



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUIZ ALBERTO BARROS FREITAS

**Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de inéditos Tiazóis para
tratamento do Câncer e das Doenças Negligenciadas**

Recife
2021

LUIZ ALBERTO BARROS FREITAS

Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de inéditos Tiazóis para tratamento do Câncer e das Doenças Negligenciadas

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Linha de Pesquisa: Planejamento e Síntese de Fármacos.

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

Co-orientador: Dr. Paulo André Teixeira de Moraes Gomes.

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

F866p	<p>Freitas, Luiz Alberto Barros Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de inéditos Tiazóis para o tratamento do Câncer e das Doenças Negligenciadas / Luiz Alberto Barros Freitas. – 2021. 115 p. : il.</p> <p>Orientadora: Ana Cristina Lima Leite. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021. Inclui referências.</p> <p>1. Tiazóis. 2. Isatina. 3. Neoplasias. 4. Doença de Chagas. 5. Leishmaniose. 6. Zika virus. I. Leite, Ana Cristina Lima (orientadora). II. Título.</p> <p>617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 097)</p>
-------	---

LUIZ ALBERTO BARROS FREITAS

Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de inéditos Tiazóis para tratamento do Câncer e das Doenças Negligenciadas

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Linha de Pesquisa: Planejamento e Síntese de Fármacos.

Aprovada em: 25/02/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dr.^a Aline Caroline da Silva Santos (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz - Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Miria de Oliveira Barbosa (Examinadora Externa)
Centro Universitário dos Guararapes

Aos meus pais, Lucicleide Gomes Barros Freitas e Aucrecio Antônio Oliveira Freitas, por todo apoio e confiança depositados em mim.

Ao meu avô, Luiz Francisco Barros (*in memoriam*), e a todos que, como ele, tiveram que lutar contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Ana Cristina, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e por todas as oportunidades ofertadas. Pela confiança que deposita em todos os alunos do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM). E por todos os ensinamentos que vêm contribuindo para minha formação.

Ao Prof. Dr. Paulo André, pelo apoio inicial no LpQM, por toda ajuda durante a pesquisa e pela realização dos ensaios de atividade antiviral.

A todos os meus colegas do LpQM presentes no decorrer deste trabalho, Juliana Maria, Luiz Maia, Vanessa Almeida, Vanessa Barbosa, Miria Barbosa, Luciana Rabelo, Igenes Regina, Fabiano Souza, Vinicius Vasconcelos (*in memoriam*), Mabilly Holanda, Camila Ramos, Gedália de Cassia, Franciely Albuquerque, Amanda Leal, Lizandra Amorim, pelo apoio e companheirismo.

À FACEPE, pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e todos que trabalham na secretaria do PPGCF/UFPE, em especial a Nerilin e Rilvan, pela disponibilidade e apoio aos alunos.

À Prof.^a Dr.^a Mafalda Marques Videira do Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa) da Universidade de Lisboa e a Me. Denise Araújo, pela realização dos ensaios de atividade antitumoral.

À Prof.^a Dr.^a Valéria Rêgo Alves Pereira do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) e a Dr.^a Aline Santos, pela realização dos ensaios de atividade antiparasitária (anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania*).

Ao Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos do Departamento de Virologia e Terapia Experimental do IAM/FIOCRUZ-PE pelo estudo ultraestrutural de *T. cruzi*.

Ao Prof. Dr. Lindomar José Pena do Departamento de Virologia e Terapia Experimental do IAM/FIOCRUZ-PE, pela realização do ensaio antiviral (anti-ZIKV).

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone do Laboratório Multiusuário de Cristalografia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), pelas análises cristalográficas fornecidas.

Ao CETENE e a Central analítica do DQF, pelas análises fornecidas.

E a todos que um dia passaram em minha vida, e de alguma forma ensinamentos que me ajudaram no crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O câncer é a expansão clonal de células malignas, cujo crescimento desordenado promove a invasão de tecidos e órgãos. Os quimioterápicos disponíveis apresentam problemas quanto à especificidade e potência. As doenças negligenciadas são um grupo de doenças transmissíveis que ocorrem, em sua maioria, em países tropicais. Nesse grupo se destacam a Doença de Chagas e a Leishmaniose, como as principais doenças parasitárias, e a febre por Zika vírus (ZIKV), considerada uma ameaça à saúde mundial. O tratamento para a Doença de Chagas e Leishmaniose ainda é muito limitado e não há tratamento específico para o ZIKV. Portanto, há uma necessidade de novas terapias contra essas doenças. A literatura relata que o tiazol apresenta uma gama de atividades biológicas, com destaque para atividade antitumoral, antiparasitária e antiviral. Desta forma, este trabalho apresenta o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de 46 tiazóis derivados da isatina e da ariloxitiossemicarbazona. Os compostos derivados da isatina foram sintetizados e avaliados frente linhagens do câncer de mama, frente formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* e frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os compostos derivados da ariloxitiossemicarbazona foram sintetizados e avaliados frente ao ZIKV. Dentre os compostos testados, LAB-2C e LAB-2A se destacaram para a atividade antitumoral com valores de IC50 1,23 e 1,39 uM, respectivamente, frente a linhagem MDA-MB-231 e ambos valores de IC50 0,45 uM para a linhagem MCF-7. Com relação à atividade antiparasitária, LAB-1N se destacou frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* (IC50 1,72 uM), sendo observadas alterações ultraestruturais no parasita, indução de uma marcação compatível com necrose, como também demonstrou atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, com valores de IC50 6,17 e 6,04 uM, respectivamente. Para a atividade frente o ZIKV, os compostos DLT-1I e DLT-1H se destacaram com maiores percentuais de inibição do vírus, com 99,92% e 99,77%, respectivamente. De forma geral, este trabalho apresenta compostos promissores quanto à atividade antitumoral, antiparasitária e antiviral frente ao ZIKV.

Palavras-chave: tiazóis; isatina; neoplasias; doença de Chagas; leishmaniose; Zika vírus.

ABSTRACT

Cancer is the clonal expansion of malignant cells, whose disordered growth promotes tissue and organ invasion. The available chemotherapeutic drugs present issues regarding specificity and potential. Neglected diseases comprise a group of communicable diseases that mostly occur in tropical countries. In this group, Chagas Disease and Leishmaniasis stand out as the main parasitic diseases, and Zika virus fever (ZIKV), considered a threat to global health. Treatment for Chagas disease and Leishmaniasis is still very limited and there is no specific treatment for ZIKV. Therefore, there is a need for new therapies against these diseases. The literature reports that the thiazole group has a range of biological activities, with an emphasis on antitumor, antiparasitic and antiviral activity. Thus, this work presents the planning, synthesis, and pharmacological evaluation of 46 thiazoles derived from isatin and from aryloxythiosemicarbazone. The compounds derived from isatin were synthesized and tested against lineages of breast cancer, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, and promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. infantum*. On the other hand, the aryloxythiosemicarbazone derivatives were synthesized and evaluated against ZIKV. Among the tested compounds, LAB-2C and LAB-2A stood out for antitumor activity with IC50 values of 1.23 and 1.39 μM , respectively, compared to the MDA-MB-231 strain and both IC50 values 0.45 μM for an MCF-7 strain. Regarding antiparasitic activity, LAB-1N stood out against the trypomastigote form of *T. cruzi* (IC50 1.72 μM), with non-parasitic ultrastructural changes and induction of a marking compatible with necrosis being observed, as well as good activity against promastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum*, with IC50 values of 6.17 and 6.04 μM , respectively. Regarding the activity against ZIKV, DLT-1I and DLT-1H stood out with higher percentages of virus inhibition, with 99.92% and 99.77%, respectively. Overall, this work presents promising compounds for multiple targets such as antitumor, antiparasitic, and antiviral activity against ZIKV.

Keywords: thiazoles; isatin; neoplasms; Chagas disease; leishmaniasis; zika virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do anel heterocíclico isatina.....	16
Figura 2 - Estrutura das tiossemicarbazonas.....	16
Figura 3 - Estrutura do núcleo heterocíclico tiazol.....	17
Figura 4 - Amplo espectro de atividades biológicas da isatina e tiazol.....	17
Figura 5 - Hallmarks do câncer.....	21
Figura 6 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes em 2020 por sexo.....	22
Figura 7 - Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento do câncer.....	23
Figura 8 - Composição estrutural do núcleo isatina.....	25
Figura 9 - Derivados da isatina com atividade antitumoral.....	26
Figura 10 - Composição estrutural do núcleo tiazol.....	27
Figura 11 - Derivados do tiazol com atividade antitumoral.....	27
Figura 12 - Planejamento estrutural dos compostos.....	28
Figura 13 - Regra dos 5 proposta por Lipinski <i>et al.</i> (1997).....	29
Figura 14 - Esquema geral da síntese da série LAB.....	46
Figura 15 - Esquema de síntese dos compostos intermediários da série LAB.....	47
Figura 16 - Esquema de síntese dos tiazóis da série LAB.....	47
Figura 17 - Espectro de RMN ¹ H para a molécula LAB-Int1.....	48
Figura 18 - Espectro de RMN ¹³ C para a molécula LAB-Int1.....	49
Figura 19 - Espectro de RMN ¹ H para a molécula LAB-1D.....	50
Figura 20 - Espectro de RMN ¹³ C para a molécula LAB-1D.....	51
Figura 21 - Cristalografia da molécula LAB-1D.....	52
Figura 22 - Cristalografia da molécula LAB-2C.....	53
Figura 23 - Expressão de P-gp em células MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com LAB-2A e LAB-2C.....	56
Figura 24 - Expressão de Akt2 em MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com LAB-2A e LAB-2C.....	57
Figura 25 - Expressão de VIM em MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com LAB-2A e LAB-2C.....	58
Figura 26 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 27 - Benznidazol: medicamento e estrutura química.....	60
Figura 28 - Derivados do tiazol com atividade anti- <i>T. cruzi</i>	62
Figura 29 - Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i>	62

Figura 30 - Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento da Leishmaniose...	64
Figura 31 - Derivados do Tiazol com atividade anti- <i>Leishmania</i>	64
Figura 32 - Alterações ultraestruturais em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com BDZ e composto LAB-2N por MEV.....	71
Figura 33 - Citometria de fluxo dos compostos da série LAB.....	72
Figura 34 - Principal vetor de ZIKV.....	77
Figura 35 - Composição estrutural das tiossemicarbazonas.....	78
Figura 36 - Derivados das tiossemicarbazonas com atividade antiviral.....	79
Figura 37 - Derivados do Tiazol com atividade antiviral.....	80
Figura 38 - Planejamento estrutural dos compostos da série DLT.....	81
Figura 39 - Esquema geral de síntese da série DLT.....	98
Figura 40 - Espectro de RMN ¹ H para a molécula DLT-Int4.....	99
Figura 41 - Espectro de RMN ¹³ C para a molécula DLT-Int4.....	100
Figura 42 - Espectro de RMN ¹ H para a molécula DLT-1B.....	101
Figura 43 - Espectro de RMN ¹³ C para a molécula DLT-1B.....	102
Figura 44 - Imagens do teste antiviral com 96 horas de incubação.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos compostos planejados da série LAB aplicados à “Regra dos 5”	29
Tabela 2 - Porcentagem de inibição dos compostos para as linhagens testadas.....	54
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ (μM) (± SD) para os compostos selecionados.....	55
Tabela 4 - Resultados obtidos para as formas tripomastigota e amastigota de <i>T. cruzi</i>	69
Tabela 5 - Resultados obtidos da série LAB para formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	73
Tabela 6 - Resultados obtidos da série LAB para formas promastigotas de <i>Leishmania</i> ...	74
Tabela 7 - Dados dos compostos planejados da série DLT aplicados à “Regra dos 5”.	81
Tabela 8 - Resultado do CC ₂₀ e CC ₅₀ da série DLT para células Vero.....	103
Tabela 9 - Porcentagem de inibição viral na dose do CC ₂₀	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

<i>J</i>	Constante de acoplamento
d	Dupleto
m	Multipleteo
s	Singleto
t	Tripleteo
CC₂₀	Concentração citotóxica para 20% das células
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CCD	Cromatografia em camada delgada
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
EMAR	Espectroscopia de massas de alta resolução
IC₅₀	Concentração inibitória para 50% da população
IS	Índice de seletividade
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PF	Ponto de fusão
P-gp	Glicoproteína P
Ph	Fenil
PI	Iodeto de propídio
ND	Não definida
LpQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	CAPÍTULO UM: PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE INÉDITOS TIAZÓIS DERIVADOS DA ISATINA.....	20
3.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1.1	Câncer.....	20
3.1.1.1	<i>Características do Câncer.....</i>	21
3.1.1.2	<i>Epidemiologia do Câncer.....</i>	21
3.1.1.3	<i>Quimioterapia do Câncer.....</i>	23
3.1.2	Estruturas Privilegiadas.....	24
3.1.2.1	<i>Isatinas.....</i>	25
3.1.2.2	<i>Tiazóis.....</i>	26
3.2	PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS.....	28
3.3	METODOLOGIA.....	31
3.3.1	Síntese e Caracterização.....	31
3.3.1.1	<i>Síntese dos intermediários LAB-Int1 e LAB-Int2.....</i>	32
3.3.1.2	<i>Síntese da série isatina-hidrazona-tiazóis LAB-1A à LAB-2M.....</i>	32
3.3.1.3	<i>Caracterização Estrutural.....</i>	32
3.3.1.4	<i>Dados físico-químicos e elucidação estrutural.....</i>	33
3.3.2	Ensaio Biológicos.....	43
3.3.2.1	<i>Cultura de células e ensaio de viabilidade em linhagens do câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7).....</i>	43
3.3.2.2	<i>Imunocitoquímica de P-gp, Akt2 e VIM.....</i>	44
3.3.2.3	<i>Análise de expressão de mRNA de P-gp, Akt2 e VIM.....</i>	44
3.4	RESULTADOS.....	46
3.4.1	Síntese e Caracterização.....	46
3.4.1.1	<i>Obtenção da Série Química LAB.....</i>	46
3.4.1.2	<i>Caracterização estrutural da série LAB.....</i>	48
3.4.2	Ensaio Biológicos.....	53

3.4.2.1	<i>Avaliação da atividade antitumoral da série LAB</i>	53
3.4.2.2	<i>Avaliação frente à atividade de efluxo da glicoproteína</i>	55
3.4.2.3	<i>Avaliação dos biomarcadores Akt2 e VIM para o câncer de mama</i>	56
4	CAPÍTULO DOIS: AVALIAÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE INÉDITOS TIAZÓIS DERIVADOS DA ISATINA	59
4.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	59
4.1.1	Doença de Chagas	59
4.1.1.1	<i>Tratamento da Doença de Chagas</i>	60
4.1.2	Leishmaniose	61
4.1.2.1	<i>Epidemiologia da Leishmaniose</i>	62
4.1.2.2	<i>Tratamento da Leishmaniose</i>	63
4.2	METODOLOGIA.....	65
4.2.1	Ensaio Biológicos	65
4.2.1.1	<i>Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7</i>	65
4.2.1.2	<i>Ensaio anti-T. cruzi (tripomastigotas)</i>	65
4.2.1.3	<i>Ensaio anti-T. cruzi (amastigostas/tripomastigostas)</i>	66
4.2.1.4	<i>Ensaio de estudos ultraestruturais</i>	66
4.2.1.5	<i>Ensaio de avaliação de morte celular</i>	67
4.2.1.6	<i>Ensaio anti-Leishmania</i>	67
4.3	RESULTADOS.....	69
4.3.1	Avaliação da atividade anti-T. cruzi da série LAB	69
4.3.2	Estudos ultraestruturais para T. cruzi	70
4.3.3	Análise de citometria de fluxo	73
4.3.4	Avaliação da atividade anti-leishmania da série LAB	73
5	CAPÍTULO TRÊS: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIVIRAL FRENTE AO VÍRUS ZIKA DE INÉDITOS TIAZÓIS DERIVADOS DA ARILOXITIOSSEMICARBAZONA	76
5.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	76
5.1.1	Vírus Zika	76
5.1.1.1	<i>Infecção por ZIKV</i>	77
5.1.2	Estruturas Privilegiadas	78
5.1.2.1	<i>Tiossemicarbazonas</i>	78
5.1.2.2	<i>Tiazóis</i>	79

5.2	PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS.....	81
5.3	METODOLOGIA.....	83
5.3.1	Síntese e Caracterização.....	83
5.3.1.1	<i>Síntese dos intermediários DLT-Int1 e DLT-Int2.....</i>	84
5.3.1.2	<i>Síntese dos intermediários DLT-Int3 e DLT-Int4.....</i>	84
5.3.1.3	<i>Síntese da série dos tiazóis DLT-1A à DLT-2J.....</i>	84
5.3.1.4	<i>Caracterização Estrutural.....</i>	84
5.3.1.5	<i>Dados físico-químicos e elucidação estrutural.....</i>	85
5.3.2	Ensaio Biológicos.....	95
5.3.2.1	<i>Cultura de células Vero.....</i>	95
5.3.2.2	<i>Ensaio de citotoxicidade em células Vero.....</i>	95
5.3.2.3	<i>Cultura do vírus Zika (ZIKV).....</i>	96
5.3.2.4	<i>Ensaio antiviral frente ao ZIKV.....</i>	96
5.4	RESULTADOS.....	98
5.4.1	Síntese e Caracterização.....	98
5.4.1.1	<i>Obtenção da Série Química DLT.....</i>	98
5.4.1.2	<i>Caracterização estrutural da série DLT.....</i>	99
5.4.2	Ensaio Biológicos.....	102
5.4.2.1	<i>Avaliação da atividade antiviral da série DLT.....</i>	102
6	CONCLUSÃO.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

A Química Medicinal é uma ciência híbrida e multidisciplinar, que envolve diversas áreas entre ciência e tecnologia. Esta interação entre as áreas é responsável pelo desenvolvimento de inovações quimioterápicas para o tratamento de várias doenças (HANN, 2011).

O Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo (WHO, 2018). Uma característica comum entre os diversos tipos de câncer é a proliferação desordenada e a incapacidade no processo de diferenciação celular normal. As células sofrem um processo de progressão tumoral, que consiste na invasão, formação de metástases e no crescimento progressivo (COSTA, 2015). Os quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer apresentam problemas quanto à especificidade, pois também podem agir em células normais, e potencialidade, no qual apresentam valores ainda considerados pequenos de cura total (SHUKLA *et al.*, 2012).

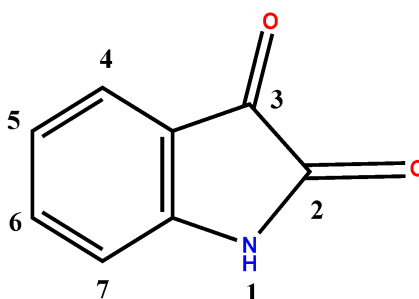
As doenças negligenciadas são um conjunto de doenças transmissíveis, que afetam principalmente regiões tropicais de países em desenvolvimento. As populações que vivem em situação de pobreza, que não possuem saneamento adequado e que estão em contato com vetores infecciosos são as mais afetadas por essas doenças. São chamadas “negligenciadas” por existir pouco interesse no desenvolvimento de novos tratamentos, por parte da indústria farmacêutica. Esse fato pode ser atribuído ao baixo retorno financeiro para estas indústrias (TROUILLER *et al.*, 2002). Dentre esse conjunto de doenças se destaca a Leishmaniose, uma das principais doenças parasitárias, e mais recentemente, a febre pelo vírus Zika, considerada uma ameaça à saúde mundial e, no qual, países latino-americanos têm enfrentado surtos nos últimos anos. Para a Leishmaniose, o tratamento não é eficaz em estágios mais avançados da doença (BRASIL, 2017) e não há tratamento específico para o vírus Zika, só alívio para os sintomas (KOK, 2016). Dessa forma, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para a quimioterapia do câncer e doenças negligenciadas se fazem necessários.

Estruturas privilegiadas são blocos de construção moleculares com propriedades de ligação versáteis e capazes de proporcionar ligantes seletivos para um amplo espectro de alvos biológicos através da modificação de grupos funcionais (POLANSKI *et al.*, 2012). São utilizados na Química Medicinal como uma estratégia para obtenção de moléculas com atividades farmacológicas direcionadas e são chamados privilegiados, por terem diversas

atividades biológicas já comprovadas e associadas à sua estrutura principal, registradas na literatura (POLANSKI *et al.*, 2012).

As isatinas e as tiossemicarbazonas são grandes alvos de estudos, por serem reconhecidas na literatura como estruturas privilegiadas. A isatina (1H-indol-2,3-diona) (**Figura 1**) é um composto heterocíclico que demonstra uma gama de atividades biológicas, incluindo propriedades anticonvulsivante, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral (VINE *et al.*, 2009).

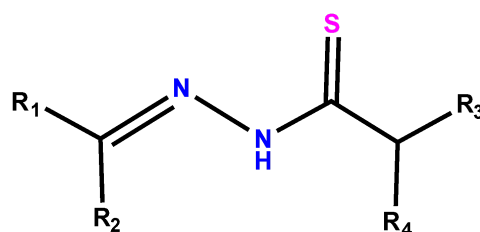
Figura 1 - Estrutura do anel heterocíclico isatina



Fonte: O autor (2021).

Assim como as isatinas, as tiossemicarbazonas (**Figura 2**) têm um amplo espectro de atividades biológicas relatadas na literatura. Destacam-se com potenciais atividades antiprotozoárias, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e antitumorais (BELARDO; GRAMBINO, 2004) e anticonvulsiva (YOGEE SWARI *et al.*, 2002). Séries de tiossemicarbazonas anteriormente desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa, apresentaram atividade anti-*T. cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2014) (ESPÍNDOLA *et al.*, 2015).

Figura 2 - Estrutura das tiossemicarbazonas

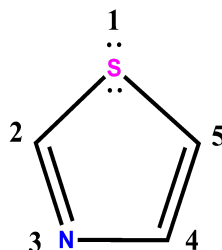


Fonte: O autor (2021).

Outro importante núcleo e que vem sendo explorado por nosso grupo de pesquisa são os tiazóis ou 1,3-tiazóis (**Figura 3**). Dentre as atividades relatadas para esse núcleo farmacofórico, destaca-se a potente ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais

como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia (LEFRANC *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2012; FALLAH-TAFTI *et al.*, 2011; ALIABADI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2005).

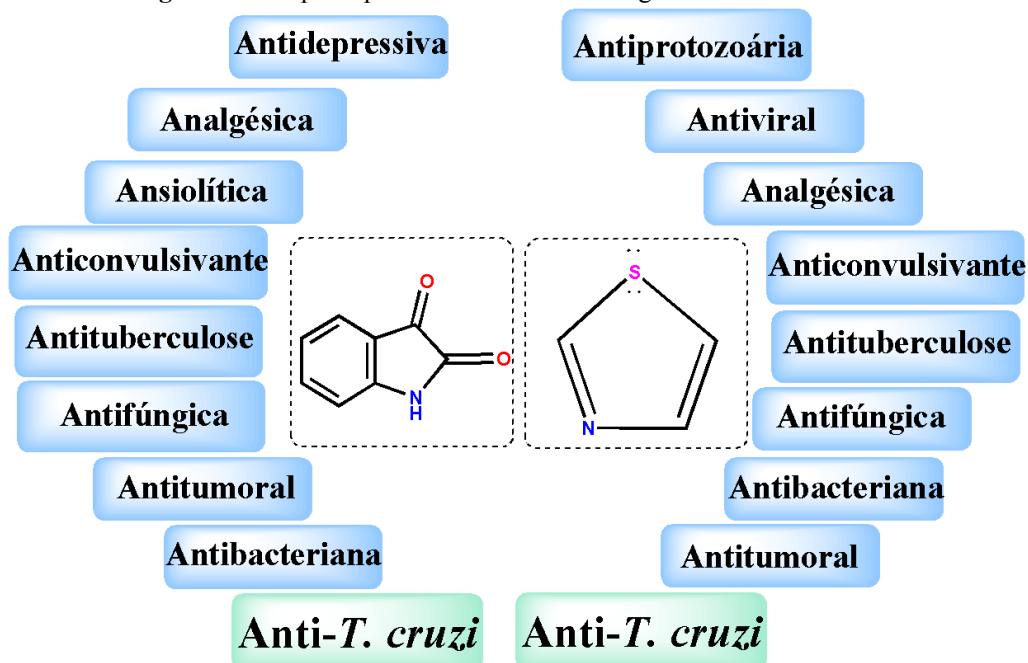
Figura 3 - Estrutura do núcleo heterocíclico tiazol



Fonte: O autor (2021).

O presente trabalho está dividido em três capítulos e apresenta duas séries de inéditos tiazóis derivados da isatina e da tiossemicarbazona, obtidos por meio da estratégia da hibridização molecular, e explora três das muitas atividades farmacológicas já relatadas para esses grupos farmacofóricos, a atividade antitumoral, a anti-*Leishmania* e a antiviral (Figura 4).

Figura 4 - Amplo espectro de atividades biológicas da isatina e tiazol.



Fonte: O autor (2021).

O primeiro capítulo é intitulado “Planejamento estrutural, síntese e avaliação antitumoral de inéditos tiazóis derivados da isatina” e nele são apresentados o planejamento, a

síntese, a caracterização estrutural e a avaliação quanto às propriedades antitumorais de tiazóis derivados da isatina.

O segundo capítulo é intitulado “Avaliação antiparasitária de inéditos tiazóis derivados da isatina” e nele são apresentados a avaliação quanto às propriedades anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania* de tiazóis derivados da isatina.

O terceiro capítulo é intitulado “Planejamento, síntese e avaliação antiviral frente ao vírus Zika de inéditos tiazóis derivados da ariloxitiossemicarbazona” e nele são apresentados o planejamento, a síntese empregada e a caracterização estrutural para a obtenção da série de inéditos tiazóis derivados da ariloxitiossemicarbazona, assim como resultados de sua propriedade antiviral frente ao vírus Zika.

Desse modo, aqui é apresentada a investigação da eficácia da estratégia da hibridização molecular, envolvendo as estruturas privilegiadas tiazol, isatina e tiossemicarbazona, com relação à potencialização das suas propriedades farmacológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o planejamento estrutural e a síntese de duas séries de inéditos tiazóis, com potencial atividade antitumoral, antiparasitária e antiviral frente ao ZIKV (vírus Zika)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar uma série de inéditos tiazóis derivados da isatina;
- Sintetizar uma série de inéditos tiazóis derivados da ariloxitiossemicarbazona;
- Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados através das técnicas de RMN ^1H e ^{13}C , EMAR e Difração de Raios X;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos em células de macrófagos e células Vero;
- Avaliar as propriedades antitumorais dos tiazóis derivados da isatina frente linhagens do câncer de mama;
- Avaliar a atividade antiparasitária dos tiazóis derivados da isatina frente a forma tripomastigota de *T. cruzi* e as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- Avaliar a atividade antiviral dos tiazóis derivados da ariloxitiossemicarbazona frente ao ZIKV.

3 CAPÍTULO UM: PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE INÉDITOS TIAZÓIS DERIVADOS DA ISATINA

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Câncer

Câncer é a expansão clonal de células malignas e mutantes, cujo crescimento desordenado promove a invasão de tecidos e órgãos, fazendo-os perder sua funcionalidade normal. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2019). De modo geral, nas células normais que possuem algum dano, um mecanismo é ativado no propósito de corrigir o defeito. Já quando o dano é irreversível, a célula desencadeia um processo chamado de apoptose celular, conhecido também como morte celular programada. No entanto, uma célula cancerosa, consegue “burlar” esse processo de apoptose o que faz com que ela continue a se duplicar exageradamente até atingir tamanhos preocupantes e formar tumores malignos (COSTA, 2015).

O câncer ocupa a 2ª posição dentre as doenças que mais matam no mundo, responsável por 9,6 milhões de mortes (GLOBOCAN, 2020). No Brasil, também ocupa a 2ª posição de causa de morte, com um número de 197 mil óbitos por ano (INCA, 2019).

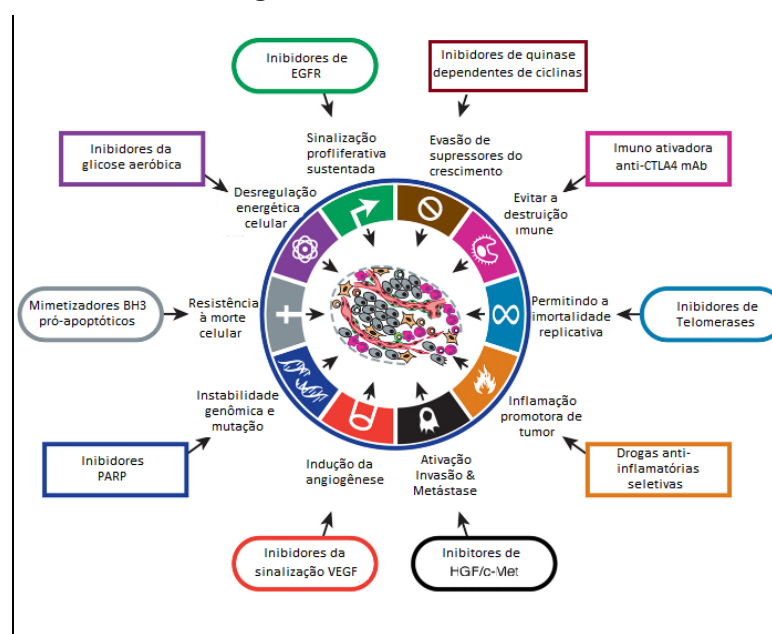
Quanto às causas de câncer, pode-se dizer que elas podem ser externas ou internas ao organismo. Embora a primeira, que está associada a fatores ambientais, seja responsável por 80% a 90% dos casos de câncer. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. Entende-se assim por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos e medicamentos), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida). Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos e atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células. Já as causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Estando ambas as causas

inter-relacionadas. O surgimento do câncer depende, assim, da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores (INCA, 2019).

3.1.1.1 Características do Câncer

Em 2011, Hanahan e Weinberg descreveram o conceito de "hallmarks" do câncer, que seriam as características que contribuem para o entendimento desta patologia. Os Hallmarks do câncer incluem: manutenção de sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, ativação de invasão e metástase, possibilidade de imortalidade replicativa, indução de angiogênese e resistência à morte celular (Figura 5). Adicionalmente, características principais que permitem a aquisição dos Hallmarks iniciais foram descritas. Essas características são: Instabilidade genômica e mutação, e inflamação promotora de tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 5 - Hallmarks do câncer.



Fonte: HANAHAN & WEINBERG (2001) (Adaptado).

3.1.1.2 Epidemiologia do Câncer


Os tipos de câncer mais diagnosticados em todo o mundo são os de pulmão (2,09 milhões), de mama (2,09 milhões), intestino (1,8 milhões), próstata (1,28 milhões) e estômago (1,03 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (14,5%), próstata (13,5%), intestino (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). E nas mulheres as maiores

frequências encontradas foram mama (24,2%), intestino (9,4%), pulmão (8,4%), colo do útero (6,6%) e glândula tireoide (5,1%) (GLOBOCAN, 2020).

O Brasil vem passando nas últimas décadas por alterações de contexto social, econômico e conseqüentemente de saúde. O aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos podem explicar o crescimento das taxas de incidência de câncer ao longo dos anos no país. A essas novas características da sociedade brasileira unem-se os novos estilos de vida e a exposição ainda mais intensa a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo. Esse processo de mudança trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas como novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da população brasileira.

A estimativa para o Brasil, referente ao ano de 2020, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Com exceção do câncer de pele não melanoma, que corresponde a aproximadamente a um número de 180 mil novos casos, ocorrerão cerca de 420 mil novos casos de câncer. Estima-se que os cânceres de próstata (65 mil) em homens e mama (66 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem levar em consideração os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens são próstata (29,2%), intestino (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5%). Já para as mulheres os tipos de câncer que figurarão entre os principais serão mama (29,7%), intestino (9,2%), colo de útero (7,4%), pulmão (5,6%) e glândula tireoide (5,4%); assim como mostra a **Figura 6** (INCA, 2019).

Figura 6 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo.

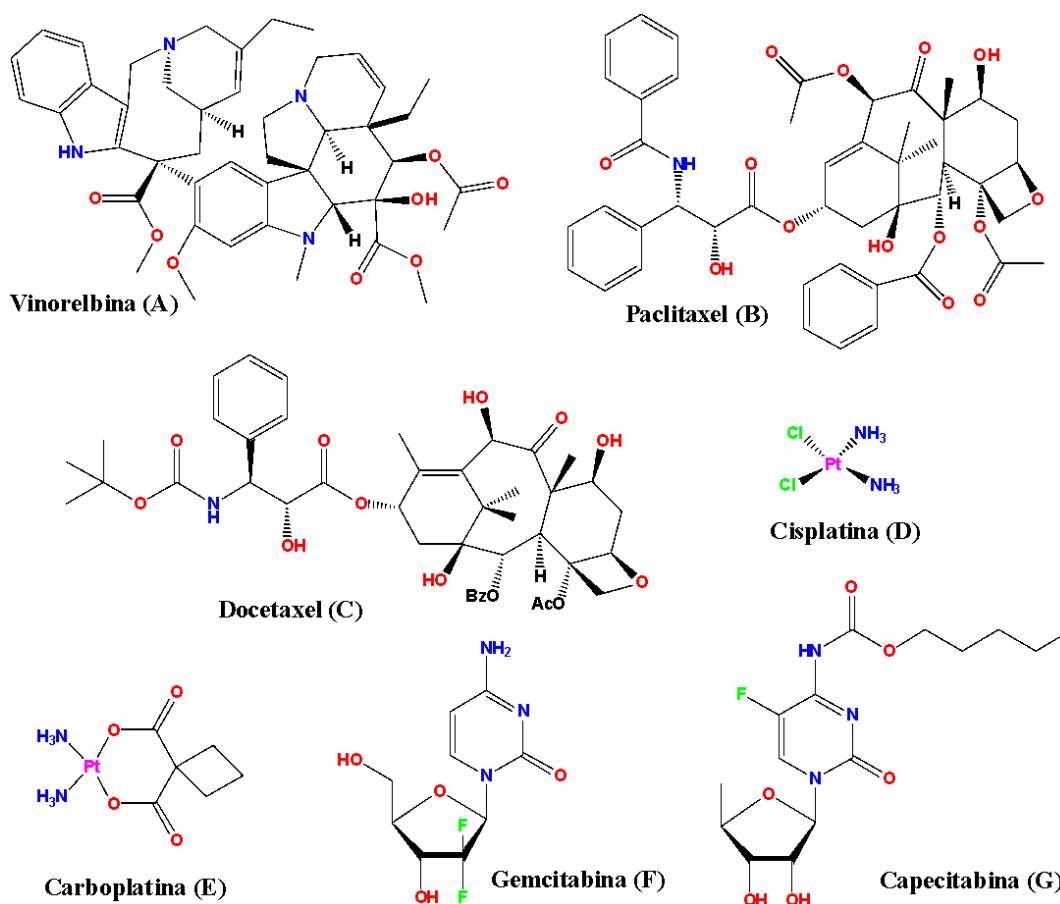
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%		Cólon e reto	20.470	9,2%	
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.590	7,4%	
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%	
Cavidade oral	11.180	5,0%		Glândula tireoide	11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema nervoso central	5.220	2,3%	

Fonte: INCA (2019) (Adaptado).

3.1.1.3 Quimioterapia do Câncer

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos para o tratamento de doenças que são causadas por agentes biológicos. A ação e o efeito dos quimioterápicos acontecem em todo o organismo, podendo assim atacar células que tenham se separado do tumor inicial formando metástases em algum outro órgão. Entretanto, pelo fato de as células normais apresentarem um tempo de recuperação previsível, é possível que a quimioterapia seja aplicada repetidamente, desde que o tempo para a recuperação da medula óssea e da mucosa do tubo digestivo seja observado. Sendo assim, a quimioterapia deve ser aplicada em ciclos periódicos. Existem dezenas de agentes quimioterápicos e a escolha de qual deles deve ser utilizado depende de cada caso, levando em consideração o tipo de tumor, a extensão da doença e as condições de cada paciente (INCA, 2018). Para o tratamento do câncer, na maioria das vezes, é utilizada uma combinação de medicamentos, que podem ser: inibidores mitóticos, agentes alquilantes e antimetabólitos (**Figura 7**).

