), 1.92 (m, 2H, CH₂-C5), 2.94 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂), 4.12 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.30 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.8 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.92 (s, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): 10.3 (CH₃), 11.6 (CH₂), 20.6 (CH₂), 25.4 (CH₂), 49.2 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.5 (BrC, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 138.9 (C, Ar), 163.0 (C=N), 165.2 (S-C=N), 176.8 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-isopropilthiazolidin-4-one (2d)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 93%. M.p. (° C): 135-137. Rf: 0.74 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 3421 (NH), 1708 (C=O), 1613 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0.92 (m, 9H, CH₃), 2.43 (m, 1H, CH-C5), 2.81 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂), 3.92 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.32 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 7.92 (s, 1H, Ar). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 11.5 (CH₃), 16.3 (CH₃), 17.7 (CH₂), 20.3 (CH₂), 21.3 (CH), 56.5 (CH heterocycle), 121.9 (CH, Ar), 125.1 (BrC, Ar), 128.4 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 131.3 (CH, Ar), 139.6 (C, Ar), 159.5 (C=N), 160.4 (S-C=N), 172.1 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5,5-dimethylthiazolidin-4-one (2e)

Recrystallization in toluene afforded yellowish crystals, yield = 88%. M.p. (° C): 162-164. Rf: 0.45 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1712 (C=O), 1615 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.12 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.74 (s, 6H, CH₃), 2.93 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), 7.23 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, Ar), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 7.93 (s, 1H, Ar). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 11.8 (CH₃), 22.0 (CH₂), 28.0 (CH₃, heterocycle), 28.3 (CH₃, heterocycle), 49.6 (C, heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 122.8 (BrC, Ar), 123.3 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 133.1 (C, Ar), 161.7 (C=N), 166.2 (S-C=N), 175.1 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-phenylthiazolidin-4-one (2f)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 85%. M.p. (°C): 187-189. Rf: 0.82 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1709 (C=O), 1619 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 2.93 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH₂), 5.42 (s, 1H, CH heterocycle), 7.14 (m, 6H, Ar), 7.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.75 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.93 (s, 1H, Ar-Br). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 11.6 (CH₃), 20.7 (CH₂), 51.1 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.2 (BrC, Ar), 125.6 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.3 (C, Ar), 138.7 (C=N), 163.4 (S-C=N), 175.3 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-3-methylthiazolidin-4-one (2g)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 74%. M.p. (°C): 129-131. Rf: 0.72 (Toluene/ethyl acetate 9:1). IR (KBr): 1707 (C=O), 1628 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 1.02 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.84 (m, 2H, CH₂), 2.93 (s, CH₃ heterocycle), 3.34 (s, 3H, N-CH₃), 7.42 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar), 7.93 (s, 1H, Ar). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 11.9 (CH₃), 20.6 (CH₂), 25.4 (CH heterocycle), 49.2 (N-CH₃), 121.9 (CH, Ar), 125.5 (BrC, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 138.9 (C, Ar), 163.0 (C=N), 165.1 (S-C=N), 176.8 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-3,5-dimethylthiazolidin-4-one (2h)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 92%. M.p. (°C): 120-122. Rf: 0.68 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1716 (C=O), 1611 and 1573 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 1.02 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH₃), 1.54 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, CH₃), 2.93 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), 3.34 (s, 3H, N-CH₃), 4.24 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH), 7.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar), 7.93 (s, 1H, Ar). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): 11.4 (CH₃), 18.6 (CH₂), 20.7 (CH₃ heterocycle), 29.5 (N-CH₃), 41.3 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.4 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 163.2 (C=N), 164.9 (S-C=N), 175.1 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-ethyl-3-methylthiazolidin-4-one (2i)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 69%. M.p. (°C): 187-189. Rf: 0.62 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1722 (C=O), 1605 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.04 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH₃), 1.93 (m, 2H, CH₂-C5 heterocycle), 2.93 (q, $J = 3.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.24 (s, 3H, CH₃), 4.24 (q, $J = 3.0$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.44 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 7.93 (s, 1H, Ar). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 10.3 (CH₃), 11.4 (CH₃), 20.8 (CH₂), 25.4 (CH₂), 29.4 (N-CH₃), 48.2 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 163.0 (C=N), 165.2 (S-C=N), 174.2 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-isopropyl-3-methylthiazolidin-4-one (2j)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 92%. M.p. (°C): 136-138. Rf: 0.59 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1716 (C=O), 1611 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 1.02 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH₃), 1.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₃), 2.93 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.34 (s, 3H, N-CH₃), 4.24 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.44 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 7.94 (s, 1H, Ar). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 10.1 (CH₃), 11.2 (CH₃), 11.6 (CH₂), 13.8 (CH), 20.6 (CH₂), 29.1 (N-CH₃), 46.3 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.4 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 163.2 (C=N), 164.9 (S-C=N), 175.1 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-3,5,5-trimethylthiazolidin-4-one (2k)

