UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS 1,2,5-OXADIAZOL-2-*N*-ÓXIDO ÚTEIS COMO PREVENTIVOS DE ATEROTROMBOSE

LUIZ ANTONIO DUTRA

ARARAQUARA - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS 1,2,5-OXADIAZOL-2-*N*-ÓXIDO ÚTEIS COMO PREVENTIVOS DE ATEROTROMBOSE

LUIZ ANTONIO DUTRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Dutra, Luiz Antonio
D978p Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos compôs 1,2,5 oxadiazol-2-*N*-oxido uteis como preventivos da aterotrombose. / Luiz Antonio Dutra. – Araraquara, 2013
164 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. N-acilhidrazona. 2.Oxadiazol-2-*N*-oxido. 3. Aterotrombose. 4. Furoxanos. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. III. Título.

CAPES: 40300005

LUIZ ANTONIO DUTRA

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS 1,2,5-OXADIAZOL-2-*N*-ÓXIDO ÚTEIS COMO PREVENTIVOS DE ATEROTROMBOSE

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista

Araraquara, 29 de Novembro de 2013

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos (Orientador)
(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara)

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo)

Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre
(Instituto de Química, UNESP, Araraquara)

Aos meus pais Valdecir e Cleuza e meu irmão Maurício. Obrigado pela confiança, apoio, e incentivo para esta conquista. À minha esposa e amada Isabel, pelo compaheirismo, paciência, amor e carinho em todos os momentos. Às minhas filhas Carina e Clarice que tanto amo, minha inspiração para todos os dias.

Agradeço às pessoas que contribuíram para realização deste trabalho:

Primeiramente ao meu Orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pela confiança para que este trabalho acontecesse; obrigado pela atenção, discussões e dedicação para este trabalho; admiro sua perseverança, dedicação e honestidade pela ciência, além da inspiração que traz pela Química Medicinal; obrigado por ser um verdadeiro amigo;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa;

A Prof. Dra. Sisi Marcondes e a Dra. Maria Elisa Lopes Pires pela colaboração com os ensaios de agregação plaquetária;

Aos técnicos Dr. Nivaldo e Dra. Lucinéia do Instituto de Química de Araraquara pela realização dos espectros de RMN;

Ao técnico Dr. José Carlos Tomaz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelos espectros de massas;

Aos meus antigos mestres Prof. Dr. Alberto Cavalheiro, Profa. Dra. Vanderlan Bolzani, Prof. André Gonzaga dos Santos e o Prof. Dr. Luis Octávio Regasini pela primeira oportunidade de fazer ciência;

Aos meus amigos de laboratório: Rafael, Thaís, Priscila, Karina, Juliana, Diego, Paulo, Daniela, Marcella, Arthur, Aylime, pelos momentos de discussões sobre ciência, pela amizade e convivência;

A Nadine, estagiária da Universidade de Mainz – Alemanha, pela colaboração no ensaio de tempo de sangramento;

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico ainda representam a principal causa de morte no Brasil. A aterosclerose é uma doença progressiva e silenciosa classificada como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. É caracterizada pelo aumento dos níveis de colesterol no plasma os quais são oxidados por radicais livres originando a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL_{ox}). A fagocitose de LDL_{ox} por macrófagos permite a transformação destes em células espumosas, que são depositadas na camada íntima dos vasos. Após o rompimento do endotélio há o extravasamento do conteúdo da placa aterosclerótica para a circulação levando à formação de trombo. Este interrompe o fluxo sanguíneo em artérias e vasos, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico. A terapia preventiva contra eventos aterotrombóticos é realizada com fármacos antiagregantes plaquetários. O ácido acetilsalicílico (AAS) é um dos fármacos mais utilizados na prevenção de aterotrombose, mas apresenta limitações como indução de ulcerações gástricas e bloqueio de somente uma via de agregação plaquetária. Neste sentido, e em continuidade com a linha de pesquisa visando à busca de novos fármacos antiagregantes plaquetários obtidos por estratégia de modificação molecular implantados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (*Lapdesf* – UNESP Araraquara), realizou-se a hibridação molecular das subunidades presentes no AAS e furoxanos sendo ambas partes espaçadas pela subunidade *N*-acilhidrazona. O furoxano é conhecido por suas propriedades doadoras de óxido nítrico (NO) responsável pelo efeito antiagregante plaquetário. Assim, o objetivo deste trabalho é a síntese de novos compostos derivados do AAS, mais potentes e seguros para serem usados como antiagregantes plaquetários. Os compostos foram sintetizados usando rota divergente para obtenção dos derivados furoxânicos, espaçadores *N*-acilhidrazonas, e os compostos híbridos finais. Todos os compostos foram purificados e caracterizados por métodos analíticos como, espectrofotometria de absorção no infravermelho, espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear. Para os espaçadores *N*-acilhidrazonas foi possível realizar a detecção quantitativa de nitrito na presença de cisteína. Os compostos inibiram a agregação de plaquetas induzidas por ADP com maior potencia em relação ao controle positivo, e com menor tempo de sangramento comparado com o AAS. A potência destes compostos juntamente com a ausência dos efeitos adversos, oferecem aos espaçadores *N*-acilhidrazonas uma maior eficácia em relação aos antiagregantes plaquetários disponíveis na terapêutica.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases such as myocardial infarction and stroke still represents the leading cause of death in Brazil. Atherosclerosis is a silent progressive disease classified as a risk factor for developing cardiovascular diseases. It is characterized by increased levels of plasma cholesterol which are oxidized by free radicals resulting in oxidized low density lipoprotein (oxLDL). The oxLDL phagocytosis by macrophages allows for transformation into foam cells, which are deposited in the intima of vessels. After the disruption of the endothelium occurs the leak plaque's contents into the circulation driving to thrombus formation. This blocks the blood flow in arteries and vessels, leading to the development of cardiovascular diseases such as myocardial infarction and stroke. The preventive therapy against atherothrombotic events is performed with antiplatelet drugs. Acetylsalicylic acid (ASA) is a drug commonly used to prevent atherothrombosis, but it has limitations such as induction of gastric ulcer and blocking only one route of platelet aggregation. Continuing goals finding new antiplatelet drugs obtained by molecular modification strategy implemented in the Laboratory of Drug Research and Development (Lapdesf - UNESP Araraquara), held the molecular hybridization of subunits present in AAS and furoxans being spaced by subunit *N*-acylhydrazone. The furoxano is known for its donor properties of nitric oxide (NO) responsible for the antiplatelet effect. The objective of this work is the synthesis of new compounds derived from AAS, most powerful and safe to use as antiplatelet agents. Compounds were synthesized using divergent route for obtaining derivatives furoxans, *N*-acilhidrazones spacers and the hybrid compounds. All compounds were purified and characterized by analytical methods such as, Infrared Absorption Spectroscopy, Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance. *N*-acilhidrazones spacers was possible to perform the quantitative detection of nitrite in the presence of cysteine. These compounds inhibited platelet aggregation induced by ADP with greater potency compared to positive control, and less bleeding time than ASA. The potency of these compounds together with the absence of adverse effects, provide to spacers *N*-acilhidrazonas greater effectiveness in respect of the antiplatelet therapy available.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 14
1.1 Epidemiologia 14
1.2 Aterosclerose: fator de risco para o desenvolvimento de aterotrombose 14
1.3 Hemostasia: agregação plaquetária, coagulação e formação do trombo 16
1.4 Terapia preventiva para aterotrombose 18
1.4.1 Fármacos fibrinolíticos 18
1.4.2 Fármacos anticoagulantes 19
1.4.3 Fármacos antiagregantes plaquetários 20
1.4.4 Espaçador *N*-acilhidrazona usado como antiagregante plaquetário 22
1.4.5 Heterocíclicos aromáticos: 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido doadores de óxido nítrico 23
1.5 Hibridação molecular na obtenção de novos compostos antiagregantes plaquetários 25
2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL 27
3. OBJETIVOS 28
4. MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 Reagentes e solventes 29
4.2 Métodos Analíticos 29
4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) 29
4.2.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN) 29
4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 29
4.2.4 Espectrometria de Massas 30
4.2.5 Espectrofotometria no Infravermelho 30
4.3 Metodologia sintética 31
4.3.1 Síntese do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano) 32
4.3.2 Planejamento para síntese dos derivados furoxânicos 33
4.3.3 Purificação dos derivados furoxânicos 35
4.3.4 Síntese dos espaçadores *N*-acilhidrazonas 35
4.3.5 Síntese dos compostos híbridos finais 36
4.3.6 Purificação dos compostos híbridos **51** e **52** 37
4.4 Avaliação inibitória da agregação plaquetária 37
4.4.1 Obtenção das plaquetas lavadas 37
4.4.2 Agregação Plaquetária 38
4.5 Avaliação do tempo de sangramento 38
4.6 Avaliação indireta da capacidade doadora de óxido nítrico 38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
5.1 Síntese do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano) 39
5.2 Planejamento para a síntese dos derivados furoxânicos 40

5.3 Síntese dos espaçadores N-acilhidrazonas 44
5.4 Síntese dos compostos híbridos 46
5.5 Identificação Estrutural.....47
5.5.1 3,4-bisaril-sulfonil-furoxano (**34**) 47
5.5.2 Derivados furoxânicos 38-40 49
5.5.2.1 Derivado furoxânico **38** 49
5.5.2.2 Derivado furoxânico **39** 51
5.5.2.3 Derivado furoxânico **40** 52
5.5.3 Espaçadores *N*-acilhidrazonas **44**-**49** 54
5.5.3.1 *N*-acilhidrazona **44** 54
5.5.3.2 *N*-acilhidrazonas **45 e 46** 57
5.5.3.2.1 *N*-acilhidrazona **45** 57
5.5.3.2.2 *N*-acilhidrazona **46** 60
5.5.3.3 *N*-acilhidrazona **47** 62
5.5.3.4 *N*-acilhidrazonas **48 e 49** 65
5.5.3.4.1 *N*-acilhidrazona **48** 65
5.5.3.4.2 *N*-acilhidrazona **49** 68
5.5.4 Compostos híbridos **51** e **52** 70
5.5.4.1 Composto híbrido **51** 70
5.5.4.2 Composto híbrido **52** 71
5.6 Inibição da agregação plaquetária 72
5.7 Avaliação do tempo de sangramento 73
5.8 Avaliação indireta da capacidade doadora de óxido nítrico 74
6 CONCLUSÕES 77
7 PERSPECTIVAS 78
REFERÊNCIAS 79
ANEXOS 84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese de colesterol catalisado por HMG-CoA redutase 15
Figura 2. (A) processo de adesão e agregação plaquetária; (B) formação trombina e fibrina através dos fatores de coagulação; (C) degradação de fibrina por plasmina e (D) formação de trombo (adaptado de Charo e Taub, 2011).....18
Figura 3. Fármacos utilizados na terapia antiagregante plaquetária 21
Figura 4. Compostos antiagregantes plaquetários contendo o espaçador *N*-acilhidrazona .23
Figura 5. Formas isoméricas de oxadiazóis.....23
Figura 6. Estrutura de furazana (**A**) e equilíbrio tautomérico de furoxanos (**B**) (Cerecetto e Porcal, 2005).....24
Figura 8. Compostos antiagregantes plaquetários obtidos por hibridação molecular.....26
Figura 9. Espectro de RMN de ^{1}H obtido pelos procedimentos 1 e 2.....41
Figura 10. Espectro de RMN de ^{1}H obtido pelos procedimentos 3 e 4.....42
Figura 11. Sinais no espectro de RMN de ^{1}H na formação do derivado furoxânico **40** 43
Figura 12. Espaçadores *N*-acilhidrazonas obtidas por adição nucleofílica a carbonila.....45
Figura 13. Estruturas químicas dos compostos híbridos **51** e **52**.....47
Figura 14. Principais correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR para *N*-acilhidrazona **44** 55
Figura 15. Principais correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR para *N*-acilhidrazona **45** 58
Figura 16. Principais correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR para *N*-acilhidrazona **46** 60
Figura 17. Principais correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **47** 63
Figura 18. Principais correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **48** 66
Figura 19. Principais correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **49** 68
Figura 20. Principais correlações no mapa de contornos HMBC de *N*-acilhidrazona **51**.....71
Figura 21. Principais correlações no mapa de contornos HMBC de *N*-acilhidrazona **52**.....72
Figura 22. Porcentagem de agregação plaquetária para os compostos **44**-**49** 73
Figura 23. Relação entre as posições *meta* e *para* na atividade antiagregante plaquetária.73
Figura 24. Avaliação do tempo de sangramento para os compostos **44**-**49**.....74
Figura 25. Curva com soluções padrão de nitrito de sódio (10-80 nMol/mL).....76
Figura 26. Porcentagem de doação de NO pelos compostos **44**-**49** na presença de cisteína 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimentos utilizados para a síntese dos derivados furoxânicos 33
Tabela 2. Rendimentos obtidos na síntese dos derivados furoxânicos de **38**-**40**.....43
Tabela 3. Rendimentos de *N*-acilhidrazonas **44**-**49**.....45
Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **34** ($CDCl_3$) 48
Tabela 5. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **38** ($CDCl_3$) 50
Tabela 6. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **39** ($CDCl_3$) 52
Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **40** (DMSO-d_6).....53
Tabela 8. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **44** (DMSO-d_6)....56
Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **45** (DMSO-d_6)....59
Tabela 10. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **46** (DMSO-d_6)..61
Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **47** (DMSO-*d6*) .64
Tabela 12. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **48** (DMSO-*d6*) .67
Tabela 13. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **49** (DMSO-d_6)..69

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Compostos planejados por hibridação molecular.....27
Esquema 2. Metodologia geral para obtenção dos compostos híbridos finais 31
Esquema 3. Etapas sintéticas para preparação do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano)...32
Esquema 4. Esquema geral de síntese na obtenção dos derivados furoxânicos.....33
Esquema 5. Esquema geral para obtenção dos espaçadores *N*-acilhidrazonas.....35
Esquema 6. Esquema geral para obtenção dos compostos híbridos **51** e **52**.....36
Esquema 7. Mecanismo de reação por SN^2 para formação do ácido feniltioacético.....39
Esquema 8. Mecanismo de S_NAr em furoxanos 40
Esquema 9. Mecanismo de reação para formação do grupo imínio presente em *N*-acilhidrazonas 44
Esquema 10. Mecanismo reacional de esterificação para obtenção dos compostos híbridos (adaptado de Hassner e Alexanian, 1978; Valeur e Bradley, 2009).....46
Esquema 11. Mecanismo doação de NO proposto para anel furoxânico (adaptado de Feelish et al., 1992).....75

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Ácido acetilsalicílico

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

ADP- Difosfato de Adenosina

apo B/E – Apoproteína B/E

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CC-FN - Cromatografia em Coluna de Fase Normal

$CDCl_3$ – Clorofórmio deuterado

CMC – Carboximetilcelulose

COX-1 – Ciclooxigenase 1

d – Dubleto

DBU – 1,8-Diazabiciclo[5.4.0]7-undecano

DCM – Diclorometano

dl – Dubleto largo

DMAP – Dimetilaminopiridina

dd – Duplo-dubleto

DMSO – d_6 – Dimetil-sulfóxido hexadeuterado

EDC – *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodimida

ESI-TOF – Ionização por eletrospray-time of flight

Et_3N – Trietilamina

EtOH – Etanol

fvW – Fator de von Willebrand

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

HAc – Ácido acético

HETCOR – Correlação Heteronuclear

HETCOR – LR - Correlação Heteronuclear a Longa Distância

HMBC – Correlação de múltipla ligação heteronuclear

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

HOMODEC – Desacoplamento Homonuclear entre H-H

HSQC – Correlação quântica única heteronuclear

Hz – Hertz

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

IL-6 – Interleucina 6

Il-1β – Interleucina 1 beta

IFN-Ɣ – Interferon gama

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

kV - Kilovolts

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

Lp-PLA_2 – Lipoproteina associada a fosfolipase A_2

m - Multipleto

MHz – Mega hertz

m/z – Relação carga/massa

mult. – Multiplicidade

NaH – Hidreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NA-TFA – Solução de ácido tetrafluoracético e sódio

NO – Óxido nítrico

PAR – Receptor ativado por protease

PGH_2 - Prostaglandina H_2

PLA_2 - Fosfolipase A_2

ppm – Parte por milhão

RMN de ^{1}H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN de ^{14}N - Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio Catorze

s - Singleto

S_NAr – Substituição nucleofílica aromática

td – triplo-dubleto

THF - Tetrahidrofurano

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

tt – Triplo-tripleto

TXA_2 – Tromboxano A_2

Tromboxano sintase –TXAS

V - Volts

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular -1

µL – Microlitro

µL/h – Microlito por hora

δ_C - Deslocamento químico de carbono

δ_H – Deslocamento químico de hidrogênio

$[M+H]^+$ - Molécula protonada

$[M+Na]^+$ - Molécula protonada com íon sódio

INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares são umas das maiores causas de morte em todo o mundo e em 2009 representaram 31% de todos os óbitos, sendo que infarto do miocárdio foi responsável por 38-46% e doenças cerebrovasculares representaram 34-37%. Países como Brasil, Bolívia, Uruguai e Argentina apresentaram taxa de mortalidade de aproximadamente 240-360/100.000 habitantes (para homens) e 180-280/100.000 habitantes (para mulheres). Rússia e alguns países da áfrica lideraram a taxa de mortalidade com 440-860 mortes/100.000 habitantes (para homens) e 370-711/100.000 habitantes (para mulheres) (WHO, 2011).

No Brasil, as doenças cardiovasculares ainda representam a principal causa de morte, sendo que em 2007 foram registrados 1.157.509 de internações no Sistema Único de Saúde (SUS) devido a infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico, das quais 308.466 pessoas foram a óbito. Em 2009 ocorreram 91.970 internações em serviços de maior complexidade no SUS levando a um custo total de R$ 165.461.644,33 (DBH, 2010).

Pesquisa realizada por Lozano e colaboradores (2012), apontou que de 1990-2010 a taxa de mortalidade global causada por infarto do miocárdio e doenças cerebrovasculares aumentou de 17 para 28% (LOZANO et al., 2012).

1.2 Aterosclerose: fator de risco para o desenvolvimento de aterotrombose

O processo aterosclerótico se desenvolve após desregularão na via biossintética do colesterol, o qual se encontra em níveis alterados no plasma. O colesterol pode ser adquirido na dieta, mas todas as células do corpo são capazes de produzir colesterol, sendo que a maior parte é biossintetizada no fígado (Nelson e Cox, 2011). A etapa crucial para a formação do colesterol é a conversão de HMG-CoA em mevalonato, catalisada por HMG-CoA redutase, para a produção de colesterol intracelular (Figura 2). Uma vez o colesterol formado, este segue diversos caminhos: **1)** o colesterol formado em tecido extra-hapáticos é utilizado para compor membranas, formação de hormônios e armazenado após a esterificação pela acil-CoA-colesterol-aciltransferase (ACAT); **2)** o colesterol hepático é esterificado pela ACAT e transportado no plasma até os tecidos extra-hepáticos por lipoproteínas de baixa densidade, a LDL (Nelson e Cox, 2011) (Figura 1).

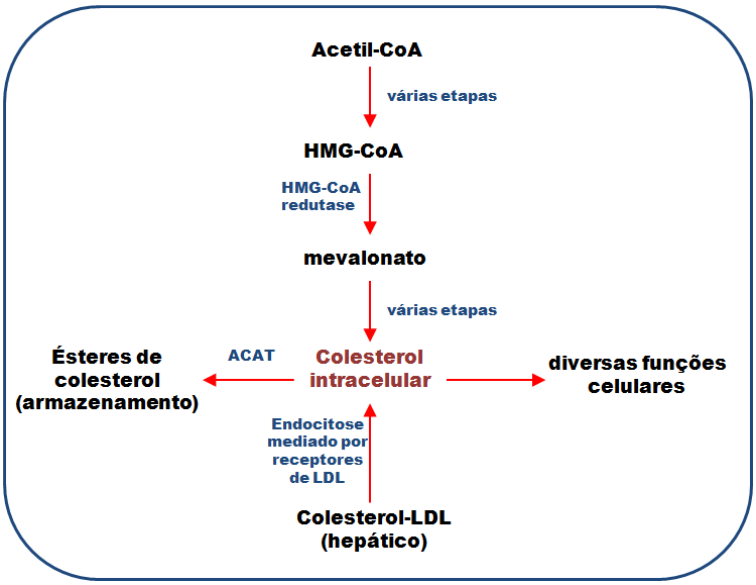


Figura 1. Biossíntese de colesterol catalisado por HMG-CoA redutase

A LDL circulante é reconhecida por receptores de LDL encontrados na superfície celular, e após este processo ambos são transferidos para o interior da célula, evento conhecido como endocitose. Os ésteres de colesterol no interior celular são hidrolisados em colesterol livre, e os receptores de LDL retornam à superfície para atuar novamente na captação de LDL. Níveis ideais de colesterol intracelular regulam a sua biossíntese inibindo a atividade da HMG-CoA redutase. Por outro lado, altos níveis de colesterol intracelulares ativam ACAT, que aumentam a formação de ésteres de colesterol para armazenamento. No entanto, níveis de colesterol aumentados na célula inibem a transcrição do gene que codifica o receptor de LDL, o qual reduz a produção do receptor e a captação de LDL plasmática, levando a um estado de hipercolesterolemia isolada. Através de reações induzidas por radicais livres, o colesterol em excesso no plasma é oxidado em lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL_{ox}) e pode ser acumulada na camada íntima dos vasos iniciando o processo de aterosclerose (PENG et al., 1991). O colesterol livre também pode ser oxidado na camada subíntima dos vasos pelas enzimas PLA_2 (fosfolipase A_2) e por Lp-PLA2 (lipoproteína associada a fosfolipase A_2) (CHARO e TAUB, 2011).

Um fator importante para a formação da placa aterosclerótica é o processo de expressão de molécula de adesão (VCAM-1) e selectina E. Essas moléculas são encontradas no endotélio vascular e são responsáveis por promover adesão de monócitos circulantes. Após a adesão, os monócitos migram para a camada subíntima das artérias e vasos transformando-se em macrófagos, que fagocitam LDL_{ox} através de receptores de varredura (*scanvenger receptors*), transformando-se em células espumosas (*foam cells*) que

são depositadas na parede de artérias e vasos. As células espumosas secretam TNF-α e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1-β, as quais promovem aumento da expressão de VCAM-1 e selectina E endotelial, dando início a um processo inflamatório crônico (LIBBY, 2002).

Outra interleucina secretada pelas células espumosas é a IL-6 que tem a função de ativar linfócitos T. Após ativação, os linfócitos T se ligam especificamente em selectina E endotelial e migram para a camada íntima. LDLs oxidadas se ligam a linfócitos T por receptores de antígeno, e este processo permite que a célula libere diversas citocinas, como IFN-γ, capaz de reduzir o colesterol intracelular agindo nos receptores de varredura presente em macrófagos (DOUGLAS, 2000).

As células musculares lisas (ou miofibroblastos) participam do processo de formação do ateroma de modo que estas podem migrar da camada média para a íntima dos vasos e dar início a um processo de proliferação. Os miofibroblastos na íntima podem acumular lipídeos devido à presença de receptores de LDL (apo B/E), adquirir aspecto de célula espumosa e ser acumulado no local de formação do ateroma. Além disso, as células musculares lisas produzem colágeno, e ambos formam uma cápsula fribrosa que revestem a placa aterosclerótica (LIBBY, 2011).

O crescente acúmulo celular na camada íntima se estende para outras camadas até atingir a luz do vaso, podendo diminuir seu calibre e acarretar na ruptura da placa aterosclerótica. Após o rompimento do endotélio há o extravasamento do conteúdo da placa para a circulação que pode levar a formação de trombo através do processo de agregação plaquetária. A formação de trombo no local da lesão endotelial interrompe o fluxo sanguíneo em artérias e vasos, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e doenças cerebrovasculares (MARTINELLI et al., 2010; LIBBY, 2011).

1.3 Hemostasia: agregação plaquetária, coagulação e formação do trombo

O rompimento da integridade do endotélio acarreta no extravasamento do conteúdo da placa que contém proteínas de adesão plaquetária, como colágeno e fator de von Willebrand (fvW). A adesão de plaquetas no local da lesão se torna estável, uma vez que a célula altera sua topografia, passando de um estado discoide para esférico, promovendo a expansão de sua superfície na área lesada formando um pseudo-endotélio, reativo para o recrutamento de novas plaquetas circulantes (DOPHEIDE et al., 2001) (Figura 2).

O fvW é produzido e liberado pelo endotélio sendo crucial para a agregação plaquetária, sendo que este se liga ao receptor GP Ib-IX-V na superfície plaquetária promovendo a adesão. A interação do colágeno com seus receptores específicos GPVI e

GPIa-IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$) também promove a adesão, ativação das plaquetas e agregação. (Figura 3) (WAGER E BURGER, 2003).

A sinalização gerada após a interação celular de colágeno e fvW com seus receptores acarreta na agregação plaquetária mediada por outros dois agonistas: **1)** Difosfato de Adenosina (ADP), o qual é sintetizado pelas plaquetas e quando liberado se liga a receptores P_2Y_{12} encontrados na superfície plaquetária, promovendo agregação; **2)** Tromboxano A_2 (TXA_2) obtido pela via do ácido araquidônico. O TXA_2 é formado nas plaquetas em duas etapas. Na primeira a enzima cicloxigenase-1 (COX-1) catalisa a biotransformação do ácido araquidônico em prostaglandina H_2 (PGH_2), sendo esta ultima, em uma segunda etapa, metabolizada pela tromboxano sintase (TXAS) das plaquetas para originar TXA_2. O TXA_2 é um indutor da agregação plaquetária que age nos receptores TP na superfície de plaquetas aumentando as concentrações intracelulares de cálcio e ativando a agregação plaquetária (NIESWANDT e WATSON, 2003) (Figura 2). Após a ativação plaquetária pelos agonistas em receptores específicos, a interação de fibrinogênio com o receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ de outra plaqueta é aumentado. O complexo fibrinogênio- $\alpha_{IIb}\beta_3$ promove a interação cruzada plaqueta-plaqueta amplificando o agregação plaquetária (Figura 2).

Além da agregação plaquetária no endotélio lesado, este expõe o fator tecidual (FT) que inicia o sistema de coagulação. As plaquetas potencializam o sistema da coagulação ao secretar os fatores de coagulação armazenados, levando à geração de trombina. Na primeira etapa, o fator VIIa circulante se liga ao FT para ativar os fatores X e IX, convertendo-os em fatores IXa e Xa. No interior das plaquetas, o fator X também é substrato da enzima VIIIa para levar a formação do fator Xa. Este juntamente com o fator Va cliva duas ligações peptídicas na protombina (fator II), convertendo-a em trombina (fator IIa) (Figura 2).

A formação de trombina converte fibrinogênio em fibrina, o qual é caracterizado por uma ‘rede’ que reforça o agregado plaquetário e o prende ao endotélio (Figura 2). A trombina ainda age como um potente agonista da agregação plaquetária ao ativar os receptores ativados por proteases (PARs) elevando as concentrações de cálcio intracelular. As plaquetas humanas expressam PAR1 e PAR4, sendo que PAR1 gera respostas plaquetárias em baixas concentrações de trombina, enquanto que PAR4 é ativado em altas concentrações (SAVAGE, 2001) (Figura 2).

Paralelamente à formação de fibrina, o processo de fibrinólise é ativado para degradar fibrina através da ação de plasmina. O ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) é secretado pelo endotélio e converte plasminogênio em plasmina. Na presença de fibrina, a plasmina se liga aos resíduos de lisina (domínios kringle) para promover a sua degradação. A degradação de fibrina pode ser contida pela α_2-antiplasmina (secretada no fígado), o qual esta se liga a fibrina impedindo a atividade da plasmina.

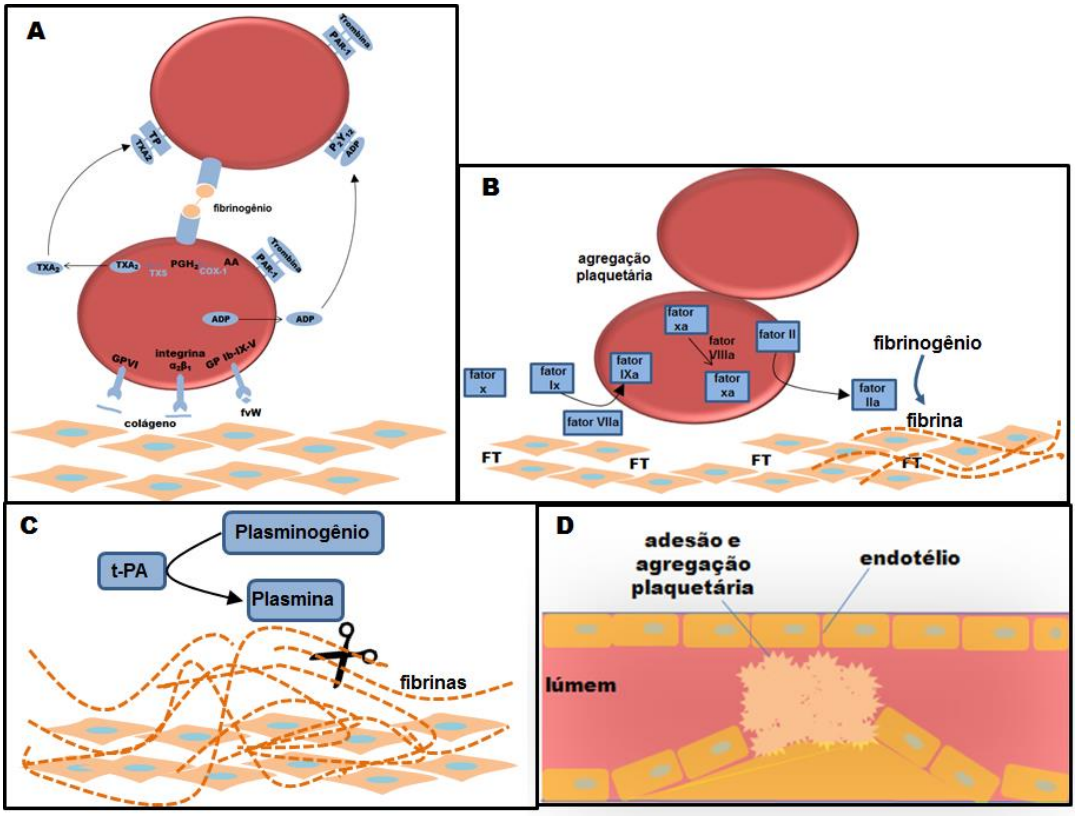


Figura 2. (**A**) processo de adesão e agregação plaquetária; (**B**) formação trombina e fibrina através dos fatores de coagulação; (**C**) degradação de fibrina por plasmina e (**D**) formação de trombo (adaptado de Charo e Taub, 2011)

1.4 Terapia preventiva para aterotrombose

1.4.1 Fármacos fibrinolíticos

Os fármacos fibrinolíticos são proteínas capazes de degradar fibrina aumentando concentrações de plasmina. Esse mecanismo de ação permite dissipar o trombo formado e reestabelecer o fluxo sanguíneo. A exemplo desses fármacos podemos citar: estreptoquinase, um proteína secretada por várias espécies de *streptococcus* que cliva o resíduo de Arg^{560} no sítio ativo do plasminogênio, convertendo-o em plasmina (Rang et al., 2012).

A alteplase e ruteplase são administrados intravenosamente e são fármacos compostos pelo ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). Altas doses desses fármacos levam a grande produção de plasmina. A plasmina é uma protease inespecífica que além de degradar fibrina no processo trombótico, pode dissipar outras proteínas plasmáticas como fatores de coagulação. A redução das concentrações dos fatores de coagulação prejudica a capacidade para a formação de trombina, que pode levar ao sangramento. Devido a este

efeito, os fármacos fibrinolíticos produzem hemorragias como seu principal efeito adverso (Range t al., 2012).

A α_2-antiplasmina inibe cerca de 50% a atividade de plasmina, desde que o sítio ativo desta última não esteja ocupado pela fibrina. Ao contrário, o inibidor sofre depleção e a plasmina compromete a hemostasia com degradação de fibrina e fibrinogênio, fatores que aumentam o sangramento (Brunton eo al., 2012).

1.4.2 Fármacos anticoagulantes

Os fármacos anticoagulantes são divididos em duas classes terapêuticas, parenterais, que incluem heparina e seus derivados e derivados de hirudina, anticoagulantes orais, como varfarina, etexilato de dabigatrana e rivarobaxana.

A heparina e seus derivados como heparina de baixo peso molecular (HBPM) e o fondaparinux, são compostos que ativam a antitrombina. A antitrombina é um polipeptídeo glicosilado que degrada os fatores da coagulação, levando a redução da concentração de trombina. Como resultado final, têm-se uma redução atenuada na formação de fibrina e dissipação do trombo formado. O sangramento é o principal efeito colateral presente nestes fármacos (Brunton et al., 2012).