Figura 7 - Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento do câncer.



Fonte: O autor (2021).

Vinorelbina (**Figura 7, A**) é um inibidor mitótico derivado da *Catharanthus roseus*, sendo um dos primeiros medicamentos disponibilizado para o tratamento do câncer. Outros inibidores mitóticos são os taxoides, como o Paclitaxel (**Figura 7, B**), isolado das cascas de *Taxus brevifolia* e o Docetaxel (**Figura 7, C**), derivado de *Taxus baccata*. A Cisplatina (**Figura 7, D**) e a Carboplatina (**Figura 7, E**) são agentes alquilantes que estão disponíveis desde a década de 70 para o tratamento do câncer. Esses medicamentos evitam a duplicação celular a partir da adição de grupos alquilas no DNA celular. A Gemcitabina (**Figura 7, F**) é um antimetabólito análogo de nucleosídeo que compete com a citidina e inibe a divisão celular. Capecitabina (**Figura 7, G**) é um antimetabólito derivado do carbamato de fluoropirimidina e foi planejado para administração oral (ONCOGUIA, 2017).

No entanto, os quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer apresentam vários problemas quanto à especificidade, agindo também em células normais, e potencialidade, apresentando valores ainda considerados pequenos de cura total. Além desses fatores, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um elemento agravante e já com certa frequência de casos na terapêutica do câncer (SHUKLA *et al.*, 2012). Dessa forma, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para a quimioterapia do câncer se fazem necessários.

3.1.2 Estruturas Privilegiadas

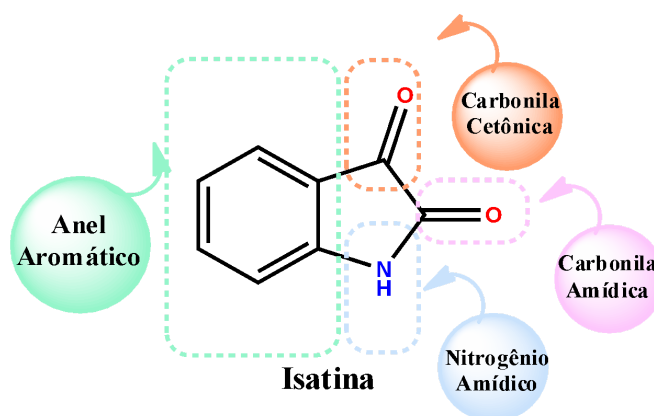
O conceito de Estruturas Privilegiadas surgiu como uma abordagem eficiente para a síntese de novos fármacos. Nesse conceito, um único bloco de construção (núcleo a partir do qual a molécula será desenvolvida), é capaz de fornecer potentes ligantes e seletivos para diferentes alvos biológicos (DESIMONE *et al.*, 2004). Utilizando essa ideia, entende-se que certas características estruturais produzem efeitos biológicos mais amplos que outras. Este tipo de estrutura é utilizado para enriquecer a atividade de novas moléculas no planejamento de fármacos (POLANSKI *et al.*, 2012).

Ao passo que os blocos de construção são apenas uma característica estrutural comum em um grupo de moléculas, as estruturas privilegiadas são núcleos que oferecem análogos biologicamente ativos para vários alvos. Assim, as estruturas privilegiadas podem servir como inspiração para o planejamento de novos fármacos (POLANSKI *et al.*, 2012); (SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2017).

3.1.2.1 Isatinas

A isatina (1H-indol-2,3-diona) é um composto heterocíclico do tipo indol. O indol é um importante sistema heterocíclico por estar inserido em proteínas e por fazer parte do esqueleto de alcaloides indóis – compostos biologicamente ativos de plantas, incluindo estricnina e LSD (SHARMA *et al.*, 2010). A isatina possui em sua estrutura dois grupos carbonilas (C=O), sendo uma cetônica e uma amídica, um nitrogênio amídico e um anel aromático (C₆H₄), como mostra a (**Figura 8**) (MARTINEZ; FERREIRA, 2017).

Figura 8 - Composição estrutural do núcleo isatina.



Fonte: O autor (2021).

As isatinas têm se mostrado muito interessantes por apresentar diversas comprovações de atividades biológicas, se encaixando perfeitamente no conceito de estrutura privilegiada. Este grupo funcional vem sendo utilizado como bloco de construção na síntese orgânica, para potencializar a atividade das moléculas e produzir novos compostos com perfis farmacocinéticos desejáveis (ABOUL-FADL *et al.*, 2012).

Dentre os registros de bioatividade das isatinas encontrados na literatura, destacam-se os anticonvulsivantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirais e outros. Esse amplo espectro de atividade biológica tem sido facilitado pela versatilidade sintética da isatina, que permitiu a geração de um grande número de derivados, incluindo análogos com substituição do anel aril e/ou derivação do nitrogênio da isatina e dos carbonos C₂ e C₃ (VINE *et al.*, 2009).

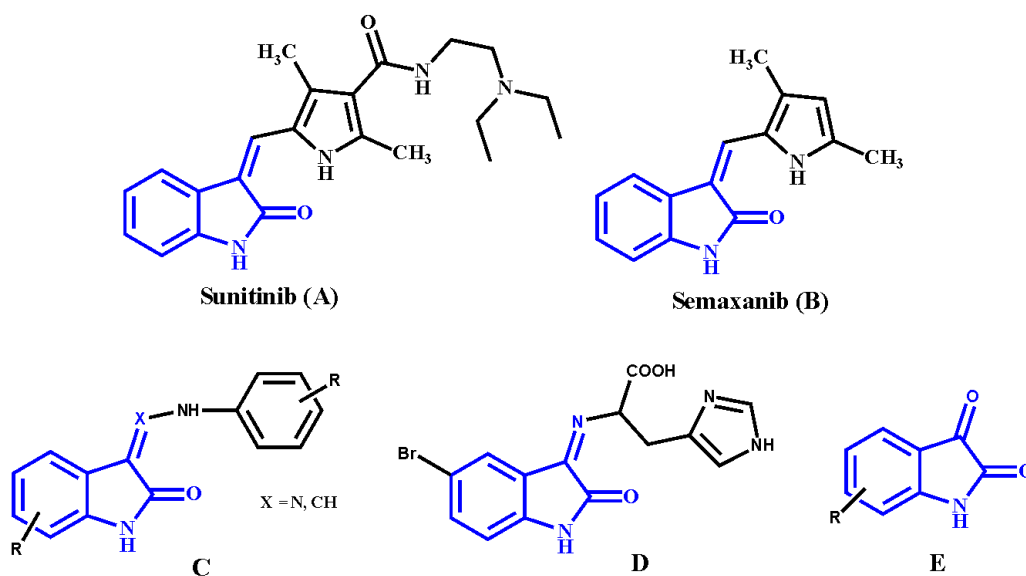
As isatinas apresentam uma conhecida atividade contra várias linhagens de células cancerígenas (ABOUL-FADL *et al.*, 2012). A aprovação pelo FDA do oxindol, que é o malato de sunitinibe (**Figura 9, A**), como um inibidor de quinase para o tratamento do

carcinoma renal avançado e tumores gastrointestinais, destacou o crescente interesse nas isatinas como uma nova classe de agentes antineoplásicos (MOTZER *et al.*, 2006).

Derivados da isatina, como o Semaxanib (**Figura 9, B**) são relatados como potentes inibidores das quinases dependentes de ciclina (CDKs), o que pode induzir apoptose em células de carcinoma de cólon. Shi e colaboradores (1996) obtiveram derivados fenil-hidrazonas de isatinas (**Figura 9, C**) que também apresentaram potente inibição de CDKs (SOLOMON *et al.*, 2009).

Além da potente inibição de quinase, o mecanismo de ação de outros derivados da isatina inclui a inibição e/ou modulação de proteases, inibição da tradução, da neovascularização e da polimerização da tubulina (VINE *et al.*, 2009). Em 2006, Abadi e colaboradores identificaram as propriedades antitumorais de imino 2-indolonas (**Figura 9, D**). Vine e colaboradores (2009) sintetizaram diversos análogos da isatina substituída (**Figura 9, E**), e testaram em cinco linhagens de células cancerígenas humanas, concluindo que isatinas substituídas podem ser efetivos fármacos anticâncer (SOLOMON *et al.*, 2009).

Figura 9 - Derivados da isatina com atividade antitumoral.



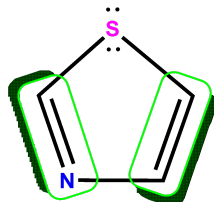
Fonte: O autor (2021).

3.1.2.2 Tiazóis

Os tiazóis ou 1,3 tiazóis são uma classe de compostos heterocíclicos formados por um anel de cinco membros contendo três átomos de carbono, um de enxofre e um de nitrogênio, além de duas duplas ligações (**Figura 10**). Os tiazóis são membros dos heterocíclicos azóis

que incluem imidazóis e oxazóis. O anel tiazol é planar, e sua aromaticidade é caracterizada pela deslocalização de um par de elétrons do átomo de enxofre para completar os 6 elétrons π necessários para satisfazer a regra de Huckel (KASHYAP *et al.*, 2012).

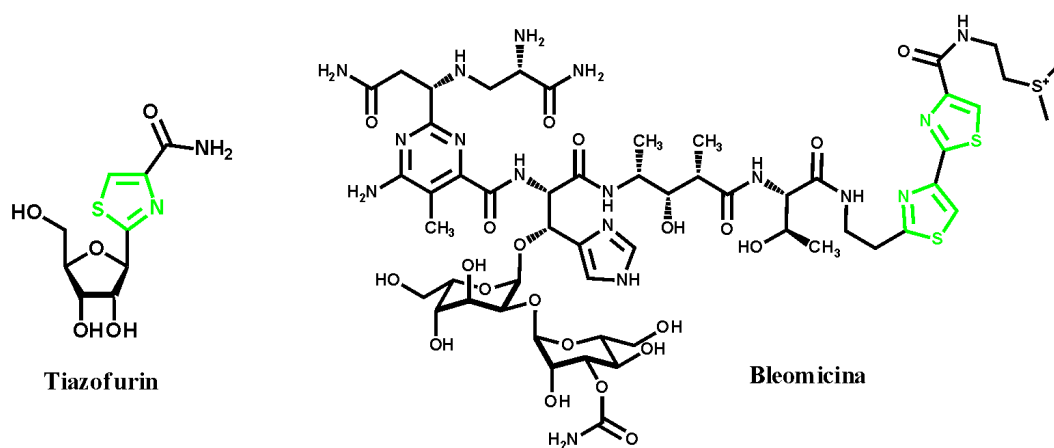
Figura 10 - Composição estrutural do núcleo tiazol



Fonte: O autor (2021).

Os tiazóis destacam-se pela potente ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia (LEFRANC *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2012; FALLAH-TAFTI *et al.*, 2011; ALIABADI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2005). Como exemplo de agentes antitumorais que apresentam tiazol em sua estrutura, podem ser citados o Tiazofurin e a Bleomicina (**Figura 11**) (KASHYAP *et al.*, 2012).

Figura 11 - Derivados do tiazol com atividade antitumoral.



Fonte: O autor (2021).

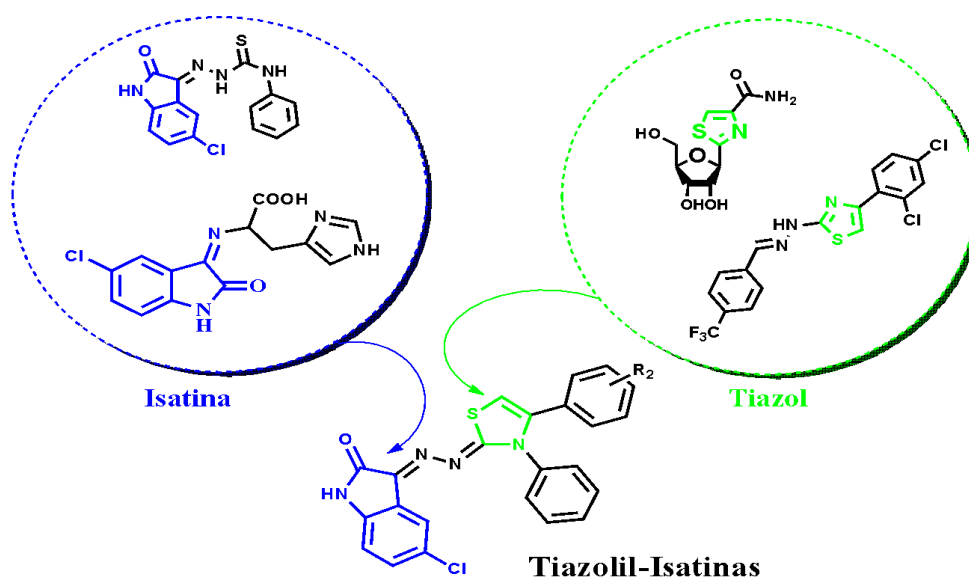
3.2 PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS

O planejamento das moléculas obtidas neste trabalho, foi feito partindo de moléculas anteriormente desenvolvidas pelo grupo LpQM. Foram norteadores os resultados obtidos dos derivados da 5-cloro-isatina sintetizados por Gomes (2016), no qual, isatina-tiossemicarbazonas com um fenil em N₄ apresentaram uma promissora atividade antitumoral. Dessa forma, o grupamento 5-cloro-isatina foi escolhido por ser responsável por um amplo espectro de atividades biológicas e recebendo destaque por sua atividade antineoplásica (SABET *et al.*, 2010). Tendo em vista a conhecida atividade antitumoral de derivados que contém o núcleo tiazol, esse grupamento farmacofórico também foi escolhido.

Vine e colaboradores (VINE *et al.*, 2009) mostraram que algumas isatinas substituídas apresentam ação anticancerígena sobre células humanas de linfoma histiocítico (U937), principalmente as isatinas halogenadas na posição C₅. Por esse motivo, foram obtidas isatinas com um halogênio nesta mesma posição.

Com os grupos farmacofóricos escolhidos, foi utilizada a estratégia química de hibridização molecular (**Figura 12**), onde duas estruturas bioativas distintas foram unidas em uma nova estrutura. Esta junção permite potencializar a atividade biológica. Foram utilizados vários substituintes químicos na posição C₄ do anel tiazol, como, por exemplo, grupo metil, metóxi, nitro e halogênios (F, Cl, Br), mantendo o grupo fenil em N₄, como sugerido no trabalho de Gomes (2016).

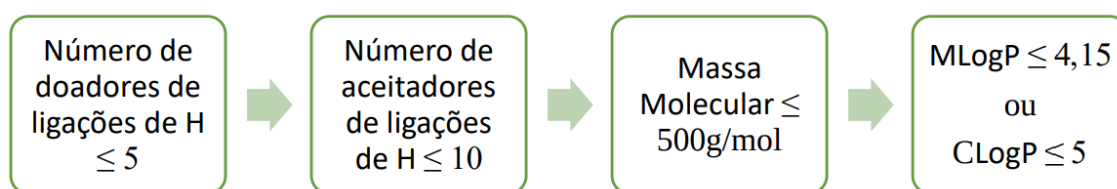
Figura 12 - Planejamento estrutural dos compostos da série LAB.



Fonte: O autor (2021).

As estruturas dos compostos planejados foram previamente analisadas segundo a “Regra dos 5” de Lipinski, *et al.* (1997). Esta regra descreve abordagens experimentais e computacionais para estimar a solubilidade e a permeabilidade nas configurações de fármacos em desenvolvimento. A “Regra dos 5” (Rule of 5) prevê que candidatos a bioativos devem apresentar quatro características físico-químicas que geralmente são comuns em fármacos ativos por via oral já existentes, apresentando resultados com valores múltiplos de cinco, como mostra a **Figura 13** e a **Tabela 1**.

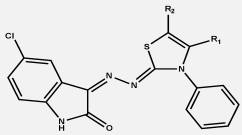
Figura 13 - Regra dos 5 proposta por Lipinski *et al.* (1997)



Fonte: O autor (2021).

Tabela 1 - Dados dos compostos planejados da série LAB aplicados à “Regra dos 5”

Estrutura Geral da Molécula	Ref.	R ₂	R ₃	Aceptores de H ≤ 10	Doadores de H ≤ 5	MLogP ≤ 4,15	Massa ≤ 500u
	LAB-1A	Ph	H	3	1	3,51	396,46
	LAB-1B	4-CH ₃ -Ph	H	3	1	3,72	410,49
	LAB-1C	4-OCH ₃ -Ph	H	4	1	3,17	426,49
	LAB-1D	3-NO ₂ -Ph	H	5	1	2,53	441,46
	LAB-1E	4-NO ₂ -Ph	H	5	1	2,53	441,46
	LAB-1F	4-F-Ph	H	4	1	3,88	414,45
	LAB-1G	4-Cl-Ph	H	3	1	3,98	430,91
	LAB-1H	2-Naph	H	3	1	4,15	446,52
	LAB-1I	4-Br-Ph	H	3	1	4,09	475,36
	LAB-1J	2,4-Cl-Ph	H	3	1	4,46	465,35
	LAB-1K	Cl-CH ₃	H	3	1	2,83	368,84
	LAB-1L	4-Ph-Ph	H	3	1	4,52	472,56
	LAB-1M	Ph	CH ₃	3	1	3,72	410,49
	LAB-1N	4-Br-Ph	CH ₃	3	1	4,29	489,39



LAB-2A	Ph	H	3	1	3,98	430,91
LAB-2B	4-CH ₃ -Ph	H	3	1	4,15	444,94
LAB-2C	4-OCH ₃ -Ph	H	4	1	3,65	460,94
LAB-2D	3-NO ₂ -Ph	H	5	1	3,00	475,91
LAB-2E	4-NO ₂ -Ph	H	5	1	2,53	441,46
LAB-2F	4-F-Ph	H	4	1	3,88	414,45
LAB-2G	4-Cl-Ph	H	3	1	3,98	430,91
LAB-2H	2-Naph	H	3	1	4,15	446,52
LAB-2I	4-Br-Ph	H	3	1	4,09	475,36
LAB-2J	2,4-Cl-Ph	H	3	1	4,46	465,35
LAB-2K	Cl-CH ₃	H	3	1	2,83	368,84
LAB-2L	4-Ph-Ph	H	3	1	4,52	472,56
LAB-2M	Ph	CH ₃	3	1	3,72	410,49
LAB-2N	4-Br-Ph	CH ₃	3	1	4,29	489,39

Valores obtidos através do site SwissADME

Os resultados da análise para os compostos planejados estão dispostos na **Tabela 1**. Foi observado que grande parte das estruturas se apresentam de acordo com todos os parâmetros da regra e apenas três compostos (LAB-2J, LAB-2L e LAB-2N) violaram apenas um parâmetro, que é aceitável segundo a regra de Lipinski.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Síntese e Caracterização

Para as reações, foram utilizados os solventes: hexano, acetato, etanol, isopropanol e DMF, provenientes das marcas Dinâmica, Cinética ou Química moderna. Já os reagentes: 4-fenil-3-tiossemicarbazida, 2-bromo-acetofenona, 2-bromo-4'-metil-acetofenona, 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona, 2-bromo-3'-nitro-acetofenona, 2-bromo-4'-nitro-acetofenona, 2-bromo-4'-fluoracetofenona, 2-bromo-4'-cloro-acetofenona, 2-bromo-2-acetonaftona, 2,4'-dibromoacetofenona, 2,2',4'-triclouroacetofenona, 1,3-dicloroacetona, 2-bromo-4'-fenilacetofenona, 2-bromo-propilfenona e 2,4'-dibromo-propilfenona, foram adquiridos das marcas Sigma Aldrich e Pro Químicos. O DMSO deuterado (DMSO-d₆) da marca Sigma-Aldrich foi utilizado para a realização de todos os RMNs.

O acompanhamento das reações foi realizado através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se por fase sílica-gel 60 da marca Alugram® com indicador fluorescente F₂₅₄. Para a leitura das placas cromatográficas foi utilizada uma câmara de radiação ultravioleta, com lâmpadas de 365 nm e 254 nm, da marca Vilber Lourmat. Para auxiliar nos processos reacionais foi utilizado chapas aquecedoras da marca Fisatom, modelo 752A. A aferição do ponto de fusão dos produtos obtidos foi feita através do equipamento fusiômetro da marca Fisatom, modelo 430D.

As análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (¹³C e ¹H e DEPT) foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, utilizando os instrumentos da Varian, modelo Unity Plus (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) e o equipamento da Bruker AMX (300 MHz para ¹H ; 75,5 MHz para ¹³C). Utilizou-se o tetrametilsilano como padrão e o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) como solvente. A análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) foi realizada no CETENE.

3.3.1.1 Síntese dos Intermediários LAB-Int1 e LAB-Int2

Em balão de fundo redondo, adicionou-se a respectiva isatina (indolina-2,3-diona ou 5-cloro-indolina-2,3-diona), a N-fenil-hidrazinacarbotioamida (na proporção 1:1), etanol (20 ml) e HCl (7 gotas, cat.). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 6 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado e submetido à lavagem com etanol e ciclo-hexano em sistema a vácuo. O funil sinterizado contendo o produto foi acondicionado em dessecador por 24h e então pesado para obtenção dos dados de rendimento reacional.

3.3.1.2 Síntese da série isatina-hidrazona-tiazóis LAB-1A à LAB-2N

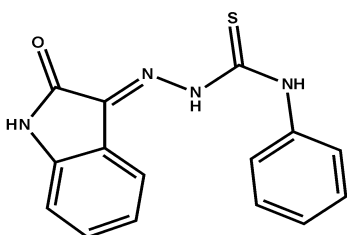
Em balão de fundo redondo, adicionou-se um dos dois intermediários (LAB-Int1 ou LAB-Int2), uma das α -halo-cetonas (2-bromo-acetofenona, 2-bromo-4'-metil-acetofenona, 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona, 2-bromo-3'-nitro-acetofenona, 2-bromo-4'-nitro-acetofenona, 2-bromo-4'-fluoracetofenona, 2-bromo-4'-cloro-acetofenona, 2-bromo-2-acetonaftona, 2,4'-dibromoacetofenona, 2,2',4'-tricloroacetofenona, 1,3-dicloroacetona, 2-bromo-4'-fenilacetofenona, 2-bromo-propilfenona e 2,4'-dibromo-propilfenona) (na proporção 1:1) e isopropanol (20 mL). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 24h horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado e submetido a lavagem com isopropanol e ciclo-hexano em sistema a vácuo. O funil sinterizado contendo o produto foi acondicionado em dessecador por 24h e então pesado para obtenção dos dados de rendimento reacional.

3.3.1.3 Caracterização Estrutural

A verificação da estrutura química das moléculas foi realizada através de análises espectroscópicas dos compostos finais (EMAR e RMN ^{13}C e ^1H). Além disso, também foram vistos o ponto de fusão (PF) destas moléculas.

3.3.1.4 Dados físico-químicos e elucidação estrutural

LAB-Int1: (*E*)-2-(2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida



Fórmula Molecular: C₁₅H₁₂N₄OS

Massa Molecular: 296,06 u.

Rendimento: 75%.

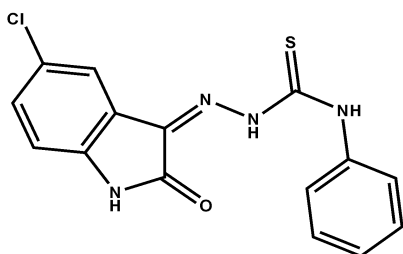
Ponto de Fusão: 246 °C.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 7.04 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.11 (t, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.25 (t, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.41 (m, 3H, ArH), 7.76 (m, 3H, ArH), 10.14 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH), 12.95 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 111.97 (CH, Ar), 121.16 (C-Ar), 121.95 (CH, Ar), 123.48 (CH, Ar), 125.29 (CH, Ar), 125.41 (CH, Ar), 126.68 (CH, Ar), 129.24 (CH, Ar), 129.24 (CH, Ar), 132.26 (CH, Ar), 132.53 (Ph-C-NH), 139.46 (C=N), 143.36 (C-NH, Ar), 163.63 (C=O), 177.44 (C=S).

EMAR: 296,07 [M + H]⁺

LAB-Int2: (*Z*)-2-(5-cloro-2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida



Fórmula Molecular: C₁₅H₁₁ClN₄OS

Massa Molecular: 330,79 u.

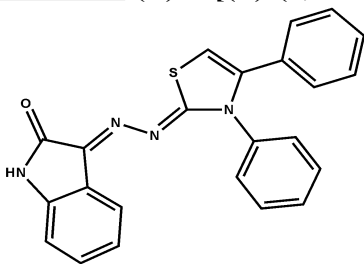
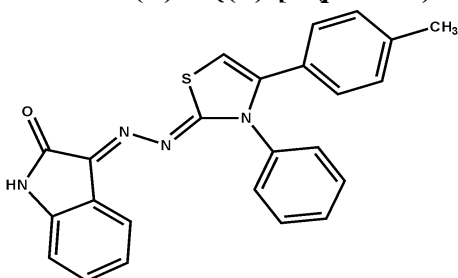
Rendimento: 80%.

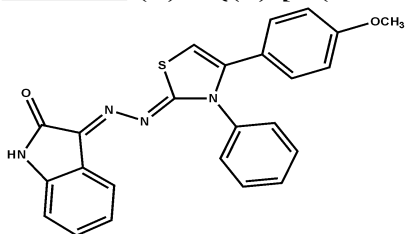
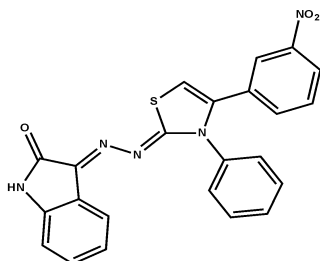
Ponto de Fusão: 255 °C.

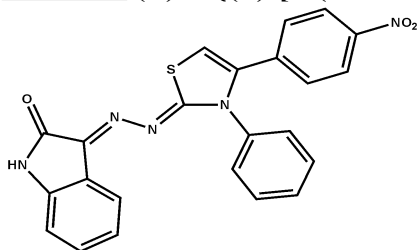
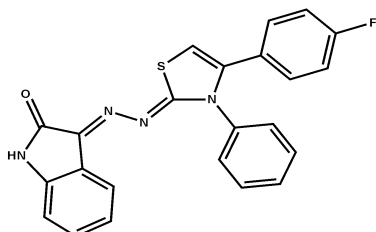
RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 7.29 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.37 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.39 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.44 (t, 2H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.61 (d, 2H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 10.88 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 12.61 (s, 1H, NH).

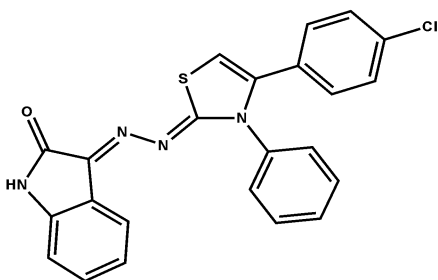
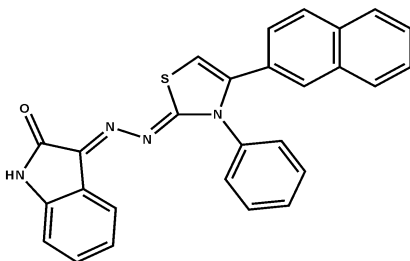
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 112.52 (CH, Ar), 120.98 (CH, Ar), 121.81 (C-Ar), 125.68 (CH, Ar), 125.68 (CH, Ar), 126.56 (CH, Ar), 126.22 (C-Cl, Ar), 128.43 (CH, Ar), 128.43 (CH, Ar), 130.56 (CH, Ar), 131.01 (C=N), 138.27 (Ph-C-NH), 141.10 (C-NH, Ar), 162.44 (C=O), 176.26 (C=S).

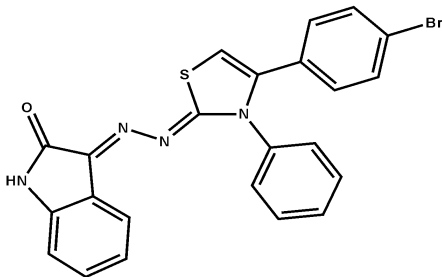
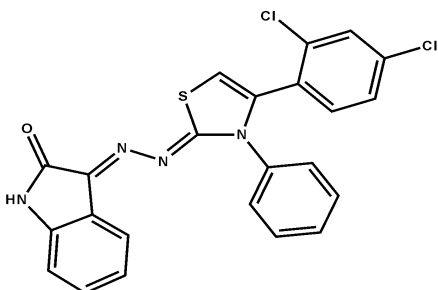
EMAR: 330,03 [M + H]⁺

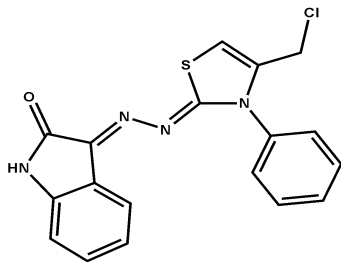
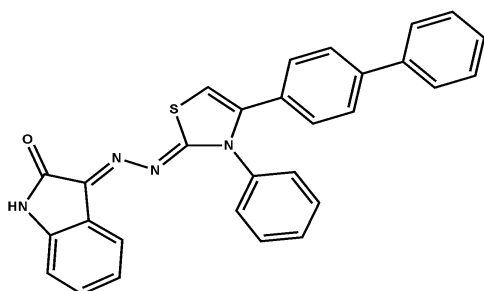
LAB-1A: (E)-3-[(Z)-(3,4-difeniltiazol-2-ilideno)-hidrazona]indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₆N₄OS**Massa Molecular:** 396,46 u.**Rendimento:** 78%.**Ponto de Fusão:** 267-268 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 6H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 104.39 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 117.56 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH, Ar), 142.55 (C-N, Ar), 165.88 (C=O), 176.53 (S-C=N).**EMAR:** 396,50 [M + H]⁺**LAB-1B: (E)-3-[(Z)-[4-(*p*-toluil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona]indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₈N₄OS**Massa Molecular:** 410,49 u.**Rendimento:** 81%.**Ponto de Fusão:** 277-278 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 3.32 (s, 3H, ArH), 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 21.18 (CH₃), 104.39 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH), 142.55 (C-N, Ar), 142.85 (C-NH, Ar), 165.88 (C=O), 176.53 (S-C=N).**EMAR:** 410,54 [M + H]⁺

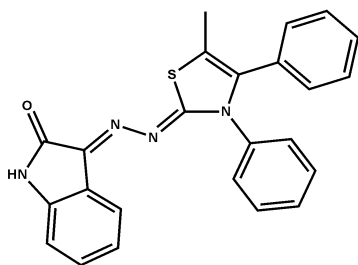
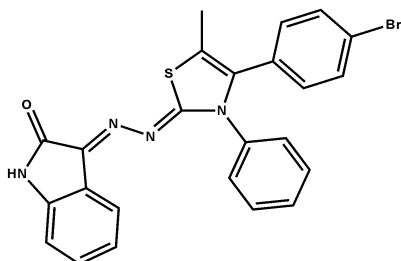
LAB-1C: (E)-3-{(Z)-[4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₈N₄O₂S**Massa Molecular:** 426,49 u.**Rendimento:** 81%.**Ponto de Fusão:** 244-245 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 3.72 (s, 3H, ArH), 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 55.43 (CH₃), 104.39 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH), 142.55 (C-N, Ar), 142.85 (C-O, Ar), 165.88 (C=O), 176.53 (S-C=N).**EMAR:** 426,79 [M + H]⁺**LAB-1D: (E)-3-{(Z)-[4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₅N₅O₃S**Massa Molecular:** 441,46 u.**Rendimento:** 96%.**Ponto de Fusão:** 278-279 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.66 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.75 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.15 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.27 (s, 1H, ArH), 7.51 (m, 8H, ArH), 8.13 (m, 2H, ArH), 10.49 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 107.74 (CH, tiazol), 109.70 (CH, Ar), 117.53 (CH, Ar), 117.53 (CH, Ar), 121.91 (CH, Ar), 121.91 (CH, Ar), 123.43 (CH, Ar), 123.43 (CH, Ar), 126.65 (CH, Ar), 128.09 (CH, Ar), 128.35 (CH, Ar), 128.84 (CH, Ar), 129.22 (CH, Ar), 129.67 (CH, Ar), 130.80 (CH, Ar), 136.09 (C, Ar), 136.76 (C, Ar), 138.26 (C=N), 142.56 (C-NH), 142.74 (C-N, Ar), 147.09 (C-NO₂, Ar), 165.28 (C=O), 175.78 (S-C=N).**EMAR:** 441,95 [M + H]⁺

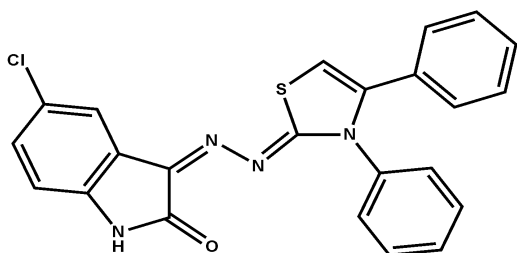
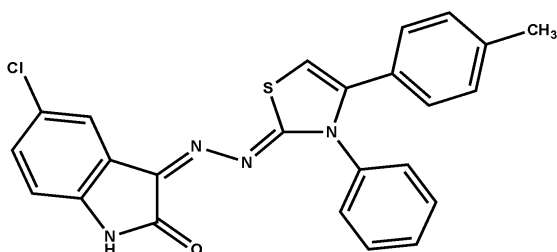
LAB-1E: (E)-3-[(Z)-[4-(4-nitro-fenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona]indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₅N₅O₃S**Massa Molecular:** 441,46 u.**Rendimento:** 90%.**Ponto de Fusão:** 286-287 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.66 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.75 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.15 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.27 (s, 1H, ArH), 7.51 (m, 8H, ArH), 8.13 (m, 2H, ArH), 10.49 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 107.74 (CH, tiazol), 109.70 (CH, Ar), 117.53 (CH, Ar), 117.53 (CH, Ar), 121.91 (CH, Ar), 121.91 (CH, Ar), 123.43 (CH, Ar), 123.43 (CH, Ar), 126.65 (CH, Ar), 128.09 (CH, Ar), 128.35 (CH, Ar), 128.84 (CH, Ar), 129.22 (CH, Ar), 129.67 (CH, Ar), 130.80 (CH, Ar), 136.09 (C, Ar), 136.76 (C, Ar), 138.26 (C=N), 142.56 (C-NH, Ar), 142.74 (C-N, Ar), 147.09 (C-NO₂, Ar), 165.28 (C=O), 175.78 (S-C=N).**EMAR:** 441,57 [M + H]⁺**LAB-1F: (E)-3-[(Z)-[4-(4-fluorofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona]indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₅FN₄OS**Massa Molecular:** 414,45 u.**Rendimento:** 93%.**Ponto de Fusão:** 260-261 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.03 (s, 1H, ArH), 7.25 (m, 2H, ArH), 7.35 (m, 3H, ArH), 7.49 (m, 6H, ArH), 10.46 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 105.07 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH, Ar), 142.55 (C-N, Ar), 160.91 (C-F, Ar), 165.85 (C=O), 176.36 (S-C=N).**EMAR:** 414,77 [M + H]⁺

