



**HAL**  
open science

# Synthesis and biological evaluation of novel imidazolinic, thiazolinic derivatives and aminosugars

Vinicius Barros Ribeiro Da Silva

## ► To cite this version:

Vinicius Barros Ribeiro Da Silva. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolinic, thiazolinic derivatives and aminosugars. Agricultural sciences. Université Grenoble Alpes; Universidade federal de Pernambuco (Récife, Brésil), 2017. Portuguese. NNT : 2017GREAV022 . tel-01684234

**HAL Id: tel-01684234**

**<https://theses.hal.science/tel-01684234>**

Submitted on 15 Jan 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
DE PERNAMBUCO



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE  
ALPES ET UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre la *Communauté  
Université Grenoble Alpes* et *Universidade Federal de  
Pernambuco***

Spécialité **Sciences du Médicament (Grenoble) et Planejamento e  
Síntese de Fármacos (Recife)**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**« Vinícius / BARROS RIBEIRO DA SILVA »**

Thèse dirigée par «**Maria do Carmo/ALVES DE LIMA**» et «**Jean-  
Luc/DECOUT**»

préparée au sein des **Laboratoires « Laboratório Pesquisa e Inovação  
Terapêutica (Recife) » et « Département de Pharmacochimie  
Moléculaire (Grenoble) »**

dans les **Écoles Doctorales de Chimie et Sciences du Vivant et  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

## **Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Dérivés Imidazoliniques, Thiazoliniques et d'Aminosucre**

Thèse soutenue publiquement le «**20 février de 2017**»,  
devant le jury composé de :

**Pr., Maria do Carmo, ALVES DE LIMA** (Directeur de thèse, Membre)

**Pr. Vania, BERNARDES-GENISSON** (Rapporteur)

**Pr, Jean-Luc, DECOUT** (Directeur de thèse, Membre)

**Dr., Alice, KANAZAWA DELAIR** (Membre)

**Pr, Ricardo, OLIMPIO de MOURA** (Président, Rapporteur)

**Dr., Anekécia Lauro, da SILVA** (Membre)



## AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Maria do Carmo Alves de Lima, minha eterna gratidão pela orientação, paciência, confiança, conhecimento e oportunidade a mim oferecida neste percurso.

Ao Prof. Dr. Jean-Luc Decout pela oportunidade de trabalhar no Departement de Pharmacochimie Moléculaire.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e da Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant, em especial aos professores e funcionários que contribuíram para enriquecer meu conhecimento.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF).

Aos meus queridos colegas do DPM Antoine, Ben, Isa, Marie-Ange, Marie-Carmen, Marine, Philippe, Romain, Serge et Yung. Em especial gostaria de agradecer a Dr. Martine Demeunynck pela ajuda e amizade tão fundamentais no decorrer deste doutorado.

Um muito obrigado aos amigos estagiários, doutorandos e pos-doutores que fiz no decorrer desta tese, Daniela, David, Doudou, Emile, Emma, Florine, Jamie, Julien, Kim, Laurent, Louise, Matt, Momo, Yasmina. Obrigado por todas a ajuda, e todas as coxinhas que fizemos juntos. Um muito obrigado especial a Flavia, por toda a ajuda nos primeiros momentos da minha instalação a Grenoble.

Aos meus amigos de Grenoble Colin, Milena, Rodolphe, Hoi, Manon, German, Hortanse, Pedro, Mayra, Rodrigo, Tiago, Adele, Elisa, e tantos outros que com certeza esqueci de mencionar. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos durante estes 3 anos.

Um agradecimento especial ao meu companheiro de vida e aventuras, François Almeras. Você foi parte indispensável nesta minha etapa. Obrigado pelo apoio e confiança.

Aos meus pais, Manoel e Verônica, ao meu irmão, Gustavo, à minha avó Priscila, à minha prima Luzia pelo amor, apoio e confiança a mim proporcionados. À minha família carioca, Rosimery, Gilmar, Maycon, Tia Celina. Amo vocês!

Aos meus bons amigos Bruno Magalhães, Clarissa Nunes, Vinícius Gouveia, Bruno Menezes, Leonardo Evedove, Lincoln Ribeiro, Luigi Rocha, Amanda Bezerra e Elisa Bezerra; aos meus amados primos Ricardo Braga, Salomão Barros, Rafael Barros e Cassandra Sá; às minhas amigas da graduação Larissa Morgana, Sarah Palácio e Giovanna Medeiros. Obrigado pelo companheirismo e por todos os momentos de apoio nas minhas inseguranças. Amo vocês!

Obrigado a todos que acreditam e acreditarem em mim.

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

2-DOS	2-deoxistreptamina
2-NM	2-metilnaftil
2-PyM	2-metilpiridinil
2-QM	2-metilquinolinil
AAG	Aminoglicosídeos anfifílicos
Ac	Acetyl
ACC	Canal de Cloreto-Acetilcolina
ACh	Acetilcolina
ACT	<i>artemisinin-based combination therapy</i>
ADMET	<i>Acyclic diene metathesis polymerization</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bn	Benzyle
Boc	t-Butyloxycarbonyl
Bu	Butil
CBz	Carboxibenzil
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CM	<i>Cross metathesis</i>
CMI	Concentração inibitória mínima
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
COSY	Espectroscopia de correlação
DCM	Diclorometano
DCPT	3-(3,5-diclorofenil)-tiazolidina-2,4-diona
DCE	Dicloroetano
DL50	Dose letal mediana
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfoxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	<i>Drug for Neglected Diseases Initiative</i>

DPM	Département de Pharmacochimie Moléculaire
DQF	Departamento de Química Fundamental
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FLAP	<i>Fingerprints for Ligands and Proteins</i>
Fmoc	9-fluorenil-metiloxicarbonila
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
GPIT	Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
GSH	Glutathione
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
-I	Efeito indutivo negativo
IR	Infrarouge
IV	Infravermelho
LGIC	superfamília de receptores Cys-loop
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
LPSF-UFPE	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
mCPBA	Acido metacloroperbenzoico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIF	<i>Molecular Interaction Fields</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
nAChRs	receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina
Nea	Neamina
NECT	terapia combinada de nifurtimox e eflornitina
Nn	Nonil
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
OM	Membrana bacteriana externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OXA	Oxamniquina

PAPS	3'fosfoadenosina 5'fosfosulfato
Par	<i>Paramina</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Componente principal
PCA	Análise de Componentes Principais
P,D&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
PDKL	leishmaniose cutânea pós-calazar
PEG	Polietilenoglicol
PIF	campos de interação farmacofórica
PGZ	Pioglitazona
PPAR	receptor gama proliferador ativado do peroxisoma
PZQ	Praziquantel
QSAR	Relação Quantitativa Estrutura Atividade
RCM	<i>Ring-closing metathesis</i>
RGZ	Rosiglitazona
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA inibitorio
ROM	<i>Ring-opening metathesis</i>
ROMP	<i>Ring-opening metathesis polymerization</i>
RPM	Rotação por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SAR	Relação Estrutura Atividade
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIQUIM	Sistema de Informação sobre a Indústria Química
SmACC	nAChR anion-selectivos
SN <sub>2</sub>	Substituição Nucleofílica de Segunda Ordem
SUS	Sistema Único de Saúde
TBAOH	Hidróxido de tetrabutilamônio
TBDMS	t-Butildimetilsilil
t-Bu	t-Butila
TFA	Ácido trifluoroacético
TDR	<i>Special Programme for Research &amp; Training in Tropical Diseases</i>

TGZ	Troglitazona
TZD	Tiazolidinas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UGA	Université Grenoble Alpes
UV	Ultravioleta
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina

# ***SUMARIO***

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>15</b>
<b>PARTE I - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS E TIAZOLIDÍNICOS 3,5-DISSUBSTITUÍDOS</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO PARTE I</b>	<b>19</b>
<b>ARTICLE 1 (SUBMITTED) Medicinal Chemistry of Antischistosomal Drugs Praziquantel and Oxamniquine</b>	<b>22</b>
<b>TRABALHOS PESSOAIS PARTE I</b>	<b>53</b>
<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
1.1. Objetivos Gerais	54
1.2. Objetivos Específicos	55
<b>CAPITULO II. Síntese, Caracterização Estrutural, Análise BioQuimétrica, Avaliação Biológica e <i>Hit to Lead</i> de Novos Derivados 4-tioxo-imidazolidin-4-ona-3,5-dissubstituídos</b>	<b>56</b>
<b>1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS</b>	<b>56</b>
1.1. Síntese	57
1.1.1. Síntese do derivado 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-31)	57
1.1.2. Síntese do derivado 4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PTS-31)	57
1.1.3 Síntese do derivado 5-benzilideno-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PTS)	58



1.2. Analises	<b>58</b>
1.2.1. Analises Fisico-Químicas	<b>58</b>
1.2.2. Analises Espectométricas	<b>60</b>
2. ESTUDO QUIMIOMÉTRICO	<b>63</b>
2.1. Análise de Componentes Principais	<b>63</b>
2.2. PCA dos Derivados Tioxo-Imidazolidinicos	<b>65</b>
----- IDADE BIOLÓGICA	<b>65</b>
3.1. Avaliação dos Novos Derivados Imidazolidinicos	<b>65</b>
3.1.1. Citotoxicidade	<b>70</b>
3.1.2. Indução da Mortalidade dos Parasitas	<b>70</b>
3.1.3. Atividade Motora	<b>71</b>
3.1.4. Oviposição	<b>72</b>
3.1.5. Alterações no Tegumento do Parasita	<b>73</b>
3.1.6. Análise dos Resultados Através do Modelo Quimiométrico	<b>75</b>
3.2. Validação da Análise Preditiva do Modelo em Novos Derivados 4-Tioxo- Imidazolidin-2-ona 3,5-Dissubstituídos	<b>76</b>
4. Identificação do Farmacóforo	<b>79</b>
4.1. Software <i>GRID</i>	<b>80</b>
4.2. <i>FLAP</i>	<b>81</b>
4.3. Geração do Farmacóforo	<b>81</b>
4.4. Seleção dos Compostos para a Criação do Farmacóforo	<b>82</b>
4.5. Determinação do Farmacóforo LPSF/PTS-14 e Derivados Imidazolidinicos	<b>83</b>
4.6. Determinação do Farmacóforo LPSF/PTS-14 e Compostos Esquistossomicidas	<b>83</b>
5. <i>HIT TO LEAD</i> - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO PTS-14	<b>84</b>
6. ADIÇÃO DE MICHAEL, UMA PROPOSTA DE MECANISMO DE AÇÃO E/OU TOXICIDADE	<b>89</b>

6.1. Adição de Michael	89
6.2. Adição de Michael em Química Medicinal	91
6.2.1. Oxamniquina	91
6.3. Proposição do Mecanismo de Ação	92
6.4. Adição de Michael em Compostos Imidazolidínicos	93
6.5. Importância da Ligação C-3 e da Tionila em C-4 para a Adição de Michael	95
7. RECEPTORES COLINÉRGICOS	96
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARTE I</b>	<b>99</b>
<b>RESUME PARTIE I</b>	<b>103</b>
1. INTRODUCTION	104
2. OBJECTIFS	105
2.1. Objectifs Généraux	106
2.2. Objectifs Spécifiques	106
3. RESULTATS ET DISCUSSION	107
3.1. Synthèse des Dérivés Imidazolidínicos	107
3.2. Etude Chimométrique	108
3.3. Evaluation de l'Activité Schistosomicide	111
3.4. Evaluation des Propriétés Prédictives du Modèle PCA	111
3.5. Identification du Pharmacophore	115
3.6. <i>Hit to Lead</i> – Modifications Structurales sur le LPSF / PTS-14	116
3.7. Addition de Michael ; Une Proposition de Mécanisme d'Action et / ou Toxicité	117
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	118
<b>PARTIE II – SYNTHÈSE d'AMINOGLYCOSIDES AMPHIPHILES A BASE DE NEOSAMINE</b>	<b>119</b>
<b>INTRODUCTION – PARTIE III</b>	<b>120</b>

<b>CHAPITRE I - Des Aminoglycosides Classiques et Amphiphiles et le Combat aux Bactéries Résistants</b>	<b>125</b>
1. INTRODUCTION	125
2. RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE (REA) ET RELATIONS STRUCTURE-TOXICITE (RET)	126
3. AMINOGLYCOSIDES AMPHIPHILES	129
3.1. Nouveaux Aminoglycosides Amphiphiles Synthétisés au Département de Pharmacochimie Moléculaire	130
<b>TRAVAUX PERSONNELS – PARTIE II</b>	<b>136</b>
1. CONTEXTE ET OBJECTIFS	137
1.1. Objectif Général	139
1.2. Objectifs Spécifiques	139
<b>CHAPITRE II - Synthèse de Nouveaux Dérivés Amphiphiles des Aminoglycosides par la Réaction de Métathèse</b>	<b>140</b>
1. OBTENTION DU PRINCIPAL INTERMÉDIAIRE DE SYNTHÈSE	140
2. REACTIONS DE METATHESE ET UTILISATION DE GROUPEMENTS PROTECTEURS	140
2.1. Groupe Protecteur Acétyle (Ac)	145
2.1.1. Synthèse des intermediaires protégés	145
2.1.2. Série 3,4-diAc - Intermediaire (25)	146
2.1.2.1. Réaction de Métathèse Croisée	2146
2.1.2.2. Homométathèse	2149
2.1.3. Série 3,4-diNn - Intermediaire (28)	150
2.1.3.1. Réaction de Métathèse Croisée	150
2.1.3.2. Homométathèse	151
2.2. Groupe Protecteur Boc	152
2.2.1. Synthèse des intermediaires 3,4-diNn	152
2.2.2. Métathèse	154
2.2.2.1. Homométathèse	154
2.2.2.2. Réaction de Métathèse Croisée	154
2.3. Groupe Protecteur Sels d'Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> X <sup>-</sup> )	155

2.3.1. Synthèse des intermediaires 3,4-diNn	156
2.3.2. Métathèse	157
2.4. Groupe Protecteur Azoture (N <sub>3</sub> )	157
2.4.1. Synthèse des Intermediaires Protégés	158
2.4.2. Métathèse de la Série 3,4-diAc - Intermediaire (85)	163
2.4.2. Métathèse de la Série 3,4-diNn - Intermediaire (86)	163
2.5. Groupes Protecteurs dans l'Allylamine	165
3. REACTIONS D'OXIDATION	166
3.1. Produits Non Alkylés Série Néamine (38)	166
3.1. Produits Alkylés Série Néamine (40)	168
4. HYDROGENATION CATALITIQUE	168
4.1. Produit de homométathèse 3,4-diAc (39)	168
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES – PARTIE III</b>	<b>170</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE - PARTIE III</b>	<b>177</b>
1. MATERIAL AND METHODS	178
2. SYNTHESIS PROTOCOLS	179
<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>207</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>209</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>211</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>228</b>

# **INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO GERAL

Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam um forte entrave ao desenvolvimento dos países.<sup>1,2</sup> Dentre as 17 doenças classificadas como negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a esquistossomose é considerada a segunda doença parasitária mais devastadora socioeconomicamente, atrás apenas da malária, infectando mais de 200 milhões de pessoas no mundo.<sup>2</sup>

Compostos derivados da imidazolidina são um grupo de substâncias heterocíclicas pentagonais possuidoras de diversas atividades biológicas.<sup>3</sup> Estudos mostraram que os derivados imidazolidínicos apresentam atividade leishmanicida,<sup>4</sup> antifúngica, antimicrobiana e tripanocida.<sup>5</sup> As imidazolidinas tiveram no passado um representante na clínica médica como um fármaco de ação comprovada frente a vermes adultos de *S. mansoni*, o niridazol.<sup>6</sup> A atividade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* de derivados imidazolidínicos vem sendo relatado em alguns estudos publicados.<sup>7-11</sup>

Tendo em vista os projetos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (Gpit) com imidazolidinas o primeiro objetivo do presente trabalho é a identificação de uma molécula promissora, *hit*, através da síntese e atividade atividade esquistossomicida de 24 novos derivados imidazolidínicos. Técnicas de análises quimiométricas serão aplicadas para auxiliar a identificação deste derivado. O modelo quimiométrico terá sua previsibilidade testada através da síntese de novos derivados imidazolidínicos da mesma série, que terão suas atividades previstas e em seguida confirmadas através dos resultados biológicos encontrados. Serão realizadas novas reações químicas variando-se o esqueleto molecular do *hit* para uma maior compreensão da relação estrutura química e atividade biológica. Um modelo de farmacóforo será proposto utilizando-se o software FLAP e o modo de ação do derivado será avaliado através da reação de adição de Michael.

Um segundo objetivo deste trabalho é a revisão do estado da arte dos dois principais medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose no Brasil a Oxaminiquina (OXA) (Mansil® – Pfizer S.A) e o Praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ). O PZQ é utilizado para tratar a esquistossomose humana, uma vez que pode eliminar os vermes adultos, durante a fase crônica da infecção.<sup>12</sup> A OXA é outro fármaco disponível, mas a sua utilização é limitada à infecções por *S. mansoni*, não sendo eficaz contra todas as formas do parasito.<sup>13</sup>

Serão explorados os diferentes pontos de cada um destes dois medicamentos utilizados na clínica brasileira contra a esquistossomose, como os aspectos farmacêuticos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos; efeitos colaterais, casos de resistência e um estudo de relação estrutura química e atividade biológica (SAR). No caso do PZQ todos os derivados desenvolvidos ao longo de 30 anos

estão listados neste estudo, permitindo a elaboração de um modelo preciso de relação estrutura química atividade biológica (SAR).

Apesar de não ser conhecido o alvo biológico e o mecanismo de ação do PZQ, através desta revisão será possível de se desenvolver um modelo de farmacóforo e de previsão da atividade de seus derivados. Estes estudos ainda estão em desenvolvimentos, porém serão apresentados os primeiros resultados em forma de um segundo artigo científico.

O terceiro objetivo desta tese é a síntese de novos aminoglicosídeos anfifílicos com ação antibiótica contra bactérias resistentes. Em um trabalho publicado em 2016 pela equipe de JL Decout du Département de Pharmacochimie Moléculaire da Université Grenoble Alpes,<sup>14</sup> um novo grupo de derivados com ação antibiótica frente a bactérias Gram (+) e Gram (-) resistentes foi identificado pelo grupo de Pharmacochimie Moléculaire da Université Joseph Fourier, Grenoble. Estes compostos são ampicilinas derivadas da Neamine, preparadas através do antibiótico natural Neomicina B. Tais moléculas possuem aplicação como fármacos antibióticos e desinfetantes. O grupo obteve diversos derivados da neamine 3',4'-dialquil e derivados 3,4-dialquil-6-aminoglicosídeos. Os derivados possuem na posição 1 um grupamento alila que pode ser modificado assemelhando-se ao anel I da Neamine. As substituições podem acarretar em uma maior flexibilidade dos derivados em comparação aos derivados da Neamine, tornando mais eficiente a interação entre os derivados e os componentes da membrana bacteriana, como por exemplo os lipossacarídeos. Os novos derivados aminoglicosídeos serão sintetizados a partir da reação de metatase para a formação dos compostos finais. Como este trabalho foi desenvolvido na França, em colaboração com uma equipe francesa, optou-se pela redação destes resultados em francês. O que facilitaria a correção dos envolvidos no trabalho.

Assim, esta tese está organizada em duas partes, uma para cada objetivo,

**Parte I:** abordando a síntese dos derivados imidazolidínicos desenvolvidos como agentes esquistossomicidas, assim como os estudos posteriores, como a proposição do modelo de farmacóforo. Como anexos nesta primeira parte serão apresentados os artigos, publicados e submetidos, referentes a esta pesquisa. Nestes artigos estão presentes as metodologias de síntese empregadas para a obtenção dos derivados assim como informações adicionais não discutidas na presente tese.

**Parte II:** dedicada aos aminoglicosídeos, e sua síntese através da reação de metatase. A bibliografia de cada parte será apresentada diretamente após a mesma, assim como os anexos correspondentes.

Com este trabalho, espera-se contribuir para o processo de conscientização da comunidade científica sobre a importância da pesquisa no desenvolvimento de novas imidazolidinas e aminoglicosídeos como alternativas no tratamento da esquistossomose e de infecções bacterianas, respectivamente. Assim como colaborar para um maior entendimento do PZQ e seu mecanismo de ação a nível farmacológico..

# **INTRODUCTION GENERALE**



## ***INTRODUCTION GENERALE***

Les maladies négligées sont des maladies qui prévalent dans les pays en voie de développement et contribuent également au maintien de l'inégalité, car elles représentent une forte barrière au développement de pays.<sup>1,2</sup> Parmi les 17 maladies classées comme négligées par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), la schistosomiase est considérée comme la deuxième maladie parasitaire la plus dévastatrice socio-économiquement, derrière le paludisme, infectant plus de 200 millions de personnes dans le monde entier.<sup>2</sup>

Des composés dérivés d'imidazolidine représentent un groupe de substances hétérocycliques à cinq chaînons possédant des activités biologiques variées; des études avec des imidazolidines ont montré des activités sur les leishmanioses.<sup>4</sup> antifongiques, antimicrobiennes et trypanocides.<sup>5</sup> Les imidazolidines ont déjà été utilisées dans la pratique médicale comme médicaments efficaces contre les vers adultes de *S. mansoni*.<sup>6</sup> L'activité *in vitro* du niridazol, dérivé d'imidazolidine schistosomicide *in vitro* contre les vers adultes de *S. mansoni*, a été décrit dans la littérature.<sup>7-11</sup>

Compte tenu des projets développés dans le Groupe de Recherche sur l'Innovation Thérapeutique (Gpit) sur les imidazolidines, le premier objectif de cette thèse est l'identification d'une molécule prometteuse (*hit*), par la synthèse et l'étude de l'activité de 24 nouveaux dérivés d'imidazolidine. Des techniques d'analyse chimométriques seront appliquées pour aider à l'identification de ce dérivé. Le modèle chimométrique aura sa prévisibilité testée grâce à la synthèse de nouveaux dérivés de la même série, et à leurs résultats biologiques. De nouvelles réactions de modulation du squelette moléculaire amèneront une meilleure compréhension de la relation structure chimique-activité biologique. Un modèle de pharmacophore sera proposé à l'aide du logiciel de FLAP et un modèle du mode d'action possible, impliquant une addition de Michael, sera évalué.

Un deuxième objectif de ce travail est une revue concise de l'état de l'art des deux principaux médicaments utilisés dans le traitement de la schistosomiase au Brésil, l'Oxaminiquina (OXA) (Mansil® - Pfizer SA) et le Praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Oswaldo Cruz Foundation / FIOCRUZ). Le PZQ est utilisé pour traiter la schistosomiase humaine, car il peut éliminer les vers adultes, pendant la phase chronique de l'infection,<sup>12</sup> l'OXA est un autre médicament disponible, mais leur utilisation est limitée aux infections à *S. mansoni*, car ils ne sont pas efficaces contre toutes les formes du parasite.<sup>13</sup>

Les différents aspects de ces deux médicaments tels que les aspects pharmaceutiques, les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, les effets secondaires, les cas de résistance, ou encore la relation entre la structure chimique et l'activité biologique (SAR). Dans le cas de PZQ, tous les dérivés développés depuis plus de 30 ans sont répertoriés dans cette étude, permettant le développement d'un modèle précis de SAR.

Bien que la cible biologique du PZQ ne soit pas connue, à travers de cette analyse de la littérature sera possible de développer un modèle de pharmacophore et de prévoir l'activité de ses dérivés. Ces études sont encore en développement, mais les premiers résultats sont présentés sous la forme d'un deuxième article scientifique.

Le troisième objectif de cette thèse est la synthèse de nouveaux aminoglycosides amphiphiles avec une activité antibiotique contre les bactéries résistantes. Dans un article publié récemment en 2016 par l'équipe du Professeur JL Decout du Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Grenoble-Alpes,<sup>14</sup> de nouveaux dérivés avec une activité antibiotique contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) résistantes a été identifié. Ces composés amphiphiles sont issus de néamine, préparée à partir de la néomycine B, antibiotique naturel. Ces molécules ont une application comme médicaments antibiotiques et désinfectants. L'équipe a préparé divers dérivés de néamine 3', 4'-dialkyle et de 3,4-dialkyl-6-aminoglycoside. Les dérivés portent en position 1 un groupement allyle peut être modifié. Les substitutions peuvent se traduire par une plus grande flexibilité des dérivés par rapport à la néamine pour une interaction plus efficace entre le dérivé et les composants des membranes bactériennes, telles que les liposaccharides (LPS). De nouveaux dérivés aminoglycosides seront synthétisés à partir de la réaction de métathèse. Comme ce travail a été développé en France dans le cadre d'une co-tutelle de thèse, ces résultats seront décrits en français.

Ainsi, ce manuscrit est organisé en deux parties.

**Partie I** : consacrée aux imidazolidines, avec la synthèse de dérivés développés comme agents schistosomicides, ainsi que d'autres études associées, telle que la proposition du modèle de pharmacophore. Comme pièces jointes à cette première partie seront présentés les articles publiés et soumis relatifs à cette recherche. Ces articles contiennent des informations supplémentaires non discutées dans ce manuscrit.

**Partie II** : La dernière partie sera consacrée aux aminoglycosides, et leur synthèse par réaction de métathèse.

Ce travail devrait contribuer à la prise de conscience de la communauté scientifique sur l'importance de la recherche dans le développement de nouveaux dérivés imidazolidines et aminoglycosides comme alternatives dans le traitement de la schistosomiase et des infections bactériennes respectivement, et en plus de contribuer à une meilleure compréhension mécanisme d'action du Praziquantel (PZQ).

**PARTE I**  
**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E**  
**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS**  
**IMIDAZOLIDÍNICOS E TIAZOLIDÍNICOS 3,5-**  
**DISSUBSTITUÍDOS**

**INTRODUÇÃO**  
**PARTE I**

## INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias possuem características comuns em relação ao contexto em que ocorrem como, as condições precárias ou inexistentes de higiene, falta de saneamento básico, subdesenvolvimento de países, ou ainda, devido a presença de vetores que contribuem diretamente na transmissão, como por exemplo, a esquistossomose e a leishmaniose. Os métodos de tratamento e diagnóstico dessas doenças são antigos e inadequados e demandam investimento em pesquisa e desenvolvimento para se tornarem mais simples e efetivos.<sup>15</sup>

Também chamadas de doenças negligenciadas, ou da pobreza, estas parasitoses são importantes problemas de saúde pública em vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, afetando mais de dois bilhões de pessoas no mundo sendo causas substanciais de morbidade e mortalidade.<sup>16</sup> São assim chamadas pela falta de atenção dada pela indústria farmacêutica ao seu tratamento. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde classifica 17 enfermidades como doenças negligenciadas: doença de chagas, esquistossomose, leishmanioses, malária, tuberculose, dentre outras.<sup>17</sup> Estas doenças apresentam áreas endêmicas no Brasil e possuem uma importante taxa de mortalidade e morbidade no país. A esquistossomose mansoni (EM CID 10 B 659), causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, originalmente chamada de bilharziose, ocupa o segundo lugar das doenças de importância na Saúde Pública, ficando atrás apenas da malária. Registros recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram uma incidência de cerca de 243 milhões de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*. A esquistossomose está associada a vinte mil mortes anuais causadas pelas consequências graves da infecção da doença, incluindo fibrose hepática e hipertensão portal em todo o mundo.<sup>2</sup>

Os dois principais medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose são a Praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ) e a Oxaminiquina (OXA) (Mansil® – Pfizer S.A).<sup>18</sup>

O PZQ é utilizado para tratar a esquistossomose humana, uma vez que pode eliminar os vermes adultos, durante a fase crônica da infecção,<sup>19</sup> OXA é outro fármaco disponível, mas a sua utilização é limitada, não sendo eficaz contra todas as formas do parasito.<sup>20</sup>

Atualmente, o PZQ tem sido o fármaco de escolha para o tratamento medicamentoso no Brasil, mas seu uso extensivo inevitavelmente culminou em baixas taxas de cura, aparecimento de isolados de *S. mansoni* refratários, além de terem sido observados efeitos colaterais causados por esse medicamento.<sup>21</sup> Portanto, a busca de novos fármacos esquistossomicidas mais eficazes se tornou necessária, nesse contexto, pesquisas com compostos sintéticos consistem numa alternativa viável, que poderiam servir de moldes para o planejamento de novos fármacos.

Políticas de incentivo à pesquisa de novos medicamentos vêm sendo estimuladas pelo Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*) (TDR) da Organização Mundial da Saúde e o DNDi (*Drugs for Neglected Diseases*).<sup>22</sup> O emprego de novos medicamentos na farmacoterapia é necessário para o tratamento de doenças já existentes ou recém-identificadas ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes.<sup>23</sup>

Compostos derivados da imidazolidina são representados por um grupo de substâncias heterocíclicas pentagonais possuidoras de diversas atividades biológicas.<sup>3</sup> As imidazolidinas tiveram no passado um representante na clínica médica como um fármaco de ação comprovada frente a vermes adultos de *S. mansoni*, o niridazol.<sup>24</sup> A busca por imidazolidinas com ação esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* vem sendo um interesse de nosso grupo em diversos estudos publicados.<sup>7,8,10,11,25</sup>

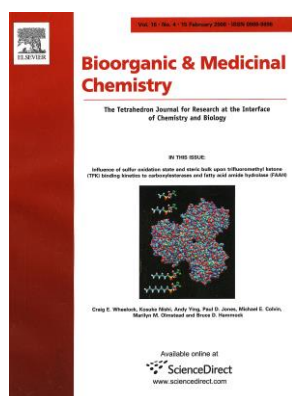
Tendo em vista a necessidade da busca de novos compostos esquistossomicidas e os resultados da atividade *in vitro* sobre o *S. Mansoni* dos derivados imidazolidínicos, este trabalho tem como objetivo a síntese de novos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos tionados na posição 4, a avaliação da atividade biológica frente a vermes adultos de *S. mansoni*, assim como a tentativa de elucidação de um possível modelo de farmacóforo e q utilização de modelos quimiométricos para previsão da atividade.

## ARTICLE 1 (ACCEPTED)

**MEDICINAL CHEMISTRY OF ANTISCHISTOSOMAL DRUGS PRAZIQUANTEL AND OXAMNIQUINE**

*Vinicius Barros Ribeiro da Silva,<sup>1,2</sup> Bruna R. K. L. Campos,<sup>3</sup> Jamerson Ferreira de Oliveira,<sup>1</sup> Jean-Luc Decout,<sup>2</sup> and Maria do Carmo Alves de Lima<sup>1</sup>*

*Bioorganic & Medicinal Chemistry*



# CAPITULO I

## *MEDICINAL CHEMISTRY OF ANTISCHISTOSOMAL DRUGS: PRAZIQUANTEL AND OXAMNIQUINE*

### **1. INTRODUCTION**

Schistosomiasis is a group of diseases caused by helminths, trematodes, digeneans, which belong to the genus *Schistosoma*. The most common etiologic agents are the species *Schistosoma mansoni*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* and *S. mekongi*.<sup>1,2</sup> It is the most prevalent pathology caused by worms in the world and it is considered endemic in 78 countries, affecting more than 200 million people in Africa, Middle East, Southeast Asia and South America. The estimated number of people living in areas of contamination is 700 millions. In America, endemic areas are found in Suriname, Venezuela, Caribbean Islands and Brazil, which has the largest endemic area. From all the neglected diseases). Over 240 million people require treatment for schistosomiasis yearly. The number of people infected with schistosomiasis increased from 12.4 million in 2006 to 35 million in 2012, with at least 243 million people required treatment for schistosomiasis in 2011. Schistosomiasis is one of major importance to public health, with 280,000 to 500,000 deaths every year.<sup>3-6</sup> However, there is a consensus among the experts that the mortality from this disease is not the major part of the problem when compared to the years of life that are lost due to the morbidity caused by schistosomiasis. The DALYs index ("Disability-Adjusted Life Years") of schistosomiasis is estimated as 1.76 million.<sup>7</sup>

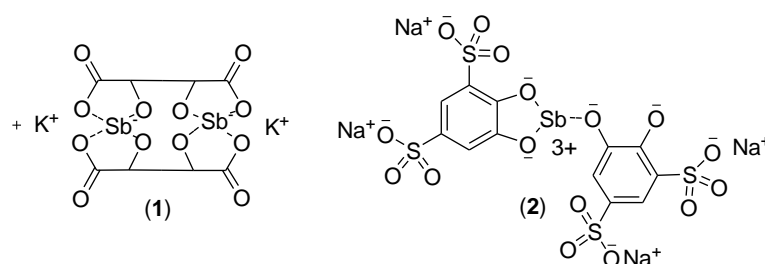
In the absence of effective vaccines to helminthic infections in humans, repeated cycles of treatment with drug monotherapies are usually used for the control of parasites in most developing countries.<sup>8</sup> The treatment consists in curing the disease, reducing the parasitic load of the host, preventing the progression of the disease to a severe stage and minimizing the production and the deposition of helminthic eggs in the environment as a primary prevention of the transmission.<sup>9,10</sup>

The drug treatment of schistosomiasis is not different from the usual theurapeutics, but it has always been limited by the difficulty in finding chemotherapeutic agents with high efficacy and tolerability. Initially, trivalent antimony compounds, as the emetic tartar (potassium antimonyl tartrate, Fig. 1), have been used as alternative treatments, administered intravenously for over a month. Side effects such as nausea, vomiting, diarrhea, anorexia, heart and liver disorders and skin problems were observed during the period of treatment. Lethal episodes were reported due to cardiac syncope or anaphylactic shock after the drug administration. In many cases, the treatment was interrupted by the small rate of treatment compliance, which led to the research of i) other metal complex and ii) other metal-free active drugs, preferably with oral administration.<sup>11-13</sup>



The research resulted in new antimony compounds that were still administered intravenously or intramuscularly, such as sodium antimony tartrate, sodium and antimony bis-pyrocatechol disulfonate (or Reprodal® Stibofen®, Fig. 1), antimony and sodium thiomalate (Anthiomaline®), antimony and sodium gluconate (Tiostram®) and sodium antimony dimercaptan (Astiban®). However, despite acting effectively against the three main species of the genus *Schistosoma* that parasitize humans, the toxicity and the side effects caused by these drugs were still intense and serious, causing the death of some patients.<sup>11,13</sup>

The action of trivalent organic antimonials on schistosome differs from that of other known antischistosomal drugs. The drug acts by a mechanism of inhibition of Phosphofructokinase (PFK), demonstrated *in vitro* and also *in vivo*. After the administration of subcurative doses of potassium antimony tartrate or stibophen to mice infected with *S. mansoni*, the substrate of the PFK reaction, fructose-6-phosphate, accumulates in the parasite while the concentration of the product, fructose-1,6-diphosphate, is decreased, indicating an inhibition of PFK activity. The fall in concentration of fructose-1,6-diphosphate decreases parasite aldolase activity, depressing glycolysis and depleting the anaerobic energy of the parasite, resulting in death.<sup>13,14</sup>



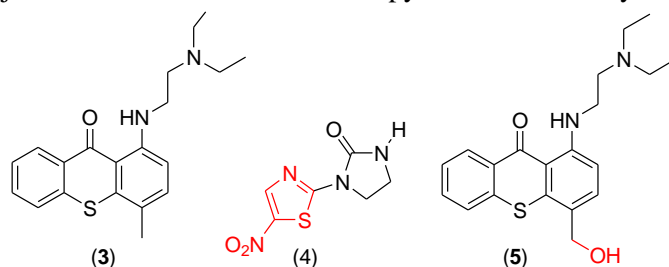
**Figure. 1** Antimonial drugs primarily used in the treatment of schistosomiasis. (1) emetic tartar; (2) sodium and antimony bis-pyrocatechol disulfonate, also known as Stibofen®

In 1935, with the end of World War II, a new compound was produced, the lucanthone (Miracil D, Fig. 2), acting against *S. mansoni* and *S. haematobium*, being the first schistosomicide with oral administration. Nevertheless, this drug still caused severe side effects on the central nervous and cardiovascular systems.<sup>15</sup> In 1964, the Niridazole (Ambilhar®, Fig. 2) started being used as a treatment, which was orally administered for seven consecutive days. The patients had little tolerance to this drug, which also had serious side effects: renal toxicity, seizures and hallucinations. Besides, this drug also presented mutagenic, carcinogenic and immunosuppressive properties.<sup>16,17</sup> Nitroaromatic chemical groups (Fig. 2), like the found in Niridazole, are known to be parasitophores (their presence is essential to kill the worm).<sup>18</sup> However, such groups are known to be toxic, mutagenic, and also are suspected or established carcinogens.<sup>19-21</sup> The interactions of nitroaromatic compounds with DNA and the resulting mutagenicity have been characterized extensively and reviewed for a variety of monocyclic, polycyclic, and heterocyclic nitroaromatic compounds.<sup>21</sup> Oxidation and reduction

products of nitroaromatic group can lead to damage in DNA and to the formation of adducts that induce mutagenesis by misincorporation of nucleotides during DNA synthesis.<sup>21,22</sup>

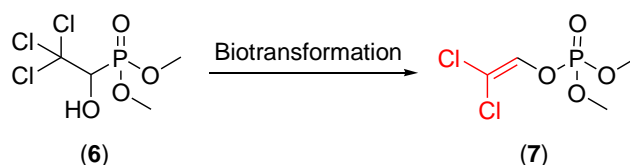
The effects of lucanthone are thought to be mediated by its bioactive metabolite, hycanthone (Fig. 2). In 1965, through the hydroxymethylation of lucanthone, the hycanthone was obtained, which is active in a single dose and may be used by both intramuscular and oral route.<sup>23</sup> Hycanthone was shown to be a better antischistosomal agent than lucanthone.<sup>24</sup> However, due to the side effects of hycanthone, including acute hepatic necrosis,<sup>16</sup> strong mutagenicity<sup>25</sup> and weak carcinogenicity,<sup>26</sup> the use of hycanthone for treatment of human schistosomiasis has been discontinued. Lucanthone, on the other hand, has been used to treat schistosomiasis for almost 20 years before being replaced by new drugs.

Lucanthone and hycanthone belong to a family of thioxanthenones and besides the use as antischistosomal drugs they were also shown to be DNA binders by their carried positive charge at physiological pH and intercalators by their polyaromatic rings. They inhibit DNA processing enzymes topoisomerases I and II as well as the mRNA synthesis.<sup>27</sup> Since lucanthone is able to cross the blood brain barrier and inhibit cell proliferation without affecting normal non-cycling cells, the compound has been used as an adjuvant for brain tumor radiotherapy<sup>28</sup> and is currently in clinical trial.



**Figure. 2** First drugs of oral administration for the treatment of schistosomiasis. (3) lucanthone, also known as miracil D; (4) Niridazole, also known as Ambilhar®; (5) hycanthone, derived from hydroxylated lucanthone.

The metrifonate (Fig. 3), recognized since 1950 as an anticholinesterase agent, was introduced in the 60s as an active agent against *S. haematobium*. However, as most of the organophosphorus compounds, the structure of metrifonate is unstable in aqueous solution, generating several secondary compounds as dichlorvos. Among them, the 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (Fig. 3) has been recognized as the bioactive form of metrifonate, which was then classified as a prodrug. Subsequent studies revealed that the group dichlorovinyl in the dichlorvo is important to the transesterification with the alcohol of the serine residues in proteins, and this esterification in the active site of acetylcholinesterase is responsible for the insecticidal and anthelmintic activity of dichlorvos.<sup>15,29</sup>

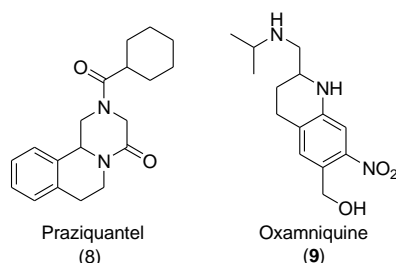


**Figure. 3** Chemical structure of Mefenoxate (a) and its active metabolite, 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (b). In red, the group dichlorovinyl, responsible for insecticidal and anthelmintic activity of dichlorvos.

In 1969, Richards and Foster developed oxamniquine, OXA, (Pfizer), originated from lucanthone, which after hydroxymethylation gave rise to hycanthon. Oxidation of hycanthon by the fungus *Aspergillus sclerotiorum*, developed by Pfizer in England, gave rise to UK 4271. This drug was subsequently named oxamniquine by Foster. OXA was administered in a single orally dose, it was well-tolerated by patients with high cure rate and no serious side effects, although some patients still reported stomach discomfort, dizziness and headaches. The treatment is not recommended to people with epilepsy.<sup>16</sup>

In 1977, Thomas and Gönner described the activity of praziquantel against cestodes and trematodes. In a single oral dose, praziquantel is well tolerated by patients and it has a high activity. There are no severe side effects for this treatment and it is effective against all species of *Schistosoma* that parasitize humans.<sup>16</sup>

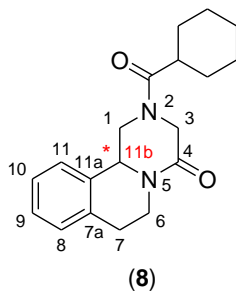
Currently, praziquantel is the first treatment against schistosomiasis and many other cestode infestations. The oxamniquine is used in case of failure of the treatment with praziquantel.<sup>30</sup> Despite the successful use in many situations<sup>31</sup> both drugs have limitations such as low activity on immature worms of *S. mansoni* and failure of the treatment due to resistance or tolerance<sup>32–35</sup> Nevertheless, the pharmaceutical industry, holding the registration of products containing OXA, decided to limit the production of medicines incorporating this compound, making PZQ the main treatment against this parasitosis.<sup>36</sup>



**Figure. 4** Chemical structures of Praziquantel and Oxamniquine.

## 2. PRAZIQUANTEL

In 1972, a research conducted by the industries E. Merck and Bayer A.G. selected praziquantel (Fig. 5), among more than 400 analogues tested, as the drug to be commercialized for the treatment against schistosomiasis due to its characteristics of low toxicity, high efficacy and tolerability. This is considered the most important development for decades in the treatment of schistosomiasis.<sup>31,37</sup> First approved for veterinary treatment of schistosomiasis, its use has been expanded to treat cestode infestations in humans in the 80s.<sup>38-40</sup> In 1983, new methods of synthesis have been developed to ensure high efficiency and low cost treatment for the disease.<sup>41</sup>



**Figure. 5** Chemical structure including atom numbering of PZQ. In red, the geometrical center of the molecule.

Structurally known by the name of  $(\pm)$ -2-cyclohexanecarbonyl-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*,6*H*,7*H*,11*bH*-piperazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-one, PZQ is a tetrahydrogenated isoquinoline pyrazine derivative with an asymmetric center. It has a pharmacological activity much higher than the oxamniquine, which acts only against *S. mansoni*, mainly against adult males. Praziquantel is effective against adults of all species of schistosoma, but not against the young forms, and the reason is still unknown.<sup>42</sup> Besides being effective against all forms of *Schistosoma*, praziquantel shows highly effectiveness against infestations of other species of trematodes and/or cestodes, especially *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* e *Diphyllobothrium latum*, *Cysticercus bovis* and *Cysticercus cellulosae*, *Echinochasmus fujianensis* and *Opisthorchis viverrini*, acting against the larval stage, immature and mature cestodes,<sup>31,43</sup> but not against nematodes.<sup>40</sup>

Today, PZQ is the main drug used in the treatment of all kinds of schistosomes, being also indicated for the treatment of taeniasis, cysticercosis and infestations of *Diphyllobothrium spp* and *Hymenolepis nana*, indicated in the list of essential drugs of WHO.<sup>30,44,45</sup> It is usually administered at dosages between 40-60 mg.kg<sup>-1</sup> and its drug efficacy, in the case of schistosomiasis, is evaluated by counting the eggs of *S. mansoni* or *S. japonicum* in the feces by Kato-Katz smears or by filtration. In the case *S. haematobium*, the drug efficacy is evaluated by the egg count in the urine.<sup>41</sup> All therapeutic doses have a cure rate against *S. mansoni* ranging from 60 to 90%, causing a reduction of 90 to 95% in the number of eggs, depending on the level of infection.<sup>53,66,67</sup>

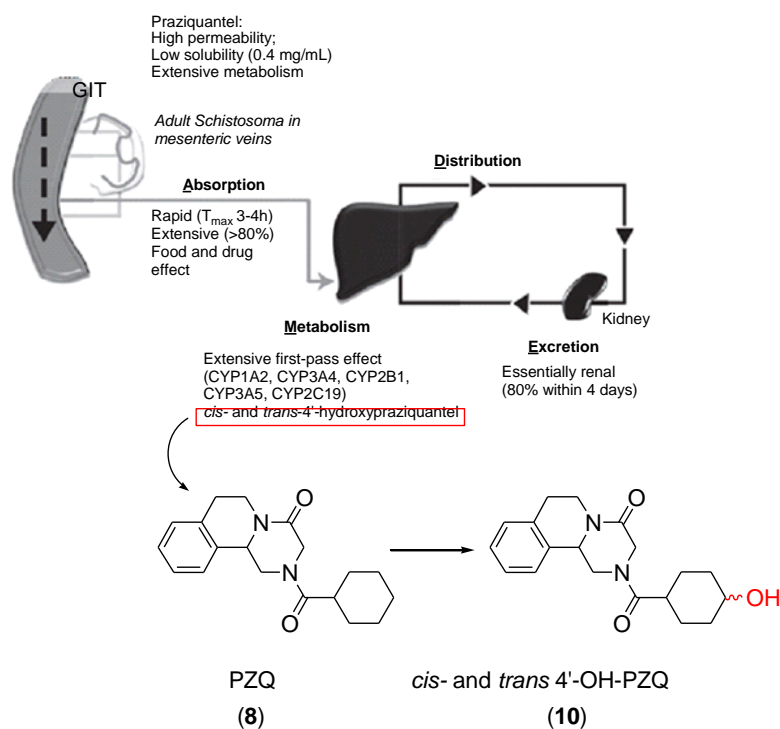
### **A. Pharmaceutical aspects of Praziquantel**

Praziquantel is a white powder with bitter taste, stable under normal storage conditions. It is practically insoluble in water but soluble in ethanol and in other organic solvents. Currently, Praziquantel is on the market as a pill, in the dosages of 150, 500 and 600 mg, and the posology is made according to the patient body weight.<sup>46</sup> PZQ is classified as a Group II BCS member (*Biopharmaceutics Classification System*), a drug with low solubility and high permeability in the gastrointestinal tract (GIT), so the dissolution rate is the limiting factor of its absorption and one of the main reasons for the high doses. The optimization of the dissolution rate of this class of drugs is, therefore, an important and challenging aspect in the development of new formulations.<sup>47</sup> Further research is needed in order to improve the drug solubility and hence reduce the high doses used in the treatment of parasitic diseases.<sup>48</sup>

### **B. Pharmacokinetics of Praziquantel**

According to Gonzalez-Esquivel *et al.* (2005),<sup>49</sup> the apparent permeability coefficient of PZQ is  $4.4 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$  (across Caco-2 cells), which is an indicative of its high permeability, suggesting that the transcellular transport may be the main absorption process. In humans, peak plasma levels of  $1 \mu\text{g/mL}$  of the drug in its unaltered form are obtained between 1-2h after the administration, which reflects between 5-7% of the ingested drug.<sup>50-54</sup> The elimination of the drug is primarily by the kidneys through urine, reaching a rate of 80% within 4 days, with 90% of that achieved in the first 24 hours. The effective half-life is 1.5 hours.<sup>40,55</sup> The absorption occurs in 75-100% of the oral dose in rats, dogs, monkeys and humans.  $T_{\text{max}}$  (the time after administration of a drug when the maximum plasma concentration is reached) is reached after 30 to 120 minutes in animals and within 3-4 hours in humans.<sup>56</sup> The binding of praziquantel to plasma proteins varies from 79 to 80.5% in the range from 0.19 to 3.0 mg/mL, being the albumin binding percentage 78 to 81%. At higher plasma concentrations (10-100 mg/mL), it was observed a reduction of 80.5 to 50% of this binding (Fig. 6).<sup>49</sup>

The major metabolite of PZQ formed by the first pass metabolism is the trans-cyclohexanol derivative (Fig. 7), reported as 4 to 10 times less effective than PZQ against *S. mansoni*.<sup>40,43,57</sup>



**Figure. 6** Schematic diagram showing the main characteristics of praziquantel absorption, distribution, metabolism and excretion ('ADME'). GI, gastrointestinal. Praziquantel and its main metabolite. <sup>58,59</sup>

In their study González-Esquivel *et al.* observed that the hepatic and intestinal metabolism may be the limiting factors in the solubility, low permeability and consequent bioavailability of PZQ.<sup>49</sup> After the absorption, PZQ readily undergoes the effect of first pass metabolism in the liver, so the bioavailability can be increased if the drug is taken with food, for example,<sup>51-53</sup> after meals<sup>60</sup> and/or with inhibitors of P450 cytochrome, such as cimetidine.<sup>55,58,59,61-63</sup> According to González-Esquivel (2005), when PZQ is administered with a lipid diet or after a carbohydrate diet, the plasma levels increase two and five times, respectively.<sup>49</sup> Nevertheless, there is a reduction in the bioavailability with concomitant intake with some drugs such as chloroquine, corticosteroids and antiepileptics.<sup>63</sup> Some studies also associate bioavailability of praziquantel to the patient clinical state. Patients with severe hepatosplenic form of the disease, resulting in hepatic impairment, have slower drug metabolism compared to those with normal hepatic function.<sup>64</sup>

### ***C. Pharmacological Effects and Mechanism of Action***

#### ***1. Adult Worms***

Praziquantel affects the membrane permeability of the adult parasites, which causes vacuolation of the tegument. It paralyzes the worm and exposes it to attacks by the host immune system. The muscle contraction, one of the first effects to be observed, occurs a few minutes after the drug administration. This effect is of great importance since, as a result of the contraction, the worms lose their binding capacity due to the central suction cup (acetabulum) relaxation and are drawn into the liver, where inflammatory reactions occur, resulting in the elimination of the parasites. The tests *in vitro* show that PZQ causes a rapid calcium influx in the schistosoma accompanied by an intense muscle paralysis.<sup>41</sup> Studies by Pax Bennett and Fetterer (1978)<sup>65</sup> demonstrated that the contraction is directly related to the calcium influx in the tissues. The authors observed that the worms were not able to contract when maintained in a free calcium medium or in a medium with high concentrations of  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ .

Another important pharmacological effect is the vacuolation and blebbing of the cutaneous and subcutaneous structures in adult worms, but not in young ones. It is believed that such events expose the parasite surface antigens that can be recognized by the host immune system.<sup>66</sup>

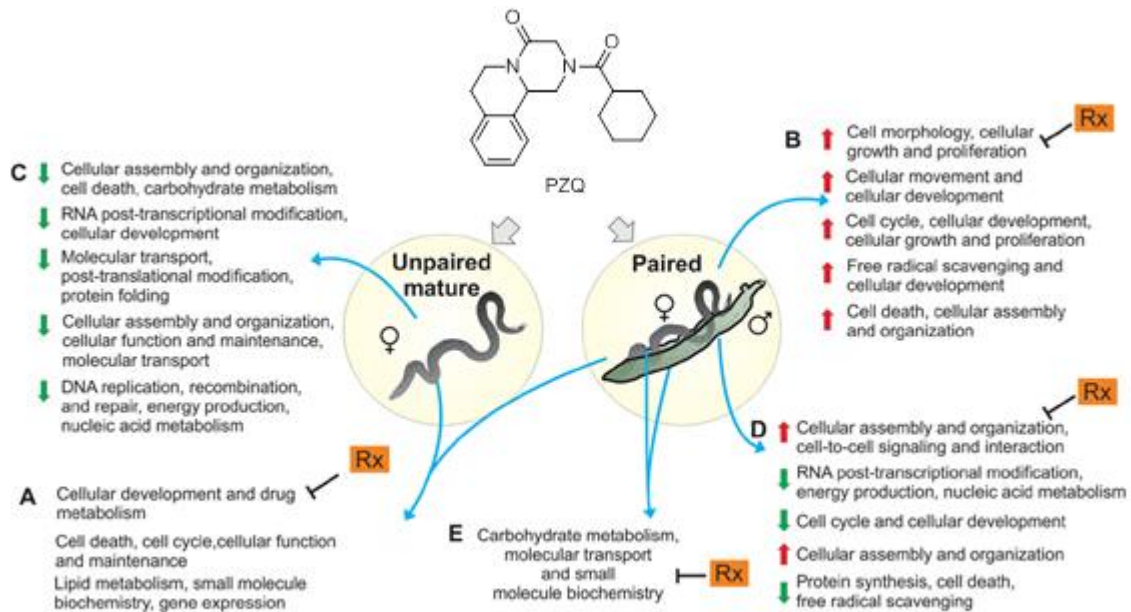
The main mechanism of action of praziquantel is still unknown; however, the most accepted hypothesis is that its anthelmintic action is probably due to a change in the function of voltage operated  $Ca^{2+}$  channels (VOCC), as they have a critical role in regulating the levels of intra-cellular  $Ca^{2+}$  and are essential for a variety of parasite cellular events, including contraction, gene expression and neurotransmitter release<sup>67</sup>. Such evidence has been mentioned in numerous articles published by Greenberg *et al*, which are grouped in the review article published by Salvador-Recatalà and Greenberg in 2012.<sup>68</sup>

VOCCs are heteromultimeric membrane protein complexes that are composed of principal  $\alpha 1$  subunit and auxiliary  $\alpha 2$ ,  $\beta$  and  $\delta$  subunits. The  $\alpha 1$  subunit comprises four linked homologous domains with six transmembrane segments pore-forming the  $Ca^{2+}$  channel.<sup>69</sup> Greenberg *et al*. suggested that PZQ alters the function of VOCC through the  $\beta$  subunit of the channel. Two distinct subtypes of the VOCC  $\beta$  subunit were identified in schistosomes, one homologous form that can be found in mammals and a second shape variant with deletion of two serine residues compared to the human variant. The absence of both serines causes an interaction domain capable of undergoing phosphorylation reactions with kinase C proteins in the beta-interaction domain (BID).<sup>41,68</sup>

The L-type  $\alpha 1$  VOCC subunit (*SmCav1*) is one of the two VOCC subunits in the *S. mansoni* genome. *SmCav1* and vertebrate homologues have approximately 50-55% structural similarity, such as the four homologous domains and a pore composed of the area between the S5 and S6 transmembrane regions in each domain.<sup>70</sup> Interestingly, the contractive effect that praziquantel exerts on the adult worm *in vitro* is assigned to the modulation of the  $\beta$  subunit of L-type calcium channel (sensitive to

dihydropyridines), causing its opening.<sup>71,72</sup> Thus, the L-type calcium channel would be the pharmacological receptor of PZQ, at least with regard to their effect on the worm muscles. Studies by Da Silva *et Noël* in 1995,<sup>73</sup> as well as those performed by Pax Bennett *et Fetterer* in 1978,<sup>65</sup> proved the inhibition of the contractive action of praziquantel in the absence of Ca<sup>2+</sup> in the external medium or in the presence of verapamil.

A review of the most important events in a molecular level caused by the PZQ in *S. mansoni* adult worms (males and females), shown for the first time in Almeida *et al.* 2015,<sup>74</sup> is represented in the (Fig. 7).



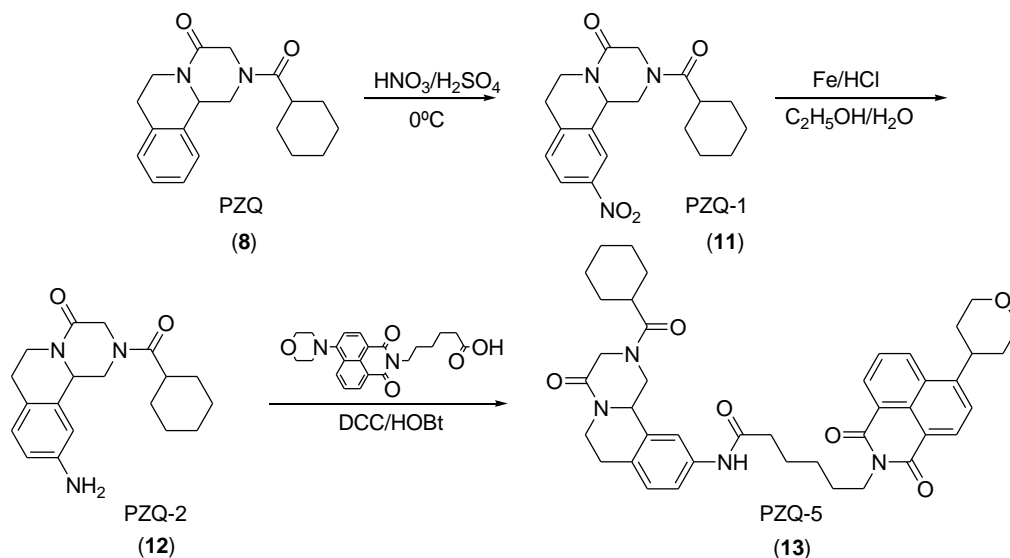
**Figure. 7** Global transcriptional changes driven by PZQ on *S. mansoni* adult worms. (A) genes affected by PZQ in opposite directions in paired or unpaired mature females, (B) all genes affected by PZQ in paired females, (C) all genes affected by PZQ in unpaired mature females, (D) all genes affected by PZQ in paired males, (E) genes affected in common in paired males and females. Color arrows indicated the direction of change in expression of the majority of the genes in each network: green implies a down-regulated expression of the majority of the genes in PZQ-treated worms, and red an up-regulated expression of the majority of the genes in PZQ-treated worms when compared with their respective no-drug controls. Rx corresponds to the identification of new candidate drugs known to act on the encoded protein products of the homolog human genes present in the indicated network (modified of: Almeida *et al.* 2015).<sup>74</sup>

## 2. Cercarial stage

The cercarial stage of the schistosome is the only infectious men period, and also the most fragile stage of its life cycle.<sup>75</sup> However, many reports focus mainly on the PZQ mechanism of action in adult and juvenile worm, while few papers focus on the mechanism of PZQ interaction with cercaria.



<sup>76,77</sup> In order to understand the interaction of PZQ with schistosome cercariae and its effects Xie *et al.*<sup>78</sup> were synthesized and tested against adult *S. japonicum* a novel fluorescent compound of PZQ, called PZQ-5. The compound was obtained by coupling the *N*-hexanoic acid-4-morpholin-1,8-naphthalimide to PZQ-3 as shown in Scheme 1.



**Scheme 1.** Synthetic routines of PZQ-5.<sup>78</sup>

The cytotoxicities of the new derivatives of PZQ (PZQ-2, PZQ-3 and PZQ-5) are relatively low (MTT assay with HeLa cells: cell survivor after 24 hours in contact with PZQ-2, PZQ-3 and PZQ-5 is over 85% in 40  $\mu$ M). Fluorescence imaging experiments revealed that PZQ-5 is mainly located at the cercarial tegument. They had as conclusion that the PZQ can influence or demolish the cercarial tegument, which may lead to a series of changes in morphological and biological metabolism for cerariae.<sup>78</sup>

#### **D. Side Effects of Praziquantel**

The administration of Praziquantel may cause infrequent and non-persistent side effects, the most common being nausea, vomiting, abdominal discomfort, anorexia and diarrhea. With reference to the central nervous system, headache, dizziness and somnolence have been reported. Other side reactions were also reported, although less frequently, such as rash, urticarial.<sup>79</sup> and sometimes fever and fatigue.<sup>80-83</sup> The frequency and severity of side effects are directly related to the intensity of infection.<sup>84</sup> Stelma *et al.* (1995)<sup>85</sup> reported cramping, vomiting, hives and swelling observed in 352 patients among 422 treated with praziquantel in an epidemic focus. As the severity of the effects was higher in patients with higher infection load, the authors suggest that the adverse effects may be related to the action of the drug on the parasite, causing allergic reactions in the patient. They also suggest that the death or migration of the worms from the mesentery to the liver can cause embolism

and intestinal colic. Praziquantel has a low toxicity<sup>86</sup> and has no mutagenic, carcinogenic or teratogenic risk. However, the contraindications for the use of any drug of the schistosomiasis therapeutic arsenal are hepatic insufficiency and renal failure or other serious situations of clinical decompensation, such as hepatointestinal decompensation.<sup>86,87</sup>

### *E. Resistance to Praziquantel*

In 1971, Rogers and Bueding demonstrated for the first time the existence of *S. mansoni* strains that were resistant to a schistosomiasis drug, hycanthone. Mice and hamsters infected with strains of *S. mansoni* from Puerto Rico and treated with hycanthone, started to eliminate viable eggs again after one year of treatment. The cercariae from these eggs were used to infect other mouse, in which the adult worms were resistant to the treatment with hycanthone.<sup>88</sup>

The first evidence of resistance to PZQ was registered in 1994, with Fallon and Doenhoff experimental studies.<sup>89,90</sup> Mice were infected using a "pool" of cercariae from four distinct geographic regions and the animals were treated with subdoses of PZQ. After seven cycles of treatment with increasing doses of PZQ, it was observed one strain of which 93% of adult worms survived three doses of 300 mg/kg. This strain was resistant to PZQ, but it was sensitive to oxaminiquine, being the case of a strain that was resistant to a specific drug.<sup>16</sup>

In 1995, it was recorded the first case of acquired resistance to praziquantel (PZQ) evidenced in Senegal, where there was an outbreak of intestinal schistosomiasis and the treatment of patients with 40 mg.kg<sup>-1</sup> PZQ did not achieve satisfactory results, with cure rates of 18-39%.<sup>85</sup> Such percentage is considered low, since the treatment with this drug has a cure rate of approximately 80-90%.<sup>79</sup> The dose was increased to 60 mg.kg<sup>-1</sup> in order to obtain a therapeutic success, but the results remained unsatisfactory.<sup>91</sup>

Melman *et al.* (2009) questioned the resistance, since the reinfection is very likely in endemic areas and it can lead to misinterpretation of the cure rates, as it is not possible to know if the patient had another exposure to the disease or not. However, advanced studies were conducted and it was actually found a reduced susceptibility of the worms to PZQ, suggesting an important resistance to the drug.<sup>92</sup>

The mechanism of resistance to Praziquantel is not yet elucidated. An evidence for the resistance of young worms can be found by observing the ABC transport proteins (ATP-binding cassette), involved in the transport of toxins and xenobiotics. Kasinathan and Greenberg demonstrated that young worms express approximately 2.5 times more transcription genes of ABC transport proteins (SmMRP1 and SMDR2) than adult worms.<sup>93</sup> Hines-Kay *et al.* demonstrated a significant increase in the transcription of genes that encode ABC transport protein genes (SMDR1, SmMRP1, SmMRP2 and SMDR3) in young worms exposed to PZQ *in vitro*.<sup>94</sup> Higher levels of parasite SMDR2 are found in females, while SmMRP1 is mostly found in males.<sup>95</sup> Couto *at al.* shown that resistant adult worms (produced from *S.*

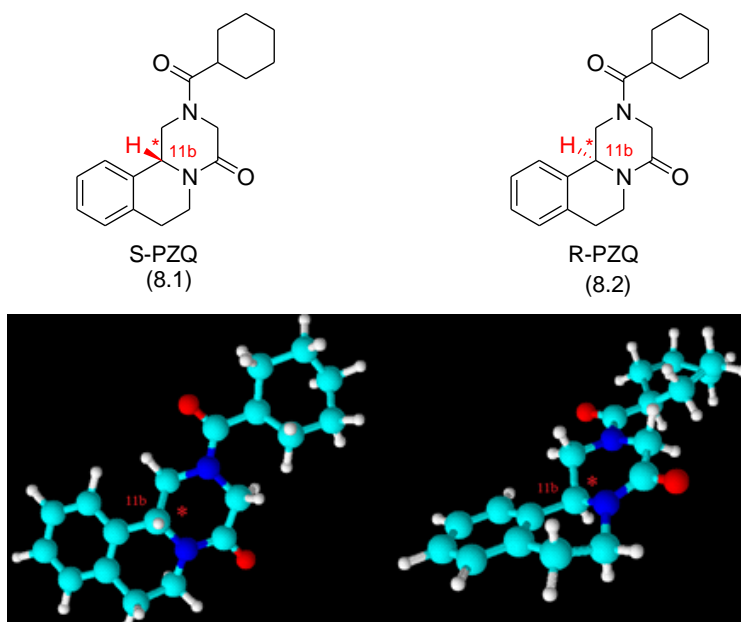
mansoni-infected *B. glabrata* snails subjected to PZQ drug pressure) exhibit less tegumental damage and less inhibition of the excretory system than normal parasites.<sup>96</sup>

Until the present days, there is no clear evidence of a clinical resistance in wide range to the treatment with PZQ. Kasinathan, Morgan and Greenberg (2010) clearly indicate that the resistance to PZQ can be selected. It was verified that a homolog of schistosomal P-glycoprotein is upregulated in resistant worms treated with PZQ and in young worms.<sup>93</sup> However, it can be argued that resistance is inevitable.

## F. Structure-Activity Relationships (SAR)

### 1. Stereochemistry of Praziquantel

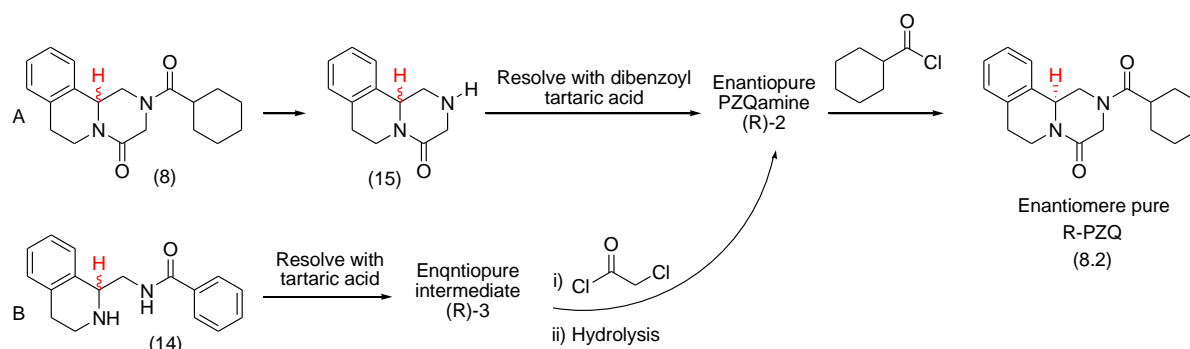
As previously mentioned, praziquantel has an asymmetric center in its structure, so the compound has two absolute configurations, (R)-PZQ and (S)-PZQ (Fig. 8). At the molecular level, the main antiparasitic activity is derived from the core isoquinoline pyrazine, and assigned to the isomer (R)-PZQ, the eutomer (isomer with biological activity).<sup>40</sup> Wu *et al.* demonstrated in 1991<sup>97</sup> that the administration of the isolated eutomer leads to a reduction of side effects when compared to the racemic mixture. Patients treated with 20 mg.kg<sup>-1</sup> of (R)-PZQ had the same cure rate and less side effects compared to patients treated with 40 mg kg<sup>-1</sup> of the racemic mixture. However, even if the dextro form does not induce severe side effects, the drug is commercially available in the form of racemic mixture for economic reasons.<sup>98</sup>



**Figure. 8** Chemical structure of the S and R isomers of Praziquantel, respectively. According to King *et al.* in 1989 and Wu *et al.* in 1991,<sup>40,97</sup> the R isomer is reported as the eutomer (Lima, 1997)

The use of (R)-PZQ reduces the size of the tablets, removes the bitter flavor and reduces the side effects. For these reasons, research on a route of synthesis and/or enantioselective purification were included in the business plan of WHO/TMS for the period of 2008-2013.<sup>99</sup>

In 2011, Woelfle *et al.*<sup>46</sup> proposed two methods for obtaining the pure enantiomeric forms of praziquantel. The first one starts from the commercial PZQ and involves hydrolysis of an amide function to afford the corresponding amines. The diastereomeric salts formed by acidification of the amines with tartaric acid can be separated to lead to the pure enantiomers (see Fig. 9.A). The second method starts from a different product, but has a same intermediate compound (Fig. 9.B).

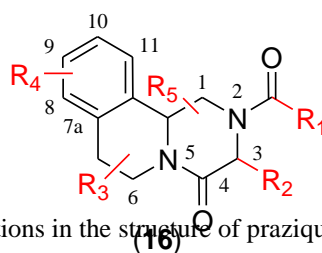


**Figure. 9** Two resolution approaches to enantiopure PZQ discovered through Woelfl *et al.*, 2011.<sup>46</sup>

Both processes of enantiomeric resolution showed promising results for large scale obtaining, being economically viable for a production of a single enantiomer at low cost.<sup>46</sup>

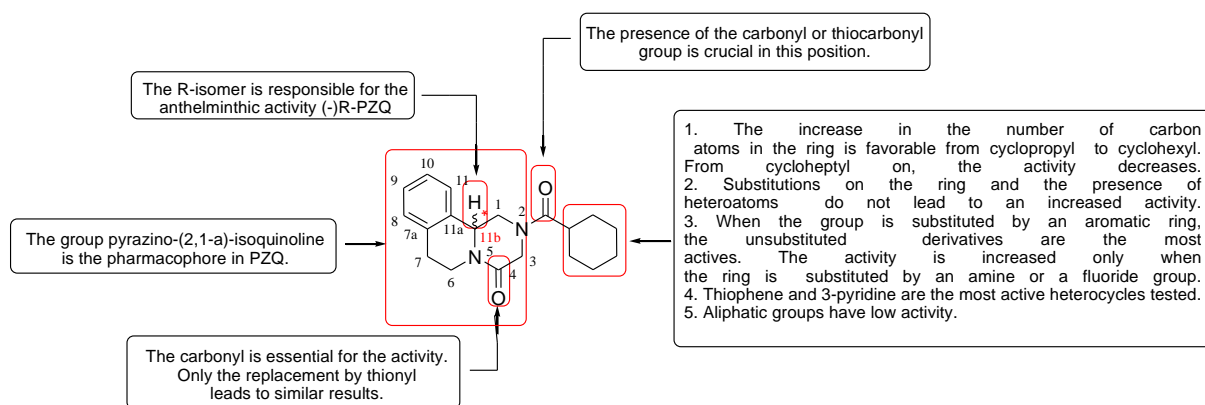
## 2. Structure-Activity Relationships (SAR)

Praziquantel is used as a treatment since the 80s, but still has some problems, as low solubility issues,<sup>47</sup> several side effects, bitter taste of the drug<sup>100</sup> and resistance.<sup>16,89-91</sup> That is the reason why further research is necessary for the development of new antischistosomal agents for replacement in case of praziquantel resistance, in other words, a second generation of antischistosomal agents. For the development of such drugs, three main strategies can be adopted: (a) synthesis of PZQ analogues; (b) the rational design of new pharmacophores; (c) the discovery of new compounds from screening programs on a large scale. The approach (b) is difficult as the target of PZQ is still unknown,<sup>41,44</sup> but the synthesis of new analogues is possible by understanding the chemical structure of PZQ. The molecule of Praziquantel has five positions susceptible to chemical changes (Fig. 10).<sup>101</sup>



**Figure. 10** Possible variations in the structure of praziquantel. (Lima, 1997)

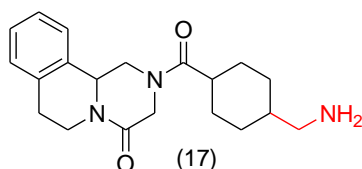
Only the R1 position was strongly investigated in the original report and patent, although it is unclear how these modifications were held, nor the activity presented by its derivatives.<sup>59,102,103</sup> Only a few of the original data SAR/QSAR are available, but the influence of some modifications in the activity of the drug is known. The introduction of 3-fluorobenzyl groups and nicotinoyl increases the anti-schistosomicidal activity against the *S. mansoni* of the derivatives,<sup>104</sup> while other groups, such as isobutyryl, eliminate the activity in this position.<sup>102</sup> A summary of the results obtained by the SAR performed by Andrews *et al.*<sup>59</sup> are shown in (Fig. 11).



**Figure. 11** First SAR from original study and corresponding publications.

### A. *Schistosoma mansoni*

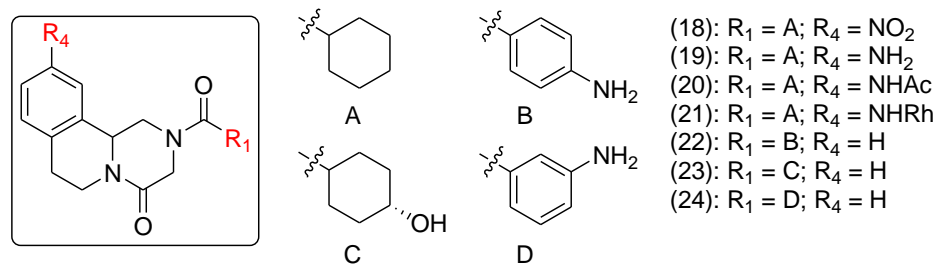
Until 2001, only one methylamine introduction in R1 position was described in the literature, and tested against the *S. mansoni*. Driven by Mitsui *et Arizono*,<sup>105</sup> it consists on the introduction of 4-aminomethyl-cyclohexyl (Fig. 12), but no detail has been published on the characterization and/or activity of the compound, so only the route of synthesis has been registered.



**Figure. 12** Derivative of 4-aminomethyl-cyclohexyl synthesized by Mitsui *et Arizono*, 2001.

For more than 30 years, no other modification in Praziquantel structure has been chemically explored, until 2007, when Matthew group held for the first time substitutions at **R**<sub>4</sub> position<sup>57</sup> (not explored in patent or open literature), in order to increase the chemical space of PZQ derivatives. Through reactions performed directly in commercial PZQ, nitro and amino substituents were added to the aromatic ring of PZQ (Fig. 14). In order to elucidate the PZQ's mechanism of action an amine in the aromatic ring would be also an ideal starting point for the attachment of fluorescent dyes or the synthesis of photoaffinity probes based on PZQ. Three other derivatives, (22)-(24), with variations in **R**<sub>1</sub>, were assigned to the group by Bayer, so that its activity is compared to that of the new analogues. The derivatives were evaluated for their ability to paralyze and kill the worms.

The results are of major importance for the understanding of the relation structure/activity of PZQ. The amino-PZQ analog (19) exhibits decreased activity compared to PZQ, the *N*-acetyl and nitro derivatives are inactive against adult *S. mansoni*. Such observations may mean that the aromatic ring, or at least the C<sub>10</sub> position of this ring, is a position of low importance in modulating the *in vivo* activity of PZQ. Nevertheless, the nature and position of the substituent is also important, since the 4-amino derivative is more active than the 3-nitro, and 3-amino, both are inactive. The low activity of the derivatives indicate that the changes performed in this position should not present significant gains in the effectiveness, but a decrease or loss of activity.<sup>57</sup>

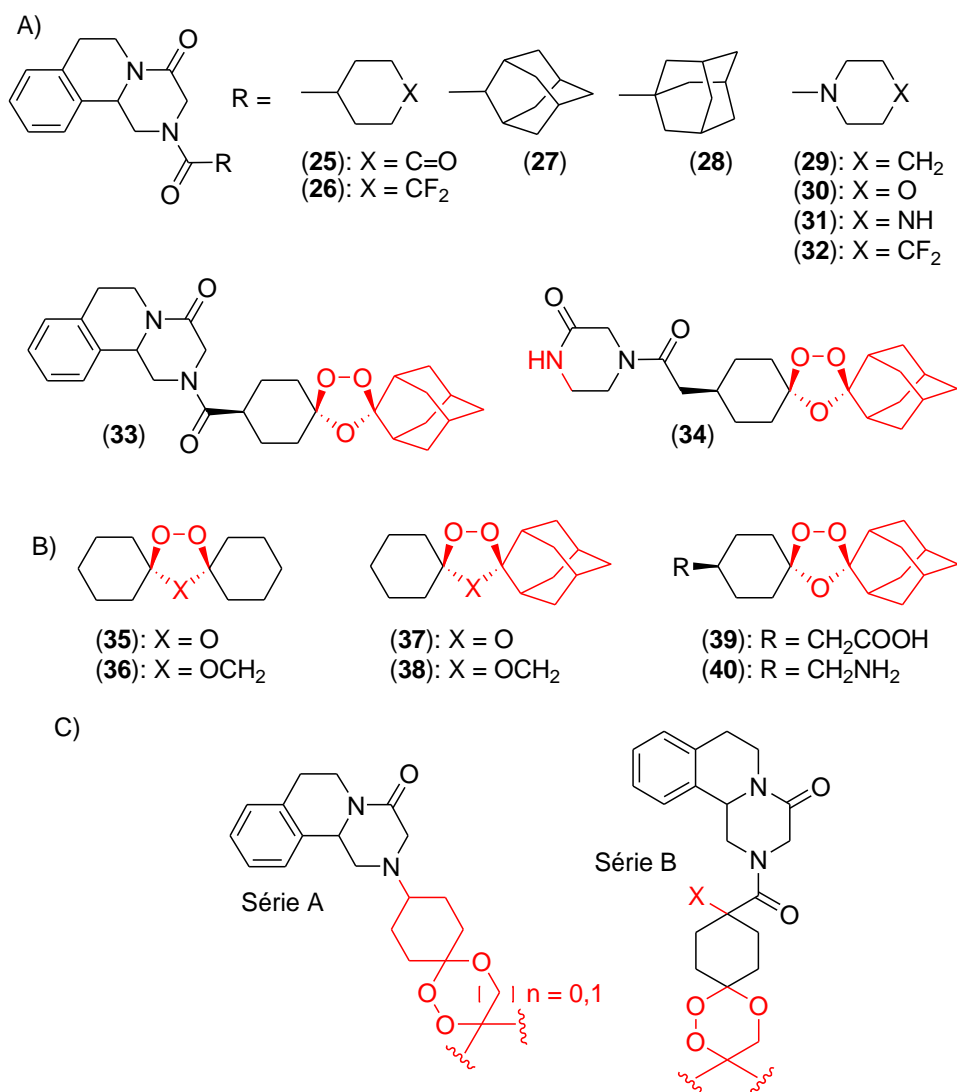


**Figure. 13** Praziquantel analogous 3-9 synthesized by Ronketti *et al.*, 2007

Recently, other changes in the position **R**<sub>1</sub> were performed, leading to the formation of PZQ ozonide hybrids (Fig. 15.A.).<sup>106</sup> The derivatives were tested *in vitro* and *in vivo* against young and adult forms of *S. mansoni*. Unfortunately, all results demonstrated a lower activity compared to PZQ.

However, the derivatives (25), (26), (28), (29) and (32) had modest activity against the young forms of the worm, with 34-56% of reduction in females. Like other ozonides derivatives, such as those synthesized by Xiao *et al.* in 2007 (Fig. 14.B.),<sup>107</sup> the derivative (34) has a high activity against the young form of the worm (85% of mortality), but has a low activity in adult forms (1-13% of mortality). Nevertheless, the hybrid (33) was completely inactive in both young and adult worms, similar to the results reported by Laurent *et al.* in 2008<sup>108</sup> to six new 1,2,4-trioxane-PZQ hybrids (Fig. 14.C.), which also showed no significant activity.

In summary, although the identification of new derivatives of PZQ with considered activity against the young form of *S. mansoni*, no compound has significant activity against adult worm compared to PZQ. Among these derivatives, compound (26) (Fig. 14.A.) shows the best activity against young and adult forms of *S. mansoni* (38-44% of mortality in young forms and 39-40% of mortality in adult forms).<sup>106</sup>

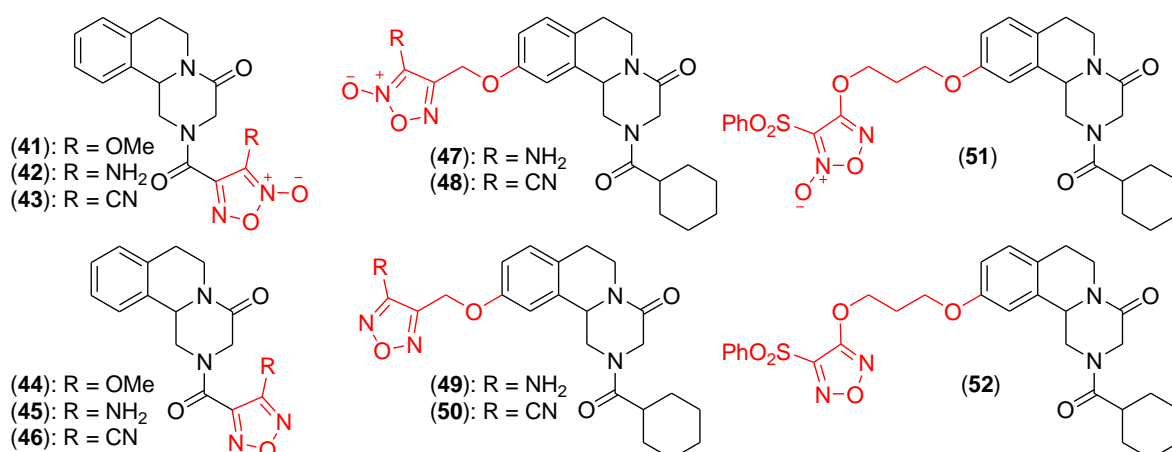


**Figure. 14** A) Hybrid analogous of Praziquantel (PZQ ozonide) synthesized by Dong *et al.* in 2010. B) Chemical structures of the trioxolane derivatives proposed by Xiao *et al.* in 2007: 1,2,4-trioxolane OZ01, OZ03, OZ78, OZ209, OZ288, ST01 1,2,4-trioxolane and ST03, and 1,3-dioxolane NP17 and NP18. C) Structure of the series A and B of Trioxaquantel derivatives proposed by Laurent *et al.* in 2008.

