



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdades de Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE
DOAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE
NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTI-AGREGANTE PLAQUETÁRIA ÚTEIS NO
TRATAMENTO DE ANEMIA FALCIFORME

Nathália Istófolis de Paula Silveira

Araraquara, 2011.



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdades de Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara

SÍNTESE E DOAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE NOVOS
COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTI-AGREGANTE PLAQUETÁRIA
ÚTEIS NO TRATAMENTO DE ANEMIA FALCIFORME

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico.

Nome: Nathália Istófolis de Paula Silveira

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara, 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por guiar-me sempre, iluminando meus atos e minhas escolhas.

Aos meus pais, Ivone e José Carlos, que, por muitas vezes, deixaram de seguir seus sonhos para me ajudar a conquistar os meus.

À minha irmã Carla que sempre se fez presente em todos os momentos da minha vida, até mesmo quando estava distante.

Aos meus familiares, principalmente aos meus avós, que sempre rezaram pelo meu sucesso.

Aos meus amigos, que sempre me ajudaram e apoiaram nesse período. Em especial ao Guilherme, pelo seu carinho e companheirismo.

E, por fim, ao meu orientador Jean que, com seus conhecimentos e incentivo, me ajudou a concretizar esse sonho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1- INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1- EPIDEMIOLOGIA E ORIGEM DA ANEMIA FALCIFORME	13
2.2- FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME	14
2.3- RELAÇÃO DA ANEMIA FALCIFORME COM O AUMENTO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA	16
2.4- TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME	17
3- OBJETIVOS	19
3.1- OBJETIVOS GERAIS	19
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4- PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	20
5- MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1- MATERIAIS	22
5.2- MÉTODOS	23
<input type="checkbox"/> <i>Metodologia de síntese:</i>	23
<input type="checkbox"/> <i>Metodologia analítica:</i>	24
<input type="checkbox"/> <i>Detecção quantitativa de nitrito</i>	25

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1- IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO (I.V)	27
6.1.1-Composto 1	27
6.1.2-Composto 2	28
6.1.3-Composto 3	29
6.1.4-Tabela comparativa de deslocamento na região do infra-vermelho entre os três compostos.	30
6.2- IDENTIFICAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	31
6.2.1-Composto 2	31
6.3- DOAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	312
6.4- PONTOS DE FUSÃO	312
7- CONCLUSÃO	33
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34
ANEXO I - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	40

RESUMO

A anemia falciforme é uma doença genética caracterizada por uma anemia hemolítica crônica e fenômenos vaso-oclusivos, que levam a crises dolorosas e à lesão tecidual crônica e progressiva. Tem sido relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam aumento dos níveis circulantes de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

O principal fármaco utilizado no tratamento dessa anemia é a hidroxiuréia (HU), fonte exógena de óxido nítrico (NO) e responsável pela inibição da agregação de plaquetas e aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF). Trabalhos prévios têm demonstrado a importância da subunidade 1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido como doadora de óxido nítrico.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar um novo derivado híbrido do 1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido para a formação de um composto útil para o tratamento dos processos preventivos contra agregação plaquetária exacerbada em pacientes falciformes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distorção da hemácia falciforme em relação às hemácias normais.....	11
Figura 02: Subunidade ftalimídica da talidomida.....	12

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Estratégia de hibridação molecular.....	18
Esquema 02: Mecanismo sugerido para liberação de NO pelos derivados furoxânicos.....	20
Esquema 03: Metodologia de síntese do novo composto híbrido.....	23
Esquema 04: Esquema sintético para obtenção do composto 1.....	40
Esquema 05: Esquema sintético para obtenção do composto 2.....	41
Esquema 06: Esquema sintético para a obtenção do furoxano fenílico.....	42
Esquema 07: Esquema sintético para obtenção do composto 3.....	43

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 01: Espectro no infravermelho do composto 1 (pastilha de KBr).....	27
Espectro 02: Espectro no infravermelho do composto 2 (pastilha de KBr).....	28
Espectro 03: Espectro no infravermelho do composto 3 (pastilha de KBr).....	29
Espectro 04: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear H^1 do composto 2.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Atribuições do espectro de absorção no infravermelho relativo ao composto 1.....	27
Tabela 02: Atribuições do espectro de absorção no infravermelho relativo ao composto 2.....	28
Tabela 03: Atribuições do espectro de absorção no infravermelho relativo ao composto 3.....	29
Tabela 04: Comparação entre as principais bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos aos compostos 1, 2 e 3.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
DCC	Dicloroexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HCl	Ácido clorídrico
HU	Hidroxiuréia
I.V	Espectrofotometria de absorção no infravermelho
NO	Óxido nítrico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

1- INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é causada por uma mutação pontual no gene da β -globina, originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS). Em ambientes com baixa tensão de oxigênio, estas moléculas de HbS podem sofrer polimerização, com falcização das hemácias. O grau de polimerização é dependente da concentração de HbS na hemácia. A hemoglobina fetal (HbF) não participa do processo de polimerização. Estudos permitem demonstrar que quanto maior a porcentagem de hemoglobina fetal, menor é a polimerização da HbS (ZAGO et al., 1983).



Figura 01: Distorção da hemácia falciforme em relação as hemácias normais

(retirado de <http://anemia-sintomas.blogspot.com/2010/02/anemia-falciforme.html> acessado em 30/08/11)

As hemácias em forma de foice (Figura 1) têm dificuldade de passar pelas arteríolas e vênulas, ocasionando seu “entupimento”. Esta situação culmina em quadros isquêmicos que tem como resultado clínico crises dolorosas intensas. Além disso, outros fatores também estão envolvidos na sintomatologia da doença falciforme, como por exemplo reações inflamatórias. O aumento dos níveis sanguíneos da citocina pró-inflamatória TNF- α , comum em pacientes falciformes, pode agravar as crises vaso-oclusivas e levar ao aparecimento de episódios

infecciosos e inflamatórios (CROIZAT, 1994; DUIJS et al 1996; MALAVÉ, et al 1993; WUN, et al 1997).

Sabe-se que a talidomida, fármaco teratogênico usado como hipnótico e sedativo nas décadas de 50 e 60, possui a capacidade de modular a síntese do TNF- α , o que poderia melhorar o quadro sintomático da anemia falciforme. Estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que a subunidade ftalimídica da talidomida (Figura 02) é o farmacóforo dessa inibição (LIMA, 2001).

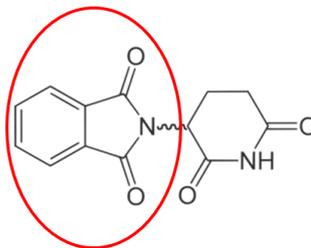


Figura 02: Subunidade ftalimídica da talidomida

Não existe tratamento específico para a anemia falciforme, porém, existem no mercado fármacos úteis ao tratamento sintomático. Atualmente o recurso terapêutico mais utilizado é a hidroxiuréia (HU), fármaco antineoplásico, que atua como fonte exógena de óxido nítrico, auxiliando na manutenção do fluxo e da pressão sanguínea normal, além de também estimular a produção de HbF (KING, 2004).

