

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CAMPUS DE ARARAQUARA**

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO  
FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS HÍBRIDOS  
POTENCIALMENTE ATIVOS PARA O TRATAMENTO DA  
ANEMIA FALCIFORME**

**JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Lúcia Moreira Lima**

**ARARAQUARA - SP**

**2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA  
DE COMPOSTOS HÍBRIDOS POTENCIALMENTE ATIVOS PARA  
O TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME**

**JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin**  
**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Lídia Moreira Lima**

**ARARAQUARA – SP**

**2007**

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

### ***Faculdade de Ciências Farmacêuticas***

**Santos, Jean Leandro dos**

S237p      Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme / Jean Leandro dos Santos. – Araraquara, 2007.  
197 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Chung Man Chin

Co-orientador: Lídia Moreira Lima

.                    1.Anemia falciforme. 2.Hibridação molecular. 3.Latenciação de fármacos. I.Chung Man Chin, orient. . II. Lima, Lídia Moreira, co-orient.  
.III. Título.

**CAPES:40300005**

**CANDIDATO: JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

**Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Compostos Híbridos potencialmente ativos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.**

---

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 07 de fevereiro de 2007, considera o candidato:

**( ☒ ) APROVADO**

**( ☐ ) REPROVADO**

1) Examinador: (Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares) \_\_\_\_\_

2) Examinador: (Prof. Dr. Wagner Vilegas) \_\_\_\_\_

3) Presidente: (Profa. Dra. Chung Man Chin) \_\_\_\_\_

" As adversidades despertam em nós  
capacidades que, em circunstâncias  
favoráveis, teriam ficado adormecidas"

*Horácio*

“Não preciso mudar o mundo, mas se conseguir  
melhorá-lo já está ótimo”

Ao meu amigo Rosenício Eustáquio Nunes,  
pela determinação, coragem e luta contra  
a anemia falciforme.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, Nossa Senhora, anjos e seres de luz pela presença em todos os momentos da realização deste trabalho;

Aos meus pais, Pedro e Aparecida, por acreditarem em minha capacidade profissional e pela oportunidade dada em continuar minha formação na pós-graduação;

À Profa. Dra. Chung Man Chin (UNESP- Araraquara) pela valioso incentivo, que permitiu-me seguir a trajetória científica. Agradeço, ainda, a orientação, amizade, confiança e respeito, e por ter contribuído consistentemente a minha formação na área da química farmacêutica e medicinal;

À Profa. Dra. Lúcia Moreira Lima (LASSBio – UFRJ) pela seriedade na realização deste trabalho, por ter aceitado o desafio de trabalhar com anemia falciforme; e por todas as sugestões e críticas, sempre muito pertinentes, que contribuíram de forma expressiva na elaboração e realização deste;

À Profa. Dra. Eliana Varanda (UNESP – Araraquara) pela confiança, abrindo as portas de seu laboratório, e pela participação ativa nas avaliações e discussões dos resultados, conduzindo com muita clareza e sabedoria a execução dos experimentos;

À Profa. Dra. Magna Suzana (UFAL) pela colaboração e responsabilidade na realização dos ensaios de edema de orelha (camundongo) e infiltração leucocitária, bem como os alunos de iniciação científica que participaram efetivamente dos ensaios;

Ao Prof. Fernando F. Costa (UNICAMP) pela confiança e colaboração na realização dos ensaios em cultura de células eritro leucêmicas K562. Em especial a Carol Lanaro, Shelley e Nicola Conran pela execução, constantes discussões e pela seriedade e compromisso na realização do ensaio.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira por disponibilizar seu laboratório para aquisição dos espectros de RMN. Em especial, a Elisângela Boffo e Leila Tavares pela aquisição dos espectros e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário;

## *Agradecimentos*

---

Aos Profs. Drs. Leoberto Costa Tavares (USP-SP) e Wagner Vilegas (UNESP- Araraquara) pelas valiosas contribuições e discussões na elaboração final deste trabalho;

Às Profas. Dras. Márcia Silva e Adélia Emília de Almeida pelo respeito e convivência científica no laboratório;

Ao Prof Dr. José Carlos Nassute pela agradabilíssima convivência durante o estágio docência na disciplina de Desenvolvimento de Fármacos, e pelo incentivo;

Ao meu amigo Rosenício Eustáquio Nunes, pelo desafio em propor a realização deste trabalho, fora da linha pesquisa das orientadoras, e pelo estímulo na tentativa de buscar uma substância que melhore a qualidade de vida dos pacientes falciformes;

Aos meus amigos de bancada, Paulo Yamasaki, Renata Bueloni e Heloísa Pinheiro pelo privilégio que tenho em contribuir na execução das suas atividades, e pela seriedade que tratam a iniciação científica;

Ao meu amigo Ricardo Vian Marques, companheiro de república e de bancada, pela incentivante motivação no trabalho;

Ao meu amigo Rodolfo Gonzalez pela parceria em trabalhos e importantes discussões reacionais que contribuíram a minha formação;

Aos meus amigos do laboratório, os pós-graduandos: Antônio Távora, Ednir Vizioli, Eliana Serafim, Lorena Blau, Lúcia Fioravanti, Mara Filomena, Renato Menegon, Thais Contente, Vanessa Zambrano com quem tive e tenho oportunidade de aprender mais a respeito da química farmacêutica e medicinal. Obrigado por todas as discussões que sempre agregaram conhecimento a minha formação;

Aos técnicos: Eduardo Santos, Karina e em especial ao meu amigo e colaborador Osmar Redondo pela adaptação do microondas e disponibilidade em ajudar sempre que é necessário;

À Helene J. Rosa pelo carinho, amizade, incentivo e companhia durante a execução deste trabalho;

Aos meus amigos de república: Vinícius (vilas), Georgius (grego), Ricardo (picaxu) Homero, Eduardo (fartura); e aos meus amigos de Franca que estiveram presentes durante o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram de forma pessoal a minha formação;



## *Agradecimentos*

---

A toda equipe da biblioteca da FCF (UNESP), pelo auxílio na aquisição do material bibliográfico;

A toda equipe de pós-graduação, Laura, Cláudia e Sônia, pelo profissionalismo e excelente trabalho frente secretária da pós-graduação;

A CAPES pela bolsa concedida e apoio financeiro.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente ao desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente, faço questão de ressaltar e agradecer a todos os alunos e professores envolvidos na execução deste trabalho, que mesmo não inserido em nenhum projeto temático, conseguiu mobilizar diferentes universidades como: UFAL, UFRJ, UNICAMP e UNESP. Obrigado pelo comprometimento, dedicação e seriedade de todos vocês.

## **SUMÁRIO**

|                                                            |        |
|------------------------------------------------------------|--------|
| ABREVIATURAS _____                                         | iii    |
| LISTA DE QUADROS _____                                     | iv     |
| LISTA DE FIGURAS _____                                     | v      |
| LISTA DE TABELAS _____                                     | vii    |
| LISTA DE ESQUEMAS _____                                    | viii   |
| LISTA DE ESPECTROS _____                                   | ix     |
| RESUMO _____                                               | xiii   |
| ABSTRACT _____                                             | xiv    |
| <br>I - INTRODUÇÃO _____                                   | <br>01 |
| <br>II – OBJETIVO _____                                    | <br>04 |
| <br>III – PLANEJAMENTO ESTRUTURAL _____                    | <br>05 |
| <br>IV – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____                       | <br>07 |
| 1. HISTÓRICO _____                                         | 07     |
| 2. EPIDEMIOLOGIA E ORIGEM DA ANEMIA FALCIFORME _____       | 08     |
| 3. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME _____               | 09     |
| 3.1 – RELAÇÃO DA ANEMIA FALCIFORME COM TNF- $\alpha$ _____ | 14     |
| 4. TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME _____                   | 17     |
| 4.1- HIDROXIURÉIA _____                                    | 19     |
| 5. MODIFICAÇÕES MOLECULARES _____                          | 22     |
| 7.1-HIBRIDAÇÃO MOLECULAR _____                             | 23     |
| 7.2- LATENCIAÇÃO _____                                     | 28     |

|                                                                                 |         |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
| V – MATERIAIS E MÉTODOS _____                                                   | 35      |
| 1. MATERIAIS _____                                                              | 35      |
| 2. MÉTODOS _____                                                                | 36      |
| 2.1 – METODOLOGIA SINTÉTICA _____                                               | 36      |
| 2.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS _____                                                  | 40      |
| 2.3 – ENSAIOS BIOLÓGICOS _____                                                  | 41      |
| 2.3.1 –TESTE DE AMES _____                                                      | 41      |
| 2.3.2 – EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR CAPSAICINA _____                           | 42      |
| 2.3.3 – ENSAIO DE PERITONITE _____                                              | 43      |
| 2.3.4 –EXPRESSÃO GÊNICA DE GAMA GLOBINA _____                                   | 44      |
| <br>Vi – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL _____                                        | <br>45  |
| 1- PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE _____                                               | 45      |
| 2- PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE<br>MUTAGÊNICA _____                | 61      |
| 3- PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA EM<br>CULTURA DE CELS. K562 _____ | 66      |
| <br>Vli – RESULTADOS E DISCUSSÃO _____                                          | <br>73  |
| <br>Viii – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS _____                                      | <br>174 |
| <br>IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____                                       | <br>178 |

## ABREVIATURAS

|                     |                                   |
|---------------------|-----------------------------------|
| ACN                 | Acetonitrila                      |
| AcOH                | Ácido acético                     |
| D <sub>2</sub> O    | Água deuterada                    |
| Ac <sub>2</sub> O   | Anidrido acético                  |
| CDCl <sub>3</sub>   | Clorofórmio deuterado             |
| CCD                 | Cromatografia em camada delgada   |
| DCM                 | Diclorometano                     |
| DMSO-d <sub>6</sub> | Dimetilsulfóxido deuterado        |
| IV                  | Espectrofotometria infra-vermelho |
| TNF $\alpha$        | Fator de necrose tumoral alfa     |
| Hb                  | Hemoglobina                       |
| HU                  | Hidroxiuréia                      |
| $\mu$               | micro                             |
| M.W. ou M.O         | Microondas                        |
| m                   | mili                              |
| M                   | Molaridade                        |
| n                   | nano                              |
| N                   | Normal ou normalidade             |
| NO                  | Óxido nítrico                     |
| P.M.                | Peso molecular                    |
| Py                  | Piridina                          |
| P.f                 | Faixa de fusão                    |
| R.M                 | Razão de mutagenicidade           |
| RMN                 | Ressonância Magnética Nuclear     |
| TEA                 | Trietilamina                      |

## **LISTA DE QUADROS**

|                                                                                  |       |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Quadro 1 – Tipos de pró-fármacos de acordo com o grupo funcional do fármaco..... | p. 32 |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------|

## **LISTA DE FIGURAS**

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Figura 01:</b> Distribuição de malária e frequência do alelo HbS na África.....                                                                                                                                                                              | p.09  |
| <b>Figura 02:</b> Distorção da hemácia falciforme em relação às hemácias normais .....                                                                                                                                                                          | p.11  |
| <b>Figura 03:</b> Patofisiologia da anemia falciforme.....                                                                                                                                                                                                      | p.13  |
| <b>Figura 04:</b> Semelhança estrutural entre os fármacos anti-inflamatórios e imunomoduladores: talidomida e lenalidomida .....                                                                                                                                | p.17  |
| <b>Figura 05:</b> Representação esquemática do princípio do teste de AMES.....                                                                                                                                                                                  | p.20  |
| <b>Figura 06:</b> Adaptação do microondas doméstico para síntese orgânica reação para obtenção de 2-fenil-1 <i>H</i> -isoindole-1,3(2 <i>H</i> )-diona(14) .....                                                                                                | p.53  |
| <b>Figura 07:</b> Retirada do hidrogênio ácido gera um ânion nucleofílico.....                                                                                                                                                                                  | p.81  |
| <b>Figura 08:</b> Atividades mutagênicas expressa pela média do número de revertentes / placa da hidroxiamina (HU), utilizando a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA100 na ausência de ativação metabólica (-S9) nas concentrações de 2,63-468 µmol/placa..... | p.153 |
| <b>Figura 09:</b> Compostos sintetizados que foram avaliados no teste de AMES .....                                                                                                                                                                             | p.156 |
| <b>Figura 10:</b> Efeito dos derivados (300 µmol/Kg), via i.p, em ensaio de edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina .....                                                                                                                         | p.160 |
| <b>Figura 11:</b> Efeito dos derivados (300 µMol/Kg), via oral, em ensaio de peritonite induzido por tioglicolato 3% em camundongo.....                                                                                                                         | p.161 |
| <b>Figura 12:</b> HU induz a expressão gênica de gama-globina em cultura de células progenitoras eritróides K562, após 48 horas do tratamento com o fármaco. ....                                                                                               | p.162 |
| <b>Figura 13</b> Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5µM, 30 µM, 60 µM e 100 µM nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na ausência de hemina.....                                                                                                  | p.164 |

- Figura 14:** Expressão de RNAm de gama globina na presença do composto VI, nas diferentes concentrações utilizadas, na ausência de hemina, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h..... p.166
- Figura 15:** Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5µM, 30 µM, 60 µM e 100 µM nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na presença de hemina.....p.167
- Figura 16:** Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5µM, 30 µM, 60 µM e 100 µM nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na presença de hemina.....p.169
- Figura 17:** Curva dose-resposta do composto IV nas concentrações de 5µM, 30 µM, 60 µM e 100 µM nos tempos 24 h, 48 h, 72 h e 96 h na ausência de hemina..... p.170
- Figura 18:** Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5µM, 30 µM, 60 µM e 100 µM nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na ausência de hemina.....p.172

**LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                                                                                                               |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tabela 01:</b> Tabela comparativa de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono da série alquílica.....                                                                         | p.73  |
| <b>Tabela 02:</b> Tabela comparativa de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono da série sulfonamídica .....                                                                    | p.74  |
| <b>Tabela 03:</b> Tabela comparativa de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono da série arílica.....                                                                           | p.75  |
| <b>Tabela 04:</b> Avaliação mutagênica nas linhagens TA 100 e TA 102 de <i>Salmonella typhimurium</i> na presença e ausência de ativação metabólica (S9) da HU, talidomida e composto I. .... | p.150 |
| <b>Tabela 05:</b> Avaliação mutagênica nas linhagens TA 100 e TA 102 de <i>Salmonella typhimurium</i> na presença e ausência de ativação metabólica (S9) dos compostos II, III e IV.....      | p.151 |
| <b>Tabela 06:</b> Avaliação mutagênica nas linhagens TA 100 e TA 102 de <i>Salmonella typhimurium</i> na presença e ausência de ativação metabólica (S9) dos compostos V e VI.....            | p.152 |
| <b>Tabela 07:</b> Viabilidade celular do composto VI em diferentes concentrações na ausência de hemina .....                                                                                  | p.165 |
| <b>Tabela 08:</b> Viabilidade celular na presença do composto VI em diferentes concentrações em função do tempo na presença de hemina.....                                                    | p.168 |
| <b>Tabela 09:</b> Viabilidade celular na presença do composto IV em diferentes concentrações em função do tempo na ausência de hemina .....                                                   | p.171 |



## LISTA DE ESQUEMAS

|                                                                                                                             |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Esquema 01</b> : Planejamento estrutural dos compostos I-VI.....                                                         | p.05  |
| <b>Esquema 02</b> : Oxidação da hidroxuréia à óxido nítrico .....                                                           | p.21  |
| <b>Esquema 03</b> : Estratégia de hibridação molecular .....                                                                | p.26  |
| <b>Esquema 04</b> : Classificação dos ligantes múltiplos (LM).....                                                          | p.27  |
| <b>Esquema 05</b> : representação esquemática do conceito de pró-fármacos.....                                              | p.29  |
| <b>Esquema 06</b> : Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos alquílicos.....                         | p.37  |
| <b>Esquema 07</b> : Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos arilsulfonamídicos.....                 | p.38  |
| <b>Esquema 08</b> : Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos arílicos.....                           | p.39  |
| <b>Esquema 09</b> : Mecanismo de reação para formação da ftalimida .....                                                    | p.76  |
| <b>Esquema 10</b> : Mecanismo de reação para formação da 2-(hidroximetil)-1 <i>H</i> -isoindol-1,3(2 <i>H</i> )-diona (8).. | p.82  |
| <b>Esquema 11</b> : Reatividade do carbono metilênico frente a reações de $SN_2$ .....                                      | p.83  |
| <b>Esquema 12</b> : Mecanismo da reação para formação de clorometilftalimida (10).....                                      | p.86  |
| <b>Esquema 13</b> : Mecanismo de formação do bromo metilftalimida (9).....                                                  | p.91  |
| <b>Esquema 14</b> : Formação do acetilnitrato .....                                                                         | p.97  |
| <b>Esquema 15</b> : Formação do pentóxido de dinitrogênio.....                                                              | p.97  |
| <b>Esquema 16</b> : Formação do nitrato de metilftalimida (COMPOSTO I).....                                                 | p.98  |
| <b>Esquema 17</b> : Mecanismo de reação para formação de <i>N</i> -fenil ftalimida (14).....                                | p.106 |
| <b>Esquema 18</b> : Mecanismo para obtenção do COMPOSTO IV .....                                                            | p.117 |
| <b>Esquema 19</b> : Mecanismo de formação dos derivados arilftalimídicos funcionalizados.....                               | p.123 |
| <b>Esquema 20</b> : Mecanismo de formação do cloreto de sulfonila (15) .....                                                | p.112 |

## LISTA DE ESPECTROS

|                                                                                                                                                                                                                                   |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Espectro 01:</b> Espectro de infravermelho da ftalimida (7) (Pastilha de KBr).....                                                                                                                                             | p.71 |
| <b>Espectro 02:</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) da ftalimida (7) ( $\text{DMSO}d_6$ ; 400 MHz).....                                                                               | p.79 |
| <b>Espectro 03:</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN $^{13}\text{C}$ ) da ftalimida (7) ( $\text{DMSO}d_6$ ; 400 MHz).....                                                                               | p.80 |
| <b>Espectro 04:</b> Infravermelho do intermediário-chave hidroximetilftalimida (8) (Pastilha de KBr).....                                                                                                                         | p.84 |
| <b>Espectro 05</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) do hidroximetilftalimida(8) ( $\text{DMSO}d_6$ ; 400 MHz))......                                                                   | p.84 |
| <b>Espectro 06:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ampliado (RMN $^1\text{H}$ ) do hidroximetilftalimida (8) ( $\text{DMSO}d_6$ ; 400 MHz).....                                                          | p.85 |
| <b>Espectro 07:</b> Espectro de infravermelho ampliado do clorometilftalimida (10) em vermelho, sobreposto ao reagente (8) em preto. (Pastilha de KBr).....                                                                       | p.88 |
| <b>Espectro 08:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) do composto clorometilftalimida (10) ( $\text{DMSO}d_6$ ; 400 MHz).....                                                           | p.89 |
| <b>Espectro 09:</b> Espectro no infravermelho do bromometilftalimida (9) (pastilha de KBr).....                                                                                                                                   | p.92 |
| <b>Espectro 10:</b> Espectro no infra-vermelho sobreposto do bromometilftalimida (9) em pastilha de KBr, sobreposto ao reagente (8) (Pastilha de KBr).....                                                                        | p.93 |
| <b>Espectro 11</b> Espectro no infravermelho sobreposto ampliado na região de estiramento axial C-Br do bromometilftalimida (9) (em preto) sobreposto ao <i>N</i> -hidroximetilftalimida (8) (em vermelho) (Pastilha de KBr)..... | p.94 |
| <b>Espectro 12:</b> Espectro no infravermelho do COMPOSTO I (Pastilha de KBr).....                                                                                                                                                | p.99 |
| <b>Espectro 13:</b> Espectro de ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio RMN $\text{H}^1$ do COMPOSTO I (em $\text{CDCl}_3d$ ; 400 MHz).....                                                                                   | p.99 |

|                                                                                                                                                                                                        |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Espectro 14</b> Espectro de ressonância Magnética Nuclear de carbono RMN $C^{13}$ COMPOSTO I (em $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                                                                          | p.100 |
| <b>Espectro 15:</b> Espectro no infravermelho do COMPOSTO II (Pastilha de KBr).....                                                                                                                    | p.103 |
| <b>Espectro 16:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO II (em $CDCl_3d$ ; 400MHz) .....                                                                  | p103  |
| <b>Espectro 17:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO II ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz) destacando os tripletos do COMPOSTO II em uma ampliação.....            | p.104 |
| <b>Espectro 18:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do COMPOSTO II (em $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                                                                  | p.104 |
| <b>Espectro 19:</b> Espectro no infravermelho da fenilftalimida (14) (Pastilha KBr).....                                                                                                               | p.108 |
| <b>Espectro 20:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) da fenilftalimida (14) relativo as regiões de $\delta$ 7,4 e $\delta$ 8,0 (em $DMSOd_6$ ).....                | p.108 |
| <b>Espectro 21:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) da fenilftalimida (14) (em $DMSOd_6$ ).....                                                                   | p.109 |
| <b>Espectro 22:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de DEPT da fenilftalimida (14) (em $DMSOd_6$ ).....                                                                                      | p.110 |
| <b>Espectro 23:</b> : Espectro no infravermelho do cloreto de sulfonila (15) (pastilha de KBr).....                                                                                                    | p.114 |
| <b>Espectro 24:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do cloreto de sulfonila (15) relativo as regiões de $\delta$ 7,4 e $\delta$ 8,0 (em $DMSOd_6$ ; 500 MHz)..... | p.114 |
| <b>Espectro 25:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do cloreto de sulfonila (15) (em $DMSOd_6$ ; 500 MHz).....                                                    | p.115 |
| <b>Espectro 26:</b> Espectro no infravermelho do COMPOSTO IV (pastilha KBr).....                                                                                                                       | p.119 |
| <b>Espectro 27:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO IV ( $DMSOd_6$ ; 500MHz).....                                                                     | p.120 |

|                                                                                                                                                                                          |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Espectro 28:</b> Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO IV ( $DMSO-d_6$ ; 500MHz) relativo as regiões de $\delta$ 7,5 a $\delta$ 8,0.....               | p.121 |
| <b>Espectro 29:</b> Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do COMPOSTO IV ( $DMSO-d_6$ ; 500 MHz). ....                                                                | p.122 |
| <b>Espectro 30:</b> Espectro no infravermelho do intermediário 25 (Pastilha KBr) .....                                                                                                   | p.125 |
| <b>Espectro 31:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do intermediário 25 ( $CDCl_3-d$ ; 400MHz).....                                                 | p.126 |
| <b>Espectro 32:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do intermediário 25 ampliação região dos tripletos ( $CDCl_3-d$ ; 400MHz).....                  | p.126 |
| <b>Espectro 33:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do intermediário 25 ( $CDCl_3-d$ ; 400 MHz).....                                                | p.127 |
| <b>Espectro 34:</b> Espectro no infravermelho do composto VI (Pastilha KBr) .....                                                                                                        | p.129 |
| <b>Espectro 35:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO VI ( $CDCl_3-d$ ; 400 MHz).....                                                     | p.129 |
| <b>Espectro 36:</b> : Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO VI ( $CDCl_3-d$ ; 400MHz) – na região entre $\delta$ 7,20 a $\delta$ 8,0. ....    | p.130 |
| <b>Espectro 37:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO VI ( $CDCl_3-d$ ; 400 MHz)– ampliação na região de $\delta$ 2,5 a $\delta$ 5,0..... | p.130 |
| <b>Espectro 38:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do composto VI ( $CDCl_3-d$ ; 400 MHz).....                                                     | p.131 |
| <b>Espectro 39:</b> Espectro no infravermelho do intermediário 19 (Pastilha de KBr) .....                                                                                                | p.135 |
| <b>Espectro 40:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do intermediário 19 ( $CDCl_3-d$ ; 400 MHz).....                                                | p.135 |
| <b>Espectro 41:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do intermediário 19 ( $CDCl_3-d$ ; 400 MHz).....                                                | p.136 |

|                                                                                                                                                        |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Espectro 42:</b> Espectro no infravermelho do intermediário 20 (Pastilha de KBr).<br>.....                                                          | p.137 |
| <b>Espectro 43:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do intermediário 20 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....               | p.138 |
| <b>Espectro 44:</b> Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do intermediário 20 em ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                        | p.138 |
| <b>Espectro 45</b> Espectro de infravermelho do intermediário 21 (Pastilha de KBr).....                                                                | p.139 |
| <b>Espectro 46:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do intermediário 21 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....               | p.140 |
| <b>Espectro 47:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do intermediário 21 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....               | p.140 |
| <b>Espectro 48:</b> Espectro no infravermelho do COMPOSTO III (Pastilha KBr).....                                                                      | p.143 |
| <b>Espectro 49:</b> : Espectro no infravermelho do composto III (azul) sobreposto ao intermediários hidroxilado (20) (vermelho) (Pastilha de KBr)..... | p.143 |
| <b>Espectro 50:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do composto III ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                   | p.144 |
| <b>Espectro 51:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do composto III ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                   | p.145 |
| <b>Espectro 52:</b> Espectro no infravermelho do COMPOSTO V (Pastilha de KBr).....                                                                     | p.146 |
| <b>Espectro 53:</b> Espectro no infravermelho do COMPOSTO V (azul) sobreposto ao intermediário hidroxilado (21) (vermelho) (Pastilha de KBr).....      | p.147 |
| <b>Espectro 54:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $H^1$ ) do COMPOSTO V ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                     | p.148 |
| <b>Espectro 55:</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN $C^{13}$ ) do COMPOSTO V ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).....                     | p.149 |

**Resumo**

A anemia falciforme é uma anemia hemolítica hereditária crônica devida à herança de um gene para a hemoglobina S, de cada um dos progenitores, e caracteriza-se pela presença de glóbulos vermelhos que, quando privados de oxigênio, tomam a forma de foice. Tem sido relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam aumento dos níveis circulantes de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). A hidroxiuréia (HU), fármaco citotóxico, é a estratégia terapêutica disponível para o tratamento, e atua como fonte de óxido nítrico beneficiando pacientes por aumentar os níveis de hemoglobina fetal (Hb F), uma hemoglobina geneticamente distinta que evita a polimerização de hemoglobina falciforme desoxigenada.

Nesse contexto, dentro de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos à protótipos de fármacos foram sintetizados uma série de compostos híbridos com propriedades inibidoras de TNF- $\alpha$  e doadoras de óxido nítrico, a fim de explorar eventual sinergismo de ação benéfico ao tratamento da anemia falciforme.

Foram sintetizados seis compostos, dos quais cinco, são derivados nitratos e um sulfonamídico. Os compostos: (1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)metil nitrato (**composto I**); (1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)etil nitrato (**composto II**); 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato (**composto III**); 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-N-hidroxibenzenosulfonamida (**composto IV**); 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato (**composto V**); 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)fenil]etil nitrato (**composto VI**), foram obtidos utilizando metodologia sintética linear, e obtidos com ótimos rendimentos globais. Todos os compostos apresentam atividade antiinflamatória em edema de orelha de camundongo, e propriedades de inibição da infiltração leucocitária. Os compostos arílicos III, IV e V apresentam menor mutagenicidade quando comparado aos compostos I, II e VI. Os compostos IV e VI apresentam atividade no ensaio com cultura de células K562, aumentando a expressão gênica de gama globina, sugerindo uma atividade potencial no aumento da hemoglobina fetal.

**Abstract**

The sickle cell disease is a chronic hereditary hemolytic anemia due to the inheritance of each one of the ancestors, to a gene for the hemoglobin S. It is characterized for the red globule presence that, when private of oxygen, they take the form of a scythe.

It has been reported that patient with sickle cell disease present increase the circulating levels of cytokines, including TNF- $\alpha$ . The hydroxyurea (HU), a cytotoxic drug, is the mainly available therapeutical strategy for the treatment which acts as nitric oxide source benefiting patient for increasing the levels of fetal hemoglobin (HbF), a kind of hemoglobin that decrease the polymerization of hemoglobin S in deoxy state.

In this context, inside of a research program that aims at the designing, synthesis and pharmacological evaluation of new drug candidates we synthesized a hybrid compounds series with properties of TNF- $\alpha$  inhibition and nitric oxide donors, acting by a synergic effect that may improve the life quality of sickle cells patients.

We had synthesized six compounds: five nitrates and one sulfonamidic. The compounds : 1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl nitrate (**compound I**); (1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethyl nitrate (**compound II**); 3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)benzyl nitrate (**compound III**); 4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-N-hydroxybenzenesulfonamide (**compound IV**); 4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)benzyl nitrate (**compound V**); 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)phenyl]ethyl nitrate (compound VI), had been synthesized using linear synthetic methodology, with good global yields. All compounds had presented antiinflammatory activity, and white blood cells infiltration inhibition properties. Aryl compounds III, IV and V had presented minor mutagenic effect when comparative to compounds I, II and VI. Compounds IV and VI, showed activity in the assay with erythroid progenitor K562 cells, increasing the genic expression of gamma globin, suggesting a potential activity to increase fetal hemoglobin.

## **I – INTRODUÇÃO**

A anemia falciforme foi uma das primeiras doenças molecularmente entendidas (PAULING *et al* 1949; INGRAM, 1957; PERUTZ, *et al*.1960). É uma anemia hemolítica hereditária crônica, devido à herança de cada um dos progenitores do gene para hemoglobina S é caracterizada por uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina, mais especificamente uma simples substituição de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon do gene  $\beta$ -globina, resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia  $\beta$ -globina variante ( $\beta^S$ -globina) (SAFO *et al* 2004).

Em ambientes com baixa tensão de oxigênio, a valina substituída pode se ligar por complementaridade à sítios hidrofóbicos de outra subunidade  $\beta$  do tetrâmero de hemoglobina, em um processo de polimerização que pode levar as hemácias a adquirir a forma de foice. A polimerização de hemoglobina S desoxigenada é o processo central da vaso-occlusão (BUNN, 1997).

Diversos outros fatores estão envolvidos na sintomatologia da doença falciforme resultado do aumento da adesão das hemácias ao endotélio vascular, modulada por fatores tais quais proteínas plasmáticas, citocinas e plaquetas (CROIZAT, 1994; DUITTS *et al* 1996; WUN, *et al* 1997).

A obstrução, principalmente da microcirculação, causado pelas células falciformes é denominado vaso-occlusão e pode levar à infarto diversos tecidos por perfusão tissular inadequada. Isso contribui para crises dolorosas, disfunção dos órgãos atingidos e, em alguns casos, levando à morte (STEINBERG, 2006).

Até o momento, não existe tratamento específico para anemia falciforme, no entanto, existem no mercado fármacos úteis ao tratamento sintomático, que melhoram a qualidade de vida dos portadores desta enfermidade. Dentre eles encontramos: 1) desferrioxamina (Desferal<sup>®</sup>), 2) hidroxiuréia (Hidrea<sup>®</sup>); 3) vacinas anti-pneumocócicas, 4) penicilina (profilática); 5) ácido fólico (doses diárias).

Diversas substâncias foram relatadas como sendo capazes de auxiliar no tratamento dos sintomas da anemia falciforme, entre essas podemos destacar: decitabina, ácidos graxos de cadeia curta, inibidores do co-transporte de  $K^+$ - $Cl^-$ , inibidores dos canais de Gardo (clotrimazol, L-arginina, dipiridamol).



A hidroxiuréia (HU), no entanto, é a mais utilizada. HU (1) é um conhecido inibidor da ribonucleotídeo redutase, usado no tratamento de uma série de desordens mieloproliferativas, e tem sido recentemente usada para tratar os sintomas da anemia falciforme (LIMA *et al* 2003).

A eficácia da HU (1) é atribuída à sua capacidade de estimular a produção de hemoglobina fetal (Hb F), diminuindo a concentração de Hb S e, conseqüentemente, o número de episódios de crises dolorosas (RODGERS, 1990).

A capacidade de HU em aumentar Hb F varia entre os diversos pacientes, sugerindo que a HU pode beneficiar os pacientes através de outros mecanismos, incluindo alterações na interação hemácia-endotélio vascular, melhora nas propriedades reológicas das células vermelhas. A HU também atua como fonte de óxido nítrico, que exerce importante papel na manutenção da pressão e do fluxo sanguíneo. Muito interesse tem sido gerado para o entendimento dos aspectos benéficos do óxido nítrico para o tratamento da anemia falciforme (HUANG, 2004).

Recentemente, foi relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam significativo aumento dos níveis circulantes de citocinas, incluindo o TNF- $\alpha$  (MALAVÉ, *et al* 1993). O TNF- $\alpha$  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 PGE<sub>2</sub>. Esta citocina também induz mudanças nas propriedades coagulantes e anticoagulantes.

Desta forma, o aumento dos níveis sanguíneos de TNF- $\alpha$ , 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).

A talidomida (3), usada como hipnótico e sedativo nas décadas de 50 e 60, foi retirada do mercado devido ao seu perfil teratogênico. Em 1965, Jacob Sheskin, médico israelita, observou redução da dor e do processo inflamatório associado ao leproma de pacientes com hanseníase que eram medicados com talidomida. Esse efeito ocorria devido à capacidade desse fármaco modular a síntese de TNF- $\alpha$ . Estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que a

subunidade ftalimida da talidomida era o farmacóforo para inibição dessa citocina pró-inflamatória (LIMA, 2001).

Assim, a inibição do TNF- $\alpha$ , associado a um aumento de NO (2), poderia gerar regulação dessa citocina pró-inflamatória, e maior equilíbrio das propriedades anti e pro-coagulantes. Ademais, o NO (2), conhecido por suas propriedades vasodilatadoras do endotélio vascular, auxiliaria os pacientes e contribuiria estimulando a síntese de gama globina, (constituente da cadeia da hemoglobina fetal – Hb F) aumentando a produção de Hb F.

## **II- OBJETIVOS**

### Objetivo geral

Este trabalho visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de protótipos potencialmente ativos contra os sintomas da anemia falciforme, que constituam alternativa para a redução dos efeitos colaterais e adversos dos compostos disponíveis na terapêutica, melhorando assim a qualidade de vida do paciente falcêmico.

### Objetivos específicos

5.1- Síntese de compostos híbridos, desenhados pela estratégia de hibridação molecular e planejados como inibidores do TNF- $\alpha$  e doadores de óxido nítrico.

5.2 – Avaliação da atividade mutagênica dos novos compostos sintetizados e comparação com os padrões hidroxiuréia e talidomida, através do teste de AMES.

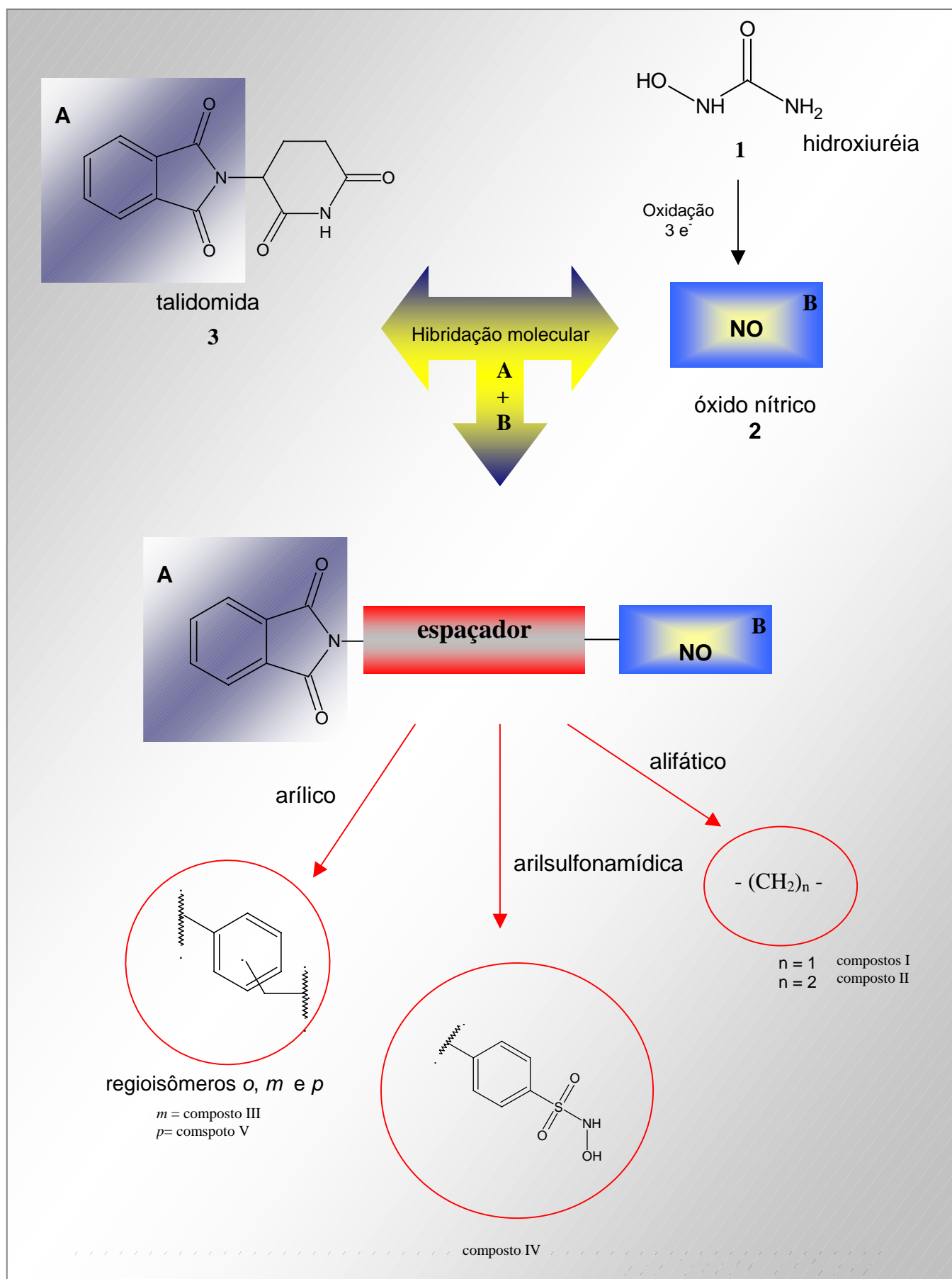
5.3 – Avaliação da atividade antiinflamatória dos compostos sintetizados, através do ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina.

5.4 – Avaliação da atividade *in vitro* dos compostos sintetizados, para avaliação da produção de hemoglobina fetal em culturas de células eritroleucêmica K562.

5.5 – Avaliação da atividade de doação de NO e inibição de TNF- $\alpha$  para constatação do caráter dual dos compostos sintetizados.

## III – Planejamento estrutural

Esquema 01: Planejamento estrutural dos compostos I-VI



A partir da hibridação molecular da talidomida (subunidade A) e hidroxiuréia (subunidade B), foi planejado uma série de novos derivados ftalimídicos (I – VI), desenhados como inibidores de TNF- $\alpha$  e doadores de óxido nítrico (esquema 01).

Sabe-se que a hidroxiuréia (1) após oxidação, produz óxido nítrico (2), e esse seria o responsável por uma série de eventos benéficos como aumento de hemoglobina fetal em pacientes falciformes (HUANG, 2004).

A talidomida (3) é conhecida por suas propriedades analgésicas periféricas e antiinflamatórias, decorrentes da inibição da expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  (RIBEIRO *et al* 2000). Mais especificamente, a subunidade ftalimídica (A), grupo farmacofórico principal para a ação moduladora direta sobre biossíntese de TNF- $\alpha$ , foi mantida nos derivados planejados (I – VI). (LIMA *et al* 2001; HASHIMOTO, 2002)

A inibição de TNF- $\alpha$  associada à capacidade de doação de óxido nítrico representa uma nova abordagem para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Assim, planejou-se uma série de compostos híbridos, através da supressão da subunidade glutamirídica da talidomida, potencialmente toxicofórica (LIMA, 2001), que por unidades espaçadoras alquílicas (I e II), arílicas (III, V e VI) e arilsulfonamídicas (IV), entre as subunidades farmacofóricas A e B (esquema 01) de modo a assegurar o caráter dual antecipado como benéfico ao tratamento sintomático da anemia falciforme. Ademais se pretendeu estudar a contribuição particular de cada subunidade espaçadora no aumento ou diminuição das atividades desejadas.

Os compostos I e II foram obtidos por homologação da cadeia alquílica espaçadora, sendo respectivamente os derivados metilênico e etilênico. A partir desses foram desenhados a série interferenilênica III e V, análoga de I. O composto VI é derivado interferenilênico análogo de II. O derivado sulfonamídico IV, foi obtido por hibridação da hidroxiuréia, e da fenilftalimida, em que o grupamento sulfona (SO<sub>2</sub>), foi introduzido explorando o isosterismo clássico com a carbonila (C=O) presente na hidroxiuréia.

## **IV - Revisão Bibliográfica**

### **1. Histórico**

A anemia falciforme é uma das doenças hematológicas mais comuns em todo o mundo, atingindo expressiva parcela da população dos mais diferentes países.

Em 1910, James Herrick relatou um caso de anemia, um pouco diferenciada, em um jovem estudante indiano. Apartir de então, uma série de descobertas permitiram o entendimento molecular da doença falciforme.

Linus Pauling e colaboradores usaram eletroforese para comparar hemoglobina (Hb) S com a hemoglobina de adulto normal, a Hb A, e descobriram que o ponto isoelétrico da hemoglobina falciforme é maior do que a da hemoglobina normal em ambos os estados, oxigenado e desoxigenado. Essas observações sugeriram que existe uma diferença no número ou tipo de grupos ionizáveis nas duas hemoglobinas (PAULING *et al* 1949).

Em 1948, Janet Watson descreveu que os sintomas da anemia falciforme, apareciam em crianças, logo após a diminuição dos níveis de Hb fetal, sugerindo uma possível relação benéfica no aumento dos níveis de Hb F (WATSON, STAHLMAN, & BILLELO, 1948).

Em 1954, Vernon Ingram descobriu que a Hb A, de pacientes normais, diferia em apenas um único resíduo de aminoácido da Hb S, presente em pacientes falciformes. Determinou ainda que Hb S continha valina ao invés de glutamato na posição 6 da cadeia beta (INGRAM, 1957).

Em 1960, Perutz decifrou a estrutura e a função molecular da hemoglobina (PERUTZ, *et al* 1960).

## **2. Epidemiologia e origem da anemia falciforme**

A anemia falciforme é a doença hematológica hereditária mais comum que afeta o homem. Os distúrbios falciformes eram conhecidos há tempos na África, e estima-se que tenha surgido nos países do centro-oeste africano, da Índia e do leste da Ásia, há cerca de 50 a 100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico (WHO, 1982). Na África, alguns indivíduos afetados eram identificados por tatuagens nos membros e cintura.

A maior prevalência de Hb S é na África tropical e, entre negros em países que participaram do tráfico de escravos.

Nos Estados Unidos, a anemia falciforme afeta aproximadamente 1 em cada 350 recém-nascidos afro-americanos por ano, e aproximadamente 72 000 indivíduos no total. A anemia falciforme é a doença hematológica genética mais prevalente nos Estados Unidos (BONDS, 2005).

Embora haja uma maior incidência na raça negra, os brancos, particularmente os que são provenientes do mediterrâneo (Grécia, Itália, etc.), Oriente Médio, Índia, apresentam a doença.

No Brasil, cerca de 8% dos afro-descendentes tem o que é chamado de traço falcêmico. A organização Mundial de Saúde estima que anualmente nascem no Brasil em torno de 2 500 crianças com anemia falciforme (ROCHA, 2004).

Antes deste século, a maioria dos indivíduos com anemia falciforme morria antes da idade reprodutiva. A manutenção do gene foi permitida pela heterozigose, em indivíduos com o traço falcêmico.

Diante deste quadro é possível deduzir-se que a miscigenação racial existente no Brasil está gerando a continuidade desta anemia, conforme ratifica a literatura científica brasileira, apontando de forma contundente que anemias hereditárias no país constituem um grave problema de saúde pública (<http://www.geocities.com/afalciforme/historic.html> acessado dia 04/10/2006).

Se observarmos a figura 01, veremos que distribuição geográfica das hemoglobina S, na África, geralmente favorece áreas onde a forte seleção natural tem estado presente na morbidade e mortalidade originada pela malária. Tem sido associada a grande presença do traço falciforme em regiões endêmicas para malária como uma forma de proteção seletiva contra as formas

mais letais de malária. O mecanismo para essa proteção é pouco entendido, mas sabe-se que *in vitro* há diminuição da invasão, crescimento e desenvolvimento de *P. falciparum* em hemácias com diminuída tensão de oxigênio (WILLIAMS *et al* 2005). Ademais, a remoção seletiva de células falciformes da circulação provavelmente reduz o grau de parasitemia e limita substancialmente o processo infeccioso (LEE *et al* 1998). O fato desta mutação deletéria permanecer em nosso genoma é um sinal da forte pressão que a malária exerce em nossa evolução (CARUCCI, 2004).

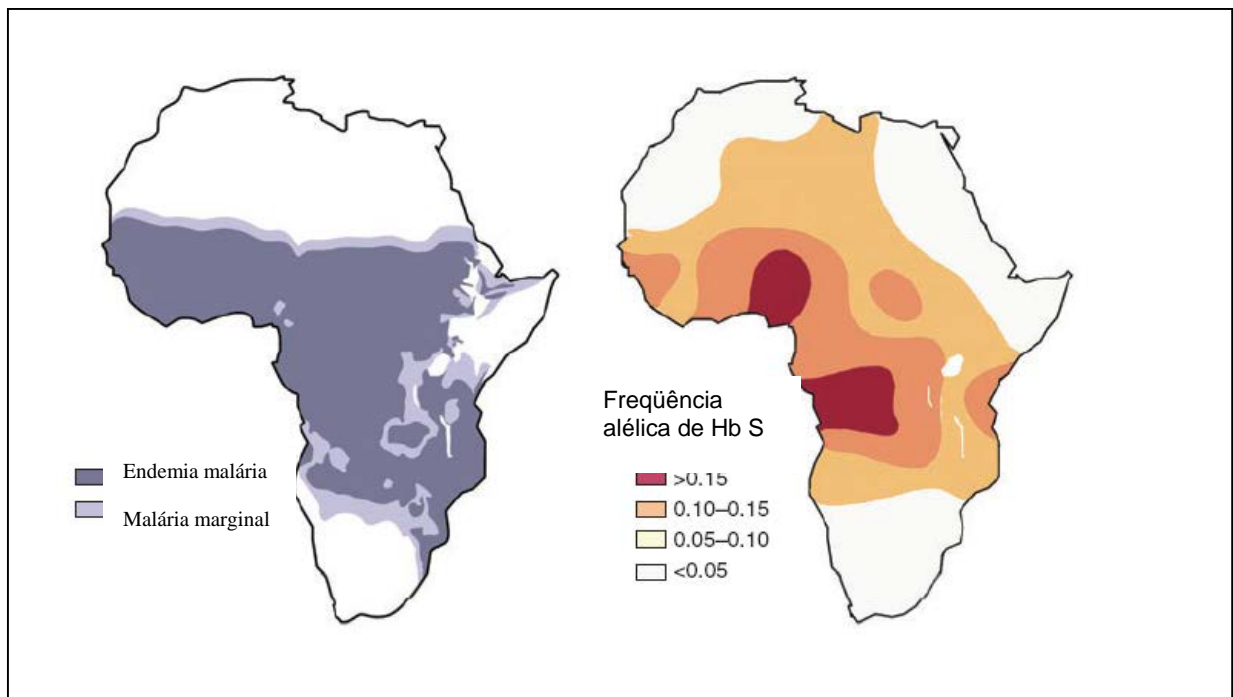


Figura 01: Distribuição de malária e frequência do alelo HbS na África. (adaptado de WELLENS & FAIRHURST, 2005)

### 3. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é a mais prevalente doença genética hematológica conhecida caracterizada por uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina, mais especificamente uma simples substituição de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon do gene  $\beta$ -globina, resultando na substituição de um ácido



glutâmico por valina na superfície da cadeia  $\beta$ -globina variante ( $\beta^s$ -globina) (SAFO *et al* 2004).

A hemoglobina normal do adulto é formada por meias moléculas idênticas, cada uma das quais contendo duas cadeias de polipeptídeos diferentes. Essas cadeias são chamadas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Mais de 96% da hemoglobina normal de um adulto é chamada de Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ). Hb A<sub>2</sub> representa cerca de 3% das hemoglobinas, e não tem significado clínico importante, é constituída de duas cadeias alfa e duas cadeias delta ( $\alpha_2\delta_2$ ).

A hemoglobina falciforme (Hb S) é um tetrâmero contendo duas cadeias globínicas alfa e duas cadeias beta globínicas falciforme, onde houve uma mutação pontual do sexto códon do gene da  $\beta$ -globina. A hemoglobina fetal (Hb F) é predominante na vida fetal, mas declina rapidamente após o nascimento e representa em adultos menos de 1%, mas essa proporção pode ser maior em indivíduos falciformes. A Hb F é um tetrâmero contendo duas cadeias globínicas alfa e duas cadeias gama globínicas ao invés de beta globínicas como em Hb A e Hb S (STEINBERG, 2006).

A substituição do glutamato por uma valina tem consequências profundas na estrutura tridimensional da hemoglobina. O ácido glutâmico é carregado negativamente e a valina é um aminoácido neutro, isso permite a aproximação das moléculas de hemoglobina e, conseqüentemente, a polimerização, quando desoxigenada. Na conformação desoxi da Hb S, a valina hidrófoba colocada neste local em cada cadeia  $\beta$  forma um contato hidrófobo com um bolso em uma molécula de Hb S vizinha (na conformação oxi, o bolso é inacessível), o que não é possível no estado oxigenado (ADACHI *et al* 1988).

Esta interação leva à polimerização da desoxi Hb S em baixas pressões de oxigênio típicas dos leitos capilares em tecidos metabolicamente ativos (BALLAS & MOHONDAS, 1996).

A polimerização de hemoglobina falciforme (Hb S) é o processo central da vaso-oclusão (BUNN, 1997; KAUL *et al*, 1996). É iniciada pela nucleação homogênea, formando um núcleo crítico individual, e prossegue com o crescimento do polímero e a nucleação heterogênea, levando a formação de espirulitas (FERRONE *et al* 1985 a e b; SAMUEL *et al* 1993).

Sabe-se que a etapa determinante da velocidade de agregação esta atribuída à formação dos tetrâmeros de Hb S, que se agregam e arranjam-se em fibras maiores, também denominadas tactóides (GALKIN & VEKILOV 2004; ADACHI *et al* 1988).

Devido à polimerização intracelular da hemoglobina, por conta dos ciclos de oxigenação-desoxigenação, células contendo Hb S adquirem um formato de foice (Figura 02).



Figura 02: Distorção da hemácia falciforme em relação as hemácias normais (retirado de <http://sna.saude.gov.br/?id=312> acessado em 08 de abril de 2005)

A falcização das hemácias está associada às alterações reversíveis da membrana. Com repetidos ciclos de falcização/desfalcização, as aberrações na função e estrutura da membrana tornam-se cada vez mais pronunciadas, culminando na fixação da membrana na forma falcizada (LEE *et al* 1998).

Mesmo com oxigenação vigorosa, cerca de 5% a 50% das células de indivíduos com anemia falciforme, permanecem na forma anormal de foice, não assumindo a forma normal.

As hemácias falciformes demonstram uma aderência anormal ao endotélio vascular, monócito e macrófagos (DUITS *et al*, 1996; OKPALA *et al*, 2002). Esta propriedade do sangue falciforme é conferida pelas células falciformes deformáveis e não pelas irreversivelmente falciformes, talvez porque as células rígidas sejam incapazes de formar contatos de superfície múltiplos com as células endoteliais. Esse fato denota uma forte correlação positiva com a frequência e gravidade das crises dolorosas. As áreas de turbulência nos capilares são os locais predominantes para a aderência.

## **Vaso-oclusão**

A oclusão vascular é a principal responsável pelo quadro clínico da anemia falciforme, sendo a causa das crises álgicas e da falência de órgãos.

Conforme podemos visualizar na figura 03, na fisiopatologia da vaso-oclusão, há ocorrência de uma série de eventos, que se iniciam com a polimerização da hemoglobina S, no estado desoxigenado; há diminuição da flexibilidade das hemácias, seguido pelo fenômeno de oclusão da microcirculação. A oclusão da microcirculação é resultado da interação das células falciformes, com as células do endotélio vascular e leucócitos (Figura 3a). Como consequência há hipóxia e a lesão tissulares disparando o estímulo doloroso.

Os polímeros de Hb S causam dano ao citoesqueleto do eritrócito (figura 03; b), levando a formação de células com aparência foicizada. Essas se apresentam com redução no conteúdo de água e cátion, e alteração na distribuição da membrana lipídica.

Na figura 3c, pode-se visualizar que algumas hemácias hemolizam intravascularmente. Essa lise libera hemoglobina na circulação, que seqüestra óxido nítrico, levando o paciente falciforme ao fenótipo denominado “vasoconstritor” (STEINBERG, 2006).

Pacientes com anemia falciforme sofrem repetidos eventos vaso-oclusivos caracterizados por injúria isquêmica e inflamação.

As crises vaso-oclusivas iniciam-se na microcirculação venular, com o aprisionamento das células falcêmicas. Os eventos primários cruciais para vaso-oclusão incluem adesão de eritrócitos (reticulócitos e células densas deformadas) ao endotélio venular. A adesão de leucócitos ao endotélio com formação de agregados heterocelulares (leucócitos e células falcêmicas) também contribuem para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento da formação de polímeros de Hb S, e propagação da oclusão da vasculatura adjacente. Transmigrações neutrofílica através das junções gap endoteliais aumentam a inflamação na microvasculatura (OKPALA *et al*, 2002; OKPALA, 2004).

Massas de hemácias falciformes entopem repetidamente os vasos da microcirculação, levando as crises de oclusão vascular dolorosas. 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. (A patogênese da lesão à parede arterial, resulta de lesão à célula endotelial por células falciformes aderentes ou da oclusão por estas células dos vasos que nutrem a parede arterial).

Tem sido relatado, que o aumento de hemoglobina fetal é benéfico ao paciente falciforme, aumentando sua sobrevivência e diminuindo os episódios de dor (CHARACHE *et al* 1992).

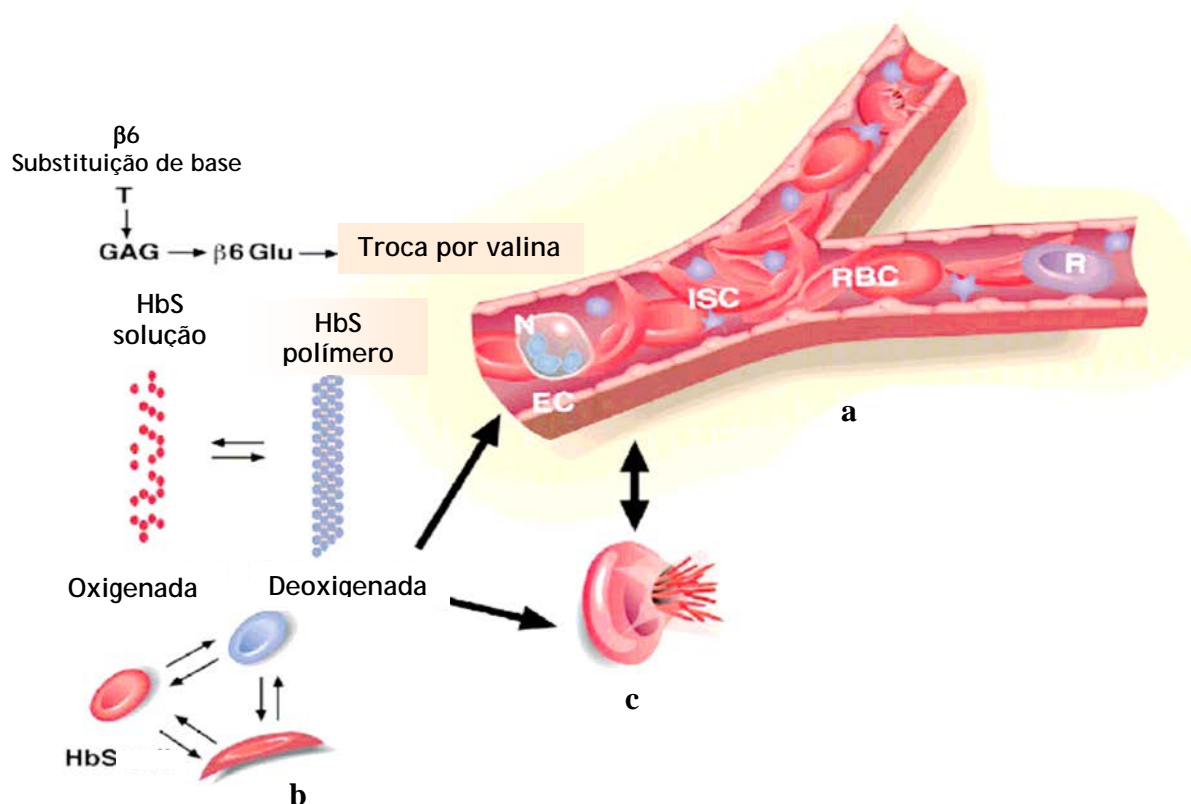


Figura 03: Patofisiologia da anemia falciforme (adaptada de STEINBERG, 2006: EC: endotélio vascular; N: neutrófilo; ISC: célula irreversivelmente falciforme; RBC: eritrócito; R: reticulócito; a) vaso-oclusão causada pelas hemácias falciformes; b) processos constantes de oxigenação e deoxigenação levando a formação da célula em forma de foice; c) lise da hemácia.

#### 4.1 – Relação da anemia falciforme com o aumento de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de proteção, cujo objetivo em última instância é livrar o organismo tanto da causa inicial da agressão celular (e.g.: micróbios, toxinas) quanto das conseqüências dessa agressão – células e tecidos necróticos. A resposta inflamatória pode ser desencadeada a partir de estímulos de natureza física, química ou biológica.

Durante o processo inflamatório temos a participação de vários mediadores químicos, entre eles as diferentes citocinas. As citocinas são polipeptídeos produzidos por células de vários tipos, principalmente linfócitos ativados e por macrófagos que modulam a função de outros tipos celulares. Desempenham papéis importantes na resposta inflamatória e imunomoduladora, e as principais citocinas mediadoras do processo inflamatório são: interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$  e  $\beta$ , e a família da IL-8 (CONTRAN, 1996).

Dados clínicos e experimentais mostram que uma maior expressão de TNF- $\alpha$  está relacionado a distintas patologias de origem inflamatória (MAKHANTADZE, 1998).

Recentemente, tem sido relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam significativo aumento dos níveis circulantes de citocinas, incluindo o TNF- $\alpha$  (MALAVÉ *et al* 1993; FRANCIS *et al.* 1992.; BUCHANAN *et al* 2004).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica possuindo atividades pró-inflamatórias e imunoreguladoras (MIYACHI *et al* 1997). É biossintetizado em um precursor ancorado à membrana plasmática, que sofre clivagem proteolítica por uma metaloenzima, zinco dependente, denominada TACE (enzima conversora do fator de necrose tumoral) (BLACK, 1997; LUKACOVA, *et al* 2005).

Atualmente são conhecidos dois tipos de fator de necrose tumoral: o TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  (linfotoxina), que são biossintetizados principalmente por monócitos e macrófagos ativados (TNF- $\alpha$ ) e por linfócitos (TNF- $\beta$ ). As atividades de ambas citocinas, são muito semelhantes, *in vivo* e *in vitro*, embora sejam moléculas antigênicamente distintas. São conhecidos 2

receptores de TNF: o TNF-R1 ou TNF-p55 e TNF-R2 ou TNF-p75 (LIMA, 2001 b).

Além dos macrófagos, o TNF- $\alpha$  pode também ser produzido por linfócitos T e células natural killer (NK). O TNF- $\alpha$  exerce efeitos pró-inflamatórios aumentando as propriedades quimiotáticas, aumentando a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular devido ao aumento das moléculas de adesão, também estimula produção de radicais livres, e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE<sub>2</sub>. O TNF- $\alpha$  também induz mudanças nas propriedades coagulantes e anticoagulantes e aumenta a síntese hepática de alguns reagentes de fase aguda. Ademais, TNF- $\alpha$  é um importante mediador da síndrome séptica e do choque endotóxico, sendo capaz de suprimir a biossíntese de lipases lipoproteicas e enzimas lipogênicas em tecido adiposo, prejudicando o armazenamento de lipídeos nos adipócitos.

Conforme comentado, TNF- $\alpha$  é capaz de alterar as propriedades anticoagulantes do endotélio vascular e induzir a atividade pró-coagulante na superfície celular do endotélio, estimulando a produção do fator de ativação de plaquetas (PAF), e aumentando a adesão leucocitária às células do endotélio vascular, resultando no aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, dificultando a circulação, exacerbando a estase microvascular e a desoxigenação de Hb S.

Desta forma, o aumento dos níveis sanguíneos de TNF- $\alpha$ , 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).

De fato, Malavé e colaboradores (1993), relataram interessante correlação inversa entre a porcentagem de hemoglobina fetal (Hb F) e a concentração sérica de TNF- $\alpha$ . Estes autores demonstraram que pacientes com altos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  apresentam consequente diminuição dos níveis de Hb F. Considerando que a Hb F possui efeito benéfico, melhorando a oxigenação tecidual e diminuindo a polimerização de Hb S, tal correlação inversa potencializa os riscos de acidentes vasculares e concomitantemente dos sintomas associados à anemia falciforme.

Portanto, a inibição do TNF- $\alpha$  tem sido demonstrada como importante estratégia para prevenção de complicações vasculares e inflamatórias relacionadas à doença falciforme.

Diversas substâncias têm sido relatadas possuindo ação direta sobre a inibição de TNF- $\alpha$ . Entre elas destacam-se os inibidores de TACE, anticorpos neutralizantes (infliximab), e fármacos estruturalmente relacionados à talidomida (3).

O primeiro protótipo de fármaco inibidor do TNF- $\alpha$  foi a talidomida (3) (Figura 06). Este fármaco, comercializado como sedativo em 1950, e mais tarde usado na prevenção de náuseas em mulheres grávidas, foi responsável pelo surgimento de diversas mal formações congênitas, sendo proscrito na década de 60, face a constatação de sua elevada teratogenicidade. Entretanto, em 1965, o médico israelita Jacob Sheskin observou melhora significativa do processo inflamatório e doloroso em pacientes com hanseníase tratados com talidomida. Este achado fortuito reacendeu o interesse neste fármaco que foi aprovado pela agência norte-americana FDA em 1998 para tratamento da hanseníase.

Diversos laboratórios e grupos de pesquisa têm relatado as propriedades antinflamatórias e imunomoduladoras da talidomida (3), demonstrando seu potencial terapêutico frente ao tratamento de patologias como mieloma múltiplo, cachexia, tuberculose, artrite, entre outras (MIYACHI, 1997; LIMA, 2001).

O TNF- $\alpha$  tem um papel importante na hiperalgesia periférica, e sua inibição tem sido associada à redução da dor. Verificou-se que o efeito analgésico periférico da talidomida está relacionado à inibição dessa citocina pró-inflamatória (RIBEIRO *et al* 2000).

Assim sendo, o desenvolvimento de novos análogos da talidomida (3), contendo os principais farmacóforos para a atividade inibidora do TNF, e desprovida dos grupamentos toxicofóricos, responsáveis pela teratogenicidade, constitui objetivo ímpar para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas para o tratamento de patologias associadas ou agravadas pelo aumento dos níveis plasmáticos de TNF, a exemplo da anemia falciforme.

Estudos de relação estrutura-atividade da talidomida (3) e análogos, demonstraram o caráter farmacofórico da subunidade ftalimídica, e a irrelevância da subunidade glutamirídica (SHIBATA, 1995). A fim de compreender a relação-estrutura atividade de derivados do núcleo ftalimídico, e

potencializar o efeito inibidor de  $\text{TNF-}\alpha$ , foi realizada uma série de substituições na subunidade ftalimídica (MIYACHI, 1997).