Several studies have demonstrated that furoxan derivatives are capable of inhibiting thioredoxin glutathione reductase (TGR), a parasite multifunctional protein that reduces both thioredoxin and glutathione disulfide, as it promotes the glutathionylation in worms, thereby killing the parasite.<sup>109</sup> The

group of Gasco was interested in the activity of furoxan derivatives, so they synthesized in 2014 a new serie of schistosomicidal compounds obtained by hybridizations of PZQ and NO-donors furoxan derivatives. In the first group of molecules, the furoxan derivatives were inserted as substituents of the cyclohexyl group of PZQ (Fig. 15. Structures (41)- (43)). In the second group of derivatives, the furoxan group was attached to the position C<sub>10</sub> of PZQ via appropriate spacers (linkers) (Fig. 15, structures (47)- (48) and (51)). Related furazones were also synthesized in order to compare the biological activity (Fig. 15, structures (44)- (46), (49)- (50) and (52)), since their structures are closely related to the corresponding furoxans. However, these derivatives are not capable of releasing NO. Thus, if the biological activity of a furoxan compound is similar to its furazone analog, it is assumed that the group NO is not involved in such activity.<sup>42</sup>

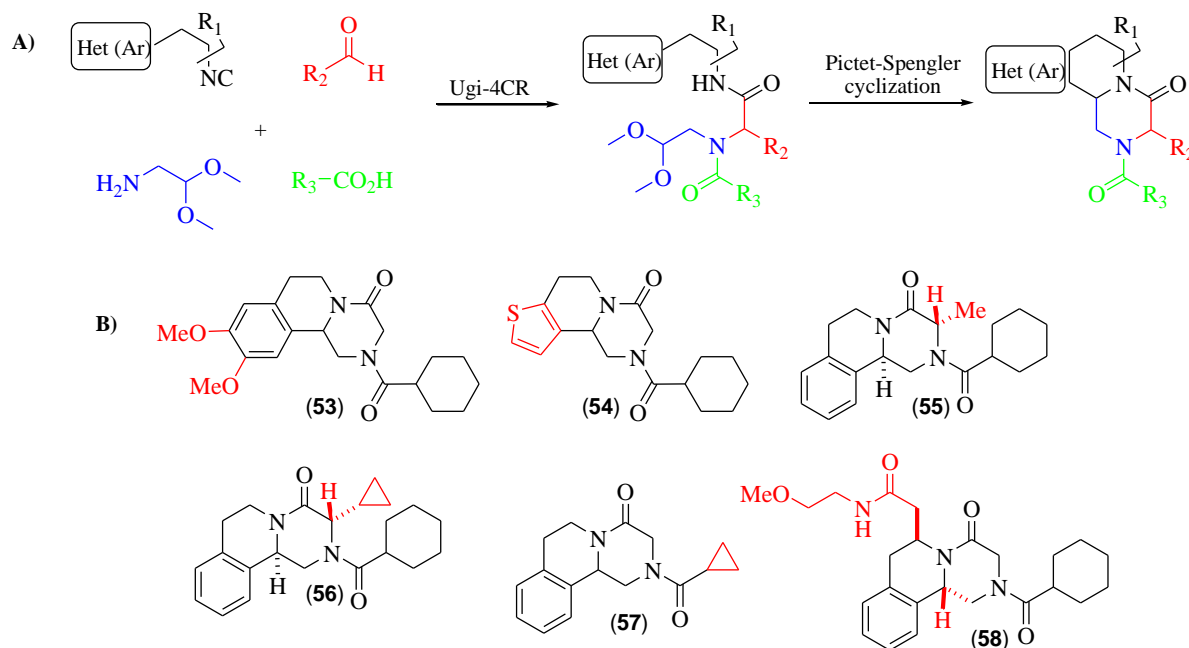
The group noted that all furoxan derivatives acted as potent inhibitors of TGR, and its power was registered in the following order (42) > (47) > (41) > (43) ~ (48) > (51). Such order is related to the ability of releasing NO under enzymatic action. This release depends on both the affinity of the molecule by the enzyme and the intrinsic reactivity of each product. As expected, des-NO furazan analogues showed no inhibitory activity when tested up to a concentration of 50 uM.<sup>42</sup> The results obtained with the second group of compounds, (47), (48), (49), (50), (51) and (52), indicate that, although the induced contraction of worms at the highest concentration, this effect was shorter in comparison to PZQ. This evidence is consistent with the conclusions that the modification of the aromatic ring of PZQ significantly reduces the activity.<sup>110,111</sup> Even with this reduced activity, the furoxans (48) and (51) possess a better activity in comparison to the related furazones (50) and (52), suggesting that the group NO is somehow involved in its activity. Since both furoxan derivatives are effective NO- donors and potent inhibitors of TGR, it is possible to conclude that the NO-donors characteristic possibly influences the ability to kill the parasite.<sup>42</sup>



**Figure. 15** Chemical structure of the analogues synthesized by Guglielmo *et al* in 2014.<sup>42</sup> The structures A, B and C are NO-donors furoxans, and the structures D, E and F are the corresponding des-NO furazones.



Recently in 2012 Liu *et al.*<sup>112</sup> were developed the synthesis of PZQ based on an Ugi four-component condensation (Ugi-4CR) followed by a Pictet-Spengler cyclization (PS-2CR), as shown in Fig. 16.A. The variations of the groups and substituents in these scaffolds arise from the four starting materials: isocyanide, aldehyde, amine and carboxylic acid, and allows access to a different chemical space compared to previous PZQ analogues, particularly derivatives with substituents R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, which are otherwise very difficult to access (Fig. 16.B). This process produces ketopiperazine fused ring systems that mimic the scaffold of praziquantel. Several compounds were identified, however less active than PZQ.<sup>112,113</sup>

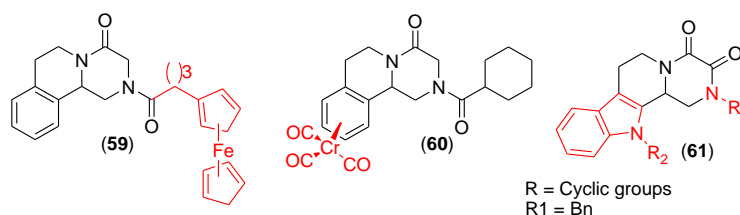


**Figure. 16** General approach for the multicomponent synthesis of PZQ derivatives by

Many other changes were made in praziquantel, contributing to further analysis of the importance of its chemical structure for its activity. Gasser group reported different PZQ analogs with the cyclohexyl radical in position 2 substituted by different organometallic moieties as previously undertaken with anticancer, antibacterial and antimalarial drugs.<sup>114,115</sup> Due to these promising results obtained with other diseases, specially against other parasites, the group have embarked on a project to evaluate the potential of some new PZQ organometallic derivatives, like the ferrocenyl-PZQ, Fc-PZQ (Fig. 17 molecule (59)). The group postulated that the derivatization of PZQ with a ferrocenyl moiety could potentially prevent future resistance as well as render the compound active against the juvenile stage of the parasite which is refractory to PZQ. Unfortunately, the Fc-PZQ derivatives were considerably less active than PZQ when tested against *S. mansoni in vitro*.<sup>116</sup> Continuing with the bioorganometallic studies Gasser group described the synthesis and biological activity of some new Cr-PZQ derivatives

(Fig. 17 molecule (60)) with antischistosomal activities comparable to PZQ when tested against adult *S. mansoni*.<sup>117,118</sup>

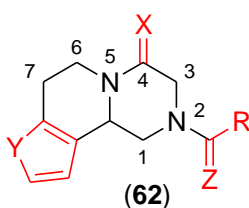
Rao group developed an efficient synthesis route for the production of various analogs of praziquantel in order to implement a SAR study. Several PZQ analogues with an indole ring (Fig. 17 molecule (61)) were synthesized and tested against adult *S. Mansoni* but, unfortunately, the compounds showed no better activity than PZQ *in vitro*.<sup>110</sup>



**Figure 17.** Chemical structure of some praziquantel analogues tested against *S. mansoni* recently reported in the literature.

### B. *Schistosoma japonicum*

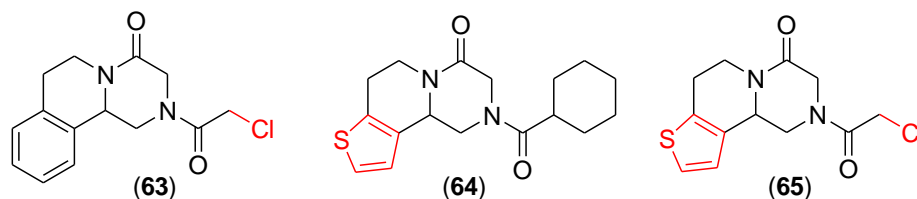
In order to increase the chemical variety for a better understanding of the relation between chemical structure and biological activity, and to analyze the affinity of PZQ derivatives against the *S. japonicum*, Wang *et al.* have synthesized, in 2013,<sup>119</sup> 33 new derivatives with different scaffolds (Fig. 18). The compounds were tested and their activities against *Schistosoma japonicum* were compared to PZQ.



**Figure 18.** Main structural modification sites of praziquantel performed by Wang *et al.*

In this work, the positions 2 and 4 of the general structure were the first ones studied. It was identified that the introduction of the chloroacetyl group in the position 2 of Praziquantel (Fig. 19.molecule (63)) would lead to the formation of the derivative 7 with higher worm-killing activity against adult *S. japonicum* than PZQ *in vitro*. The second modification evaluated was the substitution of the aromatic ring by a thiophene ring, leading to formation of derivatives with similar activity, derivative 7 (Fig. 19. Molecule (64)). The thiophenic ring was identified as a good bioisoster of the aromatic ring in PZQ.

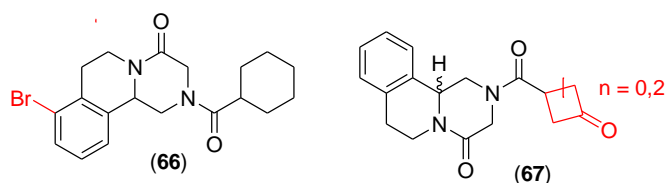
The derivative (**65**) with the chloroacetyl group killed 100% of the worms at concentrations as low as 10  $\mu$ M, which represents a more potent compound than PZQ (**64**).<sup>119</sup>



**Figure 19.** Derivatives **7** and **33** synthesized by Wang *et al.* with similar and higher activity than PZQ, respectively.

Qiao group reported new derivatives of praziquantel with modifications on the aromatic ring, which showed activity against young and adult *S. japonicum*. The compound with the bromide radical in the C<sub>8</sub> position of the aromatic ring, 8-Br-PZQ (Fig. 20 molecule (**66**)) showed the greatest activity against the adult form of *S. Japonicum*, compared to the activity of PZQ *in vitro* and *in vivo*. However, none of the products presented schistosomicidal activity superior to PZQ.<sup>120</sup>

In order to increase the metabolic stability of PZQ, Zhen *et al.* synthesized three new carbonyl analogues of praziquantel in 2014 (Fig. 20 molecule (**67**)).<sup>121</sup> Three different cycloalkyl substituents were used for the synthesis of the derivatives, cyclobutyl, cyclopentyl and cyclohexyl, all containing a carbonyl group in its structure. The use of the carbonyl group is due to its contribution to a decrease in the reactivity of the cycloalkyl radical, and its position in the case of PZQ was strategic to prevent the formation of the major metabolite, 4- trans-cyclohexanol. The compounds were obtained as a racemic mixture and the isomers were isolated. After the synthesis of the derivatives, the compounds were tested against adult and young forms of *S. japonicum*. The results showed that the R-isomer is the active form of the derivatives, and the size of the carbonyl ring is an important factor for the activity in such isomers, the cyclohexyl was the most active. Derivatives showed a higher activity against young forms of *S. japonicum* than PZQ, especially the R-isomer.

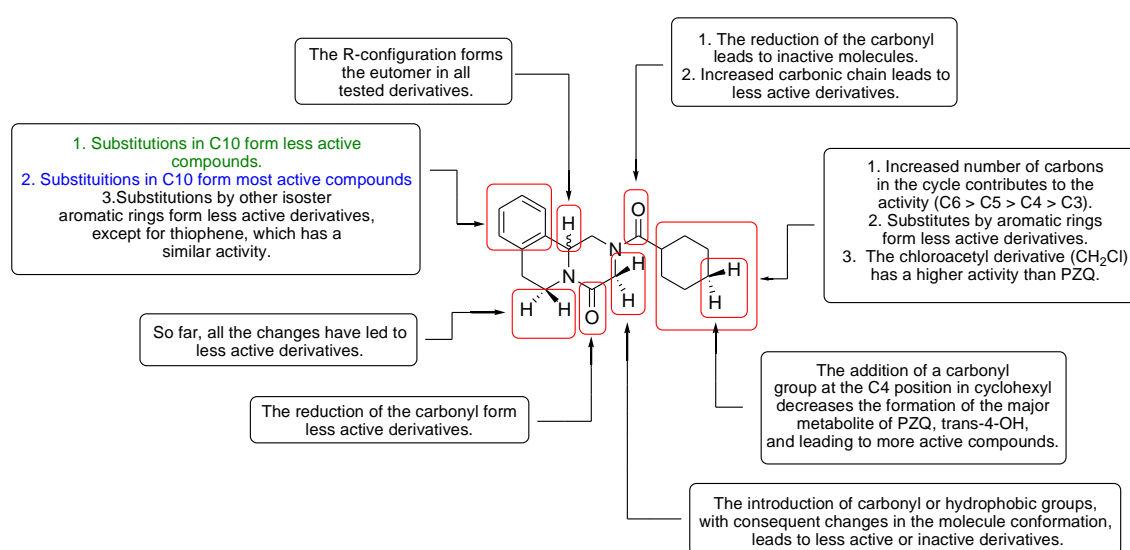


**Figure 20.** Chemical structure of some praziquantel analogues tested against *S. mansoni* recently reported in the literature.

Several structural changes were made in PZQ in order to increase its anthelmintic activity, for example, increasing the drug effectiveness in young forms of *Schistosoma*. However, the vast majority of the resulting products are not promising molecules, with moderate or no significant effect as the

original PZQ. In general the SAR between the PZQ and the activity against *S. mansoni* and *S. japonicum* are the same, the major difference is in the aromatic ring. To the *S. mansoni* substitutions in C10 positions decrease the activity, and to the *S. japonicum* increase the activity.

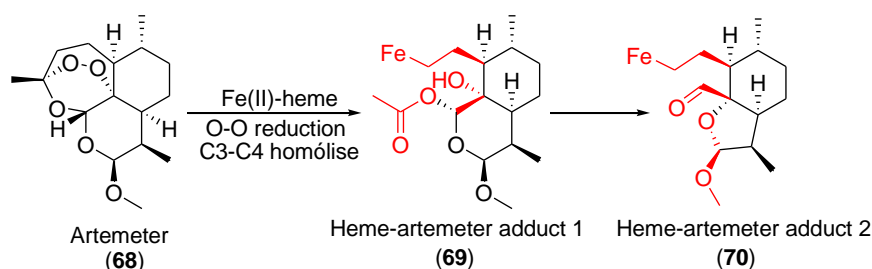
Several structural changes were performed in PZQ in order to increase its anthelmintic activity, such as expanding its action to young forms of *Schistosoma*. However, the vast majority of the resulting products were not promising molecules, presenting no significant activity or a moderate effect, being not comparable to PZQ. These studies allowed the development of a (still incomplete) list of study relating the chemical structure and the biological activity, diagrammed in Fig. 21. A biochemometric study is now being finalized to validate the SAR proposition.



**Figure 21.** New SAR proposition based in PZQ modifications made during the last 30 years. (Activity against *S. mansoni* and *S. japonicum* are both used in this study). Green: Exclusive to *S. mansoni*; Blue: Exclusive against *S. japonicum*

### 3. Molecular Hybridization of Praziquantel and Artemisinin

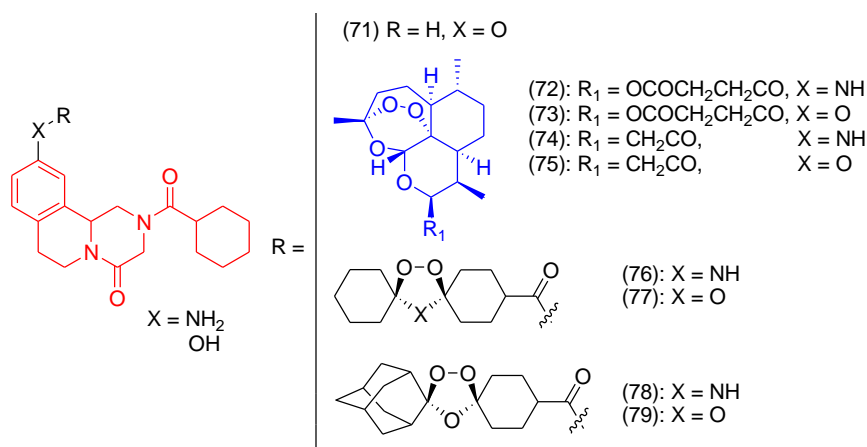
Artemisinin is a sesquiterpene lactone with a 1,2,4-trioxane ring. Originally studied as an antimalarial agent, the artemisinin and analogs, such as artemether and artesunate, also have activity against young forms of schistosomes. Meunier and Robert, in 2010, reported that artemisinin and its derivatives had their pharmacological activity in *Plasmodium* through a cytotoxic mechanism targeting the active iron-heme complex.<sup>122</sup> Since both *Plasmodium* and *Schistosoma* share the same redox-heme iron mechanism (Fig. 22), derivatives of artemisinin have demonstrated cytotoxic effects against three species of *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*.<sup>123</sup>



**Figure 22.** Mechanism of heme alkylation by artemether (the oval stands for the protoporphyrin IX ligand). Modified Portela *et al.*, 2012.<sup>124</sup>

The combination of artemether and PZQ for the treatment of acute schistosomiasis has been reported and tested in order to evaluate the synergistic effects. Shuhua *et al.* observed no increase in effectiveness when used in the combination for intragastric treatment of infected mice.<sup>125</sup> (You, Mei *et al.*, 1994). Later, a significant reduction of the parasitic load was reported in infected rabbits.<sup>126</sup> The results of the studies conducted by Utzinger with a combination of PZQ and artemether showed a significant reduction in the parasitic load compared to those achieved with the use of the individual drugs.<sup>123</sup> Positive results were also found in the combination of PZQ/artesunate in clinical trials, where the treatment had a higher cure rate compared to the individual one.<sup>127</sup> Nevertheless, the combination PZQ/artesunate is not recommended in areas where both schistosomiasis and malaria co-exist, due to the concern that large-scale use of artemisinin derivatives could induce resistance. Thus, the rational design of new hybrids derived from PZQ/artemisinin derivatives with dual action will represent an interesting strategy in the development of new and more effective schistosomicidal agents with reduced risk of drug resistance.<sup>128</sup>

PZQ is highly effective against the adult form of schistosomes, but less effective against the young stage of development, while artemisinin is more effective against the young stage of the worms.<sup>127</sup> Based on these evidences, the synergistic effects of PZQ and artemisinin against schistosomiasis started being studied by Qiao group through molecular hybridization (conjugation of two different pharmacophores to potentialize the biological activity). The group suggested that the hybridisation of both molecules would result in a wider spectrum of action against various forms of parasite when compared to a single drug treatment.<sup>101,128</sup> Thus, Duan *et al.* synthesized 8 new hybrid derivatives of praziquantel shown in Figure 23. The analogue (71) is the hydroxy-PZQ, the analogs (72)-(75) are composed of two covalently bonded pharmacophores, artemisinin, with its endoperoxide binding, and praziquantel. In the compounds (76)-(79), the artemisinin derivative was replaced by smaller groups containing endoperoxide: 1, 2, 4, 5-tetraoxane and 1, 2,4-trioxane.<sup>101</sup>

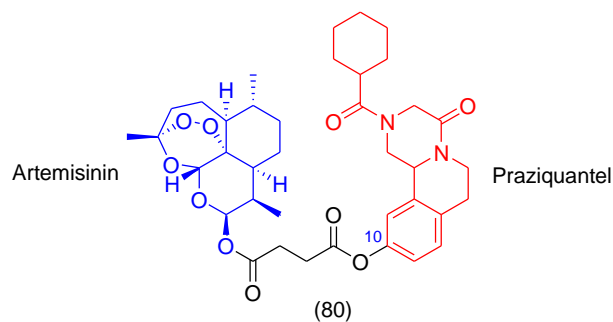


**Figure 23.** . Structure of the derivatives 1-9 synthesized and evaluated by Qiao group.

The compounds were synthesized and tested against *S. japonicum* in young and adult forms. Among these derivatives, (71)-(76) showed a higher mortality rate for the worms than PZQ, being the most active the analogs (71)-(73). In the concentrations of 15-25  $\mu\text{M}$ , these three compounds killed 100% of the worms in a 24-hour period. For comparison, the induced mortality by PZQ at 50  $\mu\text{M}$  is 63% in 72 hours. Among the analyzed compounds, the derivative (78) had the lowest activity, inducing 0% of mortality at concentrations up to 50  $\mu\text{M}$ . The activity of the compound (78) is slightly higher than those of compound (77); however, the mortality of the worms is only 60% at 100  $\mu\text{M}$ , much lower than PZQ at the same concentration. The compound (79) shows a similar effectiveness as PZQ.<sup>101</sup>

Based on the mortality of adult worms, the compounds that exhibited best activities at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  were evaluated for their ability of killing juvenile worms. The compounds (71)-(73) showed a high mortality rate, 100% at a concentration of 15  $\mu\text{M}$  in 72h. Compounds (75)-(77), although less potent than (71)-(73), also exhibited significant effect against juvenile worms. Among these, the compound (75) is slightly less effective compared to (71)-(73) derivatives, inducing 100% of death at concentration of 25  $\mu\text{M}$  in 72 hours. The compounds (76) and (77) showed modest activity against juvenile worms, reducing the motility to 100% and 14%, respectively, at 50  $\mu\text{M}$ .<sup>101</sup>

After the preliminary analysis, the derivative (73) (Fig. 24), also known as DW-3-15, was chosen as the most promising compound. This compound was prepared by binding the artesunate to PZQ by inserting a hydroxyl group at the position C<sub>10</sub> in PZQ. Its activity against the young worms is comparable to that of artesunate, but significantly higher than PZQ. More importantly, the derivative has the same effectiveness of PZQ against adult *S. japonicum*.<sup>128</sup>

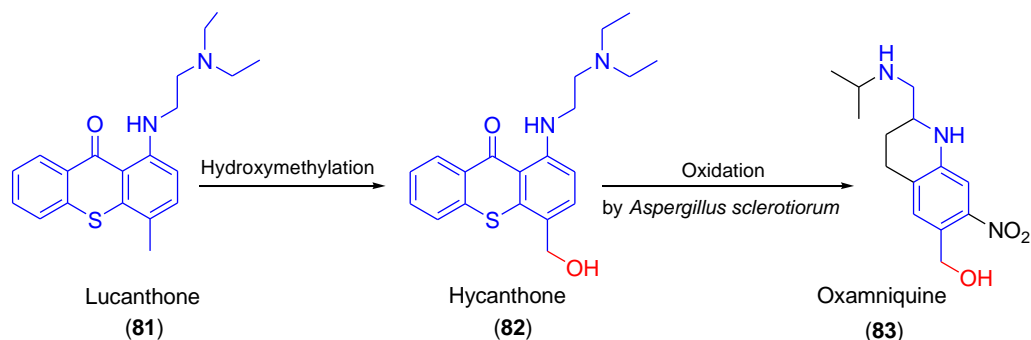


**Figure 24.** Structure of the Praziquantel/Artemisinin hybrid derivative **3**, DW-3-15, synthesized and evaluated by Duan *et al.* in 2012.

DW-3-15 was responsible for severe damage to the outer and inner wall of the worm integument, suggesting that the derivative possibly acts in a similar manner to PZQ. Therefore, the parasite is vulnerable to the host immune system due to the exposure of the surface antigens. The study further demonstrated that DW-3-15 exhibited superior worm reduction activity against *S. japonicum* at all developmental stage *in vivo*. Specifically, its activity against juvenile worm is comparable to that of artesunate but significantly improved compared to PZQ. More importantly, it retains the potency against the adult *S. japonicum* as PZQ with overall reduction rate being .60%, thus firmly support the design rationale. The results suggest that the DW-3-15 could serve as an important prototype for the development of a second generation of antischistosomal agents. This is especially important in areas where the chances of infection are high and where the retreatment with PZQ is required.<sup>128</sup>

#### 4. OXAMNIQUINE

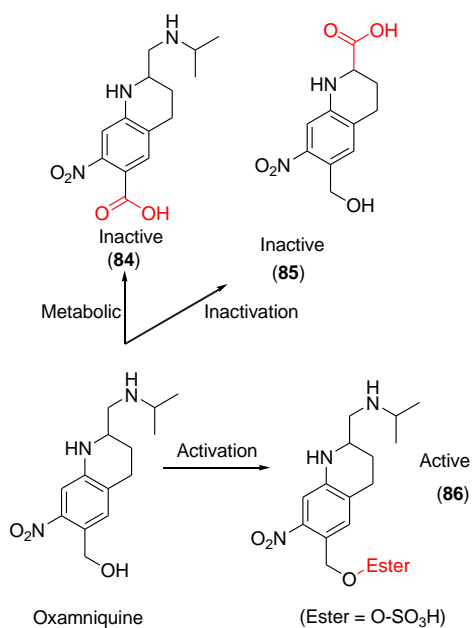
Oxamniquine (OXA, Fig. 25) is an antischistosomal agent widely used in Brazil due to its low cost and good efficacy. It operates mainly against the specie *Schistosoma mansoni* and the adult male worms are more vulnerable to the action of the drug than the female parasites.<sup>16</sup> Also known as  $(\pm)$ -(7-nitro-2-[(propan-2-yl)amino]methyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)methanol the OXA was originated from lucanthone, which after hydroxymethylation gave rise to hycanthon. Oxidation of hycanthon by the fungus *Aspergillus sclerotiorum*, developed by Pfizer in England, gave rise to OXA.<sup>129-131</sup>



**Figure 25.** Chemical structure of Oxamniquine

Oxamniquine has a lower cost when compared to PZQ,<sup>132</sup> being active in the intestinal and hepatoesplenic infections caused exclusively by *S. mansoni*, single species in Brazil.<sup>133</sup> It was launched in Brazil by Pfizer under the name of Mansil® for pharmaceutical capsules and suspension.<sup>132,134</sup>

It is easily absorbed orally and intramuscularly; however, its administration by the intramuscular route is not recommended due to intense and prolonged pain<sup>135</sup> After the administration in therapeutic doses, its half life is about 1.5 - 2 hours. The maximum plasma concentration (1 to 4 mg.L<sup>-1</sup>) is achieved from 1 to 4 hours using a therapeutic dose of about 15 mg/kg.<sup>136</sup> It is extensively metabolized by oxidative processes and the metabolites does not present negative effects. Most of the metabolites are excreted in the urine, with only 0.4 to 1.9% eliminated as the original compound.<sup>16</sup> Metabolic reactions are also produced by the resistant helminths that do not esterify the OXA as a mechanism of resistance.<sup>137</sup>



**Figure 26.** Metabolism of oxamniquine accounting for the mechanism of action and inactivation.<sup>137</sup>



The pharmacokinetic parameters of OXA are not influenced by the severity of the disease. According to a study performed by Daneshmend and Homeida (1987),<sup>138</sup> patients with advanced hepatosplenic had no significant differences between the half-life, the amount of drug in the systemic circulation and the time to achieve maximum plasma concentration compared to healthy subjects. However, variations in the pharmacokinetics of Sudanese and Brazilian patients were reported,<sup>135</sup> which are probably related to genetic differences of both populations.

The effectiveness of the drug therapy is closely associated to the geographical origin of the parasites, that differ in susceptibility to drug;<sup>139</sup> Thus, according to the World Health Organization (1990), a single OXA oral dose of 15 to 20 mg/kg is effective in the treatment of schistosomiasis in South America, Caribbean Islands and West Africa, while 30 mg/kg should be used in East Africa, Central Africa and Arabian Peninsula. Doses above 60 mg/kg may also be necessary in Egypt, South Africa and Zimbabwe in order to obtain the desired therapeutic efficacy.<sup>140</sup>

*S. mansoni* is highly susceptible to OXA and, although well tolerated by the body, the drug is considered a second choice due to its side effects on the central nervous system, including convulsions and hallucinations, being indicated only in cases of resistance/inefficiency of PZQ<sup>16,141,142</sup>

#### A. Mechanism of Action of Oxamniquine

Exploiting the *S. mansoni* genome sequence and genetic map the mechanism of action of OXA has recently been elucidated by Valentim *et al* in 2013.<sup>143</sup> As predicted by Pica-Mattoccia *et al* in 2006,<sup>144</sup> OXA is a prodrug that, after being absorbed by the parasite, is sulfonated by an endogenous sulfotransferase, present only in the parasite (SULT, GenBank AHB62207.1, UniProt V9PWX8) in the presence of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS; Fig. 27). The resulting OXA sulfate ester is unstable and spontaneously decomposes to form a reactive electrophilic product capable of alkylating the DNA, proteins and other nucleophilic macromolecules. The subsequent disruption of cellular metabolic functions possibly lead to death of the parasite.

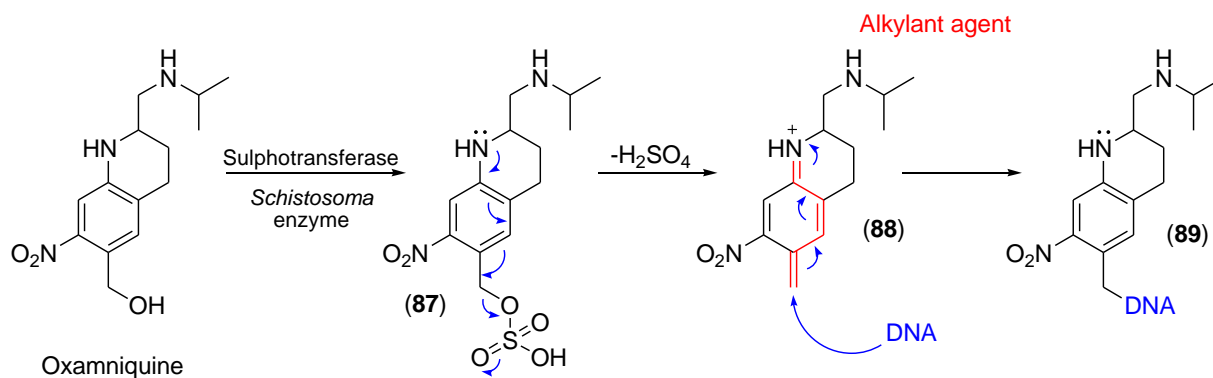


Figure 27. Mechanism of action of oxamniquine.<sup>145</sup>

The oxamniquine has an aliphatic amine function that is protonated at physiological pH, found in numerous DNA binding agents. This positive charge probably contributes to a strong interaction of the bioactive form of oxamniquine and DNA through an electrostatic bond with the negatively charged phosphodiester group.<sup>145</sup>

### ***B. Side effects of Oxamniquine***

In the clinic, the side effects most commonly reported by patients undergoing a treatment with oxamniquine were nausea, dizziness, drowsiness, headache and, less often, abdominal discomfort. Vomiting and diarrhea were mild and short-termed. Hallucinations or seizures were observed in 0.5% of treated patients. Laboratory tests showed elevated levels of serum transaminases, leukopenia, hematuria and/or proteinuria in some patients.<sup>146-149</sup> The drug may also cause fever and eosinophilia due to the destruction of the parasite.<sup>16</sup> To alleviate such manifestations, oxamniquine should be administered after meals (breakfast or dinner). Oxamniquine is well tolerated by patients and serious adverse reactions are sporadic. Nevertheless, some authors reported serious adverse effects on the central nervous system after the drug administration.<sup>148,150,151</sup> It is contraindicated for pregnant women, children under two years of age, patients with hepatic and cardiac decompensations, and in cases of hypertension. Furthermore, it should not be used in people with epilepsy.<sup>152</sup>

### ***C. Resistance oxamniquine***

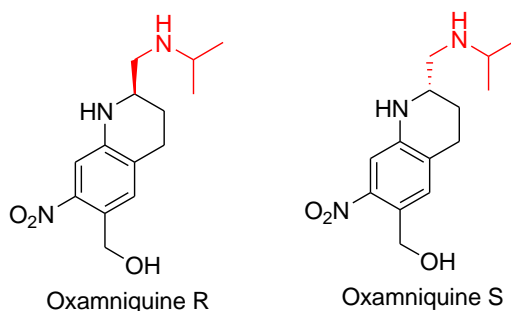
The resistance of some strains of *S. mansoni* to OXA has been demonstrated both in the laboratory and in the field.<sup>153-165</sup> According to Kinoti (1987),<sup>166</sup> *S. mansoni* has a great ability to develop resistance to therapeutic doses of OXA employed in the treatment of schistosomiasis.

The resistance to oxamniquine was evident when schistosomules were able to survive a dose 1000 times higher than the effective dose for susceptible parasites.<sup>167</sup> According to Cioli *et al.* (1992), the resistance to OXA is controlled by a single autosomal recessive gene. The absence of the drug activating enzyme (sulfotransferase) in resistant worms is responsible for the onset of resistance to oxamniquine. It is possible that the inhibition of RNA and DNA synthesis that occurs in susceptible parasites is irreversible in susceptible worms and reversible in the resistant ones.<sup>168</sup>

### ***D. Structure-Activity Relationships***

#### ***1. Stereochemistry of oxamniquine***

The oxamniquine has an asymmetric carbon and there are both enantiomers in the commercial form (Fig. 28). However, studies by Valentim *et al.* showed an affinity of crystallized forms of the enzyme SmSULT by the S-oxamniquine, but not by the R-oxamniquine. In order to identify the eutomer form of OXA, Taylor *et al.* <sup>169</sup> performed the isolation of the enantiomers R and S to determine through computational techniques, such as docking, which enantiomers have the conformation for a better interaction with sulfotransferase, the parasite SmSULT.



**Figure 28.** R and S enantiomers of oxamniquine.

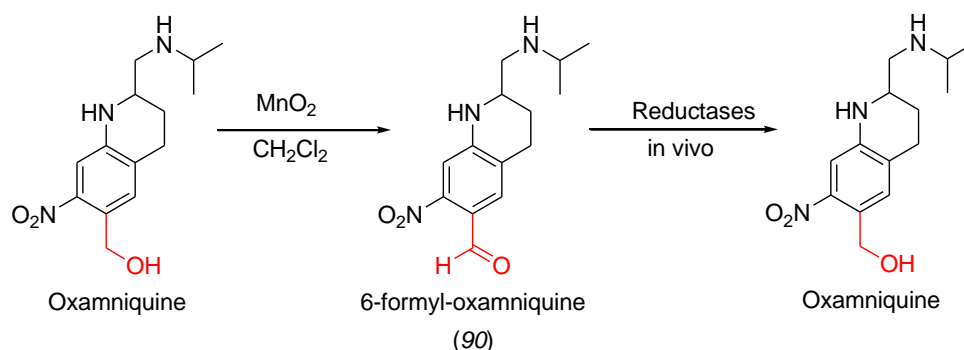
In 2015 Taylor *et al.* showed that in the crystallized structures of the enzyme both enantiomers bind similarly to the central cavity of SmSULT. Although R- and S-OXA occupy the same space inside the cavity, the positions of the piperidine moiety and its isopropylaminomethyl substituent show greater variation due to the influence of the chiral carbon, preserving the position of the methylhydroxy group, which is the target of sulfotransferase. The structures of both enantiomers complexes with SmSULT show that the amino acid residue positions that surround OXA in the central cavity do not vary significantly. Instead, it is the orientation and configuration of the OXA enantiomers that range in order to occupy the central cavity. The results suggest that the S (+) enantiomer is responsible for most of the antischistosomal activity, while the R (-) enantiomer has a moderate activity, more remarkable when isolated and in relatively high concentration. <sup>169</sup>

The combined results of these analyses suggest that, when exposed to a racemic mixture of OXA, the parasite's enzyme (SmSULT) preferentially binds to the S-enantiomer, which has a better steric conformation to the central cavity of the protein. Thus, the S-OXA enantiomer may out-compete R-OXA due to a more favorable energy of binding in the racemic mixture. <sup>169</sup>

## 2. Structural changes in oxamniquine, SAR

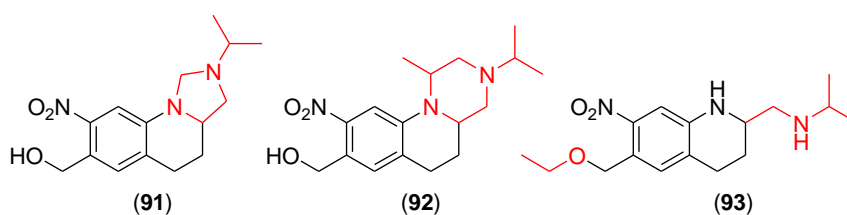
In 2008, Almeida *et al.* conducted an oxidation of hydroxymethyl in the position 6 of the molecule, which is the group involved in an important mechanism of action at the molecular level and, consequently, in the pharmacological activity (Fig. 29). After the biological analysis of the 6-formyl-oxamniquine derivative, the results showed that the substitution of the hydroxymethyl group by an

aldehyde did not alter the drug activity.<sup>170</sup> This result can be explained by the reduction of the aldehyde by the action of human or parasite reductases, creating the group hydroxymethyl, which has an important activity at the molecular level.



**Figure 29.** Synthesis and *in vivo* reduction of the 6-formyl-oxamniquine derivative

In 2002, Barberato Filho *et al.* synthesized 3 new oxamniquine derivatives in order to assess the effects caused by the changes in the heterocyclic ring and side chain (Fig. 30). Although all new derivatives show promising activity, all of them showed a higher toxicity when compared to OXA. The results indicate that the alkyl side chain may be modified without significant changes in the pharmacological activity, but such modifications are associated to an increased toxicity. The derivative (91) showed a LD<sub>50</sub> similar to OXA, while the derivatives (92) and (93) had a greater toxicity than oxamniquine. They showed high insolubility as oxamniquine.<sup>142</sup>

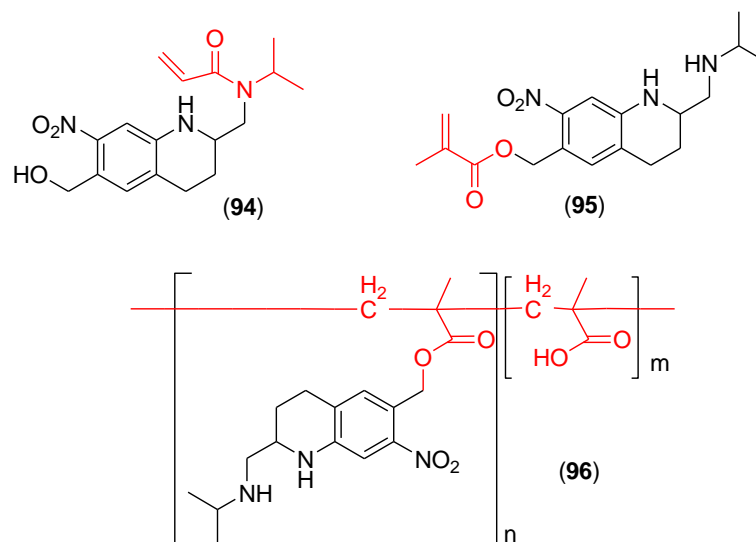


**Figure 30.** Structure of the new oxamniquine derivatives proposed by Barberato Filho *et al.* in 2002.

As an attempt of reducing the side effects of OXA in 2007, Parise Filho *et al.* used the classic approach of promoting one or more chemical bonds with synthetic or natural macromolecules to increase the effectiveness of bioactive compounds and decrease their toxicity.<sup>171,172</sup> Three new biopolymers derived from oxamniquine were synthesized to act as prodrugs.

Methacrylate and acrylic monomers were selected as drug carriers (Fig; 31). Polymethacrylic and polyacrylic are known for being good drug carriers<sup>173,174</sup> that assist in increasing bioavailability, prolonging the action and reducing the side effects.<sup>175,176</sup>

The first test performed *in vivo* and confirmed by statistical analysis showed that compounds (94) and (95) have prolonged profile of action and reduced parasitic load. Concerning the parasitic load, all profiles observed were similar to oxamniquine. Additional bioassays, such as toxicological tests, were not performed. However, it was observed a significant increase in the number of worms for compound (96), suggesting that the methacrylate copolymer do not exhibit antiparasitic activity. This behavior can be related to several factors such as: (1) the polymer is a sustained release formulation, so the compound may not have reached the effective dose during the study period. A longer test would be necessary to evaluate this hypothesis; (2) The issues concerning the drug release from the polymer matrix; for example, difficulties in the hydrolysis. Possibly, the introduction of a spacer between the drug and the polymer could solve this problem. (3) The high molecular weight of the compound.<sup>177</sup>



**Figure 31.** Chemical structure of the oxamniquine prodrugs synthesized in 2002 by Parise Filho *et al.*

## 5. PRAZIQUANTEL vs OXAMNIQUINE

PZQ and OXA are both used as drugs in the schistosomiasis treatment. PZQ is effective against all the parasite forms, however OXA is effective only against the *S. mansoni* infection. In order to evaluate the therapeutic efficacy of oxamniquine and praziquantel against *Schistosoma mansoni* infection in 2003 Ferrari *et al.*<sup>178</sup> compared the accuracy using a triple-masked and randomized controlled trial with 106 patients infected with *S. mansoni*. To the first group was given 60 mg/kg PZQ per day for three consecutive days, the second was given two daily doses of 10 mg/kg oxamniquine, and the placebo group received starch. Fecal examinations (days 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 after treatment) and biopsy of rectal mucosa by quantitative oogram (days 30, 60, 120, and 180) were used

for the initial diagnosis and for evaluating the degree of cure. When cure was evaluated by stool examination, oxamniquine and praziquantel had cure rates of 90.3% and 100%, respectively. However, when the oogram was used as an indicator of sensitivity, the oxamniquine cure rate dropped dramatically (to 42.4%), whereas the rate for praziquantel remained high, at 96.1%.

However OXA still being a valid alternative drug for the treatment of *S. mansoni*; especially in *S. mansoni* PZQ's resistant that still responding to this drug.<sup>162,168</sup> However, OXA has more side-effects and is more expensive than PZQ, at least in Africa and in Latin. These results show that PZQ is significantly more effective than OXA in treating *S. mansoni* infection.

## 6. CONCLUSIONS

The high incidence of schistosomiasis demonstrate that the epidemiologic measures taken for the eradication of the schistosomose so far, in Brazil and in the world, are not completely effective. These treatments are obsolete and the therapeutic compliance is difficult. PZQ, the most effective drug against the parasite still having some basic problems as low solubility, side effects, risk of resistance, low efficacy against juvenile forms of the parasite and its biological target still unknown. Considering this situation it is strictly necessary to develop measures for the vector control, education of the population and professional training for direct combat of the worms in addition to the urgency of developing new drugs.

Since the PZQ discovery in 1977 almost 40 years have passed and, at least, 200 new PZQ derivatives are synthesized. The most part of these derivatives are less active than it and the risk of resistance still the same. It is required a deep research concerning the improvement of the pharmaceutical characteristics of the available drugs. About the OXA, the mechanism of action was elucidated and some new derivatives were synthesized but the OXA still being the best compound. Even OXA having a lower cost when compared to PZQ it shows activity only against the *S. mansoni* and the adult male worms are more vulnerable to the action of the drug than the female parasites.

The best result from the synthesis of new derivatives are obtained through the molecular hybridization between PZQ and Artemisinin. The results suggest that this compound could serve as an important prototype for the development of a second generation of antischistosomal and antimalarial agents. This is especially important in areas where the chances of infection are high and where the retreatment with PZQ and artemisin is required. New derivatives synthesis of new hybrid compounds linking the PZQ and other antischistosomal drugs could be an interesting method to the development of a second generation of antischistosomal drugs with effect against young and resistant worms.

**TRABALHOS PESSOAIS**  
**PARTE I**

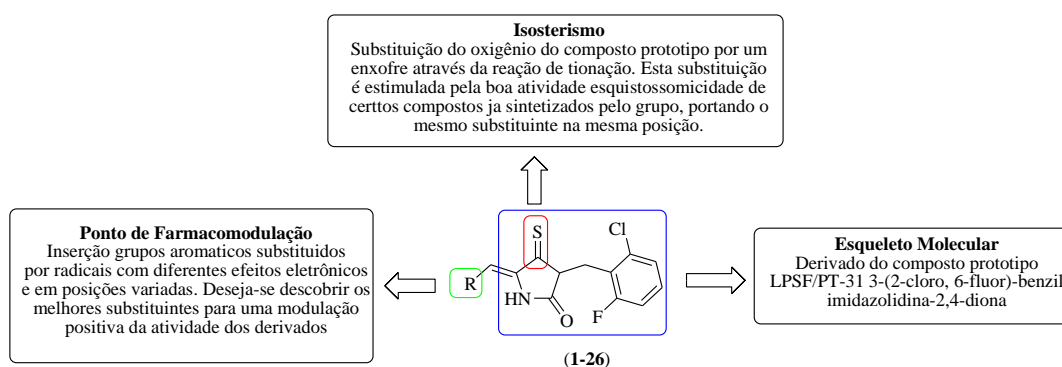
## 1. OBJETIVOS

Tendo em vista os projetos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (Gpit) com imidazolidinas e tiazolidinas 3,5-dissubstituídas como agentes esquistossomicidas o presente trabalho questiona a utilização de novos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos tionados na posição 4 na terapêutica da esquistossomose, assim como a tentativa de elucidação de um possível modelo de farmacóforo, e utilização de modelos quimiométricos para previsão da atividade.

Primeiramente, a escolha das imidazolidinas em relação as tiazolidinas é decorrente da observação que, dentre os compostos na literatura, apenas os portando o anel imidazolidínico apresentaram atividade esquistossomicida importante.

A estrutura do derivado foi planejada a partir do esqueleto do LPSF/PT-31, comprovado agonista dos receptores  $\alpha_{2A}$  adrenérgicos. A escolha desta estrutura deve-se a proposição que os derivados imidazolidínicos possuem como alvo um receptor de acetilcolina. Tal proposição foi levantada em um recente trabalho publicado em nosso grupo por Oliveira e colaboradores em 2015.

A tionila em posição C-4 do anel imidazolidínico foi escolhida devido à identificação da mesma em diversos compostos com comprovada ação esquistossomicida já publicados pelo grupo. Finalmente, as modificações realizadas no grupo metilênico são relacionadas a uma tentativa de farmacomodulação destes derivados. Espera-se através delas evidenciar uma modificação em propriedades de interesse diversos, como a solubilidade, citotoxicidade e atividade esquistossomicida, entre outros.

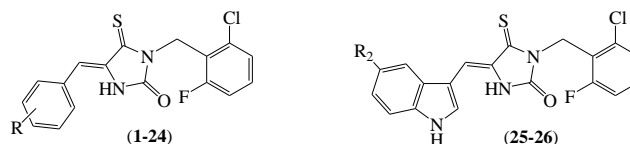


**Fig. (22)** Modificações estruturais realizadas para obtenção dos derivados LPSF/PTS

### 1.1. Objetivos Gerais

Síntese e caracterização estrutural de novas moléculas imidazolidínicas e indolicas- imidazolidínicas, com diferentes substituintes aromaticos na posição C-5 dos anéis imidazolidínicos bem como a avaliação esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* dos derivados.





**Fig. (23):** Estrutura Geral dos derivados benzilidênicos-imidazolidínicos (A) e indólicos-imidazolidínicos (B)

## 1.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar uma série de derivados 5-arylídeno-3-(2-cloro, 6-flúor)-benzil-imidazolidin-2-tioxo-4-ona a partir de reações de adição do tipo *N*-alquilação, Tionação e Adição de Michael entre os anéis pentagonais e benzaldeídos substituídos;
- Determinação das propriedades físico-químicas e caracterização estrutural dos compostos sintetizados utilizando métodos espectroscópicos convencionais (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C), espectrometria de massas e análise elementar;
- Análisar a (dis)similaridade de derivados da série 5-arylídeno-3-(2-cloro, 6-flúor)-benzil-imidazolidin-2-tioxo-4-ona (PT) através da análise multivariada de dados (PCA).
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* (CEPA LE) frente aos derivados imidazolidínicos da série PTS selecionados;
- Verificar a suscetibilidade *in vivo* de vermes adultos de *S. mansoni* (CEPA LE) frente ao derivado imidazolidínico da série PTS;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos imizadolidínicos da série PTS;
- Realizar análises ultraestruturais do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o derivado imidazolidínico PTS;
- Validação da análise preditiva do modelo quimiométrico em novos derivados 4-tioxo-imidazolidin-2-ona 3,5-dissubstituídos;
- Realização de modificações estruturais no melhor derivado encontrado no estudo para um melhor entendimento da relação estrutura química e atividade biológica;
- Determinação de modelos de farmacóforo através do programa FLAP do composto mais ativo encontrado no estudo;
- Avaliação da reatividade dos derivados através da reação de Adição de Michael;
- Proposição de um alvo biológico para os compostos sintetizados

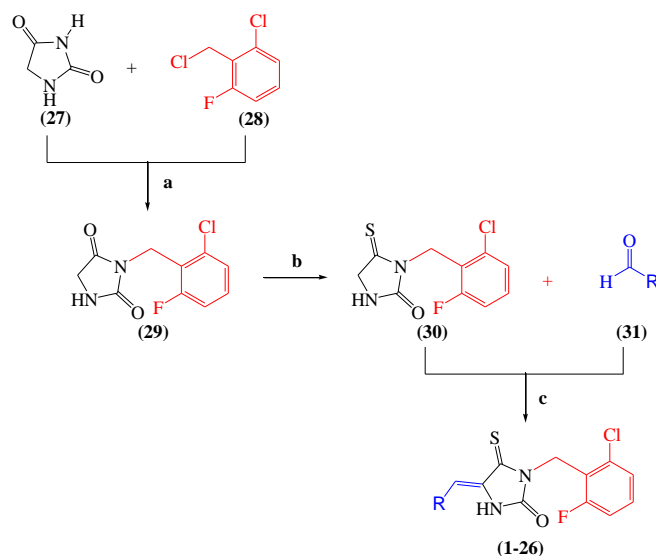
## CAPITULO II

## Síntese, Caracterização Estrutural, Análise BioQuiométrica, Avaliação Biológica e *Hit to Lead* de Novos Derivados 4-tioxo-imidazolidin-4-ona-3,5-dissubstituídos

*Ce chapitre présente les travaux personnels réalisés à l'Université Fédérale de Pernambuco pour l'identification des nouveaux agents schistosomicides. Le travail a été réalisé entre les années 2013-2016, en collaboration avec le Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), le Laboratório Ageu Magalhães et de Departamento de Química Fundamental (DQF) de l'Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brésil, et avec le Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes (DPM-UGA) en Grenoble, France.*

### 1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS

Os derivados imidazolidínicos e tiazolidínicos foram obtidos a partir de uma via plena convergente já consolidada no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos utilizando reações de *N*-alquilação, e adição de Michael (Esquema 4). Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos ou para suas análises pertencem às marcas Sigma-Aldrich, Acros, Alfa Aesor ou TCI e foram utilizados por vezes purificação após realizada destilação prévia. Para a purificação dos produtos de síntese obtidos, quando necessário, foi realizada a cromatografia em coluna sob pressão, utilizando sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh) como adsorvente.

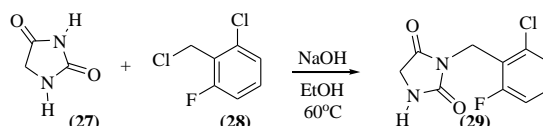


**Esq. (4)** Diagrama de síntese dos derivados imidazolidínicos 3,5-disubstituídos (27) imidazolidina-2,4-diona; (28) haleto de benzila; (31) carboxaldeído.

## 1.1. Síntese

### 1.1.1. Síntese do derivado 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT-31)

A rota sintética inicia-se com o derivado 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona. O produto foi preparado a partir de quantidades equimolares de imidazolidina-2,4-diona (27), cloreto de 2-cloro-6-flúor-benzil (28) e o hidróxido de sódio, em presença de etanol. A mistura reacional foi aquecida a 60°C e deixada sob refluxo por 15h, levando a formação da 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31) (29) (Esquema 5).

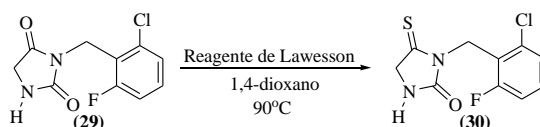


Esq. (5) *N*-alquilação da imidazolidina-2,4-diona.

A reação de *N*-alquilação ocorre através de uma substituição nucleofílica de segunda ordem (S<sub>N</sub>2), onde ocorre a retirada do átomo de hidrogênio em posição 3 do heterociclo, que se apresenta suficientemente ácido para ser suprimido por ação do hidróxido de sódio, e conduz a formação de um sal que é em seguida tratado com o cloreto de benzila substituído.

### 1.1.2. Síntese do derivado 4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PTS-31)

Uma vez obtida a 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31) (29) esta foi convertida a 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-imidazolidin-4-tioxo-2-ona numa reação de tionação onde em um foram adicionados quantidades equimolares de PT-31 e o reagente de Lawesson, em um balão volumétrico, utilizando-se 1,4-dioxano anidro como solvente. A mistura reacional foi aquecida a uma temperatura de 60° C durante 18h. A solução foi levada ao rotaevaporador para diminuir a quantidade de solvente, sendo deixada 24h na geladeira. Ao retirar da geladeira, o produto solido foi lavado em *n*-hexano e filtrado. O filtrado foi recristalizado em etanol e deixado precipitar. O precipitado foi filtrado, obtendo-se assim o intermediário PTS-31 (30) (Esquema 6).

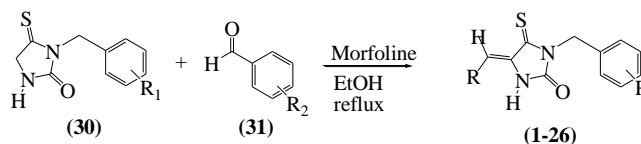


Esq. (6) Reação de tionação.

A reação de tionação, ocorre devido ao ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila da posição quatro da imizadolidina-2,4-diona ao fósforo parcialmente positivo do reagente de Lawesson que, após uma reação concertada, ocorre a entrada de um átomo de enxofre na posição 4 do anel e saída do oxigênio .

### 1.1.3. Síntese do derivado 5-benzilideno-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PTS)

Por fim, para a síntese dos produtos finais é realizada a reação de condensação de Knoevenagel onde quantidades equimolares da 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (PTS-31) (30) e de aldeídos substituídos dissolvidos em etanol, na presença de 350  $\mu$ L morfolina como catalisador, foram aquecidas sob refluxo durante 4 horas. Após resfriamento, ocorre a cristalização dos derivados 5- arilideno-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (1-26), que foram purificados através de lavagens sucessivas com álcool etílico absoluto (Esquema 7).



Esq. (7) Adição de Michael.

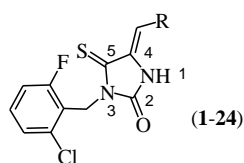
O mecanismo reacional para a obtenção dos compostos finais inicia-se com a captura do próton ácido do carbono  $\alpha$  do composto 3-(2-cloro-6-flúor)-benzil-imidazolidin-4-tioxi-2-ona pela morfolina, formando um carbânion. A seguir, o carbânion estabilizado por ressonância ataca o carbono parcialmente positivo da carbonila, deslocando os elétrons  $\pi$  no sentido do oxigênio, concentrando no átomo a carga negativa. Em seguida, após a captura de um próton pelo oxigênio, ocorre a saída de uma molécula de água, conduzindo a formação dos derivados finais. A reação é caracterizada como uma Adição de Michael. Após a reação, são obtidos 24 novos derivados 5-benzilideno-3-(2-cloro, 6-flúor)-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PTS), apresentados na tabela 2.

## 1.2. Análises

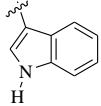
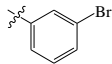
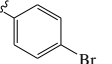
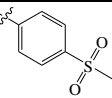
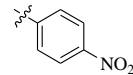

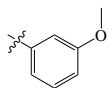
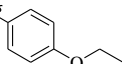
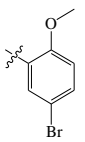
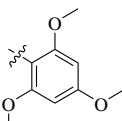
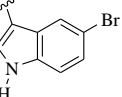
### 1.2.1. Análises Físico-Químicas

Na tabela abaixo encontram-se os dados físico-químicos dos derivados imidazolidínicos obtidos. As faixas de fusão (FF) foram determinadas em aparelho Quimis, modelo Q.340D. A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo.

Tab (2) Dados físico-químicos dos derivados imidazolidínicos obtidos



Derivados	R	Rendimento	Rf	Faixa de Fusão	Massa Molar
PTS-1		36%	0,42 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	268°C	415.92
PTS-2		20,5%	0,56 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	260°C	429.94
PTS-3		49%	0,48 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	232°C	431.92
PTS-4		33%	0,6 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	264°C	452.93
PTS-40		76%	0,59 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	197°C	350.77
PTS-6		59%	0,57 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7,5:0,5)	224°C	423.90
PTS-7		48%	0,4% ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	216°C	376.84
PTS-8		70,5%	0,57 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	230°C	360.84
PTS-9		26%	0,48 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	215°C	346.81
PTS-10		27%	0,55 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	269°C	389.88
PTS-11		66%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	210°C	406.86
PTS-12		69%	0,44 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	236°C	436.89
PTS-13		76%	0,52 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	197°C	374.86

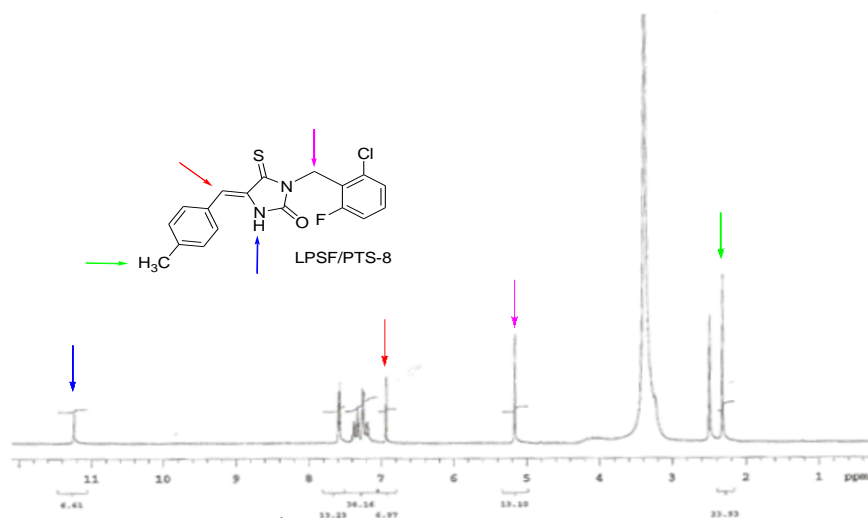
PTS-14		26%	0.52 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	269°C	385.85
PTS-15		46%	0,47 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7,5:2,5)	158°C	425.70
PTS-16		40,5%	0.43 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	210°C	425.70
PTS-17		33%	0,56 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	212°C	424.89
PTS-18		55%	0.4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 8:2)	211°C	392.81
PTS-19		65%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7,5:2,5)	200°C	392.81
PTS-20		31%	0,56 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	161°C	376.84
PTS-21		72%	0,53 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	217°C	390.86
PTS-22		56.5%	0.43 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	184 °C	455.73
PTS-23		46%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	152°C	436.89
PTS-25		43%	0.6 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	207°C	464.73

### 1.2.2. Análises Espectrométricas

Para a elucidação estrutural dos compostos sintetizados utilizamos, na espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo IFS66, em pastilhas de KBr de 1 % e 2 %, com bandas de absorção expressas em  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $\text{RMN}^1\text{H}$ ) foram realizados em espectrofotômetro Varian, modelo Unity plus-300 e Varian. A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo.

Para a caracterização das moléculas foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  além de Infravermelho (IV). No  $\text{RMN}^1\text{H}$  foram observados sinais característicos

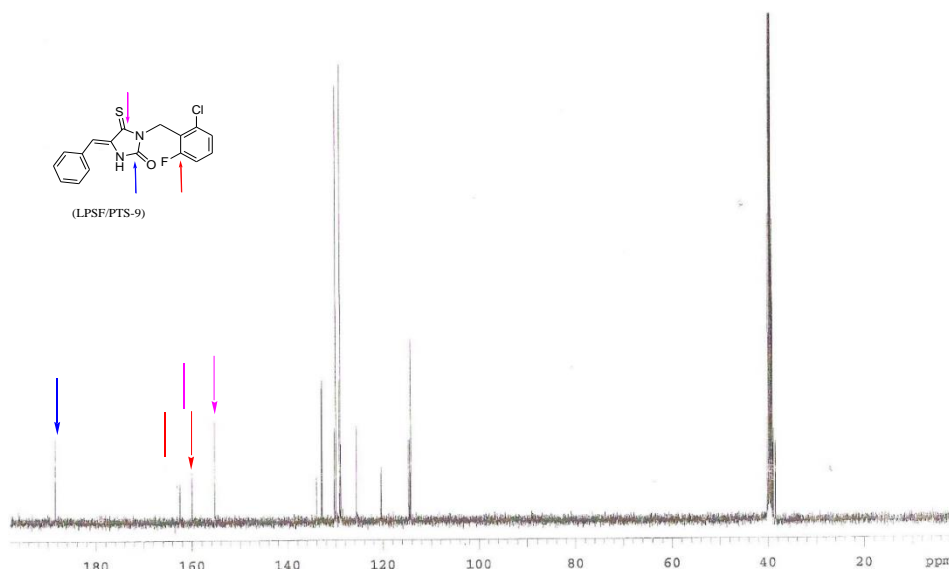
do próton presente no núcleo imidazolidínico (NH), evidenciado como um singlete na região de 10 a 11. Os singletos encontrados nas faixas de deslocamento entre 6.16 - 6.93 e 4.71 - 4.75 , são característicos do =CH e CH<sub>2</sub>, respectivamente. Em todos os espectros analisados observaram-se sinais de singlete (s), duplete (d), tripleto (t), duplo duplete (dd), quarteto (q) e multiplete (m) na região característica de grupos aromáticos (7,1 - 7,7). Na figura 24 está evidenciado o espectro de RMN <sup>1</sup>H do derivado PTS-8.



**Fig. (24)** Espectro RMN <sup>1</sup>H do derivado PTS-8

Os sinais que sofrem maior variação devido aos diferentes efeitos eletrônicos dos substituintes do anel benzilidênico são os referentes aos hidrogênios do carbono metilênico, e o do nitrogênio da posição 1. Tais variações são justificadas pelo efeito de blindagem e desblindagem que o substituinte causa em tais hidrogênios. Substituintes com efeito retirador de elétrons tendem a diminuir a nuvem eletrônica ao redor de tais hidrogênios, favorecendo que estes absorvam mais radiação magnética e aparecem em picos mais elevados, caracterizando o efeito de desblindagem. Já substituintes com efeitos doadores de elétrons, aumentam a nuvem eletrônica ao redor destes hidrogênios, que acaba por diminuir a absorção da radiação magnética e os sinais referentes a estes hidrogênios apareçam em valores inferiores, caracterizando o efeito de blindagem.

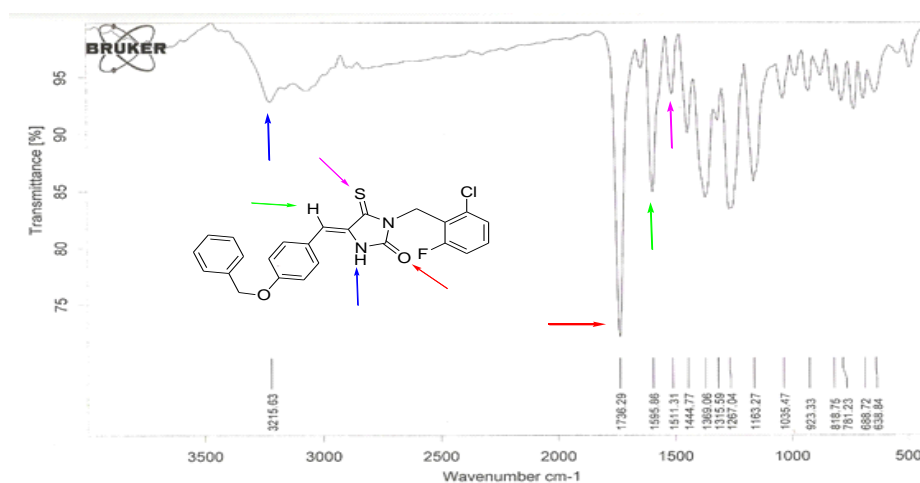
O espectro de RMN <sup>13</sup>C evidencia as absorções dos átomos de carbono característicos dos derivados imidazolidínicos. Os deslocamentos dos carbonos parcialmente positivos das carbonilas do anel imidazolidínico são evidenciados nos sinais entre 155 e 160 ppm e as tionilas em torno de 188 ppm. Na figura 25 é evidenciado o espectro de RMN <sup>13</sup>C do derivado PTS-9.



**Fig. (25)** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado PTS-9

Outro ponto de interesse nas análises é observado devido à absorção do carbono benzílico ligado ao flúor, que encontra-se bastante desblindado, e por vezes aparece como sinais de altos valores, como no caso do derivado PTS-1, que o referente a este carbono apresenta valor de 160 ppm.

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada como ferramenta adjunta na caracterização dos compostos sintetizados, por meio de grupos funcionais. Esses grupos originam bandas que ocorrem sempre na mesma região do espectro, independente da molécula em questão.<sup>130</sup> Os derivados imidazolidínicos apresentam bandas vibracionais características dos grupos funcionais N-H e C=O além do sinal característico a funcionalidade C=C. A figura 26 evidencia o espectro de IV do derivado PTS-4.



**Fig. (26)** Espectro de infra-vermelho do derivado PTS-4



## 2. ESTUDO QUIMIOMÉTRICO

A análise de dados multivariados tem se tornado, de modo crescente, uma importante área da química e de outras ciências. Isto sugere que a tendência atual do pensamento científico envolve um raciocínio multivariado, principalmente devido ao desenvolvimento tecnológico atingido neste último século. Historicamente, a análise de dados multivariados em química tem utilizado ferramentas desenvolvidas na área de ciências sociais como economia (econometria) e psicologia (psicometria). Apesar de serem interpretadas para objetivos específicos em cada área, a maioria destas ferramentas se baseia em sofisticados métodos matemáticos, estatísticos, computacionais e de lógica formal. Em química, as análises multivariadas são úteis para (1) planejar ou selecionar procedimentos experimentais ótimos; (2) extrair o máximo da informação química relevante pela análise dos dados; e (3) obter conhecimentos sobre os sistemas químicos estudados.<sup>131-133</sup>

### 2.1. Análise de Componentes Principais

Uma das técnicas quimiométricas mais empregadas para analisar conjuntos de dados contendo muitas variáveis é a análise de componentes principais (PCA). Uma das principais razões para o sucesso da PCA é o fato que ela oferece, em geral, representações gráficas de baixa dimensão, com razoável precisão, para problemas multivariados.<sup>131</sup>

A PCA é provavelmente o método quimiométrico mais amplamente difundido, e devido à importância das medidas multivariadas em química, ela é considerada por muitos como o método que mais significativamente muda o ponto de vista dos químicos para a análise multivariada dos dados.<sup>134</sup>

A aplicação mais frequente do método PCA ocorre nos casos em que as colunas em  $X$  são altamente colineares, i.e., as variáveis são correlacionadas e apresentam redundâncias. Tais colinearidades indicam que a matriz  $X$  apresenta algum tipo de variabilidade dominante que carrega a maioria da informação disponível. Estas redundâncias e pequenas variabilidades devem então ser removidas. A proposta da PCA é expressar as informações mais significativas contidas nas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis, as então chamadas componentes principais de  $X$ . Naturalmente, pode-se estender esta descrição para outros métodos multivariados, pois muitos diferem apenas no critério utilizado para determinar como as componentes são construídas. Assim, a PCA constitui, em muitas maneiras, a base para a análise multivariada dos dados.<sup>132</sup>

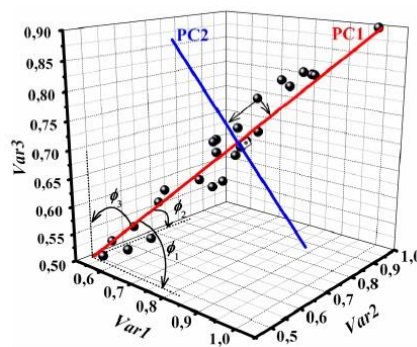
PCA é simplesmente uma rotação do sistema de eixos originais que tenta simultaneamente: i) encontrar no espaço de dimensão  $x$  uma direção ao longo da qual os pontos se encontrem espalhados de forma máxima e no qual espera-se encontrar algum tipo de padrão e ii) resguardar ao máximo a informação de partida. De um ponto de vista prático, isto é feito através da diagonalização da matriz

de covariância  $X'X$  (que é uma forma alternativa de encarar a informação), onde  $X'$  é a transposta da matriz de dados originais  $X$ .<sup>131</sup>

Os elementos dos autovetores, chamados de “loadings” (pesos) na terminologia PCA, representam os cosenos diretores, ou seja, a contribuição com que cada um dos eixos originais entra na composição dos novos eixos, chamados de componentes principais. Os autovalores, por sua vez, representam a quantidade de variância original descrita pelos respectivos autovetores. Assim, o primeiro autovetor (a primeira componente principal – PC1) representa um eixo no qual os pontos (ou objetos, na terminologia PCA) possuem máxima variância, i.e., um eixo ao longo do qual os pontos se encontram espalhados de forma máxima. A segunda componente principal (PC2), ortogonal a PC1, representa o segundo eixo de maior variância, isto é, o eixo com máxima quantidade de variância não explicada pelo primeiro autovetor.<sup>131–133</sup>

Como as PC's podem ser encaradas como eixos de máxima distribuição dos objetos, é interessante visualizar a disposição dos objetos nestes novos conjuntos de eixos. Esta figura, formada pela projeção dos objetos nas componentes principais, é denominada de gráfico dos escores. Suas coordenadas são obtidas a partir do produto da matriz de dados pela matriz de autovetores. Se os dois ou os três primeiros autovetores explicarem uma quantidade significativa da variância total, um gráfico de escores em que eles são as coordenadas pode providenciar projeções acuradas em poucas dimensões, do espaço original de maior dimensão.<sup>131–133</sup>

Cada componente principal é construído a partir da combinação das variáveis originais. Em termos matemáticos, a contribuição de cada eixo original para uma componente principal é o co-seno do ângulo entre o eixo da variável com o eixo da componente (ângulos na Figura 27). Se uma componente principal aponta exatamente na mesma direção de uma variável individual, o ângulo entre elas é zero e o co-seno é 1. Isto indica que a componente descreve toda a variação no eixo daquela variável. Similarmente, se uma componente é perpendicular ( $90^\circ$ ) ao eixo de uma determinada variável, o co-seno é 0 indicando que esta variável não fornece nenhuma contribuição à componente em questão. Os valores destes co-senos são os *loadings* e variam na faixa de -1 a 1.<sup>131–133</sup>



**Fig. (27)** Representação geométrica de duas componentes principais em um espaço com três variáveis (3D)

A direção da primeira componente principal descreve o espalhamento máximo das amostras (linhas) *i.e.*, a quantidade máxima de variação possível dos dados e pode ser definida como o melhor ajuste da reta no espaço multidimensional. A próxima componente, perpendicular à primeira (Figura 27), captura a variância comum em sua direção e em menor quantidade que a primeira e assim sucessivamente. As componentes principais são, portanto, calculadas em ordem decrescente de significância e a percentagem da variação total nos dados descrita por qualquer componente pode ser calculada com precisão usando, por exemplo, informações da diagonal da matriz D. Porém, como as componentes são perpendiculares entre si, elas contêm informações diferentes e complementares em ordem decrescente de quantidade de variância.<sup>131-133</sup>

Devido à reorientação das coordenadas do sistema de maneira a obter a máxima variância comum, a maioria da informação dos dados pode ser capturada por um pequeno número de componentes, que compacta as informações, eliminando as redundâncias e correlações nos dados originais.<sup>131-133</sup>

## 2.2. PCA dos Derivados Tioxo-Imidazolidínicos

A primeira etapa nos estudos de correlação envolve a seleção de um conjunto relevante de parâmetros ou propriedades moleculares para obter-se a melhor correlação possível. As variáveis escolhidas para um estudo preliminar de PCA devem abranger, principalmente, dados eletrônicos, de lipofilia e volume, além de serem facilmente mensurados. Os parâmetros escolhidos para a avaliação na PCA no presente trabalho foram: (1) Deslocamento do próton imidazolidínico no espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{N-H}}$ ; (2) Deslocamento do próton do carbono metilênico no espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{=CH}}$ ; (3) Deslocamento do carbono carbonílico no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta_{\text{C=O}}$ ; (4) Deslocamento do carbono tionílico no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta_{\text{C=S}}$ ; (5) Log P teórico dos 24 derivados calculado através da plataforma EPA, *Environmental Protection Agency*, através do site (<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/index.htm>); (6) Volume molecular calculado através da programa MarvinSketch; (7) Área de Superfície Polar calculado através da programa MarvinSketch.

Para PCA os dados da tabela 3 podem ser representados por uma matriz X composta de  $p = 7$  variáveis (deslocamentos químicos, volume molecular, área de superfície polar e LogP) e  $n = 24$  objetos (os compostos sintetizados). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote FactoMineR, dedicado às análises multivariadas, disponível no software R.<sup>135</sup>

Observe que neste trabalho os valores de deslocamentos químicos podem ser visualizados como as coordenadas de pontos num espaço de dimensão-4, onde cada eixo estaria associado a um deslocamento químico. A PCA foi realizada usando dados centrados na média, *i.e.*, o valor do deslocamento químico dos hidrogênios foi subtraído pela média dos demais valores na mesma coluna.

Tab

(3)

COMP.	$\delta_{\text{N-H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{=CH}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C=S}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C=O}}$ (ppm)	Vol. mol.	A. super.	Log P
PTS-1	10.991	6.961	155.141	186.484	348.477	521.51	5.4344
PTS-2	11.044	6.927	155.275	187.077	365.278	549.67	5.9255
PTS-3	10.268	6.930	160.551	188.032	357.461	535.45	4.1778
PTS-4	11.205	6.950	155.294	188.001	376.522	555.71	6.1757
PTS-6	11.341	7.013	148.857	188.300	346.580	500.79	4.9625
PTS-7	11.196	6.949	155.391	188.068	304.873	449.53	4.4679
PTS-8	11.238	6.935	155.376	188.324	295.888	433.12	4.9343
PTS-9	11.286	6.959	155.298	188.378	279.327	401.38	4.3870
PTS-10	11.008	6.954	155.643	187.181	325.233	488.25	4.5646
PTS-11	11.042	6.624	155.112	187.766	330.419	497.83	4.5488
PTS-12	11.348	6.910	155.386	188.170	355.964	544.66	3.8980
PTS-13	11.170	6.956	155.187	188.247	312.690	463.59	5.4254
PTS-14	10.810	7.402	154.795	186.093	308.305	440.18	4.4488
PTS-15	11.461	6.888	155.383	188.347	297.213	421.26	5.2770
PTS-16	11.337	6.900	155.306	188.300	297.213	422.06	5.2770
PTS-17	11.512	6.953	155.417	188.400	327.320	495.47	2.9568
PTS-18	11.603	6.980	155.463	188.369	302.661	439.40	2.0043
PTS-19	11.578	7.015	156.046	188.839	302.661	439.13	2.0043
PTS-20	11.342	6.930	155.420	188.415	304.873	449.65	4.4679
PTS-21	11.202	6.949	155.279	187.971	321.675	480.63	4.9590
PTS-22	11.245	6.943	155.263	188.185	322.758	469.69	5.3579
PTS-23	10.115	6.984	153.669	187.434	355.964	545.49	4.6297
PTS-25	10.905	7.428	155.413	186.771	326.19	460.87	5.3388
PTS-40	11.035	6.938	155.532	188.453	284.259	408.30	4.5874

Seleção de variáveis para estudo de dissimilaridade química

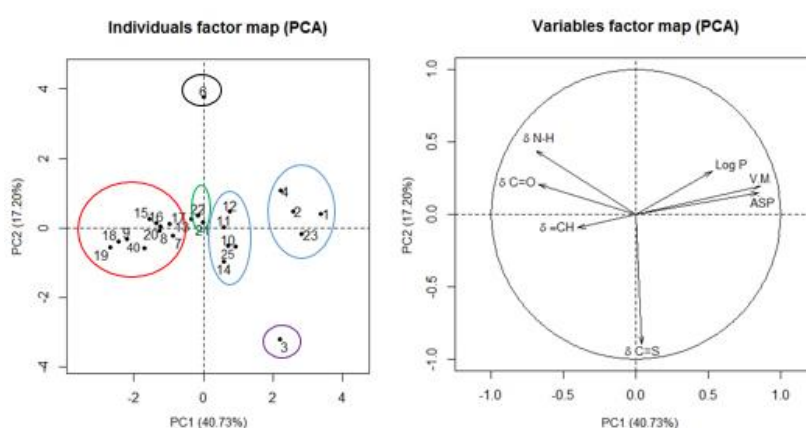
A PCA mostra que 64.7% da informação contida na Tabela 3 pode ser representada em duas componentes principais. Na Figura 28, é apresentado o gráfico dos escores de PC1 (com 40.73% da variância) *versus* PC2 (com 17.2% da variância). PC1 é definida principalmente pelo deslocamento  $\delta_{\text{NH}}$ , Volume molecular e área da superfície polar, para valores positivos, e  $\delta_{\text{N-H}}$  para valores negativos. Já PC2, é principalmente definida pelos deslocamentos  $\delta_{\text{C=O}}$  e  $\delta_{\text{N-H}}$ , para valores positivos e o deslocamento  $\delta_{\text{C=S}}$  para valores negativos (informações obtidas através dos “loadings”, i.e., os coeficientes nas equações que definem as PC's, representados na Figura 28).

Após a análise do gráfico, pode-se observar que apesar dos compostos estarem dispersos ao longo de toda PC1, PC2 aparenta dividir os derivados em 3 quadrantes principalmente. O LPSF/PTS-6, que encontra-se localizado no escore de 4, apresenta um alto valor de  $\delta_{\text{C=O}}$  e  $\delta_{\text{N-H}}$ . O LPSF/PTS-19 apresenta valores similares, porém, ao contrário do LPSF/PTS-6, este possui um alto valor de  $\delta_{\text{C=S}}$ . O LPSF/PTS-6 possui o menor valor de  $\delta_{\text{C=S}}$  dos derivados. No extremo oposto do LPSF/PTS-6 temos o derivado LPSF/PTS-3, que possui o menor escore em PC2. Tal evento se deve ao fato dos baixos valores de  $\delta_{\text{C=O}}$  e  $\delta_{\text{N-H}}$ , e o alto valor de  $\delta_{\text{C=S}}$ . O terceiro grupo encontrado na PC2, localizado na região central, não apresenta uma boa separação através da análise de PC2, sendo estudado através das características em PC1.