Estudos recentes mostram que um tratamento que gere um aumento do óxido nítrico associado com a inibição da citocina pró-inflamatória TNF- α , poderia gerar um maior equilíbrio das propriedades anti e pro-coagulantes, além de estimular a síntese de gama globina, aumentando a produção de HbF (SANTOS,2007; SANTOS & CHUNG,2011; SANTOS et al, 2011).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Epidemiologia e origem da anemia falciforme

A anemia falciforme é uma das doenças hematológicas mais comuns em todo o mundo, atingindo expressiva parcela da população dos mais diferentes países. Os distúrbios falciformes são conhecidos há tempos na África, e estima-se que tenham surgido nos países do centro-oeste africano, da Índia e do leste da Ásia, há cerca de 50 a 100 mil anos (WHO, 1982).

A doença falciforme afeta milhões de pessoas no mundo e ocorre em 1 a cada 500 nascimentos afro-americanos e em 1 a cada 4000 nascimentos hispanoamericanos (GONÇALVES et al., 2003).

Embora haja uma maior incidência na raça negra, estudos epidemiológicos têm demonstrado a presença de hemoglobina S em pessoas descendentes de populações do Mediterrâneo (gregos e italianos), Caribe, América Central e do Sul, Arábia e Índia (SALOOJEE, 1999).

No Brasil, que apresenta população com diferentes origens raciais e diversificado grau de miscigenação, a doença tornou-se problema de saúde pública (PAIVA & SILVA, RAMALHO & CASSORLA, 1993). Zago, Figueiredo e Ogo (1992), afirmam que o Brasil possui de 1 a 6% de portadores do gene da HbS (ZAGO, FIGUEIREDO e OGO, 1992).

A grande presença do traço falciforme em regiões endêmicas para malária tem sido associada como uma forma de proteção seletiva contra as formas mais letais da doença, porém o mecanismo dessa proteção ainda é pouco entendido. Segundo Hebbel (2003), essa proteção se deve a instabilidade da hemácia falcêmica, pois, as proteínas de membrana se modificam permitindo a remoção das células por fagocitose. Estudos *in vitro* mostram que há uma diminuição da invasão, do crescimento e do desenvolvimento de *P. falciparum* em hemácias com baixa tensão de oxigênio (WILLIAMS et al, 2005).

Aidoo & Terlow (2002) demonstraram através de dados de mortalidade de um grupo de crianças do Quênia na África que viviam em regiões endêmicas que indivíduos homozigotos para o gene HbS na faixa etária entre 2-16 meses apresentava redução significativa da infecção por malária quando comparadas às crianças sem a doença.

2.2- Fisiopatologia da anemia falciforme

A anemia falciforme é caracterizada por uma simples substituição do nucleotídeo adenina (GAG) pelo nucleotídeo timina (GTG) no sexto códon do gene β -globina, codificando valina ao invés de ácido glutâmico na superfície da cadeia β -globina variante (β^s -globina) (SAFO et al 2004).

A substituição do glutamato por uma valina tem consequências profundas na estrutura tridimensional da hemoglobina, pois o ácido glutâmico é carregado negativamente e a valina é um aminoácido neutro, o que permite a aproximação das

moléculas de hemoglobina e, conseqüentemente, a polimerização, quando desoxigenada.

A polimerização da HbS é a principal causa do processo de vaso-oclusão e responsável por alterar a estrutura das células para forma de foice (BUNN, 1997). A etapa determinante da velocidade de agregação está atribuída à formação dos tetrâmeros de HbS, que se agregam e arranjam-se em fibras maiores, denominadas tactóides (GALKIN & VEKILOV 2004; ADACHI et al 1988).

A falcização das hemácias está associada às alterações reversíveis da membrana, porém repetidos ciclos de falcização/desfalcização deixam essas células alteradas para a forma de foice (LEE et al 1998).

As hemácias falciformes demonstram uma aderência anormal ao endotélio vascular, monócito e macrófagos, sendo, por isso, a principal causa da vaso-oclusão em pacientes falciformes (DUITS et al, 1996; OKPALA et al, 2002). Massas de hemácias falciformes “entopem” repetidamente os vasos da microcirculação, levando à dolorosas crises de oclusão vascular. De 5% a 10% das crianças ou adultos jovens falcêmicos apresentam acidente vascular cerebral, derrame ou hemorragia resultante de estenose ou dilatação aneurismática de artérias cerebrais importantes (SANTOS, 2007).

Sabe-se que os sintomas da anemia falciforme apareciam em crianças logo após a diminuição dos níveis de HbF, sugerindo que o aumento de hemoglobina fetal poderia ser benéfico ao paciente, aumentando sua sobrevivência e diminuindo os episódios de dor (CHARACHE et al 1992).

2.3- Relação da anemia falciforme com o aumento de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Recentemente, foi relatado um aumento significativo dos níveis circulantes de citocinas, incluindo o TNF- α , em pacientes com anemia falciforme (MALAVÉ, et al 1993). Sabe-se que o TNF- α exerce efeitos pró-inflamatórios devido ao aumento de moléculas de adesão, aumentando as propriedades quimiotáticas e a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, estimula a produção de radicais livres, e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE2 (SANTOS, 2007).

Além disso, existe uma correlação inversa entre a porcentagem de HbF e a concentração sérica de TNF- α , demonstrando que pacientes com altos níveis plasmáticos de TNF- α apresentam conseqüente diminuição dos níveis de HbF, fato que potencializa os sintomas associados à anemia falciforme (MALAVÉ, et al 1993).

Portanto, o aumento dos níveis sanguíneos de TNF- α , em pacientes portadores de anemia falciforme, pode agravar as crises vaso-oclusivas e levar ao aparecimento de episódios infecciosos e inflamatórios (MALAVÉ et al 1993; FRANCIS et al 1992; BUCHANAN, et al 2004).

O primeiro protótipo de fármaco inibidor do TNF- α foi a talidomida, fármaco utilizado como sedativo, anti-emético e hipnótico nas décadas de 50 e 60, e retirado do mercado devido ao seu perfil teratogênico. Entretanto, em 1965, Jacob Shesin, médico israelita, observou melhora significativa do processo inflamatório e doloroso em pacientes com hanseníase tratados com talidomida. Esse efeito ocorria devido à capacidade do fármaco de modular a síntese de TNF- α . Estudos de relação estrutura-

atividade demonstraram que o farmacóforo para inibição dessa citocina pró-inflamatória era a subunidade ftalimida da talidomida (Figura 2) (LIMA, 2001).

2.4- Tratamento da anemia falciforme

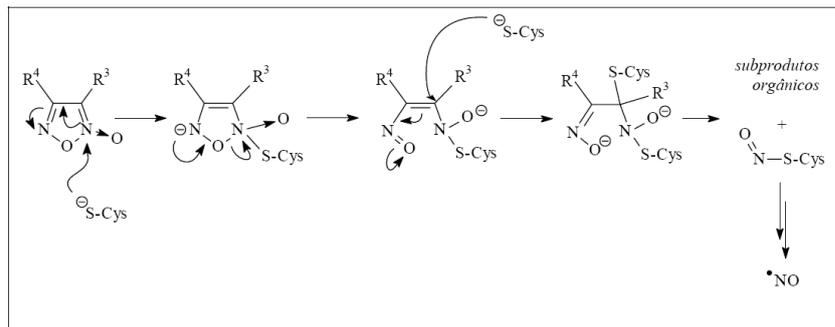
Ainda não existe tratamento específico para anemia falciforme porém, existem fármacos e outras substâncias úteis ao tratamento sintomático, que melhoram a qualidade de vida dos portadores desta enfermidade. Dentre eles: desferrioxamina, hidroxiuréia, vacinas anti-pneumocócicas, penicilina (profilática), ácido fólico (doses diárias), decitabina, ácidos graxos de cadeia curta, inibidores do co-transporte de K^+/Cl^- e inibidores dos canais de Gardo (clotrimazol, L-arginina, dipiridamol) (SANTOS & CHUNG, 2011).