Recrystallization in toluene afforded yellowish crystals, yield = 31%. M.p. (°C): 133-135. Rf: 0.63 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr):

1715 (C=O), 1608 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 0.93 (t, $J = 5.25$ Hz, 3H, CH₃), 2.54 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH₂), 3.3 (s, 6H, diMe), 5.64 (s, 3H, N3-CH₃), 7.54 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar), 7.93 (s, 1H, Ar). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): 10.4 (CH₃), 11.6 (CH₂), 21.6 (CH₃-N3), 28.3 (CH₃ heterocycle), 29.8 (CH₃ heterocycle), 51.2 (C, heterocycle), 122.7 (CH, Ar), 124.9 (BrC, Ar), 125.4 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 132.6 (C, Ar), 161.6 (C=N), 166.2 (S-C=N), 178.2 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-3-methyl-5-phenylthiazolidin-4-one (2l)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 90%. M.p. (°C): 128-130. Rf: 0.66 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1709 (C=O), 1619 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.93 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂), 5.43 (s, 1H, CH heterocycle), 7.33 (m, 6H, Ar), 7.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.93 (s, 1H, Ar-Br). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 11.6 (CH₃), 13.8 (CH₃), 20.7 (CH₃-N3), 26.3 (CH, heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.2 (BrC, Ar), 125.6 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.3 (C, Ar), 137.0 (C, Ar), 138.7 (C=N), 163.6 (S-C=N), 175.1 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-3-phenylthiazolidin-4-one (2m)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 61%. M.p. (°C): 168-170. Rf: 0.58 (Hexane/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1720 (C=O), 1602 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 2.63 (q, $J = 8.8$ Hz, 2H, CH₂), 4.14 (s, 2H, CH₂ heterocycle), 7.42 (m, 6H, Ar), 7.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.93 (s, 1H, Ar-Br). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 11.3 (CH₃), 21.0 (CH₂), 32.3 (CH₂ heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 135.0 (C, Ar), 138.6 (N3-C, Ar), 164.2 (C=N), 165.3 (S-C=N), 171.8 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-methyl-3-phenylthiazolidin-4-one (2n)

Recrystallization in toluene afforded yellowish crystals, yield = 68%. M.p. (°C): 141-143. Rf: 0.69 (Hexane/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1724 (C=O), 1605 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 2.6 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH₂), 4.44 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.33 (m, 5H, Ar), 7.54 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.63 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.9 (s, 1H, Ar-Br). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 11.3 (CH₃), 18.7 (CH₂), 20.9 (CH₃), 41.3 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 135.0 (C, Ar), 138.6 (N3-C, Ar), 162.9 (C=N), 165.3 (S-C=N), 174.8 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-ethyl-3-phenylthiazolidin-4-one (2o)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 90%. M.p. (°C): 121-123. Rf: 0.68 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1731 (C=O), 1603 (C=N) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.03 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.04 (m, 2H, CH₂), 2.62 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 4.43 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, CH heterocycle), 7.33 (m, 6H, Ar), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar-Br), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-