Através de uma análise minuciosa dos compostos dispersos em PC1 três principais grupos foram localizados; 1) o grupo com escores negativo, com altos valores de  $\delta_{\text{N-H}}$  e baixos valores de  $\delta_{\text{NH}}$ , Volume molecular e área da superfície polar; 2) o grupo com escores positivo, com altos valores de  $\delta_{\text{NH}}$ , Volume molecular e área da superfície polar e baixos valores de  $\delta_{\text{N-H}}$ ; 3) o grupo centrado no escore 0 da PC1, com valores equilibrados de  $\delta_{\text{N-H}}$ ,  $\delta_{\text{NH}}$ , Volume molecular e Área de superfície polar.

O grupo 1 pode ser dividido em dois sub-grupos; 1A) com escores entre 0 e 1 e o grupo 1B) com escores entre 2 e 4.

Após a análise do gráfico PC1 *versus* PC2, 11 compostos foram escolhidos como os mais dissimilares, devido às suas distâncias no gráfico dos de escore. Nove compostos foram escolhidos através da análise de PC1, sendo eles: o LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-18, LPSF/PTS-19, LPSF/PTS-21, LPSF/PTS-23 e LPSF/PTS-25. Dois compostos foram escolhidos através da análise de PC2, o LPSF/PTS-3 e o LPSF/PTS-6. A expectativa é que como estes derivados estão entre os mais dissimilares nas sete variáveis utilizadas, eles tem chance de apresentarem respostas biológicas distintas entre si. Através destas análises também será possível a proposição de uma relação estrutura química atividade biológica, que terá sua capacidade de previsão testada.



$$PC1 = -0.413 \delta_{N-H} - 0.24 \delta_{CH} + 0.025 \delta_{C=S} - 0.4 \delta_{C=O} + 0.511 \text{ Vol. Mol.} + 0.503 \text{ ASP} + 0.311 \text{ LogP}$$

$$PC2 = 0.405 \delta_{N-H} - 0.085 \delta_{CH} - 0.818 \delta_{C=S} + 0.19 \delta_{C=O} + 0.178 \text{ Vol. Mol.} + 0.134 \text{ ASP} + 0.27 \text{ LogP}$$

**Fig. (28)** Gráfico dos escores de PC1 e PC2 dos dados da Tabela 3.

### 3. Atividade Biológica

Esta etapa teve como objetivos a obtenção da viabilidade celular, a fim de verificar o potencial citotóxico dos compostos obtidos e também avaliar a susceptibilidade dos parasitos do *S. mansoni* frente aos derivados indólicos-tiazolidínicos.

#### 3.1. Avaliação dos Novos Derivados Imidazolidínicos

Na busca por novas moléculas com atividade biológica sobre *S. mansoni* a realização de testes biológicos *in vitro* torna-se relevante, pois esse passo é vital para encontrar uma substância líder que possa ser posteriormente usada em ensaios *in vivo*, reduzindo os custos desse processo. Por essa razão, quando são testadas empiricamente substâncias em que não há um prévio conhecimento sobre a ação

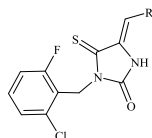
em determinados alvos, o teste *in vitro* fornece um parâmetro inicial para que se possa, posteriormente, partir para uma abordagem seletiva, permitindo uma investigação biológica de compostos quimicamente derivados daquele, guia, que anteriormente demonstrou ter alguma atividade sobre o organismo em estudo. Através dessa triagem inicial, vários parâmetros podem ser observados, visando à avaliação da viabilidade do organismo-alvo. <sup>138</sup>

A semelhança estrutural dos novos derivados tioxo-imidazolidínicos sintetizados com o niridazol (Ambilhar®), quimicamente denominado 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-imidazolidin-2-ona, fármaco de comprovada ação frente ao *S. mansoni* e bastante utilizado no passado como esquistossomicida, embora possuidor de indesejáveis efeitos colaterais, vem se incentivando a pesquisar os efeitos provocados por essas moléculas em vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro*. <sup>137</sup>

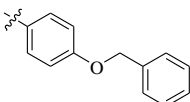
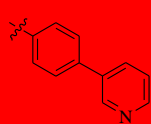
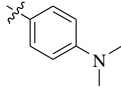
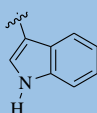
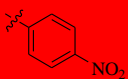
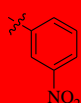
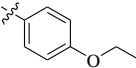
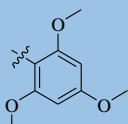
A investigação da atividade biológica dos candidatos a agentes esquistossomicidas é de grande importância para o entendimento da biologia do parasito, podendo ser profilático acarretando a morte de esquistossômulos, supressivo ao inibir a oviposição ou apresentar atividade eficaz ao ser capaz de induzir a morte do verme adulto de *S. mansoni*. <sup>139</sup> Nesse contexto, alguns parâmetros precisam ser avaliados, sendo eles atividade motora, acasalamento, oviposição, mortalidade, bem como suas alterações tegumentares a fim de analisar o efeito biológico do composto frente ao parasito. <sup>138</sup>

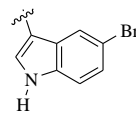
Os derivados tioxo-imidazolidínicos são bem conhecidos pela sua atividade em alguns trabalhos que analisaram sua eficácia *in vitro*<sup>6-8,11,72,140</sup> e *in vivo*,<sup>10</sup> apresentando assim, resultados bem interessantes. Nesse estudo, foi observada a mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni*, após a adição dos compostos LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-6, LPSF/PTS-10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-18, LPSF/PTS-19, LPSF/PTS-21, LPSF/PT-S23 e LPSF/PTS-25, durante 120 horas de observação. (Tabela 4).

**Tab (4)** Relação entre derivados tioxo-imidazolidínicos e resposta biológica frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Em azul os derivados mais ativos e em vermelho os menos ativos. O Praziquantel, utilizado como padrão, apresentou citotoxicidade em concentrações maiores que 1 µg/mL e 100 % de mortalidade em todas as concentrações testadas.



Derivado	R	Resposta Biológica
PTS-2		Citotoxicidade: > 100 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 80 µM

PTS-4		<p>Citotoxicidade: &gt; 100 µM</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterado</p> <p>Mortalidade: &gt; 80 µM</p>
PTS-6		<p>Citotoxicidade: &gt; 10 µM</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterado</p> <p>Mortalidade: -</p>
PTS-10		<p>Citotoxicidade: &gt; 100 µM</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterado</p> <p>Mortalidade: 20 µM</p>
PTS-14		<p>Citotoxicidade: &gt; 5 µg/mL</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterado</p> <p>Mortalidade: 5 µg/mL</p>
PTS-18		<p>Citotoxicidade: &gt; 10 µM</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterado</p> <p>Mortalidade: -</p>
PTS-19		<p>Citotoxicidade: &gt; 10 µM</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterada</p> <p>Mortalidade: -</p>
PTS-21		<p>Citotoxicidade: 25 µg/mL</p> <p>Ovipoisição: Não inibido</p> <p>Acasalamento: vermes unidos</p> <p>Motilidade: Não alterada</p> <p>Mortalidade: -</p>
PTS-23		<p>Citotoxicidade: &gt; 100 µM</p> <p>Ovipoisição: Inibido</p> <p>Acasalamento: vermes separados</p> <p>Motilidade: Alterado</p> <p>Mortalidade: &gt; 5 µM</p>

PTS-25		Citotoxicidade: > 5 µg/mL Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: 40 µg/mL
--------	---	---

### 3.1.1. Citotoxicidade

Os derivados tioxo-imidazolidínicos LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-21 e LPSF/PT-23 não exibiram citotoxicidade em concentrações até 100 µM. Os derivados LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-21 e LPSF/PTS-25 apresentaram citotóxicos nas concentrações de 5 µg/mL, 25 µg/mL, 5 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. Dessa forma, esses compostos demonstraram ser menos citotóxicos que o PZQ, uma vez que apresenta-se citotóxico a uma concentração <1 µg/mL. Em outras palavras, nenhum destes grupos substituintes no anel benzilideno conferiram atividade citotóxica aos derivados.

Por outro lado, os derivados LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 e LPSF/PTS19 apresentaram citotoxicidade em concentrações superiores a 10 µM, possivelmente associada com a inclusão de substituintes como piperidin-3-il, 3,4-dibenziloxi, 4-nitro e 3-nitro, respectivamente.

Grupos químicos nitroaromáticos, como os presentes no LPSF/PTS-18 e PTS-19, são conhecidos como grupamentos parasitóforos, cuja presença é essencial para a morte do parasita.<sup>141</sup> No entanto, tais grupos são também conhecidos pela toxicidade, mutagenicidade e por vezes carcinogenicidade.<sup>142-144</sup> As interações dos compostos nitroaromáticos com o DNA e a mutagenicidade resultante tem sido caracterizadas extensivamente e revisadas para uma variedade de compostos nitroaromáticos monocíclicos, policíclicos e heterocíclicos.<sup>145</sup> Os produtos de oxidação e redução do grupo nitroaromático podem causar danos ao DNA formar adutos que induzem a mutagênese por má incorporação de nucleotídeos durante a síntese do DNA.<sup>33,145</sup>

### 3.1.2. Indução da Mortalidade dos Parasitas

O LPSF/PTS-2, composto com grupo piperidin-4-il, e o LPSF/PTS4, composto com grupo 4-benziloxi, substituídos no anel benzilidênico, causaram mortalidade de 100% até 120 horas em concentrações apenas nas concentrações de 80 e 100 µM, e essa mortalidade foi diminuindo com a redução da concentração dos derivados durante a realização do experimento. A adição do grupo 4-dimetilamina no composto LPSF/PTS10, provocou um aumento da susceptibilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, ocasionando mortalidade nas primeiras 24 horas.

Já o LPSF/PTS-18, composto com grupo 4-nitro e o LPSF/PTS-19 com o grupo 3-nitro, todos substituídos no anel benzilidênico, mostraram-se os menos ativos dos compostos avaliados, causando



mortalidade de 50% ao final de 120 horas na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Estes compostos foram avaliados apenas na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , uma vez que a adição desses grupos ao anel benzilidênico tornou estes mais citotóxicos.

O LPSF/PTS-23, composto com grupo metoxila nas posições 2,4,6 do anel benzilidênico, causou a morte de 100% dos vermes até 120 horas em concentrações variando de 5 a 100  $\mu\text{M}$ . Achados da literatura também mostraram que os compostos heterocíclicos contendo um grupo metoxila exibiram maior atividade esquistossomicida do que compostos sem este grupo.<sup>146</sup>

O composto LPSF/PTS-25 apresentou uma taxa de mortalidade de 40% dos parasitos na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  como pode ser visto na tabela 3. Dentre todos os compostos imidazolidínicos testados e observados o composto LPSF/PTS-14 apresentou o resultado mais expressivo com uma taxa de mortalidade de 100% dos parasitos nas primeiras 24 horas de observação em todas as doses testadas. O mesmo resultado pôde ser visto com o composto padrão do experimento, o PZQ. No entanto, o derivados LPSF/PTS-21 e não foi capaz de causar mortalidade em nenhuma das doses testadas.

O LPSF/PTS-14, além de ser o melhor composto esquistossomicida desta série, representa o primeiro derivado indólico-imidazolidínico com ação esquistossomicida desenvolvido pelo Gpit. O radical indol é de grande importância na estrutura do LPSF/PTS-14, uma vez que possui uma vasta gama de propriedades associadas, tais como anti-fúngica,<sup>147</sup> anti-inflamatória<sup>148</sup> e anti-tuberculose.<sup>149</sup> O radical indol é também um bioisóstere de quinolina, encontrada em trioxaquinas e mefloquina, com alto nível de mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni*.<sup>150-152</sup>

### 3.1.3. Atividade Motora

Os vermes adultos de *S. mansoni*, principalmente os vermes machos, apresentam uma variedade de movimentos entre os quais, rápidos encurtamentos e prolongamento do corpo, movimentos ondulatórios e ondas peristálticas, parcial ou de uma extremidade a outra.<sup>153</sup> A motilidade do *S. mansoni*, e o efeitos de compostos esquistossomicida sobre essa atividade, baseiam-se, principalmente, na observação visual. A análise macroscópica da atividade motora, apresenta a vantagem de ser um método simples, direto, de baixo custo e facilidade operacional.<sup>154,155</sup>

Nesse estudo, a atividade motora dos vermes adultos de *S. mansoni*, baseada na observação microscópica dos vermes, foi diariamente monitorada qualitativamente definida como “normal”, “com menor perda dos movimentos” e “sem movimentos”. Apesar de subjetivo, esse critério qualitativo é comumente empregado nos ensaios *in vitro*.<sup>139,155-157</sup> Nos experimentos realizados no estudo, comparativamente aos vermes adultos incubados apenas em meio de cultura, a motilidade dos parasitos foi alterada quando incubados na presença dos derivados tioxo-imidazolidínicos. Foi descrito também, que os compostos tioxo-imidazolidínicos que foram letais para os vermes adultos,

independentemente do tempo de incubação. Nesse mesmo estudo, observou-se que, nenhum dos derivados induziu a contração muscular nos parasitos. Por outro lado, PZQ induziu, nos instantes iniciais, contração dos helmintos e redução na motilidade sem a separação dos pares de vermes adultos de *S. mansoni*, achados esses também observados no estudo realizado por Moraes (2011).<sup>155</sup>

Em *S. mansoni* o controle da atividade motora ocorre por diversos neurotransmissores ou neuromoduladores, tais como: os pertencentes ao grupo de mediadores do tipo amina (serotonina, dopamina, noradrenalina, adrenalina, acetilcolina); aos do tipo aminoácidos (glutamato,  $\gamma$ -ácido aminobutírico-GABA) e aos neuropeptídeos (peptídeos da família FMRF-amidas - FaRPs).<sup>170,171</sup>

Cada um desses neurotransmissores/neuromoduladores atua de formas diferentes na motilidade aumentando-a (serotonina), diminuindo-a (acetilcolina) ou mantendo-a constante (dopamina, noradrenalina, adrenalina, glutamato e GABA). Assim, a partir da movimentação que o verme adquire após a adição de uma amostra a ser testada, ocorrem evidências farmacológicas da presença desses neurotransmissores no meio de incubação.<sup>154</sup>

Desta forma, os neurotransmissores são possíveis alvos de agentes esquistossomicidas, sobretudo depois de ter sido mostrado que agonistas/antagonistas desses sistemas produziram alterações no padrão de motilidade dos vermes.<sup>154,158</sup> Então, levando em consideração os dados já publicados, é possível que as alterações na atividade motora em vermes adultos de *S. mansoni* em presença de compostos esquistossomicida estejam associados à neurotransmissores ou neuromoduladores.<sup>155</sup>

#### 3.1.4. Oviposição

As manifestações clínicas da esquistossomose estão associadas, principalmente, à presença dos ovos de *S. mansoni*, no tecido do hospedeiro.<sup>159</sup> Dessa forma, na busca de compostos para terapêutica experimental deve-se considerar drogas supressoras, que acabem com a oviposição da fêmea e, portanto, eliminem o principal agente patogênico, o ovo, além de interromper a transmissão dessa parasitose.<sup>138</sup> O objetivo dessa fase da pesquisa foi de avaliar a capacidade reprodutiva de vermes adultos de *S. mansoni* quando em presença de compostos imidazolidínicos. A capacidade reprodutiva de *S. mansoni* foi avaliada pela observação aos efeitos da exposição no acasalamento e oviposição das fêmeas. Nos experimentos, foram observadas inibição da oviposição durante todo período do experimento quando os vermes foram incubados com todos os derivados tioxo-imidazolidínicos empregados nesse estudo, exceto o LPSF/PTS-21 que, assim como no grupo controle (vermes não tratados), foi observada a oviposição e se os vermes permaneceram viáveis durante o período de observação. Alguns estudos relatam através de experimentos *in vitro* a redução da oviposição de *S. mansoni* por compostos imidazolidínicos.<sup>6,8,11,140,146</sup>

A redução da oviposição pode ser causada por alterações no sistema reprodutivo de machos e/ou fêmeas.<sup>155</sup> Por exemplo, um estudo sobre o efeito esquistossomicida da lovastatina realizado por

Araújo et al. (2002),<sup>160</sup> mostraram que esse medicamento foi capaz de causar redução da oviposição de vermes adultos de *S. mansoni*. Os estudos morfológicos em vermes adultos expostos a lovastatina mostraram alterações degenerativas, sendo as principais no aparelho reprodutor, com redução dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas e modificações nos testículos dos machos. No estudo não foi verificado se os derivados tioxo-imidazolidínicos causam alterações morfológicas nos órgãos reprodutivos. No entanto, baseado na ausência de ovos observada nos experimentos desse estudo, é provável que os órgãos reprodutores dos vermes adultos de *S. mansoni* tenha afetado a oogênese e/ou espermatogênese.

### 3.1.5. Alterações no Tegumento do Parasita

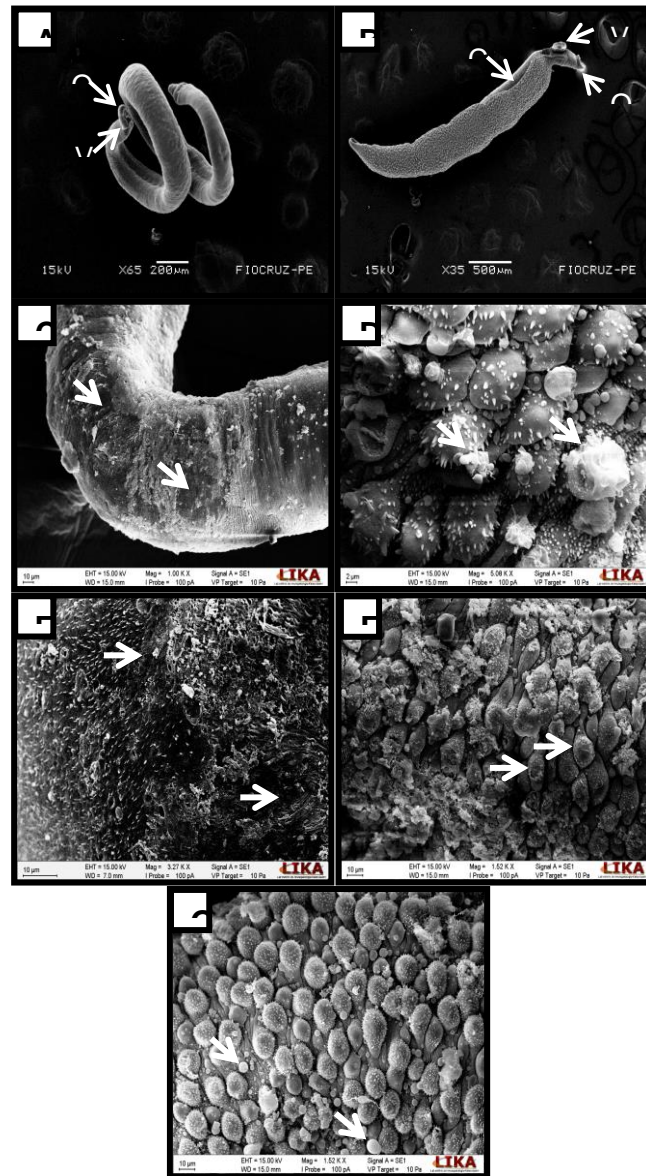
Não obstante a análise subjetiva para avaliar o efeito de compostos esquistossomicida, sobre o tegumento do *S. mansoni*, esse critério é qualitativo e comumente empregado em ensaios *in vitro*.<sup>25,140,161</sup>

No que diz respeito as alterações ultraestruturais, a superfície tegumentar tem sido o alvo biológico bastante importante no combate ao parasito, uma vez que essa estrutura se caracteriza por estar envolvida com a resposta imune do parasito frente ao hospedeiro definitivo, com atividade sensorial e com a capacidade de absorção de nutrientes.<sup>162</sup> Os resultados baseados em análises ultraestruturais por MEV demonstraram que vermes adultos após serem incubados com o controle, observou-se o tegumento parasitário com ventosas orais e ventraies, tubérculos e espinhas em estado normal após 120 h de incubação, respectivamente representados nas figuras 30A e 30B. Danos graves do tegumento foram observados na incubação de vermes com o PZQ, contração e ruptura de bolhas. Observou-se a aparição de vários orifícios no local onde as bolhas foram localizadas e perda de espinhas (Figura 30C).

As alterações ultraestruturais em esquistossomas adultos causadas pelo LPSF/PTS-23 foram caracterizadas por extensa erosão em todo o corpo dos vermes (Figura 30D); Após 48 h, várias bolhas e projeções (setas sólidas) emergindo do interior de tubérculos danificados (Figura 30E); Após 72 h, a erosão do tegumento pode ser visualizada com maior ampliação (Figura 30F); Após 96 h, alguns tubérculos não têm espinhas (seta tracejada) (Figura 30G). Tubérculos e bolhas danificados presentes dentro da lesão, como observado após 120 h de exposição ao derivado (Figura 30H).

O mesmo resultado foi observado em trabalhos anteriores com compostos tioxo-imidazolidínicos.<sup>25,71,140,161</sup> Sendo assim, suspeita-se que, de alguma forma, LPSF/PTS23 atue no sistema tegumentar, interferindo nas células do tegumento, porém, esse mecanismo também ainda não foi totalmente elucidado no estudo.

Neves et al. (2010; 2011)<sup>24,140</sup> avaliando *in vitro* a atividade esquistossomocida dos compostos LPSF/RZS-2, LPSF/RZS-5, LPSF/PT-11, LPSF/PT-05, através de análises de microscopia eletrônica de varredura e citotoxicidade, demonstraram que esses compostos foram capazes de apresentar resultados semelhantes ao PZQ com 100% de mortalidade dos vermes adultos *S. mansoni* nas primeiras 24 horas de contato com o composto. O composto LPSF/PTS23 avaliado no estudo demonstrou resultados semelhantes aos dos compostos citados acima.



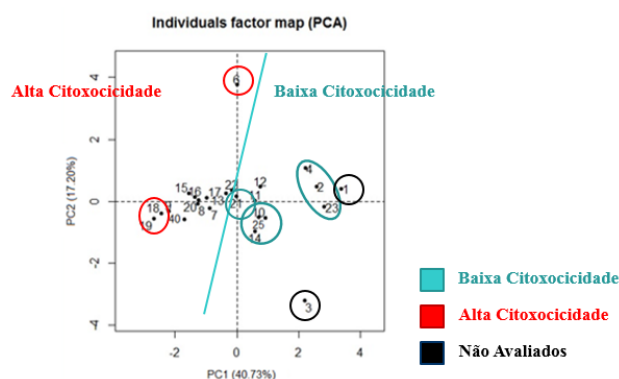
**Fig. (30)** a-b Imagens de SEM de *S. mansoni*. (A) Felxes adultos de *S. mansoni* não expostos a LPSF / PTS23. Parasitas incubadas em meio de manutenção por 120 h mostrando morfologia normal. (B) GC, canal ginecof oral; OS, otário oral; VS, Ventre ventoso. Medial e porção posterior. Figuras c-g SEM imagens de adultos *S. mansoni* após a exposição do LPSF / PTS23. (C) Após 24 h, observou-se uma erosão extensa sobre todo o corpo da haste; (D) Após 48 h, várias bolhas e projeções (setas sólidas) emergindo do interior de tubérculos danificados; (E) Após 72 h, a erosão do tegumento pode ser visualizada em maior ampliação; (F) Após 96 h, alguns tubérculos não têm espinhas (seta tracejada) (g) Tubérculos danificados e bolhas presentes dentro da lesão, como observado após 120 horas de exposição à droga.

### 3.1.6. Análise dos Resultados Através do Modelo Quimiométrico

Apos a obtenção dos valores de citotoxicidade e atividade esquistossomicida, os gráficos da PCA dos derivados imidazolidínicos foram novamente analisados. Tal estudo teve por objetivo encontrar um padrão entre a estrutura química e a atividade biológica, o que facilitaria a síntese racional de novos derivados. Apesar de não ser possível de se observar nenhum padrão referente à atividade esquistossomicida, um padrão na dispersão dos compostos no gráfico da PCA foi observado referente aos valores de citotoxicidade.

Estes compostos estão dispersos, em sua maioria, ao longo do eixo horizontal, PC1 (Figura 31). Compostos com baixa citotoxicidade (azul) encontram-se posicionados a direita da linha central, valores positivos de PC1, e compostos com alta citotoxicidade (vermelho) à esquerda, valores negativos de PC1. A exceção a este padrão é o derivado LPSF/PTS-6. Apesar de apresentar valores de PC1 compatíveis com os derivados não citotóxicos o composto apresenta uma alta citotoxicidade. Porém, esta observação pode ser explicada devido ao composto possuir um alto valor em PC2.

A equação dos loadings de PC1 demonstra que valores positivos são decorrentes de altos valores de volume molecular, área de superfície polar e Log P. Para o derivado 6, o alto valor do  $\delta_{NH}$  e o baixo valores de  $\delta_{C-S}$  são os principais responsáveis pelo seu posicionamento em PC2.



$$PC1 = -0.413 \delta_{NH} - 0.24 \delta_{CH} + 0.025 \delta_{C-S} - 0.4 \delta_{C=O} + 0.511 \text{ Vol. Mol.} + 0.503 \text{ ASP} + 0.311 \text{ LogP}$$

$$PC2 = 0.405 \delta_{NH} - 0.085 \delta_{CH} - 0.818 \delta_{C-S} + 0.19 \delta_{C=O} + 0.178 \text{ Vol. Mol.} + 0.134 \text{ ASP} + 0.27 \text{ LogP}$$

**Fig. (31):** Gráfico dos escores de PC1 e PC2 e correlação com as citotoxicidades dos derivados

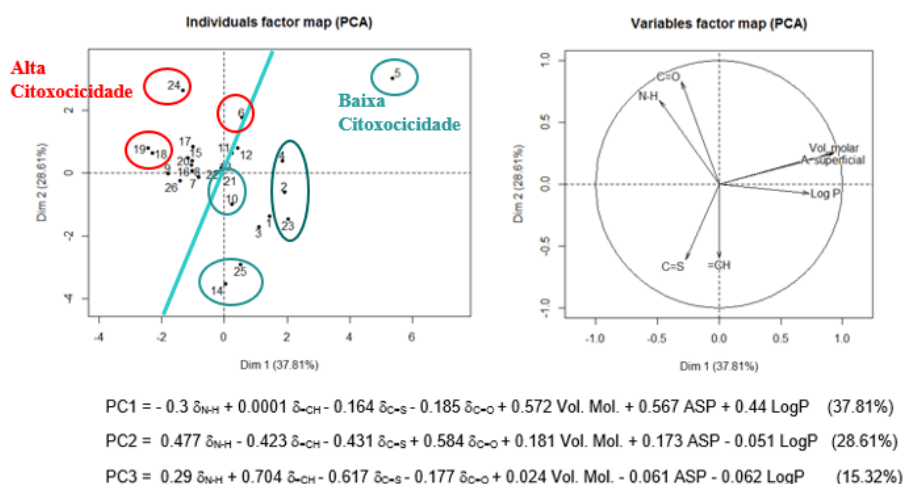
### 3.2. Validação da Análise Preditiva do Modelo em Novos Derivados 4-Tioxo-Imidazolidin-2-ona 3,5-Dissubstituídos

Desejando-se verificar se o modelo de PCA obtido para os derivados 4-tioxo-imidazolidin-2-ona possui propriedades preditivas foram sintetizados 2 novos derivados imidazolidínicos. As variações estruturais realizadas foram simples substituições no radical na porção benzilidênica do esqueleto central. Com diferentes substituintes no anel benzilideno, o LPSF/PTS-5, 3,4-dibenziloxi, e LPSF/PTS-24, 2-nitro, 5-cloro. Os novos compostos foram obtidos em rendimentos satisfatórios através da mesma rota de síntese utilizada para a obtenção da primeira série de compostos. Para a obtenção da PCA foram calculadas as mesmas variáveis independentes que as utilizadas no primeiro modelo (Tabela 5), em seguida aplicou-se a técnica da PCA com os 26 derivados imidazolidínicos sintetizados até o momento, obtendo-se o gráfico representado na figura 32.

**Tab (5)** Estruturas dos radicais dos 3 novos derivados imidazolidínicos e suas variáveis independentes para estudo quimiométrico.

COMP.	$\delta_{N-H}$	$\delta_{=CH}$	$\delta_{C=S}$	$\delta_{C=O}$	Vol. mol.	A. super.	Log P
PTS-5	11.230	6.923	148.274	187.617	473.718	709.93	7.4476
PTS-24	11.698	6.952	146.512	188.446	316.197	455.32	2.6488

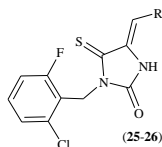
Os grafico obtidos mostram que 66,28 % da informação esta contida nas duas primeiras componentes principais. Através da análise da equação de PC1, pode-se observar que as variaveis, qualitativamente, possuem a mesma significancia que nos graficos anteriores. O mesmo é valido para PC2. Sendo assim é possível realizar uma análise qualitativa valida.



**Fig. (32)** Graficos PC1xPC2 dos 26 derivados imidazolidínicos

Os derivados foram submetidos ao mesmo teste biológico realizado anteriormente, e os resultados podem ser observados na Tabela 6 abaixo.

**Tab (6)** Relação entre os novos derivados tioxo-imidazolidínicos e resposta biológica frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.



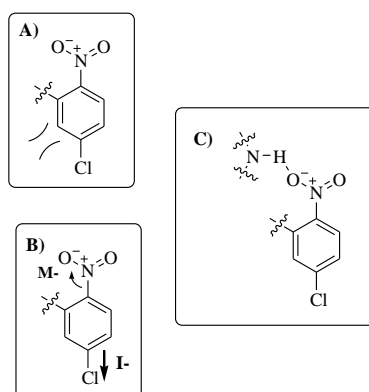
Derivado	R	Resposta Biológica
PTS-5		Citotoxicidade: > 10 $\mu$ M Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade:-
PTS-24		Citotoxicidade: > 100 $\mu$ M Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 20 $\mu$ M

O LPSF/PTS-5, composto com grupo 3,4-dibenziloxi, assim como o LPSF/PTS-18 e o LPSF/PTS-19, causou a mortalidade de 50% ao final de 120 horas na concentração de 10  $\mu$ M. Este composto também foi avaliado apenas na concentração de 10  $\mu$ M, devido à sua alta citotoxicidade.

O LPSF/PTS-24, embora possua o grupo nitro na posição 5 do anel aromático, não exibiu citotoxicidade em concentrações até 100 $\mu$ M. Três hipóteses foram adotadas como explicação; a primeira seria em relação a presença do cloro na posição 2 do anel benzilidênico. A presença deste grupamento aumenta o impedimento estérico na posição 6, que poderia vir a desempenhar um papel fundamental na citotoxicidade do derivado. Todavia, tal hipótese não pode ser adotada. Para tal, seria necessária a síntese e avaliação biológica do derivado 2-nitro não substituído pelo cloro na posição 5. A segunda hipótese seria devido ao efeito indutivo negativo (-I), este grupo. Tal efeito, mesmo que não sendo muito pronunciado, pode acabar por aproximar ao nitrogênio a carga negativa dispersa entre os oxigênios. Isto pode contribuir para uma diminuição da reatividade deste grupo, assim como seu efeito retirador de elétrons (Figura 33A). Os halogênios também são eficientes em melhorar a absorção dos derivados em meio biológico, mais precisamente nas membranas celulares.<sup>163</sup>

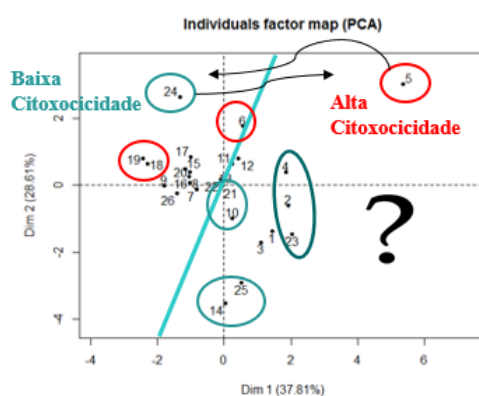
A terceira hipótese é ligada ao fato do grupo nitro se encontrar na posição orto do anel aromático. A proximidade deste grupo com o N-H em posição 1 do anel imidazolidínico pode acarretar na formação

de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do nitro e o hidrogênio do N-H. Tal ligação seria responsável pela diminuição da reatividade do grupo nitro pela estabilização através de um pseudo-ciclo, tornando-o menos disponível à ação de enzimas, como a CYP450, que podem vir a formar metabólitos tóxicos. Para a validação desta hipótese seria necessário a realização da cristalografia do derivado, porém o mesmo é obtido na forma de um pó amorfo. O entendimento deste resultado seria um importante fator para a compreensão do mecanismo de citotoxicidade, e desenvolvimento de um modelo de previsão mais fiável



**Fig. (33)** Proposta através dos efeitos eletrônicos do grupo nitro como justificativa da atividade do PTS-24.

Contrariamente ao esperado no início do estudo, os derivados não se comportaram de acordo com o previsto pelo modelo. Tanto o LPSF/PTS-5 quanto o LPSF/PTS-24 obtiveram valores contrários ao esperado. O LPSF/PTS-24, que se situa no mesmo quadrante dos compostos de alta citotoxicidade, mostrou-se um composto não citotóxico em concentrações até 100 $\mu$ M. Já o LPSF/PTS-5, situado na proximidade dos compostos não citotóxicos, é citotóxico em concentrações superiores a 10 $\mu$ M. Os resultados podem ser avaliados no gráfico PC1xPC2 abaixo (Figura 34).



**Fig. (34)** Gráficos PC1xPC2 dos 26 derivados imidazolidínicos juntamente com as atividades obtidas.

Após a análise dos resultados concluiu-se que o modelo quimiométrico obtido através da técnica PCA não apresenta complexidade suficiente para prever a citotoxicidade dos compostos sintetizados, tendo em vista que as variáveis utilizadas no modelo possuem, possivelmente, uma baixa importância



no fenômeno estudado. Um dos principais fatores seria devido à falta de informação quanto ao alvo/mecanismo de ação dos derivados. Sendo assim, faz-se necessária a identificação de um possível alvo biológico e/ou identificação do farmacóforo dos derivados, para que assim a análise PCA possa ser aplicada com a escolha de variáveis independentes mais complexas e mais precisamente envolvidas na atividade dos derivados. Outro fator determinante seria a escolha da variável independente  $\delta_{N-H}$ , tendo em vista que o deslocamento deste próton pode ser influenciado pela concentração do produto no tubo RMN.

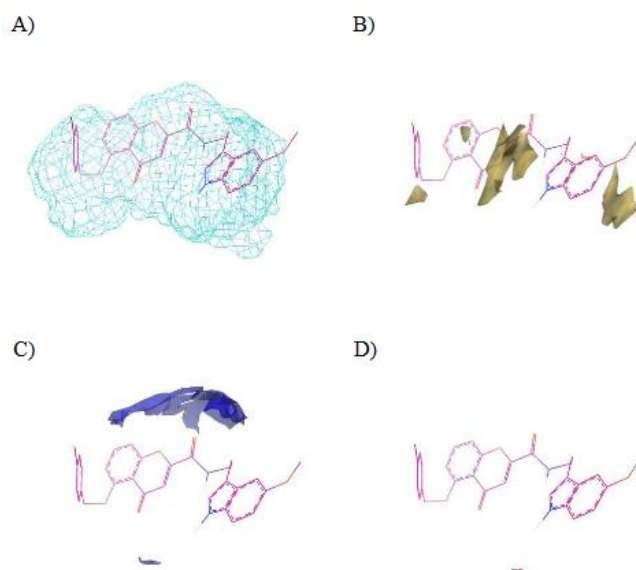
#### 4. IDENTIFICAÇÃO DO FARMACÓFORO

Apesar da comprovada atividade dos derivados imidazolidínicos na literatura, tanto o alvo farmacológico quanto a estrutura do farmacóforo permanecem desconhecidas. Desejando-se estabelecer um modelo de farmacóforo que possa ajudar a entender a atividade dos derivados, assim como direcionar a síntese de novos análogos e o desenvolvimento de modelos preditivos mais seguros, utilizou-se o software FLAP, que se baseia pelos princípios do software GRID.

##### 4.1. Software *GRID*

GRID permite o cálculo das energias de interação entre uma entidade química (a sonda) e uma outra molécula (alvo) e as descreve em termos de campo interação molecular ou MIFs (*Molecular Interaction Fields*). Estes campos podem ser definidas como sendo a distribuição de interações físicas potenciais capazes de fazer uma molécula com o seu ambiente, incluindo as interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals.<sup>164</sup>

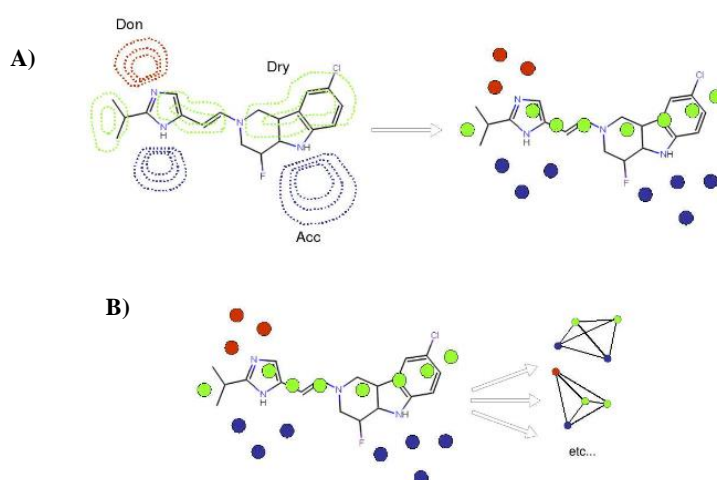
No GRID, a molécula alvo pode ser uma macromolécula tal como uma proteína, uma pequena molécula ou um fármaco. As interações da sonda com a molécula alvo são calculados em certas posições distribuídas ao longo da molécula alvo e chamados "pontos GRID." As energias são representados por superfícies em três dimensões que rodeiam a molécula alvo e conhecidas como áreas de interação molecular (Figura 35). Diferentes sondas provenientes do GRID podem ser utilizadas. Em particular, quatro delas são utilizados como parte do FLAP: 1) Sonda H: que define a forma da estrutura; 2) Sonda DRY: sonda hidrofóbica. É posicionada sobre cada átomo localizado na superfície da molécula-alvo capaz de realizar interações favoráveis com uma zona hidrofóbica localizado em outra molécula; 3) Sonda N1: átomo de nitrogênio de uma amida capaz de realizar ligação de hidrogênio; 4) Sonda O: oxigênio de um grupo carbonílico, capaz de aceitar uma ou duas ligações de hidrogênio.<sup>164</sup>



**Fig. (35)** Representação dos MIFs de um derivado sintetizado por Schmidt em 2015,<sup>164</sup> o MBL-141-II. A) Sonda H definindo a forma. B) Sonda DRY descrevendo as interações hidrofóbicas. C) Sonda N1 descrever as interações doadoras de ligação de hidrogênio. D) Sonda O descrevendo os receptores de ligação de hidrogênio.

#### 4.2. FLAP

*FLAP (Fingerprints for Ligands and Proteins)* é um software de modelagem molecular que permite a comparação de moléculas a partir de "impressão digital". Essas impressões derivam dos MIFs do GRID. 261-263 FLAP inicialmente reduz a complexidade desses campos, selecionando um número significativo de pontos correspondentes a cada sonda (O, N1 e DRY, 36A). O número de pontos selecionados para cada sonda depende do volume do campo de interação molecular e o seu nível de energia. Cada um destes pontos é caracterizado pelo: 1) tipo de interação neste ponto (hidrofóbica, aceitor, doador); 2) o valor da energia (kcal / mol); 3) as coordenadas cartesianas que definem a posição do ponto.<sup>164</sup>



**Fig. (36)** A) Remoção de pontos à partir dos campos de interação molecular. B) Formação de quadrigêmeos

Uma vez determinadas estas áreas, FLAP cria todas as combinações possíveis entre quatro pontos formando quadrupletos (Figura 36B). Para cada quadrupletos é calculada a distância euclidiana entre cada um dos quatro membros (seis valores de distância totais). FLAP trabalha com as informações do cálculo destas distâncias.<sup>164</sup>

Os quadrupletos de cada molécula são armazenadas sob a forma de "impressões farmacofóricas". As moléculas podem ser comparadas por meio da sobreposição destes "*Fingerprints*" e calculando diretamente a similaridade dos campos de interação molecular.<sup>164</sup>

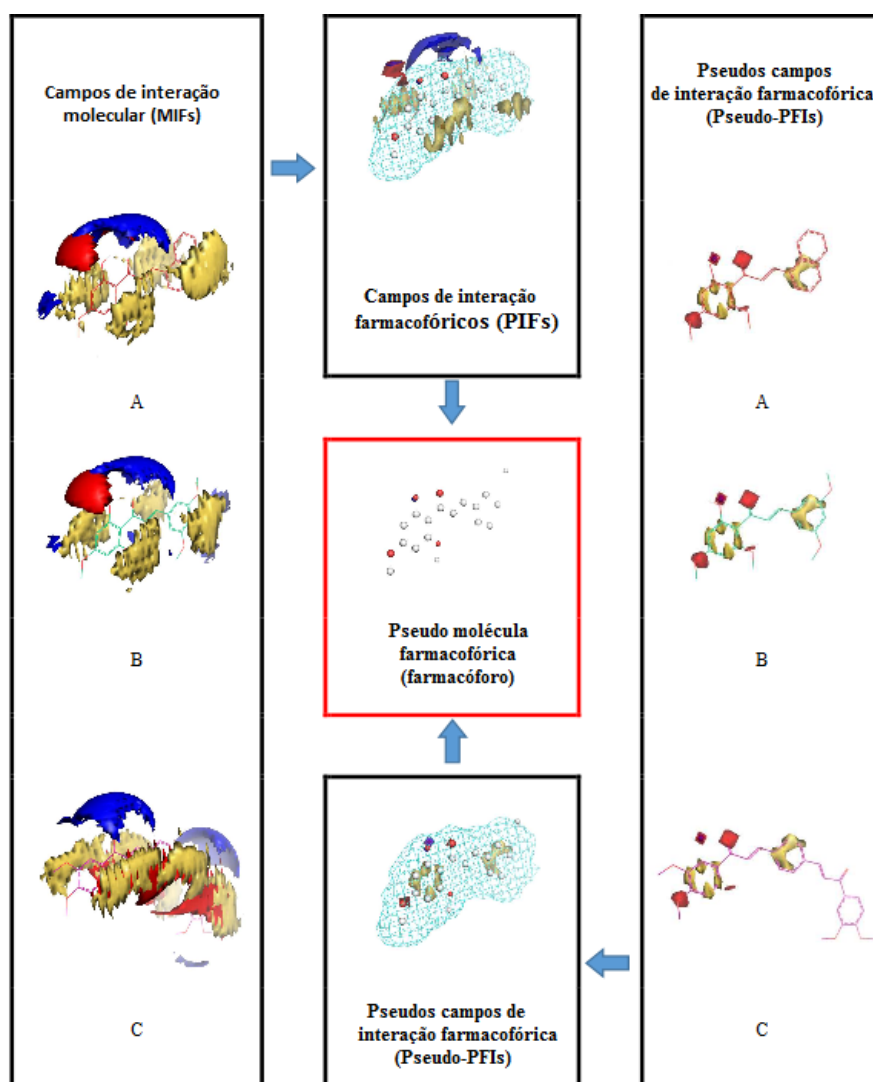
Na etapa de sobreposição, FLAP determina, para cada sonda individualmente (H, O, N1, DRY) ou em combinação umas com as outros (por exemplo H\*O\*N1 é a combinação de sondas de H, O e N1), o grau de sobreposição dos campos de interação molecular entre cada molécula sobreposta. Este grau de sobreposição constitui o *probe score* (score das sondas). FLAP também determina um soma global (*Global-Sum*) correspondente à soma de todos os *probe scores* obtidos para cada sonda individualmente e o produto global (*Glob-Prod*) correspondente ao produto de todos os *probe scores* obtidos para cada sonda individualmente. Uma vez que todos estes valores forem determinados, FLAP calcula a "distância", que representa a semelhança global entre o ligante e as estruturas dos compostos.<sup>164</sup>

### 4.3. Geração do Farmacóforo

A partir da sobreposição dos MIFs de todas as moléculas estudadas, FLAP determina os campos de interação farmacofórica ou PIFs (Figura 37), correspondente à média campos de interação molecular de cada composto em cada ponto de grade de acordo com cada sonda.<sup>164</sup>

FLAP também usa pseudos campos de interação molecular (*pseudo-MIFs*) que representam um campo de densidade electrónica centrado em cada átomo e correspondente a um tipo de sonda escolhida (O, N1 ou DRY). Uma nova análise GRID pode assim ser utilizada de modo a proporcionar o ajuste máximo entre um dado campo interação molecular e o pseudo-campo que corresponde à sonda equivalente (Figura 37). Assim como para os MIFs, a média dos pseudo MIFs representa o pseudo campo de interação molecular (pseudo PIFs) caracterizando as interações comuns em cada uma das posições atômicas. O centro de cada uma dessas posições atômicas comuns é chamado de ponto farmacofórica.<sup>164</sup>

Assim, graças esta abordagem, a partir de átomos individuais, dos MIFs e dos pseudo MIFs, um conjunto de moléculas alinhadas é convertido em uma pseudo molécula farmacófora, chamada farmacóforo, constituído de pontos farmacofóricos, dos campos de interação farmacofóricos e pseudos campos de interação farmacofóricos (Figura 37).<sup>164</sup>



**Fig. (37)** Representação dos MIFs (esquerda) e pseudo MIFs (direita) correspondente a três compostos selecionados (A, B e C) por Schmidt em 2015.<sup>164</sup> No centro estão representados o farmacóforo (meio) gerado pelo FLAP a partir destes três compostos e as representações do PIF (superior) e os pseudo-PIF (parte inferior). Em amarelo são representadas as interações hidrofóbicas, em vermelho as interações de aceptores de ligação de hidrogênio e em azul as interações doadores de hidrogênio

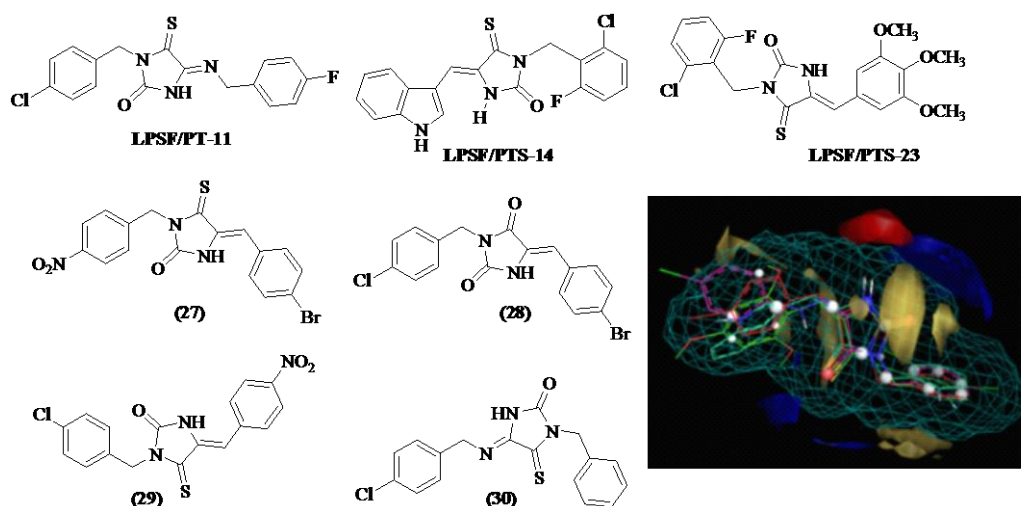
#### 4.4. Seleção dos Compostos para a Criação do Farmacóforo

FLAP precisa apenas de 3 a 5 compostos para gerar um modelo farmacóforo confiável.<sup>165,166</sup> Como primeiro passo desta etapa foram escolhidos os compostos a partir de bases de dados disponíveis. Para executar esta tarefa, foi realizada uma seleção "manual" com base nos melhores derivados já produzidos em nosso grupo, juntamente com os dois melhores derivados obtidos neste trabalho, o LPSF/PTS-14 e o LPSF/PTS-23. Também foi realizada uma tentativa de farmacóforo através do composto LPSF/PTS-14 e derivados clássicos no tratamento da esquistossomose.

#### 4.5. Determinação do Farmacóforo LPSF/PTS-14 e Derivados Imidazolidínicos

Juntamente com o LPSF:PTS-14 e o LPSF/PTS-23, foram escolhidos os derivados imidazolidínicos mais ativos sintetizados pelo nosso grupo durante um período de 20 anos. Os derivados, suas atividades esquistossomicidas e o modelo de farmacóforo obtido são apresentados na Figura 38.<sup>24,25,71,72,140,167,168</sup>

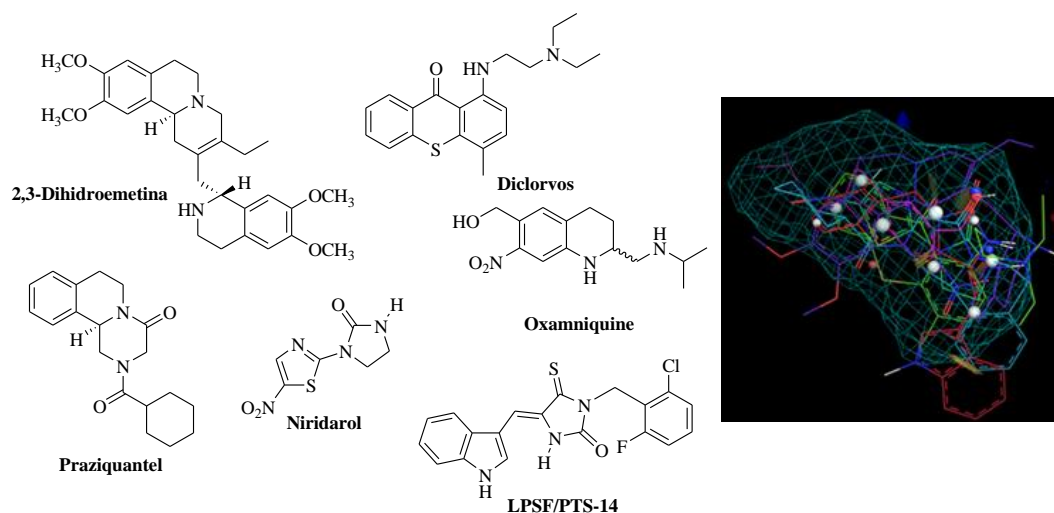
Nas análises dos modelos farmacóforos obtidos pelo FLAP os pontos azuis representam zonas comuns doadoras de ligações de hidrogénio, os em vermelho representam os aceptores e finalmente os em amarelo indicam os pontos hidrofóbicos. Após análise do modelo de farmacóforo obtido para os derivados imidazolidínicos, pode-se evidenciar a existência de zonas doadoras e aceptoras de ligações de hidrogénio, assim como interações hidrofóbicas. Porém, visto que as moléculas possuem uma enorme similaridade química entre os derivados estes resultados não podem ser totalmente conclusivos na determinação do farmacóforo. Para o desenvolvimento de um modelo farmacóforo mais confiável, faz-se necessária a identificação de compostos ativos com uma maior diversidade molecular.



**Fig. (38)** Derivados imidazolidínicos utilizados para a construção do modelo do farmacóforo, assim como o modelo obtido. Os pontos azuis representam zonas doadoras de ligações de hidrogénio; em vermelho os aceptores; em amarelo as zonas hidrofóbicas.

#### 4.6. Determinação do Farmacóforo LPSF/PTS-14 e Compostos Esquistossomicidas

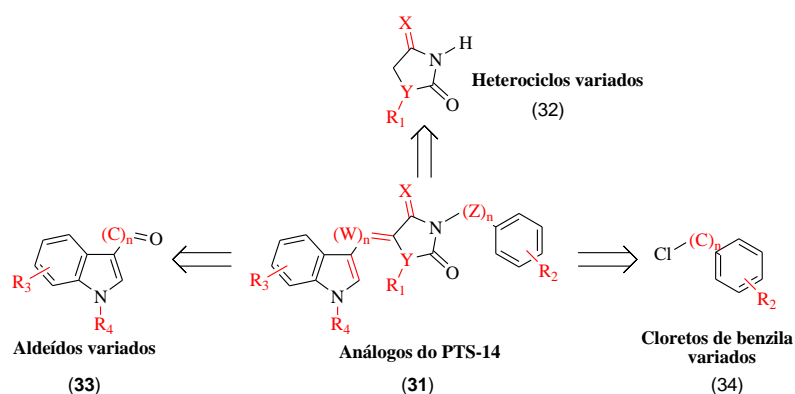
Após a utilização do software Flap com o derivado mais ativo, LPSF/PTS-14, e as moléculas de referência no tratamento da esquistossomose obtivemos o modelo representado na figura 39. Após análise do modelo nenhum ponto de similaridade é encontrado entre as moléculas. Tal observação deve-se ao fato que apesar de todas as moléculas apresentarem uma boa ação esquistossomicida não necessariamente apresentam o mesmo modo de ação no parasita. Sendo assim necessária a elucidação do modo de ação do derivado PTS-14 para a proposição de um modelo de farmacóforo.



**Fig. (39)** Compostos esquistossomicidas usados no estudo, assim como o modelo obtido. Não foi possível observar pontos farmacofóricos no modelo.

## 5. HIT TO LEAD - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO PTS-14

Assim como o praziquantel os derivados imidazolidínicos sintetizados apresentam problemas decorrentes da baixa solubilidade fazendo-se necessária a pesquisa de novos agentes mais solúveis. A síntese racional de tais agentes é dificultada pela falta de informação quanto ao alvo farmacológico das imidazolidinas. Sendo assim, afim de se aumentar o espaço químico dos derivados indólicos-imidazolidínicos, e contribuir para um maior entendimento do farmacóforo foi realizada a síntese de análogos do derivado LPSF/PTS-14, através de pontos que após modificados nos levariam ao melhor entendimento da atividade a nível molecular. A molécula do LPSF/PTS-14 possui sete posições de fácil modificação, sem necessidade da modificação da rota de síntese (Esquema 9).



**Esq. (9)** Possíveis variações a serem realizadas no LPSF/PTS-14

Em um trabalho já publicado em 2015 por Oliveira et al. (em anexo) foram sintetizados novos análogos estruturais do PTS-14 (Figura 40). A rota de síntese para obtenção dos análogos é a mesma

apresentada para a síntese dos primeiros compostos, apresentada na figura 40. Os derivados apresentam variações estruturais na posição C<sub>5</sub> do anel indólico, variando entre Br e H; mudança do heteroátomo presente na posição 1 do heterociclo central, variando entre NH, no caso das imidazolidinas, e S, no caso das tiazolidinas; mudança do substituinte da posição C<sub>4</sub> do anel central, variando entre oxigênio, formando carbonilas, e enxofre, formando tionilas; e por fim variando entre os substituintes no anel benzílico. Os derivados são apresentados na figura 40 (Oliveira et al., 2015).<sup>11</sup>

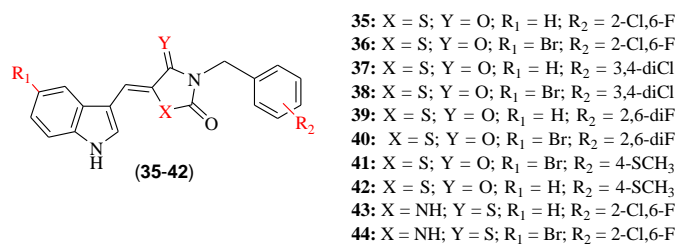


Fig. (40) Primeiras modificações moleculares realizadas a partir do derivado LPSF/PTS-14.

Após a síntese e caracterização dos análogos os mesmos foram submetidos a avaliação de suas propriedades esquistossomicidas e tripanomicidas. Na presente discussão será dada uma maior ênfase às propriedades esquistossomicidas. O artigo original está disponível na sessão de anexos da presente tese, sendo assim os resultados tripanomicidas podem ser consultados.

A citotoxicidade das tiazolidinas (35-42) e imidazolidinas (43-44) testadas foram inferiores a do praziquantel (<1 µg.mL<sup>-1</sup>). Doze derivados foram testados para avaliação de sua atividade schistosomicida (Tabela 7), a uma concentração de 5 a 100 µg.mL<sup>-1</sup> a cada 24 h durante um período de 144 horas, sendo observada a mortalidade, motilidade, e oviposição dos vermes. Ao longo das 144 horas de observação, todos os *S. mansoni* adultos incubados na ausência de qualquer grupo de controle negativo e/ou droga exibiram o movimento peristáltico normal ao longo do eixo do corpo, com a adesão ocasional para o fundo da placa de cultura pela ventosa central.

O derivado 43, PTS-14, mostrou a maior eficácia entre os derivados imidazolidínicos testados em termos de mortalidade de parasitas, 100% após 6 horas da administração na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> e sendo também letal em outras concentrações como 5, 10, 20, 40 e 80 µg.mL<sup>-1</sup> dentro das primeiras 24 horas de observação. Todos os testes com o composto 44 mostraram um baixo nível de mortalidade para *S. mansoni*, atingindo apenas 40% de mortalidade a uma concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> no sexto dia de observação, enquanto que as outras concentrações foram capazes apenas de reduzir a motilidade dos parasitas.

A administração de compostos 43 e 44 atuou diretamente na fisiologia normal dos parasitas, que não eram mais capazes de botar ovos e foram também incapazes de acasalar.

Dos derivados tiazolidínicos, o derivado **40** causou a morte de 100% dos parasitas a uma concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nas primeiras 24 horas de observação. Esta taxa de mortalidade permaneceu inalterada em concentrações de  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 48 horas;  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 96 horas e  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 144 horas ao longo dos dias de avaliação. O derivado **38** também matou 100% dos vermes em doses de 100 e  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  após 48 horas de avaliação. O **41** alcançou a máxima taxa de mortalidade após 72 horas na dose mais elevada. O último composto, **36** alcançou 100% de mortalidade apenas na dose mais elevada,  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , após 120 horas. Os outros compostos avaliados (**35**, **37**, **39** e **42**) apenas alteraram a motilidade dos parasitas, com exceção do derivado 5a, que induziu 83,33% dos parasitas a morte após 144 horas de observação. Da mesma forma que evidenciado nos derivados imidazolidínicos (**43-44**), os derivados tiazolidínicos (**35-42**) também foram capazes de interferir na oviposição e adesão. Por outro lado, os vermes expostos ao fármaco antischistosomal de escolha, praziquantel (grupo controle positivo), apresentaram contração muscular, com movimentos parciais ou permaneceram imóveis, porém vivos. Isto ocorreu imediatamente após a administração do PZQ. Durante as primeiras 24 horas de tratamento todas as doses mataram 100% dos vermes.

Quanto aos primeiros ensaios de relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos derivados podemos notar que a natureza do anel heterocíclico central possui uma grande importância na atividade do derivado LPSF/PTS-14, tendo em vista que o análogo tiazolidínico (**35**) da molécula apresentou uma baixa atividade esquistossomicida, tendo a melhor taxa de mortalidade em 83.3%, na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  após 144 horas. Tal variação pode ser atribuída à capacidade do substituinte NH, presente nos anéis imidazolidínicos, agirem como doadores de ligações de hidrogênio com outras macromoléculas. Como o alvo biológico e mecanismo de ação do derivado continuam desconhecidos, não podemos afirmar se tal capacidade é importante para a interação da molécula com seu receptor no parasita, ou se é responsável apenas por aumentar as características farmacocinéticas do derivado. Mais estudos devem ser realizados antes de qualquer afirmação.

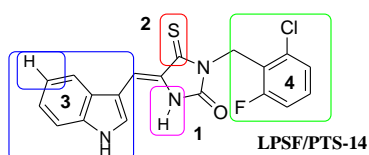
Poucas variações foram realizadas até o momento na série de derivados indólicos-imidazolidínicos para que a importância do grupamento tionila na posição C<sub>4</sub> do anel possa ser comprovada. Porém, através de uma rápida análise de todos os derivados sintetizados e testados no nosso grupo podemos evidenciar que o grupamento tionila está presente na grande maioria das moléculas ativas na esquistossomose, tanto na posição C<sub>4</sub> quanto na posição C<sub>2</sub>.

Também podemos observar que a contribuição da substituição do hidrogênio em C<sub>5</sub> do anel indólico pelo bromo é ambígua. Fraco doador de elétrons através de um efeito mesomérico positivo o bromo é um halogênio volumoso comumente utilizado na síntese de derivados em química medicinal. Quando inserido nos derivados tiazolidínicos não tionados, o bromo aparenta contribuir positivamente para o aumento da atividade biológica dos derivados, porém, quando inserido nos derivados imidazolidínicos o grupamento aparenta diminuir a atividade de tais moléculas, sendo então desfavorável para a



atividade. De tal forma, não podemos concluir a importância do bromo para a atividade, e novas substituições visando esta posição devem ser feitas.

Em resumo, através de quatro principais modificações realizadas no derivado LPSF/PTS-14, foi concluído que: 1) A mudança do heteroátomo do anel heterocíclico central, para enxofre, ou seja, substituindo a imidazolidina por uma tiazolidina, não parece contribuir para ganho de atividade. Possivelmente o nitrogênio está envolvido na formação de ligações de hidrogênio; 2) o grupamento tionila parece desempenhar uma importante função na estrutura, tendo em vista que vários derivados sintetizados no laboratório que possuem atividade também o possuem; 3) a inserção de grupos retiradores de elétrons na posição C<sub>5</sub> do indol não aparente contribuir para ganho de atividade quando no caso de derivados imidazolidínicos; 4) a presença dos halogênios Cl e F na benzila em posição N-3 do anel imidazolidínico possui um papel ainda não evidenciado na atividade, porém essencial à atividade (Figura 41). Visto que a simples troca do fluoreto pelo cloreto reduz a atividade dos derivados.



**Fig. (41)** Principais pontos passíveis de análise de relação entre estrutura química e atividade biológica através das modificações realizadas pelo grupo em artigo recentemente publicado.

**Tab (7)** Citotoxicidade e porcentagem de mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni* frente aos derivados imidazolidinicos e tiazolidinicos

Compostos	Concentração ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )							Citotoxicidade ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	Tempo (h)	100	80	40	20	10	5	
		Mortality (%)						
35	24	0	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	0	0	
	72	33.3	0	0	0	0	0	10
	96	41.6	33.3	0	0	0	0	
	120	50	50	41.6	8.3	0	0	
	144	83.3	50	41.6	25	8.3	0	
36	24	8.3	8.3	0	0	0	0	
	48	33.3	33.3	16.6	8.3	8.3	0	
	72	50	50	41.6	33.3	25	0	5
	96	50	50	41.6	41.6	25	0	
	120	100	66.7	58.3	58.3	50	16.7	
	144	100	83.3	66.7	66.7	50	33.3	
37	24	0	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	0	0	
	72	0	0	0	0	0	0	50
	96	8.3	0	0	0	0	0	
	120	16.7	16.7	16.7	16.7	0	0	
	144	25	25	16.7	16.7	0	0	
38	24	25	25	8.3	8.3	0	0	
	48	100	100	50	8.3	0	0	
	72	100	100	75	33.3	0	0	5
	96	100	100	100	66.7	0	0	
	120	100	100	100	83.3	0	0	
	144	100	100	100	100	0	0	
39	24	8.3	8.3	8.3	100	0	0	
	48	8.3	8.3	16.7	100	0	0	
	72	16.7	8.3	16.7	100	0	0	>100
	96	16.7	8.3	25	100	0	0	
	120	16.7	8.3	25	25	0	0	
	144	16.7	25	33.3	33.3	0	0	
40	24	100	83.3	50	50	0	0	
	48	100	100	91.7	58.3	16.7	0	
	72	100	100	100	75	25	0	1
	96	100	100	100	91.7	66.7	0	
	120	100	100	100	91.7	75	8.3	
	144	100	100	100	100	83.3	8.3	
41	24	0	0	0	0	0	0	
	48	33.3	33.3	16.7	8.3	0	0	
	72	100	83.3	58.3	16.7	0	0	10
	96	100	100	91.7	50	0	0	
	120	100	100	100	75	0	0	
	144	100	100	100	91.7	0	0	
42	24	0	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	0	0	
	72	0	0	0	0	0	0	10
	96	0	0	0	0	0	0	
	120	16.7	8.3	0	0	0	0	
	144	25	16.7	16.7	0	0	0	
43	24	100	100	100	100	100	100	
	48	100	100	100	100	100	100	
	72	100	100	100	100	100	100	5
	96	100	100	100	100	100	100	
	120	100	100	100	100	100	100	
	144	100	100	100	100	100	100	
44	24	0	10	0	0	0	0	
	48	10	10	0	0	0	0	
	72	10	10	0	0	0	0	5
	96	10	10	16.6	0	0	0	
	120	30	10	33.3	0	0	0	
	144	40	30	33.3	0	0	0	

## 6. ADIÇÃO DE MICHAEL, UMA PROPOSTA DE MECANISMO DE AÇÃO E/OU TOXICIDADE

Como visto anteriormente, os novos derivados imidazolidínicos sintetizados apresentam promissora atividade esquistossomicida, especialmente o derivado indólico-imidazolidínico LPSF/PTS-14 (Figura 42). Apresentando uma alta taxa de mortalidade, superior a do praziquantel, e uma baixa citotoxicidade o derivado, até o presente momento, mostra-se um forte candidato a molécula líder.

Faz-se necessário o entendimento, a nível molecular, do seu modo de ação, para uma melhor compreensão de quais modificações aumentariam sua ação esquistossomicida, assim como tornaria a síntese de novos derivados mais racional. Duas proposições são levantadas para o modo de ação do derivado; 1) atuaria como acceptor de ligação de Michael, assim como a Oxamniquina; 2) atuaria a nível de receptores colinérgicos do parasita, como sugerido por Thibaut et al. em 2009.<sup>169</sup> Neste trabalho foi avaliada a possibilidade da ocorrência de Reação de Michael como possível modo de ação do derivado.

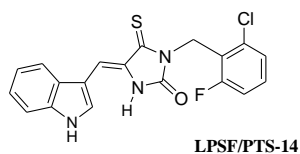
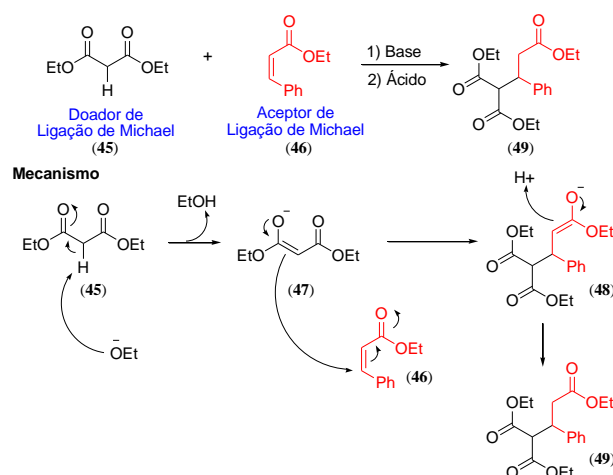


Fig. (42) Estrutura do derivado LPSF/PTS-14

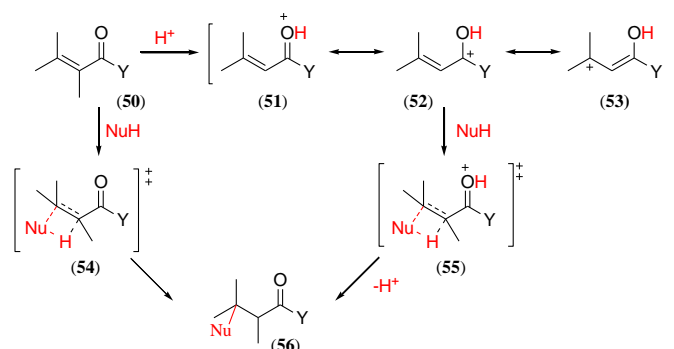
### 6.1. Adição de Michael

Em química orgânica clássica a adição de Michael é uma reação orgânica utilizada para converter um metileno ativado e uma olefina conjugada ao produto de adição correspondente, utilizando um catalisador básico, seguido por um ácido. O metileno ativado é essencialmente um metileno ligado a grupos retiradores de elétrons que estabilizam a carga negativa formada após a desprotonação pela base. A desprotonação resulta em um enolato, que por sua vez reage através de uma adição 1,4 à olefina conjugada. Após tratamento com ácido obtém-se o produto final de adição de Michael (Esquema 10).<sup>170</sup> Reações envolvendo nucleófilos não enolatos tais como aminas, tióis e fosfinas são geralmente referidos como 'Adições do tipo Michael'. Nesta tese trataremos todas as reações de adição com nucleófilos não enolatos do tipo Michael como Adição de Michael.



Esq. (10) Esquema de s\u00edntese e mecanismo de rea\u00e7\u00e3o de Adi\u00e7\u00e3o de Michael

Embora as caracter\u00edsticas nucleof\u00edlicas do doador de Michael sejam aumentadas por meio de cat\u00e1lise b\u00e1sica, o estudo conduzido por Um, Lee et Min em 2001 indicou que a cat\u00e1lise \u00e1cida pode produzir uma melhoria not\u00e1vel da taxa de rea\u00e7\u00e3o, a qual foi nove vezes mais r\u00e1pida no caso da adi\u00e7\u00e3o de anilinas de 3-buten-2-one, esquema 11.<sup>171</sup>



**Esq. (11)** Vias alternativas para a adi\u00e7\u00e3o de 1,2-olefinas carbon\u00edlicas  $\alpha, \beta$ -insaturado. Esquerda: Ataque nucleof\u00edlico no receptor de Michael neutro. Direita: protona\u00e7\u00e3o inicial do oxig\u00eanio carbon\u00edlico com subsequente ataque do nucle\u00f3filo no carbono  $\beta$  e subsequente desprotona\u00e7\u00e3o originando o produto final. Y: H para alde\u00eddos, R para cetonas e OR para os \u00e9steres.

A rea\u00e7\u00e3o de adi\u00e7\u00e3o de Michael possui aplica\u00e7\u00e3o em in\u00fameras tecnologias emergentes, incluindo aplica\u00e7\u00f5es biom\u00e9dicas, como a transfec\u00e7\u00e3o de genes,<sup>172</sup> constru\u00e7\u00e3o de arcabou\u00e7os celulares,<sup>173</sup> e substitui\u00e7\u00f5es de tecidos.<sup>174</sup> Por\u00e9m, apenas no in\u00edcio dos anos 2000, estas rea\u00e7\u00f5es foram reconhecidos como poss\u00edveis de ocorrer em condi\u00e7\u00f5es fisiol\u00f3gicas (tamp\u00e3o de fosfato, pH 7,4 e 37\u00b0C), implicando na atividade e toxicidade de f\u00e1rmacos e outros compostos em organismos celulares *in vivo* e *in vitro*.<sup>175</sup>

A adição de Michael em condições fisiológicas é mais seletiva para às proteínas contendo tiol em relação a nucleófilos de amina.<sup>176</sup>

## 6.2. Adição de Michael em Química Medicinal

Diversos agentes eletrofílicos, conhecidos como aceptores de ligação de Michael podem formar ligações covalentes com sítios nucleófilos de proteínas e DNA de organismos biológicos, doadores de ligações de Michael, resultando em reações como a carcinogenicidade<sup>177-179</sup> e a dermatite alérgica de contacto.<sup>180,181</sup> Além disso, a adição de Michael com tiois cisteína endógenas está associada no tratamento de patologias como aterosclerose e estresse oxidativo,<sup>182-186</sup> na atividade anti-inflamatória das prostaglandinas ciclopentenônicas<sup>187</sup> e na ativação de canais de iônicos do sistema nervoso.<sup>188</sup>

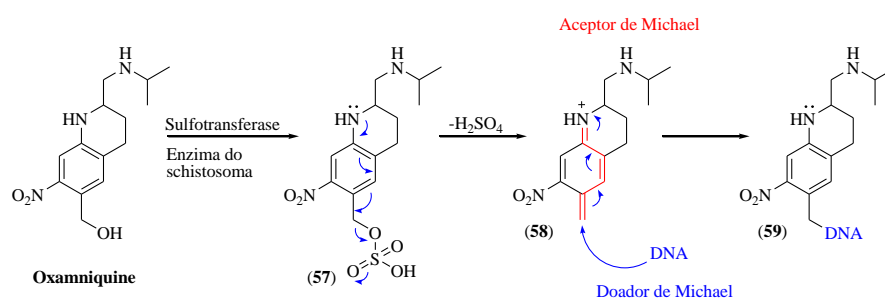
Apesar do potencial tóxicológico de aceptores de Michael devido à sua reatividade como eletrófilos, eles também podem induzir as enzimas de fase-2 que promovem a proteção contra a carcinogenesis.

188

### 6.2.1. Oxamniquina

A Oxamniquina é um agente esquistossomicida amplamente utilizado na terapêutica brasileira contra o *Schistosoma mansoni*, cujo o modo de ação foi recentemente elucidado por Valentim et al em 2013.<sup>189</sup> Atua como um pró-fármaco que após ser absorvido pelo parasita é sulfonado por uma sulfotransferase endógena, presente apenas no schistosoma, em presença da 3'fosfoadenosina 5'fosfosulfato (PAPS). O éster de sulfato de OXA resultante é instável e se decompõe espontaneamente para formar um produto reativo bastante eletrofílico, que apresenta uma porção aceptora de ligação de Michael (esquema 12, em vermelho), capaz de alquilar o DNA, proteínas e outras macromoléculas nucleofílicas, que se portam como doadores de ligação de Michael (esquema 12, em azul). A disrupção subsequente do sintético e funções metabólicas celulares, eventualmente, conduzem o parasita à morte.

O grupo amino em posição para do anel aromático em relação ao grupo hidroximetilo é também necessário para a formação das espécies eletrofílicas, sendo responsável pela estabilização da carga negativa formada após a decomposição do éster de sulfato.<sup>189</sup>



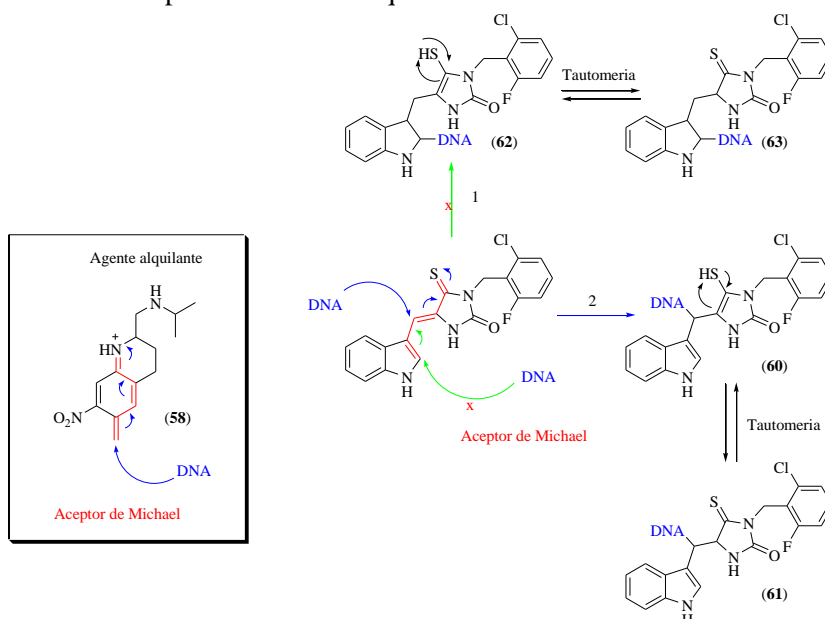
Esq. (12) Mecanismo de ação da oxamniquina<sup>190</sup>

### 6.3. Proposição do Mecanismo de Ação

A reação de Michael em meio biológico pode tanto ser responsável pela toxicidade dos derivados aos organismos vivos, como nos casos dos hidrocarbonetos halogenados;<sup>191,192</sup> pela bioativação da molécula, formando em meio biológico sua forma ativa, como no caso dos derivados de tiopurina;<sup>193</sup> ou pelo efeito principal da molécula, como o caso Oxamniquina.<sup>190</sup>

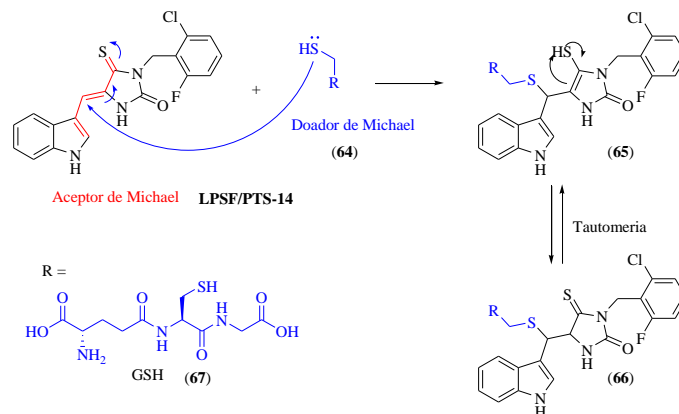
A hipótese aqui abordada é baseada na estrutura química do derivado LPSF/PTS-14, que, assim como a Oxamniquina, apresenta uma porção contendo carbonos  $\alpha, \beta$  insaturados (esquema 13, em vermelho), podendo assim reagir como aceptores de ligação de Michael com sítios nucleófilos do DNA do Schistosoma resultando na morte do parasita. Porém, podendo também ser responsável pelos efeitos citotóxicos encontrados em alguns derivados.

Dois prováveis pontos de ataque nucleofílico são possíveis de serem identificados na estrutura do LPSF/PTS-14, como demonstrados no esquema 13. O primeiro no carbono 2 do indol, caminho 1 do esquema 13, e o outro no carbono metilênico, caminho 2 do esquema 13. Como análise preliminar desconsideramos a possibilidade de ocorrência da ligação no carbono 2 do indol, devido ao fato de que caso este ataque aconteça a aromaticidade do indol seria quebrada, formando um intermediário instável altamente energético. Sendo o meio fisiológico brando (37°C; pH 7,4) a probabilidade de tal reação ocorrer é baixa, pois a energia fornecida para a estabilização de tal intermediário é baixa. Consideramos o caminho 2 como sendo o mais apto para a ocorrência da reação de Michael com o DNA, pois a reação aparentemente se desenvolve em condições mais brandas, principalmente pelo fato de não desestabilizar a molécula com a quebra da aromaticidade. Porém, caso seja evidenciada a ocorrência da Adição de Michael, o produto será submetido a análises aprofundadas de NOESY e HMBC, afim de evidenciar o ponto exato do ataque nucleofílico.



**Esq. (13)** Mecanismo de ação proposto para o derivado LPSF/PTS-14 de acordo com sua similaridade química a Oxamniquina.

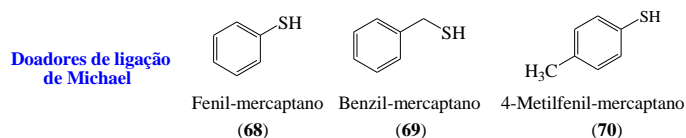
Para a avaliação desta hipótese o derivado LPSF/PTS-14 foi submetido à reação de adição de Michael com a glutatona (GSH), doador de ligação de Michael, utilizando condições reacionais que mimetizarão o meio fisiológico (Esquema 14).



**Esq. (14)** Proposição de reação entre o derivado LPSF/PTS-14, atuando como acceptor de ligação de Michael, e a GSH, atuando como doador de ligação de Michael e possível produto formado.

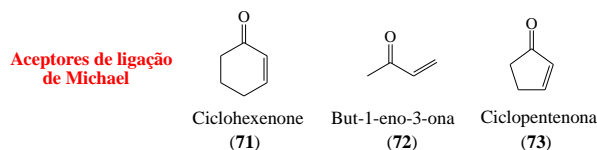
#### 6.4. Adição de Michael em Compostos Imidazolidínicos

Para a realização das reações de Michael os compostos foram submetidos à metodologia desenvolvida por Khatik, Kumar e Chakraborti, 2006,<sup>194</sup> onde 2,5 equivalentes do composto carbonílico insaturado são tratados com 1,1 equivalentes do tiol em presença de água a temperatura entre 30 e 35 °C. A segunda metodologia utilizou as mesmas quantidades catalíticas de reagente, solução tampão de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a pH 7,4 e 37 °C, afim de simular o fluido corpóreo. A adição de Michael em condições fisiológicas é mais seletiva para às proteínas contendo tiol em relação a nucleófilos de amina,<sup>176,195</sup> devido à maior nucleofilia do enxofre em comparação às aminas. Sendo assim, todos os nucleófilos escolhidos para esta etapa são compostos de enxofre e, com excessão do GSH, foram utilizados por Khatik, Kumar e Chakraborti na realização dos seus estudos em 2006, Figura 43.



