



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

MARIA CECILIA VICENTE ALVES DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTICONVULSIVANTE DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOFTALIMÍDICOS**

Recife
2020

MARIA CECILIA VICENTE ALVES DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTICONVULSIVANTE DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOFTALIMÍDICOS**

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

Área de concentração: Farmácia

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

Coorientador: Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Oliveira, / Maria Cecilia Vicente Alves de

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antiinflamatória e anticonvulsivante de novos derivados tiazofalimídicos / Maria Cecilia Vicente Alves de Oliveira - 2020.

153 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientadora: Marina Galdino da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Tiazolidina 2. Ftalimida 3. Inflamação

I. Pitta, Ivan da Rocha (Orientador) II. Pitta, Marina Galdino da Rocha (Coorientadora) III. Título

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-095

MARIA CECILIA VICENTE ALVES DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTICONVULSIVANTE DE NOVOS DERIVADOS
TIAZOFTALIMÍDICOS**

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

Aprovada em: 30/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Michelly C. Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Drª. Marina Galdino da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Douglas Carvalho Francisco Viana
Universidade Federal de Pernambuco

Aos portadores de doenças inflamatórias e epilepsia que sofrem com os malefícios causados pelas doenças e pelos tratamentos utilizados, merecendo nossos esforços para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, seguros e com menos efeitos não benéficos.

À minha mãe, Josélia Vicente, por me amar de uma forma tão pura e incondicional, me doando a vida. Por ser exemplo de luta e honestidade. E ao meu pai, José Heleno, por seu carinho, amizade e seu exemplo de honestidade e caráter.

Aos meus familiares e em especial a meus dois afilhados, Orlanny e Murilo Vicente, que amo e espero ser exemplo de pessoa para a construção do “eu” deles.

Aos meus amigos, Maria Cristina, Diego Moraes, Andréa França, Rayanne Albuquerque, Tacylla Lima, Layza Lima, Eduarda Maria e Jeann Branco. A amizade de vocês me torna mais forte e mais leve,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta e à Dra. Marina Pitta, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), pela confiança, apoio e ensinamentos durante esses anos de PIBIC e mestrado.

Ao Prof. Dr. Filipe S. Duarte, do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, por ceder seu laboratório e seu tempo, bem como sua orientação e conhecimento passado, contribuindo de forma imprescindível para realização dos testes biológicos *in vivo*.

À Profa. Dra. Michelly Pereira, do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), pela orientação e contribuição para realização dos testes biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Pablo Gualberto, do LINAT, pela sua ajuda, disponibilidade e paciência na realização dos testes biológicos *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Moacyr Rêgo, também do LINAT, pela orientação na realização de um ano de estágio à docência.

Ao lindo Hernando Neto, do LPSF, por sua disponibilidade e ajuda na caracterização dos compostos.

À minha amiga-irmã, Me Tacylla Lima, pela amizade linda que construímos ao longos dos anos (pra vida) e companheirismo que se manteve desde a graduação, em momentos felizes, difíceis e na realização dos testes biológicos.

Ao meu incrível amigo, Me Jeann Branco, pela amizade, conversas e conhecimento passado em nosso ambiente de pesquisa e fora dele também.

Assim como os demais companheiros que se fizeram mais próximos, Me Sandra Elizabeth, Arion Thomaz do LPSF e também ao Dr. Marcel Almeida, por dividirem parte da sua caminhada acadêmica comigo.

À Me Sabrina Barboza, pelos momentos divididos no laboratório e agora fora deles. Por mostrar que há sempre algo bom que podemos tirar de coisas não tão boas assim.

À Samanta Souza, psicóloga clínica, por me ajudar no meu desenvolvimento pessoal e profissional. Provavelmente, sem nossos encontros semanais, eu não teria conseguido me encontrar e melhorar em diversos pontos.

Aos meus pais, Josélia e José Heleno, que sempre me cobriam de amor e apoio as minhas escolhas no caminho que venho traçando na vida. Se sou uma pessoa responsável, honesta e empática devo a eles.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), pelo aprendizado e em especial a Paulo Germano, do PPGIT, por sua paciência e disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) que junto com Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concederam a bolsa ao projeto.

Eu sou um corpo
Um ser
Um corpo só
Tem cor, tem corte
E a história do meu lugar
Eu sou a minha própria embarcação
Sou minha própria sorte.
(LUNA, 2016).

RESUMO

A inflamação é compreendida como o processo de defesa do corpo e embora seja uma resposta natural, pode tomar rumos prejudiciais aos organismos mostrando-se envolvida com diversas patologias, inclusive na epilepsia. A epilepsia é o resultado de um desequilíbrio entre neurotransmissores, cujo o principal sintoma é convulsão. O tratamento medicamentoso dessas doenças é acompanhado de vários efeitos colaterais e no caso da epilepsia, pacientes continuam apresentando convulsão mesmo sob terapêutica. Os dois núcleos ativos, ftalimida e tiazolidina, mostram-se promissores frente as atividades anti-inflamatória e anticonvulsivante. Assim, o planejamento dos derivados híbridos tiazolidina-Ftalimida visa contribuir na busca de novos fármacos. Para tal, dez novos derivados, codificados de LPSF/FT's, foram sintetizados a partir de 3 etapas reacionais. A primeira etapa foi a reação de ciclização que teve como solvente H₂O e os reagentes tiourea/ac. tricloroacético. A segunda etapa foi *n*-alquilação com solvente acetonitrila/metanol e reagentes tiazolidina/ftalmida, obtendo o intermediário LPSF/FT-1. A última etapa foi para obtenção dos compostos finais, através de uma Condensação de Knoevenagel utilizando como solvente o Ácido acético glacial e os reagentes, LPSF/FT-1 e Aldeídos Aromáticos Substituídos. A síntese do intermediário LPSF/FT-1 teve duração média de 3h e rendimento(rdt) de 74%. Enquanto os compostos finais, a duração foi entre 4-24h e o rdt variou de 11-87%. Todos tiveram suas estruturas químicas confirmadas através da utilização das técnicas de MALDI/TOF, RMN ¹H e ¹³C e IV com grau de pureza entre 99-100%. Nenhum dos compostos finais se mostrou citotóxico apresentando viabilidade celular maior que 86%. Todos os 9 compostos demonstraram capacidade de modular IFN-gama e IL-17A, sendo os LPSF/FT-40, LPSF/FT-35 e LPSF/FT-38 foram o que tiveram destaque. O LPSF/FT-40 passou para os testes *in vivo* não demonstrando toxicidade aguda nas concentrações de 300mg/kg e 2000mg/kg. Através do teste de convulsões induzida por pentilenotetrazol, não foi visto a capacidade do LPSF/FT-40 de proteger contra convulsões. Os compostos derivados de tiazolidina-ftalimida demonstram ser moléculas imunomoduladoras em destaque para os LPSF/FT-35, LPSF/FT-38 e LPSF/FT-40.

Palavras-chave: Tiazolidina. Ftalimida. Inflamação. Convulsão.

ABSTRACT

Inflammation is understood as the body's defense process and although it is a natural response, it can take harmful paths to organisms, showing itself to be involved with several pathologies, including epilepsy. Epilepsy is the result of an imbalance between neurotransmitters, the main symptom of which is seizure. The drug treatment of these diseases is accompanied by several side effects and in the case of epilepsy, patients continue to have seizures even under therapy. The two active nuclei, phthalimide and thiazolidine, are promising in the face of anti-inflammatory and anticonvulsant activities. Thus, the planning of thiazolidine-Phthalimide hybrid derivatives aims to contribute in the search for new drugs. To this end, ten new derivatives, encoded in LPSF/FT's, were synthesized from three reaction steps. The first step was the cyclization reaction that had H₂O as solvent and the thiourea/ac. trichloroacetic reagents. The second step was n-alkylation with acetonitrile/methanol solvent and thiazolidine/phthalimide reagents, obtaining the intermediate LPSF/FT-1. The last step was to obtain the final compounds, through a Knoevenagel condensation using glacial acetic acid and the reagents, LPSF/FT-1 and Substituted Aromatic Aldehydes as a solvent. The synthesis of the intermediate LPSF/FT-1 had an average duration of 3 hours and a reduction (rdt) of 74%. As for the final compounds, the duration was between 4-24h and the rdt varied from 11-87%. All of them had their chemical structures confirmed through the use of MALDI/TOF, NMR ¹H and ¹³C and IV techniques with a purity level between 99-100%. None of the final compounds was shown to be cytotoxic with cell viability greater than 86%. All nine compounds demonstrated the ability to modulate IFN-gamma and IL-17A, with LPSF/FT-40, LPSF/FT-35 and LPSF/FT-38 being the highlights. The LPSF/FT-40 passed for in vivo tests, showing no acute toxicity at concentrations of 300mg/kg and 2000mg/kg. Through pentylenetetrazole-induced seizure testing, the ability of LPSF/FT-40 to protect against seizures was not seen. The compounds derived from thiazolidine-phthalimide prove to be immunomodulatory molecules highlighted for LPSF/FT-35, LPSF/FT-38 and LPSF/FT-40.

Keywords: Thiazolidine. Phthalimide. Inflammation. Convulsion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Efeitos colaterais devido a altas doses ou terapia com glicocorticoides prolongados.....	28
Quadro 2 –	Subclassificação dos aines e exemplos de fármacos	30
Gráfico 1 –	Relação de ocorrência da Epilepsia por idade	35
Gráfico 2 –	Condições psiquiátricas de pessoas com epilepsia versus pessoas sem epilepsia.....	36
Gráfico 3 –	Linha do tempo dos fármacos anticonvulsivantes	38
Quadro 3 –	Fármacos tradicionais e seus possíveis efeitos colaterais	42
Esquema 1 –	Formas de obtenção do núcleo da tiazolidina-2,4-diona.....	46
Quadro 4 –	Derivados da tiazolidina-2,4-diona com atividade anti-inflamatória investigada.....	49
Esquema 2 –	Síntese do núcleo da ftalimida.....	51
Quadro 5 –	Derivados da ftalimida com atividade anti-inflamatória investigada	54
Quadro 6 –	Derivados da ftalimida com atividade anticonvulsivante investigada.....	55
Quadro 7 –	Estrutura e radicais dos compostos finais LPSF/FT'S	58
Esquema 3 –	Etapas para obtenção dos derivados tiazoftalimídicos	59
Quadro 8 –	Relação entre a porcentagem de metanol e o rendimento.....	67
Tabela 1 –	Características físico-química dos compostos sintetizados	69
Esquema 4 –	Possível mecanismo de ciclização	71
Esquema 5 –	Possível mecanismo de n-alquilação.....	72
Esquema 6 –	Possível mecanismo de condensação de Knoevenagel.....	73
Tabela 2 –	Valores da média de viabilidade celular e desvio padrão dos LPSF/FT'S finais em PBMC	92
Quadro 9 –	Relação de alguns dos prováveis alvos para os compostos finais e as doenças que os alvos tem ligação.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Síntese dos eicosanoides, os derivados do ácido araquidônico.	22
Figura 2 –	Micróglia, neuroinflamação e ciclo da inflamação crônica.	25
Figura 3 –	Ciclo vicioso da inflamação e epilepsia	26
Figura 4 –	Fármacos aies.....	27
Figura 5 –	Estrutura da aspirina e estrutura geral dos aines.....	29
Figura 6 –	Efeitos colaterais não benéficos associados ao uso prolongados dos aines.	31
Figura 7 –	Classificação das epilepsias segundo o ilae.	33
Figura 8 –	Prevalência global da epilepsia a cada 100 000 habitantes.....	34
Figura 9 –	Fármacos utilizados no tratamento da convulsão.	39
Figura 10 –	Grupo de benzodiazepínicos com potencial antiepilético.....	41
Figura 11 –	Moléculas híbridas com TZD e outros núcleos.	44
Figura 12 –	Moléculas híbridas com ftalimida e outros núcleos.	45
Figura 13 –	Estrutura da tiazolidina-2,4-diona	46
Figura 14 –	Fármacos derivados de TZD.	47
Figura 15 –	Atividades biológicas relacionadas ao núcleo da tiazolidina	48
Figura 16 –	Estrutura química da ftalimida	50
Figura 17 –	Atividades biológicas relatadas para o núcleo da ftalimida.	52
Figura 18 –	Fármacos derivados da ftalimida no mercado farmacêutico.	53
Figura 19 –	Hibridização molecular tiazolidina-ftalimida e obtenção dos derivados LPSF/FT's.	56
Figura 20 –	Método de classe tóxica aguda - OECD 423. 0,1,2,3: número de animais mortos em cada etapa. SCGH: sistema de classificação harmonizada globalmente para substâncias e misturas químicas. ∞: não classificado.	64
Figura 21 –	Estrutura química do LPSF/FT-1 e da tiazacridina	68
Figura 22 –	Estrutura química dos I LPSF/FT's finais e derivados da ftalimida – tiazolidinona da literatura	70
Figura 23 –	Espectro de massas do LPSF/FT-1 (GC-MS - ionização por impacto de elétrons).....	74
Figura 24 –	Espectros de massas do LPSF/FT-16 e LPSF/FT-40 (MALDI/TOF - ionização/dessorção a laser assistida por matriz)	74

Figura 25 –	Espectro RMN H ¹ do LPSF/FT-1.....	75
Figura 26 –	Espectros RMN H ¹ do LPSF/FT-16, LPSF/FT-36, LPSF/FT-40, respectivamente. R= ftalimida.....	76
Figura 27 –	Espectros RMN H ¹ do LPSF/FT-35 e LPSF/FT--31, respectivamente. R= ftalimida.....	77
Figura 28 –	Espectro RMN C ¹³ do I LPSF/FT-1.....	78
Figura 29 –	Espectro RMN C ¹³ do LPSF/FT-36.....	78
Figura 30 –	Espectro de infravermelho do LPSF/FT-1	79
Figura 31 –	Espectro de infravermelho LPSF/FT-40	80
Figura 32 –	Efeitos dos derivados tiazoftalimidicos na expressão da citocina IFN- gama. (a) LPSF/FT-16, n=8; p=0.078 (dexa). (b) LPSF/FT-19, n= 8, p=0.0078 (dexa, 100µm). (c) LPSF/FT-31, n= 6, p=0.0313 (dexa). (d) LPSF/FT-34, n= 5, p=0.0159(dexa). (e) LPSF/FT-35, n= 5, p=0.0159(dexa, 100µm). (f) LPSF/FT-36 n= 5, p=0.0159(dexa). (g) LPSF/FT-38, n= 8, p=0.0078(dexa), p=0.0156(100µm). (h) I LPSF/FT-39, n= 7, p=0.0156(dexa), p=0.0469(10µm), p=0.0313(100µm). (i) I LPSF/FT-40 n= 7; p=0.0156(dexa,100µm), p=0.0313(1 e 10µm). Foi considerado p<0,05 como valor significativo, sendo sempre uma comparação entre o grupo estimulado e as outras condições. Cel: célula; pma+inomicina (100 ng/ml); dexa: dexametasona (10µm).....	94
Figura 33 –	Efeitos dos derivados tiazoftalimidicos na expressão da citocina IL- 17a. (a) LPSF/FT-19, n= 4. (b) LPSF/FT-34 n= 5. (c) LPSF/FT-35 n= 5. (d) LPSF/FT-36 n= 5. (e) LPSF/FT-38 n= 4. (f) LPSF/FT-39 n= 4. (g) LPSF/FT-40 n= 8; p=0.0078 (dexa, 10 e 100µm). Foi considerado p < 0,05 como valor significativo, sendo sempre uma comparação entre o grupo estimulado e as outras condições. Cel: célula; pma+ion: pma+inomicina(100 ng/ml); dexa: dexametasona (10µm).	95
Figura 34 –	Classificação de graduação crescente dos compostos a partir dos substituintes e dos níveis de secreção das citocinas IFN-gama e IL- 17a na concentração de 100µm. Pontilhado azul: substituintes da posição 4. Pontilhado vermelho: outras posições. R= ftalimida- tiazolidina.....	97

Figura 35 –	Derivado de tiazolidina, TM17, com capacidade de modular IFN-gama, IL-17a e IL-6.....	98
Figura 36 –	Compostos ftalimida-tiazolidinona capazes de modular IFN-gama e IL-6.	99
Figura 37 –	(A) ganho de peso das ratas tratadas com LPSF/FT-40 300mg/kg e (B) ganho de peso das ratas tratadas com LPSF/FT-40 2000mg/kg.....	102
Figura 38 –	(A) peso dos órgãos das ratas tratadas com LPSF/FT-40 300mg/kg e (B) peso dos órgãos das ratas tratadas com LPSF/FT-40 2000mg/kg.	102
Figura 39 –	(A) latência para primeira convulsão generalizada em segundos(s) e (B) duração da primeira convulsão generaliza em segundos(s).....	103
Figura 40 –	Números de convulsões de acordo com tipo de convulsão e o grau de severidade.	104
Figura 41 –	Relação das propriedades compartilhadas entre os fármacos anticonvulsivantes.....	106
Figura 42 –	Moléculas com pirazol e tiazolidina-2,4-diona com atividade anticonvulsivante.	107

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	INFLAMAÇÃO.....	19
2.1.1	Vias de sinalização: mediadores da inflamação	21
2.1.2	Implicações clínicas do processo inflamatório	23
2.1.2.1	A conexão entre inflamação e epilepsia	24
2.1.3	Tratamento padrão da inflamação	27
2.2	EPILEPSIA	31
2.2.1	Epidemiologia e etiologia	34
2.2.2	Tratamento medicamentoso da convulsão	38
2.3	HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	42
2.3.1	Tiazolidinas	45
2.3.2	Ftalimida	50
3	METODOLOGIA	57
3.1	SÍNTESE ORGÂNICA E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	57
3.1.1	Equipamentos e Materiais	57
3.1.1.1	Equipamentos	57
3.1.1.2	Reagentes e Solventes	57
3.1.2	Rotas de síntese	57
3.1.3	Confirmação estrutural	59
3.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS	61
3.2.1	Aspectos éticos	61
3.2.2	Ensaio <i>In vitro</i>	61
3.2.2.1	Recrutamento de voluntários sadios e critérios de Inclusão e Exclusão	61
3.2.2.2	Coleta de sangue e isolamento das PBMCs	61
3.2.2.3	Ensaio de citotoxicidade	62
3.2.2.4	Cultura celular e determinação de citocinas	62
3.2.2.5	Análise de dados	62
3.2.3	Ensaio <i>In vivo</i>	63

3.2.3.1	Teste de toxicidade aguda	63
3.2.3.2	Teste de convulsão induzida por PTZ	64
3.2.3.3	Análise de dados	64
3.3	ESTUDOS IN SILICO	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	SÍNTESE ORGÂNICA E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	66
4.1.1	Síntese orgânica	66
4.1.1.1	Tiazolidina-2,4-diona (TZD)	66
4.1.1.2	3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/FT-1)	67
4.1.1.3	Compostos finais (LPSF/FT's)	68
4.1.2	Mecanismo reacionais	70
4.1.2.1	Ciclização	70
4.1.2.2	<i>N</i> -alquilação	71
4.1.2.3	Condensação de Knoevenagel	72
4.1.3	Identificação e caracterização estrutural	73
4.1.3.1	Espectrometria de massas (EM)	73
4.1.3.2	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	75
4.1.3.3	Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	77
4.1.3.4	Espectrofotometria de infravermelho (IV)	79
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS	92
4.2.1	Ensaio <i>in vitro</i>	92
4.2.1.1	Citotoxicidade em PBMC de voluntários saudáveis	92
4.2.1.2	Dosagem de citocinas	92
4.2.2	Ensaio <i>in vivo</i>	101
4.2.2.1	Toxicidade aguda	101
4.2.2.2	Teste de convulsão por PTZ	103
4.3	ESTUDOS IN SILICO	108
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	111
	REFERÊNCIAS	112
	APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAL	120
	APÊNDICE B – ESPECTROS	121
	APÊNDICE C – TRIAGEM COMPORTAMENTAL	148
	APÊNDICE D – ARTIGO APROVADO	153

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta rápida contra agentes patógenos, lesão tecidual e corpos estranhos, afim de manter a integridade do organismo. De uma forma geral, o que ocorre no processo sadio é o reconhecimento de agentes agressores, o recrutamento e acúmulo de células que vão realizar a eliminação desses agentes e por último, um reparo e cicatrização (HENSON, 2005). Muitas vezes, a inflamação torna-se um processo persistente durando meses/anos sendo considerada anormal. A inflamação crônica pode ser a causa de diversas doenças ou ainda estar indiretamente ligada a outras, como o câncer, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer (NASEF; MEHTA; FERGUSON, 2017; SIKORA; SCAPAGNINI; BARBAGALLO, 2010).

O tratamento padrão da inflamação é a utilização de fármacos classificados como anti-inflamatórios esteroidais (AIES) ou os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Os AIES são esteroides e inibem expressão de mediadores inflamatórios, bloqueando assim a síntese de mediadores pró-inflamatórios (VANDEWALLE *et al.*, 2018). Quanto aos AINES, temos vários fármacos que além da atividade anti-inflamatória possuem efeito analgésico. O mecanismo de ação dos AINES é a inibição das enzimas cicloxigenases que, assim como as fosfolipases, atuam sintetizando mediadores que induzem a inflamação (FELSON, 2016; SEPPÄLÄ, 2009; MOLDOVEANU; TIGAN; ACHIMAŞ CADARIUT, 2012). O maior problema destes fármacos são seus vários efeitos colaterais. Os AIES podem tornar o paciente hipertenso, outros deles podem ter a puberdade tardia e alguns desenvolvem catarata. Já exemplos dos efeitos não benéficos dos AINES são o aumento de risco de doenças cardiovasculares e complicações gastrointestinais (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; TARR; REUTER, 2015).

Entre as várias doenças que vem apresentando relações com a inflamação, temos a epilepsia. Além de ser uma das etiologias da epilepsia, estudos tem mostrado que as convulsões podem induzir o aparecimento de processos inflamatórios devido a expressão de TNF-alfa, IL-6 e IL-1beta, mediadores pró-inflamatórios (VALENCIA, 2014; VEZZANI *et al.*, 2011). A presença destes, pode também induzir novas convulsões como é o caso da IL-1beta que pode aumentar o influxo de Ca^{2+} , o qual tem papel na geração de crises. Além destas, temos a IL-17 e IL-22, conhecidas por gerarem uma fissura na barreira hematoencefálica aumentando também a probabilidade da ocorrência de convulsões (ALYU; DIKMEN, 2017; ANNAMARIA VEZZANI, 2014; SHIMADA *et al.*, 2014; VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008).

A epilepsia é uma doença que afeta mais de 50 milhões de pessoas e a cada ano, 2,4 milhões recebem o diagnóstico positivo. Trata-se de uma doença que afeta homens e mulheres de qualquer idade e posição no globo sendo uma condição resultante de um desequilíbrio entre neurotransmissores inibitórios e excitatórios (ALIZED, 2014; NIKALJE *et al.*, 2014; SPICIARICH *et al.*, 2019). O tratamento medicamentoso para epilepsia é através de fármacos anticonvulsivantes e assim como os anti-inflamatórios, podem gerar uma série de efeitos colaterais, como depressão, fadiga, efeitos gastrointestinais e etc. E ainda é estimado que cerca de 30% dos pacientes tenha epilepsia refratária (CONTRERAS-CAICEDO, 2014; WHO, 2019). Diante desta problemática, faz-se necessário a busca por novos fármacos que sejam mais eficazes, seguros e com menos efeitos não benéficos.

Diferentes núcleos bioativos são descritos na literatura, entre eles temos as tiazolidinas e ftalimidas. A tiazolidina-2,4-diona (TZD) é um composto que possui um anel de 5 membros, duas porções de carbonila, um átomo de azoto e um de enxofre. Inicialmente as tiazolidinas ficaram conhecidas através da sua ação anti-hiperglicêmica devido ao seu alvo PPAR-gama. Atualmente, as TZDs já estão sendo investigadas para diversas atividades. Por outro lado, a Talidomida® despertou o olhar dos químicos medicinais para uma parte de sua molécula, a ftalimida, que trata-se de uma amina aromática possuindo também duas carbonilas ligada a porção amina. As pesquisas vem demonstrando que, assim como as TZDs, os derivados da ftalimida apresentam potencialidade para atividades como anticâncer, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica e anticonvulsivante (CHADHA *et al.*, 2015; JAIN; VORA; RAMAA, 2013; SHARMA *et al.*, 2010).

Estes dois núcleos são investigados através da síntese de derivados que se dão com substituição e modificações estruturais. O nosso grupo de pesquisa já vem trabalhando com a hibridização molecular - uma das principais estratégias da química medicinal - de outros núcleos, portanto, a junção Tiazolidina-Ftalimida pode constituir uma nova alternativa na busca por novos fármacos para o tratamento das doenças. Tendo isso como base, o presente projeto visou a síntese de novos derivados tiazoftalimídicos (LPSF/FT's), avaliando sua citotoxicidade e a modulação de citocinas *in vitro*, bem como avaliação anticonvulsivante *in vivo*. Assim, contribuindo com a busca para um melhor tratamento da população acometida por essas patologias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento das convulsões e da inflamação através do planejamento e sínteses de moléculas híbridas de tiazolidina e ftalimida.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar e determinar das características físico-químicas de novos derivados tiazofitalimidicos;
- ✓ Elucidar das estruturas químicas através de técnicas espectroscópicas de espectrometria de massas (EM), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade e investigar a atividade imunomoduladora dos derivados tiazofitalimidicos sobre as citocinas IFN-gama e IL17A em sobrenadante das culturas de células mononucleadas do sangue periféricos (PBMC) de voluntários saudáveis;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda *in vivo*;
- ✓ Avaliar a atividade anticonvulsivante em ratos através do teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO

Durante a vida, os organismos estão expostos a diversos agentes capazes de colocar em risco sua integridade. Há então o sistema imune que é responsável por realizar a defesa destes organismos, principalmente contra os agentes causadores de doenças, mas também contra toxinas e outros (HARSONO, 2005). O sistema imune trabalha reconhecendo quando há algo “anormal” e responde as anormalidades de duas formas: a resposta inata e a resposta adaptativa. A resposta inata envolve uma variedade de células que visam eliminar o agente agressor de uma forma rápida e essas células, além da eliminação, podem ativar a resposta adaptativa; esta é uma resposta mais lenta, envolvendo duas principais células (células T e B) produzindo anticorpos que, em uma futura infecção, fará um reconhecimento e uma resposta específica (THOMPSON, 2015).

O processo de resposta do sistema imune inato, após o reconhecimento, pode ser considerado uma inflamação. Muitas vezes, estes dois são vistos como sinônimos e ainda sim, o desenvolver do processo inflamatório pode abrir portas para o reconhecimento e ativação da resposta adaptativa, também se mostrando ligada ao sistema imune de adaptação. A inflamação é então definida como um mecanismo de proteção do corpo, frente à agentes agressores que, através de uma rede complexa de sinalização celular, envolvendo vasos sanguíneos e leucócitos, serão eliminados havendo reparo tecidual (HENSON, 2005). Segundo Robbins e Cotran (2010), quatro estímulos podem ser desencadeantes de uma resposta inflamatória:

- a. A chegada de parasitas, fungos, bactérias, vírus e toxinas microbianas causando as infecções;
- b. A necrose tecidual que pode ser causada por diversos tipos de traumas e danos, seja ele físico e/ou químico;
- c. Os corpos estranhos que podem trazer os agentes causadores de doenças ou causar lesões nos tecidos;
- d. E as reações autoimunes, onde o sistema imune vai de contra aos próprios tecidos.

Na antiguidade, Celsius definiu sinais cardinais relacionados com a inflamação que são o calor, vermelhidão, dor e inchaço (WILSON; DURHAM, 1756 *apud* EVANS; REPASKY; FISHER, 2015) e hoje, já se sabe que esses sinais estão envolvidos com as

etapas do processo inflamatório. De uma forma geral, o que ocorre são inicialmente efeitos vasculares (vasodilatação e alterações no fluxo do sangue), em seguida o recrutamento, acúmulo e ativação de células-chaves para o processo de remoção/eliminação do agente agressor e reparo/cicatrização e por fim, o término da resposta (HENSON, 2005).

A vermelhidão e o calor são devido à dilatação dos vasos sanguíneos que ocorre, a fim de possibilitar a entrega de células necessárias para desenvolvimento da resposta inflamatória. Este processo envolve arteríolas, formando novos leitos microvasculares acontecendo, em seguida, um aumento da permeabilidade vascular com passagem de líquido rico em proteínas (exsudato e transudato) e um fluxo sanguíneo aumentado, dando início ao recrutamento dos leucócitos que precisam passar da corrente sanguínea para o local da inflamação (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Com o aumento do fluxo de sangue, os leucócitos começam a se aproximar das paredes dos vasos em um processo conhecido como marginação. Estes irão se aderir de forma frouxa, prendendo e soltando, movimentando-se através do endotélio por rolagem e isto se torna possível, principalmente, devido à presença de selectinas na superfície endotelial e os seus ligantes nos leucócitos (KELLY; HWANG; KUBES, 2007). As selectinas envolvidas são três: E-selectina, P-selectina e L-selectina (SCHMIDT; MOSER; SPERANDIO, 2013). E-selectina é encontrada nas células endoteliais assim como a P-selectina que além de estarem presentes nessas células, também está nas plaquetas, já L-selectina é exclusivamente localizada na superfície dos leucócitos (ANGIARI, 2015). O ligante PSGL-1 é o principal para P-selectina e o mais importante para L-selectina (LEY, 2003). Enquanto que para E-selectina além de PSGL-1, tem os ligantes CD44 e ESL-1 (MCEVER, 2015).

Próximo ao local da inflamação a rolagem cessa e agora, através das integrinas, os glóbulos brancos acumulados passam a se aderir ao endotélio de forma firme (LEY; ZARBOCK, 2006). Esta forte adesão vai permitir a migração transendotelial ou diapedese, passagem dos leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido, que pode ocorrer por duas vias: via paracelular e via transcelular (SCHIMMEL; HEEMSKERK; VAN BUUL, 2017). Na migração via paracelular, as junções endoteliais se abrem e as células de defesa atravessam pela interação com moléculas de adesão, sendo estas etapas mediadas por ICAM-1/2, VCAM-1, JAM-A/B/C, PECAM-1, CD99 e ESAM (LEY *et al.*, 2007). Já na migração via transcelular não há alterações nas junções endoteliais, uma vez que, os leucócitos se fundem às células do endotélio passando para o tecido inflamado e embora

seja diferente da via paracelular, as moléculas adesivas e os controles são semelhantes (FILIPPI, 2016).

Uma vez que os leucócitos se encontram no tecido, há um gradiente químico que os guiam até o local injuriado, sendo este mecanismo a quimiotaxia, realizada por quimioatraentes que podem ser representados por quimiocinas (Ex. IL-8) (JIN; XU; HERELD, 2008). Juntamente com essa atração, há também a ativação dos glóbulos brancos que serão capazes de reconhecer os agentes agressores através da presença de receptores de reconhecimento padrão (ROBBINS; COTRAN 2010). Como exemplo, temos a família dos receptores do tipo Toll que identificam bactérias, vírus, fungos e protozoários, através dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Já no local, os leucócitos neutralizam os patógenos e os fagocitam, em seguida, morrem por apoptose. Quem tem papel importante nesse final da inflamação é os macrófagos que completam a eliminação dos leucócitos apoptóticos deixando o tecido livre (FREIRE; VAN DYKE, 2000).

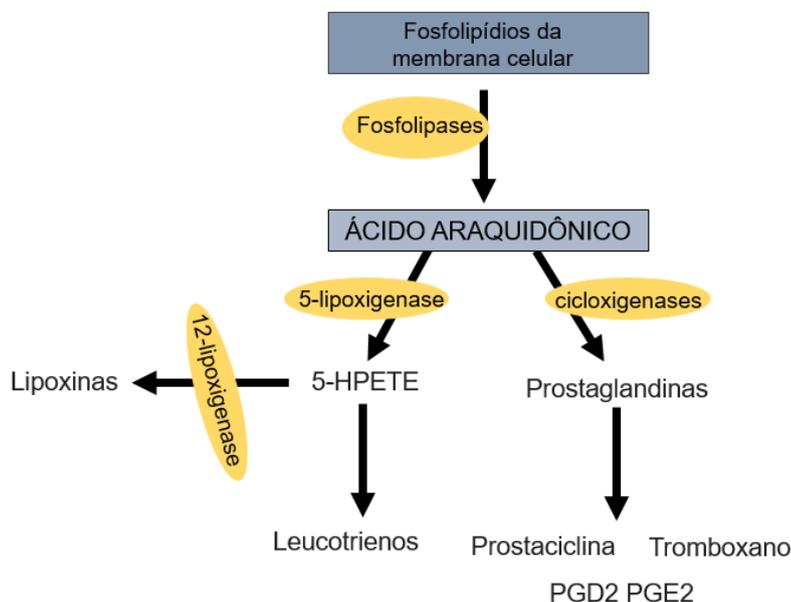
2.1.1 Vias de sinalização: mediadores da inflamação

Todos os eventos descritos no item anterior são coordenados por uma rede complexa de sinalização celular envolvendo vários mediadores pró-inflamatórios ou atuantes na resolução/finalização da inflamação. Estes mediadores podem ser derivados de proteínas plasmáticas, secretados por células ou produzidos por leucócitos especializados, em resposta aos estímulos e a indutores da inflamação (MEDZHITOV, 2008). Ainda segundo Medzhitov, os indutores são os primeiros sinais para dá início ao processo de resposta inflamatória e fazem isso ao ativar sensores especializados desencadeando na produção de alguns mediadores específicos.

Um dos mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade e alterações vasculares, por exemplo, é a histamina que tem quatro receptores (HR1, HR2, HR3 e HR4) acoplados à proteína G, sendo sintetizada pela descarboxilação da histidina em uma reação catalisada pela enzima L-histidina descarboxilase (BRANCO *et al.*, 2018). Juntamente com histidina, outros mediadores, como a prostaglandina E2, prostaglandina D2 e leucotrieno B4 estão envolvidos na indução da inflamação através de alterações no fluxo sanguíneo e tráfico de leucócitos (SERHAN; SAVILL, 2005). Estes são pertencentes ao grupo de mediadores lipídicos, os eicosanoides, derivados do ácido araquidônico.

A ação de enzimas fosfolipásicas faz com que o ácido araquidônico, até então presente nas membranas celulares, seja convertido nestes mediadores (figura 1). Esse processo é através das cicloxigenases (COXs), formando as prostaglandinas, e das lipoxigenases (LOXs), produzindo leucotrienos e lipoxinas (BENNETT; GILROY, 2016). Diferente das prostaglandinas e dos leucotrienos citados acima, as lipoxinas desempenham papel anti-inflamatório e na resolução da inflamação. Entre as funções desempenhadas pela Lipoxina A4, por exemplo, foi visto sua capacidade de diminuir a aderência dos leucócitos, reduzir os níveis de prostaglandina E2 nos exsudatos, inibição do recrutamento de neutrófilos e bloqueio da quimiotaxia (FREIRE; VAN DYKE, 2000)(SERHAN, C., CHIANG N., 2008).

Figura 1 Síntese dos eicosanoides, os derivados do ácido araquidônico.



Fonte: adaptado de ROBINS, 2010.

Há também várias citocinas, proteínas ou glicoproteínas, que são mediadores pró-inflamação ou anti-inflamação. Como exemplo temos IL-6, IL-10, IFN-gama e TNF-alfa. IL-6 é expressa afim de garantir que o processo inflamatório ocorra, modulando o acúmulo de leucócitos nos locais da infecção e/ou trauma. Já IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que atua bloqueando a síntese de IL-1beta, reduzindo os níveis de PGE₂, através da regulação de COX-2, e suprimindo a produção do fator de necrose tumoral (TNF-alfa). TNF-alfa é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, além de induzir sua

própria secreção, é visto que pode induzir a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Ao contrário de IL-10, IFN-gama alimenta a síntese de TNF-alfa e também de IL-12, outro mediador pró-inflamatório. IFN-gama também está relacionado a produção de espécies reativas de oxigênio e com o aumento de apresentação de antígenos (CHU, 2013; HUNTER; JONES, 2015; LEES, 2015; MOLLAZADEH *et al.*, 2019).

2.1.2 Implicações clínicas do processo inflamatório

Embora o processo inflamatório seja uma resposta em defesa do organismo, pode ter o aparecimento de implicações clínicas. A inflamação aguda é uma ação rápida que dura horas ou até no máximo 3 dias, porém muitas vezes ela pode ser persistente e acabar durando meses, anos ou uma vida inteira. A partir deste momento passamos a lidar com uma inflamação crônica. Vários mecanismos distintos estão relacionados com a não resolução/fim da inflamação e está passa a ser considerada anormal tendo se mostrado ligada, de forma direta ou indireta, a diversas doenças. Na literatura já é visto relações da inflamação com o câncer, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer e outros (NASEF; MEHTA; FERGUSON, 2017; SIKORA; SCAPAGNINI; BARBAGALLO, 2010).

O papel da inflamação crônica no câncer, por exemplo, foi objeto de estudo em diversas pesquisas. Hoje já se sabe que ter inflamação crônica deixa o paciente mais suscetível a desenvolver vários tipos de câncer de bexiga, cervical, gástrico, intestinal, câncer de ovário, próstata e tireoide. O câncer de cólon mostra-se estar associado a doença inflamatória intestinal, enquanto o câncer de próstata está relacionado a prostatite. Assim, o tratamento da inflamação pode contribuir para diminuir a incidência destes cânceres. Outro ponto é que durante o desenvolvimento dos cânceres também é notado a presença de mediadores pró-inflamatórios em tecidos tumorais como IL-1beta, IL-6, IL-23 e TNF-alfa. O nível de prostaglandinas também tem alterações devido a frequente expressão de COX-2 em células cancerígenas (CANDIDO; HAGEMANN, 2013).

A obesidade e a diabetes tipo dois estão relacionadas entre si e mostraram também terem ligações com a inflamação crônica. Pessoas obesas são mais propensas a terem resistência a insulina que é a causa da diabetes tipo 2. A diabetes, por sua vez, é um problema de saúde global matando 6 pessoas a cada minuto. Estudos tem relacionado inflamação crônica e resistência à insulina, pois é visto o aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como TNF-alfa, que são capazes de aumentar a

resistência. Nos tecidos adiposo de animais e humanos obesos também foram encontrado níveis alterados de TNF-alfa, sendo indicativo de processos inflamatórios (BADAWI *et al.*, 2010; HOTAMISLIGIL, 2006).

Além das complicações causadas pela persistência da inflamação, é visto também que em muitos organismos o sistema imune não tem a capacidade de reconhecer o “eu” do “não-eu”, assim, as células imunológicas ou anticorpos “atacam” os componentes normais do corpo. Essa ação acaba causando danos estruturais e/ou funcionais das células/tecidos/órgãos, sendo esses distúrbios conhecidos como as doenças autoimunes. Apesar de serem doenças raras com cerca de 3-5% da população mundial afetada, os efeitos de morbidade e mortalidade são significativos. São doenças que podem ocorrer em qualquer idade e gênero e sua prevalência pode diferenciar a partir da doença. Algumas doenças autoimunes são a esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes tipo 1 e lúpus eritematoso sistêmico (WANG; WANG; GERSHWIN, 2015).

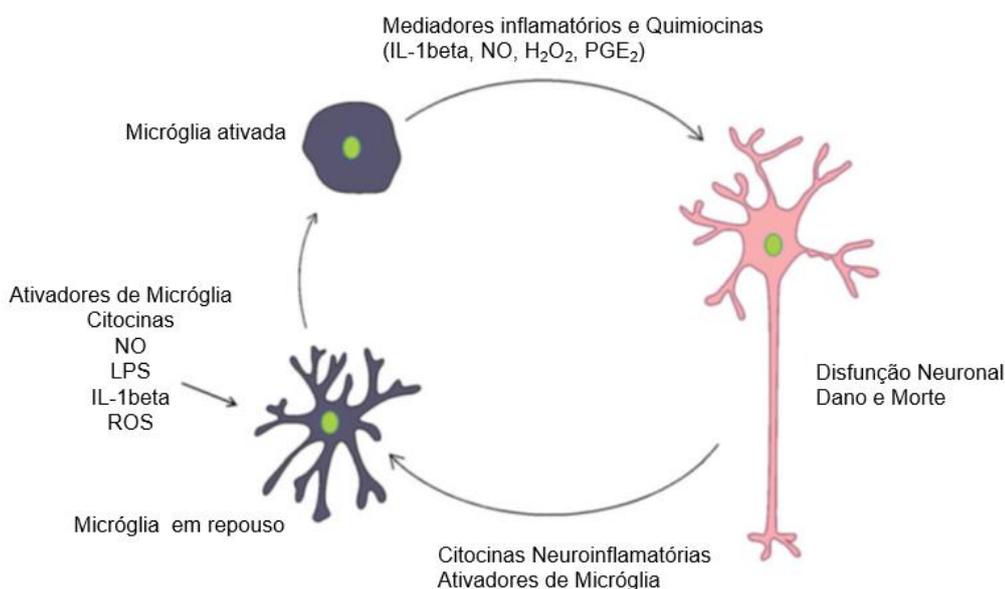
A artrite reumatoide, por exemplo, trata-se de uma inflamação da membrana sinovial caracterizada, principalmente, pelo inchaço das articulações e mesmo tendo a patologia heterogenia, sabe-se que os sintomas mais severos estão associados a presença de autoanticorpos (AR soropositiva). A resposta autoimune se dá em proteínas citrulina e imunoglobulina G. Já resposta autoimune na esclerose múltipla leva a destruição dos axônios mielinizados no sistema nervoso central (SNC). A neurodegeneração causada pela existência de um processo inflamatório crônico conduz a uma incapacidade física dos pacientes. A esclerose múltipla é apenas uma de algumas doenças que tem conexão com a neuroinflamação (GOLDENBERG, 2012; RUTHERFORD; NIKIPHOROU; GALLOWAY, 2017).

2.1.2.1 A conexão entre inflamação e epilepsia

Além dos mediadores e das células comuns no processo inflamatório, na neuroinflamação, contamos ainda com a presença de células próprias do SNC como os neurônios, macroglia e micróglia. Esta última tem um papel fundamental para o desenvolvimento da resposta inflamatória no cérebro. A ativação da micróglia pela presença de agentes patógenos, danos teciduais/lesões e neurotoxinas é o primeiro passo para uma neuroinflamação. A partir da ativação, micróglia “comanda” uma série de mecanismos que acontecem até a resolução da inflamação. É visto a presença de COX-1, COX-2 e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-1beta, e

compostos neurotóxicos (ligados a neurodegeneração). Se permanecendo ativadas, micróglia continua liberando essas citocinas e moléculas neurotóxicas fazendo com que a inflamação seja crônica (figura 2). Além de estar envolvida com esclerose múltipla, também é visto neuroinflamação em doenças como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, narcolepsia e autismo (SHABAB *et al.*, 2017).

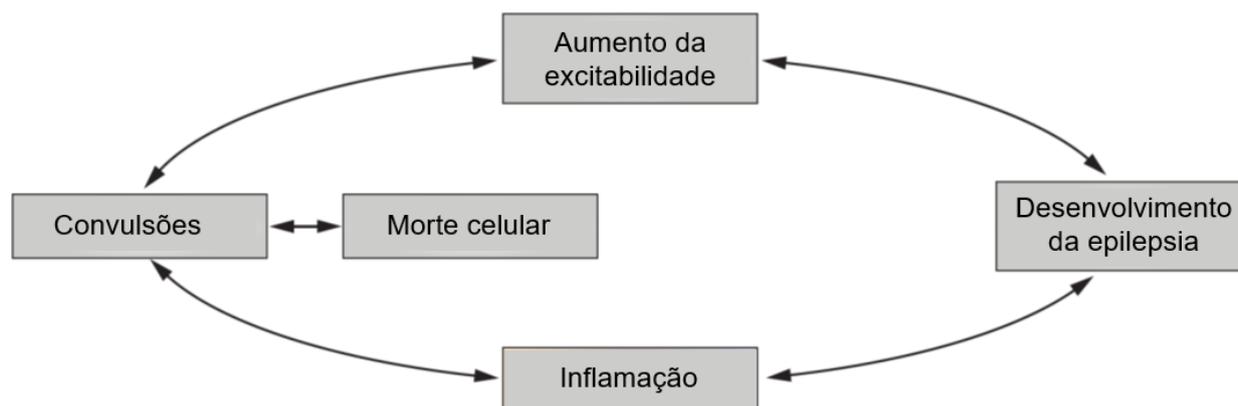
Figura 2 Micróglia, neuroinflamação e ciclo da inflamação crônica.



Fonte: adaptado de SHABAB *et al.*, 2017

Muito se tem discutido sobre o real papel da neuroinflamação no desenvolvimento e na perpetuação de crises convulsivas relacionadas à epilepsia. Em um ciclo, podemos notar que a convulsão pode levar morte celular e assim, a um processo inflamatório que por si também contribui para o encaminhamento de novas crises (figura 3). Em estudos experimentais, ratos e camundongos foram induzidos a convulsões e deste modo, foi visto que há uma indução de produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 por micróglia em regiões do cérebro onde se teve início e propagação das convulsões. Em seguida, foi visto a expressão de COX-2 que indica a produção de prostaglandinas. Vale ressaltar que essas citocinas podem ser produzidas por neurônios e astrócitos ativados até semanas após o status epiléticos. E como visto acima, o processo da neuroinflamação pode levar ao dano e morte de células do SNC (VEZZANI *et al.*, 2011).

Figura 3 Ciclo vicioso da inflamação e epilepsia



Fonte: adaptado de VEZZANI *et al.*, 2011

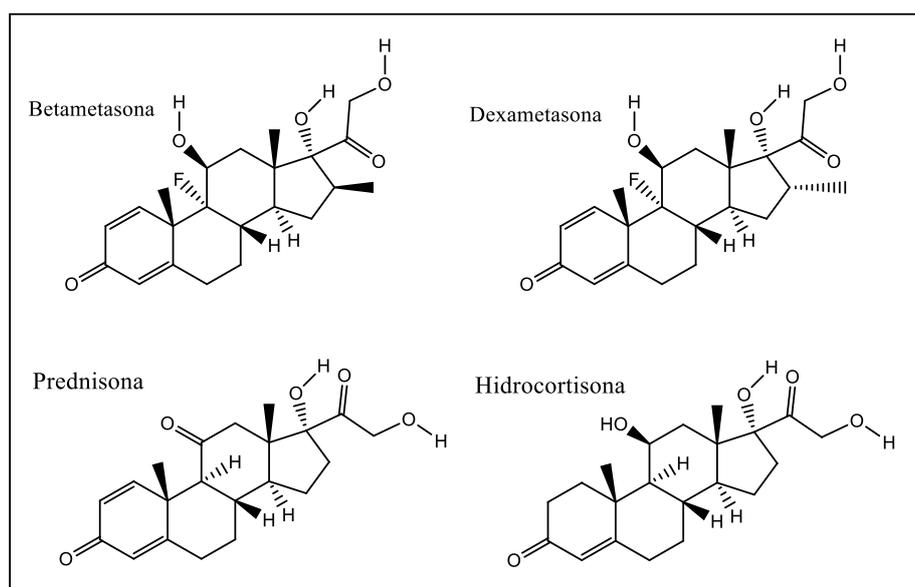
A inflamação por sua vez pode levar ao desenvolvimento de convulsões e epilepsia, inclusive em cérebros inicialmente “sadios”. Entre os pontos que podem estar envolvidos no mecanismo, é a presença de IL-1beta aumentando o influxo de Ca^{2+} que tem papel na geração de crises juntamente com a promoção da excitotoxicidade. Outro, é que juntamente com IL-1beta, a IL-6 e TNF-alfa são capazes de induzir convulsões através da via de transmissão glutamatérgica. Ainda sim, IL-17 e IL-22 podem aumentar a probabilidade de ocorrências de convulsões, uma vez que podem gerar fissuras na barreira hematoencefálica, levando a uma invasão de leucócitos no cérebro liberando mais citocinas inflamatórias (ALYU; DIKMEN, 2017; ANNAMARIA VEZZANI, 2014; DE VRIES *et al.*, 2016; SHIMADA *et al.*, 2014; VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008)

Uma evidência que ressalta o possível papel de IL-1beta é um estudo de caso. Uma paciente de 14 anos diagnosticada com epilepsia apresentava cerca de 4 a 15 crises por dia, mesmo fazendo uso das drogas antiepilépticas (levetiracetam, etossuximida, lamotrigina e clonazepam). Ao realizar avaliação laboratoriais, os resultados apresentaram uma série de alterações como autoanticorpos negativos e alterações dos níveis de citocinas, como IL-1beta, no líquido cefalorraquidiano. Devido à suspeita de uma inflamação sistêmica e de que esse processo poderia estar relacionado à epilepsia, a paciente foi tratada com dexametasona, anakinra e por último canakinumab (anticorpo monoclonal anti-IL-1 β), onde passou a apresentar uma convulsão média por vários meses. O uso passou a ser combinado com clobazam, mostrando que a inflamação pode ter papel importante e que pacientes com epilepsia refrataria podem encontrar tratamentos mais adequados as suas condições (DESENA; DO; SCHULERT, 2018).

2.1.3 Tratamento padrão da inflamação

O tratamento das doenças inflamatórias acontece através do uso de fármacos que podem ser os anti-inflamatórios esteroidais (AIES) ou os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Os AIES são os glicocorticoides (GC) ou corticoides que, assim como os mineralocorticoides, andrógenos, estrogênios, progestogênios e vitamina D, fazem parte da família dos esteroides. São conhecidos também como hormônios do estresse e se mostram envolvidos em diversos processos como homeostase metabólica, saúde mental, proliferação celular, desenvolvimento, reprodução e inflamação. Várias doenças autoimunes, inflamatórias e alérgicas são tratadas com os GC sintéticos (figura 4) (VANDEWALLE et al., 2018).

Figura 4 Fármacos AIES



Fonte: Autor, 2019.

A propriedade anti-inflamatória e imunoterapêutica dos GCs se faz possível devido a sua interação com o receptor nuclear GR. Após essa ligação, ocorre uma interação GR-DNA que induzem genes codificantes para proteínas anti-inflamatórias. GR também consegue inibir atividade de fatores de transcrição NF-Kb, que regula os genes pró-inflamatórios. O uso prolongado ou com alta doses de corticoides vem sendo associado a um número extenso de efeitos adversos (quadro 1). Um desses efeitos é que o paciente pode se tornar hipertenso e um dos mecanismos pelo qual isto ocorre, é que há uma retenção renal de sódio junto a um aumento do volume sanguíneo. Alguns GCs, por exemplo, são indicados para tratamento de inflamações oculares e entre os efeitos, há o aparecimento de glaucoma e catarata. GCs também podem inibir a transcrição de osteocalcina em osteoblastos, fazendo com que algumas pessoas passem a ter

osteoporose e um risco maior de ter fraturas (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002).

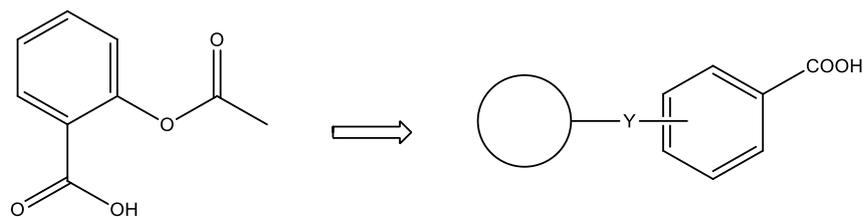
Quadro 1 Efeitos colaterais devido a altas doses ou terapia com glicocorticoides prolongados.