A lepirudina, desirudina, e bivalirudina são fármacos derivados da hirudina, um polipeptídeo encontrado nas glândulas salivares da sanguessuga. Esses compostos inibem a coagulação por atuar como antagonistas de trombina e apresentam altas taxas de sangramento como efeito adverso (Brunton et al., 2012).

A vitamina K encontrada em frutas e hortaliças constitui um papel importante na coagulação sendo fundamental para a síntese hepática da pró-trombina e fatores da coagulação (VII, IX e X). Durante o metabolismo a vitamina K é reduzida para sua forma ativa (hidroquinona) pela enzima vitamina K redutase. A varfarina é um anticoagulante oral derivado de cumarinas e antagonista da vitamina K. A varfarina inibe a enzima vitamina k reduatase bloqueando a redução do epóxido em hidroquinona, sua forma ativa. O sangramento também o principal efeito adverso da varfarina (Range et al., 2012).

O etexilato de dabigatrana (antagonista de trombina) e rivaroxabana (inibidor do fator Xa) são anticoagulantes orais destinados para prevenção de trombose em pacientes submetidos a cirurgias de quadril e joelho. Estudos mostraram que os fármacos foram superior a varfarina na prevenção de acidente vascular cerebral com menor risco e sangramento (Range t al., 2012).

1.4.3 Fármacos antiagregantes plaquetários

A terapia antiagregante plaquetária é composta por diversas classes de fármacos que incluem antagonistas de integrina αIIbβ3, antagonistas de trombina, inibidores da biossíntese de tromboxanos e antagonistas de receptor P_2Y_{12}.

A classe de inibidores de integrina αIIbβ, receptor do fibrinogênio e do fvW, agem inibindo agregação plaquetária induzida por qualquer agonista e, por isso, essa classe é constituída pelos antiplaquetários mais potentes disponíveis, como o tirofibano (**1**). Esses fármacos apresentam baixa biodisponibilidade oral limitando a utilização por via parenteral. Apresentam ainda e efeitos adversos graves como elevadas taxas de sangramento (Figura 3) (HAMILTON, 2009).

O ximelagatran (**2**) é um antagonista dos receptores de trombina que se mostra mais potente que o AAS, mas apresenta elevada taxa de hepatotoxicidade (Figura 3) (HO e BRIGHTON, 2006). Um inibidor reversível de receptores de trombina foi descoberto, o vorapaxar (**3**) (Figura 3). No período de 2007-2009 este composto passou por estudos de fase clínica III financiado pela Merck®, onde um total de 26.449 pacientes com histórico de eventos cardiovasculares foram tratados. Nestes pacientes, o vorapaxar diminuiu os ricos de eventos isquêmicos, mas apresentou elevada taxa de sangramento quando comparado com pacientes que receberam placebo (CHACKALAMANNIL et al., 2008; MORROW et al., 2012).

Entre os antagonistas do receptor de ADP (P_2Y_{12}) disponíveis na terapia temos: a ticlopidina (**4**), clopidogrel (**5**), prasugrel (**6**) e cangrelor (**7**) (Figura 3). A ticlopidina inibe irreversivelmente esse receptor e seu uso clínico está restrito devido ao surgimento de neutropenia e trombocitopenia em alguns indivíduos. O clopidogrel e prasugrel são pertencentes à classe das tienopiridinas, e são utilizados como agentes antitrombóticos (HAMILTON, 2009). O cangrelor é um análogo de adenosina trifosfato, um antagonista natural de receptores P_2Y_{12}. Este fármaco é administrado intravenosamente, exibindo um rápido início de ação (2 horas). No período de 2010-2012, o cangrelor foi submetido a estudos de fase clínica III, avaliando um total de 11,145 pacientes com riscos de doenças cardiovasculares, o qual demonstrou uma diminuição no desenvolvimento de eventos isquêmicos e trombose (DEEPAK et al., 2013).

O AAS (**8**) é um dos fármacos mais utilizados na aterotrombose para inibição da agregação plaquetária. Estima-se que somente nos Estados Unidos, mais de 50 milhões de pessoas, que correspondem a 36% da população adulta, administrem cerca de 10-20 bilhões de comprimidos regularmente por ano (Figura 3) (CAMPBELL et al.,2007).

O AAS inibe irreversivelmente a enzima COX-1 impedindo a formação de TXA_2 nas plaquetas ativadas. Especificamente, o AAS realiza uma acetilação a um resíduo de serina (Ser529) presente na COX-1 das plaquetas impedindo a ligação do ácido araquidônico ao sítio catalítico (Tyr385) (TANTRY et al., 2009).

O AAS apresenta efeitos colaterais como ulceração gástrica e sangramento devido seu uso em longo prazo. Tais efeitos colaterais são atribuídos à capacidade fibrinolítica, sendo que o AAS diminui as concentrações dos inibidores de plasminogênio-1, aumentando a atividade de plasmina (BUCZKO, et al., 2003). Estudos ainda apontam que o risco de eventos cardiovasculares em pacientes que usam AAS é alto, em torno de 8-18%. Esse dado sugere que o efeito antiagregante plaquetário do AAS pode não ser equivalente em todos os pacientes e que a diminuição na resposta à terapia com AAS esta associado com aumento dos riscos de eventos aterotrombóticos (PORTNARY et al., 2005).

A ausência de resposta à terapia com antiagregantes plaquetários tem sido denominada na literatura como “resistência”. Vários estudos corroboram que muitos indivíduos apresentam “resistência” ao AAS, não respondendo à terapia adequadamente (SHARMA et al., 2009). Evidências indicam que pacientes “resistentes” ao ácido acetilsalicílico tem entre quatro a cinco vezes mais chances de apresentar um evento aterotrombótico (BRISTER e BUCHANAN, 2009).

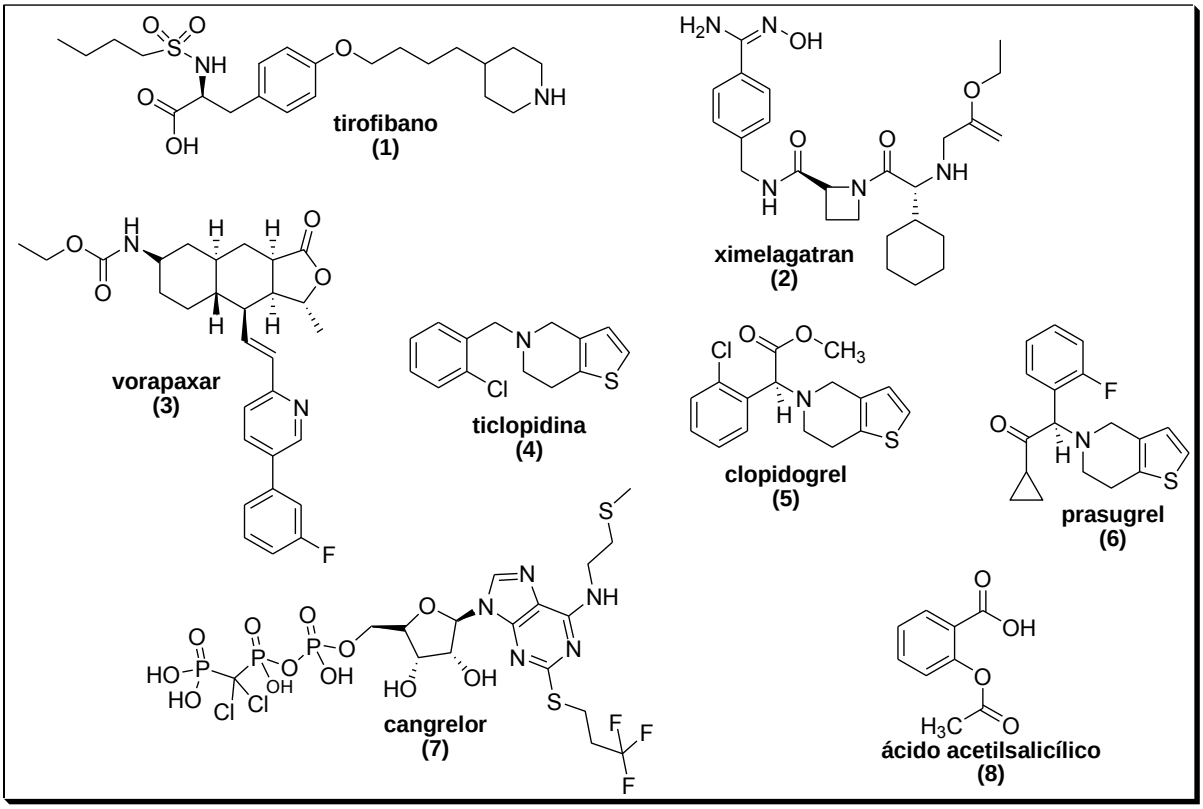


Figura 3. Fármacos utilizados na terapia antiagregante plaquetária

1.4.4 Espaçador *N*-acilhidrazona usado como antiagregante plaquetário

A subunidade *N*-acilhidrazona é considerada uma estrutura privilegiada devido o amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, anticonvulsivante, antimicrobiana, antitumoral, antitrombótica, analgésica, anti-inflamatória e antiagregante plaquetária (ROLLAS e KÜÇÜKGÜZEL, 2007; LIMA et al., 2008; BARREIRO et al., 2002). Diversos estudos têm demonstrado que a presença desta subunidade confere aos compostos aumento na atividade antiagregante plaquetária em ensaios de indução de agregação por ácido araquidônico e fator de agregação plaquetária (BARREIRO e FRAGA, 1999; SILVA et al., 2002; MIRANDA et al., 2003; ZAPATA-SUDO et al., 2003).

Alguns fármacos são comercializados contendo em sua estrutura a subunidade *N*-acilhidrazona, a exemplo do dantroleno (**10**) e nitrofural (**11**) (WARD *et al*., 1986; CHUNG et al., 2003). Entretanto, na literatura podemos encontrar diversos exemplos de moléculas contendo essa subunidade.

Derivados de dantroleno foram sintetizados a fim de se avaliar a capacidade da inibição de agregação de plaquetas, e o composto LASSBio-1221 (**12**) apresentou-se como potente inibidor da via do AA para esta atividade (Figura 4). A investigação da contribuição da subunidade *N*-acilhidrazona como antiagregante plaquetário levou a obtenção da estrutura LASSBio 785 (**9**) com ação potencializada desta atividade, uma vez que o composto inibiu a formação de TXA_2 na cascata do AA e a agregação de plaquetas induzida por colágeno (KUMMERLE, 2005; BRITO, 2005).

O provável mecanismo proposto para a atividade antiagregante dessa subunidade farmacofórica tem sido relacionado ao melhor reconhecimento pela COX-1 e consequentemente melhor perfil de inibição da enzima reduzindo a formação de TXA_2 (FRAGA et al., 2000). Outra proposta mecanística baseia-se na propriedade quelante da subunidade *N*-acilhidrazona que tem sido associada com o sequestro de cálcio intracelular das plaquetas interferindo no processo de ativação e agregação. Essa foi a proposta mecanística para descrever a atividade antiagregante das moléculas como LASSBio-2 (**13**) e LASSBio-160 (**14**) (Figura 4) (TODESCHINI et al., 1998).

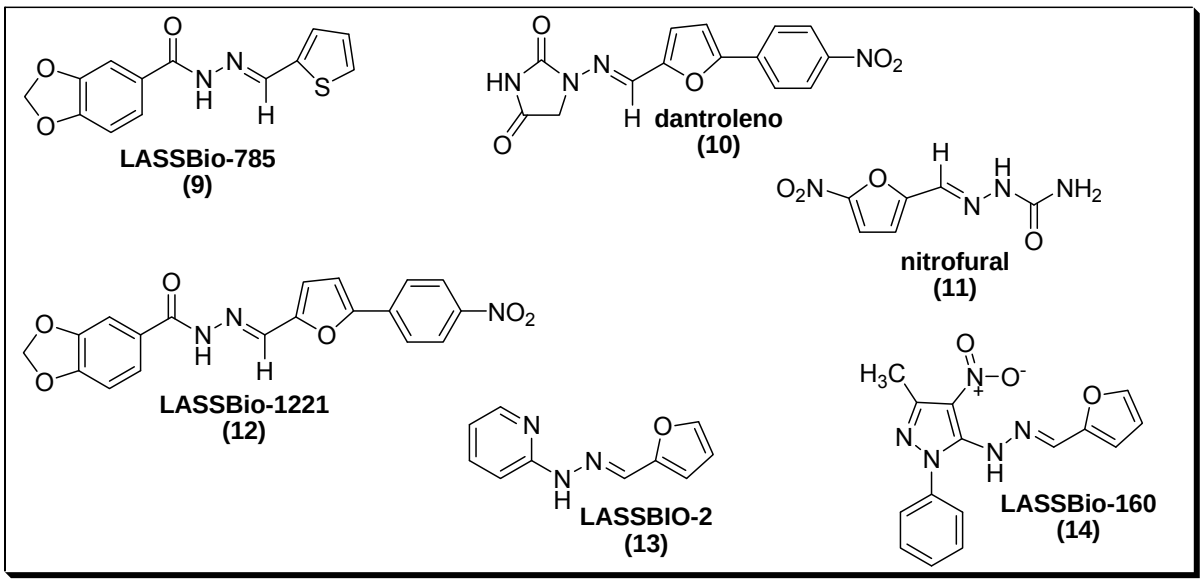


Figura 4. Compostos antiagregantes plaquetários contendo o espaçador *N*-acilhidrazona

1.4.5 Heterocíclicos aromáticos: 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido doadores de óxido nítrico

Compostos heterocíclicos aromáticos de anéis de cinco membros contendo um átomo de oxigênio e dois de nitrogênio são chamados de oxadiazóis. Os oxadiazóis são encontrados na forma de quatro isômeros, **15**, **16**, **17** e **18** (Figura 5). O isômero 1,2,5-oxadiazol (**17**), ou também conhecido como furazana, teve seu estudo iniciado na química orgânica em 1857 quando Kekulé sintetizou o primeiro composto contendo esta subunidade (GASCO e BOULTON, 1981; ARORA et al., 2013).

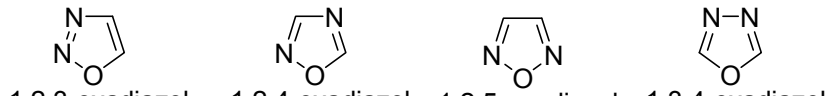


Figura 5. Formas isoméricas de oxadiazóis

A furazana é encontrada como uma molécula planar e possui sua densidade eletrônica concentrada sobre os heteroátomos (Figura 6A). O efeito indutivo permite que os átomos de carbono tenham menor densidade eletrônica, fornecendo à molécula maior reatividade frente à nucleófilos (SLIWA, 1984).

Os furoxanos são análogos de furazanas com a presença de um *N*-óxido em sua estrutura, sendo então conhecidos quimicamente como 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido. Assim como as furazanas, apresentam baixa reatividade frente à eletrófilos, e podem sofrer reação

de substituição nucleofílica aromática dependendo da substituição na cadeia lateral (GASCO e BOULTON, 1981).

Diferentemente das furazanas, os furoxanos apresentam capacidade de isomerização, também conhecido como equilíbrio tautomérico, e este fenômeno tem sido estudado utilizando-se técnicas como RMN de ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N e cristalografia (Figura 6). O tautomerismo envolve o 1,2-dinitroso como intermediário, sendo que os furoxanos requerem alta energia para sua interconversão (CERECETTO e PORCAL, 2005).

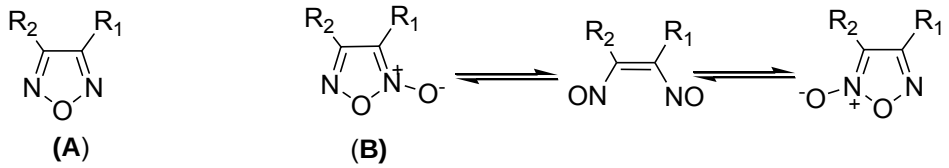


Figura 6. Estrutura de furazana (**A**) e equilíbrio tautomérico de furoxanos (**B**) (Cerecetto e Porcal, 2005).

Os furoxanos são estruturas de grande interesse na Química Farmacêutica & Medicinal, e nos últimos anos tem sido muito utilizados como protótipos para obtenção de novos compostos ativos. Um amplo espectro de atividades biológicas foi relatado por compostos contendo a subunidade 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido como atividade antimalárica (GALLI *et al*., 2005), antimicrobiana (CALVINO et al*.,* 1980), antichagásica (CERECETTO et al*.,* 1999), antineoplásica (BOZZO et al., 2009), antiagregantes plaquetários (CENA et al*.,* 2003) e propriedades vasodilatadoras (DEL GROSSO et al*.,* 2005; FRUTTERO et al*.,*1997; CENA et al*.,* 2004). Essas atividades farmacológicas são relacionadas em parte à capacidade de doação de óxido nítrico (NO) pelo anel furoxânico (CERECETTO e PORCAL, 2005).

A investigação da propriedade antiagregante plaquetária de furoxanos (**20**) (Figura 7) foi realizada por Civelli e colaboradores, os quais relataram a inibição da agregação induzida por ADP, colágeno, fator de ativação de plaquetas, além de aumentar os níveis de GMPc (CIVELLI et al., 1994). Após esses dados, diversos outros compostos derivados do anel furoxânico foram obtidos e avaliados como antiagregante plaquetários, como **21** (SORBA et al., 1996), **22** e **23** (CENA *et al*., 2002) e **24** (Figura 7) (DELL GROSSO et al., 2005).

A síntese de pró-fármacos entre ácido acetilsalicílico e furoxanos (**25** e **26**) é descrita na literatura. Esses compostos inibiram a agregação plaquetária em plasma humano e apresentaram atividade anti-inflamatória sem os efeitos gastroulcerativos presentes no AAS (Figura 7) (CENA et al., 2003; LAZZARATO et al., 2011).

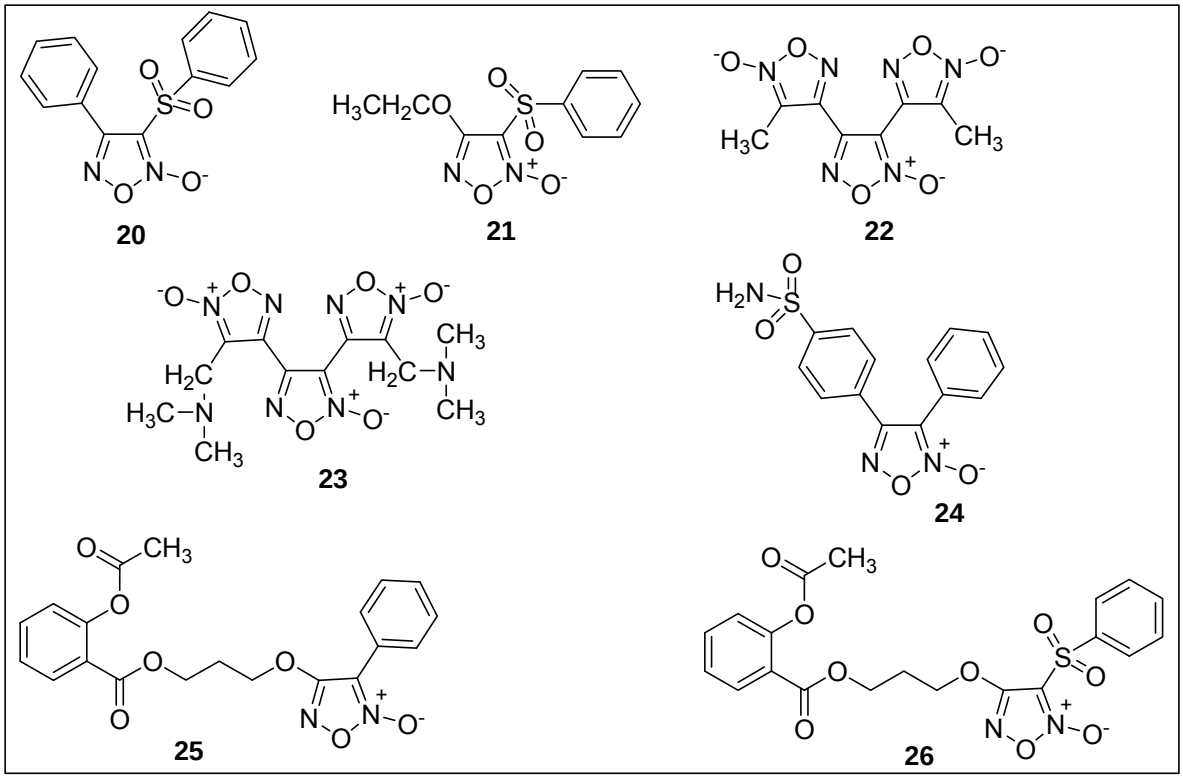


Figura 7. Compostos derivados de 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido antiagregantes plaquetários

1.5 Hibridação molecular na obtenção de novos compostos antiagregantes plaquetários

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos a modificação molecular se mostra como uma das mais promissoras (WERMUTH, 2004). Entre os processos de modificação molecular destacam-se: hibridação, latenciação, bioisosterismo entre outros (SANTOS, 2009). A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos em uma única molécula. Essa estratégia tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (STRUPEZEWSKI, 1991).

Os fármacos disponíveis atualmente como antiagregantes plaquetários inibem apenas uma via de ativação de plaquetas, entretanto outros mediadores atuam ativando o efeito agregante como, por exemplo, adenosina difosfato (ADP), trombina, colágeno, TXA_2 e fator de agregação plaquetária (PAF). Como as vias para ativação da agregação plaquetária são múltiplas, a estratégia farmacológica que atua inibindo apenas uma única via não poderá prevenir a ocorrência de todos os eventos trombóticos (TRANTRY et al., 2009). Assim,

estratégias terapêuticas que atuam simultaneamente em mais de um alvo dentro das plaquetas possuem maior probabilidade de apresentar a ação múltipla desejada.

Lima e colaboradores (2008) sintetizaram uma série de compostos obtidos por hibridação molecular entre o ximelagatran e arilsulfonatos com importantes propriedades antitrombóticas e antiagregante plaquetária. O tratamento prévio com dois dos compostos (**27** e **28**) (Figura 8) avaliados em modelo de trombose *in vivo* foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos em 80% (LIMA et al., 2008).

Usando a estratégia de hibridação molecular, em nosso grupo de pesquisa Rosseto (2011) sintetizou uma série de novos derivados do AAS espaçados pela subunidade *N*-acil hidrazona com propriedades doadoras de NO (**29** e **30**). Esses compostos demonstraram pequena capacidade de doação de óxido nítrico, entretanto, foram capazes de inibir a agregação de plaquetas induzidas pelo ADP, além de demonstraram atividade analgésica e anti-inflamatória sem efeito gastroulcerante (Figura 8) (resultados não publicados).

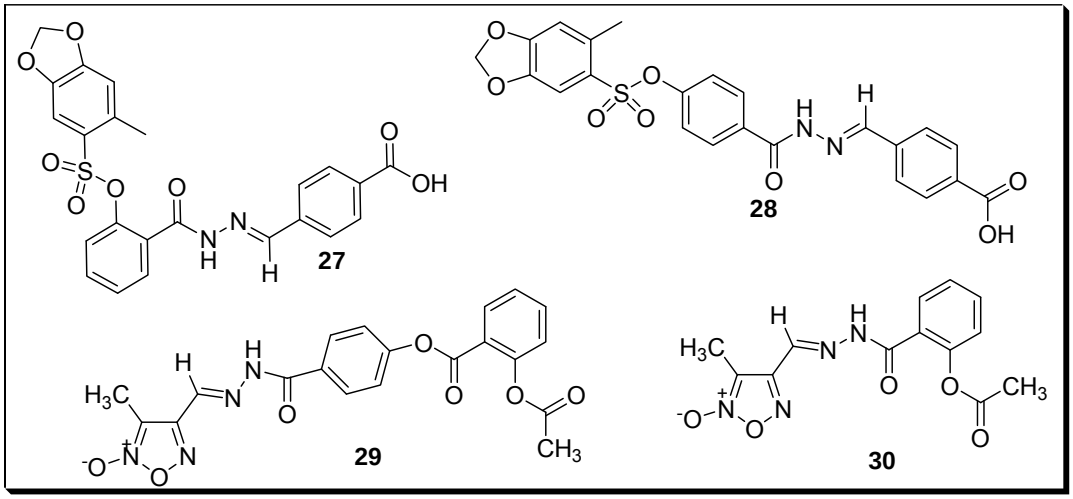
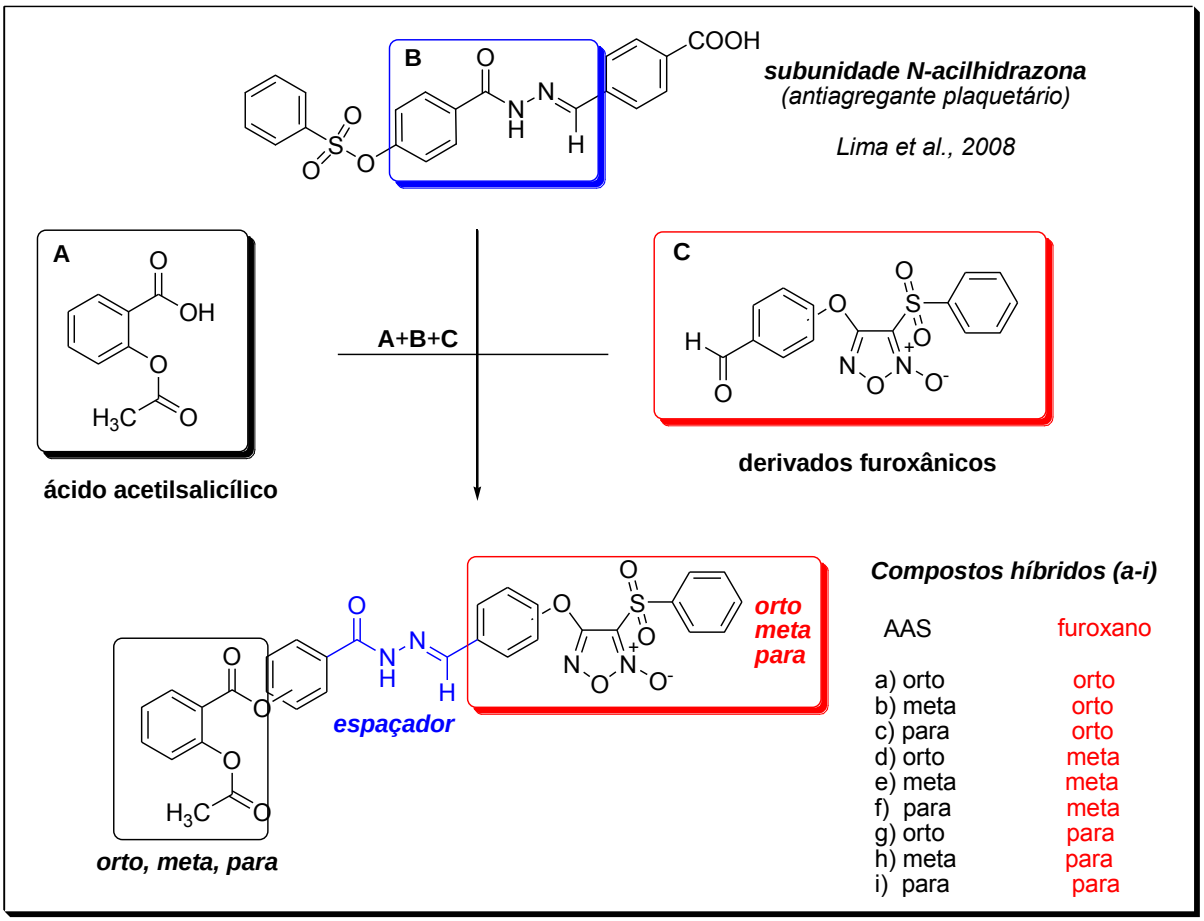


Figura 8. Compostos antiagregantes plaquetários obtidos por hibridação molecular

2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Utilizando a estratégia de hibridação molecular, foi planejada uma nova série de compostos derivados do ácido acetilsalicílico contendo três subunidades farmacofóricas: a) do fármaco ácido acetilsalicílico utilizado como antiagregante plaquetário, o qual é um inibidor da formação de TXA_2, representado pela subunidade **A**; b) espaçador contendo a subunidade *N*-acilhidrazona, descrita como antiagregante plaquetária (**B**); c) e o núcleo furoxânico **C** como doador de óxido nítrico, capaz de inibir a agregação de plaquetas (Esquema 1).



Esquema 1. Compostos planejados por hibridação molecular

O objetivo do planejamento estrutural é obter compostos derivados do ácido acetilsalicílico, mais potentes e seguros para serem usados como antiagregantes plaquetários.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho visa o desenvolvimento de novos compostos para tratamento e prevenção da aterotrombose através do planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos derivados do ácido acetilsalicílico com propriedades doadoras de óxido nítrico, contendo a subunidade *N*-acilhidrazona.

3.2 Objetivos específicos

- Síntese, isolamento e caracterização estrutural dos compostos híbridos (**a**-**i**);
- Avaliação da capacidade doadora de óxido nítrico pelos compostos híbridos (**a**-**i**);
- Avaliação da atividade antiagregante plaquetária induzida por ADP

pelo compostos híbridos (**a**-**i**);

- Avaliação do tempo de sangramento dos compostos híbridos (**a**-**i**);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados no procedimento de síntese e purificação foram adquiridos comercialmente da Sigma Aldrich® e Merck®. Os reagentes e solventes foram: tiofenol, ácido monocloracético, NaOH, água destilada, tetrahidrofurano, NaH, acetato de etila, etanol, ácido acético, peróxido de hidrogênio 30%, ácido nítrico fumegante, 2-hidroxi-benzaldeído, 3-hidroxi-benzaldeído, 4-hidroxi-benzaldeído, trietilamina, DBU, diclorometano, hexano, dimetilsulfóxido hexadeuterado e clorofórmio deuterado.

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para realização da cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foram utilizadas cromatoplacas de gel de sílica em folhas de alumínio de 250 µm (Whatman®), e a fase móvel foi estabelecida para cada composto analisado. Após eluição das cromatoplacas, estas foram visualizadas em câmara de luz ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 e 365 nm.

4.2.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN)

Na purificação por cromatografia em coluna de fase normal, empregou-se como suporte cromatográfico gel de sílica com tamanho de partícula de 40-60 µm (“Flash”), (Across Organics®), sendo esta suspensa em hexano e em seguida transferida para uma coluna de vidro, mantendo-se o fluxo até sua estabilização e empacotamento completo do suporte cromatográfico.

4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os compostos tiveram suas estruturas moleculares determinadas por meio das análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional de ^{1}H, ^{13}C e HOMODEC, e bidimensional, HETCOR e HETCOR-LR. Os espectros foram obtidos em espectrômetro Varian® INOVA 11,7 T operando a 300 MHz para os núcleos de ^{1}H e 75 MHz

para ^{13}C. Os solventes utilizados na solubilização das amostras para a obtenção dos espectros foram dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO – d_6) e clorofórmio deuterado ($CDCl_3$).