Br), 7.91 (s, 1H, Ar-Br). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 10.1 (CH₃), 11.3 (CH₃), 21.0 (CH₂), 25.6 (CH₂), 48.2 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 134.9 (CH, Ar), 138.6 (N3-C, Ar), 162.7 (C=N), 165.5 (S-C=N), 173.9 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5-isopropyl-3-phenylthiazolidin-4-one (2p)

Recrystallization in toluene afforded yellowish crystals, yield = 67%. M.p. (°C): 157-159. Rf: 0.55 (Toluene/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1725 (C=O), 1566 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0.82 (m, 6H, CH₃), 1.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃), 2.63 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.12 (m, 1H, CH isopropyl), 4.52 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, CH heterocycle), 7.42 (m, 6H, Ar), 7.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-Br), 7.84 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-Br), 7.93 (s, 1H, Ar-Br). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 10.9 (CH₃), 17.4 (CH₃), 20.8 (CH₂), 26.3 (CH, diMe), 53.9 (CH heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 127.9 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 130.1 (CH, Ar), 130.9 (CH, Ar), 132.9 (CH, Ar), 135.5 (CH, Ar), 138.7 (C, Ar), 139.2 (CH, Ar), 163.0 (C=N), 165.1 (S-C=N), 172.7 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-5,5-dimethyl-3-phenylthiazolidin-4-one (2q)

Recrystallization in toluene afforded yellowish crystals, yield = 40%. M.p. (°C): 122-124. Rf: 0.56 (Hexane/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1732 (C=O), 1606 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.63 (s, 6H, CH₃), 2.63 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 7.42 (m, 6H, Ar), 7.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-Br), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-Br), 7.93 (s, 1H, Ar-Br). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 11.2 (CH₃), 20.9 (CH₂), 27.8 (CH₃, heterocycle), 50.8 (C, heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 135.0 (CH, Ar), 138.5 (C, Ar), 161.7 (C=N), 165.3 (S-C=N), 177.2 (C=O).

2-((1-(3-bromophenyl)propylidene)hidrazono)-3,5-diphenylthiazolidin-4-one (2r)

The washing in ethanol afforded yellow powders, yield = 61%. M.p. (°C): 183-185. Rf: 0.67 (Hexane/ethyl acetate 8:2). IR (KBr): 1728 (C=O), 1602 (C=N) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 5.62 (s, 1H, CH heterocycle), 7.42 (m, 11H, ArH), 7.72 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-Br), 7.93 (s, 1H, Ar-Br). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 11.3 (CH₃), 21.0 (CH₂), 50.2 (CH, heterocycle), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (BrC, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 132.6 (C, Ar), 135.0 (CH, Ar), 136.7 (CH, Ar), 138.5 (CH, Ar), 162.4 (C=N), 165.8 (S-C=N), 172.7 (C=O).

5-phenyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3a)

White crystals; Yield 43%; m.p.(°C) 212-215; Rf: 0.61 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2943.43 (NH), 1723.06 (C=O), 1637.62 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 5.48 (s, 1H, CH thiazolidin-4-one), 7.35-7.39 (m, 5H, Ar), 7.81 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.96 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 8.55 (s, 1H, HC=N), 12.10 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 51.9 (C, thiazolidin-4-one), 122.7 (CF₃), 125.7 (C, Ar), 126.2 (C, Ar), 126.2 (C, Ar), 128.7 (C, Ar), 128.9 (C, Ar), 129.4 (C, Ar), 137.3 (N=C-S), 138.6 (C=N), 155.3 (C=O).

5-methyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3b)

White crystals; Yield 45%; m.p.(°C) 239-241; Rf: 0.71 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2939.54 (NH), 1727.77 (C=O), 1641.83 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 1.51 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 4.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH thiazolidin-4-one), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 8.51 (s, 1H, HC=N), 12.05 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 16.7 (C, CH₃), 42.3 (C, thiazolidin-4-one), 122.7 (CF₃), 125.4 (C, Ar), 125.7 (C, Ar), 128.2 (C, Ar), 130.0 (C, Ar), 130.3 (C=N), 137.3 (N=C-S), 154.9 (C=O).