A hidroxiuréia (HU), no entanto, é a mais utilizada. Conhecida como um inibidor da ribonucleotídeo redutase, é usada no tratamento de uma série de desordens mieloproliferativas, e tem sido usada para tratar os sintomas da anemia falciforme (LIMA et al 2003).

A eficácia da HU é atribuída à sua capacidade de aumentar os níveis de HbF, uma hemoglobina geneticamente distinta que inibe a polimerização de HbS deoxigenada, diminuindo a concentração da HbS e, conseqüentemente, os sintomas relacionados a esta patologia (RODGERS, 1990). Além disso, outros mecanismos de ação também são descritos, entre eles a alteração dos eritrócitos, a melhora nos aspectos reológicos das células vermelhas. Grande parte desses efeitos parecem ser relacionados ao óxido nítrico, já que é sabido que *in vivo* HU sofre biotransformação nesse mediador. (SPACE et al, 2000; STEINBERG et al, 2003; SANTOS, 2007).

Baseado nos efeitos benéficos associados ao uso de NO substâncias que atuam como potenciais doadores poderiam beneficiar o tratamento da doença (HUANG, 2004, SANTOS & CHUNG, 2011). Os aspectos benéficos da aplicação do óxido nítrico no tratamento da anemia falciforme têm gerado muito interesse. Atualmente, os derivados N-óxido-1,2,5-oxadiazol vem sendo muito utilizados devido à capacidade de doação de NO pela sua unidade furoxânica, porém ainda não se sabe ao certo o mecanismo exato pelo qual se dá essa doação (CERECETTO & PORCAL, 2005).

Cerecetto e colaboradores propõem como mecanismo a liberação de NO pelo furoxono como sendo cisteína-dependente (Esquema 01).



Esquema 01: Mecanismo sugerido para liberação de NO pelos derivados furoxânicos (RETIRADO DE CERECETTO & PORCAL, 2005).

Observando o Esquema 01, percebemos que o ataque do enxofre da cisteína ao nitrogênio N-óxido é o gatilho que inicia o processo de doação de NO, acarretando na abertura do anel furoxânico. Após essa abertura, o carbono alfa sofre um ataque nucleofílico de um resíduo de cisteína, formando subprodutos que possuem a capacidade de liberar NO (CERECETTO & PORCAL, 2005).

De fato, doadores de óxido nítrico podem aumentar a expressão gênica de gama globina, representando uma promissora terapêutica para reduzir a vaso-oclusão em pacientes falciformes (COKIC et al, 2003). Santos (2009) demonstrou que derivados furoxânicos são capazes de promover aumento dos níveis de hemoglobina fetal em cultura de células K562 (resultados não publicados).

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivos gerais

Este trabalho visa o planejamento e a síntese de um novo composto com possível atividade anti-agregante plaquetária útil no tratamento da anemia falciforme.

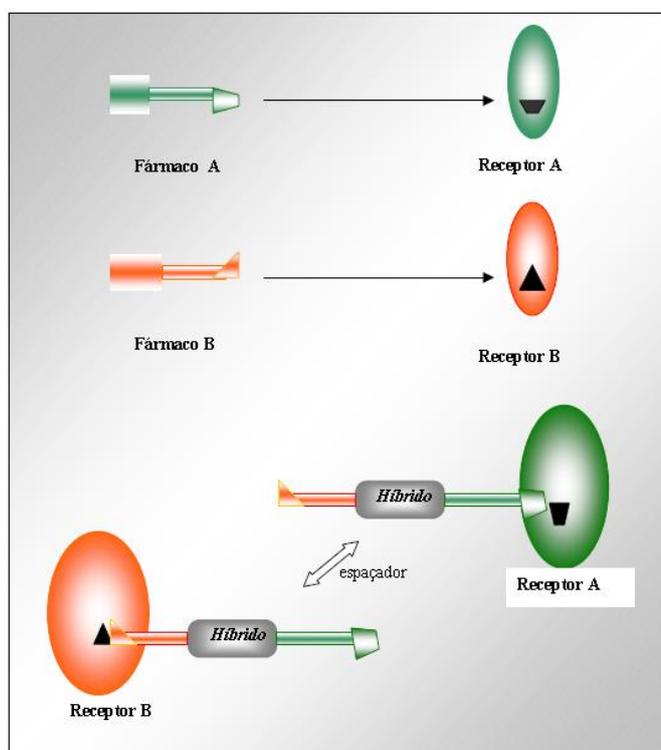
3.2- Objetivos específicos

- Planejamento de um composto híbrido, desenhado pela estratégia de hibridação molecular com propriedades duais de ação: inibidor do TNF- α e doador de óxido nítrico.
- Síntese dos intermediários (composto 1 e composto 2);
- Síntese do composto híbrido (composto 3);
- Avaliação da atividade de doação de NO do composto 3.

4- PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

O novo composto foi planejado como inibidor de TNF- α e doador de NO, a partir da hibridação molecular da subunidade ftalimidica da talidomida e de um derivado N-óxido-1,2,5-oxadiazol, usando como agente espaçador uma subunidade *N*-acil-hidrazona.

A hibridação é um processo de modificação molecular que combina duas subunidades farmacofóricas em uma única molécula. Apesar de apresentar vantagens farmacocinéticas sobre a administração concomitante de dois fármacos distintos (Esquema 02), a hibridização molecular pode levar à obtenção de um composto inativo, sendo de fundamental importância se conhecer a relação estrutura-atividade dos compostos e dos receptores que serão utilizados (BALDWIN et al 1979; BARREIRO et al, 2002 WERMUTH, 1996).



Esquema 02: Estratégia de hibridação molecular (RETIRADO DE SANTOS,2007)

Analisando o Esquema 02, percebemos que o fármaco A interage apenas com o receptor A, que o fármaco B interage apenas com o receptor B e que o composto híbrido formado pela junção das subunidades farmacofóricas dos dois fármacos em questão tem a capacidade de interagir tanto com o receptor A quanto com o receptor B, desencadeando os respectivos efeitos farmacológicos (SANTOS, 2007).

Estudos demonstram que a subunidade *N*-acil hidrazona poderia auxiliar na atividade antiagregante plaquetária,, apesar de não se saber ao certo qual o mecanismo desse aumento. Duas propostas estão sendo estudadas, uma se relaciona ao melhor reconhecimento do composto pela COX-1, melhorando o perfil de inibição dessa enzima e reduzindo a formação de tromboxano A₂, enquanto que a outra se baseia na propriedade quelante dessa subunidade, uma vez que o cálcio interfere tanto na ativação quanto na agregação das plaquetas (CUNHA et al 2003; FRAGA et al 2000; SILVA et al 2004; TODESCHINI et al 1998).