**Fig. (43)** Clássicos doadores de ligação de Michael

Foram escolhidos aceptores de ligação de Michael utilizados no mesmo trabalho para validação da reatividade dos tiois nas condições empregadas. Os compostos reagirão sob as mesmas condições que o derivado indólico-imidazolidínico, Figura 44.



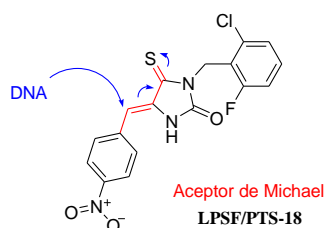
**Fig. (44)** Clássicos aceptores de ligação de Michael.

Apos a reprodução das reações realizadas por Khatik, Kumar e Chakraborti, foram obtidos os seguintes resultados disponíveis na tabela 8. As reações foram repetidas de acordo com as condições propostas pela metodologia 2, porém sem isolamento dos produtos, apenas identificação por CCM de suas formações. Todos os produtos reagiram como esperado, o que indica que as ambas as metodologias propostas são propícias para a formação dos produtos de Michael.

**Tab (8)** Reações de Michael realizadas primeiramente realizadas por Khatik, Kumar e Chakraborti em 2006<sup>194</sup> e reproduzidas neste trabalho para evidenciação da compatibilidade entre o meio reacional e a reação de Michael.

Enona	Tiol	Tempo	Rendimento
(71)	(68)	10 min	82 %
(72)	(69)	15 min	75 %
(73)	(70)	10 min	87 %
(72)	(68)	10 min	85 %
(71)	(70)	15 min	83 %
(73)	(69)	20 min	78 %

Seguindo a mesma metodologia, foram realizadas as reações de Michael no LPSF/PTS-14. Também foi utilizado o derivado imidazolidínico LPSF/PTS-18, não ativo e com alta citotoxicidade, esperando-se obter os resultados opostos aos encontrados pelo LPSF/PTS-14. Este derivado apresentou uma baixa atividade esquistossomicida, indução de mortalidade de 50% dos parasitas ao final de 120 horas na concentração de 10  $\mu$ M, e uma alta citotoxicidade de 10  $\mu$ M.





**Fig. (45)** Possível mecanismo de toxicidade do LPSF:PTS-18

Primeiramente foram realizadas as reações em água à temperatura de 35 °C, com tiois diversificados. Após mais de 24 h de reação não observou-se a formação dos produtos em nenhuma das tentativas realizadas. A temperatura da reação foi modificada para 120 °C, porém sem observação dos produtos esperados. As reações foram então realizadas em PBS à 37 °C, e mesmo após o aumento da temperatura à 120 °C, nenhum produto foi observado. Finalmente, condições mais severas foram utilizadas, com aumento da quantidade do tiol em presença de uma base forte, o KOH e MeOH a

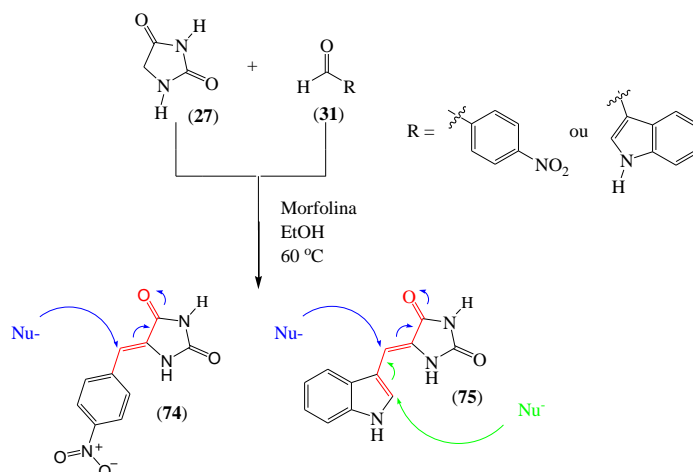
Derivado	Tiol	Metodologia	Tempo	Produto formado
LPSF/PTS-14	(68), (69), (70) e GSH	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> e 3 <sup>c</sup>	24 h	X
LPSF/PTS-18	(68), (69), (70) e GSH	1 <sup>a</sup> , 2 <sup>b</sup> e 3 <sup>c</sup>	24 h	X

refluxo. Um resumo das principais reações realizadas encontram-se na Tabela 9.

**Tab (9)** Reações de Michael realizadas nos derivado imidazolidinicos. <sup>a</sup>2,5 equivalentes do derivado LPSF/PTS, 1,1 equivalentes do tiol, H<sub>2</sub>O, 35 °C; <sup>b</sup> 2,5 equivalentes do derivado LPSF/PTS, 1,1 equivalentes do tiol solução tampão de PBS pH 7,4 e 37 °C; <sup>c</sup> 1 equivalente do derivado LPSF/PTS, 2,5 equivalentes do tiol, KOH, MeOH a refluxo.

### 6.5. Importância da Ligação C-3 e da Tionila em C-4 para a Adição de Michael

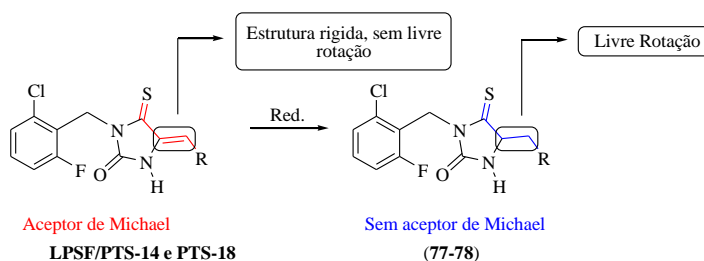
Como em nenhuma das reações com os compostos tioxo-imidazolidinicos-3,5-dissubstituídos foram identificadas a formação dos produtos de Michael, sintetizaram-se novos derivados 5-benzilidenos-imidazolidin-2,4-diona, afim de avaliar se o radical benzila e/ou a tionila teriam uma importância nesta reatividade. Para isto, a imidazolidina-2,4-diona reagiu diretamente com os aldeídos para formar os derivados (74), 5-((1*H*-indol-3-yl)methylene), e (75), 5-(4-nitro)-benzilideno. A formação de um produto de Michael nestas hipóteses seria um indicio da reatividade dos derivados LPSF/PTS-14 e/ou LPSF/PTS-18 em meio biológico no caso de hidrólise enzimática da ligação N-C da posição N-3 da imidazolidina e/ou oxidação enzimática da tionila em C-4.



**Esq. (15)** Diagrama de síntese dos derivados imidazolidínicos 5-substituídos (4) imidazolidina-2,4-diona; (7) carboxaldeído e proposição de mecanismo de Adição de Michael.

Apesar de realizada através da metodologia clássica, com aumento de temperatura, e em meio fisiológico, em nenhuma das tentativas foi observada a formação dos produtos de Michael, e após as etapas de purificação apenas os produtos de partida foram recuperados. Pode-se então concluir que os derivados imidazolidínicos sintetizados neste estudo, apesar de apresentarem pontos de possível ocorrência da ligação de Michael, não produzem seus efeitos esquistosomocidas e/ou tóxicos reagindo com nucleófilos através deste mecanismo.

A importância da reatividade química da dupla ligação para a atividade e toxicidade do derivado também será avaliada através da redução da mesma pela reação de hidrogenação catalítica (Esquema 16). Tanto o derivado LPSF/PTS-14 quanto o LPSF/PTS-18 serão submetidos a estas reações e após isolados e caracterizados, terão suas atividades esquistosomocidas e toxicidades avaliadas. Porém, não apenas a reatividade da dupla ligação será avaliada através da reação de redução, a conformação rígida da molécula será perdida através da formação da ligação simples, que apresenta uma livre rotação. Sendo assim, a perda ou aumento da atividade biológica / toxicidade também pode estar relacionada a mudança de conformação da molécula.



**Esq. (16)** Reação de redução da dupla ligação do derivado LPSF/PTS-14 e possível produto formado.

Até o presente momento, a hipótese mais plausível para o modo de ação destes derivados seria através de interações com receptores biológicos, como sugerido por Thibaut et al. em 2009.

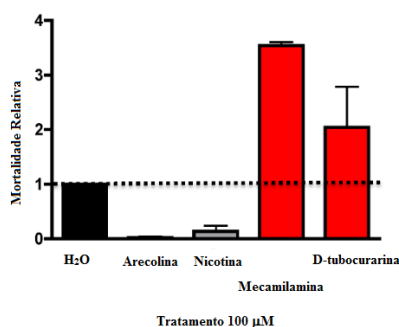
## 7. RECEPTORES COLINÉRGICOS

A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor em vertebrados e invertebrados. Os efeitos neuromusculares da ACh são tipicamente mediados pelos receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina (nAChRs). Estruturalmente, os nAChRs são membros da superfamília de receptores Cys-loop (LGIC). Eles formam estruturas homo e heteropentaméricas, que são organizadas em forma de barril em torno de um poro iônico-seletivo central.<sup>196</sup> Os nAChRs dos vertebrados são invariavelmente cation-seletivos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) e mediam respostas excitatórias. Os invertebrados, por outro lado, possuem canais de ACh cation e ânion seletivos ( $\text{Cl}^-$ ). Os canais de ACh ânion seletivos mediam a hiperpolarização da membrana e, portanto, acredita-se que desempenham um papel nas respostas inibitórias à ACh.

Um exemplo destes receptores em invertebrados é o Canal de Cloreto-Acetilcolina (ACC). Nematodos possuem um tipo incomum de ACC, mais estreitamente relacionado com outros canais de cloreto, como os receptores GABA, do que com os nAChRs.<sup>197,198</sup> Os ACCs não tinham sido identificados em nenhuma espécie de parasita, no entanto, evidências experimentais suportam um papel inibitório da ACh nos parasitas, que poderia ser mediado por este tipo de receptor. Estudos iniciais nos anos 60 observaram que a adição de agonistas colinérgicos exógenos a culturas de parasitas causou paralisia flácida de trematodos e cestodos adultos.<sup>199,200</sup>

A paralisia flácida indica relaxamento muscular e está em contradição direta com a resposta excitatória de contração tônica esperada pela estimulação colinérgica. Recentemente, a publicação do genoma do *S. mansoni*<sup>201</sup> foi o estímulo necessário para uma revisão da atividade inibitória incomum da ACh no parasita. MacDonald et al em 2014 descreveram uma nova classe de nAChR anion-seletivos (SmACCs) invertebrados específicos. Os canais iônicos formados por estas subunidades desempenham um papel inibitório na atividade neuromuscular do parasita, tal como sugerido pelos resultados de RNA inibitório (RNAi), de sua distribuição nos tecidos e propriedades farmacológicas frente a diversos agonistas colinérgico.<sup>202</sup>

No gráfico presente na figura 46 é possível de observar a mobilidade relativo dos vermes quando submetidos a agonistas (nicotina e arecolina) e antagonistas (mecamilamina e D-tubocurarina) dos receptores colinérgicos. Os padrões encontrados são inversos à atividade encontrada nos vertebrados.



**Fig. (46)** Motilidade relativa medida antes e 5 minutos após a adição de *compostos* colinérgicos a 100 mM. <sup>202</sup>

Neste trabalho foi possível se identificar ao menos a presença de dois receptores SmACCs, o SmACC1 e o SmACC2, com importantes funções na inibição neuromuscular. Ambas sub-unidades foram detectados em fibras nervosas menores do sistema nervoso submuscular dos músculos somáticos. Isto sugere que SmACC-1 e SmACC-2 medeiam os seus efeitos motores inibitórios de forma indireta, talvez modulando a liberação de outros neurotransmissores ou atuando como autoreceptores. Os receptores nicotínicos são conhecidos por mediar a liberação de outros neurotransmissores, incluindo neuropeptídeos e dopamina.<sup>203–205</sup> Nos esquistossomas, o sistema colinérgico e neuropeptidérgico (que é excitatório), estão muito próximos.<sup>206,207</sup> O equilíbrio entre esses sistemas pode, portanto, ser um fator importante na regulação do comportamento motor.

Assim como os composto agonistas colinérgicos utilizados por MacDonald et al em 2014 para ativar os receptores SmACCs o derivado LPSF/PTS-14 conduziu os parasitas à morte através da paralisia flácida do mesmo. Tal indício pode significar que seu modo de ação se desenvolve através da interação com os receptores SmACCs. Infelizmente os receptores SmACCs não foram ainda cristalizados, o que impossibilitou a realização de um modelo de docking, e a construção de um modelo através de homodimerização não poderia ser realizado a tempo habil. Faz-se necessária a utilização dos compostos imidazolidínicos, em especial o LPSF/PTS-14, em testes biológicos frente aos receptores SmACCS. A única alternativa viável para a validação desta hipótese, seria através do contato direto com o grupo canadense para a realização de uma parceria onde nossos compostos seriam avaliados frente aos SmACCs.

**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**  
**PARTE I**

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Primeiramente foram obtidos 24 derivados imidazolidínicos-3,5-dissubstituídos. Os compostos obtidos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas tendo suas estruturas confirmadas. Após a caracterização os derivados foram submetidos a análises quimiométricas, como a avaliação dos componentes principais (PCA), para a determinação dos compostos mais (dis)similares, com objetivo de submeter a menor quantidade a menor quantidade de compostos aos testes de atividade esquistossomicida.

Através da análise da PCA foram escolhidos 11 compostos, considerados os mais (dis)similares nos parâmetros escolhidos para o estudo, sendo eles o LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-3, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-6, LPSF/PTS-10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-18, LPSF/PTS-19, LPSF/PTS-21, LPSF/PTS-23 e LPSF/PTS-25.

Os derivados tioxo-imidazolidínicos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-21 e LPSF/PTS-23 e LPSF/PTS25 não foram citotóxicos nas concentrações avaliadas. Os derivados tioxo-imidazolidínicos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10 e LPSF/PTS23 foram os bastante ativos nos ensaios de viabilidade *in vitro* em vermes adultos de *S. mansoni*.

Os derivados LPSF/PTS6, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19 e LPSF/PTS-21, embora não tenham causado mortalidade, foram capazes de causar alteração de motilidade, inibição de oviposição e acasalamento dos vermes.

Com relação às alterações tegumentares, foi possível observar alterações como destruição de tubérculos com perda de espinhos e formação de vesículas nos vermes machos, e, erosão do tegumento nos vermes fêmeas em vermes adultos de *S. mansoni* após incubação com LPSF/PTS23.

Porém, o melhor derivado sintetizado neste trabalho foi o composto indólico-imidazolidínico LPSF/PTS-14. A alta taxa de mortalidade em baixas concentrações, aliadas a uma baixa citotoxicidade, alterações no acasalamento e oviposição, colocam a LPSF/PTS-14 como um promissor agente esquistossomicida.

Com os resultados da atividade biológica foi possível notar que apesar de não ser possível de se observar nenhum padrão referente à atividade esquistossomicida, um padrão na dispersão dos compostos no gráfico da PCA foi observado referente aos valores de citotoxicidade.

Desejando-se verificar se o modelo de PCA obtido para os derivados 4-tioxo-imidazolidin-2-ona possui propriedades preditivas frente à citotoxicidade foram sintetizados 2 novos derivados imidazolidínicos, o LPSF/PTS-5 e LPSF/PTS-24. Contrariamente ao esperado no início do estudo, os derivados não se comportaram de acordo com o previsto pelo modelo. Tanto o LPSF/PTS-5 quanto o LPSF/PTS-24 obtiveram valores contrários ao esperado. Concluiu-se que o modelo quimiométrico obtido através da técnica PCA não apresenta complexidade para prever a citotoxicidade dos compostos sintetizados, tendo em vista que as variáveis utilizadas no modelo possuem, possivelmente, uma baixa importância no fenômeno estudado.

Desejando-se obter informações mais precisas para a síntese de novos análogos e o desenvolvimento de modelos preditivos mais seguros, utilizou-se o software FLAP para a proposição de dois modelos de farmacóforos dos derivados. O primeiro através dos dois melhores derivados sintetizados e identificados na etapa da atividade biológica, o LPSF/PTS-14 e o LPSF/PTS-23, juntamente com os derivados imidazolidínicos mais ativos sintetizados pelo nosso grupo durante um período de 20 anos. Pode-se evidenciar através das análises a existência de zonas doadoras e aceptoras de ligações de hidrogênio, assim como interações hidrofóbicas. Porém, visto que as moléculas possuem uma enorme similaridade química entre os derivados estes resultados não podem ser totalmente conclusivos na determinação do farmacóforo. Para o desenvolvimento de um modelo farmacóforo mais confiável, faz-se necessária a identificação de compostos ativos com uma maior diversidade molecular.

O segundo modelo foi realizado utilizando-se o derivado LPSF/PTS-14, e as moléculas de referência no tratamento da esquistossomose. Nenhum ponto de similaridade é encontrado entre as moléculas. Tal observação deve-se ao fato que apesar de todas as moléculas apresentarem uma boa ação esquistossomicida não necessariamente apresentam o mesmo modo de ação no parasita. Sendo necessária a elucidação do modo de ação do derivado PTS-14 para a proposição de um modelo de farmacóforo.

A fim de se aumentar o espaço químico dos derivados indólicos-imidazolidínicos, e contribuir para um maior entendimento do farmacóforo foi realizada a síntese de 10 novos análogos indólicos-imidazolidínicos e indólicos-imidazolidínicos do derivado LPSF/PTS-14, através de pontos que após modificados nos levariam ao melhor entendimento da atividade a nível molecular. Em resumo, através de quatro principais modificações realizadas no derivado LPSF/PTS-14, foi concluído que: 1) A mudança do heteroátomo do anel heterocíclico central, para enxofre, ou seja, substituindo a imidazolidina por uma tiazolidina, não parece contribuir para ganho de atividade. Possivelmente o nitrogênio está envolvido na formação de ligações de hidrogênio; 2) o grupamento tionila parece desempenhar uma importante função na estrutura, tendo em vista que vários derivados sintetizados no laboratório que possuem atividade também o possuem; 3) a inserção de grupos retiradores de elétrons na posição C<sub>5</sub> do indol não aparente contribuir para ganho de atividade quando no caso de derivados imidazolidínicos; 4) a presença dos halogênios Cl e F na benzila em posição N-3 do anel imidazolidínico possui um papel ainda não evidenciado na atividade, porém essencial à atividade. Visto que a simples troca do fluoreto pelo cloreto reduz a atividade dos derivados.

Também foi avaliada a possibilidade da ocorrência de reação de Michael como possível mecanismo de ação ou toxicidade do derivado. Para tanto, foram escolhidos dois derivados o LPSF/PTS-14, devido à sua alta atividade e baixa citotoxicidade, e o LPSF/PTS-18, devido à sua alta citotoxicidade e baixa atividade. Apesar de realizada através da metodologia clássica, com aumento de temperatura, e em meio fisiológico, em nenhuma das tentativas foi observada a formação dos produtos de Michael, e após as etapas de purificação apenas os produtos de partida foram recuperados. Pode-se então concluir que os derivados imidazolidínicos sintetizados neste estudo, apesar de apresentarem pontos de possível ocorrência da ligação de Michael, não produzem seus efeitos esquistossomicidas e/ou tóxicos reagindo com nucleófilos através deste mecanismo.

As principais perspectivas decorrentes deste trabalhos seriam:

- 1) A avaliação da importância da reatividade química da dupla ligação para a atividade e toxicidade dos derivados através da redução da mesma pela reação de hidrogenação catalítica. Tanto o derivado LPSF/PTS-14 quanto o LPSF/PTS-18 serão submetidos a estas reações e suas atividades esquistossomicidas e toxicidades serão avaliadas.
- 2) Um modelo de farmacóforo mais confiável, através da identificação de novos compostos ativos obtidos pela modificação molecular nas sete posições susceptíveis do LPSF/PTS-14.
- 3) Os receptores de acetilcolina SmAACs, possíveis alvos biológicos dos compostos imidazolidínicos, devem ser avaliados para o entendimento de um possível mecanismo de ação. Caso possível, em seguida, a realização de um modelo de docking, desde que a proteína seja cristalizada. Através destas informações será possível o desenvolvimento de moléculas mais ativas através da síntese dirigida ao alvo



## **RESUME PARTIE I**

**SYNTHESE, CARACTERISATION STRUCTURALE ET  
EVALUATION BIOLOGIQUE DE NOUVEAUX  
DERIVES IMIDAZOLIDINIQUES 3,5-DISUBSTITUES**

## INTRODUCTION

Les maladies parasitaires ont des caractéristiques communes en relation avec le contexte dans lequel elles se produisent comme des conditions d'hygiène précaire ou inexistante, le manque d'installations sanitaires de base, le sous développement des pays, ou encore en raison de la présence de vecteurs qui contribuent directement à la transmission, comme par exemple, la schistosomiase et la leishmaniose. Les méthodes de traitement et de diagnostic de ces maladies sont vieilles et inappropriées et nécessitent des investissements dans la recherche et le développement pour devenir plus simple et efficace.<sup>15</sup>

Aussi appelé maladies négligées ou de pauvreté, ces maladies parasitaires sont d'importants problèmes de santé publique dans de nombreux pays sous-développés et en développement. En affectant plus de deux milliards de personnes dans le monde, elles sont des causes importantes de morbidité et de mortalité.<sup>16</sup> Elles sont appelées ainsi du fait du manque d'attention accordée par l'industrie pharmaceutique pour leur traitement. À l'heure actuelle, l'Organisation Mondiale de la Santé classe 17 affections comme maladies négligées, entre autres la maladie de Chagas, la schistosomiase, la leishmaniose, le paludisme et la tuberculose.<sup>17</sup>

Ces maladies présentent des zones d'endémie au Brésil et ont un taux important de mortalité et de morbidité dans le pays. La schistosomiase (EM CID 10 B 659), causée par le trématode *Schistosoma mansoni*, à l'origine appelée bilharziose, occupe le deuxième rang en importance des maladies de santé publique, après la malaria. Les études récentes de l'OMS ont montré une incidence d'environ 243 millions de personnes infectées par *S. mansoni*. La schistosomiase est associée à vingt mille décès par an causés par les conséquences graves de l'infection, y compris la fibrose hépatique et l'hypertension portale chez les malades.<sup>2</sup>

Les deux principaux médicaments utilisés dans le traitement de la schistosomiase sont l'Oxaminiquina (OXA) (Mansil® - Pfizer S.A.) et le Praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Oswaldo Cruz Foundation / FIOCRUZ).<sup>2,18</sup>

Le PZQ est utilisé pour traiter toutes les schistosomiasis humaines, car il peut éliminer les vers adultes, au cours de la phase chronique de l'infection,<sup>19</sup> l'OXA est l'autre médicament disponible, mais son utilisation est limitée et n'est pas efficace contre toutes les formes du parasite.<sup>13</sup>

À l'heure actuelle, le PZQ a été le médicament de choix pour le traitement médicamenteux au Brésil et au monde, mais son utilisation extensive conduit inévitablement à baisse du taux de guérison, par l'apparition d'isolats de *S. mansoni* réfractaires. Des effets secondaires importants sont par ailleurs causés par ce médicament.<sup>21</sup> Par conséquent, la recherche de nouveaux médicaments schistosomicides plus efficaces est devenu nécessaire. Dans ce contexte, la recherche d'autres composés de synthèse constitue une alternative viable, qui pourrait servir de modèle pour la conception de nouveaux médicaments.

Les politiques d'incitation à la recherche de nouveaux médicaments ont été stimulées par le Programme Spécial de Recherche et Formation sur les Maladies Tropicales (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*) (TDR) de l'OMS et DNDi (*Drugs for Neglected Diseases*).<sup>22</sup> L'utilisation de nouveaux médicaments dans la pharmacothérapie est nécessaire pour le traitement de maladies déjà existantes ou nouvellement identifiées, ou même pour la mise en œuvre de traitements plus sûrs et plus efficaces.<sup>23</sup>

Les composés dérivés de l'imidazolidine représentent un groupe de substances hétérocycliques pentagonales possédant diverses activités biologiques.<sup>208</sup> Des études avec des dérivés imidazolidiniques ont montré des activités leishmanicide,<sup>4</sup> antifongique, antimicrobienne et trypanocide.<sup>5</sup>

Dans la pratique médicale, les imidazolidines avaient comme seul représentant un médicament d'action prouvée contre les vers adultes de *S. mansoni*, le niridazole.<sup>24</sup> L'activité schistosomicide *in vitro* contre les vers adultes de *S. mansoni* des dérivés imidazolidiniques a été rapportée dans certaines études publiées par notre groupe.<sup>7,11,25,71,209</sup>

Considerant la nécessité de rechercher de nouveaux composés schistosomicide pour le traitement de la schistosomiase et les résultats de l'activité *in vitro du noyau imidazolidinique* sur le *S. mansoni*, nous avons entrepris la synthèse de nouveaux dérivés imidazolidiniques 3,5-disubstitués soufrés en position 4 pour l'utilisation dans le traitement de la schistosomiase. Nous avons aussi cherché à établir un modèle possible de pharmacophore, et à utiliser un modèle chimiométrique pour la prédiction de l'activité.

Ce travail devrait contribuer au processus de prise de conscience de la communauté scientifique sur l'importance des imidazolidines comme alternatives contre *S. mansoni*.

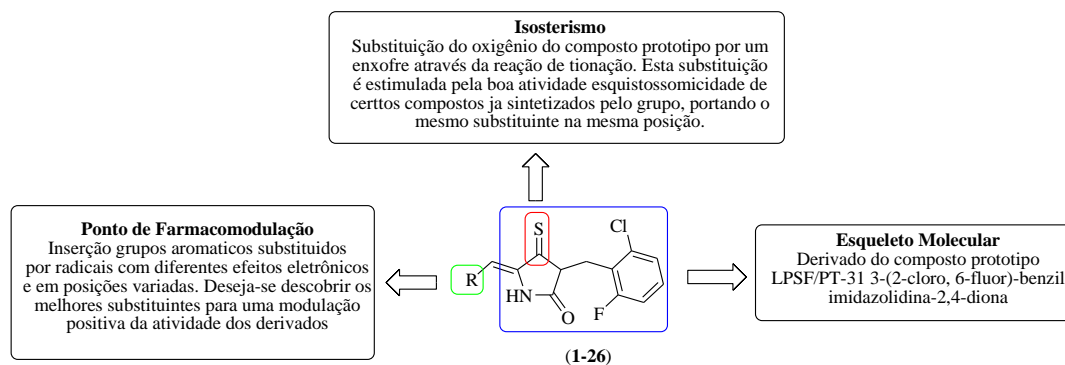
## 2. OBJECTIFS

Tout d'abord, le choix des imidazolidines par rapport aux thiazolidines résulte de l'observation selon laquelle, parmi les composés décrits dans la littérature, seuls ceux portant le noyau imidazolidinique avaient une activité schistosomicide significative.

La structure de nouveaux composés dérivent de celle du LPSF/PT 31, connu comme agoniste des récepteurs  $\alpha_{2A}$  adrénergiques. Le choix de ce squelette vient de la proposition selon laquelle les dérivés imidazolidiniques ont pour cible un récepteur de l'acétylcholine. Cette hypothèse a été soulevée dans un article récent publié dans notre groupe par Oliveira et coll. en 2015.<sup>11</sup>

Le groupe thionyle en position C-4 du cycle imidazolidinique a été choisi en raison des nombreuses preuves de l'action schistosomicide déjà publiés par notre équipe. Enfin, les modifications apportées dans le groupe méthylène sont liés à une tentative de pharmacomodulation de ces dérivés, afin de

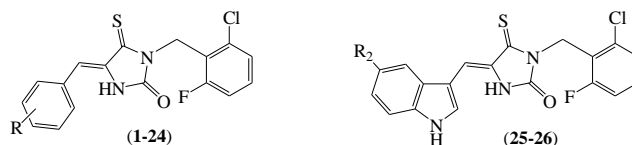
moduler de nombreuses propriétés d'intérêt, telles que la solubilité, la cytotoxicité et l'activité schistosomicide, entre autres.



**Fig. (1)** Modifications structurelles réalisées pour l'obtention de la série LPSF/PTS

## 2.1. Objectifs Généraux

Il est prévu la synthèse et le caractérisation structurale de nouvelles molécules imidazolidiniques et indoliques-imidazolidiniques, avec différents substituants aromatiques en position C-5 des anneaux imidazolidiniques ainsi que l'évaluation schistosomicide *in vitro* et *in vivo* des dérivés.



**Fig. (2):** Structure Générale des dérivés benzylidéniques-imidazolidiniques, et Indoliques-imidazolidiniques

## 2.2. Objectifs spécifiques

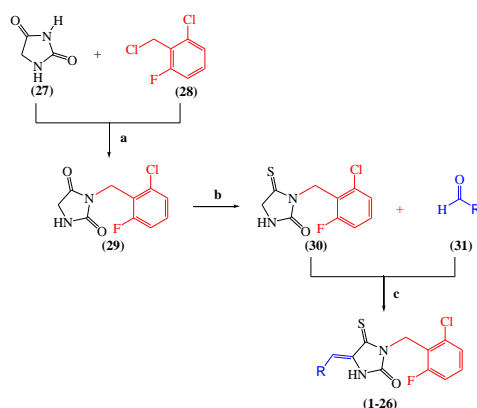
- Synthétiser une série de dérivés de 5-arylidène-3-(2-chloro, 6-fluoro)-benzyl-imidazolidin-2-thioxo-4-one à partir de réactions d'addition de type N-alkylation, thionation et addition de Michael entre les cycles pentagonaux et les benzaldéhydes substitués;
- Déterminer les propriétés physico-chimiques et caractérisation structurale des composés synthétisés à l'aide des méthodes spectrométriques conventionnelles (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et IR), la spectrométrie de masse et analyse élémentaire;
- Analyse de la dissimilarité des dérivés de la série 5-arylidène-3-(2-chloro, 6-fluoro)-benzyl-2-imidazolidin-thioxo-4-one (PT), par l'analyse en composants principaux (PCA);
- Évaluer la sensibilité *in vitro* des vers adultes de *S. mansoni* (CEPA LE) en présence des dérivés imidazolidiniques de la série LPSF / PTS sélectionnés par PCA;

- Vérifier la sensibilité *in vivo* des vers adultes de *S. mansoni* (CEPA LE) en présence des dérivés imidazolidiniques de la série LPSF / PTS sélectionnés suite à l'étude *in vitro*;
- Evaluer la cytotoxicité des composés de la série LPSF / PTS;
- Effectuer des analyses ultrastructurales du tégument des vers adultes de *S. mansoni* traités avec le dérivé LPSF / PTS;
- Valider l'analyse prédictive du modèle chimiométrique des nouveaux dérivés 4-thioimidazolidin-2-one 3,5-disubstitués;
- Réaliser des modifications structurales sur le meilleur dérivé trouvé dans l'étude pour mieux comprendre la relation entre la structure chimique et l'activité biologique;
- Déterminer des modèles de pharmacophores par le programme FLAP sur le composé le plus actif trouvé dans l'étude;
- Evaluer la réactivité des dérivés vis à vis de la réaction d'Addition de Michael;
- Proposer une cible biologique pour les composés synthétisés

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Synthèse des Dérivés Imidazolidiniques

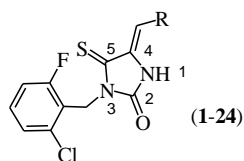
Les dérivés imidazolidiniques et thiazolidiniques ont été obtenus à partir d'une voie convergente déjà optimisée dans le Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos en utilisant des réactions de *N*-alkylation, condensation de Knoevenagel, et addition de Michael (schéma 4).



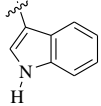
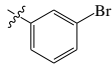
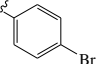
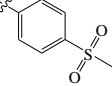
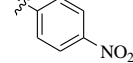
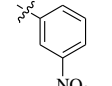
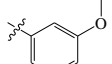
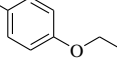
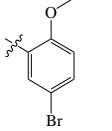
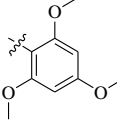
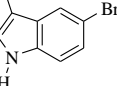
**Sch. (1)** Schéma de synthèse des dérivés imidazolidiniques 3,5-disubstitués (1-26)

Dans le tableau ci-dessous reprend les données physicochimiques des dérivés imidazolidiniques obtenus.

Tab (1) Dados físico-químicos dos derivados imidazolidínicos obtidos



Derivados	R	Rendimento	Rf	Faixa de Fusão	Massa Molar
PTS-1		36%	0,42 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	268°C	415.92
PTS-2		20,5%	0,56 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	260°C	429.94
PTS-3		49%	0,48 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	232°C	431.92
PTS-4		33%	0,6 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	264°C	452.93
PTS-40		76%	0,59 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	197°C	350.77
PTS-6		59%	0,57 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7,5:0,5)	224°C	423.90
PTS-7		48%	0,4% ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	216°C	376.84
PTS-8		70,5%	0,57 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	230°C	360.84
PTS-9		26%	0,48 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	215°C	346.81
PTS-10		27%	0,55 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	269°C	389.88
PTS-11		66%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	210°C	406.86
PTS-12		69%	0,44 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	236°C	436.89
PTS-13		76%	0,52 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	197°C	374.86

PTS-14		26%	0,52 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	269°C	385.85
PTS-15		46%	0,47 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7,5:2,5)	158°C	425.70
PTS-16		40,5%	0,43 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	210°C	425.70
PTS-17		33%	0,56 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	212°C	424.89
PTS-18		55%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 8:2)	211°C	392.81
PTS-19		65%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7,5:2,5)	200°C	392.81
PTS-20		31%	0,56 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	161°C	376.84
PTS-21		72%	0,53 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	217°C	390.86
PTS-22		56.5%	0,43 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 7:3)	184 °C	455.73
PTS-23		46%	0,4 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 6:4)	152°C	436.89
PTS-25		43%	0,6 ( <i>n</i> -Hex/AcOEt, 1:1)	207°C	464.73

### 3.2. Etude Chimiométrique

L'analyse des données multivariées devient de façon croissante, un domaine important de la chimie et des autres sciences. Cela donne à penser que la tendance actuelle de la pensée scientifique implique un raisonnement multivariée, principalement en raison du développement technologique réalisé au cours du siècle dernier. La PCA est probablement la méthode chimiométrique la plus répandue, et en raison de l'importance des mesures multivariées en chimie, elle est considérée par beaucoup comme une méthode de choix dans la recherche de médicaments. <sup>134</sup>

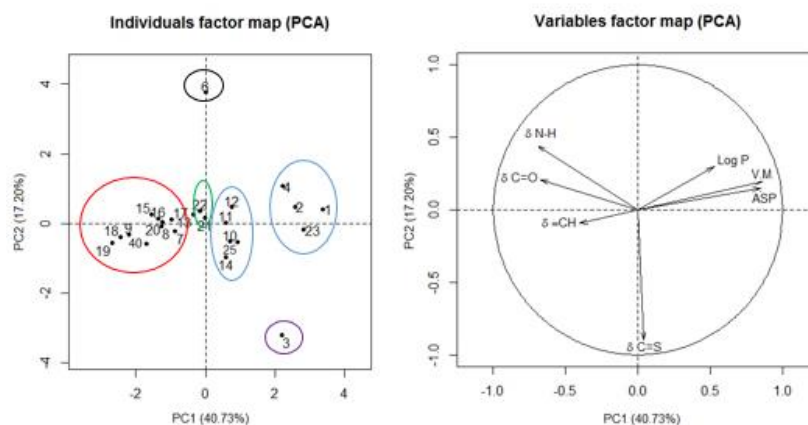
La première étape dans les études de corrélation implique la sélection d'un ensemble pertinent de paramètres ou propriétés moléculaires pour obtenir la meilleure corrélation possible. Les variables choisies pour une étude préliminaire de l'PCA devraient couvrir principalement des données électroniques, de lipophilie et volume, faciles à mesurer. Les paramètres retenus pour l'évaluation de la PCA dans cette étude étaient les suivants: (1) le déplacement du proton N-H du cycle imidazolidinique,  $\delta_{N-H}$ ; (2) le déplacement du proton du carbone méthylénique,  $\delta_{CH}$ ; (3) le déplacement du carbone carbonyle,  $\delta_{C=O}$ ; (4) le déplacement du carbone thionyle,  $\delta_{C=S}$ ; (5) Log P théorique des 24 dérivés calculées en utilisant la plate-forme EPA, (*Environmental Protection Agency*, <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/index.htm>); (6) le volume moléculaire calculé par le programme MarvinSketch; (7) Aire de Surface Polaire calculée par le programme MarvinSketch.

La PCA de ces données peut être représentée par une matrice X composée de  $p = 7$  variables (déplacements chimiques, volume moléculaire, l'aire de superficie polaire et LogP) et  $n = 24$  objets (les composés synthétisés). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le pack FactoMineR dédié aux analyses multivariées, disponible dans le logiciel R.<sup>135</sup>

La PCA montre que 64.7 % des informations contenues dans le tableau 5 peuvent être représentés en deux composantes principales (PC). Dans la figure 28 présente le graphique des scores de PC1 (40.73 % de la variance) *versus* PC2 (17.2 % de variance). PC1 est principalement définie par le volume moléculaire, et l'aire de superficie polaire pour des valeurs positives, et  $\delta_{N-H}$  pour des valeurs négatives. La PC2 est principalement définie par le déplacement  $\delta_{C=O}$  et  $\delta_{N-H}$ , pour les valeurs positives et déplacement  $\delta_{C=S}$  pour des valeurs négatives (informations obtenues par les "loadings", i.e., les coefficients dans les équations qui définissent le PC's, représentés dans la figure 3).

Grâce à l'analyse en PCA, 11 composés, considérés comme les plus (dis)similaires aux paramètres choisis pour l'étude, ont été sélectionnés. Ceux sont LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-3, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-6, LPSF/PTS-10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-18, LPSF/PTS-19, LPSF/PTS-21, LPSF/PTS-23 et LPSF/PTS-25.





$$PC1 = -0.413 \delta_{N-H} - 0.24 \delta_{CH} + 0.025 \delta_{C=S} - 0.4 \delta_{C=O} + 0.511 \text{ Vol. Mol.} + 0.503 \text{ ASP} + 0.311 \text{ LogP}$$

$$PC2 = 0.405 \delta_{N-H} - 0.085 \delta_{CH} - 0.818 \delta_{C=S} + 0.19 \delta_{C=O} + 0.178 \text{ Vol. Mol.} + 0.134 \text{ ASP} + 0.27 \text{ LogP}$$

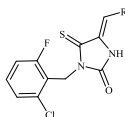
**Fig. (3)** Graphique PC1 x PC2.

### 3.3. Evaluation de l'Activité Schistosomicide

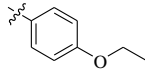
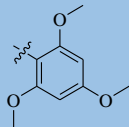
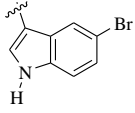
Dans la recherche de nouvelles molécules à activité biologique contre *S. Mansoni*, la réalisation d'essais biologiques *in vitro* est indispensable, car cette étape est essentielle pour trouver une substance leader qui pourra être utilisée plus tard dans des essais *in vivo*, ce qui réduit les coûts de ce processus. Pour cette raison, lorsque des substances sont testées empiriquement sans qu'il n'y ait aucune connaissance préalable de leur effet potentiel, le test *in vitro* fournit un paramètre initial de sorte qu'il peut ensuite servir de base à une approche rationnelle. Grâce à cette sélection initiale, plusieurs caractéristiques structurales peuvent être déterminés, afin d'évaluer leur importance sur l'activité.<sup>138</sup>

Les dérivés thioxo-imidazolidiniques sont bien connus pour leur efficacité *in vitro*<sup>6-8,11,72,140</sup> et *in vivo*.<sup>10</sup> Nous avons observé la mort des vers adultes de *S. mansoni* après l'addition des composés LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-6, LPSF/PTS-10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-18, LPSF/PTS-19, LPSF/PTS-21, LPSF/PT-S23 e LPSF/PTS-25, après 120 heures. (Table 2).

**Tab (2)** Relation entre les dérivés thio-imidazolidiniques et la réponse biologique sur les vers adultes de *Schistosoma mansoni*. En bleu les dérivés les plus actifs et en rouge les moins actifs.



Derivado	R	Resposta Biológica
PTS-2		Citotoxicidade: > 100 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 80 µM
PTS-4		Citotoxicidade: > 100 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 80 µM
PTS-6		Citotoxicidade: > 10 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade:-
PTS-10		Citotoxicidade: > 100 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: 20 µM
PTS-14		Citotoxicidade: > 5 µg/mL Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: 5 µg/mL
PTS-18		Citotoxicidade: > 10 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: -
PTS-19		Citotoxicidade: > 10 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterada Mortalidade: -

PTS-21		Citotoxicidade: 25 µg/mL Oviposição: Não inibido Acasalamento: vermes unidos Motilidade: Não alterada Mortalidade: -
PTS-23		Citotoxicidade: > 100 µM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 5 µM
PTS-25		Citotoxicidade: > 5 µg/mL Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: 40 µg/mL

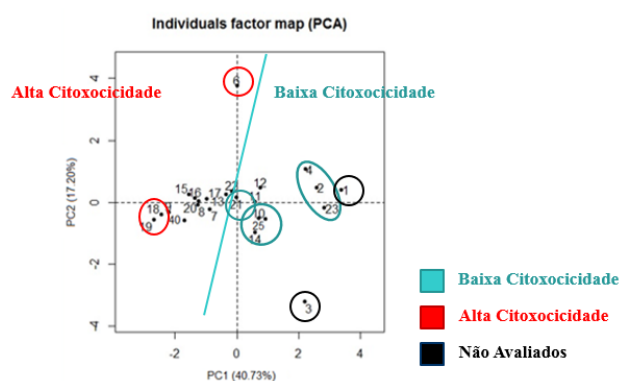
Les dérivés thioxo-imidazolidiniques LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-10, LPSF/PTS-14, LPSF/PTS-21 e LPSF/PTS-23 e LPSF/PTS-25 n'ont pas été cytotoxiques dans les concentrations évaluées. Les dérivés LPSF/PTS-2, LPSF/PTS-4, LPSF/PTS-10 e LPSF/PTS-23 ont été actifs dans les tests *in vitro* sur les vers adultes de *S. Mansoni*.

Les dérivés LPSF/PTS6, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19 et LPSF/PTS-21, bien qu'ils n'ont pas causé la mortalité, ont été en mesure de provoquer un changement de la motilité, l'inhibition de la ponte et de l'accouplement des vers.

En ce qui concerne les modifications tégumentaires, il a été possible d'observer des altérations comme la destruction des tubercules avec une perte des épines et la formation de vésicules dans les vers mâles, et l'érosion des téguments chez les vers femelles dans les vers adultes de *S. mansoni* après incubation avec LPSF/PTS23.

Cependant, le meilleur dérivé synthétisé dans ce travail a été le composé indole-imidazolidinique LPSF / PTS-14. Le taux élevé de mortalité à de faibles concentrations, couplé à une faible cytotoxicité, ainsi que les changements dans l'accouplement et la ponte, placent LPSF/PTS-14 comme un agent schistosomicide prometteur.

Avec les résultats de l'activité biologique il a été possible d'observer une corrélation entre la dispersion des composés et les valeurs de cytotoxicité. Neanmoins aucune relation concernant l'activité schistosomicide n'est observable dans le graphique de PCA



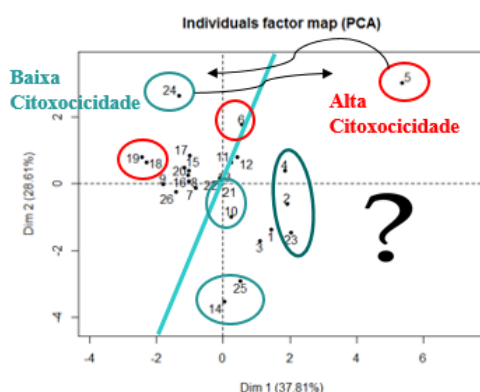
$$PC1 = -0.413 \delta_{N-H} - 0.24 \delta_{-CH} + 0.025 \delta_{C-S} - 0.4 \delta_{C=O} + 0.511 \text{ Vol. Mol.} + 0.503 \text{ ASP} + 0.311 \text{ LogP}$$

$$PC2 = 0.405 \delta_{N-H} - 0.085 \delta_{-CH} - 0.818 \delta_{C-S} + 0.19 \delta_{C=O} + 0.178 \text{ Vol. Mol.} + 0.134 \text{ ASP} + 0.27 \text{ LogP}$$

**Fig. (4):** Graphique des scores de PC1 et PC2 et corrélation avec la cytotoxicité des dérivés

### 3.4. Evaluation des Propriétés Prédictives du Modèle PCA

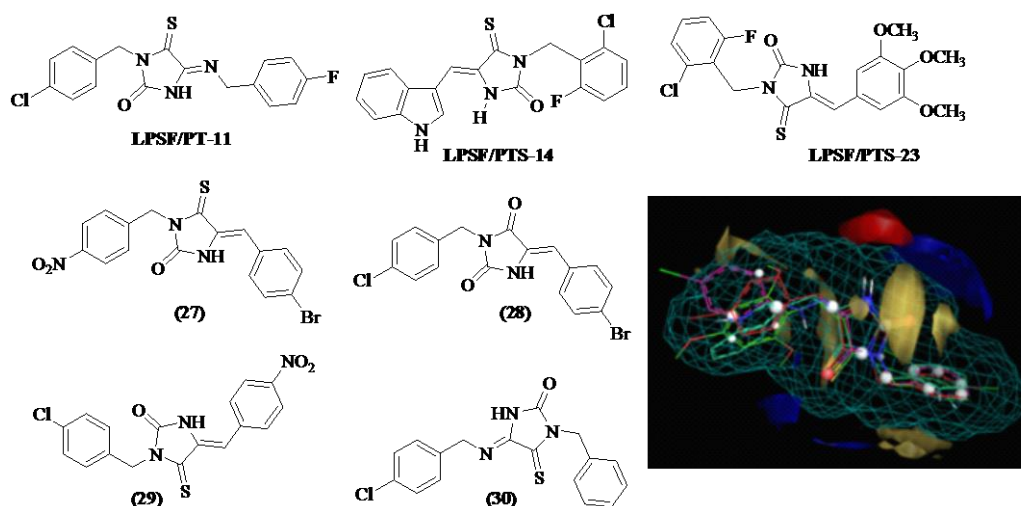
Afin d'évaluer les propriétés prédictives du modèle PCA obtenu pour les 4-thioxo-imidazolidine-2-ones pour la cytotoxicité, deux nouveaux dérivés ont été synthétisés, LPSF/PTS-5 et LPSF/PTS-24. Contrairement à nos attentes, les dérivés ne se comportaient pas en accord avec la prévision du modèle. LPSF / PTS-5 comme LPSF / PTS-24 ont montré des valeurs contraires aux prévisions. Il a été conclu que le modèle chimiométrique obtenu par la PCA n'a pas suffisamment de complexité pour prévoir la cytotoxicité des composés synthétisés compte tenu que les variables utilisées dans le modèle ont possiblement une faible importance dans le phénomène étudié.



**Fig. (5)** Graphique PC1xPC2 des 26 dérivés imidazolidiniques jointes aux activités obtenues

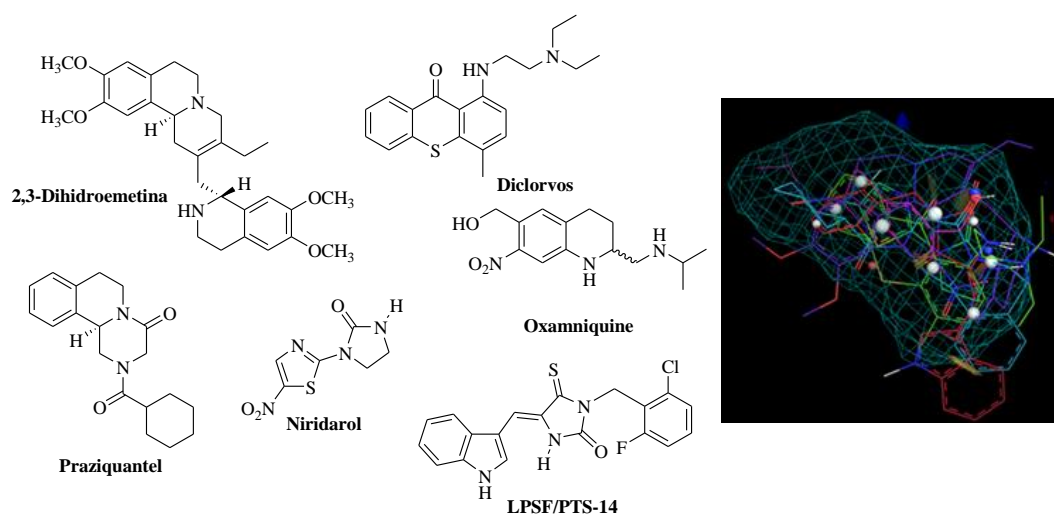
### 3.5. Identification du Pharmacophore

Afin d'obtenir des informations plus précises pour la synthèse de nouveaux analogues et le développement de modèles prédictifs plus sûrs, nous avons utilisé le logiciel FLAP pour proposer deux modèles de pharmacophores. Le premier modèle est basé sur les deux meilleurs dérivés synthétisés et identifiés dans l'étape de l'activité biologique, LPSF/PTS-14 et LPSF/PTS-23, et sur les dérivés imidazolidiniques les plus actifs synthétisés par notre groupe sur une période de 20 ans. Nous pouvons mettre en évidence à travers les analyses l'existence de zones donneur et accepteur de liaisons hydrogène, ainsi que les interactions hydrophobes. Cependant, étant donné que les molécules présentent une grande similitude structurale ces résultats ne sont pas entièrement concluants pour la détermination du pharmacophore. Pour le développement d'un modèle de pharmacophore plus fiable, il est nécessaire d'identifier des composés actifs avec une diversité moléculaire plus élevée.



**Fig. (6)** Structures utilisés pour la construction du modèle de pharmacophore ainsi que le modèle obtenu. Les points bleus représentent les zones donneuses de liaison d'hydrogène; en rouge: les zones acceptrices de liaison d'hydrogène; et en jaune: les zones hydrophobes.

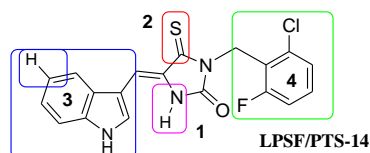
Le deuxième modèle a été réalisé en utilisant le dérivé LPSF / PTS-14 et les molécules de référence utilisées dans le traitement de la schistosomiase. Nous avons obtenu un modèle sans point de similarité entre les molécules. Cette observation est due au fait que, bien que toutes les molécules présentent une bonne action schistosomicide, elles n'ont pas nécessairement le même mode d'action sur le parasite. Il est nécessaire d'élucider le mode d'action du dérivé PTS-14 pour la proposition d'un modèle de pharmacophore.



**Fig. (7)** Les composés schistosomicide utilisés dans l'étude, et le modèle obtenu.

### 3.6. *Hit to Lead* – Modifications structurales sur le LPSF / PTS-14

Afin d'augmenter l'espace chimique des dérivés indole-imidazolidiniques, et contribuer à une meilleure compréhension du pharmacophore, nous avons réalisé la synthèse de 10 nouveaux analogues indole- imidazolidiniques et indole-thiazolidiniques du dérivé LPSF/PTS-14. En résumé, à travers quatre grandes modifications du dérivé LPSF/PTS-14 nous avons montré que: 1) Le changement de l'hétéroatome de l'hétérocycle central par un soufre, ou en d'autres termes la substitution de l'imidazolidine par une thiazolidine, ne semble pas augmenter l'activité. Éventuellement l'azote est impliqué dans la formation des liaisons hydrogène; 2) le groupement thionyle semble jouer un rôle important dans la structure, étant donné que les divers dérivés actifs précédemment synthétisés dans le laboratoire le portent également; 3) l'insertion de groupes atracteurs d'électrons de la position C<sub>5</sub> de l'indole n'apporte aucun gain d'activité; 4) la présence des halogènes Cl et F sur le groupe benzyle en position N-3 du cycle joue un rôle essentiel sur l'activité, étant donné que le simple échange du fluor par un chlore réduit l'activité des produits dérivés.



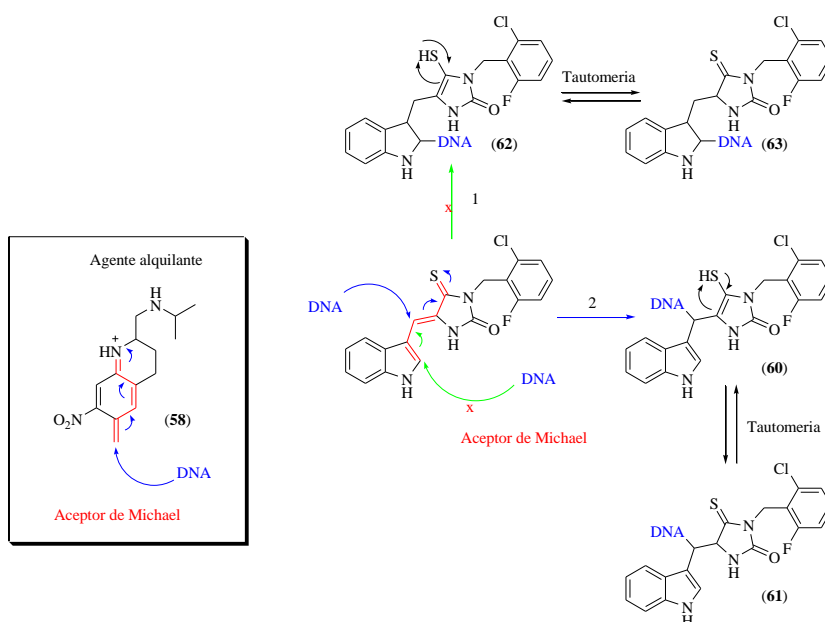
**Fig. (8)** Principaux points possibles d'analyse de relation entre la structure chimique et l'activité biologique.

### 3.7. Addition de Michael; Une Proposition de Mécanisme d'Action et/ou de Toxicité

La réaction de Michael dans un milieu biologique peut être responsable de la toxicité des dérivés pour les organismes vivants, comme dans le cas des hydrocarbures halogénés;<sup>191,192</sup> ou de la bioactivation de la molécule, comme dans le cas des dérivés de thiopurine;<sup>193</sup> ou encore de l'effet principal de la molécule, comme le cas de oxamniquine.<sup>190</sup>

L'hypothèse ici abordée est basée sur la structure chimique du dérivé LPSF/PTS-14, qui, ainsi que l'oxamniquine, comporte une partie contenant des carbones  $\alpha, \beta$  insaturés (schéma 2, en rouge), pouvant alors réagir comme accepteurs de Michael avec des sites nucléophiles de l'ADN de *Schistosoma* entraînant la mort du parasite. Cependant, il peut également être responsable des effets cytotoxiques trouvés dans certains produits.

Nous avons évalué la possibilité d'occurrence de la réaction de Michael en tant que mécanisme d'action ou de toxicité possible du dérivé. A cet effet, deux dérivés ont été choisis: LPSF/PTS-14, en raison de sa haute activité et une faible cytotoxicité et LPSF/PTS-18, en raison de sa haute cytotoxicité et activité basse. Bien que réalisées par des procédés classiques, à différentes températures, et en milieux physiologiques, aucun essai n'a conduit à la formation de produits de Michael, et seuls les produits de départ ont été récupérés. Nous pouvons conclure que les dérivés imidazolidiniques synthétisés dans cette étude, bien que présentant des sites de type accepteur de Michael, ne produisent pas leurs effets schistosomicides et / ou toxicologiques en réaction avec un nucléophile par ce mécanisme.



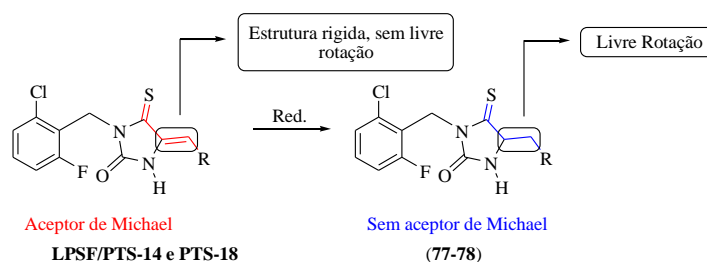
**Sch. (2)** Mécanisme d'action proposé pour le dérivé LPSF/PTS14 en accord avec la similarité chimique avec l'Oxamniquine.

#### 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les principales perspectives découlant de ces travaux sont:

Le dérivé indole-imidazolidinique, LPSF/PTS-14, a donné des résultats supérieurs au PZQ, la mort de 100% des vers sous 24 heures à une concentration de 5 µg/mL et une toxicité inférieure à 5 µg/mL par rapport aux splénocytes BALB/c des souris. Ces résultats ont conduit au développement d'un modèle de pharmacophore avec le logiciel FLAP, ainsi que l'évaluation du mode d'action via réaction d'addition de Michael, et à la tentative de développement d'un modèle de prédiction de la cytotoxicité.

1) L'évaluation de l'importance de la réactivité chimique de la double liaison pour l'activité et la toxicité des dérivés LPSF/PTS-14 et LPSF/PTS-18.



**Esq. (3)** Réaction de réduction de la double liaison du dérivé et possible produit formé

2) Création d'un modèle de pharmacophore plus fiable grâce à la synthèse et étude de nouveaux composés obtenus par modification moléculaire dans les sept positions sensibles du LPSF / PTS-14.

3) Comme les composés agonistes cholinergiques utilisés par MacDonald et al. en 2014 pour activer les récepteurs SmACCs, le dérivé LPSF / PTS-14 a conduit les parasites à la mort par la paralysie flasque. Un tel indice peut signifier que son mode d'action implique l'interaction avec les récepteurs SmACCs. Malheureusement les récepteurs SmACCs n'ont pas encore été cristallisés, ce qui empêche à ce jour la réalisation d'un modèle de docking, et la construction d'un modèle d'homodimérisation n'a pas pu être réalisé en temps utile. Il serait nécessaire de tester les composés imidazolidiniques, en particulier LPSF / PTS-14, sur les récepteurs SmACCS.



# **PARTIE II**

**SYNTHESE D'AMINOGLYCOSIDES AMPHIPHILES A  
BASE DE NEOSAMINE**

**INTRODUCTION**  
**PARTIE II**

## INTRODUCTION GENERALE

Tout au long de l'histoire, l'humanité a été victime de nombreuses pandémies extrêmement mortelles telles que celles dues au choléra, à la peste, la grippe, la fièvre typhoïde, la tuberculose ou encore à d'autres maladies infectieuses. D'autres maladies telles que les infections de l'oreille, de la peau et de la gorge, peuvent également être responsables de nombreuses complications telles que la surdité. Jusqu'au milieu du XIX<sup> me</sup> siècle, l'espérance de vie en Europe et en Amérique du Nord était en moyenne de 50 ans, avec de grandes chances de décès prématurés dus aux maladies infectieuses.<sup>1</sup>

La découverte et l'innovation des antibiotiques sont considérées comme l'une des principales réalisations de l'humanité. Sans ces derniers, les naissances prématurées seraient difficiles, la plupart des interventions chirurgicales et des greffes seraient impossibles, les thérapies cytotoxiques pour le cancer conduiraient à des infections mortelles et les hôpitaux deviendraient des nids   bactéries. Depuis la découverte des antibiotiques, l'espérance de vie a été augmentée de plus de 20 ans et des millions d'infections, auparavant considérées comme fatales, ont pue  être traitées.<sup>2-4</sup>

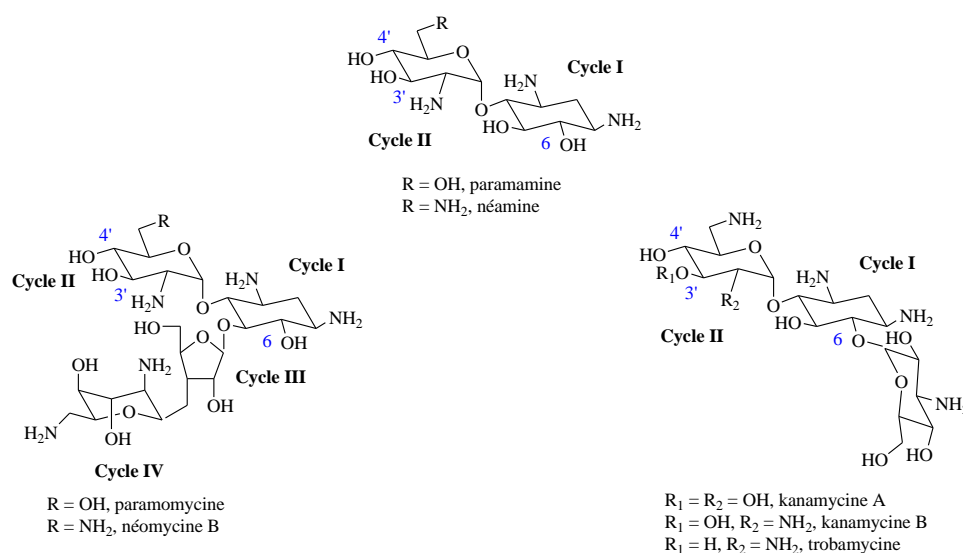
Les aminoglycosides sont une partie importante de l'arsenal thérapeutique antibactérien depuis leur découverte dans les années 40 et constituent la première classe d'antibiotiques découverts par criblage de produits naturels avec une activité antibactérienne. En 1944, le laboratoire Waksman est le premier à identifier et isoler la streptomycine, un aminoglycoside antibiotique synthétisé par des bactéries du sol. Depuis, d'autres aminoglycosides ont été isolés et sont généralement administrés par voie topique ou intraveineuse. La néomycine (néomycine) a été isolée à partir de la bactérie *Streptomyces fradiae* et possède une meilleure activité contre les bactéries Gram aérobie (+) que de la streptomycine. La gentamicine a été isolée à partir de *Micromonospora* en 1963 et constitue une percée majeure dans le traitement des infections à bacilles à Gram négatif, y compris celles provoquées par *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>5</sup>

Généralement, le nom associé à une substance est lié à son origine. Par exemple, les noms se terminant par « mycine » correspondent à des molécules qui sont directement ou indirectement dérivés de *Streptomyces*. A l'inverse, ceux se terminant par « micine » correspondent à des molécules provenant directement ou indirectement de *Micromonospora*.<sup>5,6</sup>

Les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides, naturels ou semi-synthétiques dont le spectre d'action implique les bactéries à Gram (+) et Gram (-). De tels dérivés possèdent un effet de synergie avec d'autres antibiotiques, comme les  -lactamines.<sup>7-10</sup> Néanmoins, l'activité de cette classe d'antibiotiques est dépendante de la concentration *in vivo* de dioxygène et son effet est donc très faible sur les bactéries ana robes et les mycoplasmes. De plus, certains effets toxiques tels que la néphrotoxicité et l'ototoxicité ont été observés. Ces effets, en plus de l'apparition de mécanismes de résistance bactérienne constituent des limites pour cette classe de médicaments.<sup>11</sup>

La structure des aminoglycosides comporte au moins une unité sucre aminé généralement reliée par à un aminocyclitol (figure 1, cycle I généralement en position centrale), ce sont donc généralement des pseudo-oligosaccharides. Ces molécules sont donc hydrophiles. Généralement, les composés possédant une activité antimicrobienne présentent le cycle I aminocyclitol 2-déoxystreptamine, qui peut être disubstitué en positions 4 et 5 ou 4 et 6 (figure 1). La classification des cycles la plus largement utilisée est la suivante : le premier cycle correspond à l'aminocyclitol central (2-déoxystreptamine), le cycle II au sucre aminé qui se lie à la position 4 de la 2-déoxystreptamine centrale, tandis que le cycle III correspond au sucre aminé qui se lie à la position 5 ou 6 de la déoxystreptamine centrale. Le cycle IV est relié au troisième cycle.<sup>7,12,13</sup>

Les deux classes principales d'aminoglycosides peuvent être définies par rapport à la position du cycle III sur le premier cycle. Dans les aminoglycosides de la classe de la paromomycine et de la néomycine B, le cycle III est lié en position 5 du cycle I font partie de la classe des néomycines. A l'inverse pour les aminoglycosides de la famille de la tobramycine et la kanamycine, le cycle III est lié au cycle I en position 6 (classe des kanamycines, Figure 1).<sup>7,13,14</sup>



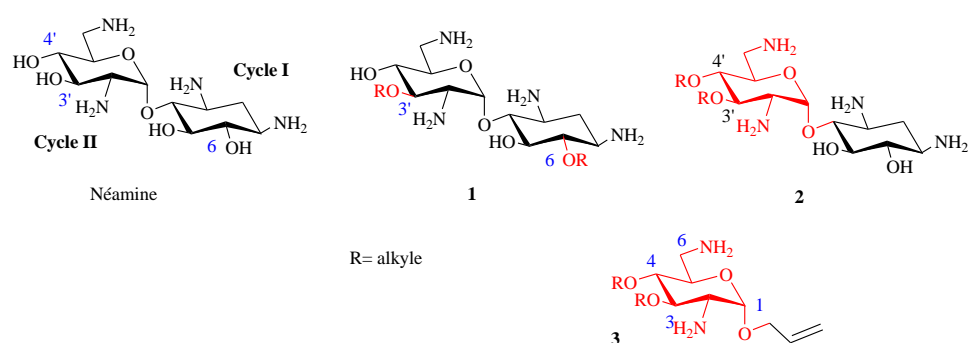
**Fig. (1)** Structure chimique des principaux squelettes de glucosamine disponibles dans le commerce

En dépit de leur efficacité, l'utilisation thérapeutique des aminoglycosides est moins fréquente que par le passé. L'une des principales raisons de la réduction de son utilisation est due à la toxicité vestibulaire et rénale.<sup>15</sup> Le principal effet secondaire de cette classe d'antibiotiques est la néphrotoxicité qui peut se survenir chez 20% des patients traités. Les lésions rénales, bien que généralement réversibles, causent une hospitalisation prolongée des patients, entraînant, par conséquent, des coûts plus élevés. Plus important encore, la néphrotoxicité est généralement associée à une mortalité élevée chez ces patients. Cet effet peut être limité puisque certains facteurs de risques

pour la néphrotoxicité sont connus (mâles à doses multiples, maladie du foie, hypokaliémie, etc.) et des mesures préventives peuvent être envisagées.<sup>16</sup>

Dans le but de contrer ces effets l'activité antibactérienne des aminoglycosides, de nombreux dérivés des aminoglycosides ont été synthétisés et développés comme antibiotiques et parmi eux des aminoglycosides amphiphiles (AAGs). Les AAGs sont une classe émergente de nouveaux agents antibactériens avec de nouveaux modes d'action agissant sur les membranes lipidiques des bactéries. Des études antérieures ont montré que les analogues amphiphiles de la néomycine B et de la kanamycine A rétablissent une puissante activité antibactérienne contre les bactéries Gram (+) résistantes à la néomycine B, à la kanamycine A.<sup>17-20</sup>

Dans un travail publié par Zimmerman et collaborateurs en 2016,<sup>293</sup> un nouveau groupe de dérivés actifs contre des bactéries à Gram (+) et Gram (-) résistantes a été identifié par le Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes. Ces composés sont des dérivés amphiphiles de la néamine, et sont préparés à partir de néomycine B, un antibiotique naturel. Ces molécules se sont révélées intéressantes pour des applications en tant qu'antibiotiques ou comme désinfectants. Le groupe a obtenu divers dérivés de néamine dont des dérivés 3',4'-dialkylés de la néamine (2) et 3,4-dialkylés de la néosamine ou 6-amino-6-désoxyglucosamine (Figure 2, composés 3). Ces dérivés possèdent un groupement allyle en position 1 qui peut être modifié pour y introduire une structure ressemblant à celle des dérivés 3',4'-dialkylés de la néamine. L'époxydation de la double liaison suivie d'une ouverture du cycle époxyde par attaque nucléophile par des aminoalcools ou des diamines a ainsi conduit à des dérivés antibiotiques très efficaces contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) sensibles ou résistantes. Les modifications se traduisent par une plus grande flexibilité au niveau du cycle I des dérivés par rapport aux dérivés de néamine pouvant permettre une interaction plus efficace avec les composants des membranes bactériennes, telles que les lipopolysaccharides (figure 3).<sup>21</sup>



**Fig. (2)** Dérivés de néamine et de néosamine obtenus au Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes.

Dans le but d'agrandir la famille des dérivés de la néosamine amphiphiles antibiotiques à spectre large d'action, le but de ce travail de thèse était donc de synthétiser de nouveaux dérivés de la néosamine antibactériens en utilisant des réactions de métathèse.

## CHAPITRE I

### Des aminoglycosides classiques et amphiphiles et le combat aux bactéries résistants

#### 1. INTRODUCTION

Les aminoglycosides appartiennent à l'une des classes les plus anciennes d'antibiotiques, la streptomycine a été le premier à être découvert en 1944. Il a été suivi par la découverte d'une autre série de substances similaires, comme la néomycine, paromomycine, kanamycine, gentamicine et la tobramycine (Fig. 1). En 1970, des antibiotiques semi-synthétiques comme l'amikacine, la dibékacine, la sisomicine et le nétilmicine ont été introduits dans les thérapies afin de contourner les problèmes de développement de résistance bactérienne.<sup>22</sup> Ces antibiotiques agissent principalement en se fixant à la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal bactérien perturbant ainsi la synthèse protéique. La néomycine a été découverte par Waksman et Lechevalier en 1949, la paromomycine en 1956 et en 1957 la kanamycine, antibiotique très actif, non toxique par voie parentérale, et bien toléré. Jusqu'à la découverte de la gentamicine en 1963 par Weinstein, la kanamycine a été largement utilisé dans le traitement des infections systémiques par des bactéries Gram (-).<sup>23</sup>

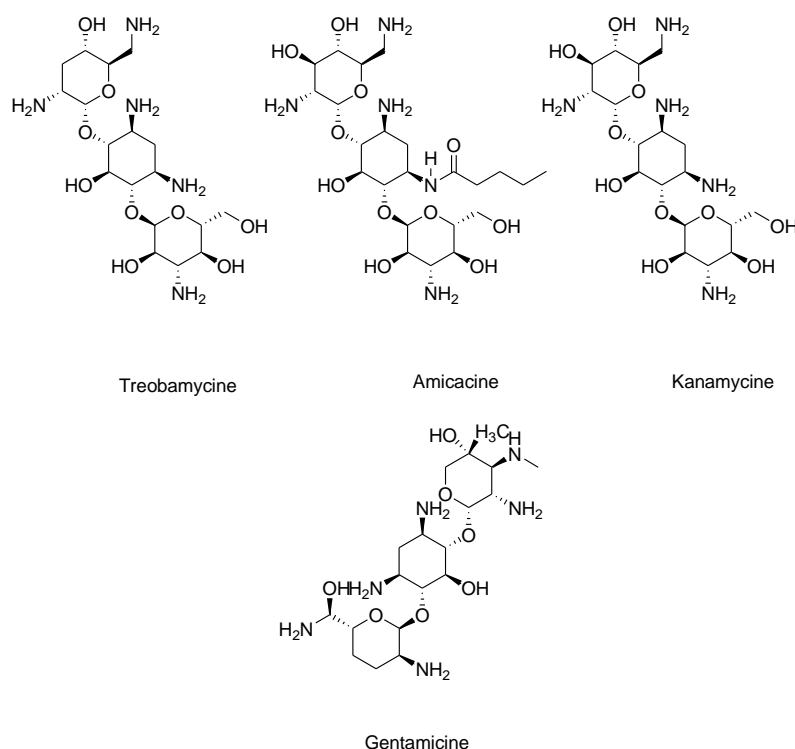


Fig. (3) Des dérivés d'aminoglycosides

La découverte de gentamicine a été une étape importante dans l'histoire des aminoglycosides car au-delà de sa tolérance raisonnable, elle est active contre de nombreuses souches de bactéries, y compris *Pseudomonas aeruginosa*. Le succès clinique de la gentamicine a grandement stimulé la demande d'antibiotiques similaires, et a entraîné la découverte de plusieurs autres aminoglycosides naturels, tels que la tobramycine en 1968, la sisomicine et la ribostamycine en 1970, la lividomycine en 1971 et la verdomycine en 1972. Dans cette nouvelle liste d'aminoglycosides naturels, seuls la sisomicine et la tobramycine ont une application thérapeutique. Ces deux antibiotiques ont un spectre d'activité similaire à la gentamicine, en étant toutefois plus actif contre certaines espèces de bactéries comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>23</sup>

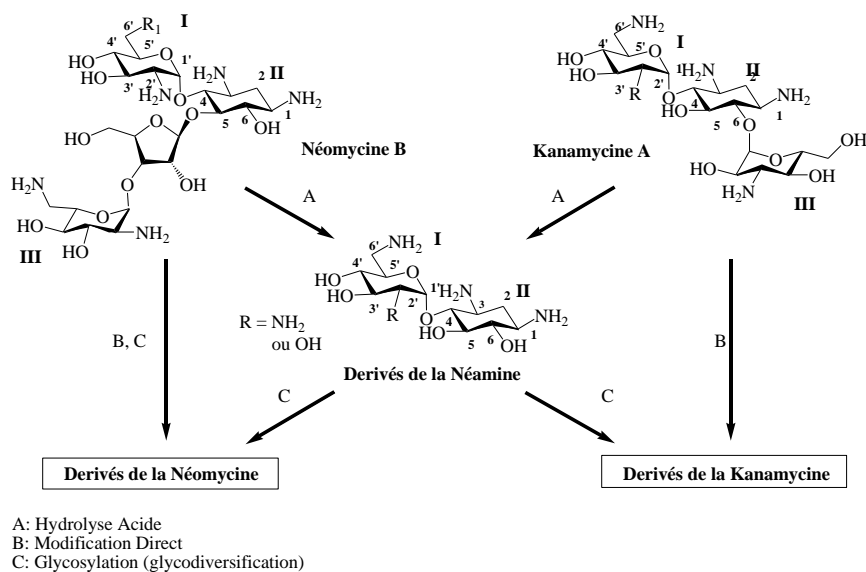
Une autre voie dans l'histoire des aminoglycosides a commencé avec la découverte des mécanismes des modifications enzymatiques conduisant à l'émergence de résistance. L'identification des groupes fonctionnels présents dans les aminoglycosides sensibles au métabolisme par les enzymes, a été étudiée afin de les éliminer ou de les protéger sans que l'antibiotique ne subisse de réduction de son activité et n'ait pas sa toxicité augmentée. Les modifications de la kanamycine A ont abouti à la synthèse de l'amikacine, un antibiotique très actif et résistant à la plupart des enzymes qui inactivent la gentamicine. Plus récemment, des manipulations similaires ont conduit à la synthèse de la nétilmicine, dont le principal intérêt est une moindre toxicité.<sup>23</sup>

Les aminoglycosides présentent une activité antimicrobienne contre un large spectre de micro-organismes, notamment des bactéries Gram (-) et Gram (+), les mycobactéries et protozoaires.<sup>24</sup> Les aminoglycosides sont transportés à travers la membrane plasmique par un processus dépendant du dioxygène, et n'ont pas d'activité sur les micro-organismes anaérobies.<sup>24</sup> Dans la pratique clinique, les molécules les plus fréquemment prescrits sont la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine, alors que la streptomycine reste encore un outil important dans le traitement de la tuberculose, la brucellose, la tularémie et la peste bubonique.<sup>24</sup>

### **1.1. Relations Structure-Activité (RSA) et Relations Structure-Toxicité (RST)**

La néomycine et la kanamycine sont les deux aminoglycosides antibiotiques les plus étudiés. La néomycine appartient au groupe des aminoglycosides dans lesquels le noyau 2-déoxystreptamine est 4,5-disubstitué (cycle II), alors que la kanamycine contient un noyau 2-déoxystreptamine 4,6-disubstitué. En général, il existe deux types d'approches rapportées pour la synthèse des nouveaux antibiotiques aminoglycosides (schème 1). La première consiste en une modification directe des aminoglycosides existants. La deuxième approche consiste à appliquer des stratégies de glycosylation sur des précurseurs sélectionnés, comme la 2-déoxystreptamine et la néamine (cycles I et II), de façon à créer des « bibliothèques » de nouveaux aminoglycosides. Ces synthèses ont produit de nombreux nouveaux aminoglycosides actifs.<sup>25</sup>





**Sch. (1)** Stratégies générales pour la synthèse d'aminoglycosides de la classe de la néomycine et de la classe de la kanamycine.