Tecido	Efeitos colaterais
Glândula suprarrenal	Atrofia adrenal, síndrome de Cushing
Sistema cardiovascular	Dislipidemia, hipertensão, trombose, vasculite
Sistema nervoso central	Mudanças de comportamento, cognição, memória, humor e atrofia cerebral
Trato gastrointestinal	Hemorragia gastrointestinal, pancreatite e úlcera
Sistema imunológico	Imunossupressão ampla
Tegumento	Atrofia, atraso na cicatrização de feridas, eritema, hipertricose, dermatite perioral e acne
Sistema musculoesquelético	Necrose óssea, atrofia muscular, osteoporose, retardo do crescimento ósseo longitudinal
Olhos	Catarata, glaucoma
Rim	Maior retenção de sódio e excreção de potássio
Sistema reprodutivo	Puberdade tardia, retardo de crescimento fetal, hipogonadismo

Fonte: adaptado de RHEN; CIDLOWSKI, 2005

Além da atividade anti-inflamatória, os AINES também possuem atividade analgésica e antipirética (MOLDOVEANU; TIGAN; ACHIMAŞ CADARIUT, 2012). Trata-se da classe mais utilizada e podem ser obtidos em muitos países sem a necessidade de apresentação de receita médica (GÓMEZ-ACEBO *et al.*, 2018). O primeiro AINES foi sintetizado por Felix Hoffmann na década de 1890, ficando conhecido como Aspirina, sendo este o ácido acetilsalicílico ganhando mercado pela Bayer (Cuzick, 2009 *apud* BANTI e HADJIKAKOU, 2016). Os AINES sintetizados, depois da Aspirina, possuem em suas estruturas grupamentos em comum havendo então um padrão geral destes fármacos (figura 5).

Figura 5 Estrutura da Aspirina e estrutura geral dos AINES



Fonte: Adaptado de ASIRVATHAM; DHOKCHAWLE; TAURO, 2016.

São constituídos por uma porção ácida que pode ser enóis ou ácido carboxílico e apresentam um pK_a entre 3 a 5, sendo esta uma propriedade essencial para ação farmacológica; há também uma ligação com um grupo aromático planar que vai lhe conferir caráter lipofílico diferente, dependente dos substituintes, normalmente halogêneos (ASIRVATHAM; DHOKCHAWLE; TAURO, 2016). Suas estruturas dão base para uma subclassificação, onde no quadro 2 podemos encontrar os principais grupos e fármacos incluídos.

Quadro 2 Subclassificação dos AINES e exemplos de fármacos

Grupos	Fármacos
Derivados do ácido salicílico	Ácido acetilsalicílico, salicilamida e salicilato de sódio
Derivados de anilina e p-aminofenol	Paracetamol e fenacetina
Derivados de pirazolona	Fenilbutazona e propifenazona
Oxicams	Piroxicam, meloxicam, tenoxicam, lornoxicam e droxicam
Derivados de ácidos arilalcanóicos	Aceclofenac, diclofenac, etodolac, indometacina, nabumetona, sulindac e tolmetina
Derivados dos ácidos 2-arilpropiónicos (profens)	Flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e ácido tiaprofênico
Ácidos N-arilntranílicos (ácidos fenâmicos)	Ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, ácido flufenâmico e ácido meclofenâmico
Derivados de ácido enólico e coxibes	Celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, parecoxib, valdecoxib
Derivados de naftilbutanona	Nabumetona
Sulfonamidas	Nimesulida
Derivados de benzoxazocina	Nefopam

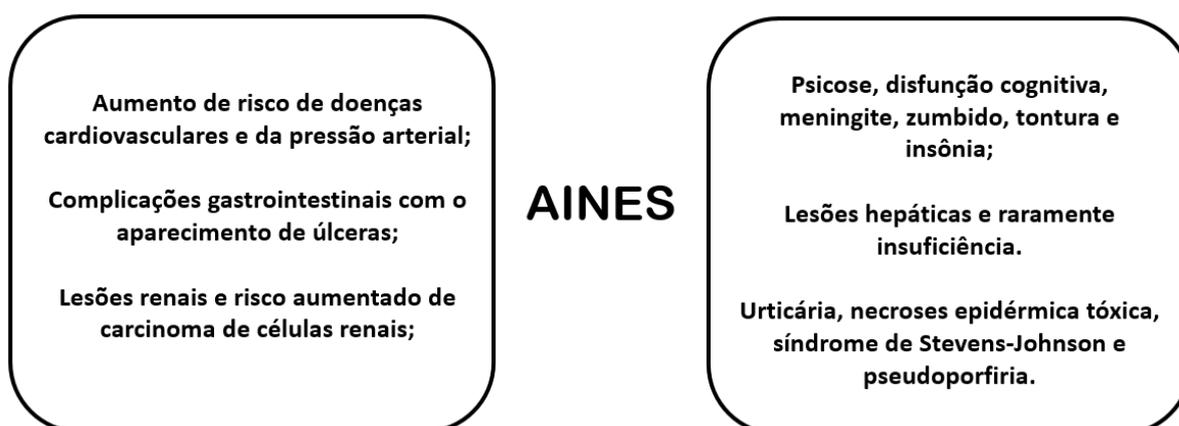
Fonte: Adaptado de GOUDA *et al*, 2010.

O mecanismo de ação dos AINES é a inibição das enzimas COX que são responsáveis pela síntese de prostaglandinas, sendo assim, há uma diminuição na vasodilatação e abrandamento da inflamação. As COXs possuem pelo menos duas isoformas, COX-1 e COX-2, ambas são suprimidas, porém possuem funções diferentes. A COX-2 é normalmente expressa em condições inflamatórias, enquanto que COX-1 é encontrada na maioria dos tecidos e é responsável por processos celulares como proteção gástrica, função renal e homeostase vascular. A inibição de forma não seletiva e uso indiscriminado, muitas vezes prolongado, resulta na maior problemática do uso dos AINES (FELSON, 2016; SEPPÄLÄ, 2009).

Os efeitos não benéficos associados ao uso prolongado dos AINES são variados (figura 6). A maior parte desses efeitos são resultados da inibição da COX-1. Por exemplo, as prostaglandinas gástricas aumentam a secreção de mucinas, bicarbonato e

fosfolipídios conferindo proteção e a inibição da COX-1 encerra a produção destas prostaglandinas, deixando mais favorável a formação de úlceras. Hoje também já se sabe que COX-2 é expressa em células endoteliais e nesse caso sua inibição altera a síntese de prostaciclina, gerando um desequilíbrio que aumenta o risco de eventos tromboembólicos e de doenças cardíacas. Assim, os coxibes que são inibidores específicos da COX-2 passam a ser problemáticos para uso (BOZIMOWSKI, 2015; KHAN; GUTIÉRREZ-DE-TERÁN; ÅQVIST, 2018; TARR; REUTER, 2015). Portanto, é visto a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que possam tratar a inflamação sendo mais seguros e que tenham menos efeitos não benéficos, proporcionando mais saúde aos pacientes.

Figura 6 Efeitos colaterais não benéficos associados ao uso prolongados dos AINES.



Fonte: adaptado de TARR; REUTER, 2015

2.2 EPILEPSIA

Entre as doenças neurológicas existentes, a epilepsia é a mais comum sendo caracterizada por crises epiléticas. Trata-se de uma condição resultante de um desequilíbrio entre neurotransmissores inibitórios e excitatórios e seus receptores, alterando a comunicação sináptica ideal que são necessárias para as funções cerebrais. Os principais envolvidos são o ácido γ -amino-butírico (GABA) e o glutamato (Glu), que são neurotransmissores inibitórios e excitatórios, respectivamente. Havendo alterações na inibição funcional de GABA acaba contribuindo para convulsões e Glu pode ter papel no início e na disseminação da atividade convulsiva (MINJAREZ *et al.*, 2017).

Entre os sintomas, temos a presença de movimentos involuntários do corpo (convulsões) que podem variar de uma por dia a várias, perda de consciência,

enrijecimento, repuxa e déjà vu. Além das alterações transitória comportamental, a epilepsia tem implicações neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (DEVINSKY *et al.*, 2018; TORRES, 2015). A Liga Internacional Contra a Epilepsia (do inglês, ILAE) (FISHER *et al.*, 2014) trouxe uma definição mais prática para a clínica, que afirma que a epilepsia é definida por qualquer uma das condições abaixo:

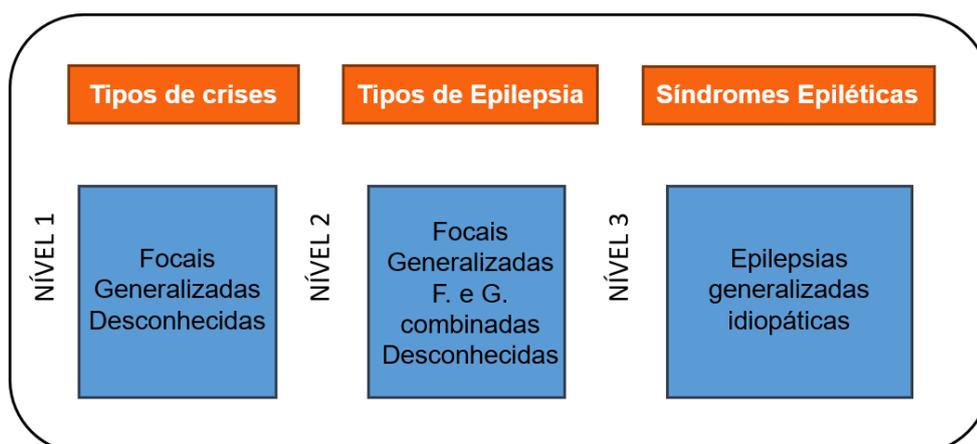
- a. Se em um intervalo >24h ocorrer no mínimo duas crises epiléticas, seja ela não provocada ou reflexa;
- b. “Uma crise epilética não provocada (ou reflexa) e a probabilidade de ocorrência de outras crises similar ao risco geral de recorrência (de pelo menos 60%) após duas crises epiléticas não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos;”
- c. Diagnóstico de uma síndrome epilética.

Além do diagnóstico, a ILAE fala também sobre em quais situações a epilepsia pode ser considerada resolvida:

Epilepsia deve ser considerada *resolvida* para os indivíduos que tenham uma síndrome epilética idade-dependente que já tenham ultrapassado a idade limite para esta síndrome ou para aqueles que tenham permanecido livres de crises nos últimos 10 anos, sem fármacos antiepiléticos nos últimos 5 anos.

A classificação das epilepsias é separada em três níveis: tipos de crises epiléticas, tipos de epilepsia e as síndromes epiléticas (Figura 7). As crises e as epilepsias focais estão envolvidas com atividade neuronal anormal ou excessiva em apenas um hemisfério cerebral, podendo ser unifocal e multifocal. Há uma variedade de tipos de crises incluídas na epilepsia focal, como crises focais, crises focais motoras e não motoras e crises focais que podem evoluir para crises tônico-clônicas bilaterais. Quanto as crises generalizadas, a atividade neuronal anormal ou excessiva tem um maior alcance atingindo os dois hemisférios. Os indivíduos que apresentam a epilepsia generalizada podem ter crises tônicas, atônicas, tônicas-clônicas, mioclônicas e ainda crises de ausência. Em alguns casos, mesmo analisando os dados laboratoriais e clínicos de determinados pacientes, não é possível detectar e atribuir uma dessas duas classificações acima, podendo então a crise ser de origem desconhecida, assim como a epilepsia também. Normalmente, quando os tipos de crises são de início desconhecido a epilepsia também é desconhecida. Há uma quarta subclassificação para os tipos de epilepsia que é uma combinação de crises focais e generalizadas. As síndromes de Dravet e de Lennox-Gastaut são exemplos desta condição (SCHEFFER *et al.*, 2017).

Figura 7 Classificação das Epilepsias segundo o ILAE.



Fonte: Autor, 2019.

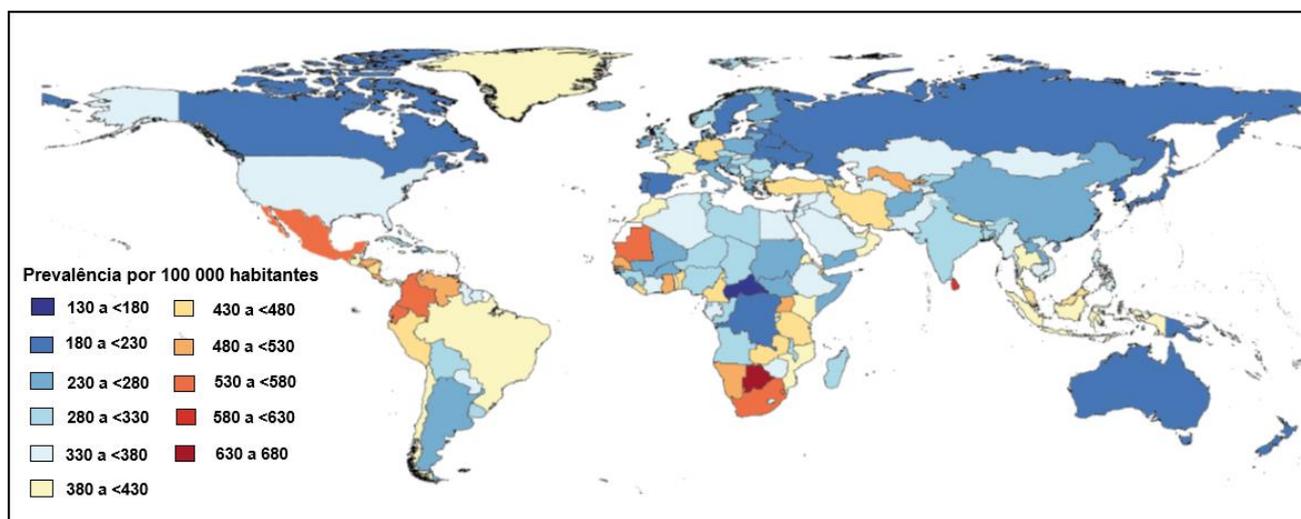
O último nível inclui as síndromes epiléticas que, ocorrendo um diagnóstico, há um grupo de características acontecendo em conjunto. Exemplos dessas características são tipos de crises e dados do diagnóstico de Eletroencefalografia. Um bom exemplo de síndromes é um subgrupo da epilepsia generalizada. As Epilepsias Generalizadas Idiopáticas incluem quatro síndromes epiléticas: Epilepsia Ausência da Infância, Epilepsia Ausência Juvenil, Epilepsia Mioclônica Juvenil e a Epilepsia com Crises Tônico-clônicas Apenas. São síndromes que afetam mais crianças e adolescentes e tem envolvimento genético (SCHEFFER *et al.*, 2017; WOLF, 2005).

Alterações em muitos níveis da função cerebral podem levar a um desequilíbrio entre excitação e inibição no cérebro que acabam gerando convulsões (STAFSTROM; CARMANT, 2015). Os canais de Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} podem estar envolvidos. Mutações em genes relacionados aos canais de sódio e potássio podem ser os mecanismos responsáveis por epilepsias, as que tem causa genética e são hereditária. Essas mutações alteram as funções normais desses canais, que no caso do potássio é repolarização e hiperpolarização, enquanto sódio é responsável pela despolarização da membrana neuronal. Quanto ao canais de cálcio, o aumento no influxo de Ca^{2+} faz com haja a diminuição da sua concentração extracelular e se crie uma atividade epilética. Embora que se tenha esse conhecimento, muitos estudos ainda ocorrem afim de entender a doença (PORTO *et al.*, 2007; STEINLEIN, 2001).

2.2.1 Epidemiologia e etiologia

É estimado que o número de pacientes portadores da epilepsia ultrapassem os 50 milhões e quando pensamos no número de pessoas que são afetadas indiretamente pela doença, como familiares e cuidadores, chegamos a 500 milhões. Em cima do número de pacientes, é de conhecimento que 80% deles residem em países em desenvolvimento e a cada ano, 2,4 milhões de pessoas recebem o diagnóstico positivo para a doença. No Brasil, a prevalência de pacientes é de 380 a <430 por 100.000 habitantes (figura 8). Portanto, a Organização Mundial da Saúde considera a epilepsia um problema de saúde pública e tem traçado programas/campanhas afim de trazer informação e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Entre essas ações, temos a “Campanha Global contra a Epilepsia: fora das sombras” e nas américas, em 2011, a “Estratégia e Plano de Ação sobre epilepsia” (BILL; FOUNDATION, 2019; SPICIARICH *et al.*, 2019, WHO, 2019).

Figura 8 Prevalência global da Epilepsia a cada 100 000 habitantes.

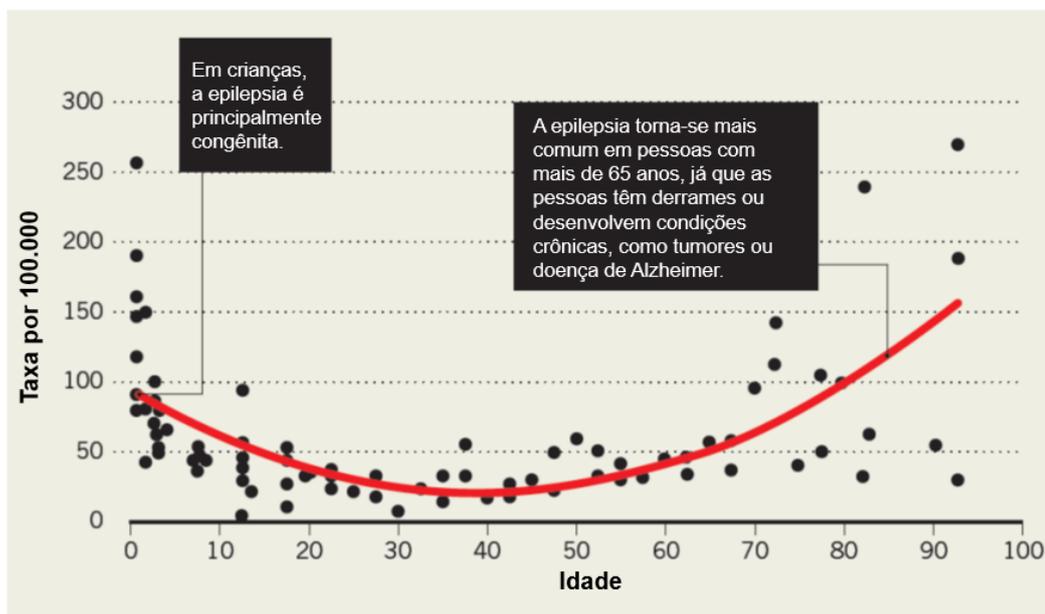


Fonte: Adaptado de BILL; FOUNDATION, 2019.

Embora os grupos mais afetados sejam o de idosos e de jovens menores de 20 anos, a epilepsia pode afetar homens e mulheres, em qualquer momento da vida, independente de raça e posição no globo (gráfico 1). De forma geral, quando comparamos com o restante da população, há um aumento de três vezes na mortalidade de pacientes epiléticos e ao confrontar com outras doenças neurológicas, a epilepsia é responsável por 1,3% de todas as mortes e também 5% dos anos de vida perdidos por incapacidade. As mortes podem ser decorrentes da epilepsia, como no caso de status epiléticos ou ainda

de traumas consequentes das crises convulsivas e suicídios. Os suicídios se mostram presentes, pois pessoas com epilepsia tendem a apresentar condições psiquiátricas, como depressão e ansiedade, mais que a população geral (gráfico 2), fora também que em muitos países há estigma social (BILL; FOUNDATION, 2017; BOER; MULA; SANDER, 2008; SPICARICH *et al.*, 2019).

Gráfico 1 Relação de ocorrência da Epilepsia por idade

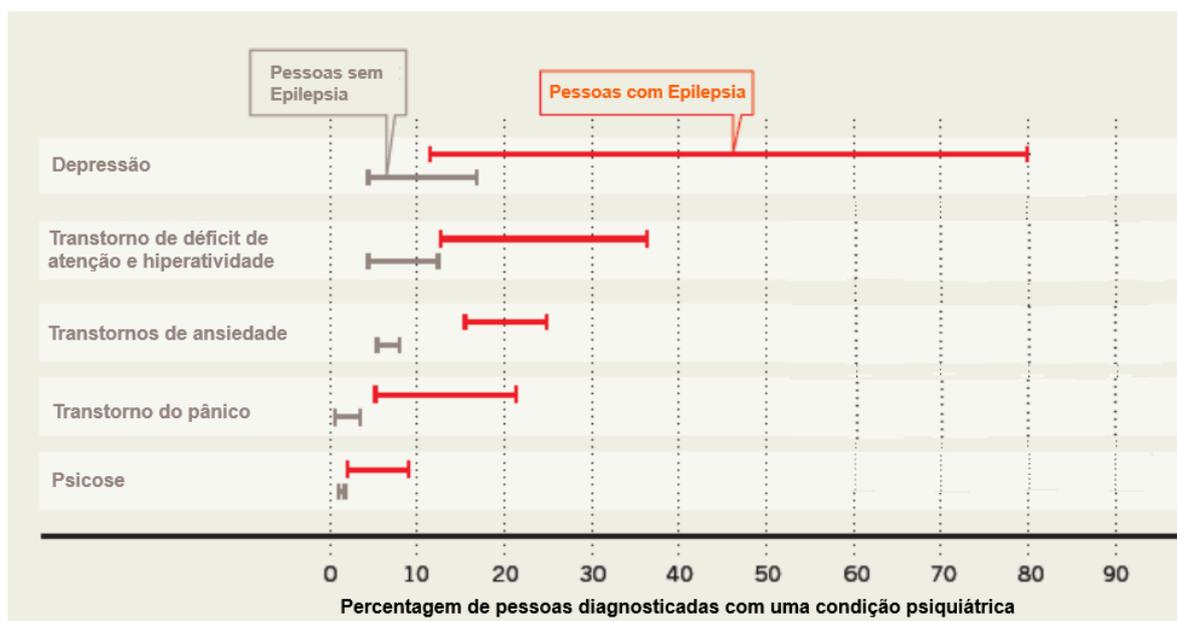


Fonte: Adaptado de ALIZED, 2014.

Ignorância, preconceito e discriminação, há 4000 mil anos, estes três pontos que resultam no estigma social, já era visto em torno dos portadores de epilepsia. Isso por que a doença sempre foi associada a impureza e a possessão de espíritos malignos. Embora, nos últimos 100 anos tenha se descoberto muita coisa sobre a doença, ainda é possível ver em alguns países a existência de várias crenças que são capazes de oprimir os epiléticos e distancia-los de um possível tratamento. Camarões africanos, liberianos e os curandeiros mais tradicionais da Suazilândia, associam que as pessoas estão possuídas por entidades e que a causa da doença é devido a bruxaria/feitiçaria e maus espíritos. Em outros países como Etiópia, Quênia e Equador ocorre exclusão social, problemas de relacionamentos com cônjuges e/ou pais, problemas de emprego e moradia. Se formos para Ásia, mais precisamente Indonésia, é considerada um “Karma” e uma punição. Na Índia, áreas rurais, pessoas são amarradas em árvores e sofrem uma série de rituais afim do espírito ser retirado. Na china, a família sente vergonha das pessoas com epilepsia e

estas também tem dificuldades para relacionamentos amorosos (BOER, 2010; BOER; MULA; SANDER, 2008).

Gráfico 2 Condições psiquiátricas de pessoas com Epilepsia versus pessoas sem Epilepsia



Fonte: Adaptado de ALIZED, 2014.

É de conhecimento que em 50% dos casos, os motivos pelos quais os pacientes manifestaram a epilepsia são desconhecidos e na outra metade, a causa pode ser variada. Além da genética, a etiologia abrange categorias como estrutural, infecciosa, metabólica e imune. A primeira etiologia ocorre quando há mutações genéticas conhecidas ou presumidas resultando em crises epiléticas. Há uma diversidade de epilepsia com essa etiologia e muitas vezes não há conhecimento sobre o gene que é responsável. Entre os exemplos de mutações conhecidas, temos aquela que ocorre nos genes do canal de potássio, KCNQ2 ou KCNQ3, causando a síndrome da Epilepsia Neonatal, que vem de um histórico familiar sendo uma síndrome autossômica dominante. É interessante ressaltar que não necessariamente as mutações são hereditárias e que uma etiologia genética não significa que não tenha uma contribuição de outro fator (SCHEFFER *et al.*, 2017; WHO, 2019).

Por outras vezes, pessoas que tem/tiverem infecções cerebrais como neurocisticercose e encefalite viral ou doenças causadas por *Cysticercosis cellulosae*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma japonicas* e *Toxocara canis*, vem apresentando convulsões e posteriormente desenvolvendo a epilepsia. Isso ocorre devido a lesões cerebrais juntamente com predisposição genética. Epilepsias com origem

infeciosas tem maior prevalência em países em desenvolvimento, logicamente devido à alta incidência de doenças que causam infecções cerebrais. Como já vimos anteriormente, a inflamação vem se mostrando envolvida com a Epilepsia. Sabe-se que a produção de anticorpos, a síntese aumentada com liberação de citocinas e quimiocinas, podem ter papel para o desenvolvimento da doença. Ao analisar crianças portadores de doenças autoimunes (como lúpus), foi visto que há uma maior prevalência epilética quando comparados com crianças sem, 1,8% a 0,4 %, respectivamente. Um total de 17,5% dos pacientes portadores de doenças autoimunes tem epilepsia (RAMANTANI; HOLTHAUSEN, 2017; VALENCIA, 2014).

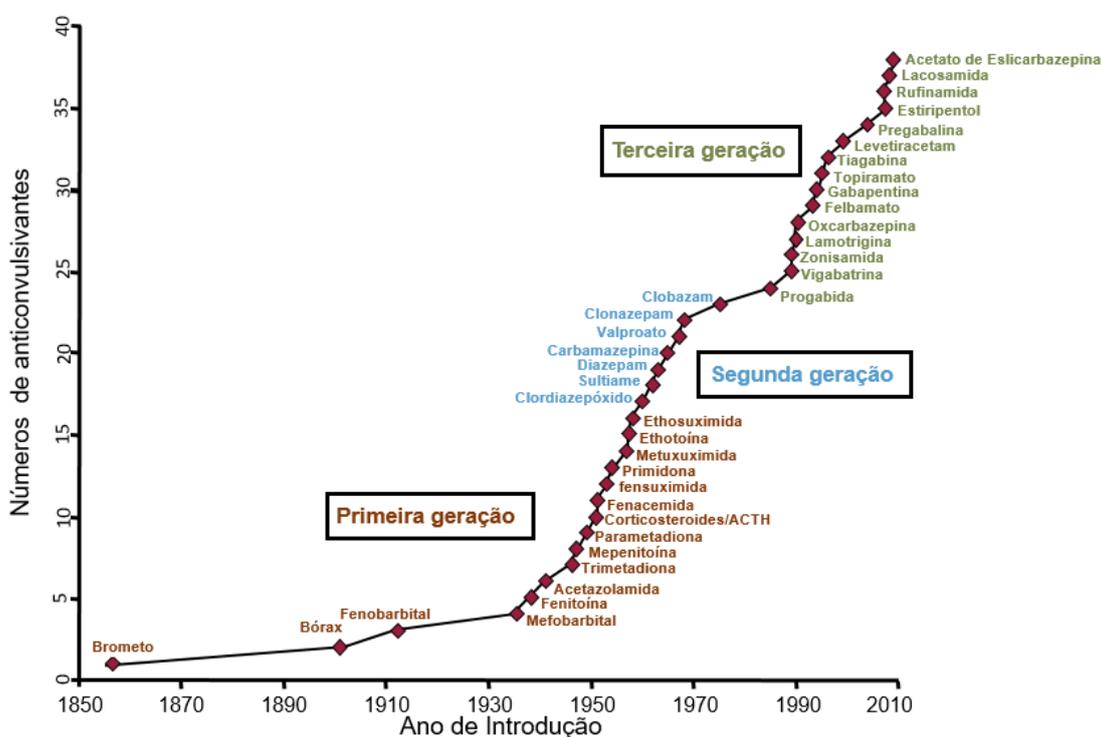
Apesar de não ser tão comum, distúrbios metabólicos podem gerar convulsões, como é no caso da hiperamonemia e hipoglicemia, que normalmente desaparece ao ser iniciado o tratamento ideal. Em outros casos, é conduzido o aparecimento da epilepsia juntamente com as convulsões, podendo ser resultado de diversas síndromes como a deficiência de creatina e deficiência de guanidinoacetato miltransferase. A predominância da epilepsia resultante de “erros” metabólicos é na infância. Uma última causa é a estrutural que pode ocorrer depois de traumas, acidente vascular cerebral, infecção ou genética, neste último caso malformações no desenvolvimento cortical. Todos esses acontecimentos podem gerar uma anormalidade estrutural, visíveis em estudos de imagens, que são responsáveis pelo desenvolvimento da Epilepsia (SCHEFFER *et al.*, 2017; SHARMA; PRASAD, 2017; WOLF; BAST; SURTEES, 2005).

Em crianças e adolescentes predomina a causa genética e embora tenha uma clara influência genética em adultos, normalmente neles, o início da epilepsia é resultado de causas estruturais adquiridas. O processo pelo qual um cérebro assintomático passa a ser epilético é conhecido como epileptogênese. Os últimos fatores descritos na etiologia estrutural são exemplos onde a epileptogênese acontece. Inicialmente, nós temos convulsões espontâneas e posteriormente um diagnóstico para epilepsia. Na literatura foi mostrado que cerca de até 50% dos casos de traumatismo, até 10% dos casos de acidente vascular cerebral e outros 7% dos casos de infecção podem desenvolver a doença, de meses até anos depois das primeiras lesões. Em convulsões com etiologias como infecciosas ou autoimune e ainda sim, outras em que sejam vistas sinais de inflamação no cérebro leva ao subgrupo denominado de “convulsões relacionadas a inflamação” diretamente relacionado a epileptogênese (ALYU; DIKMEN, 2017; SMITH, 2012; VALOTTA; CABRAL, 2008).

2.2.2 Tratamento medicamentoso da convulsão

O tratamento medicamentoso é caracterizado pela presença de 3 gerações de fármacos (gráfico 3). A primeira geração se encontra os que são, principalmente, derivados dos barbitúricos e como exemplo temos a fenitoína (FTN). Uma segunda geração teve início por volta de 1960, estruturalmente diferentes dos anteriores, os benzodiazepínicos (BZP), assim como a carbamazepina (CBZ) e valproato (VPA) são fármacos exemplos. A partir de 1980 houve um desenvolvimento mais “racional” dos medicamentos caracterizando a terceira geração, sendo presente neste grupo o Topiramato, Gabapentina e Oxcarbazepina (SCHMIDT; LO, 2011).

Gráfico 3 Linha do tempo dos fármacos anticonvulsivantes



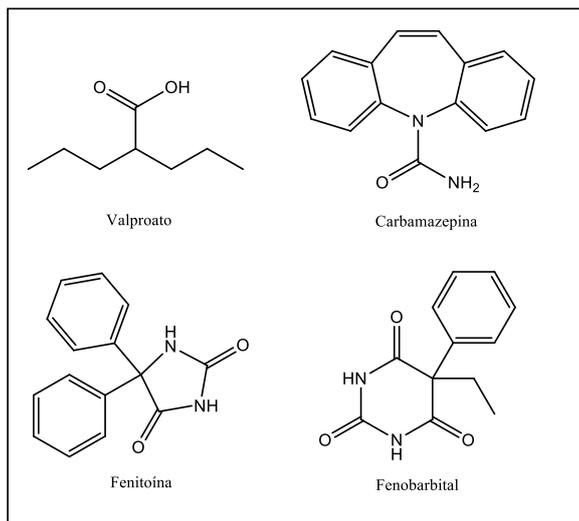
Fonte: Adaptado de SCHMIDT; LO, 2011

No Brasil, os antiepiléticos comumente utilizados são carbamazepina, clobazam, clonazepam, fenitoína, fenobarbital, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, oxcarbazepina, pregabalina, topiramato, valproato e vigabatrina (ELZA; TARGAS, [s.d.]). Um desses fármacos, o fenobarbital, entrou no mercado devido as suas propriedades hipnóticas, mas logo em seguida, os estudos desenvolvidos por Hauptmann possibilitaram o uso contra convulsões. Quimicamente falando, é o ácido 5-etil-5-fenil barbitúrico, um

ácido fraco com solubilidade moderada em água e funciona durante a convulsão controlando a atividade elétrica anormal existente no cérebro. É indicado para convulsões neonatais, para prevenção da recorrência de convulsões febris, epilepsia generalizada idiopática e importante no status epilepticus. No entanto, em algumas síndromes epilépticas infantis é considerado inapropriado. Até pelo menos 2012, um século depois de sua primeira aparição, estava presente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde, continuando então a ser amplamente utilizado, principalmente, por ter bons resultados e por ser barato (BIALER, 2012; SCHMIDT; MOSER; SPERANDIO, 2013; YASIRY; SHORVON, 2012).

Da mesma geração do fenobarbital, a FTN não possui efeito sedativo como era comum aos anticonvulsivantes utilizados até a sua descoberta. O anel da hidantoína foi combinado com dois anéis fenílicos ligados na posição C5 e é utilizada principalmente no tratamento de convulsões tônico-clônicas generalizadas, tendo efeito limitado em convulsões do tipo tônicas e atônicas, bem como mioclônicas. Pela ILAE, a fenitoína é declarada como nível A para tratamento da epilepsia focal juntamente com outras 4 drogas. O mecanismo de ação desta droga é através do bloqueio dos canais de sódio (GULDIKEN; RÉMI; NOACHTAR, 2016; KEPPEL HESSELINK; KOPSKY, 2017; SHANMUGARAJAH *et al.*, 2018). Por mais de 50 anos, o ácido valproico foi utilizado como solvente quando, por acidente, descobriu-se seus efeitos contra a epilepsia. Conhecido então como Valproato é dito como primeira linha para tratar as crises generalizadas seja ela primária ou idiopáticas, como também em crises parciais. A maioria das formulações existentes para este medicamento, o ácido valproico, são sais como valproato de sódio e divalproato de sódio (figura 9) (YACUBIAN, 2014).

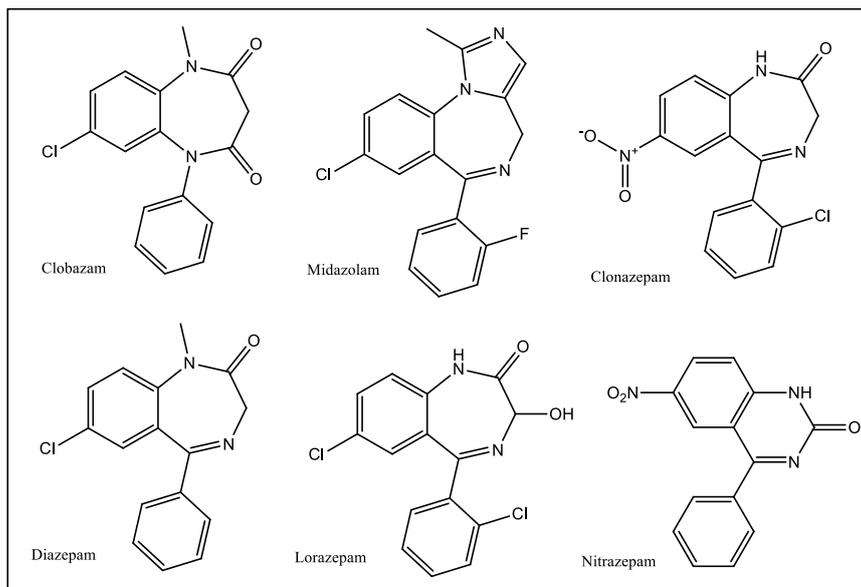
Figura 9 Fármacos utilizados no tratamento da convulsão.



Fonte: Autor, 2019.

Outro fármaco que tem eficácia nas crises generalizadas é a Carbamazepina (CBZ), que também é indicada para crises parciais e epilepsias localizadas sintomáticas, idiopáticas e indeterminadas. Esta ação é possível através de dois mecanismos básicos: ações na transmissão sináptica e receptores para neurotransmissores e ação na condutância dos canais de sódio neuronais (monoaminas, purinas, acetilcolina). O desenho estrutural da CBZ é semelhante a fármacos antidepressivos, imipramina e maprotilina, sendo um iminostilbeno (COSTA, 2014). Já o grupo dos benzodiazepínicos foram primeiro focados como agentes ansiolíticos, posteriormente ganharam mercado como antiepiléticos. Os 1,4-benzodiazepínicos e os 1,5-benzodiazepínicos são frequentemente utilizados em situação especiais em crises repetidas com intervalos curtos, crises prolongadas e no estado de mal epilético. Diazepam, Clonazepam, lorazepam e midazolam são os de primeira linha quando temos em questão situações de emergência. Enquanto que nitrazepam e clobazam são fármacos adjuvantes durante o tratamento crônico (figura 10) (BRAGA; BOGACZ, 2014).

Figura 10 Grupo de benzodiazepínicos com potencial antiepilético.



Fonte: Autor, 2019.

O uso de fármacos para tratar a epilepsia é marcado pela presença de efeitos colaterais diversos e ainda sim, segundo a Organização Mundial de Saúde, 30% da população continua a apresentar convulsões mesmo sob tratamento. No quadro 3 podemos encontrar alguns dos efeitos causados pelo uso dos fármacos tradicionais. Embora tenhamos um número extenso de fármacos disponíveis, é visto que há a necessidade de busca por medicamentos com maior eficácia, segurança e menos efeitos indesejados aos pacientes, juntamente com fármacos que sejam capazes de ir na gênese da doença e não apenas tratamento sintomático.

Quadro 3 Fármacos tradicionais e seus possíveis efeitos colaterais

FÁRMACO	POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS
Fenobarbital	Ataxia, fadiga, depressão, dificuldade de atenção e memória, distúrbio do tecido conjuntivo, dermatite alérgica, síndrome de Stevens-Johnson, insuficiência hepática, trombocitopenia.
Fenitoína	Encefalopatia irreversível, depressão, déficits de memória, atenção e concentração, alterações cardíacas, hipertrofia gengival e etc.
Carbamazepina	Sonolência, fadiga, tonturas, visão turva, diplopia, ataxia, leucopenia transitória, elevação de enzimas hepáticas, retenção de água e hiponatremia e etc.
Valproato	Efeitos Gastrointestinais e hematológicos, ganho de peso, rash cutâneo, queda de cabelo, alopecia, ovários policísticos e hiperandrogenismo e etc.
Benzodiazepínicos	Hipotensão arterial, depressão respiratória, apneia, ataxia, fadiga, sonolência, tontura, distúrbio de comportamento, agressividade e etc.

Fonte: Adaptado de CONTRERAS-CAICEDO, 2014.

2.3 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

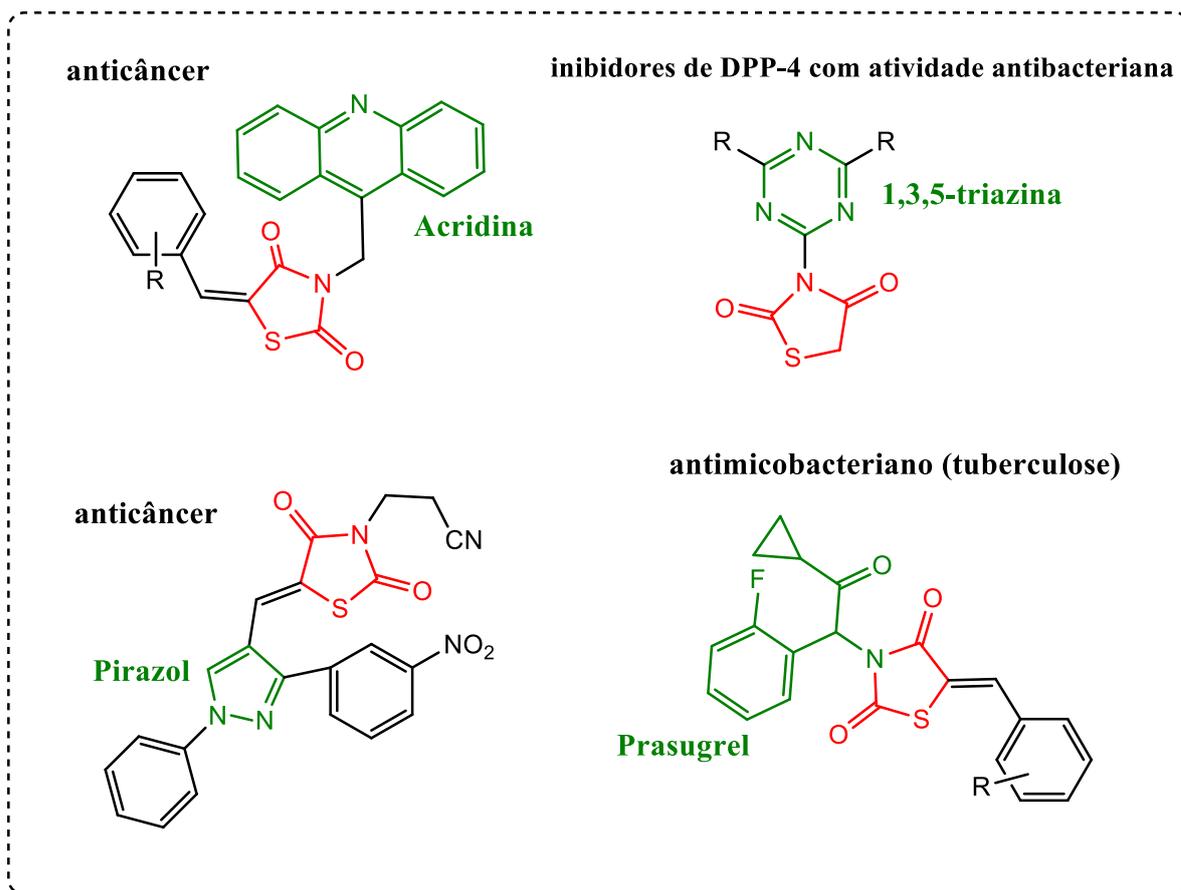
A química medicinal é a parte da ciência que tem como principal objetivo o planejamento e desenvolvimento de compostos biologicamente ativos. Envolve áreas como ciências biológicas, médicas e farmacêutica além da própria química. O desenho de moléculas através do planejamento – utilizando estratégias de modificação molecular ou ainda com emprego de técnicas computacionais – compreende a etapa de “descoberta”. Há também a otimização com o melhoramento da estrutura do composto – desenvolvimento de uma série a partir de protótipo original – através da síntese e avaliações de testes biológicos *in vitro* e *in vivo*. E uma terceira etapa é o “desenvolvimento

de um protótipo” que visa melhorar as propriedades ADMET e farmacêuticas (LIMA, 2007).

Dentro da química medicinal, a hibridização molecular é uma das estratégias de modificação molecular que tem sido amplamente utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos. Nessa estratégia, temos a junção de núcleos ativos distintos que passam a compartilhar características em uma única estrutura. Esse novo composto poderá ter atividade de um dos núcleos ou de ambos. Quando este último caso ocorre pode representar uma inovação terapêutica para as doenças que possuam etiologia multifatoriais, como a epilepsia (BARREIRO, 2008). Há vários estudos em que moléculas híbridas demonstram ser ativas para atividades como antifúngica, antituberculosa, antimalárica, anti-inflamatória, anticâncer, anticonvulsivante e contra a doença de Alzheimer (MISHRA; SINGH, 2016; RAPACZ *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018).

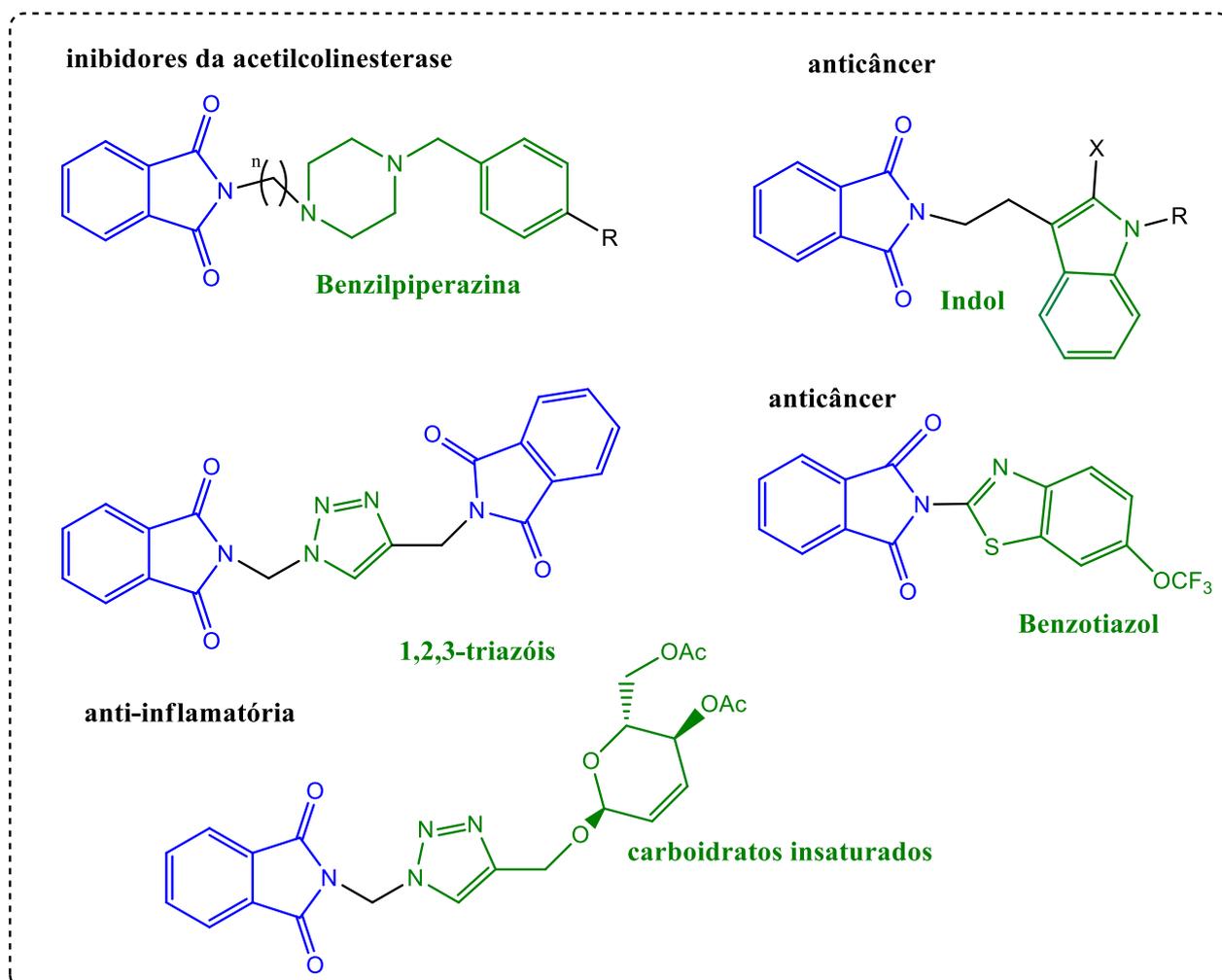
Entre os núcleos que já foram base para o planejamento e teste de novas moléculas híbridas temos as TZD's e as ftalimidas. No nosso grupo de pesquisa a TZD foi hibridizada com acridina, conhecida como tiazacridina(LPSF/AA's), possuindo propriedade anticâncer(FRANCISCO; ARAU, 2013; CHAGAS *et al.*, 2017). Outros grupos também já hibridizaram TZD com vários núcleos com atividade antibacteriana, anticâncer, antimicobacteriano (figura 11) (AVECILLA *et al.*, 2017; PONNUCHAMY *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2015). As ftalimidas seguem o mesmo caminho e já foram hibridizadas com triazol, piperazina, indol e benzotiazol com atividades como anticâncer e anti-inflamatória (figura 12) (ASSIS *et al.*, 2012; HON *et al.*, 2008; SI *et al.*, 2015; ZAHRAN *et al.*, 2018).

Figura 11 Moléculas híbridas com TZD e outros núcleos.



Fonte: adaptado de AVECILLA *et al.*, 2017; PONNUCHAMY *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2015; CHAGAS *et al.*, 2017.

Figura 12 Moléculas híbridas com ftalimida e outros núcleos.

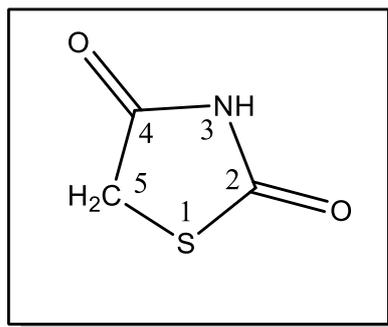


Fonte: adaptado de ASSIS *et al.*, 2012; HON *et al.*, 2008; SI *et al.*, 2015; ZAHARAN *et al.*, 2018.

2.3.1 Tiazolidinas

Como visto a cima a tiazolidina vem sendo utilizada no desenho de novas moléculas, trata-se de composto orgânico heterocíclico de 5 membros, onde temos um átomo de azoto e um de enxofre. Ao adicionar duas porções de carbonila nas posição 2 e 4 do anel da tiazolidina, teremos a tiazolidina-2,4-diona (figura 13). Substituições diferentes na posição 3 e 5 do anel tiazolídínico encaminharam ao desenvolvimento de moléculas com um espectro de atividades biológicas variadas. É um núcleo com grande importância na química medicinal e em diversas pesquisas vem sendo utilizado como intermediário para criação de drogas sintéticas (CHADHA *et al.*, 2015).

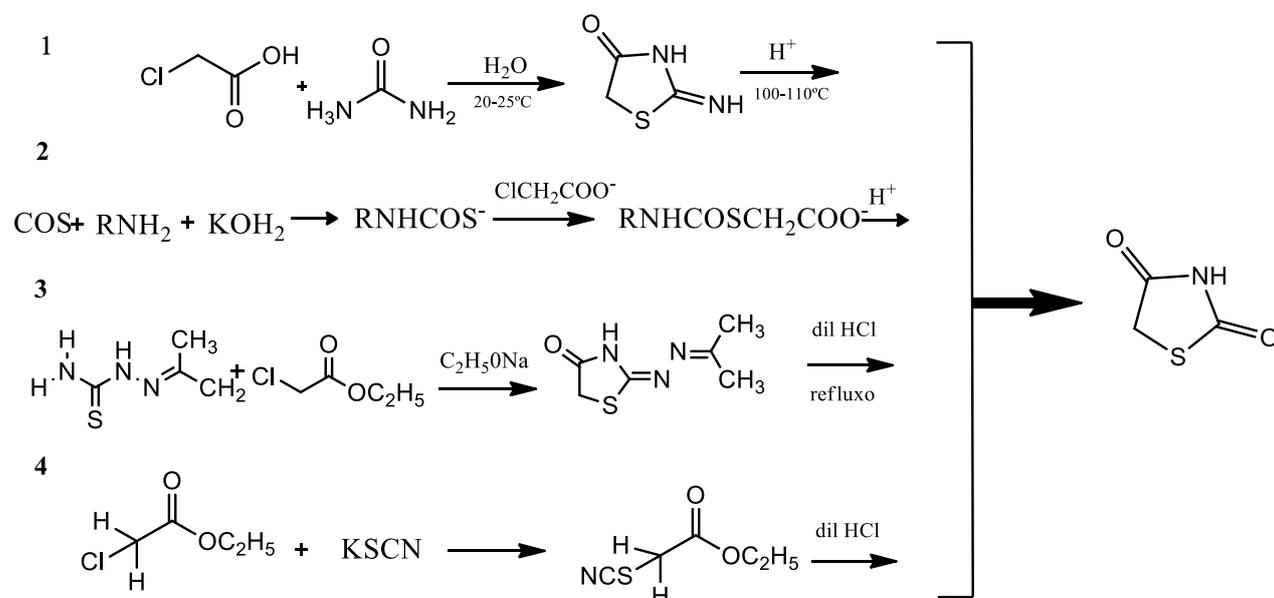
Figura 13 Estrutura da Tiazolidina-2,4-diona



Fonte: autor, 2019.

Ainda segundo Chadha e seus colaboradores, há algumas possíveis formas de síntese para obter o núcleo da tiazolidina-2,4-diona (esquema 1). A mais comum é através da reação entre o ácido cloroacético com tioureia(1), utilizando uma temperatura ambiente ele obtém o intermediário que em uma segunda reação, em temperatura alta, formará a TZD. Essa reação pode ser feita também através de micro-ondas fazendo que ela seja mais rápida. Uma outra forma trata-se de uma reação que tem duas etapas (2) contando com a formação de dois intermediário, o ultimo - tiolcarbamato – ciclizará formando o núcleo da TZD. O núcleo também pode ser formado na presença de ácido clorídrico diluído a partir de tiossemicarbazona (3) ou etilcloroacetato (4).