2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3c)

White crystals; Yield 40%; m.p.(°C) 251-254; Rf: 0.45 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2941.46 (NH), 1710.55 (C=O), 1644.05 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 3.92 (s, 2H, thiazolidin-4-one), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.96 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 8.50 (s, 1H, HC=N), 12.08 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 33.1 (C, thiazolidin-4-one), 122.7 (CF₃), 125.4 (C, Ar), 125.7 (C, Ar), 128.2 (C, Ar), 130.0 (C, Ar), 130.3 (N=C-S), 138.1 (C=N), 154.9 (C=O).

5-ethyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3d)

White crystals; Yield 65%; m.p. (°C) 235-237; Rf: 0.79 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2965.93 (NH), 1714.07 (C=O), 1641.98 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.76-1.86 (m, 1H, CH₂), 1.94-2.02 (m, 1H, CH₂), 4.26 (q, *J* = 8 Hz, 1H, CH thiazolidin-4-one), 7.82 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 7.97 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 8.51 (s, 1H, HC=N), 12.07 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 10.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.3 (C, thiazolidin-4-one), 122.7 (CF₃), 125.4 (C, Ar), 125.7 (C, Ar), 128.2 (C, Ar), 130.0 (C, Ar), 130.3 (N=C-S), 138.0 (C=N), 155.0 (C=O).

5-(propan-2-yl)-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3e)

White crystals; Yield 65%; m.p.(°C) 203-205; Rf: 0.70 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2965.62 (NH), 1722.03 (C=O), 1637.52 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 0.88 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.47-2.50 (m, 1H, CH), 4.32 (d, *J* = 4 Hz, 1H, thiazolidin-4-one), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.80 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 8.50 (s, 1H, HC=N), 12.08 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 16.4 (CH₃), 20.5 (CH₃), 29.9 (CH), 55.2 (C, thiazolidin-4-one), 122.7 (CF₃), 125.7 (C, Ar), 128.2 (C, Ar), 131.0 (N=C-S), 138.2 (C=N), 154.7 (C=O).

3-methyl-5-phenyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3f)

White crystals; Yield 40%; m.p.(°C) 245-248; Rf:0.62 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2943.43 (NH), 1723.06 (C=O), 1637.62 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 3.33 (s, 3H, CH₃), 5.53 (s, 1H, thiazolidin-4-one) 7.35-7.40 (m, 5H, Ar), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.97 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 8.56 (s, 1H, HC=N). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 30.9 (C, CH₃), 51.2 (C, thiazolidin-4-one), 122.7 (C, Ar), 125.4 (C, Ar), 125.7 (CF₃), 125.7 (C, Ar), 128.2 (C, Ar), 128.4 (C, Ar), 128.9 (C, Ar), 129.8 (C, Ar), 130.1 (C, Ar), 130.4 (C, Ar), 136.6 (C, Ar), 137.9 (C, Ar), 155.3 (N=C-S), 64.8 (C=N), 174.7 (C=O).

3,5-dimethyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3g)

White crystals; Yield 42%; m.p.(°C) 114-118; Rf: 0.75 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2939.54 (NH), 1727.77 (C=O), 1641.83 (C=N). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 1.53 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 3.19 (s, 3H, CH₃), 4.29 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, thiazolidin-4-one), 7.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar), 7.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 8.60 (s, 1H, HC=N). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 18.6 (C, CH₃), 29.5 (C, CH₃), 41.4 (C, thiazolidin-4-one), 125.8 (CF₃), 125.7 (C, Ar), 128.3 (C, Ar), 137.9 (C, Ar), 156.2 (C=N), 165.1 (N=C-S), 175.3 (C=O).