Par les modifications chimiques directes des aminoglycosides existants, plusieurs critères doivent tout d'abord être considérés. Ceux-ci comprennent la source disponible d'aminoglycosides, les groupes protecteurs appropriés pour les groupes amines et la différenciation régiosélective des groupes hydroxyles à fonctionnaliser. La néomycine B et la kanamycine A sont deux aminoglycosides disponibles dans le marché qui peuvent être utilisés comme matériaux de départ pour des modifications chimiques. Bien que la néomycine B disponible dans le commerce soit habituellement mélangée à 10-20% de néomycine A et C et que la kanamycine A soit habituellement mélangée à 10-20% de kanamycine B, ces composants mineurs ne constituent pas une difficulté significative dans la synthèse chimique et la caractérisation des composés synthétisés.<sup>25</sup>

Les groupes protecteurs les plus utilisés pendant les synthèses pour les fonctions amine sont les carbamates et leur transformation en azoture a également beaucoup été utilisée. La première stratégie est la plus facile à mettre en oeuvre. Cependant, la faible solubilité des composés contenant des polycarbamates et des azotures rend la purification et la caractérisation de ces composés très difficiles. L'utilisation du groupe azoture pour masquer les groupes amine d'aminoglycosides présente l'avantage de générer des composés ayant une plus grande solubilité dans des milieux organiques, facilitant leur extraction à partir de milieux aqueux qui reste néanmoins difficile.<sup>25</sup>

Le problème le plus difficile dans la synthèse des dérivés aminoglycosides est la différenciation régiosélective des groupes amine qui a été étudiée en profondeur, en particulier dans la néomycine, la kanamycine et la néamine. En général, ces procédés utilisent des ions de chélation ou de cyclisation à médiation métallique.<sup>25</sup>

La stéréochimie de la liaison glycosidique à laquelle le composant glucidique est fixé au noyau de la néamine est essentielle pour l'activité antibactérienne.<sup>26</sup>

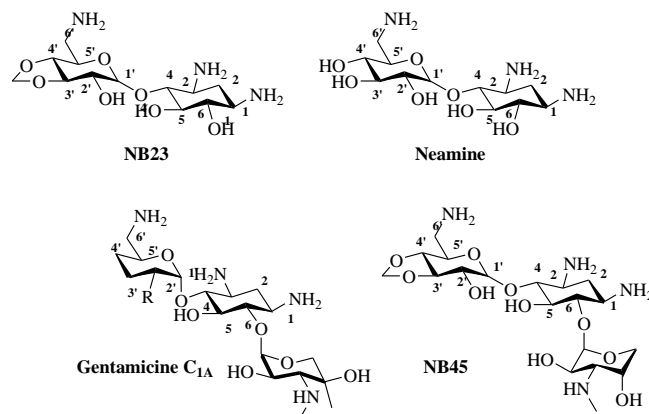
Certaines conclusions ont été tirées des études des relations Structure-activité (RSA) à travers de la comparaison des structures naturelles de aminoglycosides et ceux qui ont été modifiés par des réactions semi-synthétiques.<sup>26</sup>

Le cycle I est d'une importance fondamentale pour le large spectre d'activité et est également la cible principale des enzymes bactériennes d'inactivation. Les fonctions amine sur 6' et 2' sont particulièrement importantes, par exemple la kanamycine B (2',6'-diamino), est plus actif que la kanamycine A (6'-amino-2'-hydroxyl), qui à son tour est plus actif que la kanamycine C (2'-amino-6'-hydroxyl). La méthylation en position 2' ou 6' ne réduit pas considérablement l'activité antibactérienne et confère une résistance à l'acétylation enzymatique du groupe amine en C-6'. L'élimination du groupe hydroxyle en 3' ou 4' ou dans les deux positions dans les kanamycines, ne réduit pas le pouvoir antibactérien. Les gentamicines n'ont également pas de fonction hydroxyle dans ces positions ainsi que la sisomicine et la nétilmicine, qui ont aussi une double liaison entre les positions 4' et 5'. Aucun de ces dérivés n'est inactivé par l'enzyme d'inactivation phosphotransférase qui phosphoryle hydroxyle de la position 3'. Les dérivés phosphorylés dans cette position ont beaucoup moins d'affinité pour le site actif sur le ribosome bactérien.<sup>26</sup>

Peu de modifications sont possibles sur le cycle I car ce cycle est principalement impliqué dans la liaison de l'antibiotique à la cible. Cependant, le groupe amine en position 1 de kanamycine A peut être acylé (amikacine par exemple), sans perdre l'activité. La nétilmicine conserve son pouvoir antibactérien de la sisomicine car elle est résistante à différentes enzymes bactériennes.<sup>26</sup>

Les groupes fonctionnels du cycle III semblent être moins sensibles aux changements structurels que ceux portés par les cycles I et II bien que les gentamicines 2''-désoxy soient nettement moins actives que leurs analogues 2''-aminés ou -hydroxylés soient plus actifs. Le groupe amine en C-3' des gentamicines peut être primaire ou secondaire avec dans les deux cas une grande efficacité antibactérienne. En outre, l'hydroxyle en 4' peut être en position axiale ou équatoriale avec peu de changement dans l'activité antibiotique (Figure 3).<sup>26</sup>

Une étude de relations structure-toxicité relative des dérivés pseudo-disaccharides similaires à la néamine (NB23 et gentamicine C1A), contenant le cycle 2-désoxystreptamine (2-DOS), a proposé que la basicité du groupe 2'-NH<sub>2</sub> soit liée à la toxicité aiguë des aminoglycosides. Basé sur les résultats obtenues, a été synthétisé un nouveau pseudo trisaccharide (NB45), qui a montré une activité antibactérienne significative et une faible toxicité aiguë, la figure 3.<sup>27</sup>



**Fig. (3)** Des dérivés d'aminoglycosides

Un étude de toxicité (DL50) et d'activité antibactérienne (CMI) a montré que le composé NB23 est nettement moins toxique ( $pK_a$  6,02 ; DL50 303 mg / kg, CMI => 384 pg/mL) que la néamine ( $pK_a$  7,2 ; DL50 160 mg/kg, CMI = 96 pg/mL) et trois fois moins toxique que la Gentamicine C<sub>1A</sub> ( $pK_a$  8,4 ; DL50 103 mg/kg, CMI = 192 pg/mL), chez les souris.<sup>27</sup>

En 1964, Owada a évalué la cochléotoxicité (toxicité à la cochlée) des différentes unités qui composent la kanamycine A (I, II, III) et a constaté que le cycle III a été le plus toxique, causant surdité chez la souris dans un période de traitement trois fois meneur que la kanamycine A. En revanche, les unités 2-déoxystreptamine (I) et 2,6-diaminoglucose (II) ont été sensiblement non cochléotoxique. Ces résultats sont très intéressants car l'unité III est celle qui présente la plus faible toxicité aigüe létale par rapport aux autres unités et la kanamycine A. L'importance du cycle III dans l'ototoxicité (toxicité aux structures de l'oreille interne ou au nerf auditif) est encore plus évident par la plus faible toxicité des dérivés *O*-méthylé et *N*-acétylée par rapport aux dérivés et *N* déprotèges correspondants.<sup>28</sup>

D'autres études faisant état de relations structure-cochléotoxicité des aminoglycosides ont montré un rapport direct entre le nombre de groupes ionisables venant des groupements amine attachés au noyau 2-déoxystreptamine.<sup>29</sup>

## 2. AMINOGLYCOSIDES AMPHIPHILES

Au cours des dernières années, plusieurs articles ont décrits les modifications semi-synthétiques des aminoglycosides pour les transformer en dérivés amphiphiles cationiques par fixation d'un ou plusieurs groupes alkyle ou aryle sur les groupements alcool ou amine. Plusieurs de ces nouveaux analogues, connus comme des Aminoglycosides Amphiphiles (AAGs) présentent des activités antibiotiques améliorées contre les bactéries Gram (+) et Gram négatif sensibles et résistantes aux

aminoglycosides de référence. Des dérivés antifongiques amphiphiles de la kanamycines avec des chaînes alkyle, avec ou sans activités antibactériennes ont ensuite aussi été décrits. Plusieurs études montrent que la perturbation membranaire est le principal mécanisme d'action de ces aminoglycosides amphiphiles antibactériens et antifongiques, ce qui conduit à suggérer qu'ils représentent un nouveau groupe d'aminoglycosides antimicrobiens.<sup>8,18,30-32</sup> C'est à partir des dérivés antibiotiques amphiphiles de la néamine synthétisés dans notre laboratoire en collaboration avec l'équipe de M.-P. Mingeot-Leclercq de l'Université catholique de Louvain à Bruxelles qu'a été proposée et démontrée pour la première fois une action des AAGs sur les membranes bactériennes.<sup>33,34</sup>

Des études menées par Hanessian et coll.<sup>35</sup> avaient révélé que les dérivés de la paromomycine avec des substituants lipophiles attachés à la position 2' du cycle III présentent des activités inhibitrices exceptionnellement fortes contre *Staphylococcus aureus* malgré une orientation de liaison à l'ARNr du site A altérée. Zhang et al.<sup>36,37</sup> ont observé que l'ajout de chaînes alkyle stéarique et palmitique à la position O-5 'de la néomycine B conduit à une activité 32 fois plus élevée contre les entérocoques résistants à la méticilline (MRSA) et résistants à la vancomycine (VRE). Ces observations initiales ont conduit à des développements révélant des activités antibactériennes améliorées avec fixation de groupes alkyles et d'autres fragments hydrophobes à la néamine,<sup>8,18,38,39</sup> paromomycine,<sup>20,35,40</sup> et tobramycine.<sup>30,41</sup> Ces nouvelles découvertes d'aminoglycosides amphiphiles antibactériens soulèvent immédiatement des questions sur leurs mécanismes d'action, et sur la nature des interactions avec les membranes bactériennes impliquées. Plusieurs observations indiquent que la perturbation membranaire est l'action antibactérienne primaire de la majorité de ces composés et non l'interaction ribosomique.<sup>8,17,30,42,43</sup>

## **2.1. Nouveaux Aminoglycosides Amphiphiles Synthétisés au Département de Pharmacochimie Moléculaire**

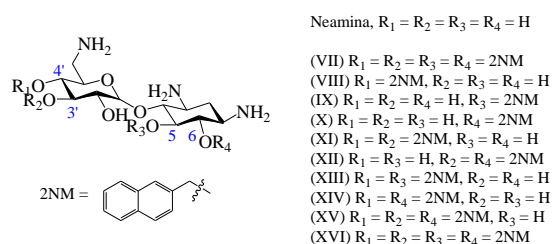
Ayant conscience de la nécessité de développer de nouvelles alternatives pour le traitement des infections causées par des bactéries résistantes, notre groupe a tout d'abord mis au point de nouvelles méthodes de synthèse permettant l'obtention d'aminoglycosides amphiphiles à partir de la néamine et de la paromamine (AAGs). De tels dérivés ont ainsi montré une activité prometteuse contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) sensibles et résistantes exprimant des résistances de différents types (figure 4).<sup>34</sup>

L'introduction de chaînes alkyles lipophiles sur les aminoglycosides les protègent d'une part, des modifications enzymatiques conduisant à des résistances et, d'autre part en changeant complètement le mode d'action qui devient externe limitant ainsi l'émergence de résistances.<sup>34</sup>

Parmi les composés synthétisés portant des groupements 2-naphtylméthyl (2NM), les dérivés dialkylés ou trialkylés XI, XII et XV de la néamine se sont tout d'abord révélés fortement actifs contre les souches de *S. aureus* sensibles et résistantes, y compris le MRSA et VRSA contre lesquels la néomycine B qui est totalement inactive. Lors d'un essai contre les organismes Gram (-) sensibles ou résistants, seul le dérivé trialkylé XV s'est montré prometteur.<sup>34</sup>

L'analyse des relations structure-activité biologique a ainsi montré que les dérivés monoalkylés VII-X et tétra-alkylé XVI n'ont pas d'activité antibactérienne. En revanche, les composés di ou tri-alkylés XI, XII et XV sont actifs. Parmi les dérivés dialkylés XI et XII ont été les plus actifs contre *S. aureus*. Le remplacement du groupe 2NM dans la structure XII par un groupe benzyle, 2-pyridinylméthyle (2PyM) et de 2-quinolylméthyle (2QM) conduit à une perte d'activité antimicrobienne. Seul le dérivé XV est actif contre les bactéries Gram (+) et Gram (-). D'autre part, la présence de trois groupes 2NM semble être nécessaire pour une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram (-). Leur remplacement par des groupes benzyle 2NM, 2PyM ou 2QM a également conduit à une perte totale de l'action antibiotique.<sup>34</sup>

D'après ces données, on peut en déduire que la structure chimique et le nombre de substituants sont des paramètres essentiels pour l'activité biologique de cette classe de composés.<sup>34</sup>

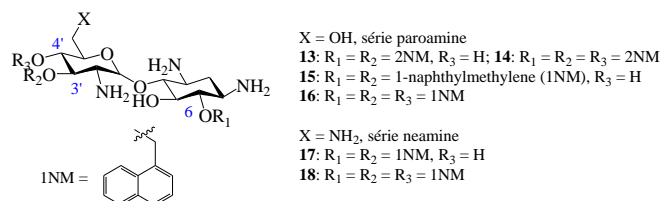


**Fig. (4)** Structure des nouveaux dérivés de néomycine synthétisés en 2010

En 2013, Zimmermann *et al.* ont décrit la synthèse de dérivés naphtylméthylés (NM) de la paromamine qui ont une fonction amine de moins que les dérivés de la néamine correspondants en raison du remplacement de la fonction 6'-amine du cycle II dans la néamine par un groupe hydroxyle dans la paromamine (Figure 5).<sup>18</sup> Les dérivés de la néamine se sont ainsi montrés un peu plus efficaces que les dérivés de paromamine.

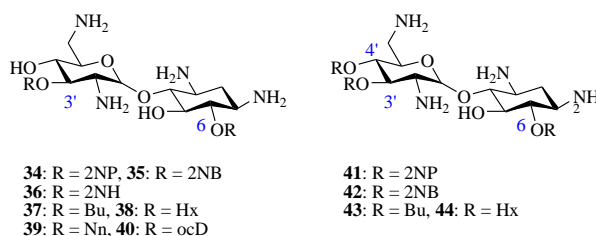
La synthèse de ces dérivés a été réalisée en 3 étapes : (i) protection des fonctions amines et de la fonction alcool primaire de la paromamine par tritylation, (ii) alkylation avec un dérivé halogéné et (iii) détritylation en présence de TFA.<sup>7,10,44</sup>

Premièrement les activités antibactériennes de la paromamine (Par) et des dérivés néamine correspondants (Nea) portant deux ou trois groupes 1NM et 2NM (Figure 2) ont été comparées contre les souches sensibles et résistantes de *S. aureus* (Tableau 2) et les bactéries Gram négatives.



**Fig. (5)** Structure des dérivés naphthylméthyl paromamine (13-16) et néamine (17 et 18) préparés.

D'autres dérivés alkylés ont ensuite été synthétisés pour mettre en évidence des composés dialkylés très actifs contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) sensibles ou résistantes comportant des chaînes 3',6-dinonyle (diNn), 3',6-(di-2-naphtyl)-propyle (di2NP) et -butyle (di2NB) (Figure 6).

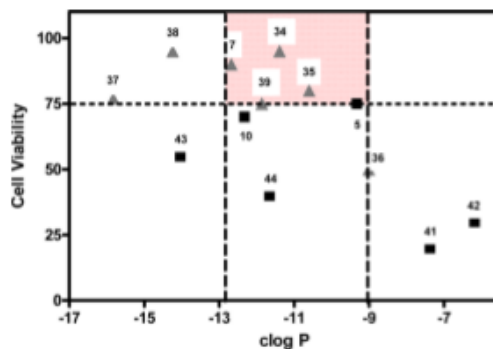


**Fig. (6)** Structure des dérivés amphiphiles de la néamine de deuxième génération synthétisés (34-39 et 41-43)

Parmi les quatre dérivés synthétisés portant deux chaînes linéaires 37-40 (Bu, Hx, Nn et ocD, respectivement), seul le dérivé 3',6-dinonyl (Nn) 39 a montré une bonne activité contre les souches *S. aureus* sensibles et résistantes ainsi que contre les bactéries Gram (-) sensibles ou résistantes contre lesquelles les dérivés 3',6-diBu (37), diHx (38) et diocD (40) se sont avérés inactifs.

Ainsi, parmi les dérivés préparés, 3',6-di2NP (**34**) et 3',6-di2NB (**35**) sont les plus actifs contre les souches de *S. aureus* sensibles et résistantes. Le dérivé 3',6-diNn (**39**) semble être légèrement moins actif. Contre les bactéries Gram (-) sensibles et résistantes, le dérivé le plus actif est le dérivé 3',6-diNn (**39**), les dérivés 3',6-di2NB **34** et **35** ayant montré des activités proches mais plus faibles. En ce qui concerne les activités des dérivés 3',4',6-trialkylés de la néamine, les dérivés tri2NM (**5**) et triHx (**44**) sont actifs contre les souches de *S. aureus* sensibles et résistantes ainsi que contre les bactéries Gram (-). Cependant, ces composés sont moins actifs contre les bactéries Gram (+) que les dérivés 3',6-dialkylés les plus actifs et surtout plus cytotoxiques.

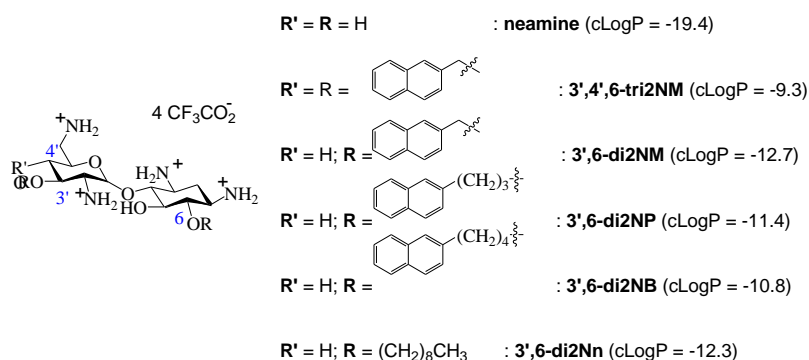
La lipophilie globale des dérivés (et des chaînes alkyles) s'est avéré un paramètre essentiel pour une bonne activité avec des fenêtres de lipophilie optimales très proches observées à la fois en série di- et tri-alkyl. Pour une même lipophilie, le passage de la série tri-alkyl à la série di-alkyl a permis de diminuer la cytotoxicité mesurée probablement en permettant une meilleure sélectivité pour les membranes bactériennes plus riches en phospholipides anioniques (Figure 7).<sup>45-47</sup>



**Fig. (7)** Viabilité (en pourcentage) de macrophages de J774 murins en présence des dérivés de 3',6-dialkylnéamine (triangles gris) et 3',4',6-trialkyl (carrés noirs) à 10 microM après 24 h d'incubation (moyenne de trois expériences) en fonction de la lipophilie des dérivés calculée (clogP). Les dérivés trialkylés sont 43 (triBu), 10 (triBn), 44 (triHx), 5 (tri2NM), 41 (tri2NP) et 42 (tri2NB), et les dérivés dialkylés (diBu), 38 (diHx), 7 (di2NM), 39 (diNn), 34 (di2NP), 35 (di2NB) et 36 (di2NH). Les lignes pointillées verticales montrent les limites de clogP entre lesquelles des activités antibactériennes peuvent être observées contre les souches de *S. aureus* et / ou *P. aeruginosa* sensibles ou résistantes.<sup>18</sup>

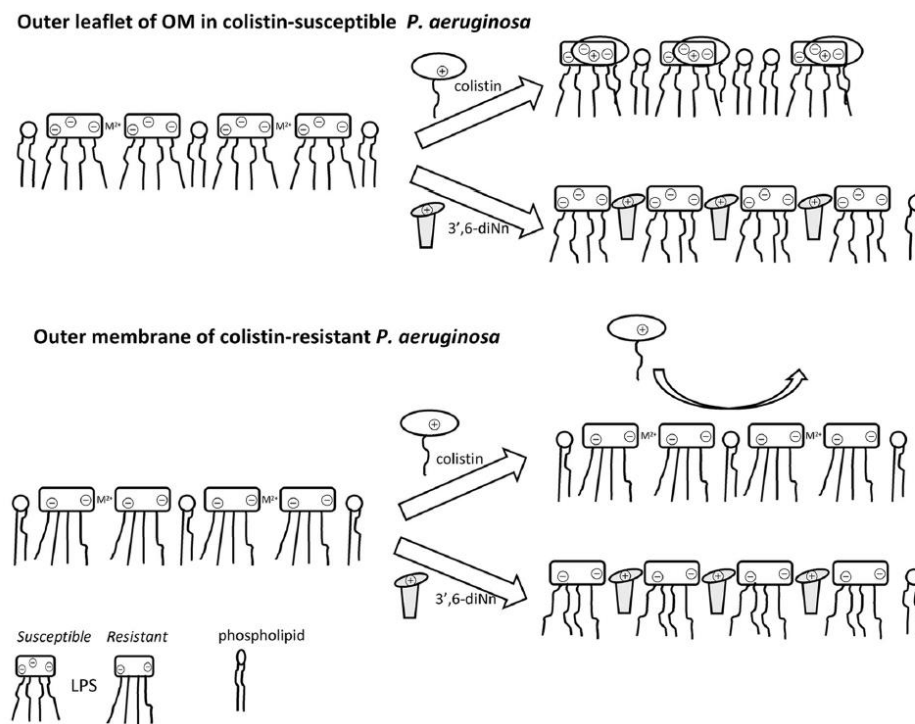
En conclusion, ce travail a permis de déterminer du nombre optimal de substituants lipophiles à fixer à la néamine ainsi que la lipophilicité optimale correspondante nécessaire pour obtenir de bons effets antibactériens. La diminution du nombre de groupes lipophiles portés par la néamine devrait permettre un ciblage plus sélectif des membranes bactériennes par rapport aux membranes eucaryotes à travers des interactions plus favorables avec les phospholipides anioniques des membranes.

Une troisième étude du mode d'action des dérivés amphiphiles de la néamine synthétisés publiée en 2013 a confirmé la forte interaction avec les lipopolysaccharides bactériens (LPS) des dérivés 3',6-dialkylés de la néamine les plus actifs en particulier du 3',6-dérivé dinonyl et leur capacité à perméabiliser la membrane externe bactérienne (OM) de *P. aeruginosa* en comparaison avec la néamine et d'autres aminoglycosides conventionnels (Figure 8). Pour mieux comprendre le mécanisme impliqué dans la perméabilisation de l'OM et les interactions avec les LPS, ils ont étudié l'effet des dérivés de la néamine sur la taille, la fluidité et la surface moléculaire moyenne de micelles de LPS.<sup>48</sup>



**Fig. (8)** Structures et lipophile calculée (valeurs de clogP) de la néamine et des dérivés amphiphiles synthétisés.

Ils ont ainsi démontré l'importance des interactions électrostatiques avec les groupes phosphates des LPS ainsi que celle des effets hydrophobes liant les groupes lipophiles de dérivés de néamine amphiphiles et les chaînes alkyles du lipide A du LPS. Les interactions des dérivés amphiphiles de la néamine avec le LPS pourraient expliquer leur activité antibactérienne, en particulier contre les souches de *P. aeruginosa* (Fig.9) résistantes à la colistine qui est l'un des antibiotiques de dernier recours contre cette bactérie. En effet, ces bactéries résistantes se caractérisent par un état hautement ordonné des LPS, une réduction de la charge négative nette du lipide A et la présence d'une chaîne acylée supplémentaire sur le lipide A. En contraste avec la colistine, le dérivé 3',6-diNn de la néamine serait capable de s'insérer dans le réseau plus ordonné des LPS en raison de sa flexibilité élevée et de sa capacité à augmenter la fluidité des LPS. Cependant, la liaison au LPS n'est probablement pas suffisante puisque le dérivé 3',6-di2NM interagit aussi avec les LPS mais ne présente aucune activité antibactérienne contre les souches sensibles et résistantes de *P. aeruginosa*.

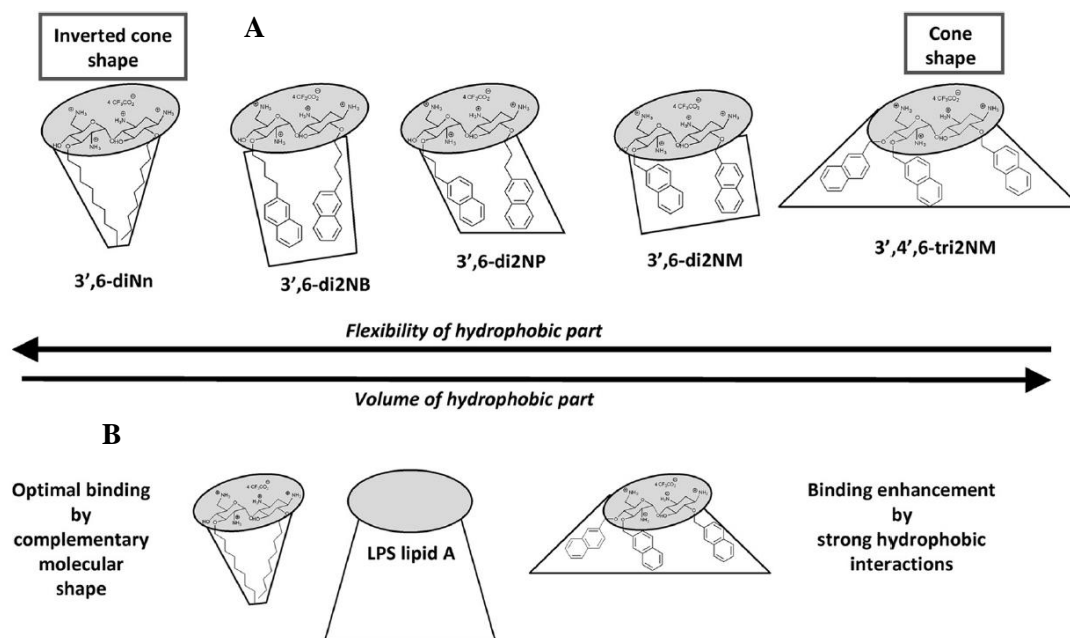


**Fig. (9)** Mécanisme d'action hypothétique de la 3',6-dinonyl néamine contre les souches de *P. aeruginosa* sensibles à la colistine (en haut) et résistantes à la colistine (en bas). En haut : la couche de LPS est stabilisée par création des pontages ioniques par interactions avec des cations métalliques divalents ( $M^{2+}$ ) ; l'insertion de colistine et/ou du dérivé dinonyl induit la formation de complexes bimoléculaires avec le LPS et perturbe la structure membranaire. En bas : La couche LPS hautement ordonnée agit comme une barrière à la colistine (pas d'insertion), alors que la flexibilité du dérivé dinonyl et sa capacité à fluidifier le réseau LPS permettent toujours des interactions primaires perturbant la membrane. <sup>48</sup>



Il a été démontré que de longues chaînes alkyles (nonyles) greffées sur la néamine aux positions 3' et 6 induisent les changements les plus importants dans la structure de la membrane externe par fixation aux LPS et par conséquent l'altération de la perméabilité à l'OM la plus forte. Le dérivé 3',6-diNn se caractérise par sa flexibilité et l'étroitesse de ses chaînes alkyles (figure.10) permettant une optimisation de l'insertion dans la région lipidique A du LPS. A cet égard, l'effet induit par 3',6-di2-naphtylpropyl n'est pas significativement différent de celui obtenu avec le dérivé 3',6-diNn. L'apparition de matière fluide prolonge les données antérieures relatives à la formation d'un réseau supramoléculaire entre les substances multicationiques et multianioniques.<sup>47,49</sup>

Lorsque toutes les données sont prises ensemble et quand on suppose que le volume de la partie hydrophobe augmente des dérivés dialkyles linéaires (3',6-diNn), aux dinaphtylalkyle (3',6-di2NM, 3',6-di2NP et 3',6-di2NB) jusqu'aux groupements trinaphtylalkyles très volumineux (3',4',6-tri2NM), la liaison maximale à la membrane externe et aux LPS serait inversement proportionnelle au volume de la fraction hydrophobe. La lipophilie et la forme moléculaire de l'antibactérien seraient donc critiques. Plus spécifiquement, le dérivé 3',6-diNn présente une forme moléculaire de cône inversé avec une grande partie hydrophile et une petite partie hydrophobe. Ceci pourrait permettre une interaction étroite entre ce dérivé et le fragment lipide A des LPS, caractérisée par une forme complémentaire conique (avec une petite partie hydrophile et une grande partie hydrophobe pour les LPS) comme illustré sur la Figure 10B.



**Fig. (10)** Relations structure-activité et principaux paramètres (flexibilité des fractions hydrophobes, forme moléculaire) impliqués dans les interactions des dérivés alkylés de la néamine avec le LPS. Des dérivés de

néamine amphiphiles et les LPS sont représentés par des fragments hydrophiles (gris) et hydrophobes (blancs). La forme moléculaire complémentaire entre dérivés 3',6-diNn et LPS est illustrée au bas du schéma. <sup>48</sup>

Les excellents résultats obtenus par le groupe et les premières relations structure-activité établies stimulent donc la synthèse de nouveaux aminoglycosides amphiphiles dans la recherche de nouveaux agents antimicrobiens encore plus puissants, moins toxiques et moins sensibles au développement de résistances bactériennes.

**TRAVAUX PERSONNELS**  
**PARTIE II**

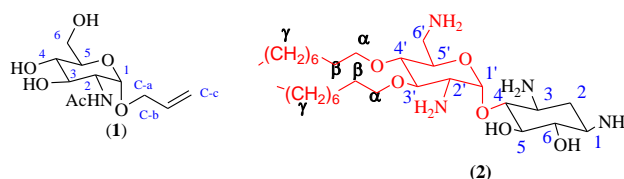
1.

## 2. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Le fort effet antimicrobien des aminoglycosides amphiphiles a suscité l'intérêt des chercheurs de plusieurs pays.<sup>50</sup> En effet, la résistance bactérienne et la toxicité associée à l'utilisation des médicaments parents que sont les aminoglycosides classiques pourraient être évitées avec ces nouveaux composés.

Notre travail a donc pour but d'élargir cette famille d'antibiotiques en synthétisant de nouveaux analogues amphiphiles de la néamine à partir de la *N*-acétyl-D-glucosamine, en accord avec les premiers résultats obtenus par Dr. Oliveira Bretas pendant son stage de thèse (Síntese de Inibidores Potenciais de Glicosamina-6-Fosfato Sintase e de (1,3)- $\beta$ -D-Glicana Sintase e de Análogos da Neamina) réalisé en 2013 dans le Département de Pharmacochimie Moléculaire.

L'introduction, dans la structure de ces AAGs, de deux chaînes hydrophobes comportant neuf atomes de carbone chacune, est basée sur les bons résultats antibiotiques obtenus dans notre groupe avec le dérivé résultant de l'alkylation de la néamine en positions 3',4' avec le 1-bromononane. Nous avons donc cherché à synthétiser des analogues de la 3',4'-dinonyl néamine à partir du dérivé alkylé (2) sous une forme protégée en utilisant un hétérocouplage par métathèse soit avec une amine aliphatique protégée soit avec un autre amino sucre allylique.

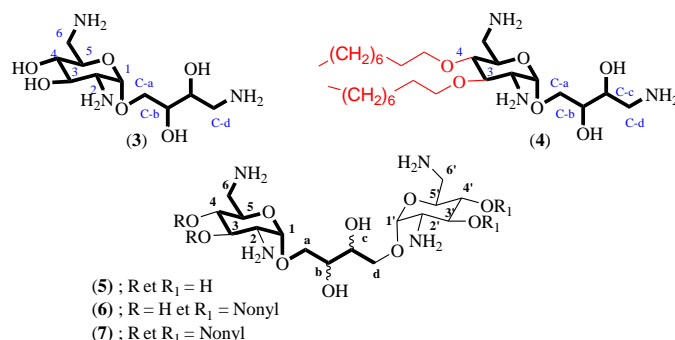


**Fig. (11)** Structure de la *N*-acétyl-D-glucosamine (1) et du composé (2).

Deux types d'aminosucres amphiphiles ne portant que deux chaînes nonyles ont donc été recherchés : 1) des composés dans lesquels le cycle I est simplifié pouvant être obtenus par couplage d'un dérivé de l'allylamine avec d'un dérivé dialkylé de la néosamine (2,6-diaminoglucosamine) portant un groupement allyle en position anomérique ; 2) des composés résultant du couplage par métathèse de deux sucres différents, tous deux portant un groupement allylique en position anomérique, l'un portant deux groupements nonyles et l'autre non.

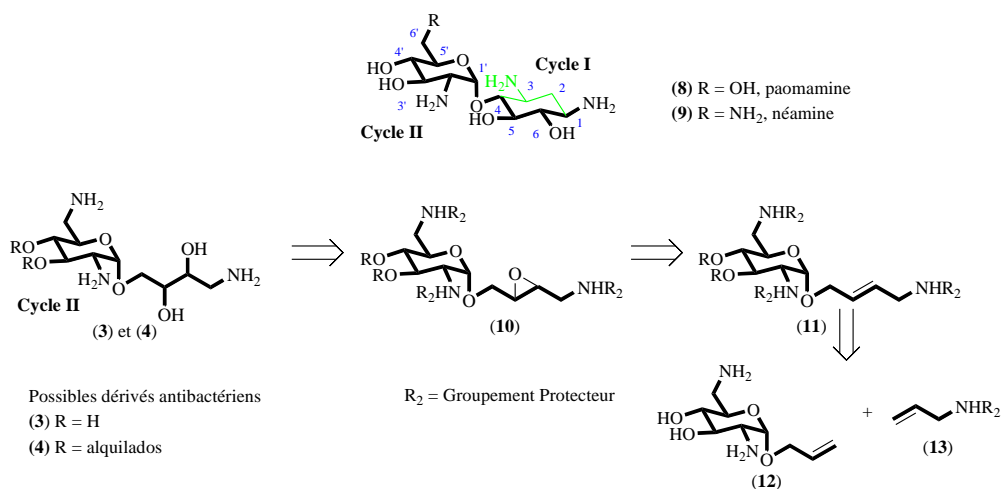
Les synthèses ont également été menées en parallèle avec des dérivés de la néosamine (2,6-diaminoglucosamine) non alkylés pour obtenir les produits ne portant pas de groupements nonyles en positions 3 et 4 de façon à bien établir l'effet des deux chaînes alkyles dans l'activité antibiotique.

La structure de tous les composés recherchés est présentée dans le schème 2



**Fig. (12)** Structure des composés recherchés.

L'obtention du dérivé (3) est justifiée par l'intérêt de l'évaluation de l'activité d'un nouvel analogue de la néamine non alkylée par rapport aux dérivés alkylés (4). La voie de synthèse proposée pour l'obtention de (3) et (4) doit conduire également, en quelques étapes, à l'obtention des dérivés (7), (8) et (9) à travers une réaction d'homométhèse. La rétrosynthèse des composés recherchés est présentée dans schéma 2.



**Sch. (2)** Structure de la néamine et de la paromamine et analyse de rétrosynthèse pour l'obtention des dérivés d'aminosucres amphiphiles par simplification moléculaire de la néamine.

Les synthèses envisagées permettent la formation d'isomères géométriques et de diastéréoisomères, à travers les étapes de métathèse et d'oxydation, à travers des étapes d'époxydation et d'ouverture de l'époxyde ce qui permet d'élargir la diversité moléculaire pour les tests antibiotiques. Dans un premier temps, le travail n'a pas pour but la séparation des isomères formés ou l'étude précise de la stéréochimie des réactions. Une fois obtenus en mélange, les isomères des produits désirés seront évalués en mélange pour leur potentiel antimicrobien. Ils pourront être ensuite isolés pour affiner les

résultats s'ils sont positifs. Toutes les substances synthétisées seront ainsi évaluées contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) sensibles et résistantes.

## **2.1. Objectif général**

Developper la recherche de nouveaux agents actifs contre les bactéries résistantes aux antibiotiques, à travers la synthèse de nouveaux analogues amphiphiles de la néamine potentiellement antibiotiques.

## **2.2. Objectifs spécifiques**

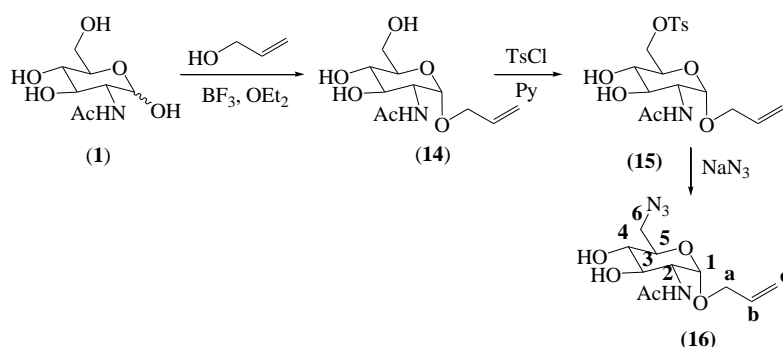
- Synthétiser des nouveaux 2,6-diaminoglycosides par réaction de métathèse, hydrolyse et oxydation de double liaison, en accord avec les premiers résultats obtenus par Dr. Oliveira Bretas pendant son stage de thèse réalisé en 2013 dans le Département de Pharmacochimie Moléculaire ;
- Elucider les structures chimiques des composés synthétisés par des méthodes spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 (RMN  $^1\text{H}$ - et  $^{13}\text{C}$ ) et la spectrométrie de masse ;
- Evaluer l'activité biologique des dérivés contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) résistant en collaboration avec Marie-Paule Mingeot-Leclercq de l'Université catholique de Louvain à Bruxelles.

## CHAPITRE II

### Synthèse de Nouveaux Dérivés Amphiphiles des Aminoglycosides par la Réaction de Métathèse

#### 1. OBTENTION DU PRINCIPAL INTERMÉDIAIRE DE SYNTHÈSE

Pour préparer les dérivés recherchés, nous avons choisi une première voie de synthèse à partir de la *N*-acétyl-D-glucosamine. Cette voie nous a permis d'obtenir le composé intermédiaire (16) (Schéma 3).



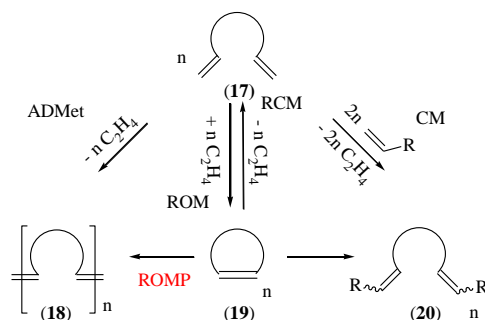
Sch (3) Obtention de l'intermédiaire (16).

La première étape de cette voie de synthèse a consisté en une réaction de la *N*-acétyl-D-glucosamine (1) avec l'alcool allylique et BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O pour obtenir le glycoside (14).<sup>51</sup> La purification du résidu brut obtenu a été réalisée par chromatographie sur silice et a conduit à l'anomère α pur avec un rendement de 48%. L'étape suivante a été la tosylation sélective de l'hydroxyle primaire de (14) en présence de chlorure de tosyloxy dans la pyridine anhydre.<sup>51</sup> Dans ces conditions, le dérivé (15) a été obtenu avec un rendement de 66%. L'introduction du groupe tosyloxy à la position C-6 du sucre est destinée à l'activation du groupe hydroxyle pour sa substitution avec l'ion azoture. Cette substitution a été réalisée avec l'azoture de sodium dans le DMF à chaud.<sup>51</sup> La réaction a été suivie par CCM, car même si le composé (15) et le produit recherché (16) ont la même R<sub>f</sub>, seul le dérivé tosylé est révélé sous la lampe UV. Le composé (16) a été obtenu avec un rendement de 57%.

A partir du dérivé (16), différentes voies de synthèse peuvent être envisagées pour l'obtention des dérivés ayant des fonctions amines protégées par des groupements compatibles avec la réaction de métathèse.

## 2. REACTIONS DE METATHESE ET UTILISATION DE GROUPEMENTS PROTECTEURS

La réaction de métathèse d'oléfines est une réaction chimique clé pour fermer ou ouvrir cycle et pour la polymérisation des oléfines à travers le réarrangement de doubles liaisons. Il existe différents types de métathèses. Les principales réactions de métathèse sont appelées en anglais : "ring-closing metathesis" (RCM), "ring-opening metathesis" (ROM), "Cross metathesis" (CM), "acyclic diene metathesis polymerization" (ADMET) ou "ring-opening metathesis polymerization" (ROMP) (Schème 4).<sup>52</sup>



Sch (4) Principaux types de réactions de métathèse des oléfines.

L'utilisation de la métathèse des oléfines dans la synthèse organique est directement liée à la découverte des catalyseurs de type métal-carbène (Figure 13), mis au point par les groupes de Schrock (Mo et W) et Grubbs (Ru).<sup>52</sup>

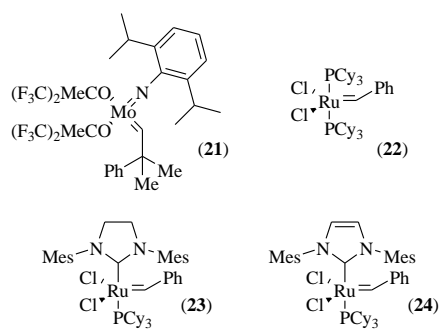


Fig. (13) Catalyseurs du type métal-carbène

Le catalyseur Schrock (21) a été développé dans les années 80 et a l'avantage d'être très réactif avec différents substrats comportant différentes variations stériques et électroniques, étant capable de réagir avec des oléfines internes et terminales. Cependant, il montre une faible stabilité face aux groupements polaires fonctionnels, l'humidité, le dioxygène et les impuretés des solvants, limitant son utilisation à certaines conditions expérimentales.<sup>53,54</sup>

En 1999, a été développé la deuxième génération de catalyseurs pour la métathèse des oléfines : le catalyseur de Grubbs deuxième génération (23) et le catalyseur de Grubbs-Nolan (27). Ces catalyseurs



résultent du remplacement la tricyclohexylphosphine comme ligand dans le premier catalyseur par un ligand *N*-hétérocyclique. Cette substitution a conduit à une augmentation de l'activité catalytique et de la stabilité de ces catalyseurs. Le ligand *N*-hétérocyclique en raison de sa forte capacité  $\sigma$  donneur favorise la coordination de l'oléfine ce qui diminue l'énergie d'activation et stabilise le métallocycle intermédiaire augmentant ainsi l'activité de ces catalyseurs. Déjà substituants mesita (Mes) liés aux azotes donnent au centre métallique, une protection stérique contre la décomposition, ce qui contribue à la stabilité thermique élevée de ces catalyseurs.<sup>55</sup>

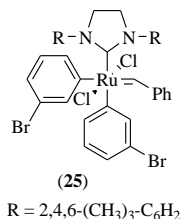
La procédure expérimentale des réactions de métathèse utilisant des catalyseurs de Grubbs est assez simple. Typiquement, le dichlorométhane est utilisé comme solvant (de préférence sec et distillé) à température ambiante ou à reflux sous une atmosphère de diazote ou d'argon, afin de diminuer la concentration de dioxygène qui est un ligand compétitif. Le catalyseur est complètement soluble dans ces solvants et la réaction de métathèse se produit en milieu homogène. Une solution du substrat est ajoutée au catalyseur préalablement dissous dans le solvant approprié. Il est possible d'observer un changement de la couleur de la solution, d'un rouge très foncé à noir quelques minutes après le début de la réaction, probablement en raison de l'échange des ligands métalliques.<sup>52</sup>

Malgré la stabilité et la facilité d'utilisation de ces derniers catalyseurs, ces systèmes catalytiques sont susceptibles d'être «empoisonnés» par des substrats contenant des groupements ou des impuretés qui agissent comme des ligands donneurs forts. Les amines, par exemple, peuvent conduire à une inhibition du cycle catalytique en se liant de manière compétitive au centre métallique ruthénium.<sup>55</sup> Ce phénomène peut être évité en masquant le groupe fonctionnel avec un groupe protecteur. Malheureusement, la protection peut conduire à une isomérisation concurrente des oléfines.<sup>56,57</sup> Et des cycles catalytiques improductifs en raison de la chélation du groupe protecteur délétère.<sup>58</sup>

Dans les catalyseurs de Grubbs, des ligands organiques complexent le ruthénium (II) et permettent aux complexes d'être soluble en milieu organique peu polaire. La première contrainte dans l'utilisation de ces catalyseurs vient de ce qu'aucune des fonctions portées par le substrat ne doit pouvoir remplir le rôle de ligand. Ainsi les fonctions amines doivent être protégées par des groupements protecteurs convenables. Certaines réactions de métathèse ont été possibles avec des fonctions hydroxyles libres mais leurs rendements sont inférieurs à ceux obtenus avec des fonctions hydroxyles protégées.<sup>59</sup> De nombreux groupements protecteurs sont compatibles avec la métathèse.<sup>60</sup> On trouve ainsi les groupes protecteurs de type acétyle (Ac), benzyle (Bn), *t*-butyloxycarbonyle (Boc) et fluorénylméthoxyloxycarbonyle (Fmoc) pour ceux utilisés en métathèse de glucides. Dans cette série, d'autres groupements ont également été décrits tels que les groupements *t*-butyle (tBu), *t*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) et triphénylméthyle (trityle).<sup>61</sup>

Nous avons travaillé principalement avec la fonction azoture pour masquer la fonction amine en position 6. Cette approche n'est pas compatible avec les catalyseurs de première et de deuxième

génération (Figure 14). En effet, le ligand qu'est la tricyclohexylphosphine (Pcy<sub>3</sub>) est capable d'induire la réduction Staudinger de la fonction azoture. Ce problème ne se pose pas avec le catalyseur de troisième génération (Figure 14), mais son coût dépasse de loin celui des deux premiers catalyseurs.<sup>62</sup>

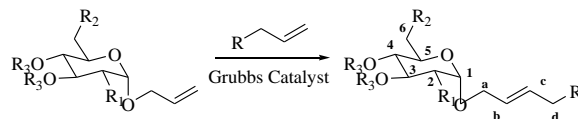


**Fig. (14)** Catalyseurs de Grubbs troisième génération.

Pour les réactions de métathèse développées dans ce travail des différents groupes protecteurs ont été choisis pour masquer la nucléophilie des fonctions amine. Des dérivés contenant des groupes acétyle (Ac), le t-butyloxycarbonyle (Boc), carboxybenzyle (Cbz), azoture (N<sub>3</sub>), ainsi qu'une amine protonée <sup>+</sup>NH<sub>3</sub> ont été synthétisés. Les fonctions hydroxyles non alkylées, ont également été protégées par des groupements acétyle (Ac). L'utilisation des mêmes groupes protecteurs sur les deux oléfines a été une priorité en vue d'éviter une étape de synthèse supplémentaire pour que la déprotection complète soit réalisée en une seule réaction.

Les couplages les plus importants à réaliser impliquent des réactions d'hétérométathèse et donc l'utilisation d'un excès d'une des oléfines choisie comme étant la plus facile à obtenir. Pour la synthèse d'un des composés cibles, l'allylamine protégée sera l'oléfine en excès pour limiter l'homométathèse du sucre utilisé. Cependant, les homodimères formés après fonctionnalisation et déprotection un intérêt dans l'évaluation de leurs activités antibiotiques et pour la détermination de relations structure-activité.

Les catalyseurs de Grubbs de première, deuxième et troisième générations ont été utilisés dans la synthèse, afin d'étudier l'effet de la nature du catalyseur sur la réactivité des dérivés. Les conditions adoptées dans les réactions ont aussi été variées a) reflux CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et temps de réaction différents ; b) Et<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à reflux et temps de réaction différents ; c) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, micro-ondes, 115 °C, 15 min. Les réactifs et leurs groupes protecteurs, les catalyseurs, les conditions de réaction et les rendements des produits obtenus sont ainsi mentionnés dans le tableau 1.

**Tab (1)** Conditions: 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux; 24 h ; 2) ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl, reflux, 24 h ; 3) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, λ, 115°C, 15 min ; 4) HC<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, λ, 115°C, 15 min.

Réaction	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Catalyseur	Conditions Réactionnels	Rendement du Produit Obtenu	
1	NHAc	NHAc	NHAc	Ac	Grubbs I	1, 2, 3, 4	<b>30% (mélange isomère)</b>	
2		NHAc	NHAc	Nonyl	Grubbs I		<b>X</b>	
3		<b>NHAc</b>	<b>NHAc</b>	<b>Ac</b>	<b>Grubbs I</b>		<b>X</b>	
4	<b>NHAc</b>	<b>NHAc</b>	<b>Nonyl</b>	<b>Grubbs I</b>	<b>X</b>			
5	NHBoc	NHBoc	NHBoc	Nonyl	Grubbs I		<b>X</b>	
6		NHBoc	NHBoc	Nonyl	Grubbs II		<b>X</b>	
7		NHBoc	NHBoc	Nonyl	Grubbs III		<b>X</b>	
8		NHBoc	N <sub>3</sub>	Nonyl	Grubbs III			
9		N <sub>3</sub>		Ac	Grubbs I ; Grubbs II		<b>X</b>	
12				Ac	<b>Grubbs III</b>		<b>2</b>	<b>traits</b>
13			Ac	Grubbs III	3		<b>X</b>	
14			Nonyl	Grubbs I ; Grubbs III	1, 2, 3, 4		<b>X</b>	
15		Nonyl	<b>Grubbs II</b>	<b>1</b>	<b>traits</b>			
16		NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	Nonyl	Grubbs I ; Grubbs II ; Grubbs III		1, 2, 3	<b>X</b>
17	<b>NHAc</b>				<b>OAc</b>		<b>Ac</b>	<b>Grubbs I</b>
18	NHCBz	N <sub>3</sub>	N <sub>3</sub>	Ac; Nonyl	Grubbs III		<b>1, 2, 3, 4</b>	<b>X</b>

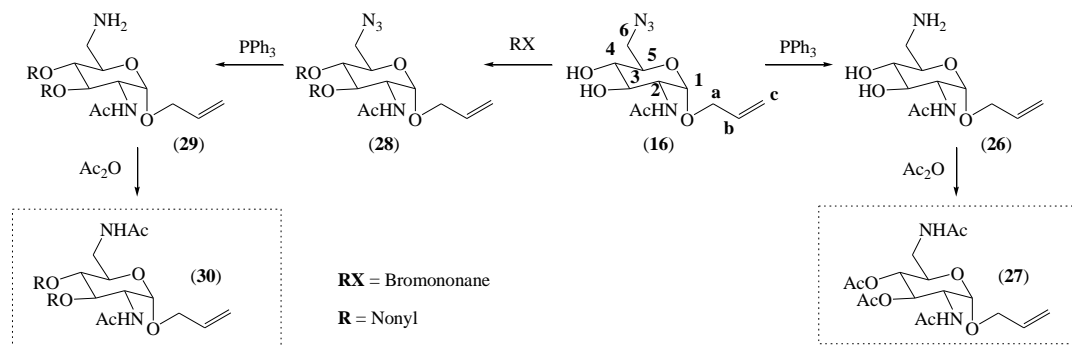
## 2.1. Groupe Protecteur Acétyle

Le choix des groupes acétyle était basé sur le fait que ces groupes sont largement utilisés dans la chimie des sucres, étant faciles à introduire avec un faible coût et avec de bons rendements.<sup>63,64</sup> La synthèse des dérivés acétylés est présentée dans le schéma 5.

### 2.1.1. Synthèse des intermédiaires protégés

La protection des fonctions amine et des groupes hydroxyle avec le groupement Ac a été réalisée après réduction de l'azoture (**16**) en utilisant de la triphénylphosphine comme agent réducteur.<sup>44</sup> Les azotures peuvent facilement être réduits en aminé primaire par hydrogénation catalytique, mais sous cette condition se produit également une réduction indésirable de la double liaison du groupe allyle. La méthodologie retenue permet une réduction sélective de l'azoture avec un rendement de 98 % du produit souhaité. Le dérivé (**26**) a été purifié avec un rendement quantitatif par extraction de sa solution aqueuse car il est très soluble dans l'eau, les impuretés pouvant être extraites avec le cyclohexane.

Le dérivé (**26**) a ensuite été complètement acétylé avec l'anhydride acétique dans la pyridine anhydre à une température de 50 °C pour donner le dérivé (**28**) obtenu a été soumis à une réaction.<sup>61</sup> Après ces étapes, le produit (**28**) a été obtenu avec un rendement de 40%.



Sch (5) Obtention des intermédiaires acétylés

L'introduction des groupes nonyle en position C-3 et C-4 du sucre a été réalisée à partir du dérivé (**16**) selon la méthode mise au point et décrite par notre groupe<sup>34</sup> en présence de 1 éq. de NaH à 60% et de 2 éq. de 1-bromononane dans le DMF. Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation magnétique à température ambiante et flux d'argon. La formation d'un produit monoalkylé en C-3 ou C-4 est tout d'abord observée. Afin d'assurer l'obtention du produit dialkylé désiré, de nouvelles additions de NaH à 60% et d'agent alkylant ont été faites. La présence de ce produit très majoritaire

correspondant au composé recherché (**28**) est ainsi observée. Le résidu brut a été purifié par chromatographie sur silice pour conduire au dérivé (**28**) obtenu ainsi avec un rendement de 60%.

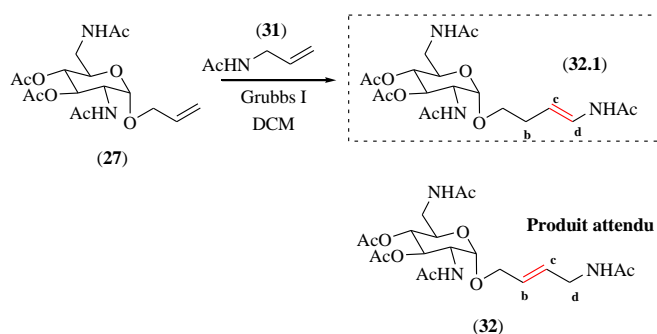
La synthèse a ensuite été poursuivie par réduction de l'azoture en présence de triphénylphosphine et d'eau pour donner le composé (**29**) avec un rendement de 69%.<sup>44</sup>

Comme lors de la synthèse de l'intermédiaire non alkylé (**30**) a nous avons utilisé le groupement protecteur acétyle de la fonction amine en C6. L'acétylation du composé (**29**) a donc été réalisée de la même façon avec l'anhydride acétique dans pyridine anhydre à 50 °C pour donner le dérivé (**30**) avec un rendement de 70%.

## 2.1.2. Série 3,4-diAc - Intermédiaire (**27**)

### 2.1.2.1. Réaction de Métathèse Croisée

Après obtention des intermédiaires protégés, l'étape suivante est la réaction de métathèse. En série allylamine, la métathèse a été réalisée entre (**27**) ou (**30**) et l'allylamine (**31**). L'utilisation d'un même groupe protecteur pour les deux oléfines éliminerait ainsi une étape avec déprotection réalisée en une seule réaction. Par conséquent, l'allylamine acétylée a été utilisée pour effectuer la réaction de métathèse. La réaction a été suivie par CCM et nous avons observé la formation d'un produit moins polaire que le réactif (**27**) après environ 6 h de réaction. Au bout de 24 h de réaction, nous avons isolé ce produit après chromatographie sur silice et récupéré le sucre de départ qui n'a pas réagi. En faisant l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution du produit obtenu, nous avons pu observer un pic  $m/z = 458$  en accord avec la masse moléculaire du produit désiré. Cependant, grâce à une analyse détaillée des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , on peut conclure à une isomérisation de la double liaison de la chaîne latérale conduisant au produit (**32.1**) (schème 6)

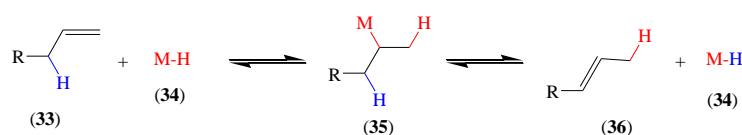


**Sch (6)** Isomérisation de la double liaison après la réaction de métathèse croisée.

L'isomérisation des oléfines est une des réactions secondaires qui peut se produire au cours de la métathèse. La migration de la double liaison peut altérer significativement la formation et la proportion des produits, ce qui conduit à des mélanges difficiles à purifier. Ainsi, le produit désiré peut

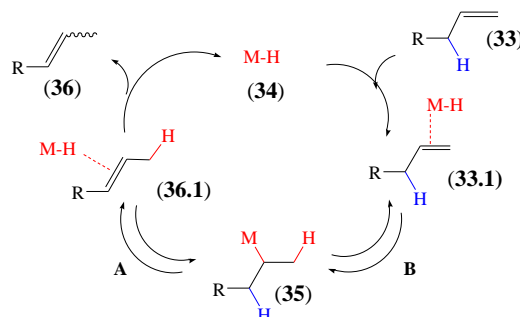
être obtenu avec un faible rendement ou ne pas être isolé.<sup>56,57</sup> Les réactions d'isomérisation des oléfines se produisent lorsque les catalyseurs sont soumis à des conditions plus drastiques telles qu'une température élevée ou lors de taux élevés de dilution et de réutilisation du catalyseur. Bien que le mécanisme exact responsable de l'isomérisation soit inconnu, deux mécanismes sont proposés pour cette réaction.

Certains résultats indiquent que les produits de décomposition du catalyseur peuvent permettre la migration de la double liaison au cours de la réaction de métathèse.<sup>64</sup> Le mécanisme le plus commun à expliquer ce phénomène peut être vu ci-dessous (schéma 7). Selon ce mécanisme, le déplacement de la double liaison serait produit par l'addition de l'oléfine à l'hydruire métallique (formée à partir de l'exposition du métal à des molécules d'eau), formation d'une liaison métal-alkyle suivie d'une  $\beta$ -élimination, reconstruction du complexe d'hydruire métallique et formation de l'isomère de l'oléfine.



Sch (7) Proposition de mechanism d'isomerisation.

La  $\beta$ -élimination peut se produire de deux façons en produisant l'oléfine de départ (voie improductive) ou des oléfines isomérisées. Le schème 8 montre le cycle catalytique complet d'isomérisation.



Sch (8) Cycle catalytique d'isomérisation. A: via improductive B: production  $\beta$ -élimination.

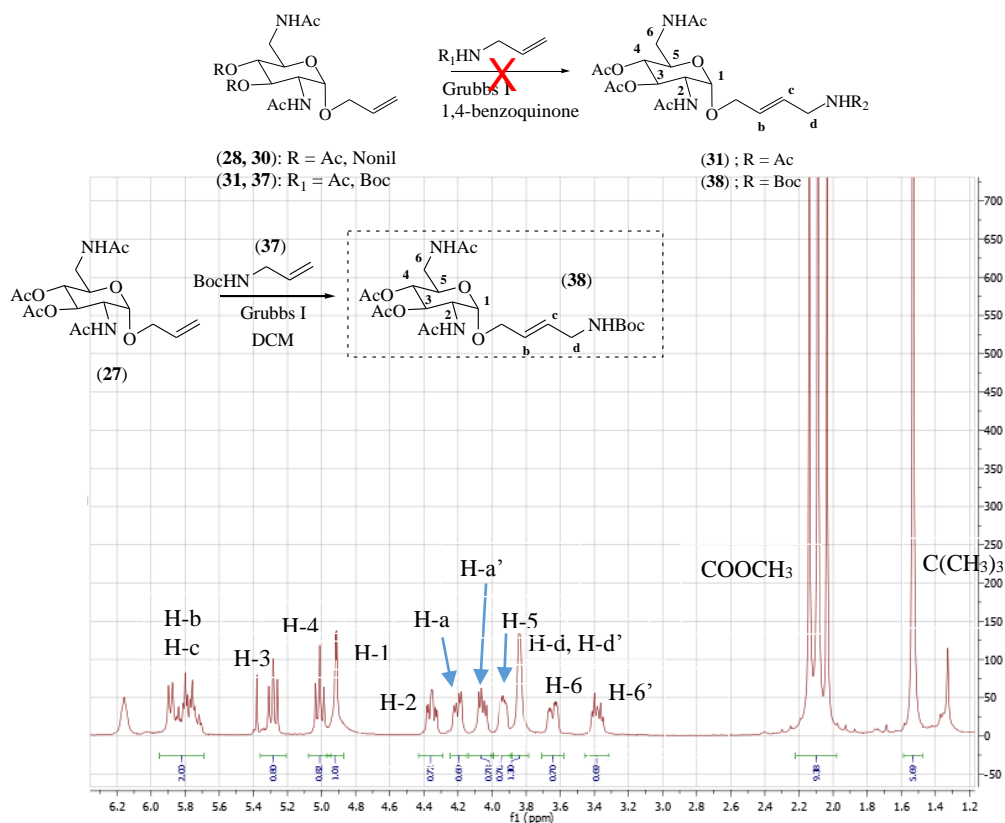
Le second mécanisme comprend la migration d'un atome d'hydrogène allylique. Dans ce cas, après la chélation de l'oléfine se produit un transfert d'atome d'hydrogène allylique à l'ion métallique, ce qui conduit à un dérivé  $\pi$ -allyllique intermédiaire. Cette étape implique une augmentation de deux unités de l'état d'oxydation du métal. L'hydrogène peut revenir à l'atome de carbone d'origine avec régénération de l'oléfine initiale ou peut "migrer" pour donner un isomère.

Hong et al ont étudié l'effet de certains additifs pour empêcher la migration de la double liaison. Il a été établi que la 1,4-benzoquinone est capable d'empêcher l'isomérisation indésirable dans les réactions de métathèse.<sup>56,57</sup>

Basé sur ces résultats, une nouvelle tentative de synthèse du dérivé (**32**) a été réalisée. Le dérivé (**27**) a été soumis à une réaction avec l'allylamine (**31**) dans du DCM en présence du catalyseur de Grubbs I et de 1,4-benzoquinone. Le mélange réactionnel a été chauffé et la réaction a été surveillée par CCM. Après environ 24 h, nous n'avons observé par CCM aucune évolution de la réaction. La réaction a été arrêtée et le résidu obtenu a été caractérisé comme étant le produit de départ (**27**).

Alternativement, nous avons essayé la réaction entre (**27**) et l'allylamine (**37**) protégée par le groupe Boc. Les composés (**27**) et (**37**) ont été soumis à des essais de réaction de métathèse en présence du catalyseur de Grubbs I et de 1,4-benzoquinone. Malheureusement, nous n'avons pas non plus observé dans ces conditions la formation du produit désiré et en fin de la réaction n'a été récupéré que le matériau de départ.

Etant donné que la présence de la 1,4-benzoquinone ne permet pas la réalisation de la réaction, nous avons décidé d'essayer une nouvelle méthodologie de métathèse, en utilisant l'allylamine (**37**) protégée par le groupe Boc en excès (1.2 éq.) dans le DCM en présence du catalyseur de Grubbs I. La réaction a été mise en reflux et maintenu sous flux d'argon. Au bout d'environ 20 h, nous avons observé la formation de deux produits moins polaires que le produit de départ et la réaction a été arrêtée. Après l'étape de purification par chromatographie sur silice, nous avons récupéré du produit de départ et deux autres produits caractérisés comme étant le produit de métathèse croisée (**38**), obtenu avec un rendement de 36% et le produit d'homométathèse (**39**), obtenu avec un rendement de 30%. Dans le schème sont résumées les essais de métathèse faites et aussi le RMN de <sup>1</sup>H du produit obtenu (**38**).

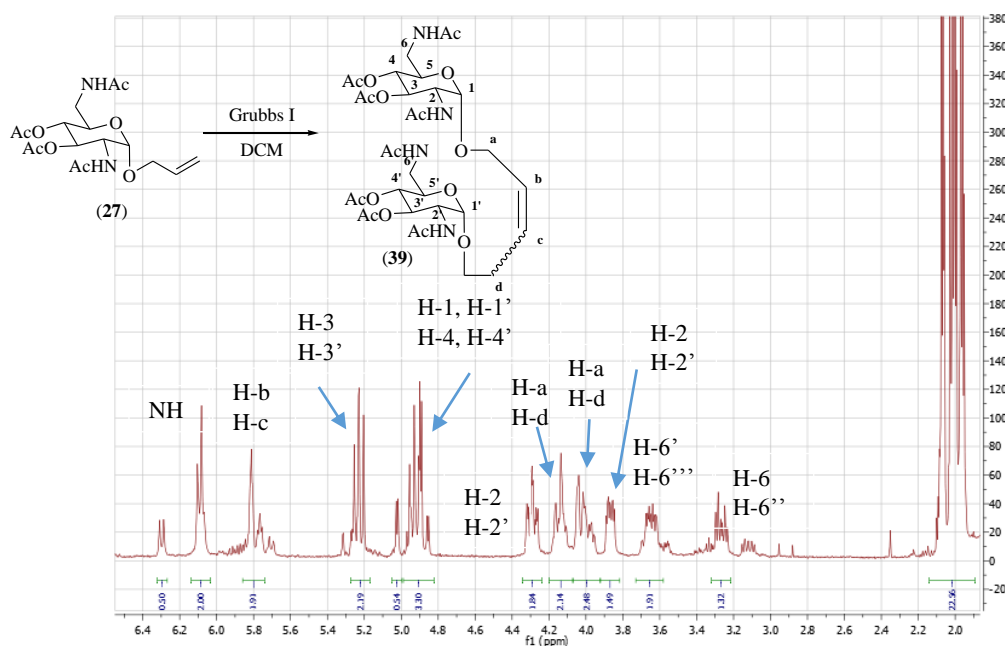


Sch (9) Essais de réaction de métathèse du dérivé (28) et RMN <sup>1</sup>H du produit de métathèse croisé obtenu (38).

### 2.1.2.2. Homométathèse

Pour préparer sélectivement le produit d'homométathèse (39), le dérivé (27) a été soumis à une réaction en présence du catalyseur de Grubbs I et du DCM comme solvant.<sup>59</sup> Le système a été maintenu sous atmosphère d'argon et reflux. La réaction suivie par CCM conduit après 20 h à la disparition complète du produit de départ. Le résidu obtenu a été soumis à une extraction avec le mélange dichlorométhane/eau. Le produit formé lors de la réaction passe ainsi dans la phase aqueuse. Après évaporation de l'eau, le dérivé (39) a été obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 75% (schème 10).





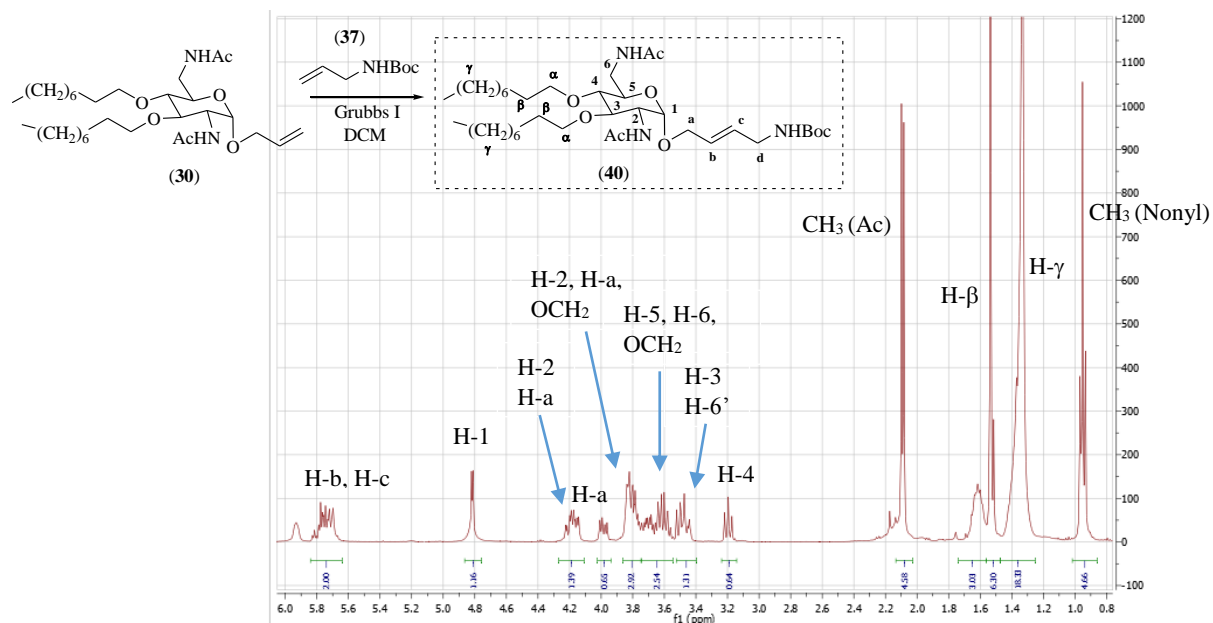
Sch (10) Réaction de homométhèse et RMN  $^1\text{H}$  du produit obtenu.

Dans le spectre de  $^1\text{H}$  RMN de (39), les rapports d'intégration de tous les signaux indiquent que deux résidus *N*-acétylglucosamine sont présents dans la structure de (39). Il est également possible d'observer le signal relatif aux atomes d'hydrogène Hb et Hc, sous la forme d'un multiplet (2H) à  $\delta$  5,78 -5,73. Le spectre de masse à haute résolution de (39) présente un pic à  $m/z = 745,3137$ , compatible en se référant à l'ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  avec la valeur attendue pour la produit d'homométhèse.

### 2.1.3. Série 3,4-diNn - Intermédiaire (28)

#### 2.1.3.1. Réaction de Métathèse Croisée

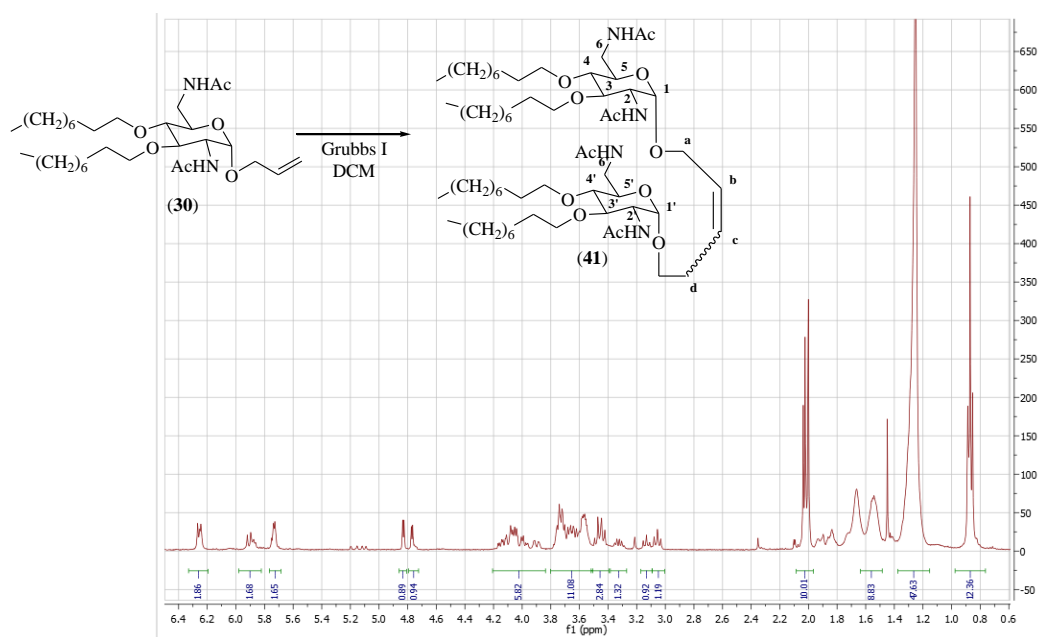
Compte tenu des résultats préliminaires de la réaction de métathèse, pour l'obtention du dérivé dialkylé (40), le produit (30) a été soumis aux mêmes conditions de métathèse avec allylamine (37) en excès (1,2 éq.), en présence du catalyseur de Grubbs I dans le DCM. La réaction a été suivie par CCM et nous avons pu observer la formation d'un produit moins polaire que le produit de départ. Au bout de 20 h, la réaction n'évolue plus et le résidu obtenu après évaporation du solvant a été soumis à une purification par chromatographie sur silice. Le dérivé (40) a été obtenu avec un rendement de 39%. En plus du produit désiré, nous avons aussi isolée 25 % du produit de départ qui n'a pas réagi.



Sch (11) Réaction de métathèse croisé du dérivé (30) et RMN <sup>1</sup>H du produit (40).

### 2.1.3.2. Homométathèse

Le dérivé (30) a également été utilisé pour la synthèse de l'homodimère (41). La réaction a été effectuée en présence du catalyseur de Grubbs I dans le DCM et après la purification par chromatographie sur silice le dérivé (41) a été obtenu avec un rendement de 72% (schéma 12).

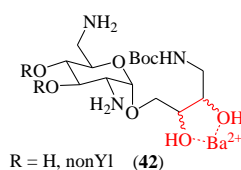


Sch (12) Réaction de métathèse croisé du dérivé (30) et RMN <sup>1</sup>H du produit.

Dans le spectre de  $^1\text{H}$ -RMN du dérivé (**41**) on observe que les signaux relatifs aux hydrogènes de la chaîne alkyle correspondent à un produit tétraalkylé. Dans le spectre de masse à haute résolution le pic  $m/z = 1081.8345$ , est en accord avec la masse moléculaire attendue de (**41**) indiquant une réaction homométhathèse.

## 2.2. Groupe protecteur Boc

Il est connu que pour que se produisent les réactions de désacétylation des groupes amine, il faut utiliser des conditions fortement basiques, des températures élevées et de longs temps de réaction. En particulier, nous avons observé dans notre laboratoire que le groupe NHAc en position C-2 ne réagit pas lorsque les atomes d'oxygène en position C-3 et C-4 sont alkylés. Un autre problème qui peut être rencontré peut venir de l'utilisation du  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  en tant que réactif sachant qu'après la réaction de métathèse, une réaction d'oxydation doit être effectuée pour former le diol correspondant et que celui-ci peut complexer le cation divalent  $\text{Ba}^{2+}$ , pour conduire à des complexes avec les hydroxyles vicinaux pour gêner les étapes de purification.



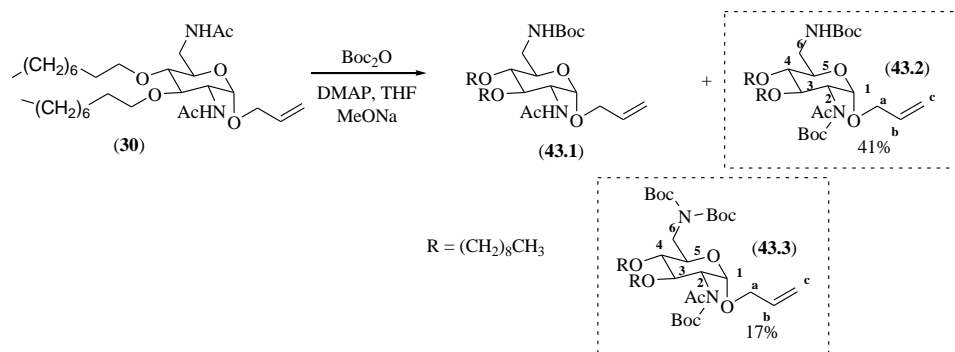
**Fig. (15)** Interaction possible entre le cation divalent  $\text{Ba}^{2+}$  et hydroxyles vicinaux.

Afin d'éviter ces problèmes potentiels dans la déprotection des produits finaux, nous avons choisi d'utiliser d'autres groupements protecteurs des fonctions amine.

Encouragée par les résultats obtenus avec l'allylamine (**37**), le premier groupe choisi a été le groupe Boc. L'utilisation de la stratégie Boc permet la déprotection dans des conditions plus douces. Le groupe Boc peut être facilement éliminé lors d'un traitement avec de l'acide trifluoroacétique.<sup>65,66</sup>

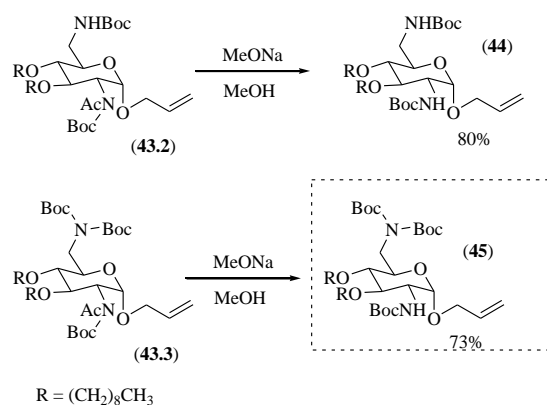
### 2.2.1. Synthèse des intermédiaires 3,4-diNn

Cette stratégie a été privilégiée pour la synthèse des dérivés 3,4-diNn. Pour obtenir le dérivé (**43**), (**30**) a été soumis à une réaction avec du  $\text{Boc}_2\text{O}$  et du DMAP dans le THF. On observe ainsi par CCM la formation de 3 produits moins polaires que le produit de départ. Des nouveaux ajouts de réactifs ont été faits avec après 24 h un ajout de 20 éq. de  $\text{Boc}_2\text{O}$  et 4 éq. de DMAP pour former principalement deux produits qui ont été purifiés par CCS. L'analyse en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  a confirmé la formation des dérivés (**43.2**) et (**43.3**) qui ont été obtenu avec un rendement de 41% et 17% respectivement.



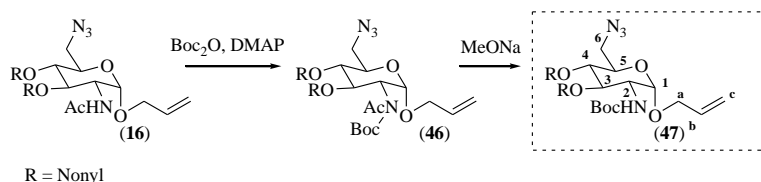
**Sch (13)** Protection du dérivé (28) avec le groupe Boc.

L'étape suivante a été la désacétylation avec du méthylate de sodium dans le méthanol.<sup>67</sup> Après l'étape de purification, les dérivés (44) et (45) ont été obtenus avec 80% et 73% de rendement respectivement.



**Sch (14)** Désacétylation des dérivés (43.2) et (43.3) en présence de méthylate de sodium dans du méthanol.

Nous avons aussi effectué la synthèse du dérivé (47), 2-Boc-6-N<sub>3</sub>, afin d'étudier la réactivité avec les catalyseurs de Grubbs de troisième génération. A cet effet, la même procédure de désacétylation a été effectuée en deux étapes, pour obtenir le dérivé recherché avec un rendement de 99%.

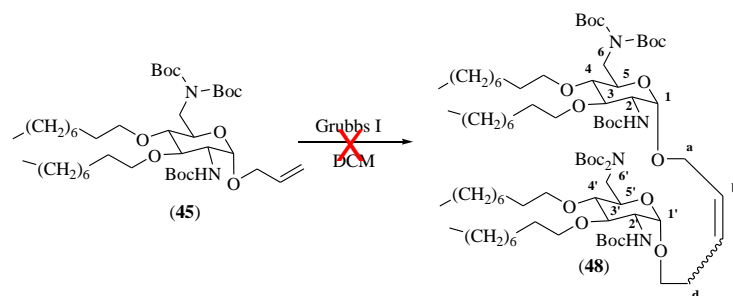


**Sch (15)** Protection du dérivé (16) avec le groupe Boc.

## 2.2.2. Métathèse

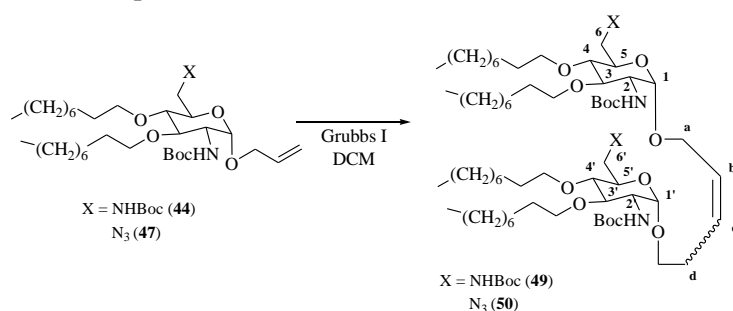
### 2.2.2.1. Homométathèse

Toutefois, avant la métathèse croisée, nous avons choisi de soumettre le dérivé (45) à la réaction d'homométathèse en présence du catalyseur de Grubbs I dans le DCM. Le système a été mis au reflux et maintenu sous courant d'argon. Après 24 h, nous n'avons pas observé de formation de produit. La réaction a été arrêtée, et après les étapes de purification, il a été constaté que seul le produit de départ a été récupéré (45).



Sch (16) Essai de réaction de homométathèse du dérivé (45).

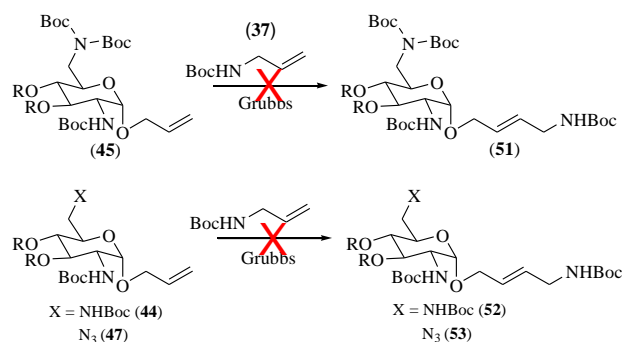
La réaction a été répétée et le milieu réactionnel modifié tout comme le catalyseur, les catalyseurs de Grubbs 2 et 3 ont été utilisés. La réaction a aussi été effectuée par micro-ondes. Cependant, dans aucune des tentatives, nous n'avons pu observer la formation de produit, Tableau 1. Le dérivé (44) et (47) ont aussi été soumis à la réaction de homométathèse, dans les conditions décrites précédemment sans évidence de formation du produit tableau de 3.



Sch (17) Essai de réaction de homométathèse des dérivés (44) et (47).

### 2.2.2.2. Métathèse Croisée

Les dérivés (44), (45) et (54) ont aussi été soumis à une réaction de métathèse avec l'allylamine (37). Quel que soit le milieu réactionnel et/ou le catalyseur (Grubbs 2 et 3) utilisé seulement du départ a été récupéré.



**Sch (18)** Essai de réaction de métathèse croisée des dérivés (44), (45) et (47).

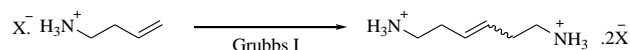
Tout comme dans les autres essais effectués avec les groupes Boc introduit sur les atomes d'azote en positions C-2 et C-6, nous n'avons pas pu observer la formation des produits désirés.

La présence du groupe Boc volumineux, principalement en C-2, empêche probablement la réaction de métathèse. L'encombrement stérique promu par la présence de ce substituant peut rendre les oléfines peu ou complètement inactive à l'action de catalyseur de Grubbs.<sup>59</sup> Cette observation pourrait justifier le non conversion du produit de départ après les essais de réaction de métathèse réalisés.