4.2.4 Espectrometria de Massas

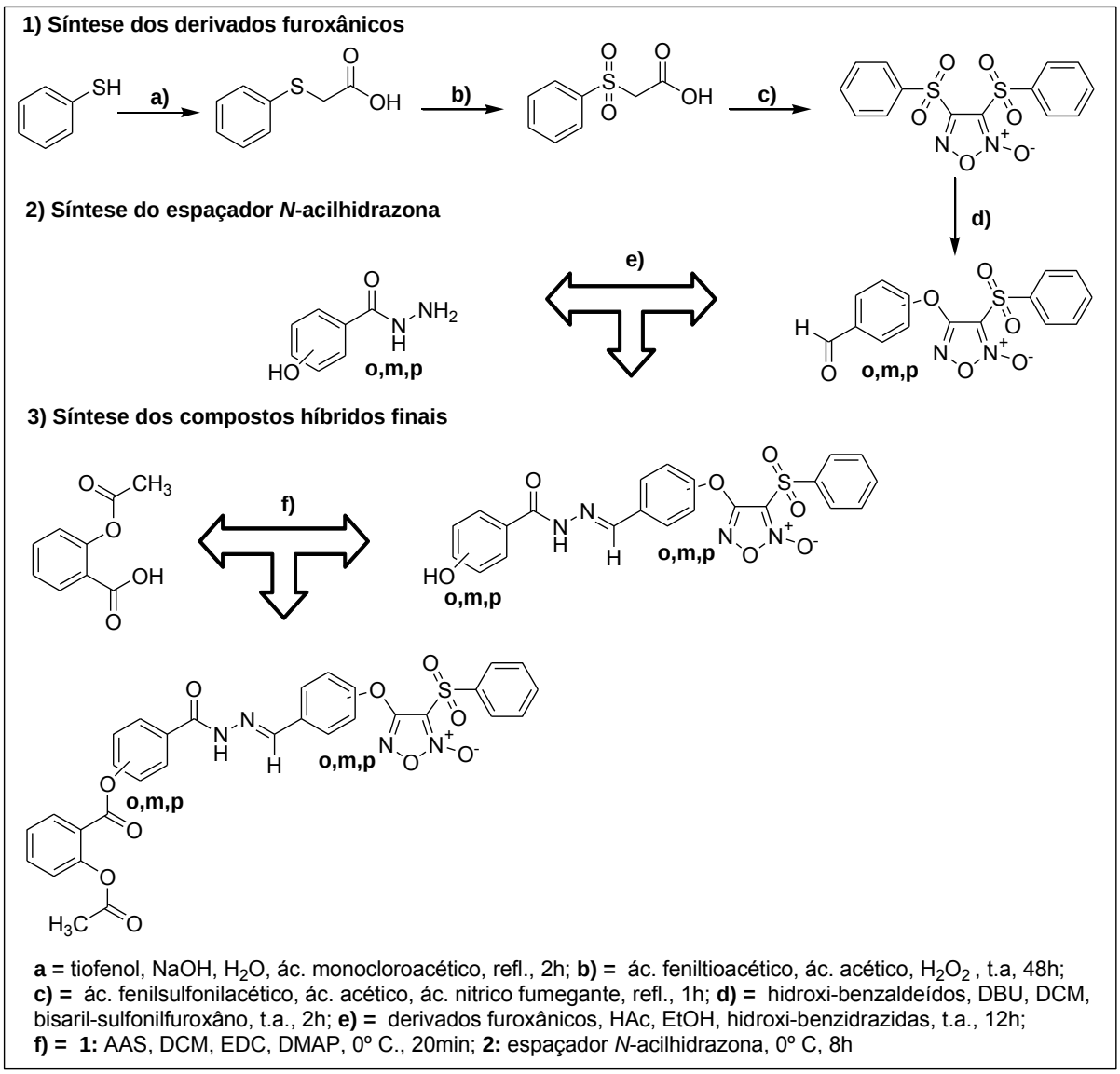
Os compostos foram analisados via espectrometria de massas com ionização por eletrospray. Os espectros foram obtidos no modo positivo através do espectrômetro modelo micrOTOF ESI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Os compostos foram introduzidos no espectrômetro através de bomba de infusão modelo Cole Parmer, a um fluxo de 300 µL/h. Os espectros foram adquiridos na faixa de 200 à 800 *m/z* e acumulado por 60 segundos. As condições gerais do equipamento durante as análises foram voltagem do capilar de 4,5 kV, voltagem do cone de 120 V, temperatura de dessolvatação 180ºC. O equipamento foi previamente calibrado utilizando se uma solução de NA-FTA 100 mg/mL.

4.2.5 Espectrofotometria no Infravermelho

Os compostos tiveram seus grupos funcionais identificados por análises realizadas por espectrofotometria na região do infravermelho. Os espectros foram adquiridos em Espectrofotômetro Shimadzu® Prestige-R, os quais foram gerados em % Transmitância x Frequências de absorção na região de 400-4000 cm^{-1}. Pastilhas de KBr foram utilizadas no preparo de amostras para o obtenção dos espectros.

4.3 Metodologia sintética

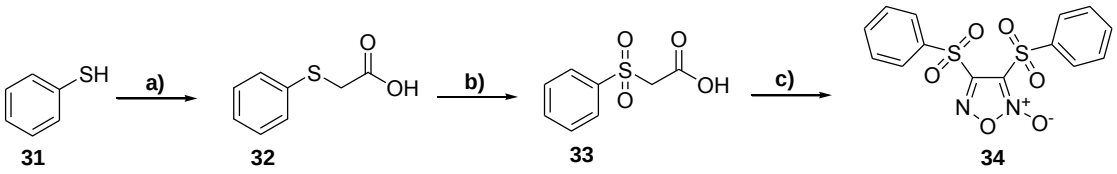
Os compostos foram obtidos conforme representado no esquema geral da síntese divergente proposta (Esquema 2). Esta síntese pode ser dividida em três métodos gerais: **1)** síntese dos derivados furoxânicos funcionalizados; **2)** síntese do espaçador *N*-acilhidrazônico; **3)** acoplamento com ácido acetil salicílico para obtenção dos compostos híbridos finais. A seguir é detalhada cada uma destas etapas.



Esquema 2. Metodologia geral para obtenção dos compostos híbridos finais

4.3.1 Síntese do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano)

O 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**) foi sintetizado em três etapas segundo metodologias descritas por Farrar (1964): **a)** obtenção do ácido feniltioacético (**32**) através de tiofenol e ácido cloroacético em meio básico; **b)** oxidação do ácido feniltioacético em ácido fenilsulfonil acético (**33**) por peróxido de hidrogênio 30% na presença de ácido acético; **c)** obtenção do furoxano 3,4-bisarilsulfonilfuroxano (**34**) a partir do ácido fenilsulfonil acético na presença de ácido acético e ácido nítrico fumegante (Esquema 3).



a) tiofenol (**31**), NaOH, H_2O, ác. cloroacético, t.a., 2h; **b)** ác. feniltioácetico (**32**), ác. acético, peróxido de hidrogênio 30%, t.a., 48h; **c)** ác. fenilsulfonil acético (**33**), ác. acético, ác. nítrico fumegante, t.a., 1h

Esquema 3. Etapas sintéticas para preparação do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano)

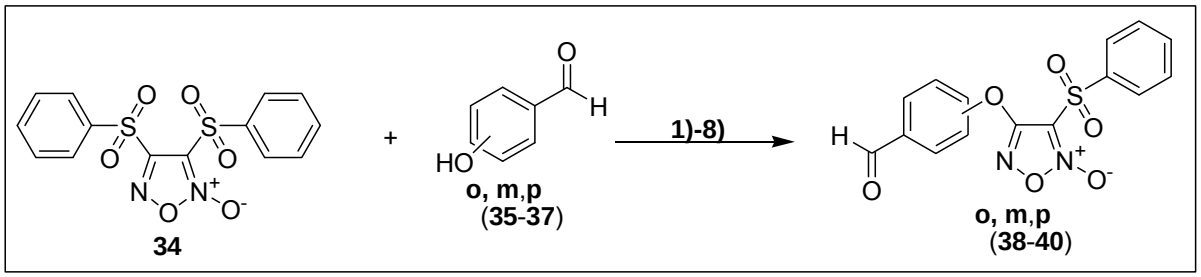
a) Em balão reacional, adicionou-se 9,3 mL de tiofenol (**31**) (90,7 mmol) em 40 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 7,6 g de hidróxido de sódio (190,60 mmol) e agitou-se por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 9,4g de ácido monocloroacético (99,84 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação e aquecimento a 110ºC por duas horas. Após, esse tempo, o precipitado branco formado (**32**) foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

b) Em um balão reacional, 5,0 g do ácido feniltioacético (**32**) (29,75 mmol) foram adicionados em 40 mL de ácido acético e 12 mL de peróxido de hidrogênio 30% (4 equivalentes). A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 48h. Após esse tempo, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (5 x 30 mL), e sobre a fase orgânica obtida foi adicionado $NaSO_4$ anidro, o qual foi submetido a filtração simples. O filtrado foi reduzido por evaporador rotatório para obtenção de um precipitado branco, o ácido fenilsulfonil acético (**33**).

c) Em um balão reacional, 3,2 g do ácido fenilsulfonilacétido (**33**) (16 mmol) foram adicionados em 10 mL de ácido acético mantendo a temperatura a 0° C. Em seguida, 5 mL de ácido nítrico fumegante a 0 ºC foram adicionados gota a gota. A reação foi mantida sob agitação por 5 minutos a 0 ºC, e em seguida foi mantida sob agitação por 1h sob aquecimento a 110 ºC. Após esse tempo o meio reacional foi resfriado em banho de gelo, e o precipitado formado foi filtrado a vácuo e cristalizado em etanol. O produto obtido foi novamente filtrado a vácuo e lavado com água gelada para obter o 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**).

4.3.2 Planejamento para síntese dos derivados furoxânicos

Os derivados furoxânicos foram sintetizados de acordo com metodologias descritas por Fang e colaboradores (2007). Oito procedimentos foram otimizados com diversos catalisadores e solventes orgânicos, a fim de estabelecer a melhor condição reacional para obtenção dos derivados furoxânicos. Para todos os procedimentos, os reagentes de partida e condições reacionais foram: 4-hidroxi-benzaldeído (**37)**, 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**), 2h e t.a (Esquema 4; Tabela 1).



Esquema 4. Esquema geral de síntese na obtenção dos derivados furoxânicos

Tabela 1. Procedimentos utilizados para a síntese dos derivados furoxânicos

Procedimentos	Catalisador	Solvente
1	NaOH	THF
2	NaOH	DCM
3	NaH	THF
4	NaH	DCM
5	Et_3N	THF
6	Et_3N	DCM
7	DBU	THF
8	DBU	DCM

1) ou **2)** Em um balão reacional, 500mg (4,1 mmol) de 2-, ou 3-, ou 4-hidroxi-benzaldeído (**37**) foi adicionado em 15 mL de THF ou diclorometano (DCM) na presença de uma solução NaOH 50% (4,1 mmol). A reação foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida 1,464g (4,1 mmol) de **34** foram adicionados e a reação mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1h. Após esse tempo, o solvente foi removido em evaporador rotatório e a mistura reacional analisada por CCD utilizando-se como fase uma proporção de hexano:acetato de etila 8:2.

3) ou **4)** Em um balão reacional, 500mg (4,1 mmol) de 2-, ou 3-, ou 4-hidroxi-benzaldeído (**37**) foi adicionado em 15 mL de THF anidro ou DCM na presença de NaH (4,1 mmol). A reação foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente em atmosfera de N_2. Em seguida 1,5 g (4,1 mmol) de **34** foram adicionados e a reação mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1h sob atmosfera de N_2. Após esse tempo, o solvente foi removido em evaporador rotatório e a mistura reacional analisada por CCD utilizando-se como fase uma proporção de hexano:acetato de etila 8:2.

5) ou **6)** Em um balão reacional, foram adicionados 400 mg (3,3 mmol) de 2-, ou 3-, ou 4-hidroxi-benzaldeído (**37**) em 15 mL de THF ou DCM na presença trietilamina (3,3 mmol), e a reação mantida sob agitação por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1g (2,73 mmol) de **34** e a reação mantida sob agitação por 2h em temperatura ambiente. Após esse tempo, o meio reacional foi diluído em 50 mL de DCM e lavado com solução saturada de K_2CO_3 (5 x 30 mL). Logo, adicionou-se $NaSO_4$ anidro à fase orgânica, e em seguida a mesma foi filtrada e removida em evaporador rotatório. O produto obtido foi analisado por CCD utilizando-se como fase móvel DCM:hexano (5:5).

7) ou **8)** Em um balão reacional, foram adicionados 400 mg (3,3 mmol) de 2-, ou 3-, ou 4-hidroxi-benzaldeído (**37**) em 15 mL de THF ou DCM na presença DBU (3,3 mmol), e a reação mantida sob agitação por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1g (2,73 mmol) de **34** e a reação mantida sob agitação por 2h em temperatura ambiente. Após esse tempo, o meio reacional foi diluído em 50 mL de DCM e lavado com solução saturada de K_2CO_3 (5 x 30 mL). Logo, adicionou-se $NaSO_4$ anidro à fase orgânica, e em seguida a mesma foi filtrada e removida em evaporador rotatório. O

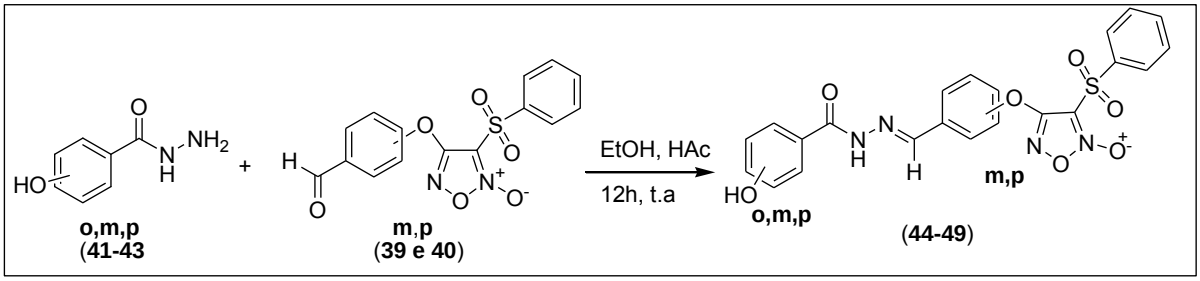
produto obtido foi analisado por CCD utilizando-se como fase uma proporção de DCM:hexano 5:5.

4.3.3 Purificação dos derivados furoxânicos

Os meios reacionais (1,3 g) obtidos pelos procedimentos sintéticos de **1**-**8** (item 4.6.3.2) foram submetidos à purificação por CC-FN (5 x 3 cm), utilizando-se um gradiente de eluição de DCM:hexano nas proporções 5:5, 6:4, 7;3, 8:2, 9:1 e DCM 100%. O volume de cada eluente foi de 3 x o volume morto calculado, o qual foi eluído com auxílio de ar comprimido, e as frações foram coletadas com volume de 30 mL. As frações foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o grau de pureza e o fator de retenção (R_f), além de serem reveladas com o reagente Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina), revelador para compostos carbonílicos, a exemplo do grupo funcional aldeído.

4.3.4 Síntese dos espaçadores *N*-acilhidrazonas

Uma série de seis espaçadores *N*-acilhidrazonas foi sintetizada através da reação de condensação dos derivados furoxânicos **39** e **40** e 2-, ou 3-, ou 4-hidroxi-benzidrazidas (**41**-**43**) em meio etanólico catalisado por ácido (LIMA *et al*., 2008; Esquema 5).

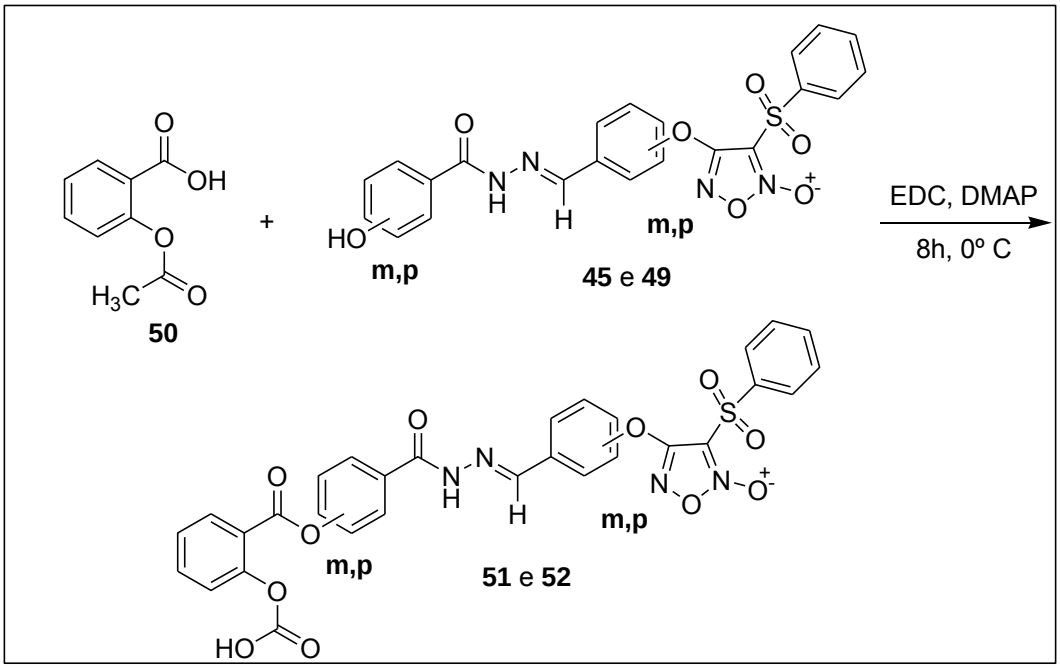


Esquema 5. Esquema geral para obtenção dos espaçadores *N*-acilhidrazonas

Em um balão reacional, 300 mg dos derivados furoxânicos **39** ou **40** (0,86 mmol) foram solubilizados em 15 mL de EtOH na presença de ácido acético (5 gotas), e a mistura foi agitada por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 105 mg de 2-, ou 3-, ou 4-hidroxi-benzidrazidas **41-43** (0,86 mmol) e a reação foi agitada por 12h em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi resfriada em banho de gelo e o precitado foi filtrado à vácuo para obter os compostos de **44-49**. Os compostos foram analisados por CCD utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (5:5.

4.3.5 Síntese dos compostos híbridos finais

Dois compostos híbridos finais foram sintetizados a partir de uma reação de esterificação entre o ácido acetilsalicílico (**50**) e os espaçadores *N*-acilhidrazonas **45** e **49,** segundo metodologias adaptadas de Hassner e Alexanier (1978) (Esquema 6).



Esquema 6. Esquema geral para obtenção dos compostos híbridos **51 e 52**

Em um balão reacional, 65 mg de AAS (**50**) (0,36 mmol) foram solubilizados em 10 mL de diclorometano destilado a 0º C. Em seguida, 56 mg de EDC (0,36 mmol) foram adicionados, e a reação permaneceu em agitação 0º C por 20 minutos. Após esse tempo, a reação foi monitorada por CCD (hexano:acetato de etila 5:5). Logo após, 4,4 mg de DMAP (0,036 mmol) foram adicionados e a reação foi agitada a 0º C por 10 minutos. Em seguida, os espaçadores *N*-acilhidrazonas **45** ou **49** (0,36 mmol) foram acrescentados e a reação permaneceu sob agitação a 0º C por 8 horas. Ao final, o meio reacional obtido foi seco em evaporador rotatório e submetido à purificação em gel de sílica C-18, utilizando-se como fase móvel gradientes de metanol:água nas proporções 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1.

4.3.6 Purificação dos compostos híbridos 51 e 52

Os meios reacionais (170 mg) contendo os compostos **51** e **52** foram submetidos a purificação por cromatografia em coluna de fase reversa (CC-FR, 15 x 2 cm), utilizando-se como fase estacionária gel de sílica C-18, e como fase móvel, um gradiente de metanol:água nas proporções 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1.O volume de cada eluente foi de 3 x o volume morto calculado, o qual foi eluído com auxílio de sistema de vácuo, e as frações foram coletadas com volume de 12 mL. As frações foram analisadas por CCD utilizando como fase móvel uma proporção de hexano:acetato de etila 1:1, as quais foram reunidas de acordo com o grau de pureza e o fator de retenção (R_f). Para as frações reunidas, o excesso de metanol foi removido em evaporador rotatório, e a fração aquosa submetida à extração liquido-liquido com diclorometano (5 x 25 mL). Na fração orgânica obtida, foi adicionado $NaSO_4$ anidro, e a solução foi filtrada por filtração simples. Logo após, o diclorometano foi removido em evaporador rotatório para obtenção dos compostos **51** e **52**.

4.4 Avaliação inibitória da agregação plaquetária

O ensaio de inibição da agregação plaquetária foi realizado em colaboração com a Prof. Sisi Marcondes e a Dra. Maria Elisa Lopes Pires, na Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Departamento de Farmacologia.

4.4.1 Obtenção das plaquetas lavadas

O sangue dos ratos controles ou tratados com LPS foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12.4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). Primeiramente o PRP foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 *g* em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 13 min a 800 *g*. O precipitado plaquetário foi ressuspenso em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 *g* por 13 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{2+} e o número de plaquetas foi ajustado para 1,2 x 10^8 plaquetas/ml através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

4.4.2 Agregação Plaquetária

A solução de plaquetária (400µl) foi transferida para a cubeta de agregação e levada ao agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). O aparelho foi calibrado para 0% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer). As plaquetas foram incubadas com os compostos **44**-**49** (10µM) ou com DMSO 0,1% por 3 minutos antes da adição de ADP (10µM). A agregação foi monitorada por 10 min.

4.5 Avaliação do tempo de sangramento

O tempo de sangramento dos espaçadores *N*-acilhidrazona **44**-**49** foram avaliados utilizando-se método de Kung et al., 1998. Uma incisão de 2 mm na cauda de camundongos machos (Swiss) foi realizada e o sangue foi coletado em papel de filtro em intervalos de 10 segundos até a parada do sangramento.

Os camundongos foram previamente anestesiados antes da incisão por cetamina (150mg/Kg). Os compostos sintetizados e o ácido acetilsalicílico (controle positivo) foram administrados por via oral 60 min. antes da incisão em uma concentração de 100µmol/Kg, utilizando-se como veículo gel de carboximetilcelulose (CMC). Como controle negativo foi utilizado somente CMC.

4.6 Avaliação indireta da capacidade doadora de óxido nítrico

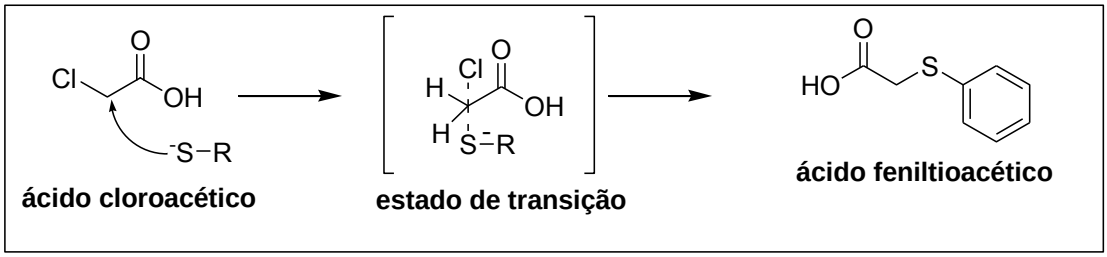
Os espaçadores *N*-acilhidrazonas **44**-**49** foram avaliados quanto a sua capacidade de doação de óxido nítrico. A metodologia utilizada segue a descrita por SORBA et al., 1997, pela quantificação de nitrito liberado. O NO em solução apresenta um curto tempo de meia-vida devido sua rápida oxidação em nitritos e nitratos, por isso a quantificação de nitrito é uma forma indireta de mensurar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos.

Solução dos respectivos compostos (20 µL) em DMSO foi adicionada a tubos contendo 2 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) na ausência e na presença de 5 mM de cisteína. Estas soluções foram mantidas sob temperatura de 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, essas soluções foram tratadas com 500 µL do reagente de Griess. Após 10 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância em 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 5 vezes em dias distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO_2-) mol/mol ± erro padrão da média, calculados pela relação entre número de mol de NO_2^- detectado e número de mol dos respectivos compostos em estudo, multiplicado por 100.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano)

O 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**) foi obtido através de três etapas sintéticas, no qual a primeira tem-se a formação do ácido feniltioacético por uma reação de substituição nucleofílíca bimolecular (SN_2) entre tiofenol e ácido cloroacético. A reação ocorre quando o nucleófilo (tiofenóxido) ataca o carbono que sustenta o haleto de alquila, levando a formação do estado de transição com ligação S-C parcialmente formada, e ligação Cl-C parcialmente rompida. À medida que a ligação S-C que forma, o grupo abandonador deixa a estrutura levando o par de elétrons (Esquema 7). O ácido feniltioacético é obtido como sólido branco com rendimento de 97% e faixa de fusão entre 60-61° C.



Esquema 7. Mecanismo de reação por SN^2 para formação do ácido feniltioacético

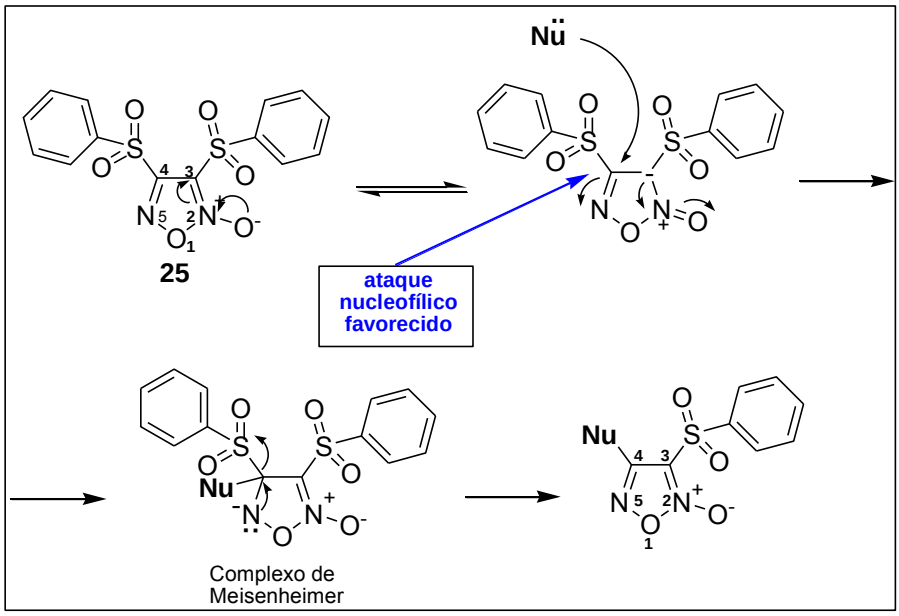
Na segunda etapa sintética (Esquema 3, item 4.6.1), o ácido feniltioacético (**32**) é oxidado à sulfona (**33**) utilizando-se peróxido de hidrogênio 30% em excesso, com rendimento de 90% (ponto de fusão de 112° C). Santos (2009) demonstrou que a relação estequiométrica 1:1 de peróxido de hidrogênio 30% e ácido feniltioacético levava a formação de sulfóxido, explicando a necessidade do excesso de peróxido no meio reacional (Santos, 2009).

Em uma terceira etapa, o furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano) (**34**) é obtido a partir do ácido fenilsulfonilacético (**33**) utilizando-se mistura de ácido acético e ácido nítrico fumegante, com rendimento de 50%, e faixa de fusão entre 140-142° C (Esquema 3, item 4.6.1).

5.2 Planejamento para a síntese dos derivados furoxânicos

A presença de três heteroátomos no anel furoxânico permite que os carbonos C_3 e C_4 tenham menor densidade eletrônica podendo apresentar maior reatividade frente a nucleófilos (Esquema 8). A presença de substituintes com caráter abandonador nas posições C_3 e C_4 permite que furazanas e furoxanos possam sofrer reações de substituição nucleofílica aromática (S_NAr). O ataque nucleofílico nessas posições leva ao rompimento de uma ligação π e delocalização do par de elétrons, o qual é estabilizado pelo átomo de nitrogênio presente nas posições 2 e 5. No momento em que a aromaticidade é reestabelecida o grupo abandonador é eliminado (Esquema 8).

Especificamente em furoxanos, o carbono que sustenta o grupo *N*-óxido é mais blindado eletronicamente pelo efeito de ressonância, efeito este que permite o ataque nucleofílico ao carbono que não sustenta o *N*-óxido (Esquema 8). Este efeito pode ser comprovado por RMN de ^{13}C, sendo que o carbono mais blindado apresenta δ_C 115,16 e o carbono menos blindado δ_C 155,67 ppm (Tabela 4, anexos 1 e 3) (FRUTTERO *et al*., 1997).



Esquema 8. Mecanismo de S_NAr em furoxanos

As reações de S_NAr em furoxanos são bem estabelecidas na literatura, seja por compostos alifáticos ou fenólicos (SORBA *et al*., 1996; FRUTTERO *et al*., 1997;). Fang e colaboradores (2007) realizaram uma S_NAr em 3,4-bisaril-sulfonil-furoxano (**34**) com 4-hidroxi-benzilálcool na presença de solução de NaOH 50% para formação do derivado

furoxânico. Nesta reação a hidroxila fenólica é preferencialmente desprotonada devido seu caráter ácido e maior estabilidade do íon fenóxido formado quando comparado com a hidroxila do grupo álcool. Dessa forma, o ataque no sistema furoxânico ocorre pela hidroxila fenólica (FANG et al., 2007).

A utilização de NaOH 50% nos procedimentos **1** e **2** (item 4.6.3.2), levaram a formação de um produto majoritário que não foi identificado como sendo o derivado furoxânico **40** (Figura 9). Aldeídos na presença de NaOH (pH>13) pode levar a formação de benzilálcoois e ácido benzóico por uma Reação de Adição Nucleofílica à Carbonila (Reação de Canizzaro) (BRUICE, 2006), porém esses dados não foram confirmados por RMN de ^{1}H. Além disso, sugere-se a possível formação de um produto de decomposição devido o ataque do hidróxido ($^-$OH) ao núcleo furoxânico, conforme resultados observados por Santos (2009). O espectro de RMN de ^{1}H não apresentou sinais característicos que confirmariam a existência do derivado **40**, como por exemplo, o triplo-tripleto em δ_H 7,92 ppm de H-9, e o singleto em δ_H 10,0 referente ao hidrogênio do grupo aldeído. Esses dados confirmam a inexistência do composto **40** pelos procedimentos **1** e **2** (Figura 9).

Hidreto de sódio (NaH) foi utilizado como base (procedimentos **3** e **4**), e o produto majoritário foi purificado e analisado por RMN de ^{1}H, sendo que seu espectro também não apresentou o triplo-tripleto em δ_H 7,92 referente ao H-9, e o singleto δ_H 10,0 do grupo aldeído (Figura 10).

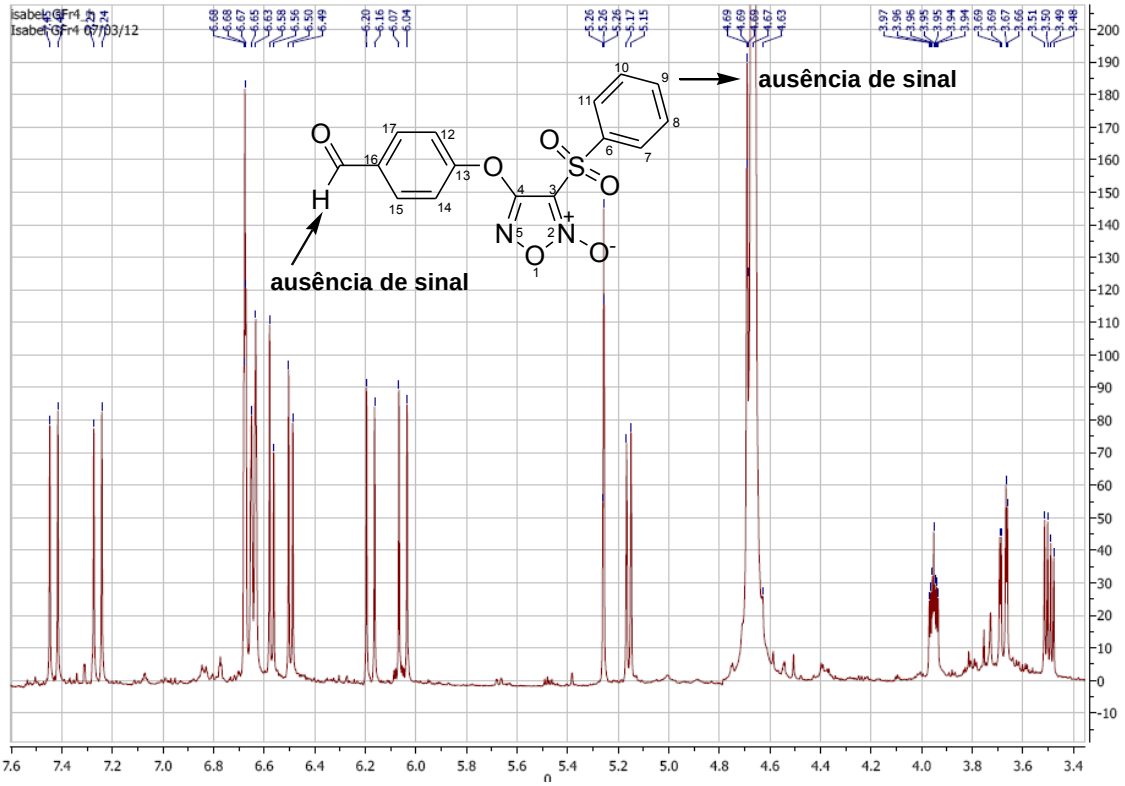


Figura 9. Espectro de RMN de ^{1}H obtido pelos procedimentos 1 e 2

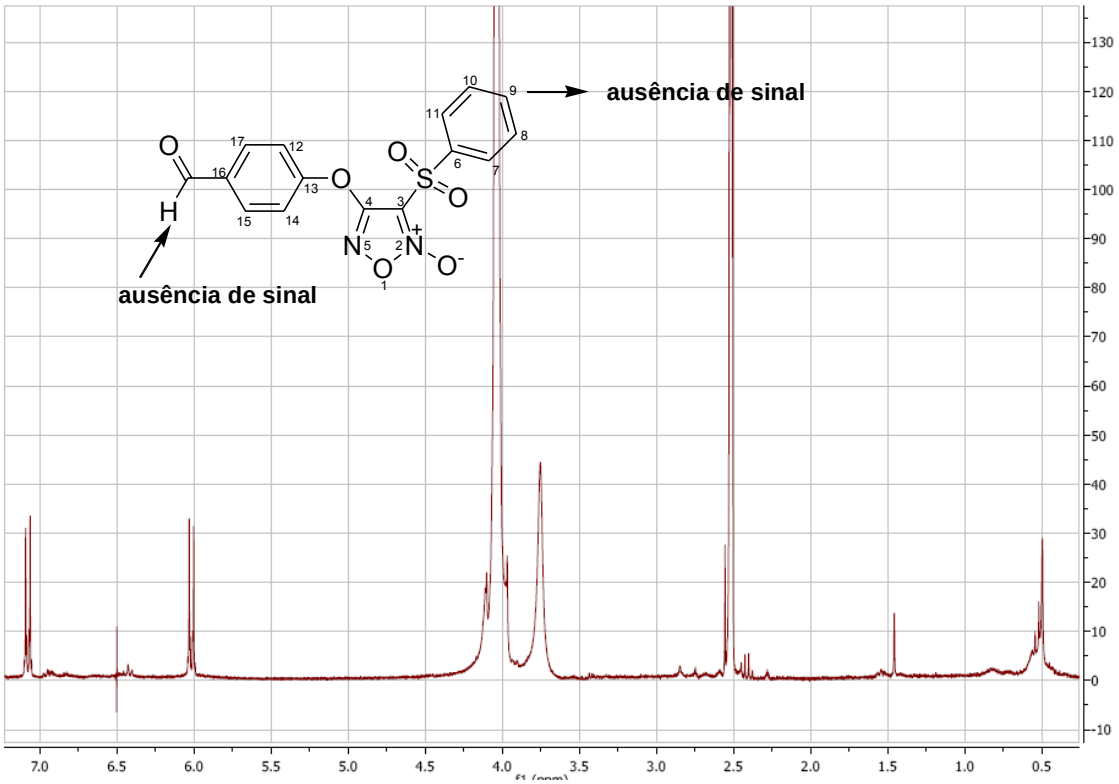
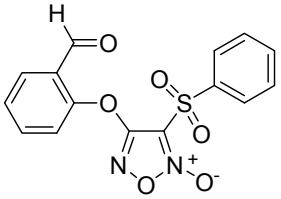
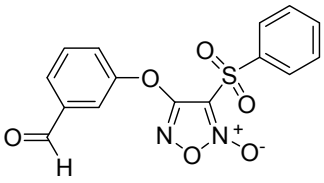
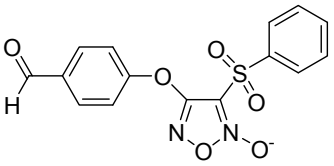


Figura 10. Espectro de RMN de ^{1}H obtido pelos procedimentos 3 e 4

A utilização de trietilamina (Et_3N) como base no procedimento **6** (item 4.6.3.2) juntamente com diclorometano, favoreceu a formação do derivado furoxânico **40** com rendimento de 10%. No procedimento 5, o qual utilizou THF como solvente de reação, não foi possível observar a formação do produto. O composto foi identificado utilizando as técnicas de RMN de ^{1}H, ^{13}C, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho e Espectrometria de Massas (item 5.3).