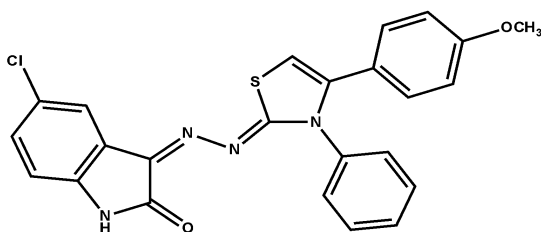
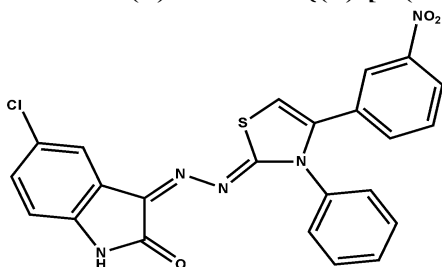
LAB-1G: (E)-3-{{(Z)-[4-(4-clorofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₅ClN₄OS**Massa Molecular:** 430,91 u.**Rendimento:** 83%.**Ponto de Fusão:** 257-258 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 105.16 (CH, tiazol), 109.62 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 142.13 (C-Cl, Ar), 142.43 (C-NH, Ar), 159.74 (C-N, Ar), 165.33 (C=O), 175.87 (S-C=N).**EMAR:** 430,80 [M + H]⁺**LAB-1H: (E)-3-{{(Z)-[4-(naftalen-2-il)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₇H₁₈N₄OS**Massa Molecular:** 446,52 u.**Rendimento:** 85%.**Ponto de Fusão:** 290-291 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 104.96 (CH, tiazol), 109.61 (CH, Ar), 117.64 (CH, Ar), 117.64 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.13 (CH, Ar), 121.13 (CH, Ar), 125.65 (CH, Ar), 126.56 (CH, Ar), 126.71 (CH, Ar), 127.00 (CH, Ar), 127.40 (CH, Ar), 128.00 (CH, Ar), 128.26 (CH, Ar), 128.47 (CH, Ar), 128.59 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 130.55 (C, Ar), 130.55 (C, Ar), 132.27 (C, Ar), 132.41 (C, Ar), 137.13 (C=N), 140.32 (C-NH, Ar), 142.42 (C-N, Ar), 165.37 (C=O), 175.99 (S-C=N).**EMAR:** 446,98 [M + H]⁺

LAB-1I: (E)-3-[(Z)-[4-(4-bromofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₅BrN₄OS**Massa Molecular:** 475,36 u.**Rendimento:** 89%.**Ponto de Fusão:** 282-283 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 105.16 (CH, tiazol), 109.62 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C-Br, Ar), 132.54 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 142.43 (C-NH, Ar), 159.74 (C-N, Ar), 165.33 (C=O), 175.87 (S-C=N).**EMAR:** 475,95 [M + H]⁺**LAB-1J: (E)-3-[(Z)-[4-(2,4-diclorofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₄Cl₂N₄OS**Massa Molecular:** 465,35 u.**Rendimento:** 80%.**Ponto de Fusão:** 278-279 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 5H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 104.39 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (CH, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 138.45 (C-Cl, Ar), 136.13 (C-Cl, Ar), 140.90 (C-NH, Ar), 142.49 (C-N, Ar), 165.37 (C=O), 175.16 (S-C=N).**EMAR:** 465,89 [M + H]⁺

LAB-1K: (E)-3-[(Z)-[4-(clorometil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₁₈H₁₃ClN₄OS**Massa Molecular:** 368,84 u.**Rendimento:** 81%.**Ponto de Fusão:** 274-275 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 74.26 (CH₂), 109.61 (CH, tiazol), 117.26 (CH, Ar), 121.06 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 126.53 (CH, Ar), 127.31 (CH, Ar), 127.31 (CH, Ar), 128.23 (CH, Ar), 128.74 (CH, Ar), 128.95 (CH, Ar), 129.71 (CH, Ar), 130.53 (C, Ar), 131.46 (C=N), 137.26 (C-NH, Ar), 140.90 (C-N, Ar), 165.08 (C=O), 174.99 (S-C=N).**EMAR:** 368,96 [M + H]⁺**LAB-1L: (E)-3-[(Z)-[4-(1,1-bifenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₉H₂₀N₄OS**Massa Molecular:** 472,56 u.**Rendimento:** 92%.**Ponto de Fusão:** 288-289 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 6H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 105.19 (CH, tiazol), 110.10 (CH, Ar), 110.74 (CH, Ar), 118.13 (CH, Ar), 120.83 (CH, Ar), 121.62 (CH, Ar), 122.20 (CH, Ar), 126.88 (CH, Ar), 126.56 (CH, Ar), 126.71 (CH, Ar), 127.00 (CH, Ar), 127.40 (CH, Ar), 128.00 (CH, Ar), 127.03 (CH, Ar), 128.32 (CH, Ar), 128.64 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.16 (CH, Ar), 129.66 (CH, Ar), 131.04 (CH, Ar), 137.66 (C, Ar), 139.29 (C, Ar), 140.62 (C, Ar), 140.85 (C, Ar), 141.16 (C=N), 142.71 (C-NH, Ar), 142.91 (C-N, Ar), 165.86 (C=O), 176.53 (S-C=N).**EMAR:** 472,65 [M + H]⁺

LAB-1M: (E)-3-{(Z)-[5-(metil)-3,4-difeniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₈N₄OS**Massa Molecular:** 410,49 u.**Rendimento:** 82%.**Ponto de Fusão:** 242-243 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 2.15 (s, 3H), 6.60 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.73 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.15 (m, 2H, ArH), 7.34 (m, 10H, ArH), 10.41 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 13.87 (CH₃), 110.00 (C, tiazol), 114.91 (C, Ar), 118.20 (CH, Ar), 121.54 (CH, Ar), 122.82 (CH, Ar), 126.09 (CH, Ar), 126.84 (CH, Ar), 128.78 (CH, Ar), 128.82 (CH, Ar), 128.82 (CH, Ar), 129.84 (CH, Ar), 129.84 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.39 (CH, Ar), 129.39 (CH, Ar), 130.77 (CH, Ar), 130.81 (C, Ar), 136.71 (C, Ar), 137.88 (C=N), 142.17 (C-NH, Ar), 142.71 (C-N, Ar), 165.92 (C=O), 176.80 (S-C=N).**EMAR:** 409,89 [M + H]⁺**LAB-1N: (E)-3-{(Z)-[5-(metil)-4-(4-bromofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₇BrN₄OS**Massa Molecular:** 489,39 u.**Rendimento:** 87%.**Ponto de Fusão:** 244-245 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 2.17 (s, 3H), 6.63 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.74 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.34 (m, 2H, ArH), 7.29 (m, 3H, ArH), 7.38 (m, 6H, ArH), 10.43 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 111.53 (C, tiazol), 115.58 (C, Ar), 118.17 (CH, Ar), 120.38 (CH, Ar), 121.56 (CH, Ar), 121.85 (CH, Ar), 122.82 (CH, Ar), 126.09 (CH, Ar), 126.09 (CH, Ar), 126.52 (CH, Ar), 126.86 (CH, Ar), 128.68 (CH, Ar), 128.82 (CH, Ar), 129.45 (CH, Ar), 130.91 (CH, Ar), 131.82 (CH, Ar), 132.74 (CH, Ar), 134.86 (C, Ar), 137.71 (C, Ar), 138.92 (C=N), 142.77 (C-NH, Ar), 142.95 (C-N, Ar), 165.88 (C=O), 176.80 (S-C=N).**EMAR:** 489,98 [M + H]⁺

LAB-2A: (Z)-5-cloro-3-[(Z)-(3,4-difeniltiazol-2-ilideno)-hidrazona]indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₅ClN₄OS**Massa Molecular:** 430,91 u.**Rendimento:** 90%.**Ponto de Fusão:** 288-289 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.76 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.09 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 7.43 (m, 6H, ArH), 10.56 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 104.39 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 117.56 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (C-Cl, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH, Ar), 142.55 (C-N, Ar), 165.88 (C=O), 176.53 (S-C=N).**EMAR:** 429,89 [M + H]⁺**LAB-2B: (Z)-5-cloro-3-[(Z)-[4-(p-toluil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₇ClN₄OS**Massa Molecular:** 444,94 u.**Rendimento:** 86%.**Ponto de Fusão:** 285-286 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 3.32 (s, 3H, ArH), 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 5H, ArH), 10.60 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 21.18 (CH₃), 104.39 (CH, tiazol), 110.64 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (C-Cl, Ar), 130.97 (C, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH), 142.55 (C-N, Ar), 142.85 (C-NH, Ar), 165.88 (C=O), 176.53 (S-C=N).**EMAR:** 445,03 [M + H]⁺

LAB-2C: (Z)-5-cloro-3-[(Z)-[4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona**Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₇ClN₄O₂S**Massa Molecular:** 460,94 u.**Rendimento:** 80%.**Ponto de Fusão:** 267-268 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 3.72 (s, 3H, ArH), 6.65 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.76 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.15 (m, 5H, ArH), 7.48 (m, 5H, ArH), 10.45 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 55.15 (CH₃), 105.03 (CH, tiazol), 111.55 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 118.14 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 121.59 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.02 (CH, Ar), 127.52 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.05 (CH, Ar), 129.34 (CH, Ar), 129.54 (C, Ar), 130.97 (C-Cl, Ar), 137.66 (C, Ar), 138.90 (C=N), 140.90 (C-NH), 152.55 (C-N, Ar), 142.85 (C-O, Ar), 165.16 (C=O), 176.56 (S-C=N). **EMAR:** 460,91 [M + H]⁺**LAB-2D: (Z)-5-cloro-3-[(Z)-[4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona****Fórmula Molecular:** C₂₃H₁₄ClN₅O₃S**Massa Molecular:** 475,91 u.**Rendimento:** 87%.**Ponto de Fusão:** 259-260 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 6.66 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.75 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.15 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.27 (s, 1H, ArH), 7.51 (m, 7H, ArH), 8.13 (m, 2H, ArH), 10.49 (s, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 107.74 (CH, tiazol), 109.70 (CH, Ar), 117.53 (CH, Ar), 117.53 (CH, Ar), 121.91 (CH, Ar), 121.91 (CH, Ar), 123.43 (CH, Ar), 123.43 (CH, Ar), 126.65 (CH, Ar), 128.09 (CH, Ar), 128.35 (CH, Ar), 128.84 (CH, Ar), 129.22 (CH, Ar), 129.67 (CH, Ar), 130.80 (C, Ar), 136.09 (C-Cl, Ar), 136.76 (C, Ar), 138.26 (C=N), 142.56 (C-NH), 142.74 (C-N, Ar), 147.09 (C-NO₂, Ar), 165.28 (C=O), 175.78 (S-C=N).**EMAR:** 475,94 [M + H]⁺

OBS: Não foram realizadas as demais análises de RMN devido ao fechamento da Central Analítica desde o início da pandemia de COVID-19.

3.3.2 Ensaios Biológicos

3.3.2.1 Cultura de células e ensaio de viabilidade em linhagens do câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7)

As duas linhagens celulares utilizadas neste trabalho (MDA-MB-231 e MCF-7) foram generosamente fornecidas pelo INSA (Intituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal). O DMEM utilizado para manter as células em cultura foi adquirido à Lonza (Portugal), assim como o FBS. O GlutaMax-I (100X) e o PenStrep foram adquiridos à Life Technologies (Portugal). O DMSO utilizado para dissolver os compostos foi adquirido à VWR e o MTT foi adquirido à AMRESCO (Portugal).

A citotoxicidade dos compostos foi testada em células do tipo epiteliais de câncer de mama MCF-7 e do tipo mesenquimais MDA-MB-231. Pelo teste de citotoxicidade é possível encontrar o índice de citotoxicidade (IC_{50}), no qual foi calculado a partir de uma curva dose-resposta resultante da representação gráfica do logaritmo da concentração individual de cada dose de composto contra a respectiva percentagem (%) de sobrevivência das células em cada dose. As células foram mantidas em DMEM com 10% de FBS, 1% de GlutaMax-I (100X), e 1% de penicilina e estreptomicina

Nos ensaios de viabilidade celular, foram utilizadas $1,5 \times 10^4$ células / poço com a linha MCF-7 e 1×10^5 células / poço com a linha MDA-MB-231, para cada placa de 96 poços. Cada composto foi testado em seis concentrações iniciais - 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M e 0,5 μ M (e posteriormente, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M e 0,0001 μ M) – diluídos em 1% de DMSO. O controle foi tratado com as mesmas condições. Estes compostos foram incubados durante 72 horas, a 37 °C. A viabilidade de células tumorais foi quantificada recorrendo ao ensaio do MTT, um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade. Após 72 horas de incubação, a solução de MTT foi adicionada a cada poço de modo a se obter uma concentração final de 0,5 mg/ml, e incubado durante 3 horas e 30 minutos para a linha MCF-7 e durante 4 horas para a linha MDA-MB-231.

Os cristais de formazan que se formaram foram diluídos em DMSO e a sua absorbância foi analisada a 570 nm no leitor de placas FLOUstar Leitor Omega MicroPlate Reader (BMG LABTECH; Alemanha). Os resultados obtidos foram analisados no Microsoft Excel 2016 ajustando os dados a uma curva sigmoidal, característica de uma curva dose-resposta, para determinar o valor de IC_{50} .

3.3.2.2 *Imunocitoquímica de P-gp, Akt2 e VIM*

Para avaliar a interação da glicoproteína P (P-gp) de efluxo de membrana com os dois compostos selecionados, 5×10^4 células / poço foram usadas para MDA-MB-231 tipo mesenquimal e $1,5 \times 10^6$ células / poço para MFC-7 tipo epitelial. Ambas as linhas celulares foram incubadas com [0,25 μ M] do composto 2A e 2C por 72 horas. As mesmas condições foram usadas para estudar o efeito farmacológico dos compostos mencionados em Akt2 e proteína mesenquimal VIM. Após a fixação das células com 4% de PFA, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 e bloqueadas com 1% de BSA. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário P-gp por 45 minutos, e anticorpo primário VIM e Akt2 durante a noite, após o que o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 e Alexa Fluor 488 foram incubados por 45 minutos em temperatura ambiente. As células foram contrastadas com DAPI por 20 minutos, lavadas em metanol e montadas em meio de montagem DPX. As células foram observadas em microscópio confocal AxioScoop.A1 acoplado a Zeiss AxioCam HR (ZEISS; Alemanha) e as imagens foram tratadas com software ZEN (ZEISS; Alemanha).

3.3.2.2 *Análise de expressão de mRNA de P-gp, Akt2 e VIM*

Para verificar o efeito dos compostos selecionados na modulação da expressão de Akt2, VIM e P-gp, 3×10^6 células / poço foram usadas para MDA-MB-231 tipo mesenquimal e 6×10^5 células / poço para MFC-7 tipo epitelial. Ambas as linhas celulares foram incubadas com [0,25 μ M] do composto LAB-2A e LAB-2C por 72 horas. Após a incubação, as células foram colhidas para extração de mRNA total seguindo as instruções do fabricante fornecidas no Kit de isolamento NZY Total RNA. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 μ g de RNA total e usando NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit, de acordo com as instruções do fabricante. A PCR em tempo real foi realizada no ABI Prism 7300 Sequence Detection System, usando NZY qPCR Green Master Mix (2x), ROX plus e primers específicos para os genes de interesse (VIM – Avançado: 5'-CGGGAGAAATTGCAGGAGGA-3'; Reverso: 5'-AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'; P-gp - Avançado: 5'-GCAATAGCTGAAGAGGTCTGG-3'; Reverso: 5'-CCCATACCAGAAGGCCAGAGC-3'; Akt2-Avançado: 5'-CTCAGCATCAACTGG CAGGA-GATGA-3'; Akt2-Reverso: 5'-GTCAGCATCAACTGGCAGGAGATGA-3';) e o gene de controle interno (β -actina - avançado: 5'-ACAGAGCCTCGCCTTTGCC-3'; Reverso: 5'-GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG-3'). Triplicados técnicos de cada

experimento e duplicatas de cada amostra foram avaliados em todos os casos. A quantificação foi realizada pelo método da curva padrão relativa (AACT, Applied Biosystems® da Life Technologies™, EUA). A diferença entre os valores das células tratadas e não tratadas foi avaliada pelo teste t de Student não pareado, onde * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ indicam uma diferença significativa.

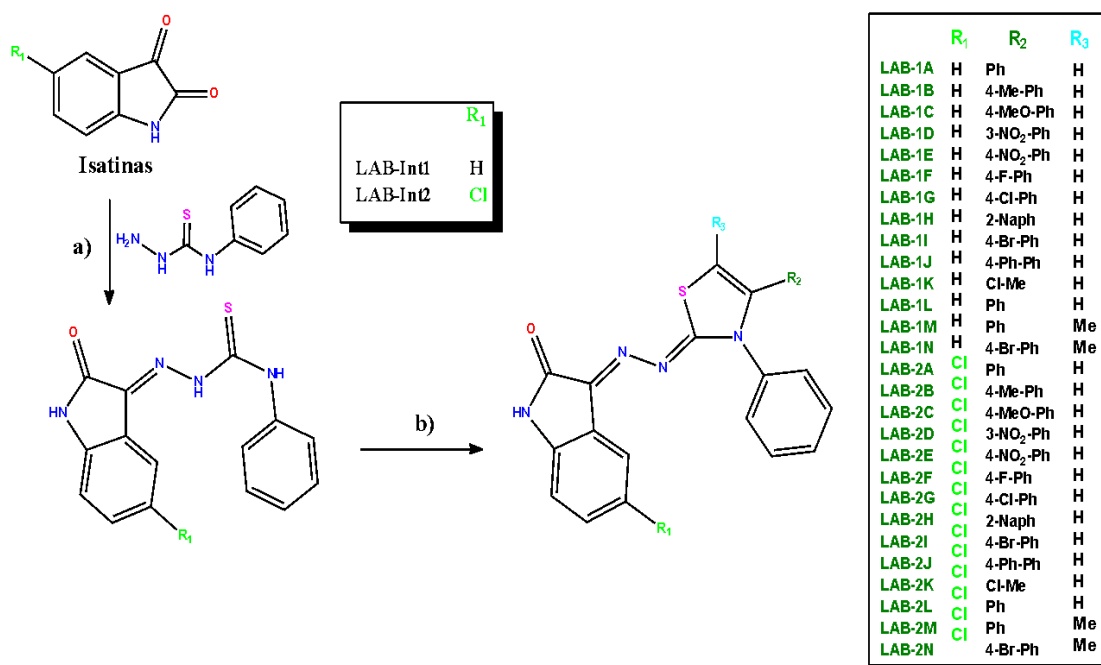
3.4 RESULTADOS

3.4.1 Síntese e Caracterização

3.4.1.1 Obtenção da Série Química LAB

Todos os compostos da série foram obtidos por meio de uma metodologia simples, em duas etapas. Inicialmente foram obtidos dois compostos intermediários (tiossemicarbazonas). Após essa reação inicial, os dois intermediários foram condensados com diferentes α -halo-cetonas, obtendo-se os tiazóis (**Figura 14**).

Figura 14 - Esquema geral da síntese da série LAB



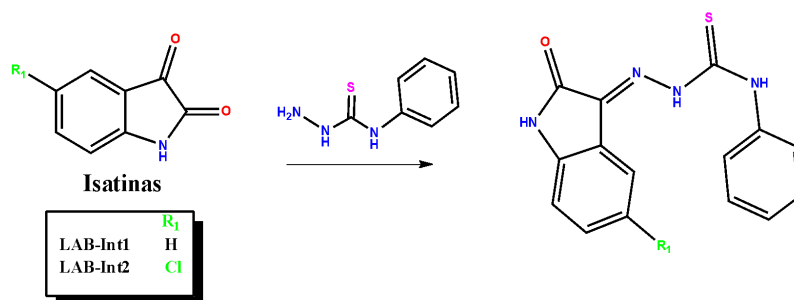
Reagentes e condições: a) Etanol, HCl, refluxo, 6h. b) respectivas α -halocetonas, isopropanol, refluxo, 24h.

Fonte: O autor (2021)

Para a obtenção do composto intermediário foi utilizada uma metodologia semelhante à de Karah, que trabalhou com derivados da isatina em 2002. Neste trabalho, Karah reagiu derivados da isatina com a tiossemicarbazida e obteve tiossemicarbazonas com altos rendimentos. A síntese é realizada em solução etanólica, sob refluxo, na presença de catalisador ácido (KARAH, 2002).

Tendo como base esta metodologia, foram obtidos os compostos intermediários (LAB-Int1 e LAB-Int2) reagindo-se a isatina ou a 5-cloro-isatina com a fenil-tiossemicarbazida, ambas obtidas comercialmente (**Figura 15**). As reações duraram em torno de seis horas e o rendimento foi de 75% e 80%, respectivamente.

Figura 15 - Esquema de síntese dos compostos intermediários da série LAB



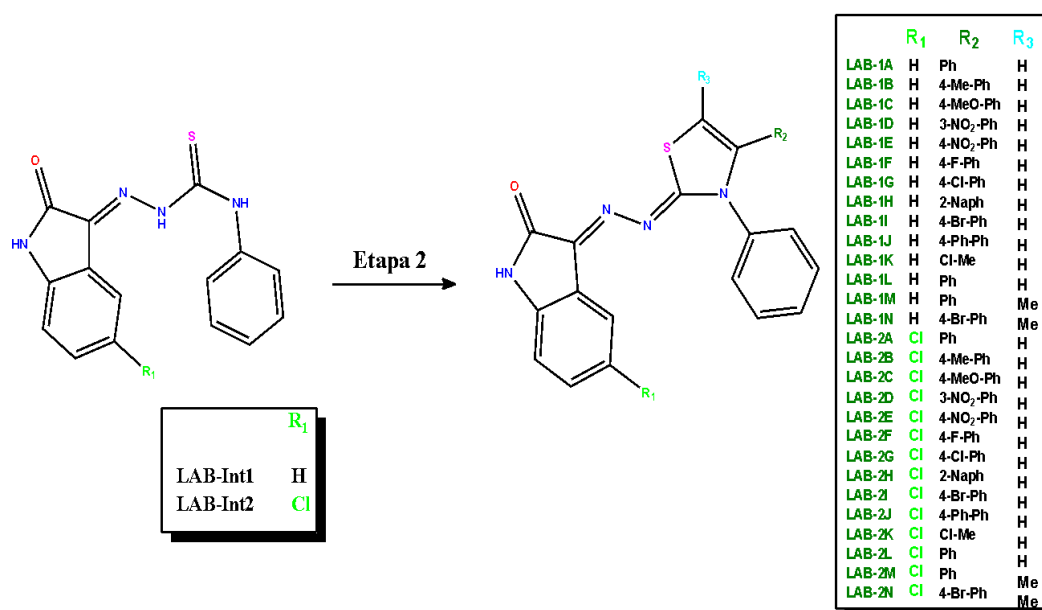
Reagentes e condições: a) Etanol, HCl, refluxo, 6h.

Fonte: O autor (2021)

A segunda etapa da síntese aqui proposta consistiu na obtenção dos tiazóis que compõem a série LAB (**Figura 16**). Cada um desses intermediários foi condensado com 14 diferentes α -halo-cetonas, seguindo-se a metodologia desenvolvida por Hantzsch em 1887 (SOUZA *et al.*, 2005). Nesta metodologia as reações são desenvolvidas em agitação magnética sob refluxo.

As tiossemicarbazonas, na presença de α -halogeno-cetonas, funcionam como agentes nucleófilos na síntese de tiazóis. Isto acontece porque as α -halogeno-cetonas são muito reativas frente ao grupo tioamida nucleofílico presente nas tiossemicarbazonas e, conseqüentemente, levam à ciclocondensação para formar o heterociclo (TENÓRIO; GÓES, 2005).

Figura 16. Esquema de síntese dos tiazóis da série LAB



Reagentes e condições: a) respectivas α -halocetonas, isopropanol, refluxo, 24h.

Fonte: Elaborado pelo autor

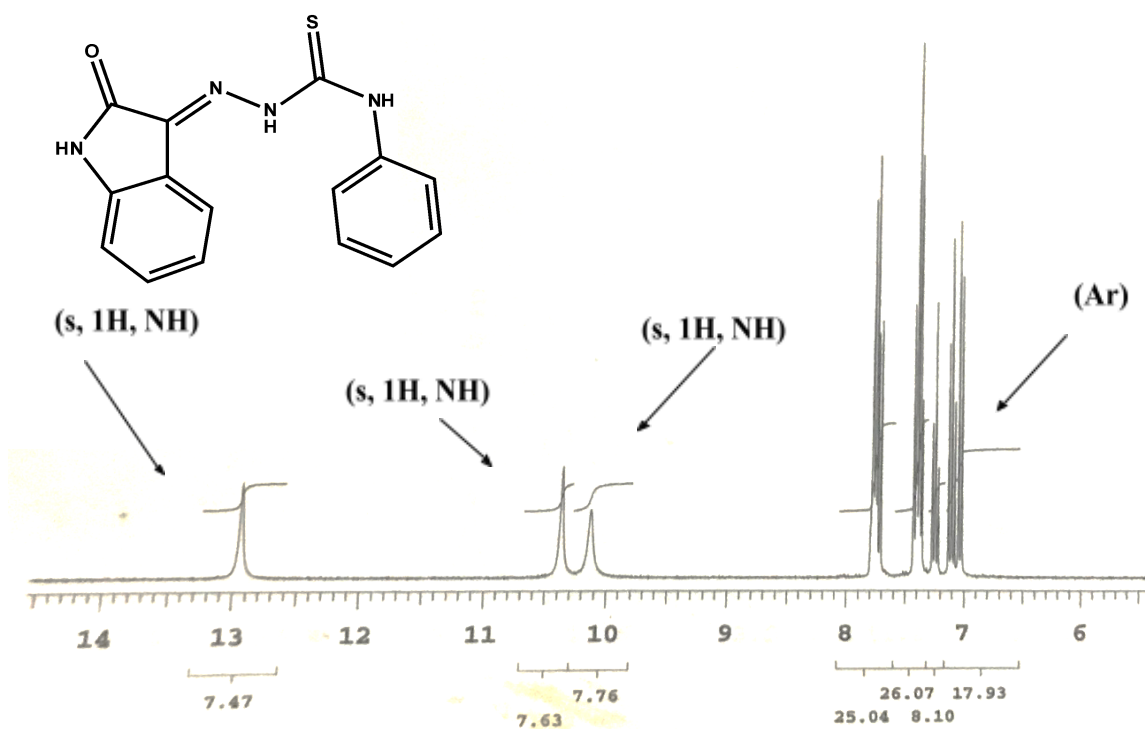
3.4.1.2 Caracterização estrutural da série LAB

Todos os compostos obtidos foram estruturalmente caracterizados utilizando-se as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ^1H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) e Espectrometria de Massas. A seguir, será detalhado o processo de caracterização dos intermediários e da série final de tiazóis.

Caracterização dos intermediários LAB-Int1 e LAB-Int2

Para representar a caracterização dos compostos intermediários LAB-Int1 e LAB-Int2, o composto LAB-Int1 foi escolhido como representante estrutural. A **Figura 17** apresenta os valores do espectro de RMN ^1H do composto LAB-Int1, onde foi constatada a presença de um duplete em torno de 7.04 ppm, integrando para um hidrogênio, referente a um hidrogênio aromático. Em 7.11 ppm é observado um tripleto integrando para um hidrogênio, que também corresponde a um hidrogênio aromático. Assim como em 7.25 ppm também é observado um tripleto integrando para um hidrogênio de anel aromático. Dois multipletos para três hidrogênios de anel aromático são identificados em 7.41 e 7.76 ppm. Três sinais largos, em 10.14 ppm, 10.37 e o último em 12.95 ppm, correspondem aos hidrogênios das três aminas secundárias (NH).

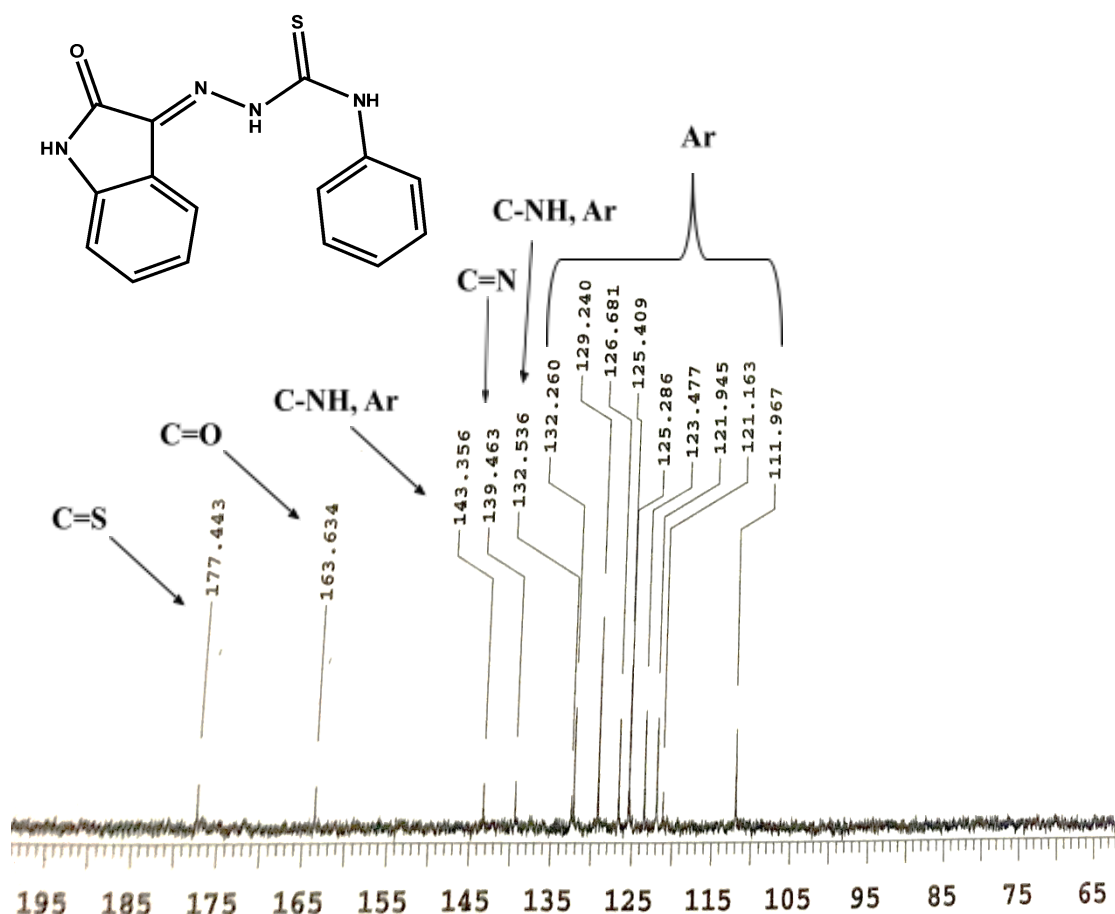
Figura 17 - Espectro de RMN ^1H para a molécula LAB-Int1.



Fonte: O autor (2021)

Para confirmação dos carbonos presentes na molécula LAB-Int1, foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (**Figura 18**). Os picos na faixa de 111.97 e 132.26 ppm correspondem aos carbonos aromáticos da molécula. O pico em 132.54 ppm corresponde ao carbono do fenil que está ligado ao NH. O pico em 139.46 ppm corresponde ao C=N. O pico em 143.36 ppm corresponde ao carbono aromático que está ligado ao NH na porção isatina. Em 163.63 ppm encontra-se o pico correspondente ao carbono da carbonila. Já em 177.44 ppm está o pico característico do C=S.

Figura 18 - Espectro de RMN ^{13}C para a molécula LAB-Int1.



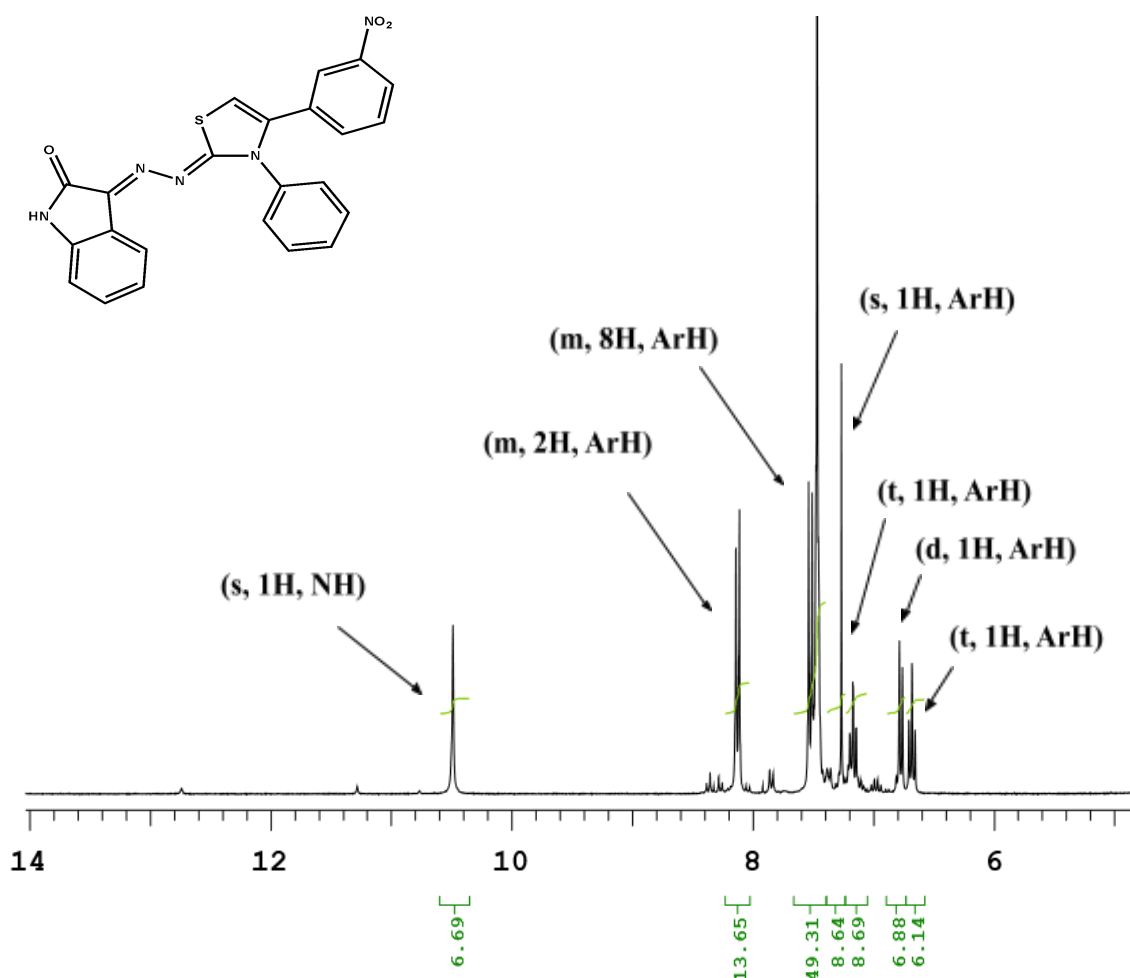
Fonte: O autor (2021)

Caracterização dos tiazóis da série LAB

Para representar a caracterização dos compostos finais, foi escolhido o composto LAB-1D. A **Figura 19** apresenta os valores do espectro de RMN ^1H do composto LAB-1D, onde foi constatada a presença de um tripleto integrando para um hidrogênio em 6.66 ppm, correspondente a um hidrogênio do anel aromático. Um duplete integrando para um hidrogênio, foi identificado em 6.75 ppm e um tripleto integrando para um hidrogênio, foi

identificado em 7.15 ppm. Em 7.27 ppm encontra-se um singlete integrando para um hidrogênio aromático, sinal característico para indicar a formação do anel tiazol. Em 7.51 ppm observa-se um multiplete referente a oito hidrogênios aromáticos, e em 8.13 ppm observa-se um multiplete referente aos dois hidrogênios aromáticos próximos ao grupo nitro. Em 10.49 ppm aparece o singlete referente ao hidrogênio da amina secundária (NH).

Figura 19 - Espectro de RMN ^1H para a molécula LAB-1D.