3-methyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3h)

White crystals; Yield 45%; m.p.(°C) 156-158; Rf: 0.70 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2941.46 (NH), 1710.55 (C=O), 1644.05 (C=N). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 3.18 (s, 3H, CH₃), 3.99 (s, 2H, thiazolidin-4-one), 7.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.99 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 8.61 (s, 1H, HC=N). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 29.4 (CH₃), 32.2 (CH₂), 38.7 (C, thiazolidin-4-one), 125.7 (CF₃), 125.8 (C, Ar), 128.3 (C, Ar), 138.0 (C, Ar), 156.2 (N=C-S), 166.5 (C=N), 172.3 (C=O).

5-ethyl-3-methyl-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3i)

White crystals; Yield 70%; m.p.(°C) 95.6- 98.9; Rf: 0.62 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2965.93 (NH), 1714.07 (C=O), 1641.98 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 0.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH₃), 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH₃), 1.03-1.09 (m, 1H, CH₂), 1.44-1.62 (m, 1H, CH₂), 1.77-2.07 (m, 1H, CH₂), 3.19 (s, 3H, CH₃), 4.31 (q, *J* = 4.1 Hz, 1H thiazolidin-4-one), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.99 (d, *J* = 8 Hz, 2H, Ar), 8.61 (s, 1H, HC=N). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 10.4 (CH₃), 25.6 (CH₂), 30.9 (CH₂), 49.4 (C, thiazolidin-4-one), 125.4 (CF₃), 125.8 (C, Ar), 127.7 (C, Ar), 128.3 (C, Ar), 137.9 (C, Ar), 139.8 (C, Ar), 156.4 (N=C-S), 165.1 (C=N), 178.0 (C=O).

3-methyl-5-(propan-2-yl)-2-[2-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]hydrazin-1-ylidene]-1,3-thiazolidin-4-one (3j)

White crystals; Yield 50%; m.p.(°C) 97.8-101; Rf: 0.72 (Toluene / ethyl acetate 7:3). IR (KBr, cm⁻¹): 2965.62 (NH), 1722.03 (C=O), 1637.52 (C=N). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.47-2.52 (m, 1H, CH), 4.47 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, thiazolidin-4-one), 7.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 8.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 8.68 (s, 1H, HC=N). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ, ppm: 20.2 (CH₃), 29.3 (CH), 30.9 (CH₃), 54.0 (C, thiazolidin-4-one), 125.5 (CF₃), 125.8 (C, Ar), 128.3 (C, Ar), 130.5 (C, Ar), 1388.3 (C, Ar), 164.9 (N=C-S), 173.8 (C=N), 177.9 (C=O).

Biological activity

Cytotoxicity in mouse L-929 fibroblasts: The active compounds were tested *in vitro* for determination of cytotoxic over L-929 cells using the alamarBlue[®] dye. Were used the same number of cells, time of the cell development and time of compound exposure used for the beta-galactosidase assay. The cells were exposed to compounds (dissolved in DMSO) at increasing concentrations (2.5 µg/mL until 160 µg/mL), starting at an IC₅₀ value of the *T. cruzi*. The compounds were tested in quadruplicate. After 96 h of exposure, alamarBlue[®] was added and the absorbance at 570 and 600 nm was measured 6 h later. The cell viability was expressed as the percentage of difference in the reduction

between treated and untreated cells CC₅₀ values were calculated by linear interpolation and the selectivity index (SI) was determined based on the ratio between CC₅₀ and IC₅₀ values. Controls with uninfected cells, untreated infected cells, infected cells treated with BZD at 3.8 µM (positive control) or DMSO 1% were used.

Anti-*T. cruzi* activity (epimastigote): Epimastigotes (Dm28c strain) grown in LIT media were counted in a hemocytometer and then seeded at 10⁶ cells/well into a 96-well plate. Compounds were dissolved in DMSO and then diluted in LIT medium in a serial dilution (1.23, 3.70, 11.11, 33.33 and 100 µg/mL) and added to respective wells, in triplicate. The final DMSO concentration in the plate was 1%. Plate was incubated for 5 days at 26 °C, aliquots of each well were collected, and the number of viable parasites were counted in a Neubauer chamber and compared to untreated parasite culture. Inhibitory concentration for 50% (IC₅₀) was calculated using nonlinear regression on Prism 4.0 GraphPad software. BZD were used as the reference drug.