O baixo rendimento obtido no procedimento **6** levou a substituição de Et_3N por DBU no procedimento **8**. O uso de DBU na presença de DCM favoreceu a formação do derivado furoxânico **40** com rendimento de 57% (Tabela 2; Figura 11). No entanto, o procedimento **7**, o qual utilizou THF como solvente de reação, não favoreceu a formação do composto desejado. Logo, os derivados furoxânicos **38** e **39** também foram sintetizados a partir do procedimento **8**, os quais foram obtidos com rendimentos de 20 e 30% respectivamente (Tabela 2). Os compostos de **38-40** tiveram suas estruturas confirmadas por RMN de ^{1}H, ^{13}C, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho e Espectrometria de Massas (item 5.4).

Tabela 2. Rendimentos obtidos na síntese dos derivados furoxânicos de **38-40**

Derivado furoxânico	Rendimento %	R_f*	P.F (° C)
 **38**	20	0,3	104-108
 **39**	57	0,1	102-104
 **40**	30	0,2	118-120

* Fase móvel: 50% DCM: 50% hexano

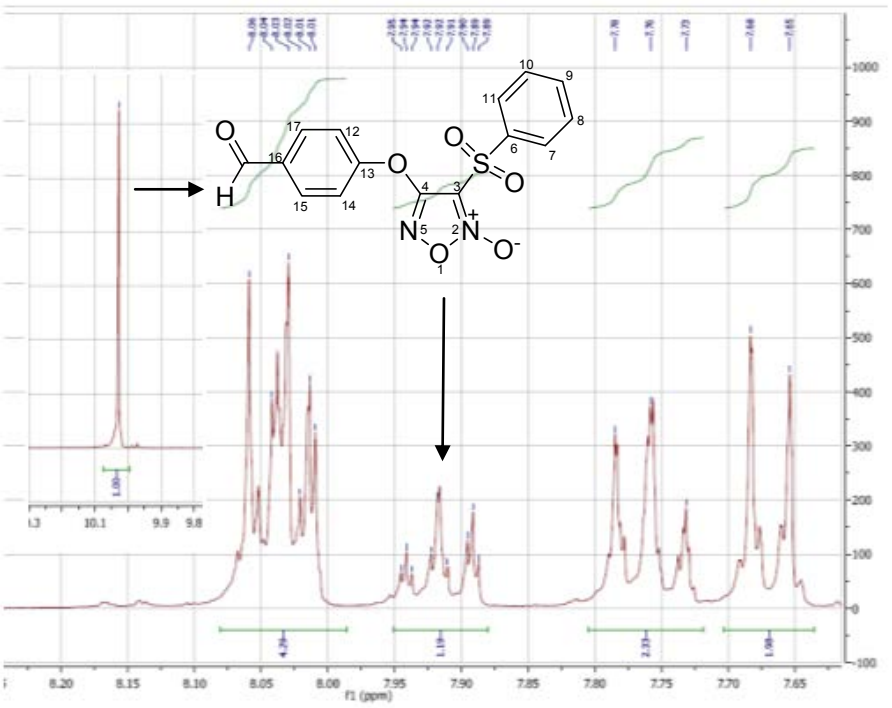
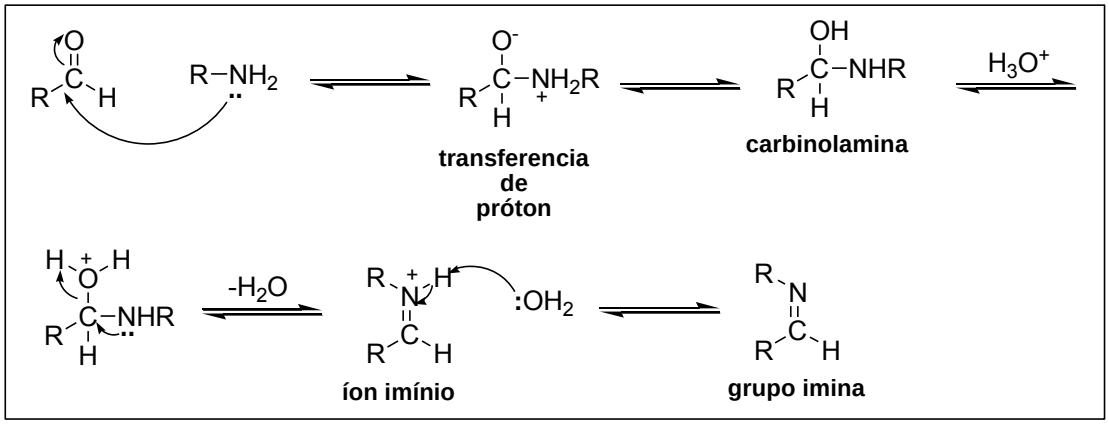


Figura 11. Sinais no espectro de RMN de ^{1}H na formação do derivado furoxânico **40**

5.3 Síntese dos espaçadores *N*-acilhidrazonas

Os compostos contendo os espaçadores *N*-acilhidrazonas **44-49** (Figura 12) foram obtidos através da reação de adição nucleofílica à carbonila, segundo metodologia sintética adaptada de Lima e colaboradores (2008) com rendimentos de 70-90% (Tabela 3).

A subunidade *N*-acilhidrazona pode ser formada através da reação entre uma amina primária e aldeído. O processo é reversível, catalisado por ácido, com adição nucleofílica de uma amina primária ao grupo carbonila de um aldeído. A transferência de um próton do nitrogênio para o oxigênio leva à formação de um aminoálcool, a carbinolamina. A protonação do oxigênio da carbinolamina por um catalisador ácido converte o –OH em um melhor grupo de saída ($–OH_2^+$). A perda de água produz o grupo imínio (Esquema 9) (MCMURRY, 2005).



Esquema 9. Mecanismo de reação para formação do grupo imínio presente em *N*-acilhidrazonas

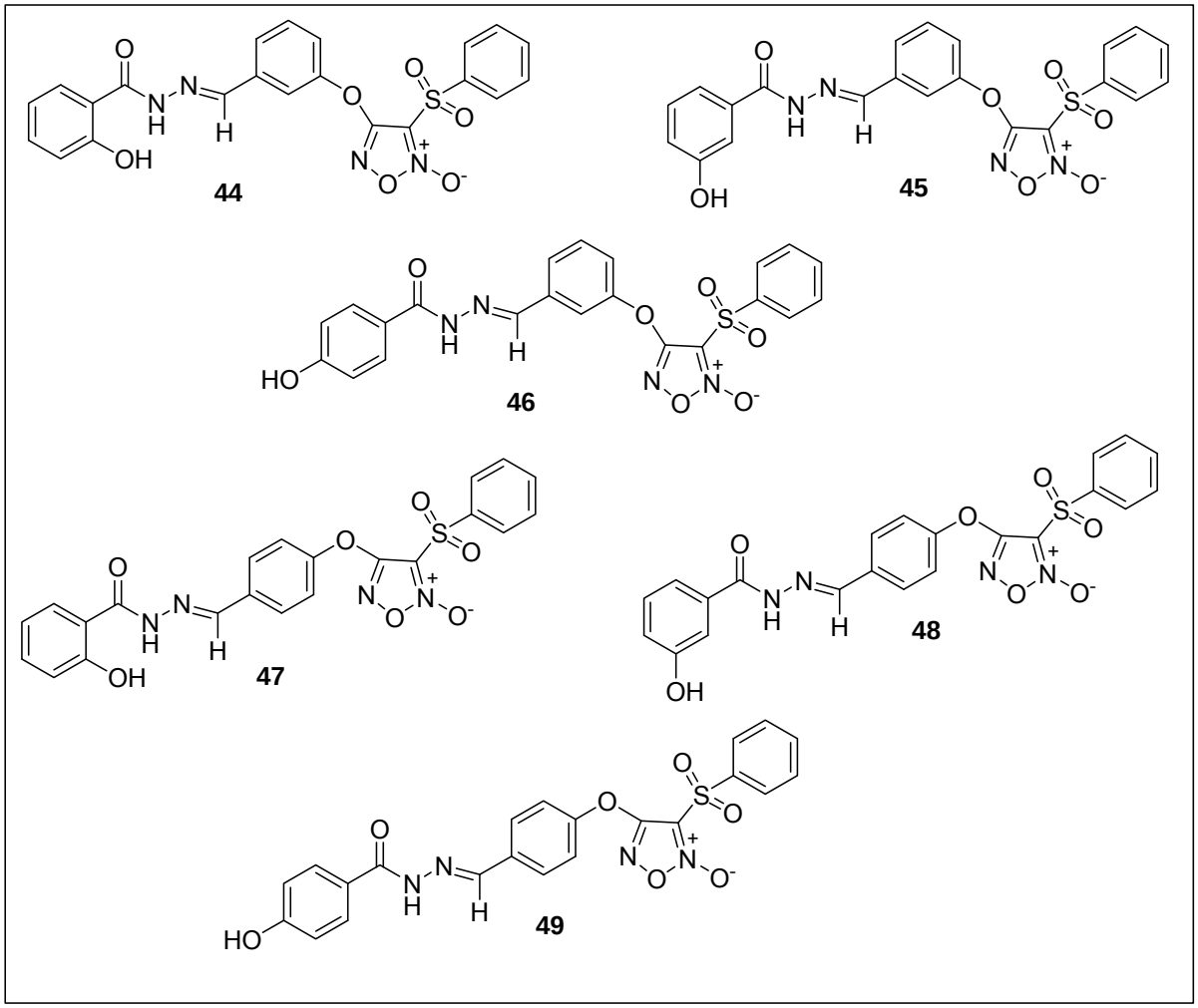


Figura 12. Espaçadores *N*-acilhidrazonas obtidas por adição nucleofílica a carbonila

Tabela 3. Rendimentos de *N*-acilhidrazonas **44-49**

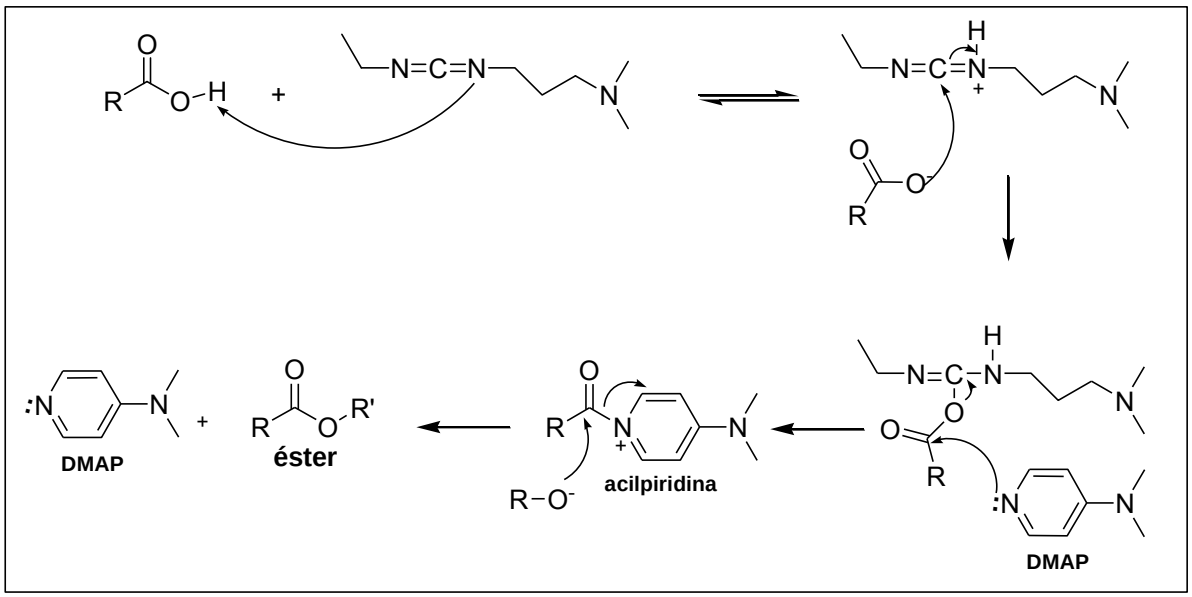
***N*-acilhidrazona**	**Posição**	**Rendimento %**	**Rf****	**P.F (° C)**
44	meta	90	0,1	230-233
45	meta	85	0,1	120-124
46	meta	60	0,1	206-210
47	para	90	0,1	185-190
48	para	60	0,1	200-205
49	para	90	0,1	142-145

** Fase móvel: 50% hexano: 50% acetato de etila

5.4 Síntese dos compostos híbridos

Os compostos híbridos **51** e **52** (Esquema 10) foram sintetizados através da Reação de Esterificação do ácido acetilsalicílico com os espaçadores *N*-acilhidrazonas **45** e **49** ,segundo metodologias descritas por Hassner e Alexanier (1978) e Valeur e Bradley (2008). A difícil purificação dos respectivos compostos forneceu a estes baixos rendimentos, de 28 e 10% respectivamente (Figura 13).

A reação de esterificação ocorre em duas etapas (Esquema 10): **1)** formação de acilpiridina como um intermediário de reação através de um ácido carboxílico, o agente acoplante *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodimida (EDC) e o catalisador dimetil-aminopiridina (DMAP); **2**) o ataque nucleofílico à carbonila da acilpiridina por um íon alcóxido ou fenóxido conduz na obtenção do grupo éster juntamente com o catalisador (DMAP) reestabelecido.



Esquema 10. Mecanismo reacional de esterificação para obtenção dos compostos híbridos (adaptado de Hassner e Alexanian, 1978; Valeur e Bradley, 2009)

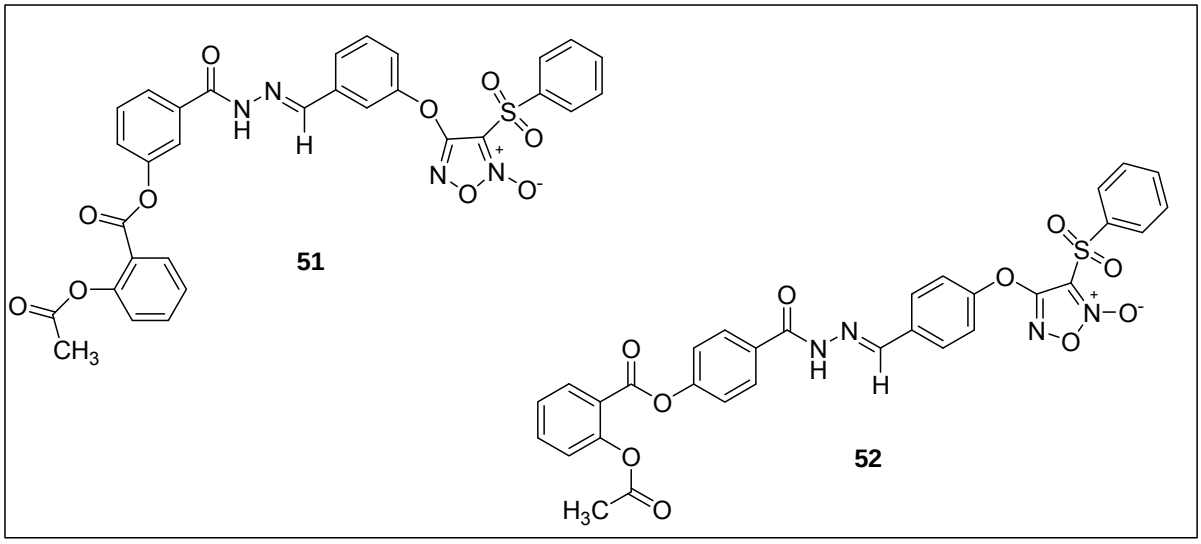
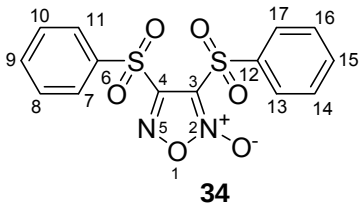


Figura 13. Estruturas químicas dos compostos híbridos **51 e 52**

5.5 Identificação Estrutural

5.5.1 3,4-bisaril-sulfonil-furoxano (34)



34

O composto **34,** obtido como um pó branco foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^{1}H, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho e Espectrometria de Massas. O espectro de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) no modo positivo apresentou picos relativos ao $[M+Na]^+$ com valor de de *m/z* de 388,9874, que são consistentes com os valores de 366 calculados com base na fórmula empírica $C_{14}H_{10}N_2O_6S_2^-$ (Anexo 1).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou dez sinais, para os quais se destaca os deslocamentos em δ_C 115,16 e δ_C 155,67 ppm atribuídos aos carbonos C-3 e C-4 respectivamente. A blindagem de C-3 pode ser explicada através do efeito de ressonânica presente no anel heterocíclico aromático de cinco membros (FRUTTERO, *et al*., 1997). Esses dois sinais juntamente com multipleto em δ_H 7,72 ppm referente aos H-9 e H-15 observados no espectro de RMN de ^{1}H, permite caracterizar a substância **34** como pertencente a classe de 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (Tabela 4; Anexos 1 e 3).

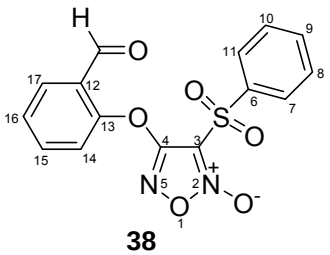
Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **34** ($CDCl_3$)

Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
1	–	–
2	–	–
3	115,16	–
4	155,67	–
5	–	–
6	137,16	–
7 e 11	130,18	8,10/ dd; 3,0 e 9,0
8 e 10	129,19	7,60/ m;
9	136,18	7,72/ m;
12	136,26	–
13 e 17	129,83	8,10/ dd; 3,0 e 9,0
14 e 16	129,56	7,60/ m;
15	135,84	7,72/ m;

5.5.2 Derivados furoxânicos 38-40

Os compostos de **38-40** são estruturas inéditas e foram identificados por Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H e ^{13}C, espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução.

5.5.2.1 Derivado furoxânico 38



38

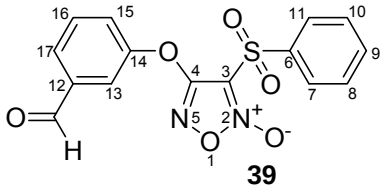
O composto **38** foi obtido como um pó amarelo. Seu espectro de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de *m/z* de 347,0340 e 369,0165, concordantes com o valor calculado 346,0265 com base na fórmula a empírica $C_{15}H_{10}N_2O_6S$ para o íon molecular (Anexo 5). As bandas de absorção observadas no espectro de Infravermelho (IV) em 2.852 cm^{-1}, 2.922 cm^{-1} e 1.689 cm^{-1}, juntamente com os sinais obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C e ^{1}H em δ_C 188,05 e δ_H 10,20, puderam confirmar a presença de um grupo aldeído no derivado furoxânico **38** (Anexos 6, 7 e 9). A banda no espectro de IV em 1.355 cm^{-1} sugere a presença do grupo *N*-óxido no composto **38**, e as bandas em 1.161 e 1.452 cm^{-1} sugerem a presença do grupo sulfona (Anexo 6).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou treze sinais, para os quais se destacaram em δ 114,6 e δ 152,7, atribuídos aos C-3 e C-4 respectivamente. Estes sinais juntamente com o triplo-tripleto em δ_H 7,80 (J = 3,0 e 9,0 Hz; H-9) no espectro de RMN de ^{1}H sugerem a obtenção do composto **38** (Anexo 9) (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **38** ($CDCl_3$)

Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
1	–	–
2	–	–
3	114,6	–
4	152,6	–
5	–	–
6	137,7	–
7 e 11	129,8	8,15/ dd; 3,0 e 9,0
8 e 10	129,0	7,69/ m
9	136,0	7,80/ tt; 3,0 e 9,0
12	135,9	–
13	158,6	–
14	121,6	7,49/ dd; 3,0 e 9,0
15	127,5	7,69/ m
16	127,3	7,49/ dd; 3,0 e 9,0
17	132,4	7,97/ dd; 3,0 e 9,0
2COH	188,0	10,20/ s

5.5.2.2 Derivado furoxânico 39



39

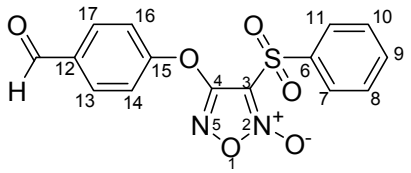
O espectro de massas de alta resolução do derivado **39** (pó branco) obtido pelo modo positivo apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de *m/z* de 347,0333 e 369,0154, (calculado 346,0265) concordantes com a fórmula a empírica $C_{15}H_{10}N_2O_6S$ para o íon molecular (Anexo 10). As bandas observadas no espectro na região de IV em 1.697 cm $^{-1}$, 2.762 e 2.850 cm^{-1} (Anexo 11), juntamente com o sinal do espectro de RMN de ^{1}H em δ_H 10,03, confirmaram a presença de um grupo aldeído (Anexo 14). As bandas no espectro de IV em 1.165 e 1.442 cm$^-$1 confirmam a presença do grupo *N*-óxido, e a banda em 1.357 cm$^-$1 é referente ao grupo sulfona. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais em δ_C 110,68 e δ_C 153,38, referentes aos C-3 e C-4 respectivamente (Anexo 13).

O espectro de RMN de ^{1}H apresenta um dubleto em δ_H 8,10 ppm relativo aos H-7 e H-11. Os demais sinais ^{1}H na região de aromáticos apresentam-se coalecidos, mas a integração mostra a proporção referente a nove hidrogênios, sugerindo a obtenção do composto **39** (Tabela 6).

Tabela 6. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **39** ($CDCl_3$)

Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
1	–	–
2	–	–
3	110,6	–
4	153,3	–
5	–	–
6	138,2	–
7 e 11	129,8	8,10/ d; 8,0
8 e 10	128,6	7,83/ t
9	135,8	7,83/ t
12	137,8	–
13	119,8	7,86/ m
14	157,8	–
15	125,7	7,66/ t
16	130,9	7,66/ t
17	128,3	7,66/ t
18 COH	190,5	10,03/ s

5.5.2.3 Derivado furoxânico 40



40

O espectro de massas de alta resolução do derivado **40** (pó branco) obtido pelo modo positivo apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de *m/z* de 347,0319 e 369,0137, que são consistentes com os valores calculados 346,0265 coma base na fórmula na empírica $C_{15}H_{10}N_2O_6S^-$ (Anexo 15).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou onze sinais, para os quais se destacam em δ_C 112,95 e δ_C 158,65 atribuídos aos carbonos C-3 e C4 respectivamente (Anexo 17). Esses dois sinais juntamente com o triplo-tripleto em δ_H 7,92 (H-9), e as bandas em 2.852 cm^{-1} e 2.922 cm-1 no espectro de IV, sugerem a obtenção do composto **40** como um derivado

furoxânico contendo o grupo aldeído livre. O espectro de IV apresentou bandas de absorção em 1.161 e 1.450 cm^{-1} referentes ao grupo *N*-óxido, e 1.357 cm^{-1} para a sulfona (Tabela 7; Anexos 16 e 19).

Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) de **40** (DMSO-d_6)

Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)
1	–	–
2	–	–
3	112,9	–
4	158,65	–
5	–	–
6	138,2	–
7 e 11	131,6	8,03/ m
8 e 10	130,1	7,75/ tt; 9,0
9	137,8	7,92/ tt; 3,0 e 9,0
12	135,6	–
13 e 17	133,2	8,03/ m
14 e 16	121,3	7,66/ d; 9,0
15	158,9	–
H-C=O	193,5	10,03/ s

5.5.3 Espaçadores *N*-acilhidrazonas 44-49

Os compostos com espaçadores *N*-acilhidrazonas **44-49** são estruturas inéditas e foram identificadas por ressonância magnética nuclear uni (^{1}H, ^{13}C e HOMODEC) e bidimensional (HETCOR e HETCOR-LR), espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução.

5.5.3.1 *N*-acilhidrazona 44

A *N*-acilhidrazona **44** foi obtida como um pó branco. Seu espectro de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) no modo positivo apresentou picos relativos aos íons [M+H^{+}] e [M+Na^{+}] com valores de *m/z* de 481,0812 e 503,0631 respectivamente, que são consistentes com o valor de 480,0745 calculado com base na fórmula empírica $C_{22}H_{16}N_4O_7S$ (Anexo 20). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 20 sinais, no qual os sinais em δ_C 111,35 e δ_C 158,54 foram atribuídos para os C-3 e C-4 respectivamente (Tabela 8; Anexo 22).

As bandas observadas no espectro de IV em 1.531 cm^{-1} e 3.250 cm^{-1} são características de ligações C=N e N-H respectivamente (Anexo 21) (BHOLE e BHUSARI., 2011). Estas juntamente com os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C e ^{1}H em δ_C 147,19 (C-18), δ_H 8,48 (s; H-18) e correlações no mapa de contornos HETCOR, indicaram a presença de um grupo imínio na molécula (Anexos 22, 24 e 25). O grupo imínio pôde ser confirmado através das correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-12 e H-18, C-16 e H-18 (Anexo 27). A banda no espectro de IV em 3.448 cm^{-}1 e os sinais em δ_H 11,92 e δ_C 164,79 nos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C evidenciaram uma hidroxila na estrutura. O grupo *N*-óxido foi confirmado pela presença de duas bandas no espectro de IV, 1.357 e 1.309 cm^{-1}, e as bandas em 1.163 e 1.456 cm^{-1} são referentes ao grupo sulfona.

Irradiações incididas sobre o sinal em δ_H 7,93/tt; (*J* = 1,2 e 9,0 Hz; H-9) no espectro de HOMODEC indicaram acoplamentos com os sinais em δ_H 8,08/dd (*J* = 6,0; H-7 e H11) e δ_H 7,81/m (H-8 e H-10). Logo, irradiações sobre o sinal em δ_H 8,08 forneceram resultados de acoplamentos entre δ_H 7,93 e δ_H 7,81 (Anexo 26; Tabela 8). Esses dados foram confirmados através das correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-7/C-11e H-9, C-9 e H-7/H-11 (Anexo 27; Figura 14).

O sinal em δ_H 7,51 (dd; *J* = 1,2 e 1,2 Hz) no espectro de RMN de ^{1}H (Anexo 35) foi atribuído ao H-13 devido o acoplamento com o sinal em δ_H 7,60 (t; 9,0 Hz; H-15) observado no espectro de HOMODEC (Anexo 26), além da correlação no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-13 e H-17 (Anexo 27; Figura 14). As correlações observadas no mapa

de contornos HETCOR-LR entre o C-21(δ_C 158,67) com H-26 (δ_H 7,45; dd; *J* = 1,2 e 9,0) e H-24 (δ_H 7,81; m), permitiram definir as posições exatas do carbono quaternário e dos respectivos hidrogênios.

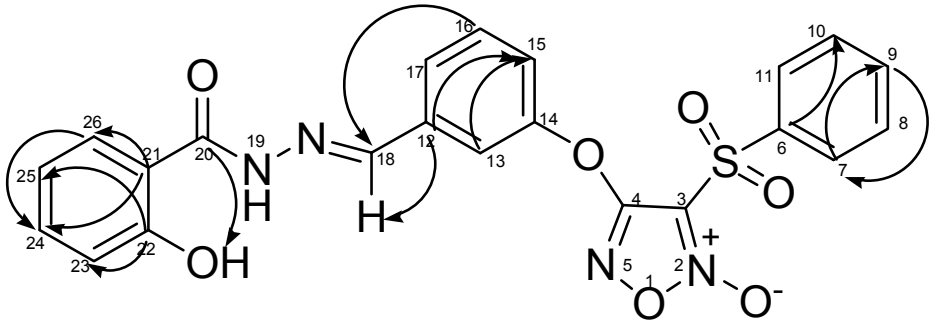


Figura 14. Principais correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR para *N*-acilhidrazona **44**

Tabela 8. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **44** (DMSO-d_6)

POSIÇÃO	δ_C	δ_H; mult.; J (Hz)	HOMODEC (δ_H)	HETCOR-LR (δ_H)
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
3	111,3	–	–	–
4	158,5	–	–	–
5	–	–	–	–
6	136,9	–	–	7,81
7 e 11	128,6	8,08/ dl; 9,0	7,81; 7,93	7,93
8 e 10	130,1	7,81/ m	–	–
9	136,3	7,93/ tt; 1,2 e 9,0	7,81; 8,08	8,08
12	136,4	–	–	7,60; 8,48
13	121,5	7,51/ dd; 1,2 e 1,2	–	7,70
14	152,9	–	–	7,60
15	130,8	7,60/ t; 9,0	7,51; 7,70	7,51
16	117,7	7,81/ m	–	8,48
17	126,1	7,70/ d; 9,0	–	–
18	147,1	8,48/ s	–	–
19	–	11,72/ s	–	–
20	164,7	–	–	11,92
21	158,6	–	–	7,45; 7,81
22	116,2	–	–	6,97
23	117,3	6,97/ t; 9,0	–	–
24	128,8	7,81/ m	–	–
25	119,1	6,97/ t; 9,0	–	6,97
26	147,1	7,45/ t; 1,2 e 9,0	6,97	7,81
22-OH	–	11,92/ s	–	–

5.5.3.2 *N*-acilhidrazonas 45 e 46

Para as estruturas químicas **45** e **46**, o anel aromático sulfônico, o anel heterocíclico aromático de cinco membros e o anel que carrega o grupo imínio, foram identificados de muito semelhante ao discutido para *N*-acilhidrazona **44**. Os espectros de IV e RMN uni e bidimensionais encontram-se nos Anexos 28 a 43, e seus dados nas Tabelas 9 e 10.

5.5.3.2.1 *N*-acilhidrazona 45

O espectro de massas de alta resolução obtido no modo positivo para *N*-acilhidrazona **45** (pó branco) apresentou picos relativos aos íons $[M+H^+]$ e $[M+Na^+]$ com valor de *m/z* de 481,0822 e 503,0631 respectivamente, sendo consistente com o valor de 480,0745 calculado com base na fórmula empírica $C_{22}H_{16}N_4O_7S$ (Anexo 28).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 20 sinais, logo o C-21 apresentou correlações no mapa de contornos HETCOR-LR com o sinal em δ_H 7,32/m [H-24, H-25 e H-26 (hidrogênios não equivalentes)], podendo indicar a posição do carbono quaternário e dos respectivos hidrogênios (Anexos 30 e 35; Figura 15). O sinal em δ_H 6,99/dd (*J* = 3,0 Hz) no espectro de RMN de ^1H foi atribuído para o H-22 (Anexo 32), o qual pôde ser confirmado através do acoplamento com o sinal em δ_H 7,32/m (H-24, H-25 e H-26), observado no espectro de HOMODEC (Anexo 34; Tabela 9).