Portanto, utilizando a estratégia de hibridação molecular planejou-se um composto híbrido espaçado pela subunidade *N*-acil hidrazona. Este composto representa uma nova abordagem no tratamento dos sintomas da anemia falciforme já que atuaria por mecanismo de ação diferenciado em relação ao que se conhece da terapia.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- Materiais

- Reagentes:
 - acetato de etila
 - ácido acético
 - anidrido ftálico
 - dicloroexilcarbodiimida
 - diclorometano
 - furoxano fenílico oxidado
 - glicina
 - hexano
 - hidrato de hidrazina
 - metanol
 - sulfato de sódio anidro
 - tolueno
 - trietilamina

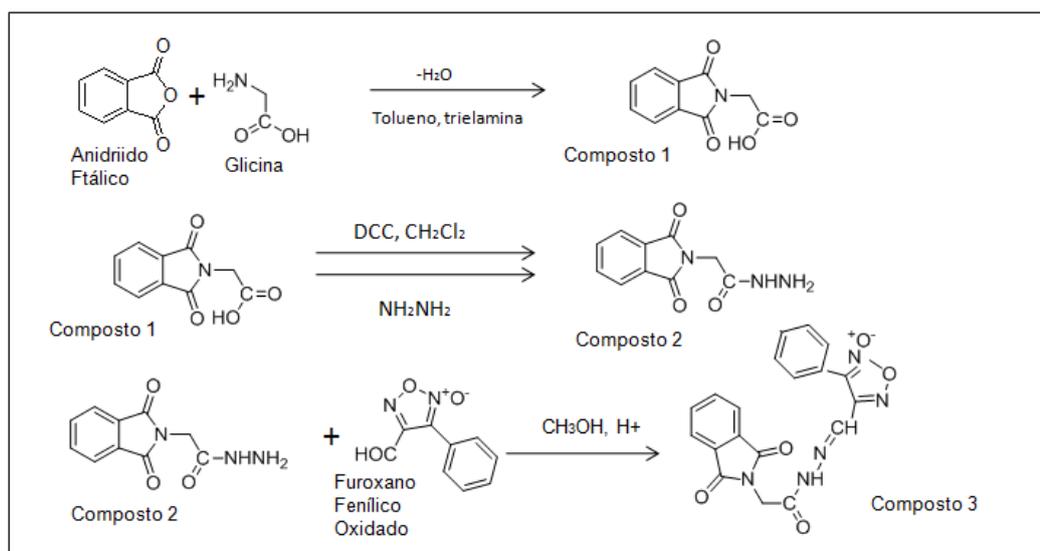
5.2- Métodos

- Metodologia de síntese:

Utilizando a metodologia descrita por Usifoh e colaboradores (2001), foi realizada a condensação do anidrido ftálico com a glicina, levando à formação da respectiva ftalimida, primeiro intermediário para obtenção do composto híbrido sintetizado.

O derivado ftalimídico então reagiu com hidrato de hidrazina e com dicloroetilcarbodiimida (DCC), formando uma hidrazida de glicina (Usifoh et al 2001; Ragavendran et al 2007).

O produto final foi sintetizado a partir da reação de condensação da hidrazida da glicina com a função aldeído do derivado furoxano para formação das respectivas hidrazonas (Esquema 3) (JIN et al 2006).



Esquema 03: Metodologia de síntese do novo composto híbrido

- Metodologia analítica:

- Cromatografia em camada delgada (CCD)

Como método de análise qualitativo para acompanhamento da reação, foram feitas cromatografias em camada delgada (cromatofolhas de alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm de espessura - Merck), utilizando acetato de etila puro como fase móvel. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365 nm), e/ou por exposição à iodo pulverizado, seguida ou não de revelação com ninidrina.

- Espectrometria de RMN ¹³C e ¹H

Os espectros de RMN ¹³C e ¹H serão realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), utilizando-se espectrômetro, Brüker, modelo Advance DPX300 - 300 MHz.

- Espectrofotometria de absorção no infravermelho (I.V.)

Os espectros de absorção no I.V., na região de 4.000 a 400 cm⁻¹, foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu

- Faixa de fusão

A faixa de fusão dos produtos foi determinada em aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific.

• Detecção quantitativa de nitrito

Primeiramente foram preparadas as amostras pesando-se 0,0001 mol da hidrazona e do padrão utilizado, dinitrato de isossorbida, solubilizando-os em 1 mL de dimetilsulfóxido, cada um em um tubo de ensaio.

Para construção da curva de calibração foram preparadas soluções-padrão de nitrito de sódio nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-4} M (SORBA et al 1997). Após adição de reagente de Griess, a mistura foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido este tempo, os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro UV/visível Shimadzu no comprimento de onda de 540 nm.

Uma solução do respectivo derivado furoxânico e padrões (20 μ L) em DMSO foi adicionado a tubo contendo 2 mL de tampão fosfato 50mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína, e ainda na ausência de cisteína. A concentração final do composto foi 10^{-4} M. Após 1 hora a 37°C, 1 mL dessa solução foi tratada com 250 μ L do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro UV/visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO^{2-}) mol/mol + E.P.M

- Preparo de Soluções

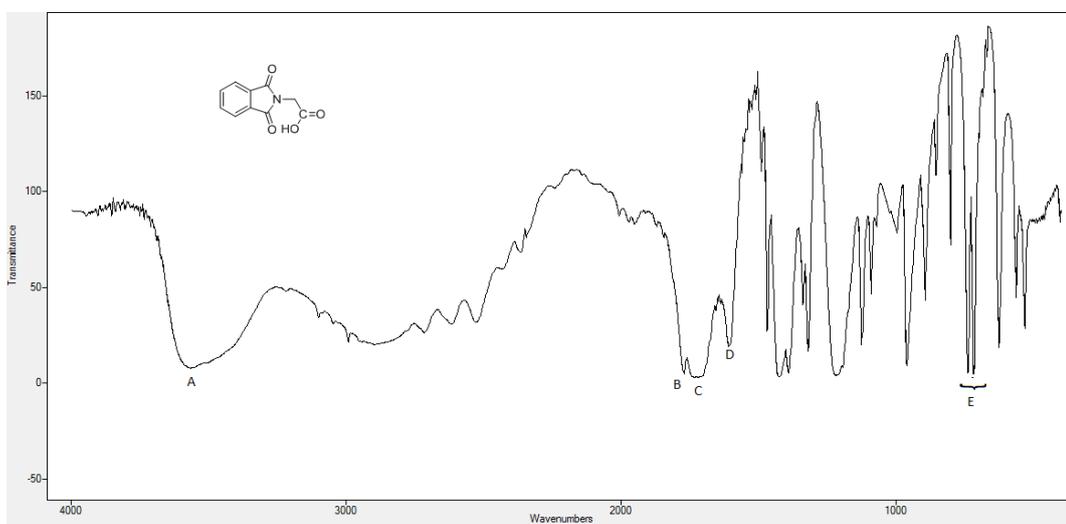
- (1) Tampão fosfato 50mM (pH 7,4): solubilizou-se 0,68g de fosfato de potássio monobásico em 80 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado, com auxílio de equipamento, para valor de 7,4 com hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. Completou-se o volume em balão volumétrico para 100 mL com água destilada. O balão foi protegido da luz.
- (2) Tampão fosfato 50mM (pH 7,4) solubilizou-se 0,68g de fosfato de potássio monobásico e 600 mg (5mM) de cisteína em 80 mL de água destilada, conforme procedimento adotado. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. Completou-se o volume em balão volumétrico para 100 mL com água destilada. O balão foi protegido da luz.
- (3) Reagente de Griess (agente colorimétrico): em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 4g de sulfonamida, 0,2g de dicloridrato de N-naftiletilenodiamina, 20 mL de água destilada e 10 mL de ácido fosfórico. O volume final do balão foi completado para 100 mL.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos experimentais para sínteses dos compostos estão descritos no ANEXO I.