Anti-*T. cruzi* activity (trypomastigotes): Metacyclic trypomastigotes were collected from the supernatant of infected LLC-MK2 cells and then seeded at 4 x 10⁵ cells/well in RPMI-1640 medium. All compounds were dissolved in DMSO and then diluted in RPMI-1640 medium in a serial dilution (1.23, 3.70, 11.11, 33.33 and 100 µg/mL) and added to respective wells, in triplicate. The final DMSO concentration was 1%. Plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% of CO₂. Aliquots of each well were collected, and the number of viable parasites was counted in a Neubauer chamber. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures. Cytotoxic concentration for 50% (CC₅₀) was determined using nonlinear regression with Prism 4.0 GraphPad software. BZD were used as the reference drug.

Anti-*T. cruzi* activity (amastigotes/trypomastigotes): *T. cruzi* (Tulahuen strain) expressing the *Escherichia coli* beta-galactosidase gene were grown on a monolayer of mouse L-929 fibroblasts. Cultures assayed for beta-galactosidase activity were grown in RPMI 1640 medium without phenol red plus 10% fetal bovine serum and glutamine. Ninety-six-well tissue culture microplates were seeded with L-929 fibroblasts at 4.0 x 10³ per well in 80 µL and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂. Beta-galactosidase-expressing trypomastigotes were then added at 4.0 x 10⁴ per well in 20 µL. After 2 h, the medium with trypomastigotes that have not penetrated in the cells was discarded and replaced by 200 µL of fresh medium. After 48 h, the medium was discarded again and replaced by 180 µL of fresh medium and 20 µL of test compounds dissolved in DMSO. Each compound was tested in quadruplicate. After 7 days culture development, chlorophenol red beta-D-galactopyranoside at 100 µM and Nonidet P-40 at 0.1% were added to the plates and incubated overnight, at 37 °C. The absorbance was measured at 570 nm in an automated microplate reader. BZD at its IC₅₀ (1 µg/µL = 3.81 µM) was used as positive control. The results are expressed as a percentage of parasite growth inhibition. Two independent experiments were performed.

Statistical analysis: To determine the statistical significance of each group in the *in vitro* experiments, the one-way ANOVA test and the Bonferroni correction for multiple comparisons were used. A *P* value < 0.05 was considered significant. The data are representative of at least two or three experiments run in triplicate.

Acknowledgment

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Ana Cristina Lima Leite is

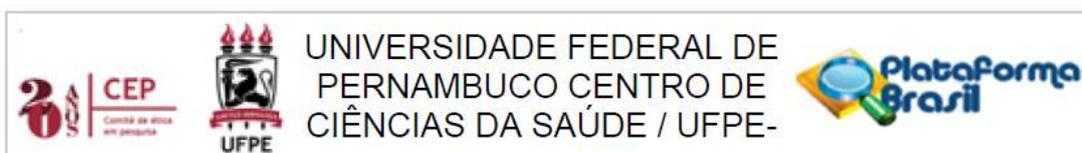
receiving a CNPq senior fellowship. Authors are thankful for the Departamento de Química Fundamental (DQF-UFPE) for recording the ¹H NMR, ¹³C NMR, and IR spectra of compounds and Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for recording LCMS of all compounds. All authors declare no competing financial interest.