A banda no espectro de IV (Anexo 29) em 1.537 cm^{-1}, juntamente com o sinal em δ_H 8,46 (s; H-18) no espectro de RMN de ^1H indicaram a presença do grupo imínio (BHOLE e BHUSARI., 2011). O mapa de contornos HETCOR-LR confirma a presença da imina através da correlação de C-12 com H-18 (Anexo 35; Figura 17). As bandas em 1.355 cm^{-1} (*N*-óxido), 1.163 e 1.446 cm^{-1} (sulfona) confirmam a presença dos respectivos grupos na estrutura. De maneira semelhante em **44**, a banda larga no espectro de IV em 3.327cm^{-1} e o sinal em δ_H 11,88 confirmou o grupo hidroxila em **45**.

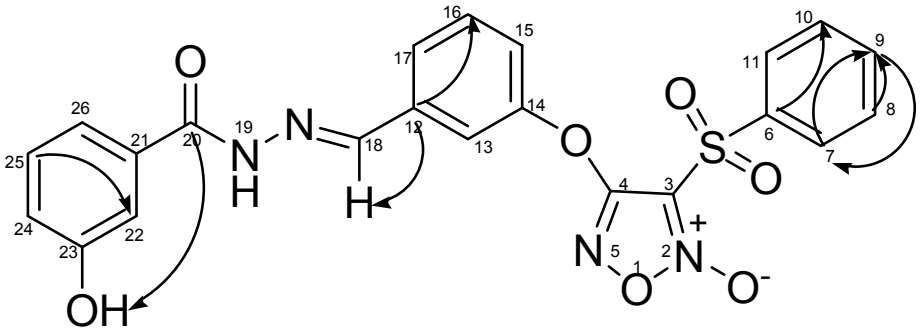


Figura 15. Principais correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR para *N*-acilhidrazona **45**

Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **45** (DMSO-d_6)

POSIÇÃO	δ_C	δ_H; mult.; J (Hz)	HOMODEC (δ)	HETCOR-LR (δ)
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
3	111,2	–	–	–
4	158,5	–	–	–
5	–	–	–	–
6	136,9	–	–	–
7 e 11	128,5	8,07/ dd; 3,0 e 9,0	7,78; 7,93	7,93
8 e 10	130,0	7,78/ m	–	7,93
9	136,2	7,93/ tt; 3,0 e 9,0	8,07; 7,78	8,07
12	136,7	–	–	7,78; 8,46
13	121,3	7,51/ dl; 1,2	7,58	–
14	152,8	–	–	7,58
15	130,7	7,58/ t; 9,0	7,51; 7,67	7,67
16	117,5	7,78/ m	–	–
17	125,8	7,67/ d; 9,0	7,51; 7,58	–
18	146,2	8,46/ s	–	–
19	–	9,77/ s	–	–
20	163,4	–	–	11,88
21	157,4	–	–	7,32
22	118,8	6,99/ dd; 3,0	7,32	–
23	134,6	–	–	–
24	114,5	7,32/ m	–	–
25	118,2	7,32/ m	–	6,99; 7,32
26	129,6	7,32/ m	–	–
23-OH	–	11,88/ s	–	–

5.5.3.2.2 *N*-acilhidrazona 46

O espectro de massas de alta resolução (modo positivo) para *N*-acilhidrazona **46** (pó branco) apresentou picos relativos aos íons [M+H$^+$] e [M+Na$^+$] com valores de *m/z* de 481,0822 e 503,0631 (calculado 480,0745), concordantes com a fórmula empírica $C_{22}H_{16}N_4O_7S$ para íon molecular (Anexo 36). Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H apresentaram sinais em δ_C 115,07 (C-23 e C-25) e δ_H 6,87 (d; *J* = 9,0 Hz; H-23 e H-25), que foram confirmados através das correlações obtidas no mapa de contornos HETCOR, e com o acoplamento observado no espectro de HOMODEC com sinal em δ_H 7,81 (m; H-22 e H-26) (Anexos 38, 40, 41 e 42). Além disso, o sinal em δ_C 160,81 (C-20) apresentou correlação no mapa de contornos HETCOR-LR com o sinal em δ_H 7,81/m, confirmando H-22 e H-26 como um multipleto (Anexo 43; Tabela 10; Figura 16).

Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H em δ_H 8,44/s (H-18) e δ_H 11,70/s indicaram a presença do grupo imínio e hidroxila respectivamente no composto **55**. Esses dados confirmados através das bandas de absorção no espectro de IV em 1.537 cm^{-1} (C=N), 3.224 cm^{-1} (N-H) e 3.427 cm^{-1} (OH) (Anexo 37). O grupo *N*-óxido pôde ser confirmado pela banda de absorção presente no espectro de IV em 1.348 cm-^{1}, e a sulfona apresentou duas bandas, em 1.165 e 1.454 cm$^-$1.

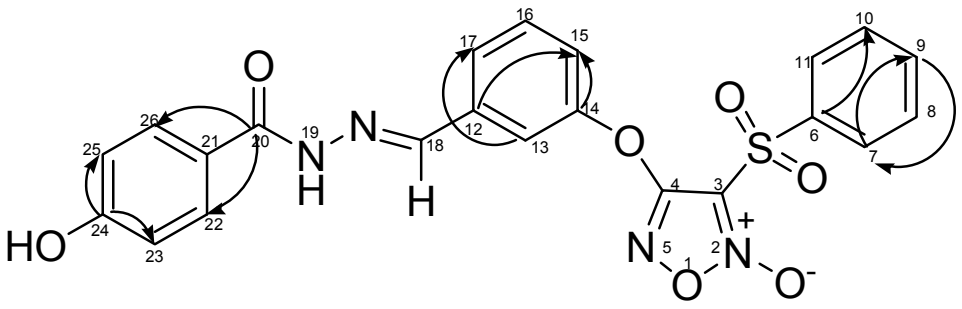


Figura 16. Principais correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR para *N*-acilhidrazona **46**

Tabela 10. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **46** (DMSO-d_6)

POSIÇÃO	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	HOMODEC (δ_H)	HETCOR-LR (δ_H)
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
3	111,2	–	–	–
4	158,5	–	–	–
5	–	–	–	–
6	135,1	–	–	7,77
7 e 11	128,5	8,07/ dd; 3,0 e 9,0	7,77; 7,92	7,92
8 e 10	130,0	7,80/ t; 9,0	–	–
9	136,2	7,92/ tt; 3,0 e 9,0	7,77; 8.07	8,07
12	136,8	–	–	7,56
13	121,1	7,49/ dl; 3,0	7,56	7,65
14	–	–	–	7,56
15	152,8	7,56/ t; 9,0	7,49 ; 7,65; 7,80	–
16	130,6	7,80/ t; 9,0	–	–
17	135,16	7,65/ d; 9,0	7,49 ; 7,56; 7,80	–
18	125,7	8,44/ s	–	–
19	145,3	10,16/ s	–	–
20	–	–	–	7,81
21	160,8	–	–	–
22 e 26	149,3	7,80/ t; 9,0	–	–
23 e 25	117,4	6,87/ d; 9,0	7,80	–
24	115,0	–	–	–
24-OH	123,7	11,70/s	–	–
	–			

5.5.3.3 *N*-acilhidrazona 47

A *N*-acilhidrazona **47** foi obtida como um pó branco. Seu espectro de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) no modo positivo apresentou picos relativos aos íons [M+H$^+$] e [M+Na$^+$] com valores de *m/z* de 481,0812 e 503,0618 respectivamente, que são consistentes com o valor de 480,0745 calculado com base na fórmula empírica $C_{22}H_{16}N_4O_7S$ para o íon molecular (Anexo 44). As bandas de absorção no espectro de IV em 1.537 cm^{-1} e 3.251 cm^{-1}, juntamente com os sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C em δ_C 147,35 (C-18) e ^1H em δ_H 8,50 (s; H-18) confirmaram a presença de um grupo imina (C=N) na molécula (Anexos 45-47). O grupo imina ainda pôde ser confirmado através das correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-12 (δ_C 132,40) e H-18 (Anexo 51; Figura 17). A banda em 3.448 cm^{-1} no IV e os sinais em δ_C 117,27 e δ_H 11,97 nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H confirmaram o grupo hidroxila no composto **47**. As bandas no espectro de IV em 1.359 e 1.309 cm^{-1} (*N*-óxido), 1.446 e 1.163 cm^{-1} (sulfona) confirmam a presença dos respectivos grupos.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 18 sinais, para os quais se destacam em δ_C 111,32 e δ_H 158,08 referentes aos C-3 e C-4 respectivamente (Anexo 46). O espectro ^1H apresentou o sinal em δ_H 7,92/tt (*J* = 1,2 e 9,0 Hz; H-9), o qual pôde ser observado acoplamentos no espectro de HOMODEC com os sinais em δ_H 8,06/dd (3,0 e 9,0 Hz; H-7/H-11) e δ_H 7,80/m (H-8/H10) (Anexos 48 e 50). Além disso, C-9 apresentou correlações no mapa de contornos HETCOR-LR com H-7/H-11, confirmando o sinal (Anexo 51). O duplo-dubleto em δ_H 8,06 no espectro e RMN de ^1H atribuído aos H-7/H-11 puderam ser confirmados através dos acoplamentos no espectro de HOMODEC entre H-8/H-10 e H-9, além das correlações no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-7/C-11 e H-9 (Figura 17; Tabela 11; Anexos 50 e 51).

O dubleto em δ_H 7,54 no espectro de RMN de ^1H foi atribuído aos H-14/H-16 devido ao acoplamento com os H-13/H-17 (δ_H 7,90; m) observado no espectro de HOMODEC, e correlações no mapa de contornos HETCOR-LR com C-12. Correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-20 e H-26 (δ_H 7,90/m), C-21 e H-26, C-15 e H-13/H-17 (δ_H 7,90;m) confirmaram as posições dos carbonos quaternários e a multiplicidade dos respectivos hidrogênios (Figura 17; Tabela 11; Anexos 50 e 51).

O sinal em δ_H 6,97 (dd; 3,0 e 9,0 Hz) no espectro de RMN de ^1H foi atribuído aos H-23 e H-25, dado confirmado através do mapa de correlações HETCOR (Anexo 49). O espectro de HOMODEC mostrou o acoplamento de H-23 e H-25 com os sinais em δ_H 7,45/dd (3,0 e 9,0 Hz; H-24) e δ_H 7,90/m (H-26), além das correlações no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-25 e H-23 (Tabela 11; Anexos 50 e 51).

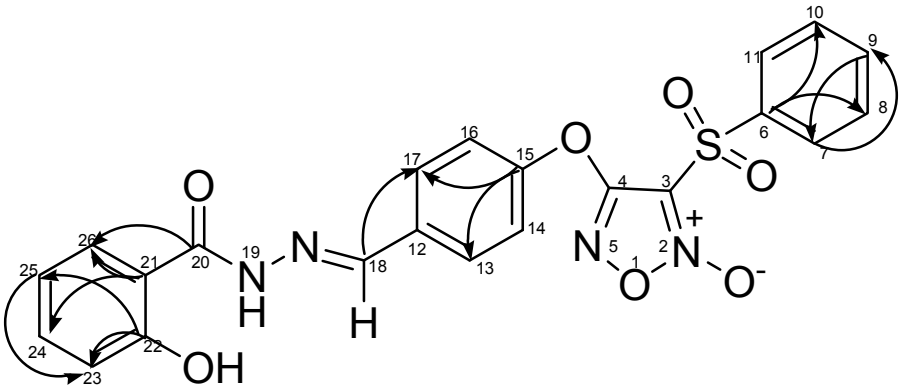


Figura 17. Principais correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **47**

Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **47** (DMSO-*d6*)

POSIÇÃO	δ_C	δ_H; mult.; J (Hz)	HOMODEC (δ_H)	HETCOR-LR (δ_H)
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
3	111,3	–	–	–
4	158,0	–	–	–
5	–	–	–	–
6	136,8	–	–	–
7 e 11	128,5	8,06/ dd; 3,0 e 9,0	7,77; 7,92; 7,77	7,92
8 e 10	130,0	7,77/ t; 9,0	–	–
9	136,1	7,92/ tt; 1,2 e 9,0	7,77; 8,06	8,06
12	132,4	–	–	7,54; 8,50
13 e 17	128,9	7,90/ m	–	–
14 e 16	120,0	7,54; d; 9,0	7,90	–
15	153,8	–	–	7,90
18	143,3	8,50/ s	–	7,90
19	–	–	–	–
20	164,7	–	–	7,90
21	158,9	–	–	7,45; 7,90
22	116,0	–	–	6,97
23	117,2	6,97/ dd, 3,0 e 9,0	7,45	–
24	133,8	7,45/ dd; 3,0 e 9,0	6,97; 7,90	–
25	119,0	6,97/ dd; 3,0 e 9,0	7,45	6,97
26	128,9	7,90/ m	–	–
23-OH	–	11,97/ s	–	–

5.5.3.4 *N*-acilhidrazonas 48 e 49

Os compostos foram identificados de maneira semelhante ao discutido em **47** para o anel aromático sulfônico, o anel heterocíclico aromático de cinco membros e o anel que carrega o grupo imínio. Os espectros de IV e RMN uni e bidimensionais encontram-se nos Anexos 52 a 67, e seus dados nas Tabelas 12 e 13.

5.5.3.4.1 *N*-acilhidrazona 48

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo para *N*-acilhidrazona **48** (pó branco) apresentou picos relativos aos íons [M+H$^+$] e [M+Na$^+$] com valores de *m/z* de 481,0812 e 503,0620 respectivamente, que são consistentes com o valor de 480,0745 calculado com base na fórmula empírica $C_{22}H_{16}N_4O_7S$ para o íon molecular (Anexo 52). O espectro de RMN de ^{1}H apresentou o duplo-dubleto em δ_H 6,98 (*J* = 3,0 Hz; H-22), que foi confirmado através das correlações obtidas no mapa de contornos HETCOR, e com o acoplamento observado no espectro de HOMODEC com sinal em δ_H 7,32/m (H-24, H-25 e H-26) (Anexos 56-58). Além disso, o C-21 em δ_C 157,5 apresentou correlações no mapa de contornos HETCOR-LR com o sinal em δ_H 7,81, confirmando H-24, H-25 e H-26 como um multipleto (Figura 18; Tabela 12; Anexos 54 e 59).

Correlações no mapa de contornos HETCOR-LR entre o grupo carbonila (C-20; δ_H 163,3) e hidroxila (δ_H 11,83; s), juntamente com as bandas em 1.633 cm^{-1} e 3.387 cm^{-1} no espectro de IV confirmaram a presença de ambos os grupos (Anexos 53 e 59). Ainda, as bandas em 1.541 cm^{-1}(C=N) e 3.226 cm^{-1} (N-H) com o sinal em δ_H 8,47 no espectro de RMN de ^{1}H indicaram o grupo imínio no composto **48** (Anexos 53 e 55). O grupo *N*-óxido pôde ser confirmado pela banda no espectro de IV em 1.354 cm^{-1}, e o grupo sulfona foi confirmado pela presença das bandas em 1.446 e 1.163 cm^{-1}.

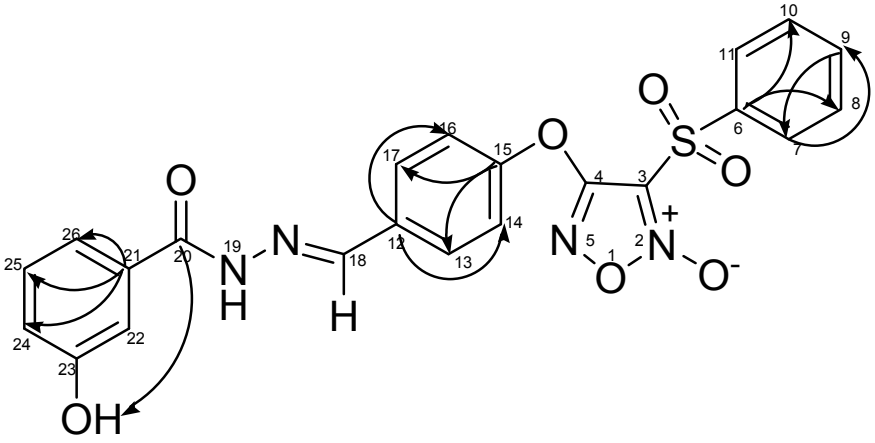


Figura 18. Principais correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **48**

Tabela 12. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **48** (DMSO-*d6*)

POSIÇÃO	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	HOMODEC (δ_H)	HETCOR-LR (δ_H)
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
3	111,3	–	–	–
4	158,1	–	–	–
5	–	–	–	–
6	136,9	–	–	–
7 e 11	128,5	8,06/ dd; 3,0 e 9,0	7,80; 7,90	7,90
8 e 10	130,2	7,80/ m	–	–
9	136,2	7,90/ tt; 3,0 e 9,0	7,80; 8,06	8,06
12	132,7	–	–	7,80; 8,47
13 e 17	135,1	7,80/ m	–	–
14 e 16	120,1	7,52/ d; 9,0	7,80	–
15	153,7	–	–	7,80
18	146,4	8,47/ s	–	–
19	–	9,78/ s	–	–
20	163,3	–	–	11,83
21	128,2	–	–	–
22	118,8	6,98/ dd; 3,0	7,32	–
23	157,4	–	–	7,32
24	114,5	7,32/ m	–	–
25	129,6	7,32/ m	–	–
26	118,1	7,32/ m	–	–
23-OH	–	11,83/ s	–	–

5.5.3.4.2 *N*-acilhidrazona 49

A *N*-acilhidrazona **49** foi obtida como um pó branco. Seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo apresentou picos relativos aos íons [M+H$^+$] e [M+Na$^+$] com valores de *m/z* de 481,0811 e 503,0616 respectivamente, que são consistentes com o valor de 480,0745 calculado com base na fórmula empírica $C_{22}H_{16}N_4O_7S$ para o íon molecular (Anexo 60). O grupo imínio foi identificado através das corelações no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-12 (132,92) e H-18 (δ_H 8,44;s) (Figura 19), além da presença das bandas de absorção no IV em 1.539 cm^{-1} (C=N) e 3.253 cm^{-1} (N-H) (Anexos 61 e 67). O sinal em δ_H 11,69 no espectro de RMN de ^{1}H, juntamente com banda em 3.410 cm^{-1} nos espectro de IV permitiram confirmar a presença de uma hidroxila na molécula (Anexos 61 e 63). A presença das bandas no espectro de IV em 1.440 e 1.169 cm^{-1} sugeriu a presença do grupo sulfona no composto **49**, e banda em 1.359 cm^{-1} indicou o grupo *N*-óxido.

O dubleto observado no espectro de RMN de ^{1}H em δ_H 6,86 (*J* = 9,0 Hz) foi atribuído aos H-23/H-25 devido ao acoplamento com o sinal em δ_H 7,82 (m; H-22/H-26) apresentado no espectro de HOMODEC, e correlações no mapa de contornos HETCOR (Anexos 65 e 66). Correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-21 (160,74) e o multipleto em δ_H 7,82, confirmaram este sinal como pertencente aos H-22 e H-26 (Tabela 13; Figura 19; Anexo 67).

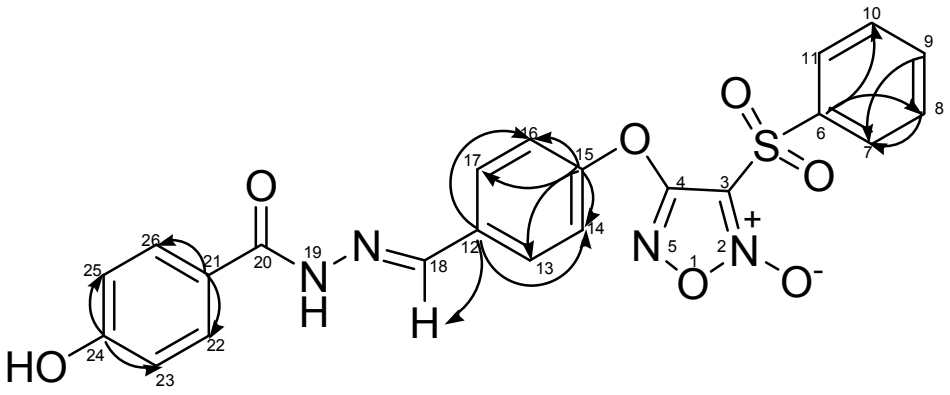


Figura 19. Principais correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **49**

Tabela 13. Dados de RMN de ^{1}H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para **49** (DMSO-d_6)

POSIÇÃO	δ_C	δ_H; mult.; *J* (Hz)	HOMODEC (δ_H)	HETCOR-LR (δ_H)
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
3	111,3	–	–	–
4	158,1	–	–	–
5	–	–	–	–
6	136,9	–	–	7,82
7 e 11	128,5	8,05/ dd; 1,2 e 9,0	7,82; 7,92	–
8 e 10	130,0	7,82/ m	–	8,05
9	136,2	7,92/ tt; 3,0 e 9,0	7,82; 8,05	8,05
12	132,9	–	–	7,82; 8,44
13 e 17	135,2	7,82/ m	–	–
14 e 16	120,0	7,51/ d; 9,0	7,82	–
15	152,5	–	–	7,51
18	145,9	8,44/ s	–	–
19	–	10,12/ s	–	–
20	162,9	–	–	–
21	160,7	–	–	7,82
22 e 26	128,6	7,82/ m	–	–
23 e 25	115,0	6,86/ d; 8,7	7,82	–
24-OH	–	11,69/ s	–	6,86

5.5.4 Compostos híbridos 51 e 52

Os compostos **51** e **52** são estruturas inéditas, e devido à difícil purificação, a identificação estrutural foi sugestiva diante das técnicas analíticas utilizadas, como espectrometria de massas de alta resolução, espectrofotometria de absorção no infravermelho e ressonância magnética nuclear uni e bidimensional.

5.5.4.1 Composto híbrido 51

O composto híbrido **51** foi obtido como um pó branco. O espectro de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) no modo positivo apresentou o pico relativo ao íon $[M+H^+]$ com valor de *m/z* de 643,0922, o qual é consistente ao valor calculado de 642,1062 com base na fórmula empírica $C_{31}H_{22}N_4O_{10}S$ (Anexo 68).

As bandas de absorção no espectro de IV em 1.531 (C=N) e 3.230 cm^{-1} (N-H), juntamente com as correlações no mapa de contornos de HSQC entre C-18 (δ_C 147,3) e H-18 (δ_H 8,27) confirmaram a presença do grupo imínio no composto **51** (Anexo 68). Além disso, o H-18 apresentou correlação no mapa de contornos de HMBC com C-12, confirmando a presença do respectivo carbono quaternário (Figura 20;). As bandas observadas no espectro de IV em 1.446 e 1.163 cm^{-1} foram consistentes à presença da sulfona (O=S=O), e a banda em 1.359 cm^{-1} confirmou o grupo *N*-óxido.

O dubleto em δ_H 7,16 (*J* = 8,4 Hz) foi atribuído ao H-26, uma vez que este apresentou correlações no mapa de contornos HMBC com C-21 (δ_C 150,8) e carbonila de amida C-20 (δ_C 162,8) (Figura 20; Anexo 72).

As bandas de absorção no espectro de IV em 1.739 e 1.766 cm^{-1} sugeriram a presença das carbonilas de ésteres C-27 e C-30 respectivamente (Anexo 68) (PAVIA et al., 1996). Correlações no mapa de contornos de HMBC entre H-31 (δ_H 2,28/s) e C-30 (δ_C 170,4), confirmaram a carbonila do grupo acetil (Figura 20; Anexo 71). Correlações observadas no mapa de contornos de HSQC entre o singleto com δ_H 2,28 (H-31) e o carbono com δ_C 20,9 (C-31) puderam confirmar a presença da metila na estrutura (Anexo 73).

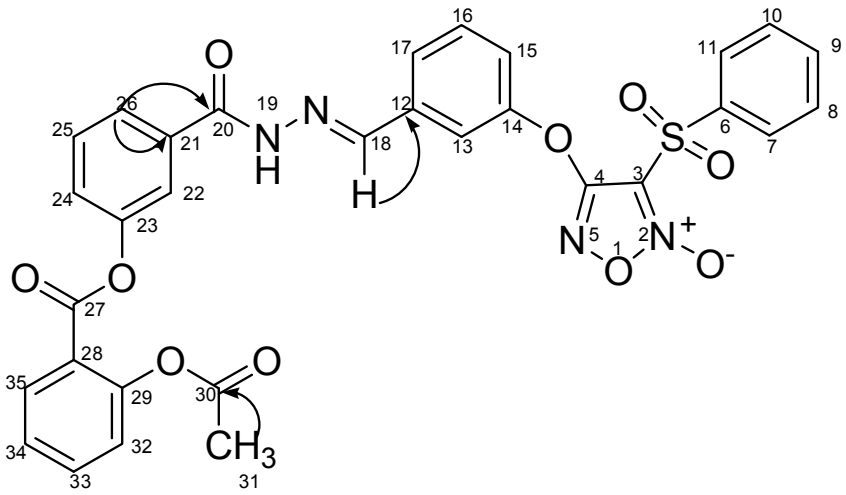


Figura 20. Principais correlações no mapa de contornos HMBC de *N*-acilhidrazona **51**

5.5.4.2 Composto híbrido 52

O composto híbrido **52** foi obtido como um pó branco. O espectro de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) no modo positivo apresentou o pico relativo ao íons $[M+H^+]$ com valor de *m/z* de 643,1146, o qual é consistente com o valor de 642,1062 calculado com base na fórmula empírica $C_{31}H_{22}N_4O_{10}S$ (Anexo 75).

As bandas de absorção no espectro de IV em 1.543 (C=N) e 3.226 cm^{-1} (N-H), juntamente com as correlações no mapa de contornos de HSQC entre C-18 (δ_C 147,3) e H-18 (δ_H 8,27) confirmaram a presença do grupo imínio na estrutura (Anexos 75 e 79). O H-18 apresentou correlações no mapa de contornos de HMBC com o carbono quaternário C-12 (δ_C 133,0) (Figura 23; Anexo 81). As bandas observadas no espectro de IV em 1.446 e 1.163 cm^{-1} foram consistentes à presença da sulfona (O=S=O), e a banda em 1.365 cm^{-1} confirmou o grupo *N*-óxido (Anexo 75).

Os carbonos quarternários C-20 (δ_C 163,0) e C-21 (δ_C 150,8) puderam ser identificados através das correlações no mapa de contornos de HMBC com H-22/26 (δ_H 8,19/dd; 7,80 Hz) (Figura 23; Anexo 80). A banda de absorção no espectro de IV em 1.739 cm^{-1} sugeriu a presença da carbonila de éster C-30 (Anexo 75). A carbonila ainda pôde ser confirmada através das correlações no mapa de contornos HMBC entre H-31 (δ_H 2,30/s) e o carbono C-30 (δ_C 170,4) (Anexo 80). O grupo metila foi identificado através das correlações no mapa de contornos de HSQC entre o H-31 (δ_H 2,30/s) e C-31 (δ_C 22,1) (Figura 21; Anexo 78).

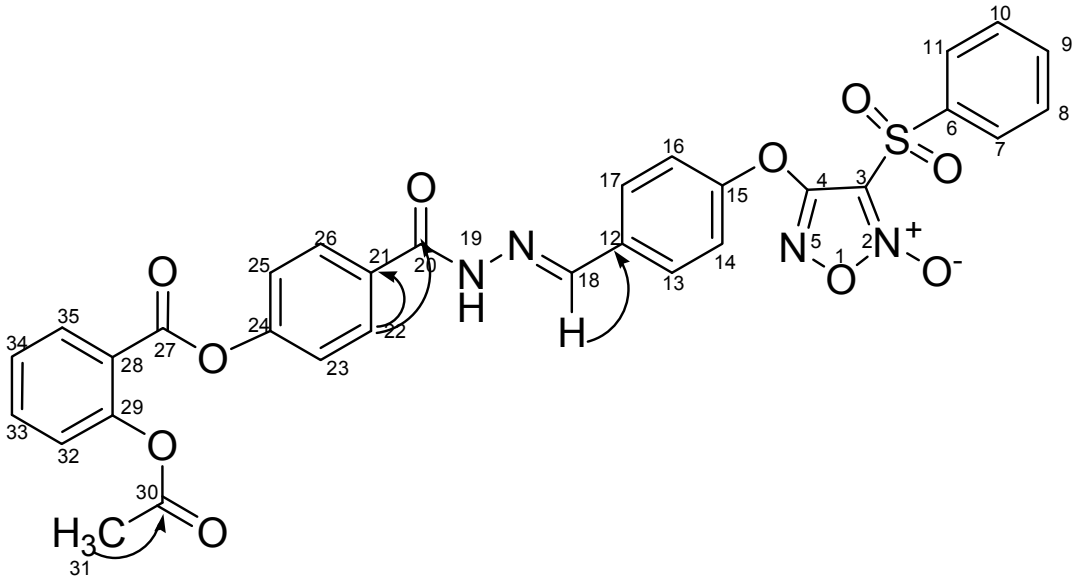


Figura 21. Principais correlações no mapa de contornos HMBC de *N*-acilhidrazona **52**

5.6 Inibição da agregação plaquetária

Os compostos contendo o espaçador *N*-acilhidrazona com propriedades doadoras de óxido nítrico **44**-**49** inibiram a agregação de plaquetas induzidas por ADP com potência superior ao do ácido acetilsalicílico, usado como controle positivo (Figura 24). A capacidade inibitória da agregação plaquetária por compostos que apresentam a subunidade *N*-acilhidrazona é bem estabelecida, mas a posição no qual este se encontra pode ser um fator significante na atividade biológica. Compostos sintetizados por Lima e colaboradores (2009) contendo o espaçador *N*-acilhidrazona em posições *meta* foram mais potentes que os compostos com o espaçador em posições *orto* ou *para*.

Os compostos de **44-46** com o espaçador *N*-acilhidrazona em posições *meta* tiveram maior capacidade na inibição da agregação plaquetária do que os compostos com o espaçador em posições *para* (**47**-**49**). O composto **44** inibiu 83,3% da agregação plaquetária, enquanto que o **47** inibiu 77,5%. O composto **45** apresentou uma porcentagem de inibição significativa em relação ao **48**, levando em consideração o desvio padrão deste último (Figura 23). Ainda pôde-se observar que a presença do grupo hidroxila nas diferentes posições nos compostos **44**-**46** (meta) e **47**-**49** (para) não foi relevante para a atividade biológica, uma vez que para os dois grupos a atividade foi similar (Figura 22).

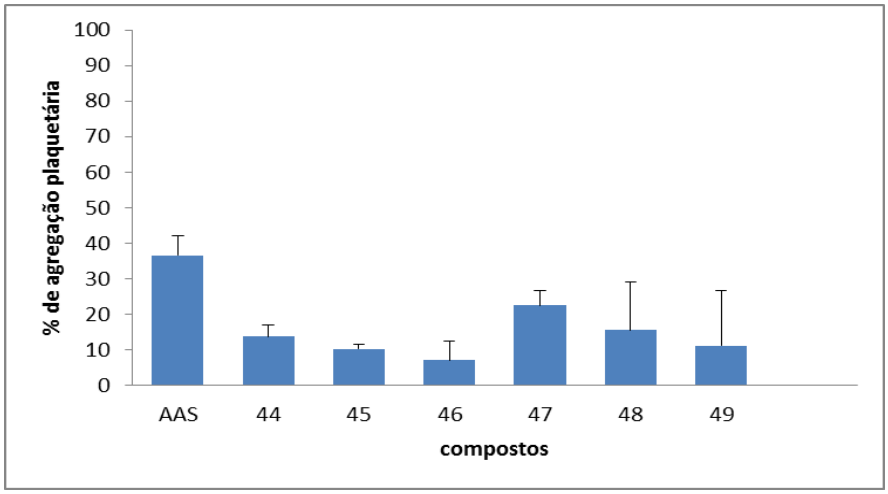


Figura 22. Porcentagem de agregação plaquetária para os compostos **44-49**

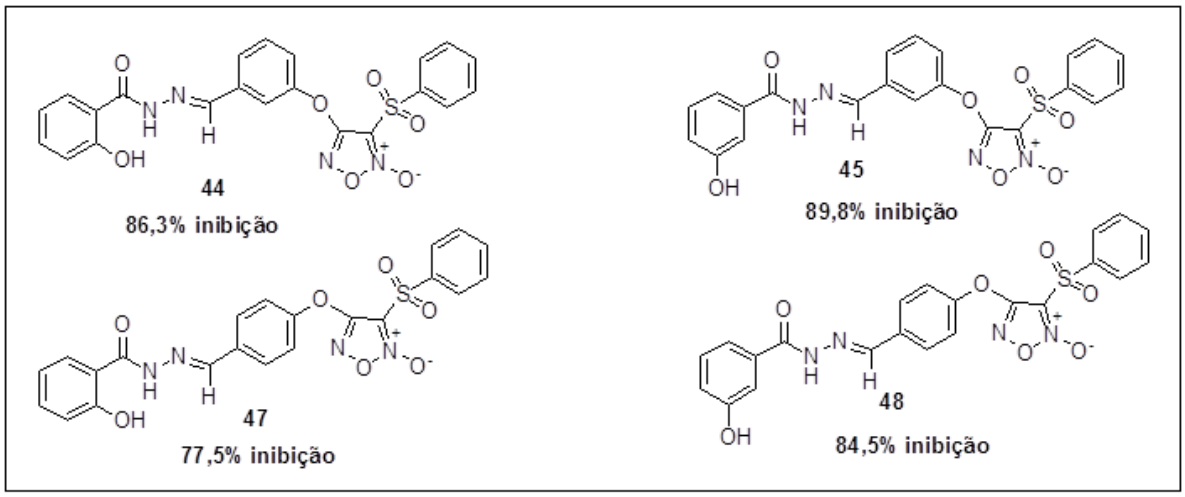


Figura 23. Relação entre as posições *meta* e *para* na atividade antiagregante plaquetária

5.7 Avaliação do tempo de sangramento

A busca por novos fármacos preventivos de aterotrombose ou infarto agudo do miocárdio ainda é uma desafio na Química Farmacêutica Medicinal, uma vez que as classes de compostos disponíveis provocam sangramentos como uns dos principais efeitos adversos. Atividade antitrombótica dos agentes fibrinolíticos e anticoagulantes é devido à degradação e redução na formação de fibrina respectivamente, fatores estes relacionados ao sangramento (PORTNARY et al., 2005; MORROW et al., 2012).