6.1- Identificação por Espectrometria no Infravermelho (I.V)

6.1.1-Composto 1

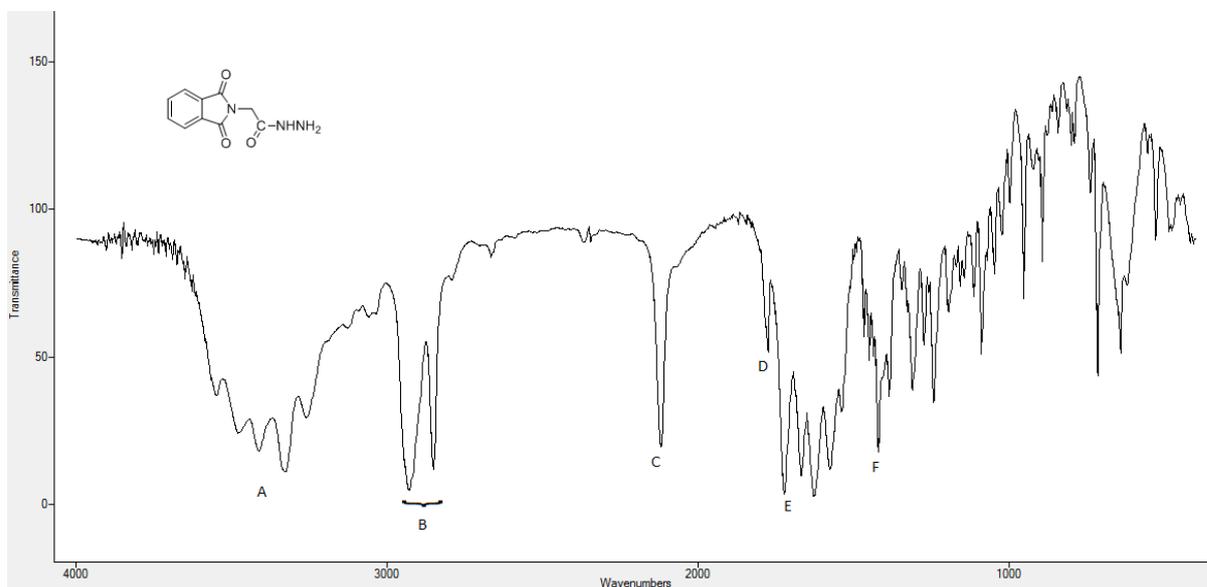


Espectro 02: Espectro no infravermelho do composto 1 (pastilha de KBr)

Marcador	ν (cm^{-1})	Grupo Funcional	Tipo de Deformação
A	3558,67 e 3500,80	-OH (Ligação Intramolecular)	Axial
B	1770,65	C=O (Carbonila da Imida)	Axial
C	1716,65	C=O (Carbonila da Imida)	Axial
D	1608,63	C=O (Carbonila do Ácido Carboxílico)	Axial
E	738,74 e 715,59	Dupla substituição em anel aromático nas posições 1,2	Angular

Tabela 02: Atribuições do espectro de absorção no infravermelho relativo ao composto 1

6.1.2-Composto 2

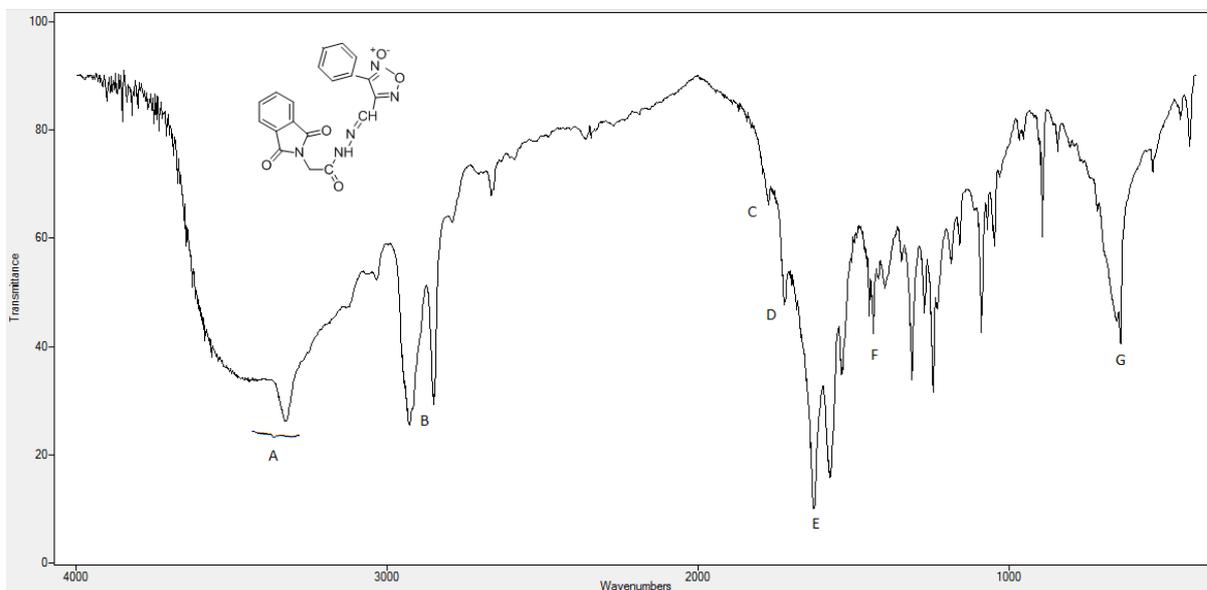


Espectro 02: Espectro no infravermelho do composto 2 (pastilha de KBr)

Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Tipo de Deformação
A	3547,09-3259,70	-CONHNH ₂	Axial
B	2827,94 e 2850,79	C-H CH ₂ simétrico e assimétrico	Axial
C	2119,77	íon amônio	-
D	1774,51	C=O (Carbonila da Imida)	Axial
E	1722,43	C=O (Carbonila da Imida)	Axial
F	1419,61	C-N (amida)	Axial

Tabela 02: Atribuições do espectro de absorção no infravermelho relativo ao composto 2.

6.1.3-Composto 3



Espectro 03: Espectro no infravermelho do composto 3 (pastilha de KBr)

Marcador	ν (cm^{-1})	Grupo Funcional	Tipo de Deformação
A	região dos 3000	-OH (Ligação Intramolecular)	Axial
B	2927,94 e 2850,79	C-H CH ₂ simétrico e assimétrico	Axial
C	1772,58	C=O (Carbonila da Imida)	Axial
D	1718,58	C=O (Carbonila da Imida)	Axial
E	1627,92	C=N (Carbonila da imina)	Axial
F	1436,97	C-N (amida)	Axial
G	653,87 e 640,37	Dupla substituição em anel aromático nas posições 1,2	Angular

Tabela 03: Atribuições do espectro de absorção no infravermelho relativo ao composto 3.