A busca de protótipos mais potentes na inibição de  $\text{TNF-}\alpha$ , levou à descoberta da lenalidomida (4) (Figura 06), aprovada pelo FDA em dezembro de 2005 para o tratamento da síndrome mielodisplásica, que é cerca de 2000 vezes mais potente que a talidomida na inibição dessa citocina (ÁVILA *et al* 2006).

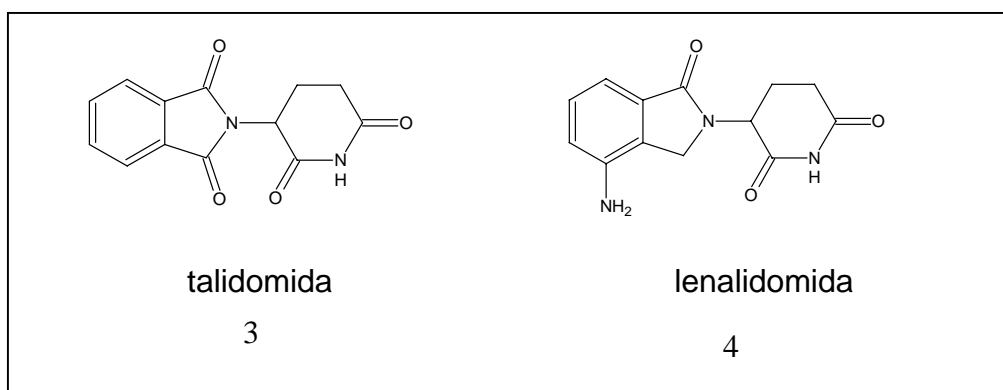


Figura 04: Semelhança estrutural entre os fármacos antiinflamatórios e imunomoduladores: talidomida e lenalidomida.

## 6 – TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

Até o momento, não existe tratamento específico para a anemia falciforme, no entanto, existem no mercado fármacos úteis ao tratamento sintomático, que melhoram a qualidade de vida dos portadores desta patologia. Dentre eles encontramos: 1) desferrioxamina (Desferal<sup>®</sup>), 2) hidroxuréia (Hydrea<sup>®</sup>), 3) vacinas anti-pneumocócicas, 4) penicilina profilática, 5) ácido fólico (doses diárias).

A desferrioxamina (Desferal<sup>®</sup>) é uma medicação que tem como objetivo a remoção do excesso de ferro do corpo, resultante das transfusões periódicas, estes excessos localizam-se principalmente no coração e fígado. Pode ser aplicado via infusão subcutânea lenta (sob a pele). É aplicado quatro a sete vezes por semana, dependendo da sobrecarga de ferro. O Desferal<sup>®</sup> também é disponível para infusão venosa.



Cabe mencionar que outras diversas substâncias tem sido relatadas como potencialmente úteis no tratamento da anemia falciforme, dentre as quais destacam-se a decitabina, ácidos graxos de cadeia curta, inibidores do co-transporte de  $K^+-Cl^-$ , inibidores dos canais de Gardo (clotrimazol, L-arginina, dipiridamol).

A decitabina (2-deoxi-5-azacitidina) é o análogo menos tóxico da 5-azacitidina que pode afetar os níveis de hemoglobina fetal (Hb F) causando hipometilação dos genes da  $\gamma$ -globina. A decitabina aumenta a produção de hemoglobina fetal, e tem se tornado uma alternativa para aumentar a hemoglobina fetal em pacientes que não respondem a hidroxiuréia (KOSHY *et al* 2000).

Os ácidos graxos de cadeia curta atuam como inibidores da histona deacetilase (HDAC), causando hiperacetilação das histonas e mudando a estrutura da cromatina. Ácidos graxos de cadeia curta e seus derivados, e outros compostos com atividade HDAC pode aumentar a expressão do gene  $\gamma$ -globina em células eritróides de pacientes com anemia falciforme e  $\beta$  talassemia (BUCHANAN *et al* 2004). Uma série de derivados ftalimídicos, contendo a subunidade ácido hidroxâmico, tem sido relatados como inibidores da histona deacetilase (SHINJI *et al* 2005).

Butiratos e outros ácidos graxos de cadeia curta, aumentam a produção de hemoglobina fetal em modelos *in vitro* e *in vivo* (ATWEH *et al* 1999). No entanto, nenhum inibidor HDAC como butirato e fenilbutirato é liberado para uso clínico e tem sido utilizado somente na pesquisa.

O clotrimazol é um inibidor do canal de Gardo em eritrócitos, mas seu uso foi associado com hepatotoxicidade celular reversível. Este composto encontra-se em estudo de fase II para anemia falciforme, e observou-se que a densidade celular e a hemólise diminuía enquanto a concentração de hemoglobina aumentava.

A L-arginina é um precursor de óxido nítrico, e tem se mostrado como alternativa de tratamento da anemia falciforme por diminuir a agregação plaquetária e reverter a disfunção endotelial, podendo ser útil principalmente na prevenção das crises vaso-oclusivas (MORRIS *et al* 2000).

Potenciais agentes anti-aderente tem sido estudado em eventos de crise dolorosa aguda, onde, através de mecanismos pouco entendidos, eles melhoram a isquemia tecidual. O polaxamer 188 é um co-polímero surfactante não iônico que reduz a duração e aumenta a resolução de episódios de crise aguda, um efeito especialmente notado em crianças com menos de quinze anos e pacientes recebendo tratamento com hidroxiuréia (ORRINGER *et al* 2001).

Aldeídos heterocíclicos com anel de 5 membros, incluindo 5-hidroximetil-2-furfural, aumentam a afinidade de hemoglobina pelo oxigênio, e inibe potencialmente a foicização de Hb S, por se ligar e estabilizar a hemoglobina. (SAFO, 2004). Esses compostos foram patenteados, e tem se mostrado como uma alternativa para o tratamento da patologia (SAFO *et al* 2005).

### **6.1 – Hidroxiuréia (1)**

A Hidroxiuréia (HU) (figura 08) é um conhecido inibidor da síntese de ribonucleotídeo redutase, que é a enzima que converte ribonucleotídeos à deoxiribonucleotídeos, e limita assim a síntese de DNA. Consequentemente a HU é um agente antineoplásico e citotóxico que interrompe o ciclo celular nas fases S e G1 (YABRO, 1992; HANFT *et al* 2000).

HU é o principal fármaco disponível para o tratamento de anemia falciforme liberado pela agência norte-americana FDA (Food and Drug Administration) (BUCHANAN *et al* 2004; STUART *et al* 2004).

Recentes estudos têm demonstrado que a terapia com hidroxiuréia (HU) reduz em 40% as mortes associadas à anemia falciforme. O benefício terapêutico da HU baseia-se no aumento dos níveis de hemoglobina fetal (Hb F), uma hemoglobina geneticamente distinta que inibe a polimerização de hemoglobina falciforme (Hb S) deoxigenada, impedindo ou dificultando o surgimento de sintomas relacionados a esta patologia (STEINBERG, 2003.; CHARACHE, 1996).

Outros mecanismos de ação da HU estão descritos e incluem: alteração dos eritócitos – interação endotelial, melhora nos aspectos reológicos das células vermelhas, melhorando o fluxo pelos vasos sanguíneos e mielossupressão. (SPACE *et al*, 2000; STEINBERG, 2003). Ademais, a HU

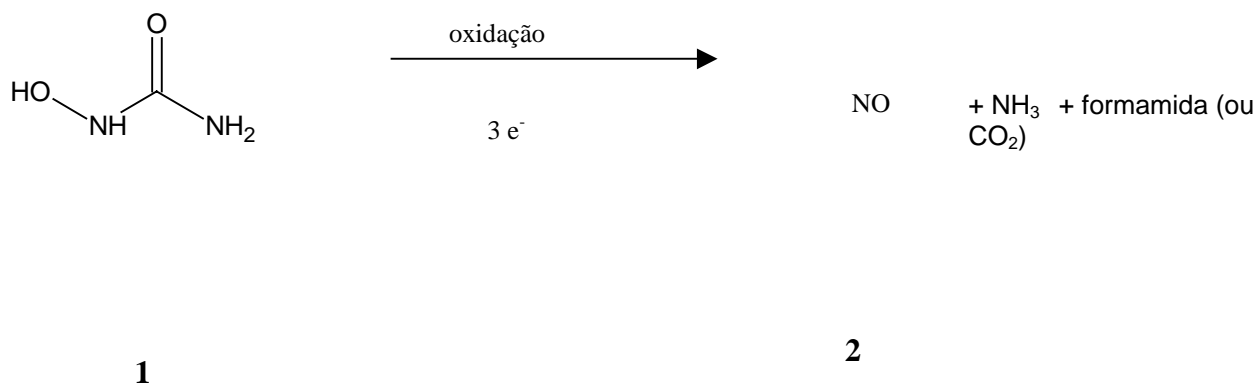
também atua como fonte de óxido nítrico (NO), o qual possui papel importante na manutenção do fluxo e da pressão sanguínea normal, representando considerável atividade na melhora do quadro falcêmico.

De fato, o óxido nítrico (2) exerce papel importante no tratamento da patofisiologia da anemia falciforme. Pacientes falcêmicos tem demonstrado um nível elevado de hemoglobina livre (hemoglobina no plasma fora das células vermelhas) que rapidamente sequestra quantidades micromolares de óxido nítrico, reduzindo sua biodisponibilidade. Dessa forma, há uma inibição dos efeitos vasodilatadores do NO em pacientes falcêmicos (KING, 2004).

Sabe-se que HU reage com oxi e deoxihemoglobina, para formar metemoglobina, que então reage com outra molécula de HU para formar hemoglobina ferro nitrosilada (HbNO). A formação de HbNO envolve uma série de reações da subunidade hidroxilamínica, para formação de NO (COKIC, 2006).

O óxido nítrico (2) também estimula a produção de hemoglobina fetal (Hb F) através da via de guanilato ciclase solúvel (sGC). A ativação de sGC aumenta a expressão de  $\gamma$  globina em células eritroleucêmicas e eritroblastos humanos primários. A inibição de sGC previne esse aumento, o que sugere que a via sGC regula a expressão de  $\gamma$  globina, e consequentemente a síntese de hemoglobina fetal (Hb F). Trabalhos tem demonstrado esta hipótese, mostrando que a HU, ativa sGC, e também induz a expressão de RNAm  $\gamma$  globina, aumentando os níveis de hemoglobina fetal (Hb F) em células eritroleucêmicas K562 e células progênitoras humanas. (CONRAN *et al* 2004.)

Estes resultados indicam que a indução de Hb F mediada por NO induz a ativação de sGC e dá suporte a estratégia terapêutica baseada em óxido nítrico para pacientes com anemia falciforme. Estes resultados indicam a importância do NO na fisiopatologia e no tratamento da anemia falciforme. A produção de NO através da HU requer uma oxidação que ocorre no fígado, e há produção de formamida ou dióxido de carbono e amônia, dependendo se na oxidação ocorrida houve transferência de 1 ou 2 elétrons, respectivamente, conforme ilustra o Esquema 1 (KING, 2003).



Esquema 2 : Oxidação da hidroxiuréia à óxido nítrico

A HU (1) reage rapidamente com o grupo heme, e agentes oxidantes para produzir NO, sendo assim, a hidrólise da hidroxiuréia em hidroxilamina produz um mecanismo alternativo para formação de NO (2) , potencialmente compatível com o aumento clínico observado de metabólitos do NO durante terapia com HU ( KING, 2004).

Tem sido relatado que doadores de óxido nítrico podem aumentar a expressão gênica de gama globina, e podem ser uma alternativa no tratamento dos sintomas da anemia falciforme (COKIC, 2003).

Estudos de relação entre a estrutura química e atividade da HU tem demonstrado que a substituição da subunidade acilidroxilamina leva a perda de atividade. O átomo de nitrogênio dessa subunidade N-hidroxi não deve ser substituída, além disso, o nitrogênio de amida primária deve possuir um hidrogênio livre; grupos volumosos dissustituídos nessa subunidade levam a abolição da atividade, no entanto se houver substituição de um hidrogênio por um grupamento arila, a atividade chega a ser cerca de 80 vezes superior a da hidroxiuréia. Estes resultados sugerem que outras moléculas possuam capacidade de doação de NO superior a do protótipo hidroxiuréia (HUANG *et al* 2003).

A despeito dos efeitos tóxicos relatados ao uso crônico da HU, a redução da mortalidade e da morbidade em pacientes falcêmicos tratados com HU, justifica a continuação de seu uso clínico, na ausência de outra opção terapêutica mais segura e eficaz para o tratamento da anemia falciforme.

## **7 - Modificações moleculares**

O processo de descoberta de novos fármacos caracteriza-se pela multiplicidade de fatores que devem ser considerados durante a etapa de planejamento molecular de estruturas que apresentem os efeitos farmacológicos pretendidos, como biodisponibilidade, segurança e comodidade ao paciente. Além dos aspectos farmacocinéticos, a descoberta de novos fármacos deve levar em consideração a toxicidade e o metabolismo (BARREIRO, 2002).

O planejamento racional de novos fármacos é um processo multietapas e interdisciplinar, onde participam diversos profissionais, e estimativas recentes apontam que seu custo envolva milhões de dólares (DIMASI, HANSEN & GRABOWSKI, 2003).

Em análise realizada para entender os caminhos da descoberta dos fármacos foi destacada a estratégia baseada na modificação molecular de fármacos ou protótipos já conhecidos (WERMUTH, 2004).

A modificação molecular consiste, basicamente, em apartir de protótipo de estrutura e ação biológica conhecidas, sintetizar congêneres, análogos ou homólogos estruturais do mesmo, obtendo compostos com aumento de potência, melhor perfil de atividade específica, melhor segurança e formulação mais adequada ao manuseio pelos profissionais da saúde, e melhor aceitabilidade pelos pacientes. Esses compostos são por vezes chamados de *me too* e devido a maior rapidez no desenvolvimento, é uma estratégia da indústria farmacêutica para possuir um medicamento/fármaco, que consiga uma parcela do mercado, no caso de uma nova classe (inovadora). São exemplos de compostos obtidos por essa estratégia os análogos da lovastatina: sinvastatina, provastatina, fluvastatina, atorvastatina, etc (WERMUTH, 2004; FERREIRA *et al* 1980).

Sir James Black, ganhador do prêmio Nobel em medicina e fisiologia em 1988, aponta que a obtenção de novos fármacos mais promissora, é aquela que se utilizam os processos de modificação molecular como estratégia.

Entre as estratégias de modificação molecular mais utilizada em Química Farmacêutica Medicinal podemos citar: hibridação molecular,

biososterismo e latenciação (BARREIRO *et al* 2002; LIMA *et al* 2004; CHUNG *et al* 1999).

A hibridação e a latenciação serão detalhadas a seguir face sua importância na elaboração das moléculas alvos deste plano de trabalho.

## **7.1 - Hibridação Molecular**

Alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças podem, por suas características, sugerir a necessidade de se desenharem bioligantes ou protótipos onde sejam incluídas, na mesma molécula, propriedades farmacodinâmicas duplas, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica.

Neste caso, o desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve considerar fatores estruturais mais complexos, de maneira a assegurar à mesma molécula planejada o reconhecimento molecular por dois alvos terapêuticos, simultaneamente. O desenho com propriedade dual pode explorar a hibridação molecular como estratégia de planejamento estrutural inicial, e apresentam vantagens farmacocinéticas sobre a administração concomitante de dois fármacos distintos (BARREIRO *et al* 2002).

A capacidade de um fármaco ser reconhecido por mais de um receptor no sistema biológico, que por vezes era considerado um problema, passou a ser uma estratégia da química farmacêutica medicinal para o desenvolvimento de compostos. A aspirina, por exemplo, que inicialmente foi usada para o alívio da dor, hoje também é indicada na redução da agregação plaquetária, prevenção de pré-eclâmpsia, câncer, anti-artrite, demonstrando o potencial multi ligante desse fármaco (WEBER *et al* 2004).

A capacidade de uma única molécula se ligar a múltiplos receptores, tem várias denominações na literatura, como: ligantes duais, heterodímeros, bloqueio triplo e fármacos promíscuos, e pode apresentar uma série de vantagens: a) diferentes alvos de uma mesma rota metabólica podem ser inibidos por uma única molécula, aumentando a eficácia terapêutica; b) para uma simples molécula, pode-se não somente alterar a biodisponibilidade na célula, mas também sua capacidade de ser eficientemente eliminada depois de

sua ação, devido à “promiscuidade” dos sistemas de distribuição e excreção (ESPINOZA-FONSECA, 2006).

Recentemente foi proposto o termo ligante múltiplos. Este termo se refere apenas as substâncias planejadas para atuar nos alvos determinados, e não àquelas que atuam em outros receptores, de forma não seletiva levando freqüentemente leva a efeitos deletérios. Um exemplo de fármaco que atua de forma não seletiva é a clozapina (MORPHY & RANKOVIC, 2005).

A despeito dessa capacidade intrínseca da substância em se ligar a múltiplos alvos, pode-se planejar compostos que atuem apenas nos receptores planejados. Esses compostos são obtidos da conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma única molécula, e representa dentro da química farmacêutica medicinal a estratégia denominada hibridação molecular (BARREIRO *et al* 2001).

Essa estratégia tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado (STRUPEZEWSKI *et al* 1991) e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (BARREIRO *et al* 2002).

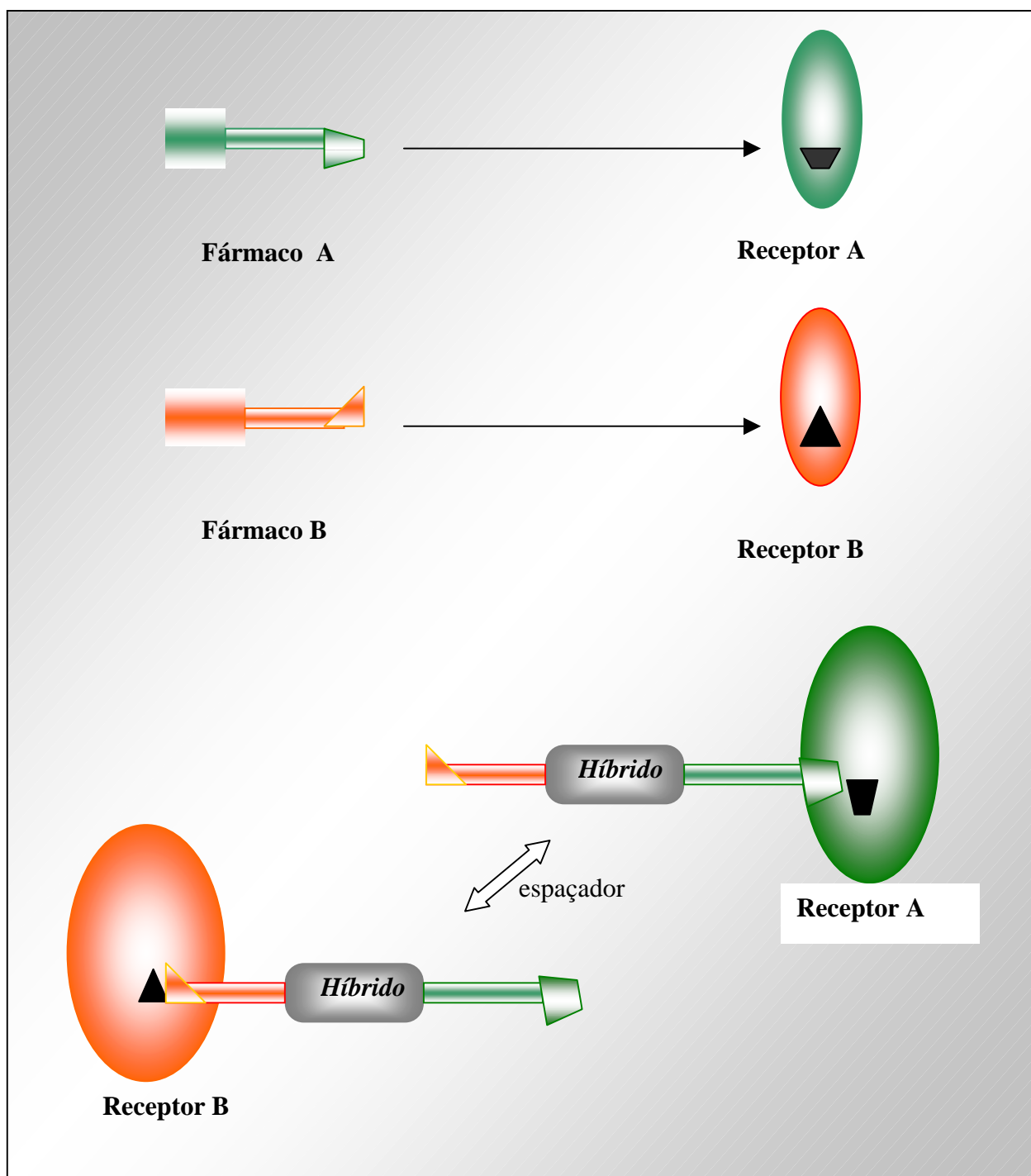
O planejamento de compostos híbridos é promissor, no entanto, é mais difícil que o planejamento convencional que visa uma única atividade. Algumas considerações devem ser feitas como por exemplo: a) A combinação de duas subunidades farmacofóricas em uma única molécula pode levar a obtenção de um composto inativo; b) Na hibridação, deve-se levar em consideração os conhecimentos da relação estrutura atividade dos compostos e do receptor; c) Deve-se conhecer os tipos de interação com o receptor, regiões estericamente impedidas do receptor, áreas hidrofílicas e hidrofóbicas; d) A escolha do agente espaçante deve ser baseada nesses conhecimentos. Essa estratégia fica impossibilitada, ou com difícil aplicação quando ambos “progenitores” possuem uma relação estrutura atividade particular (BALDWIN *et al* 1979; WERMUTH, 1996).

Embora se possa obter composto híbrido com o perfil farmacológico pretendido, muitas vezes essa estratégia é invalidada por conta de problemas toxicológicos imprevistos no planejamento. Deve ser avaliada a potência dos “progenitores” no planejamento do composto híbrido. Por exemplo, no planejamento de híbridos agonistas/antagonistas deve ser levado em

consideração que a atividade dos antagonistas nos receptores está em concentração muito menor que aquelas requeridas pelos agonistas.

Segundo o modelo chave-fechadura, proposto por Fischer, cada chave encaixa-se em uma determinada fechadura, assim como cada fármaco, atua em seu receptor específico. Embora, hoje se saiba que esse modelo não é adequado, por não levar em conta a flexibilidade dos ligantes e do receptor, e tampouco por desconhecer a capacidade multiligante de alguns compostos, ele nos auxilia de forma esquemática a entender o planejamento de compostos híbridos. Conforme podemos visualizar no esquema 02, o ligante A se complexa com o receptor A e origina uma determinada resposta biológica. O ligante B, da mesma forma, se interage com receptor B e origina uma outra resposta biológica. O ligante A, não se complexa com o receptor B, e vice-versa. Na hibridação molecular, a mesma estrutura possui a capacidade de se ligar ao receptor A e B e, desencadear os respectivos efeitos farmacológicos.





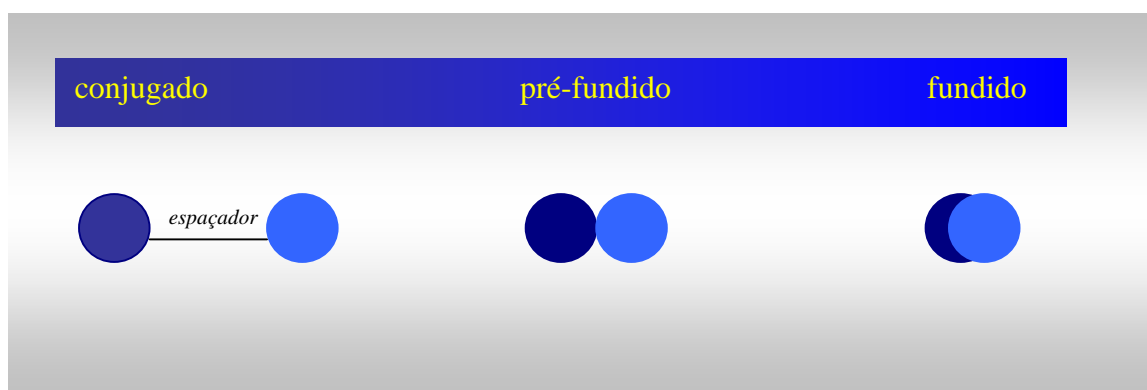
Esquema 03: Estratégia de hibridação molecular

## Classificação dos híbridos (ligantes múltiplos)

Segundo classificação de MORPHY & RANKOVIC (2005), os ligantes múltiplos (LM) podem ser classificados conforme a estratégia de planejamento em: conjugados, pré-fundidos e fundidos.

Os ligantes múltiplos (LM) conjugados mantem a arquitetura molecular dos protótipos, e são unidos covalentemente por uma ligação estável. O processo de obtenção de LM conjugados está intimamente relacionado com a estratégia de obtenção de pró-fármacos recíprocos, a principal diferença, está no fato de que nos pró-fármacos, a hibridação leva a um composto inativo, e a ligação não é estável, podendo ser rompida *in vivo* por processos químicos ou enzimáticos. Após esse rompimento, há liberação dos fármacos, que agora ativos, podem atuar em seus receptores específicos, exercendo suas ações.

Quando, no processo de hibridação, o tamanho do agente espaçante é diminuído a ponto das arquiteturas moleculares dos protótipos se tocarem, obtemos o que denomina-se híbridos pré-fundidos. O mais comum, no entanto, é observar compostos híbridos fundidos, em que se combinam as características estruturais de ambos os fármacos em uma única estrutura, com uma inovadora e diferenciada arquitetura molecular (esquema 04).



Esquema 04: Classificação dos ligantes múltiplos (LM) – Adaptado de MORPHY & RANKOVIC, 2005.

Compostos que apresentam potencial múltiplo ligante apresentam melhor potencial em doenças complexas, que aqueles com potencial ligante único. No entanto, para essa ação, é necessária uma validação dos receptores escolhidos como alvo, a fim de avaliar a real contribuição de uma substância com propriedade multiligante na doença (WERMUTH, 2004).

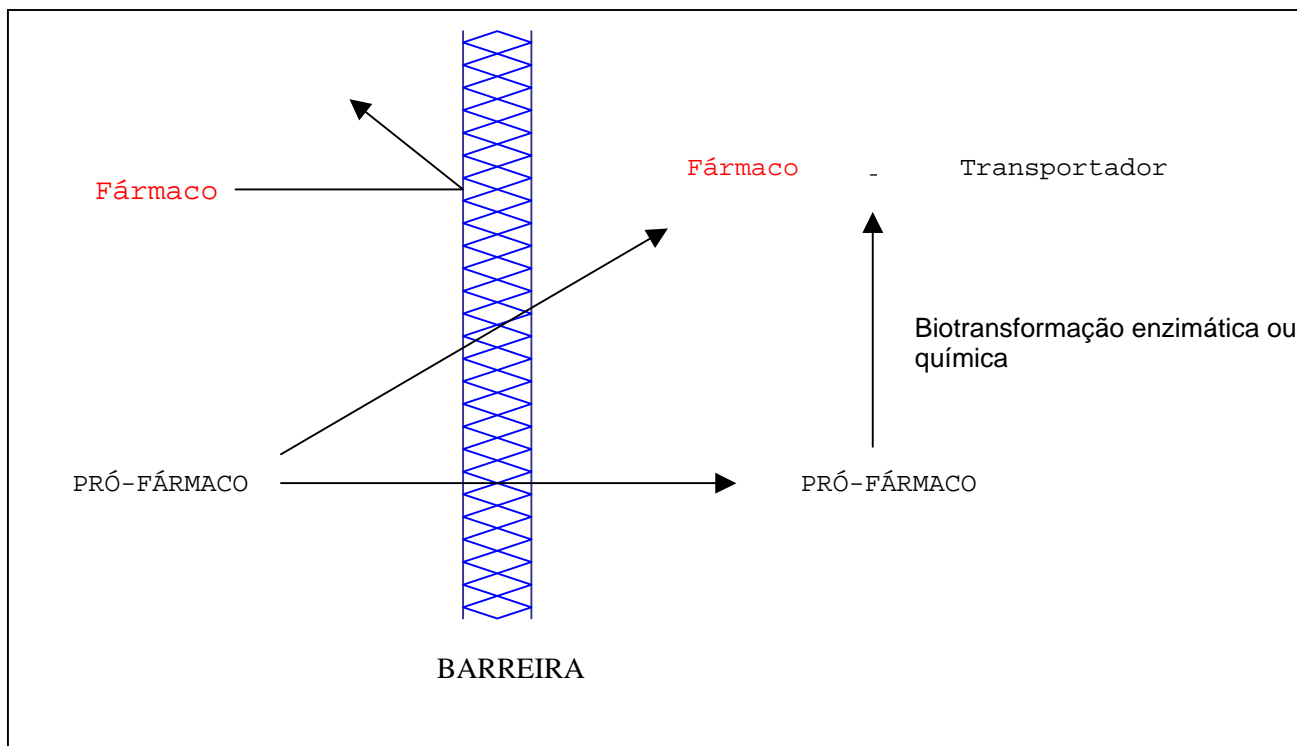
A avaliação das propriedades ADME, é um ponto importante no desenvolvimento de híbridos. Muitas vezes, os compostos ativos esbarram em problemas farmacocinéticos e de toxicidade. Nesse momento, pode-se explorar a estratégia de modificação usando a latenciação.

## **7.2 - Latenciação**

A latenciação é uma outra importante estratégia de modificação molecular, utilizada para inserção de fármacos na terapêutica. Diversos fármacos disponíveis na terapêutica são considerados pró-fármacos, entre esses, destacam-se o enalapril, omeprazol, sinvastatina e aciclovir, considerados “blockbusters” devido ao potencial mercadológico (ETTMAYER *et al* 2004).

Os compostos obtidos por essa estratégia foram denominados por Harper, em 1959, de pró-fármacos. Mas o termo pró-fármaco ou pró-agente foi introduzido por A. Albert em 1958 para descrever “compostos que sofrem biotransformação, antes de apresentarem seus efeitos farmacológicos” (FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980; CHUNG, 1996)

A latenciação é a transformação do fármaco em uma forma de transporte inativo, que *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a subunidade ativa no local de ação ou próxima a ele. O esquema 05 mostra uma representação do conceito de pró-fármacos (CHUNG & FERREIRA, 1999; SILVA, *et al.* 2005; WERMUTH, 1996).



Esquema 05: representação esquemática do conceito de pró-fármacos (adaptação - CHUNG *et al* 1999).

Pró-fármacos são planejados para superarem problemas farmacêuticos e farmacocinéticos associados com a molécula matriz, que caso contrário, poderia ter seu uso clínico limitado. Um grande número de barreiras pode limitar o uso clínico de um fármaco. Na fase farmacêutica, relacionada à obtenção do medicamento, pode-se observar falta de solubilidade, estabilidade, e propriedades organolépticas indesejáveis, etc. A solubilidade é muitas vezes alterada modulando a atividade do transportador pela introdução de grupamentos lipossolúveis ou hidrossolúveis, esse tipo de alteração não altera a atividade intrínseca do fármaco após a liberação do transportador *in vivo*. A estabilidade, da mesma forma, pode ser modulada por efeitos eletrônicos e estéricos, auxiliando nas etapas de desenvolvimento farmacotécnico.

Propriedades organolépticas também podem ser alteradas, por exemplo, sabe-se que o metamizol (dipirona) possui desagradável sabor, perceptível principalmente na forma farmacêutica solução (gotas), com base nessa característica organoléptica NEVES, sintetizou o pró-fármaco palmitato de

metamizol, já que se sabia que esse transportador possuía a capacidade de mascarar sabores desagradáveis (NEVES, 2003).

É na fase farmacocinética, que a utilização da latenciação tem sido utilizada com mais interesse (FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980). Essa fase, que leva em consideração principalmente a absorção, distribuição, metabolismo e excreção, e tem sido uma barreira a uma série de ligantes identificados pela estratégia de modelagem molecular, a etapas posteriores do desenvolvimento de um fármaco. Muitos desses problemas farmacocinéticos, podem ser resolvidos pela estratégia da latenciação. Os principais problemas relacionados à fase farmacêutica são (CHUNG *et al* 1999):

- Absorção incompleta do fármaco através das membranas biológicas, tais como células da mucosa gastrintestinal;
- Biodisponibilidade sistêmica incompleta do fármaco devido ao metabolismo pré-sistêmico;
- Absorção ou excreção muito rápida do fármaco, quando são desejáveis longos períodos de ação;
- Toxicidade relacionada à irritação local ou à distribuição em outros tecidos.

Com relação à toxicidade, relacionada a irritação local, é sabido que AINEs administrados por via intramuscular, possuem potencial necrosante, NASSUTE, demonstrou que a obtenção de pró-fármacos utilizando como transportador uma matriz polimérica, diminuía a lesão causada por essa via de administração, mantendo a atividade antiinflamatória, mostrando o potencial da utilização da latenciação como estratégia de modificação molecular (NASSUTE, 2002).



Durante o planejamento de um pró-fármaco alguns critérios devem ser considerados (BUNDGAARD, 1991; CHUNG & FERREIRA, 1999):

- A existência de grupos funcionais na molécula-matriz capazes de sofrer derivatização;
- Existência de mecanismos e/ou sistemas no organismo capazes de bioativar o pró-fármaco;
- Facilidade e simplicidade da síntese e purificação do pró-fármaco;
- Estabilidade química do pró-fármaco;

- Regeneração, *in vivo* da molécula matriz, em quantidades ideais;
- Toxicidade do transportador e do pró-fármaco *per se*.

No quadro 01, podemos observar que a obtenção de pró-fármacos, está relacionada com a presença de determinados grupos funcionais capazes de sofrer derivatização. Entre os tipos de pró-fármacos, observa-se que aqueles obtidos por esterificação são os mais comuns, seguido pela formação de amidas, imidas e carbamatos (CHUNG *et al* 1999).

Quadro 1 – Tipos de pró-fármacos de acordo com o grupo funcional do fármaco.

| Grupo Funcional                                          | Ligação Fármaco-Transportador                                                                                                                                                                                           | Tipos de Pró-Fármacos                                                                                       |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| -COOH                                                    | -COOR<br>-COOCH(R)OOCR<br>-CONHR                                                                                                                                                                                        | ésteres<br>ésteres $\alpha$ -aciloxialquílicos<br>amidas                                                    |
| -OH                                                      | -OOCR<br>-OOOCR<br>-OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub><br>-OR<br>-OCH(R)OOCR                                                                                                                                               | ésteres<br>ésteres carbonatos<br>ésteres fosfatos<br>éteres<br>éteres $\alpha$ -aciloxialquílicos           |
| -SH                                                      | -S-R<br>-SCH(R)OOCR<br>-SCOR<br>-S-S-R                                                                                                                                                                                  | tioéteres<br>tioéteres $\alpha$ -aciloxialquílicos<br>tioésteres<br>dissulfetos                             |
| -C=O                                                     | RRC(OR') <sub>2</sub><br>-HC=N-R<br>-C=C-OOCR<br><br> | cetais<br>iminas<br>ésteres enólicos<br><br>oxazolidinas<br><br>thiazolidinas                               |
| -NH <sub>2</sub>                                         | -NHCOR<br>-NHCOOR<br>-N=CRR<br>NHCH=CRR<br>-NH-CH <sub>2</sub> N(R)COR<br>-NHCOOCH(R)OCOR                                                                                                                               | amidas<br>carbamatos<br>iminas<br>enaminas<br>N-bases de Mannich<br>derivados N-aciloxialcoxycarbonílicos   |
| -N terciária                                             | -NC(R)CHOCOR                                                                                                                                                                                                            | derivados N-aciloxialquílicos                                                                               |
| -SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ou -SO <sub>2</sub> NH- | -SO <sub>2</sub> N=C(OR)R<br>-SO <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> OR                                                                                                                                                      | imidatos N-sulfonílicos<br>derivados N-alcoximetílicos                                                      |
| -NH ácido                                                | -CON(R)CH <sub>2</sub> -NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub><br>-CONRCH <sub>2</sub> OH<br>-CONH-COR<br>-CONRCH(R <sub>1</sub> )OCOR <sub>2</sub>                                                                             | N-bases de Mannich<br>derivados N-hidroximetílicos<br>derivados N-acílicos<br>derivados N-aciloxialquílicos |

Fonte: Bundgaard, H. - *Design of prodrugs*, Amsterdam: Elsevier, 1985.

A ligação formada entre o fármaco e o transportador deve ser lábil, de forma que regenere o fármaco. A cinética de quebra da ligação in vivo, seja por hidrólise, ou por ação enzimática (exemplo: esterases hidrolisam as ligações ésteres), deve ser conhecida para modulação do perfil farmacocinético. A ligação deve ser suficientemente estável para permitir que o pró-fármaco chegue ao local de ação, ou próximo a ele, em níveis terapêuticos adequados ao tratamento de determinada doença.

O transportador isento de toxicidade pode ou não ser ativo. Caso ele seja inativo, após a quebra da ligação, ele é eliminado sem causar danos ao organismo. Sendo o transportador planejado para ser ativo, os pró-fármacos obtidos podem possuir caráter dual de ação.

Segundo WERMUTH, os pró-fármacos podem ser classificados em: (WERMUTH, 1984; WERMUTH, 1996).

- Pró-fármacos clássicos;
- Bioprecursores;
- Pró-fármacos mistos e
- Fármacos dirigidos.

### PRÓ-FÁRMACOS CLÁSSICOS

- Promovem a melhoria da atividade terapêutica por aumento de biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento de ação, aumento de seletividade.
- Grupo transportador adequado, geralmente de caráter lipofílico.
- Devem sofrer reação hidrolítica (química ou enzimática) para liberar a subunidade ativa.

### BIOPRECURSORES

- Tipo de forma latente que não apresenta transportador;
- Composto obtido gera o agente ativo, em geral após bioativação oxidativa ou redutiva;
- Sofre catálise enzimática;
- Permite aumentar a biodisponibilidade, entre outras propriedades.

### PRÓ-FÁRMACOS MISTOS

- Possui características de pró-fármacos clássicos e de bioprecursores (exemplo: sistema CDS – *Chemical Delivery System*);
- Requer várias etapas para sua conversão à forma ativa, aumentando a liberação do fármaco em um sítio ou órgão específico (exemplo: pró-fármacos duplos).



## PRÓ-FÁRMACOS DIRIGIDOS

- Transporta o fármaco seletivamente do local de administração até o sítio de ação;
- Reduz os efeitos tóxicos provocados pela ação inespecífica do fármaco em outros alvos;
- O transportador utilizado interage especificamente com os sítios presentes nas superfícies das células-alvo e permite ativação após endocitose do conjugado.

## PRÓ-FÁRMACOS RECÍPROCOS

- O transportador apresenta atividade farmacológica;
- Substâncias com atividades terapêuticas, atuando preferencialmente por mecanismos de ação diferentes em uma determinada doença, auxiliam de forma sinérgica no tratamento;

**V – Materiais e Métodos****1. Material****1.1 - Reagentes e solventes**

- (2-aminofenil)metanol (Across);
- (3-aminofenil)metanol (Across);
- (4-aminofenil)metanol (Across);
- 2-(2-hidroxietil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (Across N-(2-hidróxietil)ftalimida);
- 2-(4-aminofenil)etanol (Across);
- acetato de etila P.A. (Synth);
- ácido acético glacial P.A. (J.T. Baker);
- ácido bromídrico P.A. (J.T. Baker);
- ácido clorossulfônico P.A (Merck);
- ácido nítrico P.A. (Merck);
- anidrido acético P.A. (Merck);
- anidrido ftálico (J.T. Baker);
- anilina P.A. (Merck);
- cloreto de tionila (Merck);
- cloridrato de hidroxilamina (Across);
- diclorometano P.A. (Synth);
- etanol absoluto (Merck);
- etanolamina (Merck);
- formaldeído P.A. (Merck);
- ftalimida (Across);
- hexano (Synth);
- hidroxauréia (Across);
- nitrato de prata (Merck);
- pentacloreto de fósforo (Merck);
- piridina (Merck);
- tricloreto de fósforo (Merck);
- trietilamina (Merck);
- uréia (J.T. Baker);

## 2 - Métodos

### 2.1 – Metodologia de síntese

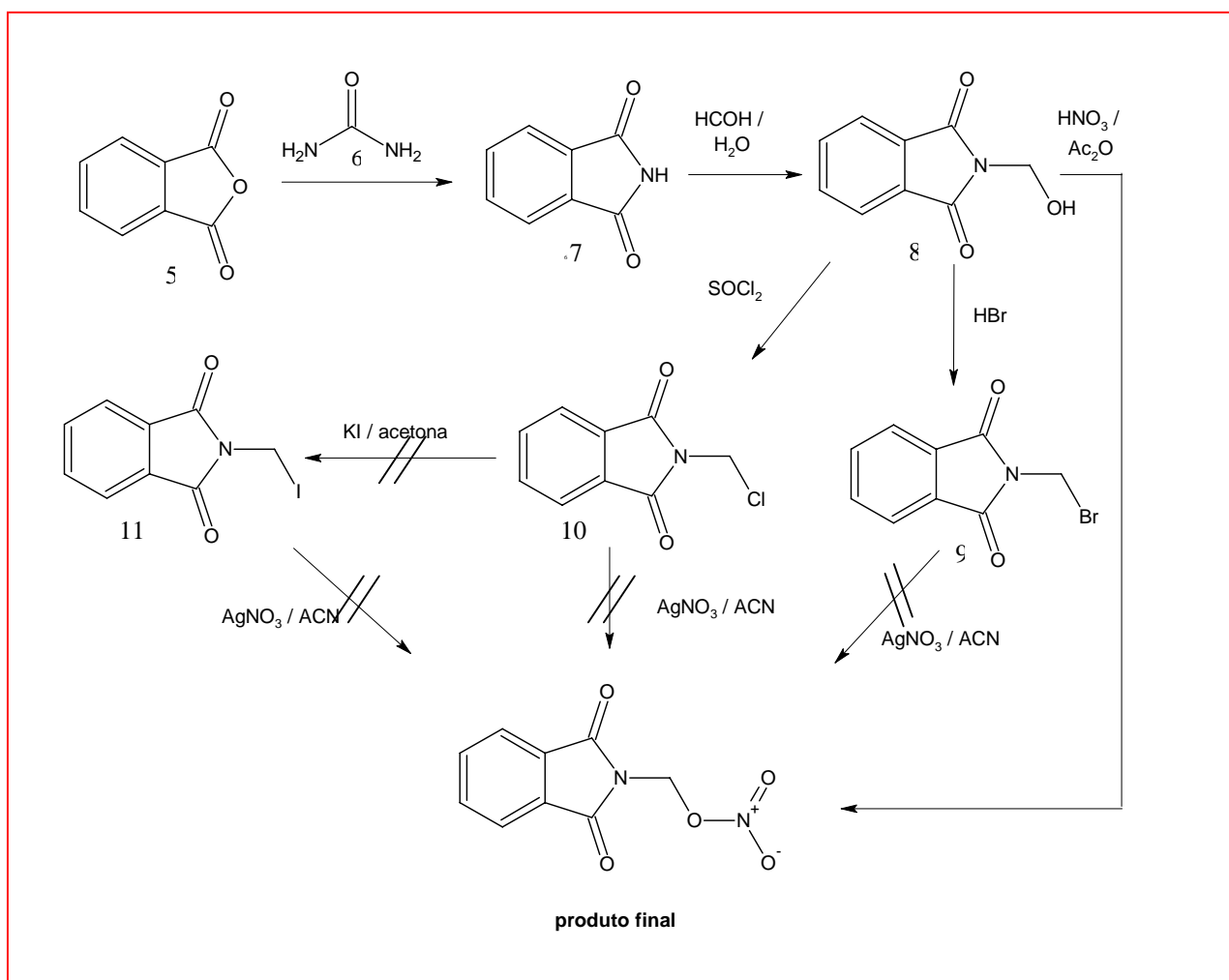
Utilizando a metodologia descrita por LIMA e colaboradores (LIMA *et al* 2002) foi realizada a condensação do anidrido ftálico com os derivados amínicos apontados no planejamento estrutural, levando à formação das respectivas ftalimidas funcionalizadas – primeiros intermediários chave para obtenção dos compostos híbridos sintetizados. As reações de derivados ftalímídicos são bem conhecidas e fornecem rendimentos entre 66-89%, com formação mínima de impurezas (GUTSCHOW *et al* 2001; HESS *et al* 2001; FILHO *et al* 2003).

Desde 1986, microondas são utilizadas na síntese orgânica, e diversos compostos têm sido obtidos explorando as diferentes reatividades dos vários grupos funcionais. O aquecimento por microondas é também chamado de aquecimento dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor. Como o campo elétrico na frequência de 2,45GHz oscila (muda de sinal)  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo, ocorre um pronto aquecimento destas moléculas. O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado através de perdas por fricção, que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético (CADDICK, 1995; LOUPY & PERREUX, 2001; BERLAN, 1995). Tem sido relatado que compostos ftalímídicos podem ser obtidos utilizando a metodologia de síntese em microondas (LÁCOVÁ *et al* 1996; VIDAL *et al* 2000). Dessa forma, o intermediário fenil-ftalimida (14) foi obtido sob irradiação por microondas, para fornecer o produto desejado em menor tempo reacional e com maior rendimento quando comparados com o aquecimento convencional (FILHO *et al* 2003; SEIJAS *et al* 2001; VIDAL *et al* 2000; SANTOS *et al* 2005).

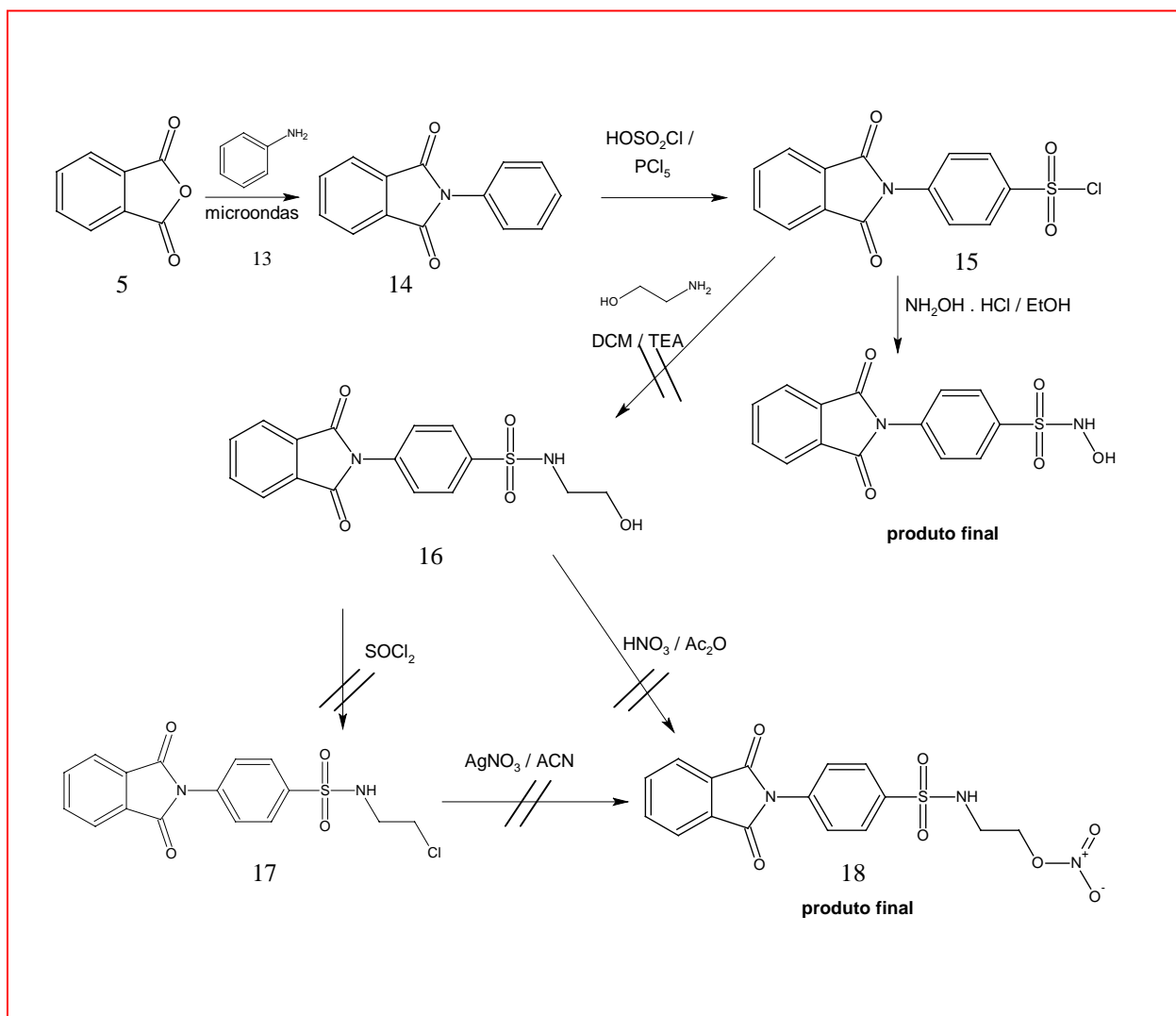
A partir do intermediário 8 sintetizado, foi realizada uma reação de substituição nucleofílica de um grupo hidroxila por um grupamento halogenado, resultando na formação do haleto correspondente (Esquema 06). Posteriormente, foi realizada a conversão do haleto derivado de ftalimida em nitrato (fonte endógena de óxido nítrico), segundo metodologias previamente descritas na literatura (BALLINI *et al* 2004; CHIROLI *et al* 2003).

Além dessas interconversões de grupos funcionais, também foi explorado a reatividade da hidroxila alcoólica dos intermediários que foi reagida com uma mistura de ácido nítrico e anidrido acético para formar os ésteres de nitrato desejados (BOYER, 1986; ENDRES, *et al* 1999).

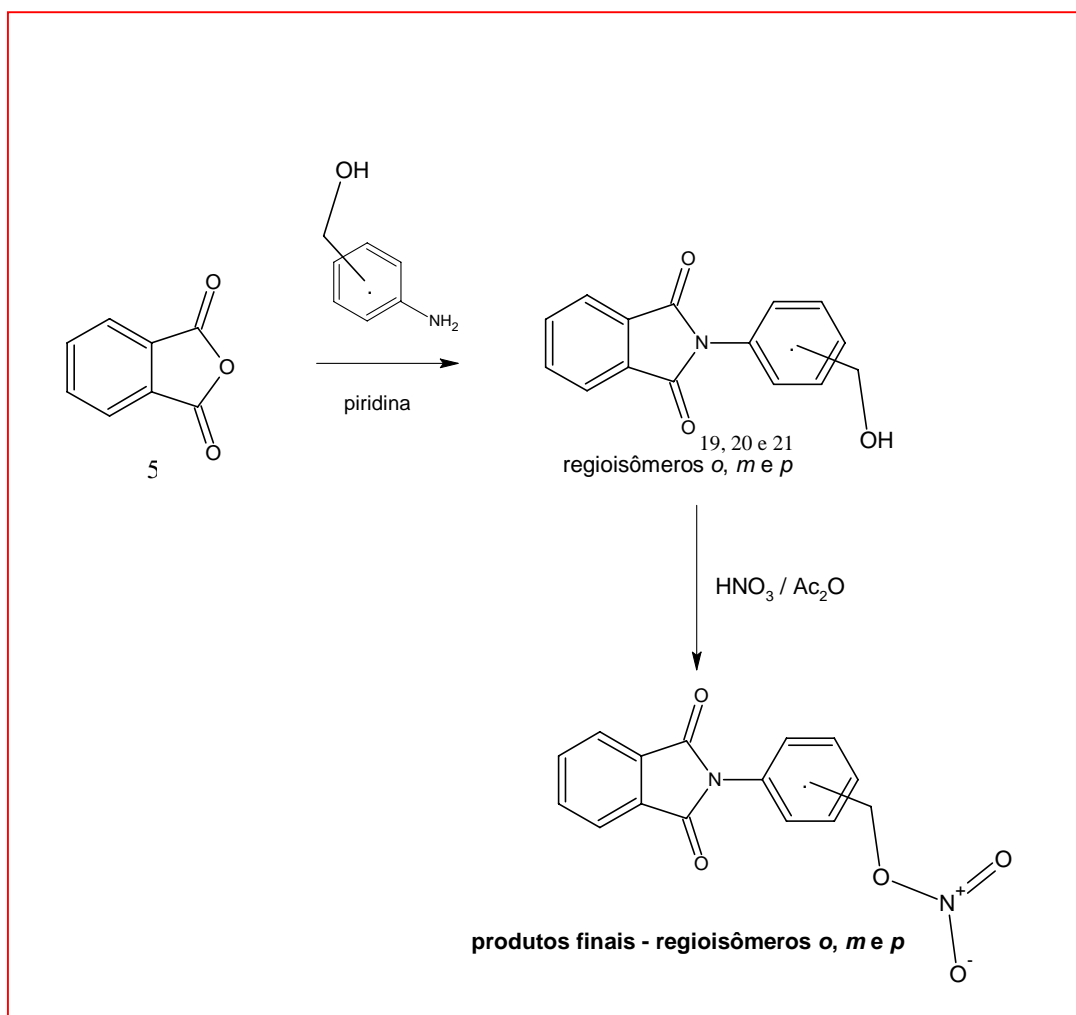
Através dos esquemas 06, 07 e 08 podemos visualizar as rotas sintéticas utilizadas para a obtenção dos diferentes derivados planejados.



Esquema 06: Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos alquílicos.



Esquema 07: Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos aril sulfonamídicos.



Esquema 08: Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos arílicos.

Para auxílio na interpretação dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN  $C^{13}$  e  $H^1$ ), foram utilizadas as seguintes referências: Dyer, 1965; Siverstain *et al*, 1994 e Pavia *et al*, 1996.

## 2.2 Métodos Analíticos

### 2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.)

Utilizou-se cromatografia em camada delgada (cromatofolhas de alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm de espessura - Merck) para o acompanhamento das reações e das purificações dos compostos que foram sintetizados. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365 nm), e/ou por exposição à iodo pulverizado.

### 2.2.2. Espectrometria de RMN $^1H$ e RMN $^{13}C$

Os espectros de RMN  $^{13}C$  e  $^1H$  foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo DRX-400 (400 MHz) utilizando como solventes  $D_2O$ ,  $CDCl_3$  e  $DMSO-d_6$  do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### 2.2.3. 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.

### 2.2.4. Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific.

### 2.2.5. Análise Elementar

Foi realizada a análise elementar dos compostos obtidos a fim de avaliar a sua composição atômica. Esta análise foi realizada na central analítica do Instituto de Química da USP – São Paulo, no equipamento Perkin-Elmer CHN 2400.

## **2.3– Ensaio Biológicos**

### **2.3.1 – Teste de Ames para avaliação da atividade mutagênica**

O teste de AMES caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium* sensíveis às substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens reverterem o caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido deste aminoácido. Há aumento do número de colônias, que está diretamente relacionada a atividade mutagênica do composto (Figura 05). O teste também é realizado na presença e na ausência de ativação metabólica. Na ativação metabólica é utilizado fração microssômica S9 (S9 mix), preparada a partir do homogeneizado de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos na forma liofilizada (MARON & AMES, 1983; GUIDO *et al* 2001).



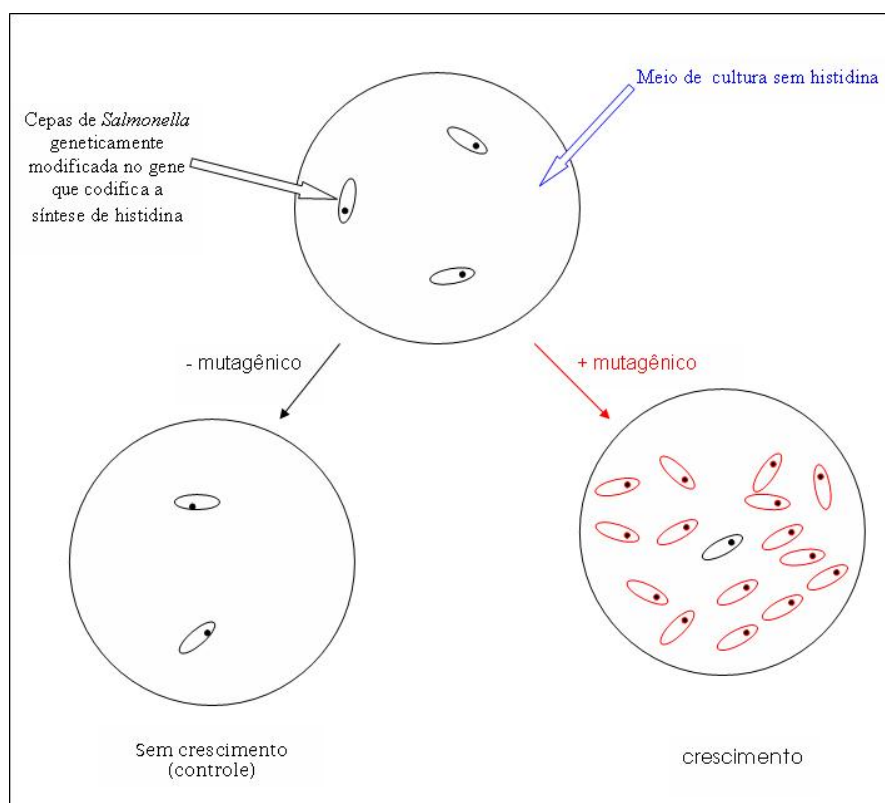


Figura 05: Representação esquemática do princípio do teste de AMES.

A fim avaliar o perfil mutagênico dos compostos sintetizados foi realizado o teste de AMES, onde pretendeu-se estabelecer e comparar os compostos obtidos com os padrões hidroxuréia e talidomida,

### 2.3.2– Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina

Este ensaio foi realizado em colaboração com a profa. Dra. Magna Suzana do departamento de farmacologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação.

O ensaio consiste na administração local (orelha direita) de 20µl de solução de capsaicina diluído em acetona, 1 hora após a administração *i.p* da substância teste, indometacina (ou veículo-salina). O ensaio é caracterizado

por uma reposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema. Os animais foram sacrificados e suas orelhas pesadas para obtenção do índice de inflamação, e em seguida os pesos das orelhas inflamadas que foram comparados com os pesos da orelha contra-lateral que não foi tratada com agente flogístico.

**Animais:** Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-30g) machos ou fêmeas, adultos, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas e com livre acesso a água.

**Preparo das substâncias:** Todas as substâncias foram preparadas adicionando duas gotas de Tween 80 e em seguida feita uma solução com água destilada. O Tween não apresentou nenhuma resposta nos modelos em que foram administrados por via oral. Porém no modelo de peritonite, o tratamento com as substancias testes foram feitos por via oral, pois o Tween induziu migração, quando administrado por via *ip*. (dados não mostrados).

### **2.3.3 - Ensaio de peritonite**

Os camundongos foram tratados 1 hora antes por via oral com as substancias teste ou indometacina ou apenas salina e em seguida foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração *i.p* de 1 mL de solução de tioglicolato 3%. Após 4 h da administração deste, o lavado peritoneal foi obtido com 4 mL de HANK's para a determinação do número de células inflamatórias por mL do lavado (leucócitos). A contagem foi avaliada em microscópio óptico em objetiva de 40x.

#### **Análise Estatística**

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se o Teste T de Student. Os valores foram considerados significativos quando  $*P < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

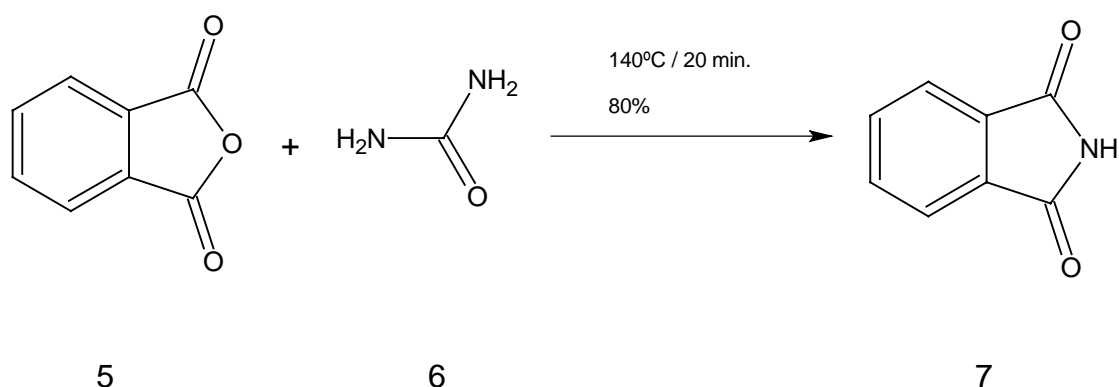
### **2.3.4– Ensaio em células K562 humanas**

As células K562 humanas produzem hemoglobina com o aumento da expressão de genes  $\epsilon$  e  $\gamma$  globina quando tratadas com compostos como hidroxiuréia. Por isso, essas células podem ser usadas como modelo *in vitro* para estudar o potencial efeito de novos compostos na indução eritróide e compará-lo aos padrões talidomida e hidroxiuréia.

Esse ensaio foi realizado em colaboração com o prof. Dr. Fernando F. Costa, do hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e guiará as modificações subseqüentes que possam ser introduzidas na estrutura do protótipo identificado visando otimizar seu perfil de ação farmacodinâmico.

## VI- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

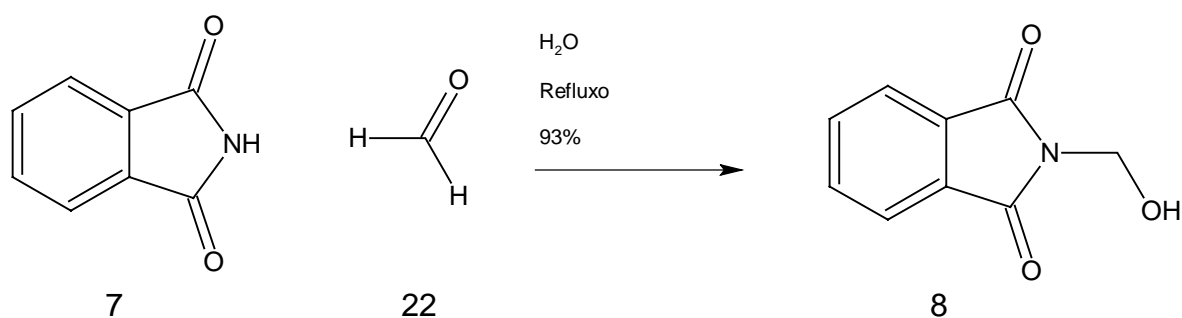
## 1 - PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE

3.1 – Síntese da 1,3-isoindolinodiona (FURNISS *et al* 1991).

Em um balão de 125 mL, contendo 5 g (33,35 mmol) de anidrido ftálico e 1 g (16,65 mmol) de uréia foi aquecido a 140°C até fusão dos reagentes, permanecendo a suspensão resultante sob aquecimento e agitação por mais 20 minutos sob refluxo, quando observou-se a formação de massa esponjosa de cor branca, com conseqüente aumento da temperatura do meio reacional.

O isolamento foi feito por resfriamento do meio reacional, seguido de adição de gelo e filtração do precipitado obtido, que foi posteriormente lavado exaustivamente com H<sub>2</sub>O destilada e seco a pressão reduzida. O sólido obtido foi finalmente recristalizado em mistura hidroalcoólica 1:1, para fornecer 1,95 g (80%) da ftalimida como sendo cristais de cor branca e faixa de fusão= 232-234 °C (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>; PM= 147).