Na classe dos fármacos antiagregantes plaquetários o sangramento também é um sério problema na terapia. Estudos confirmaram que o sangramento ocasionado pelo AAS

está relacionado ao efeito fibrinolítico devido à redução das concentrações dos inibidores do ativador de plasminogênio-1 (IAP-1), levando ao aumento na atividade da plasmina.

A avaliação do tempo de sangramento teve como objetivo avaliar a inibição da coagulação pelos compostos sintetizados, os quais foram desenvolvidos como antiagregante plaquetários. Os compostos sintetizados **44**-**49** apresentaram menor tempo de sangramento em relação ao controle positivo (Figura 24). Os espaçadores *N*-acilhidrazonas **44**-**46** com maior porcentagem de inibição da agregação de plaquetas apresentaram um maior tempo de sangramento em relação aos compostos **47** e **48**, com menor capacidade de inibição da agregação plaquetária. O composto **49** apresentou tempo de sangramento superior ao controle negativo (CMC), apesar de uma potente capacidade de inibição da agregação plaquetária (Figura 24).

A potencial inibição da agregação plaquetária e o tempo de sangramento similar ao do controle negativo (CMC) para os compostos de **44**-**48** sugerem que estes não degradam ou não reduzem a formação do coágulo de fibrina, ao contrário do observado para o controle positivo (AAS) (Figura 24).

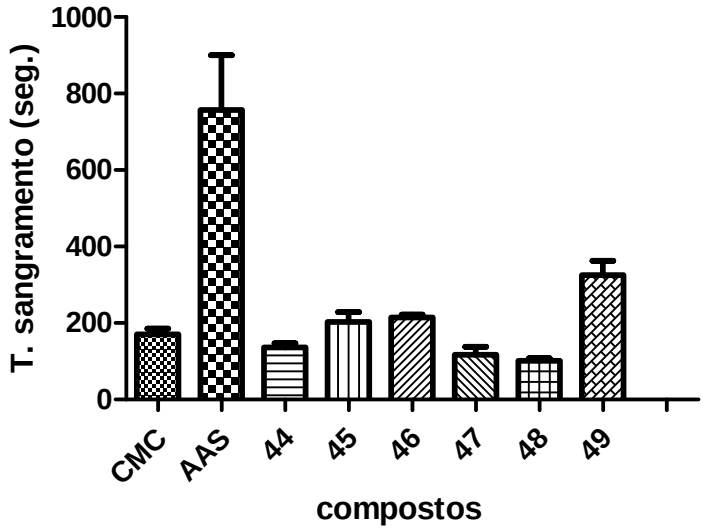
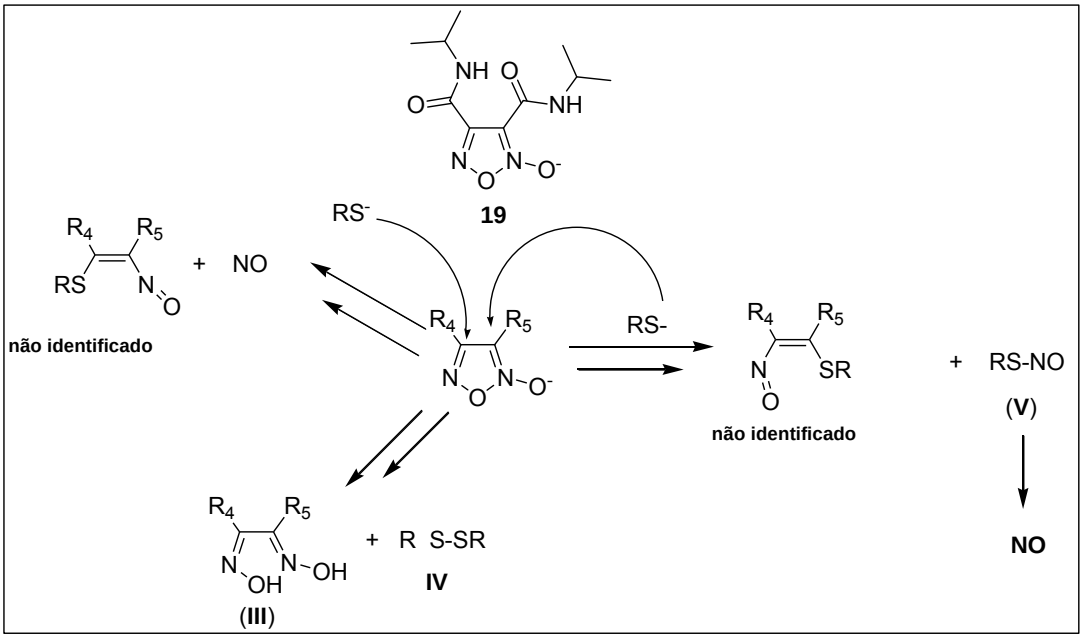


Figura 24. Avaliação do tempo de sangramento para os compostos **44-49**

5.8 Avaliação indireta da capacidade doadora de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro importante envolvido em muitos processos fisiológicos e desempenha papel fundamental na neurotransmissão, no controle da pressão sanguínea e inibição da agregação plaquetária. O NO é uma molécula gasosa simples, encontrada na atmosfera em pequenas quantidades, e quando diluído o NO tem curto tempo de meia vida (menos de 10 segundos) devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (BARRETO e CORREA, 2005).

A capacidade doadora de NO por furoxanos foi primeiramente relatada por Gosh e Everitt (1974), o qual avaliou a atividade vasodilatadora do benzo-difuroxano comparada a nitroglicerina (GOSH e EVERITT et al., 1974). Apesar da doação de NO estar bem fundamentada na literatura, o mecanismo correto ainda permanece obscuro. O composto ipramidil (**19**) foi relatado como um potente vasodilatador, e sua doação de NO foi confirmada através da interação com tióis (Esquema 11). Foi possível realizar a identificação de dois produtos (**III** e **IV**) além de nitrosotiol (**V**) após a interação de ipramidil com L-cisteína. Após esses resultados, o mecanismo de doação de NO pelo anel furoxânico foi proposto (Esquema 11) (FEELISCH et al., 1992).



Esquema 11. Mecanismo doação de NO proposto para anel furoxânico (adaptado de Feelish et al., 1992)

A detecção do NO representa um desafio na Química Farmacêutica Medicinal em função da meia-vida curta deste composto (DUSSE et al., 2003). Uma das formas de avaliar a capacidade de doação de óxido nítrico por compostos sintéticos é quantificar o nitrito presente em solução. Um dos principais métodos de quantificação de nitrito para derivados furoxânicos é descrito por Sorba et al., 1997.

As concentrações de nitrito foram quantificadas através da preparação de curva de soluções padrão de nitrito de sódio em concentrações de 10 a 80 nmol/mL (Figura 25). A capacidade de doação de NO foi expressa em porcentagem de nitrito (NO_2^- mol/mol), calculada através da relação entre número de mol de NO_2^- detectado, pelo número de mol dos respectivos compostos multiplicado por 100.

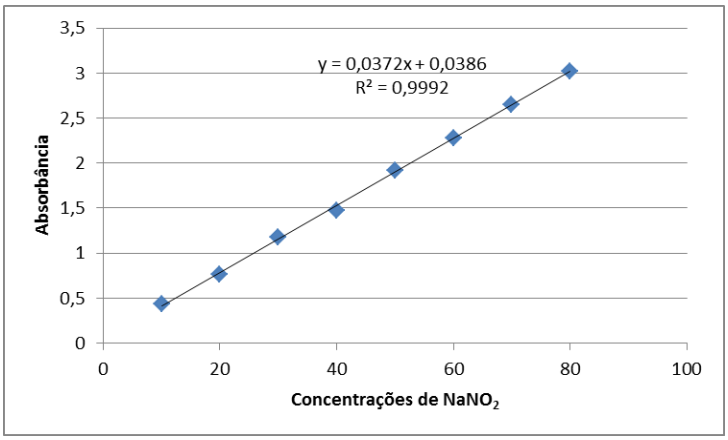


Figura 25. Curva com soluções padrão de nitrito de sódio (10-80 nMol/mL)

Segundo o mecanismo de doação de NO descrito por Gosh e colaboradores (1974), os furoxânos são capazes de liberar NO na presença de tióis. No entanto, através do ensaio realizado sugere-se que o mecanismo de doação de NO pelos compostos segue o descrito por Gosh e colaboradores (1974), devido à liberação ser cisteína-dependente. Os resultados estão dispostos na Figura 26.

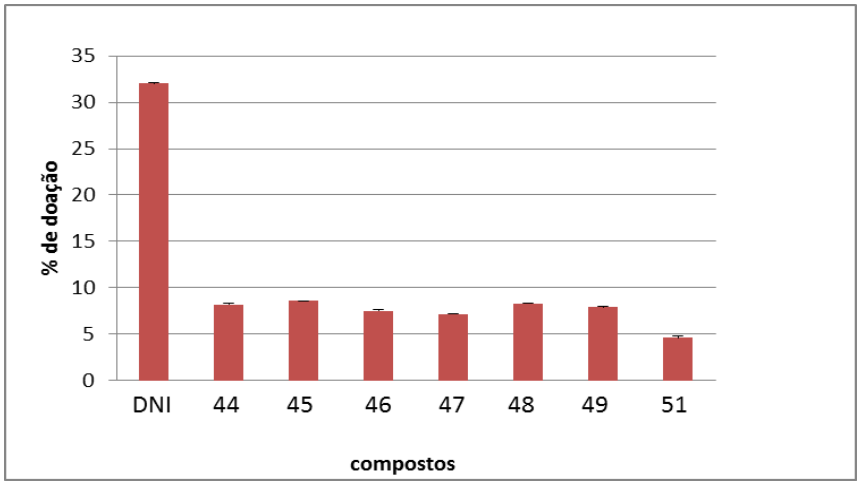


Figura 26. Porcentagem de doação de NO pelos compostos **44**-**49** na presença de cisteína

**DNI: Dinitrato de isossorbida

6 CONCLUSÕES

Foi possível realizar a síntese, purificação e caracterização estrutural por RMN de ^{1}H, ^{13}C, e Espectromeria de Massas do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano) (**34**), sendo este escolhido como doador de óxido nítrico para este trabalho. A seleção deste derivado levou em consideração resultados prévios obtidos em nosso laboratório que demonstraram grande capacidade de doação de óxido nítrico.

A partir do furoxano (3,4-bisaril-sulfonilfuroxano) (**34**) foi possível estudar a melhor condição reacional para sintetizar os derivados furoxânicos **38-40**. A combinação de DBU e DCM como solvente de reação (procedimento **8**), apresentou maior seletividade na formação, bem como maiores rendimentos na obtenção dos derivados **38-40**. Os compostos foram identificados por Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H e ^{13}C, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho e Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

Uma série seis espaçadores *N*-acilhidrazonas contendo o núcleo furoxânico (**44-49**) foi sintetizada a partir dos derivados **39** e **40,** de acordo com planejamento estrutural. Os compostos foram purificados e caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear Uni e Bidimensional, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho, e Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

A partir dos espaçadores *N*-acilhidrazonas **46** e **49** foi possível realizar a síntese de dois compostos híbridos (**51** e **52**), os quais contém em sua estrutura a unidade do ácido acetilsalicílico. A determinação estrutural foi sugestiva de acordo com as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear Uni e Bidimensional, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho, e Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

Os espaçadores *N*-acilhidrazonas **44**-**49** mostraram maior potencia na inibição da agregação plaquetária em relação ao controle positivo (AAS), e tempo de sangramento similar ao controle negativo. Estes resultados sugerem que os compostos não interferem no processo de coagulação, o qual é uma propriedade inovadora em relação aos fármacos preventivos aterotrombose disponíveis na terapêutica. Para os mesmos compostos sintetizados foi possível quantificar a porcentagem de doação de nitrito na presença de cisteína, podendo sugerir um mecanismo de doação de NO semelhante ao descrito por Gosh e colaboradores (1974).

7 PERSPECTIVAS

1) Avaliação da capacidade antitrombótica do espaçador *N*-acilhidrazonas **46**;
2) Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos compostos híbridos **51** e **52**;
3) Avaliação da propriedade antiagregante plaquetária dos compostos híbridos **51** e **52**;
4) Avaliação da propriedade doadora de óxido nítrico dos compostos híbridos **51** e **52**;
5) Avaliação do tempo de sangramento dos compostos híbridos **51** e **52**;

Os espaçadores *N*-acilhidrazonas com propriedades doadoras de óxido nítrico obtidos neste trabalho foram mais potentes na inibição da agregação plaquetária sem os efeitos colaterais presente nos fármacos disponíveis na terapêutica. O inetidismo destes compostos juntamente com os benefícios que apresentam, corroboram para o patenteamento com uma Indústria Farmacêutica para dar segmento nos estudos clínicos, uma vez que os espaçadores *N*-acilhidrazonas são candidatos a fármacos para serem utilizados como antiagregantes plaquetários e antitrombóticos.

REFERÊNCIAS

ARORA, P. K.; MITTAL, A.; KAUR, G.; CHAUHAN, A. Synthesis of some novel oxadiazole based chalcone derivatives as anti-bacterial agents. *IJPSR*., v. 4, p. 419-424, 2013.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Quím. Nova*., v. 22, p.744-759, 1999.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C.R.D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim. Nova*, v. 28, n. 6, p.1046-1054, 2005.

BOZZO, F.; BASSIGNANA, A.; LAZZARATO, L.; BOSCHI, D.; GASCO, A.; BOCCA, C.; MIGLIETTA, A. Novel nitro-oxy derivatives of celecoxib for the regulation of colon cancer cell growth . *Chem. Biol. Inter*., v. 182, p. 183-190, 2009.

BRITO, F. C. F. DE. Estudo da atividade antiagregante plaquetária e mecanismo de ação de compostos tienilacilhidrazônico análogos ao LASSBio-294. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas – Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BRISTER, S. J.; BUCHANAN, M. R. *Heart*, v. 95, p.1223-1224, 2009.

BRUICE, P. Y. Química Orgânica. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BUCZKO, W.; MOGIELNICKI, A.; KRAMKOWSKI, K.; CHABIELSKA, E. Aspirin and the fibrinolytic response. *Thromb. Res*., v. 110, p. 331-334, 2003.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica, 2012.

CALVINO R.; MORTARINI, V.; GASCO, A.; SANFILIPPO, A.; RICCIARDI, M.L. Antimicrobial properties of some furazan and furoxan derivatives. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther*., v.15, p. 485–487, 1980.

CAMPBELL, C. L.; SMYTH, S.; MONTALESCOT, G.; STEINHUBL, S. R. Aspirin Dose for the Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic. *JAMA*. v. 297, p. 2018-2024, 2007.

CENA, C.; VISENTIN, S.; GASCO, A.; MARTORANA, P. A.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Platelet antiaggregatory effects and haemodynamic activity of two terfuroxan isomer pairs *Il Farmaco*, v. 57, p. 417-420, 2002.

CENA, C.; LOLLI, M. L.; LAZZARATO, L.; GUAITA, E.; MORINI, G.; CORUZZI, G.; MCELROY, S. P.; MEGSON, I. L.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Antiinflammatory, Gastrosparing, and Antiplatelet Properties of New NO-Donor Esters of Aspirin. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 747-754, 2003.

CENA, C.; BOSCHI, D.; TRON, G. C.; CHEGAEV, K.; LAZZARATO, L.; DISTILO, A.; ARAGNO, M.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Development of a new class of potential antiatherosclerosis agents: NO-donor antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., v.14, p. 5971-5974, 2004.

CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-oxadiazole *N*-oxide

derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*, v.42, p.1941–1950, 1999.

CERECETTO,H.; PORCAL, W. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. *Mini-Rev. Med. Chem*., v. *5,* p. 57-71, 2005.

CHACKALAMANNIL, S.; WANG, Y.; GREENLEE, W. J. Discovery of anovel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J. Med. Chem*., 2008; v. 51, p. 3061-400.

CHARO, I. F.; TAUB, R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nature Rev. Drug Disc*., v. 10, p. 365-376, 2011.

CHUNG, M. C; GUIDO, R. V.; MARTINELLI, T. F.; GONÇA ALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.; TERESA, M.; FERREIRA, E. I.; Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. *Bioorg. Med.Chem*., v. 11, p. 4779-4783, 2003.

CIVELLI, M.; CARUSO, P.; BERGAMASCHI, M.; RAZZETTI, R.; BONGRANI, S.; GASCO, A. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 255, p. 17, 1994.

CLAYDEN, J. Organic Chemistry. New York: Oxford University Press, 2001.

DEL GROSSO, E.; BOSCHI, D.; LAZZARATO, L.; CENA, C.; DI STILO, A.; FRUTTERO, R.; MORO, S.; GASCO, A. The furoxan system: design of selective nitric oxide (NO) nonor inhibitors of COX-2 endowed with antiaggregatory and vasodilating activities. *Chem. Biodivers.*, v. 2, p. 886-900, 2005.

DEEPAK, L.; BHATT, M. P. H.; GREGG, W. S. Effect of Platelet Inhibition with Cangrelor during PCI on Ischemic Events. *N. Engl. J. Med*., v. 368, p. 1303-1313, 2013.

DOUGLAS, C. R. Patofisiologia Geral- Mecanismo de Aterogênise. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *J.Bras.Pat.Med.Lab*.,v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FANG, L.; ZHANG, Y.; LEHMANN, J.; WANG, Y.; DING, D. Design and synthesis of furoxan-based nitric oxide-releasing glucocorticoid derivatives with potent anti-inflammatory activity and improved safety. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., v. 17, p.1062-1066, 2007.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (DBH VI), v. 95, p. 1-151, 2010.

FARMER, J. A.; TORRE-AMIONE, G. Atherosclerosis and inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.*, v. 4, p. 92-98, 2000.

FARRAR, W. V. The 3,4-bisarenesulfonylfuroxans. *J. Chem. Soc.*, p. 904–906, 1964.

FEELISCH, M.; SCHÖNAFINGER, K.; NOACK, E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. *Biochem. Pharmacol*., 1992, 44, 1149.

FRAGA, A. G. M.; RODRIGUES, C. R.; De MIRANDA, A. L. P.; BARREIRO, E. J. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 11, p. 285-290, 2000.

FRUTTERO, R.; SORBA, G.; ERMOND, G.; LOLLI, M.; GASCO, M. Unsymmetrically substituted furoxans. XVII. Structural investigations in benzenesulfonylfuroxan derivatives and related compounds. *Il Farmaco*, v. 52, p. 405–410, 1997.

GALLI, U.; LAZZARATO, L.; BERTINARIA, M.; SORBA, G.; GASCO, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. *Eur. J. Med. Chem.,* v. 40, p. 1335-1340, 2005.

GASCO, A.; BOULTON, A. J. Furoxans and Benzofuroxans. *Adv. Heterocycl. Chem.*, v. 29, p. 251-340, 1981.

GOSH, P. B.; EVERITT, B. J. Furazanobenzofuroxan, furazanobenzothiadiazole, and their N-oxides. New class of vasodilator drugs. *J. Med. Chem*., 1974, v. 17, p. 203-206.

HAMILTON, J. R. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. *Blood*. *Rev*., v. 23, p. 61-65, 2009.

HASSNER, A.; ALEXANIAN, V. Direct room temperature esterification of carboxylic acid. *Tetrahedron Lett.,* n. 46, p. 4475-4478.

HO, S. J.; BRIGHTON, T. A. *Vasc. Health Risk Manag.*, v.2, p. 49-58, 2006.

KUMMERLE, A. E. Síntese de compostos cardioativos 1,3-benzodioxolil-*N*-acilhidrazônicos planejados por otimização estrutural do protótipo LASSBio-294. Dissertação. (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v. 420, p. 868-874, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, v. 473, p. 317-325, 2011.

LIBBY, P. Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*., v. 32, p. 2045-2051, 2012.

LAZZARATO, L.; CENA, C.; ROLANDO B.; MARINI, E.; LOLLI, M. L.; GUGLIELMO, S.; GUAITA, E.; MORINIB, G.; CORUZZI, G.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Searching for new NO-donor aspirin-like molecules: Furoxanylacyl derivatives of salicylic acid and related furazans. *Bioorg. Med. Chem*., v. 19, p. 5852–5860, 2011.

LIMA, L. M.; FRATTANI, F. S.; SANTOS, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E.J; Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate–acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *Eur. J. Med. Chem*., v. 43, p. 348-356, 2008.

MARTINELLI, I.; BUCCIARELLI, P.; MANNUCCI, P. M. Thrombotic risk factors: Basic pathophysiology. *Crit*. *Care Med.*, v. 38, p. S3-S9, 2010.

MCMURRY, J. Química Orgânica. São Paulo: Cengage Learning, 2005.

MIRANDA, A. L. P.; LIMA, P. C.; TRIBUTINO, J. L. M.; MELO, P. A.; FERNANDES, P. D.; CINTRA, W. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; Anti-inflammatory, analgesic and anti-platelet properties of LASSBio-294, a new thienylacylhydrazone derivative. Abstract du 6 ème Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie, P296; Rennes, França, 2002.

MORROW, D. A.; BRAUNWALD, E.; BONACA, M. P. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N. Engl. J. Med*., v. 366, 1404-1413, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to spectroscopy. Orlando: Saunders College Publishing, 1996.

PENG, S. K.; HU, B.; MORIN, R. J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J. Clin. Lab. Anal.*, v. 5, p. 144-152, 1991.

PORTNAY, E. L.; FOODY, J. M.; RATHORE, S. S.; WANG, Y.; MASOUDI, F. A.; CURTIS, J. P.; KRUMHOLZ, H. M. Prior Aspirin Use and Outcomes in Elderly Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 46, p. 967-974, 2005.

NIESWANDT, B.; WATSON, S. P. Platelet–collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, v. 102, p. 449-461, 2003.

Bhole, R. P.; Bhusari, K. P. Synthesis, Antihypertensive Activity, and 3D-QSAR Studies of Some New p-Hydroxybenzohydrazide Derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*., v. 2, p. 119–134, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia, 2012.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL S. G. Biological activities of hydrazones derivatives. *Molecules*. v.12*,* p.1910-1939, 2007.

RUGGERI, Z. M. Platelet in atherotrombosis. *Nature Med*., v. 8, p. 1227-1234, 2002.

SANTOS, J. L. Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme. 2009. ese (Doutorado em iências Farmacêuticas) Faculdade de iências Farmacêuticas, niversidade stadual aulista, Araraquara. 2009.

SAVAGE, B.; CATTAENO, M.; RUGGERI, Z. M. Mechanism of platelet aggregation. *Curr. Opin. Hematol*., v. 8, p. 270-276, 2001.

SCHWARS, U. R. WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem. Pharmacol*., v. 62, p. 1153-1161, 2001.

SEMPLE, J.W.; FREEDMAN, J**.** Platelets and innate immunity. *Cell Mol. Life Sci.,* v. 67, p. 499-511, 2010.

SHARMA, R.K.; REDDY, H.K.; SINGH, V.N.; SHARMA, R.; VOELKER, D.J.; BHATT, G. Aspirin and clopidogrel hyporesponsiveness and nonresponsiveness in patients with coronary artery stenting. *Vasc. Health Risk Manag*., v. 5, p. 965-972, 2009.

SILVA, G. A.; ZAPATA-SUDO, G.; KUMMLE, A. E.; FRAGA, C. A .M.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acilhidrazones derivatives designed as LASSBio-294 analogues. *Bioog. Med. Chem*., v. 13, p. 3431-3437, 2005.

SLIWA, W. The Chemistry of Furazans. *Heterocycles*, v. 22, p. 1571-1589, 1984.

SORBA, G.; ERMONDI, G.; FRUTTERO, R.; GALLI, U.; GASCO, A. *J. Heterocyclic Chem.*, v. 33, p. 327,1996.

TANTRY, U. S.; MAHLA, E.; GURBEL, P. A. Aspirin Resistance. *Progr. Cardiovasc. Dis*., v. 52, p.141-152, 2009.

TODESCHINI, A. R.; DE MIRANDA, A. L. P.; SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C.; BARREIRO, E. J. *Eur. J. Med. Chem.,* v. 33, p.189-199, 1998.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth coupling reagents. *Chem. Soc. Rev*., v. 38, p. 606-631, 2009.

WARD, A.; CHAFFMAN, M. O.; SORKIN, E. M. Dantroleno – a review of its pharmacodynac and pharmacokinetic properties and therapeutics use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs*, v. 32, p. 130-168, 1986.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. C. Platelets in inflammation and thrombosis. *Aterioscler*. *Thromb. Vasc. Biol*., v. 23, p. 2131-2137, 2003.

WHO. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Gênova: Shanthi Mendis, 2011. 164 f.

YEH, E. T. H; KHAN, B. V. The potential role of antiplatelet agents in modulating inflammatory markers in atherothrombosis. *J. Thromb. Haemost*., v.4, p.2308-2316, 2006.

ZAFAR, M. U.; VILAHUR, G.; CHOI, B. G.; IBANEZ, B.; VILES-GONZALEZ, J. F.; SALAS, E.; BADIMON,J. J. A novel anti-ischemic nitric oxide donor (LA419) reduces thrombogenesis in healthy human subjects. *J. Thromb. Haemost*., v. 5, p. 1195-1200, 2007.

ZAPATA- SUDO, G.; SUDO, R. T; MARONAS, P. A.; SILVA, G.; MOREIRA, R.; AGUIAR, M. I. S.; BARREIRO, E. J. Thienylhydrazone derivative increase sarcoplasmic reticulum Ca^{+} releasein mammalian skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol*., v. 470, p. 79-85, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1

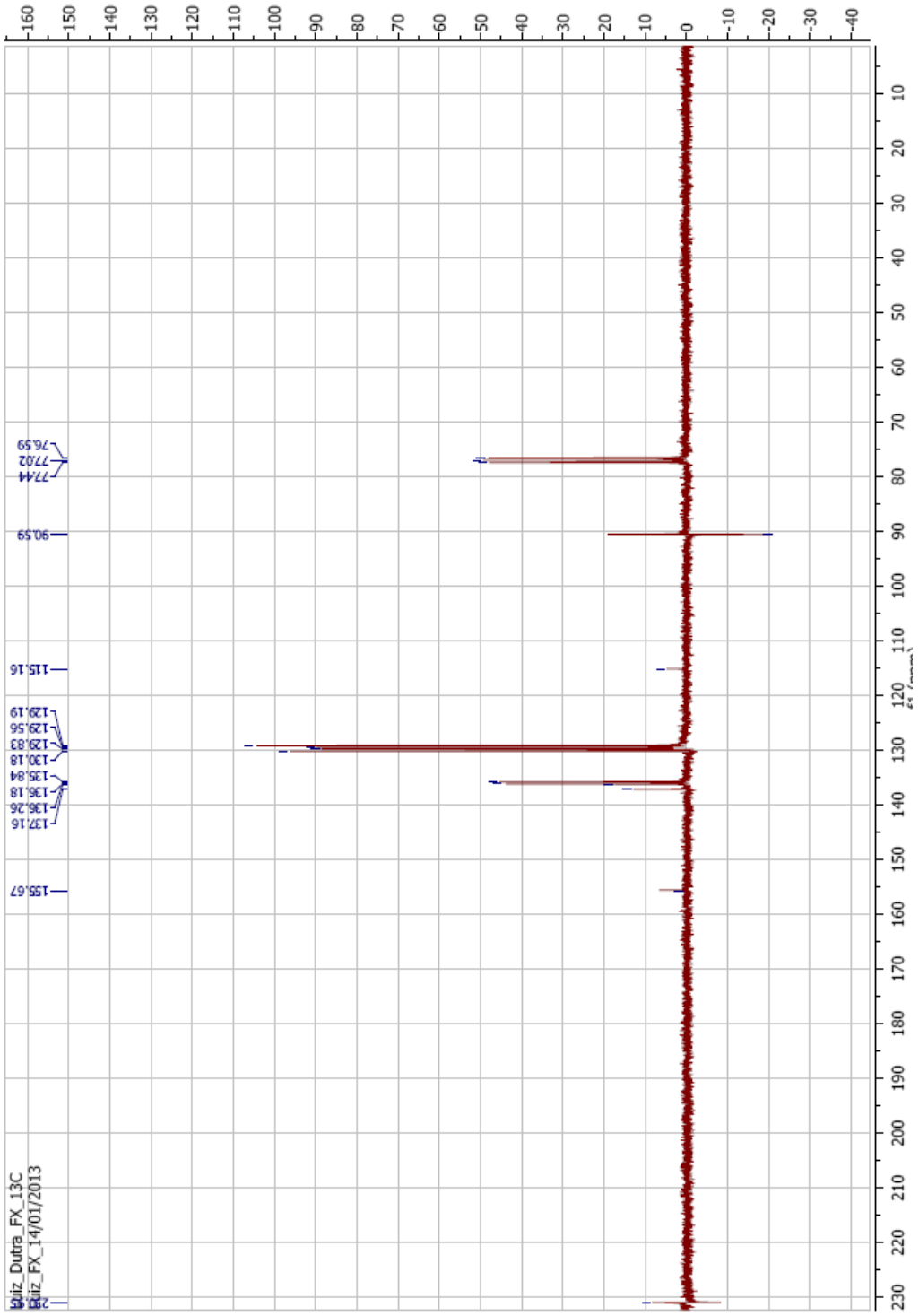


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) de 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**) ($CDCl_3$)

ANEXO 2

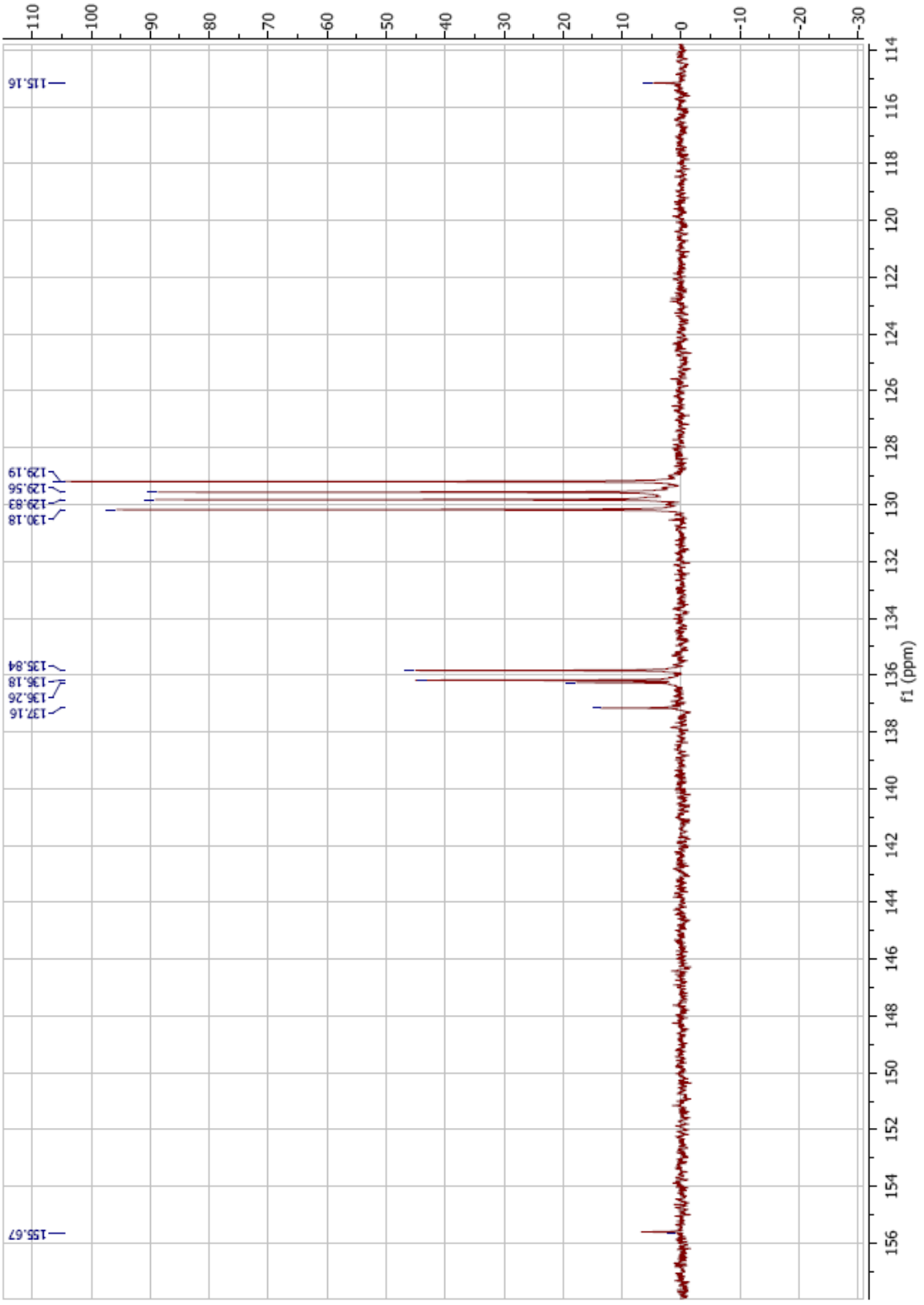


Figura: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) de 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**) ($CDCl_3$