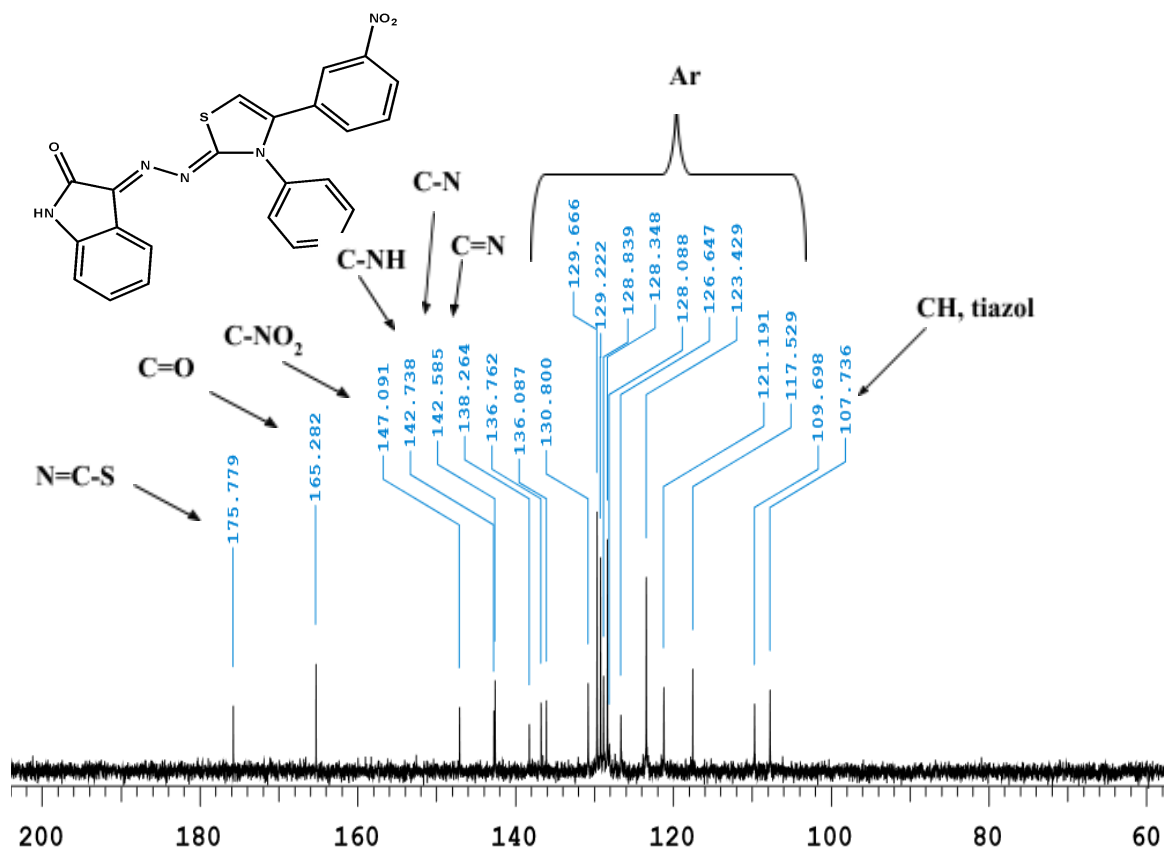


Fonte: O autor (2021)

Para confirmação dos carbonos presentes na molécula LAB-1D, foi utilizada a Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (**Figura 20**). O pico em 107.74 é o sinal característico para indicar a formação do anel de tiazol. Os picos entre 109.70 e 130.80 ppm correspondem a carbonos aromáticos. Os picos em 136.09 e 136.76 ppm correspondem a dois carbonos quaternários aromáticos. O pico em 138.26 ppm corresponde ao C=N. Em 142.56

ppm está o C-N do fenil e em 142.74 ppm está o C-NH aromático. Em 147.09 ppm observa-se o carbono quaternário aromático ligado ao nitro. Em 165.28 ppm está o carbono da carbonila (C=O). Por fim, o pico em 175.78 ppm corresponde ao carbono ligado ao nitrogênio e ao enxofre (N=C-S).

Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C para a molécula LAB-1D.



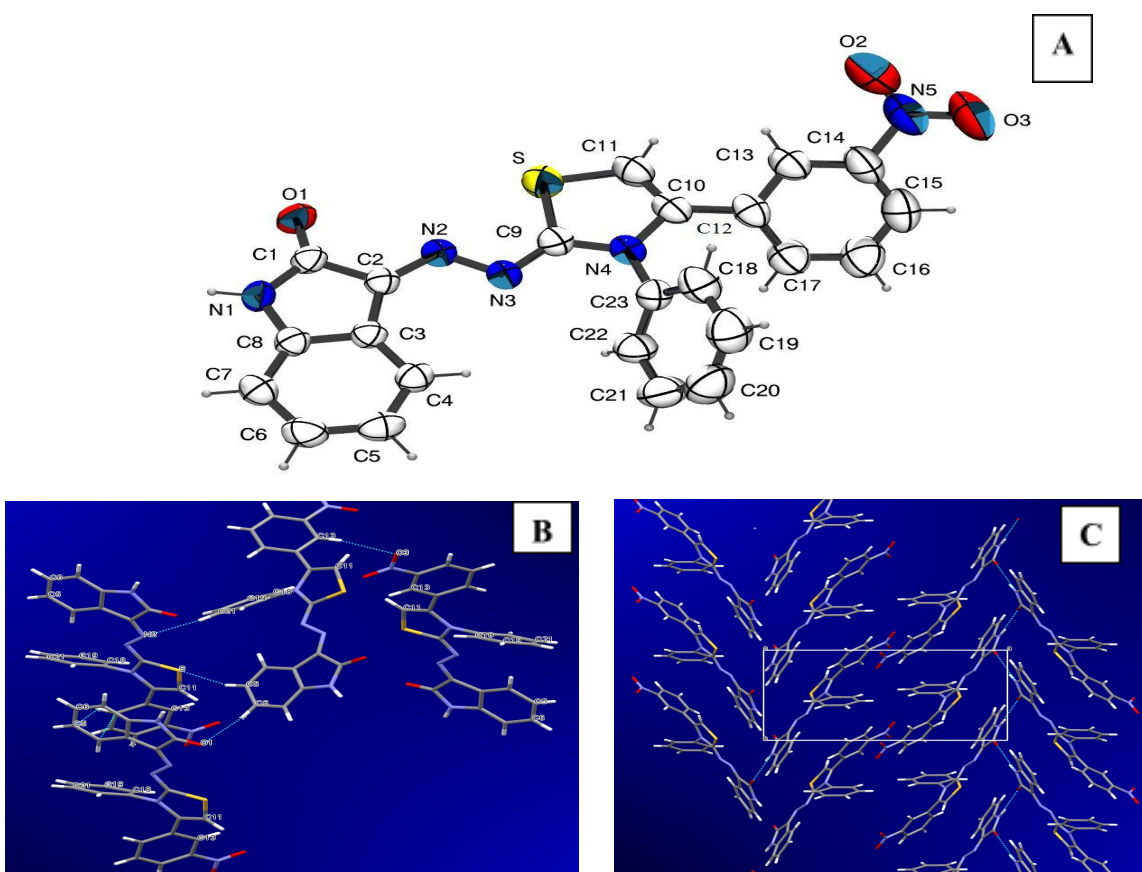
Fonte: O autor (2021)

Além dessas análises, também foi possível realizar uma análise cristalográfica por Difração de Raios X, utilizando cristais obtidos dos compostos LAB-1D e LAB-2C. Com essa técnica foi possível confirmar a estrutura dos compostos obtidos e observar a configuração espacial dos mesmos.

A estrutura de cristal de raios-X de (*E*)-3-{(Z)-[4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2-ilideno]-hidrazona}indolin-2-ona (LAB-1D) é mostrada na **Figura 21**. Com esta técnica foi possível confirmar a não-planaridade do composto LAB-1D. A distribuição espacial em torno da dupla ligação entre o carbono C2 do núcleo isatina e o nitrogênio N2 apresenta configuração *E*. Já a configuração espacial em torno da dupla ligação do nitrogênio N3 e o carbono C9 do núcleo tiazol é *Z* (**Figura 21A**).

O arranjo da molécula na célula unitária resultando no empacotamento cristalino é mostrado na **Figura 21B**. É possível observar algumas fortes interações de hidrogênio entre moléculas, tais como: carbono hidrogênio C21 com N2, carbono C6 hidrogênio com O1, carbono C13 hidrogênio com O3, carbono C6 hidrogênio com S (**Figura 21C**).

Figura 21 - Cristalografia da molécula LAB-1D.

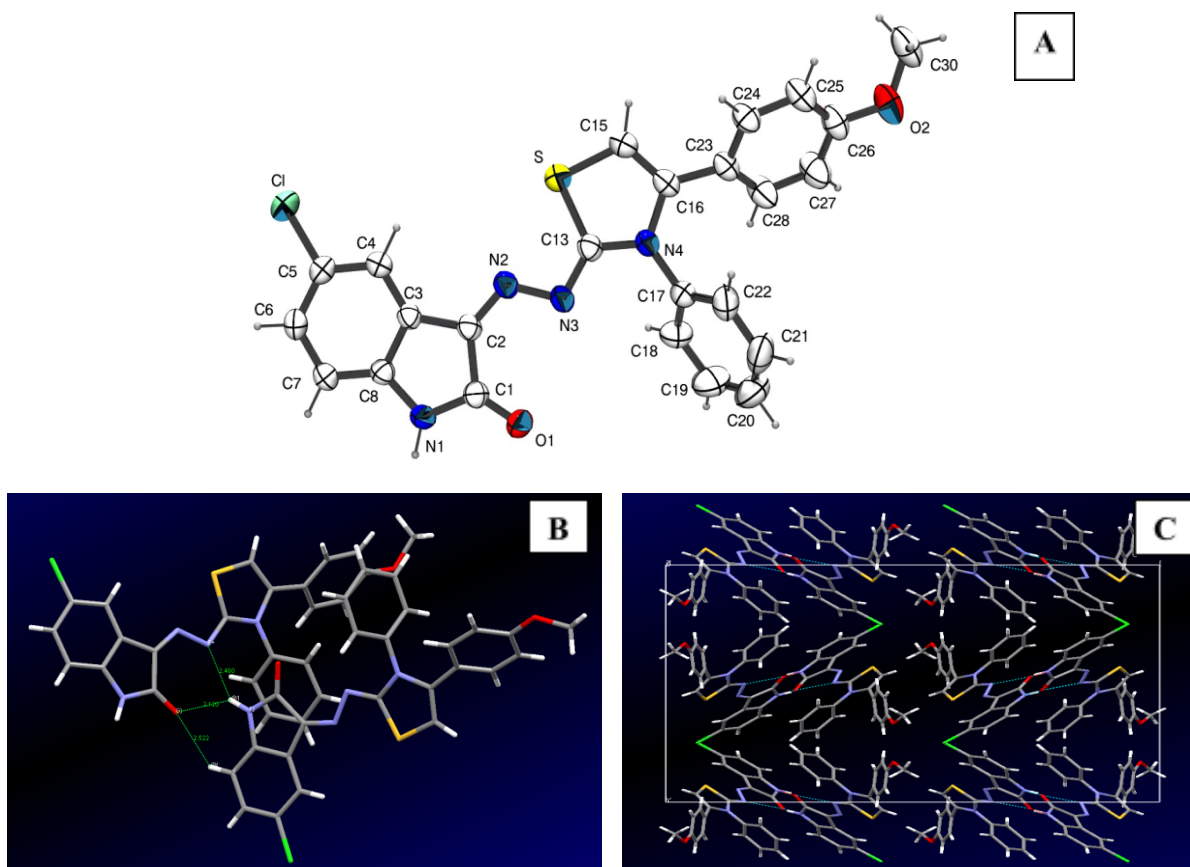


(A) Projeção ORTEP-3 da molécula com elipsoides de vibração térmica com 50%; (B) Interações fortes de Hidrogênio que facilitam a formação de cristais; (C) Disposição da molécula na célula unitária resultando em um empacotamento cristalino.

A estrutura de cristal de raios-X de (Z)-5-cloro-3-{(Z)-[4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2-ilideno] hidrazona} indolin-2-ona (LAB-2C) é mostrado na **Figura 22**. A distribuição espacial em torno da dupla ligação entre o carbono C2 do núcleo isatina e o nitrogênio N2 apresenta configuração Z. A configuração espacial em torno da dupla ligação entre o nitrogênio N3 e o carbono C13 do núcleo tiazol também é do tipo Z. Assim, a presença do átomo cloro na molécula da isatina faz com que os tiazóis derivados da 5-cloro-isatina possuam uma configuração diferente dos tiazóis derivados da isatina. Também foi observada a não-planaridade da molécula (**Figura 22A**).

O arranjo da molécula na célula unitária resultando no empacotamento cristalino é mostrado na **Figura 22B**. É possível observar, também, as mesmas fortes interações de hidrogênio entre moléculas, que ocorreram na molécula LAB-1D, tais como: carbono C21 com N2, carbono C6 hidrogênio com O1, carbono C13 hidrogênio com O3, carbono C6 hidrogênio com S (**Figura 22C**).

Figura 21 - Cristalografia da molécula LAB-2C.



(A) Projeção ORTEP-3 da molécula com elipsóides de vibração térmica com 50%; (B) Interações fortes de Hidrogênio que facilitam a formação de cristais; (C) Disposição da molécula na célula unitária resultando em um empacotamento cristalino.

3.4.2 Ensaios Biológicos

3.4.2.1 Avaliação da atividade antitumoral da série LAB

Primeiramente foi determinado a porcentagem de inibição nas duas linhagens de células do câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) para concentrações de 10 μM (dose máxima) e 1 μM (dose mínima). A seleção dos compostos ativos foi baseada no valor percentual de viabilidade celular obtido na maior concentração testada, que deve ser $\leq 10\%$

para ambas as linhagens celulares (**Tabela 2**). Os quatro compostos ativos (LAB-Int2, LAB-2A, LAB-2C e LAB-2D) foram selecionados com base na porcentagem de viabilidade celular obtida na concentração mais alta testada ($\leq 10\%$ para ambas as linhas celulares).

Tabela 2 - Porcentagem de proliferação ($\pm 0,02$) dos compostos para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231

Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	MCF-7		MDA-MB-231	
				10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M
LAB-Int1	H	-	-	18%	51%	54%	81%
LAB-1A	H	Ph	H	2.6%	76%	6%	98%
LAB-1B	H	4-Me-Ph	H	1.7%	69%	2.1%	76%
LAB-1C	H	4-MeO-Ph	H	52%	99%	47%	82%
LAB-1D	H	3-NO ₂ -Ph	H	44%	61%	44%	83%
LAB-1E	H	4-NO ₂ -Ph	H	10%	76%	57%	90%
LAB-1F	H	4-F-Ph	H	78%	65%	20%	94%
LAB-1G	H	4-Cl-Ph	H	5%	23%	17%	100%
LAB-1H	H	2-Naph	H	8%	52%	36%	74%
LAB-1I	H	4-Br-Ph	H	6%	68%	16%	86%
LAB-1J	H	2,4-diCl-Ph	H	7%	53%	34%	100%
LAB-1K	H	Cl-Me	H	71%	67%	87%	115%
LAB-1L	H	4-Ph-Ph	H	27%	53%	14%	77%
LAB-1N	H	Ph	Me	7%	93%	37%	71%
LAB-Int2	Cl	-	-	6.30%	63%	8%	83%
LAB-2A	Cl	Ph	H	2%	66%	5%	73%
LAB-2B	Cl	4-MeO-Ph	H	5%	39%	60%	58%
LAB-2C	Cl	3-NO ₂ -Ph	H	6.50%	71%	8%	81%
LAB-2D	Cl	3-NO ₂ -Ph	H	9.70%	76%	7.50%	90%
LAB-2E	Cl	4-NO ₂ -Ph	H	17%	89%	10%	96%
LAB-2F	Cl	4-F-Ph	H	19%	44%	22%	58%
LAB-2G	Cl	4-Cl-Ph	H	20%	50%	7%	79%
LAB-2H	Cl	2-Naph	H	25.90%	68%	13%	90%
LAB-2I	Cl	4-Br-Ph	H	12.80%	82%	7%	84%
LAB-2J	Cl	2,4-diCl-Ph	H	23%	81%	36%	63%
LAB-2K	Cl	Cl-Me	H	85%	91%	79%	83%
LAB-2L	Cl	4-Ph-Ph	H	48%	74%	34%	94%
LAB-2M	Cl	Ph	Me	64%	100%	49%	96%
LAB-2N	Cl	4-Br-Ph	Me	41%	46%	44%	85%

De acordo com o valor de IC₅₀ obtido (**Tabela 3**), o composto LAB-Int2 apresentou valores semelhantes para ambas às linhagens celulares ($11,42 \pm 1,02$ vs $15,60 \pm 4,95$). Os

compostos LAB-2A e LAB-2C foram os únicos que apresentaram um valor de IC_{50} semelhante para células MCF-7 ($0,45 \pm 0,01$ vs $0,45 \pm 0,25$, respectivamente) e para células MDA-MB-231 ($1,39 \pm 0,15$ vs $1,23 \pm 0,33$, respectivamente). Com base nesse valor de IC_{50} , selecionamos os dois compostos cujo valor de $IC_{50} \leq [1,5 \mu M]$ para ambas as linhas celulares. Assim, apenas dois compostos corresponderam a este critério (LAB-2A e LAB-2C). A atividade biológica desses compostos foi avaliada a partir do seu impacto em proteínas de membrana envolvidas na quimiorresistência, como a P-gp, e em proteínas de sinalização tumorigênica.

Tabela 3 - Valores de IC_{50} (μM) (\pm SD) para os compostos selecionados

Composto	MCF-7*	MDA-MB-231*
LAB-Int2	11.42±1.02	15.60±4.95
LAB-2A	0.45±0.01	1.39±0.15
LAB-2C	0.45±0.25	1.23±0.33
LAB-2D	1.76±0.08	1.58±0.33

*Após 72h de incubação

3.4.2.2 Avaliação frente à atividade de efluxo de drogas da glicoproteína P

No planejamento de compostos com potencial anticâncer, o objetivo é garantir sua localização nos compartimentos celulares e obter proteção contra a atividade de efluxo da glicoproteína P (P-gp). Para avaliar a resposta da membrana celular quando em contato com os dois compostos selecionados, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram incubadas com $0,25 \mu M$ do composto LAB-2A e LAB-2C por 72 horas. A expressão de P-gp está altamente associada a uma diminuição na taxa de sobrevivência em vários tipos de cânceres, principalmente o câncer de mama. Um aumento da expressão deste transportador resulta em resistência a vários medicamentos anticâncer (ROBINSON & TIRIVEEDHI, 2020).

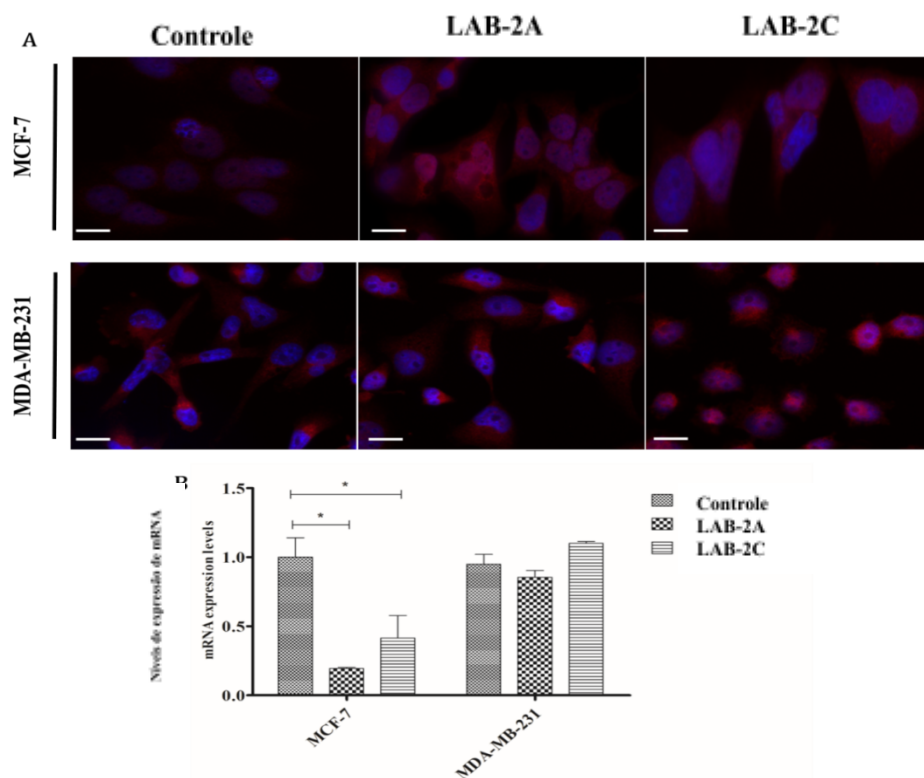
Após a incubação com o composto LAB-2A e LAB-2C, os níveis basais da proteína P-gp não mudaram nas células da linhagem MDA-MB-231 (**Figura 16A**), nem os níveis de expressão de mRNA (**Figura 16B**). Essas mesmas observações foram relatadas por Ronbinson e colaboradores (2020), no qual moléculas com diferentes estruturas químicas, tanto cíclicas ou lineares, eram muito suscetíveis à atividade de efluxo de transporte da P-gp (SINGH *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2018).

Um resultado diferente foi encontrado para as células MCF-7, visto que os compostos LAB-2A e LAB-2C diminuíram significativamente os níveis de expressão de mRNA da P-gp nessa linhagem em 4 e 2 vezes, respectivamente (**Figura 23B**). Porém, os níveis basais da

proteína P-gp aumentaram após 72 horas de incubação com ambos os compostos (**Figura 23A**), sugerindo que qualquer um dos compostos foi mais eficaz em células do tipo epitelial (MCF-7) do que nas do tipo mesenquimal (MDA-MB-231). Este aparente caráter de indução do gene da P-gp também foi observado por outros autores (Souza *et al.*, 2019; Ihnat *et al.*, 1997). Pode-se supor que os compostos levam à interrupção da troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, resultando em um aumento nos níveis de cálcio citoplasmático que, por sua vez, modula a calmodulina e aumenta a expressão da P-gp (SULOVIĆ *et al.*, 2009).

Tendo em vista que o gene da P-gp é indutível, a sua expressão pode ser modulada por diferentes fármacos, um maior acúmulo intracelular de cada composto, como resultado de uma maior concentração testada, poderia suprimir a expressão do transportador de efluxo em células MDA-MB-231.

Figura 23 - Expressão de P-gp em células MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com LAB-2A e LAB-2C

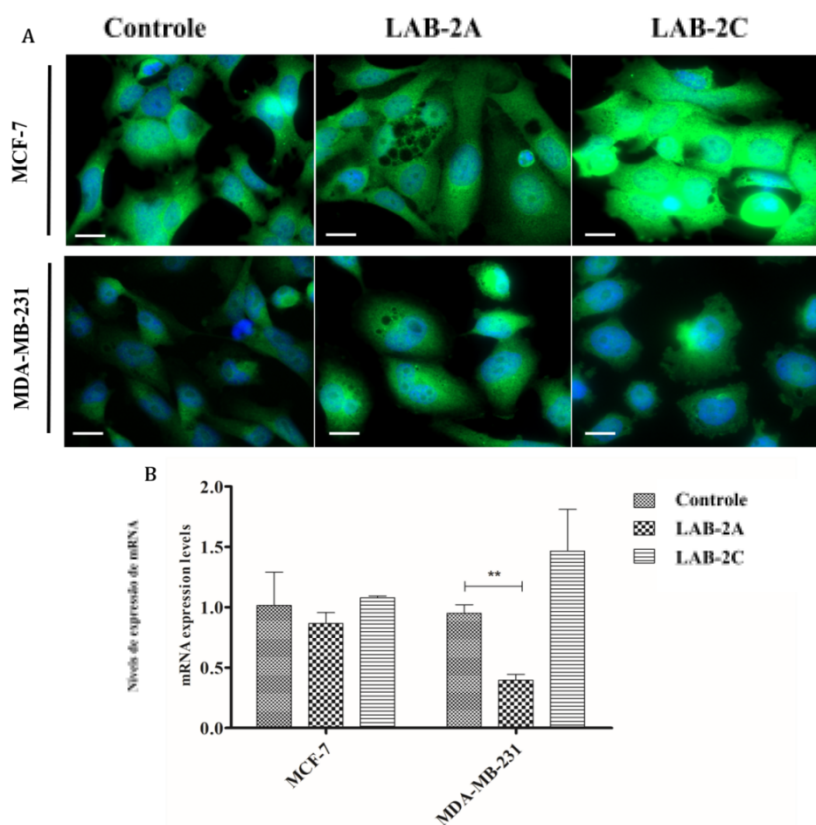


3.4.2.3 Avaliação dos biomarcadores Akt2 e VIM para o câncer de mama

Os biomarcadores farmacológicos são considerados proteínas cuja expressão é modulada como resultado da atividade do fármaco. Como consequência de seu papel tumorigênico na progressão do câncer, Akt2 e VIM exemplificam dois desses biomarcadores. Vários estudos têm demonstrado a importância da Akt2 na regulação de diversos processos

celulares, como proliferação, crescimento, sobrevivência celular e síntese protéica (PEREIRA *et al.*, 2015), bem como a invasividade celular por interação com filamentos intermediários, como o VIM (RIGGIO *et al.*, 2017). Foi, então, avaliado a eficácia do nosso tratamento na inibição de Akt2 e, conseqüentemente, seu impacto na expressão de VIM. Apenas o composto LAB-2A inibiu efetivamente os níveis de expressão de mRNA de Akt2 em células MDA-MB-231, sem alterações significativas observadas no nível de proteína para qualquer um dos compostos (**Figura 24A e 24B**). Para células epiteliais, apenas o composto LAB-2C foi capaz de aumentar os níveis de proteína de Akt2, e nenhuma alteração significativa foi observada no nível de mRNA para qualquer um dos compostos. Esses dados sugerem que o mesmo composto teve efeitos opostos em duas linhagens de câncer de mama muito diferentes.

Figura 24 - Expressão de Akt2 em MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com LAB-2A e LAB-2C



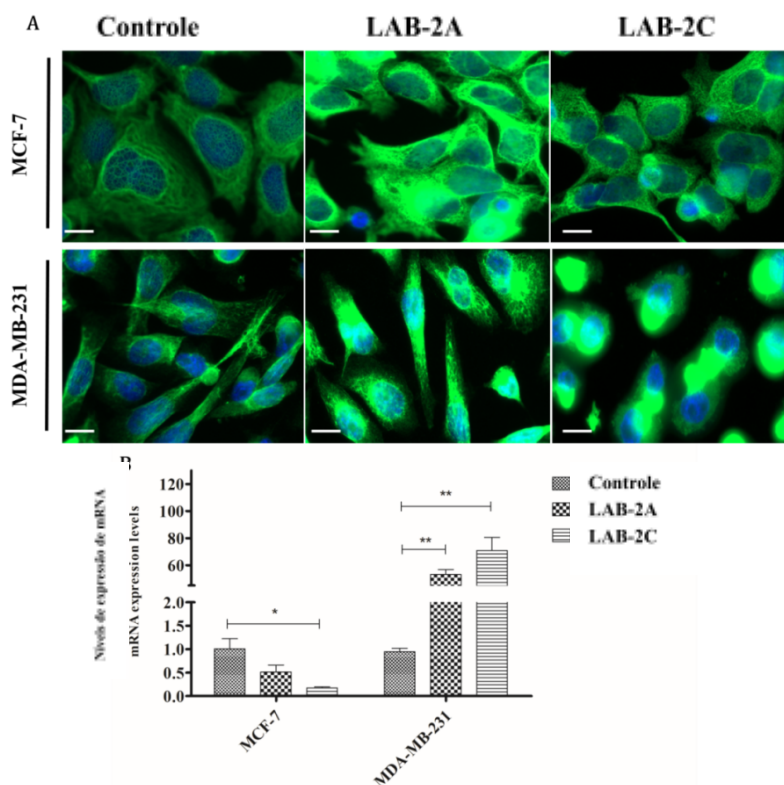
De acordo com Altintop *et al.* (2018), compostos com o anel tiazol são potentes inibidores de Akt35. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, onde apenas o composto LAB-2A atuou como um inibidor de Akt em células do tipo mesenquimal. Em células MCF-7, o composto LAB-2C foi capaz de aumentar os níveis de proteína de Akt2, sugerindo que há outra molécula que pode equilibrar a expressão de Akt2 para mitigar as conseqüências de nosso tratamento. Esta molécula pode ser o fator de transcrição Twist e é

conhecida por regular positivamente a expressão de Akt2. Resultados semelhantes foram obtidos por Xue et al. (2012) onde a fosforilação de Twist aumentou a fosforilação de Akt em células de câncer de pulmão. Isso pode ser explicado se as células cancerosas "escaparam" da inibição de Akt expressando fatores de transcrição como Twist, conforme observado por DiMeo et al. (2009). No entanto, mais experimentos precisam ser feitos para determinar até que ponto o Twist pode modular a atividade Akt2 de maneira direta ou indireta.

Oposto a isso, apenas o composto 2C foi capaz de inibir a expressão de mRNA de VIM em células MCF-7 (**Figura 25A e 25B**), sugerindo que VIM pode ser regulado por outra proteína diferente de Akt2, uma vez que nenhuma alteração foi observada nos níveis de expressão de mRNA de Akt2 nesta linha celular (**Figura 25B**).

No sarcoma de tecidos moles (STS), Zhu *et al.* (2011) observaram que apenas Akt1 foi fosforilado constitutivamente e interagiu diretamente com VIM21. Resultados semelhantes foram obtidos por Riggio et al. (2017) onde Akt1 e não Akt2, regula a expressão de VIM durante a progressão do câncer de mama³⁴. Por outro lado, o trabalho de Fortier *et al.* (2010) demonstra que o VIM pode ser duplamente regulado por Akt1 e Akt2 no nível pós-transcricional.

Figura 25 - Expressão de VIM em MDA-MB-231 e MCF-7 após incubação com LAB-2A e LAB-2C



4 CAPÍTULO DOIS: AVALIAÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE INÉDITOS TIAZÓIS DERIVADOS DA ISATINA

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

4.1.1 Doença de Chagas

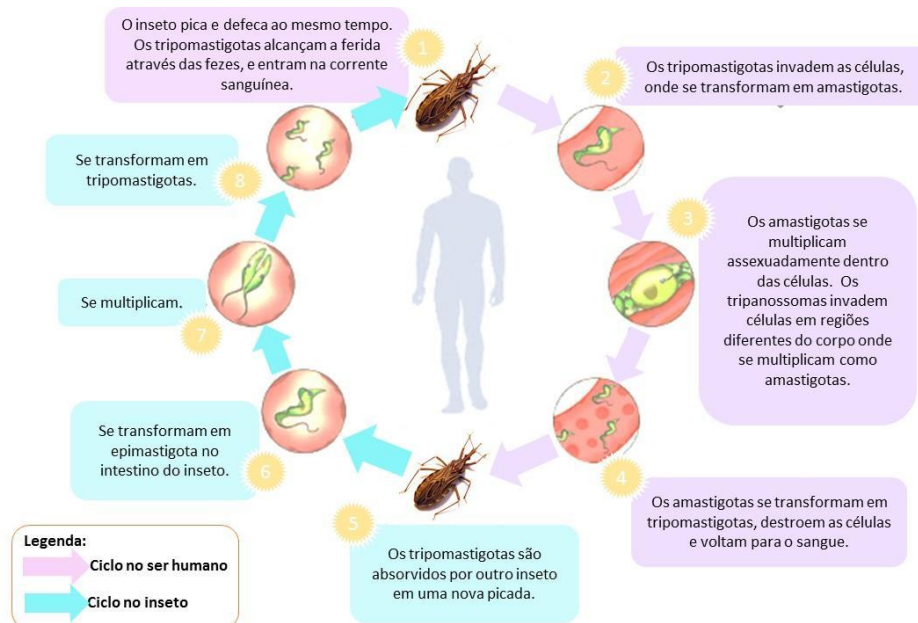
A tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É encontrada principalmente em áreas endêmicas de países da América Latina, sendo considerada potencialmente fatal. Estimativas mostram que no mundo cerca de 6 a 7 milhões de pessoas são infectadas com *T. cruzi* (WHO, 2021).

Essa doença foi descoberta pelo pesquisador Carlos Chagas, que posteriormente recebeu o nome de seu descobridor. Apesar de ter um século de descobrimento, a doença originou-se há milhões de anos como uma infecção enzoótica (doenças de rebanho) em animais selvagens. Começou a ser transmitida para humanos como uma antropozoonose, quando o homem começou a explorar áreas selvagens. Enquanto zoonose, seu estabelecimento ocorreu há cerca de 200 a 300 anos, quando seus transmissores começaram a adaptação a ambientes domésticos. Porém, existem algumas evidências de infecção humana por Doença de Chagas que foram identificadas em múmias datadas com até nove mil anos (COURA & DIAS, 2009).

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos, na maioria das vezes, através da picada de insetos triatomíneos, vetor do protozoário, popularmente conhecido como barbeiro. Ao picar, o inseto suga o sangue e expele suas fezes ao mesmo tempo. O contágio se dá através do contato das fezes do inseto com o sangue, quando o local da picada é coçado, ou há contato das mãos infectadas com olhos ou boca (WHO, 2021). Também pode haver outras formas de infecção, como: ingestão de alimentos contaminados, transfusão de sangue infectado, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (OPAS, 2021).

O ciclo de vida do *T. cruzi* se apresenta em três estágios de desenvolvimento (**Figura 26**). A forma amastigota é intracelular, encontrada em hospedeiros mamíferos, na qual o parasita se reproduz após a infecção. A forma tripomastigota, é o estágio na qual o parasita se encontra na corrente sanguínea do infectado, e pode ser transmitida a insetos vetores ao picar o enfermo. Na forma epimastigota, o parasita se encontra no intestino do vetor triatomíneo. O parasita é ingerido pelo vetor na forma tripomastigota e em seu intestino se transforma em epimastigota, onde sofre reprodução binária. Ao passar pelo reto do triatomíneo, o parasita se transforma novamente em tripomastigota (RASSI *et al.*, 2010).

Figura 26 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

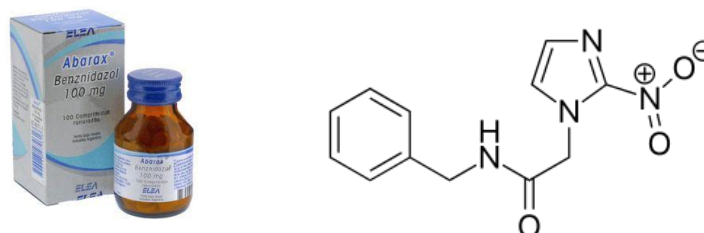


Fonte: <http://www.ideiasedicar.com/sintomas-e-prevencao-de-doencas-de-chagas> (adaptado)

4.1.1.1 Tratamento da Doença de Chagas

O controle de vetores é o método mais eficaz de prevenção da doença, pois não existe vacina (WHO, 2021). O Ministério da Saúde recomenda que para prevenção, além do monitoramento dos vetores, também sejam adotadas medidas higiênico-sanitárias e ações de educação e saúde. O tratamento da doença de Chagas é feito através da administração do medicamento benznidazol para matar o parasita (**Figura 27**). Se administrado logo após a infecção este pode se mostrar 100% eficaz. Porém, sua eficácia diminui quanto mais tempo passar da infecção para o tratamento. Outro agravante, que pode diminuir os potenciais benefícios do tratamento utilizando benznidazol, são os efeitos colaterais. Ocorrendo em cerca de 40% dos pacientes tratados, não podendo ser ultrapassado o tempo de tratamento de dois meses (BRASIL, 2015). Diante deste fato, surge a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da doença.