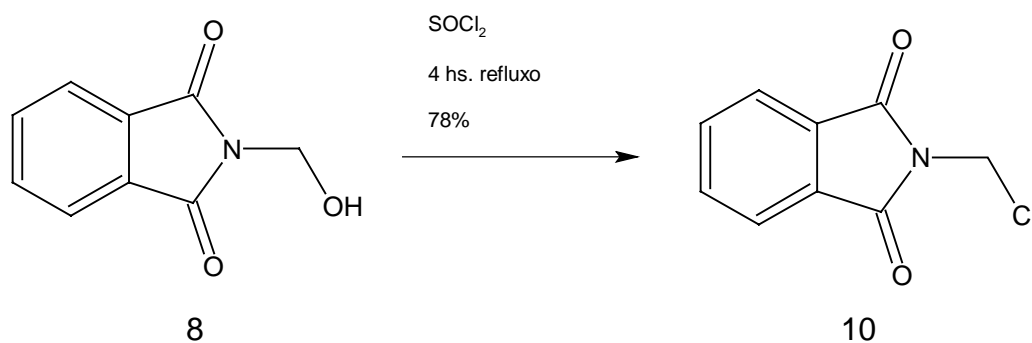
### 3.2- Síntese da 2-(hidroximetil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (MANO & SEABRA, 2002).



Em um balão de 250 mL de fundo redondo, adicionou-se 25,0 g de ftalimida (0,17 mol), 16,2 g de formol (0,2 mol; 14,7 mL de solução 37% aldeído fórmico d: 1,10 g/mL) - e 90 mL de água destilada. Adaptou-se condensador de refluxo, e aqueceu-se por cerca de 1 hora até obter uma solução límpida.

Filtrou-se a solução a quente através de papel de filtro pregueado, utilizando banho de aquecimento para o funil. Deixou cristalizar, resfriando externamente por meio de banho de gelo e água. Filtrou-se em funil de buchner os cristais obtidos. Lavou-se com água gelada, e o produto obtido foi seco em estufa a 50°C para obter 28 g (93%) de cristais de cor branca e faixa de fusão= 142°C (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>; PM= 177,16 ).

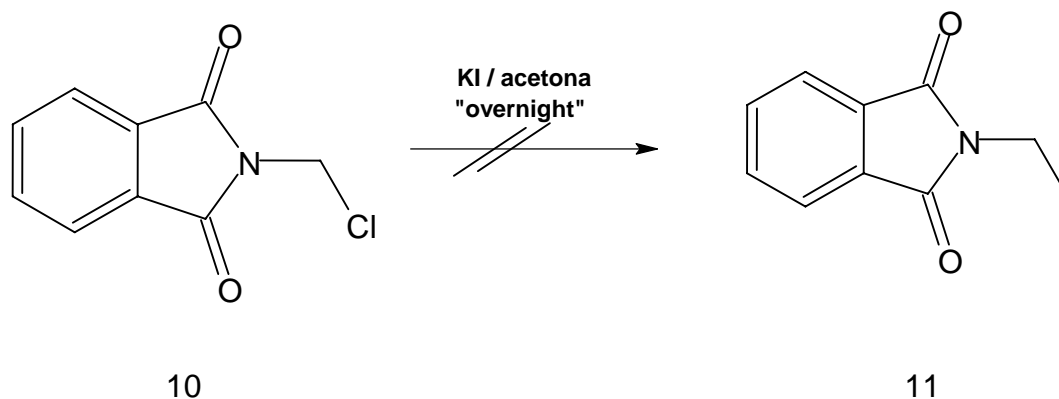
### 3.3 – Síntese da 2-(clorometil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona



Em um balão de 50 mL adicionou-se 1g de hidroximetilftalimida. Em seguida adicionou-se 6 mL de cloreto de tionila (d=1,64 g/mL, 0,083 mol). A

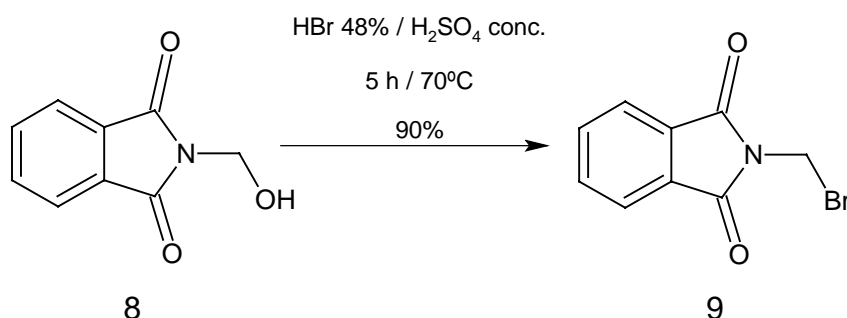
reação foi mantida em refluxo por 4 horas. Após esse período o solvente foi destilado a pressão reduzida e adiciona-se gelo ao óleo formado, observando precipitação do produto desejado que foi filtrado em funil de bücher e lavado com água gelada, para obtenção de 0,861 g (78%) de sólido branco com faixa de fusão=127-131°C ( $C_9H_6ClNO_2$  e PM= 195,6).

### 3.4 – Síntese do intermediário (2-(iodometil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona)



Em um balão de 50 mL adicionou-se 0,25 g (1,12 mmol) do cloreto de metilftalimida (57) em 10 mL de acetona anidra. Após solubilização adicionou-se 0,186 g (1,12 mmol) de iodeto de potássio. A reação foi mantida sob refluxo “overnight” em atmosfera de nitrogênio. A acetona foi evaporada sob pressão reduzida, e o produto reagido na seqüência (sem isolamento) para obtenção do produto nitrado final.

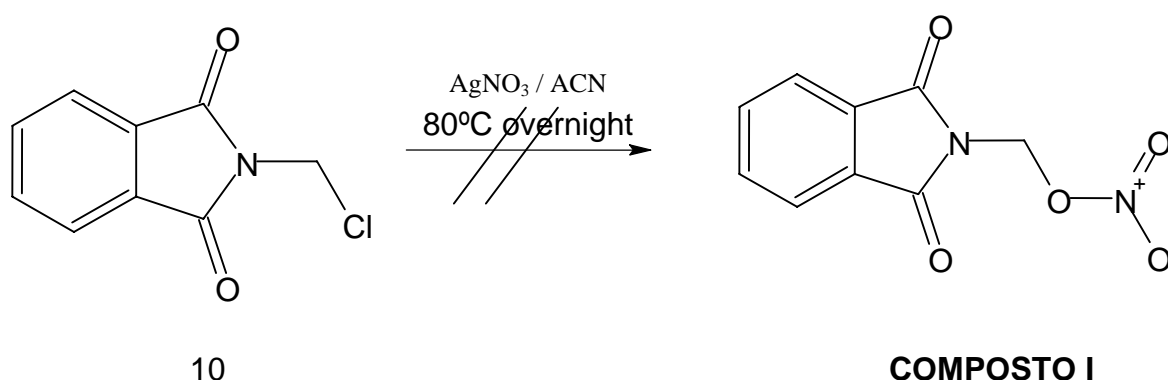
### 3.5 – Síntese do 2-(bromometil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (adaptado de Pucher & Johnson, 1922; Yamauchi, Kinoshita & Imoto, 1972).



Em um balão conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados 12,5 g (0,07 mol) de *N*-hidroximetilftalimida e 50 mL de ácido bromídrico 48%.

O balão foi mantido em banho de gelo até a adição de 19 mL de ácido sulfúrico concentrado, e agitado magneticamente por 15 minutos. Após esse período, a solução resultante foi retirada do banho de gelo, e aquecida a 70°C por 5 horas. Após esse tempo reacional, a mistura é mantida em geladeira *overnight*. O precipitado formado, foi filtrado e lavado primeiramente com água gelada (c.a. 25 mL), solução de hidróxido de amônio 10% (c.a. 15 mL) e novamente com água gelada (c.a. 25 mL). O precipitado filtrado foi seco à pressão reduzida a temperatura ambiente para fornecer 15,11 g (90%) de um sólido branco com faixa de fusão= 142°-147°C. O produto foi recristalizado em acetona anidra para fornecer a bromometilftalimida com faixa de fusão= 147°-148°C. ( $C_9H_6BrNO_2$  e PM= 240,05)

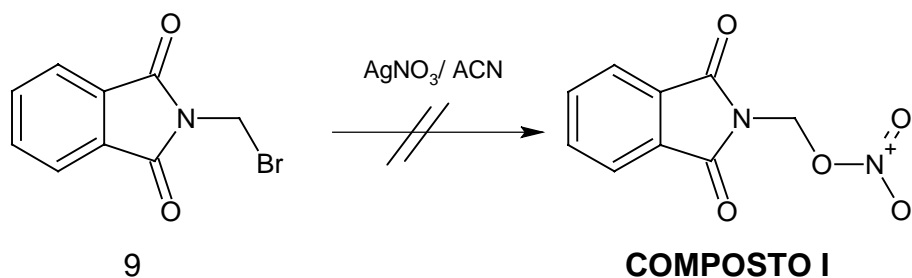
### 3.6 - Síntese do nitrato de (1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)metil



Em um balão de 125 mL adicionou-se 0,2 g (1,0 mmol) de clorometilftalimida em 10 mL de acetonitrila anidra. Adicionou-se a essa solução 0,197 g (1,16 mmol) de  $AgNO_3$ . A mistura foi mantida à 80° em refluxo protegida da luz, e sob atmosfera de nitrogênio por 48 horas. Após esse tempo,

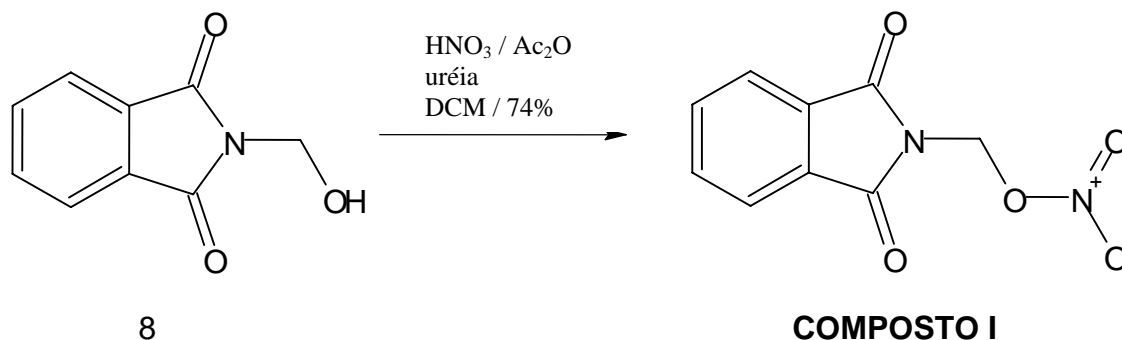
não se observa a formação de um novo produto por CCD (eluente: 98% DCM; MeOH 2%).

### 3.7 - Síntese do nitrato de (1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)metil



Em um balão de 125 mL adicionou-se 0,2 g (0,83 mmol) de bromometilftalimida em 10 mL de acetonitrila anidra. Adicionou-se a essa solução 0,197 g (1,16 mmol) de  $\text{AgNO}_3$ . Essa mistura foi mantida a 80° em refluxo protegida da luz, e sob atmosfera de nitrogênio por 48 horas. Não se observa a formação de um novo produto por CCD (eluente: 98% DCM; MeOH 2%).

### 3.8 - Síntese do nitrato de (1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il) metil



Em um balão de 100 mL adicionou-se 0,5 g (2,82 mmol) do composto obtido na reação descrita no item 3.2 e 17 mL de diclorometano. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0062 g (0,103 mmol) de uréia. A

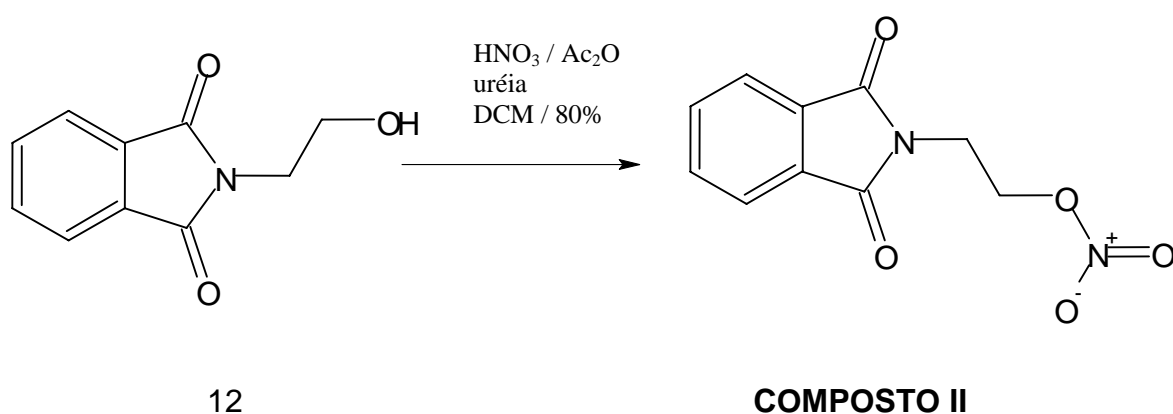


mistura reacional foi resfriada a 0°C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em béquer de 0,42 mL HNO<sub>3</sub> (9,56 mmol) e 1,16 mL (10,44 mmol) de anidrido acético e 3 mL de diclorometano. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% DCM)

Após esse tempo reacional, foram adicionados ao meio 40 mL de diclorometano e 30 mL de água/gelo. Essa mistura foi vertida para um funil de separação, onde recolheu-se a fase orgânica, que foi lavada mais 3 vezes com c.a de 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para obtenção de 0,475 g (74%) do produto desejado, como sólido branco com faixa de fusão= 75-77°C (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; PM= 222,154).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizado purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de diclorometano.

### 3.9 – Síntese do nitrato de 2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)etil



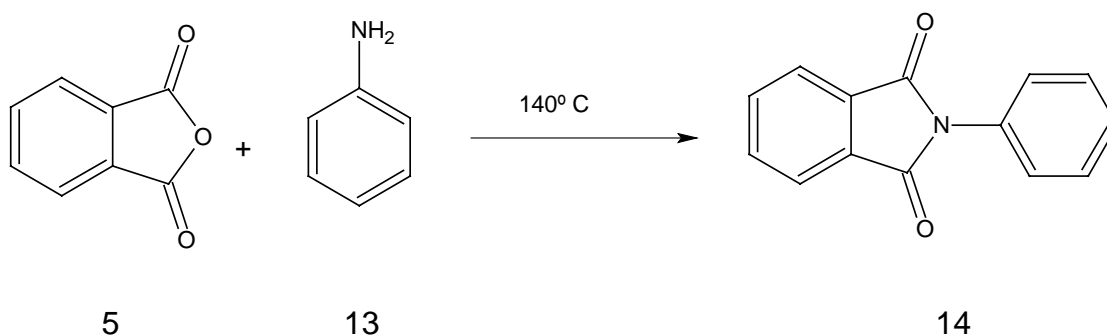
Em um balão de 100 mL adicionou-se 0,5 g do composto *N*-(2-*etanol*)ftalimida (2,61 mmol) –obtido comercialmente– e 17 mL de diclorometano. Após solubilização do produto adiciona-se 0,0062 g (0,103 mmol) de uréia. A mistura reacional foi resfriada a 0 °C em banho de gelo.

Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em béquer de 0,42 mL  $\text{HNO}_3$  (9,56 mmol) e 1,16 mL (10,44 mmol) de anidrido acético e 3 mL de diclorometano. Após a adição dos reagentes a reação é mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação. (eluente: 100% DCM)

Após esse tempo reacional, foram adicionados ao meio 40 mL de diclorometano e 30 mL de água/gelo. Essa mistura foi vertida para um funil de separação, onde recolheu-se a fase orgânica, que foi lavada mais 3 vezes com c.a de 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para obtenção de 0,494 g (80%) do produto desejado, como sólido branco com faixa de fusão= 87-89°C ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_5$ ; PM= 236,181).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de diclorometano.

### 3.10 – Síntese de 2-fenil-1*H*-isindolil-1,3(2*H*)-diona (LIMA, *et al* 2002).

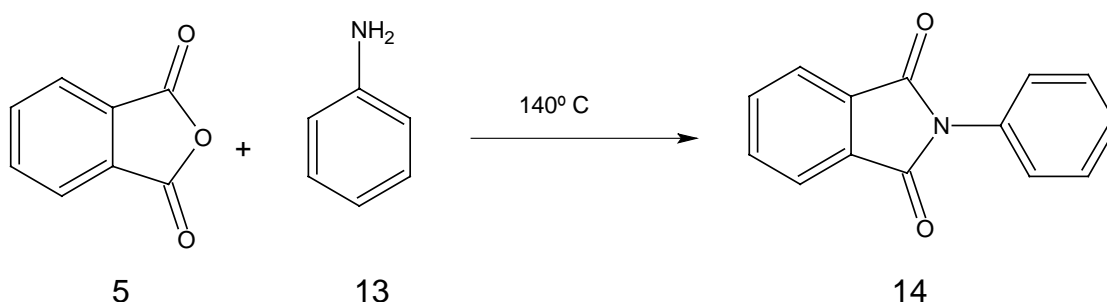


Em um balão de 10 mL, foram adicionados 0,5 g (3,38 mmol) de anidrido ftálico (5), e 0,4 mL (4,06 mmol;  $d=1,05$ ) de anilina (13). A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação à temperatura de 140 °C por 40 minutos.

O isolamento foi feito por resfriamento do meio reacional, seguido de adição de gelo e filtração do precipitado obtido, em funil de büchner, para

obtenção de 0,60 g (80%) do produto desejado (14), como cristais brancos com faixa de fusão= 204-205 °C ( $C_{14}H_9NO_2$ ; PM= 223 ).

3.10.1 - Síntese em microondas do 2-fenil-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diona (SANTOS *et al* 2005).



Em um aparelho de microondas doméstico Electroluz modelo ME27S, foi realizado uma adaptação com abertura na porção superior do microondas para que houvesse o encaixe do condensador de refluxo (Figura 06). Uma coluna de vidro foi preparada de modo a permitir que o condensador de refluxo estivesse fora do forno, esta coluna conectava-se ao balão de 10 mL, onde foram adicionados 0,5g de anidrido ftálico (5) e 2 mL de anilina (13). O forno foi programado em potência máxima, por 5 minutos.

Após esse tempo foi realizado transferência da mistura para um erlenmeyer de 125 mL onde foi adicionado cerca de 30 mL de etanol. Os produtos foram aquecidos até a solubilização e cristalizados em banho de gelo. Os cristais obtidos foram filtrados e analisados, fornecendo de 0,67 g (89%) do produto desejado (14), como cristais brancos com faixa de fusão= 204-205°C ( $C_{14}H_9NO_2$ ; PM= 223).

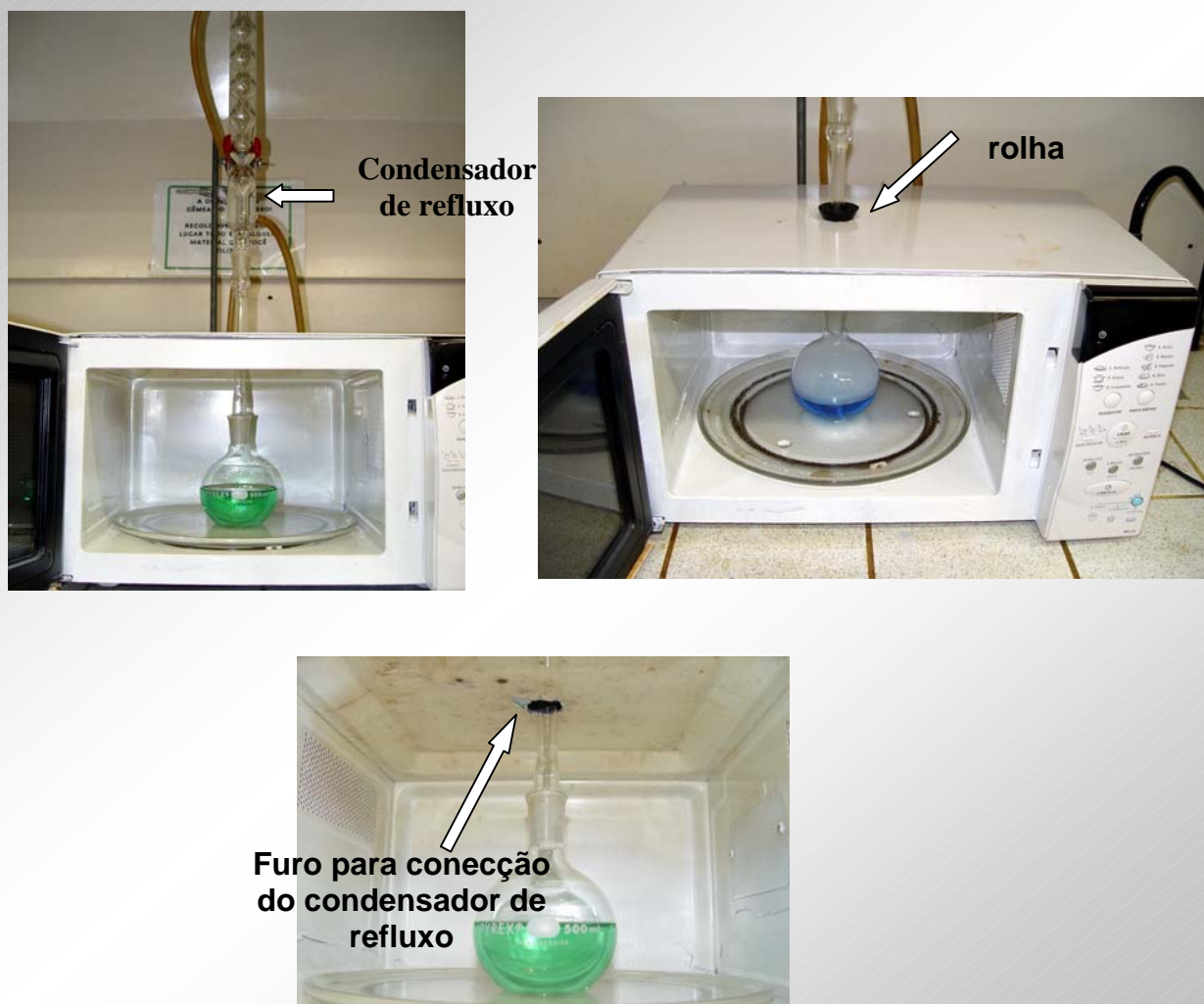
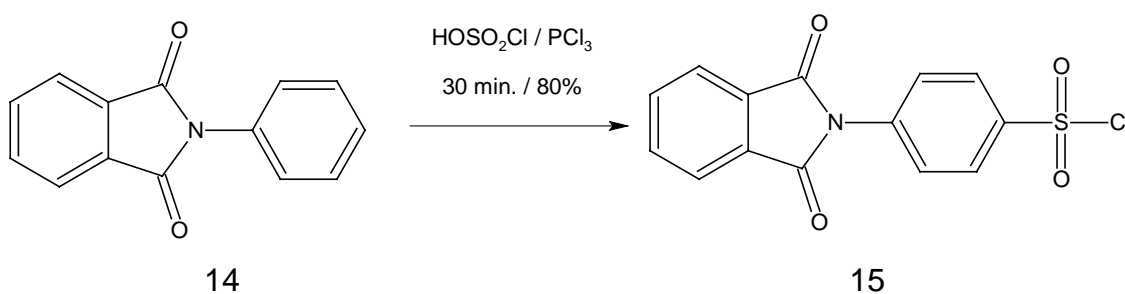


Figura 06: Adaptação do microondas doméstico para síntese orgânica – reação para obtenção de 2-fenil-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diona (14).

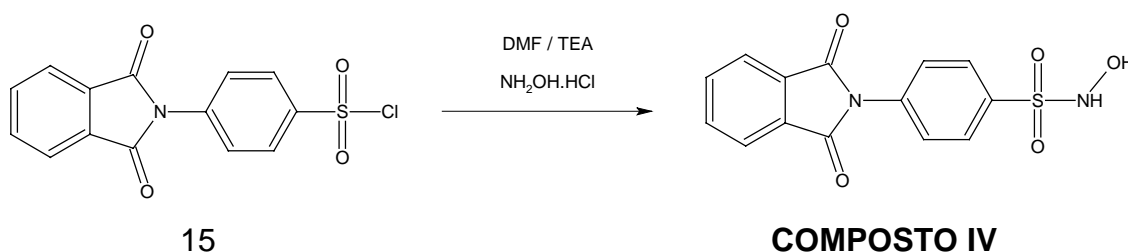
3.11 – Síntese de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzenosulfonil cloreto (62) ( adaptado de LIMA *et al* 2002)



À uma solução de 0,16 g (0,09 mL;  $d=1,753$ ; 1,35 mmol) de ácido cloro-sulfônico e 0,2 mL de  $\text{PCl}_3$ , a qual permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 10 minutos, adicionou-se, em pequenas quantidades, 0,15 g (0,67 mmol) de *N*-fenil-ftalimida (14) . A suspensão resultante foi agitada e aquecida à temperatura de  $50^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

O isolamento foi feito por resfriamento do meio reacional, seguido de adição de gelo/ $\text{H}_2\text{O}$  (ca. 20 mL) e filtração do precipitado formado, em funil de Büchner, para fornecer 0,15 g (70%) do produto desejado (15), como sólido amorfo de cor branca e faixa de fusão=  $180\text{-}182^\circ\text{C}$  ( $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{ClNO}_4\text{S}$ ;  $\text{PM}=322$ ).

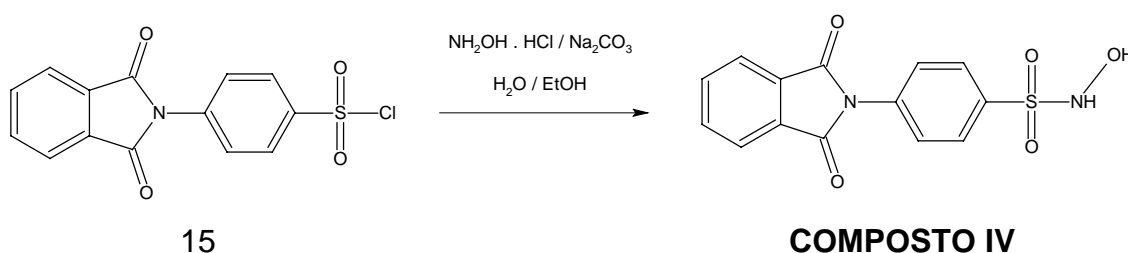
3.12 – Síntese do 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-*N*-hidroxibenzenosulfonamida (COMPOSTO IV)



Em um balão de 10 mL adicionou-se 0,2g de cloreto de sulfonila (0,621 mmol) em 3 mL de dimetilformamida (DMF). Em um béquer adicionou-se 2 mL de DMF e 43 mg de cloridrato de hidroxilamina (0,621 mmol) e 0,09 mL (0,621 mmol) de trietilamina (TEA). Essa solução foi gotejada no balão contendo o cloreto de sulfonila e a mistura reacional resultante foi mantida a temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio e acompanhada por CCD (eluente: 100% DCM)

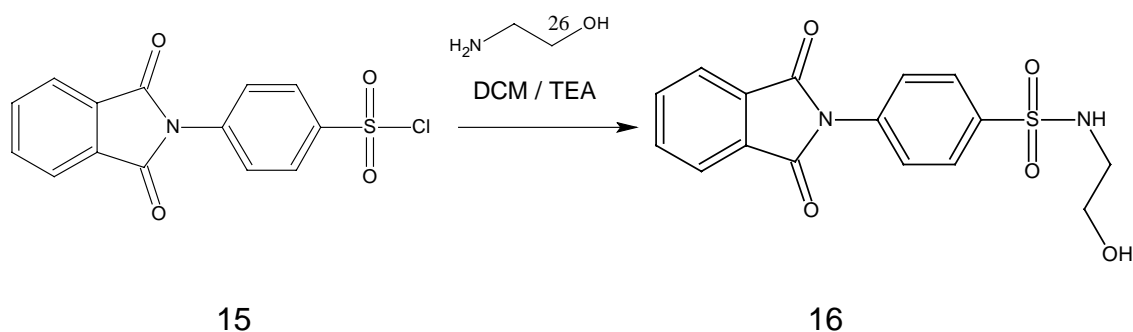
Após 24 horas de reação, adicionou-se 5 mL de água e a mistura foi vertida para um funil de separação e lavada com DCM (3 x 15 mL). A fase aquosa foi liofilizada para fornecer 0,178 g (90%) de um pó branco com faixa de fusão = > 270° C ( $C_{14}H_{10}N_2O_5S$ ; PM= 318,3).

### 3.12.1 – Síntese do 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-*N*-hidroxibenzenosulfonamida (COMPOSTO IV)



Em um balão de 10 mL adicionou-se 21,6 mg de cloridrato de hidroxilamina (0,31 mmol) e 26,1 mg de bicarbonato de sódio (0,31 mmol) e 0,1 mL de água destilada. Após cessar a eliminação de  $CO_2$ , adicionou-se 2 mL de etanol. Em seguida, adiciona-se 100 mg cloreto de sulfonila (0,31 mmol). A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 100% DCM) até que indicasse o término da reação. Após 45 minutos de reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, e o produto obtido é lavado com diclorometano a quente, (a fim de remover o cloreto de sulfonila que não reagiu) para fornecer 82 mg (80%) do produto desejado como um pó branco, com faixa de fusão maior que 275 °C ( $C_{14}H_{10}N_2O_5S$ ; PM= 318,306 ).

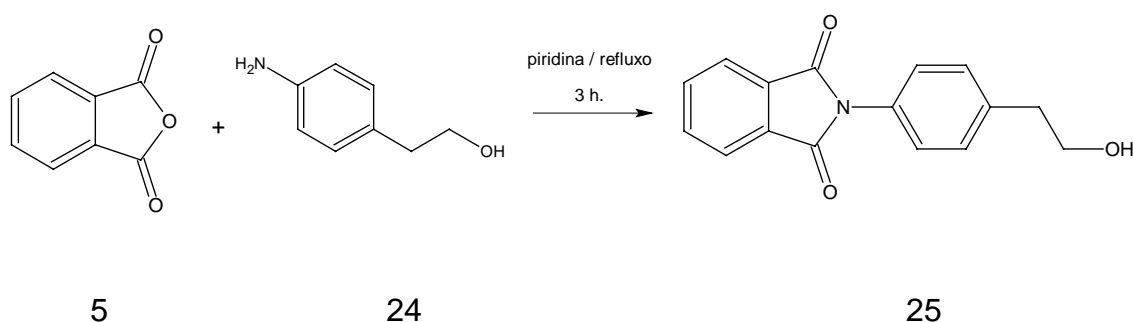
### 3.13–Síntese do 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-*N*-(2-hidroxietil)benzenosulfonamida



Em um balão de 100 mL adicionou-se 0,3 g do cloreto de sulfonila (0,932 mmol) (15) em 50 mL de diclorometano. Após solubilização, adicionou-se 0,13 mL de TEA e o pH foi medido (pH~9). Em seguida, adicionou-se 0,11 mL (2eq.) de etanolamina (26).

A reação foi acompanhada por CCD e mantida por 24 horas sob agitação em atmosfera de nitrogênio. Após esse tempo, foi adicionado a mistura reacional 20 mL de HCl 10% . Há formação de 0,2g (62 %) de um precipitado branco com faixa de fusão= 105-109°C.

### 3.14 – Síntese do 2-[4-(2-hidroxietil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona

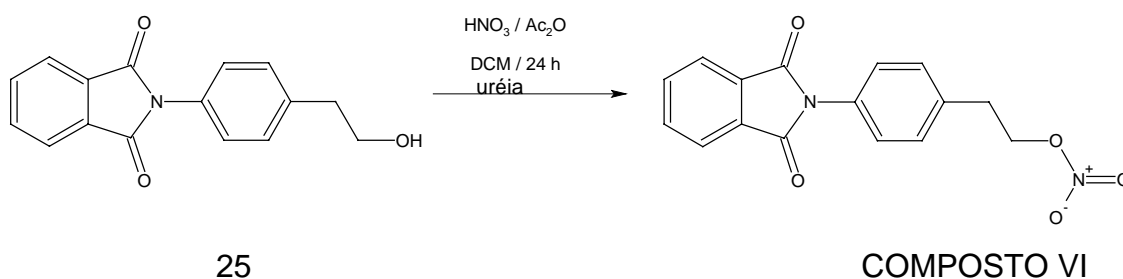


Em um balão de 50 mL conectado em condensador de refluxo, adicionou-se 0,3g de anidrido ftálico(5) (2,02 mmol) e 0,277 g da 2-(4-aminofenil)etanol (24) (2,02 mmol) em 10 mL de piridina. A reação foi mantida a 140°C durante 3 horas, até que a cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% DCM). Após resfriamento não

houve precipitação do produto. Por isso, foi adicionado ao meio 50 mL de diclorometano, e realizado lavagens sucessivas com sulfato de cobre 10% para eliminação da piridina. A fase orgânica foi lavada duas vezes com c.a de 30 mL de água, e adicionado sulfato de sódio. Após filtração e concentração à pressão reduzida, se obteve 0,4 g (74%) de sólido verde cristalino(25) com faixa de fusão= 172°-175°C.( C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>; PM= 267,28).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de diclorometano. A eficiência da separação por coluna cromatográfica, quando necessário, foi em torno de 67,5%.

### 3.15 – Síntese do nitrato de 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)fenil]etil



Em um balão de 10 mL adicionou-se 0,135 g (0,561 mmol) de 2-[4-(2-hidroxietil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (25) em 3 mL de diclorometano. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0013 g de uréia (6).

Essa mistura reacional foi resfriada a 0 °C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em um béquer de 0,1 mL HNO<sub>3</sub> (2,27 mmol) e 1,16 mL (1,91 mmol) de anidrido acético e 2 mL de diclorometano. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% DCM).

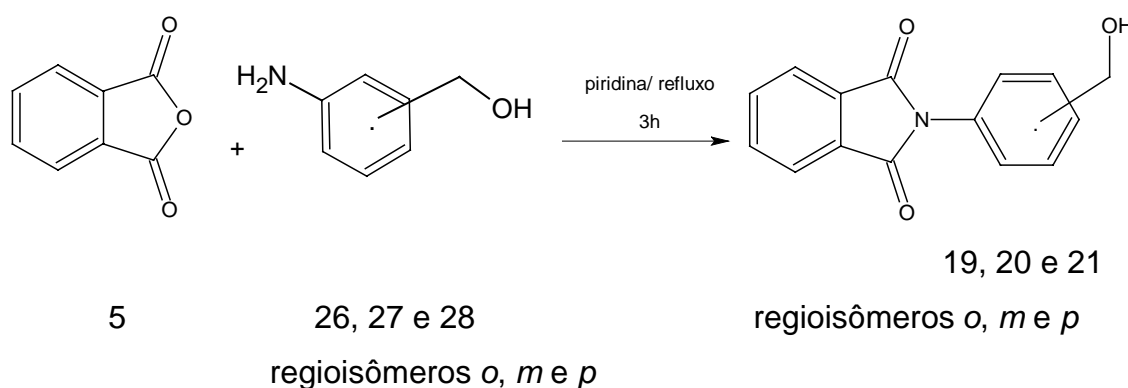
Após esse tempo reacional, foram adicionados ao meio 20 mL de diclorometano e 10 mL de água/gelo. A mistura foi vertida para um funil de separação, onde se recolheu a fase orgânica, que foi lavada mais 3 vezes com c.a de 10 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi



evaporada a pressão reduzida para obtenção de 0,120 g (76%) do produto desejado, como sólido amarelo com faixa de fusão= 141-144°C ( $C_{16}H_{12}N_2O_5$ ; PM= 312,23).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de diclorometano. A eficiência dessa separação, quando necessária foi em torno de 67 %.

### 3.16 - Procedimento geral para a síntese dos regioisômeros arílicos intermediários



Em um balão de 50 mL conectado em condensador de refluxo, adicionou-se 0,3g de anidrido ftálico (5) (2,02 mmol) e 0,270 g do respectivo regioisômero hidroximetilfenilamina (2,02 mmol) (26, 27 ou 28) em 10 mL de piridina. A reação foi mantida a 140°C durante 3 horas, até que a cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% DCM). Após resfriamento não houve precipitação do produto. Por isso, foi adicionado ao meio 50 mL de diclorometano, e foi realizado lavagens sucessivas com sulfato de cobre 10% até eliminação da piridina. A fase orgânica foi lavada duas vezes com c.a de 30 mL de água, e adicionado sulfato de sódio. Após evaporação a pressão reduzida, foi obtido o produto desejado (19, 20 ou 21) ( $C_{15}H_{11}NO_3$ ; PM= 253,25).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de diclorometano. A eficiência dessa separação, quando necessária, foi em torno de 72%.

3.16.1 – Síntese do intermediário 2-[2-(hidroximetil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (19)

Obteve-se 0,36 g (70%) de um produto sólido amarelo cristalino com faixa de fusão= 169°-174°C.

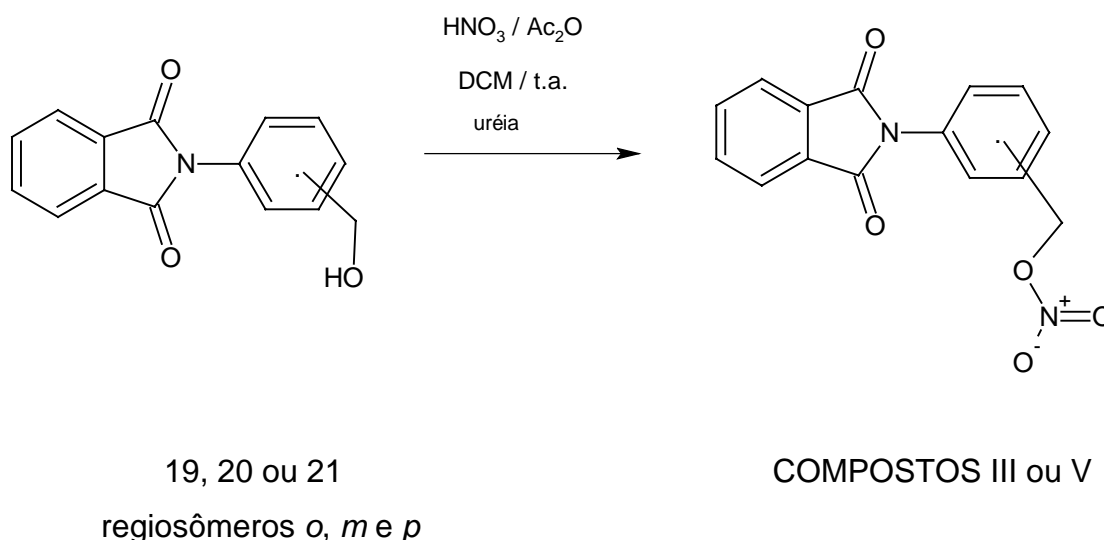
3.16.2 – Síntese do intermediário 2-[3-(hidroximetil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (20)

Obteve-se 0,42 g (82%) de um produto sólido amarelado (70) com faixa de fusão= 148°-151°C.

3.16.3 – Síntese do intermediário 2-[4-(hidroximetil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (21)

Obteve-se 0,26 g (50,6%) de um produto sólido amarelo cristalino (71) com faixa de fusão= °C.

3.17- Procedimento geral para a síntese dos **produtos finais** regioisômeros arílicos



Em um balão de 10 mL adicionou-se 75 mg do derivado ftalimídico (19, 20 ou 21) (0,296 mmol) em 3 mL de diclorometano. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0013 g (0,022 mmol) de uréia. A mistura reacional foi

resfriada a 0 °C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em um béquer de 0,1 mL HNO<sub>3</sub> (2,39 mmol) e 0,2 mL (2,09 mmol) de anidrido acético e 2 mL de diclorometano. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação. (Fase móvel: 100% DCM)

Após esse tempo reacional, foi adicionado ao meio 20 mL de diclorometano e 15 mL de água/gelo. Essa mistura foi vertida para um funil, onde se recolhe a fase orgânica, que é lavada mais três vezes com c.a de 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para fornecer o produto desejado (composto III ou V) (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; PM= 298,25).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de diclorometano.

#### 3.17.1 – Síntese do 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzil nitrato (COMPOSTO III)

Obteve-se 80 mg (90%) do produto desejado, como sólido branco com faixa de fusão= 126° -129°C.

#### 3.17.2 – Síntese do 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzil nitrato (COMPOSTO V)

Obteve-se de 78,2 mg (88%) do produto desejado, como sólido branco com faixa de fusão= 159° -161°C.

## **2 - Procedimentos para avaliação da atividade mutagênica (Teste de AMES)**

O procedimento foi inicialmente desenvolvido por MARON & AMES em 1983.

Linhagens utilizadas no ensaio:

Há diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* modificadas geneticamente a fim de detectar um tipo predominante de mutação, entre elas podemos citar: TA97, TA98, TA100 e TA102. TA100 e TA102 detectam mutações que causam substituição de pares de base, TA 98 e TA 97 detectam alterações onde há defasagem no quadro de leituras do DNA (MARON & AMES, 1983).

Utilizou-se para esse ensaio cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 e TA102 do laboratório de mutagenicidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara.

Tais linhagens, possuem as seguintes características: (AMES, 1983)

- 1- São auxotróficas em relação à histidina;
- 2- Possuem diversas mutações operon de histidina, as quais são alvos para mutação reversa;
- 3- Detectam diversos agentes mutagênicos que causam deslocamento no quadro de leitura do DNA, os quais restauram o quadro de leitura correto para síntese de histidina;
- 4 – Mutação no gene *hisG46*, esta no quadro de leitura do gene *hisG*, o qual codifica a primeira enzima para a síntese de histidina, específica da TA 100;
- 5-Mutação no gene *hisD3052*, constituído de 8 resíduos repetidos de –GC-, próximo ao local da mutação de deslocamento no quadro de leitura do gene *hisD*, o qual codifica a enzima histidinol desidrogenase, específica da TA 98;
- 6 – Mutação (*rfa*), que gera perda parcial da barreira lipopolissacarídica, aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana, facilitando a difusão de grandes moléculas para o interior da célula;
- 7- Mutação (*uvrB*), que provoca dano no sistema de reparo por excisão, resultando no aumento da sensibilidade na detecção de diversos agentes

mutagênicos. Fazendo também, com que a bactéria torne-se dependente de biotina para crescer;

8 – Plasmídeo pKM101, o qual favorece a resistência a ampicilina, assim como, aumenta a mutagênese espontânea e química, por estímulo ao sistema de reparo do DNA error-prone.

#### Manutenção e estoque das linhagens

As cepas de *Salmonella typhimurium* estão armazenadas em freezer a -80°C, em frascos para congelamento com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO como agente crioprotetor, para que se mantenham inalteradas todas suas características genéticas.

Antes do congelamento todas as linhagens tiveram seus genótipos confirmados (auxotrofia para histidina, mutação *rfa*, plasmídeo pKM101, deleção *uvrB* e taxa de reversão espontânea).

#### Preparo dos meios de cultura e soluções

##### Meio Vogel Bonner E (VB)

Dissolveu-se 0,25 g de sulfato de magnésio, 2,5g de ácido cítrico, 12,5g de fosfato de potássio dibásico e 4,375g de fosfato de sódio e amônio em 16,75 mL de água destilada a 45°C (quantidades suficientes para 25 mL de solução VB). A solução foi esterelizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

##### Glicose 40%

Preparou-se 50 mL de uma solução de glicose 40%, que foi esterelizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

##### Ágar mínimo glicosado (AMG)

Dissolveu-se 7,5g de ágar em 465 mL de água destilada, em seguida esterelizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Posteriormente adiciona-se em fluxo laminar estéril, 10 mL de VB e 25 mL de glicose 40%.

#### Top ágar ou ágar de superfície

Dissolveu-se 0,5 g de cloreto de sódio e 0,6g de ágar em 100 mL água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### Solução biotina/histidina 0,05 mM (10 mL/100 mL de top agar)

Dissolveu-se 0,00123g de biotina e 0,00096g de histidina em 10 mL de água destilada. A solução foi esterelizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### Caldo Nutriente Oxoid n.2.

Dissolveu-se 0,75g de meio Oxoid em 30 mL de água destilada. A solução foi esterelizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### Controles positivos e negativos

O controle negativo, é o solvente utilizado para dissolver a amostra, utilizando-se como volume padrão, o maior volume da amostra testada 100 µL, que também é a quantidade necessária para dissolver a concentração máxima utilizada do fármaco.

Os controles positivos são compostos mutagênicos específicos para cada cepa e condição do ensaio, sendo 25 µL/placa azida sódica (1,25 µg/placa) e 100 µL de mitomicina (0,5 µg/placa) os controles para a TA100 e TA102, respectivamente, na ausência de ativação metabólica. Para os ensaios com ativação metabólica o controle positivo para a TA100 é 50µL 2-antramina (1,25µg/placa) e o para TA102 é 50µL 2-aminofluoreno (1,25µg/placa).

### Procedimento do ensaio sem o sistema de ativação metabólica (-S9)

Utilizou-se o método de pré-incubação.

#### 1º dia

Preparam-se todas as soluções e meios de cultura anteriormente descritos. Em fluxo laminar, foi adicionado ao material estéril (AMG) 10 mL de solução de VB e 25 mL de solução de glicose a 40% (previamente preparadas), homogeneizou-se, e distribuiu-se cerca de 25 mL de AMG em cada placa.

O AMG distribuído nas placas foi deixado em repouso por 48 horas em estufa a 37°C para posterior utilização.

#### 2º dia

Em fluxo laminar, as cepas de *Salmonella typhimurium* (TA100 e TA 102) foram inoculadas separadamente com alça de platina, nos respectivos caldos nutrientes e mantidas a 37°C, sob agitação constante (160 rpm) durante 14 horas, de modo a se obter uma densidade de 1 a  $2 \times 10^9$  bactérias/mL.

#### 3º dia

Diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas a 100 µL da cultura de bactérias e 100 µL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 (ou 500 µL da mistura S9 em ensaios de ativação metabólica) e incubados por 20-30 minutos a 37°C. As soluções contendo os compostos tinham DMSO como solvente. Após esse tempo, adicionou-se 2 mL de agar superfície (“top ágar”) suplementado com trações de histidina e biotina, homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do “top ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicatas.

#### 5º dia

Após 48 horas, foi realizada a contagem manual das colônias revertentes, para o controle positivo utilizou-se o sistema protoCOL Colony Counter Version 3.15.630 (1998-2001) SYNBIOSIS LTD.

### Avaliação e interpretação dos resultados

Os dados finais obtidos do ensaio foram analisados utilizando-se o programa estatístico Salanal (Salmonella Assay Analysis) versão 1.0 do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA. Tal programa permite avaliar o efeito dose-resposta por meio de cálculos de análise de variância (ANOVA- teste F) entre a medida do número de revertentes nas diferentes concentrações (doses) testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para análise dos dados foi o de Bernstein (BERNSTEIN *et al* 1982). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por esse programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por unidade de medida da amostra analisada.

Apartir dos resultados foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada de cada composto. A RM é dada pela seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média nº revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média nº revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

O crescimento espontâneo significa que o número de revertentes que desenvolveram na placa, independente de serem ou não induzidos, onde considera-se como resposta positiva valores maiores ou iguais a 2 (Valent *et al*, 1993).

### Procedimento do ensaio com sistema de ativação metabólica (+S9)

O teste de mutagenicidade com sistema de ativação metabólica é realizado com fração microssomal S9 (S9 mix) preparadas a partir do homogeinizado de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos sob a forma liofilizada.

São preparados 50 mL de S9 mix utilizando-se as seguintes soluções:



|                     |                                          |
|---------------------|------------------------------------------|
| Água estéril        | 19,75 mL                                 |
| Tampão fosfato 0,2M | 25 mL                                    |
| NADP 0,1M           | 2 mL (freezer)                           |
| G-6-P 1M            | 250µL (geladeira)                        |
| MgCl 0,4M           | 500 µL (geladeira)                       |
| KCl 1,65M           | 500 µL                                   |
| Fração S9           | Dissolvida em 2 mL de água miliQ estéril |

O procedimento para este ensaio é o mesmo, no entanto, ao invés do tampão, deve adicionar 500 µL da mistura S9.

A mistura S9 tem viabilidade de 4 horas a partir do preparo quando mantida em gelo. As placas são então incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido o tempo necessário foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivo e negativo foram realizados em triplicatas.

### **3 - Ensaio em cultura de células K562**

Foi usada a linhagem celular de leucemia humana K562 ATCC (American Type Culture Collection), Filadélfia, PA, EUA. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, USA) contendo 10 % de soro bovino fetal e glutamina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos as células foram incubadas na densidade de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL. Para realização da cultura com hemina (30uM), esta foi adicionada 72 horas antes do início do experimento com o composto desejado.

O tempo de 0 hora consistiu na retirada de células K562 não tratadas. A partir desse ponto, foi adicionado os respectivos compostos nas concentrações desejadas (5, 30, 60 e 100uM), as células foram então mantidas por 7 dias em cultura, sem nova adição de composto ou substituição de meio de cultura.

Foram realizadas coletas de células nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A morfologia das células foi analisada nestes pontos através de lâminas de citospin coradas com Leishman e a viabilidade celular foi realizada através da coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

### Extração de RNA

Para obtenção do RNA de K562 foi utilizado o método de extração com o reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra contendo K562 e TRIzol foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, 200  $\mu$ L de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) foi adicionado e agitado vigorosamente sendo realizada nova incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 19.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500  $\mu$ L de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizada nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 19.000g à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionou-se 800  $\mu$ L de etanol gelado a 70%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 14.000g à 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuspendido em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA.

A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose à 1,2%. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer - 80°C.

### Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA obtidas, foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies). Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, 3 µg de RNA foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies), para remoção de DNA contaminante. Foi adicionado 1,0 µL de 1 u/µL DNase I, 1,0 µL de 10x DNase I Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl) e água suficiente para um volume final de 10,0 µL de reação. A reação foi realizada por 15 minutos a temperatura ambiente e paralisada com 1,0 µL de 25 mM EDTA, e incubado por 10 minutos a 65°C.

Para a síntese do cDNA adicionou-se a seguir 1,0 µL de 50 µM oligo (dT) 20 e 1,0 µL de 10 mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. A cada amostra adicionou-se 10,0 µL da seguinte mistura de reação: 2 µL de 10x RT buffer, 4,0 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,0 µL de 0,1 M DTT, 1,0 µL de 40 U/µL RNase OUTTM e 1,0 µL de 200 U/µL Superscript III RTTM. A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguido de 5 minutos a 85°C. A seguir, foi adicionado 1,0 µL de 2 U/µL E. coli RNase H por 20 minutos a 37°C.

### Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR para amplificação do gene da beta-actina (BAC). Realizou-se as reações com: 5,0 µL de 10x PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µL de 10 mM dNTP's, 1,0 µL de 10 mM de primer BACF (5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 1,0 µL de 10 mM de primer BACR (5'-TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 1,0 µL de cDNA e 39 µL de água, para um volume final de 50 µL. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/ 30 segundos – 58°C/ 45 segundos – 72°C/ 40 segundos, sendo finalizado por 72°C/ 7 minutos. Os

produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1% para verificação da ampliação de 640pb.

#### Desenho dos Primers para a reação do PCR quantitativo em tempo real

Os primers utilizados nas reações do PCR Quantitativo em Tempo Real, foram desenhados com o software “Primer Express” (Applied Biosystems), analisados no programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para verificação das condições de formação de estruturas como hairpins e dimers.

#### Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo real

##### Concentração de Primer

A concentração ótima de primer a ser utilizada na PCR quantitativa em tempo real, deve ser mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos primers (sense e anti-sense) na concentração final de 150nM, 300nM, 600nM e 900nM. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (threshold) é denominado ciclo de threshold ou Ct. Considerando que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, o Ct não deveria variar. Se o aumento da concentração de primer ocasionou diminuição de Ct, então a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct.

Seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de primer utilizado na amplificação dos genes estudados na técnica de PCR quantitativo em tempo real.

| Gene           | Seqüência Primer               | Tamanho do fragmento amplificado |
|----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Gama-Glob - F  | 5´- CCAGCTGAGTGAAGTCACTGT – 3´ | 81 pb                            |
| Gama-Glob - R  | 5´- ACGGTCACCAGCACATTTCC – 3´  |                                  |
| β – actina - F | 5´- AGGCCAACCGCGAGAAG – 3´     | 79 pb                            |
| β – actina - R | 5´-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-     |                                  |



As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBERGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCL<sub>2</sub>, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBERGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. Além disso, utiliza-se amostras de cDNA e primers específicos para o gene analisado.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct.

As reações realizadas continham 12,5 µL do reagente SYBERGreen PCR Master Mix®, 25 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de primer determinada, perfazendo um volume final de 25 µL. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/ 10 minutos, seguido de 45 ciclos: 95°C/ 15 segundos – 60°C/ 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de TM (melting temperature) entre os produtos de PCR amplificados, essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

#### Análise dos dados do real time

A expressão dos genes de interesse foram determinadas de uma forma relativa, sendo normalizadas com relação a genes chamados calibradores, neste estudo foram utilizados a  $\beta$ -actina e o GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a

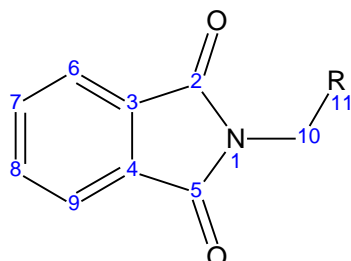
expressão desses genes pode variar consideravelmente (Vandesompele, 2002).

Dos valores de Ct obtidos, foi calculada média aritmética das duplicatas do Ct. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula  $Q = E \Delta Ct$ , onde E = eficiência de reação e  $\Delta Ct$  = menor Ct observado – Ct da amostra. Desta forma a expressão foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (Menor Ct observado), que recebeu valor  $Q = 1$ . Os valores de Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao programa Gnorm (Vandesompele, 2002), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra é dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e Fator de Normalização a amostra. O dado obtido é expresso em unidades arbitrárias ou valor absoluto de expressão.

## VII - Resultados e Discussão

Nas tabelas 01, 02 e 03 podemos visualizar os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos compostos da série alquílica, sulfonamídica e arílica respectivamente.

### Série alquílica



Ftalimida (7)

R= OH (8)

Cl (10)

ONO<sub>2</sub> (COMPOSTO I)

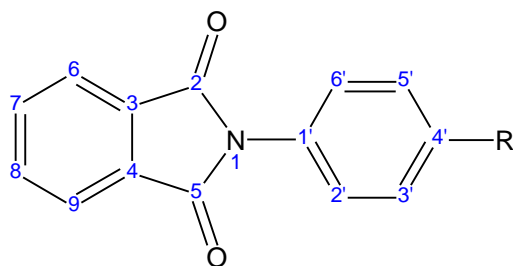
CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub> (COMPOSTO II)

**Tabela 01:** Tabela comparativa de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono da série alquílica

| posição | 7                                   |                                 | 8                                   | 10                                  | COMPOSTO I                          |                                 | COMPOSTO II                         |                                 |
|---------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
|         | RMN <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>$\delta$ | RMN <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (Hz) | RMN <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (Hz) | RMN <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>$\delta$ | RMN <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>$\delta$ |
| 1       | 11,36 s                             |                                 |                                     |                                     |                                     |                                 |                                     |                                 |
| 2       |                                     | 169,16                          |                                     |                                     |                                     | 166,01                          |                                     | 167,82                          |
| 3       |                                     | 134,22                          |                                     |                                     |                                     | 135,04                          |                                     | 134,3                           |
| 4       |                                     | 134,22                          |                                     |                                     |                                     | 135,04                          |                                     | 134,3                           |
| 5       |                                     | 169,16                          |                                     |                                     |                                     | 166,01                          |                                     | 167,82                          |
| 6       | 7,84 m                              | 132,52                          | 7,92 m                              | 8,0 m                               | 7,93 dd                             | 131,47                          | 7,85 m                              | 131,8                           |
| 7       | 7,83 m                              | 122,83                          | 7,88 m                              | 7,93 m                              | 7,8 dd                              | 124,28                          | 7,73 m                              | 123,6                           |
| 8       | 7,83 m                              | 122,83                          | 7,88 m                              | 7,93 m                              | 7,8 dd                              | 124,28                          | 7,73 m                              | 123,6                           |
| 9       | 7,84 m                              | 132,52                          | 7,92 m                              | 8,0 m                               | 7,93 dd                             | 131,47                          | 7,85 m                              | 131,8                           |
| 10      |                                     |                                 | 4,9 d                               | 5,56 s                              | 6,08 s                              | 66,7                            | 4,05 t                              | 35,23                           |
| 11      |                                     |                                 | 6,4 t                               |                                     |                                     |                                 | 4,66 t                              | 69,52                           |



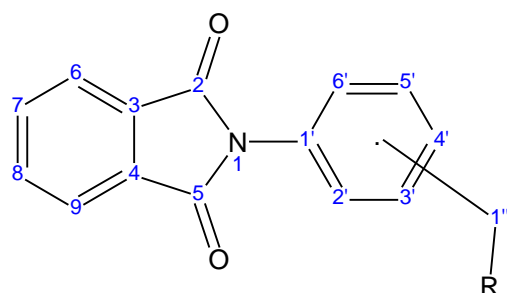
## Série sulfonamídica

R = H (**14**)SO<sub>2</sub>Cl (**15**)SO<sub>2</sub>NHOH (**COMPOSTO IV**)

**Tabela 02:** Tabela comparativa de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono da série sulfonamídica.

| posição   | <b>14</b>                 |                       | <b>15</b>                 |                       | <b>COMPOSTO IV</b>        |                       |
|-----------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
|           | RMN <sup>1</sup> H δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C δ | RMN <sup>1</sup> H δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C δ | RMN <sup>1</sup> H δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C δ |
| 1         |                           |                       |                           |                       |                           |                       |
| 2         |                           | 167,2                 |                           | 166,93                |                           | 167,84                |
| 3         |                           | 131,61                |                           | 131,53                |                           | 129,8                 |
| 4         |                           | 131,61                |                           | 131,53                |                           | 129,8                 |
| 5         |                           | 167,2                 |                           | 166,93                |                           | 167,84                |
| 6         | 7,95 m (8,3 ; 2,3)        | 134,9                 | 7,97 m                    | 134,77                | 7,79 m (7,8; 2,16)        | 136,4                 |
| 7         | 7,89 m                    | 123,7                 | 7,91 m                    | 124,05                | 7,57 dd                   | 118,9                 |
| 8         | 7,89 m                    | 123,7                 | 7,91 m                    | 124,05                | 7,57 dd                   | 118,9                 |
| 9         | 7,95 m (8,3; 2,3)         | 134,9                 | 7,97 m                    | 134,77                | 7,79 m (7,8; 2,16)        | 136,4                 |
| 1'        |                           | 131,94                |                           | 132,03                |                           | 131,84                |
| 2'        | 7,51 dd                   | 129,08                | 7,43 d (8,2)              | 126,08                | 7,9 dd (8,71; 1,9)        | 126,56                |
| 3'        | 7,43 m                    | 127,55                | 7,76 d (8,2)              | 126,72                | 7,67 m                    | 129,6                 |
| 4'        | 7,43 m                    | 125,25                |                           | 147,57                |                           | 142,38                |
| 5'        | 7,43 m                    | 127,55                | 7,76 d (8,2)              | 126,72                | 7,67 m                    | 129,6                 |
| 6'        | 7,51 dd (8,1; 2,1)        | 129,08                | 7,43 d (8,2)              | 126,08                | 7,9 dd (8,71; 1,9)        | 126,56                |
| 1'' / 2'' |                           |                       |                           |                       | 10,64 s                   |                       |

## Série arílica



R = OH (19, 20 e 21)

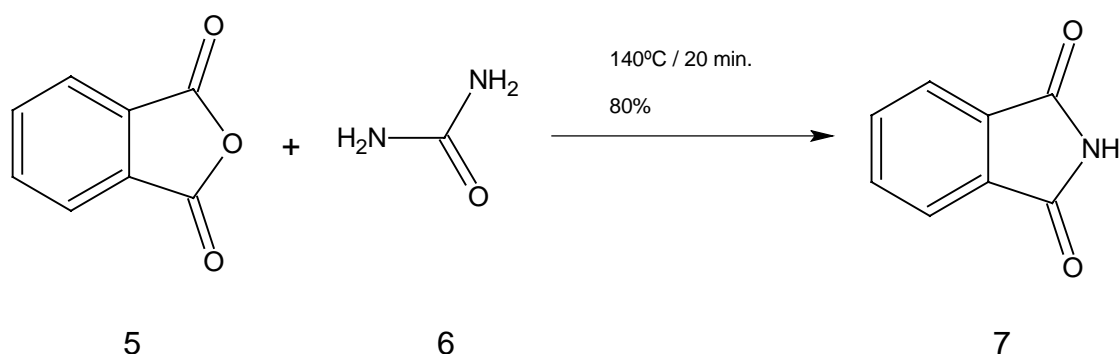
ONO<sub>2</sub> (COMPOSTOS III E V)CH<sub>2</sub>OH (25)CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub> (COMPOSTO VI)

**Tabela 03:** Tabela comparativa de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono da série arílica.

| Posição | 19                           |                          | 20                           |                          | COMPOSTO III                 |                          | 21                           |                          | COMPOSTO V                   |                          | 25                           |                          | COMPOSTO VI                  |                          |
|---------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
|         | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | RMN <sup>1</sup> H<br>δ (Hz) | RMN <sup>13</sup> C<br>δ |
| 2       |                              | 107,66                   |                              | 106,96                   |                              | 107                      |                              | 107,27                   |                              | 107,22                   |                              | 107,76                   |                              | 107,76                   |
| 3       |                              | 130,1                    |                              | 131,5                    |                              | 131,5                    |                              | 131,75                   |                              | 131,86                   |                              | 132,17                   |                              | 131,09                   |
| 4       |                              | 130,1                    |                              | 131,5                    |                              | 131,5                    |                              | 131,75                   |                              | 131,86                   |                              | 132,17                   |                              | 131,09                   |
| 5       |                              | 107,66                   |                              | 106,96                   |                              | 107                      |                              | 107,27                   |                              | 107,22                   |                              | 107,76                   |                              | 107,76                   |
| 6       | 7,95 dd<br>(7,46)            | 128,63                   | 7,94 dd<br>(8,43, 2,2)       | 134,12                   | 7,98 dd<br>(8,15, 2,1)       | 134,8                    | 7,99 dd<br>(8,57, 2,3)       | 127,57                   | 7,98 dd<br>(8,45, 2,1)       | 134,8                    | 7,95 dd<br>(8,5, 2,3)        | 134,81                   | 7,95 m<br>(8,43, 2,4)        | 134,88                   |
| 7       | 7,82 dd                      | 134,25                   | 7,78 dd                      | 123,45                   | 7,82 dd                      | 134,11                   | 7,8 dd                       | 134,42                   | 7,81 dd                      | 134,11                   | 7,88 dd<br>(8,5, 2,3)        | 134,15                   | 7,79 m                       | 124,2                    |
| 8       | 7,82 dd                      | 134,25                   | 7,78 dd                      | 123,45                   | 7,82 dd                      | 134,11                   | 7,8 dd                       | 134,42                   | 7,81 dd                      | 134,11                   | 7,88 dd<br>(8,5, 2,3)        | 134,15                   | 7,79 m                       | 124,2                    |
| 9       | 7,95 dd<br>(7,46)            | 128,63                   | 7,94 dd<br>(8,43, 2,2)       | 134,12                   | 7,98 dd<br>(8,15, 2,1)       | 134,8                    | 7,99 dd<br>(8,57, 2,3)       | 127,57                   | 7,98 dd<br>(8,45, 2,1)       | 134,8                    | 7,95 dd                      | 134,81                   | 7,95 m<br>(8,43, 2,4)        | 134,88                   |
| 1'      |                              | 133,3                    |                              | 141,96                   |                              | 133,71                   |                              | 128,25                   |                              | 133,6                    |                              | 139,16                   |                              | 132,12                   |
| 2'      |                              | 134,05                   |                              | 7,49                     |                              | 129,88                   |                              | 7,52 d<br>(8,6, 1,9)     |                              | 129,93                   |                              | 7,38 m                   |                              | 130,07                   |
| 3'      |                              | 7,46 dd<br>(7,8, 1,2)    |                              | 139,25                   |                              | 132,52                   |                              | 7,44 d                   |                              | 126,99                   |                              | 7,38 m                   |                              | 127,29                   |
| 4'      |                              | 7,5 dd<br>(7,8, 1,2)     |                              | 123,64                   |                              | 7,37 m                   |                              | 7,45 d                   |                              | 127,03                   |                              | 7,38 m                   |                              | 117,61                   |
| 5'      |                              | 7,5 dd<br>(7,8, 1,2)     |                              | 123,68                   |                              | 7,37 m                   |                              | 7,53 dd<br>(7,8)         |                              | 127,6                    |                              | 7,38 m                   |                              | 127,29                   |
| 6'      |                              | 7,64 dd                  |                              | 129,30                   |                              | 7,41 dd<br>(7,6)         |                              | 7,55 d                   |                              | 128,97                   |                              | 7,38 m                   |                              | 130,07                   |
| 1''     |                              | 4,52 s                   |                              | 62,32                    |                              | 4,76 s                   |                              | 64,43                    |                              | 5,5 s                    |                              | 74,18                    |                              | 33,38                    |
| 2''     |                              |                          |                              |                          |                              |                          |                              |                          |                              |                          |                              |                          |                              | 73,41                    |

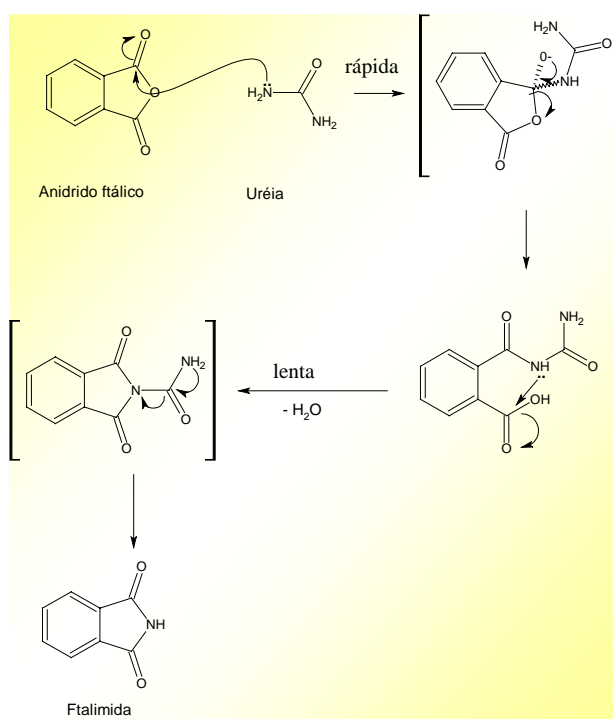
## 8.1 – Sínteses realizadas

## 8.1.1 – Síntese de 1,3-Isoindolinodiona



A ftalimida (7) foi obtida com sucesso através da condensação do anidrido ftálico (5) com uréia (6), conforme a metodologia descrita no procedimento experimental item 3.1., em rendimentos médios de 80% com faixa de fusão= 232-234 °C ( $C_8H_5NO_2$ ; PM= 147).