ANEXO 3

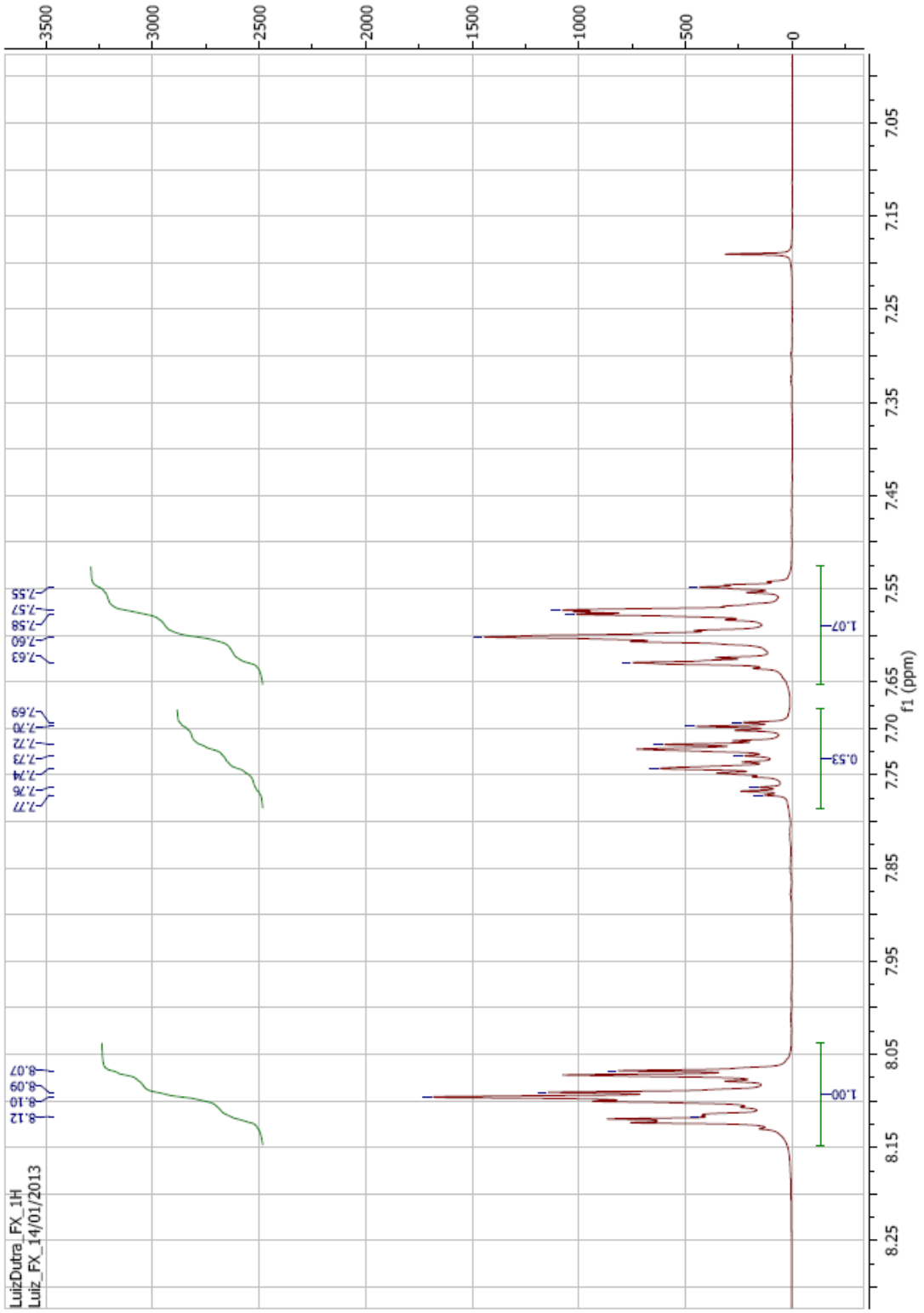


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H de 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano **34** ($CDCl_3$)

ANEXO 4

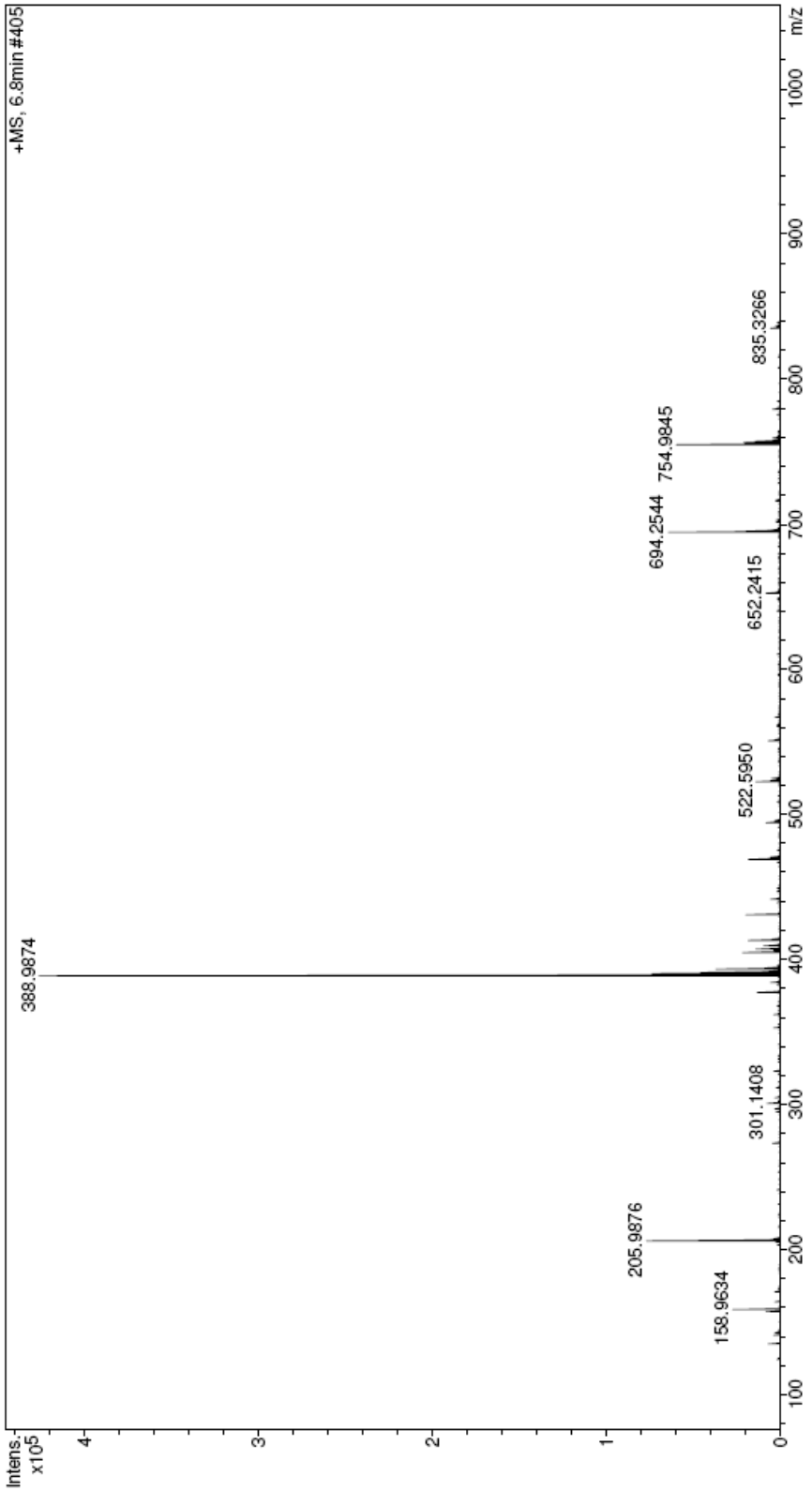


Figura: Espectro de massas de 3,4-bisaril-sulfonilfuroxano (**34**)

ANEXO 5

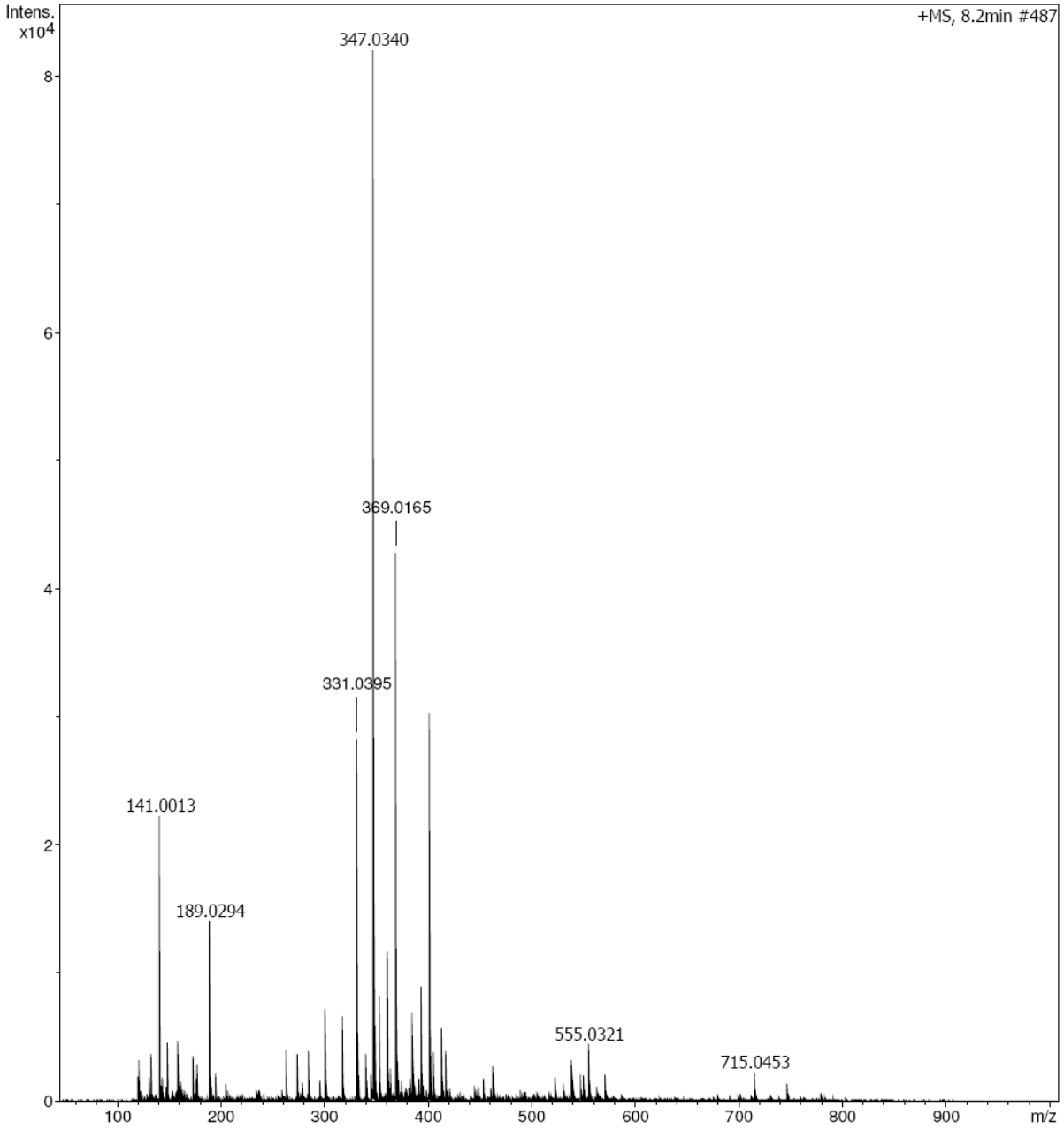


Figura: Espectro de massas do derivado furoxânico **38**

ANEXO 6

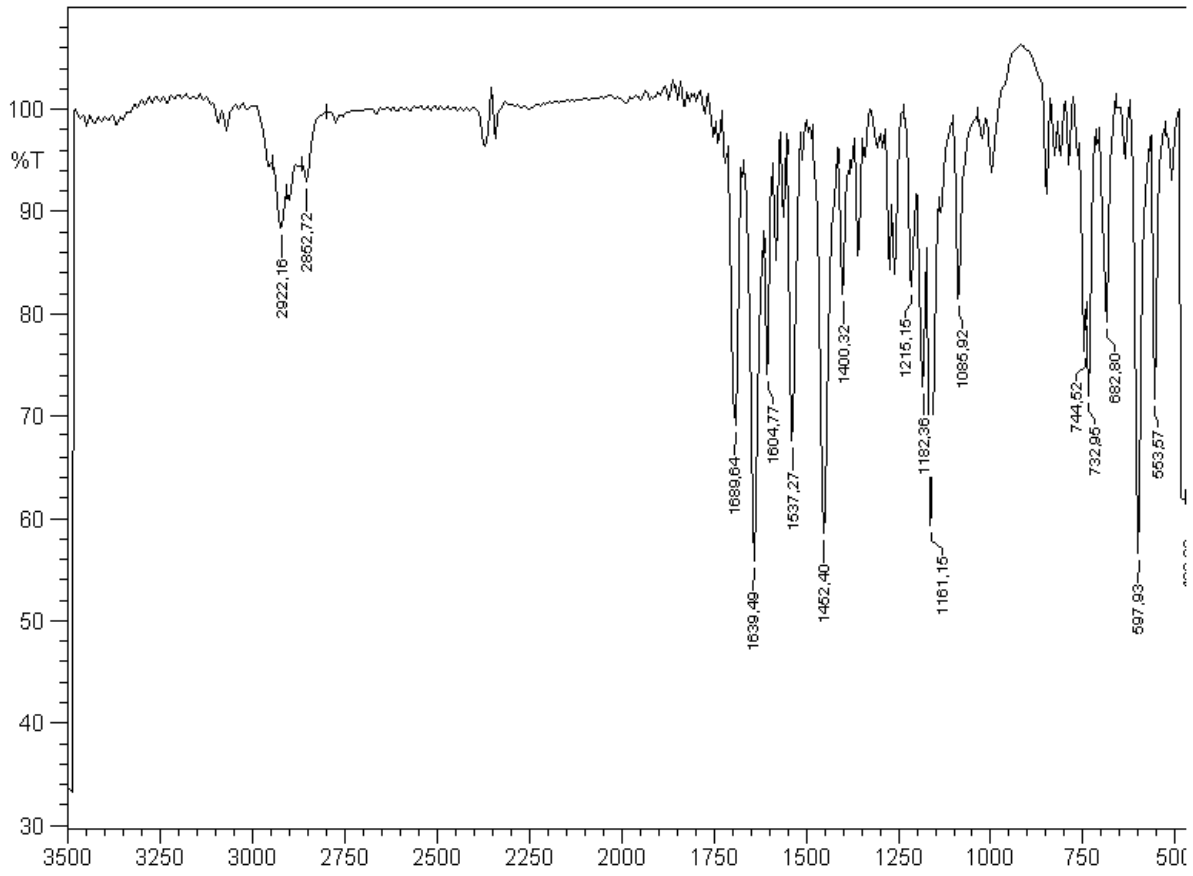


Figura: Espectro de IV do derivado furoxânico **38**

ANEXO 7

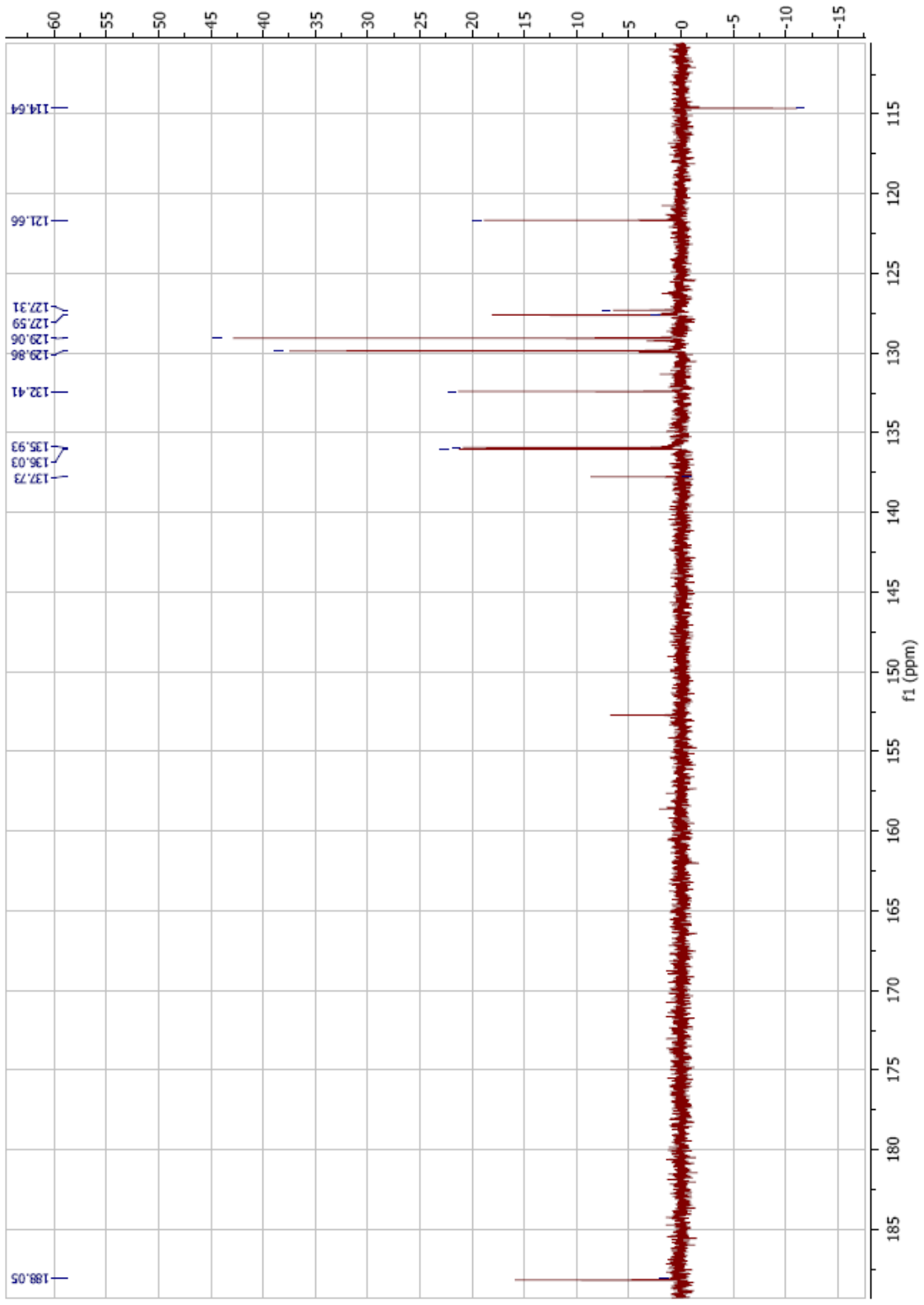


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado furoxânico **38** ($CDCl_3$)

ANEXO 8

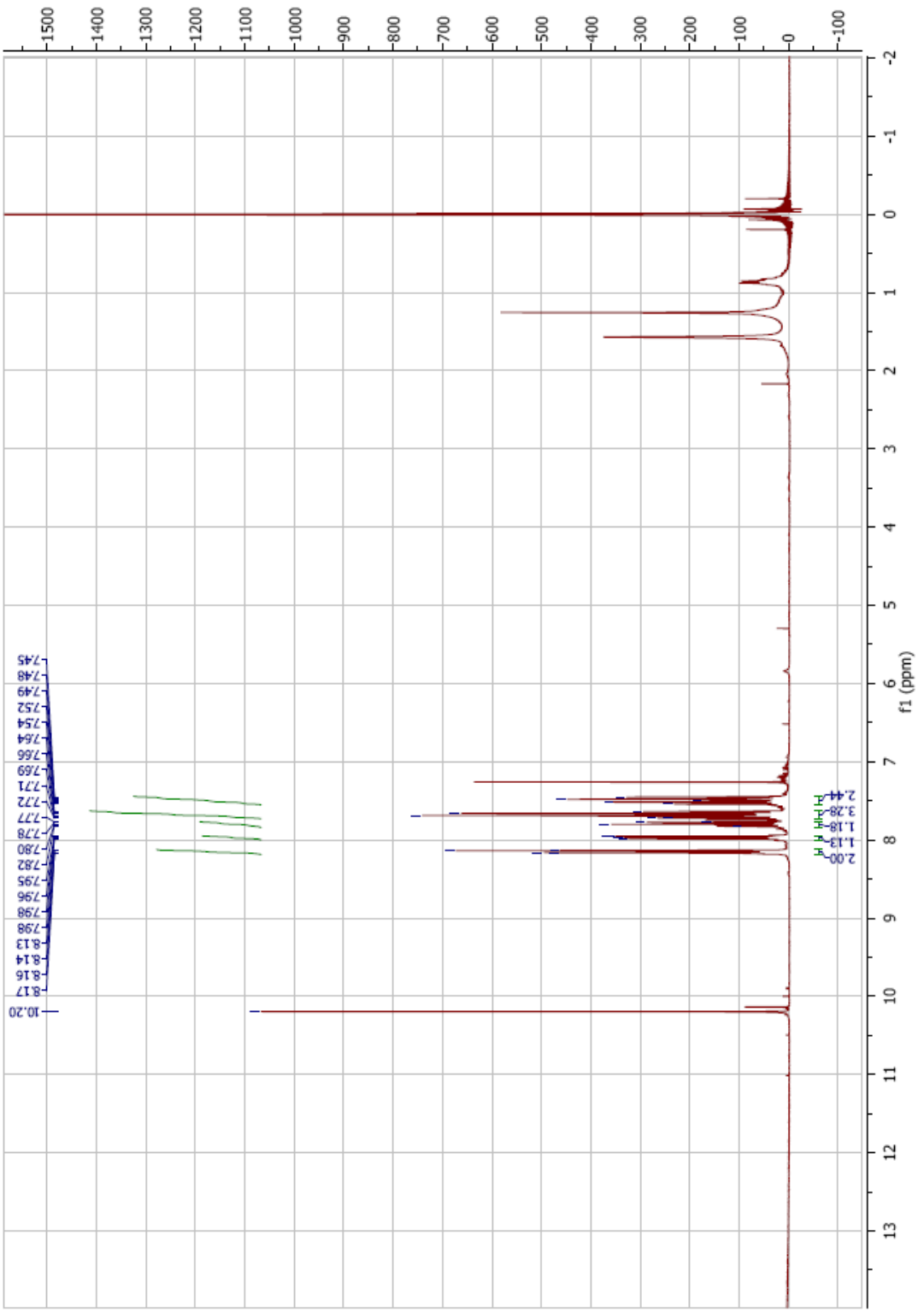


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado furoxânico **38** ($CDCl_3$)

ANEXO 9

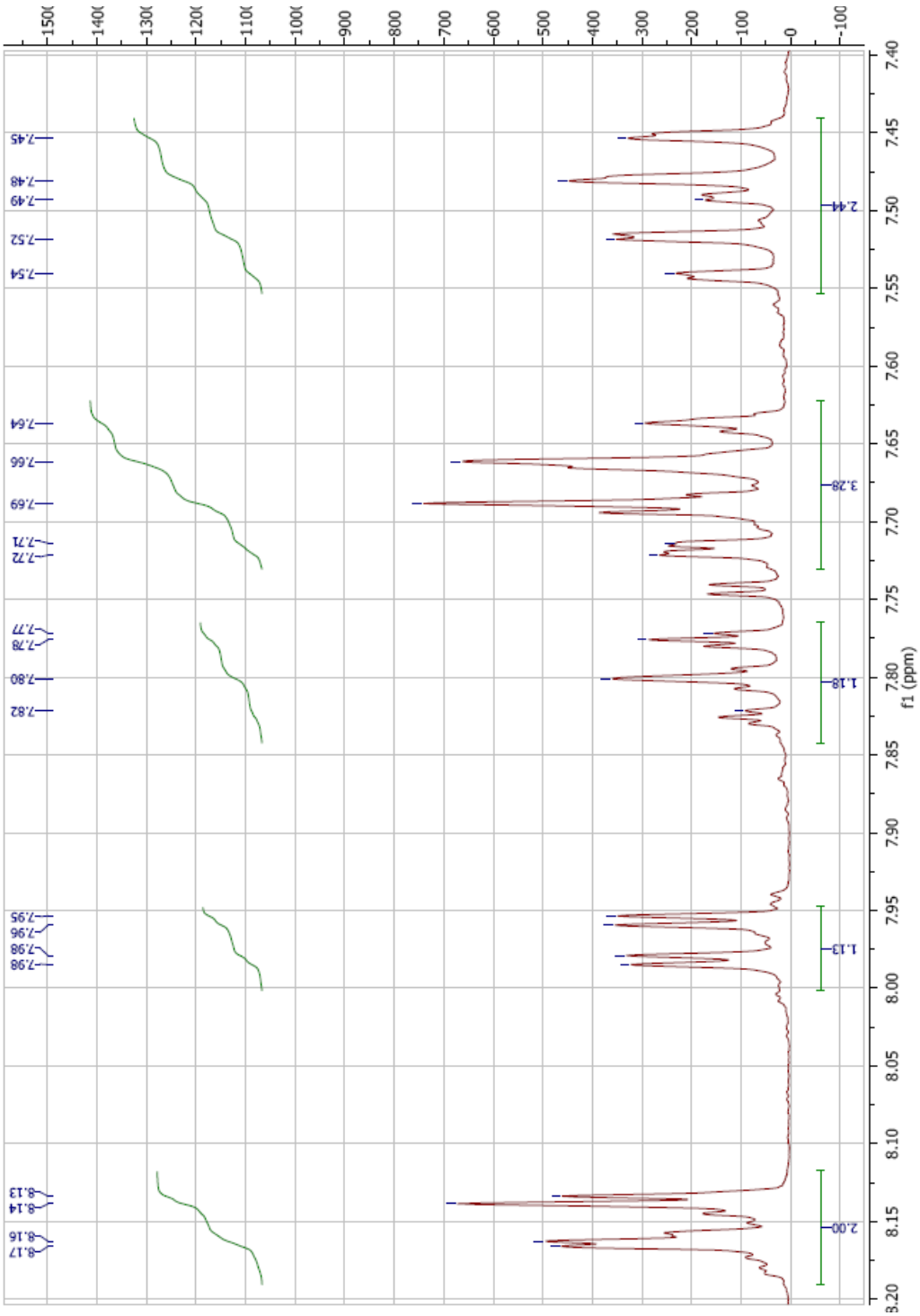


Figura: Ampliações do espectro de RMN de ^{1}H do derivado furoxânico **38** ($CDCl_3$)