### 2.3. Groupe Protecteur Sels d'Ammonium ( $\text{NH}_4^+\text{X}^-$ )

Afin de développer une méthode simple et efficace de protection des amines, Woodward et al ont proposé en 2011 l'utilisation des sels d'ammonium en tant que groupes protecteurs pour les réactions de métathèse. Plusieurs réactions d'homodimérisation ont été effectuées par Woodward et al en 2011 et leurs résultats sont présentés dans le tableau 2. Dans les essais d'homodimérisation menés, les amines ont donc été masquées sous la forme de sels d'ammonium. Les dérivés utilisés étaient les sels de 3-buténylamine (54), (56), (58), (60) et (62) (Tableau 1). Bien que la métathèse croisée de la 3-buténylamine non modifiée ait échoué, la métathèse du dérivé (54) dans du toluène saturé en HCl a fourni l'homodimère avec un rendement de 38 % (Tableau 2).<sup>68</sup>

**Tab (2)** Réactions de métathèse menées par Woodward et al en 2011 avec les amines sous forme de sels d'ammonium et résultats obtenus.<sup>68</sup>



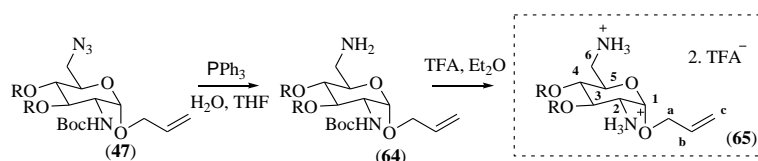
Anion X	Conditions	Produit	Rendiment
Free amine	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Δ	---	0 <sup>a</sup>
(54), Cl	80 °C, HCl et toluene	(55)	38 <sup>a</sup>
(56) OTf <sup>b</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Δ	(57)	8 <sup>a</sup>
(58), OTf <sup>c</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Δ	(59)	83 <sup>d</sup>
(60), BF <sub>4</sub> <sup>c</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Δ	(61)	91 <sup>a</sup>
(62), OTs <sup>c</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Δ	(63)	92 <sup>d</sup> , 95 <sup>d,e</sup>

Conditions: catalyseur = 3, concentration du substrat = ~ 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 24 h, sous N<sub>2</sub>. <sup>a</sup> % conversion déterminé par spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O. <sup>b</sup> Métathèse de sel préformée *in situ* avec AgOTf. <sup>c</sup> Sel d'ammonium préformé. <sup>d</sup> Rendement en produit isolé. <sup>e</sup> Chauffage par micro-ondes utilisé, 2 h, 100 l C, 100 W.

### 2.3.1. Synthèse des intermédiaires 3,4-diNn

En adoptant la même stratégie de Woodward et al, en 2011, des sels d'ammonium ont été synthétisés en vue de réaliser la protection de l'amine correspondante. Profitant du dérivé (47) protégé par le groupe Boc en C-2 et C-6 nous avons obtenu le dérivé 2,6-di-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> associés avec deux ions triflate. Ce produit intermédiaire a été obtenu en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons effectué la réaction de réduction du groupement azoture en présence de triphénylphosphine. Ensuite nous avons réalisé la déprotection du groupement Boc en présence de TFA. Les conditions classiques pour cette réaction ont été modifiées, puisque généralement le solvant utilisé, de l'eau, peut provoquer l'hydrolyse de la liaison glycosidique en C-1. Dans ce cas, le solvant choisi pour la réaction a été de l'Et<sub>2</sub>O. A travers de l'analyse en RMN <sup>1</sup>H, nous avons pu confirmer la formation du produit par l'absence de singulet correspondant

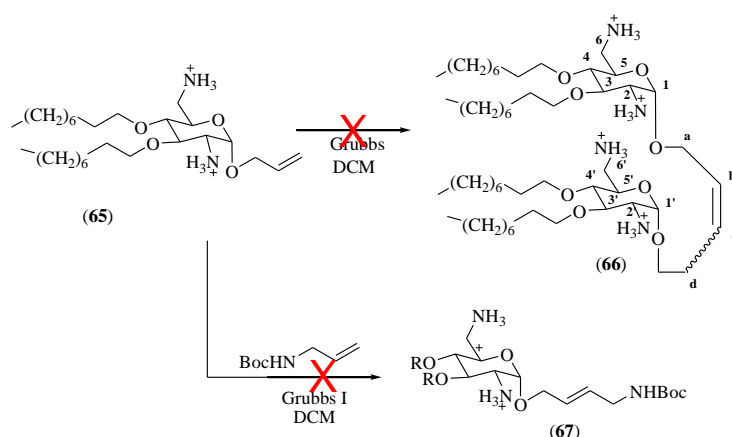
aux trois groupes méthyle du groupement Boc. Dans le spectre de masse à haute résolution, un pic avec m / z = 1081.8345 est en accord avec la masse moléculaire attendue pour (65).



**Sch (19)** Synthèse du dérivé (65) à partir du dérivé (51).

### 2.3.2. Métathèse

Après l'obtention du dérivé (65) nous avons procédé aux premiers essais de la réaction d'homométathèse en utilisant le catalyseur de Grubbs I dans le DCM à reflux. Contrairement à toute attente au bout de 24 h, la réaction a été arrêtée sans formation d'aucun produit. Un nouveau essai a été effectué en utilisant du dichloroéthane (DCE) comme solvant de façon à augmenter la température de reflux (80 °C). Après 24 h à reflux, nous n'avons pas observé la formation d'aucun produit. La réaction a été ensuite amené au micro-ondes pendant 15 min, en présence dans le DCM ou le DCE. Toutefois, comme pour les autres essais, aucun des produits attendus n'a été formé. Les réactions d'homométathèse ont également été tentées mais sans l'obtention des produits.



Sch (20) Essais de réaction de métathèse du dérivé (65)

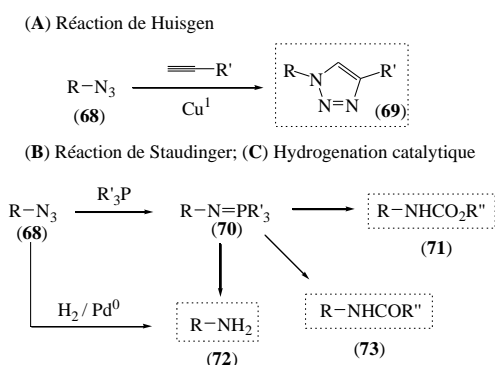
Trois hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces échecs. La première vient de la faible solubilité du produit de départ dans le solvant utilisé. Le produit n'a pas été complètement solubilisé dans le DCM ou le DCE. Il a été nécessaire d'utiliser un grand volume de solvant qui a conduit à diminuer la concentration du catalyseur Grubbs dans la réaction. La seconde est due à l'influence de l'ion triflate en tant que contre-ion utilisé dans la réaction car cet ion a pu réagir avec le catalyseur de Grubbs. La troisième raison est due à des conformations défavorables adoptées par les réactifs ou intermédiaires de réaction. Face à ces échecs dans les réactions de métathèse, une nouvelle voie de synthèse a été planifiée, en utilisant les azotures comme des groupements protecteurs.

### 2.4. Groupe Protecteur Azoture (N<sub>3</sub>)

Les azotures sont aussi des intermédiaires dans la synthèse des amines et sont connus des intermédiaires clés dans la synthèse des 1,2,3-triazoles elles (chimie click). En tant que groupe protecteur, les azotures contournent la plupart des problèmes rencontrés avec les amides et les carbamates. La possibilité d'une déprotection dans des conditions douces, telles que par hydrogénation

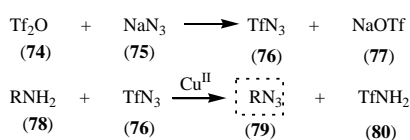


catalytique ou à travers la réaction du phosphazène de Staudinger, produisant une amine primaire<sup>69</sup>, amide<sup>70</sup> ou carbamate<sup>71</sup> (Schéma 22). La protection des amines sous forme d'azotures est une stratégie communément appliquée à l'assemblage des oligosaccharides, des aminoglycosides antibiotiques.<sup>62,72</sup>



Sch (21) Les réactions des azotures

Typiquement les azotures sont introduits dans la molécule par la formation de liaisons C-N résultant de l'attaque nucléophile d'un ion azoture sur un centre déficient en électrons d'une autre molécule. Malgré sa réussite en synthèse, cette approche peut, dans certains cas, conduire à la formation de produits d'élimination ou de produits avec la stéréochimie non désirée. Dans ce contexte, la réaction de diazotransfert est en contraste direct avec l'approche précédente. Cette réaction consiste en la conversion d'une amine existante en azoture en présence d'un donneur de diazide, l'azoture de triflate ( $\text{TfN}_3$ ), catalysée par du  $\text{Cu(II)}$  (schéma 23).<sup>73</sup>

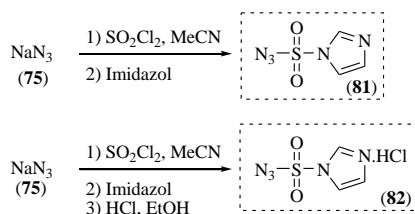


Sch (22) Réaction de diazotransfer avec du  $\text{TfN}_3$

L'élégance de ce processus réside dans ses conditions de réaction douces, des rendements élevés et à la préservation de la stéréochimie préexistante. Cependant, ce procédé présente également des problèmes. La nature explosive du  $\text{TfN}_3$  et son relatif faible temps de demi-vie nécessitant une préparation en solution avant l'utilisation. En outre, cette instabilité de  $\text{TfN}_3$  et les rendements faibles dans sa préparation nécessite son utilisation en excès.<sup>74</sup>

En 2007, l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle (**81**) a suscité l'intérêt de Goddard et Borger, qui ont prouvé la capacité du dérivé à reproduire l'activité du  $\text{TfN}_3$  comme donneur de diazide. Le composé a été choisi en raison de sa facilité de préparation, ainsi que pour sa stabilité (solide cristallin) par rapport aux autres donneurs de diazide testés et aussi pour être facilement éliminés après réaction. Le

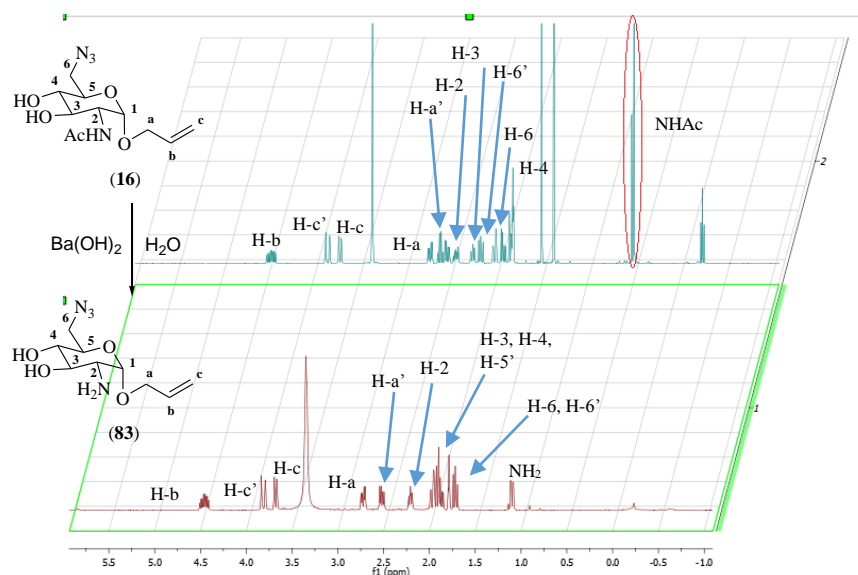
chlorhydrate d'azoture d'imidazole-1-sulfonyle (**82**), solide cristallin incolore, a la même réactivité que (**81**), conduisant à la formation des mêmes produits. L'avantage de l'utilisation de ce chlorhydrate réside dans la simplicité de leur préparation, réalisée sur une grande échelle par une réaction 'one pot', ne nécessitant pas de purification par chromatographie avec un bon rendement et une pureté élevée à la fin de toutes ces étapes (schéma 24).<sup>72</sup>



Sch (23) Synthèse du dérivé (**81**) et (**82**)

#### 2.4.1. Synthèse des Intermediaires Protégés

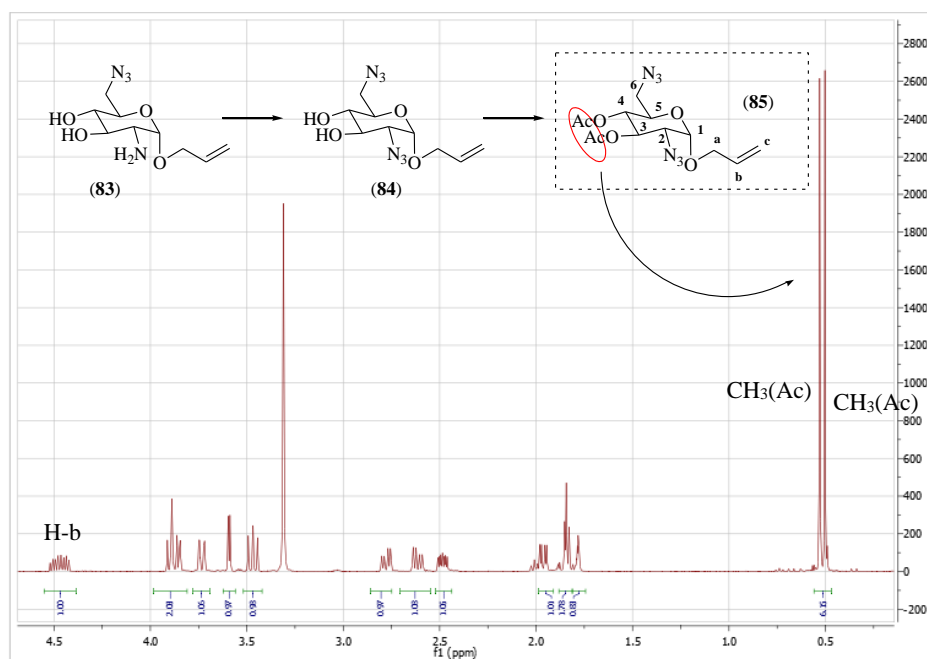
Pour obtenir les dérivés diazoture deux voies de synthèse ont été adoptées. Pour la première voie, nous avons d'abord effectué l'élimination du groupement acétyle en C-2 de l'intermédiaire (**16**), réalisée selon la méthodologie décrite par Wong et collaborateurs.<sup>51</sup> Pour ce, la réaction sur le dérivé (**16**) a été réalisée dans de l'eau avec un excès de baryte Ba(OH)<sub>2</sub> octahydraté. Le mélange réactionnel a été chauffé à 120 °C jusqu'à ce que la disparition du produit de départ soit complète. Ensuite, un volume 20 fois supérieur de DCM par rapport à l'eau a été ajouté et le mélange a été agité pendant 24 h. Après l'extraction, la phase organique a été séparée et séchée avec du MgSO<sub>4</sub> et ensuite évaporée, nous permettant d'obtenir le produit désacétylé (**83**). Le processus a été répété plusieurs fois. A la fin de cinq extractions, nous avons obtenu le produit désacétylé avec 67% de rendement. Dans les spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du produit, nous avons observé les signaux correspondants à tous les atomes d'hydrogène et de carbone attendus avec disparition des signaux des atomes du groupe acétyle. Nous avons pu conclure que la déprotection avait été réalisée.



**Fig (16)** RMN  $^1\text{H}$  du dérivé (16) et du dérivé désacétylé (83)

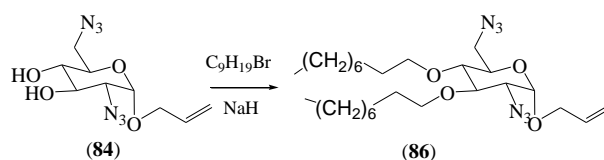
Le produit obtenu a ensuite été soumis à la réaction de diazotransfert en présence du chlorhydrate d'azoture d'imidazole-1-sulfonyle selon la méthode développée par Goddard-Stick Borger en 2007. Tout d'abord, le produit a été solubilisé dans du méthanol anhydre sous atmosphère d'argon. Ensuite, nous avons ajouté 1.2 équivalents de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et une quantité catalytique de  $\text{CuSO}_4$ . Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 1 h avant l'ajout du chlorhydrate d'azoture d'imidazole-1-sulfonyle. Après l'addition, nous avons laissé le mélange réactionnel sous agitation pendant 18 h. Après disparition du produit de départ, le mélange a été concentré, dilué avec de l'eau, acidifié avec une solution aqueuse concentrée de HCl puis extraite avec de l'EtOAc. La phase organique a ensuite été séchée et concentrée. En raison de la forte polarité du dérivé (84), nous avons réalisé l'étape d'acétylation des fonctions hydroxyle sans purification préalable.

Tout d'abord, le dérivé (84) a été solubilisé dans de la pyridine anhydre et laissé sous agitation pendant 15 min à 70 °C. Ensuite, après ajout d'anhydride acétique, le mélange réactionnel a été laissé pendant 15 h sous agitation. Dans les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du produit, il est possible d'observer les déplacements correspondants aux protons des groupes méthyle et aux deux atomes de carbone des groupes acétyle. Dans le spectre de masse à haute résolution un pic  $m/z = 377.1183$ , en accord avec la masse moléculaire attendue pour (85), est observé ce que confirme la formation du produit.



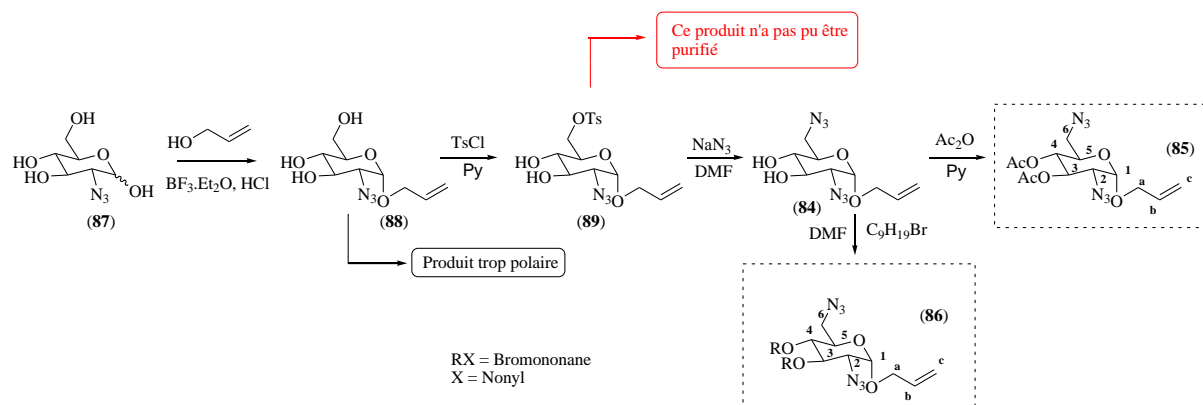
Sch (24) Réaction de diazotransfer et acetylation et RMN <sup>1</sup>H du produit (85).

A partir du dérivé diazoture (84), il a été également possible d'effectuer la synthèse du dérivé de 3,4-dinonyl (86) selon la même méthode réalisée pour la synthèse du dérivé (85). Lors de l'obtention de ce produit, dans les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, nous avons pu observer des signaux de groupes alkyle correspondant à 59 protons, ce qui indique la présence de bromononane dans la molécule. Après des successifs lavages avec du cyclohexane et d'autres tentatives de purification par chromatographie, le dérivé a toujours présenté le même nombre d'atomes d'hydrogène.



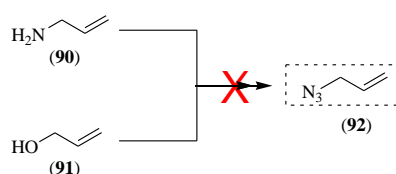
Sch (25) Réaction d'alkylation du dérivé 2,6-diN<sub>3</sub> (84) pour l'obtention du dérivé 2,6-diN<sub>3</sub>-3,4-diNn (86).

Une autre voie de synthèse utilisée pour obtenir les diazotures a été utilisée à partir d'un dérivé commercial portant un groupe azoture en C-2 (87). Il a été directement effectué la réaction de glycosidation en présence de l'alcool allylique, BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O et de HCl. Après 20 h de réaction, le produit a été chromatographié sur colonne de silice. Cependant, après avoir subi deux colonnes chromatographiques, le produit n'a pu pas être purifié. La réaction de tosylation a donc, été effectuée sur le produit impur, afin d'effectuer une purification plus efficace grâce à l'absorption de ce nouveau dérivé dans UV. Après réaction avec le chlorure de tosylo, le produit attendu n'a pas pu être purifié par chromatographie sur silice. Cette voie a donc été abandonnée.



**Sch (26)** Deuxième voie de synthèse proposée pour l'obtention des intermédiaires (85) et (86).

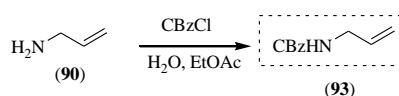
Afin d'utiliser les mêmes groupes protecteurs dans les deux dérivés à coupler par métathèse, des essais de synthèse ont été effectués afin d'obtenir l'azoture d'allylamine. Deux différentes méthodes ont été utilisées. Le premier essai a été fait à travers la réaction de diazotransfert en utilisant le chlorhydrate d'azoture d'imidazole-1-sulfonyle et l'allylamine. La deuxième méthode a été l'azidation directe de l'alcool allylique en présence de 3 équivalents de  $\text{TMSN}_3$  et  $\text{AgOTf}$  dans du toluène à température ambiante. L'absence de chromophore ne nous a pas permis d'isoler le produit recherché.



**Sch (27)** Essais d'obtention de l'intermédiaire (92).

Après ces essais, le groupe  $\text{CBz}$  a été choisi pour protéger l'allylamine. L'utilisation du  $\text{CBz}$  comme groupe protecteur présente deux avantages majeurs. Le premier est que la déprotection du groupe peut être réalisée par hydrogénation catalytique, ce qui permet la déprotection simultanée de tous les groupes protecteurs de fonction amine. Le second vient de sa détection par absorption UV qui facilite les étapes de purification.

La synthèse du dérivé a été réalisée selon la méthode employée par Xu 2013, à travers la réaction de l'allylamine et du *N*-allyl-carbamate de benzyle en présence du  $\text{H}_2\text{O}$ , de l' $\text{EtOH}$  et du  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , avec un rendement de 84 %.<sup>75</sup>

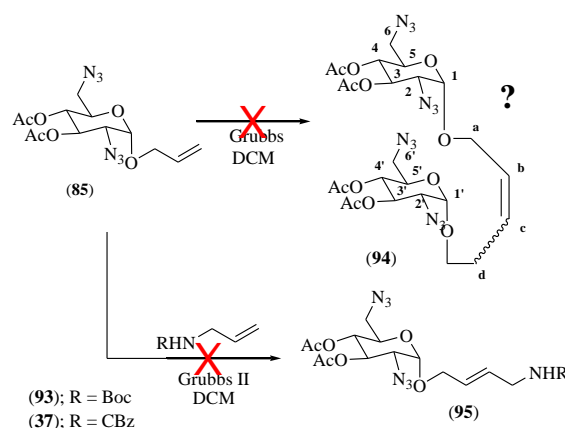


**Sch (28)** Obtention de l'intermédiaire (93).

### 2.4.2. Métathèse en série 3,4-diAc - Intermédiaire (85)

Après l'obtention des intermédiaires, les réactions de métathèse ont été effectuées. Puisque le catalyseur Grubbs I n'est pas utilisable avec des azotures, l'utilisation du catalyseur Grubbs III a été choisie, telle que décrite par Kanemitsu et Seeberger en 2003.<sup>62</sup>

Les réactions de métathèse des composés 2,6-diN<sub>3</sub>, ont d'abord été effectués avec le dérivé (85) dont les fonctions hydroxyles sont acétylées. L'homométathèse de (85) en présence du catalyseur de Grubbs III dans le DCM à reflux a tout d'abord été essayée. Après plus de 20 h, la formation d'un produit a été observé par CCM sans conversion complète le produit de départ. Ce produit n'a pas pu être isolé. Des nouveaux essais de réaction ont été menés mais cette fois sans formation de produit. D'autre part, aucun produit n'a été détecté dans les réactions de métathèse croisées.



Sch (29) Essais de réaction de métathèse du dérivé (85)

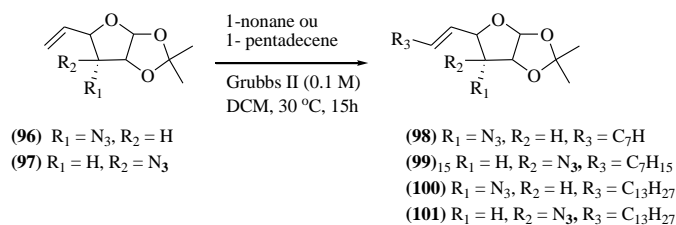
### 2.4.3. Métathèse en Série 3,4-diNn - Intermédiaire (86)

Le dérivé (86) 3,4-dinonyl a été soumis à la réaction de métathèse en utilisant les mêmes conditions que celles utilisées pour les réactions avec le produit 3,4-diAc. Ce dérivé a tout d'abord été soumis à la réaction d'homodimérisation en présence du catalyseur de Grubbs III dans le DCM distillé à reflux et sous atmosphère d'argon. Au bout de 24 h, aucun produit n'a été formé et la réaction a été stoppée. Le dérivé de départ a été récupéré par chromatographie sur silice. La réaction n'a pas été observée dans le DCE à reflux et sous micro-ondes ainsi que dans toutes ces conditions les réactions d'hétérométathèse avec les allylamines (37) et (93).

Après les échecs en utilisant le catalyseur de Grubbs III, des essais de métathèse avec le catalyseur de Grubbs II ont été effectués selon la méthode développée par Chaudhari, Kumar et Dhavale en 2005.<sup>76</sup> Dans cette étude, les auteurs ont utilisé le catalyseur de Grubbs II pour la synthèse de nouveaux D-érythro et D-thréo-sphingosine à partir de D-glucose. L'utilisation du catalyseur de Grubbs de première génération dans les réactions de (96) et (97) avec le 1-nonène n'a pas fourni de produits de couplage

alors que les mêmes réactions avec 10% en mol de catalyseur de Grubbs II avec le 1-nonène ainsi que le 1-pentadécène a fourni les produits de couplage **(98)** et **(99)** / **(100)** et **(101)**, respectivement, avec de bons rendements.

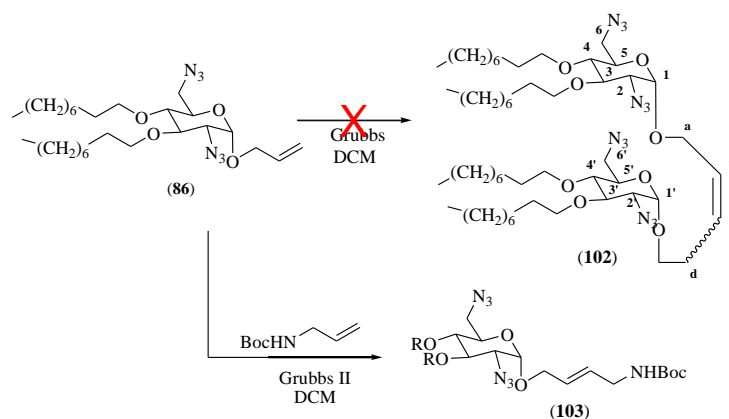
**Tab (3)** Étude des réactions de métathèse croisée



Réactif	Alquene <sup>a</sup>	Catalyseur (mol %)	Conditions Réactionnelles	Produit (Rendement %) <sup>b</sup>
<b>(96)</b>	1- nonène	<b>A</b> (20)	30 °C, 72 h	Pas de réaction <sup>c</sup>
<b>(97)</b>	1- nonène	<b>A</b> (20)	30 °C, 72 h	Pas de réaction <sup>c</sup>
<b>(96)</b>	1- nonène	<b>B</b> (10)	30 °C, 15 h	<b>(98)</b> , 83
<b>(97)</b>	1- nonène	<b>B</b> (10)	30 °C, 14 h	<b>(99)</b> , 86
<b>(96)</b>	1- pentadécène	<b>B</b> (10)	30 °C, 16 h	<b>(100)</b> , <b>85</b>
<b>(97)</b>	1- pentadécène	<b>B</b> (10)	30 °C, 15 h	<b>(101)</b> , 87

<sup>a</sup> 1-nonène et 1-pentadécène (2,0 éq.) en  $CH_2Cl_2$ . <sup>b</sup> Rendement isolé. <sup>c</sup> Produit de départ (65-75%)

Cette étude a démontré la compatibilité du catalyseur de Grubbs II avec des azotures dans les réactions de métathèse. Ainsi, des essais de réaction de métathèse ont été réalisés selon les mêmes méthodes utilisées par Chaudhari, Kumar et Dhavale. Aucun produit n'a été formé dans les réactions d'homodimérisation effectuées, toutefois la réaction du dérivé d'allylamine **(37)** avec le sucre **(86)** a conduit à la formation d'un produit plus polaire que le produit de départ détecté en CCM **(86)**. Plusieurs tentatives de purification ont été effectuées sans succès.



Sch (30) Réaction de métathèse du dérivé (86).

## 2.5. Groupes Protecteurs de l'Allylamine

De nouveaux intermédiaires de l'allylamine avec des groupes protecteurs différents ont été synthétisés pour chaque essai de métathèse. L'objectif a toujours été d'utiliser des groupes protecteurs éliminés en une seule réaction de déprotection.

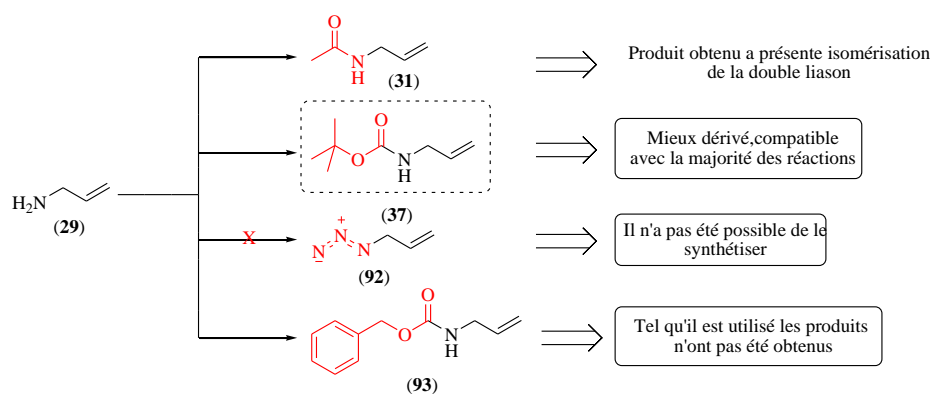
Comme abordé ci-dessus, à l'exception des azotures d'allyles, les dérivés acétylés, Boc, et Cbz d'allylamine ont été synthétisés et utilisés. Tous les dérivés utilisés dans diverses conditions de métathèse ont aussi montré des résultats différents.

Malgré la formation d'un produit de métathèse par réaction de l'allylamide (31) et le sucre (28), après des analyses en RMN, il a été constaté qu'il s'agit du produit de la réaction d'isomérisation de la double liaison. Lors de l'utilisation des conditions développées par Hong et al en 2005 aucun produit de métathèse n'a été détecté.

La deuxième allylamine protégée synthétisée porte le Boc et a conduit la formation de produits d'hétérométathèse dans des conditions classiques sans apparition de réactions d'isomérisation. Pour cette raison, l'intermédiaire (37) a été utilisé même lorsque les amines du sucre sont protégées avec d'autres groupes protecteurs.

En ce qui concerne le groupement CBz, son utilisation n'a fourni aucun des produits attendus. Un résumé des réactions effectuées pour obtenir les dérivés et les principaux résultats obtenus se trouve dans le schéma 31.





Sch (31) Groupes protecteurs de l'allylamine.

### 3. REACTIONS D'OXYDATION

Après avoir procédé à diverses réactions de métathèse, il a été montré que les groupes les plus compatibles avec la réaction de métathèse dans la voie de synthèse sont : le Boc pour la protection de l'allylamine et le groupe acétyle pour la protection du sucre. Grâce à l'utilisation de ces deux groupes protecteurs quatre dérivés de métathèse ont été synthétisés, purifiés et caractérisés (Figure 17). Le dérivé (104) n'ayant pas été totalement caractérisé, il n'a pas été oxydé. Les produits obtenus par métathèse croisée, ont donc été oxydés.

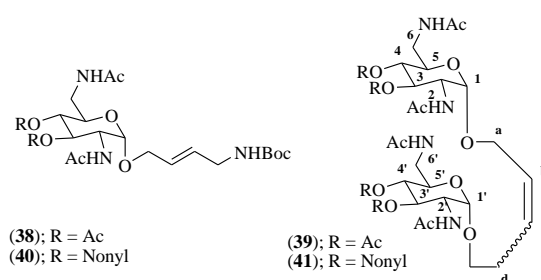


Fig (17) Dérivés obtenus après les étapes de métathèse.

#### 3.1. Produits non Alkylés

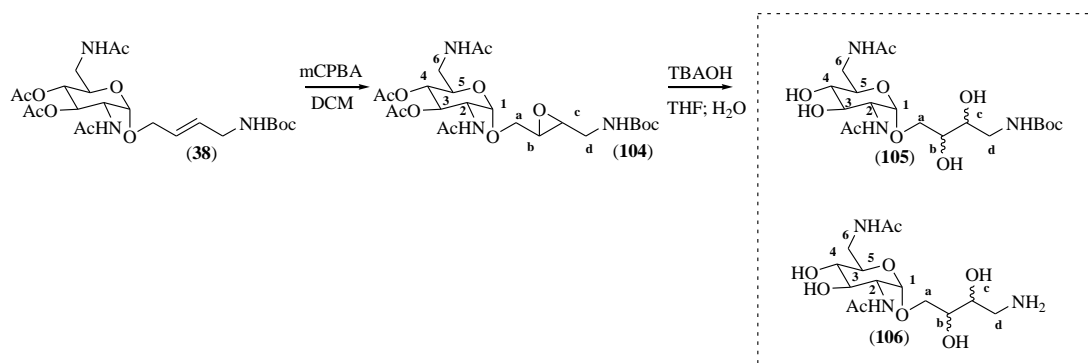
Dans la première voie de synthèse, il a été initialement effectué la réaction d'époxydation du dérivé (38). Les époxydes sont considérés comme des intermédiaires polyvalent synthèse organique. Ils peuvent être conduire à une grande variété de produits pour générer jusqu'à deux centres chiraux. La tension du cycle à trois atomes et sa polarité font les époxydes des composés hautement réactifs. Parmi les différentes possibilités de réaction, l'addition de nucléophiles à des époxydes conduit à des dérivés 1,2-disubstitués. Les peroxyacides organiques sont les réactifs classiques pour l'époxydation d'oléfines et parmi eux l'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA) est le plus couramment utilisé.<sup>77</sup>

Le dérivé (83) a été soumis à la réaction d'époxydation avec du mCPBA dans du DCM.<sup>78</sup> La réaction a été surveillée par CCM et des nouvelles additions du mCPBA ont été faites jusqu'à consommation du

produit de départ. Le produit formé n'a pas pu être purifié par chromatographie et a été utilisé après lavage par extraction dans l'étape suivante d'ouverture de l'époxyde avec l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH) dans l'eau et le THF.

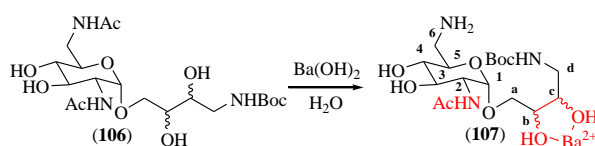
Le dérivé (**105**) a donc été soumis à une réaction avec du TBAOH 40% dans le THF. La réaction a été contrôlée par CCM et, après environ 1 h, la disparition du produit de départ a été observé. Après évaporation du THF et évaporation nécessaire de l'eau en raison de difficulté d'extraction, 20 mg d'un premier produit (**106.1**) et 60 mg d'un produit plus polaire (**106.2**), résultant de l'élimination du Boc et des groupes acétyle.

Dans les spectres de RMN  $^1\text{H}$  des deux produits nous notons l'absence du signal des groupes Ac en C-3 et C-4 des deux dérivés. Les conditions employées dans la réaction semblent donc provoquer la déprotection de. Pour le produit (**106.2**), les signaux du groupe Boc de l'amine de la chaîne latérale



Sch (32) Obtention des dérivés (**106.1**) et (**106.2**) à travers des réactions d'oxydation

La réaction finale de déprotection a ensuite été tentée avec le dérivé de (**106**) obtenu. Trois conditions principales ont été utilisées : 1) de l'hydrazine à 85%, 70 °C pendant 15 h ;<sup>79</sup> 2) de l'hydroxyde de potassium (10 éq.) en solution aqueuse à reflux 6 h ; 3) de l'hydroxyde de baryum en solution aqueuse (10 éq.) à reflux 6 h.<sup>51</sup> Bien qu'efficace pour la déprotection du groupement acétyle en position C-3, C-4 et C-6 avec élimination mineure du groupement Boc, aucune des méthodes utilisées n'a été efficace pour la déprotection du groupe acétyle en position C-2. La méthode 3 à l'hydroxyde de baryum a été la plus efficace mais n'a permis d'isoler le produit recherché probablement en raison de la complexation d'un ion Ba<sup>+2</sup> par les hydroxyles en C-b et C-c de la chaîne latérale.

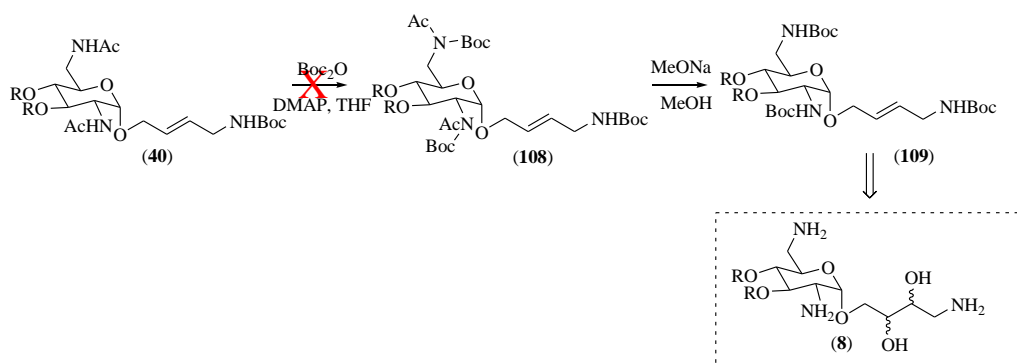


Sch (33) Réaction de déprotection du dérivé (**106**) et produit obtenu complexé avec un ion Ba<sup>+2</sup>.

### 3.2. Produits Alkyles Série Néamine (40)

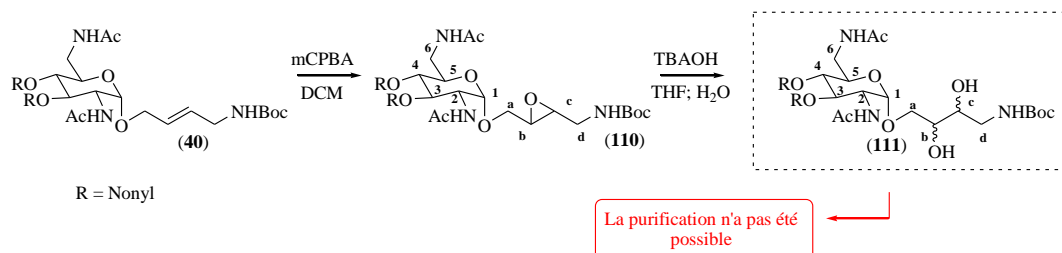
En raison de difficulté de déprotection en milieu basique des groupes *N*-acétyle portés par les dérivés 3,4-dialkylés mis en évidence précédemment dans notre laboratoire, le dérivé 3,4-dinonyl (**44**) a été traité avec l'anhydride de Boc pour permettre une élimination ultérieure des groupes *N*-acétyle en milieu acide en présence de TFA.<sup>65,66</sup>

Pour l'obtention du dérivé (**109**), le dérivé (**40**) a été soumis à une réaction avec du Boc<sub>2</sub>O et du DMAP dans le THF. Après 24 h de réaction, le produit de départ n'a pas été consommé et d'autres additions de réactifs ont été effectuées. Un total de 20 éq. de Boc<sub>2</sub>O et 4 eq. de DMAP ont été ajoutés. Aucun produit n'a été observé par CCM. De nouveaux essais ont été faits sans succès.



Sch (34) Essai d'obtention du dérivé (**109**).

En conclusion, nous n'avons pas pu obtenir les produits d'oxydation recherchés.



Sch (35) Réaction d'oxydation du dérivé (**40**).

## 4. HYDROGENATION CATALYTIQUE

### 4.1. Produit d'homométhèse 3,4-diAc (39)

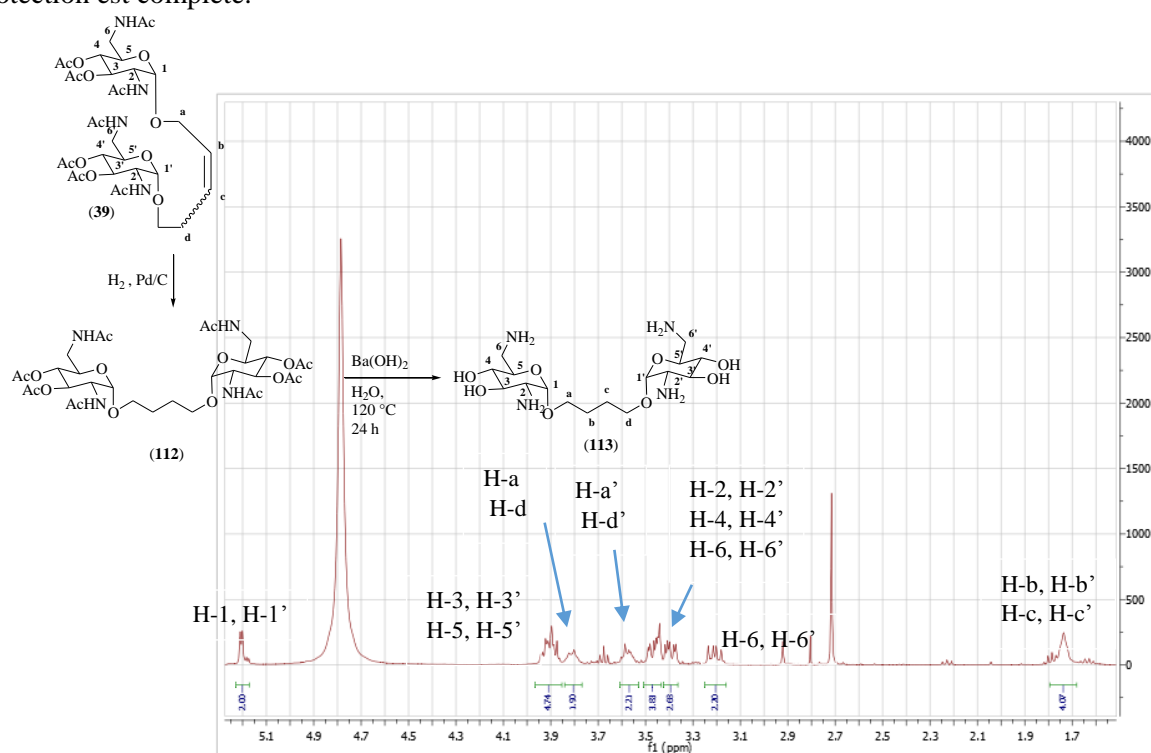
Comme le dérivé (**106**) 3,4-dihydroxylé présentait des problèmes dans l'étape de déprotection une voie de synthèse a été réalisée en éliminant la double liaison par la réaction d'hydrogénation catalytique suivie d'une étape d'élimination des groupes acétyle.

Le dérivé (39) a tout d'abord été soumis à une réaction d'hydrogénation catalytique en présence de Pd/C. La réaction a été suivie par CCM jusqu'à la consommation du produit de départ. Après la filtration pour éliminer le catalyseur et évaporation du solvant, le dérivé (112) a été obtenu avec un rendement quantitatif.

Dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  de (112) le multiplet correspondant aux hydrogènes Hb et Hc de la chaîne allylique dans la région entre 5,70 ppm à 6,00 n'est plus visible, ce qui confirme la réduction de la double liaison. Cette réduction a éliminé le problème lié à la présence d'isomères cis/trans, donc dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  sont observés uniquement les déplacements relatifs à un seul isomère. Dans le spectre de masse à haute résolution un pic  $m/z = 747.3291$ , à l'ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  est observé.

Enfin, la dernière étape prévue dans la voie de synthèse a été l'élimination des groupes Ac, en utilisant la méthode décrite par Wong et al en 1998. Le dérivé (112) a été soumis à la réaction avec un excès de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  dans l'eau à reflux. La réaction suivie par CCM montre la disparition du produit de départ. L'addition d'une solution aqueuse de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M permet d'faire précipiter les ions baryum sous forme de sulfate insoluble dans de l'eau. Après élimination du solide par filtration et évaporation de l'eau, le résidu obtenu a été soumis à une purification sur colonne de phase inverse  $\text{C}_{18}$  pour conduire au produit final (113) obtenu avec un rendement quantitatif.

Dans les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  les déplacements relatifs aux hydrogènes des groupes méthyle et les atomes de carbone des groupes acétyle ne sont plus observés. On peut dire que la réaction de déprotection est complète.

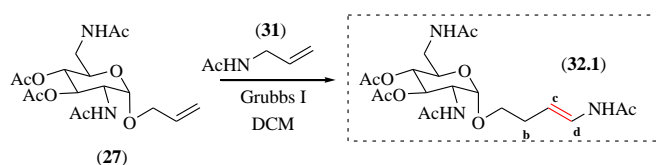


Sch (36) Réaction d'hydrogénation et déprotection du dérivé (39) et RMN  $^1\text{H}$  du produit (113).

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**  
**PARTIE II**

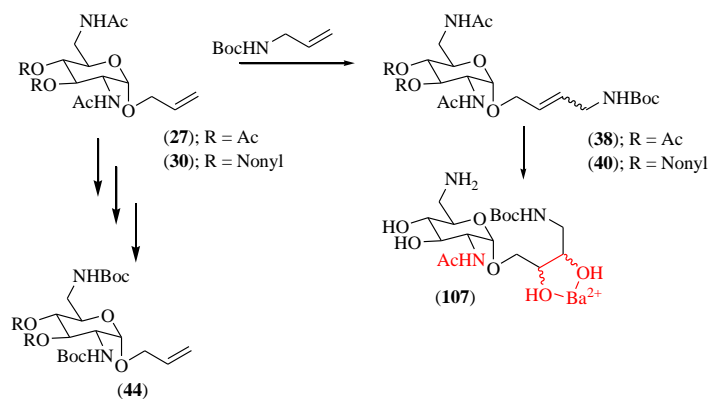
Pour la synthèse des analogues désirés de la néamine, il a été choisi une voie de synthèse convergente impliquant une étape clé de métathèse comme l'étape cruciale pour assembler les deux éléments des aminosucres recherchés. Les réactions de métathèse sont bien connues et utilisés dans la chimie des oléfines, formant des produits avec des rendements élevés et une certaine diastéréosélectivité. Typiquement, les réactions sont réalisées dans le DCM fraîchement distillé, à reflux et en présence d'un catalyseur de Grubbs. Bien que les catalyseurs de Grubbs soient stables lorsqu'ils sont en présence de nucléophiles non protégés, ils sont facilement désactivés. Ainsi, dans la synthèse des dérivés désirés, il a été nécessaire d'utiliser des groupes protecteurs pour masquer le caractère nucléophile des atomes d'azote et d'oxygène des fonctions amine et hydroxyle présentes dans les produits recherchés.

Le premier groupe protecteur utilisé a été le groupe acétyl. Après l'obtention des intermédiaires protégés les réactions de métathèse ont été menées. Dans du couplage avec l'allylamine utilisant des groupes acétyl, le couplage se produit bien mais il est accompagné d'une réaction de migration de la double liaison.



**Sch (37)** Isomérisation de la double liaison après la réaction de métathèse croisé.

Ensuite, le groupe acétyl de l'allylamine a été remplacé par le groupe Boc. Les produits d'hétérométathèse et d'homométathèse attendus ont bien été obtenus avec des rendements satisfaisants pour la réaction (30-40%). Cependant, des difficultés dans l'étape de déprotection, principalement pour l'élimination du groupe *N*-acétyl ont conduit au développement d'une seconde voie de synthèse utilisant le groupe Boc comme groupe protecteur des fonctions amine du sucre.

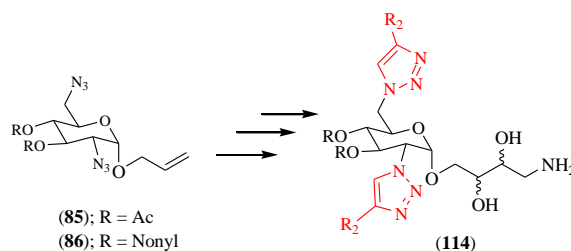


**Sch (38)** Protection du dérivé (28) avec le groupe Boc et interaction possible entre le cation divalent  $\text{Ba}^{2+}$  et hydroxyles vicinaux lors de la déprotection des acétyles.

Tout d'abord les dérivés 2,6-diBoc (**44**), 2,6,6-triBoc (**45**) et 2-Boc-6-N<sub>3</sub> (**47**) ont été synthétisés. Par la suite les réactions de métathèse ont été effectuées dans des conditions classiques sans obtention des produits désirés. Les conditions ont été modifiées ainsi que le catalyseur de Grubbs utilisé mais dans aucun cas, on a observé la formation des produits. Nous concluons que la présence du groupe Boc volumineux, peut empêcher la réaction de métathèse. L'encombrement stérique promu par la présence de ce substituant peut rendre l'oléfine peu active ou complètement inactive face à tous les types de catalyseurs de Grubbs utilisés en raison d'une conformation du sucre défavorable.

En adoptant la même stratégie de Woodward et al, en 2011, des sels d'ammonium ont été préparés à partir des amines correspondantes en vue de réaliser une pseudo-protection des amines. A partir du dérivé (**47**) protégé par le groupe Boc en C-2 et C-6, le dérivé (**65**), portant les cations C-2 et C-6 di-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> associés à deux ions triflates, a été obtenu. Des réactions d'homométhathèse et hétérométhathèse ont été essayées sans former les produits attendus dans aucune des conditions adoptées. Trois hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats. La première serait la faible solubilité du sel de départ dans le solvant utilisé. L'utilisation d'un grand volume de solvant peut avoir trop dilué le milieu. La seconde vient de l'influence des ions triflate en tant que contre-ion utilisé dans la réaction, ils ont pu réagir avec le catalyseur de Grubbs. La troisième raison est due à une conformation défavorable adoptée par le sucre. Face aux échecs dans les réactions de métathèse une nouvelle voie de synthèse a été planifiée, en utilisant les azotures comme des groupements protecteurs.

Parmi les principaux avantages de l'utilisation des azotures, il y a la facilité de leur conversion en amines par diverses réactions effectuées dans des conditions douces, telles que l'hydrogénation catalytique ou l'utilisation de la triphénylphosphine. Un autre avantage résultant de l'utilisation des azotures est la possibilité de formation de triazoles, ce qui pourrait former des composés d'intérêt pas non évalués par notre groupe.

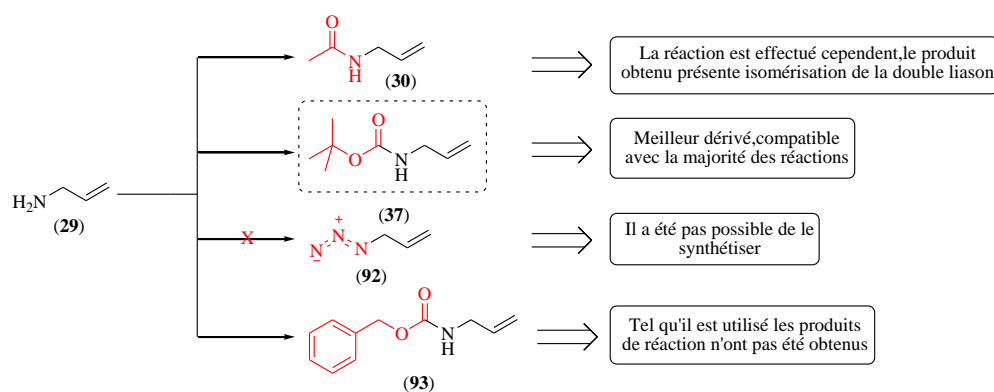


**Fig (18)** Proposition de nouvelles modifications dans les dérivés aminoglycosides.

Le dérivé diazoture (**85**) ont été obtenus à traveurs de la déprotection de l'intermédiaire (**16**), et en suite soumis à la réaction de diazotransfert avec du chlorhydrate d'azoture d'imidazole-1-sulfonyle et comme dernière étape la réaction d'acétylation par l'anydride acétique. Dans le cas de la synthèse des sucres alkylés (**86**), la réaction d'alkylation a été effectuée directement après la diazotransfert à partir

du dérivé (84). Directement après l'obtention des dérivés 2,6-diN<sub>3</sub>, les réactions de métathèse ont été essayées en présence des catalyseurs de Grubbs II et III. Malgré la formation des dérivés cette méthode a présenté des problèmes dans les étapes de purification et d'isolement, ainsi qu'un faible rendement des produits formés. Ce faible rendement peut résulter de la présence de traces du cuivre restant de l'étape de diazotransfert pouvant gêner la réaction de métathèse. Un traitement à l'EDTA des produits formés lors de cette étape sera donc à essayer.

Afin de faciliter l'étape de déprotection, les mêmes groupes protecteurs ont été utilisés pour les fonctions amine des sucres et de l'allylamine et le sucre, ce sont alternativement des groupes Ac, Boc et Cbz. Un résumé des principaux résultats obtenus par l'utilisation de chacun de ces groupes est présent dans Le schème 39. Il a aussi été effectué deux essais de réaction pour la formation d'un dérivé allylamine protégé par l'azoture, toutefois, ce produit n'a pas pu être purifié et isolé par les méthodes employées. L'absence d'absorption sous UV est l'un des principaux facteurs expliquant la difficulté de la purification du produit.



Sch (39) Groupes protecteurs de l'allylamine.

Après la réalisation de diverses réactions de métathèse, il a été montré que les groupes les plus compatibles avec la voie de synthèse sont : 1) le groupe Boc pour la protection de l'allylamine ; 2) le groupe acétyle pour la protection du sucre. Grâce à l'utilisation de ces groupes protecteurs quatre dérivés ont été synthétisés, purifiés et bien caractérisés après les réactions de métathèse (figure 19).

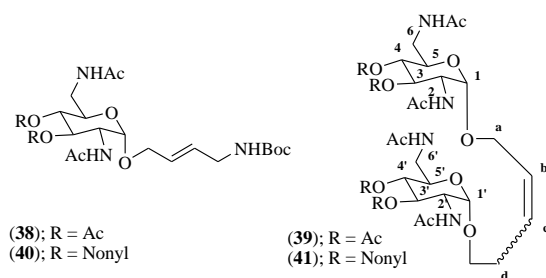


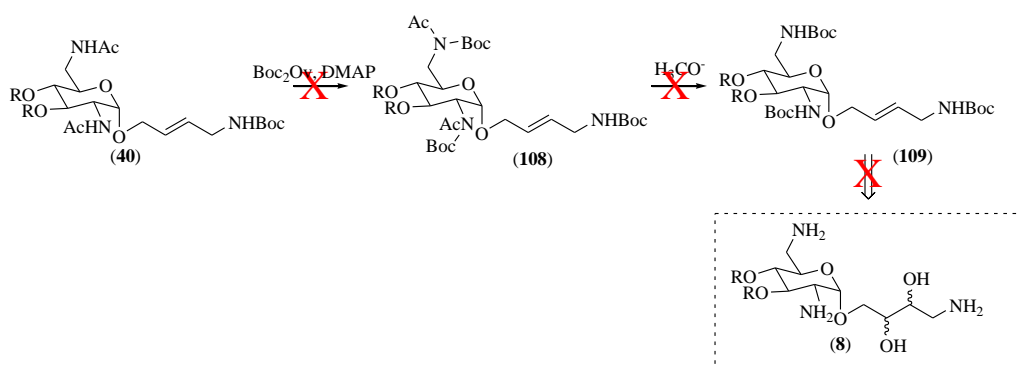
Fig (19) Dérivés obtenus après les étapes de métathèse.



Une fois obtenus les produits de la réaction de métathèse, des réactions d'oxydation ont été réalisées à travers deux différentes méthodes. Pour la première, après époxydation du dérivé (38) par l'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA), l'étape suivante réalisée sans purification par chromatographie a consisté en l'ouverture de l'époxyde avec l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH) dans l'eau et le THF. Après la purification, l'isolement et la caractérisation, deux produits majeurs ont été obtenus : 1) le produit oxydé en C-b et C-c dans lequel le groupe Boc protecteur introduit à partir de l'allylamine a été éliminé ; 2) le produit oxydé en C-b et C-c, avec l'amine correspondante n'ayant pas perdu son groupe protecteur Boc. Il est probable que les conditions utilisées trop drastiques dans la réactions d'hydrolyse a conduit à la déprotection de l'amine présente sur la chaîne latérale.

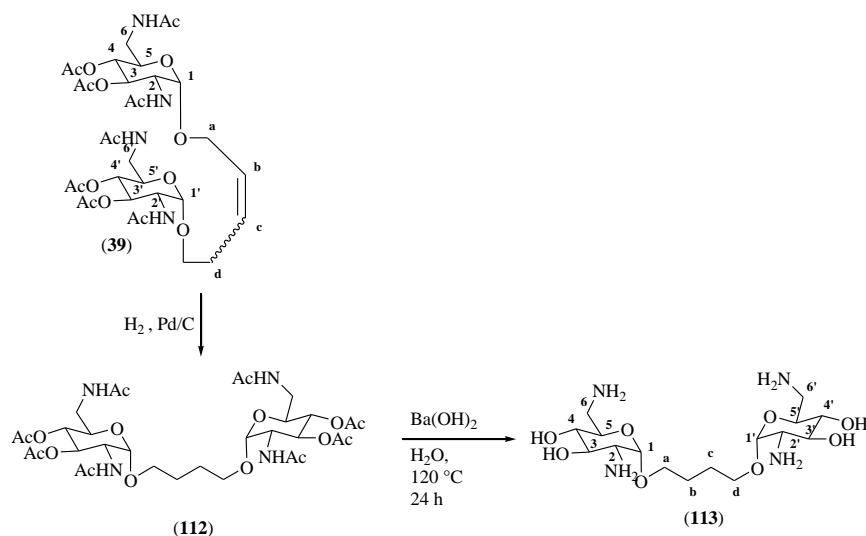
Pour l'obtention des produits finaux, les premières réactions ont été réalisées en utilisant le dérivé (106). Trois conditions principales ont été adoptées : 1) de l'hydrazine à 90 °C pendant 18 h ; 2) de l'hydroxyde de potassium dans l'eau à reflux pendant 6 h ; 3) de l'hydroxyde de baryum dans l'eau à reflux pendant 6 h. Bien qu'efficace pour la déprotection des groupements acétyles en positions C-3, C-4 et C-6, ces traitements provoquent dans certains cas du dérivé (106), l'élimination du groupement Boc en raison des conditions extrêmes utilisées. Toutefois, avec aucune des méthodes utilisées, il n'a été possible d'éliminer le groupe *N*-acétyle en position C-2.

Afin d'éviter les contraintes rencontrés lors de la déprotection du groupe acétyle dans les dérivés non alkylée, il a été adopté la même stratégie utilisée pour la synthèse du dérivé (44), le remplacement du groupe acétyle par le groupe Boc, en vue d'une déprotection plus douce avec de l'acide trifluoroacétique. Cependant, il n'a pas été possible d'effectuer la synthèse de ces dérivés.



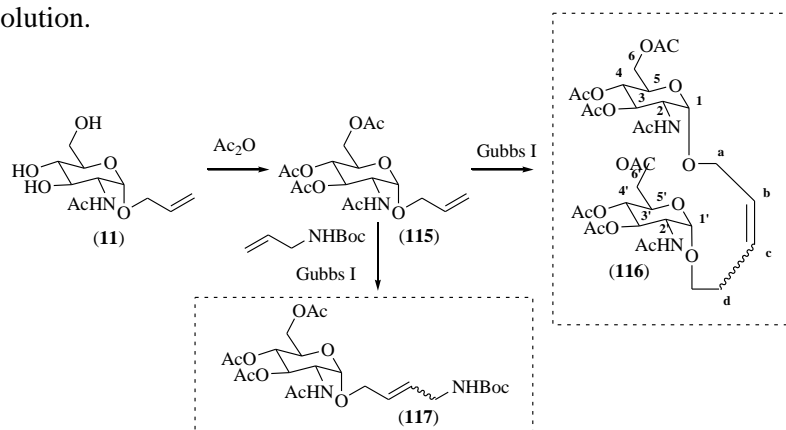
Sch (40) Essai d'obtention du dérivé (109).

Une réaction d'hydrogénation catalytique du dérivé d'homométhèse (**40**) a été effectuée. Après cette étape, le dérivé a été facilement déprotégé et purifié. Le produit a été obtenu avec des rendements quantitatifs et caractérisé.



**Sch (41)** Réaction d'hydrogénation et déprotection du dérivé (**39**)

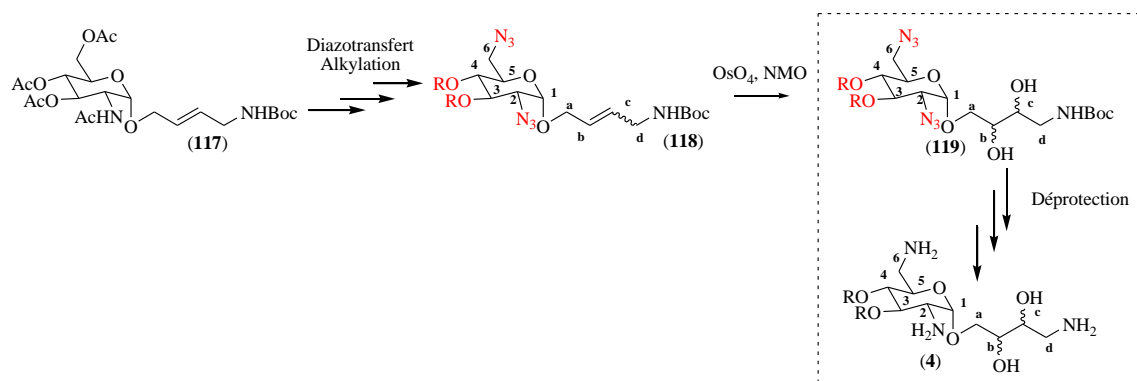
Afin de surmonter tous les problèmes liés à la déprotection du groupe acétyle, une dernière voie de synthèse a été adoptée pour l'obtention des produits de métathèse. Pour cela, le sucre (**14**) a été acétylé, puis soumis à la réaction d'homo et d'hétérométhèse (schéma 42). Les produits obtenus avec des rendements satisfaisants, ont été isolés et caractérisés en RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et par spectrométrie de masse à haute résolution.



**Sch (42)** Obtention du dérivé (**114**) à partir de (**11**) et réactions de métathèse réalisées en séquence

Les prochaines étapes proposées pour la suite de ce travail impliquent les dérivés (**116**) et (**117**) de métathèse obtenus. La voie de synthèse proposées comporte les étapes suivantes (schéma 43) : 1) la désacétylation du dérivé (**117**); 2) la conversion de l'hydroxyle en C-6 en amine par l'approche de tosylation et azidation ultérieure pour donner (**118**); 3) la conversion de l'amine en C-2 en azoture par

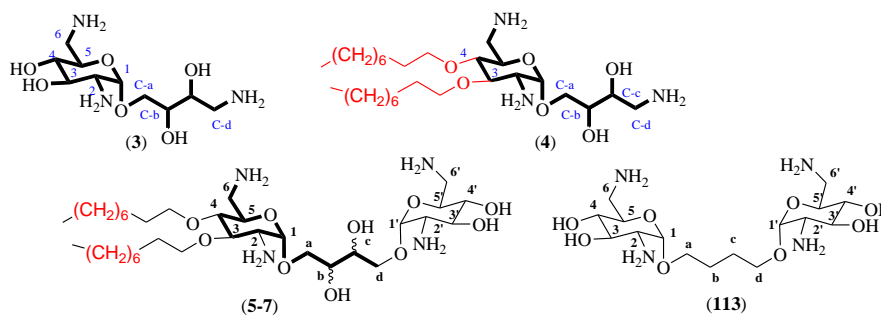
la réaction de diazotransfert pour conduire au composé **(119)**; 4) la dialkylation en positions C-3 et C-4 ; 5) l'oxydation de la double liaison et 6) la déprotection de tous les groupes protecteurs.



**Sch (43)** Obtention du dérivé **(116)** et prochaines étapes de synthèse pour l'obtention du produit final **(8)** à partir de **(116)**.

Le travail accompli a mis en évidence l'influence des groupes protecteurs dans les réactions de métathèse.

Bien que les produits finaux **(3)**, **(4)**, **(5-7)** n'ont pas pu encore être synthétisés, des informations concernant les voies de synthèse utilisées ont été obtenues pour avancer vers la réalisation des synthèses proposées. Le produit final **(113)** a été obtenu avec succès et sera évalué pour son activité antibiotique contre les bactéries sensibles et résistantes.



**Fig (20)** Dérivés envisagés et le dérivé final obtenu.

**PARTIE EXPERIMENTALE**  
**PARTIE II**

## **PARTIE 1.      *MATERIAL AND METHODS***

Thin-layer chromatography (TLC) was performed on aluminum backed silica plates (Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> from Macherey–Nagel with fluorescent indicator UV<sub>254</sub>). Purifications were performed by flash chromatography in silica gel 60, 200–400 mesh from Merck or in Reveleris® Flash Chromatography System with GraceResolv® Flash cartridges or Reveleris® cartridges. Data for <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on Brüker AC-400 instrument (400 MHz for <sup>1</sup>H and 100 MHz for <sup>13</sup>C) or Brüker 500 instrument (500 MHz for <sup>1</sup>H and 126 MHz for <sup>13</sup>C) and are internally referenced to residual solvent signals. Data for <sup>1</sup>H NMR are reported as follows: chemical shift ( $\delta$  ppm), integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, bs = broad singlet), coupling constant and assignment. Interpretation of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra often needed the support of 2D experiments COSY, HMQC and HMBC records. Otherwise stated, protons and carbons of purine and derivatives were numbered as below when associated with <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signals.

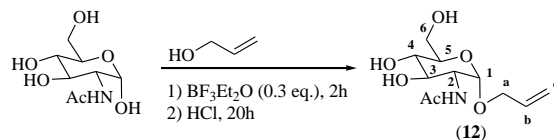
Electrospray ionization ESI mass was acquired by the analytical service of Institut de Chimie Organique et Analytique at Orleans, France, using a HRMS Q-ToF MaXis spectrometer.

Unless otherwise specified, chemicals were purchased and used without further purification.

## PARTIE 2. SYNTHESIS PROTOCOLS

Allyl  $\alpha$ -D-N-Acetylglucosaminide<sup>51</sup> (**14**)

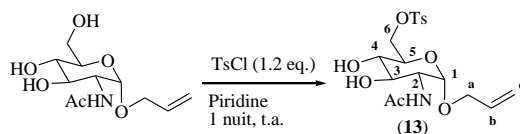
**Procedure:** Introduction of allyl group at the anomeric carbon



**Synthesis:** In a 1 L round bottom flask was added 30.0 g (0.14 mol) of *N*-acetyl-4-D-glucosamine, 4.8 mL (0.015 mol) of  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  and 300 mL (4.4 mol) of allyl alcohol. The reaction mixture was stirred at reflux under argon flow. After 20 h, the mixture was clear and orange (TLC eluent: ethyl acetate/methanol 8:2; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol solution (v/v)). After evaporation of the solvent, compound (**12**) was purified by chromatography on silica (eluent: ethyl acetate/methanol 8:2) to lead to 19.0 g of a white solid (48% yield).

### Analysis and characterization:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  5.94-5.84 (m; 1H); 5.32 (ddd;  $J = 17.3, 3.4, 1.6$  Hz, 1-H); 5.15 (ddd;  $J = 12.0, 3.4$  Hz; 1.2 Hz, 1-H); 4.79 (d,  $J = 3.6$  Hz; 1-H); 4.17 (ddd,  $J = 13.2, 5.2, 1.6$  Hz; 1-H); 3.85 (ddd,  $J = 13.2, 6.0, 1.2, 1.6$  Hz; 1-H); 3.86 (dd;  $J = 10.8, 3.6$  Hz, 1-H); 3.88 (dd;  $J = 11.8, 2.0$  Hz, 1-H); 3.67-3.62 (m; 2-H); 3.57-3.53 (m; 1H); 3.33 (t;  $J = 4.5, 9.4, 1$ -H); 1.93 (s; 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  173.6 (CONH); 135.6 (C-b); 117.5 (C-c); 97.6 (C-1); 74.0 (C-5); 72.9 (C-3); 72.3 (C-4); 69.9 (C-a); 62.7 (C-6); 55.3 (C-2); 22.6 ( $\text{CH}_3$ ).

Allyl 6-*O*-Tosyl- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside<sup>51</sup> (**15**)**Procedure:** tosylation of the hydroxyl function in position 6

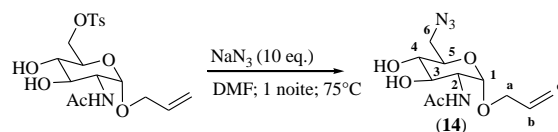
**Synthesis:** In a round bottom 500 mL flask were added 18.4 g (0.064 mol) of (**14**) and 120 mL of anhydrous pyridine. The reaction mixture was subjected to argon flow and maintained under magnetic stirring at room temperature for 1 h. Then, a solution of 14.4 g (0.075 mol) of tosyl chloride in 40 mL of anhydrous pyridine was added. The system was kept under stirring at room temperature for 15 h. After this time, it was observed by TLC consumption of all starting material (eluent: ethyl acetate/methanol 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol v/v). The solvent was evaporated and the obtained crude mixture was purified by chromatography on silica (eluent: ethyl acetate/methanol 9:1) to afford 18.5 g of compound (**15**) as a white solid (66% yield).

**Analysis and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  7.76 (d;  $J = 8.4$ , 2-H); 7.45 (d;  $J = 8.4$  Hz, 2-H); 5.90-5.80 (m; 1-H); 5.24 (ddd;  $J = 17.2, 3.2, 1.6$  Hz; 1-H); 5.13 (ddd;  $J = 10.4, 3.2, 1.2$  Hz; 1-H); 4.68 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H); 4.30 (dd;  $J = 10.8, 2.0$  Hz, 1-H); 4.17 (dd;  $J = 10.8, 6.0$  Hz, 1-H); 4.04 (ddd;  $J = 13.0, 5.2, 1.6, 1.6$  Hz; 1-H); 3.86 (ddd;  $J = 13.0, 6.4, 1.2, 1.6$  Hz; 1-H); 3.80 (dd;  $J = 10.8, 3.6$  Hz; 1-H); 3.71 (ddd;  $J = 9.8, 6.0, 2.0$  Hz; 1-H); 3.59 (dd;  $J = 10.8, 8.8$ ; 1-H); 3.24 (dd;  $J = 9.8, 8.8$ ; 1-H); 2.42 (s; 3-H; CH<sub>3</sub>); 1.94 (s; 3-H; CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  173.8 (CONH); 146.9 (C-7); 135.2 (C-b); 134.4 (C-10); 131.4 (C-8); 129.0 (C-9); 117.8 (C-c); 97.6 (C-1); 72.6 (C-3); 72.0 (C-4); 71.4 (C-5); 71.0 (C-6); 69.3 (C-a); 55.0 (C-2); 22.5 (CH<sub>3</sub>); 21.6 (CH<sub>3</sub>).

Allyl 6-azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-N-acetylglucopyranoside<sup>51</sup> (**16**)

**Procedure:** Substitution of the 6-tosyl group by an azide function



**Synthesis:** To a solution of compound (**15**) (25.1 g, 60.5 mmol, MW 415.46 g mol<sup>-1</sup>) in 200 mL of DMF was added to sodium azide (38.9 g, 605 mmol, MW 65,01 g mol<sup>-1</sup>). The mixture was heated to 75 °C overnight. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and a 80:20 AcOEt / MeOH mixture was added. After filtration and evaporation of the filtrate, the derivative (**16**) was purified by chromatography on silica eluted with a mixture: AcOEt / MeOH 95:5 to lead to a white solid (90% yield, 15.6 g, 54.4 mmol, MW 286.28 g mol<sup>-1</sup>).

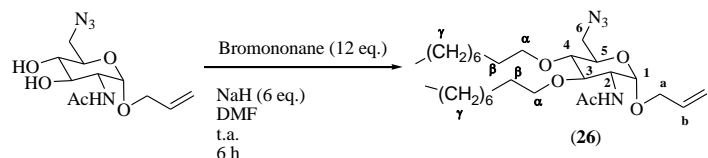
**Analyze and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  5.94-5.87 (m; 1-H); 5.33 (d;  $J = 17.2$ ; 1-H); 5.15 (d;  $J = 10.4$  Hz; 1-H); 4.12 (dd;  $J = 13.0, 4.4$  Hz; 1-H); 3.98 (dd;  $J = 13.0, 6.0$  Hz; 1-H); 3.99 (dd;  $J = 9.6, 3.2$  Hz; 1-H); 3.70 (t;  $J = 7.6, 6.4$  Hz; 1-H); 3.65 (t;  $J = 3.4, 9.6$  Hz; 1-H); 3.46 (d;  $J = 13.2$  Hz; 1-H); 3.37 (dd;  $J = 13.2, 6.4$ ; 1-H); 3.31-3.26 (m; 1-H); 1.94 (s; 3-H; CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  173.8 (CONH); 135.2 (C-); 117.8 (C-c); 97.5 (C-1); 73.2 (C-5); 73.1 (C-4); 72.6 (C-3); 69.4 (C-a); 55.3 (C-2); 52.8 (C-6); 22.5 (CH<sub>3</sub>).



Allyl 3,4-di-*O*-Nonyl-6-Azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**30**)

**Procedure:** Alkylation in homogeneous phase (NaH / DMF) 3,4-dialkylated derivative.



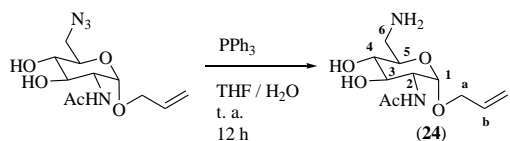
**Synthesis:** To a solution of compound (**14**) (2.80 g, 9.8 mmol) in 7.5 mL of anhydrous DMF, was added 3.8 mL (19.9 mmol) of 1-bromononane and 390 mg (9.8 mmol) of 60% NaH. The system was subjected to argon flow and maintained under magnetic stirring at room temperature. The reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol v/v). To ensure consumption of all starting material and the formation of the di-alkylated product further additions of 60% NaH (1eq.) and 1-bromononane (2 eq.) were carried out every hour (total: 6 eq. NaH 60% and 12 eq of 1-bromononane). Methanol was added to the reaction mixture and, after evaporation, ethyl acetate was added. The solution was washed with water and then dried with anhydrous magnesium sulfate. The solvent was evaporated and the residue was purified by chromatography on silica (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 8:2) to lead to 3.0 g of a white solid (60% yield).

**Analysis and characterization:**

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.88-5.78 (m; 1-H); 5.76 (d;  $J = 10.0$  Hz; 1-H); 5.27 (ddd;  $J = 17.4$ , 3.0, 1.2 Hz; 1-H); 5.33 (dd;  $J = 10.4$ , 3.0 Hz; 1-H); 4.77 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H); 4.15 (dt;  $J = 10.0$ , 9.8, 3.6 Hz, 1-H); 4.1 (ddd;  $J = 12.2$ , 5.4, 1.6, 1.6 Hz; 1-H); 3.89 (dd;  $J = 12.2$ , 6.0 Hz; 1-H); 3.70-3.62 (m; 3-H,  $\text{OCH}_2$ ); 3.48-3.29 (m; 5-H,  $\text{OCH}_2$ ); 3.20 (t;  $J = 4.5$ , 9.2; 1-H); 2.04 (s; 3-H;  $\text{CH}_3$ ); 1.48-1.46 (m; 4-H;  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 1.21 (sl; 24-H;  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 0.84-0.80 (m; 6-H;  $-\text{O}-(\text{CH}_2)$ , 8  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  169.5 (CONH); 133.4 (C-b); 118.0 (C-c); 96.9 (C-1); 80.7 (C-3); 78.9 (C-4); 73.2; 73.3 ( $-\text{OCH}_2-$ ); 71.1 (C-5); 68.2 (C-a); 52.5 (C-2); 51.3 (C-6); 31.8; 30.4; 30.3; 29.5; 29.4; 29.2; 26.1 ( $-\text{CH}_2$ ); 23.4; 22.5; 14.0 ( $\text{CH}_3$ ).

Allyl 6-Amino-6-deoxy- $\alpha$ -D-N-acetylglucopyranoside (**26**)

**Procedure:** Reduction of azide function in position 6.



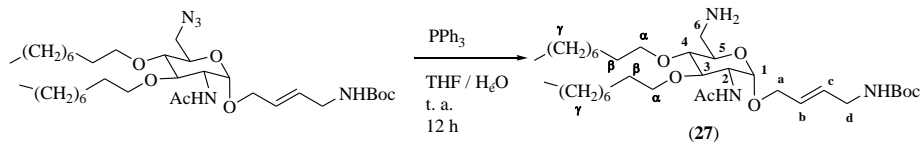
**Synthesis:** In a round bottom flask of 250 mL was added 2.0 g (7.0 mmol) of (**16**), 5.5 g (21.0 mmol) of triphenylphosphine in 60 mL of THF and 20 mL of distilled water. The reaction mixture was under magnetic stirring at room temperature for 12 h. The consumption of all starting material was observed in TLC (eluent: ethyl acetate / methanol 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v) 0.3% ninhydrin in ethanol (w/v)). The solvents were evaporated and the residue obtained was dissolved in water. The solution was washed with 3x30 mL of cyclohexane and water was evaporated. The product (**26**) was obtained as a white solid in a quantitative yield (1.8 g).

**Analysis and characterization:**

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  5.95-5.85 (m; 1-H); 5.33 (d;  $J = 17.2$  Hz; 1-H); 5.17 (d;  $J = 10.4$  Hz; 1-H); 4.23 (dd;  $J = 13.2, 4.4$  Hz; 1-H); 3.96 (dd;  $J = 13.2, 6.0$  Hz; 1-H); 3.81 (dd;  $J = 10.6, 3.2$  Hz; 1-H); 3.64 (t;  $J = 3.2, 9.2$  Hz; 1-H); 3.66 (t;  $J = 9.2, 7.2, 4.4$  Hz; 1-H); 3.20 (t;  $J = 4.5, 9.2$  Hz; 1-H); 2.96 (dd;  $J = 13.2, 4.4$  Hz; 1-H); 2.74 (dd;  $J = 13.2, 7.2$  Hz; 1-H); 1.95 (s; 3-H;  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  173.7 (CONH); 135.4 (C-b); 117.6 (C-c); 97.8 (C-1); 74.0 (C-4); 73.5 (C-5); 72.5 (C-3); 69.1 (C-a); 55.4 (C-2); 43.9 (C-6); 22.6 ( $\text{CH}_3$ ); HRMS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5$  261.14, found 261.14.

Allyl 3,4-di-*O*-nonyl-6-amino-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**29**)

**Procedure:** Reduction of the azide in position 6.



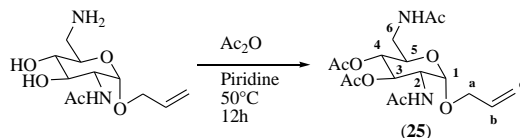
**Synthesis:** In a round bottom flask of 250 mL were added 2.60 g (4.8 mmol) of (**28**), 4.70 g (18.0 mmol) of triphenylphosphine in 50 mL of THF and 20 mL of distilled water. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The consumption of the starting material was observed by TLC (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 6:4; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v), 0.3% ninhydrin in ethanol (w/v)). The solvents were evaporated and the residue obtained was purified by chromatography on silica (eluant: ethyl acetate; ethyl acetate/methanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$  8:1:1) to afford 1.70 g of (**29**) as a white solid (69% yield).