Mecanismo da reação:



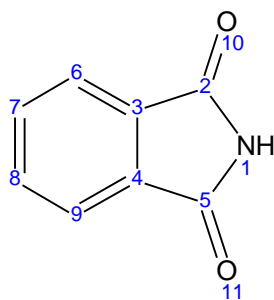
Esquema 09: Mecanismo de reação para formação da ftalimida

Na primeira etapa dessa reação há ataque do par de elétrons não ligante do nitrogênio da uréia (6) ao carbono carbonílico que sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta^+$ ). Esse carbono carbonílico ( $sp^2$ ) está em um anel de cinco membros tensionado. Há um rompimento da ligação  $\pi$  e deslocamento da carga negativa para o átomo de oxigênio. Essa etapa leva à geração de um intermediário tetraédrico, ocorrendo clivagem da ligação sigma do C-O do anidrido, com o deslocamento da carga negativa para o átomo de oxigênio. Na etapa seguinte, o intermediário teve seu anel de cinco membros aberto. A restauração desse anel é endergônica, justificando a energia térmica fornecida ao sistema. No entanto, essa restauração só é possível porque o nitrogênio da ligação amida formada ainda contém pares de elétrons não ligantes, que podem ser utilizados para realizar um segundo ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico ( $sp^2$ ) do ácido carboxílico. Esse ataque gera o rompimento da ligação  $\pi$ , e deslocamento de elétron para o átomo de oxigênio, levando à formação de intermediário tetraédrico. Há restauração da ligação  $\pi$  e expulsão de uma molécula de água. Na última etapa, há uma eliminação levando à formação da ftalimida (7).

O mecanismo dessa reação para formação da ftalimida (7), bem como de seus derivados são muito semelhantes. A diferença primária está que nos derivados ftalimídicos o nucleófilo é geralmente uma aril-amina, e há geralmente eliminação de uma molécula de água. Mas todos os eventos de quebra e formações de ligações ocorrem conforme exemplificado pelo esquema 09.

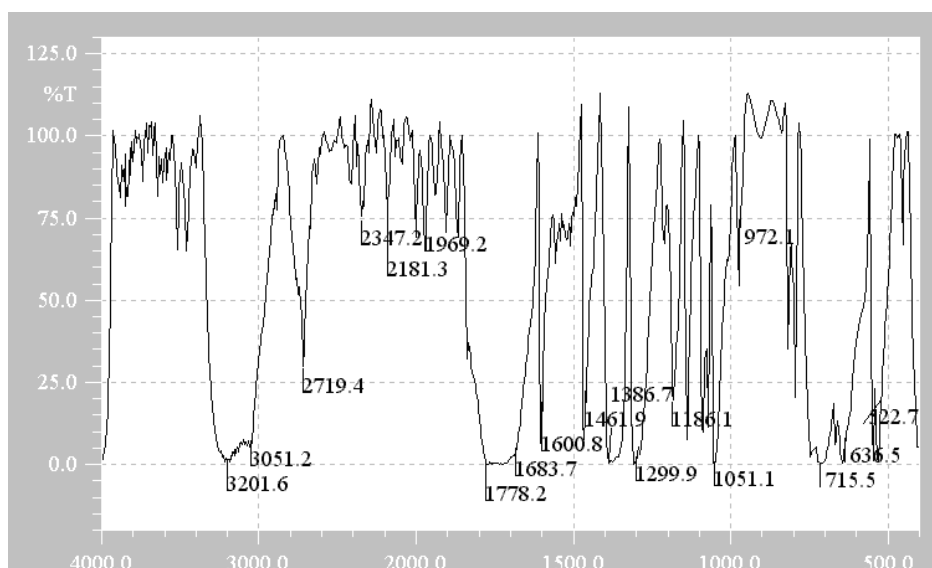
A identificação do composto foi realizada comparando a faixa de fusão do produto obtido, com os valores da literatura (MANO *et al* 2002; LIMA, 2001).

Identificação da ftalimida (7):



7

Infravermelho (pastilha de KBr):  $\nu$  N-H imida =  $3201\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático =  $3051\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1778\text{ cm}^{-1}$  e  $1683\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1386\text{ cm}^{-1}$ ;  
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7,83(m, 4H; H6, H7, H8 e H9);  $\delta$  11,36 (H1).  
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  169,16 (C2 e C5);  $\delta$  134,22 (C6 e C9);  $\delta$  132,52 (C3 e C4) e  $\delta$  122,83 (C7 e C8).

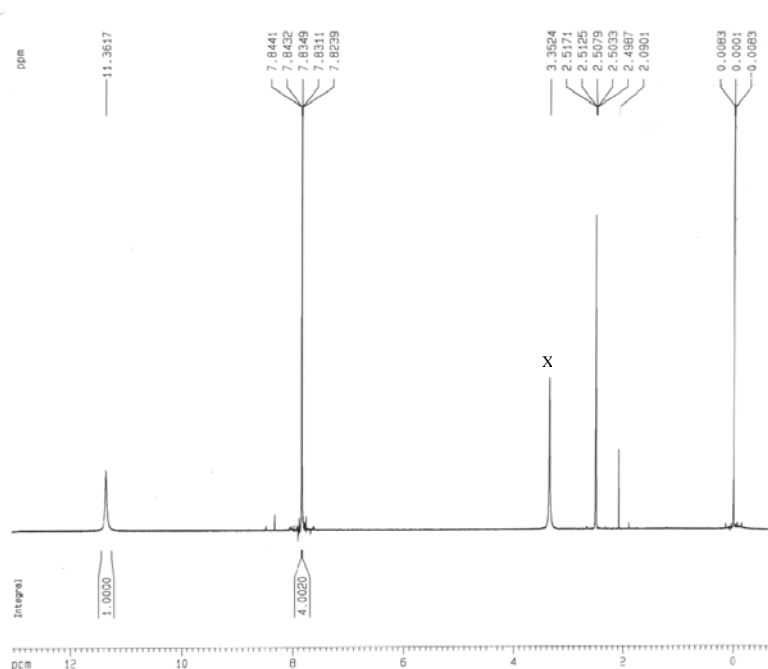


Espectro 01: Espectro de infravermelho da ftalimida (7) (Pastilha de KBr).

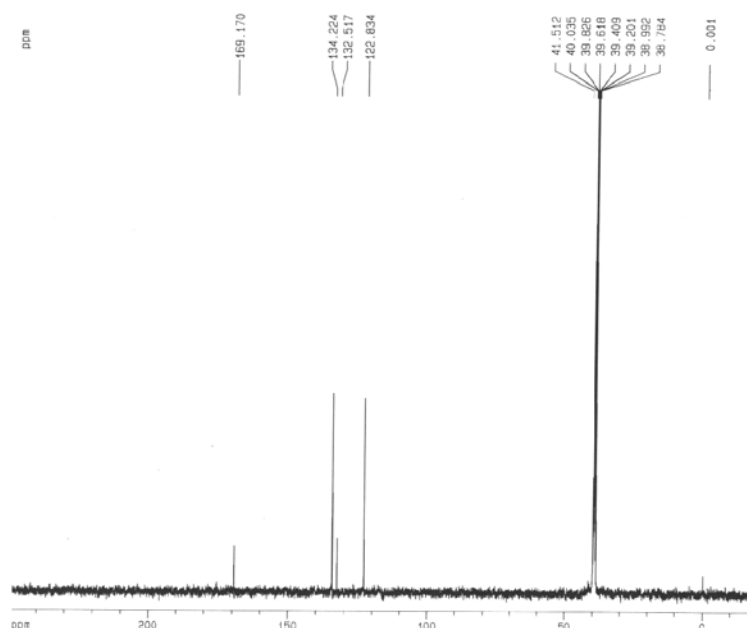
Conforme podemos observar pelo espectro no infravermelho (espectro 01), a substituição de um átomo de oxigênio por um átomo de nitrogênio modifica o espectro, principalmente na região da carbonila conjugada, que

agora absorve em frequência menor na ftalimida, quando comparada ao anidrido ftálico.

A absorção em menor frequência da carbonila está diretamente relacionado à menor eletronegatividade do átomo de nitrogênio em relação ao oxigênio, conforme pode-se evidenciar pela lei de Hooke, e a capacidade de utilizar seus pares de elétrons não ligantes em fazer ressonância com a carbonila.



Espectro 02: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) da ftalimida (7) ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 400 MHz).



Espectro 03: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN<sup>13</sup>C) da ftalimida (7) (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 400 MHz).

No espectro 02 e 03 podemos observar uma maior desproteção tanto dos hidrogênios aromáticos, quanto dos carbonos, quanto há troca do oxigênio presente no anidrido ftálico (5), pelo nitrogênio da ftalimida (7), relacionado à capacidade que o par de elétrons não ligantes do nitrogênio possui de fazer ressonância com a carbonila.

As ftalimidas são classicamente utilizadas em química orgânica sintética como grupo de proteção de aminas primárias. Os derivados ftalimídicos podem ser preparados através da condensação do anidrido ftálico com aminas primárias, ou também podem ser preparados por substituição nucleofílica, quando ftalimida é tratada com base para geração do ânion ftalimídico (figura 07). O tratamento com base é realizado para retirar o hidrogênio da ftalimida (7) relativamente ácido ( $pK_a = 9$ ) (figura 07). O ânion ftalimídico pode reagir com haletos de alquila primários e secundários para levar à formação de aminas. Esse método de síntese é conhecido como síntese de Gabriel. (SOLOMONS, 1996).

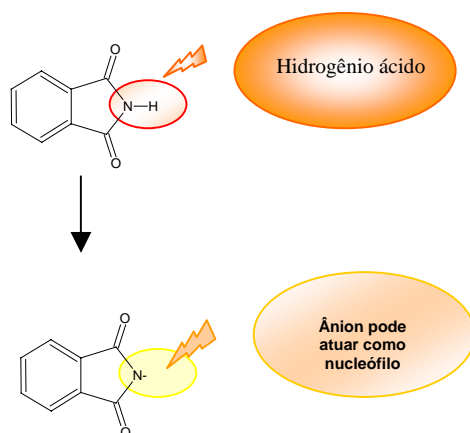
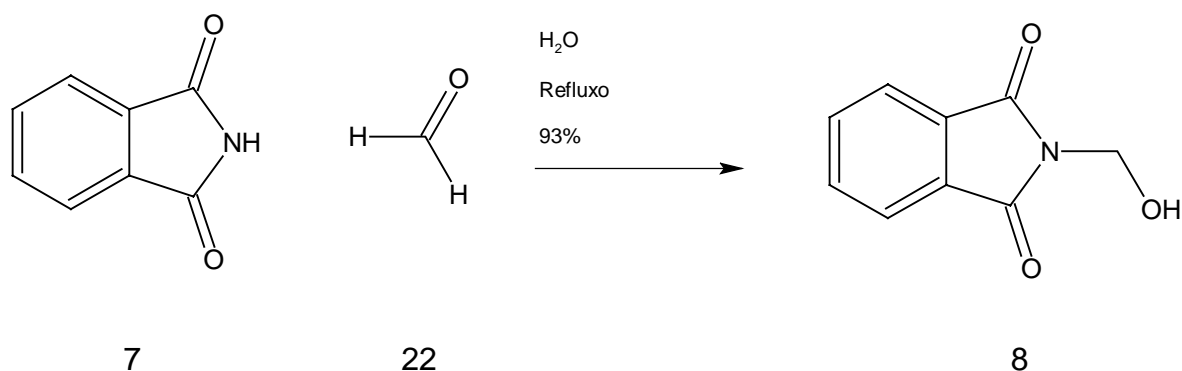


Figura 07: Retirada do hidrogênio ácido gera um ânion nucleofílico

Devido à capacidade de realizar interações hidrofóbicas, transferência de carga (com a subunidade aromática e os carbonos carbonílicos) e interações hidrogênio (doador de próton) o anel ftalimídico é considerado um importante bióforo, podendo ser reconhecido por diversos receptores biológicos. Isso explica, as mais distintas propriedades farmacológicas como anticonvulsivante, ansiolítica, anti-Parkinson, anti-Alzheimer, analgésica, antiinflamatória e imunomoduladora, descritas em fármacos e protótipos com essa subunidade estrutural.

#### 8.1.2 - Síntese do 2-(hidroximetil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (8) (MANO & SEABRA, 2002)

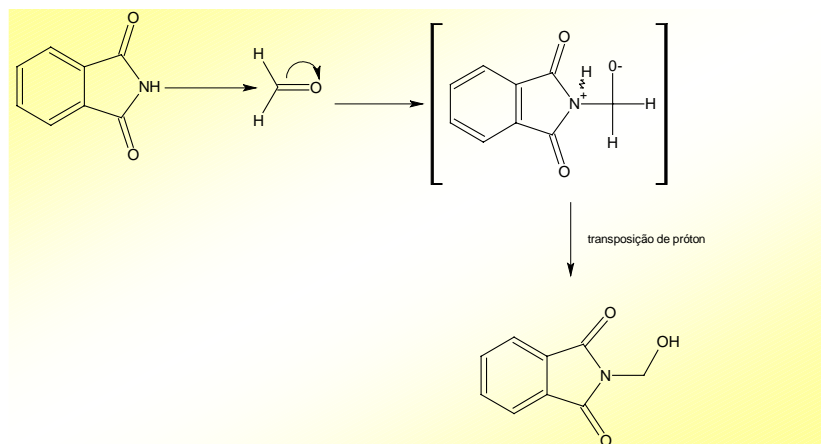


A reação de adição à carbonila deve ocorrer com o ataque do par de elétron desemparelhado do nitrogênio ao carbono do formaldeído (22), que sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta^+$ ). Há rompimento da ligação  $\pi$  e



deslocamento da carga negativa formada para o átomo de oxigênio, levando a um intermediário, que após transposição de próton leva a formação de um composto hidroximetilado (Esquema 10). O produto obtido (8) é um sólido de cor branca com rendimentos médios de 93% e faixa de fusão= 142°C ( $C_9H_7NO_3$ ; PM= 177,16 ).

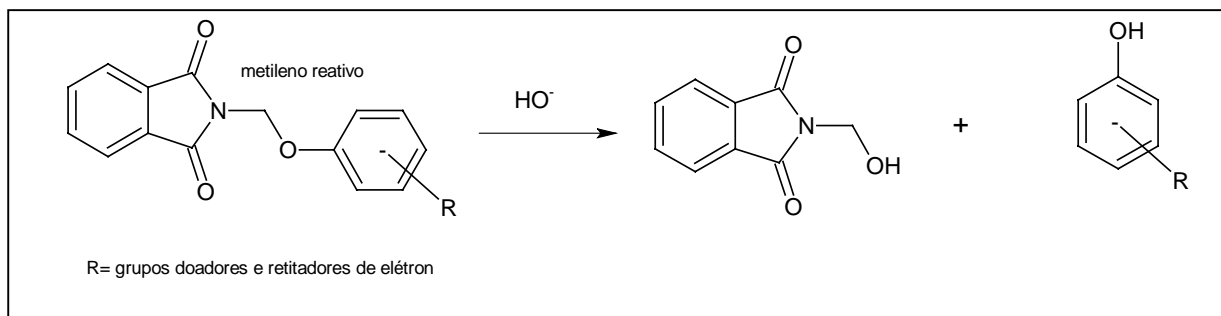
Mecanismo:



Esquema 10: Mecanismo de reação para formação da 2-(hidroximetil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (8)

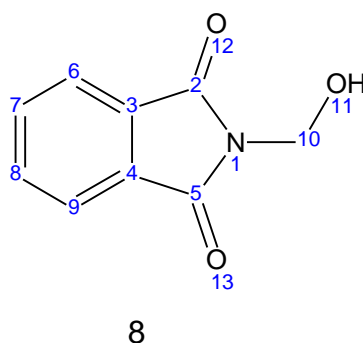
O composto hidroximetilado (8) é um derivado ftalimídico intermediário importante para obtenção dos híbridos desejados. Nesse derivado alquílico podemos observar a presença de um hidrogênio metilênico ácido, bem como um carbono carbinólico que sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta^+$ ) por estar vizinho a grupos eletroatratores, ou seja, o oxigênio eletronegativo por indução desloca a densidade eletrônica para sua proximidade; ao mesmo tempo, a ligação ao nitrogênio imídico funciona como eletroatrator, e deixa o carbono carbinólico mais positivo. Esse efeito auxilia as reações de substituição nucleofílica, e deverá funcionar bem durante as reações de interconversão de grupos funcionais (Esquema 10).

A presença do metileno reativo na estrutura 8 têm sido explorado na química orgânica sintética frente às reações do tipo  $SN_2$ , onde o anel ftalimídico funcionaria como grupo protetor de fenóis (GETZ *et al* 1993). Esse caráter de reatividade desse carbono pode indicar toxicidade, já que temos no organismo vários bionucleófilos (exemplo: DNA) que poderia ser alquilados pela molécula.



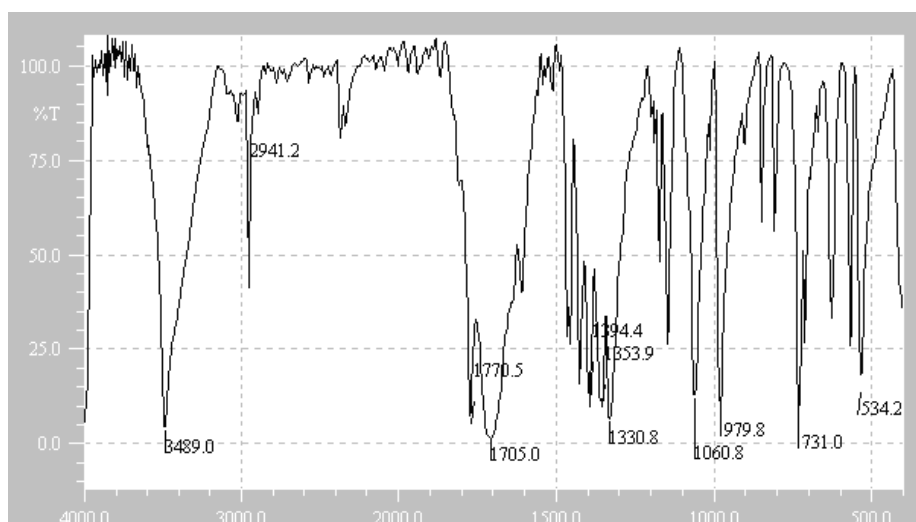
Esquema 11: Reatividade do carbono metilênico frente a reações de  $S_N2$  (LIMA, 2001).

Identificação do composto 8:

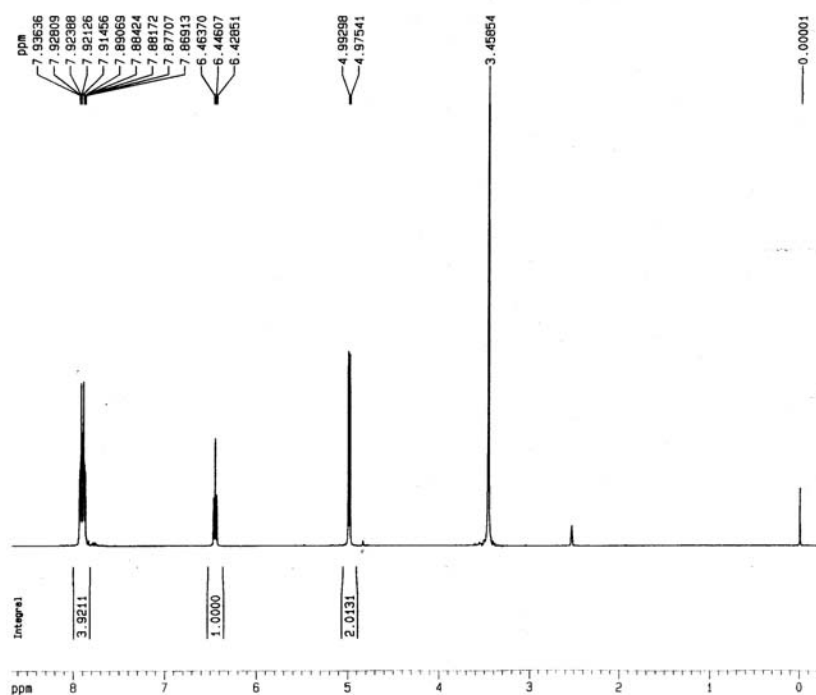


Infra-vermelho (pastilha de KBr):  $\nu$  O-H =  $3489\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático =  $3030\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  simétrico e assimétrico =  $2941\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de carbonila conjugada =  $1770\text{ cm}^{-1}$  e  $1705\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C<sub>imídico</sub>  $1394\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$   $\sim 730\text{ cm}^{-1}$  padrão de substituição 1,2 (orto) aromático.

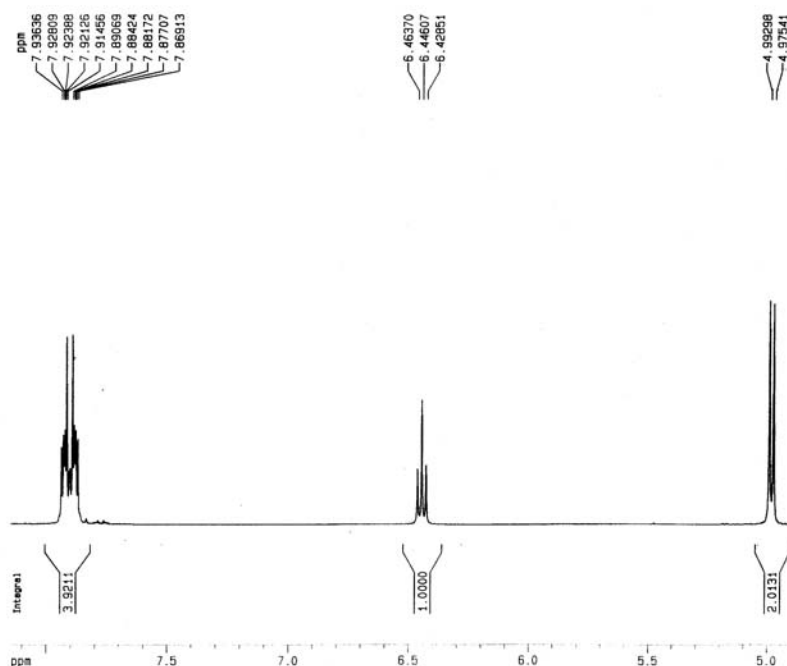
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  4,9 (H10 ; d; 2H);  $\delta$  6,4 (H11 ; t; 1H);  $\delta$  7,89 (m; 4H; H6, H7, H8 e H9).



Espectro 04: Infravermelho do intermediário-chave hidroximetilftalimida (8) (Pastilha de KBr).



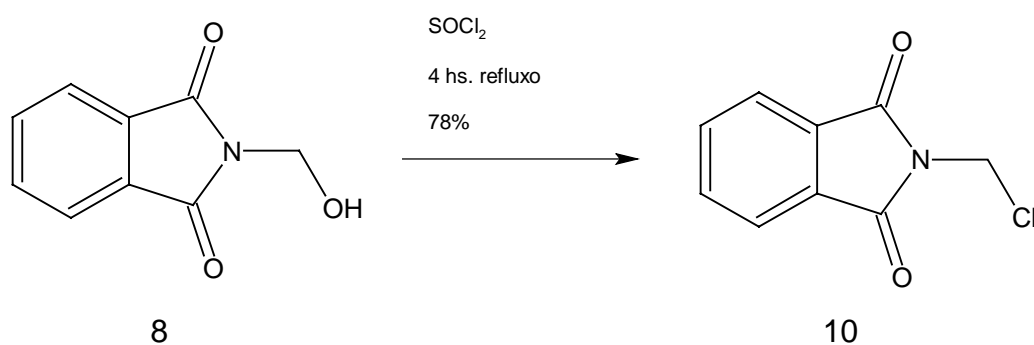
Espectro 05: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do hidroximetilftalimida(8) ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 400 MHz).



Espectro 06: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ampliado (RMN  $^1\text{H}$ ) do hidroximetilftalimida (8) ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 400 MHz).

No espectro 06, tem-se a ampliação do RMN  $^1\text{H}$ , a fim de confirmar o padrão de substituição aromática e melhor visualizar a multiplicidade do hidrogênio alquílico. Há nesse espectro acoplamento entre os hidrogênios do O-H e do C-H, fato esse que pode ser comprovado pela multiplicidade dos sinais e integração dos hidrogênios.

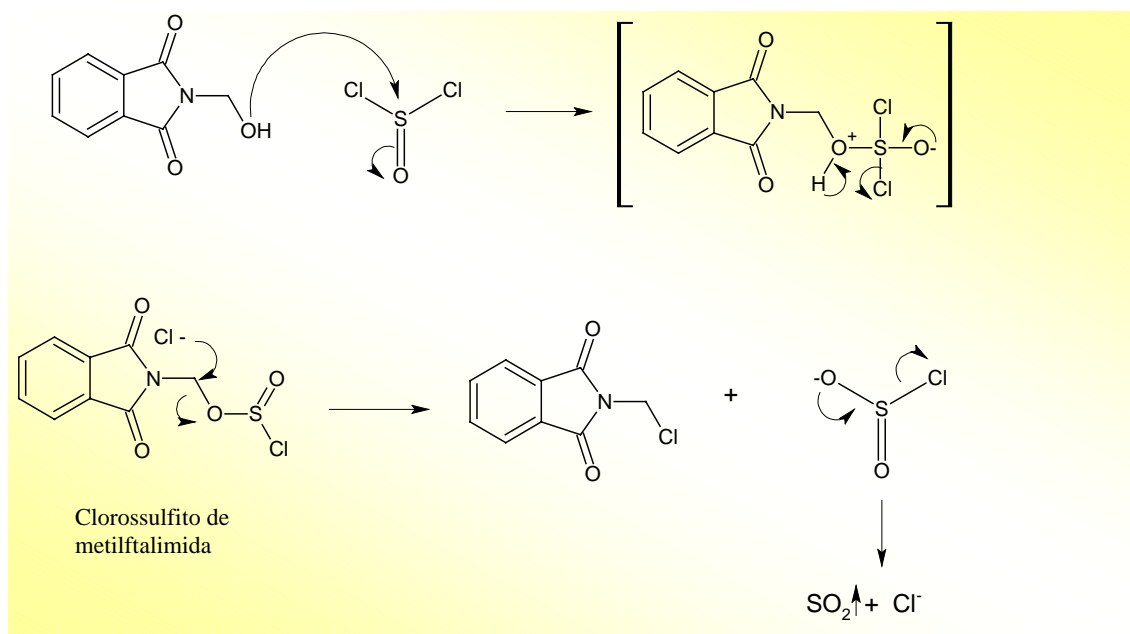
### 3.3 – Síntese de 2-(clorometil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (10)



Explorando a reatividade da hidroxila  $\alpha$  ao carbono metilênico, foi realizada através de interconversão de grupos funcionais a troca da hidroxila por um halogênio (BALLINI *et al* 2004; CHIROLI *et al* 2003).

Um dos métodos clássicos para essa interconversão é a utilização de cloreto de tionila como reagente. Nessa reação, o par de elétrons do oxigênio ataca o átomo de enxofre do cloreto de tionila que sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta+$ ). Nessa substituição nucleofílica, há rompimento da ligação  $\pi$  (cloreto de tionila), que ao retornar à hibridização  $sp^2$  no enxofre, elimina um átomo de cloro, levando a formação do clorossulfito de metilftalimida. O carbono metilênico sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta+$ ), e sofre ataque de um íon cloreto, numa reação tipo  $SN_2$ . Há deslocamento do grupo  $ClSO_2^-$ , que é um bom grupo retirante e que, decompõe-se em  $SO_2$  gasoso e íon  $Cl^-$ . Este último pode ajudar o avanço da reação até seu término (Esquema 12).

Mecanismo da reação:

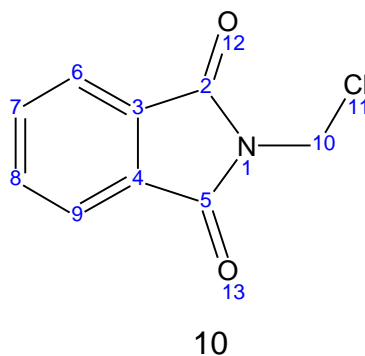


Esquema 12: Mecanismo da reação para formação de clorometilftalimida (10)

Essa reação foi realizada com sucesso, levando à formação de clorometilftalimida (10), com 78% de rendimento, como um sólido branco com faixa de fusão=127-131°C ( $C_9H_6ClNO_2$  e PM= 195,6). Os cloretos de alquila,

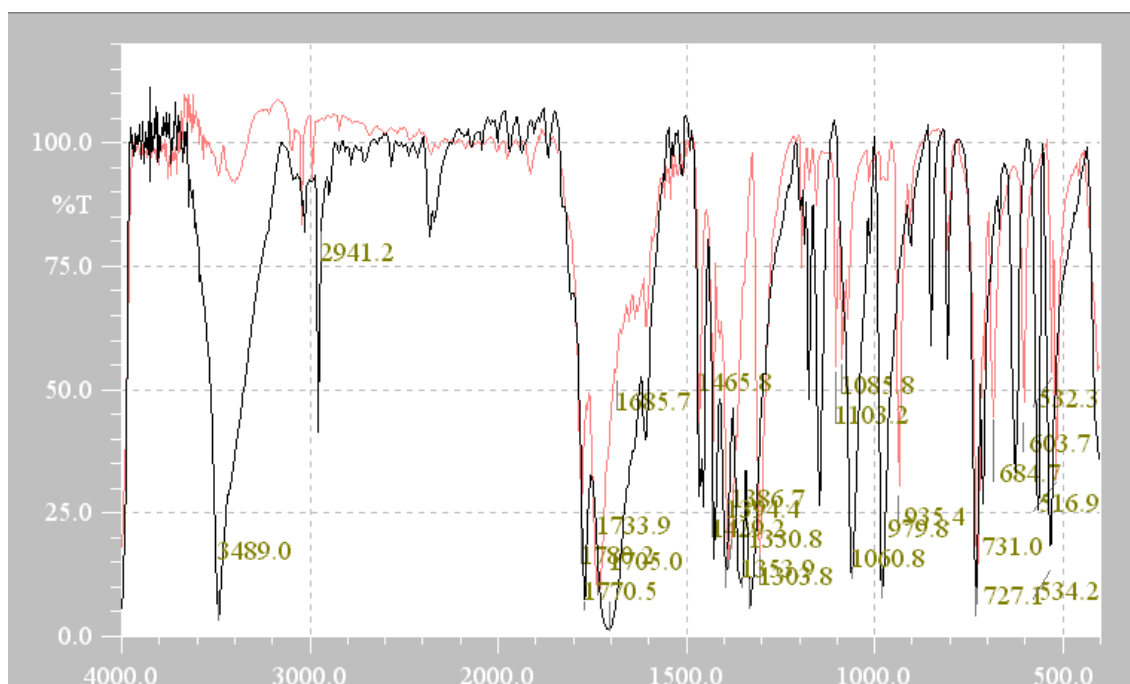
são descritos como intermediários importantes para obtenção de produtos nitrados (CHIROLI *et al* 2003), embora sejam os menos reativos da série dos halogênios. Dessa forma, o composto foi sintetizado para posteriormente avaliar sua interconversão a nitrato (produto final), usando nitrato de prata em acetonitrila, conforme mostrado no esquema 06.

Identificação estrutural:



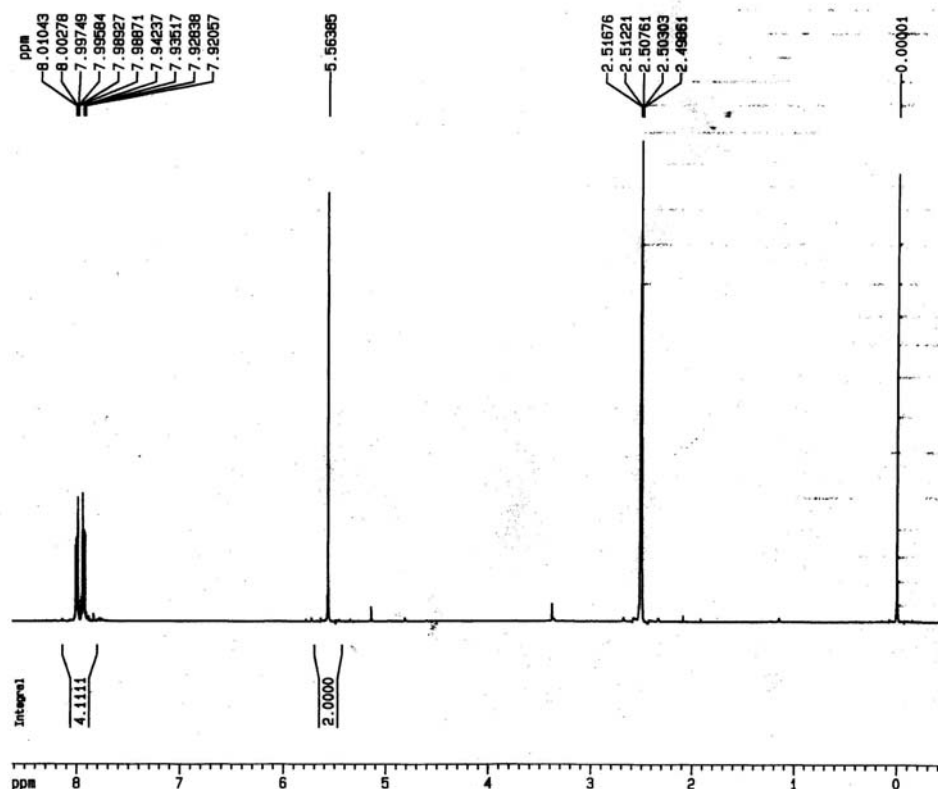
Infravermelho (pastilha de KBr):  $\nu$  C-H aromático =  $3039\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  simétrico e assimétrico =  $2941\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de carbonila conjugada =  $1780\text{ cm}^{-1}$  e  $1732\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $1445\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C:  $1386\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-Cl:  $685\text{ cm}^{-1}$  ou  $604\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$  C-H  $\sim 730\text{ cm}^{-1}$  padrão de substituição 1,2 (orto) aromático.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  5,56 (2H; singleto; H10);  $\delta$  7,93 (2H; m, H7 e H8);  $\delta$  8,00 (2H; m, H6 e H9).



Espectro 07: Espectro de infravermelho ampliado do clorometilftalimida (10) em vermelho, sobreposto ao reagente (8) em preto. (Pastilha de KBr)

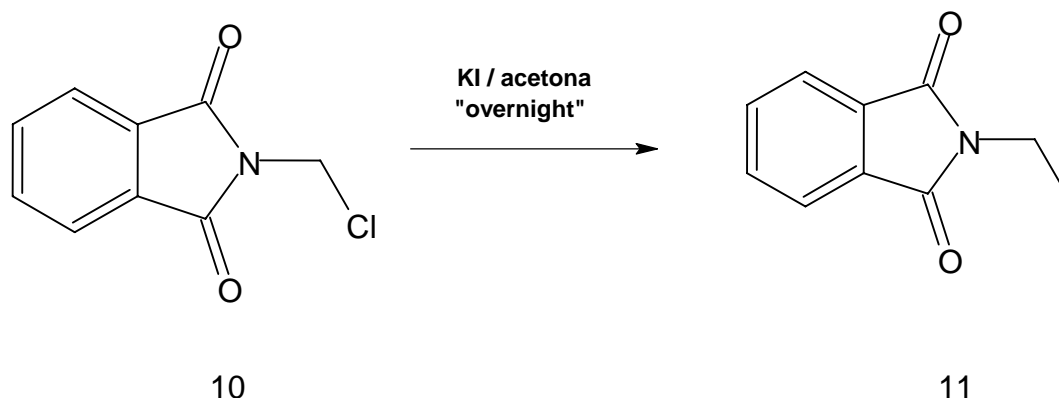
O espectro 07 é uma sobreposição de clorometilftalimida (10) (vermelho) com hidroximetilftalimida (8) (preto) observa-se a ausência do estiramento axial da ligação O-H no produto obtido. Ademais o estiramento axial da ligação C-Cl que geralmente apresenta-se entre  $550\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ , parece estar presente no composto obtido, correspondendo a ligação  $685\text{ cm}^{-1}$  ou  $604\text{ cm}^{-1}$ , já que estes são os únicos novos estiramentos observados dentro da faixa conhecida como referente à ligação C-Cl.



Espectro 08: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto clorometiltalimida (10) ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 400 MHz).

Podemos observar no espectro 08 a presença de um singlete em  $\delta$  5,56, com integração para 2 hidrogênios. Ainda, pode-se visualizar que o efeito de desproteção eletrônica causado pela presença do cloro, é maior que a desproteção causada pelo oxigênio. A explicação para tal fenômeno não é eletrônico, já que o átomo de oxigênio é mais eletronegativo que o átomo de cloro. Uma provável explicação estaria relacionada à maior capacidade do par de elétrons não ligante do composto clorado (10) em fazer ressonância com a carbonila do sistema imídico. Esse fenômeno é dificultado no composto hidroxilado (8), por conta da maior eletronegatividade do oxigênio, que dificultaria essa ressonância. Esse fenômeno leva a uma menor desproteção do composto hidroxilado, quando comparado ao cloreto, conforme podemos evidenciar nos respectivos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de ambos compostos.

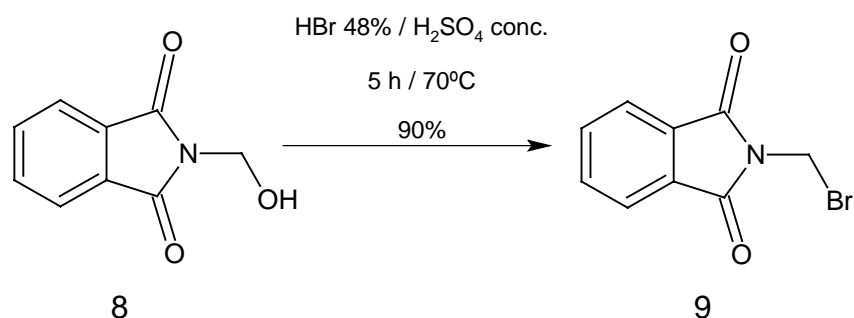


3.4 – Síntese do intermediário (2-(iodometil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona) (11)

Nessa reação de interconversão entre haletos foi tentada a síntese do iodometilftalimida (11). Essa reação foi realizada para obter um grupamento de saída ( $I^-$ ), mais eficiente que o cloreto na interconversão à nitrato. No entanto, não foi possível obter o produto desejado, conforme se pode constatar no acompanhamento por C.C.D.

Nessa reação, o íon iodeto atacaria o carbono metilênico numa reação tipo  $SN_2$  e expulsaria o cloreto, para formar o produto desejado. A não obtenção desse composto poderia ser explicada pela utilização do solvente reacional. A acetona é um solvente de média polaridade, e poderia estar impedindo a dissociação do KI. Solventes polares apróticos, como DMF, DMSO e HMPA poderiam favorecer a reação, já que haveria uma maior disponibilização do íon iodeto para o ataque nucleofílico.

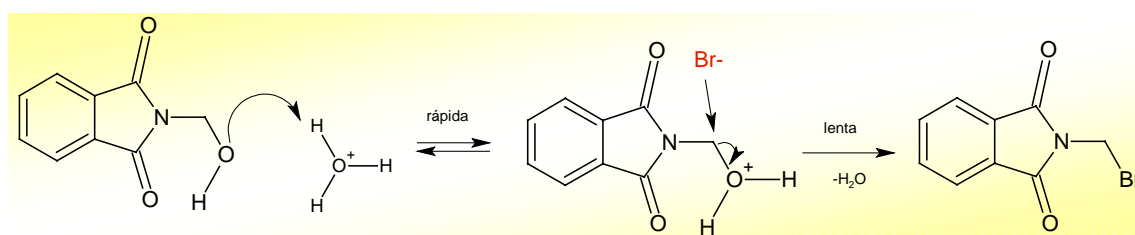
### 3.5 – Síntese do 2-(bromometil)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (Pucher & Johnson, 1922; Yamauchi, Kinoshita & Imoto, 1972) (9)



O procedimento para preparação de bromometilftalimida (9) é uma adaptação das reações descritas por Pucher & Jonhson, e trata-se de uma metodologia bem conhecida para a preparação de brometos de alquila. Este mesmo produto também pode ser obtido pela reação de *N*-hidroximetilftalimida (8) com tribrometo de fósforo (PBr<sub>3</sub>) conforme descrito por Yamauchi e colaboradores.

Nessa reação, foi realizada a interconversão da hidroxila alcoólica à brometo de alquila. A reação se processa com ótimos rendimentos (90%) levando à obtenção do produto desejado (9) em cerca de 5 horas de reação.

O par de elétrons do oxigênio da hidroxila em meio ácido é protonado. O íon brometo, atuando como nucleófilo ataca o carbono metilênico que possui carga parcial positiva ( $\delta^+$ ) e desloca uma molécula de água, numa reação tipo S<sub>N</sub>2, formando o brometo de metilftalimida (Esquema 13).

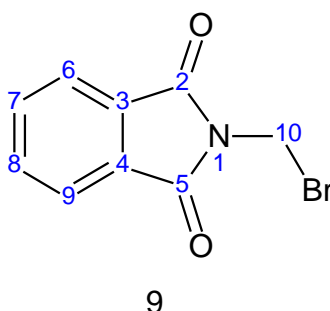


Esquema 13: Mecanismo de formação do bromo metilftalimida (9)

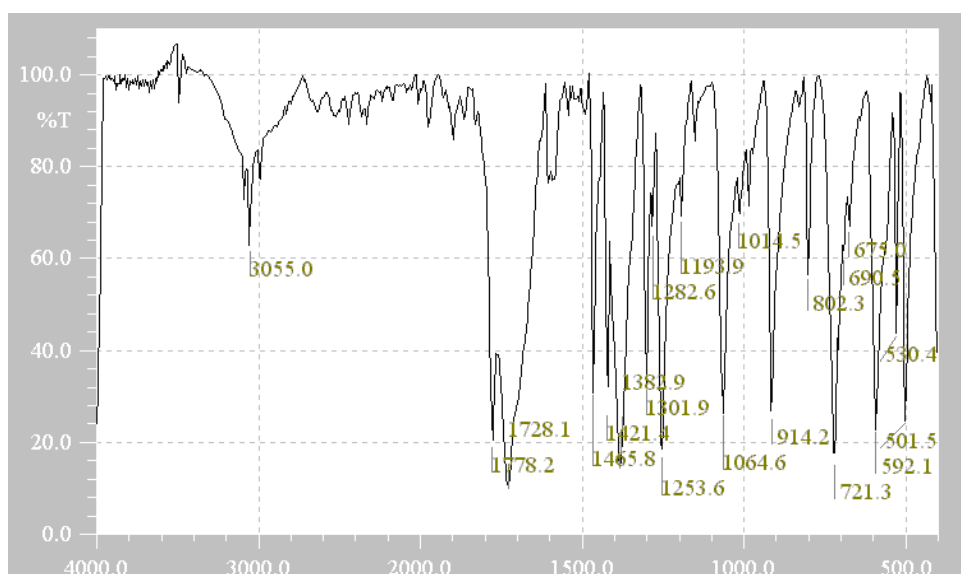
Os brometos são melhores grupos abandonadores que os cloretos, o que auxiliaria na obtenção do nitrato desejado, com maiores rendimentos e menores tempos reacionais que quando comparados aos cloretos.

Como o brometo de metilftalimida (9) já havia sido descrito por Pucher & Jonhson, e a caracterização estrutural estava bem definida, não se realizou a análise por ressonância magnética nuclear desse composto. Sua caracterização foi realizada pela faixa de fusão (147°-148°C) e espectrometria infravermelho (Espectros 09,10 e 11).

Identificação estrutural:

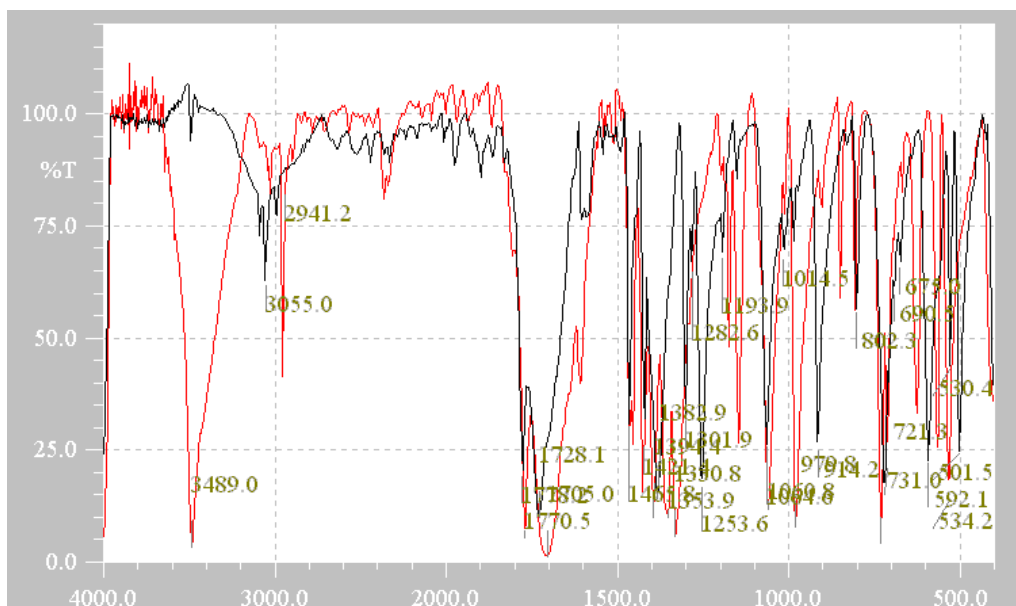


Infravermelho (pastilha de KBr):  $\nu$  C-H aromático= 3055  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  simétrico e assimétrico= 2941  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de carbonila conjugada= 1778  $\text{cm}^{-1}$  e 1728  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático = 1603  $\text{cm}^{-1}$  e 1465  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta$  C-H  $\text{CH}_2$  = 1421  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C: 1383  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-Br: 501,5  $\text{cm}^{-1}$  ou 592,1  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta$  C-H  $\sim$ 721  $\text{cm}^{-1}$  padrão de substituição 1,2 (orto) aromático.

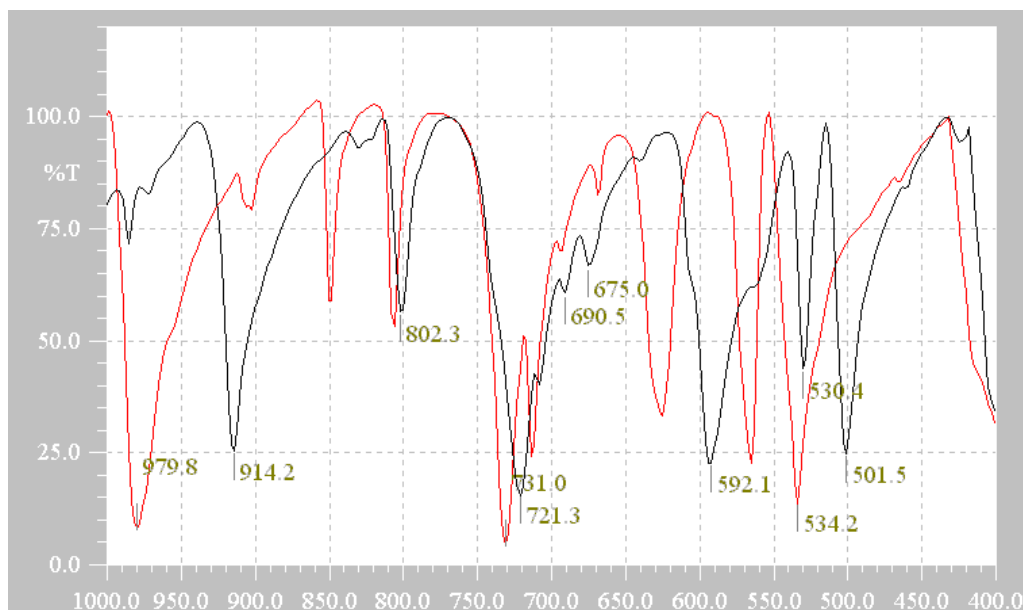


Espectro 09: Espectro no infravermelho do bromometilftalimida (9) (pastilha de KBr).

No espectro 09, podemos observar a ausência do estiramento axial O-H presente no reagente. Isso pode melhor ser evidenciado nos espectros 10 e 11, onde foi realizada a sobreposição do espectro do reagente (*N*-hidroximetilftalimida (8), em vermelho) com o produto obtido (9) (em preto). Ademais, temos o acréscimo de um estiramento C-Br nas regiões entre 500-600  $\text{cm}^{-1}$  (Dyer *et al* 1965), que não pode ser apontado exatamente nesse espectro, devido à presença de dois estiramentos nessa região. Há ainda um pequeno deslocamento das carbonilas da imida, em relação ao cloreto, justificada pela menor eletronegatividade do átomo de bromo.



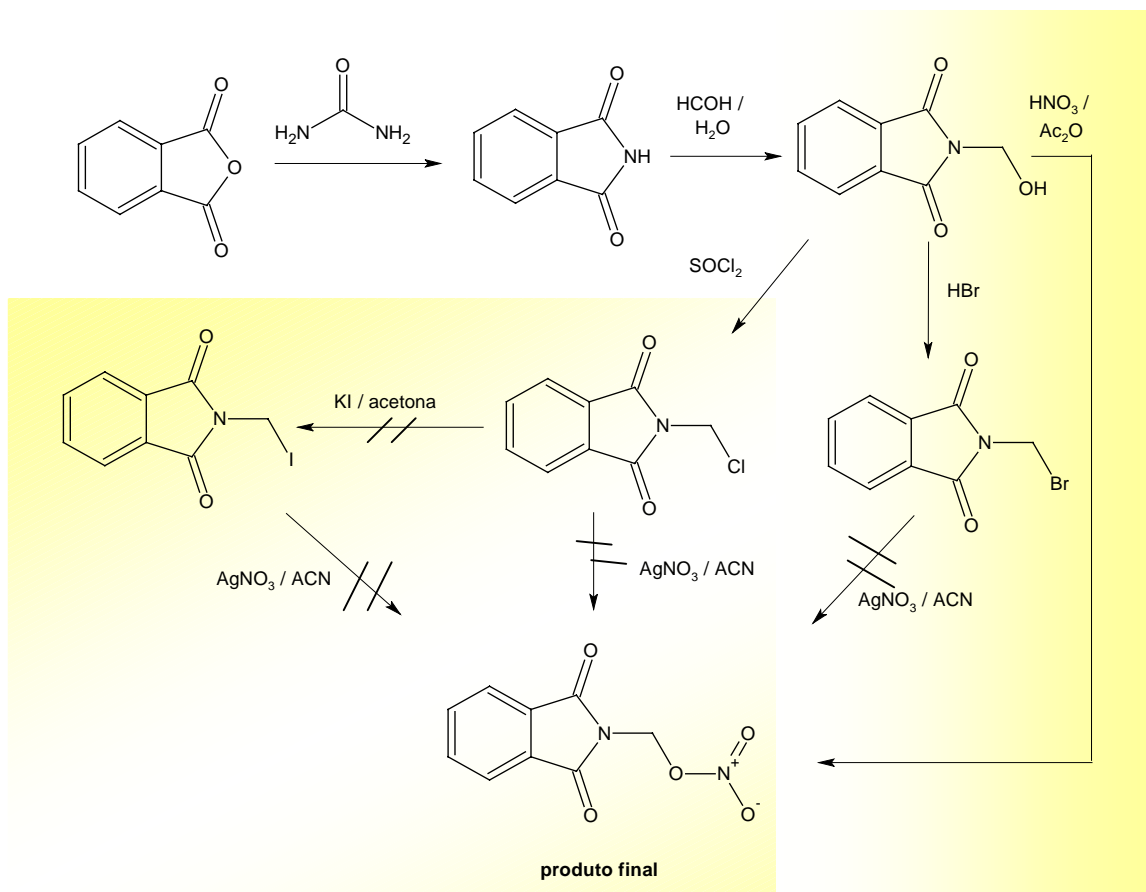
Espectro 10: Espectro no infra-vermelho sobreposto do bromometilftalimida (9) em pastilha de KBr, sobreposto ao reagente (8) (Pastilha de KBr)



Espectro 11: Espectro no infravermelho sobreposto ampliado na região de estiramento axial C-Br do bromometilftalimida (9) (em preto) sobreposto ao *N*-hidroximetilftalimida (8) (em vermelho) (Pastilha de KBr).

Sínteses para a obtenção do nitrato de (1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)metil

As rotas 3.3 a 3.9 (esquema 06) para a obtenção do nitrato (produto final – composto I) exploram a interconversão de halogênios, e a reação entre a hidroxila alcoólica e a mistura anidrido acético/ ácido nítrico.



**Esquema 06:** Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos alquílicos

Embora hajam relatos descritos na literatura de que a interconversão de halogênios a nitrato seja uma estratégia eficiente levando à obtenção de produtos com elevados rendimentos e baixos tempos reacionais, esse método não se mostrou adequado para obtenção do produto final, levando à formação de subprodutos não identificados, de difícil separação por coluna cromatográfica. Ademais, no planejamento sintético proposto, há uma etapa (ou duas etapas) adicional para a obtenção do produto nitrato quando comparado à formação do éster de nitrato diretamente pelo método ácido nítrico/anidrido acético, isso levaria a uma diminuição do rendimento global.

Por isso, embora realizada, a metodologia de obtenção de ésteres de nitrato via interconversão de halogênios, não foi repetida muitas vezes, já que ao mesmo tempo observava-se a formação do éster desejado pela metodologia de utilização do ácido nítrico/anidrido acético sob temperatura ambiente,

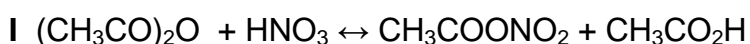
utilizando o hidroximetilftalimida como reagente, em uma reação com apenas uma etapa, sem a necessidade de separação por coluna cromatográfica, e com rendimento reacional de 74%, e rendimento global em torno de 56%.

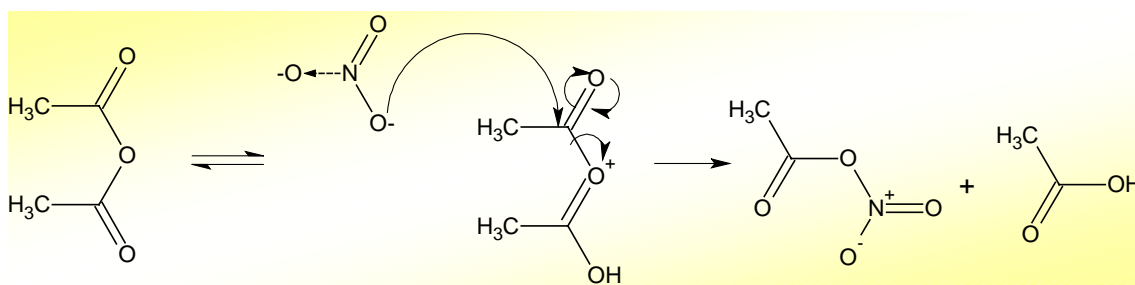
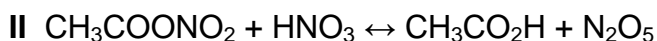
A reação de substituição de Finkelstein para obtenção do iodeto de alquila não foi possível utilizando-se a interconversão do cloreto, usando iodeto de potássio em acetona anidra e refluxo *overnight*, sob atmosfera de nitrogênio e ao abrigo da luz. Embora esse método não tenha sido eficiente, há relatos na literatura mostrando que a interconversão a iodeto, quando se utiliza brometo de alquila como reagente, leva à obtenção do iodeto de alquila com excelentes rendimentos (90-95%) utilizando essas mesmas condições (MARTINKUS *et al* 1983).

Assim, a metodologia via interconversão de halogênios foi escolhida como secundária para obtenção do produto desejado, embora os intermediários halogenados já tivessem sido obtidos e caracterizados, o produto final não foi obtido, nem caracterizado quando se utilizaram os haletos de alquila, reagindo com nitrato de prata e acetonitrila anidra sob refluxo em atmosfera de nitrogênio, protegida da luz.

Há relatos na literatura (BOYER, 1986) mostrando que a utilização da mistura anidrido acético/ácido nítrico em diversos solventes pode ser utilizada para obtenção de nitro-azóis. Essa metodologia também pode ser utilizada para nitração aromática. No entanto, na nitração de sistemas aromáticos se explora as reações de substituição eletrofílica aromática, em que um eletrófilo (nitrônio) ataca o sistema de elétrons  $\pi$  aromático, levando à formação do íon arênio (complexo  $\sigma$ ) que, após perda de um próton, regenera o sistema aromático, levando à obtenção do nitro aromático. Não foram observadas reações de substituição eletrofílica aromática no sistema aromático ftalimídico, nas condições utilizadas (temperatura ambiente). Além disso, o sistema aromático da ftalimida está “desativado” pela presença do sistema imídico, desfavorecendo este tipo de reação.

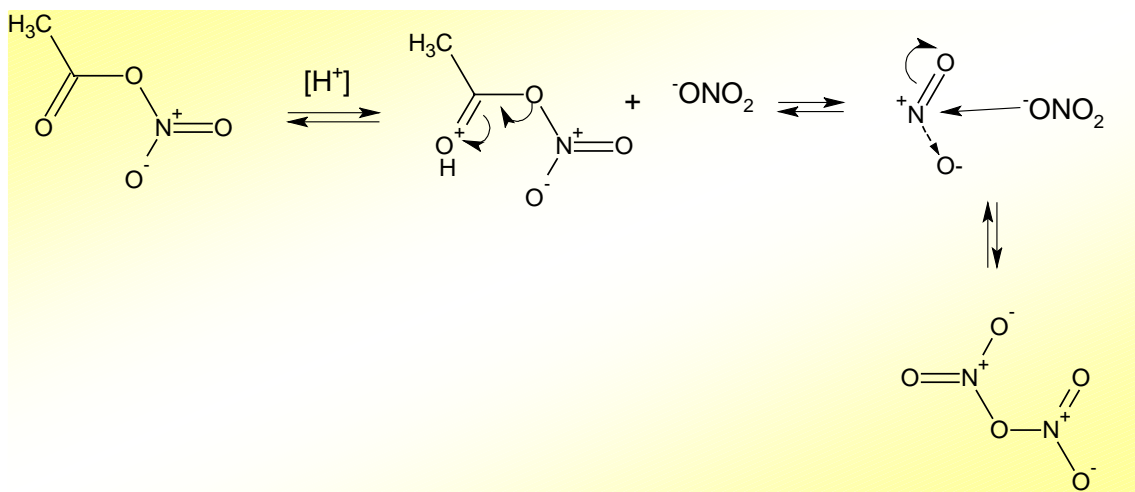
O mecanismo para formação do pentóxido de dinitrogênio, utilizando a mistura anidrido acético/ácido nítrico envolve o seguinte equilíbrio (BOYER, 1986):





Esquema 14: Formação do acetil nitrato.

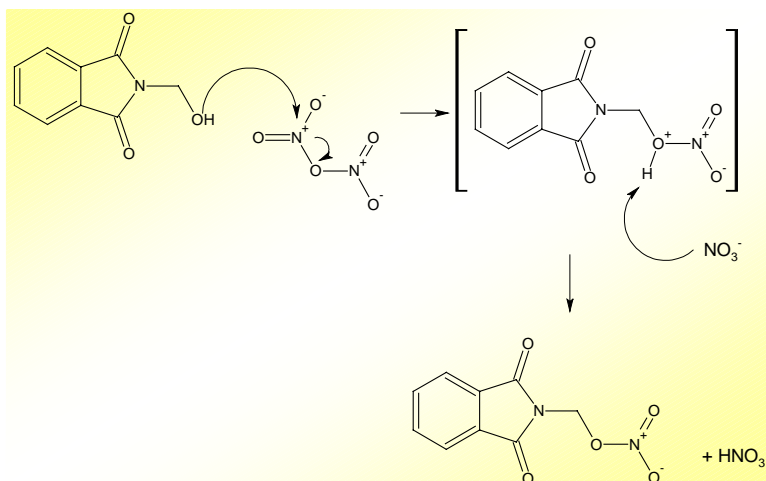
Em uma primeira etapa, a catalise ácida do anidrido acético rompe a ligação  $\pi$  do carbono carbonílico. O par de elétrons não ligante do oxigênio é doado para reestabelecer as quatro ligações do carbono, forma-se assim um intermediário reativo. O carbono carbonílico desse intermediário sofre ataque pelo  $\text{NO}_3^-$  formado um acetil nitrato e eliminando um ácido acético (Esquema 14).



Esquema 15: Formação do pentóxido de dinitrogênio.

Em uma segunda etapa, a catalise ácida favorece o rompimento da ligação  $\pi$ , e o par de elétrons do oxigênio é usado para reestabelecer as ligações do carbono. Há formação de acetato e de uma espécie positivamente carregada. O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) do ácido nítrico ataca essa espécie positivamente carregada, para formar o pentóxido de dinitrogênio (Esquema 15).