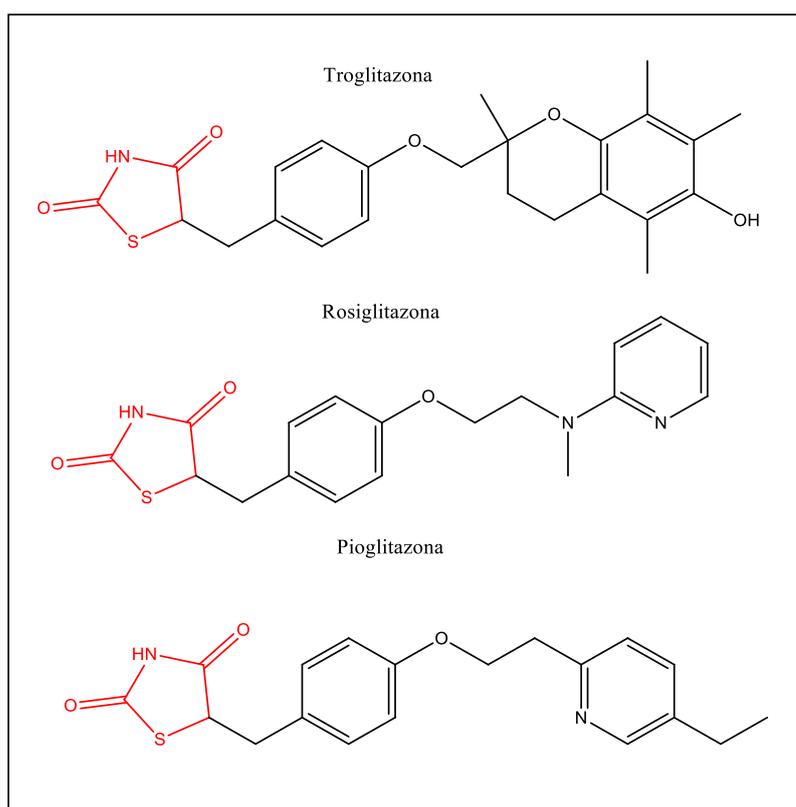
Esquema 1 Formas de obtenção do núcleo da Tiazolidina-2,4-diona

Fonte: adaptado de CHADHA *et al.*, 2015.

As tiazolidinas ganharam o mercado com sua potencialidade como sensibilizadores de insulina. A descoberta das TZDs revolucionou o tratamento da diabetes tipo 2.

Troglitazona® (TGZ), Rosiglitazona® (RGZ) e Pioglitazona® (PGZ) foram aprovadas para uso em 1997, 1999 e 2000, respectivamente (figura 14). Apesar da eficiência destes fármacos, 3 anos depois de ser aprovado TGZ foi retirado do mercado devido a hepatotoxicidade e em 2010 foi a vez de RGZ sair devido à cardiotoxicidade. O mecanismo pelo qual é responsável por esse efeito, é a conhecida alta afinidade com o receptor PPAR-gama. A atuação agonista a este receptor acaba levando a regulação da diferenciação de adipócitos, armazenamento de ácidos graxos e metabolismo da glicose (JAIN; VORA; RAMAA, 2013).

Figura 14 Fármacos derivados de TZD.

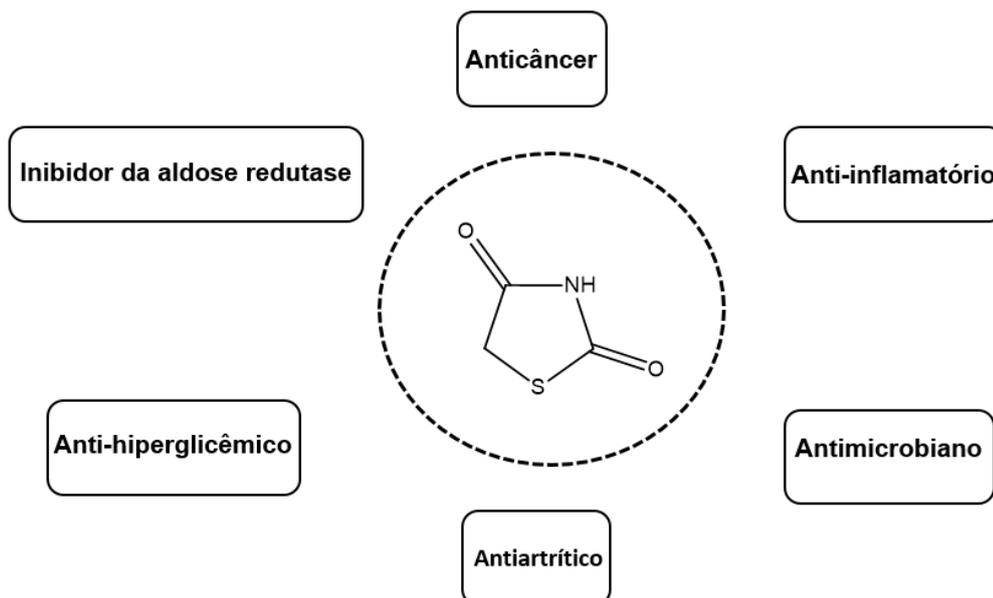


Fonte: Autor, 2019.

A atuação como agonista de PPAR-gama não conferiu apenas atividade anti-hiperglicêmica, mas também anti-inflamatória. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, PPARs, trata-se de um sub conjunto da superfamília de receptores nucleares que possuem três formas: alfa, beta/delta e gama. Hoje já se sabe que PPAR-gama tem papel fundamental na resposta imune, já que possui a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatória como IL-12, IL-1beta, TNF-alfa e IL-6 e ainda pode encaminhar a diferenciação de células imunes para células com fenótipos anti-inflamatório. Por esses motivos, PPAR-gama tornasse um possível alvo terapêutico contra

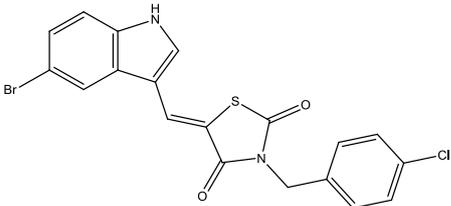
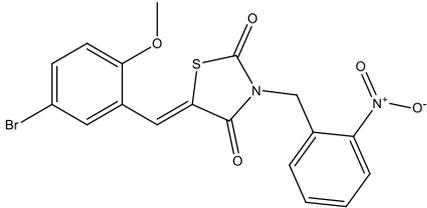
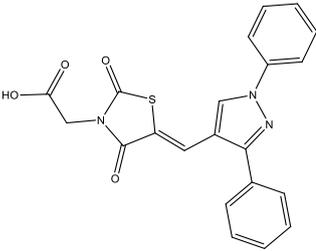
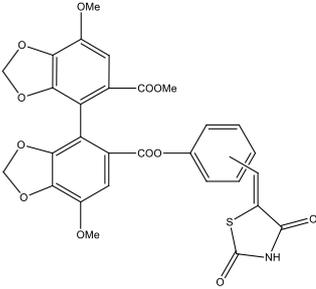
a inflamação, saindo das rotas das COX's e seus efeitos colaterais indesejáveis (MARTIN, 2010). Há diversos estudos então que passaram a avaliar atividade anti-inflamatória de derivados da TZD (quadro 4). Outras atividades demonstradas pelo núcleo são anticâncer, antimicrobiano, antiartrítico e inibidor da aldose redutase (JAIN; VORA; RAMAA, 2013) (figura 15).

Figura 15 Atividades biológicas relacionadas ao núcleo da Tiazolidina



Fonte: adaptado de JAIN; VORA; RAMAA, 2013

Quadro 4 Derivados da tiazolidina-2,4-diona com atividade anti-inflamatória investigada

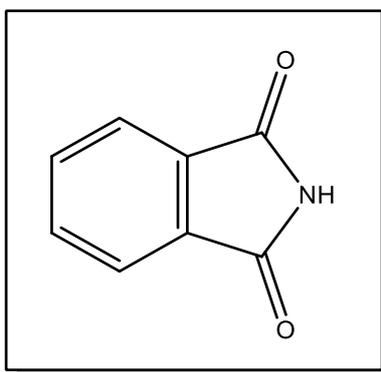
REF	Composto	Atividade
SANTIN <i>et al.</i> , 2013		Docking: afinidade com as COXs e os três subtipos de PPAR; Efeito in vivo redução do influxo de neutrófilos
DA ROCHA JUNIOR <i>et al.</i> , 2013		Inibição de IL-17A, IL-22, IL-6 e IFN-gama em PBMC de pacientes de artrite reumatoide
BANSAL <i>et al.</i> , 2019		Docking: afinidade com PPAR-gama; Inibição de TNF-alfa, IL-1beta e MDA
WANG <i>et al.</i> , 2011		Inibição da produção de óxido nítrico; Diminuição do edema de pata; Efeito hepatoprotetor

Fonte: Autor, 2019.

2.3.2 Ftalimida

A 1,3-isoindolinediona, conhecida como ftalimida, também é um núcleo de importância para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos. Quimicamente falando trata-se de uma amina aromática onde duas carbonilas estão ligadas a porção funcional da amina (figura 16). Assim como a tiazolidina, na linha de pesquisa de síntese e avaliação biológica, a ftalimida vem sofrendo alterações/substituições no seu núcleo e no átomo do nitrogênio. Seu potencial terapêutico vem sendo visto através das variadas atividades que possui como a anticâncer, anti-angiogênico, anti-inflamatória, anticonvulsivante, anticolinesterásico e antimicrobiano (figura 17) (SHARMA *et al.*, 2010).

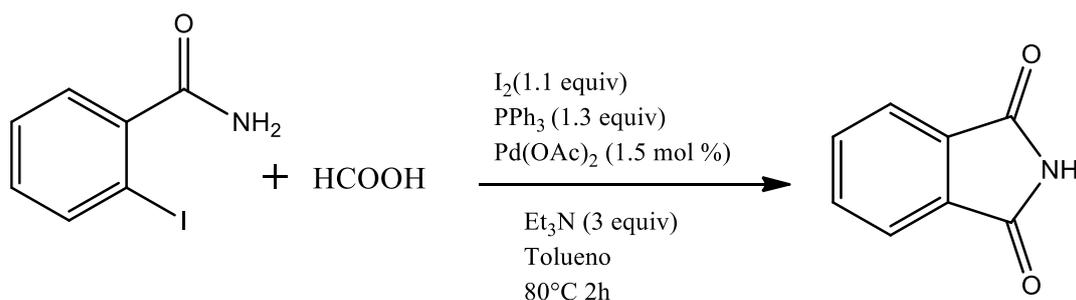
Figura 16 Estrutura química da Ftalimida



Fonte: Autor, 2019.

Entre as metodologias para síntese da ftalimida temos a reação entre 2-iodobenzamida e ácido metanoico (esquema 2), na presença de iodo, trifetilfosfina, acetato de paládio (II) e Trietilamina. O solvente foi tolueno, sendo mantido a 80°C por 2h. A ftalimida é o segundo produto da reação sendo isolado e purificado. O esquema da reação encontra-se abaixo (WANG *et al.*, 2019).

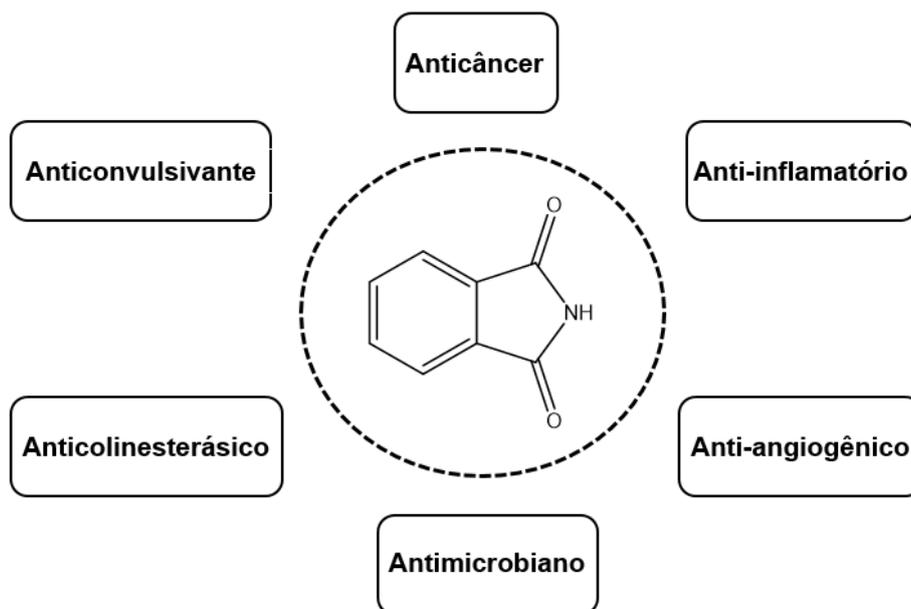
Esquema 2 Síntese do núcleo da ftalimida



Fonte: adaptado de WANG *et al.*, 2019.

No mercado farmacêutico, a ftalimida mais conhecida é Talidomida® que foi comercializada na Europa em 1957 sendo indicada para o tratamento da ansiedade, insônia e no caso de mulheres grávidas, contra as náuseas e vômito. A Talidomida® foi classificada como uma droga sedativa e hipnótica. Aos poucos ganhou o mercado em vários países, mas a partir de 1960 houve uma reviravolta. Inicialmente, foi visto que pacientes que faziam uso prolongado da droga passaram a apresentar uma neuropatia periférica e dois anos depois, foi retirada do mercado após ser associada a um grande número de casos de teratogenicidade. Posteriormente, vários estudos levaram a utilização da Talidomida® em outras doenças. No Brasil, ela é indicada para o tratamento de hanseníase, doenças sexualmente transmissíveis e doenças crônico-degenerativas (lúpus eritematoso, doença enxerto-versus-hospedeiro). Essas utilidades clínicas são possíveis devido as propriedades anti-inflamatória e moduladora da resposta imunológica e é de conhecimento que a Talidomida® é capaz de reduzir os níveis de TNF-alfa (GRYGLEWSKI, 1964; MARTÍNEZ-FRÍAS, 2012).

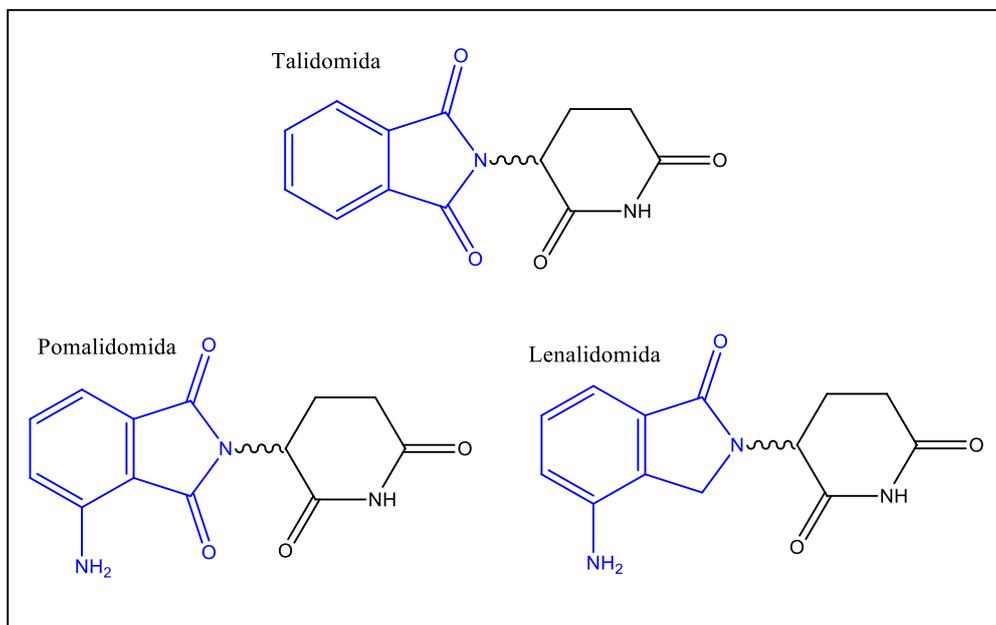
Figura 17 Atividades biológicas relacionadas para o núcleo da Ftalimida.



Fonte: Autor, 2019.

O protótipo da talidomida® serviu de arcabouço para otimização colocando mais dois fármacos no mercado, a Pomalidomida® e Lenalidomida®. Alterações foram feitas no núcleo da ftalimida, onde no primeiro foi adicionado ao anel aromático um grupamento NH₂ e no segundo fármaco, além da adição desse grupo, foi retirado uma carbonila (figura 18). Os dois são indicados para o tratamento de mieloma múltiplo devido aos seus efeitos imunomoduladores, antiproliferativos e antiangiogênicos (SCOTT, 2014; ZELDIS *et al.*, 2011).

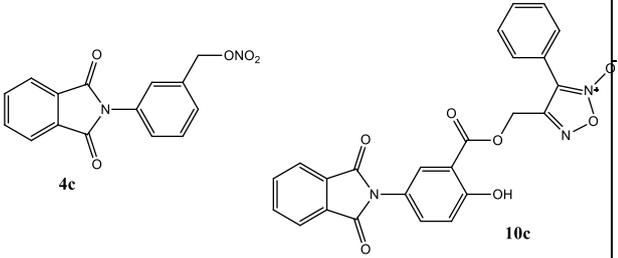
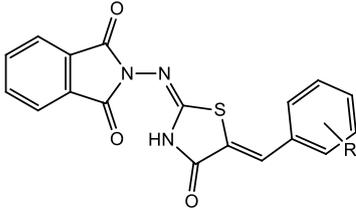
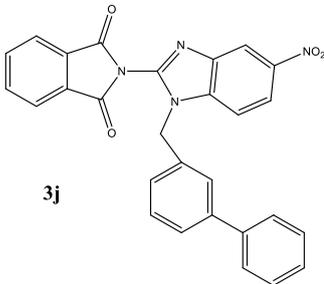
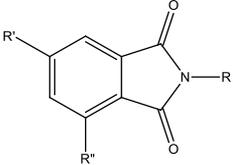
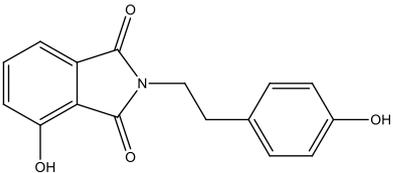
Figura 18 Fármacos derivados da Ftalimida no mercado farmacêutico.



Fonte: Autor, 2019.

A descoberta da Talidomida® e seus análogos como compostos imunomoduladores despertou o interesse no núcleo da ftalimida. Diversos derivados são planejados afim avaliar sua possível atividade anti-inflamatória. Estes já demonstram ser moduladores de citocinas como IFN-gama, IL-2, IL-6, TNF-alfa, IL-10 e IL-1beta, também foi visto a capacidade de inibição do óxido nítrico. A eliminação da produção de óxido nítrico (NO) mostra-se como alvo para fármacos com atividade contra a inflamação, pois o NO é um mediador inflamatório. A inibição das COXs e LOXs por moléculas contendo ftalimidias também já foi investigada, assim como a capacidade desses compostos em diminuir a inflamação aguda através da avaliação pelo modelo de edema da pata de rato. Do mesmo modo que as tiazolidinas, a ftalimida também demonstrou a interação agonista de PPAR-gama. No quadro 5, é possível conferir alguns derivados que demonstram resultados anti-inflamatório.

Quadro 5 Derivados da ftalimida com atividade anti-inflamatória investigada

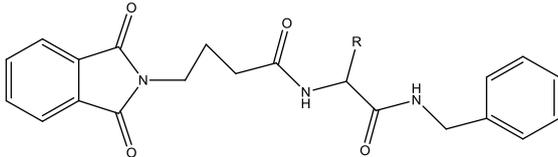
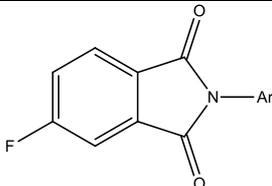
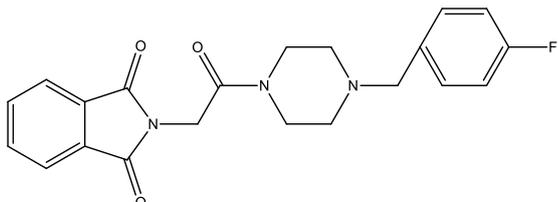
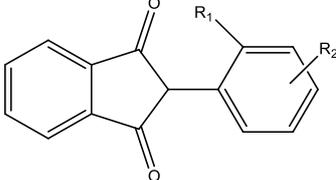
REF	Composto	Atividade
CHELUCCI <i>et al.</i> , 2019		Inibição de TNF-alfa: 4c: 73.5% (100µM); 10c: 65.0% (100µM);
DE OLIVEIRA CARDOSO <i>et al.</i> , 2015		Inibição de citocinas: TNF-alfa: 40-73%, IFN-gama: 35-75% IL-2: 50-70% IL-6: 20-40%
KAUR; SILAKARI, 2018		Inibição de COX-2 e 5-LOX; Diminuição do edema de pata; Atividade analgésica.
BACH <i>et al.</i> , 2017		Inibição da produção de óxido nítrico; Inibição de TNF-alfa e IL-1beta
SU <i>et al.</i> , 2017		Agonista PPAR-gama; Inibição da expressão de TNF-alfa, IL-1beta e IL-6;

Fonte: Autor, 2019.

A atividade anticonvulsivante também é alvo da pesquisa com compostos que possuem o núcleo da ftalimida. Os compostos foram investigados através dos testes de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) e eletrochoque máximo (MES). Alguns

derivados conferiram proteção a uma quantidade aproximado ou valores iguais ao fármacos como fenitoína e carbamazepina. Essa atividade é conferida a ftalimida devido a um possível bloqueio ao canal de sódio como foi visto em estudo de docking. No quadro 6, é possível conferir alguns derivados que demonstram resultados anticonvulsivante.

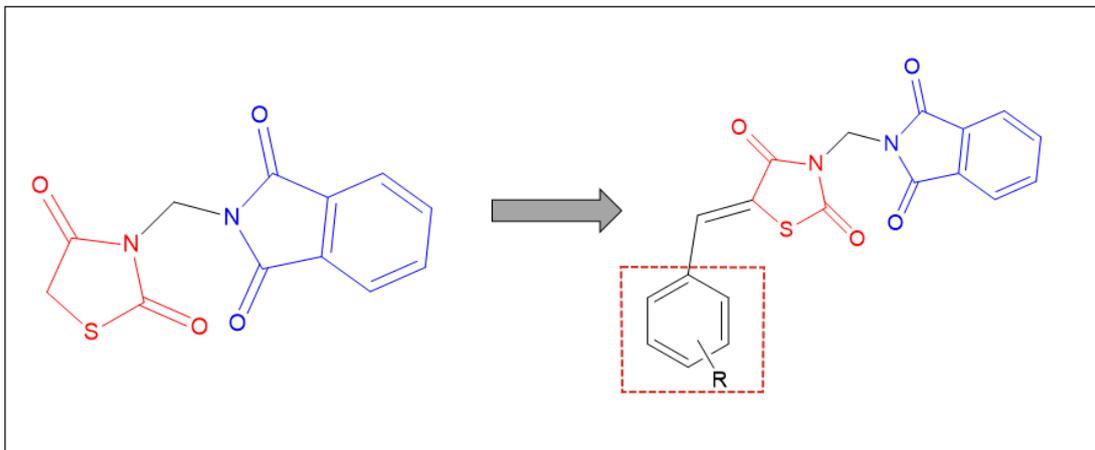
Quadro 6 Derivados da ftalimida com atividade anticonvulsivante investigada

REF	Composto	Atividade anticonvulsivante
AHUJA; HUSAIN; SIDDIQUI, 2014		Eletrochoque máximo Proteção 4/4 ratos em 0.5h e 2h Fenitoína: 4/4 Carbamazepina: 4/4
IMAN <i>et al.</i> , 2018		Convulsão induzida por pentilenotetrazol Proteção 6/10
KAMIŃSKI <i>et al.</i> , 2011		Eletrochoque máximo Proteção 4/4 ratos em 2h Fenitoína: ¾
IMAN; SAADABADI; DAVOOD, 2013		Docking: bloqueio de canal de sódio

Fonte: Autor, 2019.

Diante das problemáticas das doenças expostas acima e dos diversos efeitos colaterais não benéficos dos fármacos padrões, bem como a potencialidade demonstrada pelos núcleos da TZD e da ftalimida, é visto a possibilidade hibridização dos dois núcleos formando o LPSF/FT-1. Posteriormente, serão adicionados radicais variados, visando contribuir na busca de novos fármacos anticonvulsivantes e anti-inflamatórios que possam ser mais eficazes e seguros com menos efeitos indesejáveis (figura 19).

Figura 19 Hibridização molecular tiazolidina-ftalimida e obtenção dos derivados LPSF/FT's.



Fonte: Autor, 2019.

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE ORGÂNICA E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.1.1 Equipamentos e Materiais

3.1.1.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante o processo de síntese e para análise estrutural foram a Placa Aquecedora Digital (Nova Instruments®), Medidor de ponto de fusão modelo M-565 (Buchi®), Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência modelo LC-20AT (Shimadzu®), Espectrômetro de massas/maldi-tof modelo Autoflex III (Bruker®), Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear modelos Varian Unity Plus 300MHz e Varian Unmrs 400MHz como também Espectrofotômetro de Infravermelho modelo IV Prestige-21 por transformada de Fourier (Shimadzu®).

3.1.1.2 Reagentes e Solventes

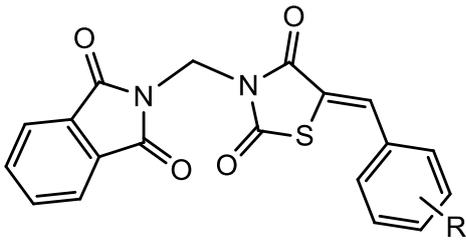
Os solventes, reagentes e intermediários usados para a sínteses dos compostos foram: metanol, acetronitrila, água destilada, tolueno, etanol, hexano, acetato de etila, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, morfolina, acetato de amônio, ácido monocloroacético, tiouréia, *N*-(clorometil)ftalimida, 4-metoxibenzaldeído, 4-bromobenzaldeído, 3-(Trifluorometoxi)benzaldeído, 9-antracênil(benzaldeído), 4-fluorobenzaldeído, 2,6-diclorobenzaldeído, 2,4-diclorobenzaldeído, 3,4-diclorobenzaldeído, 4-(trifluorometil)benzaldeído, 4-metilbenzaldeído, 5-bromo-indol-3-carboxaldeído, 3-nitrobenzaldeído, 5-bromo-2-metoxibenzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 2-nitrobenzaldeído. Os reagentes utilizados para as sínteses são das marcas Sigma-Aldrich® e TCI Chemicals®.

3.1.2 Rotas de síntese

A obtenção dos derivados LPSF/FT's contou com 3 etapas reacionais (Esquema 3). Na primeira etapa, temos a ciclização da tioureia com ácido monocloroacético obtendo assim o primeiro intermediário, a tiazolidina-2,4-diona(TZD). Na segunda etapa, a tzd

reage através de uma n-alquilação com a N-(clorometil)ftalimida formando o intermediário 3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/FT-1). A terceira etapa foi uma condensação de Knoevenagel foi realizada entre os aldeídos e o LPSF/FT-1 sintetizando os derivados tiazofthalimídicos finais. No quadro 7 encontra-se os substituintes de cada final sintetizado e mais detalhes da metodologia podem ser encontrado no apêndice A, página 120.

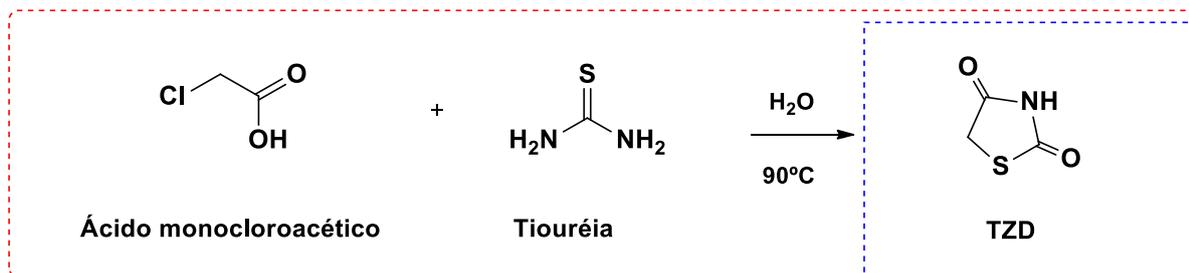
Quadro 7 Estrutura e radicais dos compostos finais LPSF/FT's

	R	Código LPSF	R	Código LPSF
		4-OCH ₃	FT-16	4-CF ₃
	3-OCF ₃	FT-19	4-CH ₃	FT-36
	4-F	FT-31	3-NO ₂	FT-38
	2,6-Cl	FT-32	5-Br-2-OCH ₃	FT-39
	3,4-Cl	FT-34	4-OH	FT-40

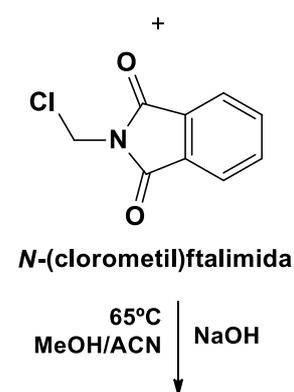
Fonte: Autor, 2019.

Esquema 3 Etapas para obtenção dos derivados tiazoftalimídicos

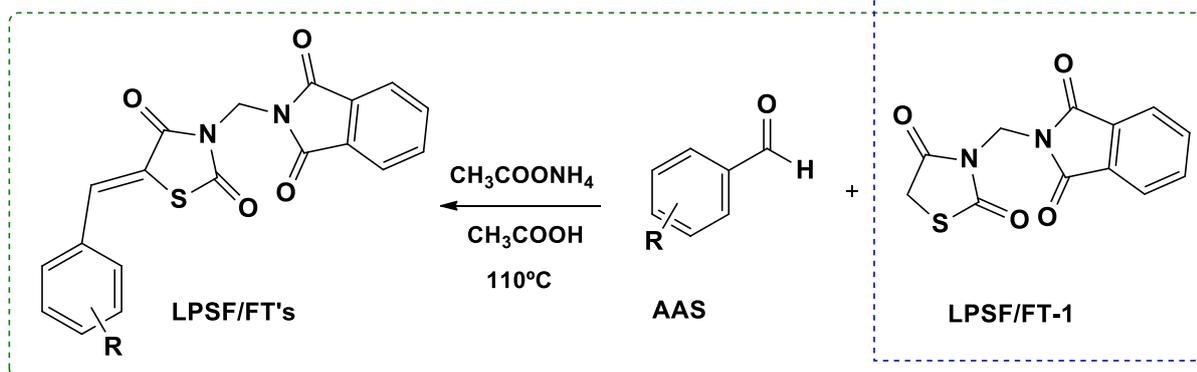
Etapa 1. Síntese do intermediário Tiazolidna-2,4-diona



Etapa 2. Síntese do intermediário LPSF/FT-1



Etapa 3. Síntese dos intermediário compostos finais LPSF/FT's



Fonte: Autor, 2019.

3.1.3 Confirmação estrutural

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): com o emprego do CLAE foi possível acompanhar a reação em tempo real bem como avaliar o grau de pureza dos compostos. Para solubilizar as amostras foi utilizado acetonitrila (ACN) na proporção de 0,2 mg/mL e estas foram passadas para vial através de filtro. Foram então aplicadas em coluna (C-18/fase estacionária) a 40°C. Os solventes de fase móvel foram Metanol (MeOH) e ACN. Quanto à variação do gradiente de solventes tivemos:

0,01min – 80% MeOH/ 20% ACN

10min – 20% MeOH/ 80% ACN

15min – 20% MeOH/ 80% ACN

15min – Fim de corrida.

Espectrometria de massas (EM): A espectrometria de massas é uma técnica utilizada para determinar a massa de compostos químicos. Empregada então para diversos fins, inclusive, o desenvolvimento de novos compostos candidatos a fármacos. Na espectrometria de massas, o composto é ionizado, separado para enfim ser detectado. Entre as variações de métodos existentes temos, a Ionização/dessorção a laser assistida por Matriz (MALDI) associada ao método de separação “time of fly” (TOF). A ionização acontece através da utilização de um laser capaz de excitar o analito, separação tem como base a diferença de velocidade/tempo que os íons levam para chegar ao detector. Esta foi a técnica adotada para analisar os LPSF/FTs finais. Utiliza-se 10-20µl de DMSO ou CDCl_3 para solubilizar os compostos que foram então plaqueados e levados aos espectrômetro. Quando solubilizados com DMSO a placa foi à estufa (60°C) para retirada de solvente. Foi utilizado Alfa-Ciano (Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) como matriz e como calibrante, o pep (peptide calibration standard II).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN): outra técnica bastante utilizada para auxiliar na comprovação estrutural de compostos orgânicos é a RMN, principalmente a de Hidrogênio e de Carbono. Nesta técnica, os compostos são submetidos a um campo magnético que afeta o spin do núcleo fazendo com que eles possam ser detectados. No espectro de hidrogênio, a faixa de detecção baseada no deslocamento químico é de 0-10 partes por milhão (ppm). Já faixa de deslocamento para o elemento de carbono tem variação de 0-200ppm. Os solventes utilizados para analisar os compostos foram DMSO- d_6 ou CDCl_3 - d em temperatura ambiente. Através dos espectros foi possível identificar os picos que caracterizam os compostos correspondentes aos anéis aromáticos, alcanos, alcenos e alguns de seus radicais.

Espectrofotometria de Infravermelho (IV): através do IV é possível identificar os principais grupos funcionais das moléculas, isso porque os compostos são capazes de absorver radiações eletromagnéticas de frequências variadas na região de infravermelho. Teremos assim um gráfico de intensidade de absorção (% transmitância) por número/comprimento de onda. Ligações como C=C existentes nos anéis aromáticos, C=O das carbonilas e de outros grupamentos são caracterizadas em faixas de comprimentos de ondas e intensidades específicas. Podemos então caracterizar os compostos sintetizados, analisando os espectros em relação aos grupos existentes que é de nosso

conhecimento. As amostras foram preparadas em forma de pastilha de Brometo de Potássio (KBr) na proporção de 1:100.

Ponto de Fusão: os compostos foram macerados e colocados em capilares apropriados para realização da análise. O método utilizado foi de 80-305°C subindo 2.0°C/min.

3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.2.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), com o registro de número 91714718.0.0000.5208. Também possui aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPE) com processo de nº 0003/2019.

3.2.2 Ensaio *In vitro*

3.2.2.1 Recrutamento de voluntários sadios e critérios de Inclusão e Exclusão

Foram recrutados 16 voluntários saudáveis, de ambos os sexos, estando na faixa etária de 18 a 50 anos e assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). Todos os voluntários foram esclarecidos sobre os procedimentos e objetivos do estudo. Através de um questionário prévio foram excluídos qualquer indivíduo que tenha relatado doença inflamatória ou imunodeficiência, tenha feito uso de qualquer medicamento ou que tenha ingerido bebida alcoólica nas últimas 24 horas. Foram excluídos também aqueles que não aceitaram participar da pesquisa.

3.2.2.2 Coleta de sangue e isolamento das PBMCs

A coleta de 15 ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina, foi realizada no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de doadores sadios por centrifugação com FicollPaque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences), sendo cultivadas com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, juntamente com HEPES 10mM e penicilina/estreptomicina 200 U/ml.

3.2.2.3 Ensaio de citotoxicidade

As PBMCs foram utilizadas para realização do ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Estas células foram plaqueadas em placas de 96 poços e foram incubadas por 24h na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram tratada com os compostos LPSF/FT's (16, 19, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 39 e 40) nas concentrações de 1, 10 e 100µM, e incubadas novamente por 48h. Também tiveram poços com apenas células e outros poços tratados com DMSO a 0,1%. Ao termino das 48h, foi adicionado a cada poço 20 µL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e retornada a estufa nas mesmas condições por três horas, depois, 130 µL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% foi também adicionado. A absorbância foi mensurada 24 horas depois no comprimento de onda de 570 nm em leitora de placas (Elx808, Biotek, EUA).

3.2.2.4 Cultura celular e determinação de citocinas

As PBMCs também foram utilizadas para determinação de citocinas, sendo estas cultivadas em placas de 24 poços (1x10⁶ células/poço) em meio RPMI-1640 com suplemento de soro bovino fetal a 10% incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Estas células foram estimuladas utilizando PMA+inomicina(PMA+ION) na concentração de 100 ng/mL. Os controles utilizados foram poços com Dexametasona (10µM) (DEXA) e outro com apenas células. Após 48h, os sobrenadantes de cada poço foram recolhidos e utilizados para a dosagem de citocinas. A dosagem foi realizada com kits ELISA sanduíche de INF-γ(BD Bioscience) e IL-17A (Invitrogen) seguindo o protocolo recomendado pelo fornecedor. Por fim, a absorbância foi mensurada nos comprimentos de onda de 450 nm e também no de 570 nm em leitora de placas (Elx808, Biotek, EUA).

3.2.2.5 Análise de dados

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias e desvios padrão. Para verificação de possíveis diferenças entre média foram usados o teste “t” de Student para amostras independentes e o teste de Wilcoxon não paramétrico para avaliar amostras pareadas. Foram considerados significativos valores de p<0,05.

3.2.3 Ensaio *In vivo*

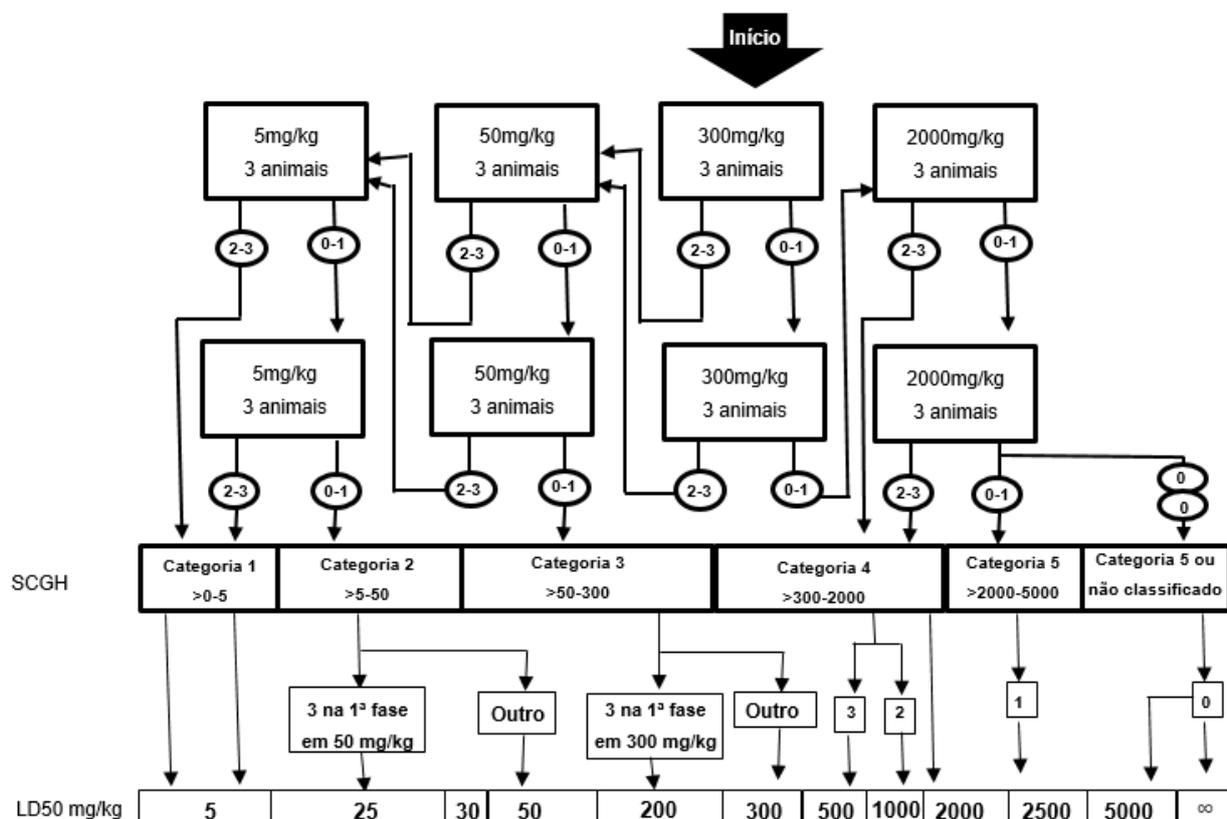
Os testes *in vivo* foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Filipe S. Duarte no laboratório de Neurofarmacologia Experimental da Universidade federal de Pernambuco. Foram utilizados ratos isogênicos/Wistar com 2,5-3 meses. A administração do composto ocorreu por via oral (gavagem), em forma de suspensão, utilizando como veículo o Propilenoglicol a 10%(PROP).

3.2.3.1 Teste de toxicidade aguda

Neste teste só foram utilizadas ratas fêmeas com 2,5 meses havendo um grupo controle (veículo=PROP) e outro com o composto testado, sendo o “n” de 3 para cada condição.

Para avaliação da toxicidade aguda foi seguido o método proposto pela OECD 423(OECD, 2001)(figura 20). Na noite antes da realização dos testes os animais foram deixados em Jejum e no dia seguinte, foram pesados e houve a administração dos compostos. Durante 4h, após o tratamento, uma triagem comportamental foi realizada através do teste de Irwin (1968). O teste inclui uma observação geral que avalia uma série de parâmetros que incluíam possíveis alterações nos olhos, orelhas e efeitos gerais, todos descritos em tabela (para mais detalhes ver apêndice C, página 147). Depois, os animais foram acompanhados por 14 dias, sendo observado o ganho de peso, o estado geral e a mortalidade. Ao final deste período, as ratas foram eutanasiadas e os seus órgãos foram pesados e separados para uma posterior avaliação histológica.

Figura 20 Método de classe tóxica aguda - OECD 423. 0,1,2,3: número de animais mortos em cada etapa. SCGH: Sistema de Classificação Harmonizada Globalmente para Substâncias e Misturas Químicas. ∞: não classificado.



Fonte: adaptado de OECD, 2001.

3.2.3.2 Teste de convulsão induzida por PTZ

Para avaliar a possível atividade anticonvulsivante dos compostos, foram utilizados o “n” de 8 animais para cada condição. As condições foram controle negativo (veículo) e composto em três doses 100, 300 e 600mg/kg. Os ratos machos com 3 meses foram inicialmente pesados e depois receberam seus respectivos tratamentos. Depois de 1h da administração, os ratos receberam 80mg/kg de Pentilenotetrazol (PTZ) via intraperitoneal para induzir as convulsões.

3.2.3.3 Análise de dados

Assim como nos testes in vitro os resultados foram analisados e considerados significativos valores em que eram $p < 0,05$. Foi usado o teste OneWay ANOVA e Newman-Keuls.

3.3 ESTUDOS *IN SILICO*

Utilizando uma ferramenta online, SWISSADME (SADME) (www.swissadme.ch) e SWISSTARGETPREDICTION (STP) (www.swisstargetprediction.ch), foi realizado um estudo *in silico* com os compostos finais LPSF/FT's em novembro de 2019. Através do SADME é possível obter previsões sobre as propriedades físico-químicas e farmacocinética, já o STP consegue prever alvos biológicos por similaridade. Essa avaliação só é possível pois trata-se de reunião de informações de diversos bancos de dados bem como publicações de pesquisas científicas. Assim, as estruturas dos compostos foram desenhadas no software ChemDraw e posteriormente importada para a plataforma da ferramenta sendo os dados obtidos e analisados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE ORGÂNICA E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

4.1.1 Síntese orgânica

4.1.1.1 Tiazolidina-2,4-diona (TZD)

No LPSF, o núcleo da TZD vem sendo empregado em diversas séries de moléculas para atividades biológicas como anticâncer e anti-inflamatória, deste modo a metodologia para sua obtenção já é bem estabelecida. Para obtenção da TZD foi utilizado água destilada como solvente e temperatura de 90°C, a duração da reação varia em torno de 20-24h e o rendimento fica na faixa de 60-72%.

Na literatura, vários grupos de pesquisa têm utilizado o método mais comum de obtenção já descrito aqui anteriormente na revisão. O rendimento encontrado fica entre 46-89%. O que difere do método deste estudo é o uso de ácido clorídrico que faz com que as reações tenham duração de 8-10h, exceto para o rendimento de 89% que teve duração de 30-40h. A utilização deste ácido também acaba sendo necessário um tratamento pós-reacional, então é feita uma recristalização com etanol (AQÜICULTURA et al., 2018; BANSAL et al., 2019; D et al., 2018; RANJAN SRIVASTAVA; BHATIA; CHAWLA, 2019; SEPAY et al., 2018).

Embora a metodologia utilizada nesta dissertação tenha como resultado uma reação mais lenta com duração de 10-14h a mais, em comparação com as sínteses encontradas na literatura, a uso de apenas água como solvente sem a presença do ácido clorídrico, material altamente corrosivo e prejudicial ao meio ambiente, somado ao rendimento, dentro da faixa encontrada nas a sínteses citadas acima, e a obtenção de cristais 100% puros sem necessidade de tratamento pós-reacional, torna a metodologia desta dissertação mais atrativa.

4.1.1.2 3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/FT-1)

A síntese do segundo intermediário, LPSF/FT-1, teve como solvente a acetonitrila e metanol. Na tentativa de otimizar a reação, os parâmetros reacionais foram modificados assim foi visto que porcentagem de cada solvente na reação e o tratamento pós-reacional foram fatores chave para atingir um maior rendimento (quadro 8). Em relação aos solventes, o volume de 20% de metanol na quantidade total de solvente mostrou ser o ideal. Metanol é um solvente prático utilizado na reação para dissolver a base que tem como papel retirar o hidrogênio presente na TZD para que a reação aconteça.

Quadro 8 Relação entre a porcentagem de metanol e o rendimento

Partida	Total de solvente	Porcentagem de MeOH	Rendimento
5g	150ml	13%	37%
5g	125ml	16%	57%
5g	120ml	20%	67-74%

Fonte: Autor, 2019.

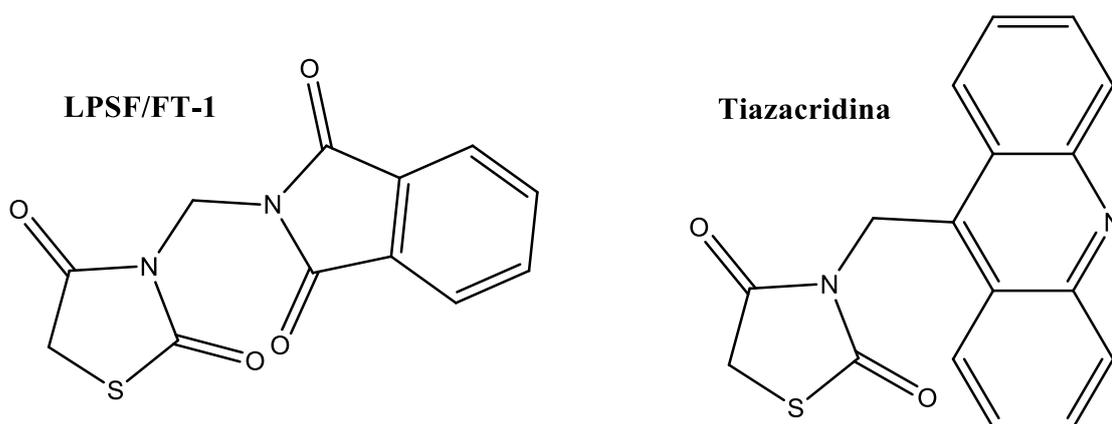
O tratamento pós-reação também se mostrou importante. A acetonitrila é o solvente majoritário e também é capaz de dissolver o LPSF/FT-1 quando utilizado em maiores quantidades. A retirada do solvente por rotaevaporação, assim como a recristalização com Metanol auxiliou na cristalização do produto contribuindo para o aumento de rendimento. O maior rendimento foi de 74% e grau de pureza de 100%. A reação foi acompanhada por CLAE e com duas horas de reação o produto já estava formado, sendo então uma reação rápida.

A junção do núcleo tiazolidina-ftalimida até o presente momento é inédito na literatura, sendo assim não é possível comparar os rendimentos com outros trabalhos. No entanto, o mecanismo de *n*-alquilação para obtenção de intermediário contendo a TZD é empregado no nosso grupo de pesquisa, um exemplo é a tiazacridina onde temos a junção tiazolidina-acridina. Do mesmo modo que o nosso intermediário (LPSF/FT-1), a acridina se ligou ao nitrogênio da posição 3 da TZD obtendo a tiazacridina (Figura 21). Ao comparar a síntese orgânica de obtenção de LPSF/FT-1 com a tiazacridina, foi possível ver que o LPSF/FT-1 teve um rendimento mais satisfatório e com um tempo menor de duração. A tiazacridina teve rendimento de 51% e um total de 7h de reação. Para as duas reações

foram utilizados com base hidróxido de sódio e a tiazacridina teve como solvente apenas etanol e como processo pós-reacional houve apenas lavagem dos cristais com água (DA ROCHA PITTA *et al.*, 2013).

Embora exista essas diferenças no procedimento de síntese, quanto ao resultado de tempo reacional e rendimento, é possível que tenha relação, principalmente, com a estrutura química dos reagentes utilizados. A ftalimida tem uma estrutura menos volumosa que a acridina, pois esta última, que possui três anéis aromáticos condensados com um átomo de nitrogênio no segundo anel, que pode facilitar a reação resultando em aproximadamente 3h de síntese e um rendimento mais satisfatório.

Figura 21 Estrutura química do LPSF/FT-1 e da Tiazacridina



Fonte: adaptado de DA ROCHA PITTA *et al.*, 2013.

4.1.1.3 Compostos finais (LPSF/FT's)

A metodologia empregada se mostrou eficaz visto que 6 dos 10 compostos finais tiveram rendimentos considerados satisfatórios (>70%). Outros dois, o LPSF/FT-34 e LPSF/36, tiveram rendimentos medianos sendo de 53 e 63%, respectivamente. Já o LPSF/32 e LPSF/38 tiveram valores baixos. Em relação ao grau de pureza, o LPSF/FT-32 teve 99%, enquanto os demais compostos tiveram 100%. Na tabela 1, é possível conferir as características físico-química, rendimento e pureza dos compostos.

Tabela 1 Características físico-química dos compostos sintetizados

Produto	F.M	P.M	Prz	Rdt	Pf	LogP	Cor
			(%)	(%)	(°C)		
FT-16	C ₂₀ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	394,40	100	71	260,0	2,62	Amarelo
FT-19	C ₂₀ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅ S	448,37	100	77	191,7	4,27	Branco
FT-31	C ₁₉ H ₁₁ FN ₂ O ₄ S	382,37	100	81	243,0	2,91	Branco
FT-32	C ₁₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₄ S	433,26	99	11		3,86	Branco
FT-34	C ₁₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₄ S	433,26	100	53	226,1	3,86	Amarelo
FT-35	C ₂₀ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₄ S	432,37	100	71	221,2	3,67	Branco
FT-36	C ₂₀ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	378,40	100	63	201,7	3,23	Branco
FT-38	C ₁₉ H ₁₁ N ₃ O ₆ S	409,37	100	27	-	2,18	Branco
FT-39	C ₂₀ H ₁₃ BrN ₂ O ₅ S	473,30	100	87	216,3	3,45	Amarelo
FT-40	C ₁₉ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	380,37	100	82	274,4	2,36	Amarelo

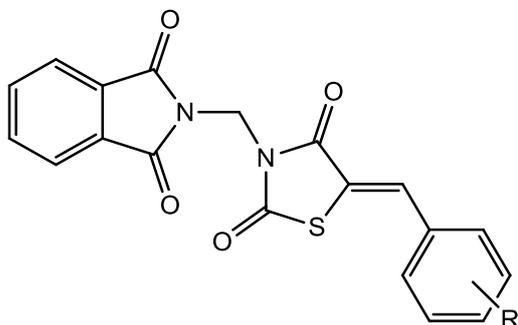
Fonte: Autor, 2019

A síntese do LPSF/FT-32 que tem como substituinte 2,6-dicloro ainda precisa ser otimizada, uma vez que existia um excesso de LPSF/FT-1 com dificuldade de sair posteriormente. Uma alteração na equivalência no aldeído e mudança no tratamento pós-reacional provavelmente subirá o rendimento de 11%. Esse provável aumento de rendimento aconteceria pois com a quantidade equivalente dos reagentes haveria mais formação de produto e evitaria um processo de retirada de excesso de LPSF/FT-1 e perda do LPSF/FT-32. Já o rendimento de 27% do LPSF/FT-38 pode ser justificado devido à instabilidade do grupo 3-nitro havendo formação de produto de degradação durante a reação prejudicando o rendimento.