**Analysis and characterization:**

**IR** ( $\nu$  max,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3285 ( $\nu$  N-H); 2953; 2919; 2850 ( $\nu$  C-H); 1649 ( $\nu$  C=O amide); 1093 ( $\nu$  C-O);  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  6.11-5.91 (m; 1-H); 5.47 (ddd;  $J = 17.2, 3.2, 1.6$  Hz; 1-H); 5.2 (dd;  $J = 10.4, 3.2$ ; 1-H); 4.77 (d;  $J = 3.6$ ; 1-H); 4.22 (dd;  $J = 13.2, 5.2$ ; 1-H); 4.05-3.99 (m; 2-H); 3.82-3.72 (m; 2-H;  $\text{OCH}_2$ ); 3.70-3.51 (m; 4-H); 3.11 (t;  $J = 4.5, 9.4$ ; 1-H); 3.00 (dd;  $J = 13.2, 2.4$ ; 1-H); 2.69 (dd;  $J = 13.2, 7.6$ ; 1-H); 2.00 (s; 3-H;  $\text{CH}_3$ ); 1.60-1.55 (m; 4H-;  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 1.43 (sl; 24-H;  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 0.93-0.90 (m; 6-H;  $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  172.9 (CONH); 135.4 (C-b); 117.8 (C-c); 97.8 (C-1); 81.8 (C-4); 81.5 (C-3); 74.2; 74.0 ( $\text{OCH}_2$ ); 73.2 (C-5); 69.1 (C-a); 54.6 (C-2); 43.7 (C-6); 33.1; 33.0; 31.7; 31.6; 31.5; 30.8; 30.7; 30.5; 30.4; 27.4; 27.3; 22.7 ( $\text{CH}_2$ ); 23.7; 14.6 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS** (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5$  513.42, found 513.42.

Allyl 3,4-di-*O*-acetyl-6-*N*-acetyl-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**27**)

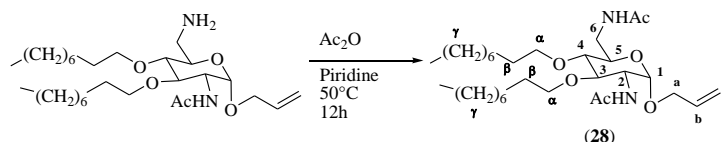
**Procedure:** acetylation of the hydroxyl and amine functions



**Synthesis:** In a round bottom flask of 25 mL was added 550 mg (2.1 mmol) of (**26**), 5 mL of anhydrous pyridine and 0.7 mL (7.7 mmol) of acetic anhydride. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 12 h. The reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)) until consumption of all starting material. Water and ethyl acetate were added to the reaction mixture. The aqueous phase was extracted with 3x30 mL of ethyl acetate. The organic phase was washed with 3x30 mL of distilled water and dried over anhydrous magnesium sulfate. After filtration, the solvent was evaporated and the residue obtained was purified by chromatography on silica (eluent: ethyl acetate/ toluene 95:0.5; ethyl acetate/methanol 9: 1) to obtain 260 mg of (**27**) as a white solid (40% yield).

#### Analysis and characterization:

**IR** ( $\nu$  max,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3319 ( $\nu$  N-H); 1742 ( $\nu$  C=O ester); 1651 ( $\nu$  C=O amide); 1253; 1021 ( $\nu$  C-O).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.90-5.67 (m; 2-H); 5.68 (d;  $J = 9.2$  Hz; 1-H); 5.29-5.17 (m; 3-H); 4.91 (t;  $J = 4.5, 10.0$  Hz; 1-H); 4.88 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H); 4.26 (ddd;  $J = 11.9, 9.2, 3.6$  Hz; 1-H); 4.15 (ddd;  $J = 12.8, 5.6, 1.2, 1.2$  Hz; 1-H); 3.89 (dtd;  $J = 12.8, 6.4, 1.2, 1.2$  Hz; 1-H); 3.78 (ddd;  $J = 10.0, 6.4, 5.6$  Hz; 1-H); 3.55 (ddd; 14.5, 6.4; 2.8 Hz; 1-H); 3.33 (ddd;  $J = 14.5, 5.6; 2.8$  Hz; 1-H); 2.02; 1.98; 1.97; 1.92 (s; 12-H;  $\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  171.2; 170.1; 170.0; 169.7 (CONH); 133.1 (C-b); 118.3 (C-c); 96.5 (C-1); 71.0 (C-3); 68.7 (C-4); 68.7 (C-a); 68.3 (C-5); 2.0 (C-2); 38.9 (C- 6); 23.1; 20.6 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS** (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$  387.17, found 387.17.

Allyl 3,4-di-*O*-nonyl-6-*N*-acetyl-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**30**)**Procedure:** Acetylation of the 6-amine function

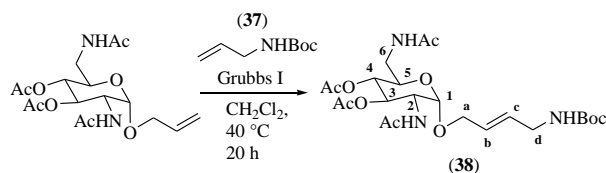
**Synthesis:** In a round bottom flask of 50 mL were added 1.20 g (2.34 mmol) of (**29**), 10 mL of anhydrous pyridine and 0.35 mL (3.7 mmol) of acetic anhydride. The system was connected to a reflux condenser and heated to 50 °C for 7 h. The reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate/cyclohexane 7:3; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)) until consumption of all starting material. To the reaction mixture, was added distilled water and ethyl acetate. The aqueous phase was extracted with 3x40 mL of ethyl acetate and the organic phases with 3 x 40 mL of distilled water. The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate and filtered and the solvent was removed in a rotary evaporator. The obtained residue was purified by chromatography on silica (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 1:1; cyclohexane/ ethyl acetate 3:7; ethyl acetate 100%) to afford 970 mg of (**30**) as a white solid (70% yield).

**Analysis and characterization:**

**IR** ( $\nu$  máx,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3287 ( $\nu$  N-H); 2954; 2919; 2850 ( $\nu$  C-H); 1651 ( $\nu$  C=O amida); 1027 ( $\nu$  C-O). **<sup>1</sup>H NMR**( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5,85-5,73 (m; 2-H); 5.55 (d;  $J = 9.6$ ; 1-H); 5.20 (dd;  $J = 17.2, 1.2$ ; 1-H); 5.15 (dd;  $J = 10.0, 1.2$ ; 1-H); 4.75 (d;  $J = 3.6$ ; 1-H); 4.1-4.02 (m; 2-H); 3.87 (dd;  $J = 12.8, 6.0$ ; 1-H); 3.69-3.55 (m; 4-H); 3.53-3.42 (m; 2-H;  $\text{OCH}_2$ ); 3.40-3.32 (m; 2-H); 3.06 (t;  $J = 4.5, 9.2$ ; 1-H); 1.95-1.94 (s; 6-H;  $\text{CH}_3$ ); 1.51-1,44 (m; 4-H;  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 1.23 (s; 24-H;  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 0.82-0.79 (m; 6-H;  $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ). **<sup>13</sup>C NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  169.9; 169.8 (CONH); 133.5 (C-b); 118.0 (C-c); 96.9 (C-1); 80.5 (C-3); 79.1 (C-4); 73.5; 73.3 ( $\text{OCH}_2$ ); 69.8 (C-5); 68.5 (C-a); 52.7 (C-2); 39.6 (C-6); 31.9; 30.5; 29.6; 29.5; 29.3; 26.2; 26.1; 22.6 ( $\text{CH}_2$ ); 23.4; 23.3; 14.1 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS** (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_6$  555.43, found 555.43.

1-[But-4'-amino-(tert-butyl-carbonate)-2'-*E*-enyl]-2,6-di-*N*-acetyl-2,6-dideoxy-3,4-di-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**38**)

**Procedure:** Procedure: Heterometathesis in the presence of the Grubbs I catalyst



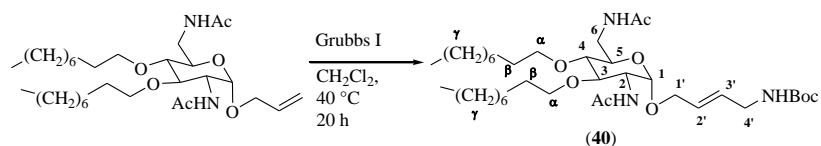
**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask, 300 mg (0.78 mmol) of (**27**) were solubilized in 5 mL of distilled DCM. Then 250 mg (1.6 mmol) of the protected allylamine (**38**) was added. The system was fitted to a reflux condenser, and subjected to argon flow under magnetic stirring for 20 min. 160 mg (0.20 mmol) of Grubbs I catalyst were added to the reaction mixture and the system was heated at reflux. The reaction was followed by TLC (eluent: ethyl acetate/methanol 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)) and after 20 h, it was observed that the reaction was no longer evolving. The solvent was evaporated and the crude residue obtained was purified by chromatography on silica (eluent: 100% ethyl acetate, 9.5: 0.5 ethyl acetate / methanol). 42 mg of starting material (**27**) was recovered at the end of the purification step and two products A and B were isolated. Product A was characterized as derivative (**38**) and B was characterized as the homometathesis product (**39**). 145 mg of (**38**) (36% yield) and 87 mg of (**39**) (30% yield).

#### Analysis and characterization (**39**):

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  5.71-5.56 (m; 2-H); 5.17 (dd;  $J = 9.6, 10.8$  Hz; 1-H); 4.87 (t;  $J = 4.5, 9.6$  Hz; 1-H); 4.62 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H); 4.23 (dd;  $J = 10.8, 3.6$  Hz; 1-H); 4.06 (dd;  $J = 12.8, 4.8$  Hz; 1-H); 3.91 (dd;  $J = 12.8, 6.0$  Hz; 1-H); 3.75 (ddd;  $J = 10.0, 5.6, 3.2$  Hz; 1-H); 3.69 (d;  $J = 4.4$ ; 2-H); 3.45 (dd;  $J = 14.6, 3.2$  Hz, 1-H); 3.27 (dd;  $J = 14.6, 5.6$ , 1-H); 2.02; 1.98; 1.97; 1.92 (s; 12-H; CH<sub>3</sub>); 1.39 (s; 9-H; C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  171.3; 170.2; 170.0; 169.9 (CO); 155.8 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 133.5 (C-b); 126.2 (C-c); 96.3 (C-1); 79.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 71.0 (C-3); 69.1 (C-4); 68.2 (C-5); 68.0 (C-a); 52.0 (C-2); 41.7 (C-d); 38.8 (C-6); 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23.1; 23.0; 20.7, 20.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI+)  $m/z$ : [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> 516.25, found 516.25.

1-[But-4'-amino-(tert-butyl-carbonate)-2'-*E*-enyl]-2,6-di-*N*-acetyl-2,6-dideoxy-3,4-di-*O*-nonyl- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**40**)

**Procedure:** Heterometathesis in the presence of the Grubbs I catalyst



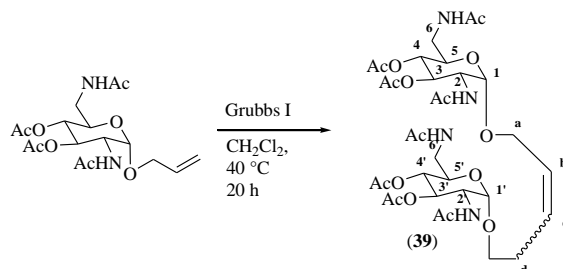
**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask, 200 mg (0.36 mmol) of (**28**) were solubilized in 5 mL of anhydrous distilled DCM. Then 115 mg (0.72 mmol) of the protected allylamine (**37**) was added. The reaction mixture was subjected to argon flow for 20 min, and then 150 mg (0.18 mmol) of Grubbs catalyst I was added. The system was fitted to a reflux condenser, sealed with a rubber stopper, and heated to reflux. The reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate/cyclohexane 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). After 20 h, the reaction was stopped and the solvent evaporated. The residue obtained was purified by chromatography on silica (eluent: ethyl acetate / cyclohexane 8: 2, ethyl acetate / cyclohexane 9: 1). 48 mg of starting material, (**28**) were recovered at the end of the purification step, 95 mg of the product of metathesis (**40**) were obtained (39% yield).

#### Analysis and characterization:

**IR** ( $\nu$  max, cm<sup>-1</sup>): 3308 ( $\nu$  N-H); 2922; 2853 ( $\nu$  C-H); 1683 ( $\nu$  COOt-But); 1649 ( $\nu$  C=O amide); 1051 ( $\nu$  C-O). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  5.64-5.48 (m; 2-H); 4.65 (d;  $J$  = 3.6 Hz; 1-H); 4.12-4.05 (m; 2-H); 3.87 (dd;  $J$  = 12.2, 6.0 Hz; 1-H); 3.68-3.6 (m; 4-H); 3.59-3.53 (m; 2-H); 3.51-3.4 (m; 2-H); 3.38-3.3 (m; 2-H); 3.07-3.00 (m; 1-H); 1.95-1.93 (s; 6-H; CH<sub>3</sub>); 1.51-1.44 (m; 4-H; CH<sub>2</sub>(b)); 1.39-1.36 (m; 9-H; C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.19 (s; 24-H; CH<sub>2</sub>(g)); 0.82-0.79 (m; 6-H; O(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  169.9; 169.8 (CONH); 155.7 (COOt-Bu); 131.0 (C-b); 126.7 (C-c); 96.8 (C-1); 80.4 (C-3); 79.3 (C-4); 73.4; 73.3 (OCH<sub>2</sub>); 69.8 (C-5); 67.4 (C-a); 52.6 (C-2); 41.8 (C-d); 39.6 (C-6); 31.8; 30.4; 30.1; 29.6; 29.5; 29.2; 28.3; 26.8; 26.1; 22.6 (CH<sub>2</sub>); 23.4; 23.2; 14.1 (CH<sub>3</sub>). **HRMS** (ESI+)  $m/z$ : [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>37</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> 684.51, found 684.51.

(E/Z)-1,4-bis-[2,6-di-N-Acetyl -2,6-dideoxy-3,4-di-O-acetyl- $\alpha$ -D-N-acetylglucopyranoside]-but-2-ene

**Procedure:** Homometathesis in presence of the Grubbs I catalyst (**39**)



**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask were added 195 mg (0.50 mmol) of (**25**) and 5 mL of anhydrous distilled DCM. The flask was fitted to a condenser, sealed with a rubber stopper, and the system was subjected to argon flow. After 20 min, 40 mg (0.050 mmol) of the Grubbs I was added. The reaction mixture was maintained under magnetic stirring and heating at reflux. The reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate/methanol 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). After 20 h, the disappearance of the starting material was observed. The reaction mixture was diluted with 20 mL of DCM. The organic solution was extracted with 3x30 mL of distilled water. At this stage it was observed that the desired product was in the aqueous phase. Water was evaporated to lead to 140 mg of (**39**) (75% yield).

#### Analysis and characterization:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  6.19-6.14 (m; 4-H); 5.78-5.73 (m; 2-H); 5.19 (dd;  $J = 10.0, 9.6$  Hz; 2-H); 4.85 (t;  $J = 4.5, 10.0$  Hz; 2-H); 4.86 (d;  $J = 3.6$ ; 2-H); 4.29-4.22 (m; 2-H); 4.13-4.05 (m; 2-H); 4.00-3.95 (m; 2-H); 3.86-3.81 (m; 2-H); 3.65-3.56 (m; 2-H); 3.33 (td;  $J = 14.4, 5.6$  Hz, 2-H); 2.03-1.92 (s; 24-H;  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  171.2; 170.4; 170.3; 170.0 (CONH); 129.2\*; 129.4• (C-b e C-c); 96.6\*; 95.8• (C-1); 70.8\*; 70.5• (C-3); 69.2\*; 69.9• (C-4); 68.3\*; 68.5• (C-5); 67.8\*; 61.8• (C-a e C-d); 52.1\*; 52.5• (C-2); 38.9\*; 39.8• (C-6); 23.2; 23.1; 20.08; 20.07; 20.6 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{16}$  745.31, found 745.31

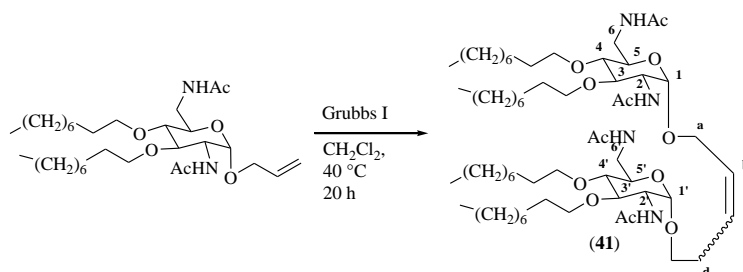
\*  $^{13}\text{C NMR}$  NMR data for the E-isomer.

•  $^{13}\text{C NMR}$  NMR data for the Z-isomer.



(E/Z)-1,4-bis-[2,6-di-N-Acetyl-2,6-dideoxy-3,4-di-O-nonyl- $\alpha$ -D-N-acetylglucopyranoside]-but-2-ene  
(**41**)

**Procedure:** Homometathesis in presence of the Grubbs I catalyst



**Synthesis:** Into a 10 mL round bottom flask were added 110 mg (0.20 mmol) of (**30**) and 3 mL of anhydrous distilled DCM. The reaction mixture was subjected to argon flow and kept under magnetic stirring at room temperature for 20 min. Thereafter, 30 mg (0.036 mmol) of the Grubbs I catalyst was added. The system was fitted to a condenser, sealed with a rubber stopper, and heated at reflux. The reaction was monitored by TLC (eluent: DCM / methanol 96: 4; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). After 12 h the reaction was stopped and the solvent was evaporated. The residue obtained was purified by chromatography on silica (eluent: 100% ethyl acetate, 9:1 ethyl acetate/methanol) to afford 78 mg of derivative (**41**) (72% yield).

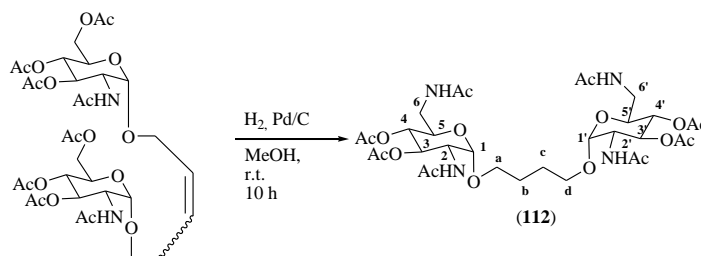
#### Analysis and characterization:

**IR** ( $\nu$  max,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3294 ( $\nu$  N-H); 2921; 2852 ( $\nu$  C-H); 1650 ( $\nu$  C=O amide); 1124 ( $\nu$  C-O).  **$^1\text{H}$  RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.70-5.67 (m; 2-H); 4.73 (d;  $J = 4.0$ ; 1-H); 4.73 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H)\*; 4.10-4.82 (m; 6-H); 3.70-3.47 (m; 12-H); 3.55-3.47 (m; 3-H); 3.95 (dd;  $J = 12.8, 6.0$  Hz; 1-H); 3.06 (t;  $J = 4.5, 9.2$  Hz; 1-H); 2.91 (t;  $J = 4.5, 9.2$  Hz; 1-H)\*; 1.97-1.94 (s; 12-H;  $\text{CH}_3$ ); 1.49-1.47 (m; 8-H;  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 1.22 (s; 48-H;  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 0.82-0.79 (m; 12-H;  $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  170.3; 170.1; 169.9 (CONH); 129.4; 129.0 (C-b e C-c)\*; 97.3; 96.8 (C-1)\*; 80.4; 80.2 (C-3)\*; 79.8; 79.5 (C-4)\*; 73.5; 73.0 ( $\text{OCH}_2$ )\*; 70.3; 69.8 (C-5)\*; 66.9; 62.5 (C-a e C-d)\*; 52.9; 52.7 (C-2)\*; 40.2; 39.6 (C-6)\*; 35.6; 34.9; 31.9; 30.5; 30.4; 29.7; 29.6; 29.5; 29.3; 26.9; 26.8; 26.3 ( $\text{CH}_2$ ); 23.2; 22.6; 14.1 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS** (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{60}\text{H}_{113}\text{N}_4\text{O}_{12}$  1081.83, found 1081.83.

\*Z/E isomeric mixture

1,4-bis-[2,6-di-N-Acetyl 2,6-dideoxy-3,4-di-O-acetyl- $\alpha$ -D-N-acetylglucopyranoside]-butane (**112**)

**Procedure:** Catalytic hydrogenation in presence of palladium



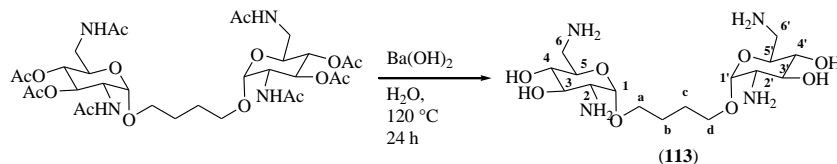
**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask were added 70 mg (0.09 mmol) of (**40**), 20 mg of palladium/charcoal (10% w/w) and 5 mL of THF. The flask was sealed with a rubber stopper and the reaction mixture was subjected to argon flow and then was kept under a dihydrogen atmosphere under stirring at room temperature for 18 h. After this time, the disappearance of the starting material was observed by TLC (eluent: ethyl acetate/methanol 8:2; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). The suspension was filtered on silica to remove palladium/charcoal and the solvent was evaporated to lead to compound (**112**) in a quantitative yield (0.068 g, 0.09 mmol).

#### Analysis and characterization:

**IR** ( $\nu$  max,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3318 ( $\nu$  N-H); 1744 ( $\nu$  C=O ester); 1653 ( $\nu$  C=O amide); 1221; 1034 ( $\nu$  C-O).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.24 (t;  $J = 3.2, 9.6$  Hz; 2-H); 4.91 (d;  $J = 4.0$  Hz; 2-H); 4.85 (t;  $J = 4.5, 9.6$  Hz; 2-H); 4.31-4.24 (m; 2-H); 3.98-3.97 (m; 2-H); 3.75-3.66 (m; 2-H); 3.58-3.48 (m; 4-H); 3.37 (d;  $J = 16.4$ ; 2-H); 2.08-2.00 (s; 24-H;  $\text{CH}_3$ ); 1.84-1.73 (m; 4-H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  175.2; 175.0; 174.3; 173.7 (CONH); 97.6 (C-1); 72.6 (C-3); 70.8 (C-4); 69.1 (C-5); 68.7 (C-a e C-d); 52.6 (C-2); 39.8 (C-6); 26.4 (C-b e Cc); 22.7; 21.1; 21.0 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS** (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{16}$  747.33, found 747.32.

But-1,4-bis-[2,6-amino-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-glicopiranosiloxy]-ane (**113**)

**Procedure:** Deacetylation in the presence of aqueous barium hydroxide



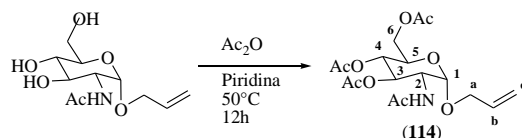
**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask was added 30 mg (0.04 mmol) of (**112**), 14.5 mL of distilled water and 200 mg (0.63 mmol) of  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . The flask was fitted to a reflux condenser and the system was heated to 120 °C under magnetic stirring. The evolution of the reaction was monitored by TLC until disappearance of the starting material (eluent: ethyl acetate/methanol 8:2; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). Thereafter, 1M aqueous solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was added dropwise to the reaction mixture until pH 4-5. Formation of a white solid ( $\text{BaSO}_4$ ) was observed which was removed by filtration. The aqueous phase was evaporated to dryness and the residue was purified by chromatographie on reverse phase column ( $\text{C}_{18}$  silica,  $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH}$  9 : 1) to lead to compound (**113**) in a quantitative yield.

**Analysis and characterization:**

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  5.16 (d;  $J = 3.6$ ; 2-H); 3.91-3.82 (m; 4-H); 3.79-3.76 (m; 2-H); 3.56-3.52 (m; 2-H); 3.45-3.35 (m; 6-H); 3.23 (dd;  $J = 13.6, 8.4$ ; 2-H); 1.75 (s; 4-H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  95.3 (C-1); 71.2 (C-3); 69.6 (C-4); 68.4 (C-5); 68.2 (C-a e C-d); 53.9 (C-2); 40.6 (C-6); 25.5 (C-b e C-c). HRMS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_{16}$  411.23, found 411.23.

Allyl 3,4,6-*O*-triacetyl- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**115**)

**Procedure:** Acetylation of the hydroxyl functions of allyl neosamine



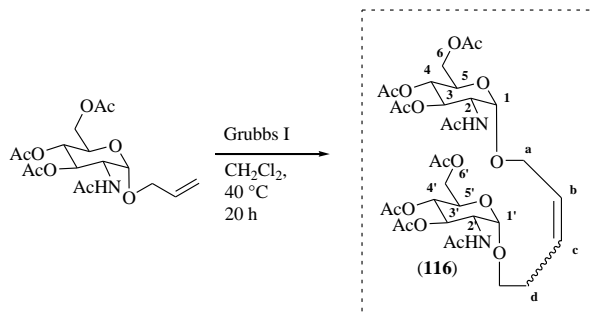
**Synthesis:** 14.2 g (54.5 mmol) of the derivative (**14**) were dissolved in 50 ml of pyridine. Acetic anhydride was added (10.3 + 5 x 5.1 mL, 379 mmol) in 6 fractions added every 1 h. The reaction mixture is kept at room temperature for 8 h and was evaporated. The residue was dissolved in 100 mL of ethyl acetate. The mixture was washed 3 times with 100 mL of water before being dried over MgSO<sub>4</sub>. The derivative (**115**) was purified by chromatography on silica eluted with a 60/40: cyclohexane/AcOEt mixture to give 18 g of a gum (94 % yield).

**Analysis and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.92-5.82 (m, 1-H), 5.31-5.21 (m, 2-H), 4.87 (d, J = 2.5 Hz, , 1-H), 4.37-4.31 (m, 2-H), 4.24-3.92 (m, 6-H), 2.11 (s, 3-H, CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3-H, CH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3-H, CH<sub>3</sub>), 1.91 (s, 3-H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.4-169.3 (4 C=O), 133.2 (C-2'), 118.5 (C-3'), 96.6 (C-1), 71.0 (C-5), 68.7 (C-1'), 68.1 (C-3), 67.8 (C-4), 62.0 (C-2), 51.8 (C-6), 23.2-20.6 (3 CH<sub>3</sub>), 14;3 (CH<sub>3</sub>).

But-1,4-bis-[3,4,6-*O*-triacetyl- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside]-2-ene (**116**)

**Procedure:** Homometathesis with the Grubbs I catalyst



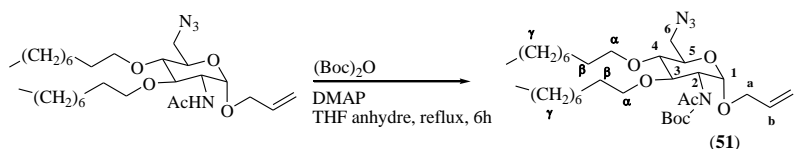
**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask 100 mg (0.258 mmol) of (**115**), was solubilized in 3 mL of freshly distilled DCM in the presence of the Grubbs I catalyst (21.2 mg, 0.026 mmol; MW 822.96 g.mol<sup>-1</sup>). The reaction mixture was refluxed for 8 h under argon atmosphere and then the solvent was evaporated. The derivative (**116**) was purified by chromatography on silica eluted with ethyl acetate and mixture AcOEt/MeOH mixtures (95/5 to 90/10 v/v) and was isolated as an oil (33% yield, 64 mg, 0.086 mmol).

**Analysis and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.80-5.79 (m, 1,5-H), 5.78-4.75 (m, 0,5-H), 5.24-5.08 (m, 4-H), 4.56 (d, J = 2.5 Hz, 0,5-H), 4.87 (d, J = 2.5 Hz, 1,5-H), 4.37- 3.93 (m, 12-H), 2.09-1.95 (m, 24-H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.5-169.1 (8 C=O), 101.1 (2 C2'), 96.6 (C-1), 96.3 (C-1), 71.0 (2 C-5), 69.1 (C-1'), 68.8 (C-1'), 68.0 (2 C-3), 67.9 (2 C-4), 62.1 (C-2), 61.8 (C-2), 51.7 (2 C-6), 23.6-20.4 (6 CH<sub>3</sub>), 19.5 (2 CH<sub>3</sub>); SMHR (ESI<sup>+</sup>) : [M+Na]<sup>+</sup>, m/z calcd for 769.26378 m/z found 769.2636, [M+K]<sup>+</sup>, m/z calcd for 785.23 m/z found 785.23.

Allyl 3,4-di-O-Nonyl-2-(*N*-Acetyl, tert-butyloxycarbonyl-amine)-6-Azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**51**)

**Procedure:** Introduction of the Boc group on the acetylated amine in position 2



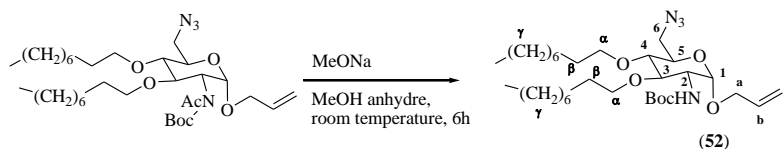
**Synthesis:** 100 mg of (0.159 mmol,) derivative (**23**) is solubilized in 6 mL of THF. 100 mg of *t*-Butyloxycarbonyl anhydride (1.33 mmol) and 21 mg of dimethylaminepyridine (DMAP, 0.517 mmol) were added three times, with a regular interval of 2 h. The reaction was heated to reflux (70 °C) for a total duration of 6 h. The reaction mixture is concentrated under reduced pressure before being solubilized in 20 mL of DCM. The organic phase is washed 3 times with 20 mL of the water until a neutral pH in aqueous phase is obtained before being dried over MgSO<sub>4</sub>. The desired alkylation products are purified by chromatography on silica eluted with a gradual mixture of 95/05 to 90/10: cyclohexane / AcOEt. The isolated products are concentrated under reduced pressure to obtain a Eparent oil with a yield of 88 % (104 mg, 1.630 mmol).

#### Analysis and characterization:

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.86-5.76 (m, 1-H), 5.29 (dd,  $J = 1.2, 17.5$  Hz, 1-H), 5.2 (dd,  $J = 1.1, 10.8$  Hz, 1-H), 4.87 (m, 1-H), 4.13 (dd,  $J = 5.3, 12.8$  Hz, 1-H), 3.9 (dd,  $J = 6.0, 12.8$  Hz, 1-H), 3.84-3.68 (m, 3-H, CH<sub>2</sub>O), 3.56-3.47 (m, 3-H, CH<sub>2</sub>O), 3.45-3.20 (m, 4-H), 2.31 (s, 3-H, CH<sub>3</sub>), 1.57-1.48 (m, 13-H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.35-1.21 (m, 24-H, CH<sub>2</sub>), 0.91-0.86 (m, 6-H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  174.0 (C=O), 156.4 (COO), 133.1 (C-2'), 118.8 (C-3'), 97.0 (C-1), 81.2 (C-3), 79.1 (C-4), 78.9 (C-3, C-O), 73.7, 73.5 (2 CH<sub>2</sub>O), 71.31 (C-5), 69.0 (C-1'), 51.7 (C-6), 50.3 (C-2), 32.1-22.9 (4 CH<sub>3</sub>, 14 CH<sub>2</sub>), 14.8 (2 CH<sub>3</sub>); SMHR (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  calcd for 597.45  $m/z$  found 597.45

Allyl 3,4-di-*O*-nonyl-2-*tert*-butyloxycarbonyl-2-*N*-Acetyl-2-deoxy-6-azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**52**)

**Procedure:** deacetylation with sodium methanolate



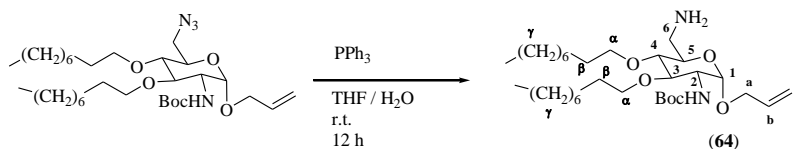
**Synthesis:** The glucosamine derivative (**51**) was dissolved in anhydrous MeOH (1 mL/0.01 g of derivative). Sodium methanolate (3x0.5-1.0 eq) was added to the solution in three portions at regular intervals of 2 h. The reaction mixture is kept at room temperature for a total of 6 h and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 20 mL of DCM (5 mL/10 mg of derivative) and the solution obtained was filtered and then washed 3 times with water (3x5 mL/10 mg of derivative) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The isolated derivative was obtained after evaporation as an opaque paste (99 % yield, 83 mg, 0.138 mmol).

#### Analysis and characterization:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.87-5.76 (m, 1-H), 5.22 (dd,  $J = 1.2, 17.5$  Hz, 1-H), 5.23 (dd,  $J = 1.1, 10.8$  Hz, 1-H), 4.71 (m, 1-H), 4.17 (dd,  $J = 5.4, 12.9$  Hz, 1-H), 3.91 (dd,  $J = 6.1, 12.7$  Hz, 1-H), 3.84-3.69 (m, 3-H, CH<sub>2</sub>O), 3.55-3.47 (m, 3-H, CH<sub>2</sub>O), 3.45-3.21 (m, 4-H), 1.57-1.48 (m, 13-H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.35-1.21 (m, 24-H, CH<sub>2</sub>), 0.90-0.86 (m, 6-H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  164.0 (COO), 133.6 (C-2'), 118.5 (C-3'), 97.0 (C-1), 81.1 (C-3), 79.1 (C-4), 78.6 (C-3, C-O), 73.6, 73.5 (2 CH<sub>2</sub>O), 71.34 (C-5), 68.0 (C-1'), 51.7 (C-6), 50.2 (C-2), 32.2-22.8 (3 CH<sub>3</sub>, 14 CH<sub>2</sub>), 14.4 (2 CH<sub>3</sub>); SMHR (ESI<sup>+</sup>) : [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  calcd for 597,458562  $m/z$  found 597,458216, [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  calcd for 619,44  $m/z$  found 619,44.

Allyl 3,4-di-*O*-nonyl-2-*tert*-butyloxycarbonyl-Amino-2-deoxy-6-Amine-6-deoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**64**)

**Procedure:** Reduction of the azide function with triphenylphosphine/water



**Synthesis:** 93 mg (0.154 mmol) of derivative (**52**) was dissolved in 9 mL of THF and 3 mL of water. 123 mg (0.469 mmol) of triphenylphosphine were added and the reaction mixture is kept at room temperature for 4 h. The solvent were evaporated under reduced pressure and the residue was by chromatographed on silica eluted with a 90/10 mixture of cyclohexane/AcOEt to afford the derivative (**64**) as an opaque amorphous compound (96 % yield, 85.4 mg, 0.150 mmol).

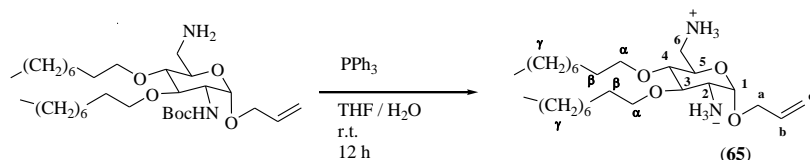
#### Analysis and characterization:

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.86-5.76 (m, 1-H), 5.27 (dd,  $J = 1.2, 17.5$  Hz, 1-H), 5.15 (dd,  $J = 1.1, 10.8$  Hz, 1-H), 4.75 (m, 1-H), 4.14 (dd,  $J = 5.3, 12.8$  Hz, 1-H), 3.95 (dd,  $J = 6.0, 12.8$  Hz, 1-H), 3.85-3.69 (m, 3-H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.56-3.51 (m, 2-H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.47-2.86 (m, 5-H), 1.57-1.48 (m, 13-H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.36-1.21 (m, 24-H,  $\text{CH}_2$ ), 0.91-0.86 (m, 6-H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  164.0 (COO), 133.5 (C-2'), 118.2 (C-3'), 97.1 (C-1), 81.1 (C-3), 79.3 (C-4), 79.0 (C-3, C-O), 73.6, 73.5 (2  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 71.5 (C-5), 68.0 (C-1'), 43.9 (C-6), 50.2 (C-2), 32.1-22.8 (3  $\text{CH}_3$ , 14  $\text{CH}_2$ ), 14.2 (2  $\text{CH}_3$ ); SMHR (ESI<sup>+</sup>):  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  calcd for 571.46  $m/z$  found 571.46.



Allyl 3,4-di-*O*-nonyl-2,6-diamino-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**65**)

**Procedure:** Deprotection with trifluoroacetic acid (TFA)



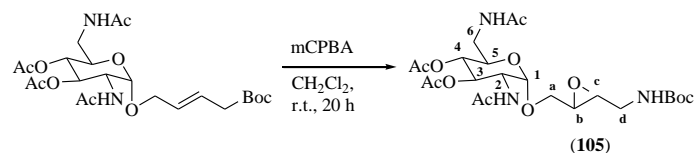
**Synthesis:** 50 mg (0.083 mmol) of derivative (**64**) was solubilized in 10 mL of DCM. 2.5 mL of TFA was added dropwise and the reaction mixture is kept at room temperature for 4 h. The solvents were removed by evaporation under reduced pressure. The residue was solubilized in MeOH (10 mL per 10 mg of derivative) and then the solution was concentrated to dryness and this procedure was repeated 3 times. The residue was solubilized in water (10 mL per 10 mg of derivative) and the aqueous solution was washed 3 times with diethyl ether (50 mL / 1 g of derivative) before evaporation. The desired products were purified by reverse phase chromatography ( $C_{18}$ ) eluting from water to 50/50 water/MeOH mixtures. The isolated products was isolated as to give a yellow amorphous solid (92% yield, 64.4 mg, 0.136 mmol).

**Analysis and characterization:**

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  6.04-5.94 (m, 1-H), 5.35 (dd,  $J = 1,4, 17,32$  Hz, 1-H), 5.29 (dd,  $J = 1.0, 10.7$  Hz, 1-H), 5.11 (d,  $J = 3,3$  Hz, 1-H), 4.35 (dd,  $J = 5.6, 12,5$  Hz, 1-H), 4.11 (dd,  $J = 6.5, 12.5$  Hz, 1-H), 3.89-3.76 (m, 3-H, 2  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.72-3.65 (m, 2-H), 3.65 (td,  $J = 6.9, 8,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.35-3.27 (m, 2-H), 3.22 (t,  $J = 9,3$  Hz, 1-H), 3.13 (dd,  $J = 9.6, 12.9$  Hz, 1-H), 1.69-1.56 (m, 4-H, 2  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.33-1.28 (m, 24-H, 12  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 0.91-0.88 (m, 6-H, 2  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  140.3 (C-2'), 119.5 (C-3'), 96.2 (C-1), 81.7 (C-4), 79.6 (C-3), 74.3, 73.6 (2  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.2 (C-1'), 69.6 (C-5), 54.7 (C-2), 41.7 (C-6), 33.1-23.7 (14  $\text{CH}_2$ ), 14.4 (2  $\text{CH}_3$ ); SMHR (ESI $^+$ ) :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  calcd for 577.39  $m/z$  found 577.39.

1-[4'-amino-(tert-butyl-carbonate)-2',3'-epoxybutyl]-2,6-di-*N*-acetyl-2,6-dideoxy-3,4-di-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**105**)

**Procedure:** Oxidation with mCPBA

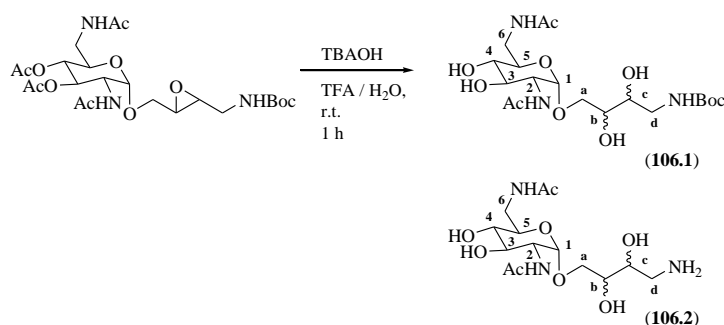


**Synthesis:** In a 25 mL flask, 100 mg (0.19 mmol) of (**38**) were solubilized in 10 mL of anhydrous DCM. To this solution was added 100 mg (0.58 mmol) of meta-chloroperbenzoic acid (mCPBA). The system was sealed with a rubber stopper and stirred at room temperature. The evolution of the reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate/methanol 95:5, visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)) and two 100 mg mCPBA fraction was added, respectively after 4 and 6 h of reaction. After disappearance of the starting material, the reaction mixture was diluted with 20 mL of DCM and extracted with 3x15 mL of 5% aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and then 3x20 mL of water. The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness to lead to the product which was used in the next step without other purification.

1-[4'-amino-(tert-butyl-carbonate)-2',3'-dihydroxybutyl]-2,6-di-*N*-acetyl-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside (**105**)

1[1-Amino-2,3-dihydroxy-butyl]-2,6-di-*N*-acetyl-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-*N*-acetylglucopyranoside

**Procedure:** Epoxide opening with aqueous tetrabutylammonium hydroxide (**106**)



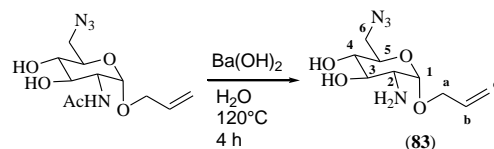
**Synthesis:** In a 25 mL bottom flask, to a solution of 80 mg of (**105**) in 5 mL of THF, a mixture of 1 mL of 40% aqueous tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH) and 4 mL of water was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature and the evolution of the reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate/methanol 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). After 1 h, the consumption of the starting material was observed. THF was evaporated and the aqueous residue obtained was dissolved in water and then extracted with 3x30 mL of ethyl acetate. Water was evaporated and the residue was purified by chromatography on silica (eluent: ethyl acetate / methanol 9: 1, ethyl acetate / methanol 8: 2) to lead to two products, A and B, which were characterized respectively as (**105**) (20 mg) and (**106**) (60 mg).

**(106.1) <sup>1</sup>H NMR** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  4.93 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H)\*; 4.85 (d;  $J = 3.6$  Hz; 1-H)\*; 4.05-3.93 (m; 2-H); 3.8-3.7 (m; 2-H); 3.64-3.6 (m; 1-H); 3.53-3.36 (m; 4-H); 3.31-3.24 (m; 2-H); 2.04; 2.03 (s; 6-H; CH<sub>3</sub>); 1.43 (s; 96H; C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). \* Interchangeable. **<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 100 MHz)  $\delta$  174.6; 174.5; (CONH); 97.3; 97.2 (C-1)\*; 71.5; 71.4; 70.8; 70.4 (C-3; C-4; C-5; C-b; C-c); 67.5 (C-a); 53.7 (C-2); 40.0 (C-6); 29.7; 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 22.0; 21.9 (CH<sub>3</sub>). \*Isomeric mixture

**(106.2) <sup>1</sup>H NMR** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  4.91-4.87 (m; 2-H); 4.15 (dd;  $J = 9.0, 4.8$  Hz; 1-H); 3.95 (dd;  $J = 10.1, 3.6$  Hz; 2-H); 3.85-3.54 (m; 7-H); 3.50-3.37 (m; 2-H); 2.06; 2.05 (s; 6-H; CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 100 MHz)  $\delta$  174.7; 174.5; (CONH); 97.6; 97.4 (C-1)\*; 71.5; 71.0; 70.6; 70.5; 70.1 ; 69.7 (C-3; C-4; C-5; C-b; C-c); 67.6 (C-a); 53.6 (C-2); 41.8 (C-d); 40.0 (C-6); 23.4; 21.9 (CH<sub>3</sub>).

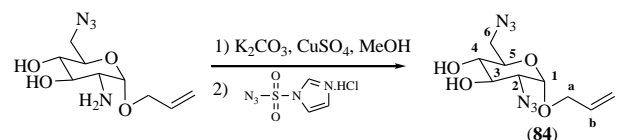
Allyl 2-amino-2-deoxy-6-azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside<sup>51</sup> (**83**)

**Procedure:** Deacetylation in an aqueous barium hydroxide solution



**Synthesis:** In a flask fitted with a reflux condenser, compound (**14**) (2 g, 3.35 mmol) was dissolved in an aqueous solution of barium hydroxide octahydrate (14 g) in water (72 mL). The solution was stirred at reflux for 4 h. After cooling, the solution was extracted with DCM under stirring for 20 h to afford 639 mg (78%) of (**83**) as a colorless oil.

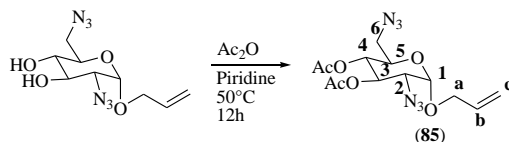
<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  5.96 (m, 1-H), 5.32 (m, 1-H), 5.20 (m, 1-H), 4.82 (d,  $J = 4$  Hz, , 1-H), 4.24 (m, 1-H), 4.07 (m, 1-H), 3.72 (ddd,  $J = 9.5, 6.5, 2.5$  Hz, , 1-H), 3.50-3.37 (m, 3-H), 3.25 (dd,  $J = 9.5, 9$  Hz, 1-H), 2.62 (dd,  $J = 10.4$  Hz, 2-H); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  135.3, 117.7, 99.4, 75.9, 73.3, 72.8, 69.5, 57.1, 52.8

Allyl 2,6-diazido-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (**84**)**Procedure:** Diazotransfer

**Synthesis:** Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride.1HCl (0.25 g, 1.2 mmol) was added to a mixture of derivative (**83**) (1.0 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.5 mmol) and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (2.5 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) in MeOH (5 mL). The solution was stirred at room temperature and the evolution of the reaction was monitored by TLC (eluent: ethyl acetate/methanol 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)). After 18 h the consumption of the starting material was observed. The mixture was concentrated, diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL), acidified with conc. aqueous HCl and the solution extracted with EtOAc (3 $\times$ 10 mL). The combined organic layers were dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and concentrated. The product obtained was used in the next step without other purification.

Allyl 3,4-*O*-diacetyl-2,6-diazido-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (**85**)

**Procedure:** Acetylation of the hydroxyl functions



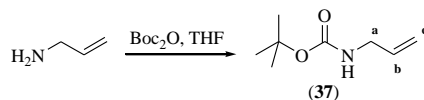
**Synthesis:** In a 25 mL round bottom flask was added (**84**) (120 mg, 0.45 mmol), 5 mL of anhydrous pyridine and 0.7 mL (7.7 mmol) of acetic anhydride. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 12 h. The reaction was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 9:1; visualization: 5% sulfuric acid in ethanol (v/v)) until consumption of the starting material. Ethyl acetate was added to the reaction mixture and the solution was washed with water (3x30 mL) and then dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated and the residue obtained was purified by chromatography on silica (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to afford compound (**85**) as a colorless oil (26 % yield, 40 mg).

**Analysis and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.89 (dddd,  $J = 13.6, 10.4, 6.2, 5.4$  Hz, 16H), 5.47-5.39 (m, 1-H), 5.31 (dq,  $J = 17.2, 1.5$  Hz, 1-H), 5.26 (ddd,  $J = 10.4, 2.6, 1.2$  Hz, 1-H), 4.93 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1-H), 4.87 (dd,  $J = 10.1, 9.2$  Hz, 1-H), 4.24 (ddt,  $J = 12.8, 5.3, 1.4$  Hz, 1-H), 4.10-4.00 (m, 1-H), 4.0-3.92 (m, 1-H), 3.32-3.21 (m, 3-H), 2.02 (s, 3-H), 1.98 (s, 3-H). HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> 355.1359, found 355.1360.

*N*-Boc-allylamine (**37**)

**Procedure:** Allylamine protection with *tert*-butyloxycarbonyl (Boc)



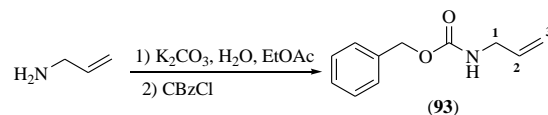
**Synthesis:** In a 50 mL round bottom flask, were added 1 mL (13 mmol) of allylamine, 10 mL of THF and 4.3 g (20 mmol) of di-*tert*-butyl dicarbonate. The flask was sealed with a rubber stopper and the reaction mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored by TLC (eluent: 100% ethyl acetate; visualization: 5% iodine in ethanol (w/v)) and after 4 h the consumption of the starting material was observed. The solvent was removed by evaporation and the residue obtained was solubilized in ethyl acetate. The solution was washed with 3x30 mL of 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub> and 3x30 mL of water and then dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated and the residue was purified by chromatographed on silica (eluent: 100% ethyl acetate then 9:1 ethyl acetate/methanol) to lead to compound (**37**) as a solid product (53% yield, 1.1 g).

**Analysis and characterization:**

**IR** ( $\nu$  max, cm<sup>-1</sup>): 3340 ( $\nu$  N-H); 1678 ( $\nu$  COOt-Bu); **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  5.85-5.42 (m; 1-H); 5.16 (ddd;  $J$  = 17.1, 3.0, 1.6 Hz; 1-H); 5.09 (ddd;  $J$  = 10.3, 3.0, 1.2 Hz; 1-H); 4.62 (s; 1-H; NH); 3.71 (s; 2-H); 1.39 (s; 9-H; C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  155.8 (COOt-Bu); 134.8 (C-b); 115.6 (C-c); 79.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 43.1 (C-a); 28.4 (CH<sub>3</sub>).

Benzyl *N*-allylcarbamate<sup>75</sup> (**93**)

**Procedure:** Allylamine protection with benzyl chloroformate

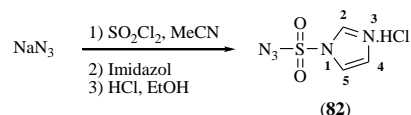


**Synthesis:** To a solution of allylamine (0.57 g, 10 mmol) in 15 mL of ethyl acetate, was added a solution of potassium carbonate (0.35 g, 25 mmol) in 15 mL of water. The mixture was cooled in an ice bath and benzyl chloroformate (1.79 g, 10.5 mmol) was added in 30 min. After stirring at room temperature for 2 h, the organic layer was separated and washed twice with 10 mL portions of 1 M HCl once with 10 mL of saturated aqueous NaCl. The combined organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>. After evaporation, the residue was purified by flash chromatography on silica gel to give the desired colorless oil (90% yield).

**Analysis and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.35-7.32 (m, 5-H), 5.81 (ddt, J = 17.1, 10.5, 5.3 Hz, 1-H), 5.23 (dd, J = 17.1, 1.4 Hz, 1-H), 5.15 (dd, J = 10.5, 1.4 Hz, 1-H), 5.17 (s, 2-H, OCH<sub>2</sub>), 4.82 (s, 1-H, NH), 3.81 (t, J = 7.6 Hz, 2-H, CH<sub>2</sub>NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 156.2, 136.5, 134.4, 128.4, 128.0, 115.9, 66.7, 43.4.



Imidazol-1-sulfonyl azide hydrochloride 1.HCl <sup>72</sup> (**82**)**Procedure:** Preparation of Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride 1.HCl

**Synthesis:** Sulfuryl chloride (16.1 mL, 200 mmol) was added dropwise to an ice-cooled suspension of NaN<sub>3</sub> (13.0 g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. Imidazol (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3 h at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (400 mL), washed with H<sub>2</sub>O (2 × 400 mL) then with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2 × 400 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the dropwise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added dropwise to the filtrate with stirring, the mixture was chilled in an ice-bath and filtered and then the filter cake was washed with EtOAc (3×100 mL) to give compound (**82**) as colourless needles (63% yield, 26.4 g).

**Analysis and characterization:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.62 (dd, *J* = 1.3, 2.2 Hz, 1-H), 8.12 (dd, *J* = 1.6, 2.2 Hz, 1-H), 9.56 (dd, *J* = 1.3, 1.6 Hz, 1-H); <sup>13</sup>C NMR (150.9 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 120.8, 123.4, 138.3.

## **CONCLUSÃO GERAL**

A presente tese foi dividida em três principais partes, possuindo cada uma um objetivo específico.

A primeira parte foi dedicada à síntese de 24 novos derivados imidazolidínicos-3,5-dissubstituídos como possíveis agentes esquistossomicidas. Após a caracterização os derivados foram submetidos a análises quimiométricas. Através da análise da PCA foram escolhidos 11 compostos, considerados os mais (dis)similares nos parâmetros escolhidos para o estudo. Dentre eles, o composto indólico-imidazolidínico LPSF/PTS-14, apresentou uma alta taxa de mortalidade em baixas concentrações, aliadas a uma baixa citotoxicidade, alterações no acasalamento e oviposição, colocando-o como um promissor agente esquistossomicida. Um modelo de farmacóforo foi proposto para os derivados imidazolidínicos, porém, devido à baixa diversidade estrutural entre as moléculas escolhidas o modelo não é confiável. Também foi avaliada a possibilidade da ocorrência de Reação de Michael como possível mecanismo de ação ou toxicidade do derivado. Para tanto, foram escolhidos dois derivados o LPSF/PTS-14, devido à sua alta atividade e baixa citotoxicidade, e o LPSF/PTS-18, devido à sua alta citotoxicidade e baixa atividade. Apesar de realizada através da metodologia clássica, com aumento de temperatura, não foi possível de se obter produtos da reação de Michael. A principal perspectiva deste trabalho é a avaliação da atividade do LPSF/PTS-14 frente aos receptores de acetilcolina  $\text{SmAACs}$ , possíveis alvos biológicos dos compostos imidazolidínicos. Caso evidenciada atividade, faz-se essencial a realização de um modelo de docking desde que a proteína seja cristalizada. Através destas informações será possível o desenvolvimento de moléculas mais ativas através da síntese dirigida ao alvo:

A segunda parte desta tese foi dedicada ao Praziquantel, no que vem a ser o início de um projeto em colaboração entre o Brasil e à França. Primeiramente, foi realizada uma proposição de modelo SAR para este fármaco através de uma revisão de literatura concisa de todas as publicações com novos derivados do PZQ com ação esquistossomicida nos últimos 35 anos. Este modelo foi capaz de provar, mesmo que de forma qualitativa, a importância da substituição nas mais variadas posições do PZQ. Desejando-se validar o modelo farmacofórico, assim como entender o modo de ação a nível químico destes derivados, um modelo bioquimiométrico (em colaboração com o Département de Pharmacochimie Moléculaire, UGA, Grenoble, France) e de farmacóforo (em colaboração com a equipe Bioinformatic et Biophysique da Université Pierre et Marie Curie).

A terceira parte desta tese foi concentrada à síntese de novos derivados amfifílicos de aminoglicosídeos através da reação de metatese, a serem avaliados como agentes antibióticos contra bactérias resistentes. Apesar dos derivados não terem sido sintetizados em tempo hábil, importantes progressos foram realizados, como a síntese de intermediários-chaves, assim como a avaliação da compatibilidade de diversos grupos protetores e a reação de metatese, etapa-chave para a síntese dos derivados. Através destes avanços uma nova rota de síntese mais adequada foi proposta e iniciada neste trabalho, e será finalizada oportunamente.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette thèse a été divisée en trois parties principales, chacune ayant un but précis.

La première partie a été consacrée à la synthèse de 24 nouveaux dérivés en tant qu'agents de schistosomicide potentiels imidazolidinicos-3,5-di-substitué. Après dérivés de caractérisation ont été soumis à une analyse chimométrique. Grâce à l'analyse PCA ont été choisis 11 composés considérés comme plus (dis) similaires aux paramètres choisis pour l'étude. Parmi eux, l'indole-imidazolidinico composé LPSF / PTS-14, a montré un taux élevé de mortalité en faibles concentrations, couplée à une faible cytotoxicité, les changements dans l'accouplement et la ponte, le plaçant comme un agent de schistosomicide prometteur. Un modèle de pharmacophore a été proposé pour les dérivés imidazolidiniques, cependant, en raison de la faible diversité structurale entre les molécules choisies le modèle n'a pas été fiable. Il a également été évalué si le mécanisme d'action ou toxicité des dérivés se produise par la réaction de Michael. A cet effet, deux dérivés ont été choisis pour LPSF / PTS-14, en raison de sa forte activité élevée et une faible cytotoxicité et LPSF / PTS-18, en raison de sa forte cytotoxicité activité haute et basse. Bien que réalisée par des procédés classiques, la température augmente, nous avons pas observé la formation du produit de la réaction de Michael. La perspective de ce travail est d'évaluer l'activité de LPSF / PTS-14 contre les récepteurs d'acétylcholine SmAAs, possibles cibles biologiques de composés de imidazolidiniques et la réalisation d'un docking. Par cette information, il sera possible de développer des molécules plus actives à travers la synthèse dirigée vers la cible:

La deuxième partie de cette thèse a été consacrée au praziquantel et c'était aussi le début d'un projet en collaboration entre le Brésil et la France. Tout d'abord, un modèle proposition SAR a été faite pour le PZQ à travers une revue de la littérature concise de toutes les publications avec de nouveaux dérivés PZQ avec action schistosomicide au cours des 35 dernières années. Ce modèle a prouvé, même qualitativement, l'importance du remplacement dans diverses positions de PZQ. Désireux de valider le modèle de pharmacophore, ainsi que de comprendre le mode d'action au niveau chimique de ces dérivés, un modèle de biochimométrique (en collaboration avec le Département de Pharmacochimie Moléculaire, UGA, Grenoble, France) et pharmacophore (en collaboration avec le Bioinformatic d'équipe et Biophysique et le Université Pierre Marie Curie).

La troisième partie de cette thèse a été concentrée à la synthèse de nouveaux dérivés aminoglycosides amphiphiles par la réaction de métathèse, et leur évaluation contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Bien que les dérivés ne sont pas synthétisés en temps opportun, des progrès importants ont été réalisés, comme la synthèse des intermédiaires clés, ainsi que l'évaluation de la compatibilité des divers groupes protecteurs avec la réaction de métathèse. Grâce à ces progrès une nouvelle voie de synthèse la plus appropriée a été proposé et initié.

## **REFERÊNCIAS**

1. WHO | First WHO report on neglected tropical diseases. *WHO* (2010). Available at: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/). (Accessed: 17th October 2016)
2. WHO IRIS: Schistosomiasis: progress report 2001 - 2011, strategic plan 2012 - 2020. *WHO* (2013). Available at: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>. (Accessed: 17th October 2016)
3. Rossi, M. H. & Zelnik, R. Contribuição à química das imidazolidinadionas - síntese de ciclanilideno-hidantoínas. *Arq. Inst. Biológico* **67**, 125–130 (2000).
4. Carvalho, G. S. G., Machado, P. A., de Paula, D. T. S., Coimbra, E. S. & da Silva, A. D. Synthesis, Cytotoxicity, and Antileishmanial Activity of N,N'-Disubstituted Ethylenediamine and Imidazolidine Derivatives. **10**, 1723–1730 (2010).
5. Caterina, M. C. *et al.* Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 2226–2234 (2008).
6. Neves, J. K. de A. L. *et al.* Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of Schistosoma mansoni. *Parasitol. Res.* **107**, 531–538 (2010).
7. Albuquerque, J. F. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of substituted imidazolidinediones and thioxoimidazolidinones. *Farm. Soc. Chim. Ital.* **1989** **54**, 77–82 (1999).
8. Pitta, M. G. R. *et al.* New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101 Suppl 1**, 313–316 (2006).
9. Silva, A. L. da *et al.* Tegumental Changes in Adult Schistosoma mansoni Induced by a New Imidazolidinic Derivative. *Br. J. Pharm. Res.* **4**, 1988–2005 (2014).
10. da Silva, A. C. A. *et al.* Study of the activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against Schistosomiasis mansoni in mice. *ScientificWorldJournal* **2012**, 520524 (2012).
11. Oliveira, J. F. de *et al.* Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo- Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones. *Br. J. Pharm. Res.* **7**, 386–400 (2015).
12. Watson, M. Praziquantel. *J. Exot. Pet Med.* **18**, 229–231 (2009).
13. Taylor, A. B. *et al.* Structural and Functional Characterization of the Enantiomers of the Antischistosomal Drug Oxamniquine. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, (2015).
14. Zimmermann, L. *et al.* New Broad-Spectrum Antibacterial Amphiphilic Aminoglycosides Active against Resistant Bacteria: From Neamine Derivatives to Smaller Neosamine Analogues. *J. Med. Chem.* **59**, 9350–9369 (2016).
15. Osorio, E. J., Robledo, S. M. & Bastida, J. Alkaloids with antiprotozoal activity. *Alkaloids Chem. Biol.* **66**, 113–190 (2008).
16. WHO. WHO | Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *WHO* (2010). Available at: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564861/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/). (Accessed: 11th December 2016)
17. Kappagoda, S., Singh, U. & Blackburn, B. G. Antiparasitic therapy. *Mayo Clin. Proc.* **86**, 561–583 (2011).
18. WHO. 19th WHO Model List of Essential Medicines. *WHO* (2015). Available at: [http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015\\_8-May-15.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf). (Accessed: 11th December 2016)
19. Watson, M. Praziquantel. *J. Exot. Pet Med.* **18**, 229–231 (2009).
20. Sayed, A. A. *et al.* Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nat. Med.* **14**, 407–412 (2008).
21. Abdul-Ghani, R., Loutfy, N., el-Sahn, A. & Hassan, A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitol. Res.* **104**, 955–965 (2009).
22. Ruminski, P. G. From bench to clinic: bridging the translational gap in neglected disease drug development. *Future Med. Chem.* **3**, 1253–1257 (2011).
23. Robertson, S. A. & Renslo, A. R. Drug discovery for neglected tropical diseases at the Sandler Center. *Future Med. Chem.* **3**, 1279–1288 (2011).

24. Neves, J. K. de A. L. *et al.* Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* **107**, 531–538 (2010).
25. Silva, A. L. *et al.* Tegumental Changes in Adult *Schistosoma mansoni* Induced by a New Imidazolidinic Derivative. *Br. J. Pharm. Res.* **4**, 1988–2005 (2014).
26. Brooker, S., Clements, A. C. & Bundy, D. A. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv. Parasitol.* **62**, 221–261 (2006).
27. Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. & Kestens, L. Human schistosomiasis. *Lancet Lond. Engl.* **368**, 1106–1118 (2006).
28. Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. & Utzinger, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 411–425 (2006).
29. Bergquist, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol.* **18**, 309–314 (2002).
30. Pearce, E. J. & MacDonald, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 499–511 (2002).
31. Harder, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. *Parasitol. Res.* **88**, 395–397 (2002).
32. Hotez, P. J. *et al.* Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.* **3**, e102 (2006).
33. Hotez, P. J. & Fenwick, A. Schistosomiasis in Africa: An Emerging Tragedy in Our New Global Health Decade. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, (2009).
34. Coura, J. R. & Conceição, M. J. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v105n4/40.pdf>. (Accessed: 6th October 2016)
35. Christopherson, J. B. THE SUCCESSFUL USE OF ANTIMONY IN BILHARZIOSIS. *The Lancet* **192**, 325–327 (1918).
36. Bueding, E. & Mansour, J. M. The relationship between inhibition of phosphofructokinase activity and the mode of action of trivalent organic antimonials on *Schistosoma mansoni*. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **12**, 159–165 (1957).
37. Maddison, J. E., Page, S. W. & (BVSc.), D. C. *Small Animal Clinical Pharmacology*. (Elsevier Health Sciences, 2008).
38. Hofer, W. Chemistry of Metrifonate and Dichlorvos. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* **49**, 7–14 (1981).
39. Cioli, D., Pica-Mattoccia, L. & Archer, S. Antischistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmacol. Ther.* **68**, 35–85 (1995).
40. Katz, N., Zicker, F. & Pereira, J. P. Field trials with oxamniquine in a Schistosomiasis mansoni-endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**, 234–237 (1977).
41. Dias, L. C. *et al.* Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quím. Nova* **32**, 2444–2457 (2009).
42. Padda, R. S., Wang, C., Hughes, J. B., Kutty, R. & Bennett, G. N. Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* **22**, 2293–2297 (2003).
43. Rieger, P.-G. & Knackmuss, H.-J. in *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds* (ed. Spain, J. C.) 1–18 (Springer US, 1995). doi:10.1007/978-1-4757-9447-2\_1
44. Purohit, V. & Basu, A. K. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 673–692 (2000).
45. Ju, K.-S. & Parales, R. E. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **74**, 250–272 (2010).
46. Archer, S. & Yarinsky, A. Recent developments in the chemotherapy of schistosomiasis. *Prog. Drug Res. Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech. Pharm.* **16**, 11–66 (1972).



47. Berberian, D. A., Freele, H., Rosi, D., Dennis, E. W. & Archer, S. A comparison of oral and parenteral activity of hycanthone and lucanthone in experimental infections with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **16**, 487–491 (1967).
48. Russell, W. L. Results of tests for possible transmitted genetic effects of hycanthone in mammals. *J. Toxicol. Environ. Health* **1**, 301–304 (1975).
49. Bulay, O., Urman, H., Patil, K., Clayson, D. B. & Shubik, P. Carcinogenic potential of hycanthone in mice and hamsters. *Int. J. Cancer* **23**, 97–104 (1979).
50. Bases, R. E. & Mendez, F. Topoisomerase inhibition by lucanthone, an adjuvant in radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **37**, 1133–1137 (1997).
51. Del Rowe, J. D. *et al.* Accelerated regression of brain metastases in patients receiving whole brain radiation and the topoisomerase II inhibitor, lucanthone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **43**, 89–93 (1999).
52. Nordgren, I., Holmstedt, B., Bengtsson, E. & Finkel, Y. Plasma levels of metrifonate and dichlorvos during treatment of schistosomiasis with bilarcil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**, 426–430 (1980).
53. WHO. WHO Model List of Essential Medicines. (2015). Available at: [http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML\\_2015\\_FINAL\\_amended\\_NOV2015.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1). (Accessed: 6th October 2016)
54. Novaes, M. R. C. G. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. (1999).
55. Wilkins, H. A. Reinfection after treatment of schistosome infections. *Parasitol. Today Pers. Ed* **5**, 83–88 (1989).
56. Frézard, F. & Melo, A. L. de. Evaluation of the schistosomicidal efficacy of liposome - Entrapped Oxamniquine. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **39**, 97–100 (1997).
57. Giboda, M. & Smith, J. M. *Schistosoma mansoni* eggs as a target for praziquantel: efficacy of oral application in mice. *J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 98–102 (1994).
58. Cioli, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today Pers. Ed* **14**, 418–422 (1998).
59. Frezza, T. F., Madi, R. R., Banin, T. M. & Allegretti, S. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Cienc. Farm. Basica E Apl.* **28**,
60. Reich, M. R. & Govindaraj, R. Dilemmas in drug development for tropical diseases. Experiences with praziquantel. *Health Policy Amst. Neth.* **44**, 1–18 (1998).
61. Sinha, S. & Sharma, B. S. Neurocysticercosis: a review of current status and management. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **16**, 867–876 (2009).
62. King, C. H. & Mahmoud, A. A. Drugs five years later: praziquantel. *Ann. Intern. Med.* **110**, 290–296 (1989).
63. Cupit, P. M. & Cunningham, C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Future Med. Chem.* **7**, 701–705 (2015).
64. Guglielmo, S. *et al.* New Praziquantel Derivatives Containing NO-donor Furoxans and Related Furazans as Active Agents against *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Med. Chem.* **84**, 135–145 (2014).
65. Doenhoff, M. J., Cioli, D. & Utzinger, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis: *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**, 659–667 (2008).
66. Greenberg, R. M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *Int. J. Parasitol.* **35**, 1–9 (2005).
67. Taylor, M. Global trends in schistosomiasis control. *Bull. World Health Organ.* **86**, 738 (2008).
68. Woelfle, M. *et al.* Resolution of Praziquantel. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).
69. Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B. & Rodriguez, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *Int. J. Pharm.* **318**, 92–102 (2006).
70. Barsoum, R. S. Schistosomiasis and the kidney. *Semin. Nephrol.* **23**, 34–41 (2003).

71. González-Esquivel, D., Rivera, J., Castro, N., Yopez-Mulia, L. & Jung Cook, H. In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel. *Int. J. Pharm.* **295**, 93–99 (2005).
72. Cioli, D. & Pica-Mattoccia, L. Praziquantel. *Parasitol. Res.* **90 Supp 1**, S3-9 (2003).
73. Giorgi, M. *et al.* Effects of liquid and freeze-dried grapefruit juice on the pharmacokinetics of praziquantel and its metabolite 4'-hydroxy praziquantel in beagle dogs. *Pharmacol. Res.* **47**, 87–92 (2003).
74. Castro, N., Medina, R., Sotelo, J. & Jung, H. Bioavailability of Praziquantel Increases with Concomitant Administration of Food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2903–2904 (2000).
75. Mandour, M. E. *et al.* Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, 389–393 (1990).
76. PEARSON, R. D. & GUERRANT, R. L. Praziquantel: A Major Advance in Anthelmintic Therapy. *Ann. Intern. Med.* **99**, 195–198 (1983).
77. Leopold, G. *et al.* Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **14**, 281–291 (1978).
78. Dayan, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* **86**, 141–159 (2003).
79. Ronketti, F. *et al.* Praziquantel derivatives I: Modification of the aromatic ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 4154–4157 (2007).
80. Lima, R. M. *et al.* Enantioselective analysis of praziquantel and trans-4-hydroxypraziquantel in human plasma by chiral LC-MS/MS: Application to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **877**, 3083–3088 (2009).
81. Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R. & Seubert, Jür. Praziquantel. *Med. Res. Rev.* **3**, 147–200 (1983).
82. Masimirembwa, C. M. & Hasler, J. A. Characterisation of praziquantel metabolism by rat liver microsomes using cytochrome P450 inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1779–1783 (1994).
83. Olds, G. R. *et al.* Double-blind placebo-controlled study of concurrent administration of albendazole and praziquantel in schoolchildren with schistosomiasis and geohelminths. *J. Infect. Dis.* **179**, 996–1003 (1999).
84. Jung, H., Medina, R., Castro, N., Corona, T. & Sotelo, J. Pharmacokinetic study of praziquantel administered alone and in combination with cimetidine in a single-day therapeutic regimen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1256–1259 (1997).
85. Sotelo, J. & Jung, H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin. Pharmacokinet.* **34**, 503–515 (1998).
86. el Guiniady, M. A., el Touny, M. A., Abdel-Bary, M. A., Abdel-Fatah, S. A. & Metwally, A. Clinical and pharmacokinetic study of praziquantel in Egyptian schistosomiasis patients with and without liver cell failure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**, 809–818 (1994).
87. Pax, R., Bennett, J. L. & Fetterer, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **304**, 309–315 (1978).
88. Xiao, S.-H., Mei, J.-Y. & Jiao, P.-Y. The in vitro effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Res.* **106**, 237–246 (2009).
89. Salvador-Recatalà, V., Schneider, T. & Greenberg, R. M. Atypical properties of a conventional calcium channel beta subunit from the platyhelminth *Schistosoma mansoni*. *BMC Physiol.* **8**, 6 (2008).
90. Salvador-Recatalà, V. & Greenberg, R. M. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **1**, 85–93 (2012).
91. Catterall, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521–555 (2000).

92. Kohn, A. B., Lea, J. M., Roberts-Misterly, J. M., Anderson, P. a. V. & Greenberg, R. M. Structure of three high voltage-activated calcium channel  $\alpha 1$  subunits from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **123**, 489–497 (2001).
93. Kohn, A. B., Anderson, P. A. V., Roberts-Misterly, J. M. & Greenberg, R. M. Schistosome Calcium Channel  $\beta$  Subunits UNUSUAL MODULATORY EFFECTS AND POTENTIAL ROLE IN THE ACTION OF THE ANTISCHISTOSOMAL DRUG PRAZIQUANTEL. *J. Biol. Chem.* **276**, 36873–36876 (2001).
94. Kohn, A. B., Roberts-Misterly, J. M., Anderson, P. A. V., Khan, N. & Greenberg, R. M. Specific residues in the Beta Interaction Domain of a schistosome  $Ca^{2+}$  channel  $\beta$  subunit are key to its role in sensitivity to the antischistosomal drug praziquantel. *Parasitology* **127**, 349–356 (2003).
95. da Silva, S. P. & Noël, F. Time course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment in vitro: comparison with its effects on worm length and motility. *Parasitol. Res.* **81**, 543–548 (1995).
96. Almeida, G. T. *et al.* Synergy of Omeprazole and Praziquantel In Vitro Treatment against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, (2015).
97. Cherfas, J. New weapon in the war against schistosomiasis. *Science* **246**, 1242–1243 (1989).
98. Pica-Mattocchia, L. & Cioli, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int. J. Parasitol.* **34**, 527–533 (2004).
99. Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Sobhon, P., Riengrojpitak, S. & Kangwanransan, N. *Schistosoma mekongi*: the in vitro effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. *Exp. Parasitol.* **113**, 16–23 (2006).
100. Xie, Y. *et al.* Synthesis of fluorescent derivatives of praziquantel: cell-imaging and interaction with *Schistosoma japonicum* cercariae. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 5989–5993 (2013).
101. Katz, N. & Coelho, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. *Acta Trop.* **108**, 72–78 (2008).
102. Katz, N., Rocha, R. S. & Chaves, A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. *Bull. World Health Organ.* **57**, 781–785 (1979).
103. Davis, A. & Wegner, D. H. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. *Bull. World Health Organ.* **57**, 767–771 (1979).
104. Ishizaki, T., Kamo, E. & Boehme, K. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. *Bull. World Health Organ.* **57**, 787–791 (1979).
105. Santos, A. T. *et al.* Preliminary clinical trials with praziquantel in *Schistosoma japonicum* infections in the Philippines. *Bull. World Health Organ.* **57**, 793–799 (1979).
106. Polderman, A. M., Gryseels, B., Gerold, J. L., Mpamila, K. & Manshande, J. P. Side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 752–754 (1984).
107. Stelma, F. F. *et al.* Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 167–170 (1995).
108. Froberg, H. The toxicological profile of praziquantel in comparison to other anthelmintic drugs. *Acta Leiden.* **57**, 201–215 (1989).
109. Kramers, P. G. *et al.* International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication No. 18. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. *Mutat. Res.* **257**, 49–89 (1991).
110. Rogers, S. H. & Bueding, E. Hycanthon resistance: development in *Schistosoma mansoni*. *Science* **172**, 1057–1058 (1971).
111. Fallon, P. G. Schistosome resistance to praziquantel. *Drug Resist. Updat.* **1**, 236–241 (1998).
112. Fallon, P. G., Tao, L. F., Ismail, M. M. & Bennett, J. L. Schistosome resistance to praziquantel: Fact or artifact? *Parasitol. Today Pers. Ed* **12**, 316–320 (1996).

113. Stelma, F. F. *et al.* Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. *J. Infect. Dis.* **176**, 304–307 (1997).
114. Melman, S. D. *et al.* Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, (2009).
115. Kasinathan, R. S., Goronga, T., Messerli, S. M., Webb, T. R. & Greenberg, R. M. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug praziquantel. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 128–135 (2010).
116. Hines-Kay, J. *et al.* Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with praziquantel in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **186**, 87–94 (2012).
117. Wang, W., Wang, L. & Liang, Y.-S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol. Res.* **111**, 1871–1877 (2012).
118. Couto, F. F. B. *et al.* Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. *Parasitology* **137**, 1791–1797 (2010).
119. Wu, M. H. *et al.* Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 345–349 (1991).
120. WHO | Drug development and evaluation for helminths and other neglected tropical diseases: Business Plan 2008-2013. WHO Available at: <http://www.who.int/tdr/publications/about-tdr/business-plans/bl6-business-plan-2008-2013/en/>. (Accessed: 7th October 2016)
121. Meyer, T. *et al.* Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e357 (2009).
122. Duan, W. *et al.* Praziquantel derivatives exhibit activity against both juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1587–1590 (2012).
123. Seubert, J., Thomas, H., Andrews, P. & Haftung, M. P. G. M. B. *2-acyl-4-oxo-pyrazino-isoquinoline derivatives and process for the preparation thereof.* (1977).
124. Seubert, J., Pohlke, R. & Loebich, F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against Schistosomes and Cestodes. *Experientia* **33**, 1036–1037 (1977).
125. Abo-Ghaila, M. H. & Soliman, A. E. Synthesis and antischistosomal activity of a new 2-nicotinoyl dipeptide analogue of praziquantel. *Arzneimittelforschung.* **46**, 207–209 (1996).
126. Mitsui, Y. & Arizono, K. A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of praziquantel concentration in serum. *Int. J. Parasitol.* **31**, 87–91 (2001).
127. Dong, Y. *et al.* Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2481–2484 (2010).
128. Xiao, S.-H. *et al.* In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1440–1445 (2007).
129. Laurent, S. A.-L. *et al.* Synthesis of ‘Trioxaquantel’® Derivatives as Potential New Antischistosomal Drugs. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 895–913 (2008).
130. Alger, H. M., Sayed, A. A., Stadecker, M. J. & Williams, D. L. Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1285–1292 (2002).
131. Sadhu, P. S. *et al.* Synthesis of new praziquantel analogues: Potential candidates for the treatment of schistosomiasis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1103–1106 (2012).
132. Dömling, A. & Khoury, K. Praziquantel and schistosomiasis. *ChemMedChem* **5**, 1420–1434 (2010).
133. Liu, H., William, S., Herdtweck, E., Botros, S. & Dömling, A. MCR Synthesis of Praziquantel Derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **79**, 470–477 (2012).
134. Orru, R. V. A. & Ruijter, E. *Synthesis of Heterocycles via Multicomponent Reactions I.* (Springer Science & Business Media, 2010).

135. Hartinger, C. G. & Dyson, P. J. Bioorganometallic chemistry--from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 391–401 (2009).
136. Gasser, G., Ott, I. & Metzler-Nolte, N. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med. Chem.* **54**, 3–25 (2011).
137. Patra, M. *et al.* Ferrocenyl Derivatives of the Anthelmintic Praziquantel: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **55**, 8790–8798 (2012).
138. Patra, M. *et al.*  $[(\eta(6)\text{-Praziquantel})\text{Cr}(\text{CO})_3]$  derivatives with remarkable in vitro anti-schistosomal activity. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **19**, 2232–2235 (2013).
139. Patra, M. *et al.* In vitro metabolic profile and in vivo antischistosomal activity studies of  $(\eta(6)\text{-praziquantel})\text{Cr}(\text{CO})_3$  derivatives. *J. Med. Chem.* **56**, 9192–9198 (2013).
140. Wang, W.-L. *et al.* Synthesis and SAR Studies of Praziquantel Derivatives with Activity against *Schistosoma japonicum*. *Molecules* **18**, 9163–9178 (2013).
141. Wang, Z., Chen, J. & Qiao, C. Praziquantel Derivatives with Antischistosomal Activity: Aromatic Ring Modification. *Chem. Biol. Drug Des.* **82**, 216–225 (2013).
142. Zheng, Y. *et al.* Development of chiral praziquantel analogues as potential drug candidates with activity to juvenile *Schistosoma japonicum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 4223–4226 (2014).
143. Meunier, B. & Robert, A. Heme as Trigger and Target for Trioxane-Containing Antimalarial Drugs. *Acc. Chem. Res.* **43**, 1444–1451 (2010).
144. Utzinger, J., Xiao, S., N'Goran, E. K., Bergquist, R. & Tanner, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1549–1562 (2001).
145. Portela, J. *et al.* Antischistosomal Activity of Trioxaquinones: In Vivo Efficacy and Mechanism of Action on *Schistosoma mansoni*. *PLOS Negl Trop Dis* **6**, e1474 (2012).
146. You, J., Mei, J. & Xiao, S. Observation on effect of praziquantel combined with artemether on mouse schistosomiasis. *Chin. J. Parasit. Dis. Control* 50–51
147. Shuhua, X. *et al.* Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. *Parasitol. Int.* **49**, 25–30 (2000).
148. Utzinger, J., Keiser, J., Shuhua, X., Tanner, M. & Singer, B. H. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1487–1495 (2003).
149. Dong, L. *et al.* An artemisinin derivative of praziquantel as an orally active antischistosomal agent. *PloS One* **9**, e112163 (2014).
150. *Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil.* (Atheneu, 1988).
151. *MERCK index.* (Merck & CO., INC., 1995).
152. Korolkovas, A. *Essentials of Medicinal Chemistry.* (Wiley Interscience, 1988).
153. Korolkovas, A. *Dicionário terapêutico Guanabara.* (Guanabara Koogan, 1999).
154. Tzisin, Y. & Bronshtin, A. M. Advances in the development of new anthelmintics. *Pharm Chem J Engl Trans* **20**, 696–713 (1986).
155. DEF. *Dicionário de especialidades farmacêuticas.* (EPUB, 2016).
156. Foster, R. A review of clinical experience with oxamniquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 55–59 (1987).
157. Kokwaro, G. O. & Taylor, G. Oxamniquine pharmacokinetics in healthy Kenyan African volunteers. *East Afr. Med. J.* **68**, 359–364 (1991).
158. Lemke, T. L. & Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry.* (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
159. Daneshmend, T. K. & Homeida, M. A. Oxamniquine pharmacokinetics in hepatosplenic schistosomiasis in the Sudan. *J. Antimicrob. Chemother.* **19**, 87–93 (1987).
160. Kaye, B. Clinical experiences with, and pharmacokinetics of, oxamniquine. *Adv. Pharmacol. Ther.* **10**, 41–47 (1978).
161. WHO. *WHO Drug Information.* **3**, (WHO, 1989).