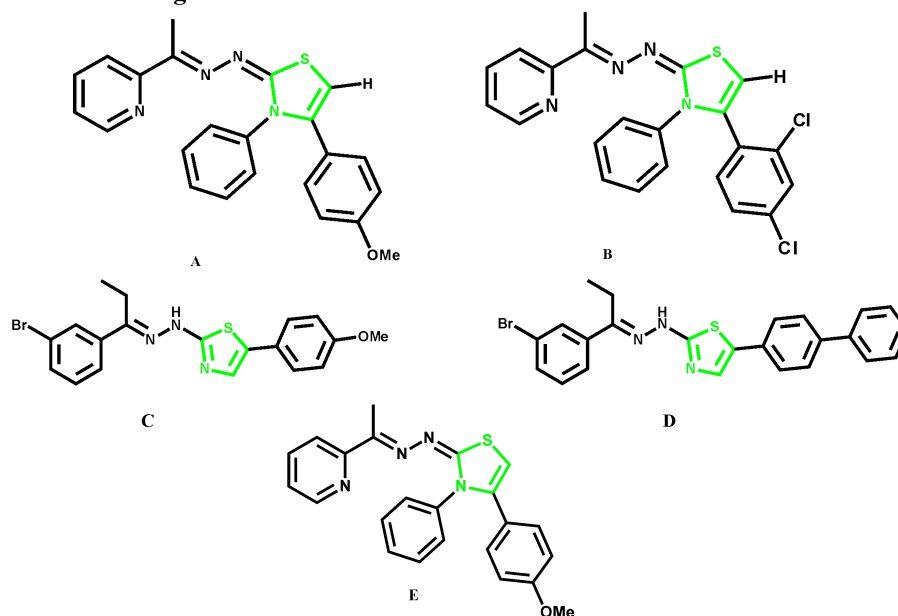
Figura 27 - Benznidazol: medicamento e estrutura química



Fonte: <http://www.keshavbiotech.com/product-tag/abarax-benznidazol/> (adaptado)

Nosso grupo de pesquisa têm relatado compostos contendo o anel tiazol com potencial atividade anti-*T. cruzi* (**Figura 28**). Em 2014, Silva avaliou a atividade anti-*T. cruzi* de derivados piridil-1,3-tiazol. Neste trabalho se destacaram os compostos **A** e **B** com valores de $IC_{50} = 1,2$ e $1,6 \mu M$, respectivamente. Estes compostos não apresentaram efeitos citotóxicos nas concentrações testadas frente à forma tripomastigota. Em 2016, Gomes e colaboradores sintetizaram novos derivados contendo o anel tiazol e observaram que um grupo volumoso, ligado ao carbono C_4 do anel tiazol, influencia no incremento da atividade antiparasitária. Nesse trabalho, o composto **D** apresentou um valor de $IC_{50} = 3.35 \mu M$ e o composto **C**, $3.84 \mu M$, ambos os valores frente à forma tripomastigota do parasita. Em 2017, Silva e colaboradores sintetizaram uma nova série de piridil-tiazóis, no qual o composto **E** se destacou frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* com valor de $IC_{50} = 1,2 \mu M$.

Figura 28 - Derivados do tiazol com atividade anti-*T. cruzi*



Fonte: O autor (2021)

4.1.2 Leishmaniose

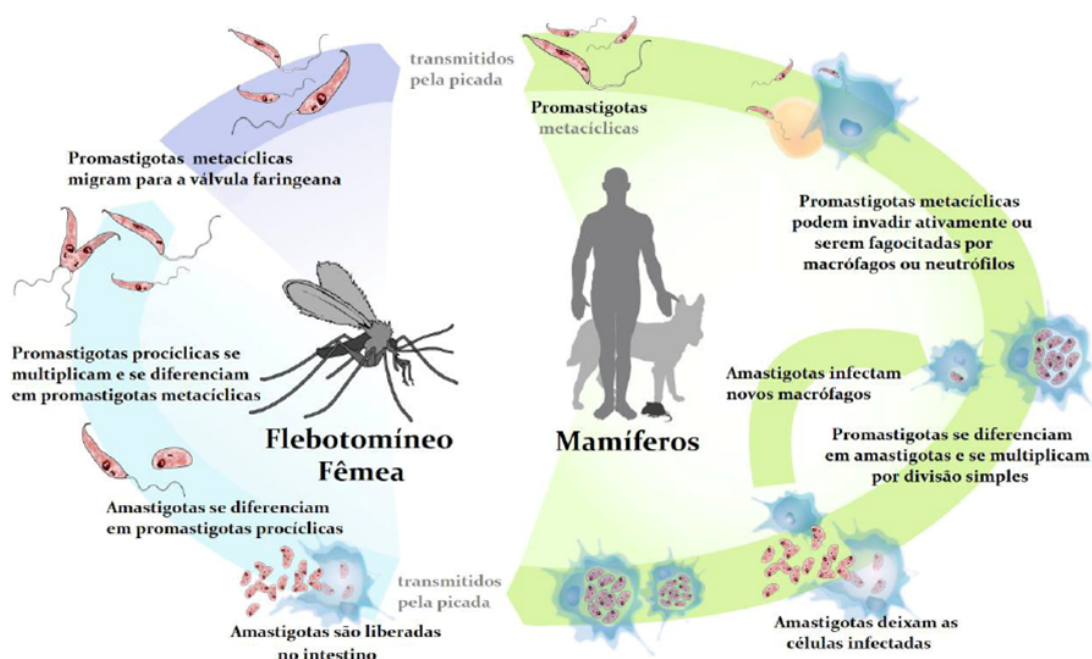
As leishmanioses são doenças parasitárias que apresentam como agente etiológico o protozoário do gênero *Leishmania*. No Brasil, foram identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgênero Viannia e uma do subgênero Leishmania. As principais espécies são: *L. amazonenses*, *L. guyanensis* e *L. brazileinsis* (BRASIL, 2017).

Os hospedeiros incluem uma grande variedade de mamíferos. Embora as infecções por esses parasitos sejam mais comuns nos roedores e canídeos, são conhecidas também entre

primatas e, entre estes, o homem. Como hospedeiros invertebrados são identificados, exclusivamente, fêmeas de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos. Na forma promastigota é alongada, com um flagelo, livre e longo. As formas flageladas se diferenciam da forma amastigota essencialmente pelo prolongamento do flagelo, que se exterioriza para a bolsa flagelar (NEVES, 2004).

A infecção ocorre quando o flebotomíneo pica um indivíduo infectado ou um hospedeiro reservatório aspira macrófagos parasitados. As amastigotas, ao atingirem o intestino do inseto, se transformam em promastigotas. Do intestino são regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto toma uma nova refeição de sangue (KAYE; SCOTT, 2011). O ciclo de transmissão está completo quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo (**Figura 29**). Os flebotomíneos são contaminados a partir de animais infectados, que são fundamentais para o estabelecimento da doença humana (BATES, 2004).

Figura 29 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania*.



Fonte: <http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa>

4.1.2.1 Epidemiologia da Leishmaniose

As leishmanioses se destacam como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pela sua elevada incidência e também pela capacidade de produzir deformidades (OPAS/OMS, 2021). As Leishmanioses são antropozoonoses, doença comum a animais e

homens, e são consideradas um grande problema de saúde pública. Representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A leishmaniose está dividida em: visceral, cutânea e mucosa.

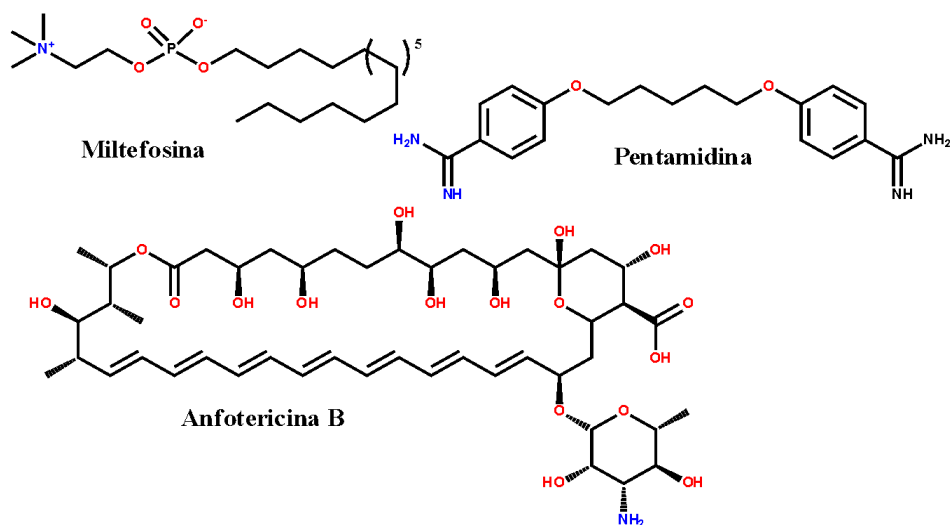
A leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) é endêmica em 18 países das Américas, e no período de 2001-2016 foram notificados 892.846 casos novos de LC, distribuídos em 17 dos países endêmicos. No Brasil, tem sido associada a sete espécies: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenberg* e *L. amazonensis*. Dados do OPAS/OMS indicaram que em 2016 foram registrados 12.690 casos no Brasil, sendo o país com maior número. Junto com Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e Peru (7.271) representaram 74,3% do total de casos na região.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente fatal com distribuição mundial em 76 países, sendo endêmica em 12 países das Américas. Cerca de 96% dos casos nesta região, estão concentrados no Brasil, no entanto, se observa uma expansão geográfica na Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela (OPAS/OMS, 2018). Está associada à espécie *Leishmania infantum*. No período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos. Dados do OPAS/OMS indicam que a LV segue apresentando uma ampla distribuição geográfica de casos humanos no Brasil, onde se destacam as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Também é notada uma dispersão geográfica ocorrendo no Paraguai e Argentina, nas fronteiras com o Brasil e Uruguai.

4.1.2.2 Tratamento da Leishmaniose

O tratamento para a *Leishmania* ainda é bastante limitado. Os principais medicamentos utilizados são: anfotericina B, miltefosina e pentamidina (**Figura 30**). A miltefosina está sendo usada recentemente principalmente no tratamento de crianças. Além disso, este fármaco está disponível apenas por via oral, não havendo outro tratamento por outras vias. Todos os medicamentos para o tratamento da LV quanto e da LC são tóxicos e podem apresentar efeitos adversos. A dose e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos.

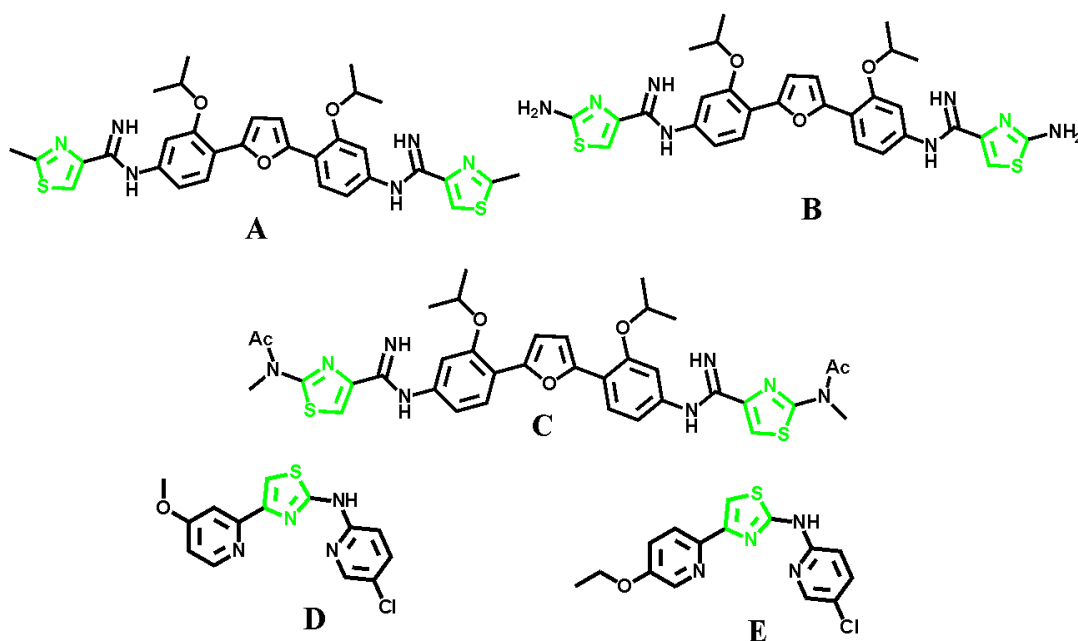
Figura 30 - Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento da leishmaniose.



Fonte: O autor (2021).

Em 2014, Liu e colaboradores sintetizaram uma série de análogos contendo tiazóis na estrutura dos seus compostos frente a *Leishmania amazonensis*. Neste trabalho se destacam os compostos **A**, **B** e **C**, com IC_{50} de 0,17; 1,7 e 0,8128 μ M respectivamente. Em 2015, Bhuniya e colaboradores testaram uma série de compostos contendo o anel tiazol, dentre os mais promissores se destacaram os compostos **D** e **E** com IC_{50} = 0,003 e 0,28 μ M respectivamente, todos para a forma amastigota em *L. donovani* (**Figura 31**).

Figura 31 - Derivados do tiazol com atividade anti-*Leishmania*



Fonte: O autor (2021)

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Ensaios Biológicos

4.2.1.1 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que devem ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância.

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram soltos em garrafas de cultura e foram plaqueados em placas de 96 poços fundo reto e incubados por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 6 a 200 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo-difenil-tetrazóico) a 5 mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado por poço para a solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.1.2 Ensaio anti-T. cruzi (tripomastigotas)

Tripomastigotas (cepa Y) foram coletadas do sobrenadante de células Vero infectadas e distribuídas em uma placa de 96 poços para uma densidade final de 4×10^5 células por poço em meio RPMI-1640. Cada composto foi adicionado aos poços em duplicado (0,19 a 100 µg/mL). O benznidazol foi utilizado como medicamento de referência. Os compostos foram testados em duplicado. A placa foi então cultivada a 37°C, por 24 horas e 5% de CO₂. Após esse tempo, as alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis (ou

seja, com motilidade aparente) foi contado em uma câmara de Neubauer. Os poços que não receberam os compostos foram considerados como 100% do número de parasitas viáveis. Os valores de IC_{50} foram calculados por regressão linear.

4.2.1.3 Ensaio anti-*T. cruzi* (amastigotas/ tripomastigotas)

T. cruzi (cepa de Tulahuen) que expressa o gene da beta-galactosidase de *Escherichia coli* foi cultivado em uma monocamada de fibroblastos L-929 de camundongo. As culturas testadas quanto à atividade de beta-galactosidase foram cultivadas em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol mais 10% de soro fetal bovino e glutamina. Microplacas de cultura de tecidos de noventa e seis poços foram semeadas com fibroblastos L-929 a $4,0 \times 10^3$ por poço em 80 μ L e incubadas durante a noite a 37°C, 5% de CO_2 . Tripomastigotas que expressam beta-galactosidase foram então adicionadas a $4,0 \times 10^4$ por poço em 20 μ L. Após 2 horas, o meio com tripomastigotas que não penetraram nas células foi descartado e substituído por 200 μ L de meio fresco. Após 48 horas, o meio foi descartado novamente e substituído por 180 μ L de meio fresco e 20 μ L de compostos de teste dissolvidos em DMSO. Cada composto foi testado em quadruplicado. Após 7 dias de desenvolvimento da cultura, vermelho de clorofenol beta-D-galactopiranosídeo a 100 μ M e Nonidet P-40 a 0,1% foram adicionados às placas e incubados durante a noite, a 37 °C. A absorbância foi medida a 570 nm em um leitor automático de microplacas. BZD foi usado como controle positivo. Os resultados são expressos como uma porcentagem da inibição do crescimento do parasita. Dois experimentos independentes foram realizados.

4.2.1.4 Ensaio de estudos ultraestruturais

Os parasitas tripomastigotas de *T. cruzi* foram cultivados por 24h em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) tamponado a pH 7,5 e suplementado com HEPES (20 mM), 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U / mL), e estreptomicina (100 mg / mL) contendo o composto na concentração de IC_{50} , duas e quatro vezes o valor de IC_{50} (1,72, 3,44, 6,88 μ M, respectivamente). Os parasitas foram coletados, lavados em PBS e fixados com glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4% e tampão cacodilato 0,1 M em pH 6,8. Eles foram então pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% (OsO_4) em um tampão cacodilato 0,1 M em pH 6,8 e processados para microscopia eletrônica de varredura de rotina. Os parasitas foram desidratados em etanol graduado e secos pelo método do ponto crítico com CO_2 . As amostras

foram montadas em tocos de alumínio, revestidas com ouro e examinadas em microscópio JEOL-5600LV (NPT / FIOCRUZ-PE). Os controles foram compostos por células não tratadas (controle negativo) e tratadas com benznidazol (controle positivo).

4.2.1.5 Ensaio de avaliação da morte celular

Após a confirmação da atividade tripanocida, a marcação com Anexina-FITC / Iodeto de Propídio foi usada para caracterizar as modalidades de morte celular induzidas pela incubação com compostos. Tripomastigotas metacíclicos foram coletadas do sobrenadante de células L929 infectadas e então semeados a 4×10^5 células / poço em meio RPMI-1640. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e adicionados aos poços nas concentrações de IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$. Benznidazol (IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$) e meio de cultura foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas nas mesmas condições utilizadas para a atividade anti-tripomastigota (37 °C, 24 horas). Resumidamente, após o tratamento, os parasitas foram lavados com PBS e ressuspensos em tampão de ligação (Anexina V Binding Buffer- BD Pharmingen™, EUA). Para marcação, foram adicionados 10L de iodeto de propídio (50 g/mL) e 5 L de Anexina-FITC (BD Pharmingen™, EUA) por 15 min, em temperatura ambiente, no escuro. A citometria de fluxo foi realizada em FACSCalibur (Becton & Dickinson, EUA). Para cada amostra adquirimos 20.000 eventos e os dados foram analisados usando o software Cellquest (Becton & Dickinson, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicado. Para análise de significância foi utilizado ANOVA e teste de Dunnett, considerando $p < 0,05$.

4.2.1.6 Ensaio anti-Leishmania

Para o ensaio na forma promastigota, cepas de *Leishmania amazonensis* (WHOM/00 LBT 0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26°C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contados e diluídos em meio Schneider's (Sigma) completo a 1×10^6 células/mL. Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações dos compostos (1,5 a 200 µg/mL) por 72h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Miltefosina foram utilizados como controle negativo e

positivo, respectivamente. O crescimento celular foi avaliado e a $IC_{50}/72h$ foi determinada por análise de regressão. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Para avaliação nas formas amastigotas, macrófagos RAW 264.7 foram distribuídos em placas de 24 poços (3×10^5 células/mL) contendo uma lamínula redonda estéril. Os macrófagos foram incubados para aderência por 2h, a $37^\circ C$ e atmosfera com 5% de CO_2 . Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas infectadas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* na proporção de 8 parasitas/macrófagos, por um período de 6h, a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 . Os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (6 a 200 $\mu g/mL$) por 24h, a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 . A miltefosina foi utilizada como controle positivo, nas mesmas concentrações dos compostos. Após a incubação, as lamínulas contendo a cultura foram lavadas com PBS, coletadas e coradas com kit de coloração Panótico Rápido. A porcentagem de macrófagos infectados, bem como o número de amastigotas/macrófagos foi determinada pela contagem de 100 macrófagos, em duplicata. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de macrófagos infectados e de amastigotas intracelulares por culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. Os valores de IC_{50} foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* da série LAB

Os valores obtidos na avaliação da atividade frente às formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, como a CC₅₀ em macrófagos da linhagem RAW 264.7, IC₅₀ e índice de seletividade (IS) dos compostos sintetizados, estão dispostos na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Resultados obtidos da série LAB para formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*

Composto				RAW 264.7	IC ₅₀	IS ^a	IC ₅₀ Amastigota	IS ^b
	R ₁	R ₂	R ₃	(CC ₅₀) μM	Tripo (μM)	Tripo	(μM)	Amastigota
LAB-Int1	H	-	-	84,91	10.44	8.14	-	-
LAB-1A	H	Ph	H	296,39	252.46	1.17	-	-
LAB-1B	H	4-Me-Ph	H	61,52	26.28	2.34	-	-
LAB-1C	H	4-MeO-Ph	H	511,59	23.51	21.76	6.99	15.56
LAB-1D	H	3-NO ₂ -Ph	H	50,90	6.85	7.43	-	-
LAB-1E	H	4-NO ₂ -Ph	H	68,47	4.43	15.46	6.10	11.23
LAB-1F	H	4-F-Ph	H	60,81	62.93	0.97	-	-
LAB-1G	H	4-Cl-Ph	H	73,71	32.41	2.27	-	-
LAB-1H	H	2-Naph	H	49,31	55.77	0.88	-	-
LAB-1I	H	4-Br-Ph	H	45,10	45.00	1.00	-	-
LAB-1J	H	2,4-diCl-Ph	H	54,52	2.05	26.58	10.85	5.02
LAB-1L	H	4-Ph-Ph	H	59,22	120.71	0.49	-	-
LAB-1M	H	Ph	Me	115,94	4.12	28.15	8.94	12.97
LAB-1N	H	4-Br-Ph	Me	87,29	1.72	50.80	6.16	14.18
LAB-Int2	Cl	-	-	55,24	7,91	6,98	-	-
LAB-2A	Cl	Ph	H	51,18	46,39	1,10	-	-
LAB-2C	Cl	4-MeO-Ph	H	49,84	4,54	10,98	-	-
LAB-2D	Cl	3-NO ₂ -Ph	H	56,94	13,78	4,13	-	-
BZD	-	-	-	123,54	14,60	8,46	5,65	21,87

BDZ = benzimidazol. Os cinco compostos mais seletivos foram testados frente à forma amastigotas de *T. cruzi*.

^a = (macrófagos CC₅₀) / (tripomastigotas IC₅₀).

^b = (macrófagos CC₅₀) / (amastigotas IC₅₀).

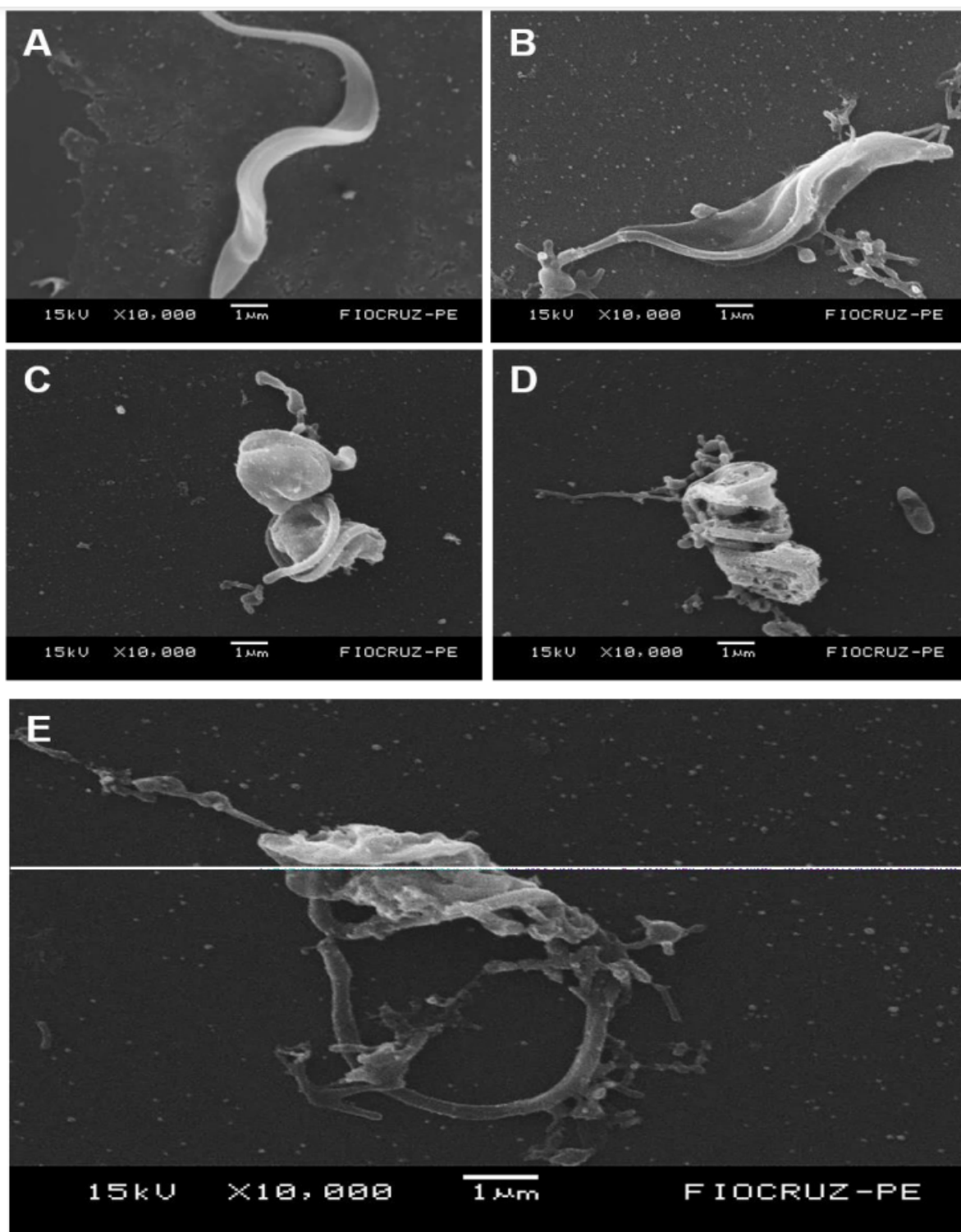
Os compostos foram avaliados frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Y. Entre os compostos testados, (LAB-1C, LAB-1E, LAB-1J, LAB-1M, LAB-1N e LAB-2C) exibiram maior seletividade do que o medicamento de referência BZD, com destaque para composto LAB-1N (SI = 50,80) que foi mais de seis vezes mais seletivo do que BZD (SI = 8,46). Os compostos LAB-1M (SI = 28,15) e LAB-1J (SI = 26,58) foram descritos como sendo três vezes mais seletivos do que BZD. O composto LAB-1N ($IC_{50\text{ tripo}} = 1,72\ \mu\text{M}$), que possui um metil no anel tiazol, foi um dos compostos mais potentes da série, sendo oito vezes mais potente do que o BZD ($IC_{50\text{ tripo}} = 14,60\ \mu\text{M}$). Além disso, valores de IC_{50} de 2,05 μM , 4,12 μM e 4,43 μM foram obtidos para os compostos LAB-1J, LAB-1M e LAB-1E, respectivamente, apresentando maior potência que o BZD. Os cinco compostos mais seletivos foram testados frente à forma amastigota de *T. cruzi*. Todos os valores de IC_{50} obtidos apresentaram uma menor potência que o BZD.

4.3.2 Estudos ultraestruturais para *T. cruzi*

Visando investigar os efeitos dos derivados de tiazolil-isatina na morfologia do parasita, o composto mais ativo deste trabalho foi selecionado (LAB-1N). A análise por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 32**) mostrou que o tripomastigota do *T. cruzi* no grupo controle apresentava morfologia e flagelos preservados (**Figura 32A**), enquanto as células tratadas com BDZ tinham seus corpos contorcidos com extravasamento de conteúdo citoplasmático (**Figura 32B**). Por outro lado, as células tratadas com o composto LAB-1N nas concentrações de IC_{50} , $2x\ IC_{50}$ e $4x\ IC_{50}$ (1,72, 3,44, 6,88 μM , respectivamente), promoveram alterações dependentes da dose na forma flagelo e superfície do corpo do parasita (**Figuras 32C-E**), comparado ao grupo controle não tratado o composto LAB-1N promoveu contorções corporais, aspecto inchado e arredondado, encurtamento do flagelo, além de extravasamento do conteúdo citoplasmático causando morte celular.

No presente estudo, a atividade deste composto LAB-1N pode ser observada através de alterações ultraestruturais causadas no *T. cruzi*, o que certamente inviabiliza a célula. Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes et al. (2020) que avaliou a atividade anti-*T. cruzi* dos compostos ftalimido-tiossemicarbazonas (3h e 3t) e ftalimido-tiazóis (4j) e observaram as mesmas alterações ultraestruturais características de morte celular por necrose e/ou apoptose.

Figura 32 - Alterações ultraestruturais em formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com BDZ e composto LAB-2N por MEV.

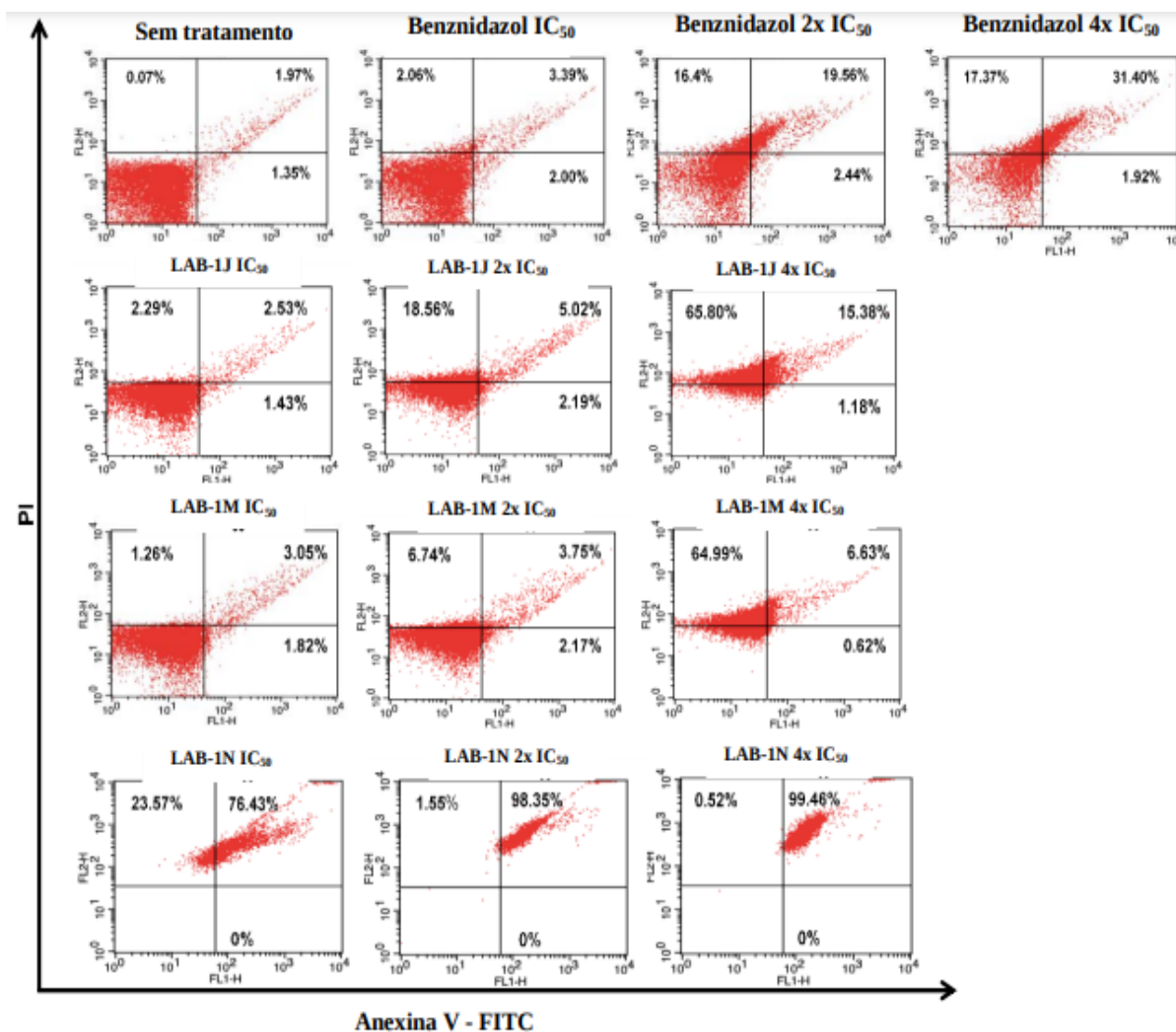


(A) Controle de tripomastigotas não tratadas, com corpo alongado típico e uma superfície celular lisa. (B) Tripomastigota tratada com BDZ, com corpo contorcido e ruptura, exibindo conteúdo celular interno. (C) Tripomastigotas tratados com LAB-1N ($IC_{50} = 1,72 \mu\text{M}$) com corpo contorcido, aparência inchada e arredondada e encurtamento de flagelo. (D) Tripomastigotas tratadas com LAB-1N ($2 \times IC_{50} = 3,44 \mu\text{M}$) com ruptura da membrana citoplasmática e exposição do conteúdo interno da célula. (E) Tripomastigotas tratadas com LAB-1N ($4 \times IC_{50} = 6,88 \mu\text{M}$) com a célula totalmente destruída com perda total de conteúdo citoplasmático e alguns traços de citoesqueleto.

4.3.3 Análise de citometria de fluxo

Após confirmar que LAB-1J, LAB-1M e LAB-1N eram compostos antiparasitários, procuramos determinar se os compostos causavam a morte celular do parasita. Para tanto, tripomastigotas da cepa Y foram tratados com diferentes concentrações de LAB-1J, LAB-1M e LAB-1N. Após 24 horas de incubação, as células do parasita foram coradas com iodeto de propídio (PI) e anexina-V e analisadas por citometria de fluxo. Os compostos LAB-1J, LAB-1M (2x IC_{50} e 4x IC_{50}) e LAB-1N (1x IC_{50} , 2x IC_{50} e 4x IC_{50}) foram capazes de induzir uma marcação significativamente compatível com necrose em tripomastigotas. Resultados semelhantes foram encontrados em parasitas tratados com Benznidazol (1x IC_{50} , 2x IC_{50} e 4x IC_{50}), o medicamento de referência e controle positivo usado neste ensaio (**Figura 33**).

Figura 33 - Citometria de fluxo dos compostos da série LAB



4.3.4 Avaliação da atividade anti-*leishmania* da série LAB

Os valores obtidos na avaliação da atividade frente às formas amastigotas das espécies de *Leishmania*, como a CC_{50} em macrófagos da linhagem RAW 264.7, IC_{50} e o índice de seletividade (IS) dos compostos sintetizados, estão dispostos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Resultados obtidos da série LAB para formas amastigotas das espécies de *Leishmania*

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	CC ₅₀ μM	IC ₅₀ <i>L. amazonensis</i> μM	IS ^a	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> μM	IS ^a
LAB-Int1	H	-	-	209.17	10,16	20,58	11,37	18,39
LAB-1A	H	Ph	H	296.39	189,25	1,57	237,67	1,25
LAB-1B	H	4-Me-Ph	H	61.52	26,09	2,36	26,41	2,33
LAB-1C	H	4-MeO-Ph	H	511.59	205,46	2,49	469,35	1,09
LAB-1D	H	3-NO ₂ -Ph	H	50.90	28,50	1,79	78,40	0,65
LAB-1E	H	4-NO ₂ -Ph	H	68.47	93,70	0,73	51,94	1,32
LAB-1F	H	4-F-Ph	H	60.81	71,07	0,86	55,47	1,10
LAB-1G	H	4-Cl-Ph	H	73.71	35,25	2,09	28,25	2,61
LAB-1H	H	2-Naph	H	49.31	28,40	1,74	25,35	1,95
LAB-1I	H	4-Br-Ph	H	45.10	25,38	1,78	24,77	1,82
LAB-1J	H	2,4-Cl-Ph	H	54.52	24,20	2,25	14,19	3,84
LAB-1L	H	Ph-Ph	H	59.22	110,16	0,54	119,84	0,49
LAB-1M	H	Ph	Me	115.94	52,13	2,22	44,23	2,62
LAB-1N	H	4-Br-Ph	Me	87.29	29,65	2,94	31,04	2,81
LAB-Int2	Cl	-	-	306.64	253,31	1,21	234,04	1,31
LAB-2A	Cl	Ph	H	51.18	38,67	1,32	32,65	1,57
LAB-2C	Cl	4-MeO-Ph	H	49.84	38,65	1,29	27,43	1,82
LAB-2D	Cl	3-NO ₂ -Ph	H	56.94	23,39	2,43	24,31	2,34
Miltefosina	-	-	-	139,04	7,08	19,65	1,67	83,17

^a = (macrófagos CC_{50}) / (amastigotas IC_{50}).