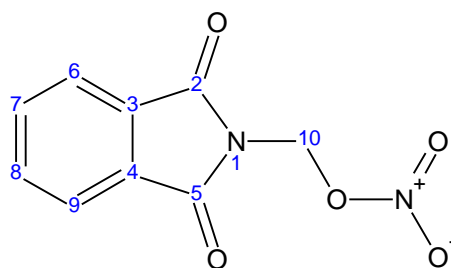




Esquema 16: Formação do nitrato de metilftalimida (COMPOSTO I)

Em uma última etapa, há o ataque do par de elétrons do oxigênio do derivado ftalimídico ao pentóxido de dinitrogênio, levando à liberação de  $\text{NO}_3^-$  e formação do intermediário. Posteriormente, o nitrato captura um próton, e forma  $\text{HNO}_3$  e o nitrato de metilftalimida desejado (Esquema 16).

Identificação do produto final:

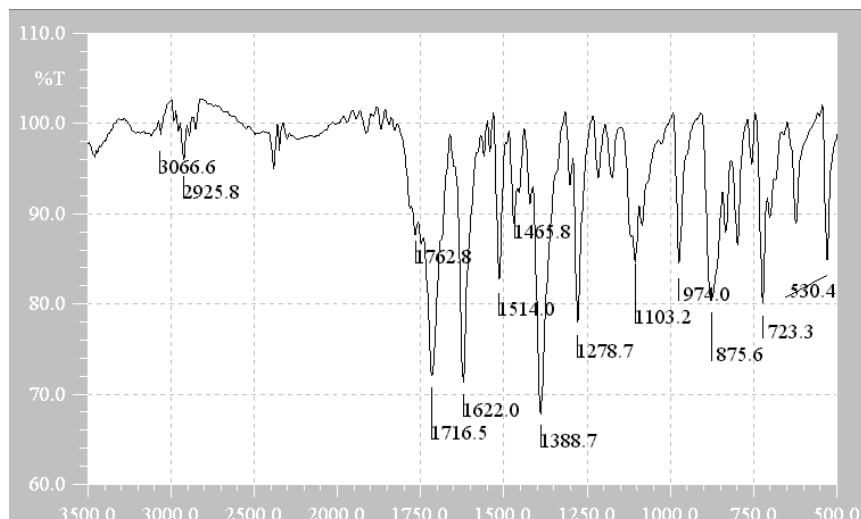


COMPOSTO I

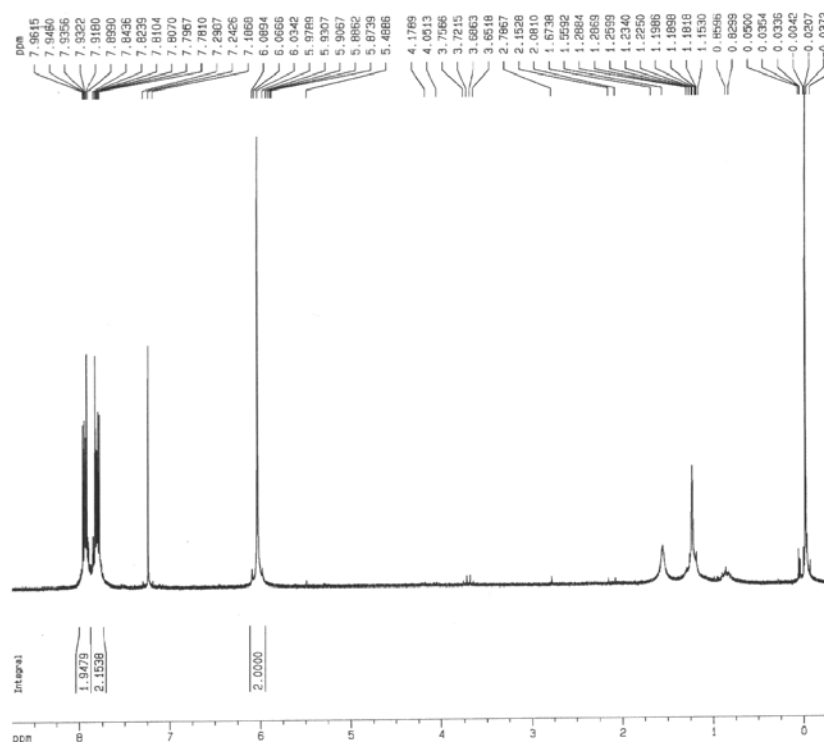
Infravermelho COMPOSTO I (pastilha de KBr) :  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2925\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O  $1762\text{ cm}^{-1}$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1620\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1465\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  O- $\text{NO}_2$  nitrato =  $1622\text{ cm}^{-1}$  e  $1278\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1388\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$   $\sim 723\text{ cm}^{-1}$  padrão de substituição 1,2 (orto) aromático.

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  7,93 (2H; m, H6 e H9);  $\delta$  7,80 (2H; m, H7 e H8);  $J_{\text{orto}} = 8,1\text{Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,1\text{Hz}$ ;  $\delta$  6,08 (2H; s, H10).

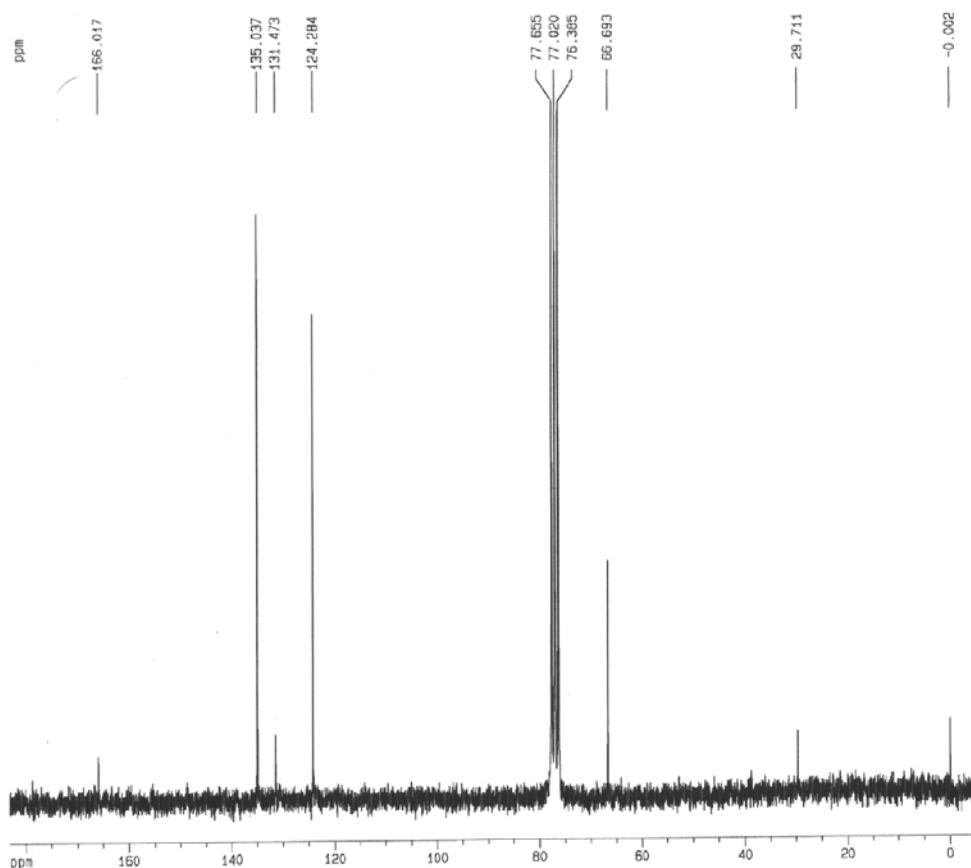
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  166,01 (C2 e C5);  $\delta$  135,04 (C6 e C9);  $\delta$  131,47 (C3 e C4);  $\delta$  124,28 (C7 e C8) e  $\delta$  66,7 (C10).



Espectro 12: Espectro no infravermelho do COMPOSTO I (Pastilha de KBr)



Espectro 13: Espectro de ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio RMN  $^1\text{H}$  do COMPOSTO I (em  $\text{CDCl}_3d$ ; 400 MHz).



Espectro 14: Espectro de ressonância Magnética Nuclear de carbono RMN  $C^{13}$  COMPOSTO I (em  $CDCl_3$ d; 400 MHz).

O produto nitrato metilftalimida (COMPOSTO I) foi obtido através da metodologia usando anidrido acético/ácido nítrico com um rendimento global de 56%. Através do espectro no infravermelho 12, podemos observar os estiramentos axiais da ligação O- $NO_2$  em  $1622\text{ cm}^{-1}$  e  $1278\text{ cm}^{-1}$ , e a ausência do estiramento axial O-H em  $3489\text{ cm}^{-1}$  devido à formação do éster de nitrato. Ademais, podemos observar através do estiramento axial C-N-C do anel ftalimídico que o sistema imídico não sofreu hidrólise, haja visto que é descrito na literatura a hidrólise ácida desse sistema. Esse fato é ainda comprovado pela presença das carbonilas de imida, e ausência de carbonila de ácido e de amida, que apareceriam em uma provável hidrólise.

Pelo espectro de RMN  $H^1$  13, quando comparamos o reagente hidroximetilftalimida (8), com o produto final (nitrato) observamos o deslocamento dos hidrogênios metilênicos, que no reagente aparece em 4,9

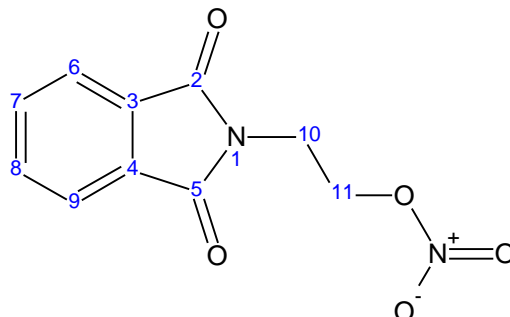
ppm e no produto final aparece em 6,08 ppm, esse efeito é causado pela maior eletronegatividade do nitrato em relação à hidroxila nas posições  $\alpha$  ao carbono metilênico, que leva a um efeito de desproteção desses hidrogênios. O mesmo efeito é observado no espectro de RMN  $C^{13}$  (Espectro 14), embora deva ser ressaltado que a análise do reagente foi feita em  $DMSO-d_6$ , e a do produto final foi realizada em  $CDCl_3d$ .

A presença de um grupamento mais eletronegativo, como no caso do nitrato, ativa ainda mais o carbono metilênico, aumentando a sua carga parcial positiva ( $\delta^+$ ), isso favoreceria o ataque nucleofílico a esse carbono. Esse fator é importante ser considerado para o entendimento do mecanismo de doação do óxido nítrico, bem como fornece bases para o entendimento molecular da maior toxicidade desse composto, quando analisamos o ensaio de mutagênese (teste de AMES).

De acordo com o planejamento sintético, também foi obtido o composto nitrato de etilftalimida (composto II), obtido por homologação da cadeia alquílica. Esse composto foi obtido através da reação do *N*-(2-etanol)ftalimida (12) adquirido comercialmente, com a mistura ácido nítrico/anidrido acético, nas mesmas condições de reação que levaram a obtenção do composto I. O mecanismo reacional para obtenção desse composto é similar àquele descrito para obtenção do composto I (Esquemas 14,15 e 16).

O produto (composto II) obtido foi um sólido branco com faixa de fusão= 87-89°C e sua identificação estrutural encontra-se no item 3.10, a seguir:

### 3.10 – Síntese do 2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)etil nitrato (COMPOSTO II)

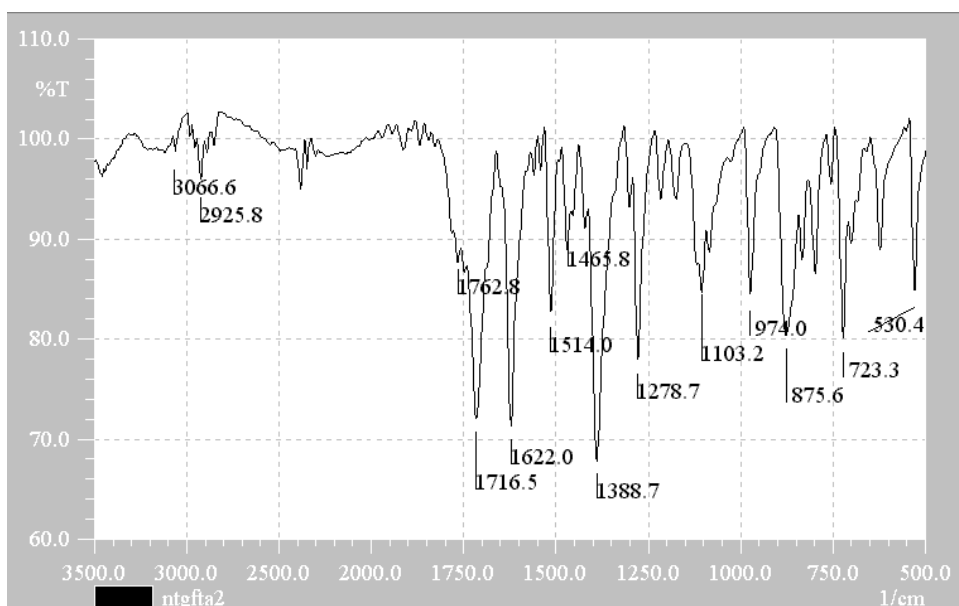


COMPOSTO II

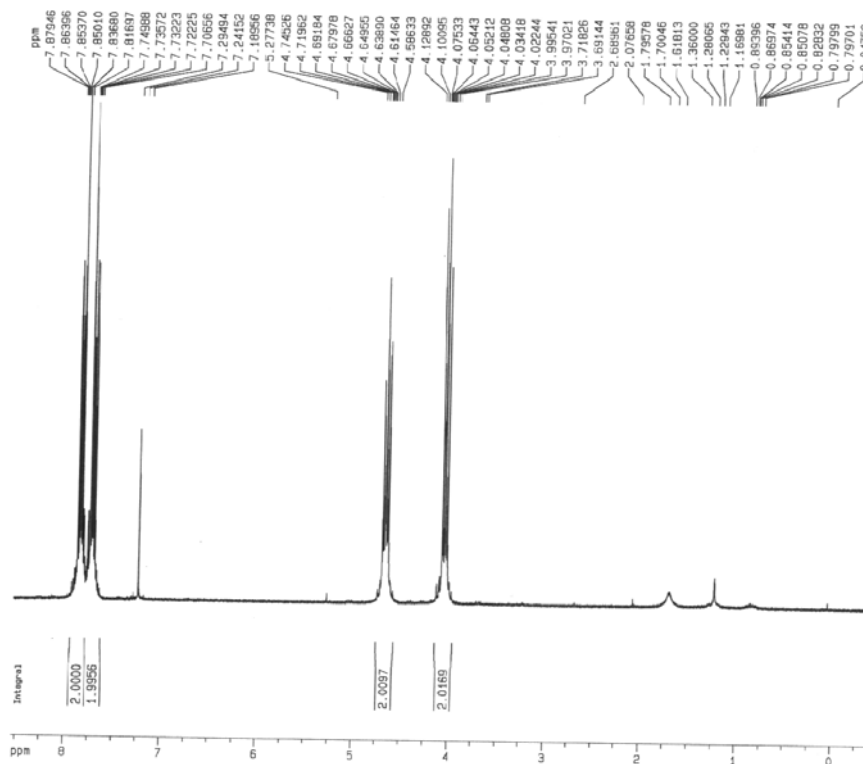
Infravermelho COMPOSTO II (pastilha de KBr) :  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2925\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1762\text{ cm}^{-1}$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1620\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1465\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  O- $\text{NO}_2$  nitrato =  $1622\text{ cm}^{-1}$  e  $1278\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1388\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta \sim 720\text{ cm}^{-1}$  padrão de substituição 1,2 (orto) aromático.

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ) :  $\delta$  7,85 (2H; m, H6 e H9);  $\delta$  7,73 (2H; m, H7 e H8;  $J_{\text{orto}} = 7,9\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2\text{ Hz}$ );  $\delta$  4,66 (2H; t, H11);  $\delta$  4,05 (2H; t, H10).

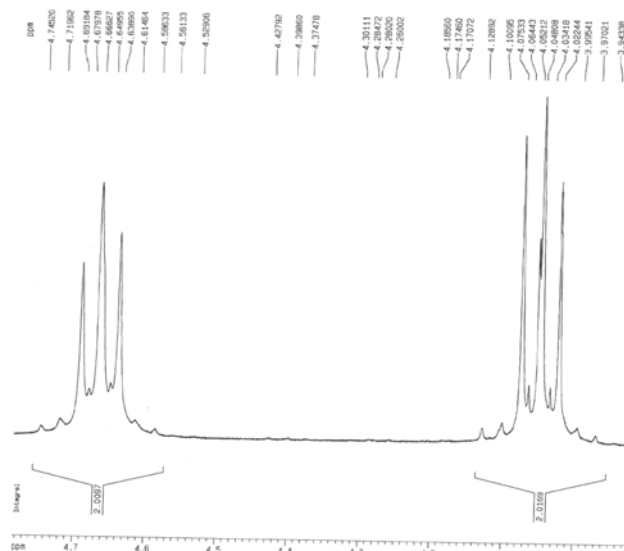
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  167,82 (C2 e C5);  $\delta$  134,3 (C6 e C9);  $\delta$  131,8 (C3 e C4)  $\delta$  123,6 (C7 e C8);  $\delta$  69,52 (C11) e  $\delta$  35,22 (C10).



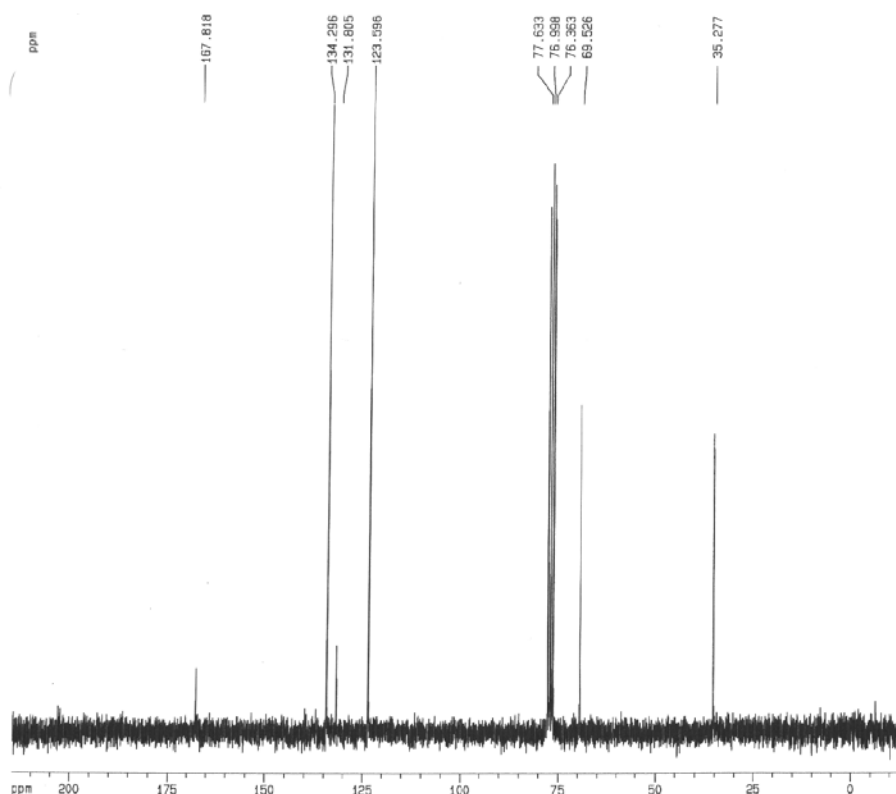
Espectro 15: Espectro no infravermelho do COMPOSTO II (Pastilha de KBr).



Espectro 16: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do COMPOSTO II (em  $\text{CDCl}_3d$ ; 400MHz)



Espectro 17: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) do COMPOSTO II ( $CDCl_3d$  ; 400 MHz) destacando os tripletos do COMPOSTO II em uma ampliação.



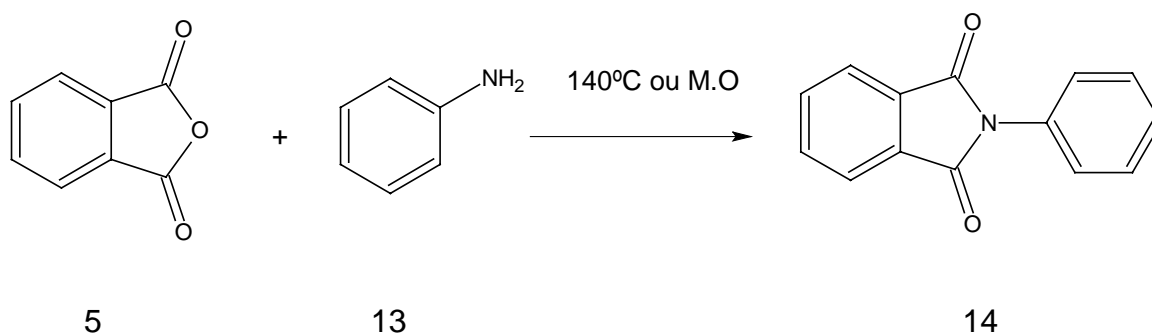
Espectro 18: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do COMPOSTO II (em  $CDCl_3d$  ; 400 MHz)

O espectro no infravermelho (Espectro 15) mostra os estiramentos axiais da ligação O-NO<sub>2</sub> em 1622 cm<sup>-1</sup> e 1278 cm<sup>-1</sup>, e ausência do estiramento axial O-H, presente no reagente. Em 1762 cm<sup>-1</sup> e 1716 cm<sup>-1</sup> é possível observar a carbonila da imida.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectros 16 e 17) ficam evidentes os tripletos característicos da cadeia alquílica. Ademais, pelo espectro de RMN <sup>13</sup>C (espectro 18) observamos todos os carbonos correspondentes ao composto II.

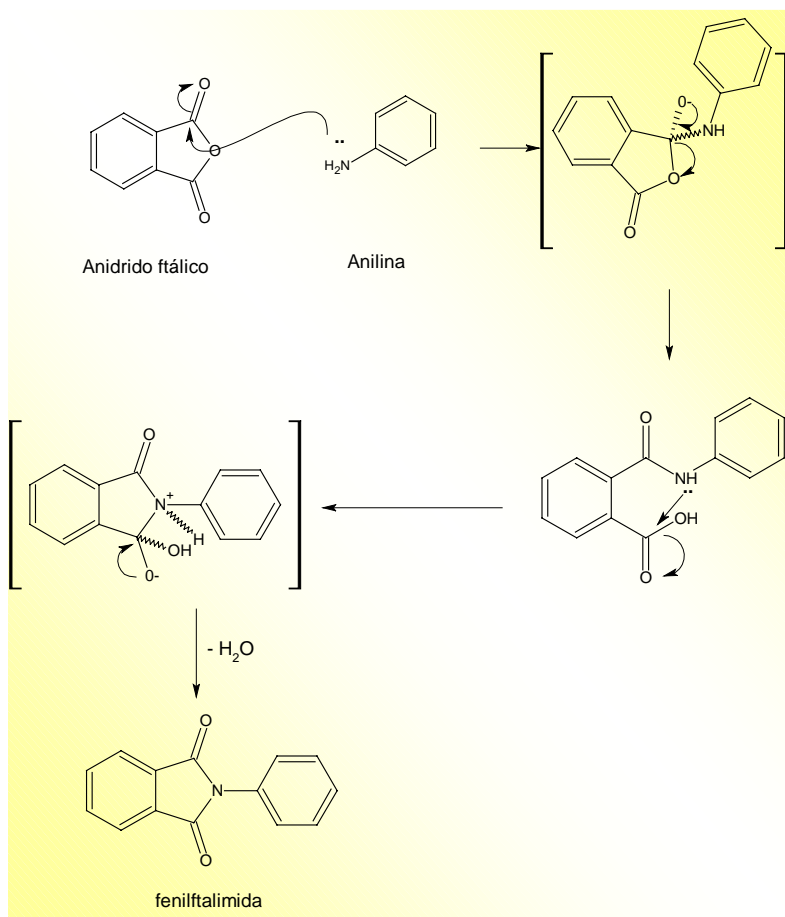
Além da série alquílica foram obtidos através de metodologia sintética linear os derivados sulfonamídicos previstos no planejamento sintético. Inicialmente foi obtido fenil ftalimida, conforme podemos evidenciar no item 8.1.4. Esse será um dos intermediários sintéticos para obtenção do composto IV.

#### 8.1.4 – Síntese do 2-fenil-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona



Explorando a metodologia descrita por Lima e colaboradores (2002), foi realizada a reação para obtenção de 2-fenil-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (14). Essa reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina da anilina à carbonila do anidrido ftálico, que sustenta uma carga parcial positiva (δ<sup>+</sup>). Há rompimento da ligação π, e o par de elétrons fica sustentado pelo átomo de oxigênio. Ao reestabelecer esta ligação, há quebra da ligação C-O. O par de elétrons da amina realiza um outro ataque ao carbono carbonílico. Novamente há rompimento de outra ligação π que, ao ser reestabelecida, elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel, e formando o derivado fenil-ftalimídico desejado (Esquema 17):

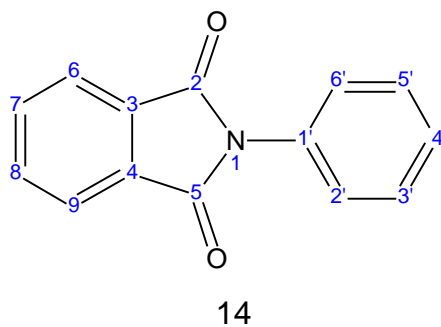




Esquema 17: Mecanismo de reação para formação de N-fenil ftalimida (14)

Lima e colaboradores descreveram a obtenção do composto fenilftalimídico, seguindo metodologia de aquecimento convencional. No entanto, atento ao fato de que as reações em microondas possam ser mais rápidas, foi realizada a mesma reação, agora sob condição de aquecimento utilizando radiação. Esse experimento nos permitiu obter rendimentos maiores (94%) e em menor tempo reacional (5 minutos) que LIMA (SANTOS, et al 2005).

Esse resultado inicial aponta a reação em microondas como importante estratégia para obtenção de compostos fenilftalimídicos de maneira mais rápida e com maiores rendimentos que o aquecimento convencional.

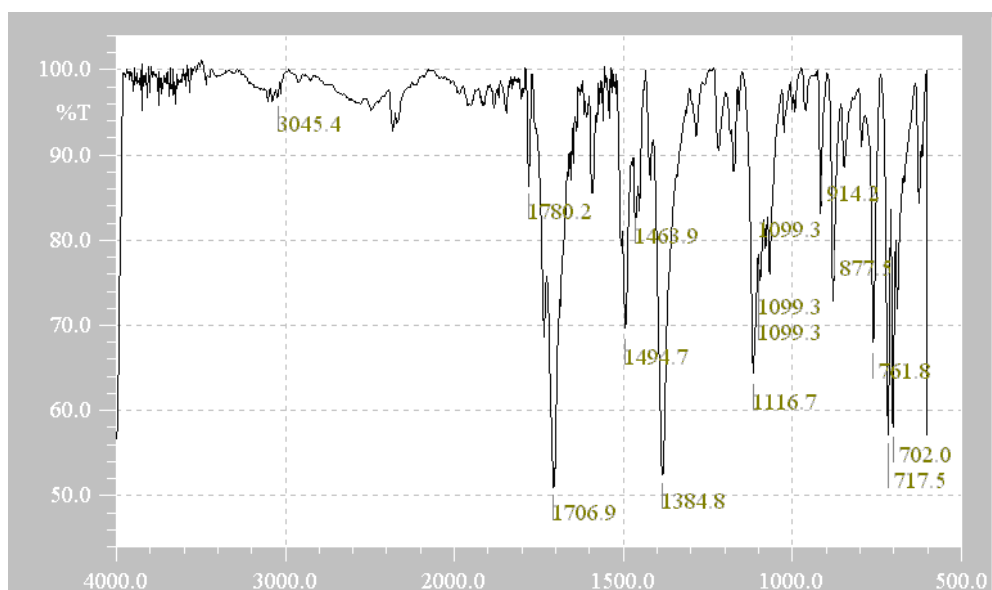


Infravermelho (Pastilha de KBr):  $3045\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H de aromáticos);  $\nu$   $1780\text{ cm}^{-1}$  e  $1706\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O de imida);  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=C aromático)  $1495\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  N-C-O);  $1385\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-N-C)  $\text{cm}^{-1}$ .

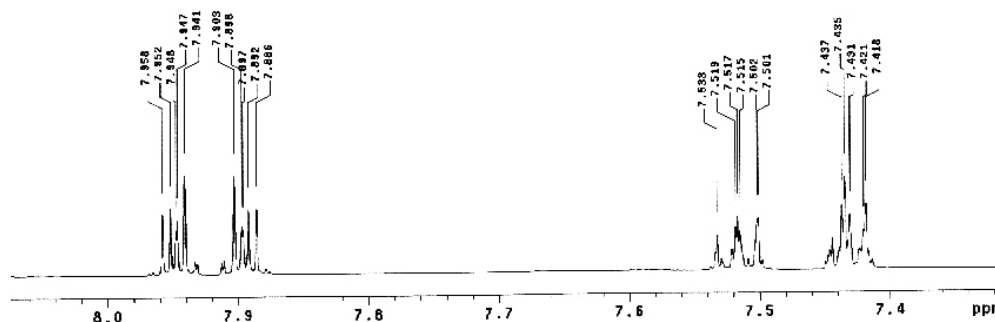
RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta 7,43$  (dd,  $\text{H5}'$  e  $\text{H3}'$ );  $\delta 7,51$  (dd;  $\text{H6}'$  e  $\text{H2}'$   $J_{\text{meta}}=2,1\text{ Hz}$  e  $J_{\text{orto}}=8,1\text{ Hz}$ );  $\delta 7,89$  (m;  $\text{H7}$  e  $\text{H8}$ );  $\delta 7,95$  (m;  $\text{H6}$  e  $\text{H9}$ ;  $J_{\text{meta}}=2,3\text{ Hz}$  e  $J_{\text{orto}}=8,3\text{ Hz}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta 123,67$  ( $\text{C7}$  e  $\text{C8}$ );  $\delta 127,55$  ( $\text{C2}'$  e  $\text{C6}'$ );  $\delta 128,25$  ( $\text{C4}'$ );  $\delta 129,08$  ( $\text{C3}'$  e  $\text{C5}'$ );  $\delta 131,61$  ( $\text{C3}$  e  $\text{C4}$ );  $\delta 131,94$  ( $\text{C1}'$ );  $\delta 134,87$  ( $\text{C6}$  e  $\text{C9}$ );  $\delta 167,2$  ( $\text{C2}$  e  $\text{C5}$ ).

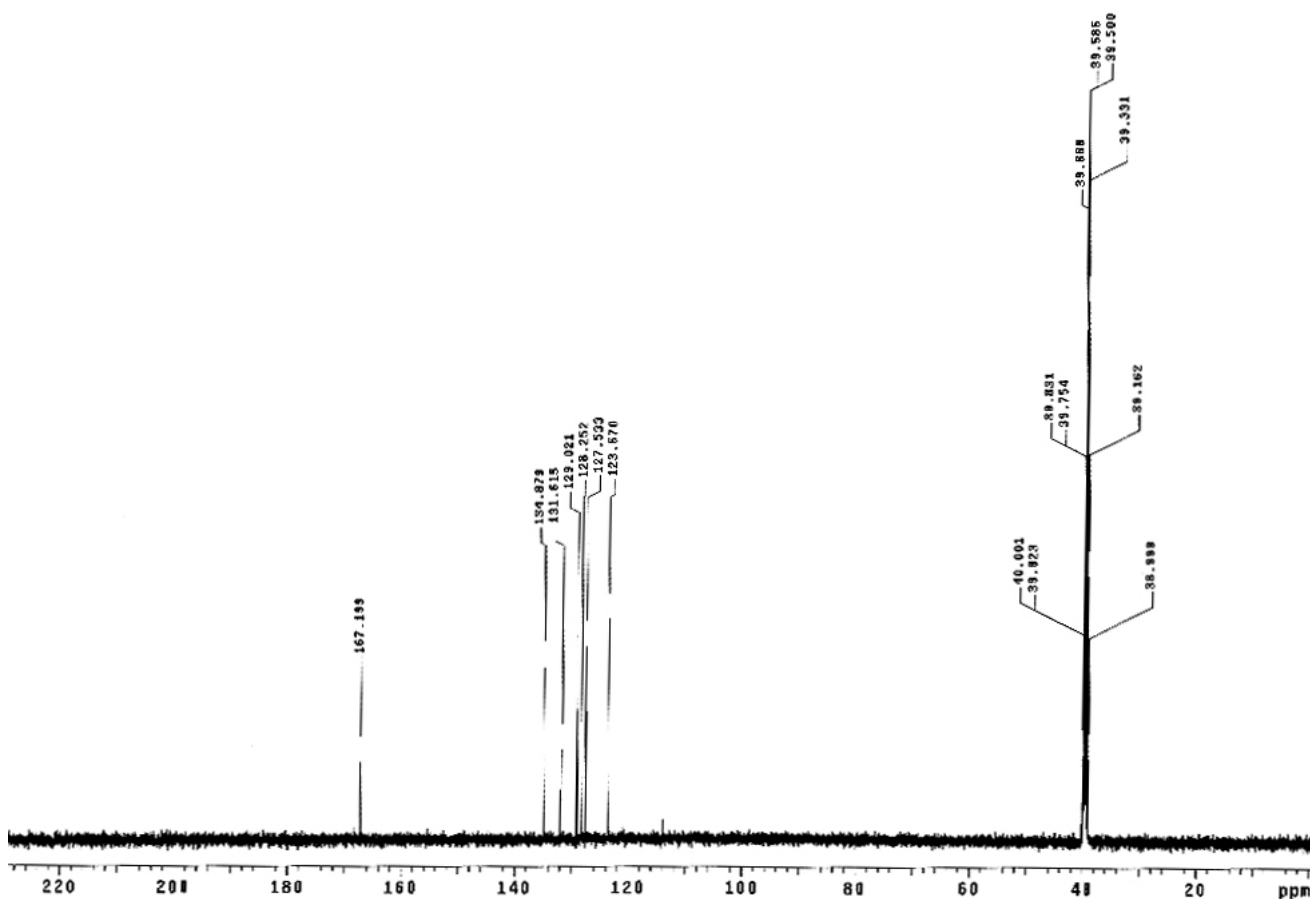
DEPT ( $\text{C-H}_{\text{arom.}}$ ; 500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta 123,67$  ( $\text{C7}$  e  $\text{C8}$ );  $\delta 127,55$  ( $\text{C2}'$  e  $\text{C3}'$ );  $\delta 128,25$  ( $\text{C4}'$ );  $\delta 129,08$  ( $\text{C3}'$  e  $\text{C5}'$ );  $\delta 134,87$  ( $\text{C6}$  e  $\text{C9}$ ).



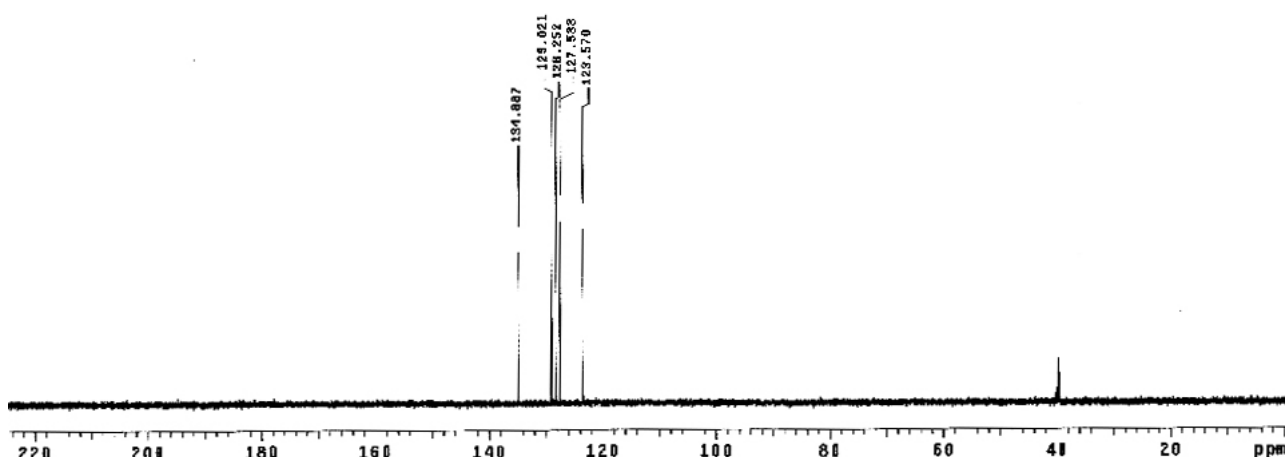
Espectro 19: Espectro no infravermelho da fenilftalimida (14) (Pastilha KBr).



Espectro 20: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) da fenilftalimida (14) relativo as regiões de  $\delta$  7,4 e  $\delta$  8,0 (em DMSO-d<sub>6</sub>).



Espectro 21: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) da fenilftalimida (14) (em  $\text{DMSO}-d_6$ ).



Espectro 22: Espectro de ressonância magnética nuclear de DEPT da fenilftalimida (14) (em  $\text{DMSO-d}_6$ ).

A síntese e a caracterização estrutural da fenilftalimida já haviam sido descritas na literatura (LIMA *et al* 2002). O acompanhamento reacional por CCD mostrou a formação de um novo produto, que foi revelado com solução de ninidrina 1%, onde não se observou a mancha rosada característica de aminas primárias, e que aparece na revelação da anilina. Após isolamento, o produto obtido teve sua faixa de fusão medido e estando entre  $204^{\circ}\text{C}$ - $205^{\circ}\text{C}$ , conforme o valor especificado na literatura.

Utilizando métodos espectroscópicos, pode-se observar pelo espectro no infravermelho (espectro 19) da fenilftalimida (14), o estiramento axial da ligação C-N-C, presente em  $1385\text{ cm}^{-1}$ , referente ao sistema imídico formado. Ademais, visualizamos, os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico como os sinais:  $1780\text{ cm}^{-1}$  e  $1706\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN  $\text{H}^1$  (espectro 20) podemos observar os hidrogênios do sistema aromático imídico em  $\delta 7,89$  e  $\delta 7,95$ , respectivamente os hidrogênios: H7,H8 e H6,H9. Nos deslocamentos de  $\delta 7,43$  e  $\delta 7,51$ , podemos observar os hidrogênios do sistema aromático fenílico, referentes respectivamente aos hidrogênios H2', H3', H4' e H5', muito embora não haja integração desses hidrogênios para completo entendimento estrutural.

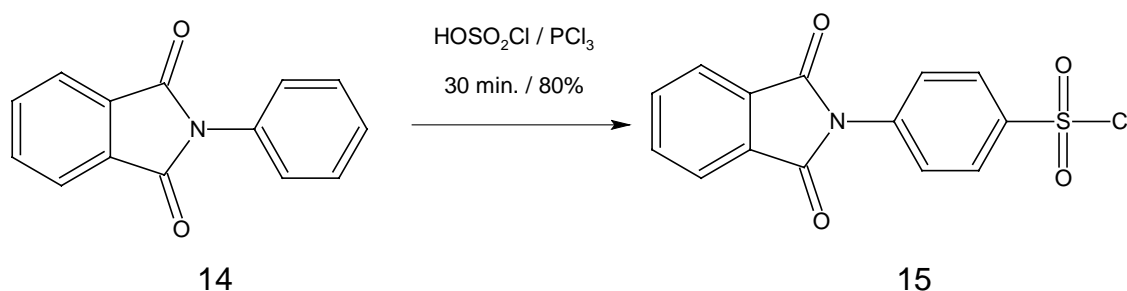
Através dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Espectros 21 e 22), podemos observar todos os carbonos presentes na molécula. No espectro de

DEPT visualizamos os carbonos C-H aromáticos. As atribuições dos C-H aromáticos foram baseadas em dados da literatura (LIMA, 2001).

Esses resultados permitem afirmar que o composto fenilftalimida, previamente descrito na literatura, foi obtido com sucesso.

A obtenção dos derivados ftalimídicos arílicos é de fundamental importância, haja visto que relatos da literatura apontam que esses derivados substituídos são mais potentes na inibição de TNF alfa que os derivados alquílicos (LIMA *et al* 2001).

3.12 – Síntese de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzenosulfonil cloreto ( adaptado de LIMA *et al* 2002).



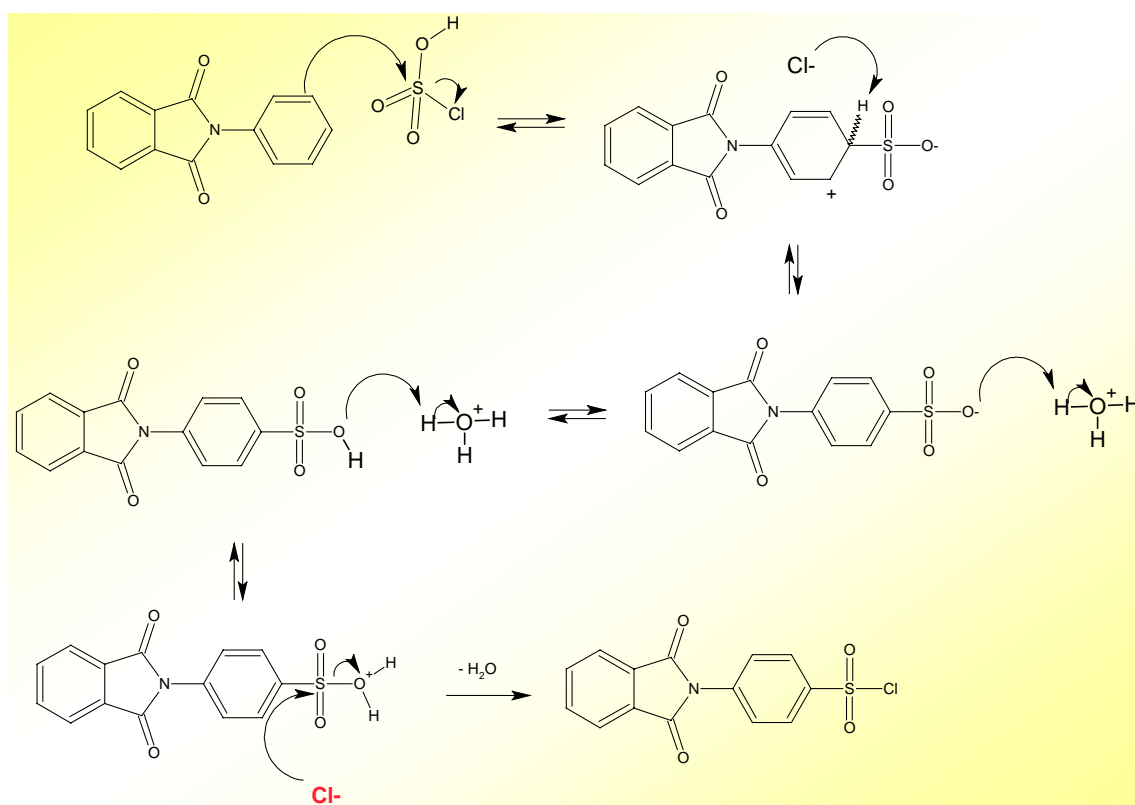
A reação de formação do derivado cloreto de sulfonila é de fundamental importância, haja visto que ele será o intermediário-chave para obtenção dos derivados sulfonamídicos (esquema 07).

Na obtenção desse intermediário-chave (15) foi explorada as reações de substituição eletrofílica aromática, em que o sistema de elétrons  $\pi$  aromático atacam o enxofre do ácido clorosulfônico que sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta^+$ ), formando em uma primeira etapa um intermediário energético, devido à quebra da ressonância do aromático. Em uma segunda etapa, o íon arênio perde um próton, reestabelece a ressonância e forma o íon ftalilbenzeno sulfonato. Nas etapas seguintes, os pares de elétrons do oxigênio abstraem prótons de moléculas de ácido, presentes no meio reacional. Há formação de um bom grupo abandonador. Em uma última etapa, uma molécula de cloreto, presente no meio reacional ataca o enxofre, e leva à eliminação de uma molécula de água, conforme podemos visualizar no esquema 18.

Essa reação é realizada sob aquecimento (50°C), e após isolamento fornece um sólido amorfo de cor branco-acinzentada (faixa de fusão= 180°-182°C) com rendimentos em torno de 80%.

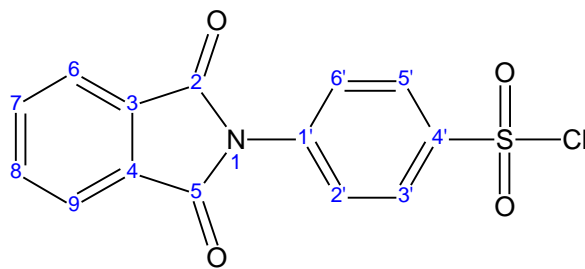
O tricloreto de fósforo foi usado em substituição ao pentacloreto de fósforo da metodologia original sem comprometimento da obtenção do produto, já que sua principal função era de um doador de íon cloreto para formação do produto desejado.

Essa metodologia de obtenção do cloreto de sulfonila é a mesma estratégia da já bem conhecida síntese da sulfonamida. No entanto, o grupo protetor ao invés do acetil é a própria ftalimida. A reação não ocorre no sistema aromático ftalimídico porque este se encontra desativado para reações de substituição eletrofílica aromática.



Esquema 18: Mecanismo de formação do cloreto de sulfonila (15)

Identificação estrutural:



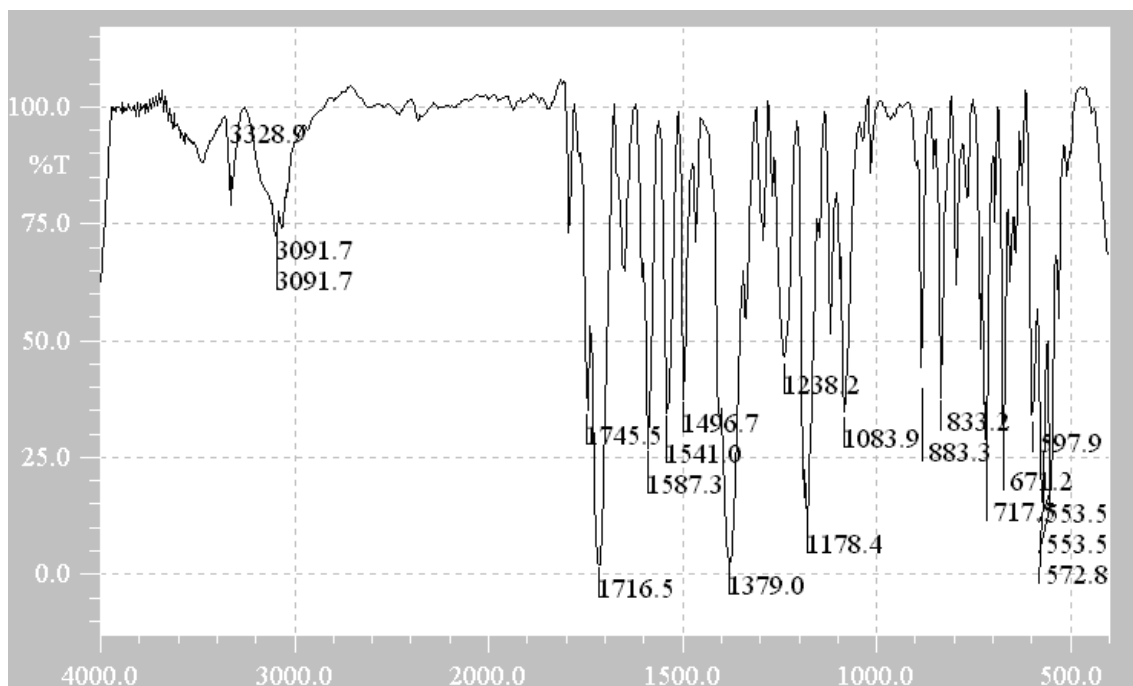
15

Infravermelho (Pastilha de KBr):  $\nu$  C-H de aromáticos  $3091\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O imida:  $1780\text{ cm}^{-1}$ ;  $1745\text{ cm}^{-1}$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático:  $1587\text{ cm}^{-1}$ ,  $1541\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  N-C-O  $1496\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1379\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  S=O  $1178\text{ cm}^{-1}$ .

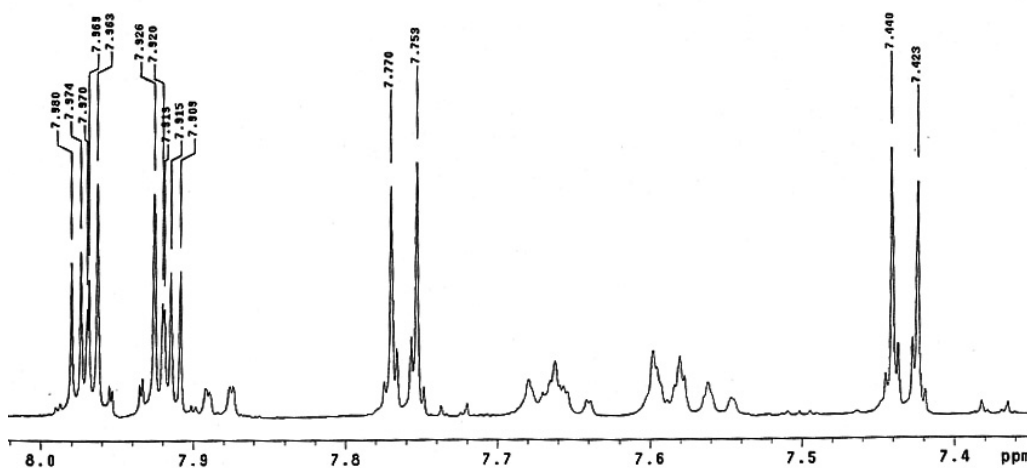
RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta 7,43$  (d, H2' e H6'  $J_{\text{orto}} = 8,2\text{ Hz}$ );  $\delta 7,76$  (d; H3' e H5'  $J_{\text{orto}} = 8,2\text{ Hz}$ );  $\delta 7,91$  (m; H7 e H8);  $\delta 7,97$  (m; H6 e H9).

RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta 124,05$  (C7 e C8);  $\delta 126,08$  (C2' e C6');  $\delta 126,72$  (C3' e C5');  $\delta 131,53$  (C3 e C4);  $\delta 132,03$  (C1');  $\delta 134,77$  (C6-C9);  $\delta 147,57$  (C4');  $\delta 166,93$  (C2 e C5).

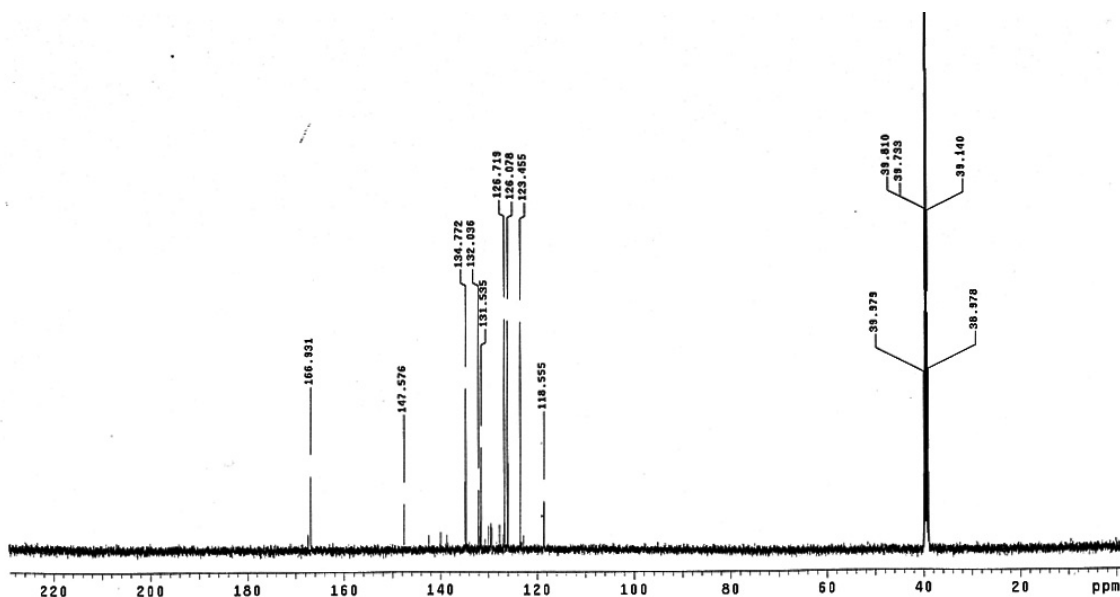




Espectro 23: Espectro no infravermelho do cloreto de sulfonila (15) (pastilha de KBr)



Espectro 24: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) do cloreto de sulfonila (15) relativo as regiões de  $\delta$  7,4 e  $\delta$  8,0 (em DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500 MHz).



Espectro 25: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN <sup>13</sup>C) do cloreto de sulfonila (15) (em DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>; 500 MHz).

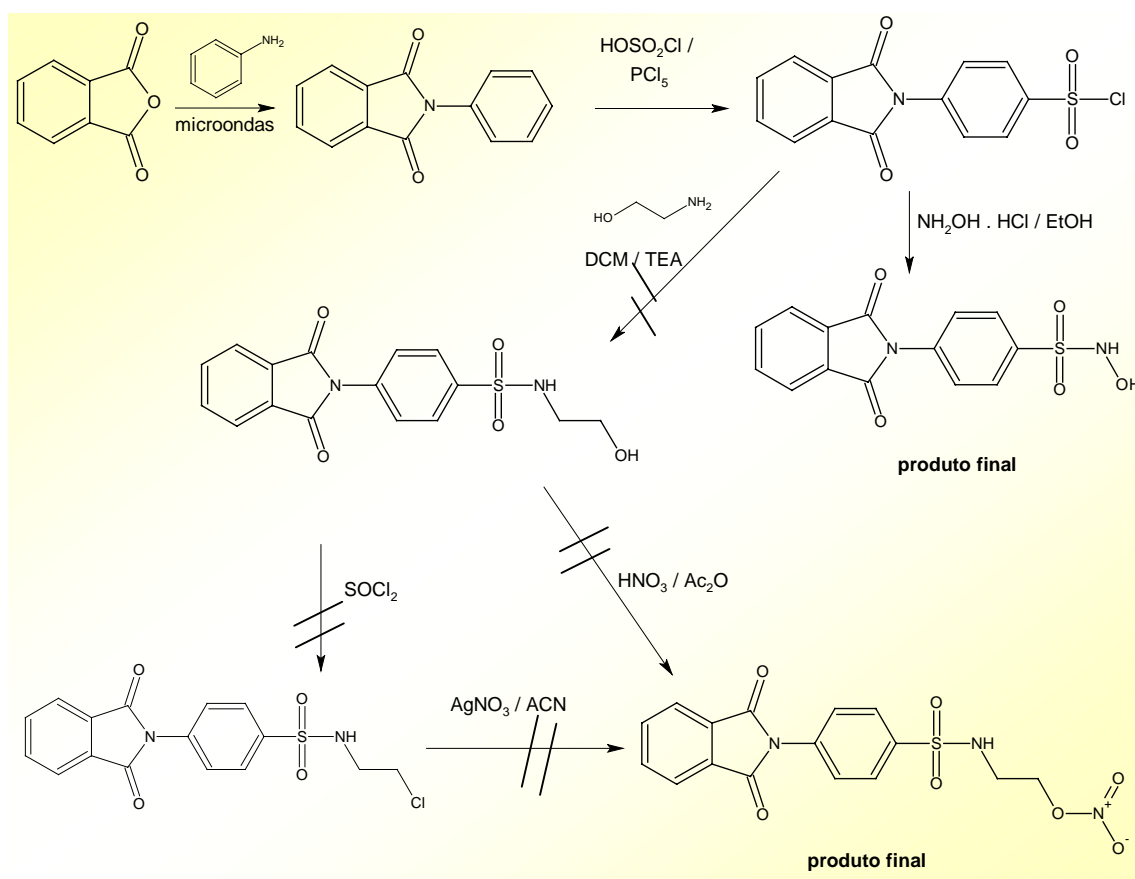
Essa reação foi acompanhada por CCD, e pode-se observar a formação de um único produto que possuía R.f. diferente da fenilftalimida (14). As faixas de fusão dos compostos também eram diferentes, tratando-se de um novo composto obtido, que foi verificado ser o cloreto de sulfonila (15).

No espectro infravermelho (Espectro 23) podemos presenciar os estiramentos da carbonilas da imida em 1780 cm<sup>-1</sup>, 1745 cm<sup>-1</sup> e 1716 cm<sup>-1</sup>, e ausência de estiramentos axiais de C=O de amida e/ou ácido carboxílico, demonstrando que o sistema ftalimídico permanece inalterado. Essa preocupação é devida a relatos na literatura demonstrarem que é possível a hidrólise ácida, mas essa exige maiores tempos reacionais. Em 1178 cm<sup>-1</sup> há um estiramento axial referente a ligação S=O da nova subunidade introduzida.

No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Espectro 24), podemos observar que a nova subunidade introduzida levou à desproteção dos hidrogênios, principalmente àqueles vizinhos ao cloreto de sulfonila. Os hidrogênios 3' e 5' por exemplo, apresentavam deslocamento químico δ 7,43 na fenilftalimida, e após a reação passaram a apresentar δ 7,76. Essa desproteção ocorre pelo efeito indutivo eletroatrator dessa subunidade introduzida.

Este mesmo efeito pode ser observado no espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (Espectro 25). Nesse, podemos analisar diretamente o carbono 4', onde está ligada a subunidade cloreto de sulfonila. Na feniltalimida (14) esse carbono apresenta um deslocamento químico de  $\delta$  128,25, após a introdução da nova subunidade seu deslocamento químico passa a ser  $\delta$  147,57, demonstrando mais uma vez o efeito de desproteção causado pela presença da subunidade eletronegativa.

Através do cloreto de sulfonila (15) intermediário-chave da série sulfonamídica, foi planejado a obtenção de compostos conforme mostrados no esquema 07:



**Esquema 07:** Rota sintética utilizada na obtenção dos derivados ftalimídicos aril sulfonamídicos.

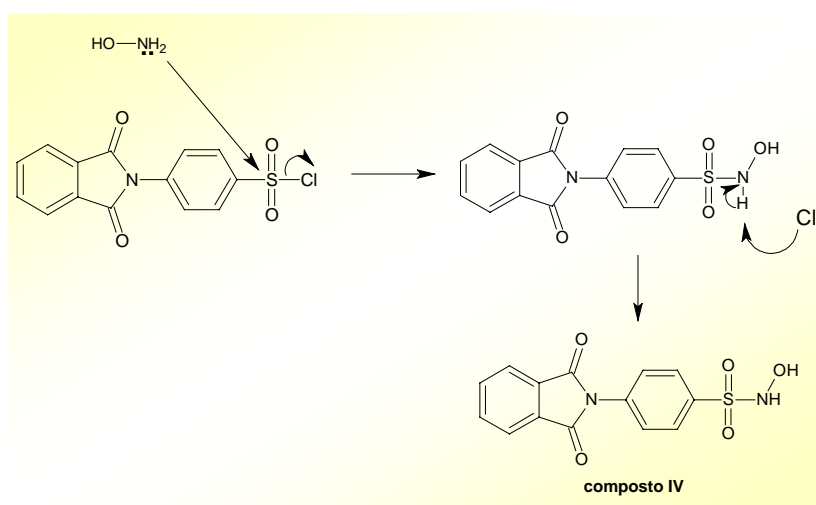
De acordo com o planejamento estrutural para obtenção dos derivados sulfonamídicos, dever-se-ia reagir etanolamina com o cloreto de sulfonila (15), a fim de obter um derivado funcionalizado com uma hidroxila alcoólica (16).

Este produto poderia então seguir duas possíveis rotas: a de interconversão de grupos funcionais (hidroxila-cloreto-nitrato), ou a reação direta com uma mistura de ácido nítrico/anidrido acético para obtenção do derivado nitrato desejado (18).

Inicialmente, reagiu-se o cloreto de sulfonila com etanolamina (26) (reação 3.14) em diclorometano, a adição de TEA foi necessária para manter o pH básico (pH = 8), deixando livre o par de elétrons da amina, que favoreceria o ataque ao enxofre, levando à retirada do cloreto, numa reação do tipo  $SN_2$ .

Após isolamento, e identificação estrutural, não foi possível obter o produto desejado. Inicialmente se imaginou que a etanolamina, possuindo dois sítios nucleofílicos, poderia competir no ataque ao cloreto de sulfonila, muito embora, seja fato a maior nucleofilicidade da amina em relação à hidroxila.

No entanto, quando se reagia o cloreto de sulfonila com hidroxilamina, a reação ocorria com elevados rendimentos para a obtenção do 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-*N*-hidroxibenzenosulfonamida (Esquema 18). Essa estratégia foi utilizada porque havia relatos na literatura de que compostos (exemplo: zileuton) que contém em sua estrutura a subunidade hidroxilamínica, poderiam, após metabolização, funcionar como provável doador de NO. Ademais, a introdução dessa subunidade ainda confere o caráter híbrido do planejamento inicial e poderia ser uma alternativa para obtenção de um composto pertencente à série sulfonamídica. Dessa forma, foi realizada a síntese do composto IV.

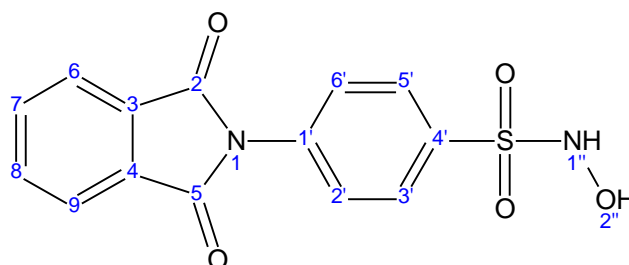


Esquema 18: Mecanismo para obtenção do COMPOSTO IV

Inicialmente essa reação foi realizada em dimetilformamida (DMF) usando como base a TEA, levando à formação de um produto sólido branco com faixa de fusão  $> 270^{\circ}\text{C}$ . O mecanismo para essa reação é do tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$ , em que o enxofre com carga parcial positiva é atacado pelo par de elétrons da amina da hidroxilamina (27). Há eliminação do cloreto, que é o grupo abandonador, e formação do derivado contendo a subunidade hidroxilamínica (Esquema 18). Análises por RMN  $\text{H}^1$  e  $\text{C}^{13}$  revelaram a presença de trietilamina. Mesmo após uma série de lavagens com HCl 10%, não foi possível a eliminação do contaminante.

Por isso, a reação foi modificada a fim de eliminar a TEA, usando como base o bicarbonato de sódio. O solvente também foi trocado, e utilizou-se uma mistura etanol/água. A reação foi acompanhada por CCD, e observou-se que a partir de 45 minutos começava a formação de subprodutos que não foram identificados. Dessa forma, determinou-se o tempo reacional, e o produto desejado foi obtido com um rendimento de 80%. Esse produto final foi posteriormente avaliado nos ensaios biológicos.