162. Shekhar, K. C. Schistosomiasis drug therapy and treatment considerations. *Drugs* **42**, 379–405 (1991).
163. Filho, S. B. *et al.* Synthesis and evaluation of new oxamniquine derivatives. *Int. J. Pharm.* **233**, 35–41 (2002).
164. Valentim, C. L. L. *et al.* Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in schistosome parasites. *Science* **342**, 1385–1389 (2013).
165. Pica-Mattoccia, L. *et al.* The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 307–312 (2006).
166. Graham, P. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. (OXFORD, 2013).
167. Silva, L. C. *et al.* Clinical trials with oral oxamniquine (UK 4271) for the treatment of mansoni schistosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **16**, 103–109 (1974).
168. Domingues, A. & Coutinho, A. Tratamento da esquistossomose mansônica com oxaminquina oral. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **17**, 164–180 (1975).
169. Bina, J. C. & Spínola, A. Convulsão associada ao uso de Oxamniquine: relato de um caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **10**, 221–223 (1976).
170. Katz, N., Grinbaum, E., Chaves, A., Zicker, F. & Pellegrino, J. Clinical trials with oxamniquine, by oral route, in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **18**, 371–377 (1976).
171. Krajden, S., Keystone, J. S. & Glenn, C. Safety and toxicity of oxamni quina in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections, with particular reference to electroencephalographic abnormalities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 1344–1346 (1983).
172. Carvalho, A. S., Shikanai-Yasuda, M. A., Amato Neto, V., Shiroma, M. & Lucas, F. J. C. Neurotoxicidade do oxamniquina no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **27**, 132–142 (1985).
173. Vitorino, R. R. *et al.* Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev. Bras.* **10**, 39–45 (2012).
174. Katz, N., Dias, E. P., Araújo, N. & Souza, C. P. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **7**, 381–387 (1973).
175. Guimarães, R. X. *et al.* Resistência ao hycanthone e oxamniquine em doentes com esquistossomose com a forma clínica hepatointestinal. *Rev. Assoc. Médica Bras.* **25**, 48–50 (1979).
176. Dias, L. C. ., Pedro, R. ., Rigo, E., Goto, M. M. . & Mafra, G. . Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas.
177. Pedro, R. de J., de Souza Dias, L. C., Amato Neto, V. & de Carvalho, S. A. Observations of the treatment of mansoni schistosomiasis with oxamniquine: efficacy in children and in persistent salmonellosis; resistance of a strain of *Schistosoma mansoni*; hepatic toxicity and neurological side effects. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **22**, 32–36, 148–152 (1980).
178. Araujo, N., Katz, N., Pinto Dias, E. & de Souza, C. P. Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**, 890–894 (1980).
179. de Souza Dias, L. C., de Jesus Pedro, R. & Deberaldini, E. R. Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**, 652–659 (1982).
180. Coles, G. C., Mutahi, W. T., Kinoti, G. K., Bruce, J. I. & Katz, N. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 782–785 (1987).
181. Dias, L. C., Bruce, J. I. & Coles, G. C. Variation in response of *Schistosoma mansoni* strains to schistosomicides. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **30**, 81–85 (1988).
182. Drescher, K. M. *et al.* Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88**, 89–95 (1993).

183. Fallon, P. G. & Doenhoff, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**, 83–88 (1994).
184. COELHO, P. M. Z., LIMA E SILVA, F. C. & NOGUEIRA-MACHADO, J. A. RESISTANCE TO OXAMNIQUINE OF A *Schistosoma mansoni* STRAIN ISOLATED FROM PATIENT SUBMITTED TO REPEATED TREATMENTS. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **39**, 101–106 (1997).
185. Conceição, M. J., Argento, C. A. & Corrêa, A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 375–380 (2000).
186. Bonesso-Sabadini, P. I. P. & de Souza Dias, L. C. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 381–385 (2002).
187. Kinoti, G. K. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82 Suppl 4**, 151–156 (1987).
188. Picamattoccia, L., Dias, L. C. D., Moroni, R. & Cioli, D. *Schistosoma mansoni*: Genetic Complementation Analysis Shows That Two Independent Hycanthone/Oxamniquine-Resistant Strains Are Mutated in the Same Gene. *Exp. Parasitol.* **77**, 445–449 (1993).
189. Cioli, D., Pica-Mattoccia, L. & Archer, S. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today Pers. Ed* **9**, 162–166 (1993).
190. Almeida, A. E. de *et al.* Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **44**, 749–754 (2008).
191. Ouchi, T. & Ohya, Y. Macromolecular prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* **20**, 211–257 (1995).
192. Patel, H., Raval, D. A., Madamwar, D. & Sinha, T. J. M. Polymeric prodrugs. Synthesis, release study and antimicrobial properties of polymer-bound acriflavine. *Angew. Makromol. Chem.* **245**, (1997).
193. Gallardo, A. *et al.* Modulated release of cyclosporine from soluble vinyl pyrrolidone–hydroxyethyl methacrylate copolymer hydrogels: A correlation of ‘in vitro’ and ‘in vivo’ experiments. *J. Controlled Release* **72**, 1–11 (2001).
194. Jiang, H. L. & Zhu, K. J. Synthesis, characterization and in vitro degradation of a new family of alternate poly(ester-anhydrides) based on aliphatic and aromatic diacids. *Biomaterials* **22**, 211–218 (2001).
195. Davaran, S. & Entezami, A. A. Acrylic type polymers containing ibuprofen and indomethacin with difunctional spacer group: synthesis and hydrolysis. *J. Controlled Release* **47**, 41–49 (1997).
196. Wermuth, C. G., Aldous, D., Raboisson, P. & Rognan, D. *The Practice of Medicinal Chemistry*. (Academic Press Books, 2015).
197. Filho, R. P. *et al.* Design, synthesis, and in vivo evaluation of oxamniquine methacrylate and acrylamide prodrugs. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 1229–1236 (2007).
198. Ferrari, M. L. A., Coelho, P. M. Z., Antunes, C. M. F., Tavares, C. A. P. & da Cunha, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2572425/>. (Accessed: 22nd September 2016)
199. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. (LTC, 2013).
200. Rencher, A. C. in *Methods of Multivariate Analysis* 380–407 (John Wiley & Sons, Inc., 2002).
201. Beebe, K., Pell, R. J. & Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A Practical Guide*. (Wiley-Interscience, 1998).
202. Wold, S., Esbensen, K. & Geladi, P. Principal component analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2**, 37–52 (1987).
203. Brereton. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. (Wiley, 2003).
204. Le, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* **25**, 1–18 (2008).

205. Katz, N. in *Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar* 823–847 (Fiocruz, 2008).
206. Silva, A. C. A. Novas imidazolidinas potencialmente esquistossomicidas: Bioatividade de 2-tioxoimidazolidin-4-onas frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (CEPA BH). (Universidade Federal de Pernambuco, 2004).
207. Moraes, J. de. in *Current Topics in Tropical Medicine* **1**, 333–358 (Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed.), InTech, 2012).
208. Oliveira, S. *et al.* A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidinônicos. *Acta Farm. Bonaer.* **23**, no. **3**, (2004).
209. Neves, J. K. A. L. *et al.* Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: an ultrastructural and cytotoxicity study. *Exp. Parasitol.* **128**, 82–90 (2011).
210. Frezza, T. F. *et al.* Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Ciênc. Farm. Básica E Apl.* **28**, 209–214 (2007).
211. Santiago, E. de F. *et al.* Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 352–363 (2014).
212. Tiwari, R. K. *et al.* Synthesis and antifungal activity of substituted-10-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazino[1,2-a]indoles. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2747–2752 (2006).
213. Santin, J. R. *et al.* Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **48**, 689–697 (2013).
214. Karalı, N. *et al.* Synthesis and structure–antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2,3-dione derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5888–5904 (2007).
215. Boissier, J., Coslédan, F., Robert, A. & Meunier, B. In vitro activities of trioxaquines against *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4903–4906 (2009).
216. Keiser, J. *et al.* Mefloquine—An Aminoalcohol with Promising Antischistosomal Properties in Mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, (2009).
217. Manneck, T., Haggemüller, Y. & Keiser, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **137**, 85–98 (2010).
218. Noel, F. in *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão interdisciplinar* 207–244 (Fiocruz, 2008).
219. Moraes, J. Efeito in vitro de extratos de compostos naturais em *Schistosoma mansoni*. (Universidade de São Paulo, 2011).
220. Silva-Moraes, V. *et al.* Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 600–604 (2013).
221. Matos-Rocha, T. J. *et al.* In vitro evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Med.* **79**, 1307–1312 (2013).
222. Sangster, N. C., Song, J. & Demeler, J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. *Parasitology* **131**, S179–S190 (2005).
223. Araújo, N., Kohn, A., Oliveira, Á. A. de & Katz, N. *Schistosoma mansoni*: the action of lovastatin on the murine model. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**, 35–38 (2002).
224. Albuquerque, M. C. P. A. *et al.* Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with Imidazolidine derivatives. *Lat. Am. J. Pharm.* **26**, 65–69 (2007).
225. Xiao, S., Shen, B., Utzinger, J., Chollet, J. & Tanner, M. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 717–724 (2002).



226. Pitta, M. G. R. *et al.* New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101 Suppl 1**, 313–316 (2006).
227. Thomas, G. *Medicinal chemistry: an introduction*. (Guanabara Koogan, 2003).
228. Schmidt, F. L. Design and development of new ligands of ABCG2 and MRP1 transporters targeting the Multidrug Resistance (MDR). (Université Grenoble Alpes, 2015).
229. Sirci, F. *et al.* Ligand-, structure- and pharmacophore-based molecular fingerprints: a case study on adenosine A(1), A (2A), A (2B), and A (3) receptor antagonists. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **26**, 1247–1266 (2012).
230. Goracci, L. *et al.* Evaluating the risk of phospholipidosis using a new multidisciplinary pipeline approach. *Eur. J. Med. Chem.* **92**, 49–63 (2015).
231. da Silva, A. C. A. *et al.* Study of the Activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against Schistosomiasis Mansoni in Mice. *Sci. World J.* **2012**, e520524 (2012).
232. Albuquerque, M. C. P. A. *et al.* Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharm.* **60**, 13–17 (2005).
233. Thibaut, J. P. B. *et al.* The effects of 3-methylclonazepam on *Schistosoma mansoni* musculature are not mediated by benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **606**, 9–16 (2009).
234. Michael, A. ‘Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren’ [On the addition of sodium acetoacetate- and sodium malonic acid esters to the esters of unsaturated acids]. *J. Für Prakt. Chem.* **35**, 349–356 (1887).
235. Um, I.-H., Lee, E.-J. & Min, J.-S. Remarkable catalytic effect of H<sup>+</sup> in Michael-type additions of anilines to 3-buten-2-one. *Tetrahedron* **57**, 9585–9589 (2001).
236. Richardson, S. C., Patrick, N. G., Man, Y. K., Ferruti, P. & Duncan, R. Poly(amidoamine)s as potential nonviral vectors: ability to form interpolyelectrolyte complexes and to mediate transfection in vitro. *Biomacromolecules* **2**, 1023–1028 (2001).
237. Ferruti, P., Bianchi, S., Ranucci, E., Chiellini, F. & Caruso, V. Novel Poly(amido-amine)-Based Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **5**, 613–622 (2005).
238. Vernon, B., Tirelli, N., Bächli, T., Haldimann, D. & Hubbell, J. A. Water-borne, in situ crosslinked biomaterials from phase-segregated precursors. *J. Biomed. Mater. Res. A* **64**, 447–456 (2003).
239. Elfarra, A. A. & Krause, R. J. in *Advances in Bioactivation Research* (ed. Elfarra, A.) 1–12 (Springer New York, 2008). doi:10.1007/978-0-387-77300-1\_3
240. Harris, J. M. & Kozlowski, A. Polyethylene (glycol) derivatives with proximal reactive groups. (2007).
241. Benigni, R. & Bossa, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chem. Rev.* **111**, 2507–2536 (2011).
242. Coles, B. & Ketterer, B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 47–70 (1990).
243. Miller, E. C. & Miller, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* **47**, 1055–1064 (1981).
244. Karlberg, A.-T., Bergström, M. A., Börje, A., Luthman, K. & Nilsson, J. L. G. Allergic contact dermatitis-formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 53–69 (2008).
245. Smith, C. & Hotchkiss, S. *Allergic Contact Dermatitis: Chemical and Metabolic Mechanisms*. (Taylor & Francis, 2001).
246. Mendez, D., Hernaez, M. L., Diez, A., Puyet, A. & Bautista, J. M. Combined proteomic approaches for the identification of specific amino acid residues modified by 4-hydroxy-2-nonenal under physiological conditions. *J. Proteome Res.* **9**, 5770–5781 (2010).
247. Szapacs, M. E., Riggins, J. N., Zimmerman, L. J. & Liebler, D. C. Covalent Adduction of Human Serum Albumin by 4-Hydroxy-2-Nonenal: Kinetic Analysis of Competing Alkylation Reactions. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 10521–10528 (2006).

248. Levonen, A.-L. *et al.* Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* **378**, 373–382 (2004).
249. Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M. & Drake, J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* **23**, 655–664 (2002).
250. Uchida, K. *et al.* Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc.)* **33**, 12487–12494 (1994).
251. Rossi, A. *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**, 103–108 (2000).
252. Macpherson, L. J. *et al.* Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541–545 (2007).
253. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. (OXFORD, 2013).
254. Ripp, S. L., Overby, L. H., Philpot, R. M. & Elfarra, A. A. Oxidation of cysteine S-conjugates by rabbit liver microsomes and cDNA-expressed flavin-containing mono-oxygenases: studies with S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine, S-(1,2,2-trichlorovinyl)-L-cysteine, S-allyl-L-cysteine, and S-benzyl-L-cysteine. *Mol. Pharmacol.* **51**, 507–515 (1997).
255. Krause, R. J., Lash, L. H. & Elfarra, A. A. Human kidney flavin-containing monooxygenases and their potential roles in cysteine s-conjugate metabolism and nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 185–191 (2003).
256. Gunnarsdottir, S. & Elfarra, A. A. Distinct tissue distribution of metabolites of the novel glutathione-activated thiopurine prodrugs cis-6-(2-acetylvinylthio)purine and trans-6-(2-acetylvinylthio)guanine and 6-thioguanine in the mouse. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **31**, 718–726 (2003).
257. Khatik, G. L., Kumar, R. & Chakraborti, A. K. Catalyst-Free Conjugated Addition of Thiols to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds in Water. *Org. Lett.* **8**, 2433–2436 (2006).
258. Mather, B. D., Viswanathan, K., Miller, K. M. & Long, T. E. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 487–531 (2006).
259. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M. & Rogers, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **89**, 73–120 (2009).
260. Putrenko, I., Zakikhani, M. & Dent, J. A. A Family of Acetylcholine-gated Chloride Channel Subunits in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **280**, 6392–6398 (2005).
261. Beech, R. N., Callanan, M. K., Rao, V. T. S., Dawe, G. B. & Forrester, S. G. Characterization of cyst-loop receptor genes involved in inhibitory amine neurotransmission in parasitic and free living nematodes. *Parasitol. Int.* **62**, 599–605 (2013).
262. Barker, L. R., Bueding, E. & Timms, A. R. The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **26**, 656–665 (1966).
263. Wilson, C. V. L. C. & Schiller, E. L. The neuroanatomy of *Hymenolepis dimimuta* and *H. nana*. *J. Parasitol.* **55**, 261–270 (1969).
264. Berriman, M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* **460**, 352–358 (2009).
265. MacDonald, K. *et al.* Functional characterization of a novel family of acetylcholine-gated chloride channels in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* **10**, e1004181 (2014).
266. Barik, J. & Wonnacott, S. Indirect Modulation by  $\alpha_7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors of Noradrenaline Release in Rat Hippocampal Slices: Interaction with Glutamate and GABA Systems and Effect of Nicotine Withdrawal. *Mol. Pharmacol.* **69**, 618–628 (2006).
267. Akasu, T., Ohta, Y. & Koketsu, K. Neuropeptides facilitate the desensitization of nicotinic acetylcholine-receptor in frog skeletal muscle endplate. *Brain Res.* **290**, 342–347 (1984).

268. Di Angelantonio, S., Giniatullin, R., Costa, V., Sokolova, E. & Nistri, A. Modulation of neuronal nicotinic receptor function by the neuropeptides CGRP and substance P on autonomic nerve cells. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1061–1073 (2003).
269. Halton, D. W. & Gustafsson, M. K. S. Functional morphology of the platyhelminth nervous system. *Parasitology* **113**, S47–S72 (1996).
270. Halton, D. W. & Maule, A. G. Flatworm nerve–muscle: structural and functional analysis. *Can. J. Zool.* **82**, 316–333 (2004).
271. Rossi, M. H. & Zelnik, R. Contribuição à química das imidazolidinadionas - síntese de ciclanilidenohidantoínas. *Arq. Inst. Biológico* **67**, 125–130 (2000).
272. Pitta, M. G. da R. *et al.* Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Med. Chem. Res.* **22**, 2421–2429 (2012).
273. WHO. Vencendo a resistência microbiana. World Health Report on Infectious Diseases. WHO (2000).
274. Alvan, G., Edlund, C. & Heddini, A. The global need for effective antibiotics—a summary of plenary presentations. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **14**, 70–76 (2011).
275. Butler, M. S. & Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *J. Antibiot. (Tokyo)* **64**, 413–425 (2011).
276. Carlet, J. *et al.* Society’s failure to protect a precious resource: antibiotics. *Lancet Lond. Engl.* **378**, 369–371 (2011).
277. Gonzalez, L. S. & Spencer, J. P. Aminoglycosides: a practical review. *Am. Fam. Physician* **58**, 1811–1820 (1998).
278. Tavares, W. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico.* (Atheneu, 2009).
279. Jackowski, O. *et al.* Major increases of the reactivity and selectivity in aminoglycoside O-alkylation due to the presence of fluoride ions. *Tetrahedron* **68**, 737–746 (2012).
280. Ouberai, M. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: a target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1716–1727 (2011).
281. Le Gall, T. *et al.* Synthesis and Transfection Properties of a Series of Lipidic Neamine Derivatives. *Bioconjug. Chem.* **20**, 2032–2046 (2009).
282. Riguet, E. *et al.* Neamine dimers targeting the HIV-1 TAR RNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4651–4655 (2005).
283. Sucheck, S. J. *et al.* Design of Bifunctional Antibiotics that Target Bacterial rRNA and Inhibit Resistance-Causing Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5230–5231 (2000).
284. Magnet, S. & Blanchard, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* **105**, 477–498 (2005).
285. Decout, J. L., Baussanne, I., Desire, J. & Mingeot-Leclercq, M. P. Derivatives of 6-amino-6-deoxyglucosamine and use of same as antibacterial agents.
286. Chittapragada, M., Roberts, S. & Ham, Y. W. Aminoglycosides: Molecular Insights on the Recognition of RNA and Aminoglycoside Mimics. *Perspect. Med. Chem.* **3**, 21–37 (2009).
287. Davies, J. E. Aminoglycosides: Ancient and Modern. *J. Antibiot. (Tokyo)* **59**, 529–532 (2006).
288. Oliveira, J. F. P., Cipullo, J. P. & Burdmann, E. A. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.* **21**, 444–452 (2006).
289. Hanessian, S. *et al.* Structure-based design, synthesis and A-site rRNA co-crystal complexes of novel amphiphilic aminoglycoside antibiotics with new binding modes: a synergistic hydrophobic effect against resistant bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7097–7101 (2010).
290. Zimmermann, L. *et al.* Tuning the antibacterial activity of amphiphilic neamine derivatives and comparison to paromamine homologues. *J. Med. Chem.* **56**, 7691–7705 (2013).
291. Guchhait, G. *et al.* Amphiphilic tobramycins with immunomodulatory properties. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **54**, 6278–6282 (2015).

292. Szychowski, J. *et al.* Inhibition of aminoglycoside-deactivating enzymes APH(3')-IIIa and AAC(6')-II by amphiphilic paromomycin O<sup>2''</sup>-ether analogues. *ChemMedChem* **6**, 1961–1966 (2011).
293. Zimmermann, L. *et al.* New Broad-Spectrum Antibacterial Amphiphilic Aminoglycosides Active against Resistant Bacteria: From Neamine Derivatives to Smaller Neosamine Analogues. *J. Med. Chem.* **59**, 9350–9369 (2016).
294. Sande, M. A. & Manell, G. L. in *Goodman & Gilman (eds) As Bases Farmacológicas da Terapêutica* (ARTMED, 2012).
295. TrabulsI, L. R. & Soares, L. A. in *Farmacologia - Penildon Silva* (Guanabara Koogan, 2010).
296. Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R. & Falagas, M. E. Do we still need the aminoglycosides? *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**, 201–205 (2009).
297. Wang, J. & Chang, C. W. T. in *Aminoglycoside Antibiotics* (John Wiley & Sons, Inc., 2007).
298. Beale, J. M. & Block, J. in *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (Lippincott Williams and Wilkins, 2010).
299. Chen, L. *et al.* Structure-toxicity relationship of aminoglycosides: correlation of 2'-amine basicity with acute toxicity in pseudo-disaccharide scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8940–8951 (2008).
300. Owada, K. Experimental studies on the toxicity of kanamycin, its hydrolyzed products and neomycin. *Chemotherapy* **5**, 277–293 (1962).
301. Lima, A. L. C. M., Marseillan, R. F. & Corrado, A. P. Aminoglycoside antibiotics: structure-toxicity relationship. *Symp. Giovanni Lorenzini Found. New Trends Antibiot Re Ther* 274–276 (1981).
302. Herzog, I. M. *et al.* 6''-Thioether tobramycin analogues: towards selective targeting of bacterial membranes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **51**, 5652–5656 (2012).
303. Chang, C.-W. T. *et al.* Antibacterial to antifungal conversion of neamine aminoglycosides through alkyl modification. Strategy for reviving old drugs into agrofungicides. *J. Antibiot. (Tokyo)* **63**, 667–672 (2010).
304. Shrestha, S., Grilley, M., Fosso, M. Y., Chang, C.-W. T. & Takemoto, J. Y. Membrane Lipid-Modulated Mechanism of Action and Non-Cytotoxicity of Novel Fungicide Aminoglycoside FG08. *PLOS ONE* **8**, e73843 (2013).
305. Ouberai, M. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: a target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1716–1727 (2011).
306. Baussanne, I. *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of amphiphilic neamine derivatives. *J. Med. Chem.* **53**, 119–127 (2010).
307. Hanessian, S. *et al.* Structure-based design, synthesis, and A-site rRNA cocrystal complexes of functionally novel aminoglycoside antibiotics: C<sup>2''</sup> ether analogues of paromomycin. *J. Med. Chem.* **50**, 2352–2369 (2007).
308. Zhang, J. *et al.* Synthesis and Combinational Antibacterial Study of 5''-Modified Neomycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **62**, 539–544 (2009).
309. Zhang, J. *et al.* Surprising alteration of antibacterial activity of 5''-modified neomycin against resistant bacteria. *J. Med. Chem.* **51**, 7563–7573 (2008).
310. Bera, S., Zhanel, G. G. & Schweizer, F. Antibacterial Activities of Aminoglycoside Antibiotics-Derived Cationic Amphiphiles. Polyol-Modified Neomycin B-, Kanamycin A-, Amikacin-, and Neamine-Based Amphiphiles with Potent Broad Spectrum Antibacterial Activity. *J. Med. Chem.* **53**, 3626–3631 (2010).
311. Zimmermann, L. *et al.* Tuning the antibacterial activity of amphiphilic neamine derivatives and comparison to paromamine homologues. *J. Med. Chem.* **56**, 7691–7705 (2013).
312. Dhondikubeer, R., Bera, S., Zhanel, G. G. & Schweizer, F. Antibacterial activity of amphiphilic tobramycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **65**, 495–498 (2012).
313. Elchert, B. *et al.* Application of the synthetic aminosugars for glycodiversification: synthesis and antimicrobial studies of pyranmycin. *J. Org. Chem.* **69**, 1513–1523 (2004).

314. Udumula, V. *et al.* Investigation of antibacterial mode of action for traditional and amphiphilic aminoglycosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 1671–1675 (2013).
315. Riguet, E., Désiré, J., Bailly, C. & Décout, J.-L. A route for preparing new neamine derivatives targeting HIV-1 TAR RNA. *Tetrahedron* **60**, 8053–8064 (2004).
316. Loh, B., Grant, C. & Hancock, R. E. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 546–551 (1984).
317. Hancock, R. E., Farmer, S. W., Li, Z. S. & Poole, K. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1309–1314 (1991).
318. Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L. & Li, J. Structure—Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **53**, 1898–1916 (2010).
319. Sautrey, G. *et al.* New Amphiphilic Neamine Derivatives Active against Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Interactions with Lipopolysaccharides. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.02536-13 (2014). doi:10.1128/AAC.02536-13
320. Pristovsek, P. & Kidric, J. Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *J. Med. Chem.* **42**, 4604–4613 (1999).
321. Mingeot-Leclercq, M.-P. & Décout, J.-L. Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. *MedChemComm* **7**, 586–611 (2016).
322. Wong, C. H., Hendrix, M., Manning, D. D., ROSENBOHM, C. & Greenberg, W. A. A Library Approach to the Discovery of Small Molecules That Recognize RNA: Use of a 1,3-Hydroxyamine Motif as Core. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8319–8327 (1998).
323. Frederico, D., Brocksom, U. & Brocksom, T. J. The olefin metathesis reaction: reorganization and cyclization of organic compounds. *Quím. Nova* **28**, 692–702 (2005).
324. Schrock, R., Rocklage, S., Wengrovius, J., Rupprecht, G. & Fellmann, J. Preparation and characterization of active niobium, tantalum and tungsten metathesis catalysts. *J. Mol. Catal.* **8**, 73–83 (1980).
325. Schrock, R. R. & Hoveyda, A. H. Molybdenum and Tungsten Imido Alkylidene Complexes as Efficient Olefin-Metathesis Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 4592–4633 (2003).
326. Scholl, M., Ding, S., Lee, C. W. & Grubbs, R. H. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-Dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *Org. Lett.* **1**, 953–956 (1999).
327. Bilel, H., Hamdi, N., Zagrouba, F., Fischmeister, C. & Bruneau, C. Eugenol as a renewable feedstock for the production of polyfunctional alkenes via olefin cross-metathesis. *RSC Adv.* **2**, 9584–9589 (2012).
328. Hong, S. H., Sanders, D. P., Lee, C. W. & Grubbs, R. H. Prevention of Undesirable Isomerization during Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17160–17161 (2005).
329. Lummiss, J. A. M., Ireland, B. J., Sommers, J. M. & Fogg, D. E. Amine-Mediated Degradation in Olefin Metathesis Reactions that Employ the Second-Generation Grubbs Catalyst. *ChemCatChem* **6**, 459–463 (2014).
330. Dominique, R. *et al.* Ruthenium Carbenoids as Catalysts for Olefin Metathesis of  $\omega$ -Alkenyl Glycosides. *Methods Enzymol.* **362**, 17–28 (2003).
331. Aljarilla, A., López, J. C. & Plumet, J. Metathesis Reactions of Carbohydrates: Recent Highlights in Cross-Metathesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6123–6143 (2010).
332. Blackwell, H. E. *et al.* New Approaches to Olefin Cross-Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 58–71 (2000).
333. Kanemitsu, T. & Seeberger, P. H. Use of Olefin Cross-Metathesis to Release Azide-Containing Sugars from Solid Support. *Org. Lett.* **5**, 4541–4544 (2003).

334. Ch, R., Tyagi, M., Patil, P. R. & Ravindranathan Kartha, K. P. DABCO: an efficient promoter for the acetylation of carbohydrates and other substances under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **52**, 5841–5846 (2011).
335. Horton, D. The Anomeric 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-(2,4-dinitroanilino)-Dglucopyranoses. *J. Org. Chem.* **29**, 1776–1782 (1964).
336. Meng, F.-C. *et al.* Total Synthesis of Polyprenyl N-Glycolyl Lipid II as a Mycobacterial Transglycosylase Substrate. *Org. Lett.* **13**, 5306–5309 (2011).
337. Benakli, K., Zha, C. & Kerns, R. J. Oxazolidinone Protected 2-Amino-2-deoxy-d-glucose Derivatives as Versatile Intermediates in Stereoselective Oligosaccharide Synthesis and the Formation of  $\alpha$ -Linked Glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9461–9462 (2001).
338. Roy, R. *et al.* Transition metal catalyzed neoglycoconjugate syntheses. *Pure Appl. Chem.* **71**, 565–571 (1999).
339. Woodward, C. P., Spiccia, N. D., Jackson, W. R. & Robinson, A. J. A simple amine protection strategy for olefin metathesis reactions. *Chem. Commun.* **47**, 779–781 (2010).
340. Gololobov, Y. G. & Kasukhin, L. F. Recent advances in the staudinger reaction. *Tetrahedron* **48**, 1353–1406 (1992).
341. Bosch, I., González, A., Urpí, F. & Vilarrasa, J. On the Reaction of Acyl Chlorides and Carboxylic Anhydrides with Phosphazenes. *J. Org. Chem.* **61**, 5638–5643 (1996).
342. Ariza, X., Urpí, F. & Vilarrasa, J. A practical procedure for the preparation of carbamates from azides. *Tetrahedron Lett.* **40**, 7515–7517 (1999).
343. Goddard-Borger, E. D. & Stick, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.* **9**, 3797–3800 (2007).
344. Alper, P. B., Hung, S.-C. & Wong, C.-H. Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. *Tetrahedron Lett.* **37**, 6029–6032 (1996).
345. Nyffeler, P. T., Liang, C.-H., Koeller, K. M. & Wong, C.-H. The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10773–10778 (2002).
346. Kakaie, S., Chen, N. & Xu, J. Expedient synthesis of 1-substituted taurines with diverse functionalized side-chains. *Tetrahedron* **69**, 302–309 (2013).
347. Chaudhari, V. D., Kumar, K. S. A. & Dhavale, D. D. An efficient synthesis of D-erythro- and D-threo-sphingosine from D-glucose: olefin cross-metathesis approach. *Org. Lett.* **7**, 5805–5807 (2005).
348. von Holleben, M. L. A. & Schuch, C. M. Ativação do Peróxido de Hidrogênio para a Epoxidação de Olefinas Não-Funcionalizadas. *Quimica Nova* **20**, 58–71 (1997).
349. Wu, B. *et al.* Synthesis of linked carbohydrates and evaluation of their binding for 16S RNA by mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3915–3918 (2003).
350. Keith, D. D., Tortora, J. A. & Yang, R. J. *Org. Chem.* **43**, 3711 (1978).

# **ANEXOS**

## 1. VALORIZAÇÃO DA TESE

### 1.1. Publicações

ROCHA, T. J. M. ; **Lima, M.C.A.** ; SILVA, A. L. ; GOUVEIA, A. L. A. ; **Silva, V. B. R.** ; ALMEIDA JUNIOR, A. S. A. ; SANTOS, F. A. B. ; CARDOSO, P. R. G. ; PITTA-GALDINO, M. R. ; PITTA, I. R. ; REGO, M. J. B. M. ; ALVES, L. C. ; PITTA, M. G. R. . Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidate schistosomicidal agents. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Impresso) (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)

ZINERMAN, L. ; DAS, I. ; DESIRE, J. ; SAUTREY, G. ; SILVA, VINÍCIUS ; KHOURY, M. E. ; MINGEOT-LECLERCQ, M. ; DECOU, J. L. . New Broad-spectrum Antibacterial Amphiphilic Aminoglycosides Active Against Resistant Bacteria: From Neamine Derivatives to Smaller Neosamine Analogues. Journal of Medicinal Chemistry, v. 53, p. 9350-9369, 2016.

OLIVEIRA, JAMERSON ; SILVA, ANEKÉCIA ; JUNIOR, ANTÔNIO ; SANTIAGO, EDNA ; **OLIVEIRA, SHEILLA** ; SILVA, VINÍCIUS ; SILVA, ALINE ; BARROS, ANDREA ; PEREIRA, VALÉRIA ; PITTA, IVAN ; LIMA, MARIA . Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones. British Journal of Pharmaceutical Research, v. 7, p. 386-400, 2015.

MAGALHÃES, LAUDELINA ; ALVES, IANE ; SANTOS, EVERALDO ; **SILVA, VINÍCIUS** ; SILVA, LUIZ ; SILVA, ANEKÉCIA ; OLIVEIRA, LEIDIANE ; CRUZ, ANNE ; SILVA, BRUNO ; LEITE, LÚCIA ; ZALDINI, MARCELO ; PITTA, IVAN ; SILVA, TERESINHA ; LIMA, MARIA . Activity Anti-Inflammatory and in silico Study of New Thiazolidinedione Derivatives. British Journal of Pharmaceutical Research, v. 4, p. 1739-1752, 2014.

### 1.2. Resumos Expandidos Publicados em Anais de Congressos

MATOS-ROCHA, T. J. ; LIMA, MARIA C. A. ; **SILVA, A. L.** ; ALMEIDA JUNIOR, A. S. A. ; Rêgo, M. J. B. M. ; **PITTA, M. G. R.** ; **PITTA, I. R.** ; ALVES, L. C. ; BRAYNER, F. A. ; **PITTA, M. G. R.** . In vivo Schistosomicidal activity of (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one. In: XVIII Congresso da Federación Farmacéutica Sudamericana 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas, 2015, Rio de Janeiro - RJ. RioFarma 2015. Rio de Janeiro - RJ: RioFarma, 2015. v. 1. p. 12-12.

**SILVA, P. R.** ; SILVA, V. B. R. ; LIMA, M. C. A. ; PITTA, I. R. ; JACOB, I. T. T. ; CRUZ, M. F. P. . SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVO DERIVADO 4-TIOXO-IMIDAZOLIDIN-2-ONA. In: 65ª Reunião Anual da SBPC, 2013, Recife. Ciência para um Novo Brasil, 2012.

### 1.3. Outros Tipos de Comunicação

Novas perspectivas na Profissão Farmacêutica, 2014 (Mesa Redonda), Dia Internacional do Farmacêutico, Conselho Regional de Farmácia de Pernambuco.



---

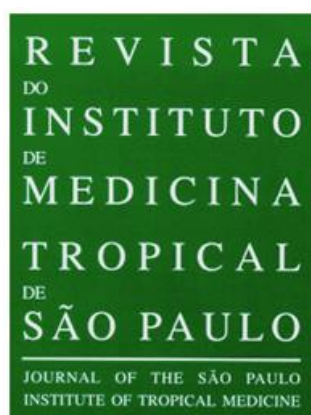
**ARTIGO (PUBLISHED)**

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL IMIDAZOLIDINE  
DERIVATIVES AS CANDIDATE SCHISTOSOMICIDAL AGENTS**

Thiago José MATOS-ROCHA, Maria do Carmo Alves de LIMA, Anekécia Lauro da SILVA,  
Allana Lemos Andrade GOUVEIA, Vinícius Barros Ribeiro da SILVA, Antônio Sérgio  
Alves de ALMEIDA JÚNIOR, Fábio André BRAYNER, Pablo Ramon Gualberto  
CARDOSO, Marina da Rocha PITTA-GALDINO, Ivan da Rocha PITTA, Moacyr Jesus  
Barreto de Melo RÊGO, Luiz Carlos ALVES and Maira Galdino da Rocha PITTA

**JOURNAL OF THE SÃO PAULO INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE**

---



## SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL IMIDAZOLIDINE DERIVATIVES AS CANDIDATE SCHISTOSOMICIDAL AGENTS

Thiago José MATOS-ROCHA (1,3,4), Maria do Carmo Alves de LIMA (2), Anekécia Lauro da SILVA (2), Jamerson Ferreira de OLIVEIRA (2), Allana Lemos Andrade GOUVEIA (2), Vinícius Barros Ribeiro da SILVA (2), Antônio Sérgio Alves de ALMEIDA JÚNIOR (2), Fábio André BRAYNER (1,3), Pablo Ramon Gualberto CARDOSO (4), Marina da Rocha PITTA-GALDINO (2), Ivan da Rocha PITTA (2), Moacyr Jesus Barreto de Melo RÊGO (4), Luiz Carlos ALVES (1,3) and Maira Galdino da Rocha PITTA (4)

(1) Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/PE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

(2) Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), Núcleo de pesquisas em inovação terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brasil.

(3) Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

(4) Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de pesquisas em inovação terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Rua Thereza Amélia s/n, Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brasil.

### SUMMARY

**Introduction:** Schistosomiasis is an infectious parasitic disease caused by trematode of the genus *Schistosoma*, which threatens at least 258 people worldwide and its control is dependent on a single drug, praziquantel. The aim of this study was to evaluate the anti-*Schistosoma mansoni* activity *in vitro* of novel imidazolidine derivatives. **Material and methods:** We synthesized three novel imidazolidines derivatives: (LPSF/PTS10) (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-dimethylaminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one and (LPSF/PTS23) (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxy-benzylidene)-imidazolidin-2-one. The structures of these compounds were determined by spectroscopic methods. During the biological assays parameters such as motility, oviposition, mortality and analysis by Scanning Electron Microscopy were evaluated. **Results:** LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 were considered to be active in the separation of coupled pairs, mortality, decrease in motor activity. In addition, LPSF/PTS23 induced ultrastructural alterations in worms, after 24 h of contact, causing extensive erosion over the entire body of the worms. **Conclusion:** The imidazolidinic derivatives which present the trimethoxy and benzylidene halogens showed promising *in vitro* schistosomicidal activity.

**KEYWORDS:** *Schistosoma mansoni*; Imidazolidines; Ultrastructure.

## INTRODUCTION

Parasitic diseases remain obstacles to socioeconomic development in poor countries. Schistosomiasis<sup>22</sup> (an infection caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*) is the second most significant parasitic disease in the world after malaria. It is a chronic and debilitating disease that continues to threaten millions of people, particularly the rural poor in the developing world<sup>42</sup>.

The major etiological agent of intestinal schistosomiasis is *Schistosoma mansoni*, and it is estimated that up to 258 million people are infected<sup>44</sup>.

The reference drug for treatment of schistosomiasis is praziquantel (PZQ) (2-cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexa-hydro-4*H*-pyrazino{2,1-*a*}isoquinoline-4-one)<sup>45</sup>. Recent reports of resistance in some strains have worried the world's public health organizations<sup>19</sup>. In this context, the identification of new and effective schistosomicidal compounds is essential<sup>31</sup>.

At present, various research groups are dedicating themselves to identifying new schistosomicidal agents obtained from natural<sup>11,21</sup> and synthetic sources<sup>8,25</sup>. The importance of heterocyclic compounds as potential agents against several parasitic diseases, caused by protozoa and helminths, is well known<sup>3</sup>.

The imidazolidines are a broad class of bioactive compounds that also have schistosomicidal properties. Niridazole, 1-(5-nitrothiazol-2yl)imidazolidin-2-one, a drug used during the last century, has been widely applied for clinical purposes<sup>35</sup> and was one of the early treatment options to be administered orally<sup>6</sup>.

Imidazolidines have antifungal, antimicrobial and leishmanicidal<sup>5</sup>, anti-*Trypanosoma cruzi*<sup>9</sup> and schistosomicidal properties<sup>1-2</sup>. The latter activity of imidazolidine derivatives has been demonstrated by *in vitro* studies with adult *S. mansoni* worms<sup>2, 30-31</sup>. However, as for PZQ, the mechanism of action of the imidazolidines has not yet been fully elucidated<sup>31</sup>.

The molecular modification of imidazolidines by bioisosteric replacement produces a biological response. This study evaluated the biological activity of imidazolidine derivatives with different substituent groups by determining their *in vitro* activity against adult worms of *S. mansoni*<sup>1-2,31</sup>.

Two novel imidazolidinic compounds (LPSF/PTS10) (*Z*)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-dimethyl aminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one and (LPSF/PTS23) (*Z*)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one, were tested by an *in vitro* activity evaluation and an ultrastructural investigation of the parasite, and by analyzing the cytotoxicity of the tested compound against PBMCs.

## MATERIALS AND METHODS

**Compounds:** The compounds (LPSF/PTS10)-(*Z*)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-dimethyl aminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one and (LPSF/PTS23)-(*Z*)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one were obtained from Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos at Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) and their identities verified by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance of hydrogen (<sup>1</sup>H NMR), infrared (IR) and mass spectroscopy (MS).

The scheme 1 displays the synthetic route of the three derivatives. The starting reagent was imidazolidine-2,4-dione (1) which was reacted with 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride under basic conditions to obtain the intermediate 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidine-2,4-dione as

previously described (2)<sup>36</sup>. After that, the reaction of 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidine-2,4-dione (2) with Lawesson's reagent in anhydrous dioxane gave the compound 1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (3) according to the protocol used by Gouveia et al<sup>14</sup>. The reaction mixture was heated under reflux for 24 hours. Confirmation of the reaction was done by mass spectrometry where it was shown that the compound 2  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> = 243.035 became the compound 3  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> = 259.013 by changing the oxygen atom in the sulfur in the structure. Then 2-cyano-3-phenyl-acrylic acid ethyl esters derivatives were synthesized through Knoevenagel condensation between 4-dimethylaminobenzaldehyde or 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde and ethyl cyanoacetate<sup>20</sup>. A Michael-type addition was then performed by reacting the ester derivatives with the intermediate 1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (3) to form the final compounds (LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23).

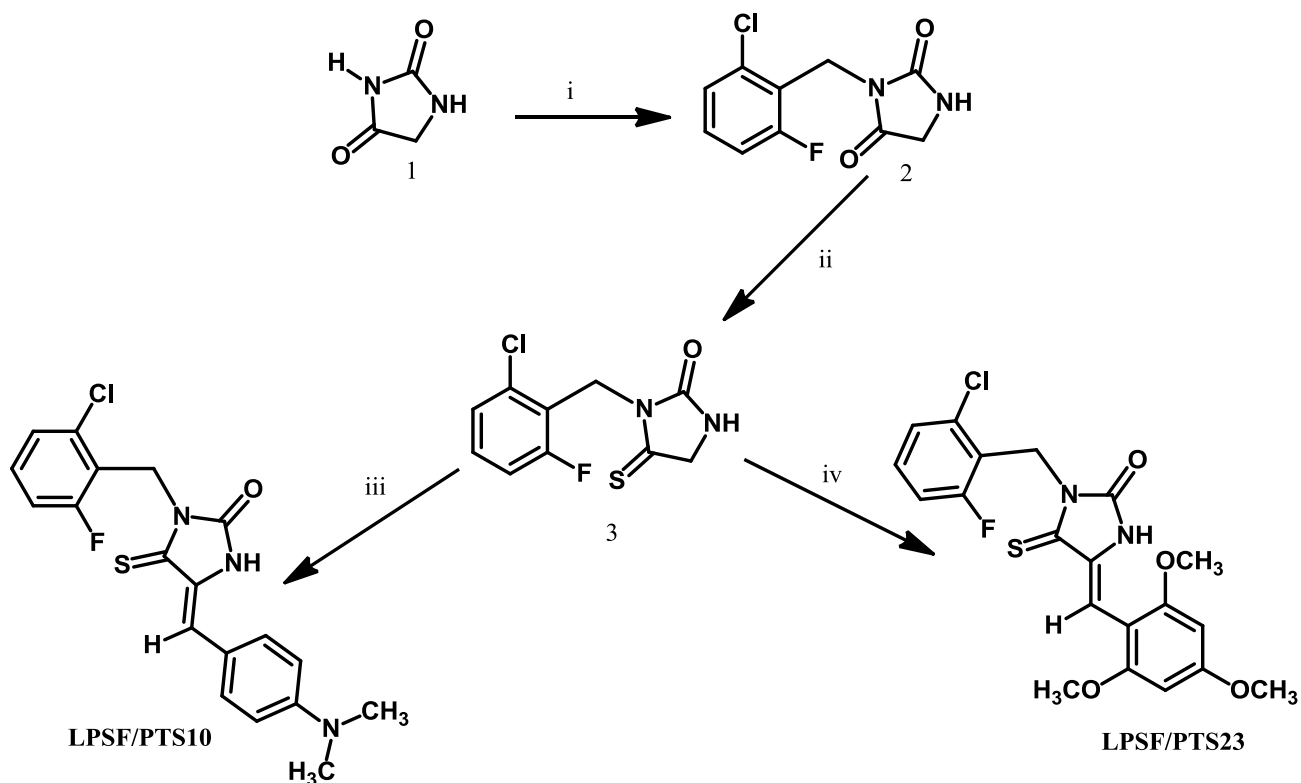
Reactions were monitored with analytical thin-layer chromatography in silica gel 60 F254 plates and visualized under UV light (254nm). Melting points were determined on a Quimis 340 capillary melting point apparatus and were not corrected. Infrared spectra were recorded as KBr discs using a BRUKER (IFS66) infrared spectrophotometer. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded in a VMRS 300 MHz and 400 MHz VARIAN spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard and DMSO-*d*<sub>6</sub> as the solvent.

Chemical shifts ( $\delta$ , ppm) were assigned according to the internal standard signal of TMS in DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$ , ppm). Coupling constants ( $J$ ) are reported in Hz. <sup>1</sup>H NMR spectra are reported in the following order: chemical shift, multiplicity, number and type of proton and coupling constant(s). Mass spectra with MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Laser Nd: YAG, 355 nm. Freq. laser: 100 Hz. The derivatives (LPSF/PTS24; LPSF/PTS10; LPSF/PTS23) were isolated as a single isomer. X-ray crystallographic studies and <sup>13</sup>C NMR have demonstrated a preferred *Z* configuration for 5-benzylidene-thiazolidinones<sup>12, 15-16, 35,37</sup>.

The presence of the arylidene proton peak in <sup>1</sup>H NMR for the synthesized derivatives (LPSF/PTS10; LPSF/PTS23) confirmed the completion of the nucleophilic addition reaction. The compounds were also confirmed by MS data in negative mode.

The IR spectrum of the compound showed characteristic peaks of the thiocarbonyl group and arylidene, confirming the formation of 5-thioxoimidazolidin-2-one derivatives. For the preparation of compounds, equimolar amounts of 1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (3) (200mg) and 2-cyano-3-phenylacrylic acid ethyl ester (165 mg) were reacted using absolute ethanol (8 mL) as the solvent and morpholine (1 mL) as the catalyst.

The reaction mixture was heated to 50 °C for 8 hours and then cooled to room temperature. The solid that precipitated out was filtered under vacuum and washed with water and absolute ethanol.



**Scheme 1** - Reagents and conditions: (i) 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride; CH<sub>3</sub>OH, NaOH, 60° C (ii) Lawesson's reagent, 90 °C (iii) 2-cyano-3-(4-dimethylaminephenyl)acrylic acid ethyl ester, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 50 °C; (iv) 2-cyano-3-(2,4,6-trimethoxy-phenyl)acrylic acid ethyl ester, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 50 °C.

**Ethical approval:** Ethics approval was obtained from ethical committee from Health Science Center of Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (protocols 483/10 and 57/10 respectively). All experiments were authorized by the Committee for Ethics in Animal Care of Foundation Oswaldo Cruz, in accordance with nationally and internationally accepted principles for laboratory animal use and care (CEUA/FIOCRUZ), approval number: 06/2010.

**Determination of cytotoxicity:** Peripheral blood mononuclear cells were obtained from heparinized blood from healthy, nonsmoking donors who had not taken any medication for at least 15 days prior to sample collection (10 volunteers), and the cells were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll Hypaque solution (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were used only when the viability was at least 98 %. All donors gave informed consent, and the study was approved by the Human Research Ethics Committee of UFPE in the Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE N0 483/10 and 57/10). Cells were plated in 96-well plates (10<sup>6</sup> cells/well). After 24 h, the test compound was added (1, 10 and 100 μM) in triplicate wells the cells were incubated for 48 h and then subjected to the MTT assay.

Cytotoxicity was quantified by the ability of living cells to reduce the tetrazolium dye MTT to formazan, a purple compound. At the end of incubation wells were centrifuged, and the medium was replaced by medium without compound (150 μL) containing MTT (0.5 mg/mL). Three hours later the

MTT formazan was diluted with 100  $\mu\text{L}$  of 20% SDS, and its absorbance was measured at 570 nm in a BioTek EL808. Cytotoxic activity was quantified as the percentage reduction in absorbance relative to a vehicle treated control. In all analyzed experiments, the vehicle (DMSO 0.1%) treated group presented >98% viability compared to control cells without vehicle in three independent assays<sup>32</sup>.

### Antischistosomal evaluation criteria

**Parasites:** *S. mansoni* (LE strain) worms were maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and *Swiss webster* mice hosts at the Schistosomiasis Laboratory of the Department of Parasitology, Oswaldo Cruz Institute, (Pernambuco, Brazil). Female mice weighing 28-30g were each exposed to around 120 cercariae.

**Mice infection.** Mice were infected by the tail immersion method. Briefly, mice were individually placed in a mouse-holding chamber with their tails outside the chambers. After cleaning with dechlorinated tap water, the tail was inserted into a vial containing 120 cercariae in 2 mL dechlorinated tap water. Mice were left in contact with the infective cercariae for 2 h, and then removed from the chamber, and their tails were allowed to dry. After 8 weeks, adults *S. mansoni* worms were recovered from the mice by perfusion with RPMI 1640 medium supplemented with heparin. The worms were washed in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of streptomycin, 100  $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$  of penicillin (Invitrogen), and 25 mM of Hepes. Two pairs of adult worms (male and female) were incubated in a 24-well culture plate (Techno Plastic Products, TPP) containing 2 mL of the same medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere, in three independent assays<sup>17</sup>.

**In vitro viability and motility assay with *S. mansoni*.** For the *in vitro* test with *S. mansoni*, LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 imidazolidine derivatives were the compounds rather dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO in the culture medium was a maximum of 1.6% dimethyl sulphoxide (DMSO) and used in concentrations varying from 5 to 100  $\mu\text{M}$ , which were added to the medium containing the worms after a period of 2 h of adaptation to the culture medium. In the positive control group the adult worms of *S. mansoni* were incubated in the presence of PZQ, triplicates were carried out for each concentration used.

An inverted microscope and a stereomicroscope were used to evaluate the motility and survival of worms monitored at 24, 48, 72, 96 and 120 h of incubation. Motility and survival of worms were assessed according to the criteria scored in a viability scale of 0-3. The scoring system was as follows: 3, complete body movement; 1.5, partial body movement or immobile but alive; and 0, dead, at least three independent assays<sup>13</sup>. Changes in the pairing and egg production, were also evaluated using an inverted microscope.

The parasites were kept for 5 days and monitored every 24 h to evaluate their general condition: motor activity, alterations in the tegument, and mortality rate. The control worms were treated with 1.6% DMSO in an RPMI 1640 medium<sup>18</sup>.

**Scanning Electron Microscopy (SEM):** The worms were incubated for 24 h and, after their death, they were washed with sodium cacodylate buffer (pH = 7.2), fixed with 2.5% glutaraldehyde (pH = 7.4) during 24 h, and then fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h. The samples were dehydrated by an increasing amount of ethanol solution, dried in a critical point dryer, and then mounted on stubs and coated with gold using a sputter coater. The material was examined under a JEOL - 5600 LV microscope.

## RESULTS

**Compound:** (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-(dimethylaminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PTS10): The product was an orange solid. Formula: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ClFN<sub>3</sub>OS; M.W.: 389.8742 g/moles; Yield: 45%; Melting point: 269 – 270° C; R<sub>f</sub>: 0.55 (*n*-hexane/AcOEt 6:4); <sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 3.00 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-N); 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.72 (d, 2H, H-Ar, J= 9.2 Hz); 7.57 (d, 2H, H-Ar, J= 8.8 Hz); 6.95 (s, 1H, HC=); 7.33 (m, 2H, CH-Ar, benzyl); 7.17 (t, 1H, CH-Ar, benzyl, J= 8.8 Hz); 11.00 (s, 1H, NH). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3226.68; 1725.22; 1588.95; 1531.52. MS [M+H]<sup>+</sup>: calculated= 390.07; found= 390.00.

(Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one (LPSF/PTS23): The product was an orange solid. Formula: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S; M.W.: 436.8843 g/moles; Yield: 55%; Melting point: 152-153° C; R<sub>f</sub>: 0.40 (*n*-hexane/AcOEt 6:4); <sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 3.80 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.26 (s, 2H, CH-Ar); 6.99 (s, 1H, CH=); 7.18 (t, 1H, CH-benzyl, J= 8.1 Hz); 7.34 (m, 2H, CH- benzyl); 10.08 (s, 1H, NH). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3413.59; 1747.92; 1598.88; 1510.63. MS [M+H]<sup>+</sup>: calculated= 437.06; found= 437.00.

**Schistosomicidal activity:** Imidazolidine composites have previously shown action against *S. mansoni* adult worms<sup>1-2, 23-25, 34</sup>.

Initially, we performed cell viability tests with the newly synthesized imidazolidine derivatives using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Our results show that compounds LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23, present no toxic effects at different concentrations ranging from 5–100 μM (Table 1).

These compounds were then evaluated for their effects on adult schistosomes at a concentration of 5 to 100 μM every 24 h for a period of 120 h, and mortality, motility, and alterations in the tegument of the worms were observed (Table 1). PZQ was used as the reference schistosomicidal drug.

In order to evaluate the pairing and egg production by adult worms of *S. mansoni*, the LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 were tested at concentrations which cause separation of coupled adult worms and inhibition in the egg production after 120 h of incubation.

LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 all demonstrated lethality against adult worms of *S. mansoni*, whereas no mortality was observed for worms incubated in medium alone or in the presence of DMSO. LPSF/PTS10 was more effective, causing 100% mortality after 72 h at 20 μM. The most effective compound was LPSF/PTS23, which caused 100% mortality after 24 h at a concentration of 20 μM, and some mortality at 5 μM after 120 h incubation.

In these experiments PZQ induced 100% mortality of adult worms after 24 h of incubation at all concentrations used, down to 5 μM.

Analysis of the effects of the compounds on worm motility allowed the detection of their action at sub-lethal concentrations (Table 2). During the complete observation period (up to 120 h) the negative control group displayed peristaltic movements and characteristic waves throughout the whole body, with suckers in constant movement and occasionally adhering to the bottom of the culture plate (score = 3). PZQ caused loss of motility in worms at all concentrations used and as early as 24 h after the start of incubation leaving them shortened, this effect persisted and became stronger with the passing of time (score=0).

After 24 h of exposure to LPSF/PTS23 and 48 h to LPSF/PTS10 at concentration of 100 μM, 100% of the worms has lost movement completely, being then considered dead (score = 0).

LPSF/PTS10 at the concentration of 5  $\mu$ M, did not alter the motility of *S. mansoni* during the observation period. However, a reduced motility was observed for 50% of worms after 24 h of incubation at 20  $\mu$ M and 75% were dead after 48 h incubation at this concentration. In the case of LPSF/PTS23, its effects on the worms were far more radical and it was therefore not possible to detect early effects on motility at the drug concentrations used. At 5  $\mu$ M this compound caused a reduction in motility (score 1.5) in 50% of the worms and 25% were dead.

Observations of worm morphology using SEM showed that in the controls, the parasite tegument was observed with oral and ventral suckers, and tubercles and spines in normal state at 120 h of incubation, (Fig. 1A-B). Severe damage of the tegument was observed in worms incubated with PZQ, characterized by a contraction and rupture of blisters. The emergence of several holes in the place where the blisters had been located, and loss of spines was also seen (Fig. 1C).

The ultrastructural changes in adult schistosomes caused by LPSFPTS23 were characterized by extensive erosion over the entire body of the worms (Fig. 1D); After 48 h, multiple bubbles and projections (arrows) emerging from the interior of damaged tubercles (Fig. 1E); After 72 h, tegument erosion can be visualized at higher magnification (Fig. 1F); After 96 h, some tubercles lack their spines (arrow) (Fig. 1G).

## DISCUSSION

Schistosomiasis is a neglected disease that has one drug of choice, PZQ<sup>3-5</sup>. Because of this, the Special Program for Research and Training in Tropical Diseases promoted by WHO provides opportunities for studies in the development of new anti-*Schistosoma* drugs<sup>6-8</sup> and encourages worldwide synthesis of new compounds for these neglected diseases<sup>10</sup>.

Imidazolidine derivatives have previously been investigated for their anti-parasitic activity<sup>1, 23-25, 34</sup>. The main activities assigned to imidazolidines are antibacterial and anti-*L. amazonensis*<sup>5</sup>, anti-*T. cruzi*<sup>6</sup> and anti-*S. mansoni*<sup>1-2, 23-25,34</sup>. Among the various schistosomicidal compounds already tested, imidazolidine derivatives have *in vitro* and *in vivo* efficacy in several studies, giving promising results when compared to PZQ, the only drug currently available for the treatment of schistosomiasis<sup>23-25,29,30,34,43</sup>.

The imidazolidine derivatives used in this study, LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 showed no cytotoxicity up to 100  $\mu$ M on PBMCs. LPSF/PTS23 exhibited the best schistosomicidal properties in relation to other compounds, with 100% mortality within 24 h at concentrations of 20–100  $\mu$ M and marked effects on motility and viability after 120 h at 5  $\mu$ M. These results suggest that the efficacy varies according to the substituent in the 4-position of the imidazolidine group. The compound LPSF/PTS23 has a methoxyl group attached in the 2,4,6-position of the imidazoline ring. In a recent study it was also shown that heterocyclic compounds (thiosemicarbazones) containing a methoxyl group exhibited higher schistosomicidal activity than compounds without this group<sup>33</sup>.

All adult worm couples were separated into individual males and females after incubation with 20, 40 or 100  $\mu$ M of compounds LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23. Oviposition by adult worms was also not observed at any concentration of these imidazolidines (not shown) while in the control group (untreated worms) oviposition was observed and the worms remained viable during the entire observation period. These same physiological alterations seen here were observed in adult worms treated with imidazolidine derivatives in other studies realized by our group (Silva et al.<sup>34</sup>). For example, similar results were achieved by Neves et al.<sup>24</sup> and Neves et al.<sup>25</sup> using 1-(4-chlorobenzyl)-



4-[(4-fluorophenyl)hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PT11) and 5-(4-fluorobenzylidene)-3-(4-nitrobenzyl)-4-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/RSZ05).

The tegument of *S. mansoni* is an important structure involved in the absorption of nutrients, in secretion of some products, variety of movements, including rapid shortening and extension of the body, typical wavy and peristaltic movement along the body anterior and posterior axis<sup>39</sup>. Therefore, the worm's tegument is the critical target for imidazolidine derivatives, as it has been other schistosomicidal activity drugs studied<sup>1-2,23-25, 34</sup>.

To test this hypothesis, we first established the concentration of LPSF/PTS23 that is capable of altering worm motility, causing death of worms in the period of a 120 h exposure *in vitro*. Based on these criteria, through SEM, we observed marked changes in the surface of the tegument of *S. mansoni* adult worms including extensive erosion and the emergence of bubbles and projections<sup>2</sup>. Thus, we contribute, along with other studies, to the demonstration that imidazolidine derivatives induce surface membrane damage to adult worms of *S. mansoni*<sup>27, 31, 34</sup>.

However, despite their effect on motor activity, the exact mechanisms by which LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 cause mortality in adult worms remain unclear.

One possible clue is provided by the fact that, some imidazolidine derivatives show toxicity to cells<sup>23-25, 34</sup>. There is evidence that these compounds act on cholinergic receptors<sup>38, 41</sup>.

Silva et al.<sup>34</sup> evaluated the schistosomicidal potential of the imidazolidinic derivative 3 (5Z)-3-(4-bromobenzyl)-5-(4-chlorobenzylidene)-4-thioxoimidazolidin-2-one. After 24 hours of incubation at a dose of 100µg.mL<sup>-1</sup>, adult *S. mansoni* worms had a significant opening of the gynecophoral canal, contraction of the head and suckers, collapse of the tubercle with erosion of the tegument and a severe lesion revealing the layer of subtegument tissue. In this case, there was an enormous destruction of the subtegument surface.

Acetylcholinesterase is also found on the tegumental surface of the worm and has the function of obtaining glucose<sup>4</sup>, but there is already evidence showing that this contraction is due to calcium influx which also causes contraction of the muscle fibers. Since this enzyme is inhibited, the absorption of nutrients for the survival of the parasite may be compromised<sup>26</sup>. Imidazolidinic compounds such as (Z)-3-(4-chlorobenzyl)-5-(4-nitrobenzylidene)imidazolidine-2,4-dione, (Z)-3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-fluorobenzylidene)-1-methyl-2-thioxoimidazolidin-4-one and (Z)-5-(4-fluorobenzylidene)-1-methyl-3-(4-phenylbenzyl)-2-thioxoimidazolidin-4-one induced significant changes in the tegumental surface of the body of adult *S. mansoni* worms, causing damage in the tegument with contraction of the body and of oral and ventral suckers, disorganization and total collapse of the tubercles with loss of spines. Thus, the nitro, fluorine and phenyl radicals can justify the good activity of the imidazolidine derivatives mentioned above<sup>28,37</sup>.

In addition, promising results were also obtained with other imidazolidine derivatives presenting chlorine and fluorine radicals in their structure, which were also able to cause ultrastructural changes in the tegument of adult worms of *S. mansoni*, such as the derivatives 1-benzyl-4-[(4-chlorophenyl)hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one and 1-(4-chlorobenzyl)-4-[(4-fluorophenyl)hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one<sup>1-3</sup>.

Furthermore, Neves et al.<sup>25</sup> showed disruption to the tegument, blisters, spine loss and tissue wrinkling after contact with LPSF/PT5 and blisters and swelling of the tegument and loss of a few spines in the tubercles after incubation with LPSF/PT11.

Thus, in these cases the presence of nitro, fluorine and phenyl radicals could explain the high activity of the imidazolidine derivatives<sup>27</sup> one explanation may be that halogens have the ability to enhance the

absorption of the derivatives by the cell membranes<sup>40</sup>. Thus, this may be the case in the tegumental surface of the parasite treated with the above compounds as well as compounds used in the present study which all present the halogens in their chemical structures.

Our study reinforced the use of imidazoline derivatives as drug anti-*S. mansoni*, and identified LPSF/PTS23 as a lead candidate for further optimization as a potential agent against *S. mansoni*.

## CONCLUSION

In conclusion, the imidazolidinic derivatives which presents the trimethoxy and benzyldiene halogens showed a promising *in vitro* schistosomicidal activity. This is the first time that the *in vitro* schistosomicidal activity was reported for LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23. Thus, it is necessary to investigate the elucidation of the mechanism of action of this compound as well as to invest in further studies to investigate its biological activity such as an *in vivo* evaluation.

## ACKNOWLEDGMENTS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ/PE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

## COMPETING INTERESTS

The authors have declared that no competing interests exist.

## CONSENT (WHERE EVER APPLICABLE)

The present study did not involve patients.

## ETHICAL APPROVAL (WHERE EVER APPLICABLE)

All authors hereby declare that "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23, revised 1985) were followed, as well as the ethical principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was approved by the Animal Ethics Committee from Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) and authorized by the license no. 06/2010.

**Síntese e avaliação biológica de novos derivados imidazolidínicos candidatos a agentes esquistossomicidas**

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada pelos trematódeos do gênero *Schistosoma*, que ameaça quase 258 milhões de pessoas no mundo e seu controle é dependente de uma única droga, o praziquantel. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*Schistosoma mansoni* *in vitro* novos derivados de imidazolidina. Nós sintetizamos dois novos derivados de imidazolidina: (LPSF/PTS10) (Z) -1- (2-cloro-6-fluoro-benzil) -4- (4- dimetil aminobenzilideno) -5-tioxo-imidazolidin-2-ona e (LPSF/PTS23) (Z) -1- (2-cloro-6-fluoro-benzil) -5-tioxo-4- (2,4,6-trimetoxi-benzilideno)-imidazolidin-2-ona. As estruturas destes compostos foram determinadas por meio de métodos espectroscópicos. Durante os ensaios, parâmetros como a motilidade, oviposição, mortalidade e análise de microscopia eletrônica de varredura foram avaliados. LPSF/PTS10 e LPSF/PTS23 foram considerados ativos na separação ativa de pares acoplados, mortalidade e diminuição da atividade motora, enquanto LPSF/PTS24 só causou mortalidade de vermes após 120 h de incubação. Além disso, LPSF/PTS23 induziu alterações ultraestruturais em vermes, após 24 h de contato, causando erosão extensiva ao longo de todo o corpo dos vermes. Os derivados imidazolidínicos que apresentam os halogênios trimetoxi e benzilideno mostraram uma promissora atividade esquistossomicida *in vitro*.

## REFERENCES

1. Albuquerque MCA, Silva TG, Pitta MGR, Silva ACA, Silva PG, Malagueño, E, Santana JV, Wanderley AG, Lima MCA, Galdino SL, Barbe J, Pitta IR. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxoimidazolidine compounds. *Pharmazie*. 2005; 60: 13-7.
2. Albuquerque MCA, Pitta MGR, Irmão JI, Malagueño, E, Santana JV, Lima MCA, Galdino SL, Pitta IR. Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives.. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2007; 26: 65-69.
3. Brandão SSF, Andrade AMC, Pereira DTM, Barbosa-Filho JM, Lima MCA, Galdino SL, Pitta IR, Barbe J. A novel way of synthesis of 1,3,5-trisubstituted-2-thioxoimidazolidinones. *Heterocycl Comm*. 2004; 10: 9-14.
4. Camacho M, Tarrab-Hazdai R, Espinoza B, Arnon R, Agnew A. The amount of acetylcholinesterase on the parasite surface reflects the differential sensitivity of schistosome species to metrifonate. *Parasitology*. 1994; 108:153-60.
5. Carvalho GS, Dias RM, Pavan FR, Leite CQ, Silva VL, Diniz CG, Paula DT, Coimbra ES, Retailleau P, Silva AD. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antileishmanial activities of imidazolidine and hexahydropyrimidine derivatives. *Med Chem*. 2013; 9: 351-9.
6. Caterina MC, Perillo IA, Boiani L, Pezaroglo H, Cerecetto H, González M. Imidazolidines as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16: 2226-34.
7. Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S. "Antischistosomal drugs: past, present ... and future?" *Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 68: 35-85.
8. Cowan N, Yaremenko IA, Krylov IB, Terent'ev AO, Keiser J. ***Elucidation of the in vitro and in vivo activities of bridged 1,2,4-trioxolanes, bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, tricyclic monoperoxides, silyl peroxides, and hydroxylamine***

- derivatives against Schistosoma mansoni.*** Bioorg Med Chem. 2015; 15;23(16):5175-81.
9. Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. Química Nova. 2009; 15: 2444-57.
  10. Dubois F, Caby S, Oger F, Cosseau C, Capron M, Grunau C, Dissous C, Pierce RJ. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol. 2009; 168: 7-15.
  11. Fabri RL, Aragão DM, Florêncio JR, Pinto Nde C, Mattos AC, Coelho PM, Castañon MC, Vasconcelos EG, Pinto Pde F, Scio E. Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. Biomed Res Int. 2014; 2014:9413-8.
  12. Handzlik J, Szymanska E, Wojcik R, Dela A, Jastrzebska-Wiesek M, Karolak-Wojciechowska J, Fruzinski A, Siwek A, Filipek B, Kiec-Kononowicz K. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with  $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonistic properties. Bioorg Med Chem. 2012; 20: 4245-7.
  13. Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. Vet Parasitol. 2005; 129: 83-7.
  14. Gouveia FL, Oliveira RMB, Oliveira TB, Silva IM, Nascimento SC, Sena KXFR, Albuquerque JFC. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. Eur J Med Chem. 2009; 44: 2038-43.
  15. Guarda VLM, Pereira MA, De Simone CA, Albuquerque JC, Galdino SL, Chantegrel J, Perrissin M, Beney C, Thomasson F, Pitta IR, Luu-Duc C. Synthesis and structural study of arylidene thiazolidine and benzothiazine compounds. Sulfur Letters. 2003; 26: 17-27.
  16. Karolak-Wojciechowska J, Szymanska E, Mrozek A, Kiec-Kononowicz K. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-amino-imidazol-4-ones. J Mol Struct. 2009; 930: 126-34.
  17. Lima CM, Freitas FI, Morais LC, Cavalcanti MG, Silva LF, Padilha RJ, Barbosa CG, Santos FA, Alves LC, Diniz MF. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. Rev Soc Bras Med Trop. 2011, 44, 327.
  18. Matos-Rocha TJ, Cavalcanti MGS, Barbosa-Filho JM, Lúcio AS, Veras DL, Feitosa AP, Siqueira Júnior JP, Almeida RN, Marques MO, Alves LC, Brayner FA. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. Planta Med. 2013; 79: 1307-12.
  19. Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, Mutuku MW, Karanja DM, Colley DG, Black CL. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PloS Negl Trop Dis. 2009; 3: e504.
  20. Mourão RH, Silva TG, Soares ALM, Vieira ES, Santos JN, Lima MCA, Lima VLM, Galdino SL, Barbe J, Pitta IR. Eur. J. Med. Chem. 2005, 40, 1129. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. Eur J Med Chem. 2005; 40: 1129-33.

21. Moraes J, Carvalho AA, Nakano E, Almeida AA, Marques TH, Andrade LN, Freitas RM, Sousa DP. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2013; 112: 603-10.
22. Nascimento GL, Oliveira MR. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014; 108: 29-36.
23. Neves JKAL, Sarinho S, Melo CML, Pereira VRA, Lima MCA, Pitta IR, Albuquerque MCP, Galdino SL. Immunological studies and *in vitro* schistosomicide action of new imidazolidine derivatives. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2011; 17: 277-86.
24. Neves JK, Botelho SP, Melo CM, Pereira VR, Lima MCA, Pitta IR, Albuquerque MCP, Galdino SL. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2010; 107: 531-8.
25. Neves JK, Lima MCA, Pereira VR, Melo CM, Peixoto CA, Pitta IR, Albuquerque MC, Galdino SL. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. Exp Parasitol. 2011; 128: 82-90.
26. Noel, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma interdisciplinária vision. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008; 207-44.
27. Oliveira SM, Albuquerque MCP, Pitta MGR, Malagueño E, Santana JV, Lima MCA, Pitta IR, Galdino SL. A Resposta do *Schistosoma mansoni* Mantido *In Vitro* frente a Derivados Imidazolidinônicos. Acta Farm Bonaerense. 2004; 3: 343-8.
28. Paula FR, Serrano SHP, Tavares LC Aspects of bioactivity and toxicity of nitrocompounds. New Quim. 2009; 32: 1013-20.
29. Pica-Mattocchia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. Int J Parasitol. 2004; 34: 527-33.
30. Pitta IR, Lima MCA, Albuquerque MCP, Galdino SL. Braz. Patent PI, PI-0305000-9, 2005; 25.
31. Pitta MGR, Pitta MGR, Rêgo MJB, Galdino SL. The evolution of drugs on schistosoma treatment: looking to the past to improve the future. Mini Rev Med Chem. 2013; 13: 493-508.
32. Rêgo MJB, Galdino-Pitta MR, Pereira DTM, Silva JC, Rabello MM, Lima MCA, Hernandez MZ, Pitta IR, Galdino SL, Pitta MGR. Synthesis, *in vitro* anticancer activity and *in silico* study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. Med Chem Res. 2014; 23: 3220-6.
33. Santiago EF, Oliveira SA, Oliveira GB, Moreira DR, Gomes PA, Silva AL, Barros AF, Silva AC, Santos TA, Pereira VR, Gonçalves GG, Brayner FA, Alves LC, Wanderley AG, Leite AC. Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. Antimicrob Agents Chemother. 2014, 58, 352-63.
34. Silva AL, Oliveira SA, Oliveira JF, Santiago EF, Almeida Júnior ASA, Jacobi ITT, Peixoto CA, Rocha VPC, Soares MBP, Pitta IR, Lima MCA. Tegumental Changes in Adult *Schistosoma mansoni* Induced by a New Imidazolidinic Derivative. Brit J Pharm Res. 2014; 4: 1988-2005.
35. Simone CA, Zukerman-Schpector J, Pereira MA, Luu-Duc C, Pitta IR, Galdino SL, Amorim ELC. 3-(4-Bromobenzyl)-5-(4-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. Acta Crystallog. 1995; 2620-1.

36. Sudo RT, Calasans-Maia JA, Galdino SL, Lima MCA, Zapata-Sudo, G, Hernandez MZ, Pitta IR. Interaction of Morphine With a New  $\alpha$ 2-Adrenoceptor Agonist in Mice. *J Pain*. 2010; 11: 71-78.
37. Tan F, Ang KP, Fong YF. (Z)- and (E)-5-arylmethylenhydantoin: spectroscopic properties and configuration assignment *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*. 1986; 12: 1941-4.
38. Tallima H, Ridi R. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29: 570-5.
39. Taman A, Ribeiro P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Mol Biochem Parasitol*. 2011; 176:42-50.
40. Thomas G. Medicinal chemistry: an introduction. Editora Guanabara Koogan; 2003.
41. Thibaut JPB, Monteiro LM, Leite LCC, Menezes CMS, Lima LM, Noel F. The effects of 3-methylclonazepam on *Schistosoma mansoni* musculature are not mediated by benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2009; 606: 9-16.
42. Vimieiro AC, Araujo N, Katz N, Kusel JR, Coelho PM. Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108: 881-6.
43. Werbel LM, Elslager EF, Islip PJ, Closier MD. Antischistosomal effects of 5-(2,4,5-trichlorophenyl)hydantoin and related compounds. *J Med Chem*. 1977; 20:1569-72.
44. World Health Organization. *Wkly. Epidemiol. Rec*. 2016, 86, 73.
45. World Health Organization. WHO Geneva Fact Sheet, 2012,115.

## Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Dérivés Imidazoliniques, Thiazoliniques et d'Aminosucre

### RESUME

La situation épidémiologique des maladies infectieuses et parasitaires a eu un impact considérable sur de nombreux changements globaux importants. Ce type de maladies offre continuellement, encore aujourd'hui, de nouveaux défis à la recherche scientifique ; on peut notamment citer l'épidémie du virus ebola, responsable de plus de 11 000 morts en 2015, l'émergence du virus zika au Brésil, les cas de schistosomiase en Corse en 2014, en plus des différents cas d'exposition des patients dans les zones endémiques des pays tropicaux. L'émergence rapide de nombreuses épidémies est notamment due à certains changements sociaux observés au niveau global depuis quelques décennies, caractérisés entre autre par une urbanisation rapide et une communication facilitée entre les continents. Ces différents facteurs ont par conséquent contribué à la conception du profil épidémiologique des maladies infectieuses et parasitaires dans le monde entier. Parmi ces maladies, la schistosomiase est une maladie parasitaire grave causée par trématode *Schistosoma mansoni*. Actuellement, le praziquantel (PZQ) est le seul médicament capable de traiter toutes les différentes formes de la schistosomiase. Néanmoins, une nouvelle classe de molécule, les imidazolidines, hétérocycles pentagonaux possédants diverses activités biologiques, se sont également révélés actifs contre les *Schistosoma*. Le premier objectif de cette étude sera donc de déterminer l'activité schistosomicide de nouveaux dérivés thioxo-imidazolidiniques. Dans ce contexte, 24 nouveaux composés 5-arylidène-3-(2-chloro,6-fluoro)-benzyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one (PTS) ont été obtenus. Après analyse en composantes principales (ACP), les 11 dérivés les plus (dis)-similaires ont été évalués biologiquement. L'un d'eux, le dérivé indole-imidazolidine LPSF-PTS-14, a montré des résultats supérieurs à la PZQ. En effet, la mort de 100% des vers a été observée après 24 heures à une concentration de 5 µg/ml de ce composé, ainsi qu'une cytotoxicité inférieure à 5 µg/ml pour des cellules humaines. Ces résultats ont stimulé le développement d'un modèle de pharmacophore en utilisant le logiciel FLAP. Une évaluation sur le mode d'action de la molécule, ainsi que le développement d'un modèle de prédiction sur la cytotoxicité de ces composés, ont également été développés. Le deuxième objectif portait sur la réalisation d'une étude bibliographique sur le PZQ, permettant d'amener une proposition de modèle sur la relation structure-activité entre les composés chimiques actifs et leur activité biologique. Ensuite, dans une partie qui présente des travaux encore en cours, a été abordé un modèle de pharmacophore et de prédiction d'activité par les méthodes chimiométriques. En ce qui concerne l'infection bactérienne, l'apparition de super bactéries comme par exemple une souche d'*Escherichia coli* résistante à tous les antibiotiques disponibles, a recentré l'attention sur le développement de nouveaux antibiotiques. Les aminoglycosides, comme la neamine, sont une famille de molécules d'origine naturelle ou semi-synthétique, efficaces contre les bactéries Gram (+) et Gram (-). Le dernier objectif de cette thèse était donc de réaliser la synthèse d'analogues de Neamina, un aminoglycosides, à partir de la N-acétyl-D-glucosamine par l'utilisation de réactions de métathèse. Bien que la synthèse de ces composés n'ai pas pu être menée jusqu'au bout, des progrès importants ont été réalisés sur les voies de synthèse proposées et certains intermédiaires clés ont été obtenus. Une évaluation de la compatibilité de certains groupes protecteurs avec les conditions de métathèse utilisées a également été réalisée, permettant ainsi de proposer une nouvelle voie de synthèse, entamée dans ce travail, mais qui devra être achevée par la suite.

**Mots-clés:** maladies infectieuses et parasitaires, schistosomiase, résistance bactérienne, imidazolidine, praziquantel, aminoglycosides, réaction de métathèse.

### Synthesis and biological evaluation of novel imidazolinic, thiazolinic derivatives and aminosugars

#### SUMMARY

The epidemiological situation of infectious and parasitic diseases has presented significant changes worldwide. This group of diseases continues to pose challenges to prevention programs, such as the ebola virus epidemic, which is responsible for more than 11,000 deaths in 2015, the emergence of the zika virus in Brazil, the cases of schistosomiasis in the region of Corsica, France, in 2014, not including the exposure of patients to endemic areas in tropical countries. This scenario reflects the social transformations that have occurred in the last decades, characterized by accelerated urbanization, communication between continents, among other factors that contributed to the delineation of the current epidemiological profile of infectious and parasitic diseases worldwide. *Schistosomiasis mansoni* is a severe parasitosis caused by the *Schistosoma mansoni* trematode. Currently, praziquantel (PZQ) is the only drug capable of treating all the different forms of schistosomiasis. The imidazolidines are represented by a group of pentagonal heterocyclic substances possessing diverse biological activities, among them the schistosomicidal activity. The first objective of this work is the investigation of the schistosomicidal activity of new thioxoimidazolidine derivatives. In this context, 24 new arylidene-3-(2-chloro, 6-fluoro)-benzyl-imidazolidin-2-thioxo-4-one derivatives of (PTS) were obtained. After principal component analysis (PCA), the most dissimilar derivatives were evaluated biologically. The indolyl-imidazolidinic derivative, LPSF / PTS-14, presented greater results than PZQ, 100% death of worms in 24 h at 5 µg / mL, and a toxicity below 5 µg / mL against BALB splenocytes / C mice. These results, combined with low cytotoxicity, stimulated the development of a pharmacophor model using FLAP software, as well as the evaluation of the mode of action by the Michael Addition reaction, and the development of a prediction model for cytotoxicity. The second objective of this work was the accomplishment of a bibliographic study about the PZQ, making it possible to propose a model relating chemical structure and biological activity. Then, in works still under development, a model of pharmacophores will be proposed, and prediction of activity through chemometric methods made. In relation to bacterial infections, the appearance of superbugs, such as the *Escherichia coli* strain resistant to all antibiotics available in the clinic in 2016, again calls attention to the development of new antibiotics. Aminoglycosides, such as Neamine, are a family of substances of natural or semi-synthetic origin that are effective against Gram (+) and Gram (-) bacteria. The third objective of this work was the synthesis of analogues of Neamine from N- Acetyl-D-glucosamine and the use of metathesis reactions. Although none of the proposed derivatives were synthesized in the allotted time, important advances were made in the proposed routes, and key intermediaries were obtained. It was also possible to develop an evaluation study between the compatibility of protective groups used in derivatives and the occurrence of metathesis reactions. These studies led to the proposition of a synthetic route compatible with the protective groups, initiated at the end of this work, and to be concluded in the future.

**Keywords:** Infectious and Parasitic Diseases, Schistosomiasis, Resistant Bacteria, Imidazolidine, Praziquantel, Aminoglycosides, Metathesis Reaction.