Com relação a atividade para a forma amastigota da *Leishmania*, os compostos não apresentaram bons resultados, visto que todos os tiazóis apresentaram uma IC_{50} maior que a Miltefosina, o fármaco utilizado como referência.

O composto intermediário LAB-Int1 foi o que apresentou o melhor resultado frente a forma amastigota de *L. amazonensis*, com uma IC_{50} 10,16 μ M e IS 20,58 para *L. amazonenses*, próximo aos valores da Miltefosina (IC_{50} 7,08 μ M e IS 19,65).

Os valores obtidos na avaliação da atividade frente às formas promastigotas das espécies de *Leishmania*, como a CC_{50} em macrófagos da linhagem RAW 264.7, IC_{50} e o índice de seletividade (IS) dos compostos sintetizados, estão dispostos na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Resultados obtidos da série LAB para formas promastigotas das espécies de *Leishmania*

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	CC ₅₀ μ M	IC ₅₀ L. <i>amazonensis</i> μ M	IS ^a	IC ₅₀ L. <i>infantum</i> μ M	IS ^a
LAB-Int1	H	-	-	209.17	43,87	4,77	57,86	3,62
LAB-1A	H	Ph	H	296.39	44,33	6,69	45,87	6,46
LAB-1B	H	4-Me-Ph	H	61.52	9,17	6,71	13,19	4,66
LAB-1C	H	4-MeO-Ph	H	511.59	469,35	1,09	469,35	1,09
LAB-1D	H	3-NO ₂ -Ph	H	50.90	9,77	5,21	11,70	4,35
LAB-1E	H	4-NO ₂ -Ph	H	68.47	10,52	6,51	20,93	3,27
LAB-1F	H	4-F-Ph	H	60.81	15,70	3,87	23,47	2,59
LAB-1G	H	4-Cl-Ph	H	73.71	16,11	4,57	18,49	3,99
LAB-1H	H	2-Naph	H	49.31	10,56	4,67	10,49	4,70
LAB-1I	H	4-Br-Ph	H	45.10	9,75	4,63	10,74	4,20
LAB-1J	H	2,4-Cl-Ph	H	54.52	8,90	6,13	8,36	6,52
LAB-1L	H	Ph-Ph	H	59.22	60,74	0,97	100,16	0,59
LAB-1M	H	Ph	Me	115.94	7,36	15,75	7,97	14,54
LAB-1N	H	4-Br-Ph	Me	87.29	6,17	14,15	6,04	14,44
LAB-Int2	Cl	-	-	306.64	36,36	8,43	60,69	5,05
LAB-2A	Cl	Ph	H	51.18	10,30	4,97	8,77	5,84
LAB-2C	Cl	4-MeO-Ph	H	49.84	13,89	3,59	18,80	2,65
LAB-2D	Cl	3-NO ₂ -Ph	H	56.94	10,40	5,48	16,80	3,39
Miltefosina	-	-	-	139,04	15,83	8,79	18,01	7,72

^a = (macrófagos CC₅₀) / (promastigota IC₅₀).

Com relação a atividade para a forma promastigota da *Leishmania*, podemos observar que um intermediário e dois tiazóis se destacaram para as duas espécies de *Leishmania* testadas, com resultados superiores a Miltefosina, o fármaco utilizado como referência.

O composto intermediário LAB-Int1 foi o que apresentou o melhor resultado frente a forma promastigota da *Leishmania*, com uma IC_{50} 5,07 μ M e IS 41,29 tanto para *L. amazonenses* como para *L. infantum*. Os tiazóis LAB-1M e LAB-1N também apresentaram resultados relevantes com IC_{50} e IS superiores a Miltefosina. Podemos inferir que a inserção da metila em R_2 pode ser responsável pelo incremento da atividade na forma promastigota da *Leishmania*.

5 CAPÍTULO TRÊS: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIVIRAL FRENTE AO VÍRUS ZIKA DE INÉDITOS TIAZÓIS DERIVADOS DA ARILOXITIOSSEMICARBAZONA

5.1 REVISÃO DA LITERATURA

5.1.1 Vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) contém RNA fita simples e pertence à família Flaviviridae e gênero Flavivirus. O vírus contém 10.794 nucleotídeos que codificam 3.419 aminoácidos. Também fazem parte desta família o vírus da febre amarela (YFV), dengue (DENV), encefalite japonesa (JEV) e vírus do oeste do Nilo (WNV) (FAUCI; MORENS, 2016).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez na Floresta Zika, em Uganda, em 1947 em um macaco Rhesus (PASTULA *et al.*, 2016). Em 1954, houve o primeiro isolamento desse vírus em humanos. O ZIKV é considerado uma infecção emergente, com diagnóstico clínico e sorológico difícil em regiões endêmicas para dengue (NHAN *et al.*, 2014; PATIÑO-BARBOSA *et al.*, 2015; YASRI; WIWANITKIT, 2015). O vírus já foi isolado em várias espécies de *Aedes sp.*, como *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer*, *Ae. apicoargenteus*, *Ae. vitattus*, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, sendo esse último encontrado em algumas regiões não tropicais (NHAN *et al.*, 2014).

Antes de 2007, haviam alguns relatos de infecções isoladas ou pequenos surtos por ZIKV, porém, foi após 2007 que se iniciou notificações de grandes surtos, como o ocorrido na ilha Yap, pertencente à Micronésia, com 7500 habitantes na época. Nenhuma morte ou internação foi relatada, mas estudos comprovaram que 73% da população com idade superior a 30 anos havia sido infectada (FAYE *et al.*, 2014; NHAN *et al.*, 2014).

Em 2013 e 2014, novos surtos foram relatados na Polinésia Francesa, e 11% da população apresentaram casos clínicos de infecção por ZIKV e o principal vetor identificado foi o *A. aegypti* (**Figura 34**) (FAYE *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2014; NHAN *et al.*, 2014). Em 2014 e 2015, esse vírus passou a ser notificado nas Américas, em casos confirmados na Ilha de Páscoa, no Chile e no Brasil (PATIÑO-BARBOSA *et al.*, 2015).

Segundo FAYE *et al.* (2014), houve duas introduções independentes do vírus, com duas distintas linhagens circulando na África e uma terceira linhagem formada por cepas encontradas na Micronésia e Malásia. Esse estudo sugeriu uma taxa de substituição de nucleotídeos de $7,74 \times 10^{-4}$ por ano, com um ancestral comum mais recente há 325 anos.

Figura 34 - Principal vetor do ZIKV.



Fonte: <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/Saude/noticia/2019/02.html>

5.1.1.1 Infecção por ZIKV

A infecção por ZIKV tem características similares a outras infecções arbovirais, apresentando características muito próximas ao quadro sintomatológico da Dengue e outras doenças tropicais. A manifestação clínica de conjuntivite não purulenta presente nas infecções por Zika é a única diferença apresentada entre as duas enfermidades, e foi observada em 55% dos casos durante o surto na Ilha Yap. Existem relatos de transmissão de forma atípica para esse vírus, como a transmissão por contato sexual, transplacentária e por transfusão de sangue. Na Polinésia Francesa, observou-se uma prevalência do vírus em 2,8% dos doadores de sangue, todos assintomáticos. Já foi reportada também, a presença desse vírus em saliva e urina de humanos contaminados (FONSECA *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2015; NHAN *et al.*, 2014; PATIÑO-BARBOSA *et al.*, 2015; YASRI; WIWANITKIT, 2015).

Em 2013, um caso diagnosticado como Síndrome de Guillain-Barré foi relacionado com infecção por ZIKV e DENV em uma mulher na Polinésia Francesa (OEHLER *et al.*, 2014). O primeiro relato no Brasil ocorreu no início do ano, em um paciente na cidade de Natal, RN. Em março, vários pacientes que apresentaram quadros clínicos similares a DENV, obtiveram resultado negativo para DENV e Chikungunya (CHIKV). Após análise por qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), foi confirmado infecção por ZIKV (ZANLUCA *et al.*, 2015)

O relato de uma possível associação entre a infecção pelo ZIKV e uma epidemia de microcefalia entre os recém-nascidos no Brasil atraiu uma atenção global (SCHULER-FACCINI *et al.*, 2016; CHAN *et al.* 2016). A disseminação do ZIKV além da África e Ásia para as Américas e Europa, além do surto de "síndrome de Zika congênita" levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a epidemia de ZIKV como uma emergência global de saúde pública em 2016 (WHO, 2016).

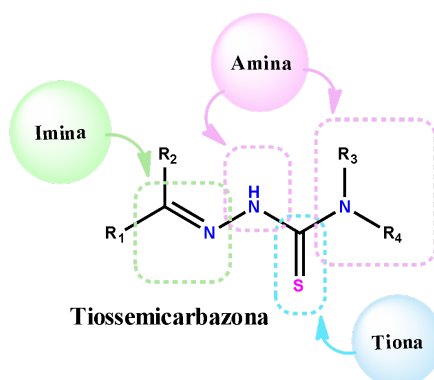
O grande impacto global, social e econômico, devido à morbidade e mortalidade associada a doenças causadas por flavivírus (como o ZIKV) exige urgentemente intervenções terapêuticas eficazes. Não existe atualmente qualquer terapia antiviral específica disponível para o tratamento eficaz de infecções clínicas por qualquer um dos *Flaviviridae* (KOK, 2016), sendo realizado apenas tratamento de suporte nos casos mais graves (NHAN *et al.*, 2014). O desenvolvimento de vacinas mais eficazes e agentes antivirais para a prevenção e tratamento da maioria das infecções por flavivírus continua sendo uma prioridade na saúde pública (KOK, 2016).

5.1.2 Estruturas Privilegiadas

5.1.2.1 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas apresentam em sua estrutura molecular os grupos amina ($N(R)_3$), imina ($(R)_2C=N(R)$) e tiona ($(R)_2C=S$) (**Figura 35**). A síntese do grupo tiossemicarbazona partindo de tiossemicarbazida é relativamente simples. Geralmente se utiliza etanol como solvente na reação, e os ácidos clorídrico ou sulfúrico como catalisadores. As reações podem ser procedidas em sistema de refluxo ou banho ultrassônico (ESPÍNDOLA *et al.*, 2015) (MOREIRA *et al.*, 2014).

Figura 35 - Composição estrutural das tiossemicarbazonas.



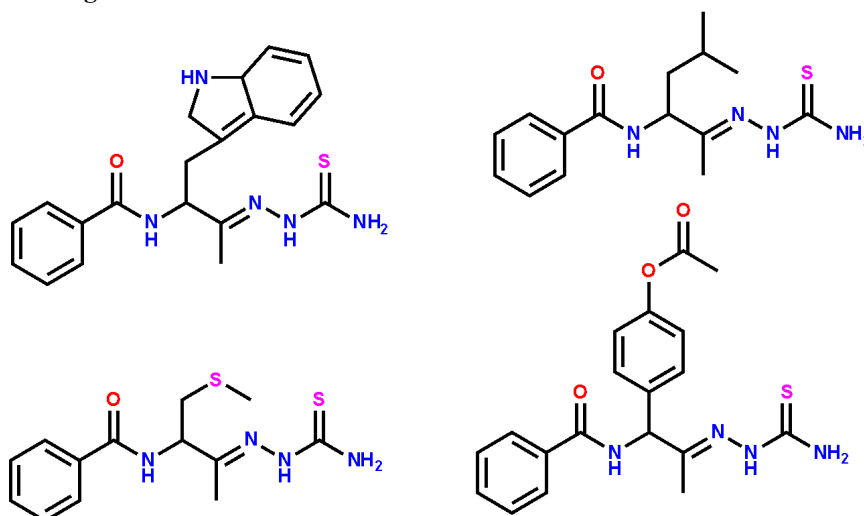
Fonte: O autor (2021)

As tiossemicarbazonas têm um amplo espectro de atividades biológicas relatadas na literatura. Destacam-se com potenciais atividades antiprotozoárias, antifúngicas, antibacterianas, antitumorais e antivirais (BELARDO; GRAMBINO, 2004). Além destas, também há relatos na literatura de tiossemicarbazonas com atividade anti-*T.cruzi* (AGUIRRE *et al.*, 2004), e anticonvulsiva (YOGESWARI *et al.*, 2002). Séries de tiossemicarbazonas

anteriormente desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa, apresentaram também atividade anti-*T. cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2014) (ESPÍNDOLA *et al.*, 2015).

Para a atividade antiviral, essa estrutura privilegiada tem apresentado um amplo espectro de atividade contra uma grande variedade de vírus tanto de DNA quanto de RNA (PADMANABHAM *et al.*, 2017). Em 2017, Padmanabham e colaboradores sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas (**Figura 36**) com atividade contra os quatro sorotipos do vírus da Dengue, contra o vírus da Encefalite Japonesa (JEV), vírus do Nilo Ocidental, vírus da Leucemia Murina Moloney e vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1.

Figura 36 - Derivados das tiossemicarbazonas com atividade antiviral.

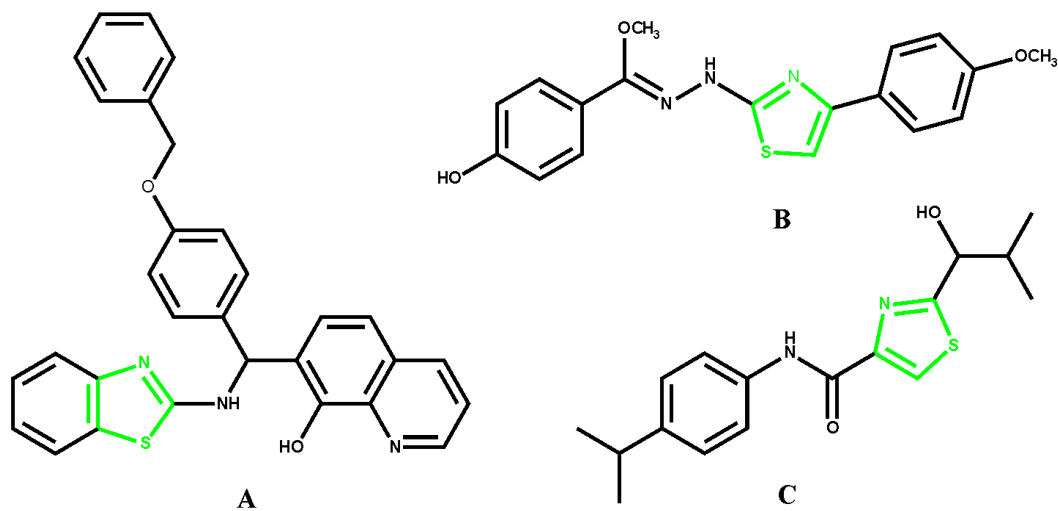


Fonte: O autor (2021)

5.1.2.2 Tiazóis

Com relação à atividade antiviral, trabalhos recentes têm demonstrado diversos compostos, com tiazol em suas estruturas, que apresentam atividade frente a diferentes vírus (**Figura 37**) (LAI *et al.*, 2013; JADAV *et al.*, 2014; JADAV *et al.*, 2015; BEHNAM *et al.*, 2016). Em 2013, Lai e colaboradores sintetizaram uma série de derivados da 8-hidroxiquinolina contendo aminobenzotiazol e avaliaram a atividade contra o vírus da dengue Tipo 2 (**Figura 37A**). Em 2015, Jadav e colaboradores sintetizaram uma série de compostos híbridos contendo um núcleo tiazol contra o vírus da Dengue 2 (**Figura 37B**). Em 2014, Jadav e colaboradores sintetizaram uma série de derivados do tiazol com atividade frente ao vírus Chikungunya (ChiK) (**Figura 37C**).

Figura 37 - Derivados do tiazol com atividade antiviral.

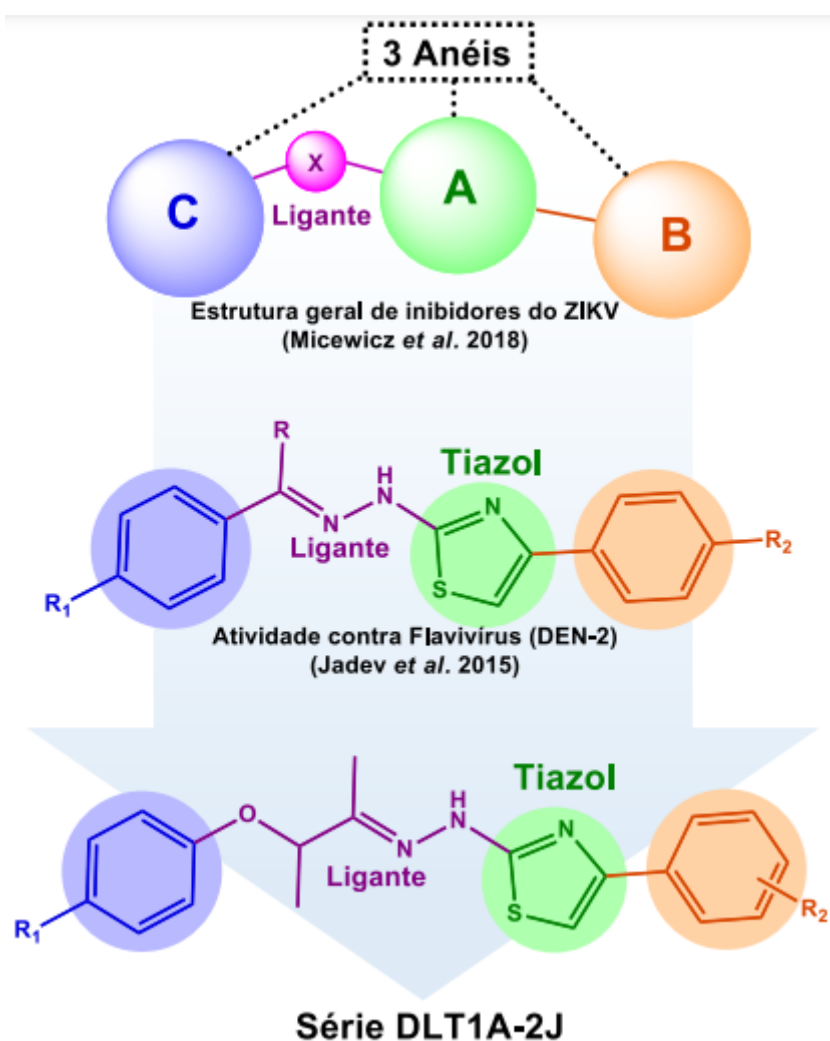


Fonte: O autor (2021)

5.2 PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS

O planejamento das moléculas obtidas neste trabalho (**Figura 38**), foi feito partindo dos trabalhos de Jadav *et al.* (2015) e Micewicz *et al.* (2018). Em 2015, Jadav e colaboradores sintetizaram uma série de compostos contendo um núcleo tiazol ativos contra o vírus da Dengue 2, que pertence à família dos Flavivírus, a mesma do ZIKV. Em 2018, Micewicz e colaboradores forneceram orientações gerais para o planejamento dos inibidores do ZIKV, no qual devem conter um conjunto de 3 anéis aromáticos ou alifáticos na configuração *para* ou *meta* e com ou sem modificações adicionais. Considerando essas duas informações, foi planejada a síntese de inéditos compostos contendo três anéis, sendo um deles o núcleo tiazol.

Figura 38 - Planejamento estrutural dos compostos da série DLT.

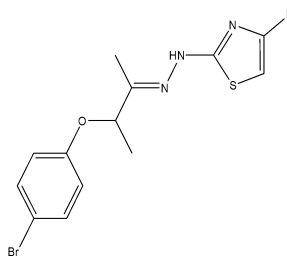
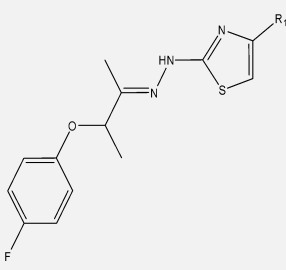


Fonte: O autor (2021)

O grupo ligante e os substituintes em R₁ (bromo e flúor) foram escolhidos com base em uma triagem anterior feita com mais de 50 compostos do banco de dados do LpQM (P. A. T. M. Gomes, dados não publicados). Com a presença dos substituintes halogenados na porção ariloxi, é possível avaliar a contribuição da densidade eletrônica na atividade biológica das moléculas.

Substituintes halogenados possibilitam, ainda, a melhoria da absorção oral, da permeabilidade, da estabilidade metabólica e química, e a formação de ligação com o alvo farmacológico, contribuindo para a estabilidade da ligação fármaco-receptor (HERNANDES *et al.*, 2010). As estruturas dos compostos planejados também foram previamente analisadas segundo a “Regra dos 5” de Lipinsk, *et al.* (1997), como mostra a **Tabela 7**.

Tabela 7 - Dados dos compostos planejados da série DLT aplicados à “Regra dos 5”

Estrutura Geral da Molécula	Ref.	R ₂	Aceptores de H ≤10	Doadores de H ≤5	MLogP ≤4,15	Massa ≤500u
	DLT-1A	Ph	3	1	3,60	416,33
	DLT-1B	4-CH ₃ -Ph	3	1	3,82	430,36
	DLT-1C	4-OCH ₃ -Ph	4	1	3,26	446,36
	DLT-1E	4-NO ₂ -Ph	5	1	2,57	461,33
	DLT-1F	4-F-Ph	4	1	3,98	434,33
	DLT-1G	4-Cl-Ph	3	1	4,09	450,78
	DLT-1H	2-Naph	3	1	4,15	466,39
	DLT-1I	4-Br-Ph	3	1	4,10	495,23
	DLT-1J	4-Ph-Ph	3	1	4,65	492,43
		DLT-2A	Ph	4	1	3,37
DLT-2B		4-CH ₃ -Ph	4	1	3,60	369,46
DLT-2C		4-OCH ₃ -Ph	4	1	3,65	385,46
DLT-2E		4-NO ₂ -Ph	6	1	2,34	400,43
DLT-2F		4-F-Ph	5	1	3,76	373,42
DLT-2G		4-Cl-Ph	4	1	3,87	389,87
DLT-2H		2-Naph	4	1	4,07	405,49
DLT-2I		4-Br-Ph	4	1	3,98	434,33
DLT-2J		4-Ph-Ph	4	1	4,45	431,53

Valores obtidos através do site SwissADME

Os resultados da análise para os compostos planejados estão dispostos na **Tabela 7**. Foi observado que grande parte das estruturas se apresentam de acordo com todos os parâmetros da regra e dois compostos (DLT-1J e DLT-2J) violaram apenas um parâmetro, que segundo a regra é aceitável.

5.3 METODOLOGIA

5.3.1 Síntese e Caracterização

Para as reações, foram utilizados os solventes: acetona, hexano, acetato, etanol, isopropanol, éter dietílico e DMF, provenientes das marcas Dinâmica, Cinética ou Química moderna. Já os reagentes: 4-bromo-fenol, 4-fluor-fenol, 3-cloro-2-butanona, tiossemicarbazida, 2-bromo-acetofenona, 2-bromo-4'-metil-acetofenona, 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona, 2-bromo-4'-nitro-acetofenona, 2-bromo-4'-fluoracetofenona, 2-bromo-4'-cloro-acetofenona, 2-bromo-2-acetonaftona, 2,4'-dibromoacetofenona e 2-bromo-4'-fenil-acetofenona, foram adquiridos das marcas Sigma Aldrich e Pro Químicos. O DMSO deuterado (DMSO-d₆) da marca Sigma-Aldrich foi utilizado para a realização de todos os RMNs.

O acompanhamento das reações foi realizado através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se por fase sílica-gel 60 da marca Alugram® com indicador fluorescente F₂₅₄. Para a leitura das placas cromatográficas foi utilizada uma câmara de radiação ultravioleta, com lâmpadas de 365 nm e 254 nm, da marca Vilber Lourmat. Para realizar algumas etapas das reações foi preciso utilizar banho ultrassônico Unique EM-804, 40 kHz de frequência (180W de potência).

Para auxiliar nos processos reacionais foi utilizado chapas aquecedoras da marca Fisatom, modelo 752A. A aferição do ponto de fusão dos produtos obtidos foi feita através do equipamento fusiômetro da marca Fisatom, modelo 430D.

As análises espectroscópicas foram realizadas em laboratórios parceiros. Sendo a Ressonância Magnética Nuclear (¹³C e ¹H e DEPT) realizada na central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, utilizando os instrumentos da Varian, modelo Unity Plus (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) e o equipamento da Bruker AMX (300 MHz para ¹H ; 75,5 MHz para ¹³C). Utilizou-se o tetrametilsilano como padrão e o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) como solvente. A análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) foi realizada no CETENE.

5.3.1.1 Síntese dos intermediários DLT-Int1 e DLT-Int2

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o 4-bromo-fenol (ou 4-fluor-fenol), a 3-cloro-2-butanona (na proporção 1:1), acetona (q.s.p.), carbonato de potássio e iodeto de potássio (catalisadores). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética por 24h. A reação foi acompanhada por placas cromatográficas de camada delgada (CCD). A reação foi filtrada em funil sinterizado e lavado com etanol.

5.3.1.2 Síntese dos intermediários DLT-Int3 e DLT-Int4

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o DLT-Int1 (ou DLT-Int2), a tiosemicarbazida (na proporção 1:1), HCl como catalisador e como solvente foi utilizado o etanol. A mistura reacional foi mantida no ultrassom. A reação foi acompanhada por placas cromatográficas de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, obtendo-se o produto puro.

5.3.1.3 Síntese da série dos tiazóis DLT-1A à DLT-2J

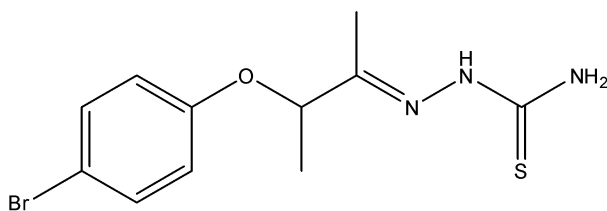
Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o DLT-Int3 (ou DLT-Int4), a acetofenona disponível e como solvente foi utilizado o isopropanol. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética por 24h. As reações foram acompanhadas por placas cromatográficas de camada delgada (CCD). O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado e submetido à lavagem com isopropanol em sistema a vácuo. O funil sinterizado contendo o produto foi acondicionado em dessecador por 24h e então pesado para obtenção dos dados de rendimento reacional.

5.3.1.4 Caracterização Estrutural

A verificação da estrutura química das moléculas foi realizada através de análises espectroscópicas dos compostos finais (EMAR e RMN ^{13}C e ^1H). Além disso, também foram observados o ponto de fusão (PF) destas moléculas.

5.3.1.5 Dados físico-químicos e elucidação estrutural

DLT-Int3: 2-(3-(4-Bromofenoxi)butan-2-ilideno)tiossemicarbazona



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₄BrN₃OS

Massa Molecular: 315,87 u.

Rendimento: 70%.

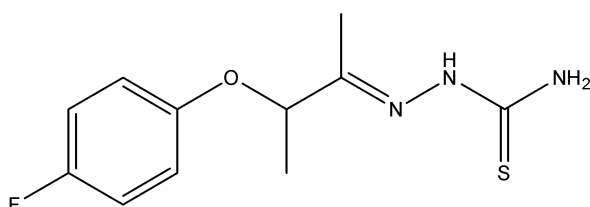
Ponto de Fusão: 141-143 °C.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 1.41 (d, 3H, *J* 6.6 Hz, CH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 4.95 (q, 1H, *J* 6.6 Hz, CH), 6.95 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 7.40 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, NH₂), 8.26 (s, 1H, NH₂), 10.20 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 11.0 (CH₃), 18.6 (CH₃), 76.5 (CH), 112.44 (C-Br, Ar), 117.9 (CH, Ar), 117.9 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 132.1 (CH, Ar), 151.2 (C=N), 156.5 (C-O), 179.1 (C=S).

EMAR: 315,91 [M + H]⁺

DLT-Int4: 2-(3-(4-Fluorofenoxi)butan-2-ilideno)tiossemicarbazona



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₄FN₃OS

Massa Molecular: 256,30 u.

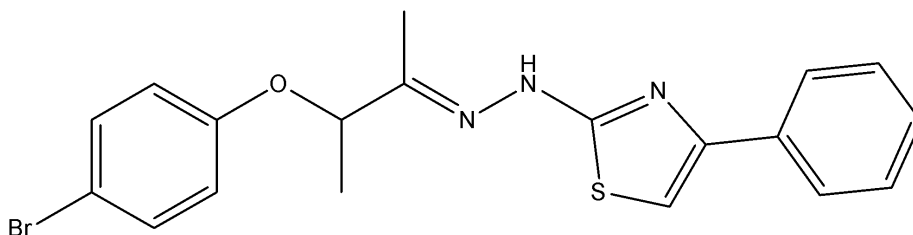
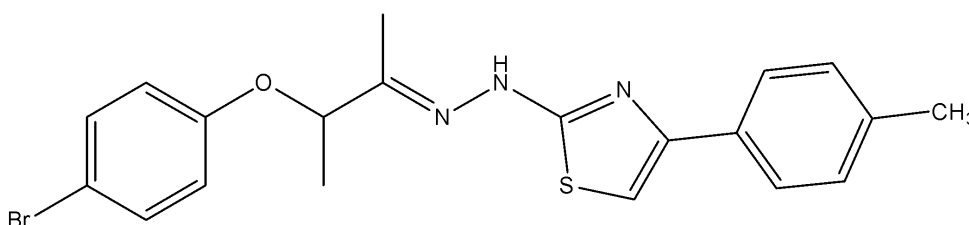
Rendimento: 83%.

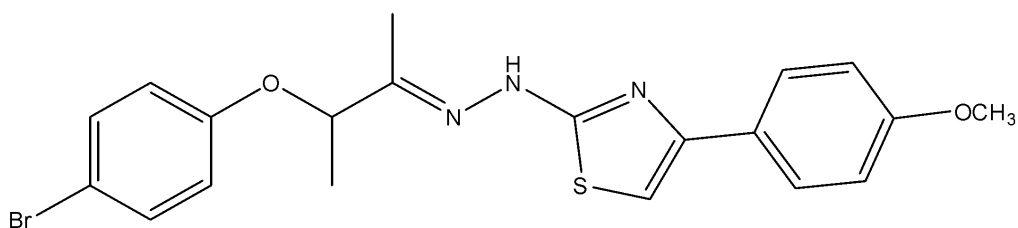
Ponto de Fusão: 148-150 °C.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 1.40 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.82 (s, 3H, CH₃), 4.91 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.97-7.10 (m, 4H, ArH), 7.81 (s, 1H, NH₂), 8.24 (s, 1H, NH₂), 10.17 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 10.99 (CH₃), 18.73 (CH₃), 76.81 (CH), 115.69 (CH, Ar), 115.91 (CH, Ar), 116.98 (CH, Ar), 117.07 (CH, Ar), 151.58 (C-O, Ar), 153.51 (C=N), 155.46 (C-F, Ar), 179.18 (C=S).

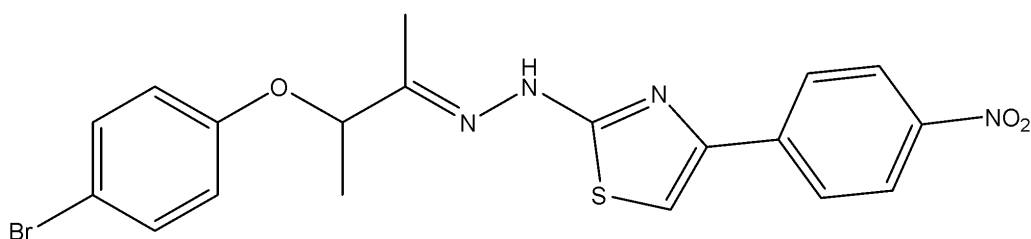
EMAR: 256,10 [M + H]⁺

DLT-1A: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-feniltiazol**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₈BrN₃OS**Massa Molecular:** 416,33 u.**Rendimento:** 91%.**Ponto de Fusão:** 154-155 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.4 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.8 (s, 3H, CH₃), 4.9 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 5.8 (s largo, 1H, NH), 6.9 (m, 2H, ArH), 7.3 (m, 4H, ArH), 7.8 (m, 4H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.6 (CH₃), 18.5 (CH₃), 76.7 (CH), 103.9 (CH, tiazol), 112.3 (C-Br, Ar), 118.0 (CH, Ar), 118.0 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 132.1 (C, Ar), 134.5 (C, tiazol), 150.3 (C=N), 156.6 (C-Ar), 169.5 (S-C=N).**EMAR:** 416,00 [M + H]⁺**DLT-1B: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-p-toluil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₂₀H₂₀BrN₃OS**Massa Molecular:** 430,36 u.**Rendimento:** 80%.**Ponto de Fusão:** 175-176 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.89 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 4.97 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.94 (d, 2H, ArH), 7.2 (m, 3H, ArH), 7.42 (d, 2H, ArH), 7.72 (d, 2H, ArH), 10.42 (s largo, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.54 (CH₃), 20.77 (CH₃), 76.72 (CH), 103.37 (CH, tiazol), 112.41 (C-Br, Ar), 118.01 (CH, Ar), 118.01 (CH, Ar), 125.52 (CH, Ar), 125.52 (CH, Ar), 129.17 (CH, Ar), 129.17 (C, Ar), 131.62 (C, Ar), 132.11 (C, Ar), 136.92 (CH, Ar), 136.92 (CH, Ar), 149.69 (C, tiazol), 150.62 (C=N), 156.67 (C-O, Ar), 169.45 (S-C=N).**EMAR:** 430,49 [M + H]⁺

DLT-1C: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-metoxifenil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₂₀H₂₀BrN₃O₂S**Massa Molecular:** 426,36 u.**Rendimento:** 91%.**Ponto de Fusão:** 164-165 °C.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.89 (s, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.97 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 5.80 (s largo, 1H, NH), 6.95 (d, 4H, ArH), 7.12 (s, 1H, ArH), 7.42 (d, 2H, ArH), 7.76 (d, 2H, ArH).

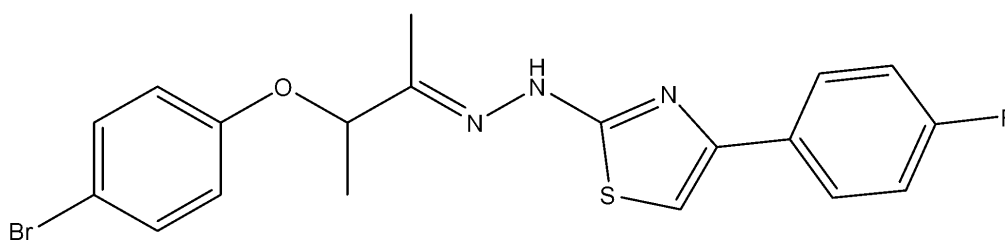
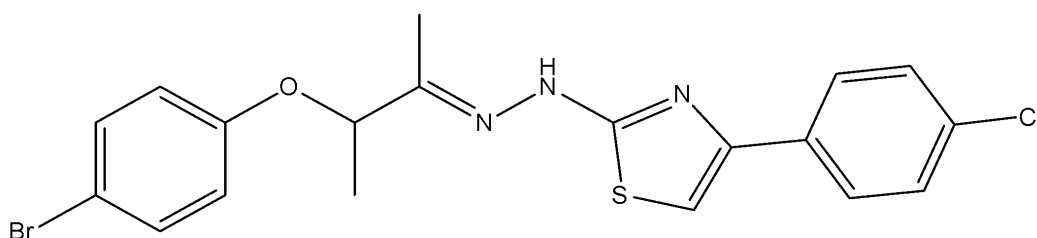
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 11.67 (CH₃), 18.53 (CH₃), 55.13 (CH₃), 76.71 (CH), 101.94 (CH, tiazol), 112.41 (C-Br, Ar), 113.97 (CH, Ar), 113.97 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 126.93 (CH, Ar), 126.93 (CH, Ar), 126.93 (C, Ar), 132.10 (C, Ar), 132.10 (C, Ar), 149.30 (C, Ar), 150.70 (C, tiazol), 156.66 (C=N), 158.86 (C-O, Ar), 169.44 (S-C=N).