6.1.4-Tabela comparativa de deslocamento na região do infra-vermelho dos 3 compostos

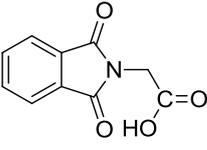
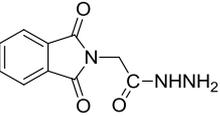
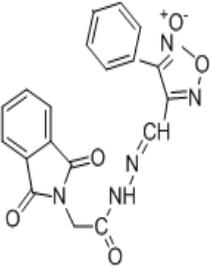
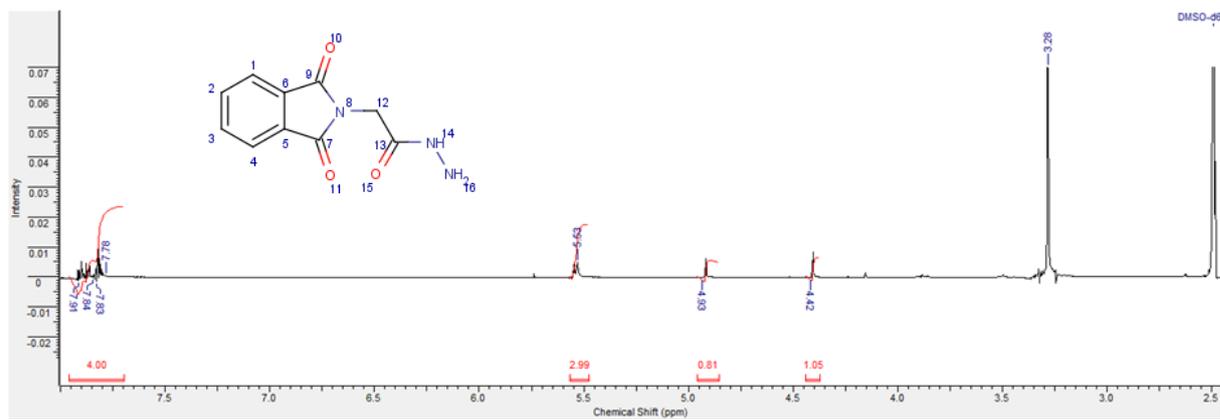
-	C=O (Carbonila do Ácido Carboxílico)	C=N (Carbonila da imina)	C=O (Carbonila da Imida)	-OH (intramolecular)	-CONHNH₂
	1608,63	-	1770,65 e 1716,65	3558,57 e 3500,80	-
	-	-	1774,51 e 1722,43	-	3547,09-3259,70
	-	1627,092	1772,58 e 1718,58	Região dos 3000	-

Tabela 04: Comparação entre as principais bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos aos compostos 1, 2 e 3

Observando a tabela, podemos deduzir que todos esses compostos possuem o grupamento ftalimídico da talidomida, pois todos apresentam o estiramento da carbonila da imida em seu espectro. Pode-se reparar também que apenas o composto 1 apresenta o estiramento característico da carbonila do ácido carboxílico, apenas o composto 2 apresenta o estiramento característico da subunidade hidrazida (-CONHNH₂) e apenas o composto 3 apresenta o estiramento da ligação carbono-nitrogênio da imina, como esperado. Estes fatos são grandes indicadores de que a reação aconteceu.

6.2- Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

6.2.1-Composto 2



Espectro 04: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear H^1 do composto 2.

O solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) foi utilizado para obtenção dos espectros de Ressonância magnética Nuclear (RMN H^1). A presença deste solvente pode ser observada no espectro 4 em 2,5 ppm. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades. Entre 7,9 e 7,7 podemos visualizar o os hidrogênios pertencentes à subunidade ftalimídica da talidomida. Em 5,5 podemos ver a integração entre os três hidrogênios ligados aos nitrogênios pertencentes à subunidade hidrazida . E por fim, em 4,93 e 4,42 os hidrogênios do carbono metilênico vizinho da carbonila.

De acordo com os dados apresentados no espectro 4, podemos inferir que a síntese do composto 2 foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento de hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

O derivado aldeídico já foi caracterizado previamente por Santos (2009) e por isso seu espectro de RMN não foi adicionado nesta seção. Já o produto final (composto 3) esta sob caracterização por RMN até presente momento, por isso não foi adicionado neste trabalho.

6.3- Doação de óxido nítrico

A porcentagem de nitrito formada pelo composto 3 foi de 1,9% (mol/mol) e pelo padrão dinitrato de isossorbida de 16,0% (mol/mol). A grande diferença na porcentagem de nitrito formada pelo composto 3 e pelo padrão, deve-se ao fato de que o padrão utilizado possui dois nitratos em sua molécula e o composto 3 apenas uma, portanto, pode-se afirmar que esse composto é doador de óxido nítrico.

6.4- Pontos de Fusão

COMPOSTOS	Anidrido Ftálico	Glicina	Composto1	Hidrato de hidrazina	Composto2	Furoxano Fenílico	Composto3
PF	131°C	233°C	190°C – 193,5°C	-60°C	178°C – 186,1°C	66-67°C	205,8°C - 210°C

O ponto de fusão do composto 1 está em uma faixa aceitável, pois encontra-se entre os valores dos compostos que as originaram. Pode-se reparar também uma queda no valor do ponto de fusão do composto 1 para o composto 2 e um aumento no valor do ponto de fusão do composto 2 para o composto 3, indicando que houve realmente a formação de compostos diferentes.

CONCLUSÃO

Este trabalho teve como principal meta a obtenção de um candidato a fármaco obtido pela estratégia de modificação molecular entre talidomida e furoxano (doador de óxido nítrico). Um fármaco híbrido pode apresentar uma redução de dose e conseqüentemente de efeitos adversos quando comparado com a tomada de dois fármacos concomitantemente.

Durante seu desenvolvimento, foi possível desenvolver metodologias sintéticas para obtenção de novas hidrazonas com potencial utilização no tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Os compostos foram sintetizados com rendimento entre 50,0% e 95,0% e foram analisados por meio de algumas técnicas analíticas, tais como: Faixa de Fusão e Espectrofotometria de Infravermelho (IV). O composto 2 também foi analisado pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para confirmação estrutural.

Além disso, confirmou-se a capacidade de doação de NO pelo composto 3 no ensaio de doação de óxido nítrico utilizando reagente de Griess. Porém, aguardamos até presente momento os dados Ressonância Magnética Nuclear (RMN) a fim de caracterizar inequivocadamente o composto 3.

Como uma abordagem futura, devemos otimizar os métodos de purificação do produto para aumentar o rendimento. Além disso, outros testes farmacológicos devem ser realizados para uma comprovação dos efeitos esperados.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, K.; KIM, J.; BALLAS, S.; SURREY, S.; ASAKURA, T. Facilitation of Hb S Polymerization by the Substitution of Glu for Gln at β 121. *J. Biol. Chem.* v. 263, n. 12, p. 5607-5610, 1988.
- AIDOO M, TERLOW J. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 2002; 359:1311-12.
- Anemia falciforme. Disponível em: < <http://anemia-sintomas.blogspot.com/2010/02/anemia-falciforme.html>>. Acesso em: 30 de ago. 2011.
- BALDWIN, J.J.; LUMMA, W.C.; LUNDELL, G.F. PONTICELLO, G.S. RAAB, A.W.; ENGELHARDT, E.L.; HIRSCHMANN, R.; SWEET, C.S. SURIABINI, A. Symbiotic approach to drug design: antihypertensive β -adrenergic blocking agents. *J. Med. Chem.* v.22, p.1284-1290, 1979.
- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Quim Nova.* v.25, n.6B, p.1172-1180, 2002.
- BUCHANAN, G.R.; DEBAUN, M.R.; QUINN, C.T.; STEINBERG, M.H. Sickle cell disease. *Hematology.* p. 35-47, 2004.
- BUNN HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* v.337, p.762-769, 1997.