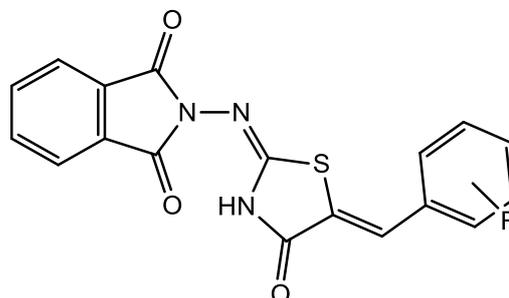
De Oliveira Cardoso e seus colaboradores, em 2015, sintetizaram uma série de moléculas híbridas contendo o núcleo da ftalimida e da tiazolidinona ligados a anéis aromáticos com substituições diversas. O que difere esses derivados dos LPSF/FT's é a presença de um nitrogênio no lugar do carbono de ligação entre os núcleos e no anel de cinco membros há um NH livre e apenas uma carbonila (figura 22). A metodologia de síntese e de tratamento pós-reacional também foi diferente. Foi utilizado acetato de potássio anidrido e dimetilformamida, e água para formação de cristais além purificação por cromatografia em coluna. A faixa de rendimento dos compostos foi entre 22-51%, reforçando que a metodologia para obtenção dos LPSF/FT's finais foi eficaz.

Figura 22 Estrutura química dos LPSF/FT's finais e derivados da ftalimida-tiazolidinona da literatura

LPSF/FT's finais



Ftalimida-tiazolidinona



Fonte: adaptado de DE OLIVEIRA CARDOSO *et al*, 2015.

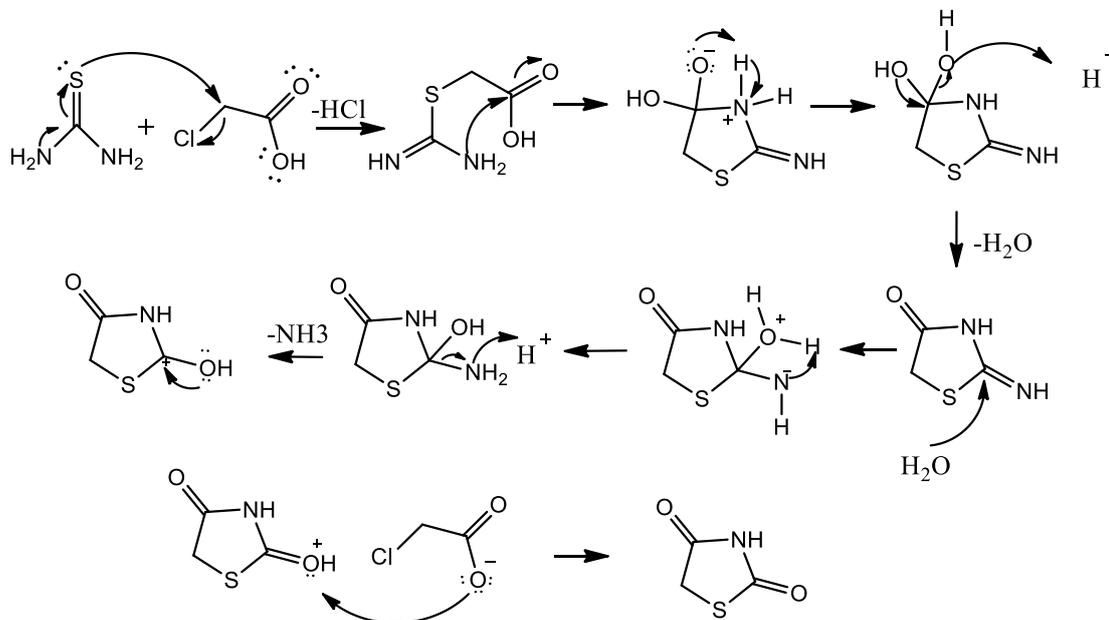
4.1.2 Mecanismo reacionais

4.1.2.1 Ciclização

O mecanismo da reação de Tiazolidina-2,4-diona comporta a ciclização entre a tiouréia e o ácido monocloroacético (esquema 4). O carbono alfa do ácido monocloroacético está mais suscetível a um ataque devido às características do cloro presente, como eletronegatividade e raio atômico. Então, o par de elétrons do enxofre da tiouréia, caracterizando como nucleófilo, ataca este carbono havendo a liberação de cloreto. Isso acontece através de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem. Em seguida, há uma ciclização devido ao ataque par de elétrons livres do nitrogênio, no carbono do grupamento carbonila. Para estabilizar a molécula, o oxigênio com carga negativa ataca o hidrogênio que estava ligado ao nitrogênio, na posição 3, que está positivamente carregado. A hidroxila formada dessa transferência abstrai o hidrogênio da hidroxila que está ligada no mesmo carbono, produzindo um ótimo grupo de saída que abandona a molécula na forma de água, quando o par de elétrons da outra hidroxila cria uma ligação π com o carbono, portanto criando uma carga positiva no oxigênio a qual é neutralizada pela retirada do hidrogênio por uma base qualquer do meio reacional. Logo após, há a formação de uma carbonila na posição 4. Em seguida, o carbono da posição 2 do anel da tiazolidina reage com uma molécula de H_2O , ocorrendo

então um rearranjo molecular que libera amônia formando a outra carbonila do anel tiazolidínico. No esquema abaixo é possível conferir o provável mecanismo de reação.

Esquema 4 Possível mecanismo de ciclização

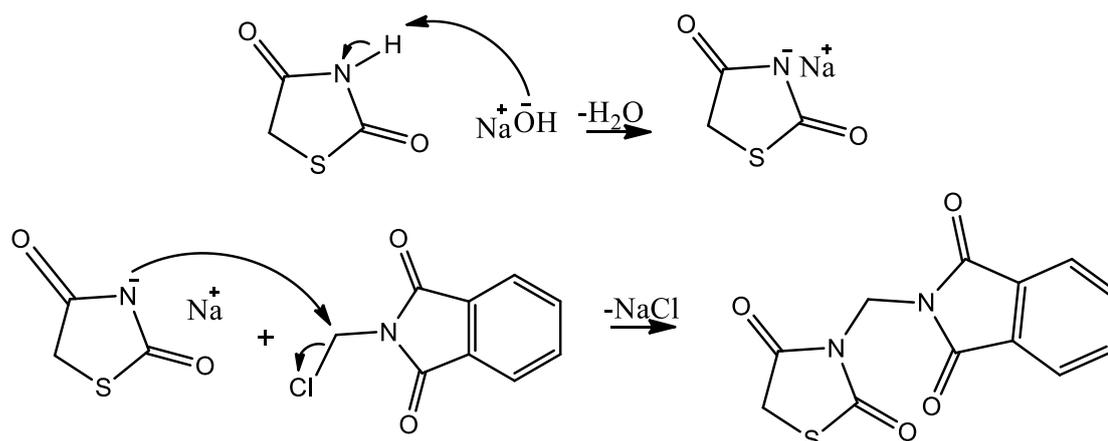


Fonte: Autor, 2019.

4.1.2.2 *N*-alquilação

A reação de *N*-alquilação para formação do LPSF/FT-1 (esquema 5) ocorre na presença de uma base. O grupamento lactama, de duas carbonilas, apresenta grande atração por elétrons, caracterizado pela sua composição (nitrogênio e oxigênio), sendo assim, faz com que a ligação entre o nitrogênio e o hidrogênio, se torne fraca, dando característica ácida para a molécula e assim disponível a um ataque básico. O ânion hidróxido, ataca este hidrogênio produzindo água e um sal de transição. Esse sal é formado do anel da tiazolidina carregado negativamente, com a contra carga do sódio através de uma ligação eletrostática. A fácil dissociação entre o nitrogênio e sódio permite que o par de elétrons disponível do nitrogênio ataque o carbono que está ligado ao grupo de saída, cloro, do anel da ftalimida, formando o intermediário LPSF/FT-1.

Esquema 5 Possível mecanismo de n-alkilação



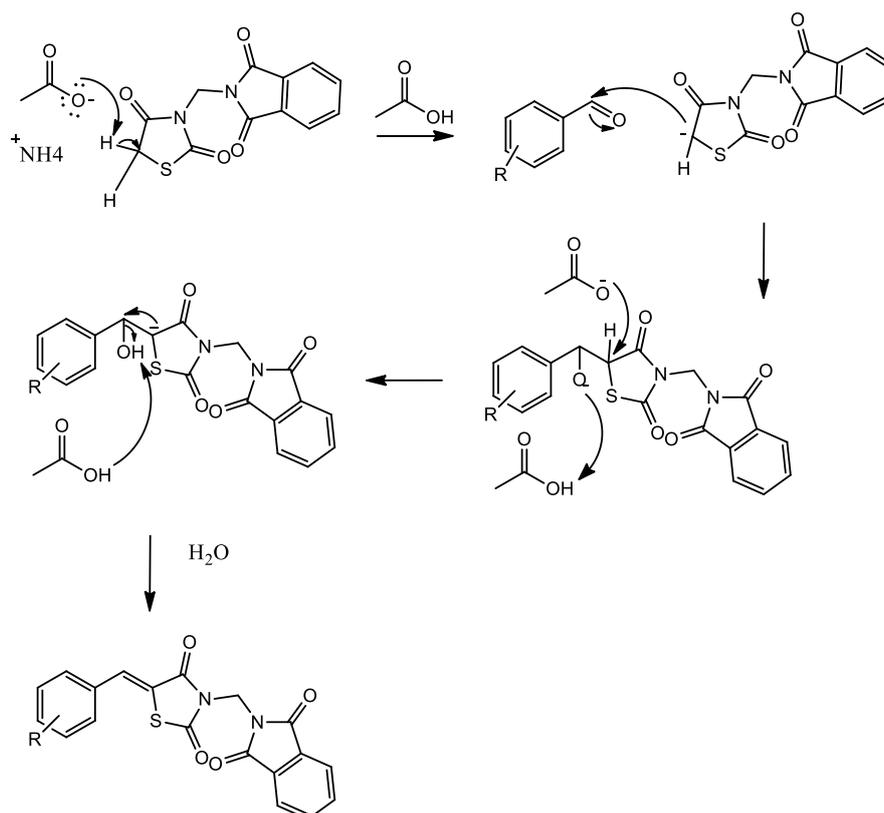
Fonte: Autor, 2019.

4.1.2.3 Condensação de Knoevenagel

A reação para formação dos compostos finais se dá pelo mecanismo de condensação de Knoevenagel (esquema 6). Esta reação ocorre no carbono da posição 5 (C5) do anel da tiazolidina. No meio reacional temos a participação de um promotor, o acetato de amônio e como solvente, o ácido acético glacial.

O oxigênio negativo do promotor irá abstrair o hidrogênio do carbono secundário do LPSF/FT-1. O resultado é a formação de ácido acético e um carbânion no anel da tiazolidina. Portanto, para estabilizar a molécula, ela ataca o carbono do aldeído presente no meio, os elétrons da ligação π são transferidos para o oxigênio dando característica negativa a molécula. Em seguida, o promotor participa novamente da reação ao atacar o hidrogênio restante ligado ao C5 do anel tiazolídínico, deixando o C5 negativo novamente. Ao mesmo tempo, o oxigênio que caracterizava a função aldeído, que está negativo, ataca o hidrogênio do ácido acético formando uma hidroxila e como o meio é ácido, é também protonado novamente, formando um ótimo grupamento de saída. Ainda possuindo carga negativa, o carbono da posição 5 na tentativa de se estabilizar, forma uma dupla ligação com o carbono da ligação com o anel aromático. Este que está fazendo mais que quatro ligações, libera o grupo de saída, formando H_2O . Esta formação de água ocorre juntamente com a formação da molécula final.

Esquema 6 Possível mecanismo de condensação de Knoevenagel



Fonte: Autor, 2019.

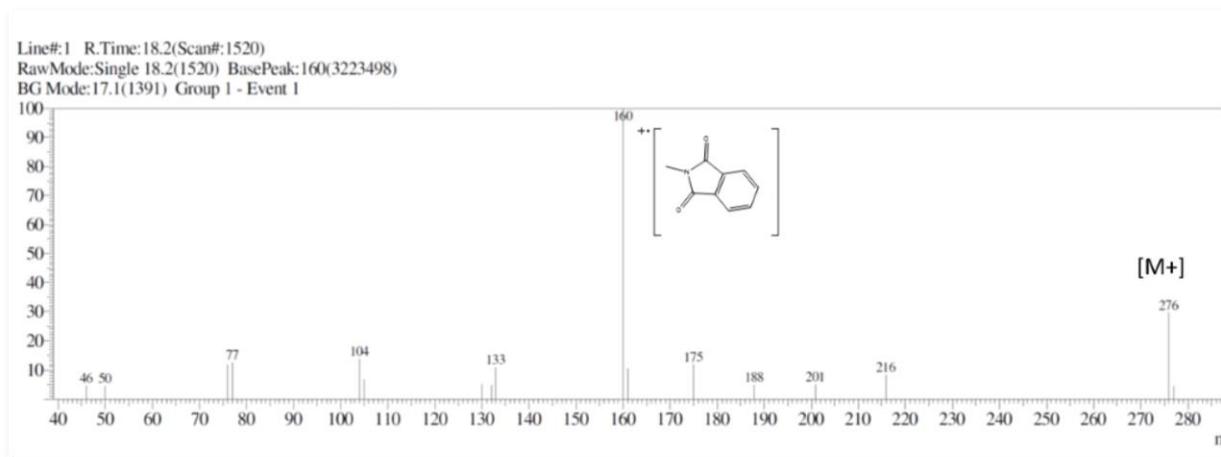
4.1.3 Identificação e caracterização estrutural

Os compostos que tiveram seu grau de pureza maior que 98% foram encaminhados para as técnicas de Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrofotometria de infravermelho. Todos os compostos tiveram suas estruturas confirmadas. Das páginas 81 a 91 é possível conferir a caracterização estrutural de todos os compostos individualmente e no apêndice B (página 121) encontra-se todos os espectros.

4.1.3.1 Espectrometria de massas (EM)

O intermediário LPSF/FT-1 teve sua massa foi analisada pela cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Nesta técnica, o método de ionização é o impacto de elétrons. A massa foi encontrada 276 m/z (M⁺) e o pico base foi de 160 m/z resultado da fragmentação da molécula (figura 23).

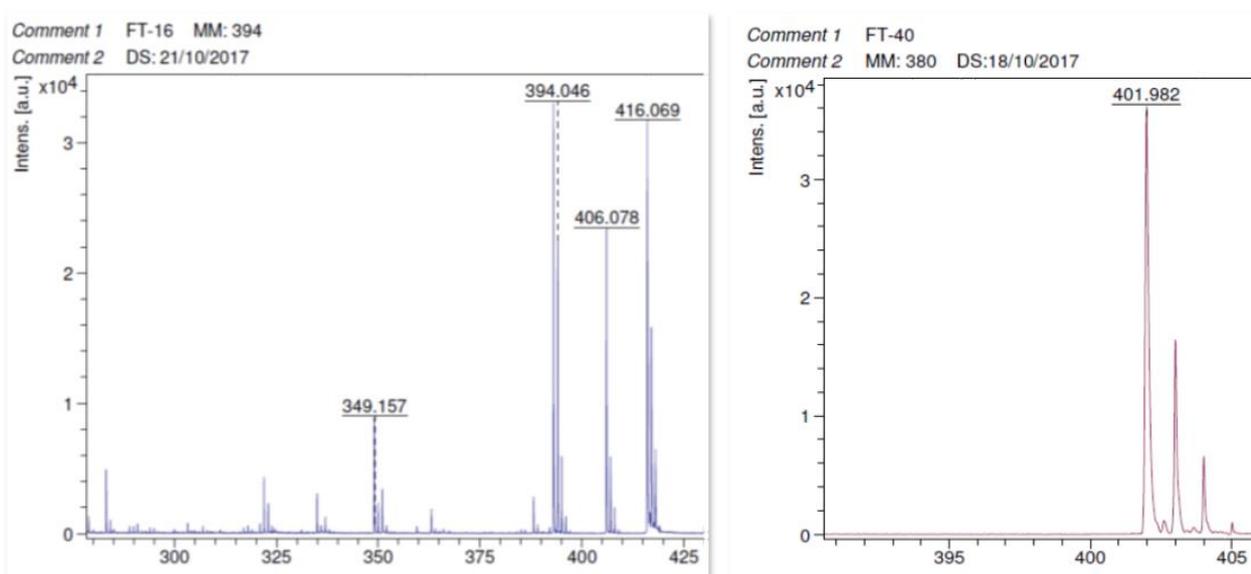
Figura 23 Espectro de massas do LPSF/FT-1 (GC-MS - ionização por impacto de elétrons)



Fonte: Autor, 2019.

Quanto aos finais, exceto o LPSF/FT-16, apresentam como o pico de maior intensidade a massa do composto mais 22, demonstrando que os compostos se associaram a uma molécula de sódio (Na), resultando em um pico M+Na. O pico referente a apenas massa do composto era encontrado em menor intensidade, exceto o LPSF/FT-40 que apenas apresentou M+Na (figura 24).

Figura 24 Espectros de Massas do LPSF/FT-16 e LPSF/FT-40 (MALDI/TOF - Ionização/dessorção a laser assistida por matriz)



Fonte: Autor, 2019.

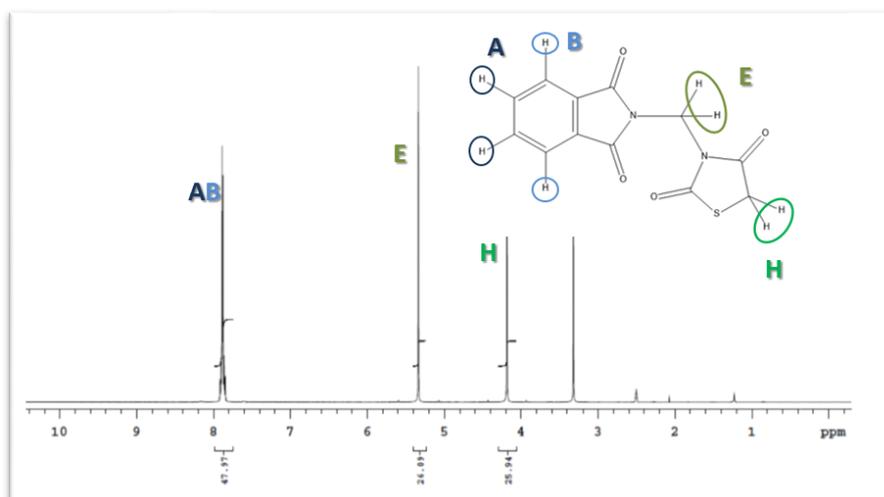
A técnica de MALDI/TOF é mais indicada para moléculas grandes como polímeros, oligonucleotídeo e proteínas. As moléculas grandes são misturadas com a matriz que é constituída por um composto orgânico e também tem sua massa detectada. Normalmente, a faixa da massa da matriz coincide com a faixa encontrada para moléculas pequenas como os compostos LPSF/FT's, o que poderia dificultar a análise dos espectros. Por tanto, não foi utilizada a matriz possibilitando a confirmação da massa das de todos os compostos.

4.1.3.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

No espectro de hidrogênio do intermediário LPSF/FT-1 (figura 25), a comprovação da reação química se deu através da presença de um singleto de deslocamento químico de 5.33 ppm (E). Esse pico é equivalente a dois hidrogênios ligados ao carbono presente entre o núcleo da ftalimida e da tiazolidina. O valor do seu deslocamento químico pode ser justificado devido a presença dos nitrogênios ligados a este carbono, deixando-o mais desblindado.

Os hidrogênios presentes nos dois núcleos também foram detectados. Devido à falta de insaturação e a presença do enxofre ligada ao carbono, esperava-se que os dois hidrogênios da posição 5 da tiazolidina apresentassem um deslocamento químico próximo a 5 ppm. Assim, foi visto um singleto com deslocamento de 4.18 ppm (H). Já hidrogênios do anel aromático da ftalimida, apareceram como um multipletto equivalente a quatro hidrogênios com deslocamento de 7,88 ppm (A, B).

Figura 25 Espectro RMN H1 do LPSF/FT-1

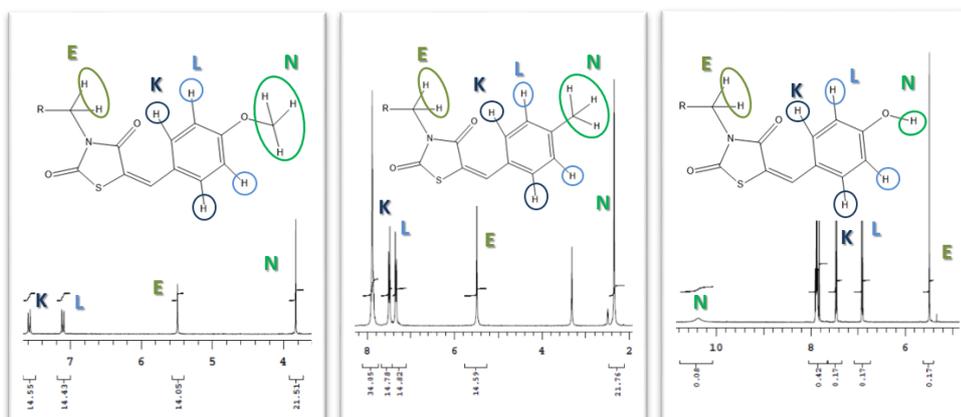


Fonte: Autor, 2019.

Quando analisamos os espectros dos compostos finais, foi possível ver que os dois hidrogênios(H) da posição 5 da tiazolidina não eram mais detectados (figura 26). Ao invés disto, agora notamos a presença do hidrogênio ligado ao carbono que é característico da substituição na posição 5 da tiazolidina, o que confirma a adição dos anéis aromáticos de radicais variados. Este hidrogênio aparece com deslocamento químico variado, é visto logo após ou antes dos hidrogênios da ftalimida e em alguns casos, juntamente com esses. Essa variação foi entre 7,82-8,14 ppm na faixa que era esperado devido a presença de insaturação e a sua posição próxima a um anel aromático. Quanto aos hidrogênios da ligação ftalimida-tiazolidina e os presentes no anel da ftalimida se mantiveram com deslocamento aproximado ao espectro do intermediário LPSF/FT-1. Os anéis de benzeno tiveram variação de deslocamento químico devido as diferentes substituições.

Os finais em que os aromáticos eram substituídos na posição *para*, esperava-se que os hidrogênios, *meta* e *orto*, fossem equivalentes sendo vistos no espectro como dupletos com integração para dois hidrogênios, cada um. Assim, o LPSF/FT-16, LPSF/FT-36, LPSF/FT-40 (figura 26) que tem como radical 4-metoxí, 4-metil e 4-hidroxí, respectivamente, apresentaram os dupletos com variação de 6,9-7,57 ppm (K, L). A metila do LPSF/FT-16 apresentou deslocamento de 3.82 ppm (N) devido a presença do oxigênio e a proximidade com o anel aromático, deixando os hidrogênios bastante desblindados. Já os hidrogênios da metila do LPSF/FT-36 se mostram mais blindada, apresentando deslocamento de 2.35 ppm (N). Quanto ao LPSF/FT-40, o hidrogênio lábio ligado ao oxigênio se apresentou como um “morro” com deslocamento químico de 10.39 ppm (N).

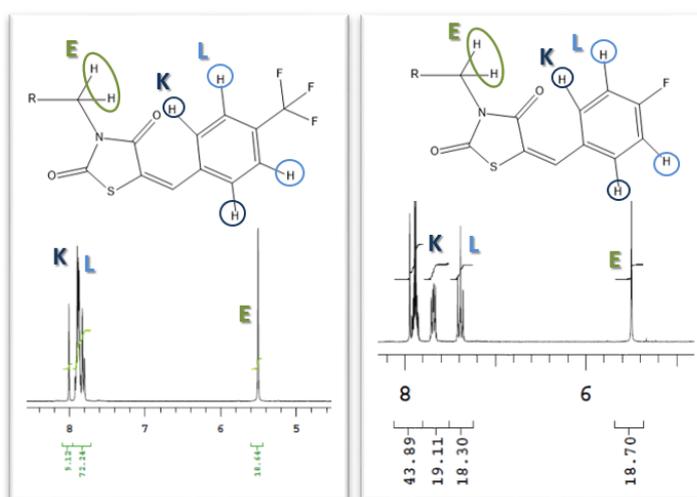
Figura 26 Espectros RMN H1 do LPSF/FT-16, LPSF/FT-36, LPSF/FT-40, respectivamente. R= Ftalimida



Fonte: Autor, 2019.

Outros dois compostos sintetizados que apresentavam substituição *para*, foi o LPSF/FT-31 e o LPSF/FT-35 com radical 4-fluor e 4-(trifluormetil), não apresentaram os dupletos (figura 27). No espectro do LPSF/FT-35, os dupletos não existiram aparecendo todos no multipletto do anel da ftalimida. Já no espectro do LPSF/FT-31 foi visto que os hidrogênios se apresentaram como duplo duplete e também como triplete. Essa mudança de padrão, refere-se a presença do Flúor, que interfere na multiplicidade do sinal, por possuir spin de $\frac{1}{2}$ podendo então ser detectado acoplando com os hidrogênios (SILVERSTEIN, 2010).

Figura 27 Espectros RMN H1 do LPSF/FT-35 e LPSF/FT-31, respectivamente. R= Ftalimida.



Fonte: Autor, 2019.

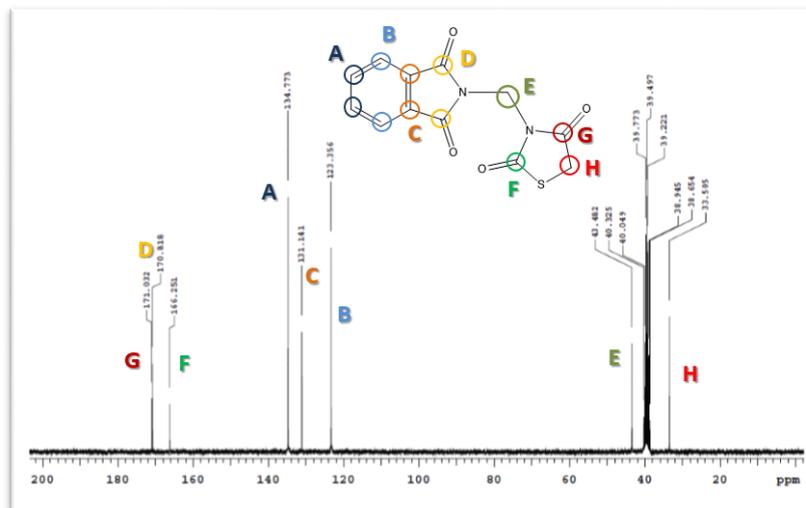
4.1.3.3 Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN¹³C)

O intermediário LPSF/FT-1 (figura 28), teve o carbono da posição 5 da tiazolidina com deslocamento de 33.50 ppm (H) e também exibiu um pico equivalente ao CH₂, ligação entre os núcleos, com deslocamento de 43.48 ppm (E). Nos compostos finais, este último manteve um deslocamento químico aproximado, já o carbono da posição 5, foi substituído, ficando mais desblindado variando a faixa entre 116-128 ppm (H).

As carbonilas do anel tiazolidinico apresentaram deslocamento de 166.25 ppm (G) e 171.07 ppm (F) no LPSF/FT-1, já as da ftalimida, que são equivalentes, apresentou a faixa de 170.81 ppm (D). Nos compostos finais, as carbonilas ficaram mais blindadas exibindo deslocamento entre 163-166 ppm. Os outros carbonos da ftalimida apresentaram a faixa de 123.35 ppm (B), 131.14 ppm (C), 134.77 ppm (A). A faixa desses carbonos

variaram nos finais, mas sempre muito próximo aos valores que exibiram no espectro do intermediário.

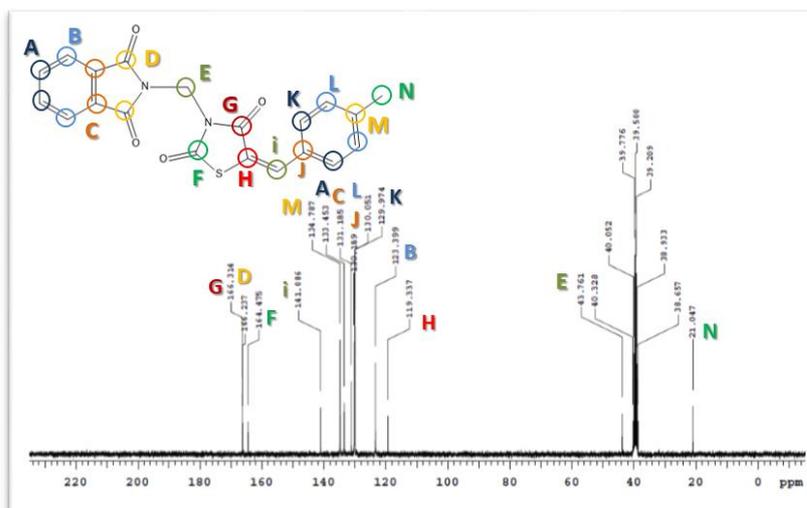
Figura 28 Espectro RMN C13 do LPSF/FT-1



Fonte: Autor, 2019.

O carbono que confirma a reação que dá origem aos compostos finais teve deslocamento químico variável entre 134-141 ppm (I), assim também ocorreu com os carbonos dos anéis aromáticos, eles variaram entre 114-160 ppm. Alguns substituintes puderam também ser identificados, como exemplo, a metila da substituição no carbono 4 do anel aromático do LPSF/FT-36 (figura 29) com deslocamento de 21.02 ppm(N).

Figura 29 Espectro RMN C13 do LPSF/FT-36

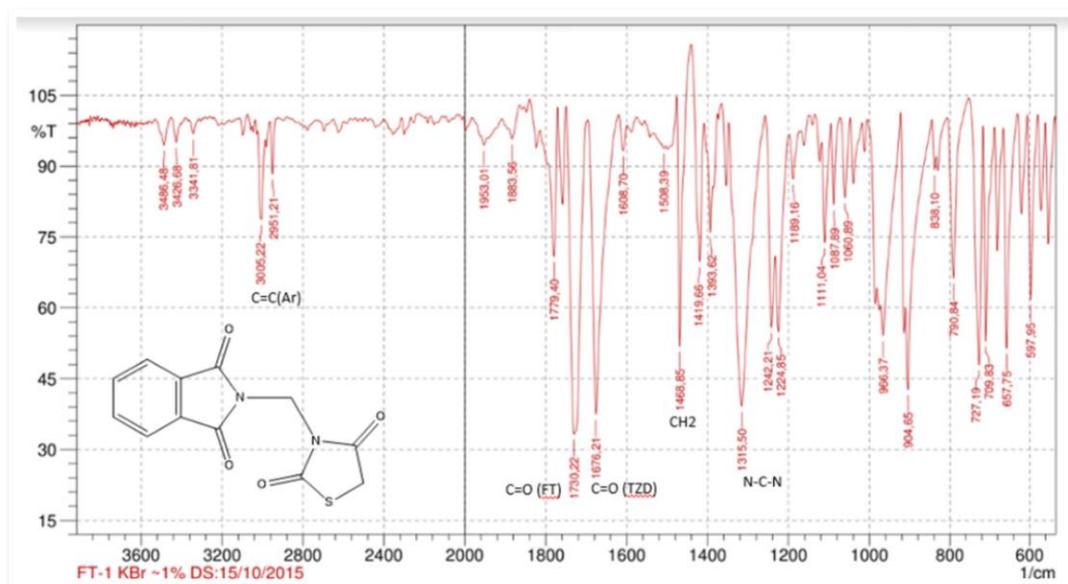


Fonte: Autor, 2019.

4.1.3.4 Espectrofotometria de infravermelho (IV)

No espectro de infravermelho do intermediário LPSF/FT-1 (figura 30) foi possível ver o estiramento das carbonilas em 1730 cm^{-1} para ftalimida e 1676 cm^{-1} para tiazolidina. Um dobramento, 1468 cm^{-1} , equivalente aos CH_2 presentes na molécula, assim como também foi visto um estiramento de 1315 cm^{-1} que corresponde a ligação N-C-N, comprovando a ligação entre os dois núcleos.

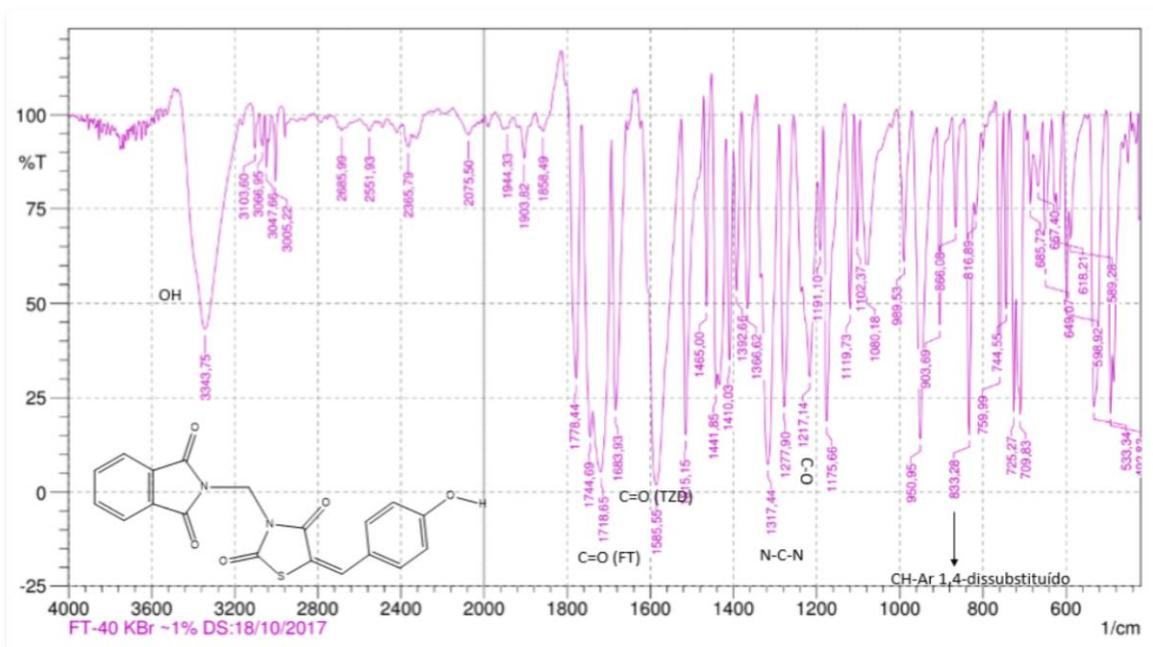
Figura 30 Espectro de infravermelho do LPSF/FT-1



Fonte: Autor, 2019.

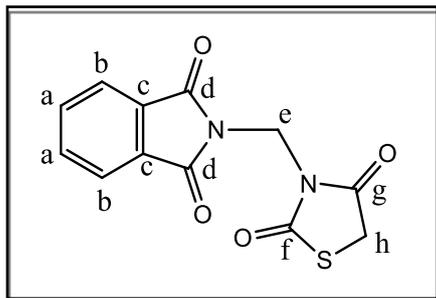
Ao analisarmos os espectros dos LPSF/FT's, os estiramentos das carbonilas e da ligação N-C-N continuaram presentes. Quanto as particularidades de cada final, foi possível ver estiramentos resultantes das substituições do anel aromático, principalmente quando se tratava de um aromático 1,4-dissubstituído como é o caso do LPSF/FT-40 que apresentou dobramento em 833 cm^{-1} . Também merece destaque a identificação dos radicais dessas substituições. A hidroxila do LPSF/FT-40 apareceu como estiramento em 3343 cm^{-1} (figura 31). A ligação do carbono com oxigênio da hidroxila foi identificada como um estiramento em 1217 cm^{-1} . As absorções das ligações entre o carbono e os halogênios (F, Cl e Br) dos outros finais também foram identificadas.

Figura 31 Espectro de infravermelho LPSF/FT-40



Fonte: Autor, 2019.

3-((1,3-Dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-1)



FM: C₁₂H₈N₂O₄S

PM: 276,27 g/mol

PF: 172.4 °C

Rdt: 74%

RF: 0,32

Cor: branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 4.18 (s, 2H, CH₂,h), 5.33 (s, 2H, CH₂, e), 7,88 (m, 4H, Ar-H, a, b)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 33.50 (CH₂, h), 43.48 (CH₂, e), 123.35 (CH, b), 131.14 (C₄, c), 134.77 (CH, a), 166.25 (C=O, g), 170.81 (C=O, d), 171.07 (C=O, f).

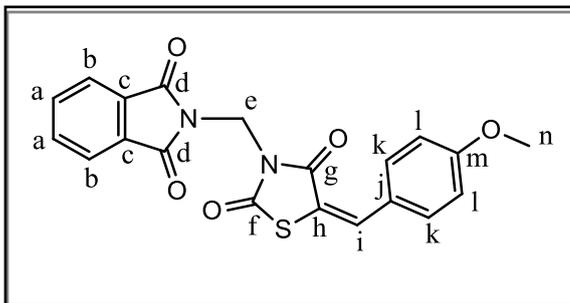
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 3005, 1730, 1676, 1468, 1315.

MS

m/z calculado para C₁₂H₈N₂O₄S: 276,02. Encontrado: 276.90.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-metoxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/FT-16)



FM: C₂₀H₁₄N₂O₅S

PM: 394,40 g/mol

PF: 260°C

Rdt: 71%

RF: 0,19

Cor: Amarelo

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 3.82 (s, 3H, CH₃, n), 5.49 (s, 2H, CH₂, e), 7,10 (d, 2H, J= 9Hz, Ar-H, l) 7.57 (d, 2H, J= 9Hz, Ar-H, k), 7.82 (s, 1H, CH, i), 7.88 (m, 4H, Ar-H, a, b)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.78 (CH₂, e), 55.49 (CH₃, n), 114.97 (CH, l), 117.25 (C₄, h), 123.40 (CH, b), 125.27 (C₄, j) 131.17 (CH, k), 132.27 (C₄, c), 133.43 (CH, a), 134.80 (CH, i), 166.32 (C=O, f)

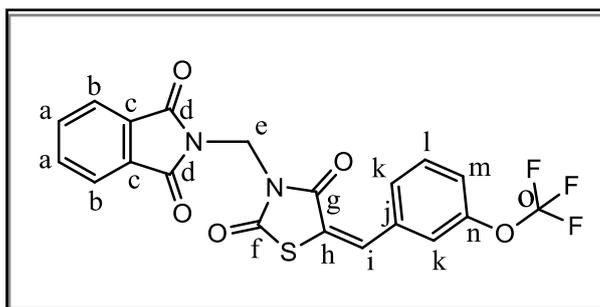
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 1742, 1722, 1685, 1589, 1509, 1398, 1313, 833.

MS

m/z calculado para C₂₀H₁₄N₂O₅S: 394,06. Encontrado: 394.04.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(3-(trifluorometoxi)benzylideno)tiiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-19)



FM: C₂₀H₁₁F₃N₂O₅S

PM: 448,37 g/mol

PF: 191.7°C

Rdt: 77%

RF: 0,54

Cor: Branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, cdcl₃)

δ = 5.68 (s, 2H, CH₂, e), 7.29 (m, 2H, Ar-H, k), 7.40 (d, 1H, J= 9Hz, Ar-H, m), 7.50 (t, 1H, J=6 Hz, j=15 Hz, Ar-H, l), 7.76 (m, 2H, Ar-H, b), 7.88 (m, 3H, Ar-H e CH, a, i).

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, cdcl₃)

δ = 43.53 (CH₂, e), 122.20 (CH, n), 122.72 (CH, k), 123.40 (CH, b), 128.11 (C₄, h), 130.69 (CH, l), 131.49 (C₄, c), 132.77 (CH, a), 134.54 (C₄, j), 134.99 (CH, i) 149.68 (C₄, m), 164.66 (C=O, g), 166.07 (C=O, d) 166.52 (C=O, f)

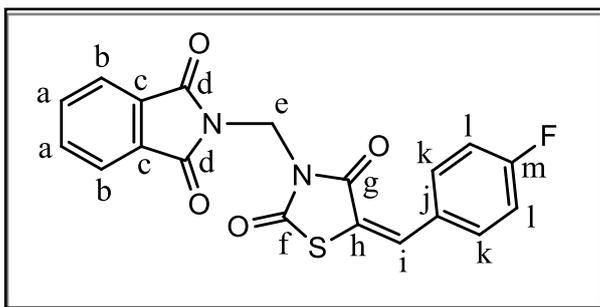
IV

IR (KBr, cm⁻¹): IR (KBr, cm⁻¹): 3008, 1731, 1686, 1483, 1471, 1432, 1409, 1321, 1146, 745, 727.

MS

m/z calculado para C₂₀H₁₁F₃N₂O₅S: 448,03. Encontrado: 469.81.

3-((1,3-dioxisoindolin-2-il)metil)-5-(4-fluorobenzilideno)tiiazolidine-2,4-diona(LPSF/FT-31)



FM: C₁₉H₁₁FN₂O₄S

PM:382,37 g/mol

PF: 243°C

Rdt: 81%

RF: 0,54

Cor: Branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

¹H NMR (300 MHz, DMS d₆): δ = 5.49 (s, 2H, CH₂, e), 7,38 (t, 2H, AR-H, J= 9Hz, j= 18Hz, l) 7.68 (dd, 2H, J= 6Hz, J=6Hz, AR-H, k), 7.88 (m, 4H, AR-H, a, b) 7.9 (s, 1H, CH, i).

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.80 (CH₂, e), 116.42 (CH, l), 116.71 (C₄, h), 120.37 (C₄, m), 123.43 (CH, b), 129.48 (C₄, j), 131.21 (CH, k), 132.58 (C₄, c), 132.70 (CH, a), 134.83 (CH, i), 164.39 (C=O, g), 166.13 (C=O, d) 166.34 (C=O, f)

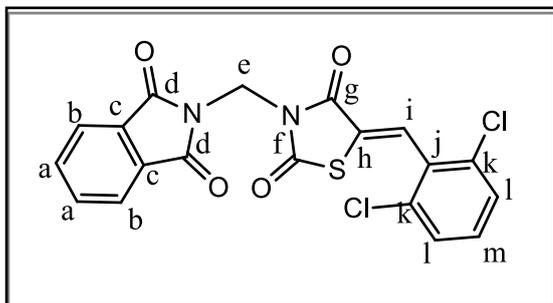
IV

IR (KBr, cm⁻¹): IR (KBr, cm⁻¹): 3030, 2957,1749,1727, 1686, 1505, 1468, 1318, 1225, 833.

MS

m/z calculado para C₁₉H₁₁FN₂O₄S: 382,04. Encontrado:404,067.

5-(2,6-diclorobenzilideno)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-32)



FM: C₁₉H₁₀Cl₂N₂O₄S

PM: 433,26 g/mol

Rdt: 32%

RF: 0,56

Cor: Branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

¹H NMR (300 MHz, DMS d₆): δ = 5.48 (s, 2H, CH₂, e), 7,6 (d, 2H, AR-H, J=9 Hz, k), 7,49 (dd, 1H, AR-H, J= 6Hz, J=6Hz, l), 7.89 (m, 4H, AR-H, a, b) 7.93 (s, 1H, CH, i)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.92 (CH₂, e), 123.44 (CH, b), 128.80 (C₄, h), 129.08 (CH, m), 129.60 (CH, l), 131.06 (C₄, k), 131.23 (C₄, j), 131.99 (C₄, c), 132.99 (CH, a), 134.80 (CH, i), 163.08 (C=O, g), 165.37 (C=O, d) 166.32 (C=O, f)

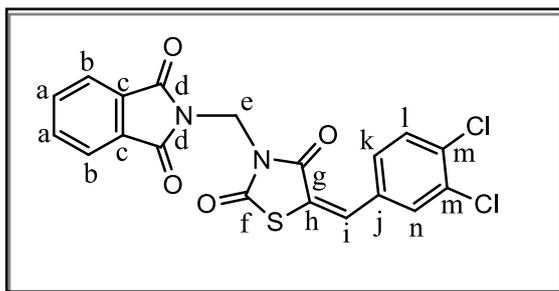
IV

IR (KBr, cm⁻¹): IR (KBr, cm⁻¹): 3027, 1732, 1669, 1426, 1410, 1310, 1070, 779.

MS

m/z calculado para C₁₉H₁₀Cl₂N₂O₄S: 431,97. Encontrado:431,67.

5-(3,4-diclorobenzilideno)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-34)



FM: C₁₉H₁₀Cl₂N₂O₄S

PM: 433,26 g/mol

PF: 226.1 °C

Rdt: 53%

RF: 0,51

Cor: Amarelo

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

¹H NMR (300 MHz, DMS d₆): δ = 5.49 (s, 2H, CH₂, e), 7,54 (d, 1H, AR-H, J= 9Hz, l) 7.79 (d, 1H, AR-H, J= 9Hz, k), 7.87 (m, 4H, AR-H, a, b, n), 7.92 (s, 1H, CH, i)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.83 (CH₂, e), 123.01 (C₄, h), 123.41 (CH, b), 128.94 (CH, k), 131.20 (CH, l), 131.47 (C₄, m), 132.07 (C₄, c), 132.25 (CH, a), 133.02 (C₄, n), 133.56 (C₄, j), 134.81 (CH, i), 164.15 (C=O, g), 165.70 (C=O, d) 166.29 (C=O, f)

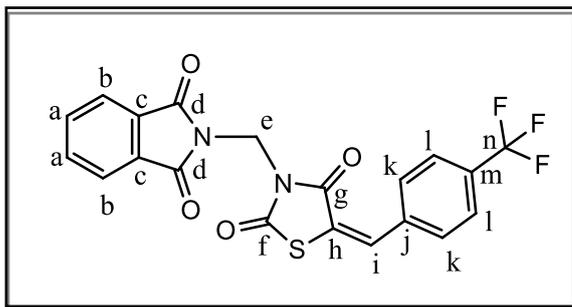
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 3029, 2961, 1732, 1664, 1465, 1310, 1233, 949.

MS

m/z calculado para C₁₉H₁₀Cl₂N₂O₄S: 431,97. Encontrado:453,55.

3-((1,3-dioxisoindolin-2-il)metil)-5-(4-(trifluorometil)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-35)



FM: C₂₀H₁₁F₃N₂O₄S

PM: 432,37 g/mol

PF: 221.2 °C

Rdt: 71%

RF: 0,48

Cor: Branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 5.50 (s, 2H, CH₂, e), 7,86 (m, 8H, AR-H, k, l, a, b) 8.00 (s, 1H, CH, i).

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.80 (CH₂, e), 123.41 (C₄, h), 123.70 (CH, b), 126.08 (CH, l), 126.14 (CH, k), 130.09 (C₄, m), 130.58 (C₄, n), 131.21 (CH, c), 131.46 (CH, a), 134.80 (C₄, j), 136.77 (CH, i), 164.21 (C=O, g), 165.86 (C=O, d) 166.31 (C=O, f)

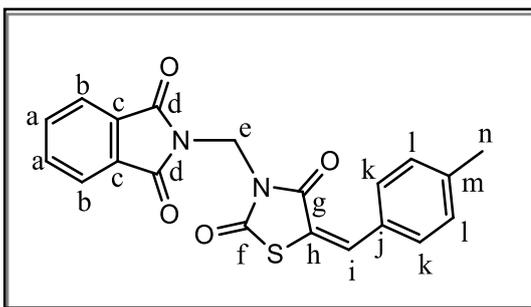
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 1725, 1685, 1316, 1124, 838.

MS

m/z calculado para C₂₀H₁₁F₃N₂O₄S: 432,04. Encontrado:452,79.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-methylbenzylidene)thiazolidine-2,4-dione(LPSF/FT-36)



FM: C₂₀H₁₄N₂O₄S

PM: 378,40 g/mol

PF: 201.7 °C

Rdt: 63%

RF: 0,48

Cor: Branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 2.35 (s, 3H, CH₃, n), 5.49 (s, 2H, CH₂, e), 7,34 (d, 2H, J= 9Hz, Ar-H, l) 7.49 (d, 2H, J= 9Hz, Ar-H, k), 7.87 (m, 5H, Ar-H e CH, a, b, i)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 21.04 (CH₃, n), 43.76 (CH₂, e), 119.33 (C₄, h), 123.39 (CH, b), 129.97 (CH, k), 130.05 (CH, l), 130.18 (C₄, j), 131.18 (C₄, c), 133.45 (CH, a), 134.78 (C₄, m), 141.08 (CH, i), 164.47 (C=O, g), 166.23 (C=O, d) 166.31 (C=O, f)

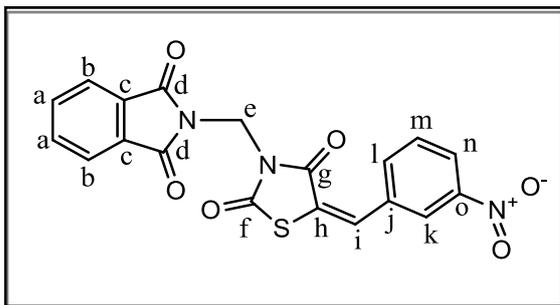
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 3027, 2962, 1745, 1727, 1686, 1397, 1313, 949.

MS

m/z calculado para C₂₀H₁₄N₂O₄S: 378,07. Encontrado:400,11.

3-((1,3-dioxoisoindolin-2-il)metil)-5-(3-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-38)



FM: C₁₉H₁₁N₃O₆S

PM: 409,37 g/mol

Rdt : 27%

Cor: Branco

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 5.50 (s, 2H, CH₂, e), 7.22 (m, 5H, Ar-H, l, a, b) 8.01 (d, 1H, J= 9Hz, Ar-H, m), 8.09 (s, 1H, CH, i), 8.30 (d, 1H, J= 6Hz, Ar-H, K) 8.46 (s, 1H, Ar-H, n)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.86 (CH₂, e), 123.43 (C₄, h), 123.70 (CH, b), 124.64 (CH, k), 124.73 (CH, n), 130.94 (CH, m), 131.04 (C₄, c), 131.23 (CH, a), 134.51 (CH, l), 134.83 (C₄, j), 135.33 (CH, i), 148.25 (C₄, o), 164.13 (C=O, g), 165.67 (C=O, d) 166.32 (C=O, f)

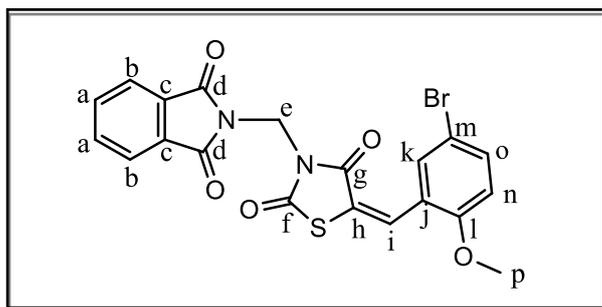
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 1736, 1687, 1527, 1322, 747, 670.

MS

m/z calculado para C₁₉H₁₁N₃O₆S: 409,04. Encontrado:430,62.

5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-39)



FM: C₂₀H₁₃BrN₃O₅S

PM: 473,30 g/mol

PF: 216.3 °C

Rdt: 87%

Cor: Amarelo

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, cdcl₃)

δ = 3.38 (s, 3H, CH₃, n), 5.66 (s, 2H, CH₂, e), 6.80 (d, 1H, J=9,6 Hz, Ar-H, m) 7.47 (m, 2H, Ar-H, k, l), 7.75 (m, 2H, Ar-H, b), 7.88 (m, 2H, AR-h, a), 8.14 (s, 1H, CH, i).

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, cdcl₃)

δ = 43.38 (CH₂, e), 55.78 (CH₃, p), 112.82 (CH, o), 113.03 (C₄, m), 121.94 (C₄, h), 123.82 (CH, b), 124.10 (C₄, j), 128.91 (CH, l), 131.53 (CH, n), 131.73 (C₄, c), 134.44 (CH, a). 134.70 (CH, i), 157.38 (C₄, k), 164.86 (C=O, g), 166.52 (C=O, d) 166.65 (C=O, f).