Identificação estrutural:

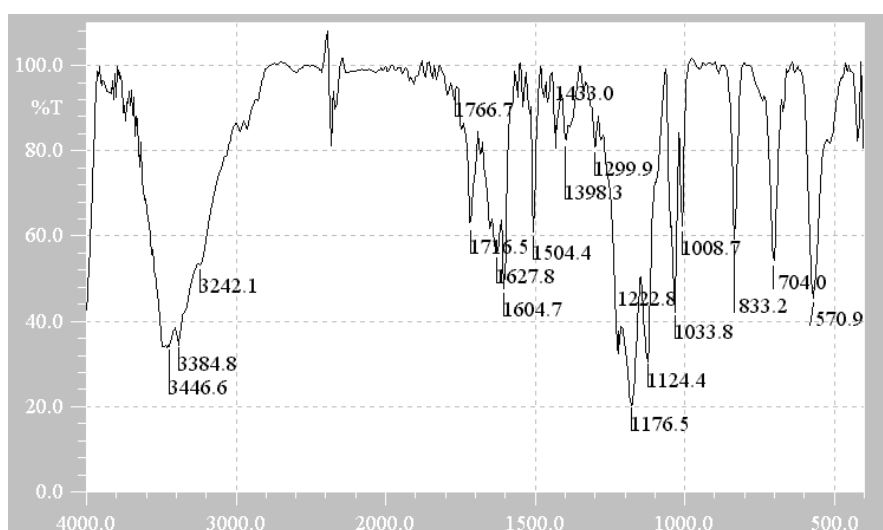


COMPOSTO IV

Infravermelho COMPOSTO IV (pastilha de KBr) :  $\nu$  O-H e  $\nu$  N-H =  $3446\text{ cm}^{-1}$  e/ou  $3384\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1766\text{ cm}^{-1}$  e  $1716,5\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$  N-H  $1627\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1604\text{ cm}^{-1}$ ,  $1504\text{ cm}^{-1}$  e  $1465\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1398\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$  O-H  $1222\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  S=O  $1176\text{ cm}^{-1}$ .

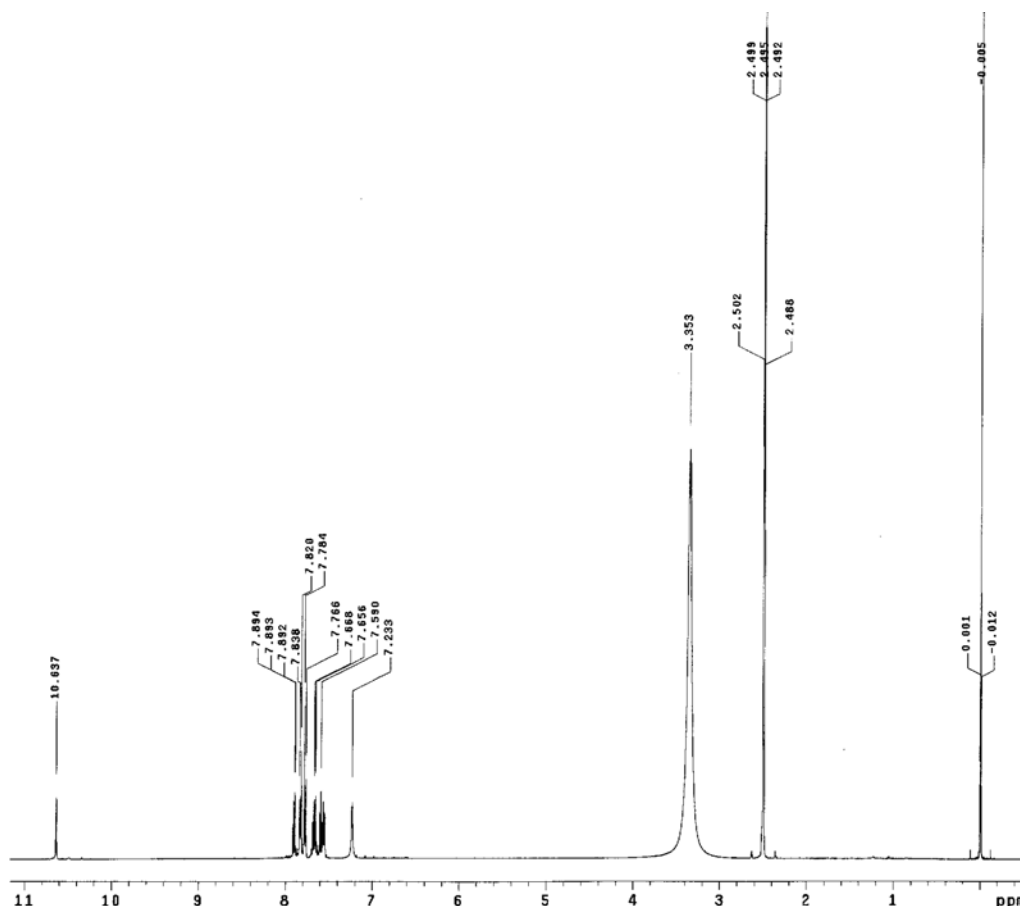
RMN  $^1\text{H}$  (500MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7,57 (m; H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 7,8$  Hz e  $J_{\text{meta}} = 2,16$  Hz);  $\delta$  7,67 (m; H3' e H5');  $\delta$  7,79 (dd, H7 e H8)  $\delta$  7,90 (dd;  $J_{\text{orto}} = 8,71$  Hz e  $J_{\text{meta}} = 1,8$  Hz; H2' e H6');  $\delta$  10,64 (s; H1" ou H2").

RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  167,84 (C2 e C5);  $\delta$  142,38 (C4');  $\delta$  131,84 (C1');  $\delta$  129,8 (C3 e C4);  $\delta$  129,6 (C3' e C5');  $\delta$  126,56 (C2' e C6');  $\delta$  118,9 (C7 e C8);



Espectro 26: Espectro no infravermelho do COMPOSTO IV (pastilha KBr).

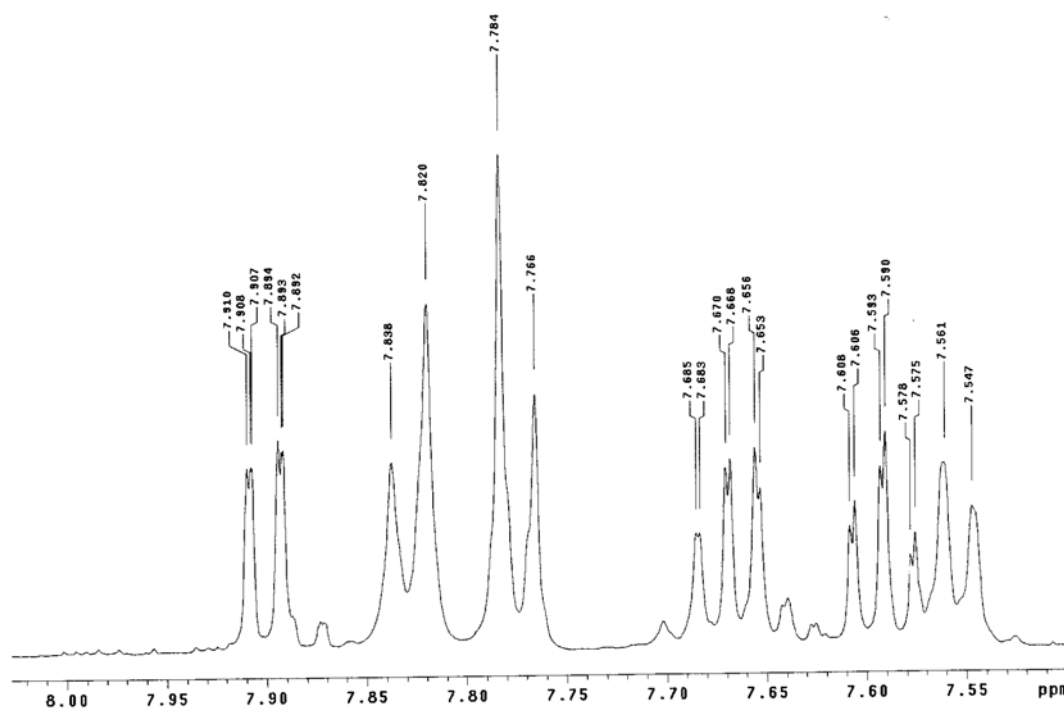
Pelo espectro 26 (infravermelho do composto IV) podemos observar os principais estiramentos axiais referentes à molécula sintetizada, como por exemplo, os estiramentos axiais da carbonila do sistema imídico em  $1766\text{ cm}^{-1}$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ . Há ainda os estiramentos axiais da ligação O-H e da ligação N-H provavelmente envolvidas numa ligação hidrogênio intermolecular, e que por essa condição não é possível apontar exatamente suas posições. Podem-se observar ainda os estiramentos axiais da ligação S=O em  $1176\text{ cm}^{-1}$ , demonstrando a presença dessa subunidade, onde foi realizada a reação de substituição nucleofílica.



Espectro 27: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do COMPOSTO IV ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500MHz).

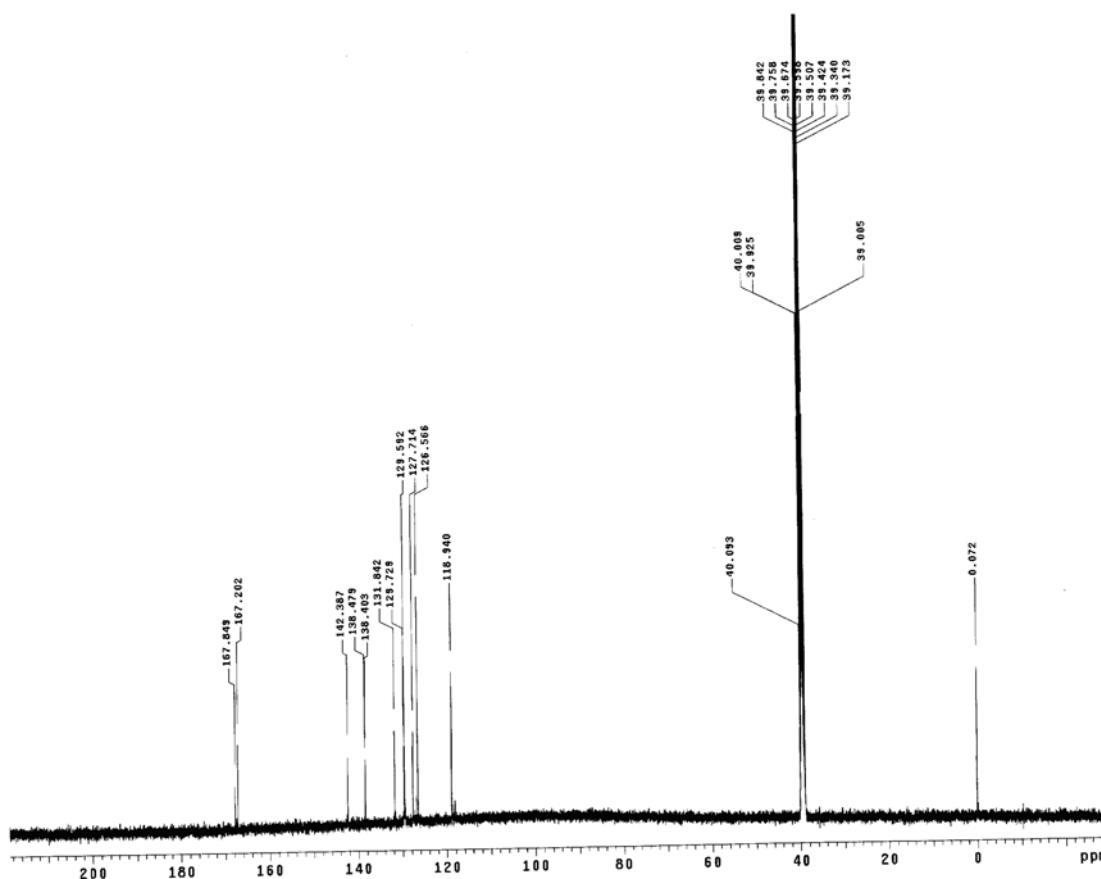
Pelo espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Espectro 27 e 28) podemos observar em  $\delta 10,64$  o deslocamento do hidrogênio de N-H e/ou O-H da subunidade hidroxilamínica. Ademais, podemos observar que os hidrogênios das posições 3 $^{\text{a}}$  e 5 $^{\text{a}}$  apresentam-se menos deslocados ( $\delta 7,67$ ) que quando comparados com o cloreto de sulfonila ( $\delta 7,76$ ). Embora os átomos de oxigênio e nitrogênio sejam mais eletronegativos que o átomo de cloro, a capacidade de o par de elétrons do nitrogênio em fazer ressonância com o grupo sulfona, “protege” esses átomos de hidrogênio vizinhos.

Esse mesmo efeito pode ser visualizado no espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (Espectro 29), que na posição 4 $^{\text{a}}$  do composto IV aparece com um deslocamento de  $\delta 142,38$ , enquanto que no cloreto de sulfonila (15) esse deslocamento é observado em  $\delta 147,57$ .



Espectro 28: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do COMPOSTO IV ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500MHz) relativo as regiões de  $\delta$  7,5 a  $\delta$  8,0.





Espectro 29: Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do COMPOSTO IV (DMSO  $d_6$ ; 500 MHz).

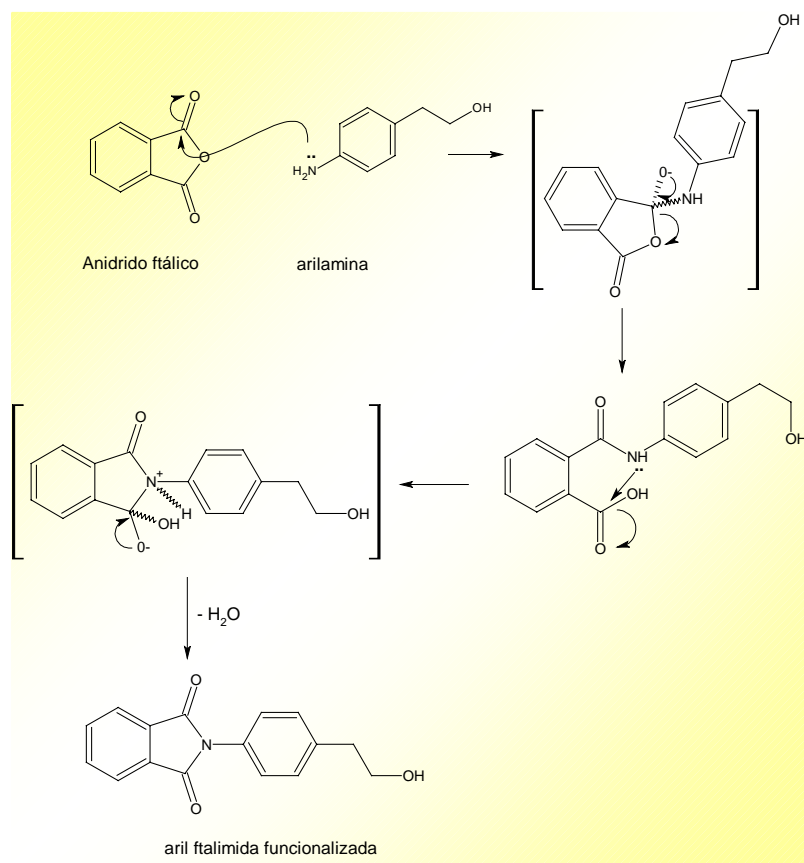
Foi realizado a análise elementar do composto IV (%S), e foi encontrado que a porcentagem de enxofre na amostra analisada era de 10,8%, enquanto, a porcentagem na amostra calculada era de 10,07%.

Os derivados arílicos apontados no planejamento estrutural foram sintetizados, analisados e avaliados nos ensaios farmacológicos realizados. A partir de aminas funcionalizadas, adquiridas comercialmente foram sintetizados os intermediários ftalimídicos. Estes foram reagidos com a mistura ácido nítrico/anidrido acético para fornecer os produtos finais desejados.

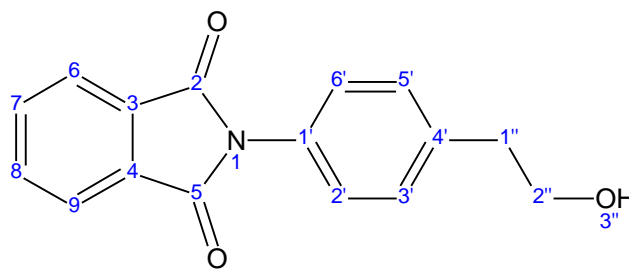
No item 8.5, a seguir, é descrita a síntese do derivado aril ftalimídico. O mecanismo para formação destes derivados é muito similar e será descrito apenas o mecanismo da reação a seguir que servirá para o entendimento da formação de todos os demais derivados arílicos.

Essa reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre do nitrogênio da aril amina (24) à carbonila do anidrido ftálico, que sustenta

uma carga parcial positiva ( $\delta^+$ ). Há rompimento da ligação  $\pi$  e o par de elétrons é deslocado para o átomo de oxigênio. Ao reestabelecer a ligação  $\pi$ , há quebra da ligação C-O do anidrido. O par de elétrons da amina ataca o carbono carbonílico localizado na posição orto aromática. Novamente há rompimento de outra ligação  $\pi$ , que ao ser reestabelecida elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel e formando o derivado arilftalimídico funcionalizado (25) (Esquema 19).



Esquema 19: Mecanismo de formação dos derivados arilftalimídicos funcionalizados

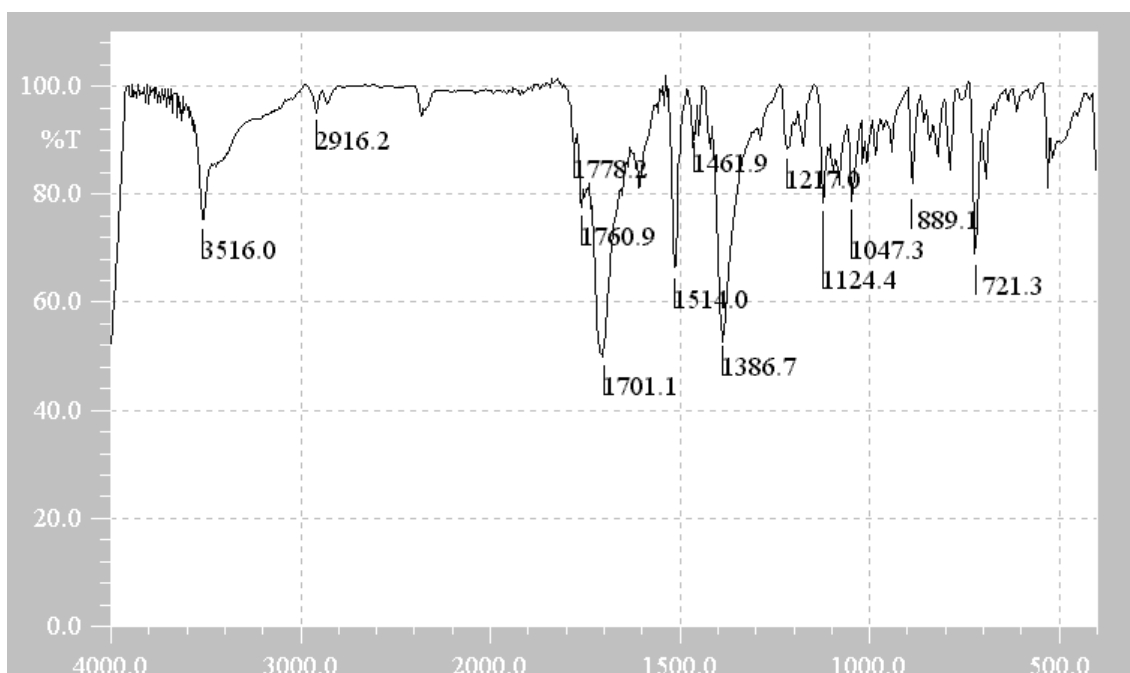
8.5 – Síntese do 2-[4-(2-hidroxiethyl)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona

25

Infravermelho intermediário 67 (pastilha de KBr) :  $\nu$  O-H =  $3516\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2916\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1768\text{ cm}^{-1}$  e  $1701\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1461\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1386\text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,95 (2H; dd, H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 8,5\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,3\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,81 (2H; dd, H7 e H8);  $\delta$  7,38 (4H; m, H2', H3', H5' e H6');  $\delta$  3,9 (2H; t, H2'');  $\delta$  2,93 (2H; t, H1'').

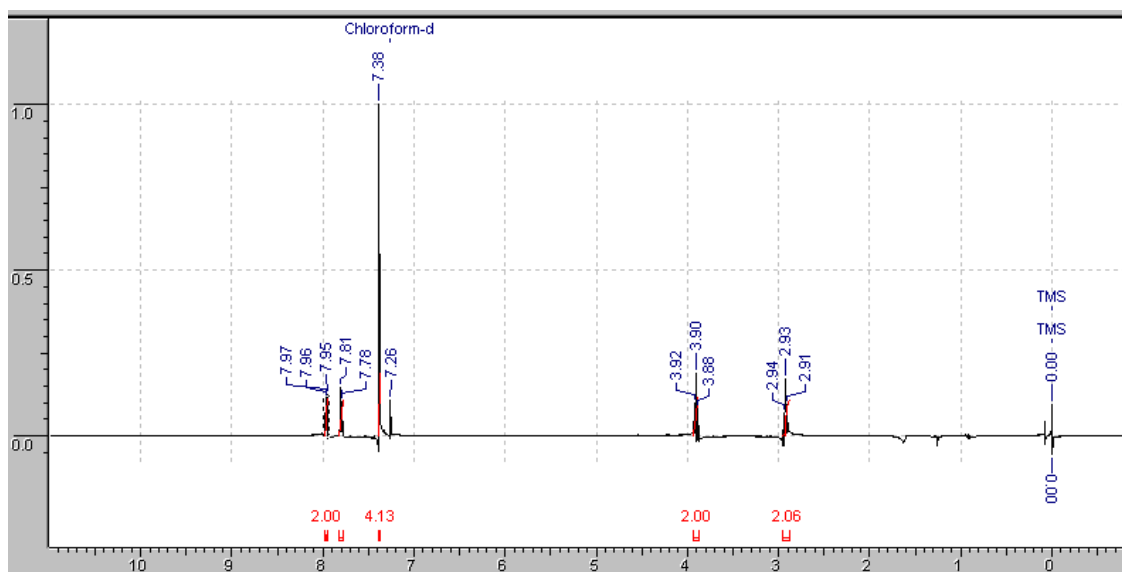
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167,76 (C2 e C5);  $\delta$  139,16 (C1');  $\delta$  134,81 (C6 e C9);  $\delta$  132,17 (C3 e C4);  $\delta$  130,22 (C2' e C6');  $\delta$  127,11 (C3' e C5');  $\delta$  124,15 (C7 e C8);  $\delta$  117,61 (C4');  $\delta$  63,92 (C2'') e  $\delta$  39,28 (C1'').



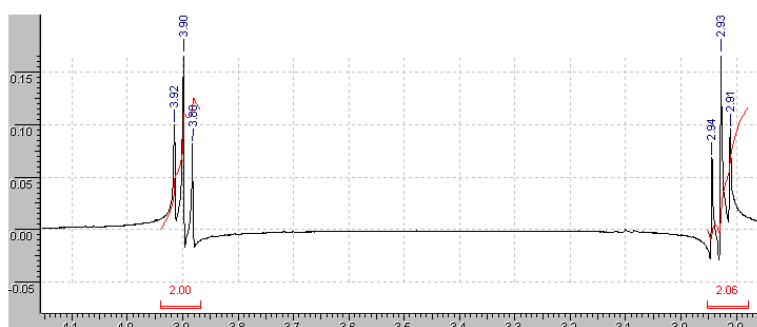
Espectro 30: Espectro no infravermelho do intermediário 25 (Pastilha KBr)

O acompanhamento por CCD a diferença nas faixas de fusão observadas indicam a obtenção de um novo composto.

No espectro no infravermelho (Espectro 30) podemos observar os estiramentos axiais da ligação O-H em  $3516\text{ cm}^{-1}$ , e os estiramentos axiais da carbonila da imida em  $1760\text{ cm}^{-1}$  e  $1701\text{ cm}^{-1}$  do anel ftalimídico. A presença de dois sítios nucleofílicos no reagente (hidroxila e amina) poderia levar a obtenção de um produto onde ocorresse o ataque da hidroxila à carbonila. Caso tivesse ocorrido essa reação, observaríamos um estiramento axial de carbonila de éster e um estiramento axial de carbonila de ácido carboxílico, referente à abertura do anel ftalimídico. Entretanto, esses estiramentos não foram observados, indicando que o mecanismo reacional ocorre majoritariamente pelo ataque dos pares de elétrons do nitrogênio da arilamina formando o derivado ftalimídico desejado.

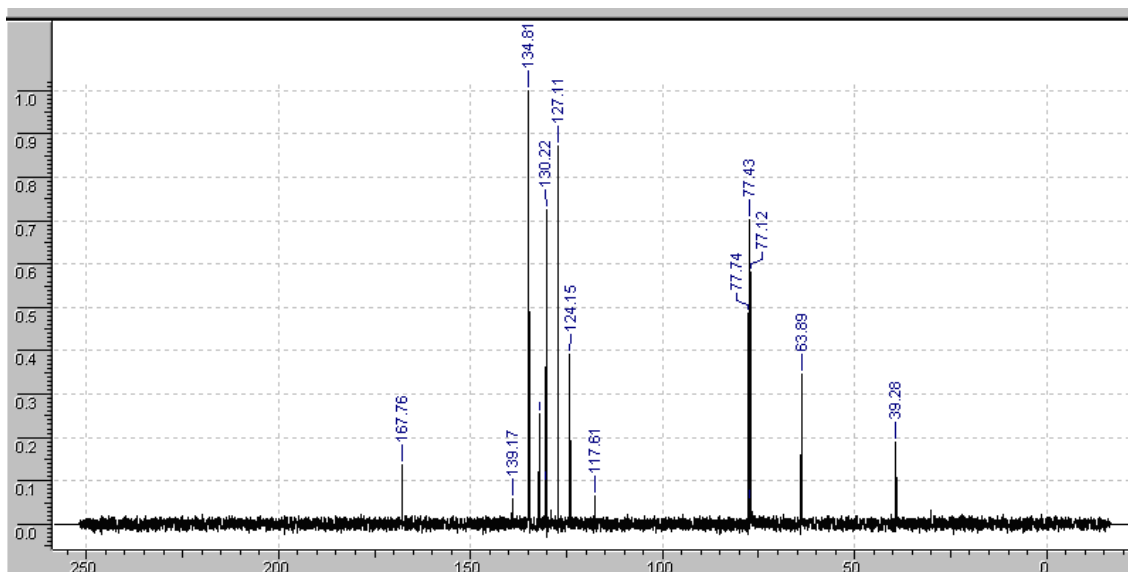


Espectro 31: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) do intermediário 25 ( $CDCl_3d$ ; 400MHz).



Espectro 32: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) do intermediário 25 ampliação região dos tripletos ( $CDCl_3d$ ; 400MHz)

Através do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Espectro 31) podemos observar a integração correspondente à estrutura proposta, com integração para 2 hidrogênios na cadeia alquílica do composto sintetizado (Espectro 32). A subunidade aromática arílica introduzida, apresenta-se como um multipeto com integração para 4 hidrogênios.



Espectro 33: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do intermediário 25 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

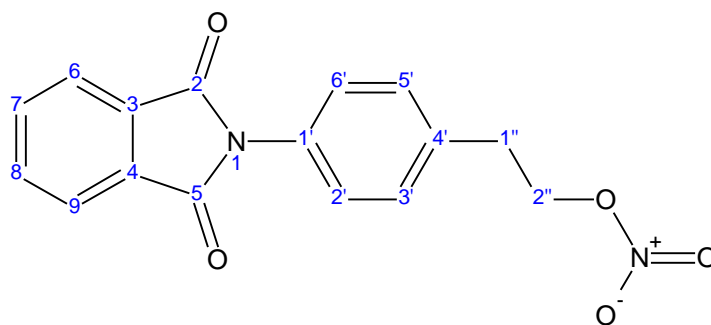
O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (Espectro 33) mostra os carbonos correspondentes a estrutura proposta. Esse conjunto de dados nos permite ter concluído com êxito a etapa desse intermediário sintético.

Apartir desse intermediário foi realizada a síntese do produto final nitrato – composto VI.

#### 8.6 – Síntese do produto final 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)fenil]etil nitrato (COMPOSTO VI)

O produto nitrado foi obtido através da metodologia utilizando ácido nítrico e anidrido acético em diclorometano, em bons rendimentos (76%).

O mecanismo para formação do composto VI é o mesmo já descrito para formação do nitrato derivado alquílico nos esquemas 14, 15 e 16.

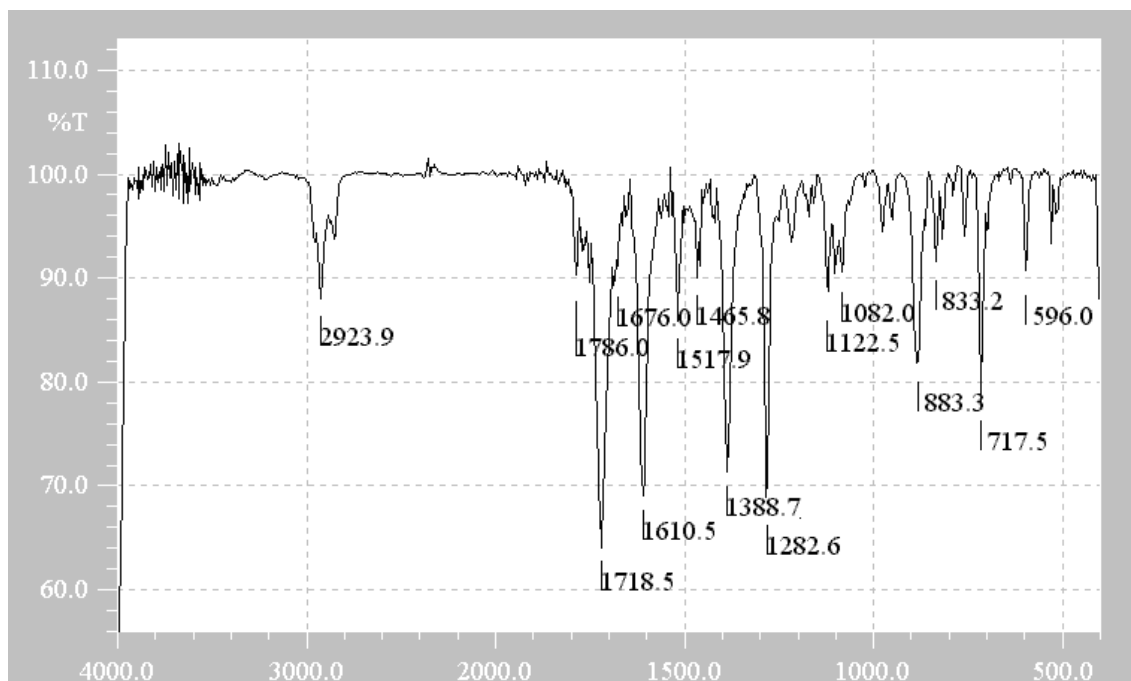


COMPOSTO VI

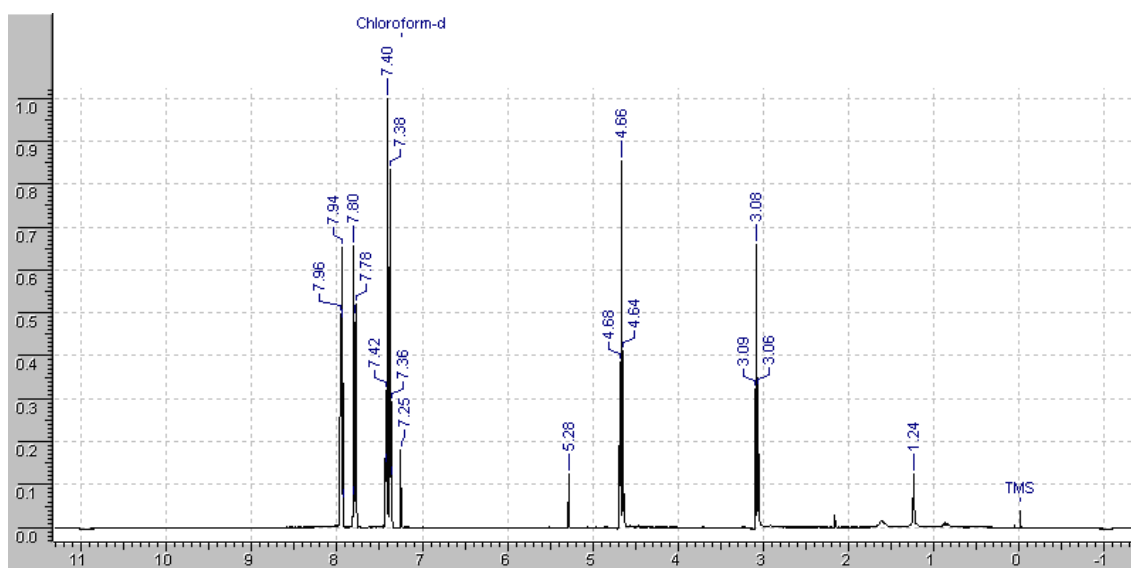
Infravermelho COMPOSTO VI (pastilha de KBr) :  $\nu$  C-H aromático=  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2924\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada=  $1786\text{ cm}^{-1}$  e  $1718\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1465\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  O- $\text{NO}_2$  nitrato =  $1610\text{ cm}^{-1}$  e  $1283\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1389\text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  7,95 (2H; m, H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 8,43\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,36\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,79 (2H; m, H7 e H8);  $\delta$  7,41 (2H; d, H2' e H6' );  $\delta$  7,37 (2H; d, H3' e H5';  $J_{\text{orto}} = 8,57\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,07\text{ Hz}$ );  $\delta$  4,66 (2H; t, H2'');  $\delta$  3,08 (2H; t, H1'').

RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  167,76 (C2 e C5);  $\delta$  132,12 (C1');  $\delta$  134,88 (C6 e C 9);  $\delta$  131,09 (C3 e C4);  $\delta$  130,07 (C2' e C6');  $\delta$  127,29 (C3' e C5');  $\delta$  124,2 (C7 e C8);  $\delta$  117,61(C4');  $\delta$  73,41 (C2'') e  $\delta$  33,38 (C1'').

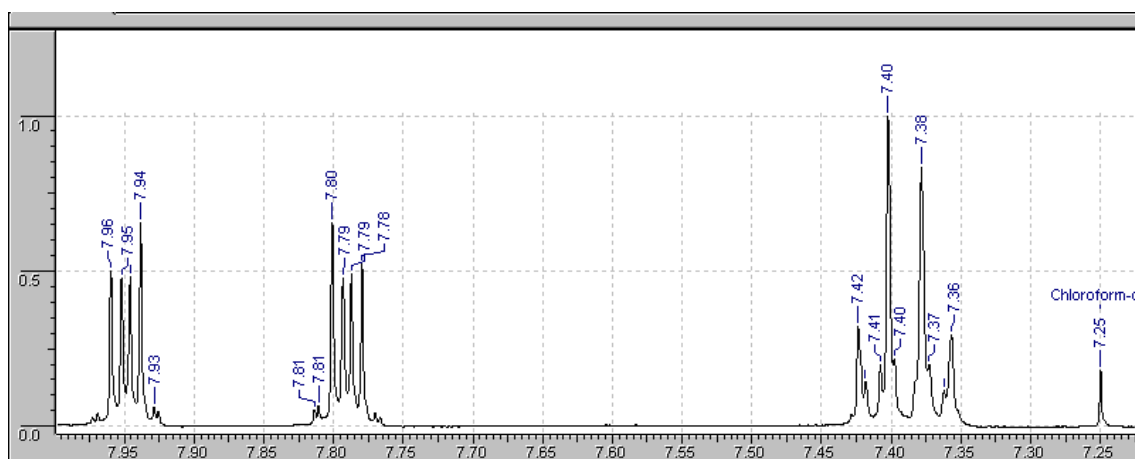


Espectro 34: Espectro no infravermelho do composto VI (Pastilha KBr).

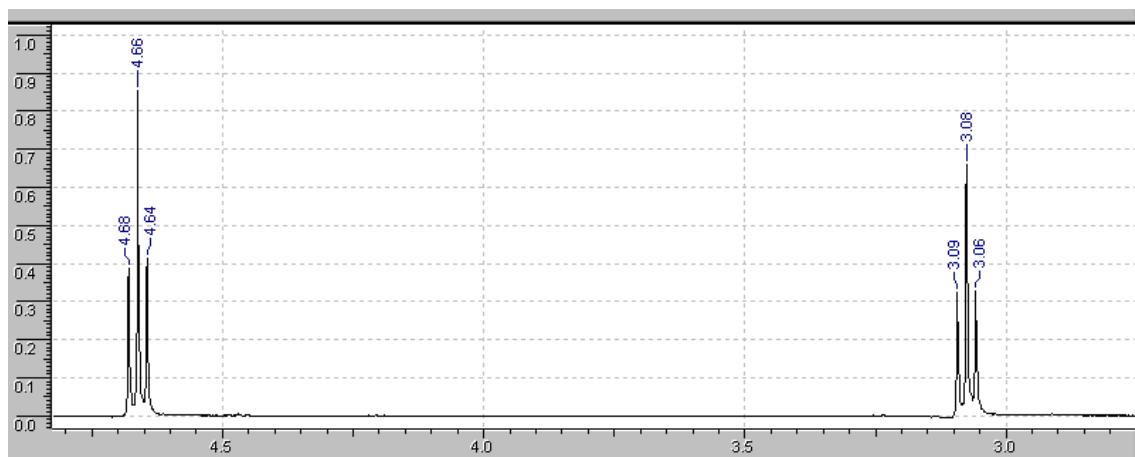


Espectro 35: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) do COMPOSTO VI ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz)

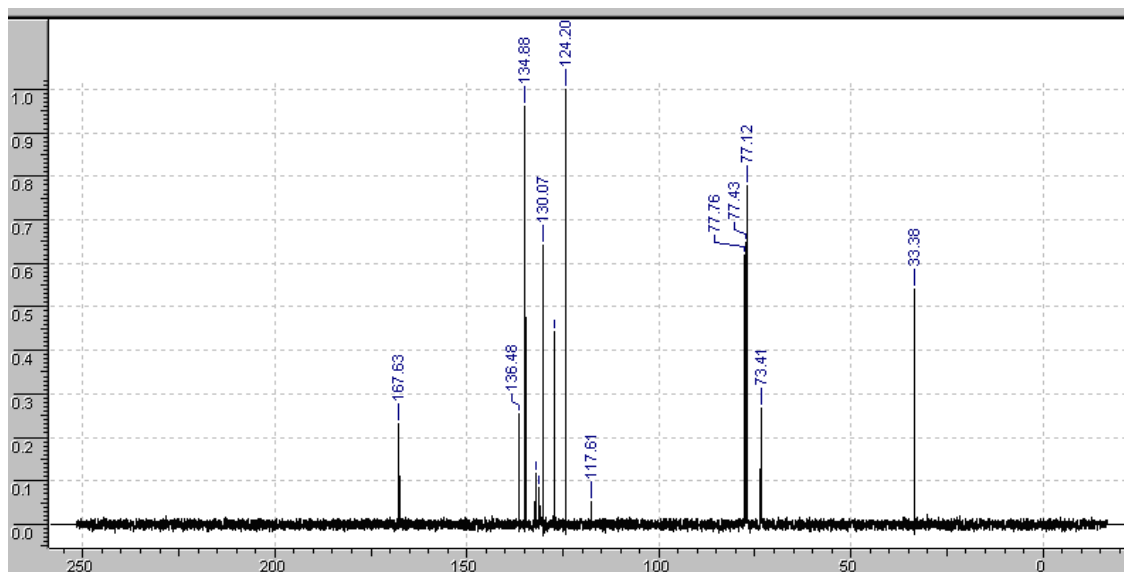




Espectro 36: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do COMPOSTO VI ( $\text{CDCl}_3d$ ; 400MHz) – na região entre  $\delta$  7,20 a  $\delta$  8,0.



Espectro 37: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do COMPOSTO VI ( $\text{CDCl}_3d$ ; 400 MHz)– ampliação na região de  $\delta$  2,5 a  $\delta$  5,0.



Espectro 38: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do composto VI ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

Através do espectro de infravermelho (Espectro 34) podemos observar os estiramentos axiais da ligação  $O-NO_2$  em  $1610\text{ cm}^{-1}$  e  $1288\text{ cm}^{-1}$  e a ausência do estiramento axial  $O-H$  em  $3516\text{ cm}^{-1}$ , devido à formação do éster de nitrato. Ademais, podemos observar através do estiramento axial  $C-N-C$  e do estiramento axial  $C=O$  das carbonilas de imida, a presença do sistema imídico no núcleo isoindolin-1,3-diona.

Pelo espectro de RMN  $H^1$  (Espectros 35,36 e 37) quando comparamos o reagente (25), com o produto final (COMPOSTO VI), observamos o deslocamento dos hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  ao nitrato, que no reagente é visualizado em 3,9 ppm ( $H2''$ ) e 2,93 ppm ( $H1''$ ), e no produto final aparece em 4,66 ppm ( $H2''$ ) e 3,08 ppm ( $H1''$ ), respectivamente. Este efeito é devido à desproteção causada pelo efeito indutivo do grupamento nitrato. Esse efeito também é observado no espectro de RMN  $C^{13}$  (Espectro 38); o efeito indutivo causa um deslocamento do  $C2''$ , que no reagente é visualizado no deslocamento de  $\delta$  63,92, e no produto em  $\delta$  73,41.

### 8.7 - Síntese dos regioisômeros intermediários 19, 20 e 21

Todos os regioisômeros foram obtidos com rendimentos consideráveis (maiores que 51%), e esta metodologia sintética mostrou-se adequada para a preparação dos compostos desejados.

Inicialmente utilizou-se como solvente o ácido acético glacial. A reação em ácido acético auxiliaria a formação do derivado ftalimídico porque o ácido funcionaria como catalisador, protonando o oxigênio da carbonila do anidrido ftálico e auxiliando o rompimento da ligação  $\pi$  quando houvesse o ataque do par de elétrons da amina (reagente). Ao mesmo tempo, o meio ácido desfavorece a reação devido protonação do par de elétrons da amina, isto levaria a uma diminuição da reatividade da amina. Embora tivesse sido observada a formação do produto desejado nesse solvente, havia também formação de subprodutos não identificados, e de difícil separação por coluna cromatográfica em sílica gel. Esses subprodutos poderiam ter sido formados decorrentes do ataque também da hidroxila alcoólica. Por isso, não foi utilizado ácido acético (AcOH) nas reações de obtenção desses intermediários.

O solvente escolhido para obtenção desses intermediários foi a piridina, porque é um solvente básico não nucleofílico com elevado ponto de ebulição. A basicidade auxiliaria disponibilizando o par de elétrons da amina, tornando-a mais nucleofílica, facilitando o ataque à carbonila do anidrido ftálico, para posterior formação do intermediário desejado. Ademais, o alto ponto de ebulição da piridina favorece a etapa de desidratação final levando ao fechamento do anel ftalimídico (Esquema 19).

O mecanismo de reação para formação dos regioisômeros intermediários é o mesmo descrito no esquema 19. A reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre do nitrogênio da aril amina à carbonila do anidrido ftálico, que sustenta uma carga parcial positiva ( $\delta^+$ ). Há rompimento da ligação  $\pi$ , e o par de elétrons é deslocado para o átomo de oxigênio. Ao reestabelecer a ligação  $\pi$ , há quebra da ligação C-O do anidrido. O par de elétrons da amina ataca o carbono carbonílico localizado na posição orto aromática. Novamente, há rompimento de outra ligação  $\pi$  que ao ser reestabelecida elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel e formando o derivado aril-ftalimídico funcionalizado.

Os espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) e carbono (RMN  $C^{13}$ ) dos intermediários são muito semelhantes, por isso serão discutidos juntos a seguir.

Os acompanhamentos reacionais por CCD e as diferenças nas faixas de fusão observadas entre os reagentes e os produtos formados indicaram a obtenção de novos intermediários, obtidos com rendimentos superiores a 51%.

Nos espectros no infravermelho (Espectros 39, 42 e 45) podemos observar os estiramentos axiais da ligação O-H entre aproximadamente  $3541\text{ cm}^{-1}$  e  $3421\text{ cm}^{-1}$ , e os da carbonila da imida em aproximadamente  $1782\text{ cm}^{-1}$  e  $1701\text{ cm}^{-1}$  indicando a presença do anel ftalimídico. A presença de dois sítios nucleofílicos no reagente (hidroxila e amina) poderia levar a obtenção de um produto onde ocorresse o ataque da hidroxila à carbonila ao invés do ataque da amina esperado. Caso tivesse ocorrido essa reação, observaríamos um estiramento axial de uma carbonila de éster, e uma carbonila de ácido carboxílico, referente à abertura do anel ftalimídico. Entretanto, esses estiramentos não foram observados, indicando que o mecanismo reacional ocorre majoritariamente pelo ataque dos pares de elétrons do nitrogênio da arilamina, formando o derivado ftalimídico desejado.

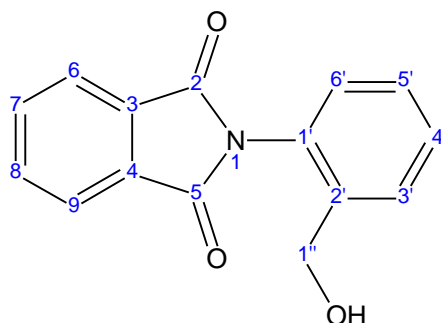
No espectros 40, 43 e 46 de ressonância magnética nuclear de hidrogênio observamos que as integrações são coerentes às estruturas propostas. A diferença fundamental observada na região de  $\delta\ 7,0$  a  $\delta\ 8,0$  entre os diferentes espectros diz respeito ao padrão de substituição aromática, levando a multiplicidades diferentes desses hidrogênios. Além disso, quando analisamos o hidrogênio 1" observamos deslocamento químico de um singlete em  $\delta\ 4,52$ , já nos intermediários *meta* e *para* esse singlete aparece em  $\delta\ 4,76$  e  $\delta\ 4,77$  respectivamente. Esse mesmo efeito de "proteção" é observado quando analisamos o espectro de ressonância magnética nuclear de carbono dos regioisômeros intermediários. Embora o átomo de nitrogênio seja mais eletronegativo que o átomo de carbono, esse efeito pode estar relacionado a capacidade de doação do par de elétrons do nitrogênio da ftalimida ao sistema aromático. Dessa forma, poderia haver "proteção" da posição *orto* conforme podemos visualizar nos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.

Nos espectros 41, 44 e 47 ressonância magnética nuclear de carbono observamos em a presença da carbonila de imida em todos os compostos sem deslocamento significativo em  $\sim \delta$  167,0. Nos itens 8.7.1, 8.7.2 e 8.7.3 observamos a identificação estrutural detalhada de cada um desses regiosômeros.

#### 8.7.1 – Síntese do 2-[2-(hidroximetil)fenil]-1*H*-isindol-1,3(2*H*)-diona (19)

O intermediário regiosômero orto foi obtido como um sólido cristalino amarelo, com rendimento de 70% e faixa de fusão: 169°-174°C.

Identificação estrutural:

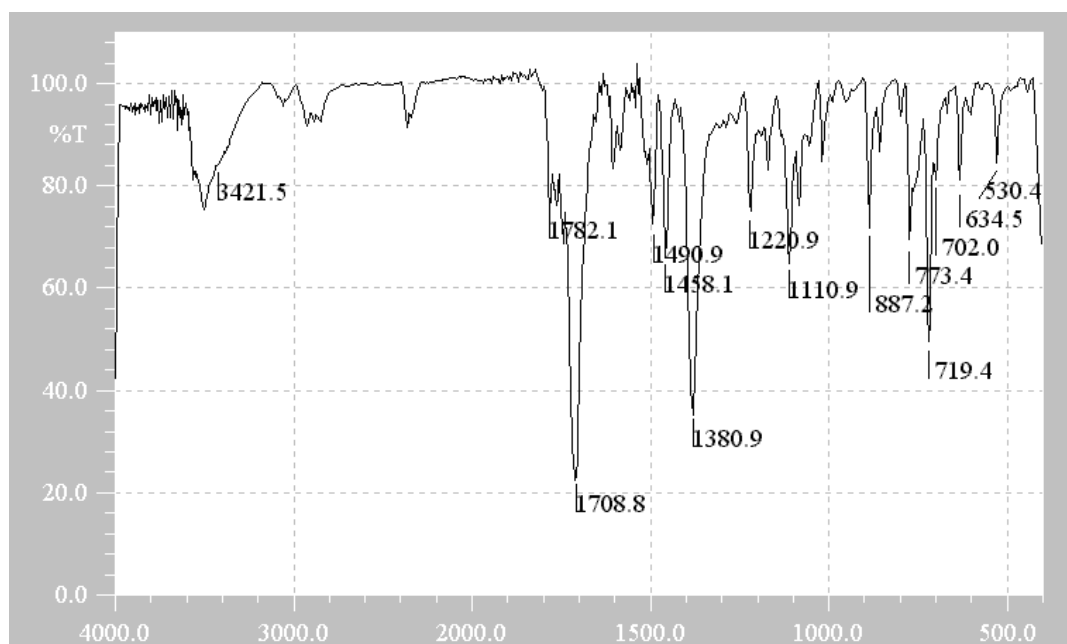


19

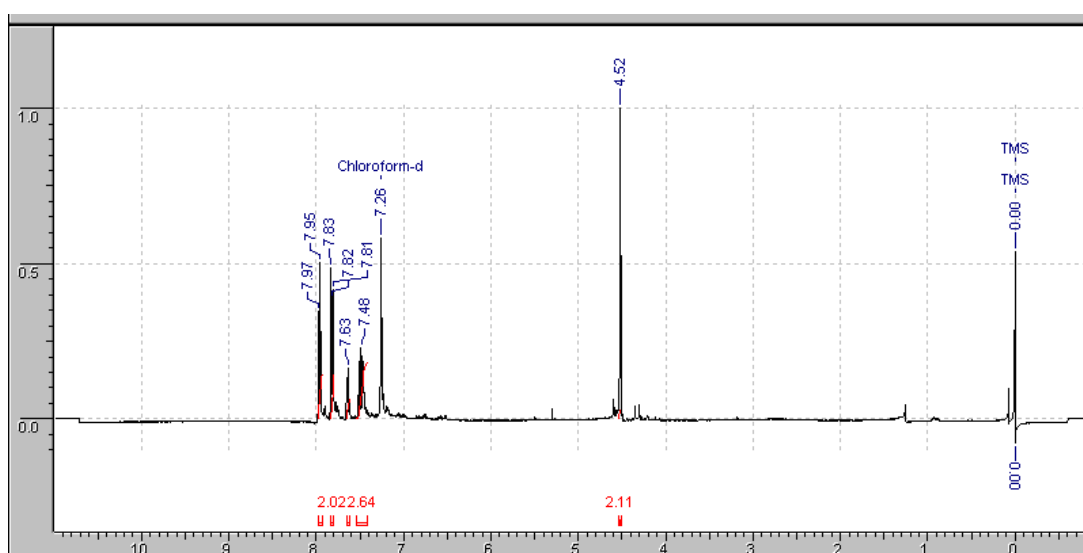
Infravermelho intermediário 19 (pastilha de KBr) :  $\nu$  O-H = 3421  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático = 3066  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  = 2925  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada = 1782  $\text{cm}^{-1}$  e 1708  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático = 1600  $\text{cm}^{-1}$ , 1490  $\text{cm}^{-1}$  e 1458  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta$  O-H 1050  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C 1381  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3$ d):  $\delta$  7,95 (2H; dd, H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 7,46$  Hz);  $\delta$  7,82 (2H; dd, H7 e H8);  $\delta$  7,64 (1H; dd; H6')  $\delta$  7,50 (2H; ddd, H4' e H5',  $J_{\text{orto}} = 7,8$  Hz e  $J_{\text{meta}} = 1,9$  Hz);  $\delta$  7,46 (1H; dd, H3'; 1hidrogênio;  $J_{\text{orto}} = 7,8$  Hz e  $J_{\text{meta}} = 1,8$  Hz);  $\delta$  4,52 (2H; s, H1'').

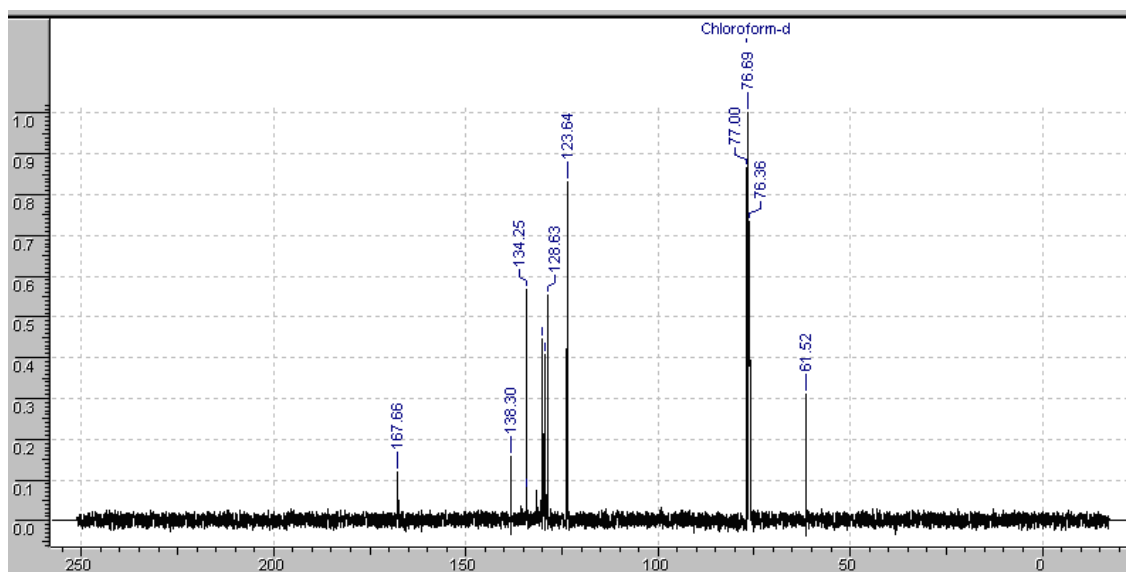
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ d):  $\delta$  167,66 (C2 e C5);  $\delta$  138,3 (C1');  $\delta$  134,25 (C7 e C 8);  $\delta$  130,1 (C3 e C4);  $\delta$  123,48 (C5');  $\delta$  129,25 (C3')  $\delta$  134,05 (C2');  $\delta$  128,63 (C6 e C9);  $\delta$  123,64 (C4');  $\delta$  129,48 (C6');  $\delta$  62,52 (C1'').



Espectro 39: Espectro no infravermelho do intermediário 19 (Pastilha de KBr)



Espectro 40: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) do intermediário 19 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

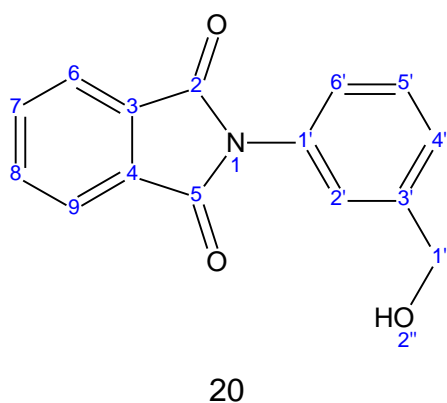


Espectro 41: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do intermediário 19 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

#### 8.7.2 – Síntese do 2-[3-(hidroximetil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (20)

O intermediário regiosômero meta foi obtido como um sólido cristalino amarelo, com rendimento de 82% e faixa de fusão: 149°-151°C.

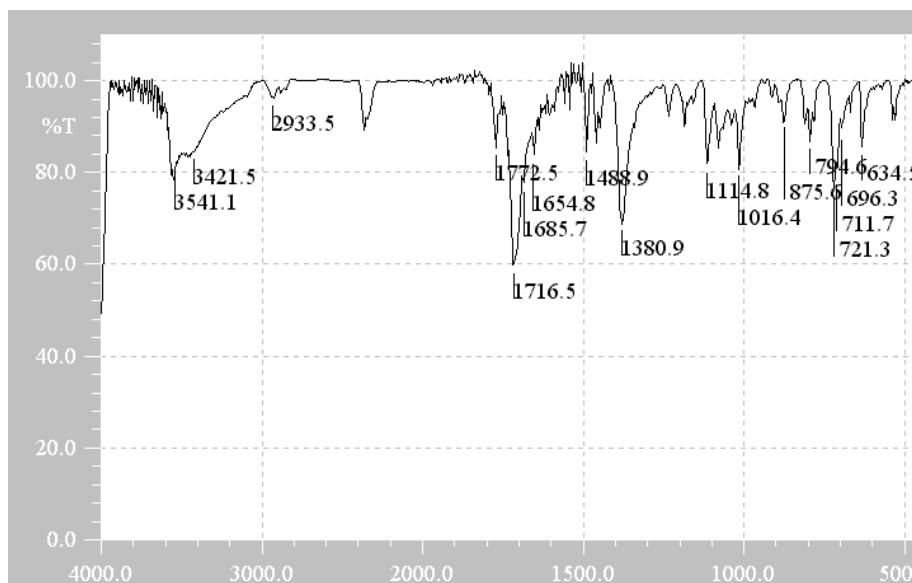
Identificação estrutural:



Infravermelho intermediário 20 (pastilha de KBr) :  $\nu$  O-H =  $3541\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2933\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1772\text{ cm}^{-1}$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1654\text{ cm}^{-1}$  e  $1488\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1381\text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta$  O-H  $1039\text{ cm}^{-1}$ .

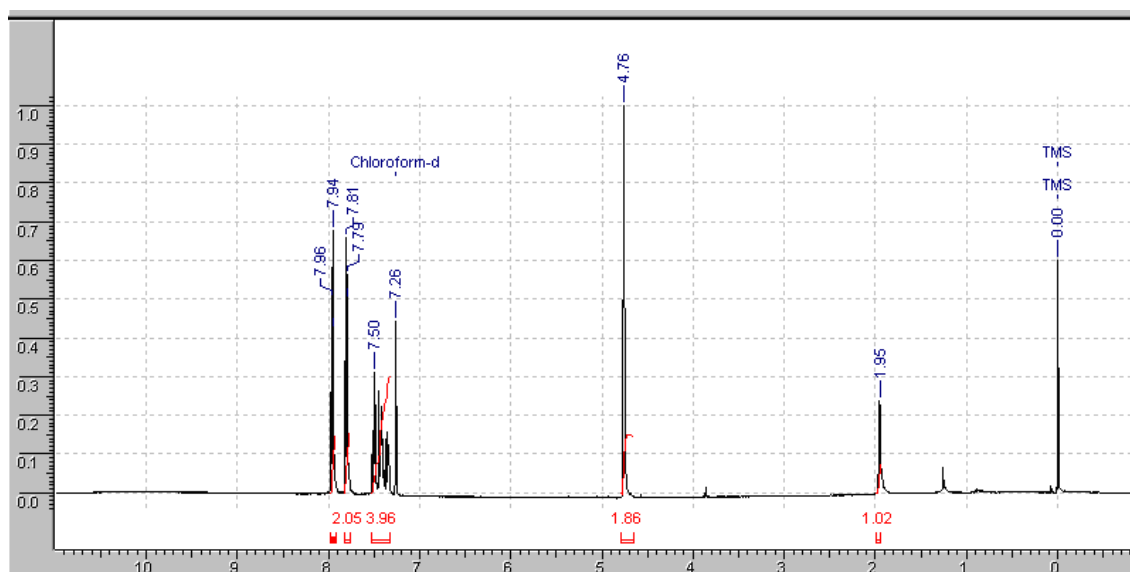
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,94 (2H; dd, H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 8,43\text{ Hz}$ ;  $J_{\text{meta}} = 2,21\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,78 (2H; dd, H7 e H8;  $J_{\text{orto}} = 8,43\text{ Hz}$ ;  $J_{\text{meta}} = 2,21\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,49 (1H; d, H 2');  $\delta$  7,41 (2H; dd, H6';  $J_{\text{orto}} = 7,6\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,37 (H4' e H5');  $\delta$  4,76 (2H; s, H1").

RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166,96 (C2 e C5);  $\delta$  141,96 (C1');  $\delta$  123,45 (C7 e C8);  $\delta$  131,5 (C3 e C4);  $\delta$  125,41 (C5');  $\delta$  116,87 (C4');  $\delta$  126,33 (C6');  $\delta$  134,12 (C6 e C9);  $\delta$  132,0 (C3');  $\delta$  128,97 (C2');  $\delta$  64,43 (C1").

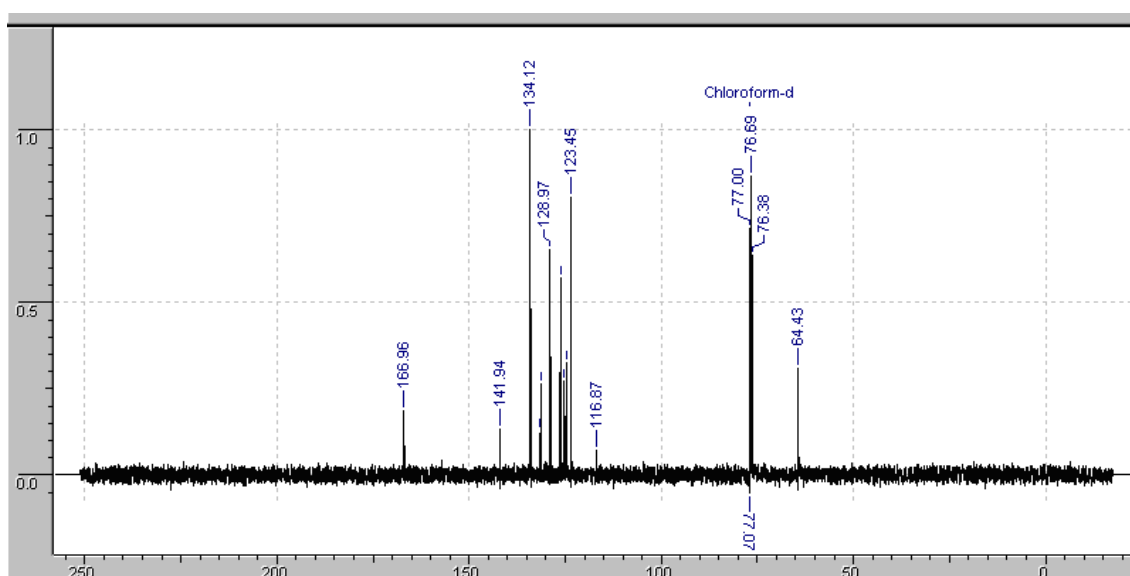


Espectro 42: Espectro no infravermelho do intermediário 20 (Pastilha de KBr).





Espectro 43: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) do intermediário 20 ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

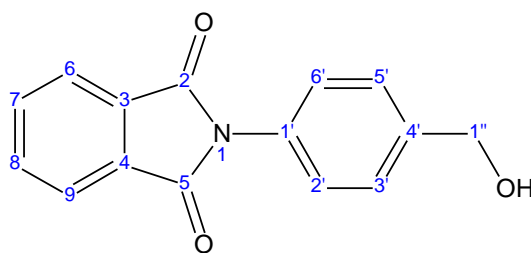


Espectro 44: Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do intermediário 20 em ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

#### 8.7.3 – Síntese do 2-[4-(hidroximetil)fenil]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (21)

O intermediário regioisômero para foi obtido como um sólido cristalino amarelo, com rendimento de 51% e faixa de fusão: °C.