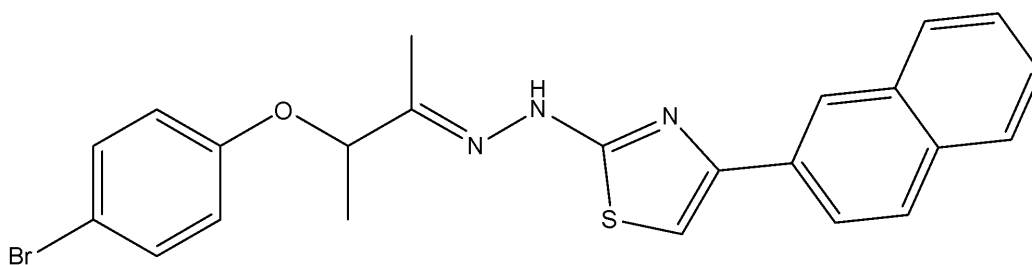
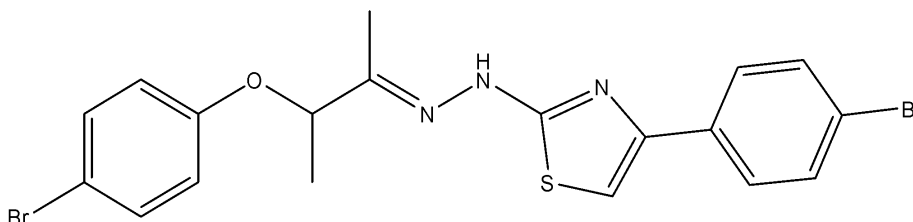
EMAR: 426,00 [M + H]⁺**DLT-1E: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-nitrofenil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇BrN₄O₃S**Massa Molecular:** 461,33 u.**Rendimento:** 93%.**Ponto de Fusão:** 183 °C.

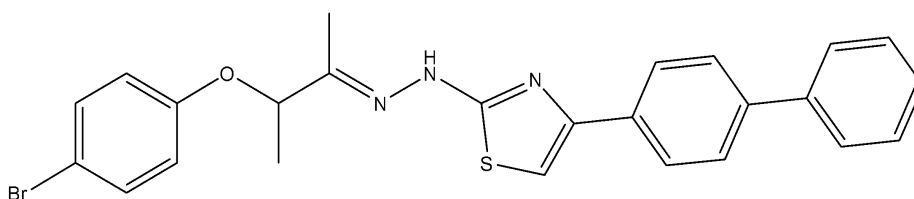
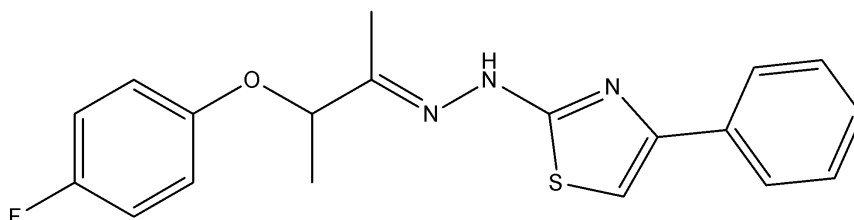
RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.89 (s, 3H, CH₃), 4.72 (s largo, 1H, NH), 4.98 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.94 (d, 2H, ArH), 7.42 (d, 2H, ArH), 7.77 (s, 1H, ArH), 8.08 (d, 2H, ArH), 8.26 (d, 2H, ArH).

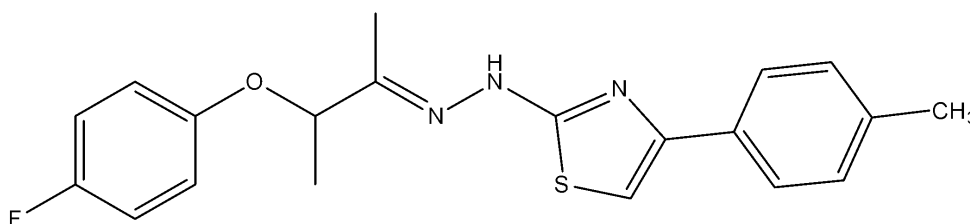
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 11.73 (CH₃), 18.52 (CH₃), 76.71 (CH), 108.88 (CH, tiazol), 112.41 (C-Br, Ar), 118.02 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 124.10 (CH, Ar), 124.10 (CH, Ar), 126.93 (CH, Ar), 126.93 (CH, Ar), 126.93 (C, Ar), 132.10 (C, Ar), 132.10 (C, Ar), 140.72 (C, Ar), 146.14 (C-N, Ar), 148.43 (C, tiazol), 150.59 (C=N), 156.66 (C-O, Ar), 169.98 (S-C=N).

EMAR: 461,10 [M + H]⁺

DLT-1F: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-fluorofenil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇BrFN₃OS**Massa Molecular:** 434,33 u.**Rendimento:** 89%.**Ponto de Fusão:** 170-171 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.88 (s, 3H, CH₃), 4.97 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.94 (d, 2H, ArH), 7.25 (m, 3H, ArH), 7.42 (d, 2H, ArH), 7.88 (d, 2H, ArH), 10.88 (s largo, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.53 (CH₃), 76.72 (CH), 103.78 (CH, tiazol), 112.40 (C-Br, Ar), 115.28 (CH, Ar), 115.57 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 127.46 (C, Ar), 127.57 (CH, Ar), 127.57 (CH, Ar), 131.13 (C, Ar), 132.10 (C, Ar), 149.03 (C, tiazol), 150.42 (C=N), 156.67 (C-O, Ar), 159.95 (C-F, Ar), 169.64 (S-C=N).**EMAR:** 434,51 [M + H]⁺**DLT-1G: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-cloro)feniltiazol****Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇BrClN₃OS**Massa Molecular:** 450,78 u.**Rendimento:** 93%.**Ponto de Fusão:** 176 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.88 (s, 3H, CH₃), 4.97 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 5.84 (s largo, 1H, NH), 6.94 (d, 2H, ArH), 7.40 (m, 5H, ArH), 7.85 (d, 2H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.53 (CH₃), 76.71 (CH), 104.82 (CH, tiazol), 112.40 (C-Br, Ar), 118.02 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 127.23 (CH, Ar), 127.23 (CH, Ar), 128.60 (CH, Ar), 128.60 (CH, Ar), 131.89 (C, Ar), 132.11 (CH, Ar), 132.11 (CH, Ar), 133.45 (C-Cl, Ar), 148.96 (C, tiazol), 150.39 (C=N), 156.66 (C-O, Ar), 169.67 (S-C=N).**EMAR:** 450,90 [M + H]⁺

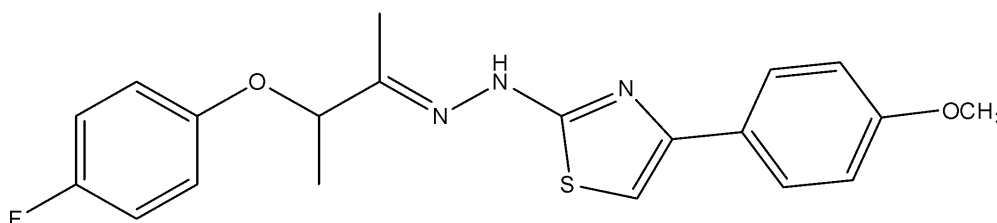
DLT-1H: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(2-naftil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₂₃H₂₀BrN₃OS**Massa Molecular:** 466,39 u.**Rendimento:** 92%.**Ponto de Fusão:** 187 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃), 4.99 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.53 (s largo, 1H, NH), 6.96 (d, 2H, ArH), 7.45 (m, 5H, ArH), 7.93 (m, 4H, ArH), 8.37 (s, 1H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.53 (CH₃), 76.73 (CH), 104.81 (CH, tiazol), 112.40 (C-Br, Ar), 118.02 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 123.92 (CH, Ar), 124.01 (CH, Ar), 125.99 (C, Ar), 126.44 (CH, Ar), 126.44 (CH, Ar), 127.54 (CH, Ar), 128.74 (CH, Ar), 128.74 (CH, Ar), 132.11 (CH, Ar), 132.11 (CH, Ar), 132.40 (C, Ar), 133.11 (C, Ar), 149.03 (C, tiazol), 150.42 (C=N), 156.68 (C-O, Ar), 169.61 (S-C=N).**EMAR:** 466,70 [M + H]⁺**DLT-1I: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-bromofenil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇Br₂N₃OS**Massa Molecular:** 495,23 u.**Rendimento:** 86%.**Ponto de Fusão:** 174-175 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.88 (s, 3H, CH₃), 4.97 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.94 (d, 2H, ArH), 7.40 (m, 3H, ArH), 7.58 (d, 2H, ArH), 7.78 (d, 2H, ArH), 8.87 (s largo, 1H, NH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.54 (CH₃), 76.69 (CH), 104.91 (CH, tiazol), 112.40 (C-Br, Ar), 118.02 (CH, Ar), 118.02 (CH, Ar), 120.50 (C-Br, Ar), 127.55 (CH, Ar), 127.55 (CH, Ar), 131.52 (CH, Ar), 131.52 (CH, Ar), 132.11 (CH, Ar), 132.11 (CH, Ar), 133.78 (C, Ar), 148.99 (C, tiazol), 150.40 (C=N), 156.66 (C-O, Ar), 169.67 (S-C=N).**EMAR:** 495,10 [M + H]⁺

DLT-1J: (E)-2-(2-(3-(4-bromofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(1,1difenil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₂₅H₂₂BrN₃OS**Massa Molecular:** 492,43 u.**Rendimento:** 93%.**Ponto de Fusão:** 199 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.45 (d, 3H, *J* 6.8 Hz, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃), 4.98 (q, 1H, *J* 6.4 Hz, CHO), 6.45 (s largo, 1H, NH), 6.94 (m, 3H, ArH), 7.25 (m, 5H, ArH), 7.71 (m, 4H, ArH), 7.93 (d, 2H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.57 (CH₃), 76.72 (CH), 104.25 (CH, tiazol), 112.41 (C-Br, Ar), 118.03 (CH, Ar), 118.03 (CH, Ar), 126.12 (C, Ar), 126.45 (CH, Ar), 126.45 (CH, Ar), 126.83 (CH, Ar), 126.83 (CH, Ar), 127.46 (CH, Ar), 127.46 (CH, Ar), 128.95 (CH, Ar), 128.95 (CH, Ar), 132.12 (CH, Ar), 132.12 (CH, Ar), 133.60 (C, Ar), 139.10 (C, Ar), 139.61 (C, Ar), 149.65 (C, tiazol), 150.43 (C=N), 156.68 (C-O, Ar), 169.59 (S-C=N).**EMAR:** 492,66 [M + H]⁺**DLT-2A: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-feniltiazol****Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₈FN₃OS**Massa Molecular:** 355,43 u.**Rendimento:** 88%.**Ponto de Fusão:** 145-147 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.4 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.9 (s, 3H, CH₃), 4,5 (s largo, 1H, NH), 4.9 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH-CH₃), 7.0 (m, 6H, ArH), 7.4 (d, 3H, ArH), 7.8 (d, 1H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.6 (CH₃), 18.6 (CH₃), 77.1 (CH), 103.9 (CH, tiazol), 115.6 (CH, Ar), 115.9 (CH, Ar), 117.1 (CH, Ar), 125.5 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 133.7 (CH, Ar), 134.4 (C, Ar), 149.9 (C, tiazol), 150.7 (C-O, Ar), 151.6 (C-F, Ar), 153.6 (C=N), 169.5 (S-C=N).**EMAR:** 356,09 [M + H]⁺

DLT-2B: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-p-toluil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₂₀H₂₀FN₃OS**Massa Molecular:** 369,46 u.**Rendimento:** 85%.**Ponto de Fusão:** 221-222 °C.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 1.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.91 (s, 3H, CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃), 4.95 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 6.75 (d, 2H, ArH), 7.15 (m, 3H, ArH), 7.44 (m, 4H, ArH), 10.56 (s largo, 1H, NH).

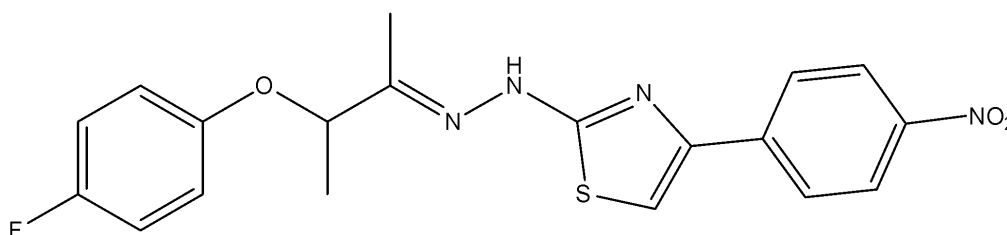
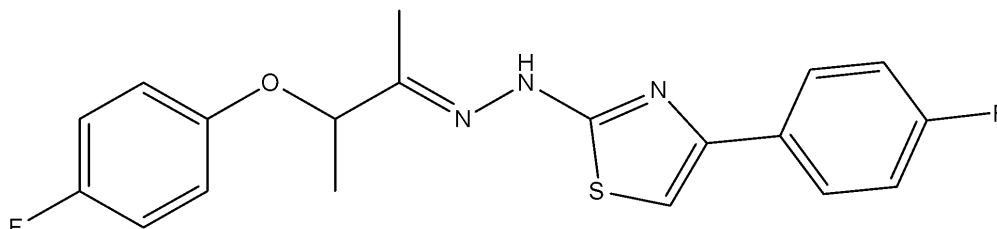
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 19.94 (CH₃), 20.72 (CH₃), 25.47 (CH₃), 76.7 (CH), 104.42 (CH, tiazol), 110.91 (CH, Ar), 110.91 (CH, Ar), 118.79 (CH, Ar), 118.79 (CH, Ar), 125.30 (CH, Ar), 125.90 (CH, Ar), 128.58 (CH, Ar), 128.83 (CH, Ar), 129.64 (C, Ar), 137.04 (C, Ar), 138.58 (C, tiazol), 140.64 (C–O, Ar), 140.73 (C–F, Ar), 165.18 (C=N), 176.64 (S–C=N).

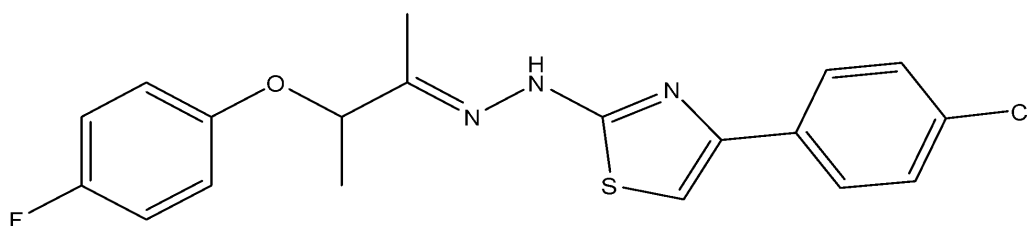
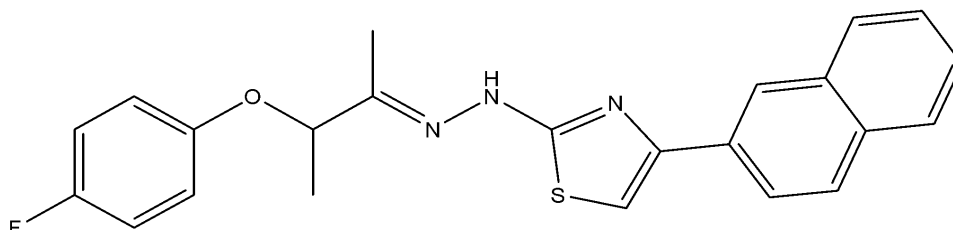
EMAR: 369,76 [M + H]⁺**DLT-2C: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-metoxifenil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₂₀H₂₀FN₃O₂S**Massa Molecular:** 385,46 u.**Rendimento:** 82%.**Ponto de Fusão:** 144-145 °C.

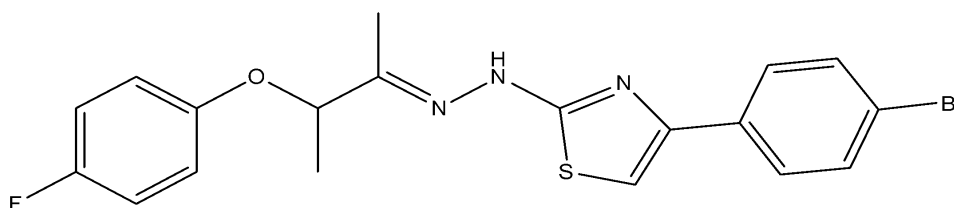
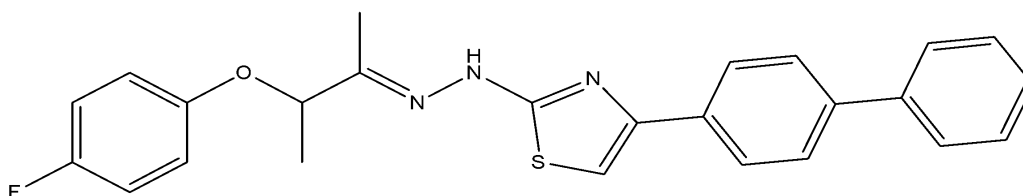
RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}: 1.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.93 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 6.97 (m, 4H, ArH), 7.10 (m, 3H, ArH), 7.75 (d, 2H, ArH), 9.53 (s largo, 1H, NH)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}: 11.75 (CH₃), 18.63 (CH₃), 55.17 (CH₃), 77.07 (CH), 102.06 (CH, tiazol), 113.67 (CH, Ar), 114.03 (CH, Ar), 115.72 (CH, Ar), 115.95 (CH, Ar), 117.17 (CH, Ar), 117.25 (CH, Ar), 126.62 (CH, Ar), 127.01 (CH, Ar), 129.21 (C, Ar), 153.64 (C, tiazol), 153.67 (C–O, Ar), 155.50 (C–F, Ar), 157.86 (C=N), 158.99 (C–O, Ar), 169.48 (S–C=N).

EMAR: 385,10 [M + H]⁺

DLT-2E: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-nitrofenil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇FN₄O₃S**Massa Molecular:** 400,43 u.**Rendimento:** 93%.**Ponto de Fusão:** 191 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃), 4.94 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 6.99 (d, 2H, ArH), 7.09 (d, 2H, ArH), 7.68 (s, 1H, ArH), 8.09 (d, 2H, ArH), 8.26 (d, 2H, ArH), 11.13 (s largo, 1H, NH)**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.66 (CH₃), 18.59 (CH₃), 77.07 (CH), 108.83 (CH, tiazol), 115.69 (CH, Ar), 115.92 (CH, Ar), 117.16 (CH, Ar), 117.23 (CH, Ar), 124.09 (CH, Ar), 124.09 (CH, Ar), 126.27 (CH, Ar), 126.27 (CH, Ar), 140.75 (C, Ar), 146.14 (C–N, Ar), 150.88 (C, tiazol), 153.66 (C–O, Ar), 155.48 (C–F, Ar), 157.82 (C=N), 169.98 (S–C=N).**EMAR:** 400,89 [M + H]⁺**DLT-2F: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-fluorofenil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇N₃F₂OS**Massa Molecular:** 373,42 u.**Rendimento:** 89%.**Ponto de Fusão:** 147-148 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.43 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.88 (s, 3H, CH₃), 4.92 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 5.79 (s largo, 1H, NH), 6.97 (m, 2H, ArH), 7.08 (m, 2H, ArH), 7.25 (m, 3H, ArH), 7.25 (m, 2H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.69 (CH₃), 18.61 (CH₃), 77.12 (CH), 103.83 (CH, tiazol), 115.36 (CH, Ar), 115.58 (CH, Ar), 115.72 (CH, Ar), 115.95 (CH, Ar), 117.18 (CH, Ar), 117.26 (CH, Ar), 127.53 (CH, Ar), 127.62 (CH, Ar), 131.02 (C, Ar), 153.68 (C, tiazol), 155.50 (C–O, Ar), 157.86 (C=N), 160.42 (C–F, Ar), 162.84 (C–F, Ar), 169.78 (S–C=N).**EMAR:** 373,78 [M + H]⁺

DLT-2G: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-clorofenil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇ClFN₃OS**Massa Molecular:** 389,87 u.**Rendimento:** 94%.**Ponto de Fusão:** 148 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.43 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.88 (s, 3H, CH₃), 4.93 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 5.81 (s largo, 1H, NH), 6.98 (m, 2H, ArH), 7.08 (m, 2H, ArH), 7.25 (m, 3H, ArH), 7.86 (d, 2H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.68 (CH₃), 18.64 (CH₃), 77.12 (CH), 104.84 (CH, tiazol), 115.72 (CH, Ar), 115.95 (CH, Ar), 117.19 (CH, Ar), 117.27 (CH, Ar), 127.27 (CH, Ar), 128.42 (CH, Ar), 128.64 (CH, Ar), 131.96 (CH, Ar), 133.40 (C, Ar), 148.86 (C-Cl, Ar) 150.91 (C, tiazol), 153.89 (C-O, Ar), 155.80 (C-F, Ar), 157.86 (C=N), 169.72 (S-C=N).**EMAR:** 389,96 [M + H]⁺**DLT-2H: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(2-naftil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₂₃H₂₀FN₃OS**Massa Molecular:** 405,49 u.**Rendimento:** 90%.**Ponto de Fusão:** 175 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.91 (s, 3H, CH₃), 4.61 (s largo, 1H, NH), 4.94 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 6.98 (m, 2H, ArH), 7.07 (m, 2H, ArH), 7.86 (m, 3H, ArH), 7.94 (m, 4H, ArH), 8.37 (s, 1H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.72 (CH₃), 18.66 (CH₃), 77.15 (CH), 104.89 (CH, tiazol), 115.75 (CH, Ar), 115.98 (CH, Ar), 117.21 (CH, Ar), 117.28 (CH, Ar), 123.96 (CH, Ar), 124.14 (CH, Ar), 126.08 (CH, Ar), 126.51 (CH, Ar), 127.60 (CH, Ar), 128.15 (CH, Ar), 128.15 (CH, Ar), 131.84 (C, Ar), 132.46 (C, Ar), 133.14 (C, Ar), 149.79 (C, tiazol), 153.70 (C-O, Ar), 155.52 (C-F, Ar), 157.87 (C=N), 169.67 (S-C=N).**EMAR:** 405,80 [M + H]⁺

DLT-2I: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(4-bromofenil)tiazol**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇BrFN₃OS**Massa Molecular:** 434,33 u.**Rendimento:** 91%.**Ponto de Fusão:** 158-159 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.43 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.89 (s, 3H, CH₃), 4.92 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 6.53 (s largo, 1H, NH), 6.99 (d, 2H, ArH), 7.08 (d, 2H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 7.58 (d, 2H, ArH), 7.78 (d, 2H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.67 (CH₃), 18.63 (CH₃), 77.12 (CH), 104.91 (CH, tiazol), 115.71 (CH, Ar), 115.94 (CH, Ar), 117.18 (CH, Ar), 117.25 (CH, Ar), 120.53 (C-Br, Ar), 127.57 (CH, Ar), 127.57 (CH, Ar), 131.54 (CH, Ar), 131.34 (C, Ar), 133.72 (C, Ar), 150.85 (C, tiazol), 153.88 (C-O, Ar), 155.48 (C-F, Ar), 157.84 (C=N), 169.70 (S-C=N).**EMAR:** 434,57 [M + H]⁺**DLT-2J: (E)-2-(2-(3-(4-fluorofenoxi)butan-2-ilideno)hidrazil)-4-(1,1-difenil)tiazol****Fórmula Molecular:** C₂₅H₂₂FN₃OS**Massa Molecular:** 431,53 u.**Rendimento:** 87%.**Ponto de Fusão:** 162-163 °C.**RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ_{ppm}:** 1.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃), 4.83 (s largo, 1H, NH), 4.94 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 6.98 (m, 2H, ArH), 7.08 (m, 2H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 7.47 (m, 2H, ArH), 7.70 (m, 4H, ArH), 7.92 (m, 2H, ArH).**RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ_{ppm}:** 11.70 (CH₃), 18.66 (CH₃), 77.13 (CH), 104.29 (CH, tiazol), 115.73 (CH, Ar), 115.96 (CH, Ar), 117.19 (CH, Ar), 117.27 (CH, Ar), 126.16 (CH, Ar), 126.47 (CH, Ar), 126.47 (CH, Ar), 126.86 (CH, Ar), 126.86 (CH, Ar), 127.51 (CH, Ar), 127.51 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 128.98 (CH, Ar), 133.44 (C, Ar), 139.16 (C, Ar), 139.61 (C, Ar), 151.09 (C, tiazol), 153.68 (C-O, Ar), 155.51 (C-F), 157.86 (C=N), 169.64 (S-C=N).**EMAR:** 431,98 [M + H]⁺

5.3.2 Ensaios Biológicos

5.3.2.1 Cultura de células Vero

As células em criotubos foram descongeladas em banho-maria a 37°C, depois transfere o conteúdo celular para um tubo Falcon e colocadas para centrifugar a 1200 RPM por 7 minutos. O conteúdo sobrenadante do tubo foi descartado, deixando apenas o conteúdo celular. As células foram suspensas em vortex com 4 mL de meio de cultura DMEM + 10% SBF (soro bovino fetal) e a suspensão foi transferida para uma garrafa T25. As células foram mantidas incubadas a uma temperatura de 37°C e 5% de atmosfera de CO₂.

O meio de cultura presente na garrafa foi descartado e em seguida foi adicionada uma solução de PBS (phosphate buffered saline) 1x no tapete celular. Em seguida, o PBS foi descartado. Uma solução de 0,2% de tripsina foi adicionada até a cobertura total do tapete de células e colocada para incubação a 37°C de 3 a 5 minutos. O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo Falcon com meio de cultura DMEM e logo após centrifugado a 1200 RPM por 7 minutos. O conteúdo sobrenadante do tubo foi descartado e o conteúdo celular foi ressuspenso com meio de cultura DMEM + 10% SBF e uma parte foi transferido para uma garrafa (T25, T75 ou T150) e completado com mais meio de cultura DMEM + SBF. A quantidade de meio de cultura DMEM + SBF e suspensão de células utilizadas variou dependendo do tamanho das garrafas e da finalidade do cultivo celular. Para o plaqueamento, a suspensão de células foi distribuída em placas com 96 poços (o número de poços podia variar de acordo com a finalidade do experimento) com meio de cultura DMEM + 10% SBF. As garrafas da manutenção e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de atm de CO₂. As placas foram utilizadas após 24h de incubação (AMMERMAN *et al*, 2008, modificado).

5.3.2.2 Ensaio de citotoxicidade em células Vero

As concentrações iniciais e diluições dos compostos testados foram previamente escolhidas e preparadas com meio de cultura DMEM + 2% SBF como solvente. Foram utilizadas placas de 96 poços. Após o meio de cultura ser descartado, 150 µL das diluições foram inseridas nos poços em várias repetições. Uma linha da placa para controle celular foi adicionada. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 5 dias. Após esse período de

incubação, observou-se visualmente o efeito citotóxico causado pelos compostos. O meio de cultura com os compostos foi descartado. Uma solução com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) foi preparada em uma concentração de 1mg/mL com meio de cultura MEM. A placa recebeu essa solução, onde cada poço teve 50 µL. Após o procedimento, a placa foi novamente incubada, nos mesmos parâmetros, por 3 a 4 horas. Depois da incubação, a solução com o MTT foi descartada. Por último, foi inserido 100 µL em cada poço de DMSO e levado para agitação por 15 minutos. A leitura espectroscópica foi realizada com 570 nm de comprimento de onda. O método utilizado foi baseado no proposto por Mosmann em 1983, com algumas modificações.

5.3.2.3 *Cultura do vírus Zika (ZIKV)*

Alíquotas de vírus foram descongeladas em banho de gelo. As garrafas provenientes da cultura celular tiveram o meio de cultura descartado e as alíquotas foram adicionadas no tapete celular. A garrafa foi levada para incubação a 37°C e 5% de atm de CO₂ por 1h. Após esse intervalo, foi adicionado meio de cultura DMEM + 2% SFB e colocado para incubar novamente com os mesmos parâmetros.

Após a observação da destruição de cerca de 70% do tapete de células pelo vírus, o conteúdo da garrafa foi centrifugado em tubo Falcon a 2000 RPM por 10 minutos a 4°C. O conteúdo sobrenadante foi transferido para outro Falcon e congelado em pequenas alíquotas. Placas de 96 poços com células Vero foram utilizadas. Foram preparadas 8 diluições seriadas do vírus em meio de cultura DMEM + 2% SFB. Após retirado o meio de cultura da placa a ser utilizada, 50 µL de cada diluição do vírus foi adicionada nos poços da placa em várias repetições. A placa foi incubada a 37°C e 5% de atm de CO₂ por 1h. Após esse intervalo, cada poço da placa recebeu mais 100 µL de meio de cultura DMEM + 2% SFB. A placa voltou a ser incubada, nos mesmos parâmetros, por 5 dias. Foram selecionadas algumas colunas da placa para utilização como controle celular (apenas meio de cultura, sem vírus).

5.3.2.4 *Ensaio antiviral frente o ZIKV*

Para a avaliação da atividade antiviral dos compostos, protocolos já validados para o vírus dengue foram utilizados com pequenas modificações para ZIKV, uma vez que os vírus apresentam muitas similaridades (Moghaddam, Teoh et al. 2014). Os diferentes cultivos

celulares foram infectados com o vírus Zika utilizando-se o MOI (Multiplicidade de Infecção, que é a relação entre a quantidade de vírus pela quantidade de célula) de 0,1 e, a seguir, incubados a 37°C com 5% de CO₂ durante duas horas, quando, então, o inóculo foi retirado. Nesses testes, incluiu-se ainda o controle celular (célula e meio) e o controle do vírus (célula, meio, vírus). Os compostos foram adicionados após a inoculação viral. Em todos os tratamentos, foi utilizada a concentração de CC₂₀ para as células Vero, determinada em experimento anterior. Após cinco dias de incubação, os meios de cultivo foram coletados e o título do vírus de cada poço foi determinado por TCID₅₀. Os dados obtidos em cada experimento foram testados quanto à normalidade e comparados utilizando o teste “t-Student” (2 tratamentos) ou ANOVA (mais de 2 tratamentos) seguida do apropriado pós-teste. Para realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. Apenas os valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significativos.

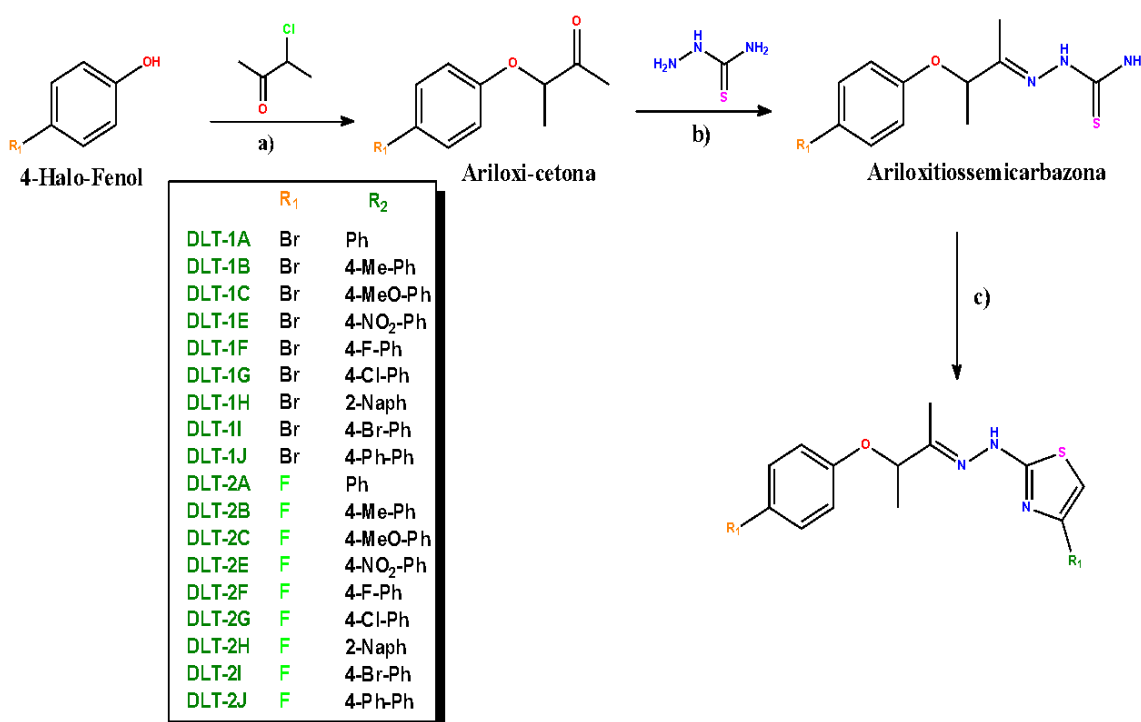
5.4 RESULTADOS

5.4.1 Síntese e Caracterização

5.4.1.1 Obtenção da Série Química DLT

Todos os compostos da série foram obtidos por meio de uma metodologia simples, em três etapas. Inicialmente foram obtidos os dois compostos intermediários (DLT-Int1 e DLT-Int2), que são duas ariloxi-cetonas, a partir do 4-bromo-fenol e 4-flúor-fenol. Posteriormente, a partir das duas ariloxi-cetonas, foram obtidos os dois compostos intermediários DLT-Int3 e DLT-Int4 (ariloxitiossemicarbazonas). Após essa reação, esses compostos intermediários foram condensados com diferentes α -halo-cetonas, obtendo-se, desse modo, os 18 tiazóis (**Figura 39**).

Figura 39 - Esquema geral da síntese da série DLT



Reagentes e condições: a) Acetona, K₂CO₃, KI, Ag. Magnética. b) EtOH, HCl, ultrassom. c) respectivas α -halocetonas, isopropanol, overnight.