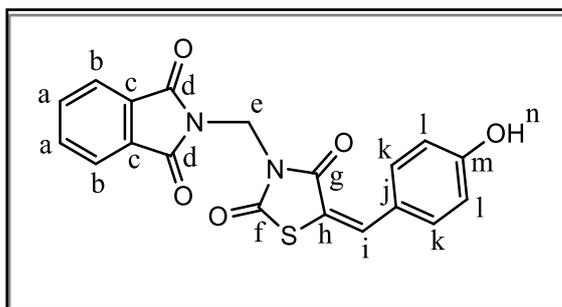
IV

IR (KBr, cm⁻¹): 1754, 1727, 1314, 1257, 1067.

MS

m/z calculado para C₂₀H₁₃BrN₃O₅S: 471,97 Encontrado:493,53.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-hidroxibenzilideno)tiiazolidina-2,4-diona(LPSF/FT-40)



FM: C₁₉H₁₂N₂O₅S

PM: 380,37 g/mol

PF: 274,4 °C

Rdt:87%

Cor: Amarelo

NMR¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 5.49 (s, 2H, CH₂, e), 6,9 (d, 2H, J= 8Hz, Ar-H, l) 7.46 (d, 2H, J= 8Hz, Ar-H, k), 7.82 (s, 1H, CH, i), 7.87 (m, 4H, Ar-H, a, b) 10.39 (s, 1H, OH, n)

NMR₁₃C (75 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

δ = 43.75 (CH₂, e), 115.88 (CH, l), 116.39 (C₄, h), 123.39 (CH, b), 123.70 (C₄, j), 131.18 (CH, k), 132.62 (C₄, c), 133.92 (CH, a), 134.78 (CH, i), 160.23 (C₄, m), 164.61 (C=O, g), 166.33 (C=O, d) 166.41 (C=O, f)

IV

IR (KBr, cm⁻¹): 3343, 1744, 1718, 1683, 1317, 833.

MS

m/z calculado para C₁₉H₁₂N₂O₅S: 380,05 Encontrado:401,98.

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Ensaios *in vitro*

4.2.1.1 Citotoxicidade em PBMC de voluntários saudáveis

Através dos resultados do teste de citotoxicidade foi possível ver que nenhum dos compostos finais se mostrou tóxico em células monucleares do sangue periférico, já que a viabilidade celular apresentou valores maiores que 86% como observado na tabela 2. Embora o LPSF/FT-32 não tenha demonstrado citotoxicidade, o composto não passou para o teste seguinte devido ao baixo rendimento.

Tabela 2 Valores da média de viabilidade celular e desvio padrão dos LPSF/FT's finais em PBMC

Condições	LPSF/FT-16	LPSF/FT-19	LPSF/FT-31	LPSF/FT-32	LPSF/FT-34
Células	100 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0
DMSO	97,2 ± 4,9	97,2 ± 4,0	97,5 ± 2,4	95,77 ± 4,2	93,1 ± 4,1
1 μM	94,0 ± 3,6	91,7 ± 3,8	96,7 ± 4,0	95,26 ± 5,0	100 ± 0,0
10 μM	94,8 ± 5,4	95,8 ± 3,7	92,4 ± 12,2	98,78 ± 2,1	99,9 ± 0,1
100 μM	95,2 ± 4,7	100,0 ± 0,0	99,1 ± 1,5	86,23 ± 11,8	100 ± 0,0

Condições	LPSF/FT-35	LPSF/FT-36	LPSF/FT-38	LPSF/FT-39	LPSF/FT-40
Células	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0
DMSO	95,3 ± 6,5	89,1 ± 12,9	95,2 ± 4,5	95,6 ± 4,5	96,2 ± 3,5
1 μM	97,2 ± 4,9	97,0 ± 3,2	98,2 ± 3,1	88,6 ± 5,9	98,3 ± 3,0
10 μM	96,9 ± 5,1	98,9 ± 1,6	98,6 ± 2,5	93,8 ± 5,4	97,8 ± 3,9
100 μM	99,7 ± 0,4	100 ± 0,0	97,3 ± 4,7	100,0 ± 0,0	95,7 ± 6,6

Fonte: Autor, 2019

4.2.1.2 Dosagem de citocinas

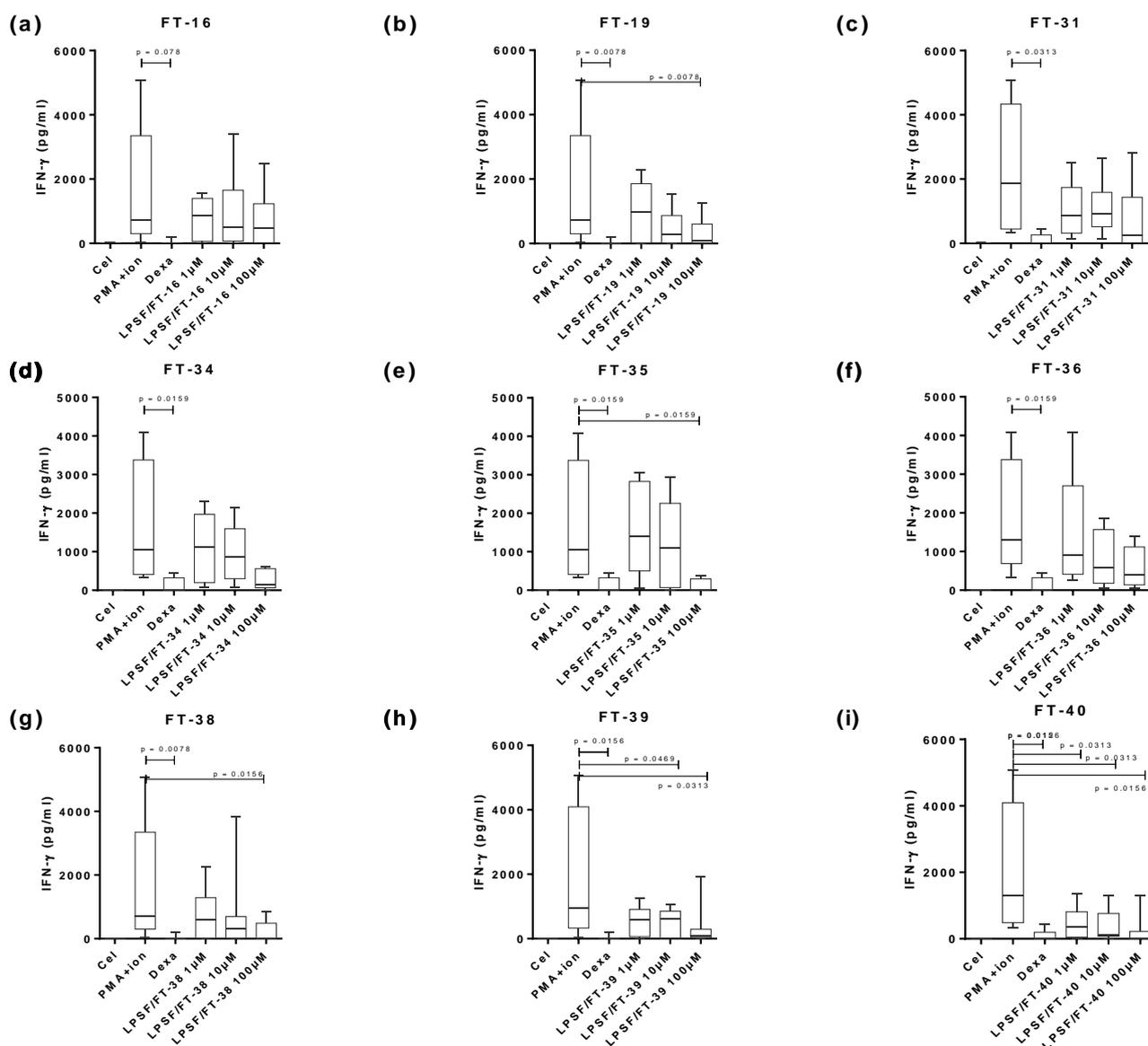
Os resultados da secreção de IFN-gama estão expressos na figura 32 (a-i). Em comparação com o estímulo, com exceção dos compostos LPSF/FT's 16,19, 34 e 35, os demais foram capazes de diminuir os níveis de IFN-gama em todas as concentrações testadas. Os compostos LPSF/FT-16, LPSF/FT-19, LPSF/FT-34, LPSF/35, LPSF/FT-36 e LPSF/FT-38 mostram uma relação inversamente proporcional entre o resultado obtido e a concentração testada, visto que quanto maior a concentração menor a secreção.

Entretanto, só foram encontrados valores significativos apenas na concentração de 100 μ M para os compostos LPSF/FT-19 ($p=0.0078$), LPSF/FT-35($p=0.0159$) e LPSF/FT-38 ($p=0.0156$), e para esses dois últimos foram vistos valores iguais ao nível achado para Dexametasona (4,70 pg/ml) (DEXA). Porém o LPSF/FT-35 nas concentrações de 1 e 10 μ M, tiveram os níveis mais altos em comparação com os demais compostos.

Esta relação, citada acima, de concentração e inibição também foi vista com LPSF/FT-40. Este diminuiu ainda mais os níveis da citocina se comparado com outras moléculas. Na maior concentração, o LPSF/FT-40, diminui a secreção chegando a valor igual ao controle positivo (4,70pg/ml). Este composto reduziu de forma significativa a citocina em todas as doses testadas 1 μ M($p=0.0313$),10 μ M($p=0.0313$) e 100 μ M ($p=0.0156$). Também foram encontrados valores significativos ($p=0.0469$ e $p=0.0313$) respectivamente, nas concentrações de 10 μ M (610,0pg/ml) e 100 μ M (103pg/ml) comparados a condição de estímulo (958,0pg/mL) para o LPSF/FT-39.

Quando observados os gráficos correspondentes a secreção nas condições do LPSF/FT-31 e LPSF/FT-39, não é visto a relação relatada acima já que os níveis nas concentrações de 10 μ M (928pg/ml e 610pg/ml) foram mais altos que na concentração de 1 μ M (854pg/ml e 578,8pg/ml), respectivamente. Além disto o LPSF/FT-31, assim como o LPSF/FT-16, tiveram níveis medianos de secreção mais próximos ao estímulo em todas concentrações e sem significância. Diante dos resultados achados para IFN-gama, decidiu-se quais compostos seriam realizadas as dosagens com IL-17A. Deste modo, o LPSF/FT-16 e LPSF/FT-31 não tiveram suas condições testadas.

Figura 32 efeitos dos derivados tiazofalimidicos na expressão da citocina IFN-gama. (a) LPSF/FT-16, n=8; $p=0.078$ (dexa). (b) LPSF/FT-19, n= 8, $p=0.0078$ (dexa, 100 μ M). (c) LPSF/FT-31, n= 6, $p=0.0313$ (dexa). (d) LPSF/FT-34, n= 5, $p=0.0159$ (dexa). (e) LPSF/FT-35, n= 5, $p=0.0159$ (dexa, 100 μ M). (f) LPSF/FT-36 n= 5, $p=0.0159$ (dexa). (g) LPSF/FT-38, n= 8, $p=0.0078$ (dexa), $p=0.0156$ (100 μ M). (h) LPSF/FT-39, n= 7, $p=0.0156$ (dexa), $p=0.0469$ (10 μ M), $p=0.0313$ (100 μ M). (i) LPSF/FT-40 n= 7; $p=0.0156$ (dexa,100 μ M), $p=0.0313$ (1 e 10 μ M). Foi considerado $p<0,05$ como valor significativo, sendo sempre uma comparação entre o grupo estimulado e as outras condições. Cel: célula; PMA+ionomicina (100 ng/mL); Dexa: Dexametasona (10 μ M).

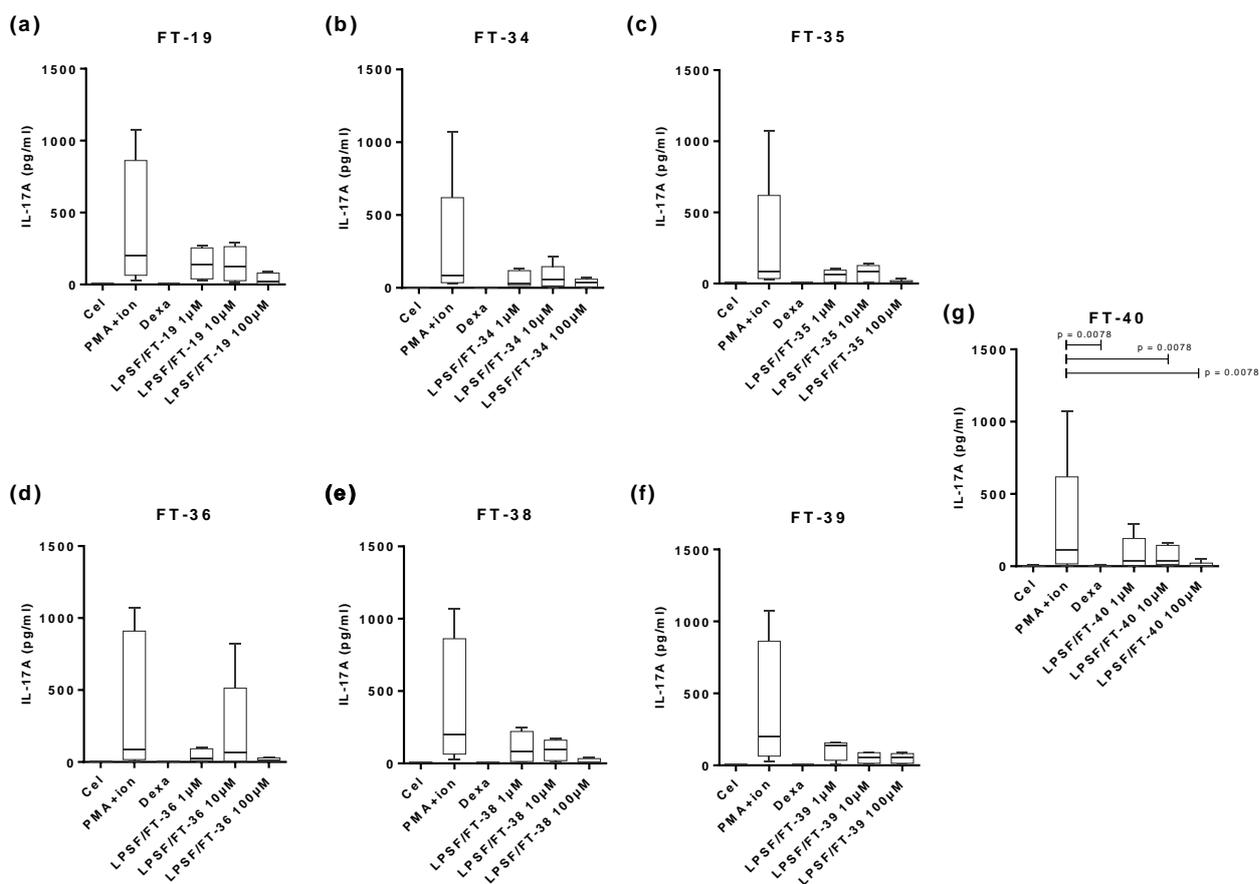


Fonte: Autor, 2019

Os resultados quanto a secreção de IL-17A estão organizados na figura 33 (a-g). Todos os compostos diminuíram os níveis da citocina em comparação com o estímulo. Os menores valores foram encontrados nas concentrações de 100 μ M e os LPSF/FT's

35(3,9pg/ml), 36(9,7pg/ml), 38(3,9pg/ml) e 40(5,6pg/ml) mostraram valores mais próximos ao controle positivo (3,90 pg/ml). Não foi visto uma relação clara de concentração-dependência, uma vez que os compostos FT-34, FT-35, FT-36, FT-38 tiveram os níveis da concentração 10 μ M maior que na concentração de 1 μ M. O FT-39 teve valores aproximados em 10 e 100 μ M, já o FT-19 e FT-40 nos de 1 e 10 μ M. Foram encontrados valores significativos nas concentrações de 10 e 100 μ M do LPSF/FT-40 ($p=0.0078$).

Figura 33 efeitos dos derivados tiazoftalimidicos na expressão da citocina IL-17A. (a) LPSF/FT-19, $n= 4$. (b) LPSF/FT-34 $n= 5$. (c) LPSF/FT-35 $n= 5$. (d) LPSF/FT-36 $n= 5$. (e) LPSF/FT-38 $n= 4$. (f) LPSF/FT-39 $n= 4$. (g) LPSF/FT-40 $n= 8$; $p=0.0078$ (dexa, 10 e 100 μ M). Foi considerado $p < 0,05$ como valor significativo, sendo sempre uma comparação entre o grupo estimulado e as outras condições. Cel: célula; PMA+ion: PMA+inomicina(100 ng/mL); Dexa: Dexametasona (10 μ M).



Fonte: Autor, 2019

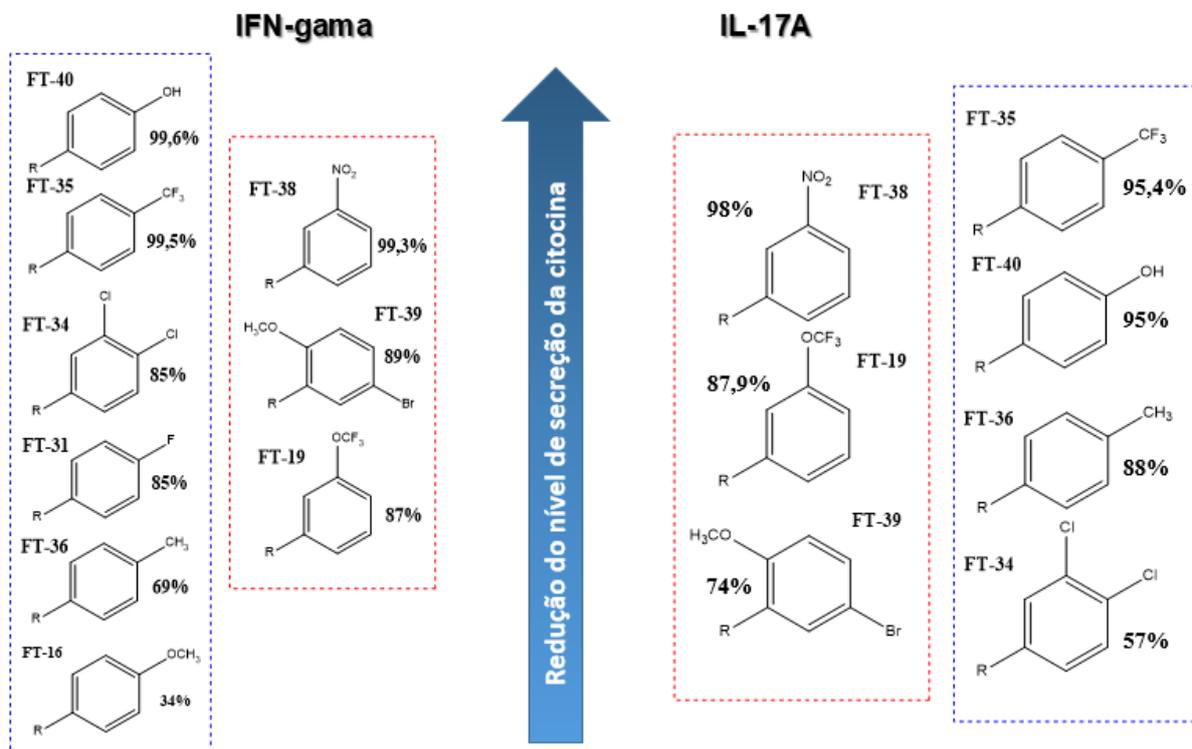
Os compostos LPSF/FT's finais tiveram substituintes variados na posição 5 da tiazolidina-2,4-diona, todos eles com anéis aromáticos substituídos em posições diferentes e com elementos químicos diferentes também. Cinco desses compostos foram substituídos na posição 4 com elementos como oxigênio, flúor, carbono e cloro que foram

eles: FT-16 (4-OCH₃), FT-31 (4-F), FT-35 (4-CF₃), FT-36 (4-CH₃) e FT-40 (4-OH). Outro composto substituído na posição 4 é o FT-34, que possui duas moléculas de cloro na posição 3,4. O FT-38 possui na posição 3 um grupamento nitro, enquanto que o FT-39 contém um bromo na posição 5 e um grupo metoxila na posição 2. Por último, o FT-19 possui também na posição 5 um grupo trifluormetoxi.

Diante dos resultados construímos uma hierarquia entre os compostos, levando em os valores das medianas encontrados na concentração de 100µM – concentração em que os valores estiveram mais próximo a dexametasona – em comparação ao estímulo (PMA+ION). Esta classificação de graduação crescente pode ser vista na figura 34, os compostos foram divididos em dois grupos: os com substituintes da posição 4 (pontilhado azul) e os com substituintes em outras posições (pontilhado vermelho). Assim também foi possível ver a influência de cada substituinte na redução das citocinas. De modo geral as percentagens de redução nos níveis variaram entre 99% e 34%, onde mais que a metade reduziu em mais de 70. Para IFN-gama, a ordem de redução da maior para a menor no grupo os dois grupos: FT-40>FT-35>FT-34>FT-31>FT-36>FT-16; FT-38>FT-39>FT-19.

Ainda sobre a modulação de IFN-gama, o –OH presente no FT-40 resultou na maior redução de nível de citocina com 98,6%. A secreção de citocinas das células tratadas com FT-40 foram 99% menor que as células tratadas com FT-16 em que o –OH foi substituído por –OCH₃. O FT-35 com substituinte –CF₃ teve o mesmo nível de redução encontrado para o FT-40 e quando comparado ao composto que tinha apenas um flúor, FT-31, foi visto que –CF₃ reduziu 98% a mais. Do mesmo modo, foi visto que o –CF₃ reduziu 98% a mais quando o flúor foi trocado por hidrogênio no FT-36 (CH₃). Ao analisar o segundo grupo (pontilhado vermelho- compostos com substituintes em outras posições), o FT-38 reduziu na mesma proporção que o FT-40 e FT-35. O grupamento nitro reduziu a secreção 94% a mais que o FT-19 que tinha como substituinte o –OCF₃.

Figura 34 Classificação de graduação crescente dos compostos a partir dos substituintes e dos níveis de secreção das citocinas IFN-gama e IL-17A na concentração de 100µM em comparação com o estímulo (PMA+ION).. Pontilhado azul: substituintes da posição 4. Pontilhado vermelho: outras posições. R= ftalimida-tiazolidina.



Fonte: Autor, 2019.

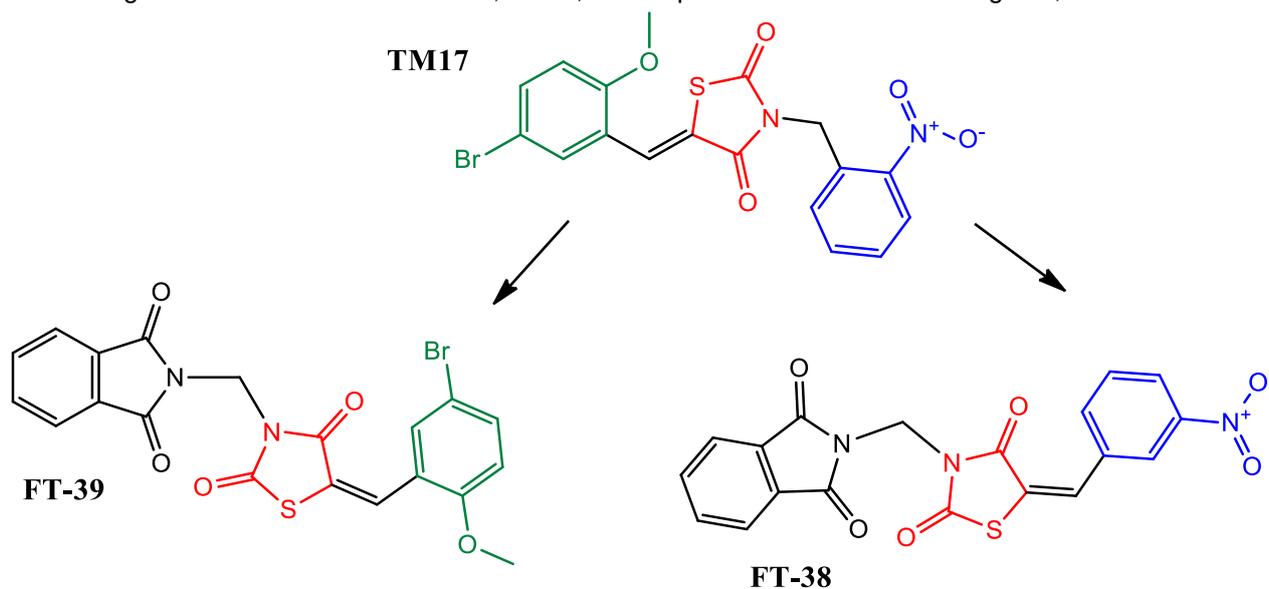
Para IL-17A, o grupo com substituintes em outras posições foi visto a ordem de redução: FT-38>FT-19>FT-39. Já em relação ao grupo substituídos na posição 4, o FT-35 reduziu um pouco a mais que o FT-40, havendo a troca da ordem. O FT-36 demonstrou modular mais IL-17A que IFN-gama subindo a ordem, enquanto que o FT-34 decaiu mais ainda mostrando ter uma maior percentagem de modulação para IFN-gama que para IL-17A. A ordem de redução passa ser: FT-35>FT-40>FT-36>FT-34.

Assim foi observado que os compostos que tem destaque na porcentagem de redução dos níveis de secreção são os compostos FT-38, FT-40 e FT-35 e que as substituições diferentes tem efeito diverso na capacidade destes compostos em modular citocinas. Quando comparamos com dados da literatura, para compostos que possuem o núcleo da tiazolidina ou ftalimida com substituintes semelhantes, foi possível corroborar alguns resultados desta dissertação. Como exemplo o TM17 que se trata de um composto (figura 35), onde a tiazolidina é substituído na posição 3 com 2-nitrobenzaldeído e na posição 5 por 5-bromo-2-metoxibenzaldeído (DA ROCHA JUNIOR *et al.*, 2013). Neste estudo foram dosados IFN-gama, IL-17A e IL-6, em sobrenadantes de PBMC de pacientes

com artrite reumatoide e de voluntários saudáveis nas mesmas concentrações utilizadas para os LPSF/FT's. O estímulo utilizado no ensaio do TM17 foi PMA/IONO, o mesmo utilizado nesta dissertação. Ao observar o gráfico para IFN-gama e IL-17A, levando em consideração o maior nível encontrado e não a mediana, notou-se que TM17 teve nível de secreção dependente de concentração com seus menores valores em 100 μ M, sendo estes significantes ($p < 0,05$). Esta relação de concentração-dependência, levando em consideração o maior nível encontrado, também foi vista para o FT-38 e FT-39 com os menores níveis de secreção para a maior concentração, com significância apenas para o ensaio de IFN-gama.

Além de ter a tiazolidina em comum, os LSPF/FT-38 e LPST/FT-39 possuem os mesmos substituintes vistos no TM17. O FT-39 possui o grupamento 5-bromo-2-métoxi ligada na tiazolidina na mesma posição que no TM17, já o FT-38 possui o grupamento nitro ligado a uma posição diferente na tiazolidina (figura 31). Desta forma, pode-se afirmar que a presença do grupo ftalimida nos LPSF/FT's exibiu potencial de inibição em citocinas pró-inflamatórias tão bom quanto o apresentado pela molécula TM17 (DA ROCHA JUNIOR *et al.*, 2013).

Figura 35 Derivado de tiazolidina, TM17, com capacidade de modular IFN-gama, IL-17A e IL-6.

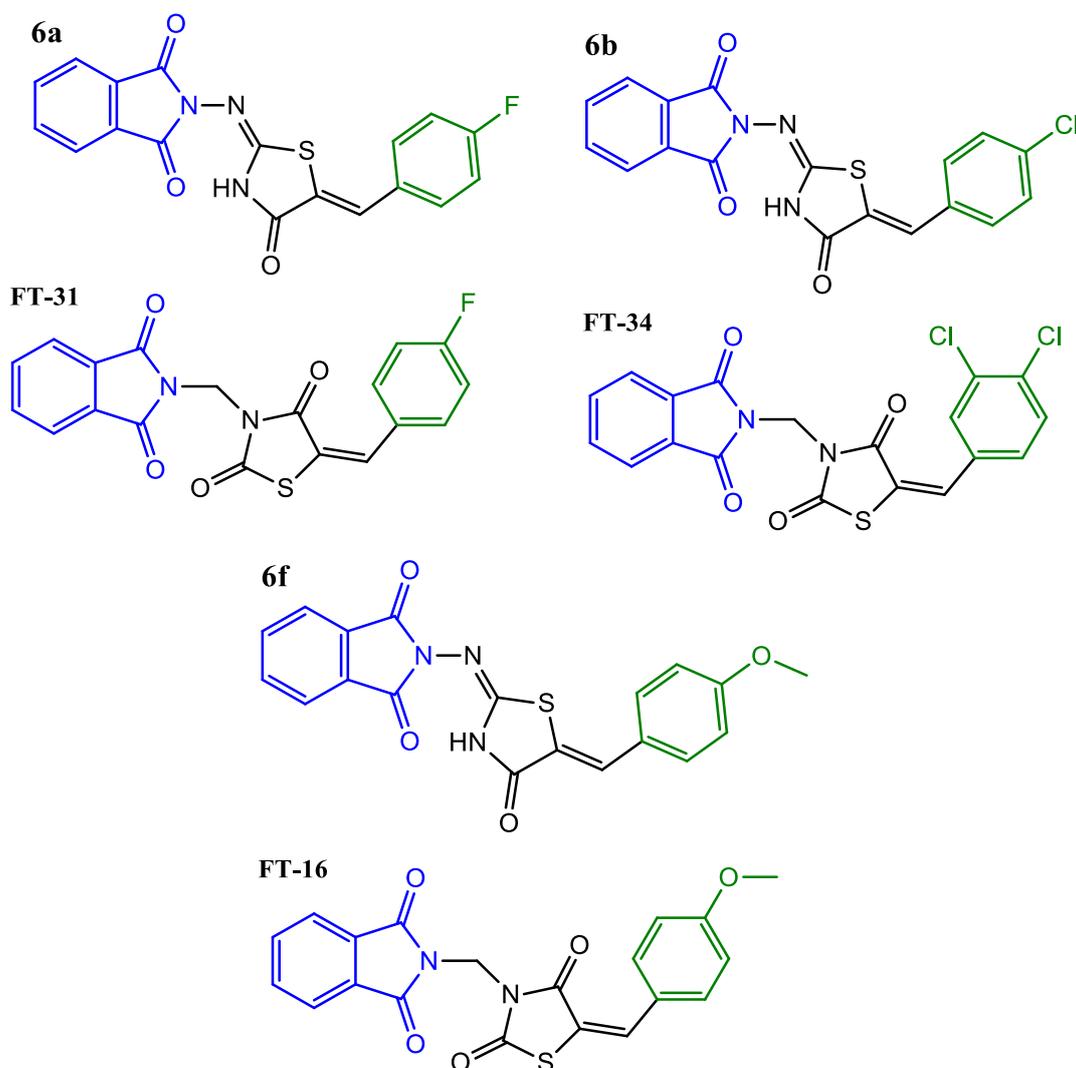


Fonte: adaptado de DA ROCHA JUNIOR *et al.*, 2013.

Compostos que continham como base ftalimida-tiazolidinona com substituintes como 4-fluorbenzaldeído (6a), 4-Clorobenzaldeído (6b) e 4-metoxibenzaldeído (6f) são análogos aos LPSF/FT's (figura 36). Foi investigado a capacidade destes compostos em modular citocinas como IL-2, IL-6, TNF-alfa e IFN-gama. Assim, para IFN-gama, as

concentrações foram de 1 e 10 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ e como estímulo concanavalina A. Assim os compostos 6a e 6b – 4-fluorbenzaldeído e 4-clorobenzaldeído – análogos do FT-31 e FT-34, respectivamente, não mostram inibição (em %) da secreção de IFN-gama, enquanto o composto 6f análogo do composto FT-16 teve inibição menor que 40%. Os dados encontrados para os análogos dos compostos FT-16 E FT-31, corroboram com os resultados desta dissertação, no entanto, o composto que tinha substituinte 4-cloro, semelhante ao FT-34 teve resultado oposto. Essa contradição pode ser, provavelmente, pela adição de mais um cloro na posição 3, existente no FT-34(DE OLIVEIRA CARDOSO *et al*, 2015).

Figura 36 Compostos ftalimida-tiazolidinona capazes de modular IFN-gama e IL-6.



Fonte: adaptado de DE OLIVEIRA CARDOSO *et al*, 2015.

Diante dos resultados encontrados destacamos a importância dos compostos possuírem a capacidade de modular estas citocinas. A IL-17A, citocina pró-inflamatória,

tem papel na defesa contra infecções bacterianas, fúngicas e também contribuição direta na inflamação crônica, por estimular e recrutar células que conduz esta última. Deste modo mostra-se envolvida em diversas patologias decorrente e/ou que envolvem um processo inflamatório. Entre elas podemos citar a psoríase e artrite psoriásica, esclerose múltipla, doença de Crohn, artrite reumatoide, doenças alérgicas e câncer. Na artrite reumatoide por exemplo, inflamação crônica nos tecidos sinoviais, IL-17A foi encontrada em níveis altos nos soros e fluidos sinoviais de pacientes. Os altos níveis de IL-17A vem mostrando relação com a gravidade do dano articular, um dos principais sintomas demonstrados por portadores da doença (BERINGER; MIOSSEC, 2018; BISWAS, 2018; KIM; PARK; CHUNG, 2016).

Já no caso da psoríase, distúrbio imunológico crônico caracterizado por lesões na pele acompanhada por dor, as lesões cutâneas encontradas em pacientes possuem em abundância de células Th17 que são responsáveis pela produção de IL-17A. Pessoas portadoras de psoríase podem desenvolver artrite psoriásica que se assemelha a artrite reumatoide. Esse forte envolvimento de IL-17A voltou os olhos dos pesquisadores para desenvolver fármacos com alvo na família IL-17, como exemplo temos o Secukinumab comercializado para o tratamento de psoríase (BLAUVELT; CHIRICOZZI, 2018; KIM; PARK; CHUNG, 2016; TAAMS et al., 2018). Do mesmo modo que IL-17A, IFN-gama também amplifica a inflamação psoriática. IFN-gama mostra-se envolvido em outras patologias como câncer, doença de Alzheimer, obesidade, entre outras (IVASHKIV, 2018; LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014).

Além disto tanto IL-17A quanto IFN-gama tem demonstrado relação com a epilepsia. Pacientes portadores de epilepsia tiveram níveis elevados de diversas citocinas no soro, incluindo IL-17A e IFN-gama. Pacientes estes que faziam usos de medicamentos tradicionais no tratamento da epilepsia como ácido valpróico e carbamazepina. Na fase pós-crise convulsiva e entre as crises foi visto a elevação de IL-17A e INF-gama no plasma e uma correlação positiva entre a frequência de crises e o nível de secreção entre as convulsões. Estudos também apontam que a presença de níveis alterados de IL-17A, também entre crises, pode contribuir para que ocorram crises mais graves (GAO et al., 2017; MAO et al., 2013; WANG; WANG; GUO, 2015).

Tendo em vista o envolvimento destas citocinas em diversas patologias é clara a importância da sua modulação para alcançar níveis mais baixos visando o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Assim, os compostos com os melhores resultados podem ser modificados estruturalmente afim de terem suas atividades

otimizadas. Baseado nisso, os LPSF/FT's mostraram que podem contribuir no tratamento doenças inflamatórias e epilepsia, uma vez que demonstraram capacidade de modular tais citocinas, as quais se fazem importantes no processo patológico de ambas doenças, especialmente em relação a epilepsia, uma vez que exiba atividade de proteção para convulsões em testes futuros.

4.2.2 Ensaio *in vivo*

O LPSF/FT-40 foi um dos compostos mais promissores na modulação das citocinas pró-inflamatórias. Além disto, também foi visto solubilidade suficiente para o preparo de uma suspensão na solução utilizada para o teste *in vivo*. Sendo assim, apenas este composto passou para os testes *in vivo*.

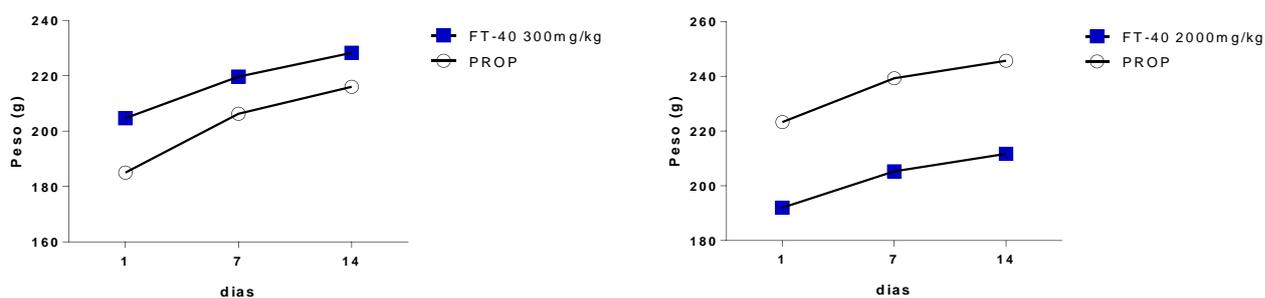
4.2.2.1 Toxicidade aguda

Seguindo o método da OECD 423, a primeira concentração testada foi de 300mg/kg. Durante a observação de 4h, não foi vista nenhuma alteração que fosse indício de possível toxicidade aguda. Não foi observado também efeitos gerais indesejados como diarreia, micção ou sialorreia, nem alterações nos olhos e orelhas. O composto nesta concentração também não afetou a atividade locomotora das ratas, não induziu convulsões nem agressividade e todas elas permaneceram vivas.

As ratas foram levadas ao biotério e foram mantidas sob condições normais de alimentação (ração/água) e tratamento (sistema de climatização e fotoperíodo). Durante os 14 dias de observação não houve nenhuma perturbação no estado geral das ratas e nenhuma mortalidade. As ratas tratadas com o LPSF/FT-40 300mg/kg tinham peso inicial entre 200-210g e fecharam o último dia com 222-235g. Em porcentagem, o ganho de peso foi de 11%. Já as ratas do controle, Propilenoglicol a 10%(PROP), engordaram mais, ficando com 17% de ganho de peso. Os dados foram expressos na figura 37 (a).

A não mortalidade das ratas tratadas com LPSF/FT-40 na concentração 300mg/kg permitiram, ainda seguindo a OCDE 423, o aumento da concentração para 2000mg/kg. Da mesma maneira que na concentração menor, nas 4h e nos 14 dias seguintes de observação, não foi visto nenhuma alteração e nem mortalidade das ratas. Em porcentagem houve equivalência entre o ganho de peso do controle e o LPSF/FT-40 2g/kg sendo de 10%. Os resultados podem ser conferidos na figura 37 (b).

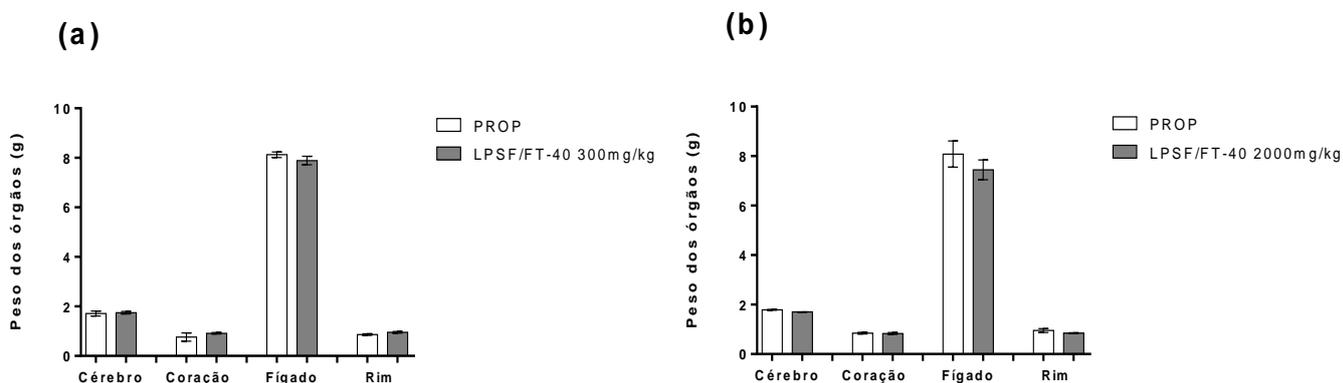
Figura 37 (a) ganho de peso das ratas tratadas com LPSF/FT-40 300mg/kg e (b) ganho de peso das ratas tratadas com LPSF/FT-40 2000mg/kg. PROP= propilenoglicol a 10%. N= 3 para cada condição.



Fonte: Autor, 2019

Após a eutanásia os órgãos como coração, rins, fígado e cérebro foram retirados para observação. Em comparação com o controle, considerando a aparência (coloração e formato), os órgãos das ratas tratadas, em ambas concentrações, estavam equiparados, ou seja, não houve alterações morfológicas visíveis. Outra relação de comparação realizada foi o peso de cada um deles e como visto na figura 38 (a,b), os pesos de cada órgão das ratas tratadas também se mostraram equivalentes ao controle. Estes resultados somados com os de cima reforçam a não toxicidade aguda in vivo.

Figura 38 (a) peso dos órgãos das ratas tratadas com LPSF/FT-40 300mg/kg e (b) peso dos órgãos das ratas tratadas com LPSF/FT-40 2000mg/kg. PROP= propilenoglicol a 10%. N= 3 para cada condição.



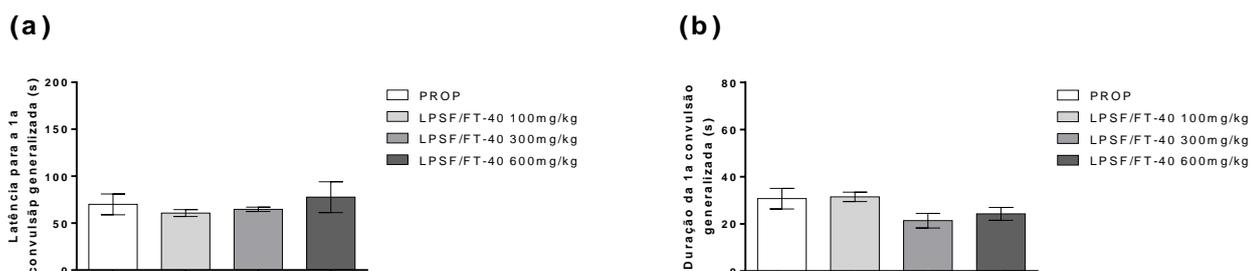
Fonte: Autor, 2019

4.2.2.2 Teste de convulsão por PTZ

Através deste modelo comportamental é possível ter 3 parâmetros de avaliação. O primeiro é o tempo até a primeira convulsão generalizada, o segundo é duração desta primeira convulsão e por último, o número de convulsões a partir do tipo de convulsão/crise levando em consideração seu grau de severidade. Entre os tipos de convulsões em avaliação temos: mioclônicas, clônicas e tônicas com e sem perda. O que caracteriza a presença de mioclônicas são movimentos involuntários breves que lembra choques, já as clônicas são contrações persistentes dos músculos com curtos períodos de relaxamento, sendo este último ponto não existente nas tônicas. Tanto as clônicas como as tônicas podem vir acompanhada da perda ou não da consciência (McNamara, 2012)

Na figura 39 (a,b) é possível ver os resultados em relação ao primeiro e segundo parâmetro. Quanto a latência, nas concentrações de 100mg/kg e 300mg/kg do composto, os ratos tiveram a primeira convulsão generalizada mais rápido que o controle. Já na concentração maior de 600mg/kg, os ratos tiveram um maior tempo até o aparecimento da primeira convulsão, porém estes dados não foram significativos. Ao analisar a duração das primeiras convulsões, notou-se uma diminuição do tempo total nas concentrações de 300mg/kg e de 600mg/kg quando comparados ao controle e a menor concentração. No entanto, não foi visto dose-dependência uma vez que os ratos tratados na maior concentração tiveram a primeira convulsão com maior duração que os tratados com 300mg/kg. Também não foram dados com significância.

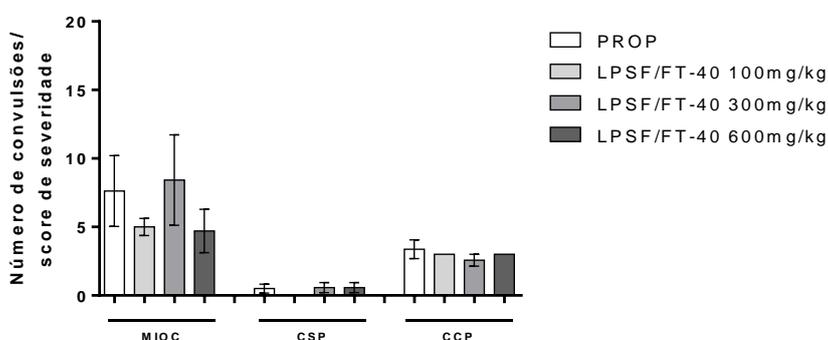
Figura 39 (a) latência para primeira convulsão generalizada em segundos(s) e (b) duração da primeira convulsão generalizada em segundos(s). PROP= propilenoglicol a 10%. N= 8 para cada condição.



Fonte: Autor, 2019

Os resultados com o número de convulsões e a severidade estão expostos na figura 40. Em relação as convulsões mioclônicas(MIOC), o LPSF/FT-40 100 e 600 mg/kg tiveram número menores em comparação com o controle e com a concentração de 300mg/kg. De um modo geral, o número de convulsões clônicas sem perda (CSP) foi baixo e ratos tratados com LPSF/FT-40 100mg/kg não tiveram esse tipo de convulsão. Em relação aos tratados com 300mg/kg e 600mg/kg, os números de CSP foram equivalentes ao controle. Já para clônicas com perda (CCP), também em comparação ao controle, houve uma pequena diminuição dos ratos tratados em todas as concentrações testadas. Contudo, não houve significância em nenhum dos resultados acima e quanto as convulsões tônicas, com e sem perda, não foram vistas nos ratos tratados e nem nos controles.

Figura 40 Números de convulsões de acordo com tipo de convulsão e o grau de severidade. PROP= propilenoglicol a 10%. N= 8 para cada condição.



Fonte: Autor, 2019

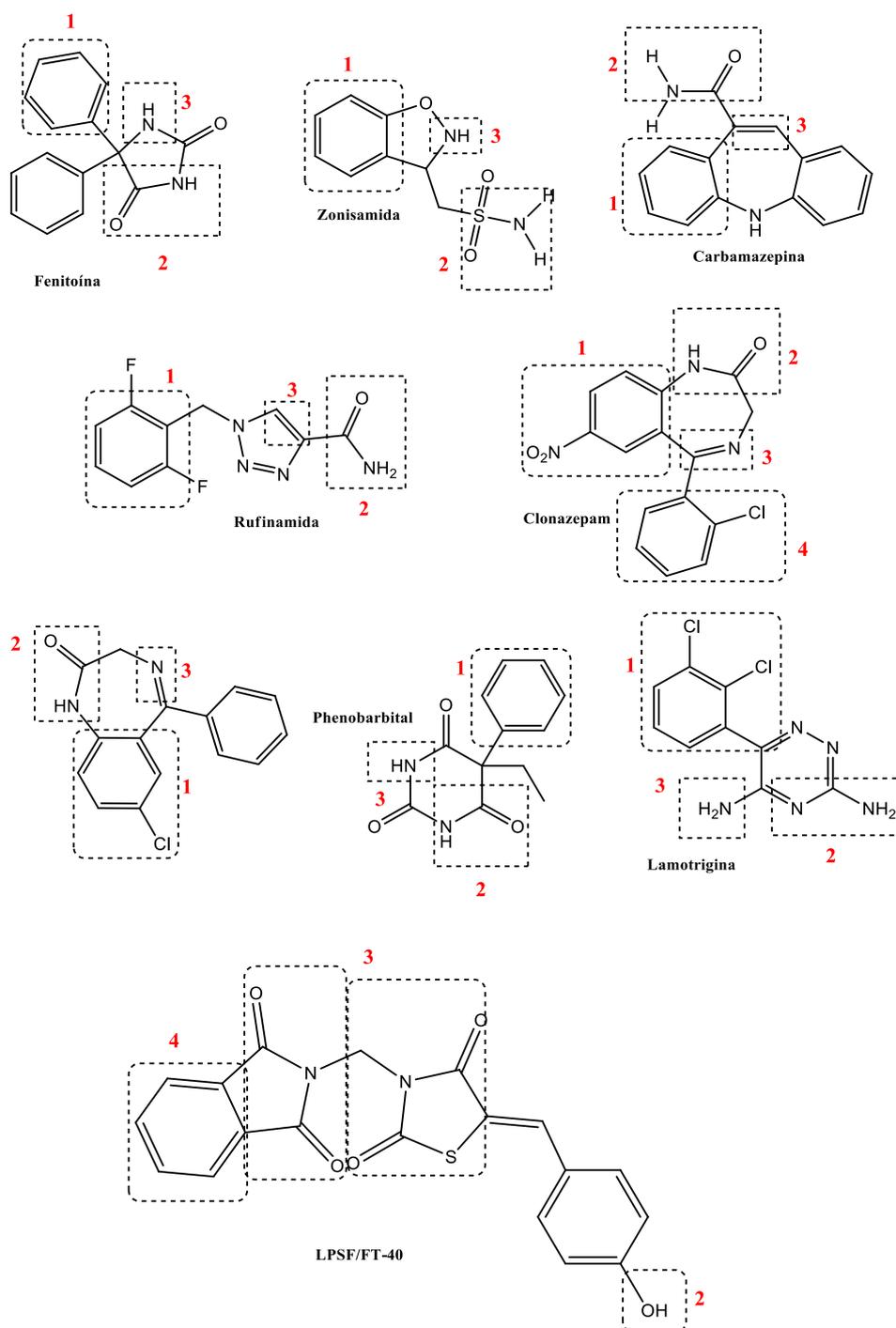
Na presença dos resultados acima ao analisar os fármacos anticonvulsivantes (figura 41) presentes no mercado farmacêutico foi observado que há diferenças estruturais entre eles e o LPSF/FT-40 também possui núcleos até então não vistos nestes fármacos. No entanto, Kumar e seus companheiros levantaram algumas propriedades compartilhadas entre estes medicamentos:

- 1) Um local de ligação com um **grupo arila hidrofóbico** que seja substituído por um **halogênio (F, Br, Cl e I)**, com preferência na **posição para**;
- 2) Um domínio de **doador de hidrogênio**;
- 3) Um grupo que seja **doador de elétrons**;

- 4) Um **local hidrofóbico-hidrofílico** para controlar as propriedades farmacocinéticas do anticonvulsivante.

Ao analisar a estrutura do composto em estudo, notou-se que o substituinte 4-OH pode atuar como grupo doador de hidrogênio, enquanto que o anel de benzeno presente na ftalimida pode ser o local hidrofóbico-hidrofílico. Quanto a presença de doador de elétrons é visto mais de um grupo, já que os 4 oxigênios, 2 nitrogênios e o enxofre possuem pares de elétrons livres para doar. No LPSF/FT-40 também não é possível encontrar um grupo arila hidrofóbico que tem na posição *para* com algum halogênio. Essa propriedade é uma das que são sempre encontradas nos fármacos como pode ser visto na figura 41. O fato do composto ter seis doadores de elétrons a mais que o indicado e não ter o grupamento arila hidrofóbico substituído pode ter sido um dos fatores chaves para a não atividade.

Figura 41 Relação das propriedades compartilhadas entre os fármacos anticonvulsivantes.