Identificação estrutural:

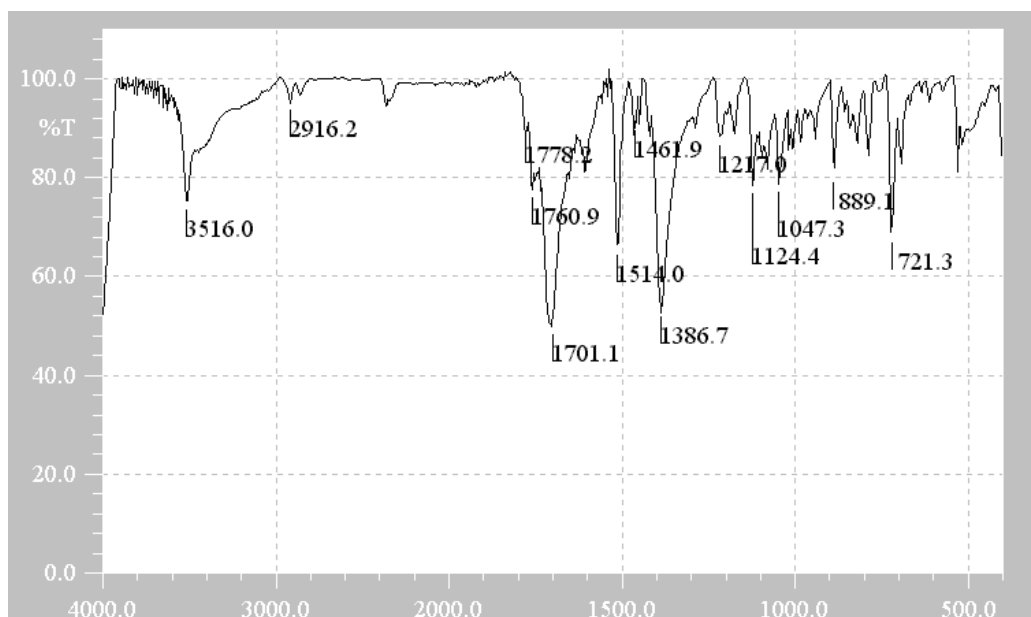


21

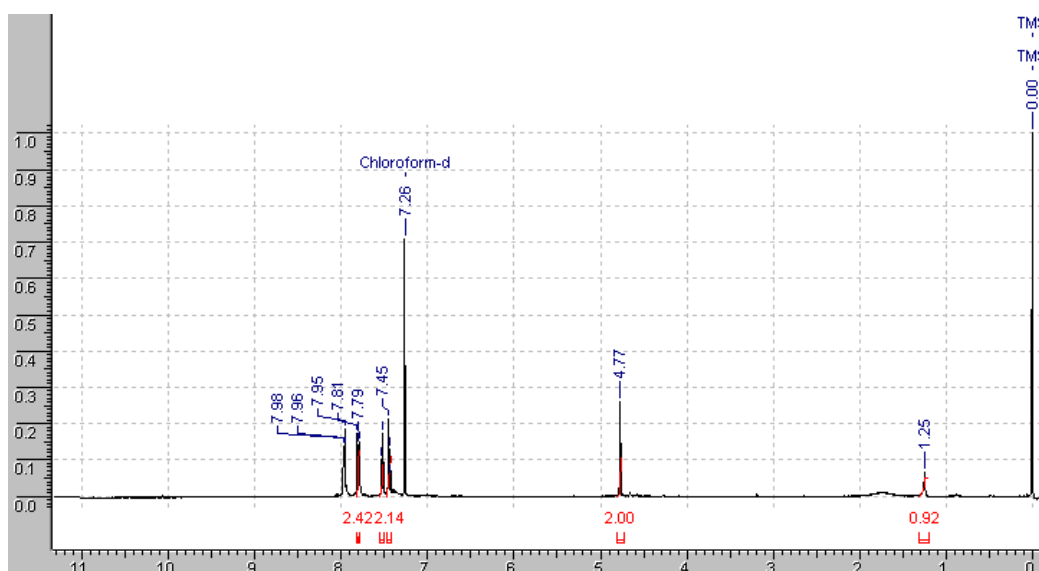
Infravermelho intermediário 21 (pastilha de KBr) :  $\nu$  O-H =  $3516\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2916\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1768\text{ cm}^{-1}$  e  $1701\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1461\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1386\text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3$ d):  $\delta$  7,99 (2H; dd, H6 e H9;  $J_{\text{orto}}=8,57\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}}=2,36\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,80 (2H; dd, H7 e H8;  $J_{\text{orto}} = 8,58\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,37\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,52 (2H; d, H2' e H6';  $J_{\text{orto}} = 8,58\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 1,92\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,44 (2H; d, H3' e H5';  $J_{\text{orto}} = 8,47\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 1,88\text{ Hz}$ );  $\delta$  4,77 (2H; s, H1'').

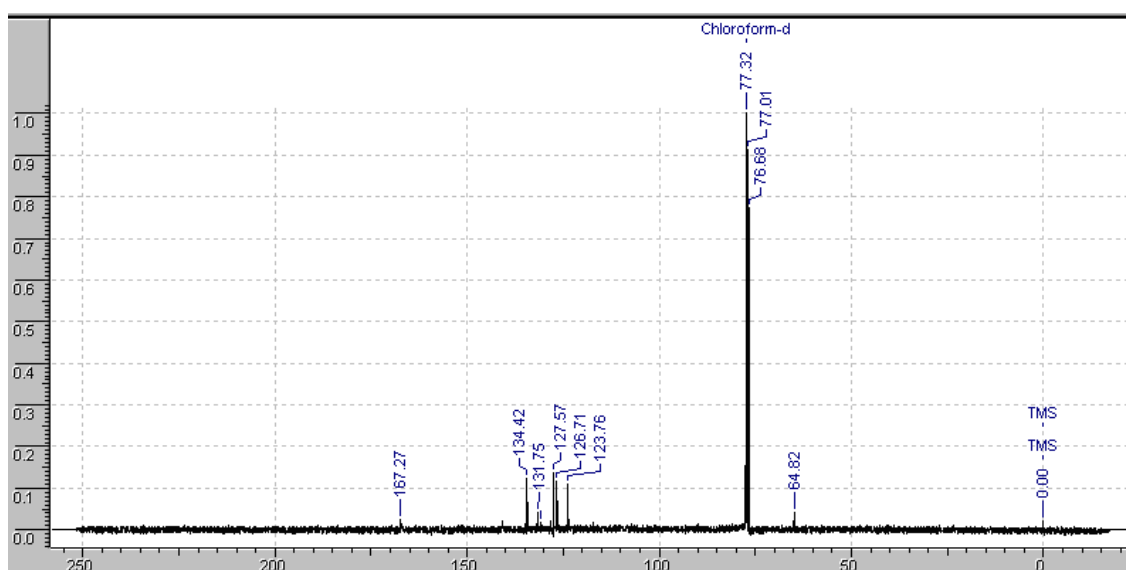
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ d):  $\delta$  167,27 (C2 e C5);  $\delta$  140,9 (C4');  $\delta$  134,42 (C7 e C8);  $\delta$  128,25 (C1');  $\delta$  131,75 (C3 e C4);  $\delta$  127,57 (C6 e C9);  $\delta$  123,73 (C3' e C5');  $\delta$  126,71 (C2' e C6');  $\delta$  64,82 (C1'').



Espectro 45: Espectro de infravermelho do intermediário 21 (Pastilha de KBr).



Espectro 46: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do intermediário 21 ( $\text{CDCl}_3d$ ; 400 MHz).



Espectro 47: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $\text{C}^{13}$ ) do intermediário 21 ( $\text{CDCl}_3d$ ; 400 MHz)

### 8.8 - Síntese dos regioisômeros nitratos – compostos finais

Seguindo a metodologia que usa ácido nítrico/anidrido acético para formação de ésteres de nitrato foram obtidos os regioisômeros *meta* e *para* com ótimos rendimentos.

O regioisômero *orto* não foi identificado devido à grande quantidade de subprodutos de difícil purificação. A menor reatividade do composto *orto* pode ser explicada pelo maior impedimento estérico desse regioisômero.

O mecanismo reacional para formação dos compostos nitratos já foi discutido nos esquemas 14, 15 e 16.

Os espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ) e carbono (RMN  $C^{13}$ ) dos intermediários são muito semelhantes, por isso serão discutidos juntos, a seguir.

Os acompanhamentos reacionais por CCD e as diferenças nas faixas de fusão observadas entre os reagentes e os produtos formados indicaram a obtenção de novos intermediários, obtidos com rendimentos superiores a 88%.

Nos espectros no infravermelho (Espectros 48, 49, 52 e 53) se pode observar os estiramentos axiais da ligação O-NO<sub>2</sub> em 1620 cm<sup>-1</sup> e 1279 cm<sup>-1</sup> no composto III, e 1610 cm<sup>-1</sup> e 1282 cm<sup>-1</sup> no composto V. Os estiramentos axiais da ligação O-H estão ausentes nos compostos obtidos, demonstrando que houve formação de éster de nitrato desejado. Os estiramentos axiais da carbonila da imida em aproximadamente 1782 cm<sup>-1</sup> e 1701 cm<sup>-1</sup> indicando a presença do anel ftalimídico. Os espectros 49 e 53 são sobreposições dos reagentes com os produtos novos formados e através dele estas modificações estruturais realizadas podem ser evidenciadas.

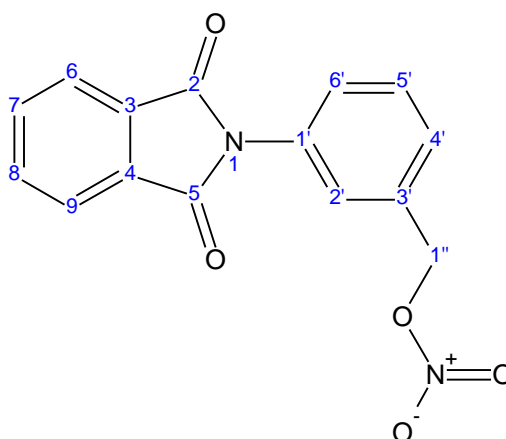
Nos espectros 50 e 54 de ressonância magnética nuclear de hidrogênio se observa que as integrações são coerentes às estruturas propostas. A diferença fundamental observada na região de  $\delta$  7,0 a  $\delta$  8,0 entre os diferentes espectros diz respeito ao padrão de substituição aromática, levando as multiplicidades diferentes desses hidrogênios. Os hidrogênios 1" podem ser visualizados na região de  $\delta$  5,5 nos compostos III e V, mas "desprotegido" que o  $\delta$  4,7 observado no reagente, devido ao efeito indutivo do grupamento nitrato,

mais eletronegativo que a hidroxila. Esse mesmo efeito é observado no espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (Espectros 51 e 55).

A identificação estrutural detalhada de cada um desses regioisômeros encontra-se a seguir.

#### 8.8.1 – Síntese do 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzil nitrato

Identificação estrutural:

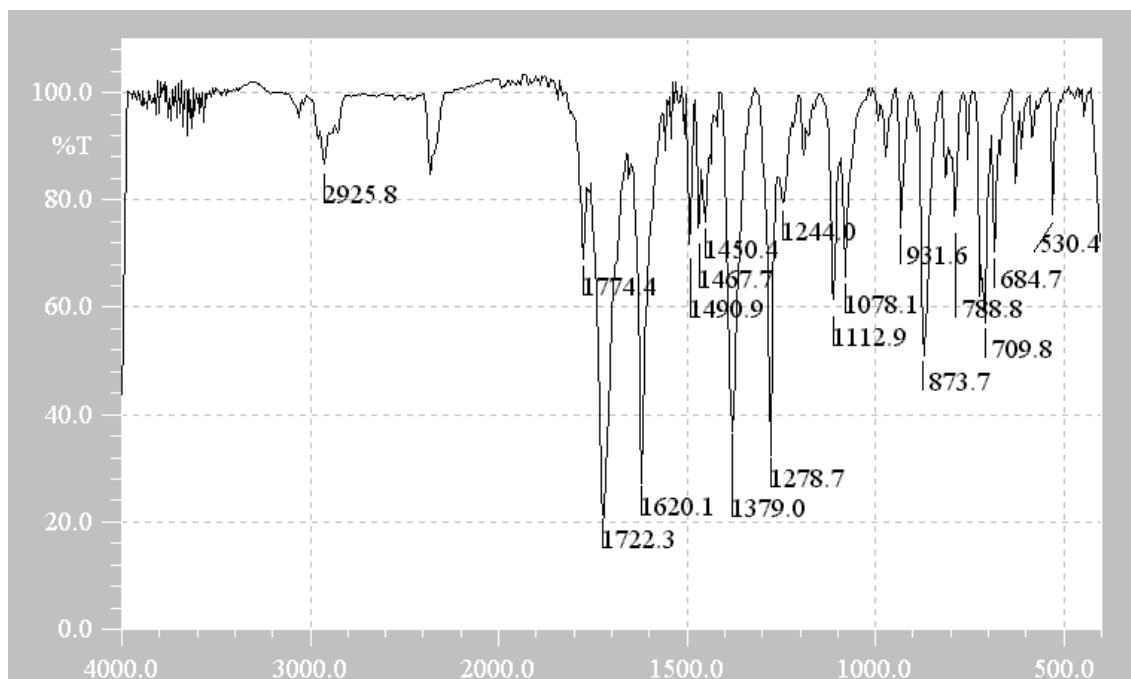


COMPOSTO III

Infravermelho COMPOSTO III (pastilha de KBr) :  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2926\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1774\text{ cm}^{-1}$  e  $1722\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1490\text{ cm}^{-1}$ ,  $1488\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  O- $\text{NO}_2$  =  $1620$  e  $1279\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1379\text{ cm}^{-1}$ .

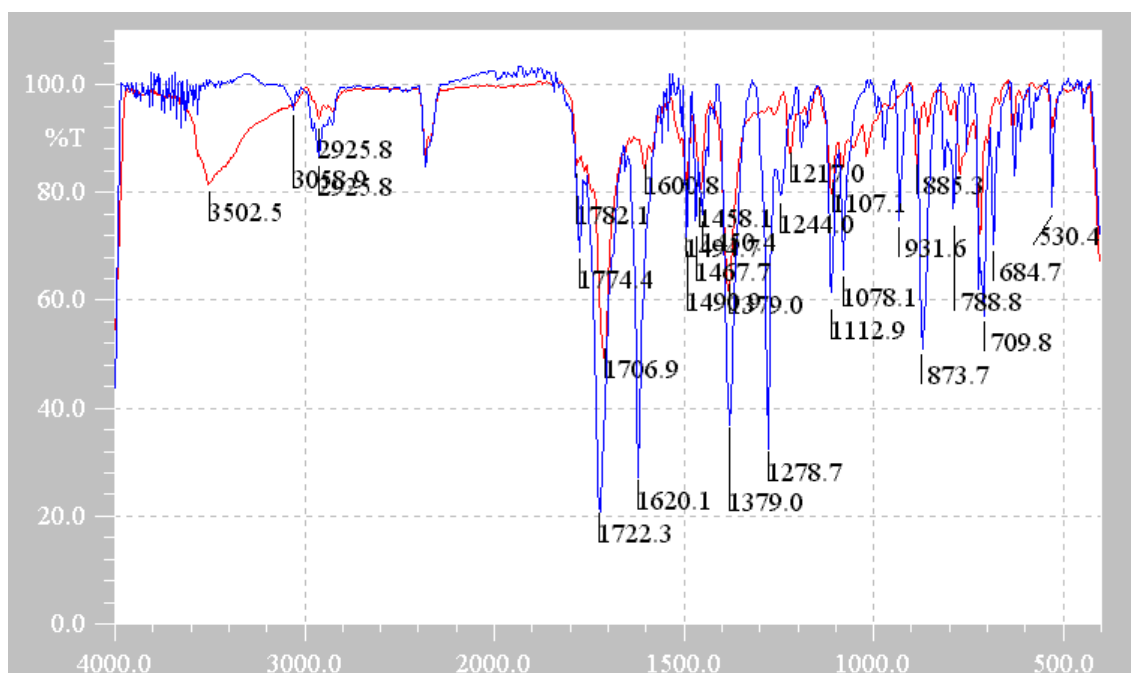
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  7,98 (2H; dd, H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 8,15\text{ Hz}$ ;  $J_{\text{meta}} = 2,15\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,82 (2H; dd, H7 e H8;  $J_{\text{orto}} = 8,16\text{ Hz}$ ;  $J_{\text{meta}} = 2,13\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,57 (1H; d, H2');  $\delta$  7,53 (1H; dd, H5'  $J_{\text{orto}} = 7,8\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,55 (1H; d, H6');  $\delta$  7,45 (1H; d, H4');  $\delta$  5,5 (2H; s, H1'').

RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3d$ ):  $\delta$  167 (C2 e C5);  $\delta$  124,11 (C7 e C8);  $\delta$  133,71 (C1');  $\delta$  131,5 (C3 e C4);  $\delta$  127,6 (C5');  $\delta$  127,03 (C4');  $\delta$  128,97 (C6');  $\delta$  134,8 (C6 e C9);  $\delta$  132,52 (C3');  $\delta$  129,88 (C2');  $\delta$  74,18 (C1'').

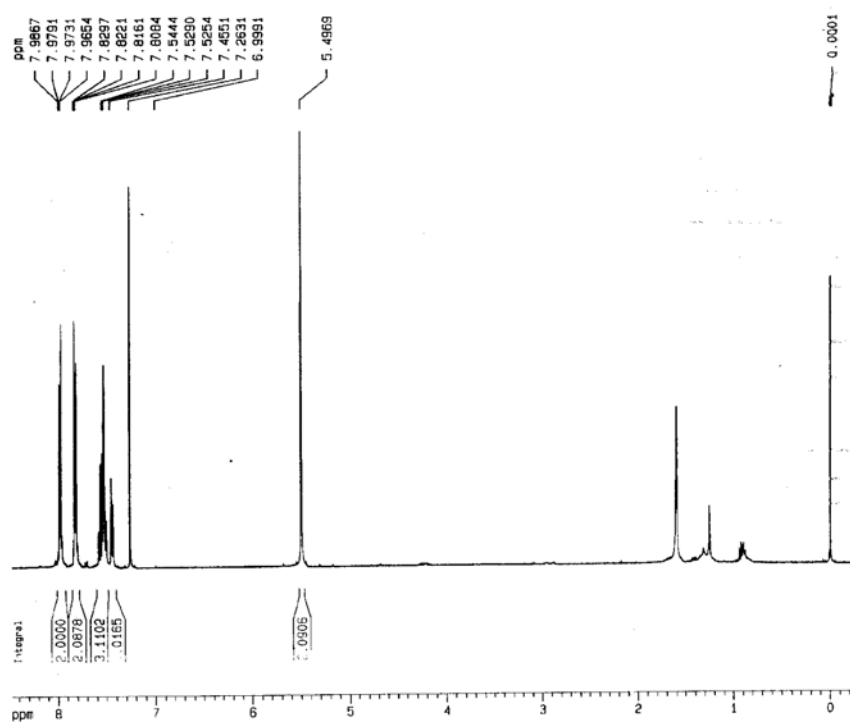


Espectro 48: Espectro no infravermelho do COMPOSTO III (Pastilha KBr).

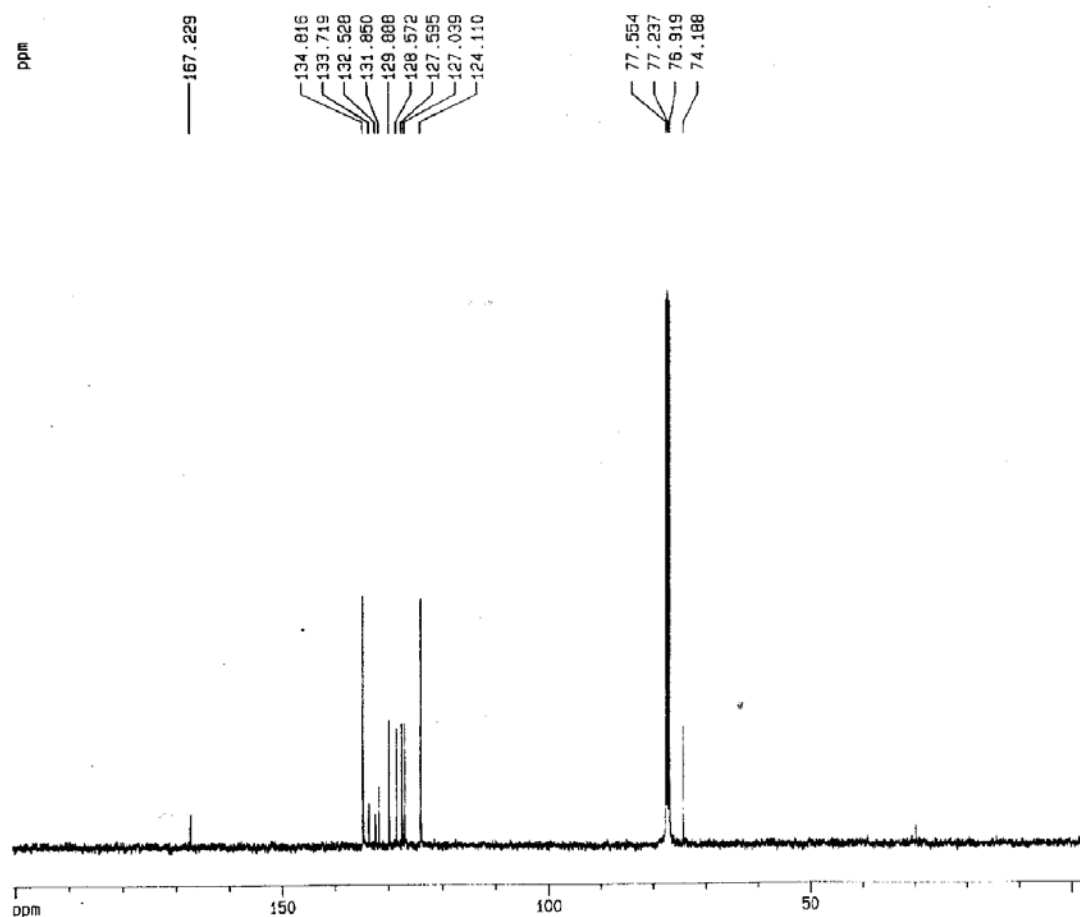
O espectro 49 mostra a sobreposição dos espectros do intermediário hidroxilado (20) em vermelho, e do COMPOSTO III em azul, destacando a ausência do estiramento axial O-H e a presença dos estiramentos axiais O-NO<sub>2</sub>, no produto final.



Espectro 49: Espectro no infravermelho do composto III (azul) sobreposto ao intermediários hidroxilado (20) (vermelho) (Pastilha de KBr).

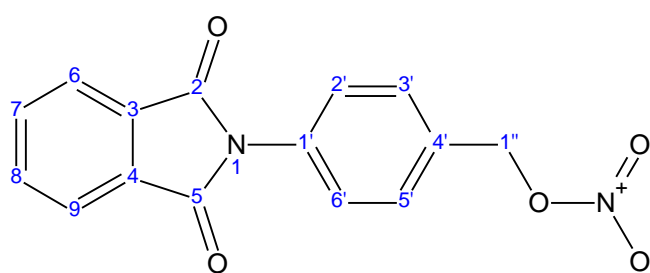


Espectro 50: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do composto III ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).



Espectro 51: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do composto III ( $CDCl_3d$ ; 400 MHz).

#### 8.8.2 – Síntese do 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzil nitrato



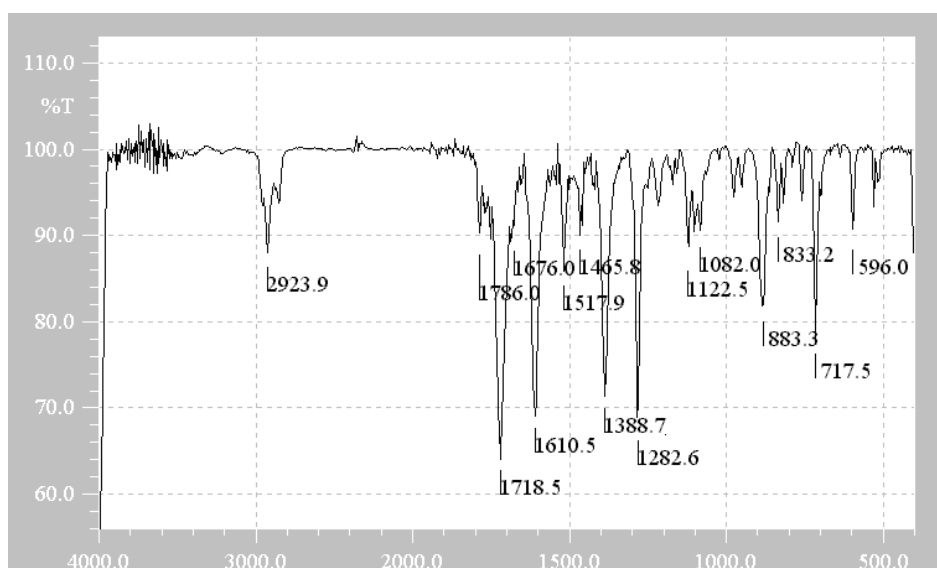
COMPOSTO V



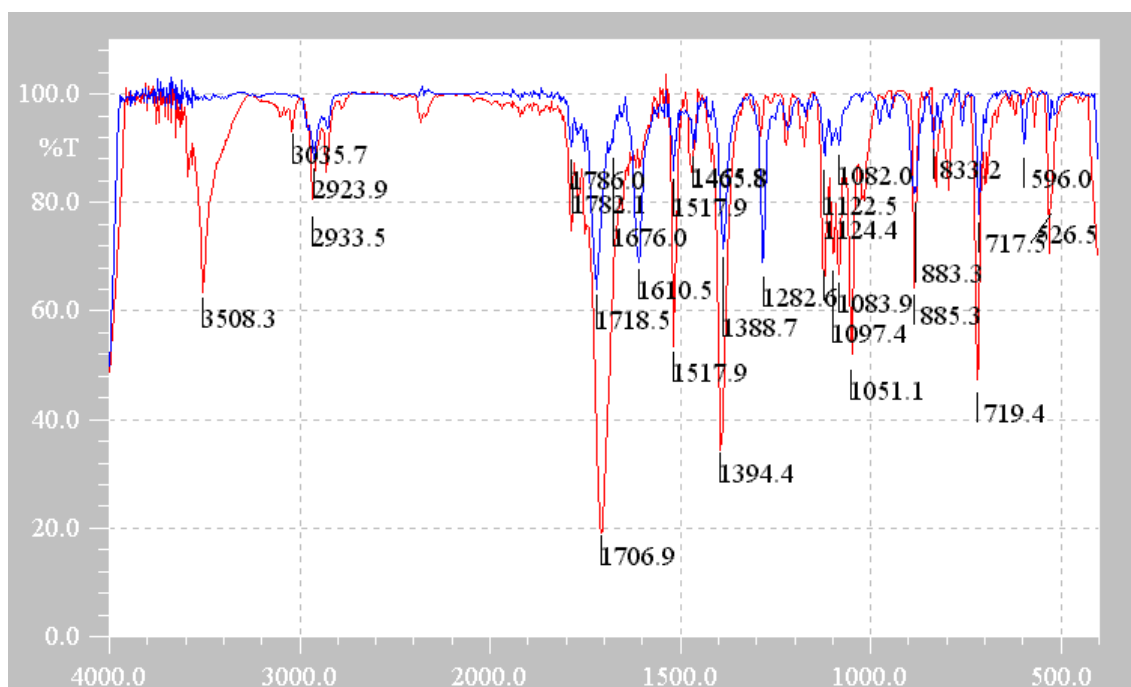
Infravermelho COMPOSTO V (pastilha de KBr) :  $\nu$  C-H aromático =  $3066\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-H  $\text{CH}_2$  =  $2924\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=O simétrico e assimétrico de C=O conjugada =  $1786\text{ cm}^{-1}$  e  $1718\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  O- $\text{NO}_2$  =  $1620$  e  $1279\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C=C aromático =  $1517\text{ cm}^{-1}$  e  $1455\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu$  C-N-C  $1389\text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,98 (2H; dd; H6 e H9;  $J_{\text{orto}} = 8,45\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,11\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,81 (2H; dd, H7 e H8;  $J_{\text{orto}} = 8,45\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 2,16\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,49 (2H; d, H3' e H5';  $J_{\text{orto}} = 8,41\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 1,9\text{ Hz}$ );  $\delta$  7,53 (2H; d, H2' e H6';  $J_{\text{orto}} = 8,42\text{ Hz}$  e  $J_{\text{meta}} = 1,89\text{ Hz}$ );  $\delta$  5,48 (2H; s, H1'');

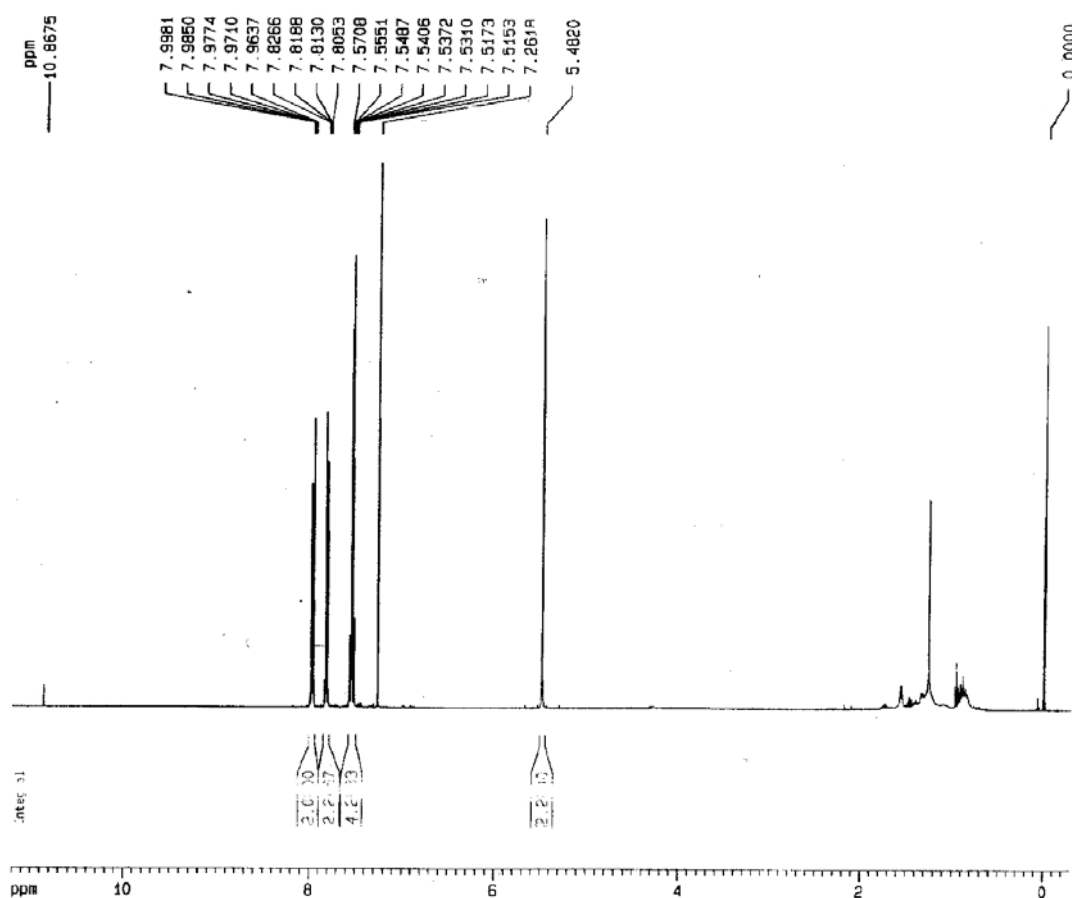
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167,22 (C2 e C5);  $\delta$  124,11 (C7 e C8);  $\delta$  133,0 (C1');  $\delta$  132,28 (C4');  $\delta$  131,86 (C3 e C4);  $\delta$  137,8 (C6 e C9);  $\delta$  126,99 (C3' e C5');  $\delta$  129,93 (C2' e C6');  $\delta$  74,15 (C1'').



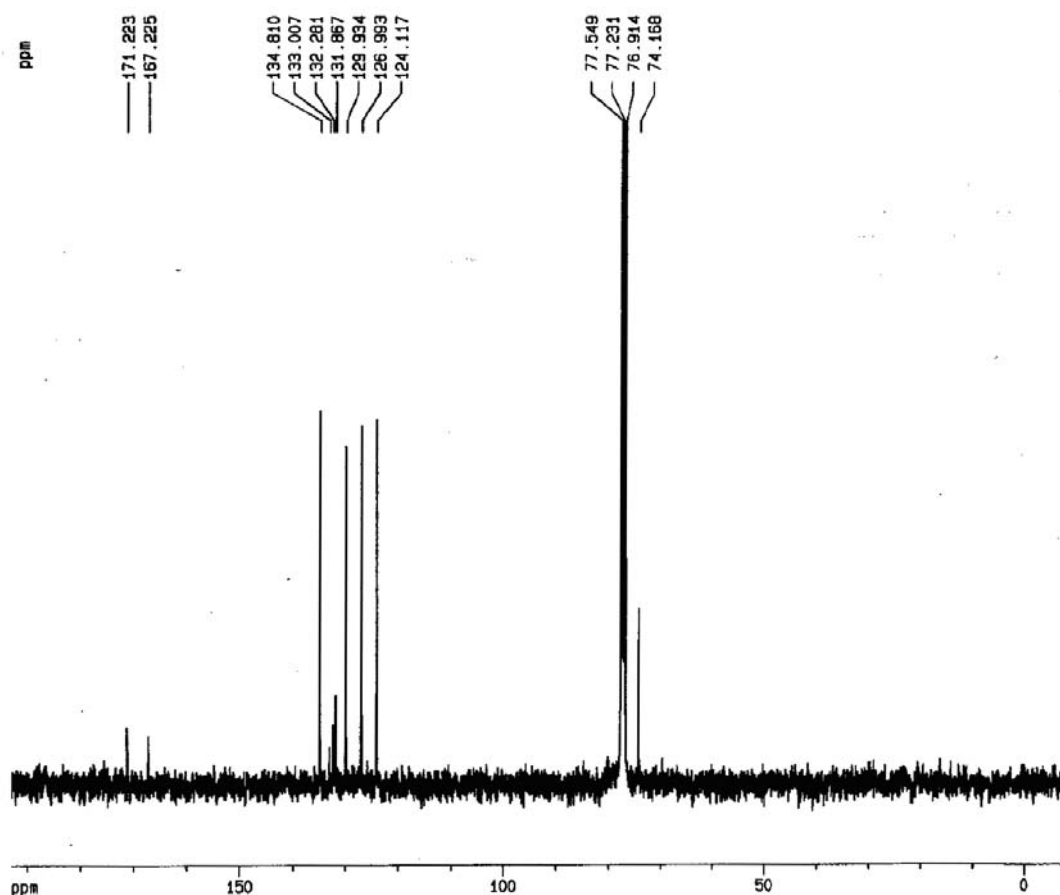
Espectro 52: Espectro no infravermelho do COMPOSTO V (Pastilha de KBr).



Espectro 53: Espectro no infravermelho do COMPOSTO V (azul) sobreposto ao intermediário hidroxilado (21) (vermelho) (Pastilha de KBr).



Espectro 54: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $\text{H}^1$ ) do COMPOSTO V ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



Espectro 55: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $C^{13}$ ) do COMPOSTO V ( $CDCl_3$ ; 400 MHz).

## 8-Testes Biológicos

### 8.1 – Ensaio de mutagenicidade (Teste de AMES)

A fim avaliar o perfil mutagênico dos compostos sintetizados foi realizado o teste de Ames, onde se pretendeu estabelecer e comparar os compostos obtidos sinteticamente com a hidroxiuréia, fármaco de escolha para o tratamento de anemia falciforme - sem relatos na literatura de mutagenicidade observada pelo teste de AMES- e talidomida que foi selecionada como fármaco protótipo das modificações moleculares (Tabelas 04, 05 e 06).

Tabela 04: Avaliação mutagênica nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) da HU, talidomida e composto I.

| Composto       | concentração | TA 100               |                     | TA 102             |                    |
|----------------|--------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|                |              | + S9                 | -S9                 | + S9               | -S9                |
| HU             | μmol/placa   |                      |                     |                    |                    |
|                | 0            | 129,3 ± 8,1          | 143 ± 4,8           | 372,3 ± 20,5       | 370 ± 17,2         |
|                | 29,25        | 178,33 ± 15,1 (1,37) | 149 ± 8,9 (1,04)    | 399 ± 31 (1,07)    | 411,3 ± 9,8 (1,11) |
|                | 58,5         | 240 ± 3 (1,85)       | 159 ± 11 (1,11)     | 484,6 ± 36 (1,3)   | 498 ± 15,3 (1,35)  |
|                | 117          | 220,7 ± 17,8 (1,7)   | 268,7 ± 13,5 (1,88) | 563,3 ± 22 (1,5)   | 602 ± 8,7 (1,63)   |
|                | 234          | 276 ± 27,7 (2,13)    | 345 ± 21,2 (2,41)   | 764,3 ± 20 (2,05)  | 799,6 ± 12 (2,16)  |
|                | 468          | 315,3 ± 16,1 (2,44)  | 358,6 ± 5,5 (2,51)  | 593 ± 23 (1,6)*    | 550 ± 7,5 (1,48)*  |
| Talidomida     | μmol/placa   |                      |                     |                    |                    |
|                | 0            | 103,7 ± 7,4          | 139 ± 9,5           | 323,3 ± 10,02      | 303,6 ± 14,5       |
|                | 0,0309       | 109,3 ± 9 (1,05)     | 145,7 ± 16,9 (1,04) | 288,7 ± 8 (0,89)   | 330 ± 17 (1,09)    |
|                | 0,155        | 121 ± 35,3 (1,16)    | 148 ± 19,1 (1,06)   | 253,7 ± 37 (0,78)  | 364 ± 14,5 (1,2)   |
|                | 0,774        | 120,7 ± 20 (1,16)    | 145 ± 12,5 (1,04)   | 341,3 ± 36 (1,05)  | 357,8 ± 21 (1,17)  |
|                | 3,87         | 104,3 ± 8,0 (1)*     | 131 ± 14,9 (0,94)*  | 258,5 ± 0,8 (0,8)* | 292 ± 22 (0,96)*   |
|                | 19,4         | 102,5 ± 31 (0,98)*   | 122 ± 9,6 (0,87)*   | 197 ± 29,6 (0,6)*  | 230 ± 5,6 (0,75)*  |
| Compostos<br>I | nmol/placa   |                      |                     |                    |                    |
|                | 0            | 129,3 ± 8,1          | 136,7 ± 12,4        | 213,5 ± 15,5       | 197,33 ± 16,01     |
|                | 7,25         | 154 ± 14,2 (1,19)    | 140,5 ± 17 (1,03)   | 298 ± 11,3 (1,4)   | 263,7 ± 15 (1,33)  |
|                | 14,5         | 155 ± 5,9 (1,19)     | 161,7 ± 11 (1,18)   | 320,8 ± 17 (1,5)   | 249,7 ± 12 (1,26)  |
|                | 29           | 140,3 ± 2 (1,08)     | 122,7 ± 3,06 (0,9)  | 385 ± 21,8 (1,8)   | 261,3 ± 20 (1,32)  |
|                | 56           | 126,3 ± 8,1 (0,97)   | 234 ± 39,5 (1,71)   | 499 ± 8,9 (2,34)   | 153 ± 21 (0,77)*   |
|                | 112          | 133,3 ± 11 (1,03)    | 335 ± 15,7 (2,45)   | 351,2 ± 12 (1,64)* | 141 ± 18 (0,71)*   |

\* morte celular

Tabela 05: Avaliação mutagênica nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) dos compostos II, III e IV.

| concentração |            | TA 100           |                    | TA 102          |                 |
|--------------|------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| COMPOSTO     |            | +S9              | -S9                | +S9             | -S9             |
| II           | μmol/placa |                  |                    |                 |                 |
|              | 0          | 104 ± 7,4        | 115 ± 13,2         | 219 ± 8,9       | 323 ± 10,2      |
|              | 0,01       | 354± 6,9(3,4)    | 171 ± 48,9 (1,49)  | 249±11,7 (1,13) | 394±30 (1,22)   |
|              | 0,021      | 335±10,8(3,22)   | 200 ± 23,3 (1,74)  | 269±10,6 (1,22) | 452±23 (1,55)   |
|              | 0,042      | 397 ± 25,9 (3,8) | 223 ± 45,04 (1,94) | 239±22,5 (1,09) | 502±14 (1,25)   |
|              | 0,085      | 395 ± 40,2 (3,8) | 206 ± 30,2 (1,8)   | 247±21,4 (1,12) | 405±24 (1,34)   |
|              | 0,17       | 261 ± 11 (2,5)*  | 165 ±11,1 (1,43)*  | 214±32 (0,97)*  | 433±35,4(1,54)  |
| III          | μmol/placa |                  |                    |                 |                 |
|              | 0          | 129 ± 8,1        | 179 ± 8,72         | 372 ± 27,5      | 254,7±14,6      |
|              | 0,224      | 165±13,2 (1,27)  | 216,7±10,2 (1,21)  | 272±26 (0,73)   | 281±25 (1,10)   |
|              | 0,488      | 153±13,1 (1,18)  | 224,5±24,6 (1,25)  | 378± 6,1 (1,01) | 286±4,2 (1,12)  |
|              | 0,896      | 146± 5 (1,12)    | 266,3±8,4 (1,48)   | 405±11 (1,09)   | 303±9,2 (1,19)  |
|              | 1,8        | 163±22,5 (1,26)  | 239,7±11,3 (1,34)  | 399,3±40 (1,07) | 395,7± 9 (1,55) |
|              | 3,58       | 158,3±9,3(1,22)  | 323,7±10,2 (1,8)   | 431±17,9 (1,15) | 387±9,7 (1,52)  |
| IV           | μmol/placa |                  |                    |                 |                 |
|              | 0          | 129,3±8,14       | 146,7 ± 12,1       | 372,3±27,5      | 197,3±16,1      |
|              | 0,98       | 160±12,4 (1,24)  | 146,3 ± 5,1 (0,99) | 385±33,1 (1,03) | 222±12 (1,12)   |
|              | 1,96       | 175,7± 2 (1,36)  | 180,5 ± 7,8 (1,23) | 323±5,54 (0,87) | 241±13 (1,22)   |
|              | 3,92       | 185,3±15 (1,43)  | 179 ± 11,3 (1,22)  | 423,7±22 (1,13) | 251±19,2(1,27)  |
|              | 7,85       | 206±13,6 (1,59)  | 172,7±12,5 (1,17)  | 387±14,4 (1,03) | 232±13,1(1,17)  |
|              | 15,7       | 354± 6,5 (2,74)  | 175 ± 2,8 (1,19)   | 300±4,9 (0,8)*  | 210±23 (1,06)   |

\* morte celular

Tabela 06: Avaliação mutagênica nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) dos compostos V e VI.

| COMPOSTO | concentração | TA 100           |                  | TA 102          |                   |
|----------|--------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
|          |              | +S9              | -S9              | +S9             | -S9               |
| V        | μmol/placa   |                  |                  |                 |                   |
|          | 0            | 129,3±8,1        | 179 ± 8,7        | 372,3 ± 27,5    | 260,1 ± 11,6      |
|          | 0,224        | 157±13 (1,21)    | 228 ± 18 (1,27)  | 405,7±13 (1,09) | 340,3±9,7 (1,31)  |
|          | 0,488        | 184,7±16 (1,42)  | 239±11,5 (1,33)  | 434,7±21 (1,16) | 373,5±21 (1,43)   |
|          | 0,896        | 216,7± 18 (1,67) | 231±20,2 (1,29)  | 370 ± 6 (0,99)  | 391,2 ± 6,3 (1,5) |
|          | 1,8          | 192,7±16 (1,49)  | 212,3±17 (1,18)  | 397,3±9,3(1,06) | 486,8±20 (1,87)   |
|          | 3,58         | 263± 12,3 (2,03) | 349 ± 5,6 (1,94) | 427,3±5 (1,14)  | 420±8,6 (1,62)*   |
| VI       | μmol/placa   |                  |                  |                 |                   |
|          | 0            | 129,3± 8,1       | 136,7±12,4       | 372,3±27,5      | 197,3 ± 16,1      |
|          | 0,12         | 363± 25,2 (2,8)  | 143,3 ± 5 (1,04) | 335,3±11 (0,9)  | 256±6,9 (1,29)    |
|          | 0,25         | 478,7±4,22 (3,7) | 135,3±12 (0,99)  | 295,3±28 (0,8)  | 262±19,1 (1,32)   |
|          | 0,5          | 628±40,8 (4,86)  | 136,3±13 (0,99)  | 406±14,1 (1,09) | 266,7±18 (1,35)   |
|          | 1            | 739±25,4 (5,72)  | 121,5±14 (0,89)  | 465±10,6 (1,25) | 265,7±10 (1,34)   |
|          | 2            | 750± 13,6 (5,79) | 177±23,6 (1,30)  | 447±19,8 (1,2)  | 201±4,7 (1,02)*   |

\*morte celular

### 8.1.1 – Hidroxiuréia (HU)

Há poucos relatos sobre o potencial carcinogênico e mutagênico de HU. Na literatura encontra-se como ensaio para HU o teste do cometa (LIMA *et al* 2003), entretanto, não foi encontrado relatos da avaliação mutagênica de HU através do teste de AMES que é um dos testes recomendados para avaliação mutagênica de compostos.

Foram então realizados vários experimentos usando HU em diferentes concentrações, na ausência e presença de ativação metabólica (S9), onde foi possível observar indícios de mutagênese no intervalo de concentração de 84 a 468 μmol. Na figura 08 e na tabela 02 podemos visualizar o aumento do número de revertentes/placa com o aumento da concentração de HU. Essa concentração utilizada encontrava-se no limite de solubilidade de HU no solvente utilizado (DMSO).

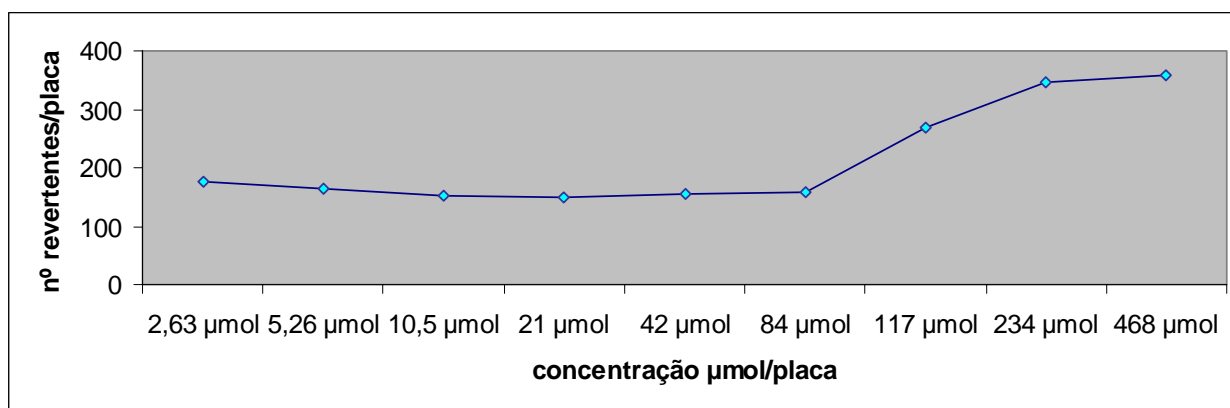


Figura 08: Atividade mutagênica expressa pela média do número de revertentes / placa da hidroxiuréia (HU), utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA100 na ausência de ativação metabólica (-S9) nas concentrações de 2,63-468 µmol/placa

Conforme podemos visualizar na tabela 04, a HU apresenta indícios de mutagenicidade a partir da concentração de 117 µmol/placa. Na concentração de 234 µmol/placa no entanto, observa-se valores de RM superiores a 2, indicando mutagenicidade nas linhagens TA 100 e TA 102, na presença e ausência de ativação metabólica. O mesmo pode ser observado para a linhagem TA 100 na concentração de 468 µmol/placa presença e ausência de S9. Quando analisamos a linhagem TA 102 nessa mesma concentração, observamos uma redução do número de revertentes, consequência da toxicidade causada pela HU.

Esses resultados indicam que HU apresenta potencial mutagênico, confirmado pelo ensaio de AMES, embora as concentrações utilizadas estejam elevadas quando comparado aos demais compostos. O provável mecanismo de mutação causado por HU parece não ser tão sensivelmente detectado pelo teste de AMES, ao contrário do que se observa no teste do cometa (LIMA *et al* 2003).



### 8.1.2 – Talidomida

O efeito teratogênico da talidomida é bem conhecido. No entanto, há diversas controvérsias sobre seu efeito mutagênico. Recentemente, foi relatado na literatura, que a talidomida era isenta de atividade mutagênica, quando avaliada no teste de AMES. Entretanto, alguns estudos apontavam uma possível mutagênese e/ou carcinogênese em outros testes (ASHBY *et al* 1997).

Foi estudada uma série de derivados da talidomida e possíveis metabólitos para avaliação no teste de AMES, e constatou-se que embora a talidomida não apresentasse mutagenese, alguns de seus metabólitos apresentavam. Dentre os análogos avaliados os derivados contendo ácido hidroxâmico, ou a subunidade hidroxilamínica foram preditos mutagênicos. No entanto, desconhece-se a presença desses compostos como metabólitos da talidomida em humanos (ZHU *et al* 1999).

A concentração utilizada foi baseada nos dados da literatura, em que foram utilizadas as linhagens TA 98 e TA 100, na presença e ausência de S9. ASHBY e colaboradores relataram que a talidomida não apresentava mutagenicidade nem quando se aumentava a concentração de S9 à 4% , 10% e 30% (ASHBY *et al* 1997).

Dessa forma, avaliamos a talidomida, utilizada como protótipo à modificação molecular, no teste de AMES, a fim de evidenciar a real atividade mutagênica do fármaco na linhagens TA 100 e TA 102, na presença e na ausência de S9 (Tabela 04).

A maior razão de mutagenicidade foi de 1,16 e 1,06 para TA100, com e sem ativação metabólica respectivamente, na concentração de 0,155  $\mu\text{mol/placa}$  (40  $\mu\text{g/placa}$ ).

Para a linhagem TA 102, a maior razão de mutagenicidade foi de 1,05 com ativação metabólica na concentração de 0,774  $\mu\text{mol/placa}$  (200  $\mu\text{g/placa}$ ), e de 1,17 sem ativação metabólica, na concentração de 0,774  $\mu\text{mol/placa}$  (40  $\mu\text{g/placa}$ ).

Pode-se observar uma diminuição do número de revertentes na concentração de 19,4  $\mu\text{mol/placa}$  (5000  $\mu\text{g/placa}$ ), isso ocorre porque a alta concentração de talidomida causa toxicidade às células, levando a uma diminuição do número de revertentes.

Pelos resultados obtidos, observamos que a talidomida não apresentava atividade mutagênica no teste de AMES. Isso já era descrito na literatura para a linhagem TA 100, no entanto, não havia relatos para a linhagem TA102, onde a talidomida também não apresentou atividade mutagênica.

#### 8.1.3 – Compostos sintetizados

Foram avaliados no teste de AMES os compostos sintetizados, visualizados na figura 09.

Cada um desses compostos apresentou um diferente potencial mutagênico, embora sejam análogos estruturais. Por isso, para cada um deles foi encontrado o intervalo de concentração que causa um aumento no número de revertentes, e que não apresenta toxicidade às células.

Essa concentração que é característica para cada composto foi utilizada na avaliação do potencial mutagênico dos compostos.

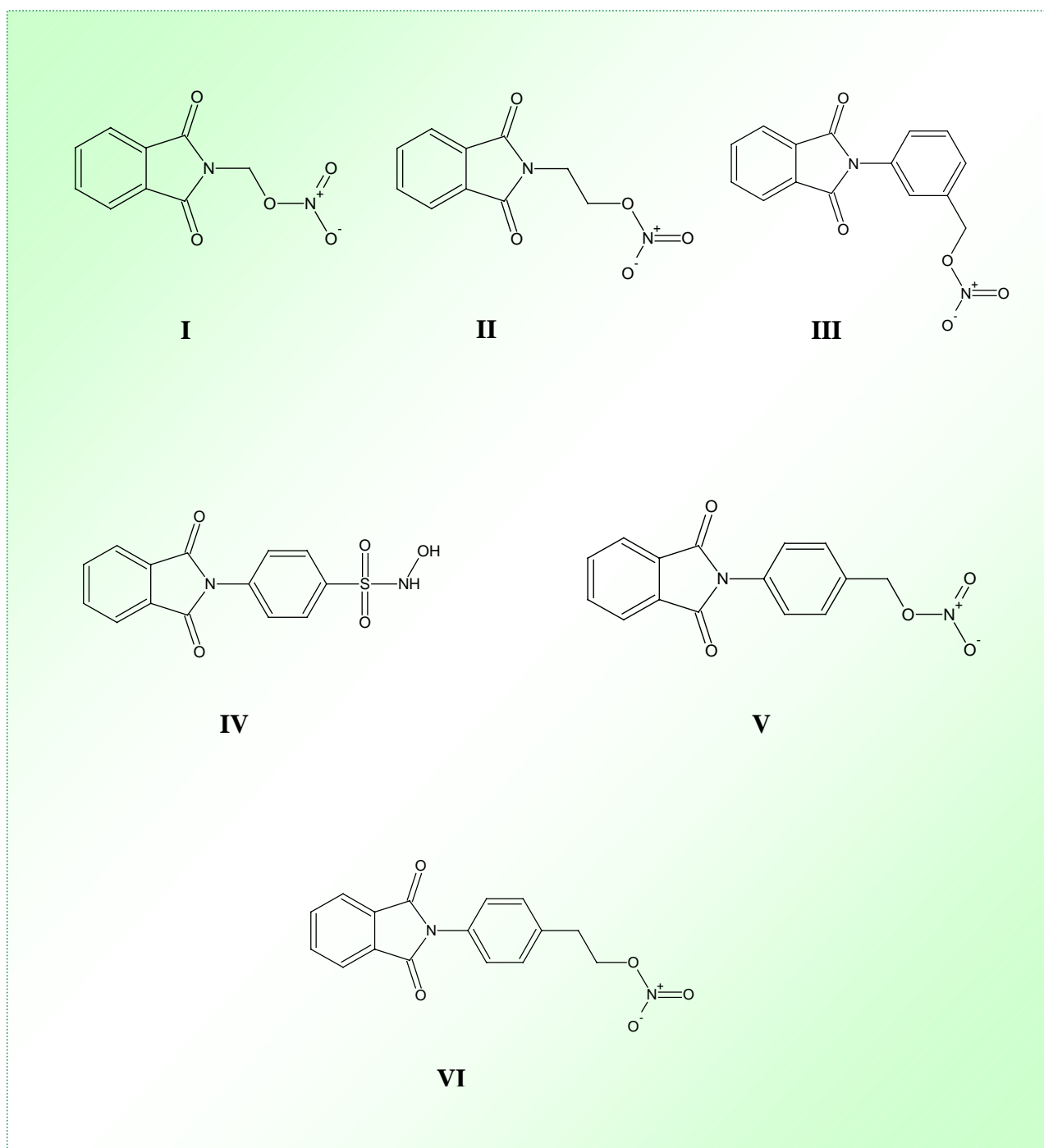


Figura 09: Compostos sintetizados que foram avaliados no teste de AMES

O composto I apresentou razões de mutagenicidade (RM) de 2,45 e 2,34; na linhagem TA100, na ausência de ativação metabólica (112 nmol/placa), e na linhagem TA102, na presença de ativação metabólica (56 nmol/placa), respectivamente. Em concentrações superiores a 56 nmol na

TA102 (+S9), observa-se toxicidade, com diminuição do número de revertentes por placa (Tabela 04). O composto I (Figura 09) é um derivado alquílico que apresenta carbono metilênico reativo, ou seja, o átomo de carbono apresenta uma carga parcial positiva pela retirada da densidade eletrônica por conta dos grupamentos  $\alpha$  mais eletronegativos. A presença desse carbono metilênico, favorece o ataque por bionucleófilos, levando à eliminação do nitrato, que rapidamente se decompõe em uma espécie radicalar gerando uma série de efeitos deletérios no DNA do procarioto, que não possui um sistema reparador tão eficiente quanto dos eucariotos. Ademais, pode ocorrer a adição do bionucleófilo ao carbono metilênico reativo resultando na formação de aduto covalente, modificando de forma irreversível a estrutura original do bionucleófilo em questão.

O composto II apresenta nas concentrações utilizadas, mutagenicidade na linhagem de TA100 na presença de ativação metabólica, em todas as concentrações testadas e com as seguintes razões de mutagenicidade (RM): 0,01  $\mu\text{mol}$  (3,4); 0,021  $\mu\text{mol}$  (3,22); 0,042  $\mu\text{mol}$  (3,8); 0,085  $\mu\text{mol}$  (3,8) e 0,17  $\mu\text{mol}$  (2,5) (Tabela 05). Dentre a série alquílica testada, esse foi o que apresentou maior RM. Quando se compara o composto II, com o composto I, é evidente que no primeiro há um menor impedimento ao ataque no carbono metilênico, facilitando o acesso do bionucleófilo. O impedimento no composto I é maior, devido a presença de grupamentos volumosos nas posições  $\alpha$ . Isso explicaria maior razão de mutagenicidade do composto II, e nos permite prever que os compostos metilênicos devam ser menos mutagênicos que os compostos etilênicos. Essa hipótese será confirmada quando analisarmos os compostos V e VI.

O composto III não apresentou mutagenicidade nas concentrações utilizadas, embora no ensaio com a linhagem TA100 na ausência de ativação metabólica e na concentração de 3,58  $\mu\text{mol/placa}$  apresentasse uma razão de mutagenicidade de 1,8; ou seja, indícios de mutagenicidade (Tabela 05). Quando comparamos o composto I com o composto III, observamos que esse último – derivado interfernilênico – possui menor mutagenicidade já que o indício se mostrou em apenas 3,58  $\mu\text{mol/placa}$ , enquanto no composto I, houve mutagenicidade a 112 nmol/placa com RM de 2,45 (TA100; -S9). Também, quando comparamos o composto III, com o II, observamos uma menor

mutagenicidade do derivado intefenilênico. Esses dados, nos levam a sugerir que os derivados arílicos, ou seja, aqueles que apresentassem um anel aromático ligado a subunidade ftalimídica (compostos III, IV, V e VI), apresentavam menor mutagenicidade que os derivados alquílicos, ou seja, aqueles em que a cadeia alquílica estivesse ligada diretamente a subunidade ftalimídica (I e II); corroborando a hipótese de que fatores estéricos, impeçam o acesso do bionucleófilo ao sítio reativo, modulando a mutagenicidade dos derivados sintetizados.

O composto IV é um derivado sulfonamídico (Figura 09), que não apresenta a subunidade nitrato, comum a todos os demais compostos. É relatado na literatura que derivados hidroxilamínicos, ou derivados do ácido hidroxâmico, apresentam mutagenicidade devido principalmente à grande contribuição toxicofórica dessa subunidade (ZHU *et al* 1999). Durante muito tempo, a subunidade hidroxilamínica foi apontada como um dos principais metabólitos, gerados na redução do grupo nitro, responsáveis pela atividade mutagênica de nitrocompostos (ex. cloranfenicol, metronidazol e nitrofuranos). No entanto, constatou-se que são espécies radicalares formadas em etapas anteriores a reduções que geram produtos mutagênicos, e não o derivado hidroxilamínico por si só (TOCHER, 1997).

Dessa forma, avaliou-se o composto IV, contendo a subunidade hidroxilamínica, a fim de verificar a contribuição toxicofórica dessa subunidade no composto sintetizado.

Na concentração de 15,7  $\mu\text{mol/placa}$  na linhagem de TA100, com ativação metabólica, o composto IV apresentou razão de mutagenicidade de 2,74. Acima de 15,7  $\mu\text{mol/placa}$ , há diminuição do número de revertentes por toxicidade celular. A possível mutagênese do composto IV, que só ocorre na presença de ativação metabólica, poderia ser atribuída a formação de um derivado oxidado e/ou radicalar desse composto. Quando se compara, a concentração do composto IV usado no ensaio com os derivados arílicos (III, V e VI) observa-se que embora apareça mutagênese, esta só é observada em concentrações elevadas, chegando a ser 125 vezes maior, em número de mols, àquela encontrada para o composto VI (0,12  $\mu\text{mol/placa}$ ) (Tabela 05 e 06).

O composto V apresentou na linhagem TA100, na presença de ativação metabólica e na concentração de 3,58  $\mu\text{mol/placa}$  uma razão de mutagenicidade de 2,03; enquanto na ausência de ativação metabólica, nessa mesma concentração, apresentou indícios de mutagenicidade com valores de RM iguais a 1,94. Na concentração de 1,8  $\mu\text{mol/placa}$  na ausência de S9, na linhagem TA102, apresentou indícios de mutagenicidade, com RM igual a 1,87 (Tabela 06). Quando se compara o composto V, regioisômero do composto III, observamos um discreto perfil de maior mutagenicidade e/ou indício de mutagenicidade do composto V em relação à III.

O composto VI, derivado interferilênico do composto II, apresentou na linhagem de TA100 na presença de ativação metabólica, assim como o composto II, mutagênese nas concentrações de 0,12; 0,25; 0,5; 1 e 2  $\mu\text{mol/placa}$ , com valores de RM de 2,8 ; 3,7; 4,86; 5,72 e 5,79 respectivamente (Tabela 06). Embora os valores de RM sejam maiores no composto VI em relação ao II, esse último encontra-se em menor concentração molar. A necessidade de maiores concentrações para o composto VI apresentar mutagênese confirma, em termos estruturais, o que já se havia observado entre os compostos I e III de que a presença da fenila ligada à subunidade ftalimídica diminui a mutagenicidade dos compostos.

Quando se compara o composto VI, com o composto V, ambos *para* substituídos podemos confirmar também, o visualizado entre os compostos I e II, de que o espaçamento etílico aumenta a mutagênese, quando comparado ao metílico. Conforme discutido anteriormente, esse fator deve estar relacionado além do fator eletrônico, principalmente ao fator estérico, devido ao melhor acesso por nucleófilos ao carbono  $\alpha$  ao grupamento nitrato.

Quando relacionamos os compostos obtidos, com os padrões talidomida e hidroxiuréia, observamos uma sensibilidade do teste de AMES em responder aos compostos, quando comparado com HU e talidomida. Essa observação embora sugira uma maior atividade mutagênica dos compostos sintetizados em relação aos padrões do planejamento estrutural, não pode ser conclusiva e necessita-se de mais ensaios para tal afirmação. Ademais, talidomida, HU e compostos sintetizados são estruturalmente distintos e poderiam por essa peculiaridade química apresentar perfil mutagênico diferenciado.

## 8.2 – ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA

### 8.2.1 - Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina

O ensaio é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema, e foi realizado a fim de avaliar a atividade antinflamatória dos compostos sintetizados.

Nesse ensaio foi utilizado indometacina como controle a 100  $\mu\text{mol/Kg}$ , e os compostos foram avaliados inicialmente a 300  $\mu\text{mol/Kg}$  via *i.p.* Pela figura 10, podemos observar que o composto III (Figura 09) apresenta porcentagem de inibição do edema de orelha maior que a indometacina. O composto III apresentou porcentagem de inibição em torno de 65% no ensaio realizado. Já os demais compostos apresentam uma atividade similar à indometacina, considerando o erro-padrão. Esses resultados apontam que os compostos sintetizados apresentam atividade antinflamatória na fase aguda, devido provavelmente a inibição da citocina  $\text{TNF}\alpha$ , já que se sabe que os derivados ftalimídicos possuem essa atividade.