References

1. WHO, Chagas disease (American trypanosomiasis).
2. Pérez-Molina JA, Molina I (2018) Chagas disease. *Lancet* 391: 82-94. [Crossref]
3. Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115: 14-21. [Crossref]
4. Urbina JA (2009) New advances in the management of a long-neglected disease. *Clin Infect Dis* 49: 1685-1687. [Crossref]
5. Fabiana S, Jelicks LA, Kirchoff LV, Shirani J, Nagajyothi F (2013) *Cardiol Rev* 20: 53-65.
6. Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, et al. (2009) The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 319-324. [Crossref]
7. Scarim CB, Jornada DH, Chelucci RC, de Almeida L, Dos Santos JL, et al. (2018) Current advances in drug discovery for Chagas disease. *Eur J Med Chem* 155: 824-838. [Crossref]
8. Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, et al. (2010) Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4896-4899. [Crossref]
9. Leite ACL, Santos LMF, Barbosa FF (2006) *Biomed. Pharmacother* 60: 121-126.
10. de Oliveira FGB, de Oliveira MVC (2015) *Bioorg. Med. Chem* 23: 7478-7486.
11. Andres CJ, Bronson JJ, D'Andrea SV, Deshpande MS, Falk PJ, et al. (2000) 4-Thiazolidinones: novel inhibitors of the bacterial enzyme MurB. *Bioorg Med Chem Lett* 10: 715-717. [Crossref]
12. Küçükgüzel SG, Oruç EE, Rollas S, Sahin F, Ozbek A (2002) Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. *Eur J Med Chem* 37: 197-206. [Crossref]
13. Bondock S, Khalifa W, Fadda AA (2007) Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. *Eur J Med Chem* 42: 948-954. [Crossref]
14. Verma A, Saraf SK (2008) 4-thiazolidinone—a biologically active scaffold. *Eur J Med Chem* 43: 897-905. [Crossref]
15. Aubé J (2012) Drug repurposing and the medicinal chemist. *ACS Med Chem Lett* 3: 442-444. [Crossref]
16. Kaiser M, Maes L, Tadoori LP, Spangenberg T, Ioset JR (2015) Repurposing of the open access malaria box for kinetoplastid diseases identifies novel active scaffolds against trypanosomatids. *J Biomol Screen* 20: 634-645. [Crossref]
17. Alvarez G, Varela J (2015) *Antimicrob. Agents Chemother* 59: 1398-1404.
18. Alvarez G, Varela J, Márquez P, Gabay M, Arias Rivas CE, et al. (2014) Optimization of antitrypanosomatid agents: identification of nonmutagenic drug candidates with in vivo activity. *J Med Chem* 57: 3984-3999. [Crossref]
19. GCS, UFD (2009) *Antimicrob. Agents Med. Chem* 8: 345-366.
20. Magalhaes DRM, de Oliveira ADT, de Moraes PATG (2014) *Eur. J. Med. Chem* 75: 467-478.
21. Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, et al. (2002) Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J Med Chem* 45: 2695-2707. [Crossref]
22. Álvarez-Hernández DA, Franyuti-Kelly GA, Diaz-López-Silva R (2018) *Gen. México* 81: 154-164.
23. Hernandez MZ, Cavalcanti SM, Moreira DR, de Azevedo Junior WF, Leite AC (2010) Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr Drug Targets* 11: 303-314. [Crossref]
24. de Moraes PATG, de Oliveira MB, Farias ES, de Oliveira MVC (2016) *Eur. J. Med. Chem* 121: 387-398.
25. de Santana TI, Barbosa MO, Gomes PATM, da Cruz ACN, da Silva TG, et al. (2018) Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. *Eur J Med Chem* 144: 874-886. [Crossref]
26. de Oliveira GBF (2017) *Eur. J. Med. Chem* 141: 346-361.
27. Jagodzinska M, Huguenot F, Candiani G, Zanda M (2009) Assessing the bioisosterism of the trifluoromethyl group with a protease probe. *ChemMedChem* 4: 49-51. [Crossref]
28. CALA (2004) 337-341.
29. Oprea TI, Gottfries J (1999) Toward minimalistic modeling of oral drug absorption. *J Mol Graph Model* 17: 261-274, 329. [Crossref]
30. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, et al. (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 45: 2615-2623. [Crossref]
31. Meanwell NA (2011) Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. *Chem Res Toxicol* 24: 1420-1456. [Crossref]

ANEXO A

Carta de aprovação do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de aril-4-tiazolidinonas

Pesquisador: LUCIANNA RABELO PESSOA DE SIQUEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 77521417.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.361.827