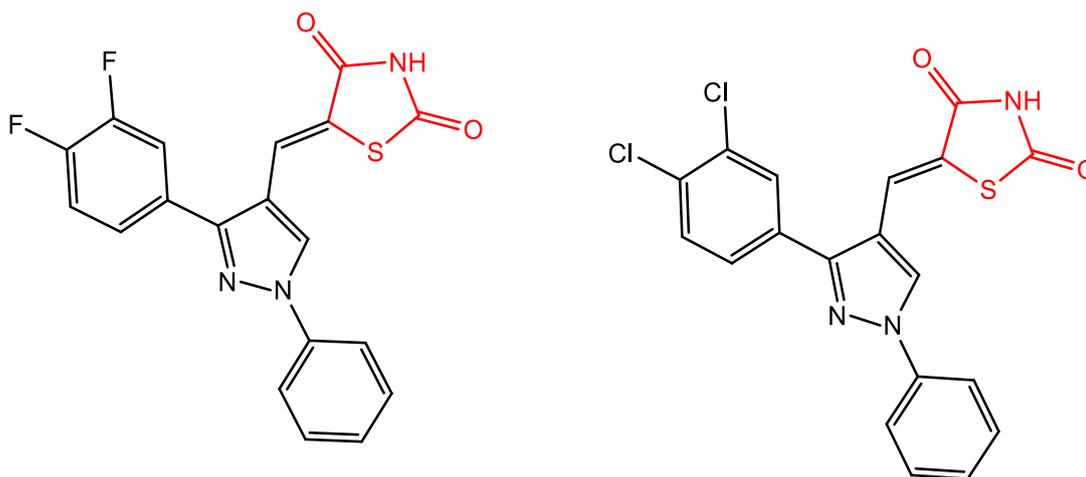


Fonte: adaptado de KUMAR *et al.*, 2014.

Outro ponto é que embora o núcleo da TZD seja promissor em diversas atividades biológicas, a atividade anticonvulsivante é pouco investigada. Na literatura, um trabalho utilizou o pirazol para avaliar sua possível atividade de proteção contra convulsões e sua atividade analgésica. Entre as séries, uma tinha o núcleo da tiazolidina-2,4-diona e outra, a tiazolidina que foram substituídas de diversas formas. As duas moléculas contendo TZD

exibiram proteção de 76.58 e 73.77% na triagem utilizando o modelo de convulsão eletrochoque máximo (figura 42) (VIVEKA et al., 2015). Viveka e seus companheiros destacam que grupos como imida cíclica, C–CO– e N–CO– são importantes para a atividade anticonvulsivantes, grupos até então presente nos LPSF/FT's. No entanto, eles também destacaram que a presença de mais e mais substituintes na tiazolidina pode diminuir gradativamente a atividade o que pode ser a questão dos compostos LPSF/FT's, já que o –NH (livre nas moléculas abaixo) estão substituídos pela ftalimida.

Figura 42 Moléculas com Pirazol e Tiazolidina-2,4-diona com atividade anticonvulsivante.



Fonte: adaptado de VIVEKA et al., 2015

Por outro lado, o modelo experimental utilizado para avaliar compostos e sua possível atividade anticonvulsivante é fator chave, isso por que há diversos mecanismos envolvidos na epilepsia que são contemplados por vários modelos diferentes. Neste presente estudo foi utilizado um modelo comportamental onde o PTZ induz o aparecimento de convulsões em ratos. Entre os mecanismos pelo qual PTZ induz convulsões é que ele é considerado um agonista seletivo de GABA, bloqueando este receptor, PTZ também aumenta a tensão no canal de potássio depende de tensão. A epilepsia desencadeada assim assemelha-se a epilepsia generalizada tônico-clônica primária em humanos, sendo gerada e disseminada principalmente através do hipocampo (RUBIO et al., 2012).

Levando em consideração a capacidade do LPSF/FT40 de modular citocinas envolvidas na inflamação e na epilepsia, poderia o composto em questão mostrar resultados de proteção contra convulsões em modelos experimentais que contemplem um processo inflamatório. Um dos modelos indicado seria o de convulsões induzidas por

pilocarpina, que trata-se de um alcalóide extraído das folhas de *Pilocarpus jaborandi* e que assim como PTZ pode ser injetado via intraperitoneal ou diretamente no cérebro. Esse modelo é utilizado para estudar a epilepsia do lobo temporal, esta é caracterizada por uma lesão como evento inicial, um período de latência e depois o aparecimento de convulsões espontâneas recorrentes. A aplicação de Pilocarpina causa várias lesões cerebrais, onde provavelmente ocorra um processo inflamatório, sendo este desencadeante de convulsões (epileptogênese) (MINJAREZ *et al.*, 2017; RAOL; BROOKS-KAYAL, 2012).

Perante o exposto, a contradição entre os resultados positivos de imunomodulação e baixa atividade anticonvulsivante do composto LPSF/FT-40 pode ser futuramente equilibrada com a utilização de ensaio de atividade anticonvulsivante que esteja relacionado ao processo inflamatório. Além disto, havendo um resultado positivo para atividade anticonvulsivante, poderá ser realizado a melhoria desta ação através de modificações moleculares, a partir de síntese de derivados LPSF/FT-40, que teriam também sua atividade imunomoduladora avaliada.

4.3 ESTUDOS *IN SILICO*

Moléculas candidatas a fármacos e os medicamentos tendem a apresentar alguns padrões que envolvem características como lipofilicidade, polaridade, insolubilidade, tamanho, flexibilidade e instauração. Através dos resultados obtidos foi possível ver que todos os LPSF/FT's estão dentro dos limites esperados com exceção do parâmetro de instauração. Isto ocorre devido a presença dos anéis aromáticos tanto do núcleo da ftalimida quanto dos radicais. Também está justificado pelas quatro carbonilas, duas de cada núcleo, e a dupla ligação que liga o núcleo da TZD com os radicais. O radical 3-nitro presente no LPSF/FT-38 fez com que ele estivesse fora também do parâmetro de polaridade.

Todos os compostos também respeitaram a regra dos cinco de Lipinski que estabelece parâmetros para que uma molécula seja um bom fármaco em relação a sua biodisponibilidade por via oral (LIPINSKI *et al.*, 2012). Essas regras incluem ter o peso molecular menor que 500, o número de aceptores de hidrogênio menor que 10 e o de doadores menor que 5, assim como Log P também menor que 5. Lipinski delimitou a regra a partir da análise de “n” compostos onde frequentemente os fármacos respeitavam esses valores. Além disso, a análise mostrou uma alta probabilidade de absorção pelo trato gastrointestinal o que corrobora com o respeito a regra de Lipinski descrito acima.

Exceto para os compostos LPSF/FT-38 e LPSF/FT-39, foi possível ver uma lista de possíveis alvos biológicos onde alguns deles podem ser encontrados no quadro 9. O levantamento destes alvos mostra uma probabilidade dos compostos finais em contribuir para a busca de novos fármacos em outras doenças como câncer, diabetes e depressão. O LPSF/FT-16, LPSF/FT-19 e LPSF/FT-35 tiveram como possível alvo a subunidade alfa-5 do receptor GABA ou subunidade alfa da proteína do canal de sódio tipo 1 e 2 que se mostram relacionados com a epilepsia. Também foram vistos alvos com papel importante no processo da inflamação como IL-8, Toll-like receptor, TNF-alfa e inibidor da migração de macrófagos para os compostos LPSF/FT-19, LPSF/FT-35 e LPSF/FT-40.

Os resultados encontrados no SWISSTARGETPREDICTION (STP) mostram que os LPSF/FT's finais podem contribuir na busca de novos fármacos para diversas doenças, bem como a probabilidade com os alvos envolvidos na epilepsia e inflamação reforçam que podem ser candidatos a fármacos anti-inflamatórios e anticonvulsivante.

Quadro 9 Relação de alguns dos prováveis alvos para os compostos finais e as doenças que os alvos tem ligação

Composto	Prováveis alvos	Doenças
LPSF/FT-16	Fosfodiesterase 10 ^a Trombina e fator de coagulação X Subunidade alfa-5 do receptor GABA	Degeneração estriatal, autossômica dominante 2 Deficiência do fator X Desordens do sistema nervoso centra (Bipolaridade/epilepsias)
LPSF/FT-19	Receptor da interleucina-8 Subunidade alfa da proteína do canal de sódio tipo 1 e 2 Receptor de serotonina 2 ^a	Inflamação Epilepsias Depressão
LPSF/FT-31	Adesão focal quinase 1 Tirosina-proteína quinase ABL Trombina e fator de coagulação X	Câncer Leucemia mielóide crônica Deficiência do fator X
LPSF/FT-32	Adesão focal quinase 1 Serina/treonina-proteína quinase 1 Elastase de leucócitos	Câncer Imunodeficiência 57 Hematopoese cíclica
LPSF/FT-34	Adesão focal quinase 1	Câncer
LPSF/FT-35	Receptor Toll-like Subunidade alfa-5 do receptor GABA Receptor de serotonina 2a Tirosina-proteína quinase ABL	Inflamação Desordens do sistema nervoso centra (Bipolaridade/epilepsias Depressão Leucemia mielóide crônica
LPSF/FT-36	Elastase de leucócitos	Hematopoese cíclica
LPSF/FT-40	Inibidor da migração de macrófagos Receptor de glucagon TNF-alpha	Inflamação/Artrite Reumatóide Diabetes Inflamação

Fonte: Adaptado de STP, 2019 e Uniprot, 2019

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A inflamação e epilepsia são doenças que afetam a população e o tratamento atual é acompanhado por uma série de efeitos não benéficos. Portanto, é vez visto a necessidade de busca por novos fármacos frente a inflamação e a epilepsia. Deste modo, dez novos derivados da série LPSF/FTs foram sintetizados sendo caracterizados com as técnicas de EM, IV e RMN de ^1H e ^{13}C . Os compostos não foram citotóxicos apresentando viabilidade celular maior que 86%. A maioria das moléculas foram capazes de reduzir os níveis das citocinas IFN-gama e IL-17A, com destaque para o LPSF/FT-40, LPSF/FT-38 e LPSF/FT-35 que teve os níveis de secreção mais próximo do controle positivo, dexametasona, com valores significativos. *In vivo*, embora não tenha protegido contra as convulsões induzidas por PTZ, o LPSF/FT-40 não mostrou toxicidade aguda nas concentrações de 300mg/kg e 2000mg/kg. Assim, como perspectiva temos o aumento do “n” para alguns compostos, bem como avaliação de outras citocinas como TNF-alfa em especial para o LPSF/FT-40. Avaliar também os resultados histológicos dos órgãos das ratas do teste de toxicidade aguda, somando com os resultados aqui descritos para uma publicação.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, P.; HUSAIN, A.; SIDDIQUI, N. Essential aminoacid incorporated GABA-phthalimide derivatives: Synthesis and anticonvulsant evaluation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 9, p. 4085–4098, 2014.
- ALIZED, G. F. ONTAL LOBE EPILEPSY. p. 50–51, 2014.
- ALYU, F.; DIKMEN, M. Inflammatory aspects of epileptogenesis: Contribution of molecular inflammatory mechanisms. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 29, n. 1, p. 1–16, 2017.
- ANGIARI, S. Selectin-mediated leukocyte trafficking during the development of autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 11, p. 984–995, 2015.
- ANNAMARIA VEZZANI. Epilepsy and Inflammation in the Brain. **Epilepsy current**, v. 14, p. 3–7, 2014.
- ASIRVATHAM, S.; DHOKCHAWLE, B. V.; TAURO, S. J. Quantitative structure activity relationships studies of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.
- ASSIS, D. O. et al. The cientific WorldJOURNAL Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of New Alkyl-Substituted Phthalimide 1H -1 , 2 , 3-Triazole Derivatives. v. 2012, p. 1–7, 2012.
- AVECILLA, F. et al. Experimental and theoretical studies of a pyrazole-thiazolidin-2 , 4-dione hybrid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1141, p. 417–427, 2017.
- BACH, D. H. et al. Synthesis and biological activity of new phthalimides as potential anti-inflammatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3396–3405, 2017.
- BADAWI, A. et al. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy**, v. 3, p. 173–86, 2010.
- BANSAL, G. et al. Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione-pyrazole conjugates as antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 92, n. September, p. 103271, 2019.
- BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in In fl ammation. p. 1–21, 2016.
- BERINGER, A.; MIOSSEC, P. IL-17 and IL-17-producing cells and liver diseases, with focus on autoimmune liver diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 12, p. 1176–1185, 2018.
- BIALER, M. How did phenobarbital's chemical structure affect the development of

- subsequent antiepileptic drugs (AEDs)? **Epilepsia**, v. 53, n. 2011, p. 3–11, 2012.
- BILL, F.; FOUNDATION, M. G. Articles Global , regional , and national burden of neurological disorders during 1990 – 2015 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. 2017.
- BILL, F.; FOUNDATION, M. G. Articles Global , regional , and national burden of epilepsy , 1990 – 2016 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. v. 4422, n. 18, 2019.
- BISWAS, P. S. IL-17 in Renal Immunity and Autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 11, p. 3153–3159, 2018.
- BLAUVELT, A.; CHIRICOZZI, A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 55, n. 3, p. 379–390, 2018.
- BOER, H. M. DE. Epilepsy stigma : Moving from a global problem to global solutions. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, v. 19, n. 10, p. 630–636, 2010.
- BOER, H. M. DE; MULA, M.; SANDER, J. W. The global burden and stigma of epilepsy. v. 12, p. 540–546, 2008.
- BOZIMOWSKI, G. A Review of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **AANA journal**, v. 83, n. 6, p. 425–33, 2015.
- BRANCO, A. C. C. C. et al. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–10, 2018.
- CANDIDO, J.; HAGEMANN, T. Cancer-related inflammation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. SUPPL.1, 2013.
- CHADHA, N. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Thiazolidine-2 , 4-dione derivatives : Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 2953–2974, 2015.
- CONTRERAS-CAICEDO, G. Medicamentoso das Epilepsias Medicamentoso das Epilepsias. 2014.
- DA ROCHA JUNIOR, L. F. et al. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- DA ROCHA PITTA, M. G. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 5, p. 2421–2429, 2013.
- DE OLIVEIRA CARDOSO, M. V. et al. Design, synthesis and structure - Activity

- relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 491–503, 2015.
- DE VRIES, E. E. et al. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 63, p. 177–190, 2016.
- DESENA, A. D.; DO, T.; SCHULERT, G. S. Systemic autoinflammation with intractable epilepsy managed with interleukin-1 blockade. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2018.
- DEVINSKY, O. et al. 3,4,5 ,. n. May, 2018.
- ELZA, D.; TARGAS, M. Eficácia e Efeitos Adversos dos Fármacos Antiepilépticos. p. 2–10, [s.d.].
- FELSON, D. T. Safety of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 26, p. 2595–2596, 2016.
- FRANCISCO, S.; ARAU, W. CHEMISTRY Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. p. 2421–2429, 2013.
- GAO, F. et al. Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 135, n. 6, p. 663–669, 2017.
- GOLDENBERG, M. M. Multiple sclerosis review. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 37, n. 3, p. 175–84, 2012.
- GÓMEZ-ACEBO, I. et al. Epidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs consumption in Spain. The MCC-Spain study. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1134, 2018.
- GULDIKEN, B.; RÉMI, J.; NOACHTAR, S. Cardiovascular adverse effects of phenytoin. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 5, p. 861–870, 2016.
- HARSONO, A. Child immune response and the role of nutrition. **Paediatrica Indonesiana**, v. 45, n. 6, p. 158–161, 2005.
- HENSON, P. M. Dampening Inflammation Nature 06. v. 6, n. 12, p. 1179–1181, 2005.
- HON, S. et al. Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. v. 16, p. 3626–3631, 2008.
- HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature immunology**, v. 16, n. 5, p. 448–57, 2015.
- IMAN, M.; SAADABADI, A.; DAVOOD, A. Docking studies of phthalimide pharmacophore as a sodium channel blocker. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n. 9, p. 1016–1021, 2013.
- IVASHKIV, L. B. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease

- and cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 9, p. 545–558, 2018.
- JAIN, N.; SINGH, B. An Overview of Biological and Synthetic Aspects of Thiazole Derivatives in Heterocyclic Chemistry. n. 5, p. 52–57, 2016.
- KAMIŃSKI, K. et al. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4634–4641, 2011.
- KAUR, G.; SILAKARI, O. Benzimidazole scaffold based hybrid molecules for various inflammatory targets: Synthesis and evaluation. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, n. March, p. 24–35, 2018.
- KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 3–10, 2007.
- KEPPEL HESSELINK, J. M.; KOPSKY, D. J. Phenytoin: 80 years young, from epilepsy to breast cancer, a remarkable molecule with multiple modes of action. **Journal of Neurology**, v. 264, n. 8, p. 1617–1621, 2017.
- KHAN, Y. S.; GUTIÉRREZ-DE-TERÁN, H.; ÅQVIST, J. Molecular Mechanisms in the Selectivity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1236–1248, 2018.
- KIM, B. S.; PARK, Y. J.; CHUNG, Y. Targeting IL-17 in autoimmunity and inflammation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 11, p. 1537–1547, 2016.
- KUMAR, R. et al. Original article: DESIGN , SYNTHESIS AND ANTICONVULSANT ACTIVITY OF SOME (A) (HBD) (D) (C). p. 225–240, 2014.
- LEES, J. R. Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 18–26, 2015.
- LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 6, p. 263–268, 2003.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2007.
- LEY, K.; ZARBOCK, A. Hold on to Your Endothelium: Postarrest Steps of the Leukocyte Adhesion Cascade. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 185–187, 2006.
- LIMA, L. M. *Biologia Molecular Década De 80*. Pdf. v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.
- 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. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.
- LOWES, M. A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; KRUEGER, J. G. Immunology of Psoriasis.

Annual Review of Immunology, v. 32, n. 1, p. 227–255, 2014.

MAO, L. Y. et al. Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. **Epilepsia**, v. 54, n. 9, p. 142–145, 2013.

MARTIN, H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 690, n. 1–2, p. 57–63, 2010.

MCEVER, R. P. Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovascular Research**, v. 107, n. 3, p. 331–339, 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MINJAREZ, B. et al. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 83, n. November 2016, p. 373–380, 2017.

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

MOLLAZADEH, H. et al. **Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10**. [s.l: s.n.]. v. 59

NASEF, N. A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L. R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1131–1141, 2017.

NIKALJE, A. P. G. et al. Ultrasound-assisted synthesis, anticonvulsant activity, and docking study of indole-appended thiazolidin-4-ones. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 10, p. 756–767, 2014.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. **Oecd Guideline for Testing of Chemicals**, n. December, p. 1–14, 2001.

PONNUCHAMY, S. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Antimycobacterial evaluation of novel hybrid arylidene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 4, p. 1089–1093, 2014.

PORTO, L. A. et al. O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas: uma breve revisão. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 13, n. 4, p. 169–175, 2007.

RAMANTANI, G.; HOLTHAUSEN, H. Epilepsy after cerebral infection : review of the literature and the potential for surgery. v. 19, n. 2, p. 117–136, 2017.

- RAOL, Y. H.; BROOKS-KAYAL, A. R. **Experimental models of seizures and epilepsies**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 105
- RAPACZ, A. et al. Analgesic , antiallodynic , and anticonvulsant activity of novel hybrid molecules derived from N -benzyl-2- of pain and epilepsy. p. 567–579, 2017.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.
- RUBIO, C. et al. In Vivo Experimental Models of Epilepsy. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 298–309, 2012.
- RUTHERFORD, A.; NIKIPHOROU, E.; GALLOWAY, J. Rheumatoid arthritis. **Comorbidity in Rheumatic Diseases**, v. 388, n. 10055, p. 53–79, 2017.
- SANTIN, J. R. et al. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 689–697, 2013.
- SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of gl... [Pharmacol Ther. 2002] - PubMed - NCBI. v. 96, p. 23–43, 2002.
- SCHEFFER, I. E. et al. No Title. p. 1–25, 2017.
- SCHIMMEL, L.; HEEMSKERK, N.; VAN BUUL, J. D. Leukocyte transendothelial migration: A local affair. **Small GTPases**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2017.
- SCHMIDT, D.; LO, W. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver : Ways out of the current dilemma. v. 52, n. 4, p. 657–678, 2011.
- SCHMIDT, S.; MOSER, M.; SPERANDIO, M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. **Molecular Immunology**, v. 55, n. 1, p. 49–58, 2013.
- SEPPÄLÄ, M. NSAID for Sciatica. **Suomen Lääkärilehti**, v. 64, n. 12, p. 1091–1092, 2009.
- SERHAN, C., CHIANG N., V. D. T. Resolution Lipid Mediators. **Nat Rev Immuno**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.
- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, 2005.
- SHABAB, T. et al. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017.
- SHANMUGARAJAH, P. D. et al. Phenytoin-related ataxia in patients with epilepsy: clinical and radiological characteristics. **Seizure**, v. 56, p. 26–30, 2018.
- SHARMA, S.; PRASAD, A. N. Inborn Errors of Metabolism and Epilepsy: Current Understanding , Diagnosis , and Treatment Approaches. 2017.

- SHARMA, U. et al. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. p. 678–704, 2010.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.
- SHIMADA, T. et al. Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- SI, W. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Design , synthesis and bioactivity of novel phthalimide derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS**, 2015.
- SIKORA, E.; SCAPAGNINI, G.; BARBAGALLO, M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. **Immunity and Ageing**, v. 7, p. 2–5, 2010.
- SMITH, P. E. M. Introduction : The causes of epilepsy. v. 53, p. 1–2, 2012.
- SPICIARICH, M. C. et al. Global Health and Epilepsy : Update and Future Directions. v. 6, 2019.
- SRIVASTAVA, J. K. et al. RSC Advances antibacterial activity targeting the S1 pocket for the treatment of type 2 diabetes. p. 14095–14102, 2015.
- STAFSTROM, C. E.; CARMANT, L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. p. 1–18, 2015.
- STEINLEIN, O. K. Ion channels and epilepsy. **American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics**, v. 106, n. 2, p. 146–159, 2001.
- SU, M. et al. The in vitro and in vivo anti-inflammatory effects of a phthalimide PPAR- γ agonist. **Marine Drugs**, v. 15, n. 1, 2017.
- TAAMS, L. S. et al. IL-17 in the immunopathogenesis of spondyloarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 8, p. 453–466, 2018.
- TARR, G. S.; REUTER, H. Review of the safety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors. **South African Family Practice**, v. 57, n. 3, p. 18–22, 2015.
- TORRES, C. V. Keywords : v. 11, n. 73, 2015.
- TOXICOLOGY, E. New thiazacridine agents: Synthesis , physical and chemical characterization , and in vitro anticancer evaluation. 2017.
- VALENCIA, I. Epilepsy in Systemic Autoimmune Disorders. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 21, n. 3, p. 226–231, 2014.
- VALOTTA, A.; CABRAL, F. R. Ictogênese , Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. v. 14, n. Suppl 2, p. 39–45, 2008.

- VANDEWALLE, J. et al. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42–54, 2018.
- VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2011.
- VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 6, p. 797–803, 2008.
- VIVEKA, S. et al. Design, synthesis, anticonvulsant and analgesic studies of new pyrazole analogues: A Knoevenagel reaction approach. **RSC Advances**, v. 5, n. 115, p. 94786–94795, 2015.
- WANG, G. et al. Synthesis and biological evaluation of novel dimethyl[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylate derivatives containing thiazolidine-2,4-dione for the treatment of concanavalin A-induced acute liver injury of BALB/c mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5941–5948, 2011.
- WANG, L.; WANG, F. S.; GERSHWIN, M. E. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. **Journal of Internal Medicine**, v. 278, n. 4, p. 369–395, 2015.
- WANG, Y. et al. PPh₃ / I₂ / HCOOH: An efficient CO source for the synthesis of phthalimides. **Tetrahedron**, v. 75, n. 9, p. 1180–1185, 2019.
- WANG, Y.; WANG, D.; GUO, D. Interictal cytokine levels were correlated to seizure severity of epileptic patients: A retrospective study on 1218 epileptic patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2015.
- WOLF, N. I.; BAST, T.; SURTEES, R. Epilepsy in inborn errors of metabolism. v. 7, n. 2, p. 67–81, 2005.
- WOLF, P. Idiopathic Generalized Epilepsies : A Review and Modern Approach. v. 46, p. 1–6, 2005.
- YASIRY, Z.; SHORVON, S. D. How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: The story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. **Epilepsia**, v. 53, p. 26–39, 2012.
- ZAHRAN, M. A. H. et al. Design , synthesis , biological evaluations , molecular docking , and in vivo studies of novel phthalimide analogs. n. March, p. 1–12, 2018.
- ZHANG, X. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Review article A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-target- directed ligands against Alzheimer ' s disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 543–550, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAL

Tiazolidina-2,4-diona

Em um balão de fundo redondo de 250ml foram diluídos quantidades equimolares de tiouréia e ácido monocloroacético em água destilada. Partindo de 5g de tiouréia foi utilizado 50ml de solvente. A mistura foi deixada em refluxo por 24h a 90°C. Ao final, a mistura foi posta em um Becker e levada a geladeira para formação dos cristais.

3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/FT-1)

Em um erlenmeyer foi solubilizado a base, NaOH, em metanol. Enquanto isso, embalão de fundo redondo foi adicionado a tiazolidina mais acetonitrila. Em seguida, a base solubilizada foi adicionada ao balão, onde a mistura permaneceu em agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo foi adicionado a N-(clorometil)ftalimida e a reação ficou por 2h30min na temperatura de 65°C sob refluxo e agitação. A proporção dos solventes foi de 20% de metanol para 80% de acetonitrila. Já para ftalimida, tiazolidina e base foi de 1: 1.2 : 1.2 de equivalência, respectivamente. Ao fim da reação a mistura foi levada ao rotaevaporador para retirada de solventes e foi recristalizado com metanol.

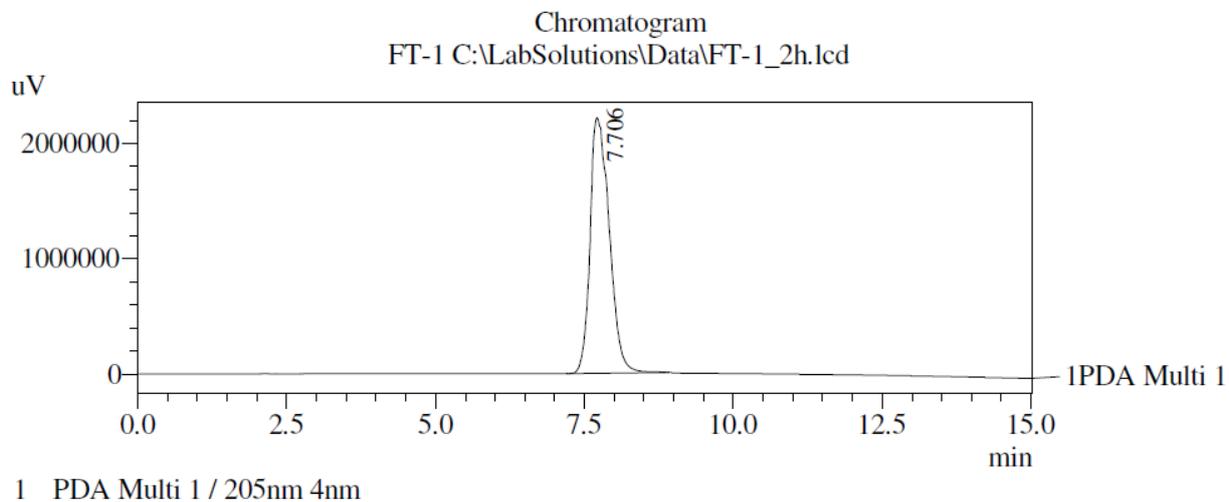
Derivados tiazofthalimídicos (LPSF/FT's)

Para síntese dos compostos finais, através de uma condensação de Knoevenagel, o 3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/FT-1) foi adicionado em um balão com ácido acético glacial juntamente com o aldeído correspondente ao final. A mistura foi deixada sob agitação e refluxo com a temperatura de 110°C. Como promotor da reação foi utilizado o acetato de amônio a 1.2 de equivalência ao LPSF/FT-1. Quanto à equivalência do aldeído foi levada em conta a necessidade de cada reação onde em alguns finais foi utilizado 1 e em outras 1.2. A duração da reação foi variável estando entre 3-8 horas. Após o término da reação, a mistura foi levada mantida a 4°C para formação dos cristais. A purificação de alguns compostos foi feita através de lavagens com acetonitrila.

APÊNDICE B – ESPECTROS

3-((1,3-Dioxoisindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-1)

Figura 29 Cromatograma do LPSF/FT-1



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.706	49973313	2222051	100.000	100.000
Total		49973313	2222051	100.000	100.000

Figura 30 Espectro de massas do LPSF/FT-1

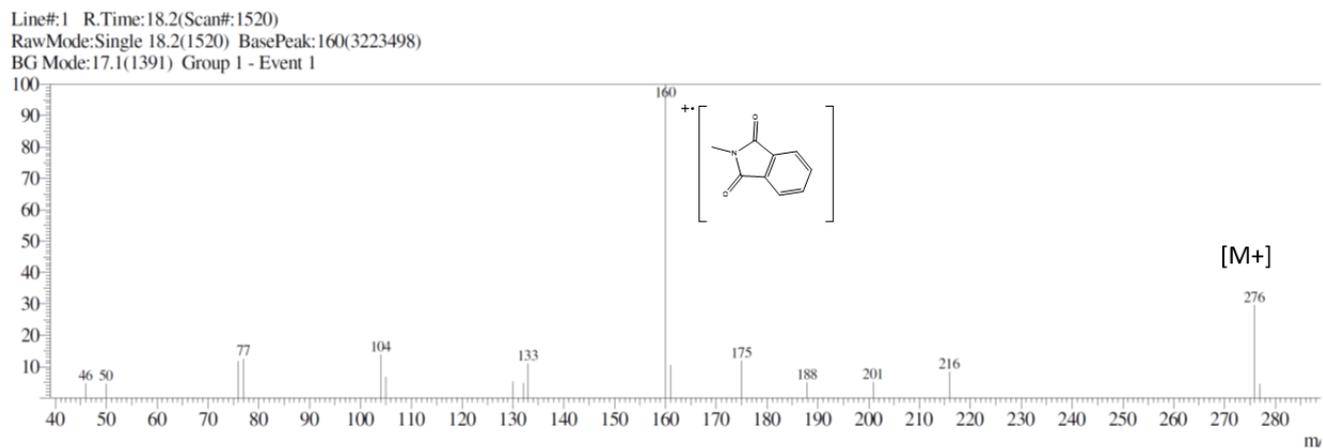


Figura 31 Espectro de RMN H1 do LPSF/FT-1

Maria Cecília/Marina
 Amostra Ft-1
 Solicitação N. Q0131-16
 01.02.18 UFPE

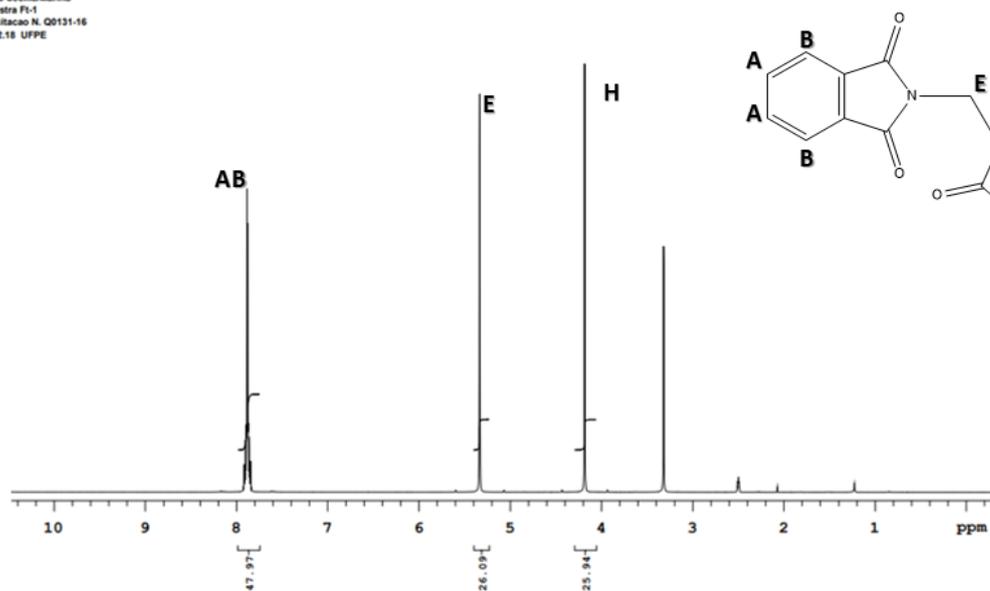


Figura 32 Espectro de RMN C13 do LPSF/FT-1

Maria Cecília/Marina
 Amostra Ft-1
 Solicitação N. Q0131-16
 01.02.18 UFPE

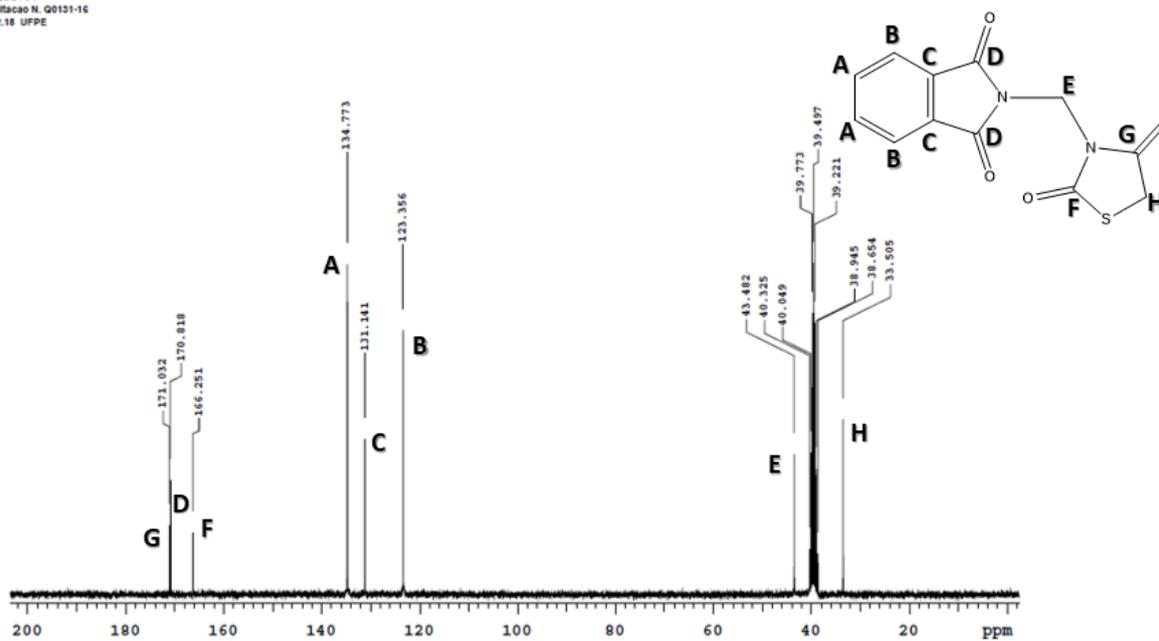
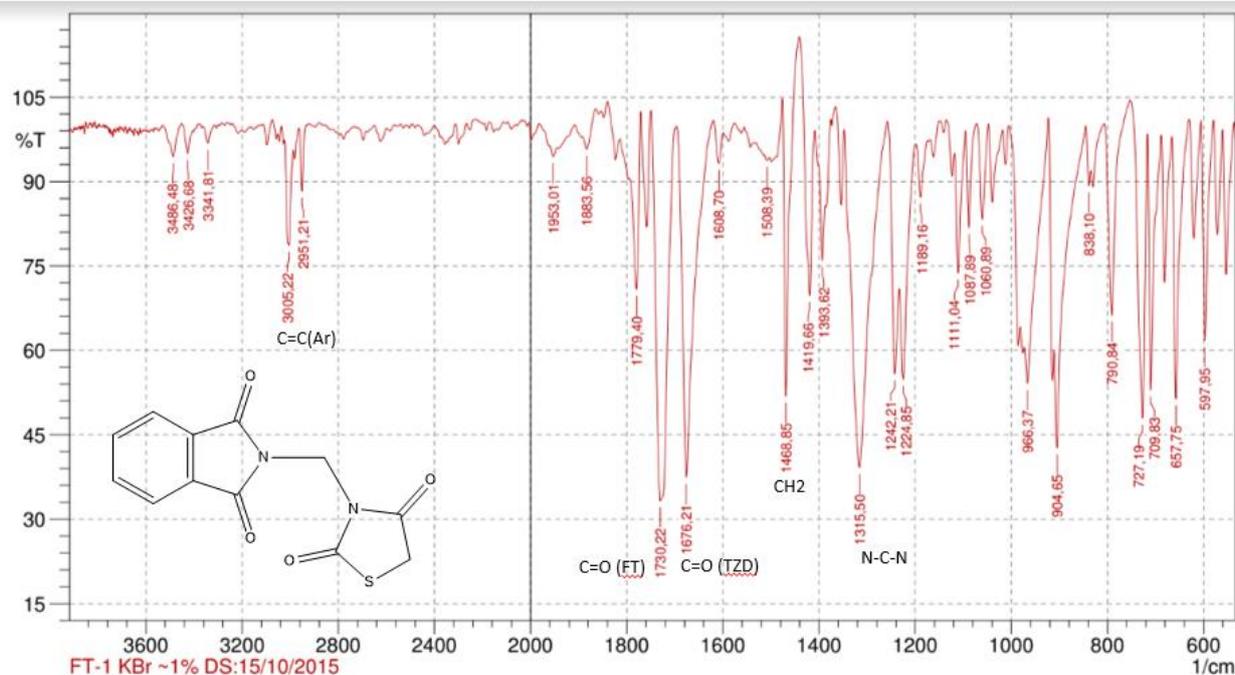
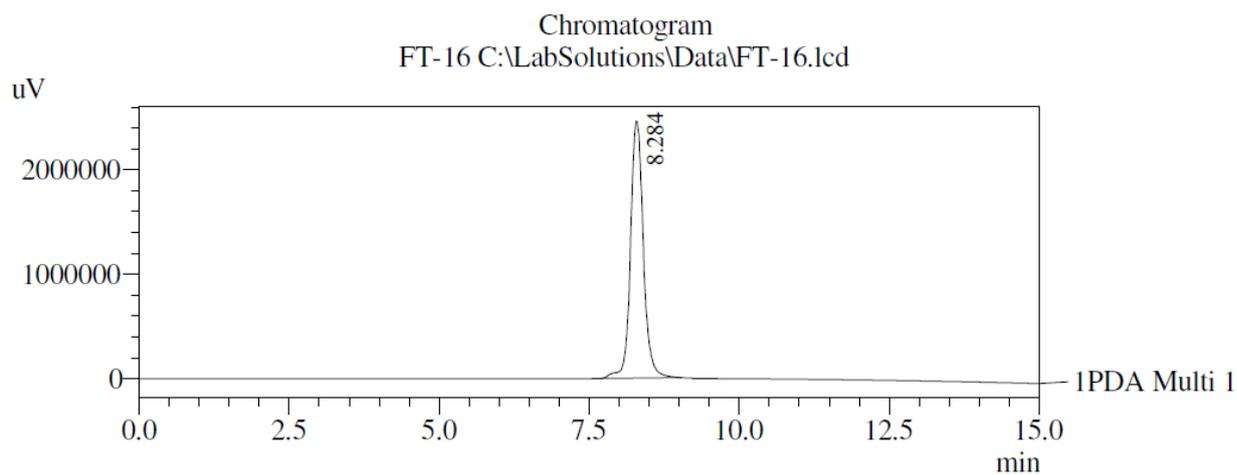


Figura 33 Espectro de IV do LPSF/FT-1



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-16)

Figura 34 Cromatograma do LPSF/FT-16



1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.284	36736846	2461811	100.000	100.000
Total		36736846	2461811	100.000	100.000

Figura 35 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-16

Comment 1 FT-16 MM: 394

Comment 2 DS: 21/10/2017

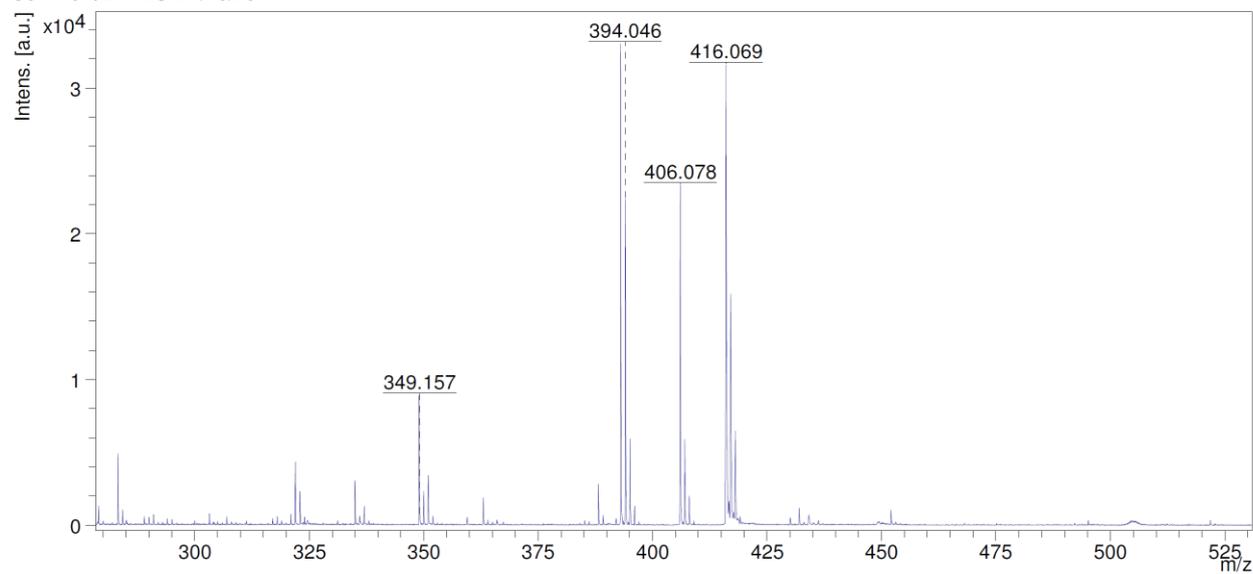


Figura 36 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-16

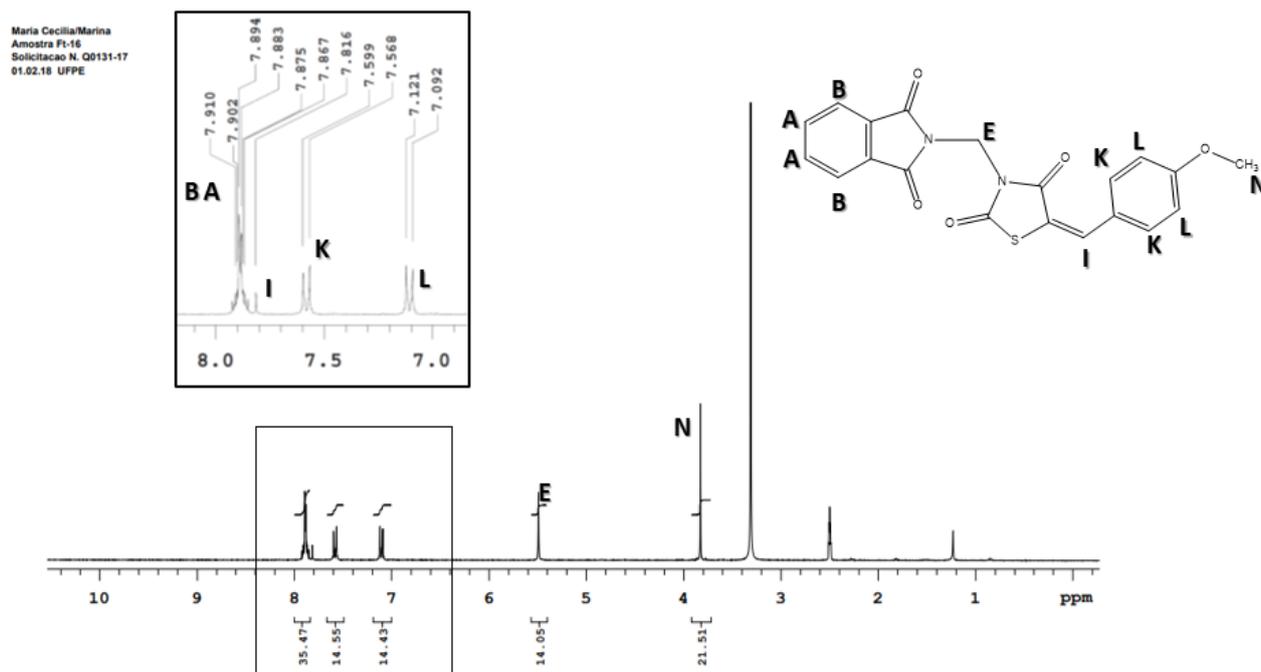


Figura 37 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-16

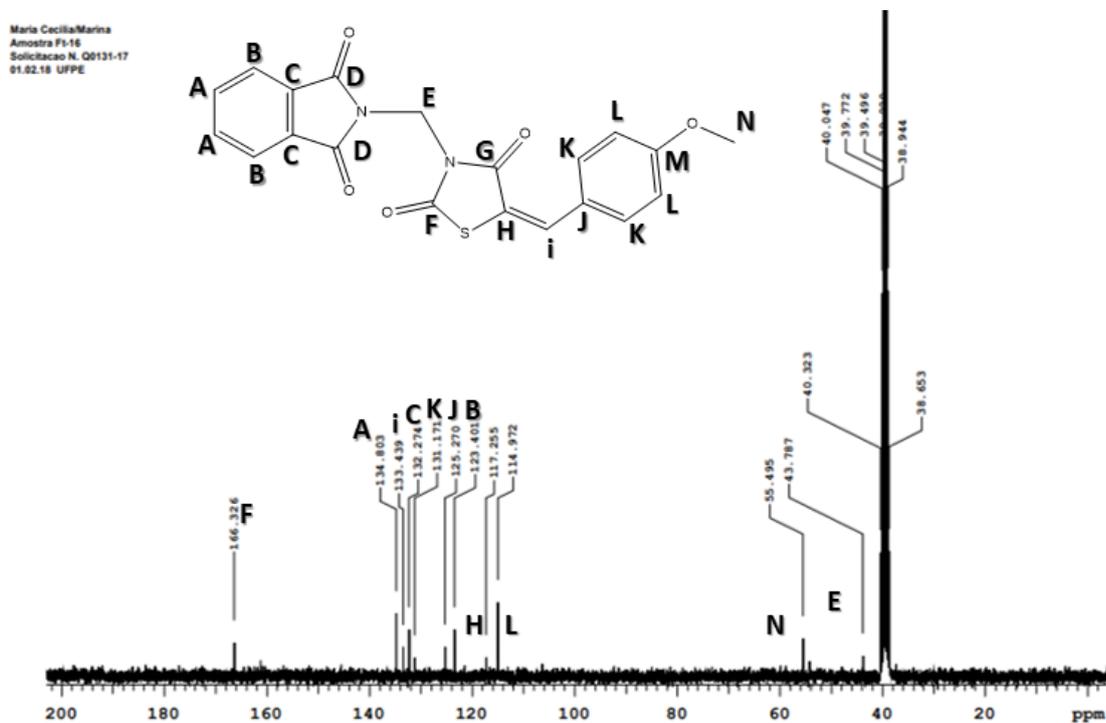
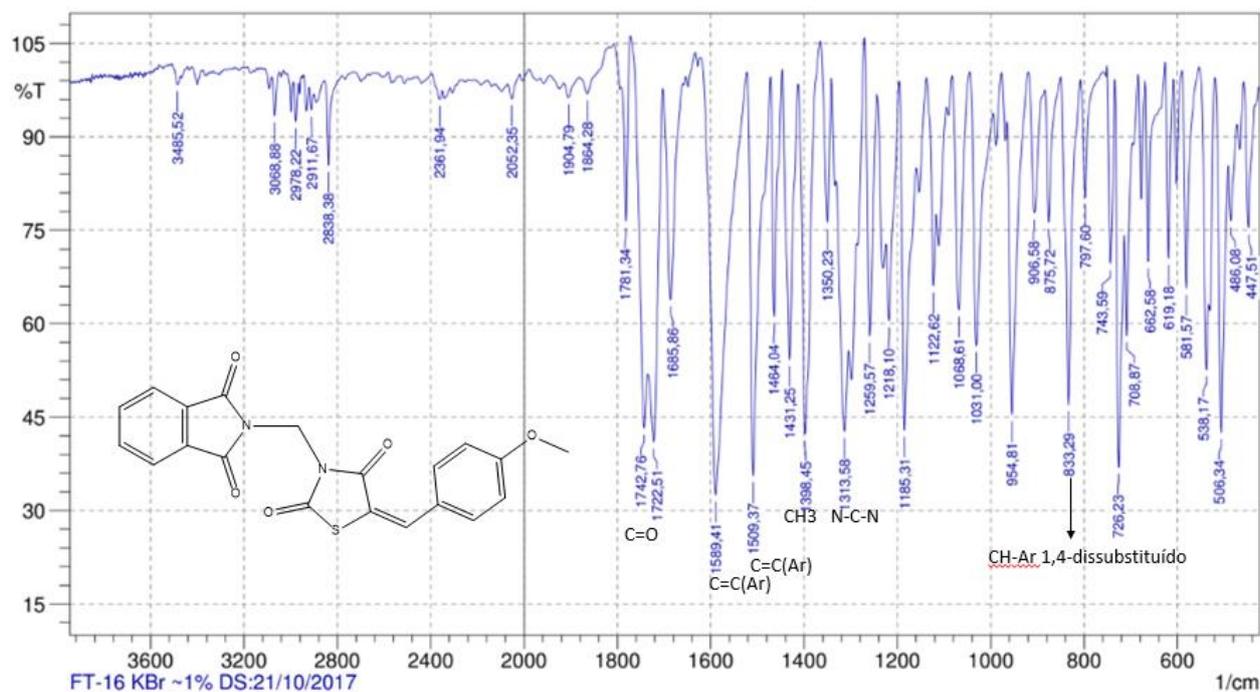
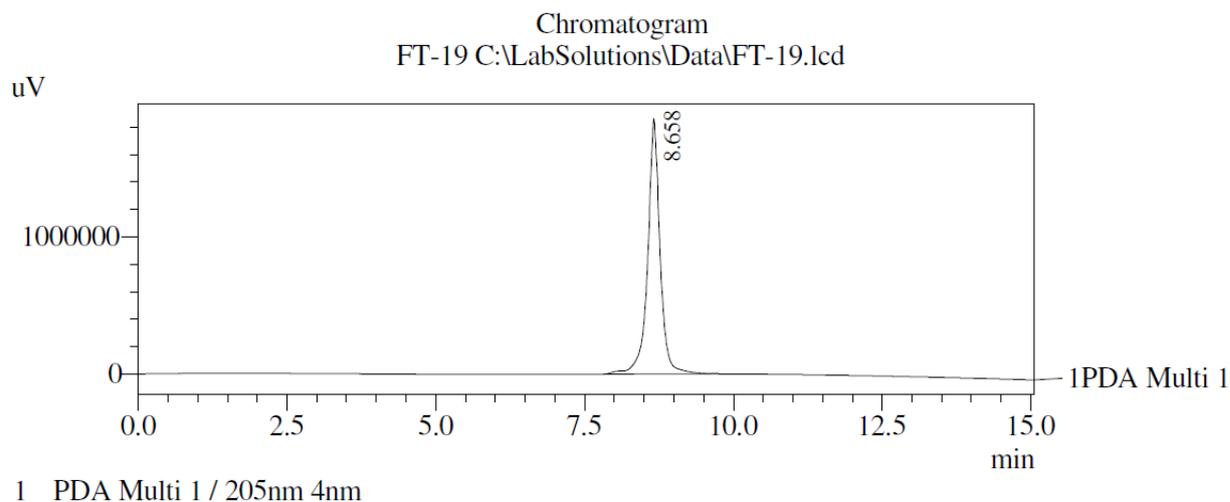


Figura 38 Espectro de IV do LPSF/FT-16



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(3-(trifluoromethoxy)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-19)

Figura 39 Cromatograma do LPSF/FT-19



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.658	26970875	1862420	100.000	100.000
Total		26970875	1862420	100.000	100.000