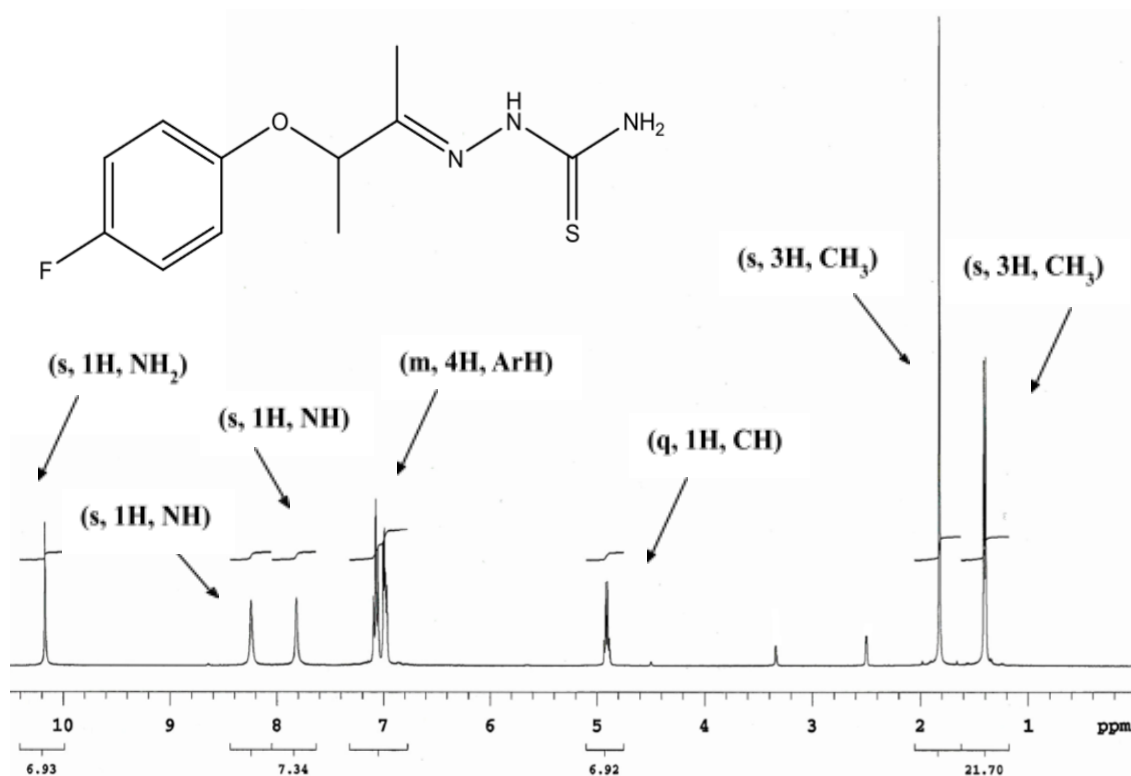
5.4.1.2 Caracterização estrutural da série DLT

Todos os compostos obtidos foram estruturalmente caracterizados utilizando-se as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ^1H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) e Espectrometria de Massas. A seguir, será detalhado o processo de caracterização dos intermediários e da série final de tiazóis.

Caracterização dos intermediários DLT-Int3 e DLT-Int4

Para representar a caracterização dos compostos intermediários DLT-Int3 e DLT-Int4, o composto DLT-Int4 foi escolhido como representante estrutural. A **Figura 40** apresenta os valores do espectro de RMN ^1H do composto DLT-Int4, onde foi constatada a presença de um dubleto em 1.40, integrando para três hidrogênios, referente a um grupo metila ligado ao grupo metino. Em 1.82 encontra-se um singlete referente à outra metila ligada a um carbono quaternário. O quadruplete em 4.91 refere-se ao hidrogênio do metino ligado à metila. O multiplete entre 6.97 e 7.10 está relacionado aos quatro hidrogênios aromáticos. Os sinais em 7.81 e 8.24 referem-se aos dois hidrogênios da amina primária. O sinal em 10.17 caracteriza a presença da amina secundária.

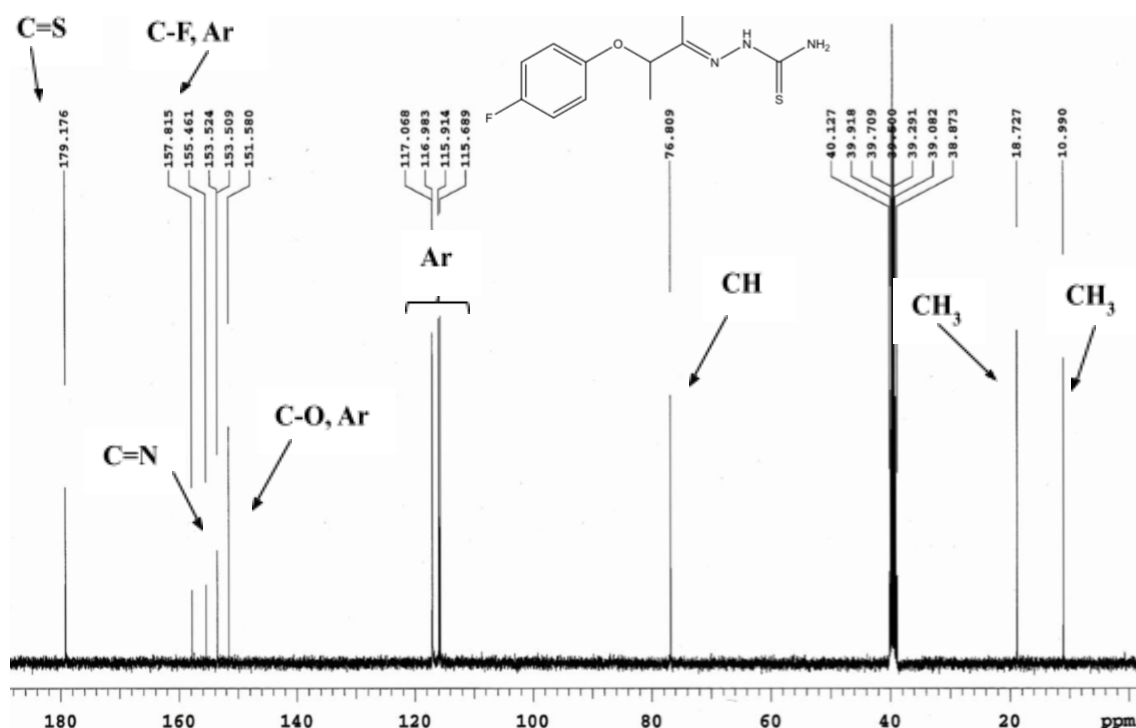
Figura 40 - Espectro de RMN ^1H para a molécula DLT-Int4.



Fonte: O autor (2021)

Para confirmação dos carbonos presentes na molécula DLT-Int4, foi utilizada a ressonância magnética nuclear de carbono 13 (**Figura 41**). Os picos em 10.99 e 18.73 referem-se às duas metilas presentes na molécula. O pico em 76.81 corresponde ao carbono do grupamento metino. Os picos em 115.69, 115.91, 116.98 e 117.07 correspondem aos carbonos aromáticos. O sinal em 151.58 corresponde ao carbono ligado ao oxigênio. O pico em 153.51 indica o carbono da função azo metílica. Em 155.46 observa-se o pico referente ao carbono aromático ligado ao flúor. Em 179.18 tem-se o pico referente ao carbono ligado ao enxofre.

Figura 41 - Espectro de RMN ^{13}C para a molécula DLT-Int4.



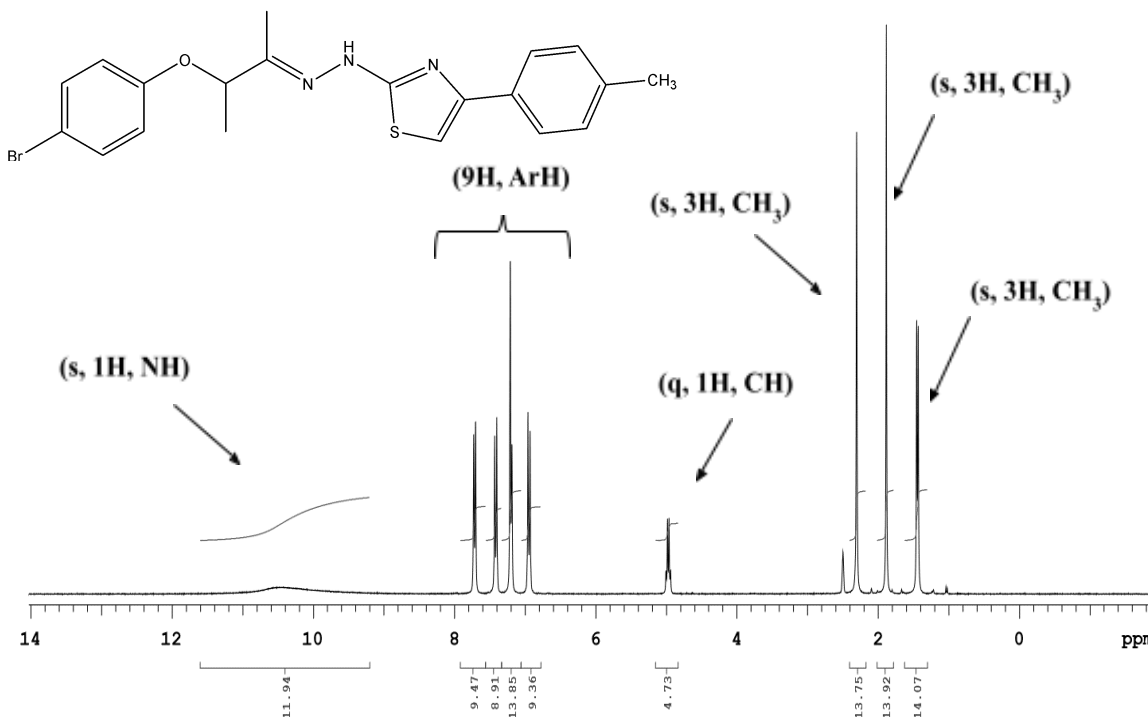
Fonte: O autor (2021)

Caracterização dos tiazóis da série DLT

Para representar a caracterização dos compostos finais, foi escolhido o composto DLT-1B. A **Figura 42** apresenta os valores do espectro de RMN ^1H do composto DLT-1B, onde foi constatada a presença de um duplete em 1.44 ppm, integrando para três hidrogênios, referente a metila próxima ao oxigênio. Em 1.89 ppm, há o sinal do singlete que integra para três hidrogênios, que corresponde a metila próxima a C=N. Em 2.31 ppm, há o sinal do singlete que integra para três hidrogênios, que corresponde a metila ligada ao anel aromático. Um sinal de quadrupeto, em 4.97 ppm, integrando para 1 hidrogênio é atribuído ao H do metino

que está ligado ao oxigênio. Os sinais em torno de 6.94 a 7.42 ppm, são os hidrogênios aromáticos (distribuídos em dupletos) juntamente com o hidrogênio do C5 do anel tiazol, além do sinal em 7.72 ppm referente aos dois hidrogênios do anel aromático próximos ao bromo. O sinal em 10.42 é referente a amina secundária.

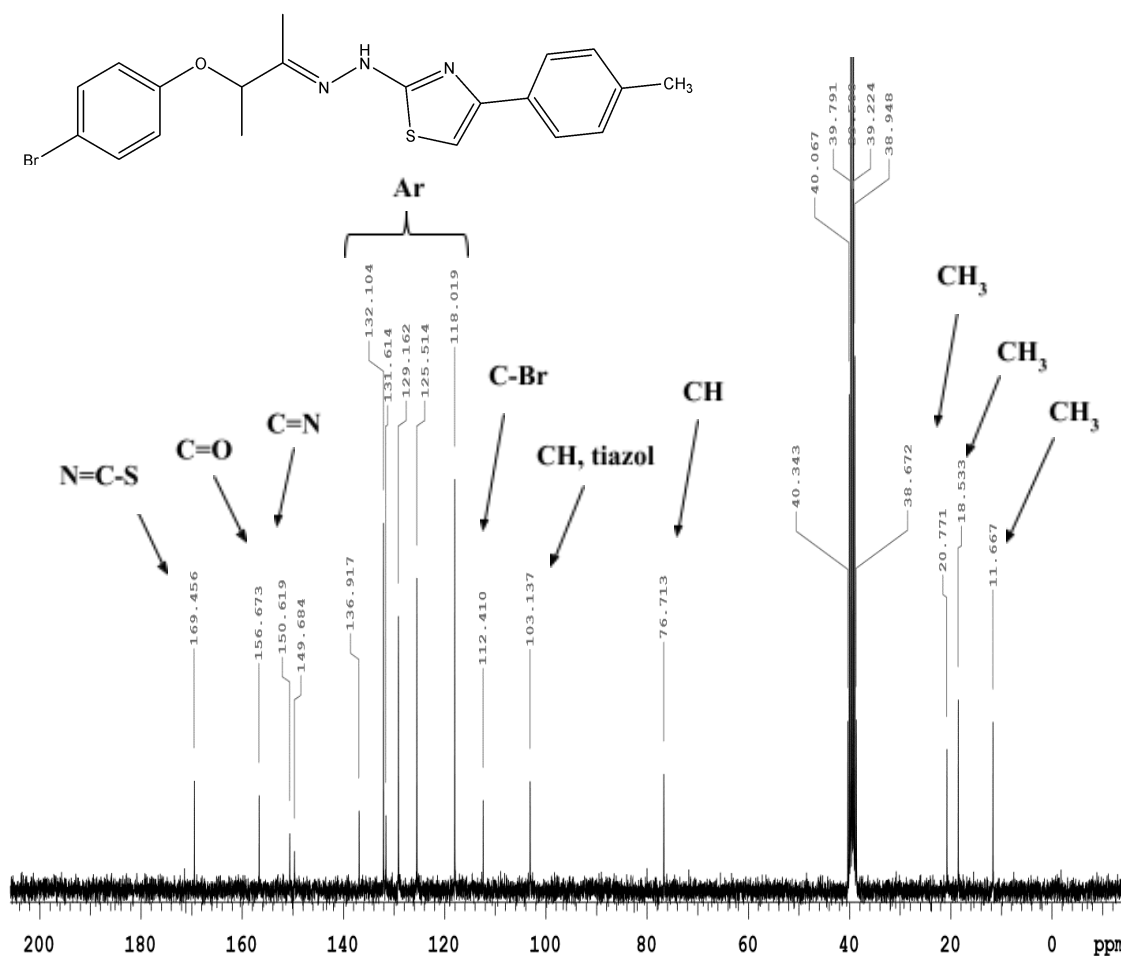
Figura 42 - Espectro de RMN ^1H para a molécula DLT-1B.



Fonte: O autor (2021)

A **Figura 43** mostra o RMN ^{13}C do composto DLT-1B, utilizado como referência. Em 20.77 ppm, aparece o CH₃ ligado ao anel aromático e em 18.54 e 11.67 ppm as outras duas metilas presentes na molécula. Em 76.72 ppm, há o carbono do metino ligado a CH₃ da parte alifática da molécula. O pico em 112.41 é atribuído ao carbono aromático ligado ao bromo. Em 103.14 ppm tem-se o pico que corresponde ao carbono 5 do anel heterocíclico, confirmando a formação do anel tiazol. Os picos localizados entre 118.01 e 132.11 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O pico em 149.69 é atribuído ao C4 do heterociclo. Por fim, o pico em 156.67 corresponde ao carbono aromático ligado ao oxigênio e 150.62 a ligação C=N, enquanto que 169.45 ppm corresponde ao carbono da ligação S-C=N do anel de tiazol.

Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C para a molécula DLT-1B.



Fonte: O autor (2021)

5.4.2 Ensaios Biológicos

5.4.2.1 Avaliação da atividade antiviral da série DLT

Inicialmente os compostos foram avaliados quanto à citotoxicidade em células Vero. Foram obtidos valores de CC_{20} (concentração citotóxica para 20% das células) e CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) que estão dispostos na **Tabela 8**. Os valores de CC_{20} foram utilizados no teste de atividade antiviral.

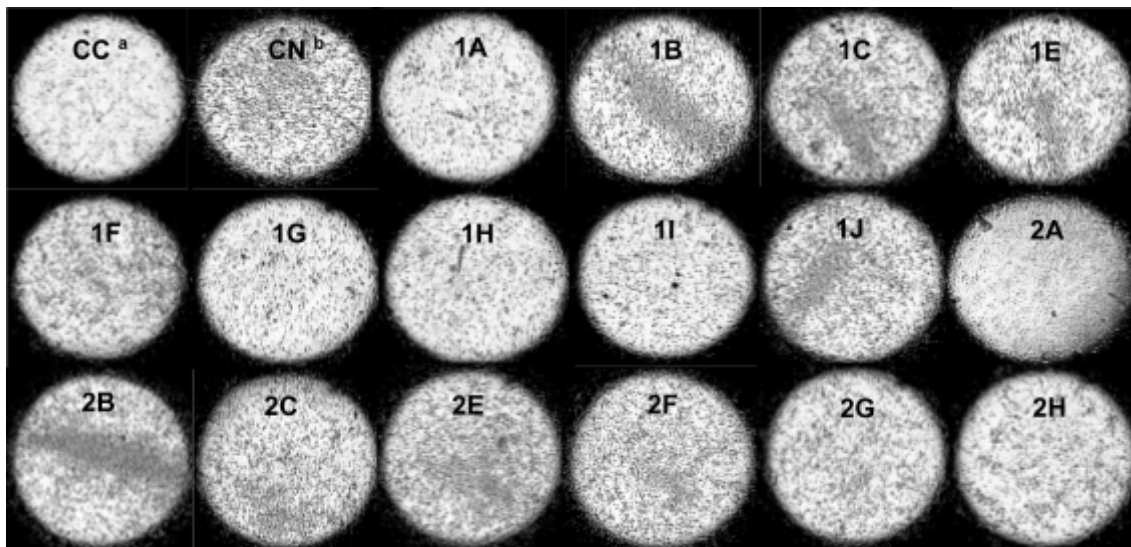
Tabela 8. Resultado do CC₂₀ e CC₅₀ da série DLT para células Vero.

Composto	R	Ar	CC ₂₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
DLT-1A	Br	Ph	71.42	416.34
DLT-1B	Br	4-Me-Ph	13.60	145,7
DLT-1C	Br	4-MeO-Ph	5,267	112,0
DLT-1E	Br	4-NO ₂ -Ph	9,668	279,0
DLT-1F	Br	4-F-Ph	13,92	148,3
DLT-1G	Br	4-Cl-Ph	24,25	126,4
DLT-1H	Br	2-Naph	19,37	55,79
DLT-1I	Br	4-Br-Ph	33,46	112,3
DLT-1J	Br	4-Ph-Ph	1,667	4,565
DLT-2A	F	Ph	132.9	355.43
DLT-2B	F	4-Me-Ph	9,494	240,2
DLT-2C	F	4-MeO-Ph	11,39	154,2
DLT-2E	F	4-NO ₂ -Ph	3,369	9,979
DLT-2F	F	4-F-Ph	18,32	83,03
DLT-2G	F	4-Cl-Ph	21,86	75,60
DLT-2H	F	2-Naph	21,60	72,03
DLT-2I	F	4-Br-Ph	3,68	116,3
DLT-2J	F	4-Ph-Ph	1,45	5,03

Dez dos compostos apresentaram valores de CC₅₀ acima de 100μM. Não foi possível observar um padrão em relação às estruturas destes compostos e os seus respectivos valores de CC₅₀, no entanto, os dois compostos que apresentam um fenil sem substituição ligado ao C4 do anel tiazol (DLT-1A e DLT-2A) tiveram os melhores valores de CC₅₀. De um modo geral, os compostos não foram tóxicos para células Vero.

Após os testes de citotoxicidade, os compostos foram testados quanto à capacidade de inibir a replicação do vírus Zika. Como controle positivo, utilizou-se o 6MMPr (6-metilmercaptapurina ribosídica), um análogo de nucleosídeo que recentemente foi retratado como sendo capaz de reduzir 99% do título do Zika (CARVALHO *et al.*, 2017). O experimento durou 96h. A seguir são apresentadas imagens do experimento (**Figura 44**).

Figura 44. Imagens do teste antiviral com 96 horas de incubação.

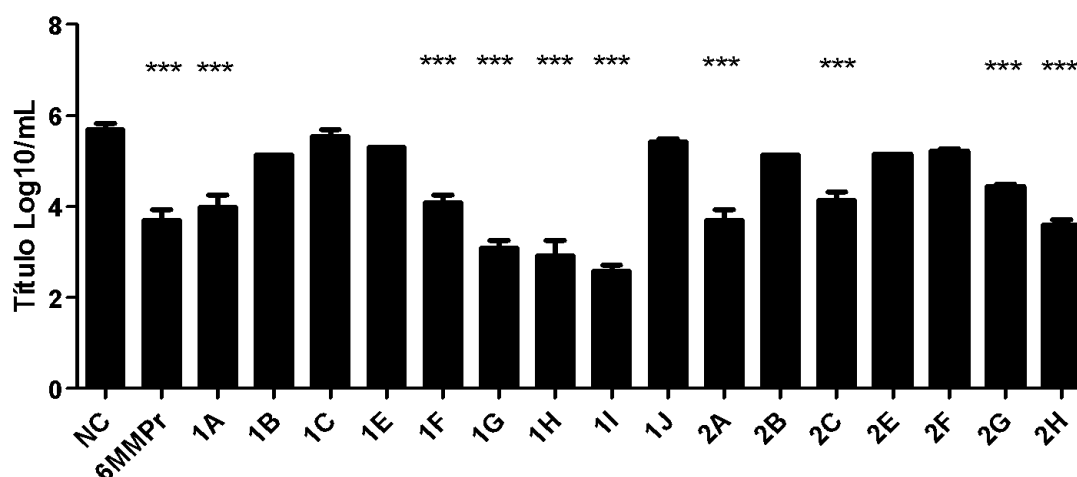


^a CC = Controle celular.

^b CN = Controle negativo (células + vírus).

Na **Figura 44** é possível observar o tapete celular intacto no controle celular (CC). No controle negativo (CN) é possível observar o efeito citopático do ZIKV sobre as células Vero, ou seja, é observado a destruição ou danificação do tapete celular. Alguns dos compostos são visivelmente ativos, pois mantiveram o tapete celular praticamente intacto, semelhante ao CC, por exemplo, os compostos DLT-1A, DLT-1G, DLT-1H, DLT-1I e DLT-2A. Entretanto, para confirmar a inibição do ZIKV foi realizado um teste de titulação do vírus. Os resultados das titulações estão presentes no **Gráfico 1**.

Gráfico 1 - Titulação por TCID₅₀ do ZIKV frente aos tiazóis (série DLT).



NC = Controle Negativo (Célula + Vírus).

6MMPr = 6-metilmercaptipurina ribosídica, Controle Positivo.

*** = $p < 0,001$ em comparação com o Controle Negativo (CN).

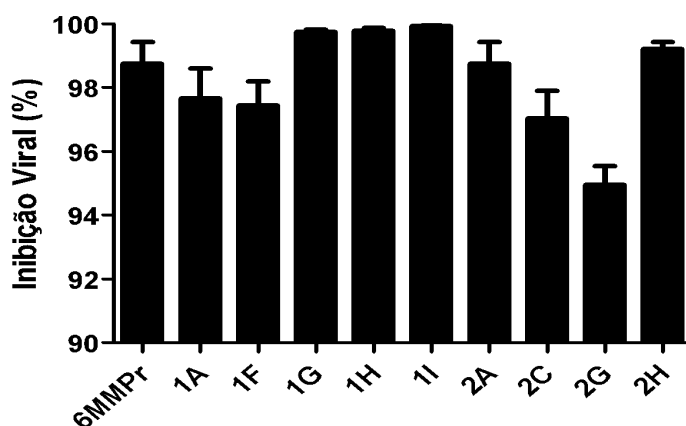
Como pode ser observado no **Gráfico 1**, nove compostos apresentaram uma redução significativa do título do ZIKV, com destaque para DLT-1G, DLT-1H e DLT-1I. DLT-1A e DLT-2A, que tiveram os maiores valores de CC_{50} , também apresentaram bons índices de redução do título do ZIKV. Os compostos DLT-1A e DLT-2A, que tiveram os maiores valores de CC_{50} , também apresentaram bons índices de redução do título do ZIKV.

Os nove compostos que apresentaram uma redução significativa do título do ZIKV apresentaram percentuais de inibição que variaram de 94,94% a 99,92%. Quatro compostos (DLT-1G, DLT-1H, DLT-1I e DLT-2H) apresentaram inibição maior que o 6MMPr na dose do CC_{20} (**Tabela 9** e **Gráfico 2**).

Tabela 9 - Porcentagem de inibição viral na dose do CC_{20} .

Composto	Inibição Viral (%)±DP
DLT-1A	97,65±1,658
DLT-1F	97,43±1,316
DLT-1G	99,74±0,1350
DLT-1H	99,77±0,1769
DLT-1I	99,92±0,03464
DLT-2A	98,74±1,189
DLT-2C	97,03±1,518
DLT-2G	94,94±1,045
DLT-2H	99,21±0,3753
6MMPr	98,74±1,189

Gráfico 2. Inibição do título do ZIKV pelos tiazóis (série DLT).



6 CONCLUSÃO

Foram obtidos 46 inéditos tiazóis utilizando uma metodologia simples e com bons rendimentos. Os tiazóis derivados da isatina foram testados frente linhagens de células do câncer de mama, frente às formas tripomastigotas e amastigostas de *T. cruzi* e frente às formas amastigotas e promastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os tiazóis derivados da ariloxitiossemicarbazona foram testados frente ao ZIKV.

Dentre os compostos sintetizados e testados para atividade antitumoral, os compostos LAB-2C e LAB-2A se destacaram para a atividade antitumoral com valores de IC_{50} 1,23 e 1,39 μ M, respectivamente, frente a linhagem MDA-MB-231 e ambos valores de IC_{50} 0,45 μ M para a linhagem MCF-7.

Com relação à atividade antiparasitária, LAB-1N se destacou frente a forma tripomastigota de *T. cruzi* (IC_{50} 1,72 μ M), no qual foi observada alterações ultraestruturais no parasita e uma indução de marcação compatível com necrose, como também demonstrou atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, com valores de IC_{50} 6,17 e 6,04 μ M, respectivamente.

Dentre os compostos sintetizados e testados para atividade anti-*Leishmania*, LAB-1M e LAB-1N se apresentaram duas vezes mais seletivos que a Miltefosina (composto padrão), para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Para as formas amastigotas, nenhum composto se apresentou melhor que o composto de referência.

Dentre os compostos sintetizados e testados para atividade antiviral frente o ZIKV, DLT-1G, DLT-1H e DLT-1I apresentaram uma redução significativa do título do ZIKV. Os compostos DLT-1I e DLT-1H se destacaram com maiores percentuais de inibição do vírus, com 99,92% e 99,77%, respectivamente.

De forma geral, este trabalho apresenta compostos promissores quanto à atividade antitumoral, antiparasitária e antiviral frente ao vírus Zika.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, G. *et al.* *In vitro* Activity and Mechanism of Action Against the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl Containing Thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p. 4885–4893, 2004.
- ALIABADI, A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2-phenylthiazole-4-carboxamide derivatives as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5384-5389, 2010.
- ALTINTOP, M. D. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of a new series of thiazole-based anticancer agents as potent akt inhibitors. **Molecules** , 23, 2018.
- BATES, P. A., ROGERS, M. E. New insights into the development biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Curr Mol Med.**, v. 4, p. 601-609, 2004.
- BEHNAM, M. A. *et al.* CD. The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. **Journal of medicinal chemistry**, 2016.
- BELARDO, H.; GRAMBINO, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 31-39, 2004.
- BHUNIYA, D. *et al.* Aminothiazoles: Hit to lead development to identify antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 582-593, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância e Saúde. **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**; Boletim Epidemiológico, vol 46, nº 21, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância e Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.]. 2.^a ed. Atualizada, 2017.
- CHAN, J. F. W. *et al.* Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **J Infect**, 2016.

COSTA, P. M. et al. Improvement of *in vivo* Anticancer and Antiangiogenic Potential of Thalidomide Derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v.239, p.174-183, 2015.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas disease-100 Years After its Discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.31-40, 2009.

DESIMONE, R.W. *et al.* Privileged Structures: Applications in Drug Discovery. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 7, p.473-493, 2004.

DIMEO, T. A. *et al.* A Novel Lung Metastasis Signature Links Wnt Signaling with Cancer Cell Self-Renewal and Epithelial-Mesenchymal Transition in Basal-like Breast Cancer. **Cancer Res.** 69, 5364–5373, 2009.

ESPÍNDOLA, J. W. P. *et al.* Synthesis and Structure-activity Relationship Study of a New Series of Antiparasitic Aryloxyl Thiosemicarbazones Inhibiting *Trypanosoma cruzi* Cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 818-835, 2015.

FALLAH-TAFTI, A. *et al.* Thiazolyl N-benzyl-substituted acetamide derivatives: Synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4853-4858, 2011.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas—Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, 2016.

FAYE, O. *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8(1), p. 26-36, 2014.

FONSECA, K. *et al.* First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91(5), p. 1035-1038, 2014.

FORTIER, A.-M. et al. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells. **FEBS Lett.** 584, 984–988, 2010.

GLOBOCAN 2020. Disponível em <globocan.iarc.fr/>. Acesso em: 01 fev. 2020.

GOMES, P. A. T. M. **Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades farmacológicas de inéditas tiazolil-hidrazonas derivadas da ftalimida e da isatina.** Recife, PE. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

MOGHADDAM, E. et al. Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Scientific reports*, 4:5452, 2014.

GOMES, P.A.T. M. et al. Dual Parasiticidal Activities of New Phthalimides: Synthesis and Biological Profile against *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem*, 2020.

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

HANN, M. M. Molecular obesity, potency and other addictions in drug Discovery. *Med. Chem. Commun.* V. 2, No. 5, p. 339–443, 2011.

HASSAN, G. S.; EL-MESSERY, S. M.; AL-OMARY, F. A. M.; EL-SUBBAGH, H. I. Substituted thiazoles VII. Synthesis and antitumor activity of certain 2-(substituted amino)-4-phenyl-1,3-thiazole analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, p. 6318– 6323, 2012.

HERNANDES, M. Z. *et al.*, Studies toward the structural optimization of novel thiazolylylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. *Bioorg. Med. Chem.*, v.18, p. 7826–7835, 2010.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. 2019.

IHNAT, M. A. *et al.* Suppression of P-Glycoprotein Expression and Multidrug Resistance by DNA Cross-Linking Agents. **Clin. Cancer Res.** 3, 1339–1346, 1997.

JADAV, S. S. *et al.* Identification of Pyrazole Derivative as an Antiviral Agent Against Chikungunya Through HTVS. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 12(4), p. 292-301, 2014.

JADAV, S. S. *et al.* Design, synthesis, optimization and antiviral activity of a class of hybrid dengue virus E protein inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1747-1752, 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KARAH, N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 37, p. 909-918, 2002.

KASHYAP, S. J. *et al.* Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2123-2132, 2012.

KOK, W. M. New developments in flavivirus drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 3, 2016.

LAI, H.; PRASAD, G. S.; PADMANABHAN, R. Characterization of 8-hydroxyquinoline derivatives containing aminobenzothiazole as inhibitors of dengue virus type 2 protease in vitro. **Antiviral research**, v. 97(1), p. 74-80, 2013.

LEFRANC, F. *et al.* 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Nap/K β -ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 213-223, 2013.

LEITE, A. C. L.; *et al.*; **Phthaloyl Amino Acids as Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Prototypes**; Medicinal Chemistry Research, v.23, p.1701-1708, 2014.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 1997.

LIU, Z. *et al.* Synthesis and antiparasitic activity of new bis-arylimidamides: DB766 analogs modified in the terminal groups. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 167-173, 2014.

MARTINEZ, S. T.; FERREIRA, V. F. As isatinas do professor João. **Revista Virtual de Química**, v. 9 (3), p. 1154-1183, 2017.

MICEWICZA, E. D. *et al.* Identification of novel small-molecule inhibitors of Zika virus infection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p. 452–458, 2018.

MOREIRA, *et al.* Conformational Restriction of Aryl Thiosemicarbazones Produces Potent and Selective Anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds Which Induce Apoptotic Parasite Death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014.

MOTZER, R. J. *et al.* Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, p. 16–24, 2006.

MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill**, v. 19(14), p. 1-3, 2014.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NHAN, T. X.; CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Les infections à virus Zika. **Rev Francoph des Lab.**, v. 467, p. 45-52, 2014.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, v. 19(9), p. 207-220, 2014.

ONCOGUIA. **Quiomioterapia para o câncer de mama**. 22 jun 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-de-mama/1405/265>. Acesso em: 05 mar 2019.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde; **Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas**; Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812; Acesso em: 05 mar. 2021.

PADMANABHAN, P. *et al.* Antiviral activity of Thiosemicarbazones derived from α -amino acids against Dengue virus. **Journal of medical virology**, v. 89(3), p. 546-552, 2017.

PASTULA, D. M. *et al.* Four emerging arboviral diseases in North America: Jamestown Canyon, Powassan, Chikungunya, and Zika virus diseases. **Journal of Neurovirology**, v. 22, p. 1-4, 2016.

PATEL, B. A. *et al.* Comprehensive Synthesis of Amino Acid-Derived Thiazole Peptidomimetic Analogues to Understand the Enigmatic Drug/Substrate-Binding Site of P-Glycoprotein. **J. Med. Chem.** 61, 834–864, 2018.

PATIÑO-BARBOSA, A. M. *et al.* Zika: another sexually transmitted infection?. **Sexually transmitted infections**, v. 25, 2015.

PEREIRA, L., HORTA, S., MATEUS, R. & VIDEIRA, M. A. Implications of Akt2/Twist crosstalk on breast cancer metastatic outcome. **Drug Discov. Today** 20, 1152–1158, 2015.

POLANSKY, J. *et al.* Privileged Structures – Dream or Reality: Preferential Organization of Azanaphthalene Scaffold. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, 2012.

RASSI, A. Jr. *et al.*; **Chagas Disease**; Seminar; v.375, p.1388-1402, 2010.

RIGGIO, M. *et al.* AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. **Sci. Rep.** 7, 44244, 2017.

ROBINSON, K. & TIRIVEEDHI, V. Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. **Front. Oncol.** 10, 265 (2020).

SABET, R. *et al.* QSAR study of isatin analogues as in vitro anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 1113–1118. 2010.

SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G.; Privileged Structures Revisited. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, p. 7971-7974, 2017.

SCHULER-FACCINI, L., *et al.* Possible association between Zika virus infection and microcephaly - Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65(3), p. 59-62, 2016.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 491–502. 2010.

SHUKLA, S. *et al.* Synthesis, Molecular docking and Biological evaluation of 4-Cycloalkylidineamino 1, 2-Naphthoquinone Semicarbazones as Anticancer agents. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1040-S1046, 2012.

SINGH, S. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of (S)-valine thiazole-derived cyclic and non-cyclic peptidomimetic oligomers as modulators of human P-glycoprotein (ABCB1) NIH Public Access. **Chembiochem**, 15, 157–169, 2014.

SOLOMON, V. R.; HUA, C.; LEE, H. Hybrid pharmacophore design and synthesis of isatin–benzothiazole analogs for their anti-breast cancer activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 21, p. 7585–7592. 2009.

SOUZA, M. V. N. *et al.* Métodos de obtenção e aplicação sintética de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 77-84, 2005.

SOUSA, C. *et al.* Polymeric Micellar Formulation Enhances Antimicrobial and Anticancer Properties of Salinomycin. **Pharm. Res.** 36, 1–16, 2019.

SULOVÁ, Z. *et al.* Does any relationship exist between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and intracellular calcium homeostasis. **Gen. Physiol. Biophys.** 28, 89–95, 2009.

TENÓRIO R. P.; GÓES A. J. S. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

TROUILLER, P. *et al.* Drug Development for Neglected Diseases: a Deficient Market and a Public-Health Policy Failure. **Public Health / The Lancet**, v.359, p. 2188-2194, 2002.

VINE, K. L. *et al.* Cytotoxic and Anticancer Activities of Isatin and Its Derivatives: A Comprehensive Review from 2000-2008. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 9, 397-414, 2009.

WHO - World Health Organization. **Chagas Disease (American trypanosomiasis)**; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 01 fev 2021.

WHO - World Health Organization. **Cancer (Fact sheets)**. 12 set 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>. Acesso em: 05 mar 2019.

WHO - World Health Organization. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations**. 01 fev 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergencycommittee-zika/en>. Acesso em: 10 mar 2019.

XUE, G. *et al.* Akt/PKB-Mediated Phosphorylation of Twist1 Promotes Tumor Metastasis via Mediating Cross-Talk between PI3K/Akt and TGF- β Signaling Axes. **Cancer Discov.** 2, 248–259, 2012.

YASRI, S.; WIWANITKIT, V. New human pathogenic dengue like virus infections (Zika, Alkhumraand Mayaro viruses): a short review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, p. 31-32, 2015.

YOGEESWARI, P. *et al.* Anticonvulsant and Neurotoxicity Evaluation of Some 6-Chlorobenzothiazolyl-2-Thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 231-236, 2002.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110(4), p. 569-572.

ZHU, Q.-S. *et al.* Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. **Oncogene**, 30, 457–470 (2011).