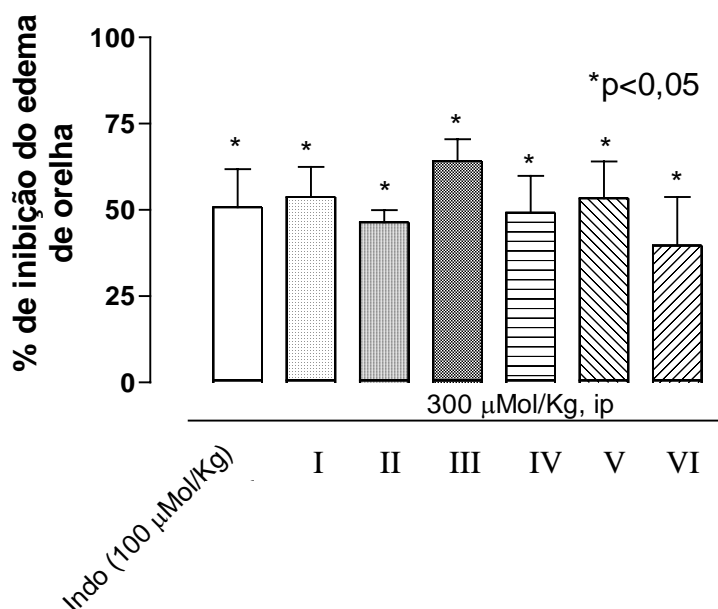


Figura 10. Efeito dos derivados (300  $\mu\text{mol/Kg}$ ), via *i.p.*, em ensaio de edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina. Os valores representam a

média e erro padrão da média de 5 animais. (\* $p < 0,05$  foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de *t* Student).

### 8.2.2 - Ensaio de peritonite

Em um segundo ensaio foi realizada a avaliação do número de leucócitos totais ( $10^6/\text{mL}$ ), afim de avaliar a capacidade de inibir a infiltração dessas células no processo inflamatório. Todos os compostos apresentaram atividade na inibição do infiltrado leucocitário (figura 11) com perfil de atividade semelhante, considerando o erro-padrão.

Esses resultados demonstram o potencial antiinflamatório desses compostos.

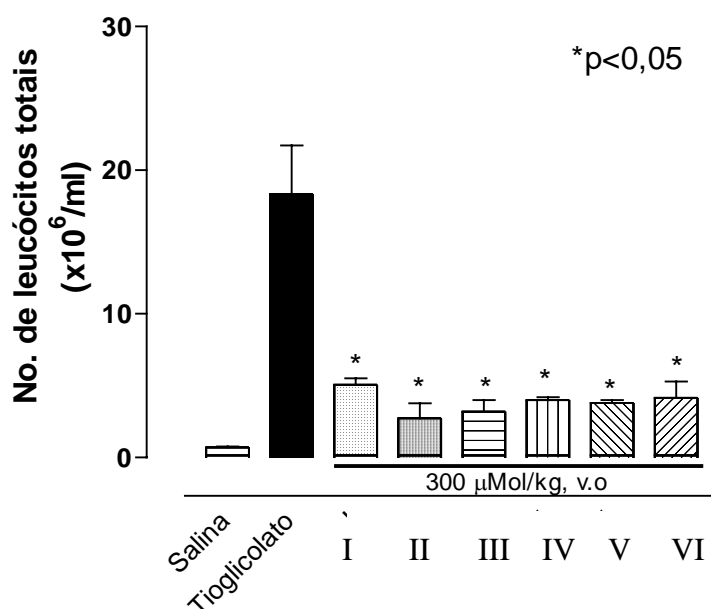


Figura 11. Efeito dos derivados (300  $\mu\text{Mol/Kg}$ ), via oral, em ensaio de peritonite induzido por tioglicolato 3% em camundongo. Os valores representam a média erro padrão da média de 4 animais. (\* $p < 0,05$  foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de *t* Student).



### 8.3 – ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE GAMA GLOBINA POR PCR EM CULTURA DE CÉLULAS K562

Esse ensaio consistiu na avaliação da expressão gênica de gama globina, por técnica de PCR Real Time, de cultura de células K562 quando tratadas com os compostos IV e VI, na presença e na ausência de diferenciação prévia com hemina.

Tem sido relatada a atividade de HU, em aumentar a expressão de gama globina, em cultura de células eritróides K562 (COKIC, 2003).

Nesse modelo a HU aumenta em duas vezes a expressão de gama globina na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , no tempo de 48 horas. (Figura 12). Maiores concentrações de HU inibiram a proliferação das células eritróides, por exemplo, a concentração de 50  $\mu\text{M}$  no 4º dia, inibiu o crescimento em 35%-40% (medido no sexto dia), e não demonstram aumento na produção de gama globina. Na figura 12, podemos visualizar o aumento da expressão de gama globina quando as células progenitoras eritróides foram tratadas com HU no 4º dia, e depois de 48 horas de incubação (COKIC, 2003).

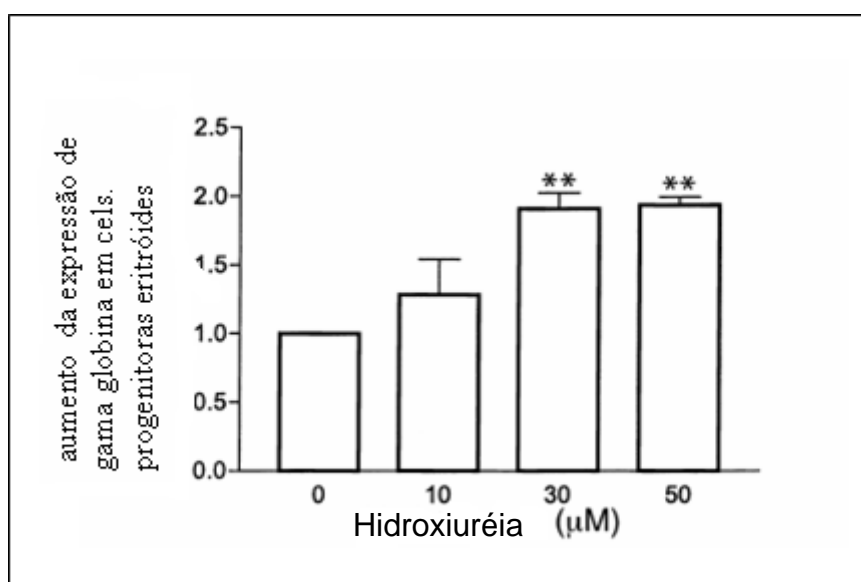


Figura 12: HU induz a expressão gênica de gama-globina em cultura de células progenitoras eritróides K562, após 48 horas do tratamento com o fármaco. (COKIC, 2003)

O composto VI foi inicialmente selecionado porque se imaginou que a subunidade etílica, menos impedida estericamente, pudesse liberar NO de uma forma mais eficiente que os compostos metílicos ou benzílicos, já que até o momento não dispúnhamos dos dados de liberação de NO. O composto IV, por sua vez, foi selecionado, por se diferenciar dos pró-fármacos nitratos, e possuir um caráter de híbrido fundido, da talidomida e da hidroxiuréia. Ademais, era o que comparativamente apresentava a menor mutagênese, e atividade nos ensaios de infiltração leucocitária e de edema de orelha induzido por capsaicina.

Todos esses experimentos foram realizados em duplicata, a fim de atestar a reprodutibilidade dos resultados.

Inicialmente, foi construída a curva dose resposta das substâncias procurando a concentração em que estas apresentavam atividade nesse modelo.

Na figura 13, observarmos a curva dose resposta do composto VI na ausência de hemina.

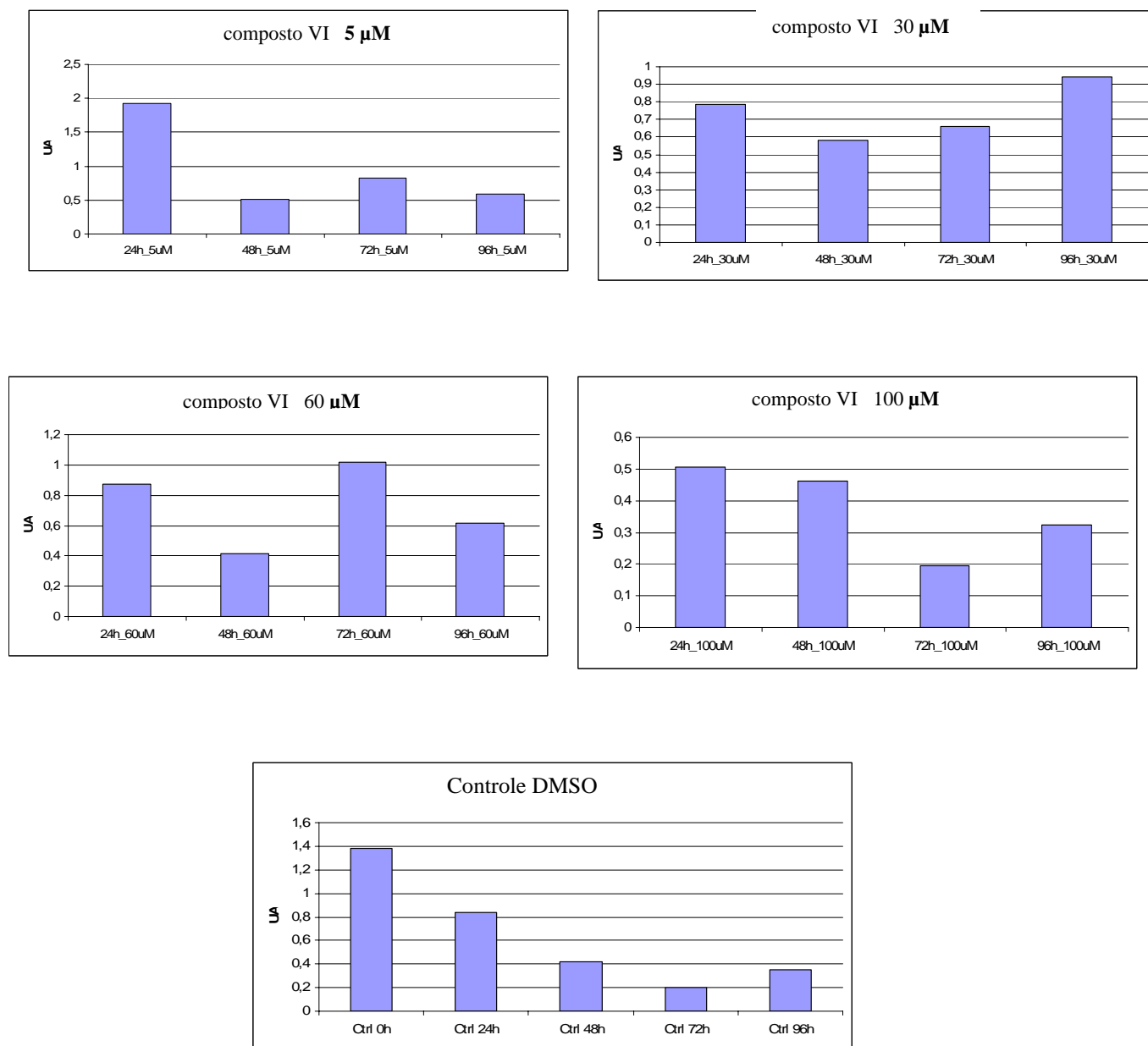


Figura 13: Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5 $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M e 100  $\mu$ M nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na ausência de hemina.

Tabela 05: Viabilidade celular do composto VI em diferentes concentrações na ausência de hemina

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 24 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 72%   | 28%    |
| 5 $\mu$ M   | 78%   | 22%    |
| 30 $\mu$ M  | 53%   | 47%    |
| 60 $\mu$ M  | 71%   | 29%    |
| 100 $\mu$ M | 68%   | 32%    |

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 48 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 84%   | 16%    |
| 5 $\mu$ M   | 94%   | 06%    |
| 30 $\mu$ M  | 94%   | 06%    |
| 60 $\mu$ M  | 89%   | 11%    |
| 100 $\mu$ M | 95%   | 05%    |

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 72 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 93%   | 07%    |
| 5 $\mu$ M   | 99%   | 01%    |
| 30 $\mu$ M  | 95%   | 05%    |
| 60 $\mu$ M  | 88%   | 12%    |
| 100 $\mu$ M | 90%   | 10%    |

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 96 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 92%   | 08%    |
| 5 $\mu$ M   | 90%   | 10%    |
| 30 $\mu$ M  | 96%   | 04%    |
| 60 $\mu$ M  | 94%   | 06%    |
| 100 $\mu$ M | 92%   | 08%    |

A viabilidade inicial das células foi de 97% (controle 0 hora) indicando que em 24 horas a queda da viabilidade observada no controle e nas diversas concentrações estudadas ocorreu devido ao efeito do diluente (garrafa controle – DMSO). Nos pontos subseqüentes houve aumento da viabilidade que pode

ser resultado do efeito do composto estudado e/ou decorrente da recuperação celular.

É possível que o diluente utilizado tenha prejudicado o resultado do experimento uma vez que, quando comparamos os pontos de 100  $\mu\text{M}$  com seus respectivos controles, observamos o mesmo perfil de expressão gênica de gama-globina.

Aparentemente esse composto apresenta efeito na expressão de gama-globina em baixa concentração (5 e 30  $\mu\text{M}$ ), (HU apresentou efeito significativo a partir de 30  $\mu\text{M}$  ; Figura 12):

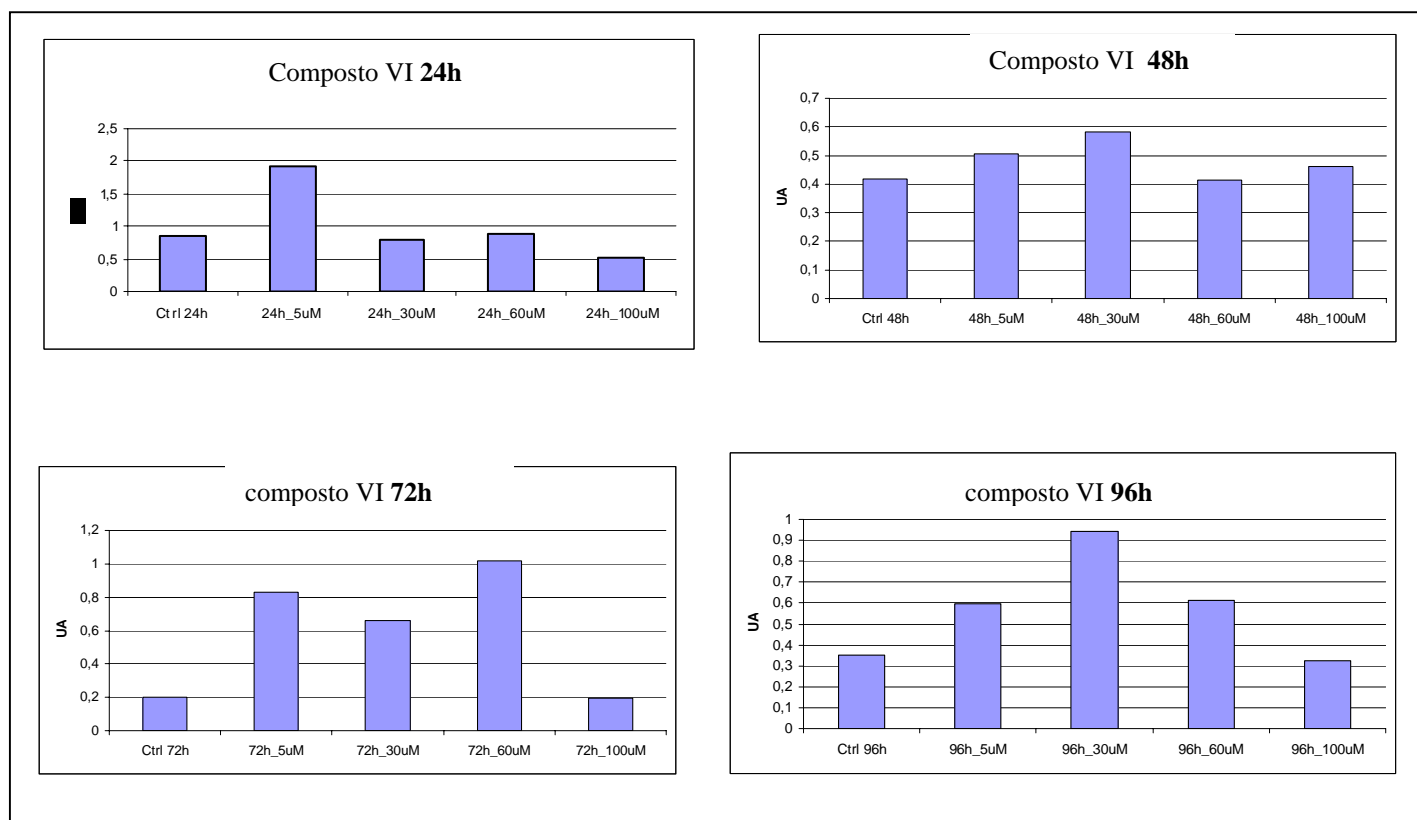


Figura 14: Expressão de RNAm de gama globina na presença do composto VI, nas diferentes concentrações utilizadas, na ausência de hemina, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.

Vale destacar a atividade do composto VI, na ausência de hemina, na concentração de 5  $\mu\text{M}$  no tempo de 24 horas. (Figura 14)

Alguns compostos pouco ativos no modelo sem diferenciação prévia com hemina, tem-se mostrado muito ativos no modelo com hemina.

Foi demonstrado que o tratamento de células K562 com hemina (ferriprotoporfirina IX) induz a síntese de proteína ferritina em nível transcricional e translacional. (IWASAKI, 2006). Por isso, o composto VI, foi avaliado na presença e na ausência de hemina. Na figura 15, podemos observar a curva dose-resposta do composto VI, na presença de hemina.

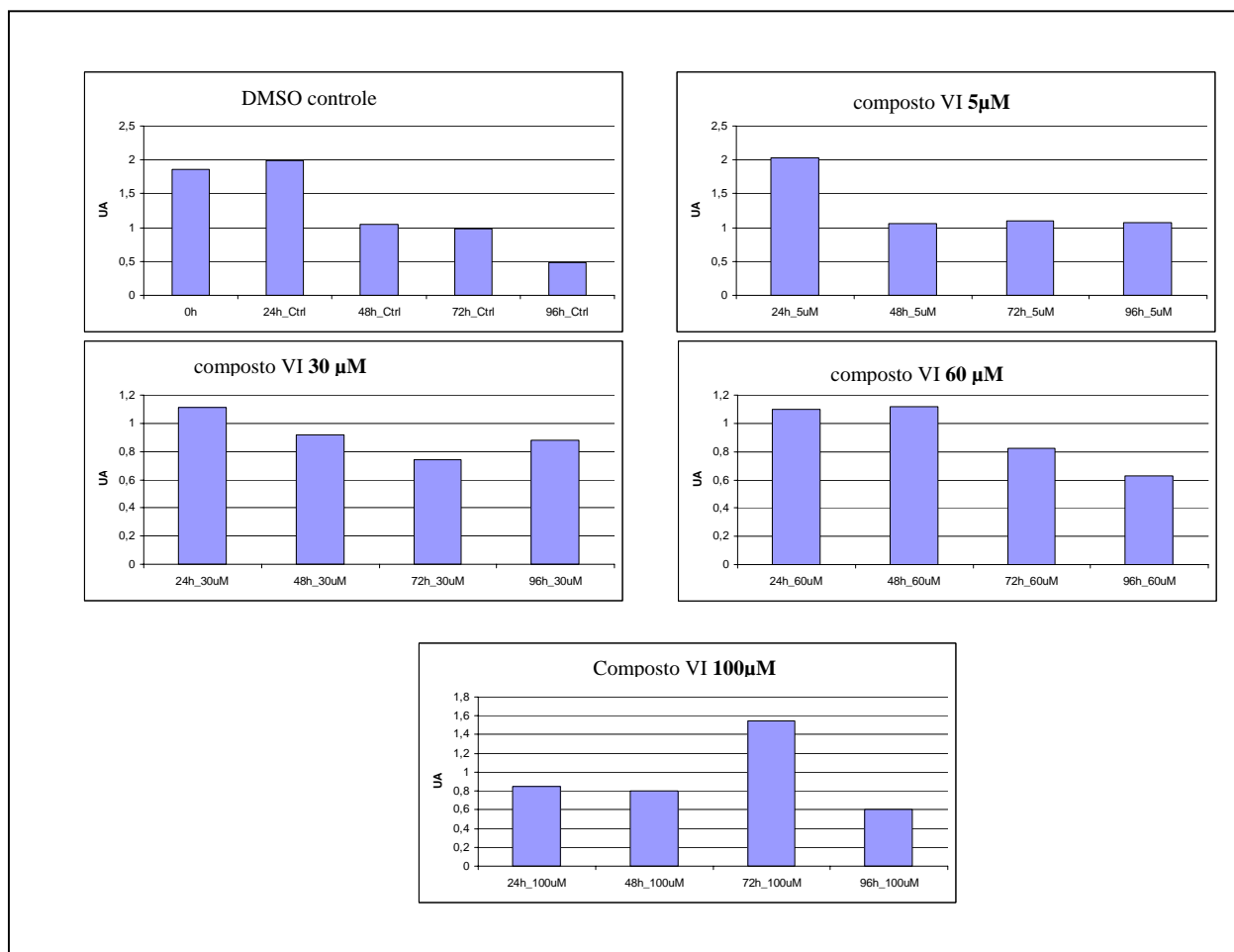


Figura 15: Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M e 100  $\mu$ M nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na presença de hemina.

TABELA 06: Viabilidade celular na presença do composto VI em diferentes concentrações em função do tempo na presença de hemina.

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 24 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 80%   | 20%    |
| 5 $\mu$ M   | 79%   | 21%    |
| 30 $\mu$ M  | 81%   | 19%    |
| 60 $\mu$ M  | 77%   | 23%    |
| 100 $\mu$ M | 80%   | 20%    |

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 48 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 79%   | 21%    |
| 5 $\mu$ M   | 93%   | 07%    |
| 30 $\mu$ M  | 72%   | 28%    |
| 60 $\mu$ M  | 78%   | 22%    |
| 100 $\mu$ M | 84%   | 16%    |

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 72 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 90%   | 10%    |
| 5 $\mu$ M   | 83%   | 17%    |
| 30 $\mu$ M  | 87%   | 13%    |
| 60 $\mu$ M  | 71%   | 29%    |
| 100 $\mu$ M | 88%   | 12%    |

VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 96 HORAS

| AMOSTRAS    | VIVAS | MORTAS |
|-------------|-------|--------|
| CONTROLE    | 89%   | 11%    |
| 5 $\mu$ M   | 82%   | 18%    |
| 30 $\mu$ M  | 82%   | 18%    |
| 60 $\mu$ M  | 67%   | 33%    |
| 100 $\mu$ M | 87%   | 13%    |

A viabilidade inicial das células foi de 90% (controle 0 hora). Segundo o protocolo da cultura as células foram diferenciadas com hemina, por 72 horas antes de iniciarmos o experimento.

Aparentemente o DMSO não provocou os mesmos efeitos encontrados nas células sem hemina. O tratamento com hemina não favoreceu a atividade das substâncias testes, uma vez que não observamos aumento da expressão gênica de gama-globina como no experimento anterior. Conforme podemos visualizar nas figuras 15 e 16, a diferenciação com hemina, não alterou de forma significativa a resposta do composto VI. No tempo de 72h com a concentração de 100  $\mu\text{M}$ , observamos um aumento interessante na expressão de gama globina RNAm.

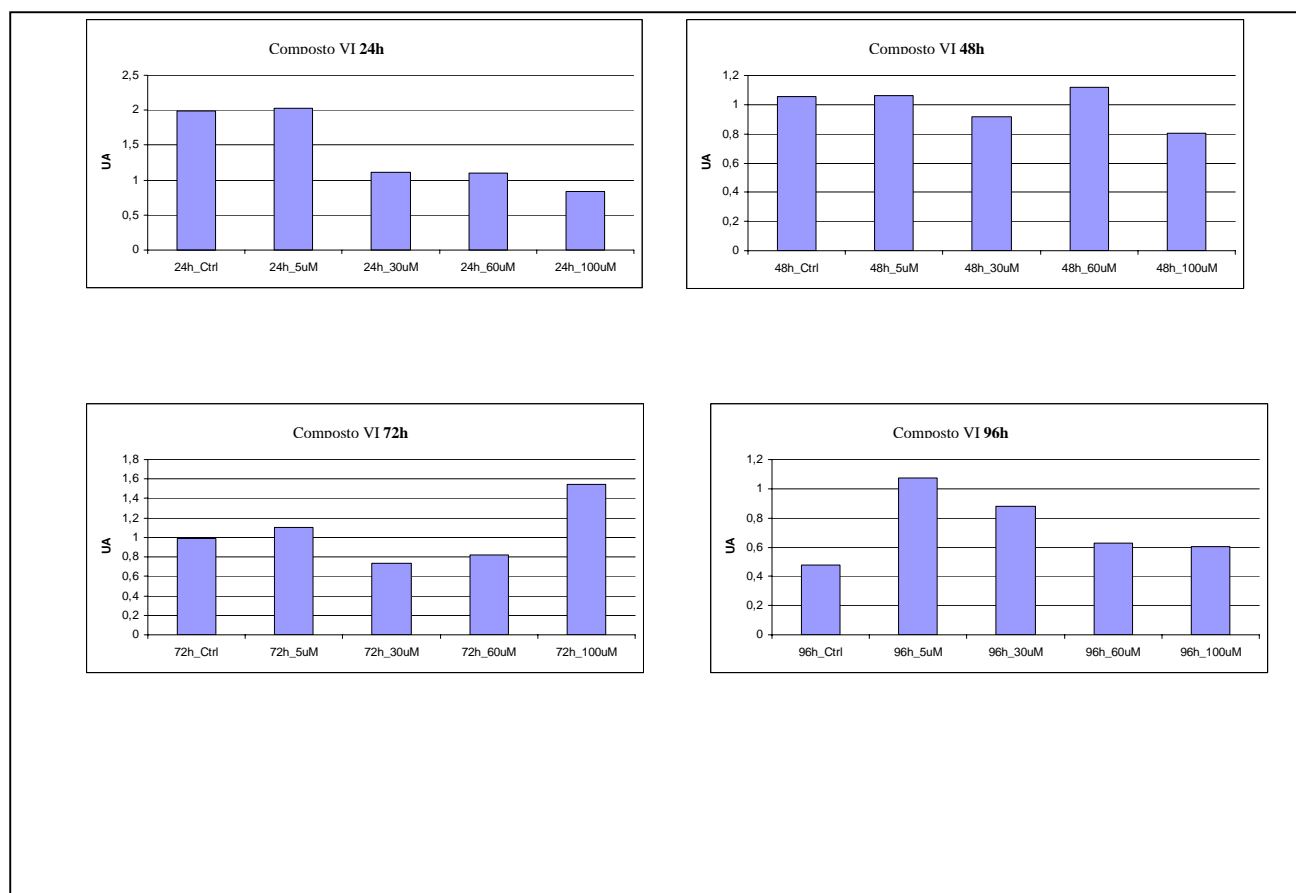


Figura 16: Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na presença de hemina.



O composto IV, derivado sulfonamídico, também foi avaliado nesse modelo na ausência de hemina. Na figura 17 observamos a curva dose resposta do composto IV na ausência de hemina.

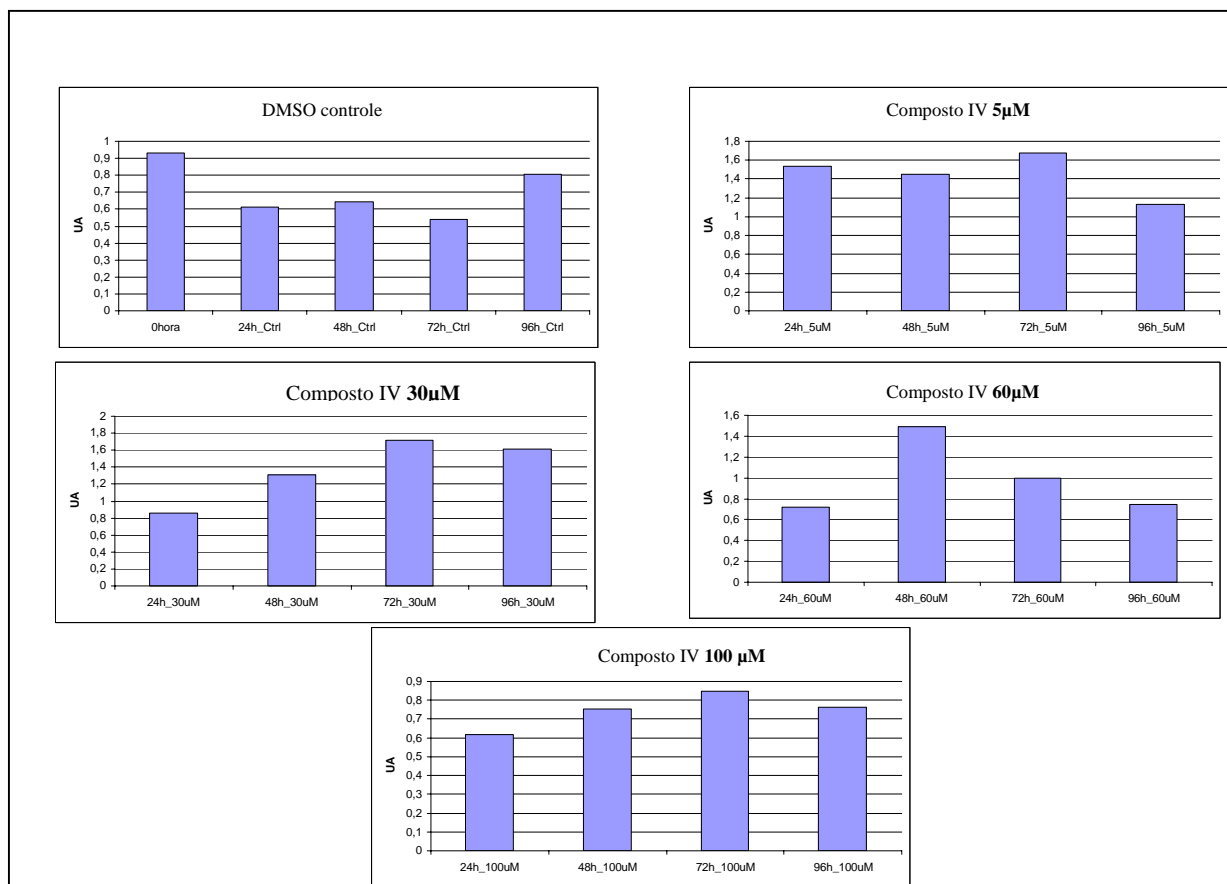


Figura 17: Curva dose-resposta do composto IV nas concentrações de 5 μM, 30 μM, 60 μM e 100 μM nos tempos 24 h, 48 h, 72 h e 96 h na ausência de hemina.

TABELA 07: Viabilidade celular na presença do composto IV em diferentes concentrações em função do tempo, na ausência de hemina

## VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 24 HORAS

| AMOSTRAS VIVAS |     | MORTAS  |
|----------------|-----|---------|
| CONTROLE       |     | 85% 15% |
| 5 $\mu$ M      | 78% | 22%     |
| 30 $\mu$ M     | 83% | 17%     |
| 60 $\mu$ M     | 85% | 15%     |
| 100 $\mu$ M    | 85% | 15%     |

## VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 48 HORAS

| AMOSTRAS VIVAS |     | MORTAS  |
|----------------|-----|---------|
| CONTROLE       |     | 91% 09% |
| 5 $\mu$ M      | 92% | 08%     |
| 30 $\mu$ M     | 95% | 05%     |
| 60 $\mu$ M     | 96% | 04%     |
| 100 $\mu$ M    | 90% | 10%     |

## VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 72 HORAS

| AMOSTRAS VIVAS |     | MORTAS  |
|----------------|-----|---------|
| CONTROLE       |     | 94% 06% |
| 5 $\mu$ M      | 91% | 09%     |
| 30 $\mu$ M     | 95% | 05%     |
| 60 $\mu$ M     | 94% | 06%     |
| 100 $\mu$ M    | 93% | 07%     |

## VIABILIDADE DAS CÉLULAS EM 96 HORAS

| Amostras    | Vivas | Mortas |
|-------------|-------|--------|
| Controle    | 96%   | 04%    |
| 5 $\mu$ M   | 93%   | 07%    |
| 30 $\mu$ M  | 95%   | 05%    |
| 60 $\mu$ M  | 95%   | 05%    |
| 100 $\mu$ M | 96%   | 04%    |

A viabilidade inicial das células foi de 97% (controle 0 hora).

O composto IV apresentou melhor eficácia em aumentar a expressão gênica de gama-globina quando comparamos com o composto VI. O aumento pode ser observado em baixas concentrações (5 e 30  $\mu\text{M}$ ), em todos os tempos estudados. Nas figuras 41 e 42, observarmos a curva dose resposta do composto IV na ausência de hemina.

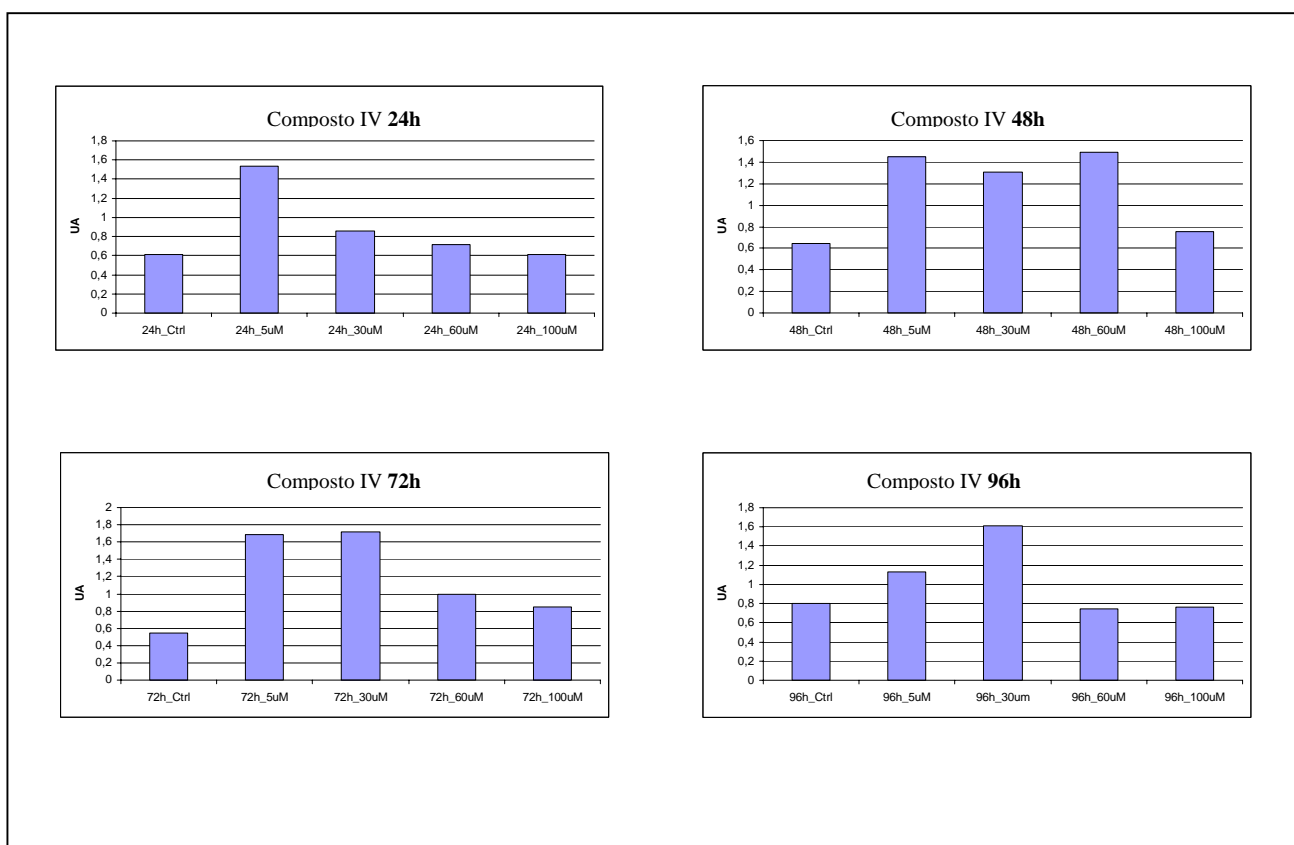


Figura 18: Curva dose-resposta do composto VI nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na ausência de hemina.

O composto IV parece ser interessante em aumentar a expressão de gama globina, conforme podemos visualizar nas figuras 17 e 18. O expressivo aumento na concentração de 5  $\mu$ M, nos tempos 24 h, 48 h e 72 h demonstra o potencial do composto IV quando comparado com HU a 10  $\mu$ M no tempo de 48 horas (Figura 12).

Inicialmente, imaginou-se que a menor atividade dos nitratos, que são pró-fármacos, era devido à ausência no meio de hidrolases inespecíficas capazes de romper a ligação éster de nitrato. Esse mesmo tipo de ligação não estava presente no composto VI que, de acordo com relatos na literatura de estruturas análogas, necessitaria de uma oxidação da subunidade hidroxilamínica para liberação de NO, exercendo assim sua ação.

Recentemente COKIC (2003), relatou a avaliação de compostos N-nitroso cisteína e doadores de NO em cultura de células eritroleucêmica K562 e também em células progenitoras de eritrócito humano e verificou que em ambos modelos os compostos apresentaram atividade de aumento da indução de RNAm de gama globina, dose e tempo dependente. Sugeriu também que compostos doadores de NO poderiam ser agentes potentes no aumento de gama globina. (COKIC *et al* 2003)

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos mostram que a metodologia sintética empregada na obtenção dos compostos nitrados usando mistura de ácido nítrico/anidrido acético foi adequada, permitindo a obtenção dos nitratos com excelentes rendimentos, e maiores rendimentos globais (menor número de etapas sintéticas);

A metodologia sintética para obtenção do composto IV, mostrou ser a mistura de solventes etanol/água a mais adequada, com menor tempo reacional (45 min.) e menor formação de subprodutos;

A metodologia sintética para a obtenção dos intermediários-chave halogenados se mostrou adequada, levando à obtenção de haletos de alquila com elevados rendimentos;

A interconversão dos haletos de alquila à nitratos, usando nitrato de prata e acetonitrila em refluxo, mostrou-se inadequada para obtenção dos produtos nitratos, levando a formação de subprodutos de difícil separação;

Na avaliação da mutagênese dos compostos pelo teste de AMES, podemos concluir que a talidomida usada como protótipo à modificação molecular não apresentou mutagênese nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 100 e TA 102;

A hidroxiuréia apresentou mutagênese em concentrações iguais ou superiores a 234  $\mu\text{mol/placa}$  nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 100 e TA 102;

Os compostos III, IV e V foram os que apresentaram menor mutagênese nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 100 e TA 102 nas concentrações utilizadas;

Os compostos II e VI foram os que apresentaram maior mutagênese nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 100 e TA 102 nas concentrações utilizadas;

O composto IV, ensaiado na maior concentração, quando comparado com III e V foi o que apresentou a menor mutagenicidade, desmistificando o potencial toxicofórico da subunidade hidroxilamínica;

Dos conjuntos de resultados obtidos no teste de AMES podemos inferir que:

Os compostos alquílicos (I e II) apresentam maior mutagenicidade expressa pela média do número de revertentes/placa que os compostos arílicos (III, IV e V);

Os compostos com espaçamento etilênico, apresentam maior mutagênese que os compostos metilênicos;

Esse conjunto de resultados nos permite concluir que o espaçamento benzílico, é o mais adequado à obtenção de compostos com menor mutagenicidade.

Quando comparada aos compostos sintetizados HU mostrou-se menos mutagênica, não respondendo muito positivamente ao teste de AMES. Isso não exclui sua capacidade mutagênica, mas indica que o mecanismo carcinogênico de HU não é bem detectado nesse teste.

Ademais, mesmo para os compostos mutagênicos, razão de mutagenicidade igual a 2, é considerada pequena, se comparada à fármacos utilizados na terapêutica como o metronidazol, que apresenta RM de 14,9 quando ensaiado a 58,4  $\mu\text{mol}$  em TA 100 sem ativação metabólica (SILVA, 2002). Isso nos permite concluir que embora haja indícios de mutagenicidade para os compostos, ela é muito baixa, e esses resultados podem não refletir em células eucarióticas.

Dos resultados obtidos no ensaio de atividade antiinflamatória podemos concluir que todos os compostos apresentam propriedades de inibição de infiltração leucocitária, e atividade antiinflamatória em fase aguda (edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina);

Os compostos I, III e V apresentam atividade antiinflamatória superior à indometacina no ensaio de edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina nas doses utilizadas.

Os compostos III, IV e V são interessantes protótipos com atividade antiinflamatória e reduzida atividade mutagênica;

Dos resultados obtidos na avaliação da expressão gênica induzida pelos compostos em cultura de células eritroleucêmicas K562, e quantificadas por PCR Real Time, podemos concluir que:

O composto VI apresenta atividade nesse modelo, aumentando a expressão gênica de gama globina, na presença e na ausência de hemina;

Na presença de hemina, o composto VI não apresentou atividade significativamente maior que na ausência de hemina, quando comparados ao controle;

Aparentemente composto VI apresenta efeito na expressão de gama-globina em baixa concentração (5  $\mu$ M e 30  $\mu$ M);

O composto VI mostrou altas porcentagens de viabilidade celular (maior que 90%) nos ensaios com e sem hemina, demonstrando ausência de efeitos tóxicos nas concentrações utilizadas;

O composto IV apresentou atividade superior ao controle na expressão de gama-globina.

O aumento da expressão de gama globina induzida pelo composto IV, é maior que o aumento gerado pelo composto VI, sugerindo que o composto IV, é mais eficiente no aumento da expressão gênica de gama-globina.

Quando se compara o composto IV com os dados de literatura de HU, observamos que o composto IV, a 5  $\mu$ M no tempo de 48 horas apresenta atividade, enquanto HU para produzir atividade comparável é utilizado a 10  $\mu$ M no mesmo tempo.

A viabilidade celular em 0 h foi de 97%, e esse mesmo padrão foi mantido durante a realização do ensaio, demonstrando ausência de toxicidade do composto IV.

Dos conjuntos de ensaios realizados, podemos concluir que os compostos III, IV e V, que apresentaram baixa mutagênicidade, atividade antiinflamatória em modelo de edema de orelha induzido por capsaicina, e inibição da infiltração leucocitária são interessantes protótipos candidatos à fármaco para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme. Vale destacar ainda, que o composto IV, apresentou resultados interessantes no modelo que avalia a expressão gênica de gama-globina, sendo mais ativo que o controle.

Constituem perspectivas deste trabalho:

- a) Avaliação dos compostos sintetizados em linhagem TA 98 de *Salmonella typhimurium*;
- b) Avaliação da atividade analgésica periférica dos compostos sintetizados por via *i.p*;
- c) Avaliação da propriedade inibidora de TNF alfa, pelo teste de ELISA
- d) Avaliação da atividade doadora de NO dos compostos sintetizados, e dos padrões;
- e) Avaliação da expressão gênica de gama globina pelo composto VI na presença de hemina;
- f) Avaliação da expressão gênica de gama globina dos compostos III e V, na presença e ausência de hemina;
- g) Avaliação das atividades antiinflamatórias na presença dos padrões talidomida e hidroxiuréia;

Os resultados obtidos a partir dos itens **d** e **e** permitirão atestar o caráter dual dos compostos sintetizados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a norma NBR 6023 / 2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

- 1- ADACHI, K.; KIM, J.; BALLAS, S.; SURREY, S.; ASAKURA, T. Facilitation of Hb S Polymerization by the Substitution of Glu for Gln at  $\beta$ 121. **J. Biol. Chem.** v. 263, n. 12, p. 5607-5610, 1988.
- 2- ASHBY, J.; TINWELL, H.; CALLANDER, R.D.; KIMBER, I.; CALY, P.; GALLOWAY, S.M.; HILL, R.B.; GREENWOOD, S.K.; GALDEN, M. E.; FERGUSON, M.J.; VOGEL, E.; NIVARD, M.; PARRY, J.M.; WILLIAMSON, J. Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints. **Mutat. Res.**, v. 396, p. 45-64, 1997.
- 3- ATWEH, G.F.; SUTTON, M.; NASSIF, I.; BOOSALIS, V.; DOVER, G.J.; WALLENSTEIN, S.; WRIGHT, E.; MAHON, L.M.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; FALLER, D.V.; PERRINE, S.P. Sustained Induction of Fetal Hemoglobin by Pulse Butyrate Therapy in Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 93, n. 6, p.1790-1797, 1999.
- 4- AVILA, C.M.; ROMEIRO, N.C.; SILVA, G.M.S; SANT'ANNA, C.M.R.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Development of new CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR models for anti-inflammatory phthalimide-containing TNFa modulators. **Bioorg. Med. Chem.** v.14, p.6874–6885, 2006.

- 5- BALDWIN, J.J.; LUMMA, W.C.; LUNDELL, G.F. PONTICELLO, G.S. RAAB, A.W.; ENGELHARDT, E.L.; HIRSCHMANN, R.; SWEET, C.S. SCRIABINI, A. Symbiotic approach to drug design: antihypertensive  $\beta$ -adrenergic blocking agents. **J. Med. Chem.** v.22, p.1284-1290, 1979.
  
- 6- BALLAS, S.K.; MOHONDAS, N. Pathophysiology of vaso-occlusion. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** v.6 , p.10-15, 1996.
  
- 7- BALLINI, R.; BARBONI, L.; GIARLO, G. **The First Conversion of Primary Alkyl Halides to Nitroalkanes under Aqueous Medium.** **J. Org. Chem.** v. 69, p. 6907-6908, 2004.
  
- 8- 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.
  
- 9- BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal:** As bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2002. 243p. Bibliografia:p.189-206. ISBN 85-7307-782-4.
  
- 10- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. **Quim Nova.** n. 1., p.129-148, 2002.

- 11-BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quim Nova**. v.28 n.6, p.1046-1054, 2005.
- 12-BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutat. Res.** v. 97, p. 267-281, 1982.
- 13-BLACK, R.A.; RAUCH, C.T.; KOLOSKY, C.J.; PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; WOLFSON, M.F.; CASTNER, B.J.; STOCKING, K.L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K.A.; GERHART, M.; PAXTON, R.J.; MARCH, C.J. & PAT CERRETI, D. A metalloproteinase disintegrin that release tumor necrosis factor alpha from cells. **Nature** v.385, p.729-733, 1997.
- 14-BONDS, D. R. Three decades of innovation in the management of sickle cell disease: the road to understanding the sickle cell disease clinical phenotype. **Blood Rev.** v. 19 p. 99-110, 2005.
- 15-BOYER, J.H. **Nitroazoles**: The C-nitro derivatives of five-membered N- and N, O-heterocycles. New Orleans: VCH, 1986. Organic nitro chemistry series, v.1. Bibliografia: p.1-4. ISBN 0-89573-148-7.

- 16-BUCHANAN, G.R.; DEBAUN, M.R.; QUINN, C.T.; STEINBERG, M.H. Sickle cell disease. **Hematology**. p. 35-47, 2004.
- 17-BUNN HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med** v.337, p.762–769, 1997.
- 18-CADDICK, S. Microwave assisted Organic Reactions. *Tetrahedron* 1995; 51 (38): 10403-10432.
- 19-CARUCCI, D. Know thine enemy. **Nature**. v.430, p.444-445, 2004.
- 20- CASTRO, L.F. Síntese de pró-fármaco osteotrópico derivado de naproxeno. 116p. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2003.
- 21-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.
- 22-CHARACHE, S., BARTON FB, MOORE RD, TERRIN ML, STEINBERG MH, DOVER GJ, BALLAS SK, MCMAHON RP, CASTRO O, ORRINGER EP. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive

"switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **Medicine** v.75, p.300-326, 1996.

23-CHIROLI, V.; BENEDINI, F.; ONGINI, E.; SOLDATO, P.D. Nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drugs: the case of nitroderivatives of aspirin. **Eur. J. Med. Chem.** v.38, p.441-446, 2003.

24- CHUNG, M. C., FERREIRA, E.I. **O processo de latenciação no planejamento de fármacos.** **Quim. Nova.** v.22, n.1, p.75-84.

25-CHUNG, M.C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos.** 1996. 196f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

26-CHUNG, M.C., SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev.Bras. Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.155-179, 2005.

27-COKIC, V.P.; BELESLIN-COKIC, B.B.; TOMIC, M.; STOJILKOVIC, S.S.; NOGUCHI, C.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. **Blood.** v.108, n.1. p.184-191, 2006.

- 28-COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; NJOROGGE, 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.
- 29-CONRAN, N., ORESCO-SANTOS C, ACOSTA HC, FATTORI A, SAAD ST, COSTA FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br. J. Haematol.** v.124, p.547-554. 2004.
- 30-COTRAN, R. S. et al. Patologia estrutural e funcional. 5.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.45-83.
- 31-CROIZAT H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state.**Br J Haematol** v. 87, p. 592–597,1994.
- 32-DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J. Health Econ.** v.22, p.151–185, 2003.
- 33-DUITS 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.

- 34-DYER, J.R. Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos. São Paulo, Edgard Blucher Ltda. 1969. p. 24-138.
- 35-ENDRES, S. HACKER A, NOACK E, KOJDA G, LEHMANN J. NO-DONORS, part 3: nitrooxyacylated thiosalicylates and salicylates - synthesis and biological activities. **Eur. J. Med. Chem.** v.34, p.895-901, 1999.
- 36-ESPINOZA-FONSECA, L.M. The benefits of multi-target approach in drug design and discovery. **Bioorg. Med. Chem.** v.14, p.896-897, 2006.
- 37-ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **J. Med. Chem.** v. 47, p.2393-2404, 2004.
- 38-FERREIRA, E.U.; KOROLKOVAS, A. Pró-fármacos e latenciação. **Quim. Nova**, p.113-128, 1980.
- 39-FERRONE, F. A., HOFRICHTER, H. & EATON, W. A. Kinetics of sickle cell hemoglobin polymerization I. Studies using temperature jump and laser photolysis techniques. **J. Mol.Biol.** v.183, p. 591-610, 1985. b) FERRONE, F. A., HOFRICHTER, H. & EATON, W. A. Kinetics of sickle cell hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism. **J. Mol. Biol.** v.183, p.611-631, 1985.

- 40-FILHO, V.C., CAMPOS, F., CORREA, R., YUNES, R.A. NUNES, R.J.  
Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas : uma revisão da literatura. **Quim. Nova**, v. 26, n2, p. 230-241, 2003.
- 41- FRANCIS, R. Jr., et al. **J. Natl. Med. Assoc.** v. 84: 611-615, 1992.;
- 42-FURNESS, B. S., et al Vogel's textbook of practical organic chemistry, 5<sup>o</sup> Ed., Longman Scientific & Technical Great Britain, 1991, p.1276-1276.
- 43- 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.
- 44-GETZ, J.J.; PRANKERD, R.J.; SLOAN, K.B. Mechanism of hydrolysis of o-imidomethyl derivatives of phenols. **J.Org. Chem.** v.58, p.4913-4918, 1993.
- 45-GUIDO, R.V.C.; FERREIRA, E.I.; NASSUTE, J.C.; VARANDA, E.A.; CHUNG, M.C.. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** São Paulo, v.22, p.319-333, 2001.
- 46-GUTSCHOW, M.; HECKER, T.; THIELE, A. HAUSCHILDT, S. EGER, K.  
Aza analogues of thalidomide: Synthesis and evaluation as inhibitors of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in vivo. **Bioorg. Med. Chem.** v. 9 p. 1059-1065. 2001.



- 47- HANFT, V.N.; FRUCHTMAN, S.R.; PICKENS, C.V.; ROSSE, W.F.;  
HOWARD, T.A.; WARE, R.E.

**Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. Blood.** v.95, n.11, 3589-3593, 2000.

- 48-HESS, S.; AKERMANN, M.A.; WNENDT, S.; ZWINGENBERGER, K.;  
EGER, K. Synthesis and immunological activity of water-soluble thalidomide  
prodrugs. **Bioorg. Med. Chem.** v. 9 p. 1279-1291, 2001;

- 49-<http://www.geocities.com/afalciforme/historic.html> acessado dia 04/10/2006

- 50-<http://www.sbmcta.org.br/?arq=doc01> acessado em 10/10/06

- 51-HUANG, J., ZOU, Z.; KIM-SHAPIRO, D.B.; BALLAS, S.K.; KING, S.B.  
Hydroxyurea Analogues As Kinetic and Mechanistic Probes of the Nitric  
Oxide Producing Reactions of Hydroxyurea and Oxyhemoglobin **J. Med.  
Chem.** v. 46, p.3748-3753, 2003.

- 52-HUANG, J.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S.B. Catalase-Mediated Nitric  
Oxide Formation from Hydroxyurea. **J. Med. Chem.** v.47, p.3495-3501,  
2004.

- 53-INGRAM, V.M. Gene mutations in human haemoglobin the chemical  
difference between normal and sickle haemoglobin. **Nature.** v.180, p.236-  
238, 1957.

- 54-IWASAKI, K.; MACKENZIE, E.L.; HAILEMARIAM, K.; SAKAMOTO, K.; TSUJI, Y. Hemin-Mediated Regulation of an Antioxidant-Responsive Element of the Human Ferritin H Gene and Role of Ref-1 during Erythroid Differentiation of K562 Cells. **Mol. Cel. Biol.** p.2845–2856, 2006.
- 55-KAUL DK, FABRY ME AND NAGEL RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. **Blood Rev.** v.10, p.29–44, 1996.
- 56-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.
- 57-KING, S.B. The Nitric Oxide Producing Reactions of Hydroxyurea. **Curr. Med. Chem.** v.10, p.437-452, 2003.
- 58-KOSHY,M.; DORN,L.; RESSLER,L.; MOLOKIE, R.; LAVELLE, D.; TALISCHY, N.; HOFFMAN, R.; OVERVELD, W.V.; DESIMONE, J.. 2-deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. **Blood**, v. 96, n.7, p.2379-2384, 2000.
- 59-LÁCOVÁ, M.; CHOVANCOVÁ, J.; VEVERKOVÁ, E.; TOMA, S. Microwaves assisted Gabriel Synthesis oh phtalides. **Tetrahedron** 1996; 52 (47):14995-15006.
- 60-LEE, G.R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. Wintrobe Hematologia Clínica. Vol. I Manole, 1998, p.1161-1163.

- 61-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.
- 62-LIMA, L.M., BARREIRO, E.J. Bioisosterism, an Useful stratey for molecular modification and Drug Design. **Curr. Med. Chem.** v. 11, p.1345-1359, 2004.
- 63-LIMA, L.M., CASTRO, P., MACHADO, A. L., FRAGA, C.A M., LUGNIER, C., MORAES, V.L.G., BARREIRO, E.J. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg Med. Chem.** v. 10, p.3067-3073, 2002.
- 64-LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quim. Nova.** v.24. n.5, p.683-688, 2001.
- 65-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.
- 66-LUKACOVA, V.; ZHANG, Y.; KROLL, D.M.; RAHA, S.; COMEZ, D.; BALAZ, S.A Comparison of the Binding Sites of Matrix Metalloproteinases and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme: Implications for Selectivity. **J. Med. Chem.** v.48, p.2361-2370, 2005.

- 67-MAKHATADZE, N. J. Tumor Necrosis factor locus: genetic organization and biological implication. **Hum. Immunol.** v.59, p.571-579, 1998.
- 68-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.
- 69-MANO, E. B., SEABRA, A. Práticas de Química Orgânica, 3º edição, Ed., Edgard Blucher Ltda., 2002, p.206.
- 70-MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mut. Res.** v.113, p.173-215, 1983.
- 71-MARTINKUS, K. J.; TANN, C.-H.; GOULD, S. J. **Tetrahedron.** v.39, p.3493-3498, 1983; 1,2-ADDITION OF A FUNCTIONALIZED ZINC-COPPER ORGANOMETALLIC [RCu(CN)ZnI] TO AN  $\alpha,\beta$ -UNSATURATED ALDEHYDE: (E)-2-(4-HYDROXY-6-PHENYL-5-HEXENYL)-1HISOINDOLE-1,3(2H)-DIONE [1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-(4-hydroxy-6-phenyl-5-hexenyl)-], **Organic Syntheses** col. v. 9, p.502,1998.
- 72-MIYACHI, H.; OGASAWARA, A.; AZUMA, A.; HASHIMOTO, Y. Tumor necrosis factor-alpha production-inhibiting activity of phtalimide analogues on human leukemia THP-1 cells and a structure-activity relashionship study. **Bioorg. Med. Chem.** v.5, n. 11, p.2095-2102, 1997.

- 73-MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. **J. Med. Chem.** v.48 n.21, p. 6523-6543, 2005.
- 74-MORRIS, C. R., KUYPERS, F.A, LARKIN, S., SWEETERS, N., SIMON, J., VICHINSKY, E.P., STYLES, L. A . Arginine therapy: anovel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. **Brit. J. Haematol.**, v.111, p.498-500, 2000.
- 75-NASSUTE, J.C. Síntese de pró-fármacos poliméricos derivados de diclofenaco. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Departamento de Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2006.
- 76-NETO, G.C.G.; PITOMBEIRA, M.S.; Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de janeiro, v.39, n.1, p.51-56, 2003.
- 77-NEVES, E.T. Síntese de pró-farmacos de dipirona. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2003.
- 78-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.

79-OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. **Blood Rev.** v.18, p.65–73, 2004.

80- ORRINGER, E.P., CASELLA, J.F., ATAGA, K.I. KOSHY, M., ADAMS-GRAVES, P., LUCHTMAN-JONES, L., WUN, T., WATANABE, M., SHAFER, F., KUTLAR, A., ABBOUD, M., STEIBERG, M., ADLER, B., SWERDLOW, P., TERREGINO, C., SACCENTE, S., FILES, B., BALLAS, S., BROWN, R., WOJTOWICZ-PRAGA, S., GRINDEL, J.M. Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. **JAMA.** v.286, p. 2099-2106, 2001.

81-PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science.** v.110, p.543-548, 1949.

82-PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRITZ, G.S. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Fort Worth: Saunders Golden Sunburst, 1996. 511 p.

83-PERUTZ, M.F.; ROSSMANN, M.G.; CULLIS, A.F.; et al. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5-5Å resolution obtained by x-ray analysis. **Nature.** v.185, p.416-422, 1960.

- 84-PUCHER, G. W.; JOHNSON, T. B. **J. Am. Chem. Soc.** V.44, p.817, 1922.
- 85-RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v.391, p.97-103, 2000.
- 86-ROCHA, H.H.G. **Anemia Falciforme**. Rio de Janeiro: Rubio Ltda, 2004. 291p. ISBN 85-87600-29-X
- 87-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.
- 88-SAFO, M.K.; ABDULMALIK, O.; DANSO- DANQUAT, R.; BURNETT, J.C.; NOKURI, S.; JOSHI, G.S.; MUSAYEV, F.N.; ASAKURA, T.; ABRAHAM, D.J. Structural basis for the potent antisickling effects of a novel class of five membered heterocyclic aldehydic compounds. **J. Med. Chem.** v.47, p.4665-4676, 2004.
- 89-SAFO, M,K.; DANSO-DANQUAT, R.; JOSHI, G.S.; ABRAHAM, D.J. Antisickling agents. US2005/ 0209199 A1; USPTO 22/09/2005)
- 90-SAMUEL, R. E., GUZMAN, A. E. & BRIEHL, R. W. Kinetics of hemoglobin polymerization and gelation under shear: II The joint concentration and shear dependence of kinetics. **Blood.** v.82, p.3474-3481, 1993.

- 91-SAMUEL, R. E., SALMON, E. D. & BRIEHL, R. W. Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin. **Nature**. v.345, p.833–835, 1990.
- 92-SANTOS, J.L.; GONZALEZ, R.C.; LIMA, L.M.; CHUNG, M.C.. Microondas na síntese do 2-fenil-1H-isindole-1,3(2H)-diona. In: **Anais da 52ª Jornada Farmacêutica da UNESP**. Araraquara, 2005.
- 93-SEIJAS, J.A., VÁZQUEZ-TATO, M. P. et al. Microwave promoted synthesis of a rehabilitated drug: thalidomide. **Synthesis**. N.7, p.999-1000, 2001.
- 94-SEIJAS, J.A.; VÁZQUEZ-TATO, M.P.; GONZÁLEZ-BANDE, C.; MARTÍNEZ, M.M.; PACIOS-LÓPEZ, B. Microwave promoted síntesis of rehabilitated drug: Thalidomide. *Synthesis*. 2001; 7: 999-1000.
- 95-SHIBATA, Y.; SASAKI, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. N-Alkylphthalimides: structural requirement of thalidomide action on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production by human leukemia HL-60 cells. **Chem. Pharm. Bull.** v.43, p.177-179, 1995.
- 96-SHINJI, C.; NAKAMURA, T.; MAEDA, S.; YOSHIDA, M.; HASHIMOTO, Y.; MIYACHIA, H. Design and synthesis of phthalimide-type histone deacetylase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.15, p.4427–4431, 2005.



- 97-SILVA, A.T.A; CHUNG, M.C.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; FERREIRA, E.I. Advances in pro drug design. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p.893-914, 2005.
- 98-SILVERSTAIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.387p. Rio de Janeiro: LTC, 1994. 5 ed.
- 99-SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**. v.2. 534p. Rio de Janeiro: LTC S.A, 1996. tradução: Horácio Macedo. p.214-216.
- 100- 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.
- 101- STEINBERG, M.H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **T. Pharmacol. Scienc.** v. 27, n.4, p. 204-210, 2006.
- 102- 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.

- 103- STRUPEZEWSKI, J.D., et al. **Ann. Rept. Med. Chem.** v. 26, p.297-313, 1991.
- 104- STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickel-cell disease. **Lancet.** v. 364, p. 1343-1360, 2004.
- 105- TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **Gen. Pharmac.** v. 28, n. 4. p.485-487, 1997.
- 106- VALENT, G.V., SATO, M.I., COELHO, M.C., COIMBRÃO, C.A., SANCHES, P.S. Monitoring São Paulo state river in Brazil for mutagenic activity using the AMES test. **Env. Toxicol. Water Quality.** v.8, p.371-381, 1993.
- 107- VIDAL, T. PETIT, A. LOUPY, A. e GEDYE, R.N. Re-examination of microwzve induced synthesis of Phtalimides. **Tetrahedron.** v.56, p. 5473-5478, 2000.
- 108- VLADAN P. COKIC, BOJANA B. BELESLIN-COKIC, MELANIJA TOMIC, STANKO S. STOJILKOVIC, CONSTANCE T. NOGUCHI, AND ALAN N. SCHECHTER. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. **Blood.** v.108, n.1, p.184-191, 2006.

- 109- WATSON, J.; STAHPMAN, A. W.; BILLELO, F.P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. **Am. J. Med. Scie.** v. 215, p.419-423, 1948.
- 110- WEBER, A.; CASINI, A.; HEINE, A.; KUHN, D.; SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; KLEBE, G. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: New pharmacological opportunities due to related binding site recognition. **J. Med. Chem.** v.46, p.550-557, 2004.
- 111- WELLENS, E.T.; FAIRHURST, R.M. Malaria-protective traits at odds in África? **Nature gen.** v.37, n.11, p.1160-1161, 2005.
- 112- WERMUTH, C. G. In: The Practice of Medicinal Chemistry., San Diego: Academic Press, 1996. p. 11-12, 672-715, 262-293.
- 113- WERMUTH, C.G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J Med Chem.** v.47, n.6, p.1303-1312, 2004.
- 114- WHO. Working group – Hereditary anemias: genetic basis, clinical features, diagnosis and treatment. **Bull WHO**, v.60, p.643-660, 1982.
- 115- WILLIAMS, N.T., MWANGIL, T.W.; WAMBUA, S. et al. Negative epistasis between the malaria protective effects of  $\alpha^+$  thalassemia and the sickle cell trait. **Nature gen.** v.37, n.11, 2005.

- 116- 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.
- 117- YAMAUCHI, K.; KINOSHITA, M.; IMOTO, M. **Bull. Chem. Soc. Jpn.** v.45, p.2531, 1972.
- 118- YARBRO, J.M. Mechanism of action oh hydroxyurea. **Semin. Oncol.** v.19, p.1-10, 1992.
- 119- ZHU, X.; ZHANG, Y.P.; KLOPMAN, G.; ROSENKRANZ, H.S. Thalidomide and metabolites: indications of the absence of ‘genotoxic’ carcinogenic potenciales. **Mut. Res.** v.425, p.153-167, 1999.