Figura 40 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-19

Comment 1 FT-19

Comment 2 DS: 27/03/2018

MM: 448,03 g/mol

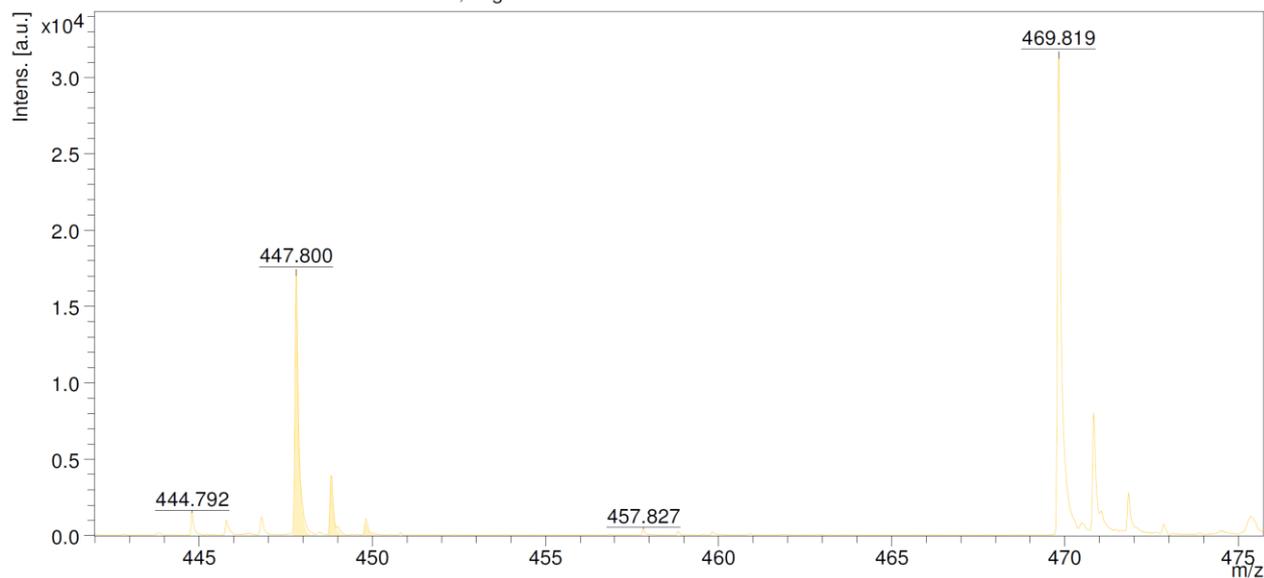


Figura 41 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-19

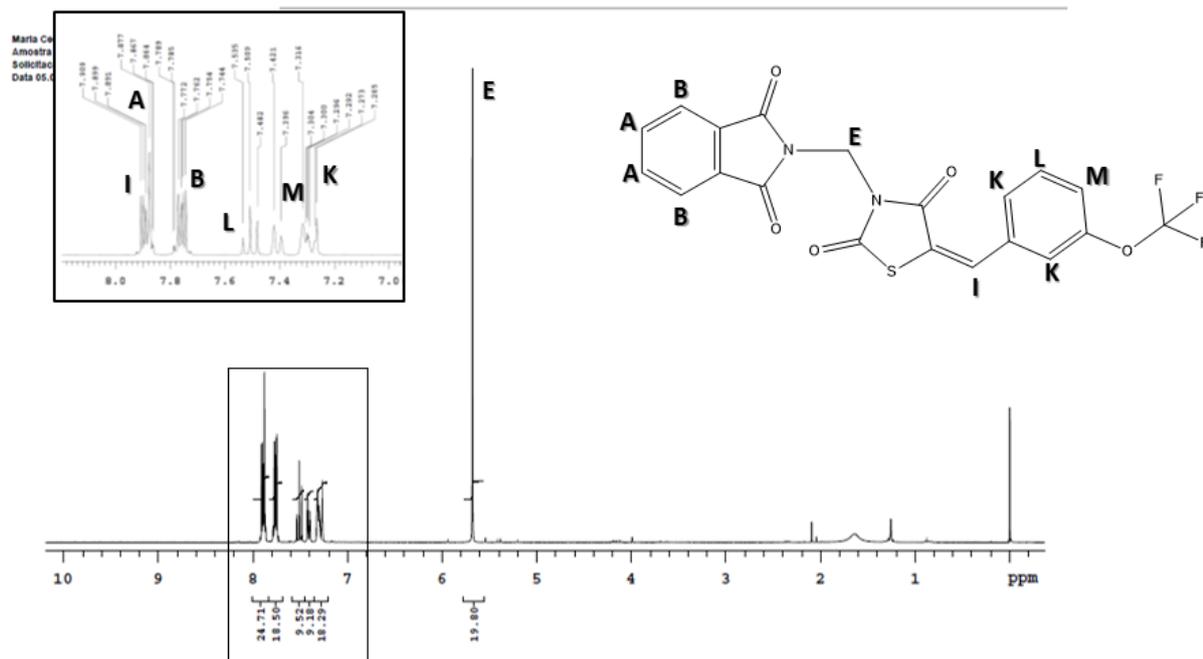


Figura 42 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-19

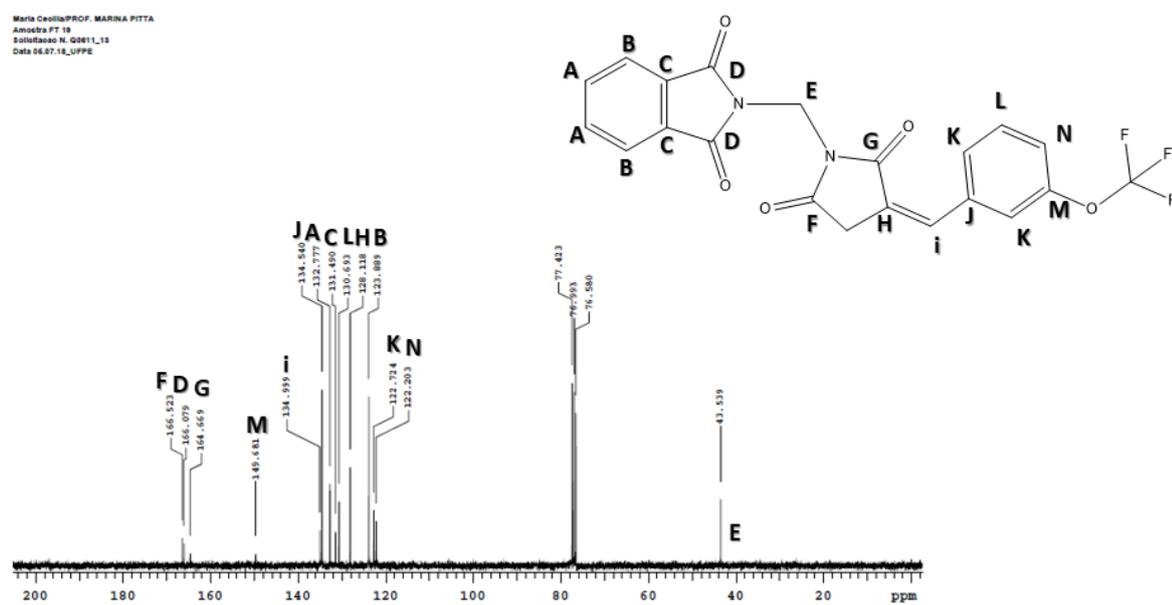
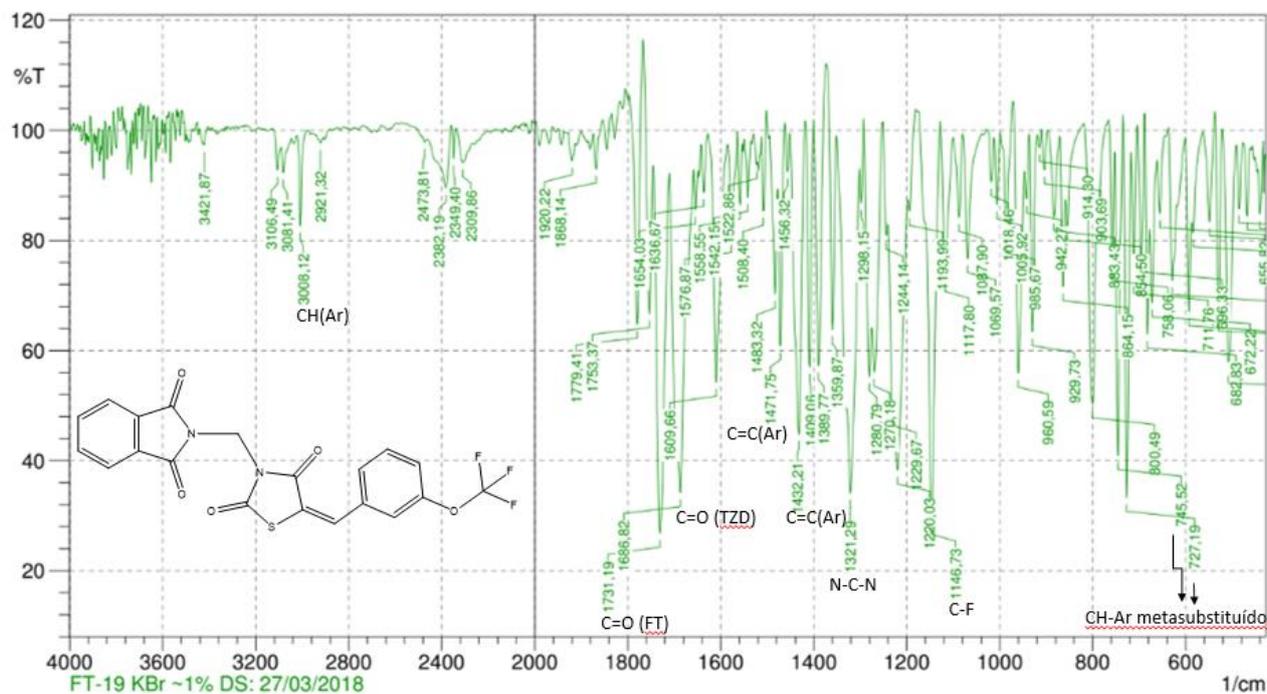
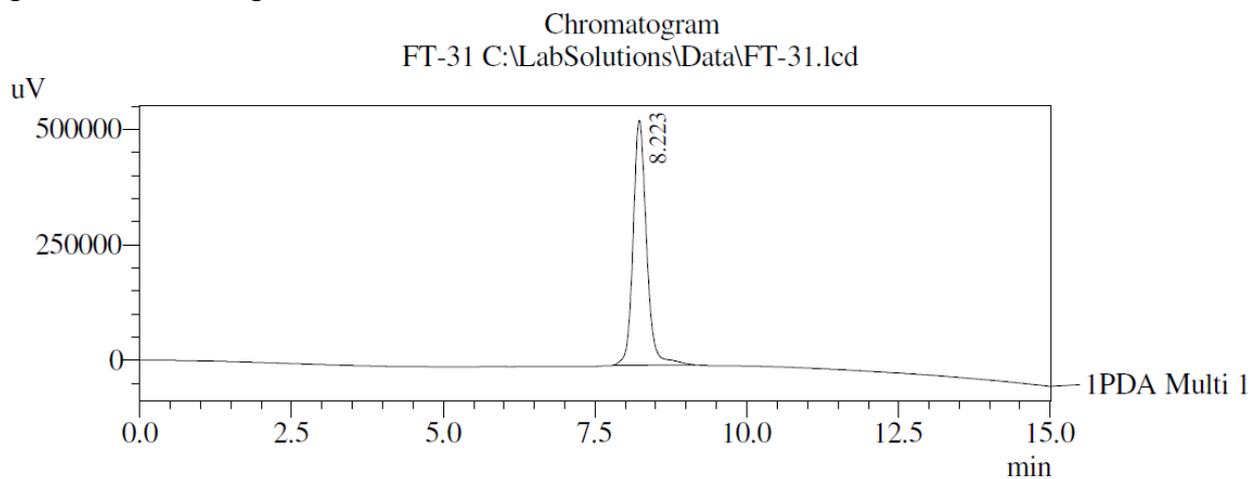


Figura 43 Espectro de IV do LPSF/FT-19



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-fluorobenzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-31)

Figura 44 Cromatograma do LPSF/FT-31



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.223	8215788	530588	100.000	100.000
Total		8215788	530588	100.000	100.000

Figura 45 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-31

Comment 1 FT - 31

Comment 2 MM: 382 DS: 22/11/2017

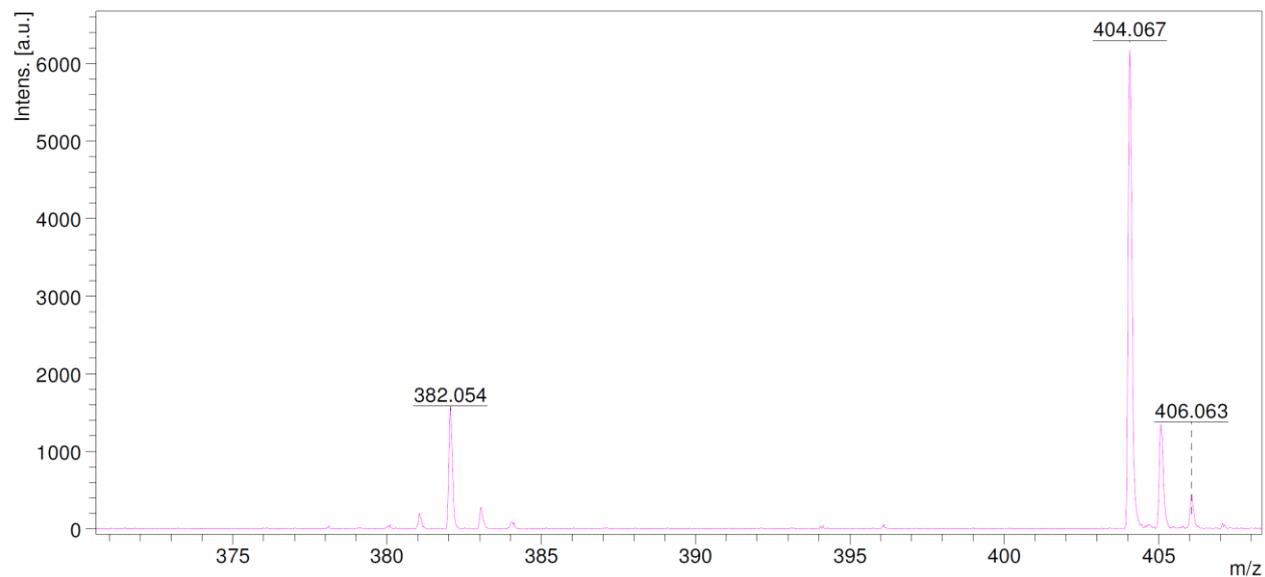


Figura 46 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-31

Maria Cecília Marina Pitta
 Amostra FT-31
 Solicitação P1204-6
 05.12.2017 UFPE

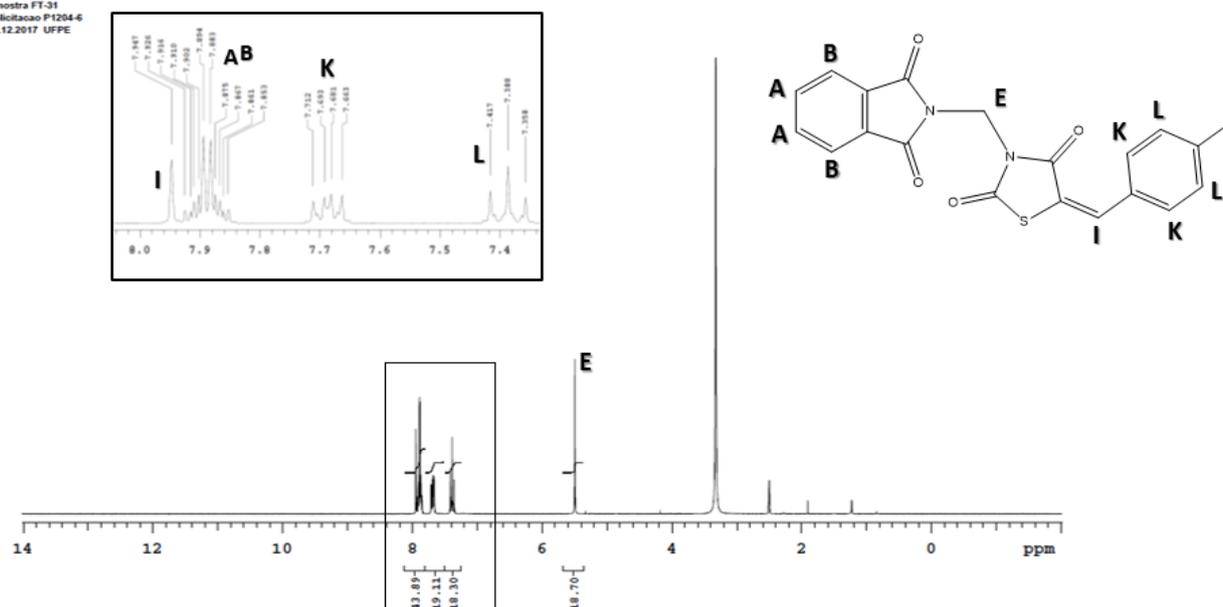


Figura 47 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-31

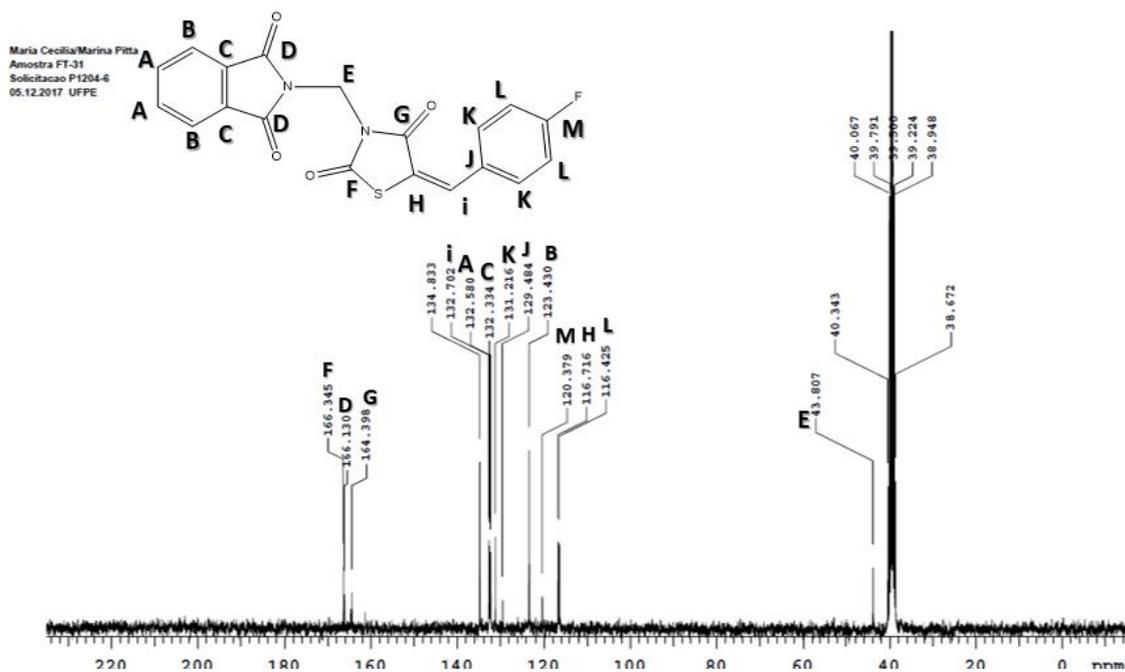
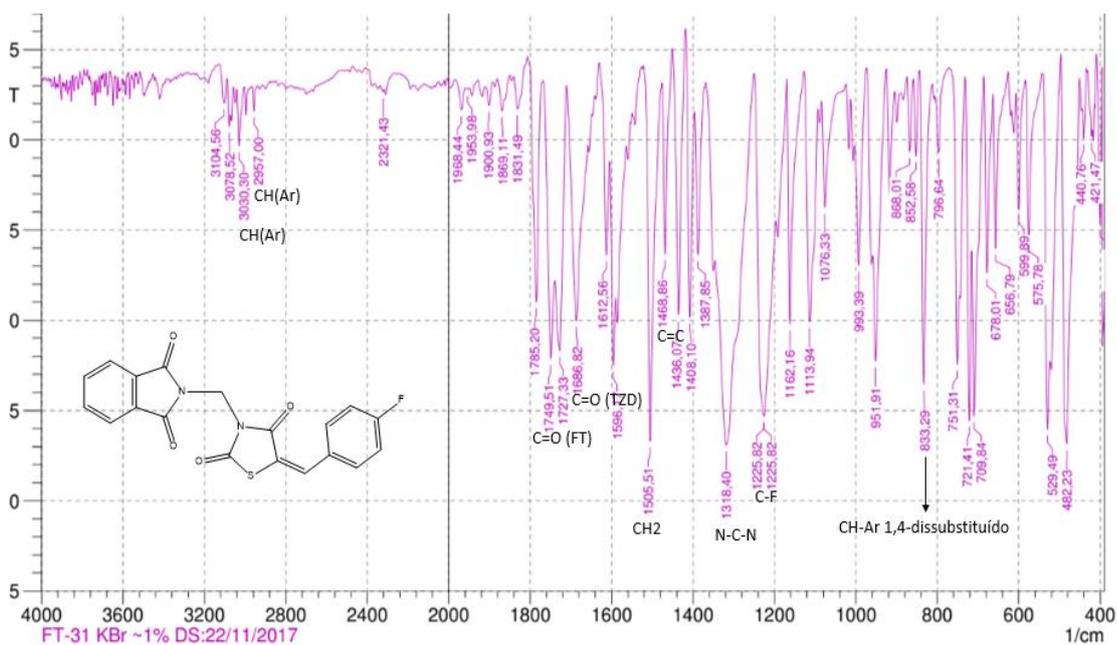
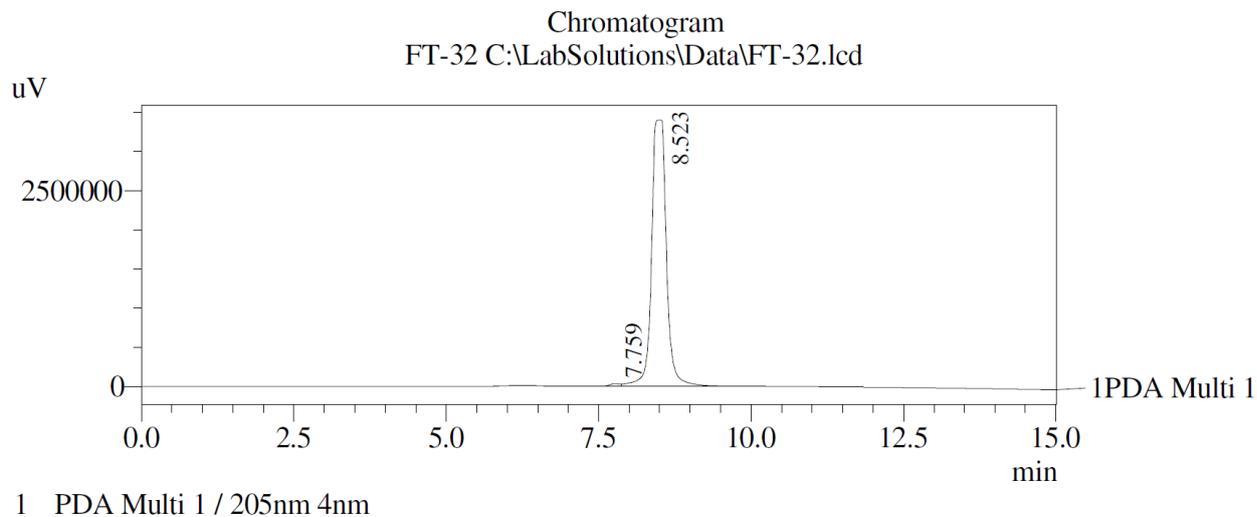


Figura 43 Espectro de IV do LPSF/FT-31



5-(2,6-dichlorobenzylidene)-3-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione
(LPSF/FT-32)

Figura 48 Cromatograma do LPSF/FT-32



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.759	381036	32863	0.663	0.958
2	8.523	57084734	3398097	99.337	99.042
Total		57465770	3430960	100.000	100.000

Figura 49 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-32

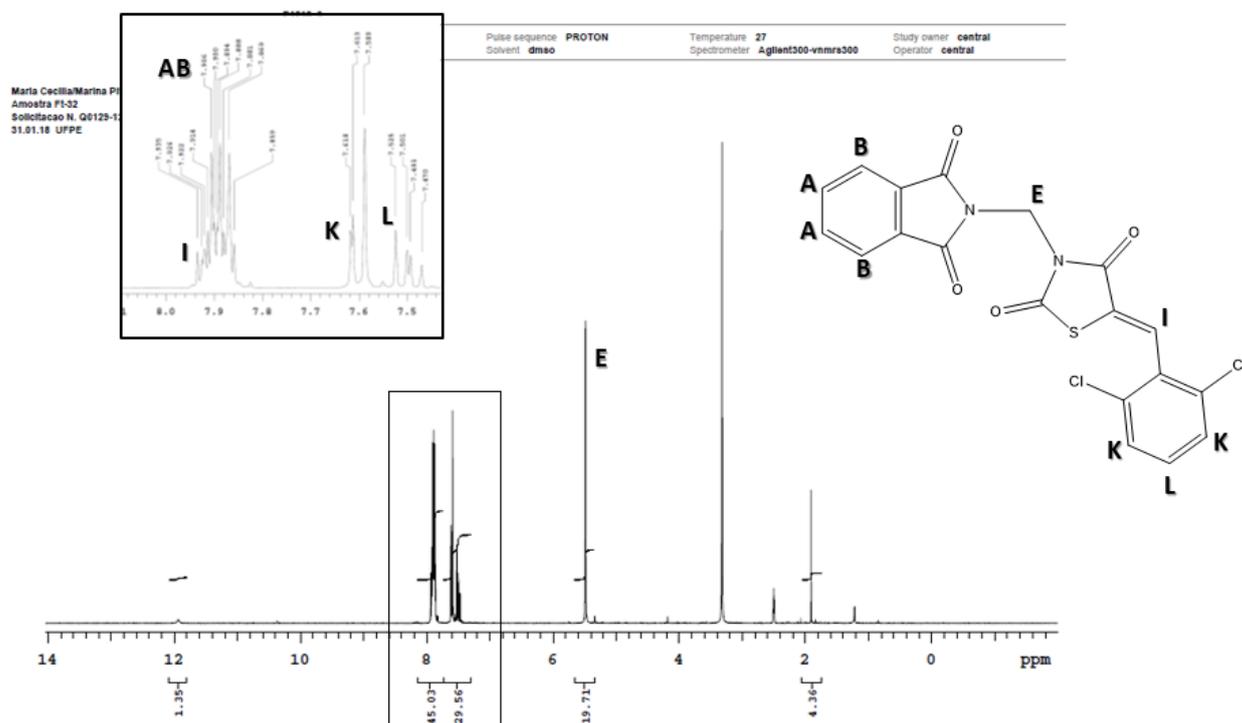


Figura 50 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-32

Maria Cecília Marina Piza
 Amostra FT-32
 Solução N. 00125-12
 31.01.16 UFPE

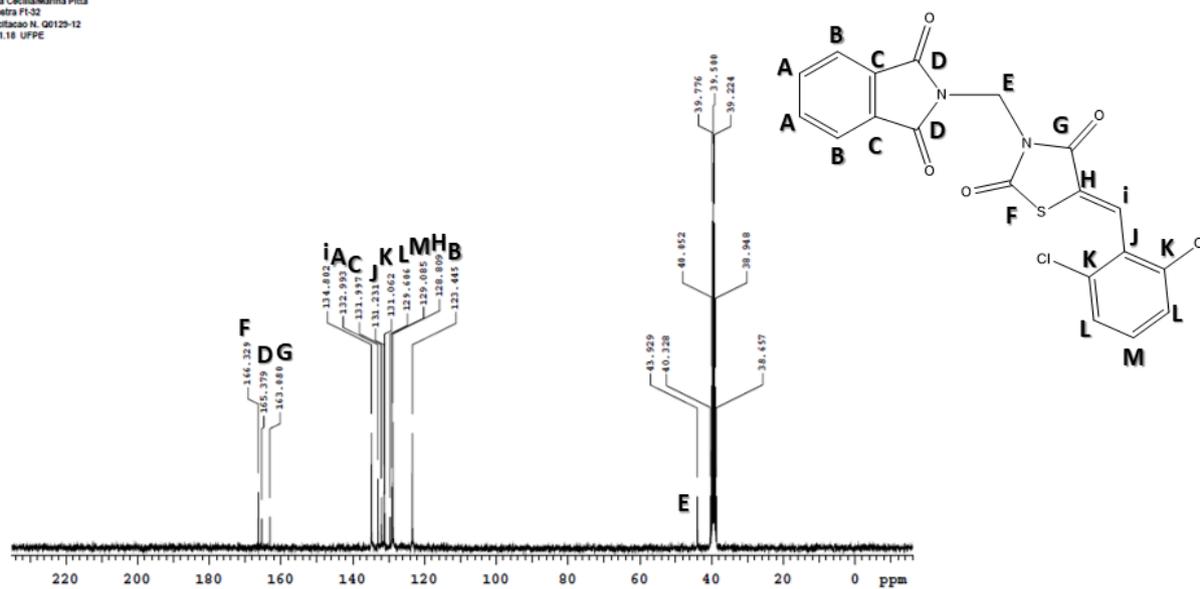
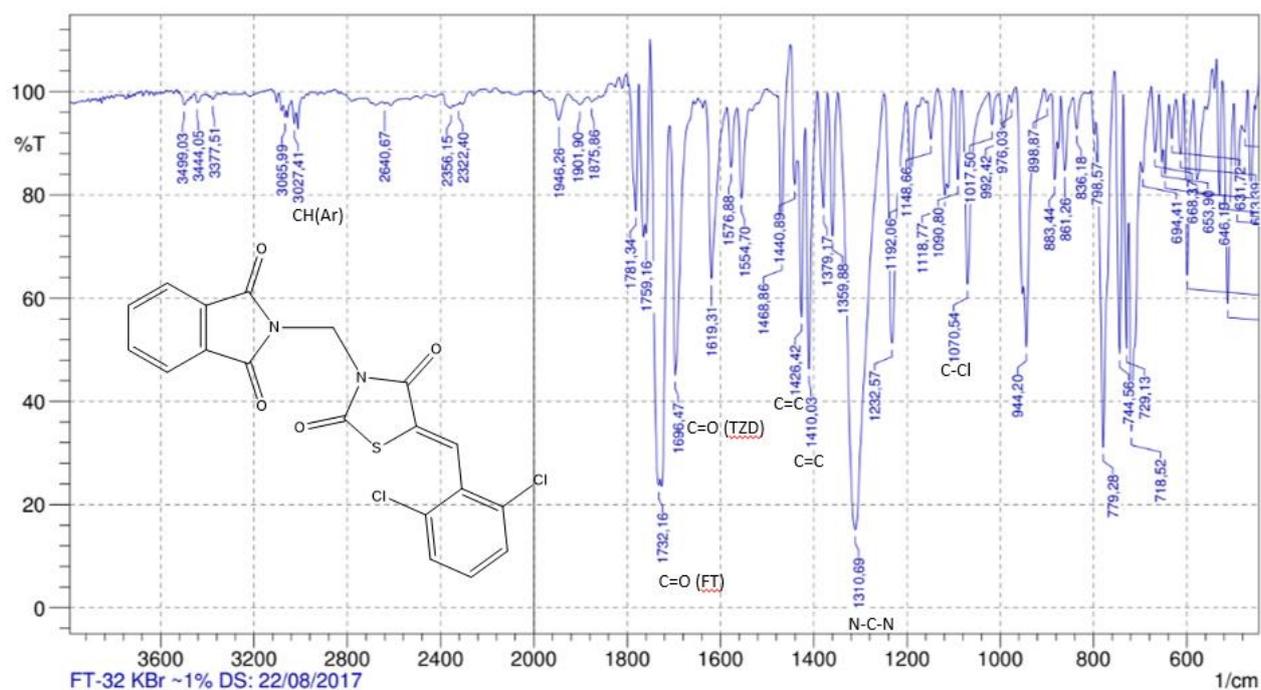
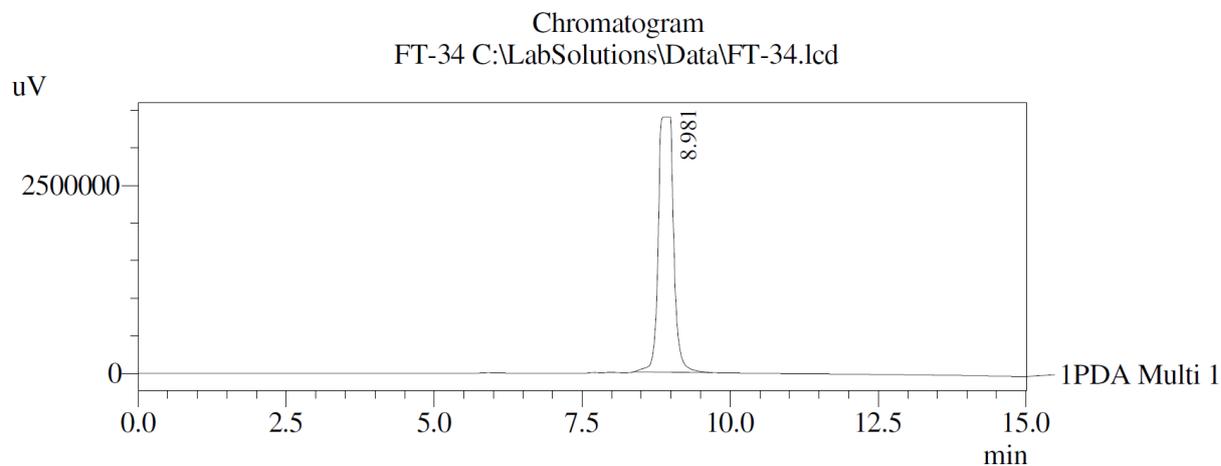


Figura 51 Espectro de IV do LPSF/FT-32



5-(3,4-dichlorobenzylidene)-3-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione
(LPSF/FT-34)

Figura 52 Cromatograma do LPSF/FT-34



1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.981	60561587	3394606	100.000	100.000
Total		60561587	3394606	100.000	100.000

Figura 53 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-34

Comment 1 FT-34

Comment 2 DS: 11/01/2018 MM: 431, 97 g/mol

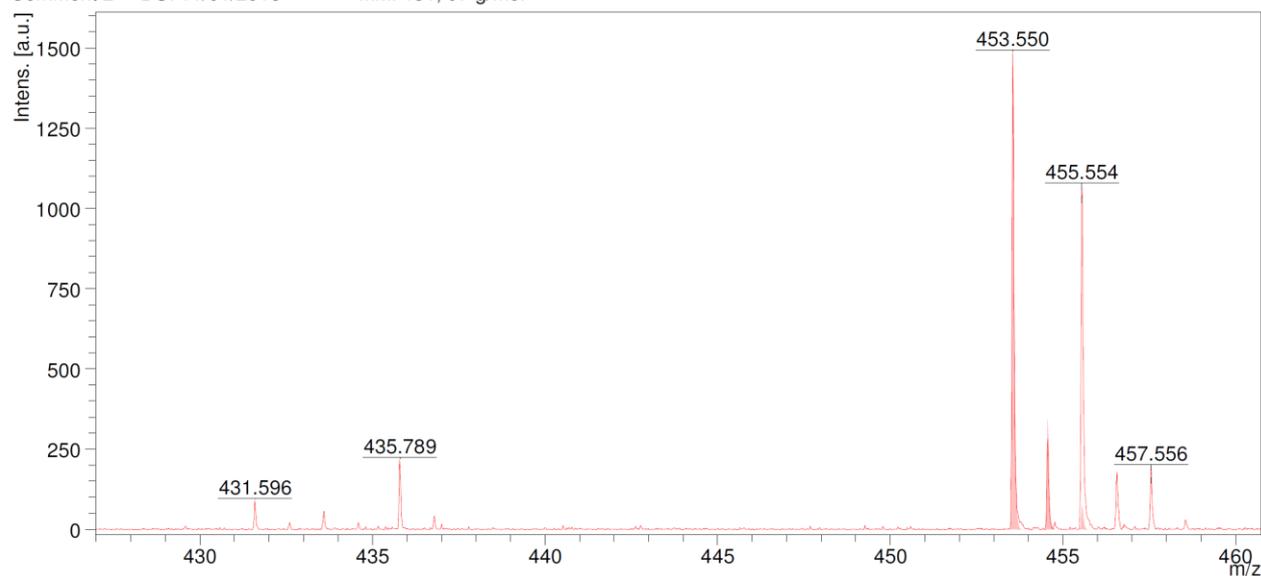


Figura 54 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-34

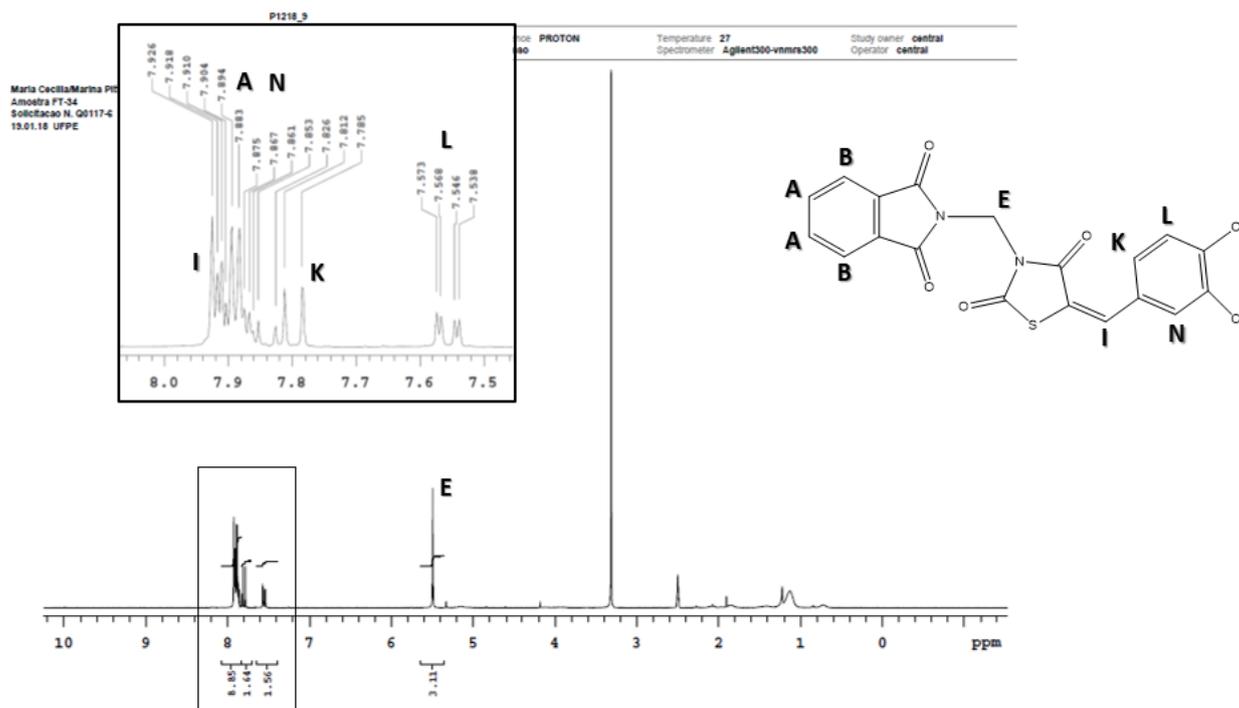


Figura 55 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-34

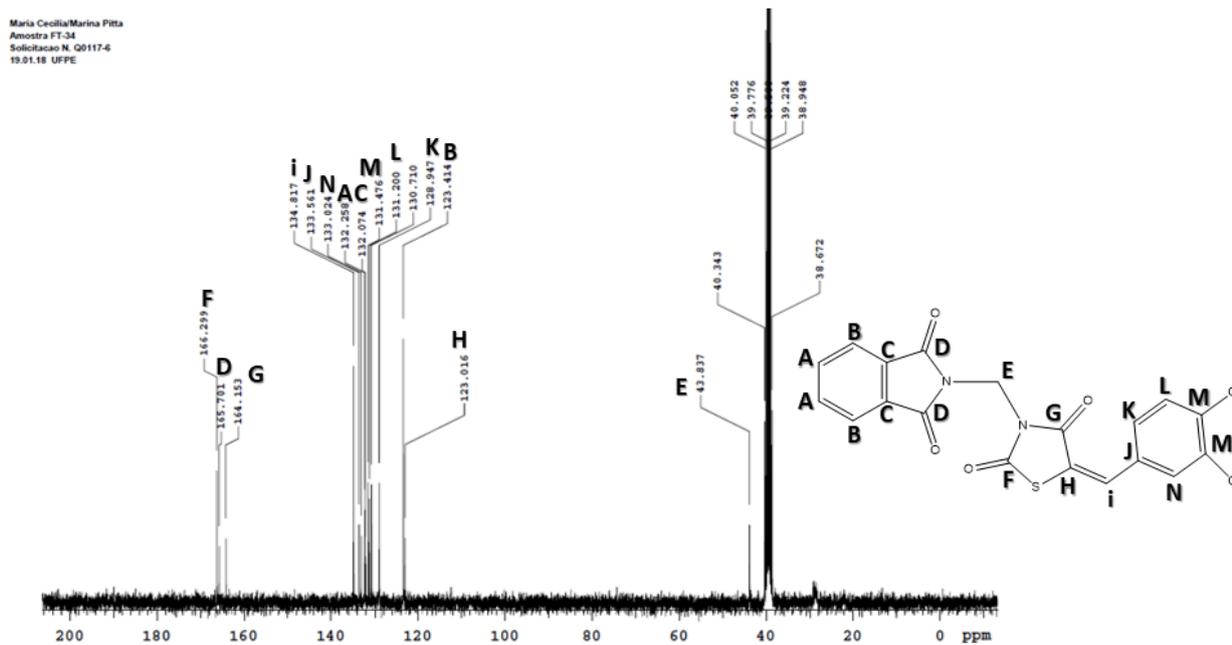
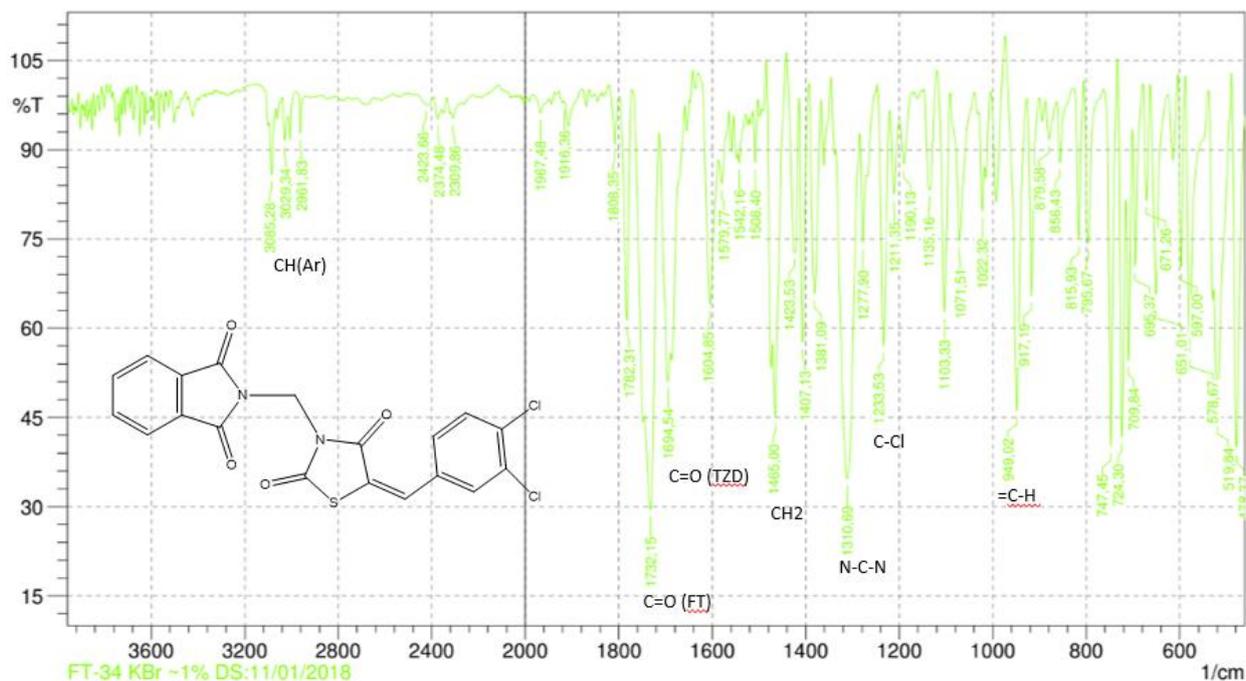
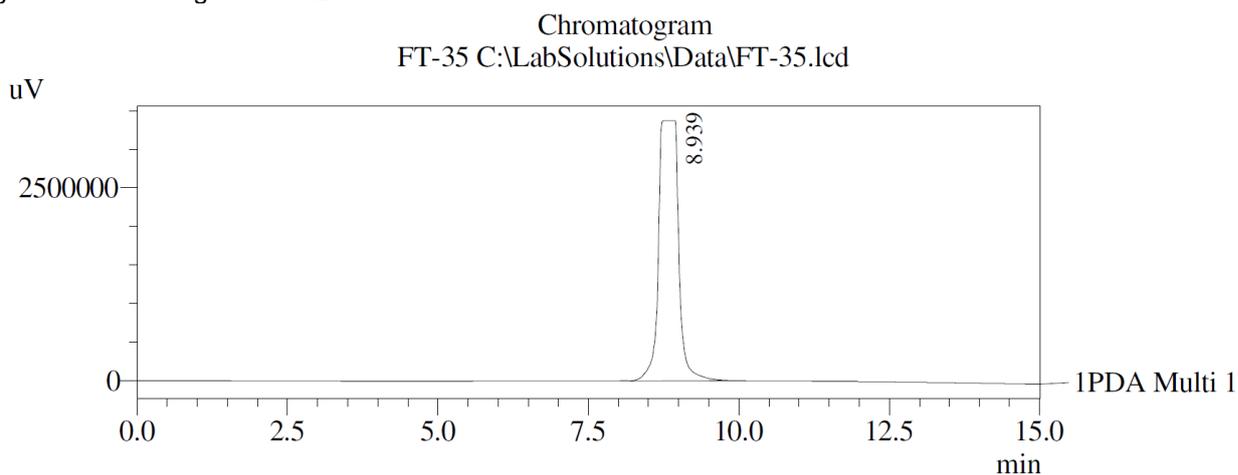


Figura 56 Espectro de IV do LPSF/FT-34



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-(trifluoromethyl)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-35)

Figura 57 Cromatograma do LPSF/FT-35



1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.939	77707349	3373881	100.000	100.000
Total		77707349	3373881	100.000	100.000

Figura 58 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-35

Comment 1 FT-35

Comment 2 PM: 432,04 g/mol DS:26/04/2018

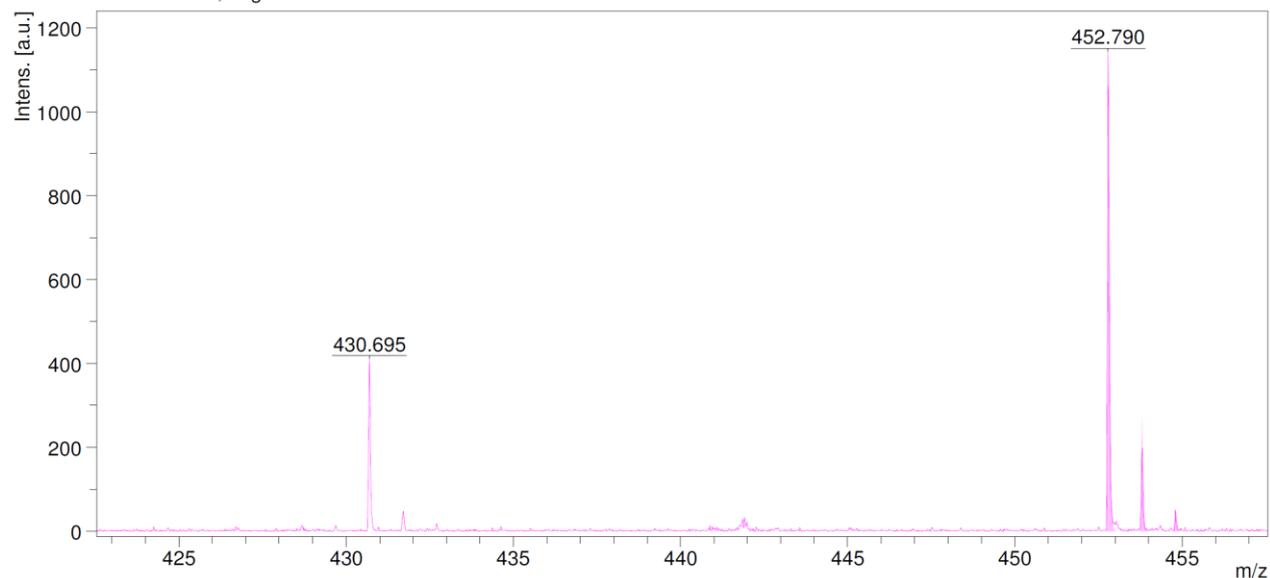


Figura 59 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-35

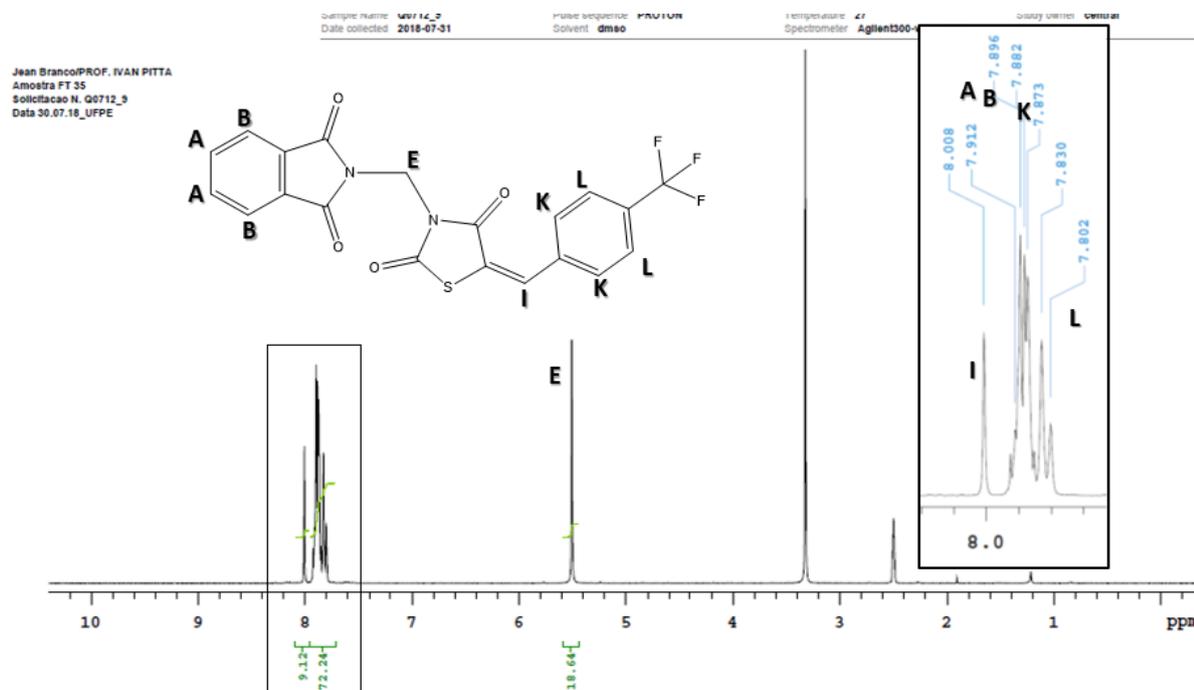


Figura 60 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-35

Jean Branco/PROF. IVAN PITTA
 Química FT-35
 Solicitação N. Q8712_3
 Data 06.07.18_UFPE