- CHARACHE S, DOVER GJ, MOORE RD, ECKERT S, BALLAS SK, KOSHY M, MILNER PFA, ORRINGER EP, PHILLIPS G, JR., PLATT OS, THOMAS GH: Hydroxyurea: Effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. v.79, p. 2555-2565, 1992.
- COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; NJOROGE, J.M.; MILLER, J.L.; GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J. Clin. Invest.* v.111, n. 2, p.231-239, 2003.
- CROIZAT H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* v. 87, p. 592–597,1994.
- CUNHA, A.C. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, v.11, p. 2051–2059, 2003.
- DUIJS AJ, PIETERS RC, SALEH AW, VAN ROSMALEN E, KATERBERG H, BEREND K AND ROJER RA. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vaso occlusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* v.81, p.96–98, 1996.
- DUIJS AJ, PIETERS RC, SALEH AW, VAN ROSMALEN E, KATERBERG H, BEREND K AND ROJER RA. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vaso occlusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* v.81, p.96–98, 1996.
- FRAGA, A.G.M. et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.11, p.285-290, 2000.
- FRANCIS, R. Jr., et al. *J. Natl. Med. Assoc.* v. 84: 611-615, 1992.;

- GALKIN, O.; VEKILOV, P.G. Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state. *J. Mol. Biol.* v. 336, p.43-59, 2004.
- GONÇALVES, M. S.; BONFIM, G. C; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I. et al. β S - haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, n.10, p.1283-1288, 2003.
- HEBBEL, R. P. Sickle hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection. *Redox Rep* 2003;8(5):238-40.
- HUANG, J.; KIM-SHAPIO, D. B.; KING, S.B. Catalase-Mediated Nitric Oxide Formation from Hydroxyurea. *J. Med. Chem.* v.47, p.3495-3501, 2004.
- JIN L. et al, *Bioorg Med Chem*, 2006, 16, 5036-5040
- KING, S.B. Mechanisms and Novel Directions in the Biological Applications of Nitric Oxide Donors. *Free Rad. Biol. Med.* v. 37, n 6, p.737-744, 2004.
- LEE, G.R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. Wintrobe Hematologia Clínica. *Vol. I Manole*, 1998, p.1161-1163.
- LIMA, L.M. *Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de novos candidatos à protótipos de fármacos antiinflamatórios e antiasmáticos*. 298p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.
- LIMA, P.D.L.; CARDOSO, P.C.S.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BURBANO, R.R. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: na in vitro study. *Gen. Mol. Res.* v.2, n.3, p.328-333, 2003.

- MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVE, H. Level of Tumor Necrosis Factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol.* v. 90, p.172-176, 1993.
- MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVE, H. Level of Tumor Necrosis Factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol.* v. 90, p.172-176, 1993.
- OKPALA I, DANIEL Y, HAYNES R, ODOEMENE D, GOLDMAN J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. *Eur. J. Haematol.* v.69, p.135–144, 2002.
- PAIVA E SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R, M. S. A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v.27, n.1, p.54-58, 1993.
- RAGAVENDRAN, J.; SRIRAM, D.; PATEL, S.; REDDY, I.; BHARATHWAJAN, N. ; STABLES, J.; YOGEE SWARI ,P. Design and synthesis of anticonvulsants from a combined phthalimide-GABA-anilide and hydrazone pharmacophore. *Eur. J. Med. Chem.* 2007, 42, 146-151.
- RODGERS GP, DOVER GJ, NOGUCHI CT, SCHECHTER AN AND NIENHUIS AW Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N Engl J Med.* v.322, p.1037–1045, 1990.

- SALOOJEE, H. In the blood: sickle cell anemia and the politics of race. *BMJ*, v.319, p.1582, 1999.
- SANTOS, J. L. ; CHUNG, M. C. . Recent Insights on the Medicinal Chemistry of Sickle Cell Disease. *Current Medicinal Chemistry*^{JCR}, v. 18, p. 2339-2358, 2011.
- SANTOS, J. L. ; LANARO, C. ; LIMA, L.M. ; GAMBERO, S. ; FRANCO-PENTEADO, C. F. ; MOREIRA, M.S.A. ; WADE, M. ; YERIGENAHALLY, S ; KUTLAR, A ; MEILER, S. E ; COSTA, F. F. ; CHIN, M. C. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds to Treat Sickle Cell Disease Symptoms. *Journal of Medicinal Chemistry*^{JCR}, v. 54, p. 5811-5819, 2011.
- SANTOS, J. L. *Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme*. Dissertação de mestrado. Departamento de fármacos e medicamentos. Faculdade de ciências farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2007
- SILVA, G.A. et al. *Bioorg. Med. Chem.* v.12, p.3149-3158, 2004.
- SORBA, G. et al. J. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. *Med. Chem.*, v. 40, n. 4, p. 463-469, 1997.
- SPACE, S.L., LANE, P.A., PICKETT, C.K., WEIL, J.L. nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. *Am. J. Hematol.* v.63, p.200-204, 2000.
- STEINBERG, M.H., BARTON, F., CASTRO, O., PEGELOW, C.H., BALAS, S.K., KUTLAR,A., ORRINGER,E., BELLEVIE, R., OLIVIERI, N., ECKMAN,

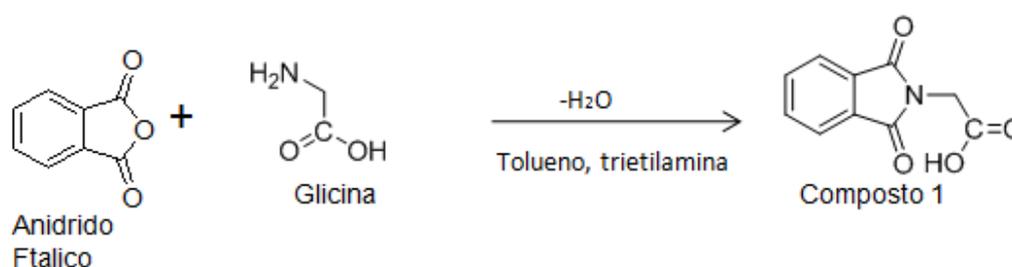
J., VARMA, M., RAMIREZ, G., ADLER, B., SMITH, W., CARLOS, T., ATAGA, K., DECASTRO, L., BJELOW, C., SAUNTHARAJAH, Y., TELFER, M., BONDS, D., TERRIN, M. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to nine years of treatment. *JAMA*. v.289, p.1645-1651, 2003.

- TODESCHINI, A.R. et al. *Eur. J. Med. Chem.* v.33, p.189-199, 1998.
- USIFOH, C. O., LAMBERT, D. M., WOULTERS, J., AND SCRIBA, G. K. E. *Arch. Pharm. Pharmacol. Med. Chem*, pg 234, 323-331, 2011.
- WERMUTH, C. G. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. San Diego. *Academic Press*, p. 11-12, 672-715, 262-293, 1996
- WILLIAMS, N.T., MWANGIL, T.W.; WAMBUA, S. et al. Negative epistasis between the malaria protective effects of α^+ thalassemia and the sickle cell trait. *Nature gen.*, v.37, n.11, 2005.
- WUN T, PAGLIERONI T, TABLIN F, WELBORN J, NELSON K AND CHEUNG A . Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med.*, v.129, p.507–516, 1997.
- ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu β^s - cluster haplotype predominates among brazilian blacks. *American Journal of Physical Anthropology*, v.88, p.295-298, 1992.

ANEXO I

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1- Obtenção do composto 1 (2-(1,3-dioxo-2,3-diidro-1H-isoindol-2-il)ácido acético)



Esquema 04 - Esquema sintético para obtenção do composto 1

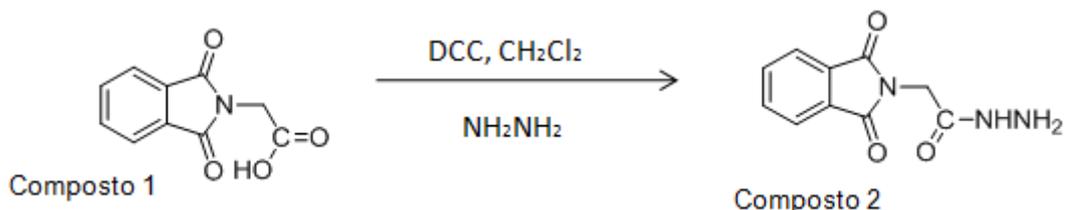
A síntese do composto 1 ocorreu em um balão de fundo redondo de 100 mL, conectado a um condensador de refluxo Dean-Stark, em banho de óleo sob aquecimento (130° C) (Esquema 4). Adicionou-se ao balão reacional 3,8g de glicina e 7,4g de anidrido ftálico em 300 mL de tolueno e 6,5 mL de trielamina, respectivamente. A reação permaneceu em agitação vigorosa. O tempo médio de reação foi de 3 horas. A reação foi acompanhada por CCD (fase móvel 6 hexano: 4 acetato de etila). Para identificação do novo produto formado a placa cromatográfica foi “revelada” com ninidrina com objetivo de identificação de grupos amina livres presentes na glicina (reagente).

Ao termino da reação foi realizada filtração à vácuo, e a fase orgânica foi lavada com uma mistura contendo 70 mL de água destilada com 1 mL de ácido clorídrico

(HCl) concentrado. Após a lavagem, o solvente orgânico foi evaporado a pressão reduzida e o sólido formado foi recristalizado em etanol.

O composto 1 foi obtido como um sólido de cor branca, que apresenta faixa de fusão entre 190,0°C e 193,5°C (C₁₀H₇NO₄; PM = 205g/mol). A reação apresentou rendimento em torno de 95,6%.

2- Obtenção do composto 2 (2-(1,3-dioxo-2,3-diidro-1H-isoindol-2-il)acetohidrazida)



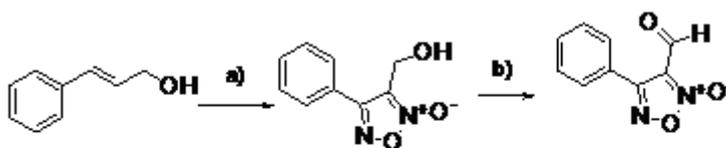
Esquema 05: Esquema sintético para obtenção do composto 2

A síntese do composto 2 (Esquema 5) foi realizada sob temperatura de aproximadamente 0-3°C. Experimentalmente, adicionou-se ao balão reacional 0,6g do **composto 1**, 0,3mL do hidrato de hidrazina e 0,6g do DCC em 20 mL de diclorometano (DCM). A reação permaneceu em agitação vigorosa, por cerca de 8 horas sendo acompanhada por CCD (fase móvel 100% acetato de etila). Para identificação do novo produto formado a placa cromatográfica foi “revelada” com ninidrina com objetivo de identificação de grupos amina livres da hidrazida formada.

Após as 8 horas, a mistura reacional foi filtrada à vácuo. Ao filtrado foi adicionado 25 mL de diclorometano para diluição do meio reacional. O filtrado foi posteriormente lavado com água (2x10 mL). A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida

para obtenção do composto 2 como um sólido de cor palha, que apresenta faixa de fusão 178°C e 186,1°C (C₁₀H₉N₃O₃; PM = 219g/mol). A reação apresentou rendimento em torno de 53%.

3- Obtenção do furoxano fenílico (4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído)



álcool cinâmico

a) NaNO₂, HAc, 0°C, 24h b) PCC, DCM, 24h (60%)

Esquema 06: Esquema sintético para a obtenção do furoxano fenílico

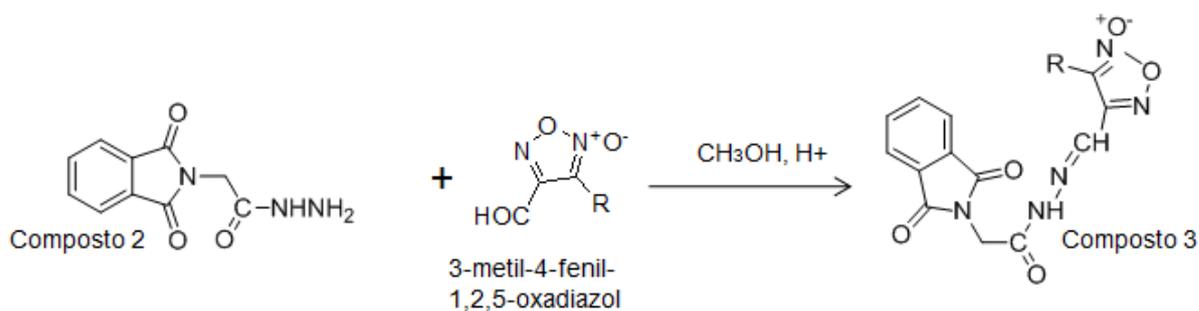
Experimentalmente, reagiu-se 10,8g do álcool trans-cinâmico com solução saturada de nitrito de sódio em 16,0mL de ácido acético. Em seguida, a reação foi retirada do banho de gelo e mantida em temperatura ambiente por um período de vinte e quatro horas.

Após esse procedimento, foi feita uma extração com frações éter etílico, até que as mesmas deixassem de ter uma coloração amarela intensa e passassem a ser transparentes. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl. Usou o sulfato de sódio anidro como agente secante. Depois de ter o solvente eliminado a pressão reduzida, o produto foi purificado em coluna sílica gel com fase móvel 5 hexano:5 acetato de etila como fase móvel. O rendimento da reação é de aproximadamente 90%.

Posteriormente, reagiu-se 900 mg do derivado obtido com 1,45g de PCC em 30mL de diclorometano anidro, mantidos sob vigorosa agitação sob temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Em seguida, filtrou-se a reação em coluna de terra diatomácea

sob pressão reduzida, visando à remoção do agente oxidante óxido. O rendimento encontrado foi de aproximadamente 60%.

4- Obtenção do composto 3 (2-(1,3-dioxo-2,3-diidro-1H-isoindol-2-il)-N'-[(1E)-(4-fenil-1,2,5-oxadiazol-3-il)metilideno]acetohidrazida)



Esquema 07: Esquema sintético para obtenção do composto 3

Para a síntese do composto 3 (Esquema 7) adicionou-se 2mmol do **composto 2**, 2 mmol do furoxano fenílico oxidado, 4 gotas de ácido acético glacial e 20 mL de diclorometano. A reação permaneceu em agitação vigorosa, por cerca de 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD (fase móvel 7 acetato de etila: 3 hexano), para identificação do novo produto. A placa cromatográfica foi revelada com ninidrina, para avaliar o consumo de todo o composto 2 usado como reagente.

Ao término da reação o produto é recristalizado em etanol e, para uma maior purificação, é passado em uma coluna de sílica gel com fase móvel 7 acetato de etila: 3 hexano. O composto 3 foi obtido como um sólido de cor amarelo, que apresenta faixa de fusão entre 205,8°C e 210°C ($\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$; PM = 391g/mol). A reação apresentou rendimento em torno de 61%.