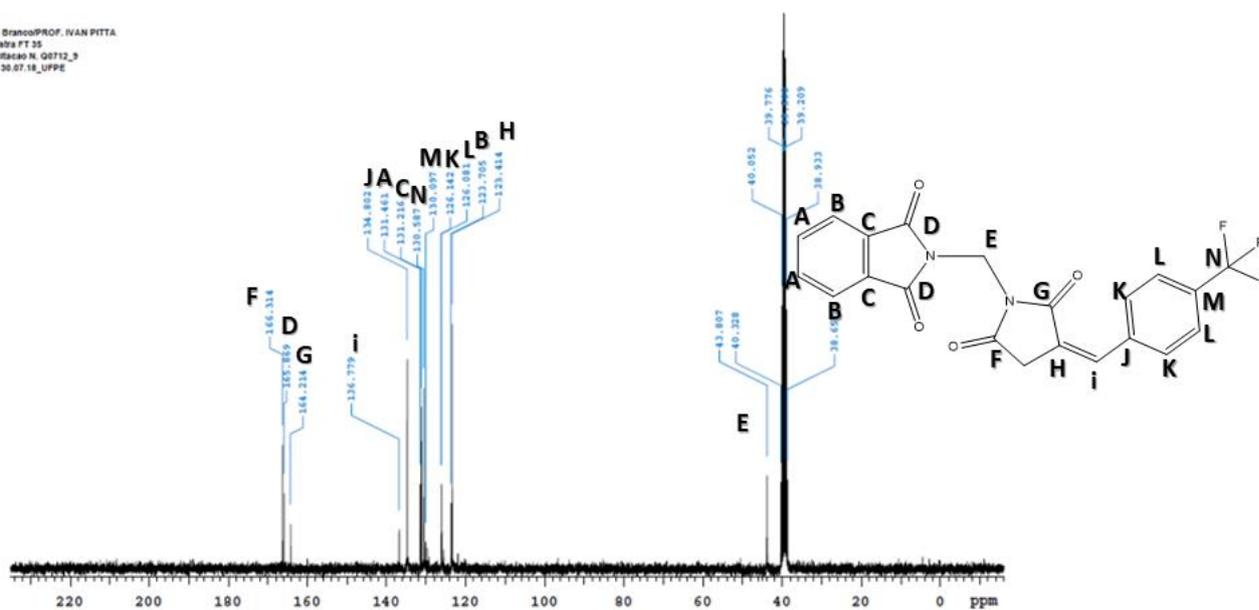
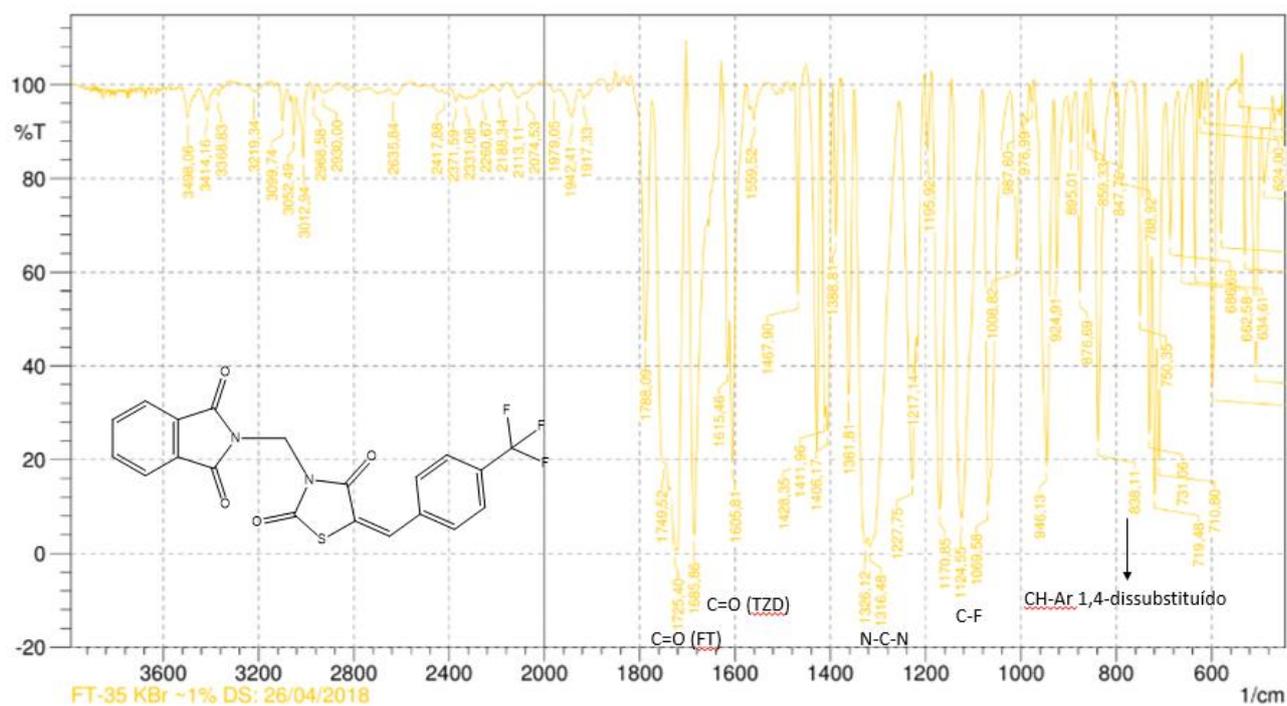
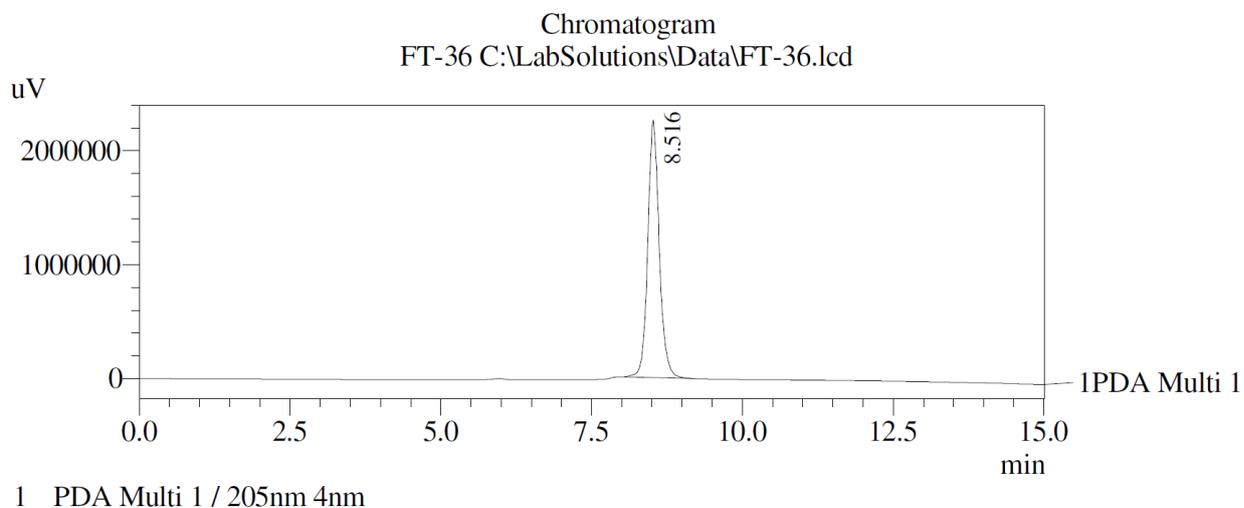


Figura 61 Espectro de IV do LPSF/FT-35



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-methylbenzylidene)thiazolidine-2,4-dione
(LPSF/FT-36)

Figura 62 Cromatograma do LPSF/FT-36



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.516	29834909	2262490	100.000	100.000
Total		29834909	2262490	100.000	100.000

Figura 63 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-36

Comment 1 FT-36

Comment 2 MM: 378 DS:23/10/2017

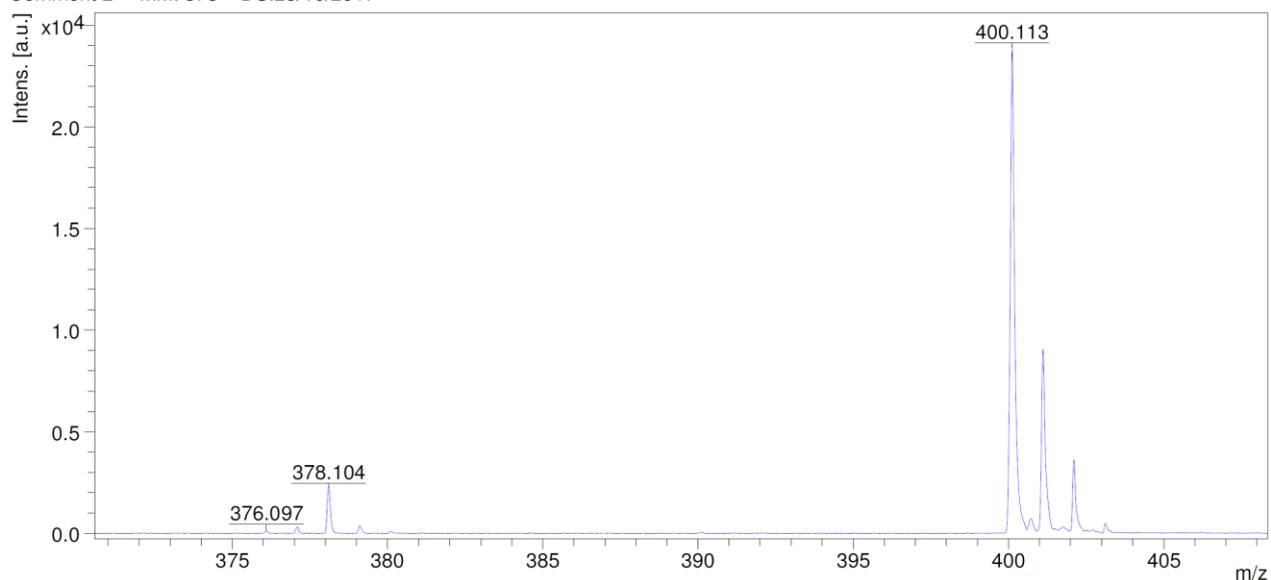
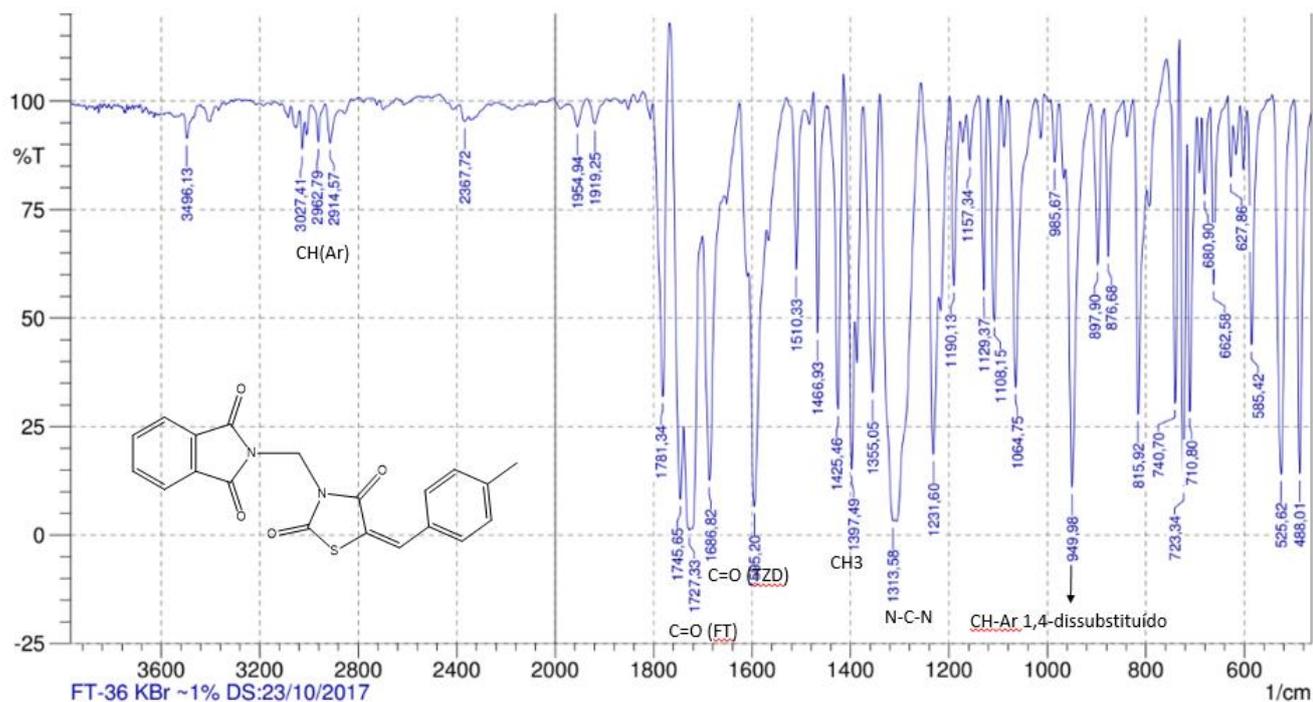
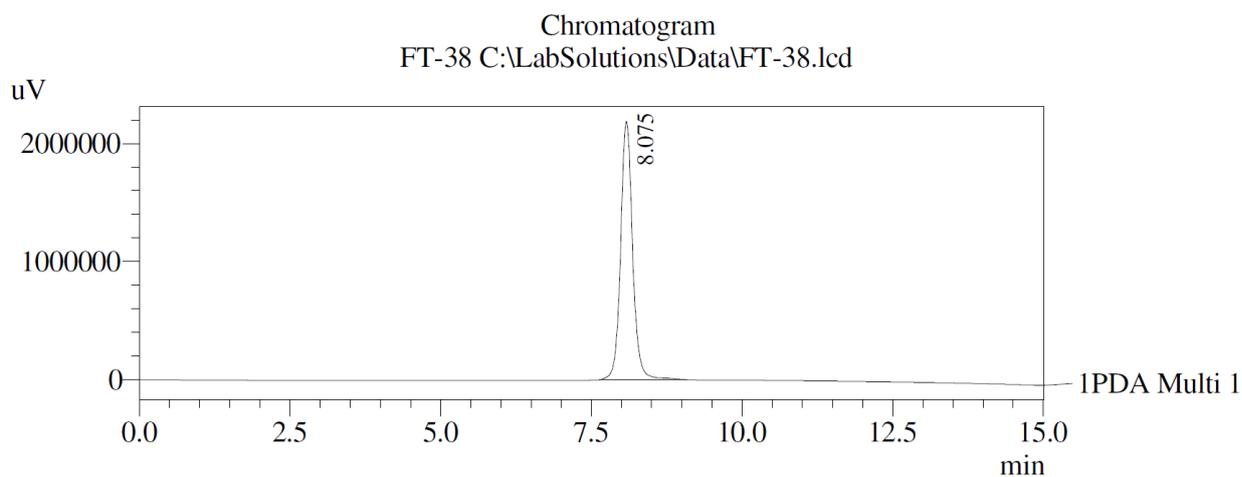


Figura 66 Espectro de IV do LPSF/FT-36



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(3-nitrobenzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-38)

Figura 67 Cromatograma do LPSF/FT-38



1 IPDA Multi 1 / 205nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.075	30372867	2189575	100.000	100.000
Total		30372867	2189575	100.000	100.000

Figura 68 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-38

Comment 1 FT-38

Comment 2 DS: 16/01/2018 MM: 409, 09 g/mol

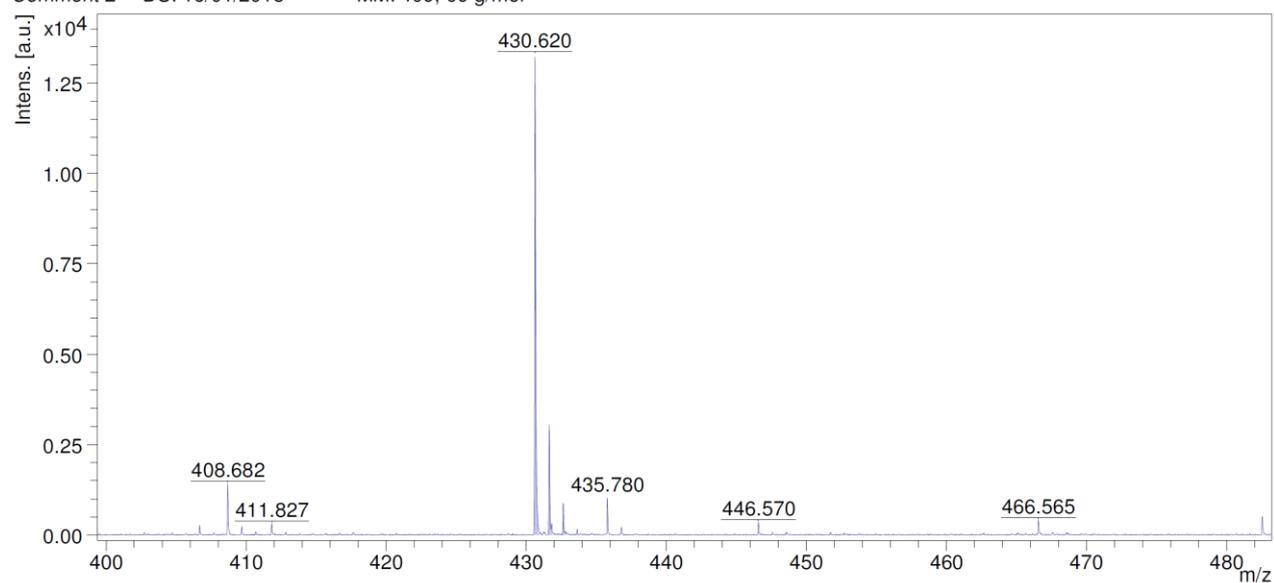


Figura 69 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-38

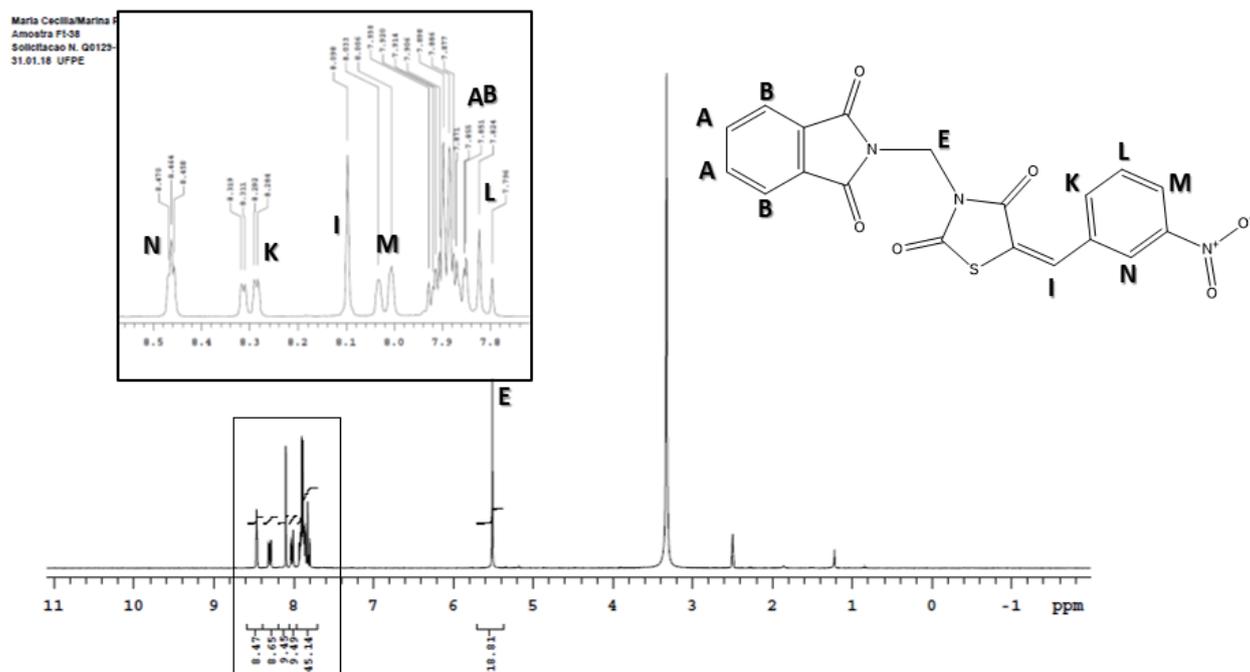


Figura 70 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-38

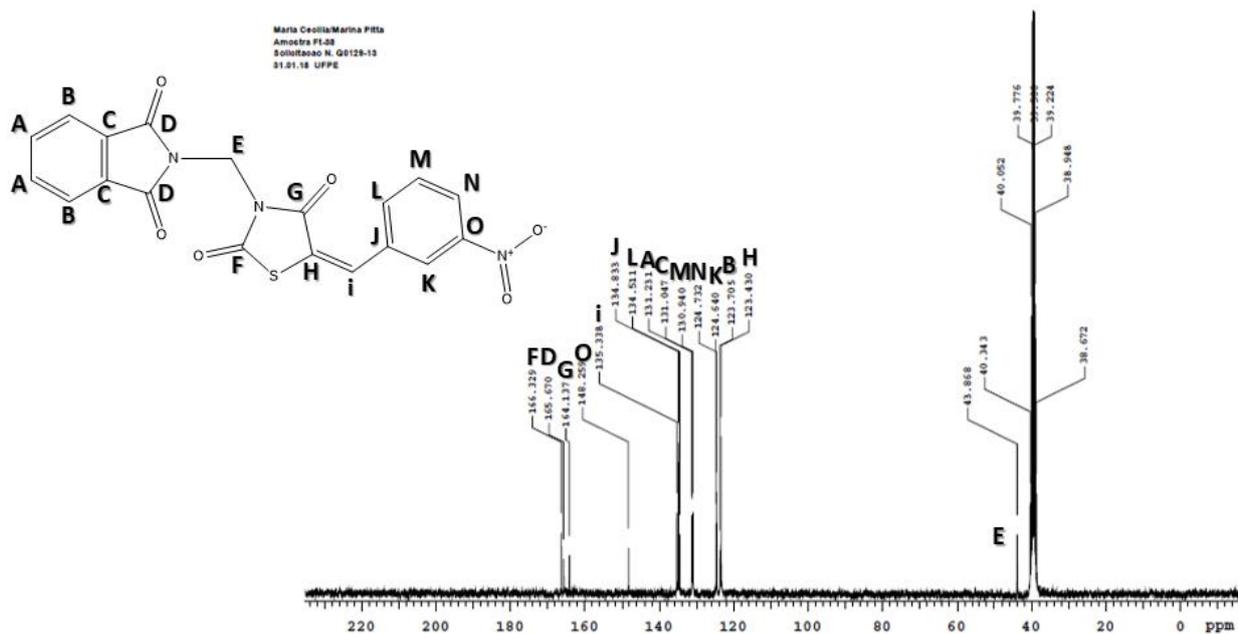
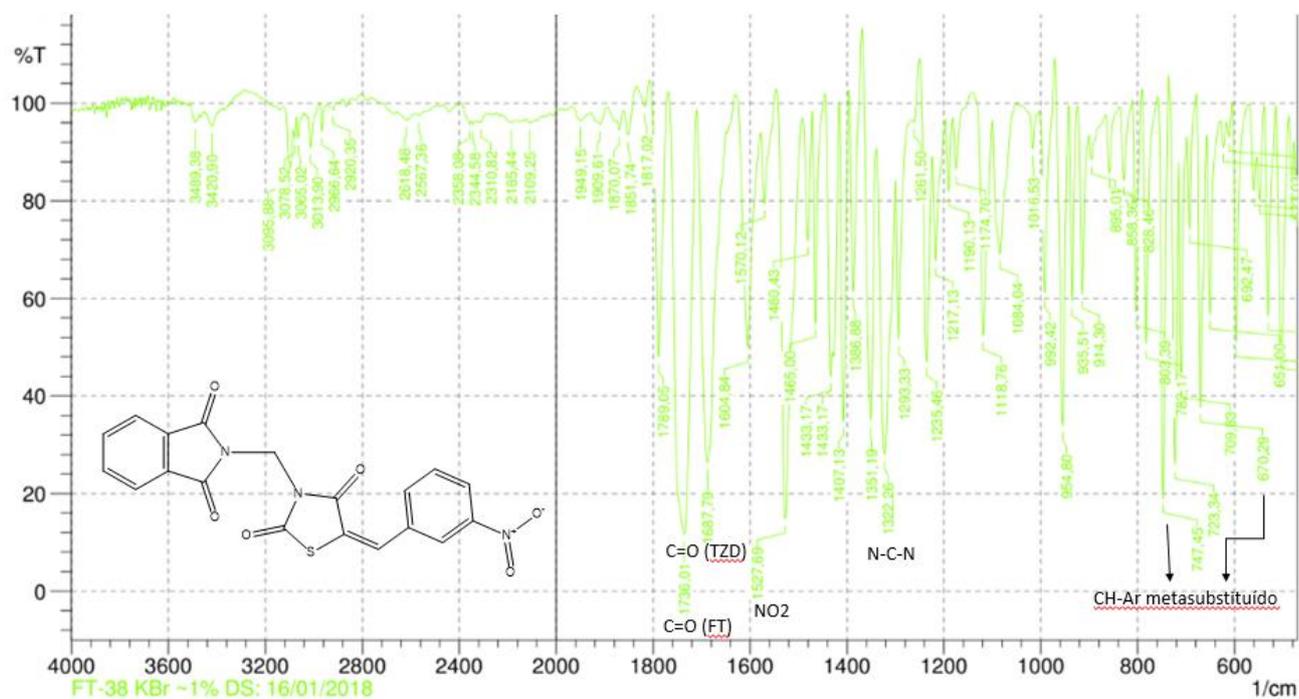
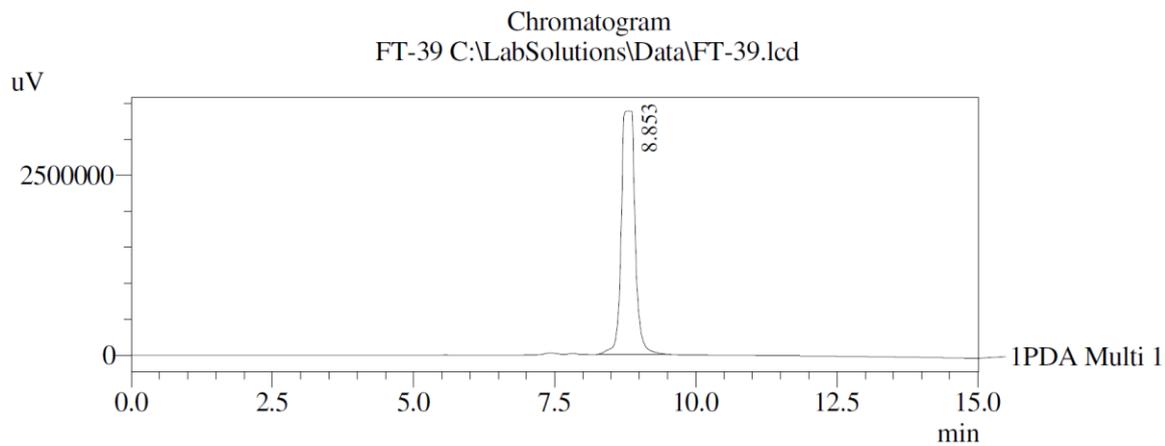


Figura 71 Espectro de IV do LPSF/FT-38



5-(5-bromo-2-methoxybenzylidene)-3-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)methyl)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-39)

Figura 72 Cromatograma do LPSF/FT-39



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.853	57616084	3382915	100.000	100.000
Total		57616084	3382915	100.000	100.000

Figura 73 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-39

Comment 1 FT-39

Comment 2 DS: 29/01/2018

MM:471.97 g/mol

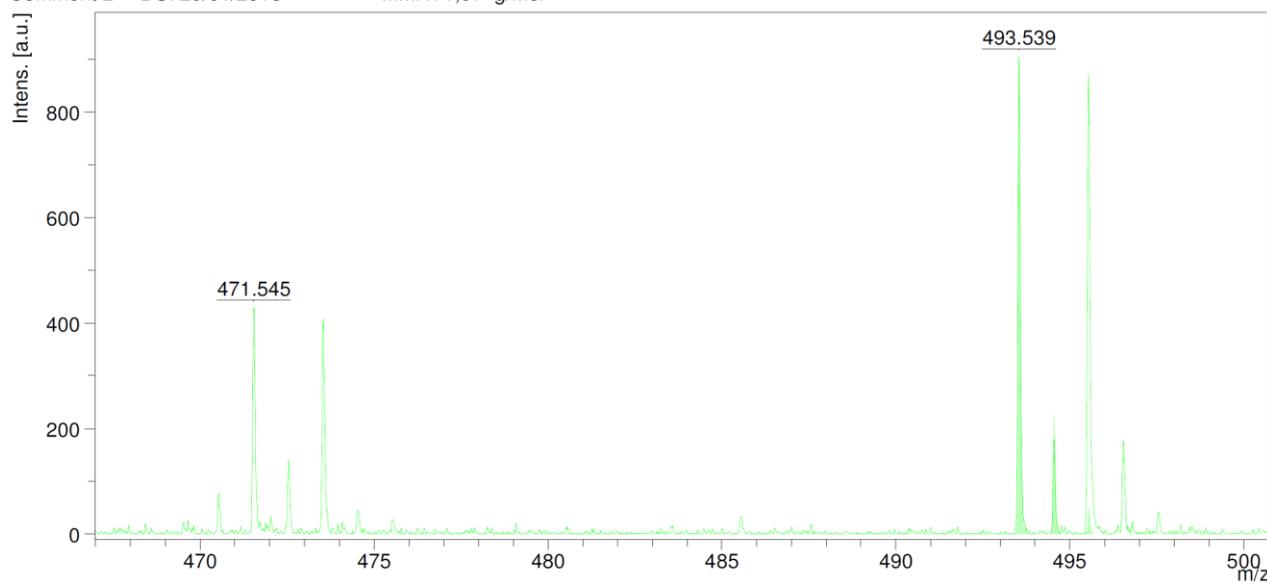


Figura 74 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-39

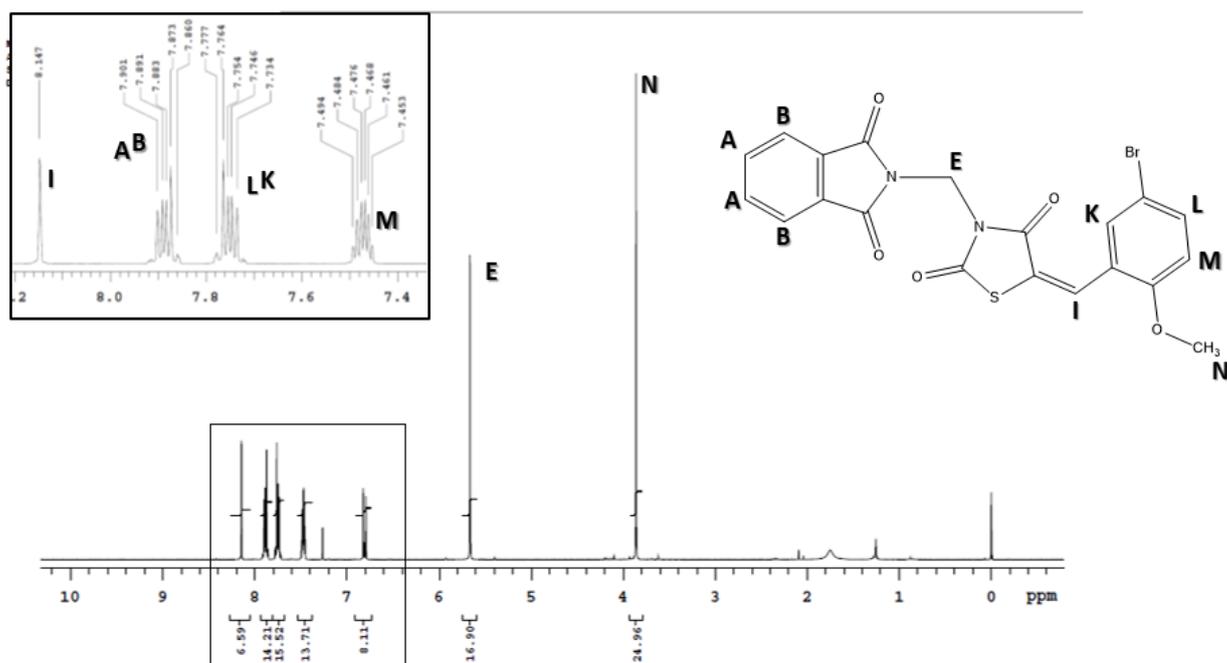


Figura 75 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-39

Marle Ceolha/PROF. MARINA PITTA
 Amostra FT 39
 Solvente N₂O
 Data 06.07.18_UFPE

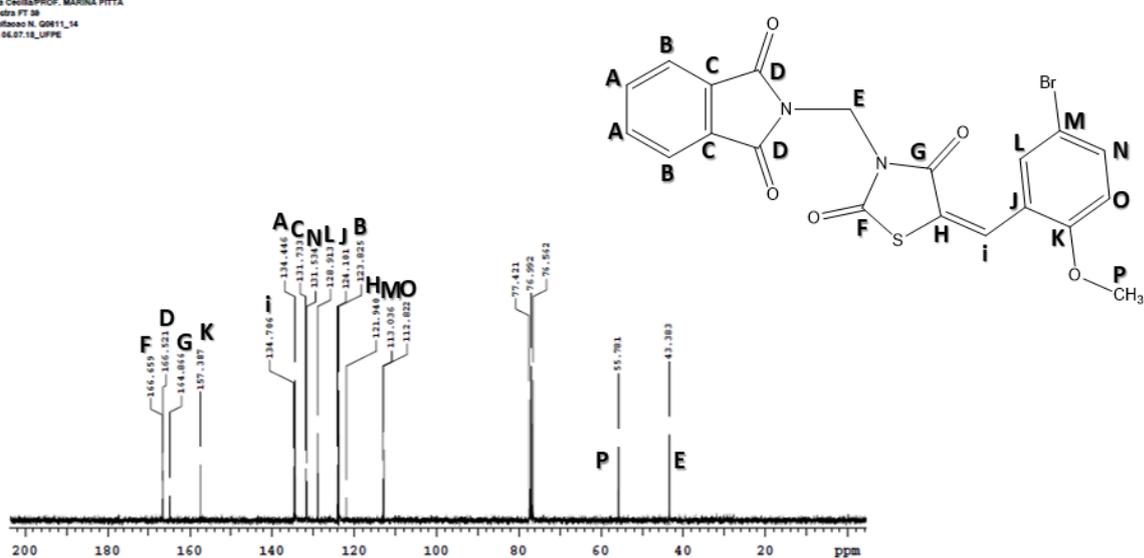
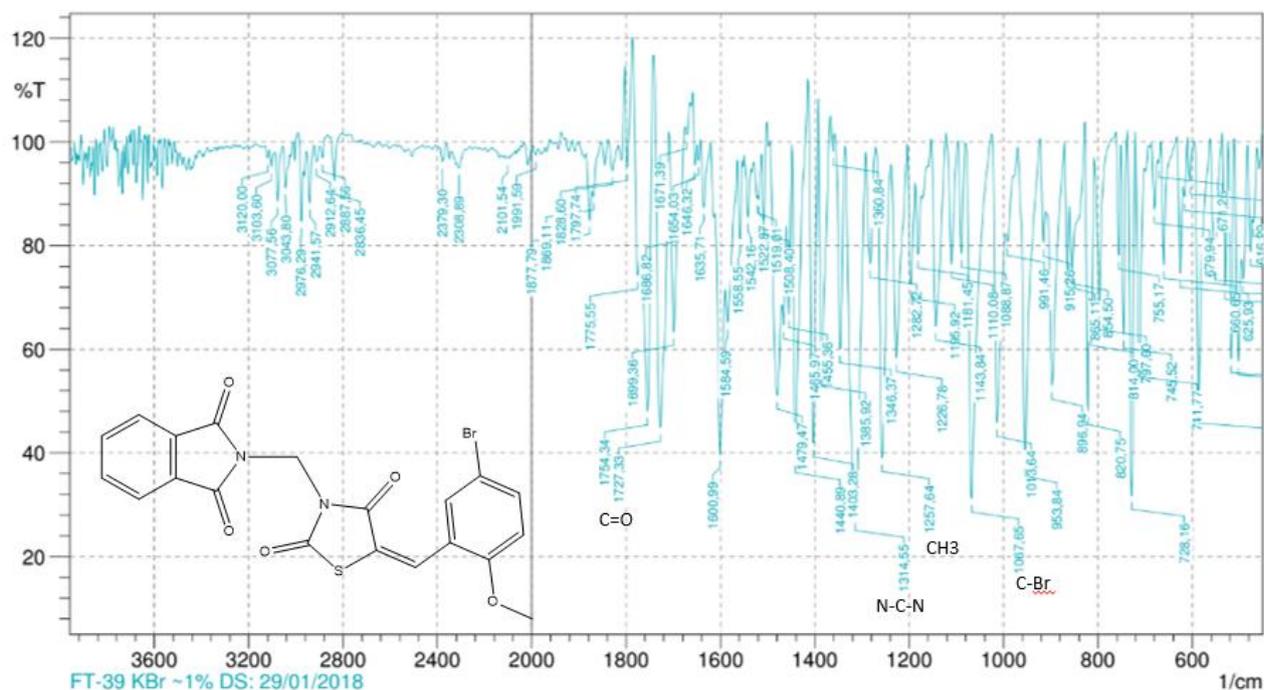
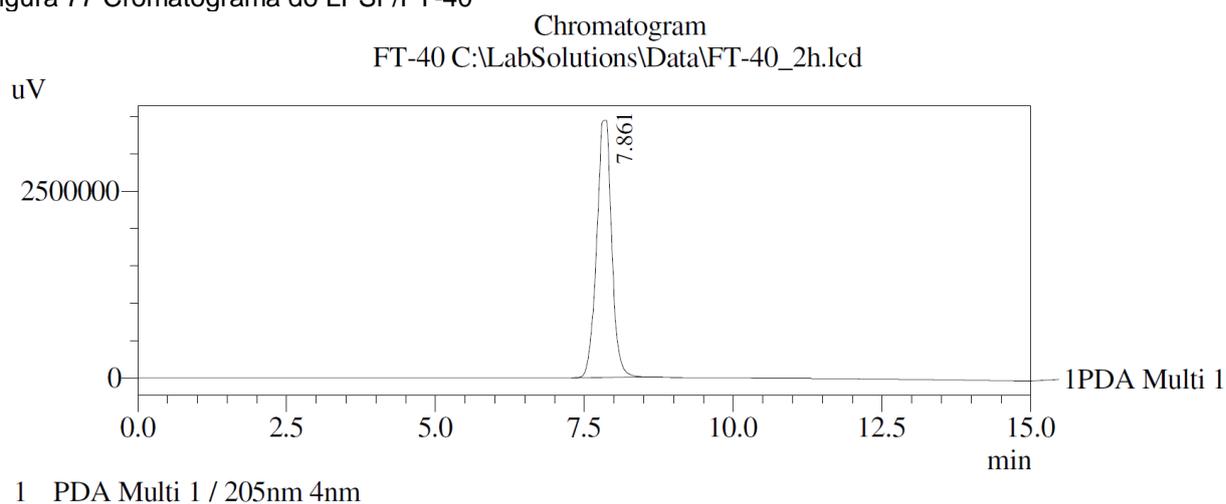


Figura 76 Espectro de IV do LPSF/FT-39



3-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)-5-(4-hydroxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/FT-40)

Figura 77 Cromatograma do LPSF/FT-40



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.861	60386976	3440823	100.000	100.000
Total		60386976	3440823	100.000	100.000

Figura 78 Espectro de MALDI/TOF do LPSF/FT-40

Comment 1 FT-40

Comment 2 MM: 380 DS:18/10/2017

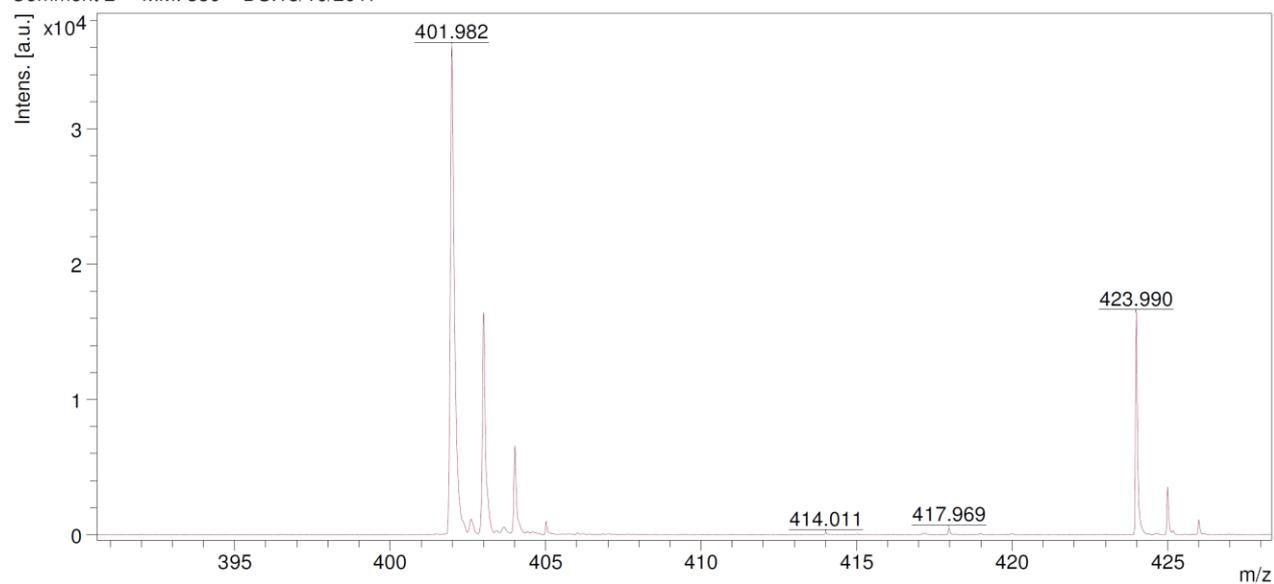


Figura 79 Espectro de RMN de H1 do LPSF/FT-40

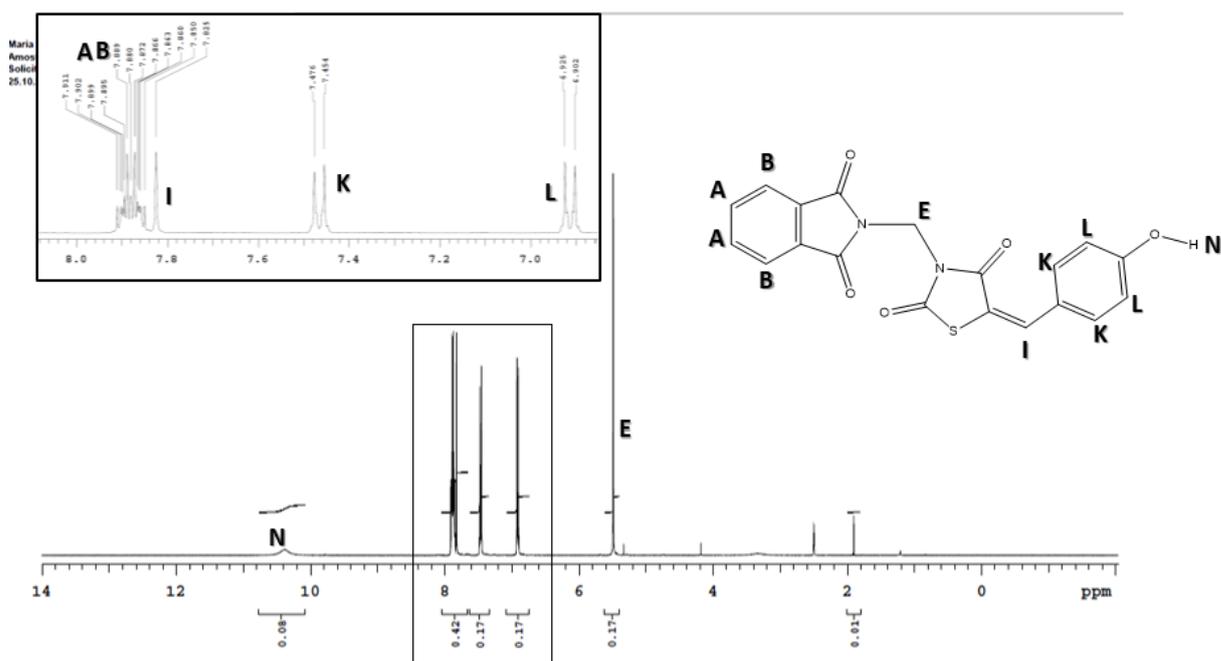


Figura 80 Espectro de RMN de C13 do LPSF/FT-40

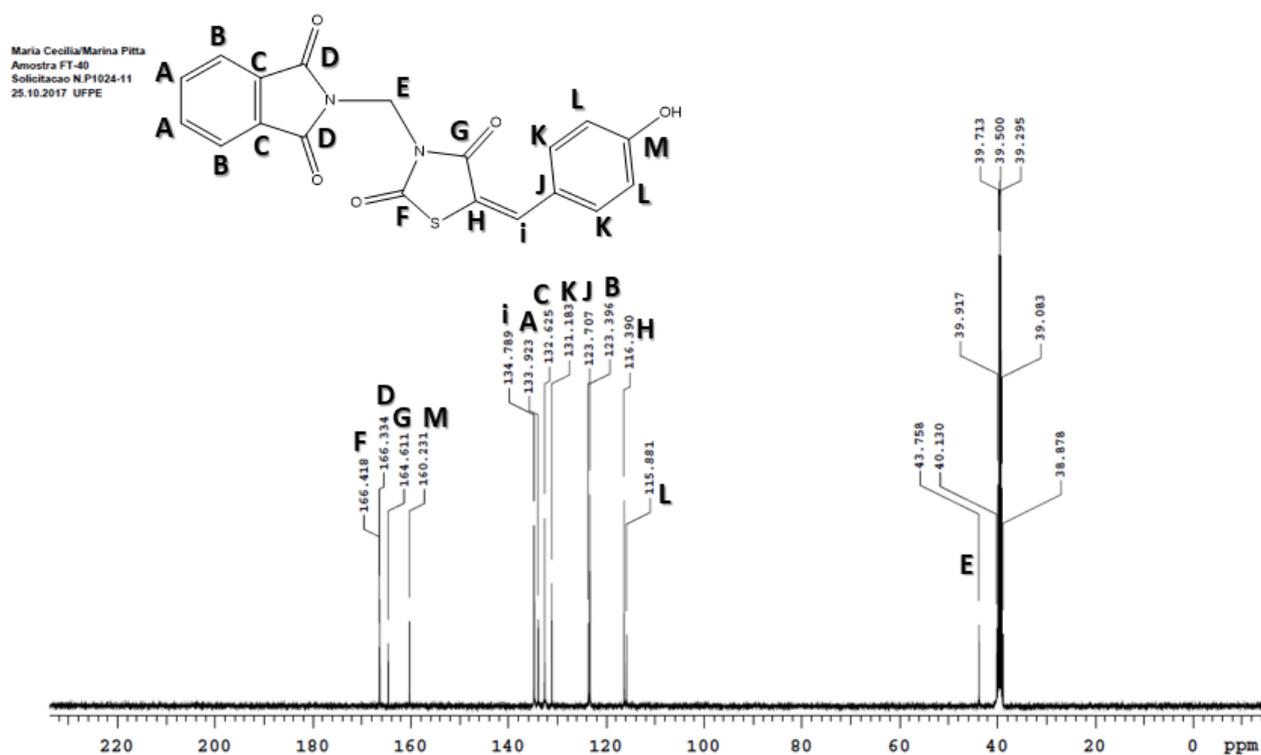
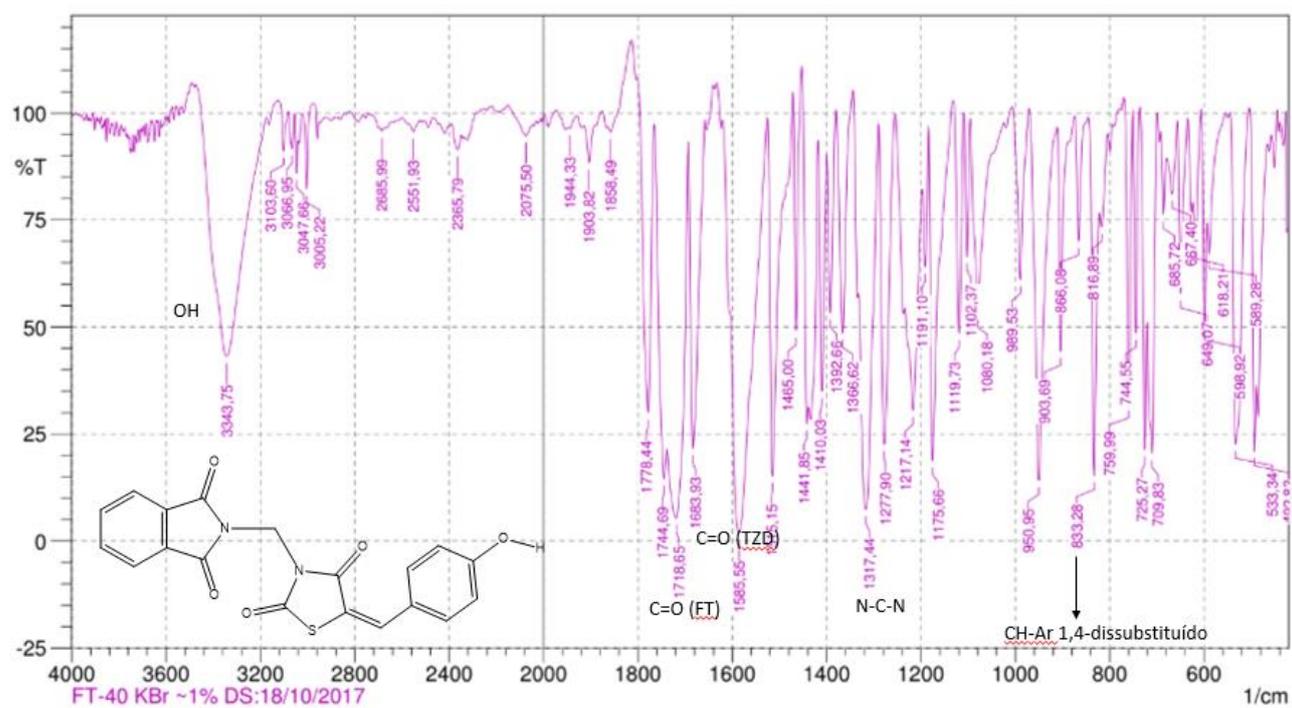


Figura 81 Espectro de IV do LPSF/FT-40



APÊNDICE C – TRIAGEM COMPORTAMENTAL (Observação geral, Teste de Irwin, 1968).

Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados	5'	10'	15'	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	Obs:
	Olhos												
	Ptose palpebral												
Controle (veículo)		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 2g/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3						
	Nistagmo												
Controle (veículo)		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 2g/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3						
	Lacrimejamento												
Controle (veículo)		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 2g/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3						
	Orelhas												
	Hiperemia												
Controle (veículo)		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
FT-40 2g/kg v.o.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3						

	Cianose														
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3								
	Efeitos gerais														
	Sialorreia														
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3								
	Frequência respiratória (FR)														
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3								
	Ereção pilomotora														
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3								
	Micção														
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			

FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3							
	Convulsões													
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		
FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3							
	Mortalidade													
Controle (veículo)		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		
FT-40 300 mg/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3		
FT-40 2g/kg v.o.		0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3							

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO**Artigo de revisão publicado a Current Organic Synthesis.****DOI: 10.2174/1570179417666200325124712****Advances in Synthesis and Medicinal Applications of Compounds Derived from Phthalimide**

Marcel L. Almeida, Maria C.V.A. Oliveira, Ivan R. Pitta, Marina G.R. Pitta*

Nucleus of Research in Therapeutical Innovation Suely Galdino (NUPIT SG), Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Abstract: Phthalimide derivatives have been presenting several promising biological activities in the literature, such as anti-inflammatory, analgesic, antitumor, antimicrobial and anticonvulsant. The most well known and studied phthalimide derivative (isoindoline-1,3-dione) is thalidomide and this compound initially presented important sedative effects, but it is known that thalidomide has effectiveness against a wide variety of diseases, including inflammation and cancer. This review approaches some of the recent and efficient chemical synthesis pathway to obtain phthalimide analogues and also present a summary of the main biological activities of these derivatives found in the literature. Therefore, this review describes the chemical and therapeutic aspects of phthalimide derivatives.

Keywords: phthalimide, thalidomide, medicinal chemistry, anti-tumor, anti-inflammatory, antimicrobial.