ANEXO 10

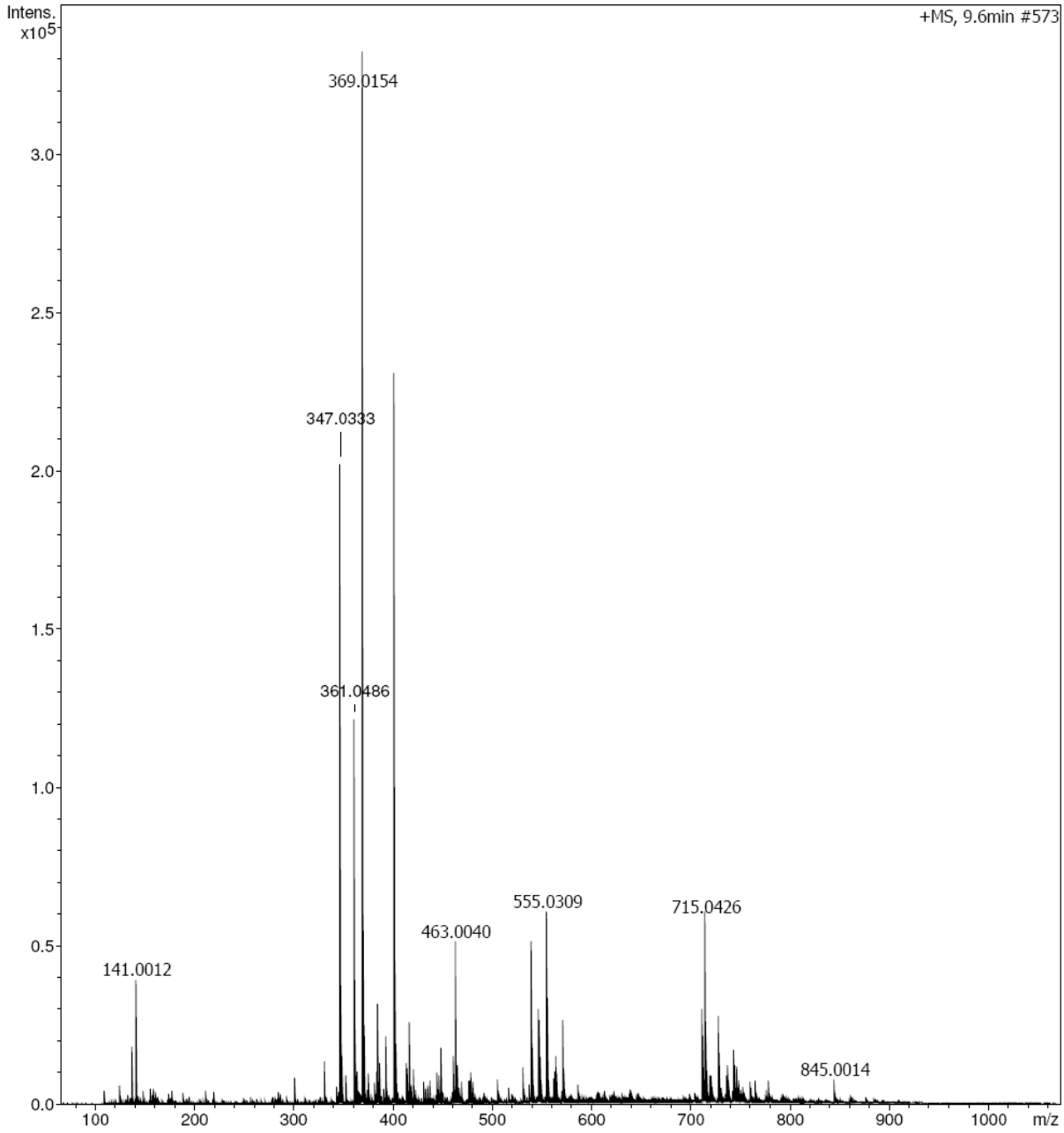


Figura: Espectro de massas do derivado furoxânico **39**

ANEXO 11

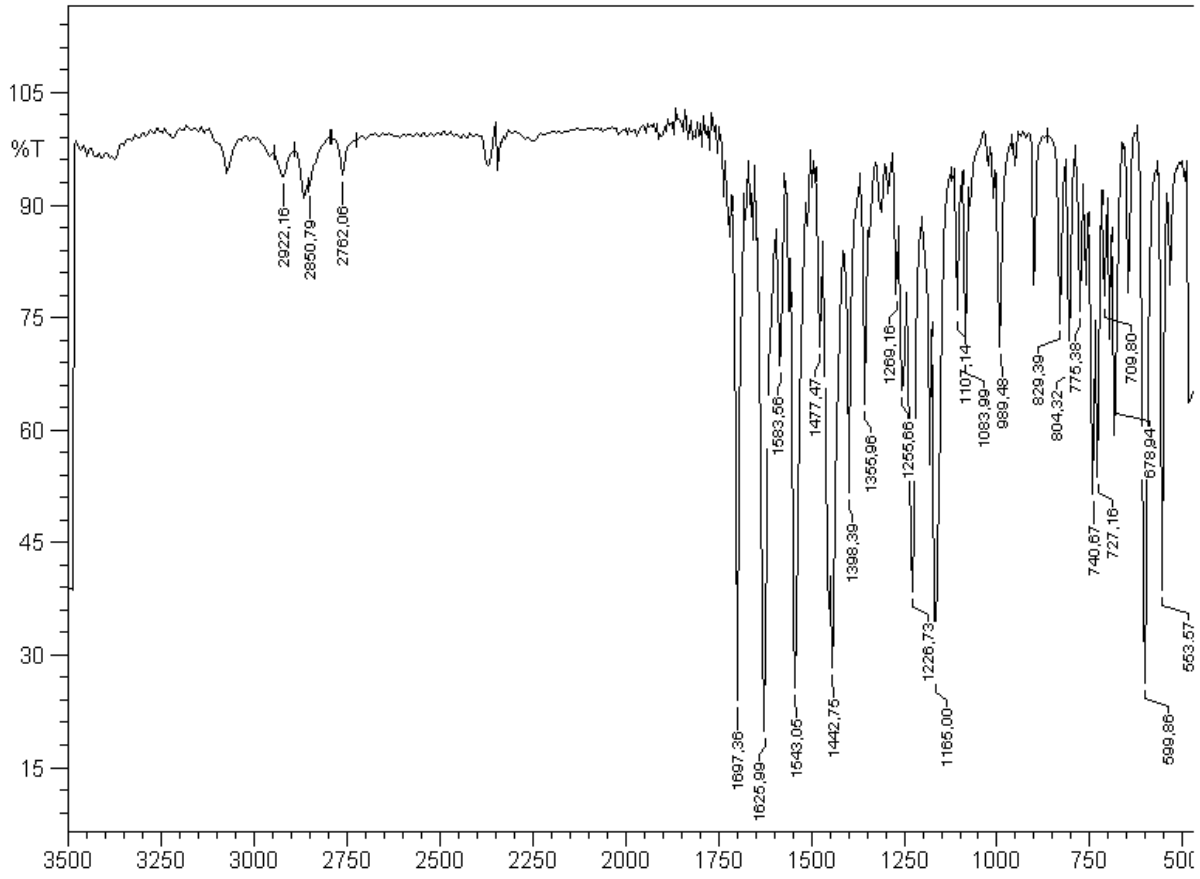


Figura: Espectro de IV do derivado furoxânico **39**

ANEXO 12

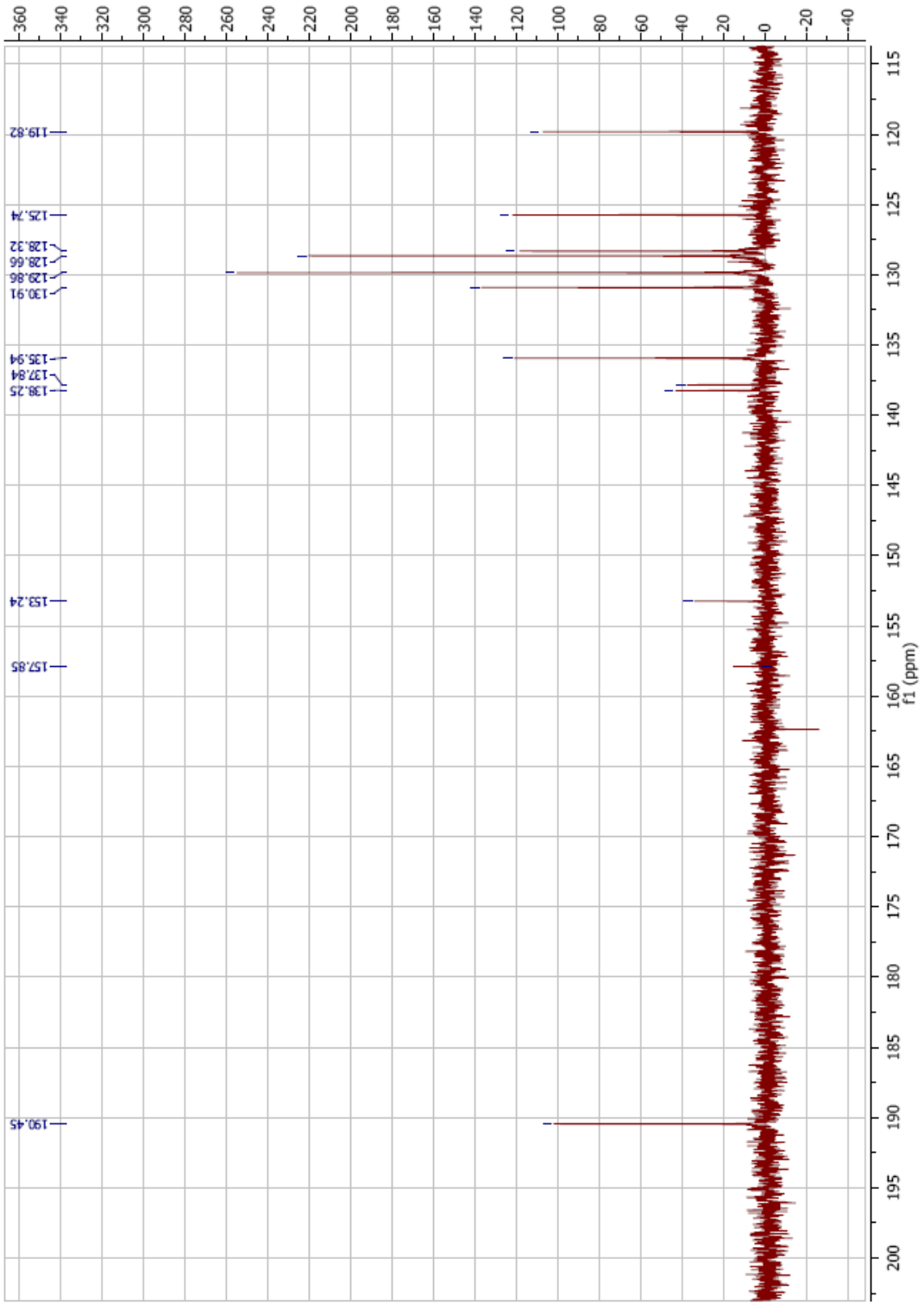


Figura: Espectro de ^{13}C do derivado furoxânico **39** ($CDCl_3$)

ANEXO 13

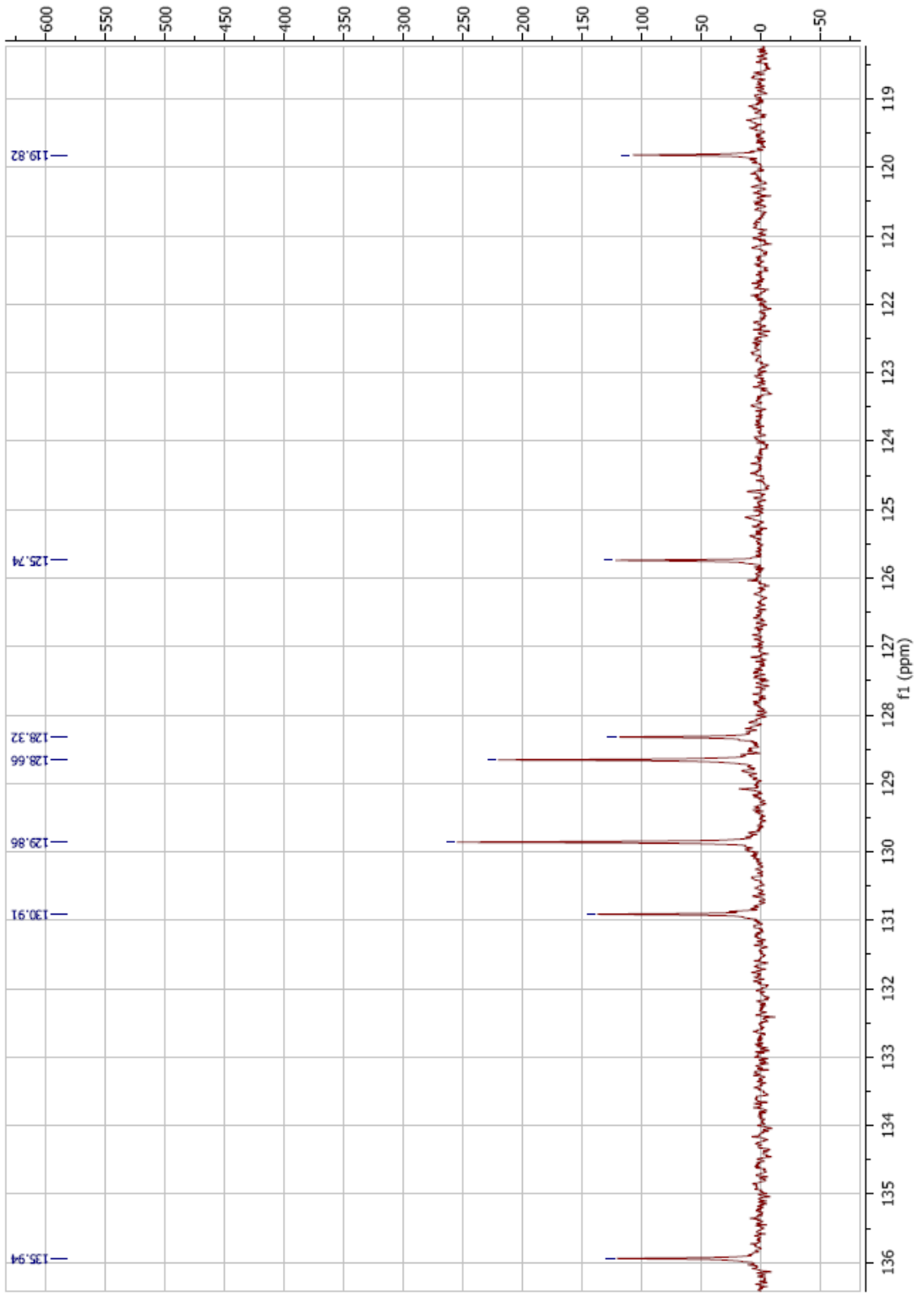


Figura: Ampliação do espectro de ^{13}C do derivado furoxânico **39** ($CDCl_3$)

ANEXO 14

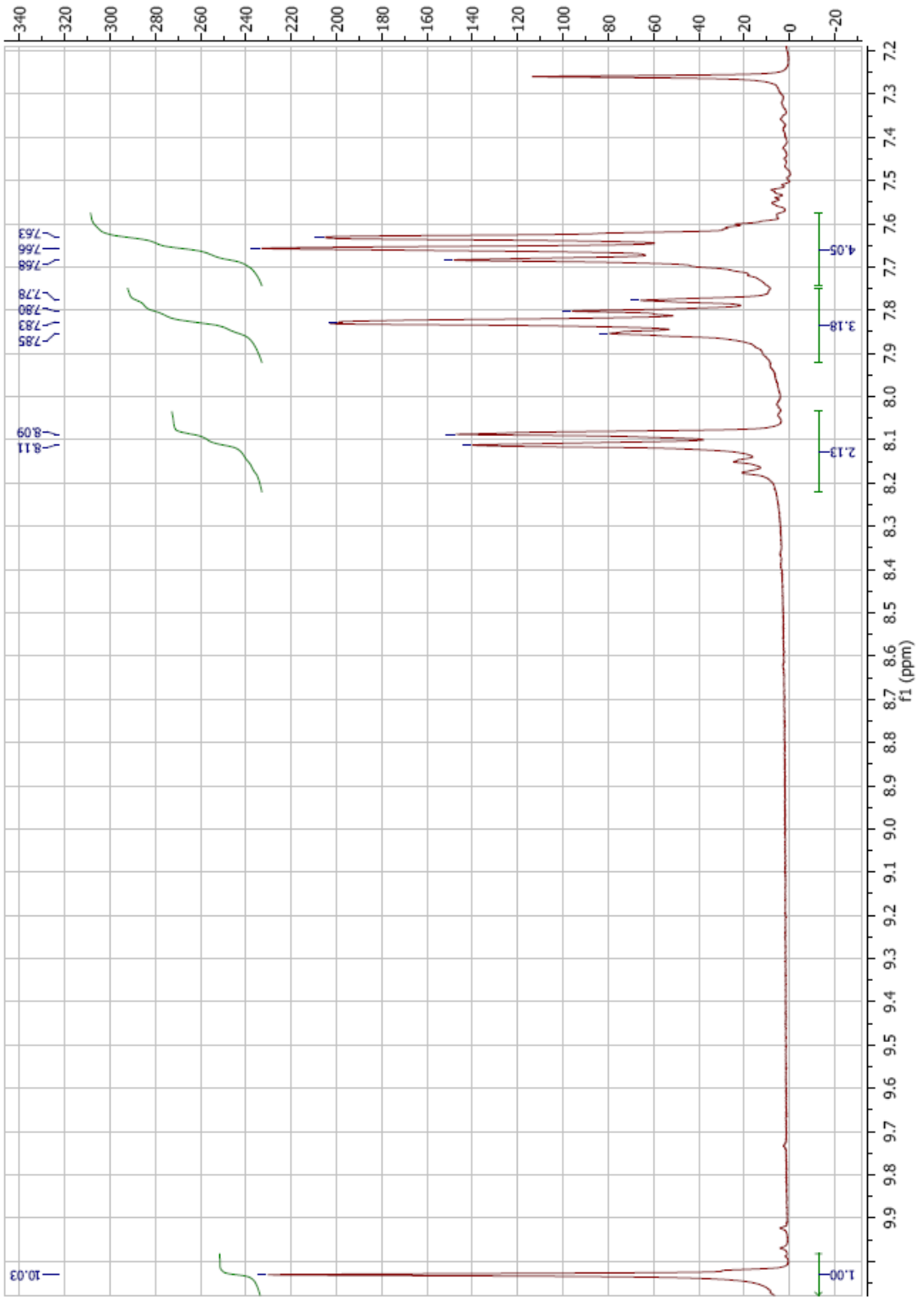


Figura: Espectro de ^{1}H do derivado furoxânico **39** ($CDCl_3$)

ANEXO 15

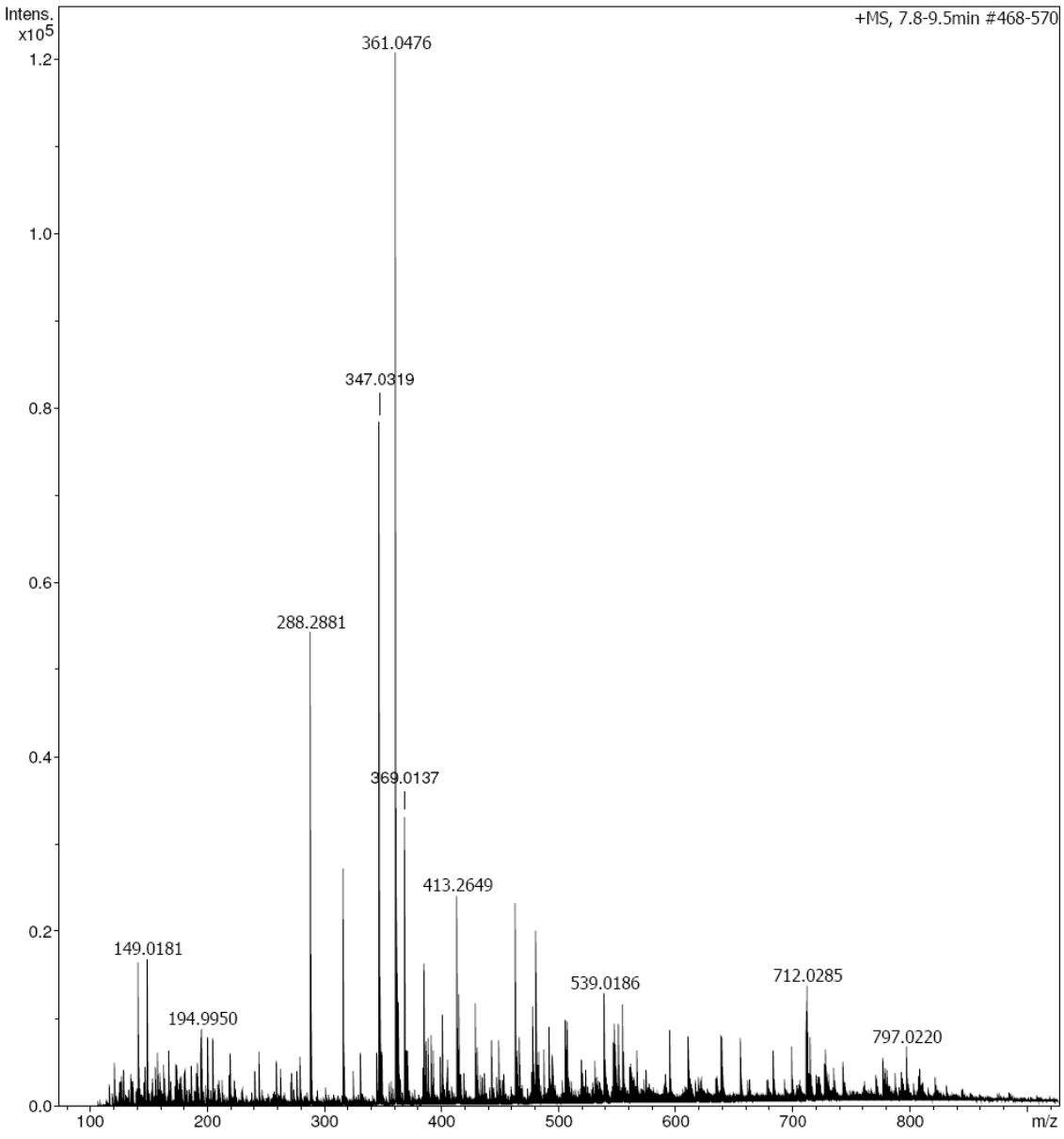


Figura: Espectro de massas do derivado furoxânico **40**

ANEXO 16

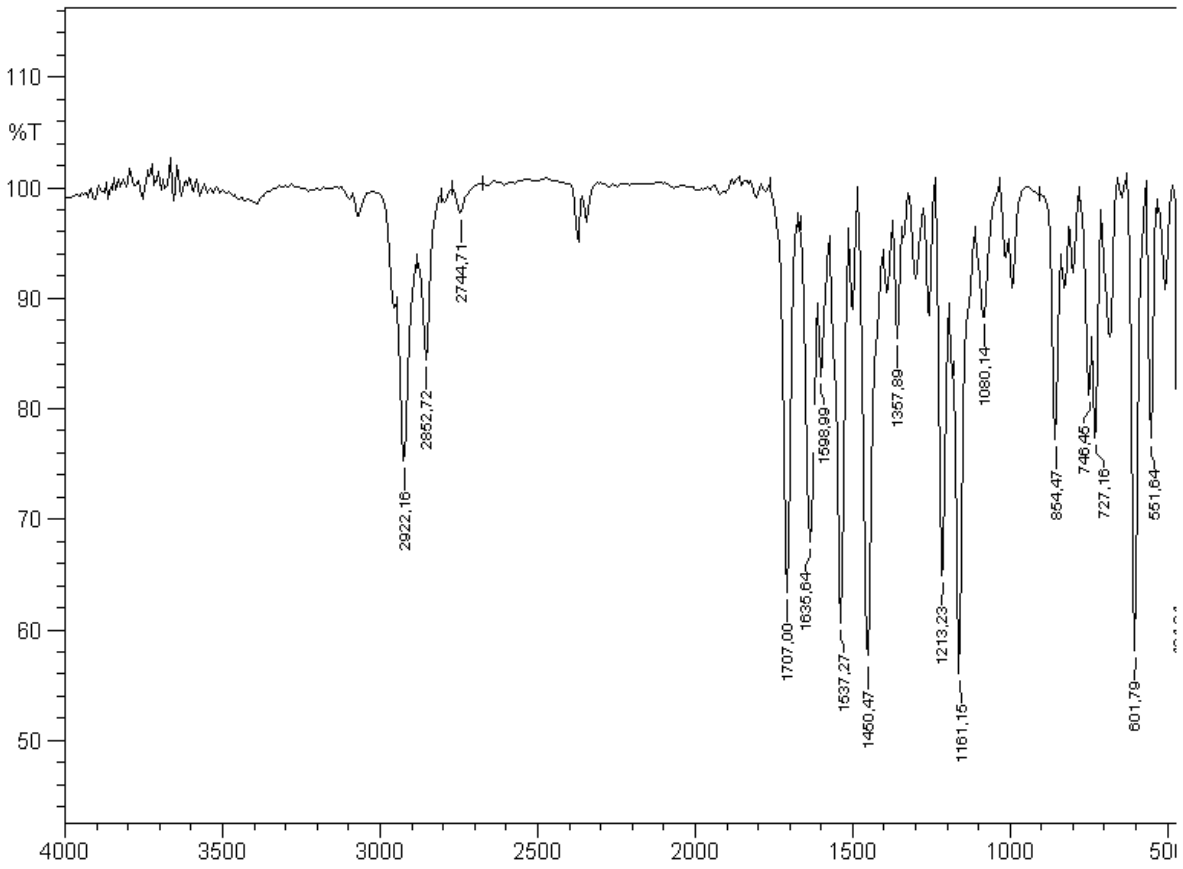


Figura: Espectro de IV do derivado furoxânico **40**

ANEXO 17

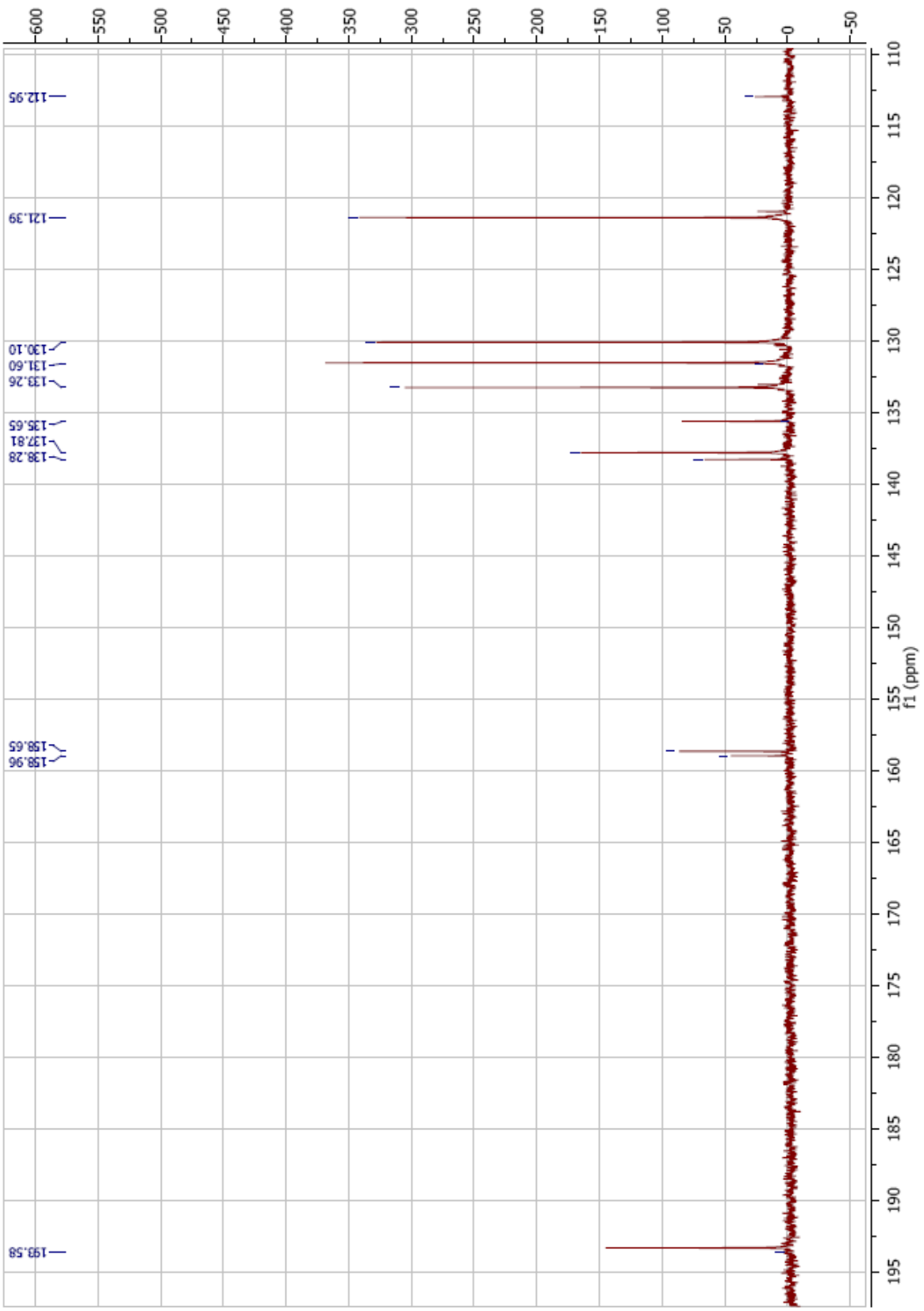


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado furoxânico **40** (DMSO-d_6)

AENXO 18

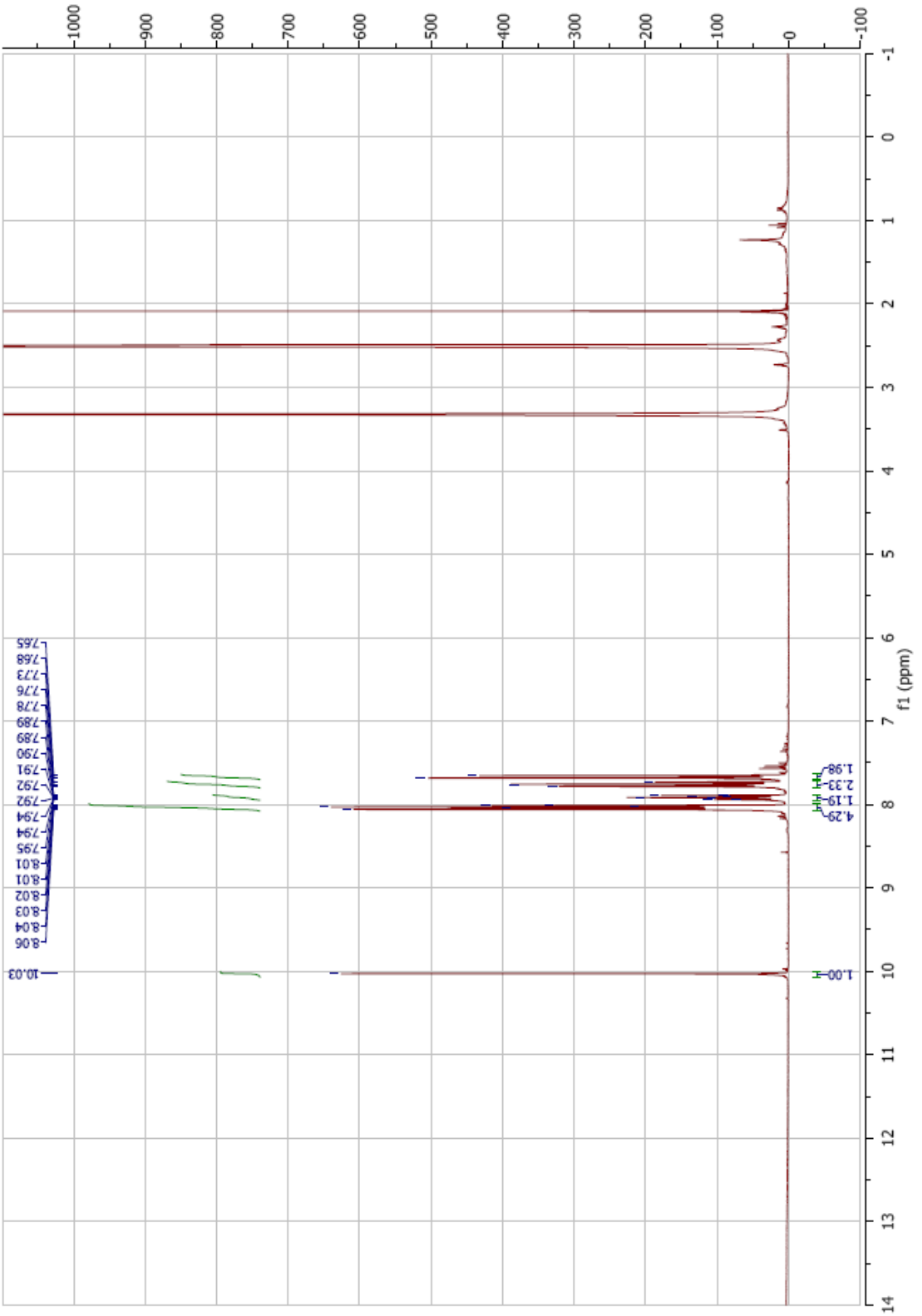


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado furoxânico **40** (DMSO $-d_6$)

ANEXO 19

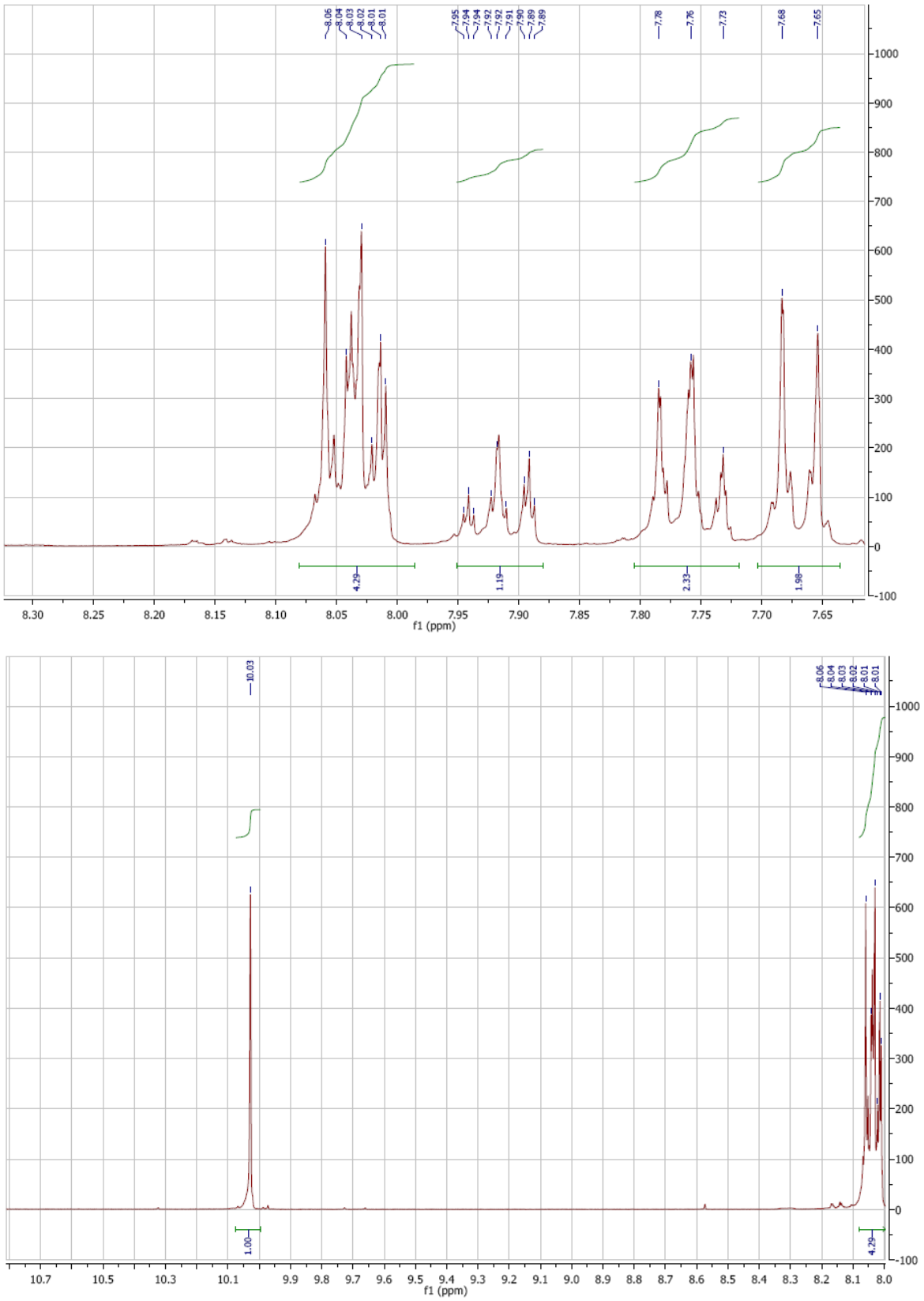


Figura: Ampliações do espectro de RMN de ^{1}H do derivado furoxânico **40** (DMSO-d_6)

ANEXO 20

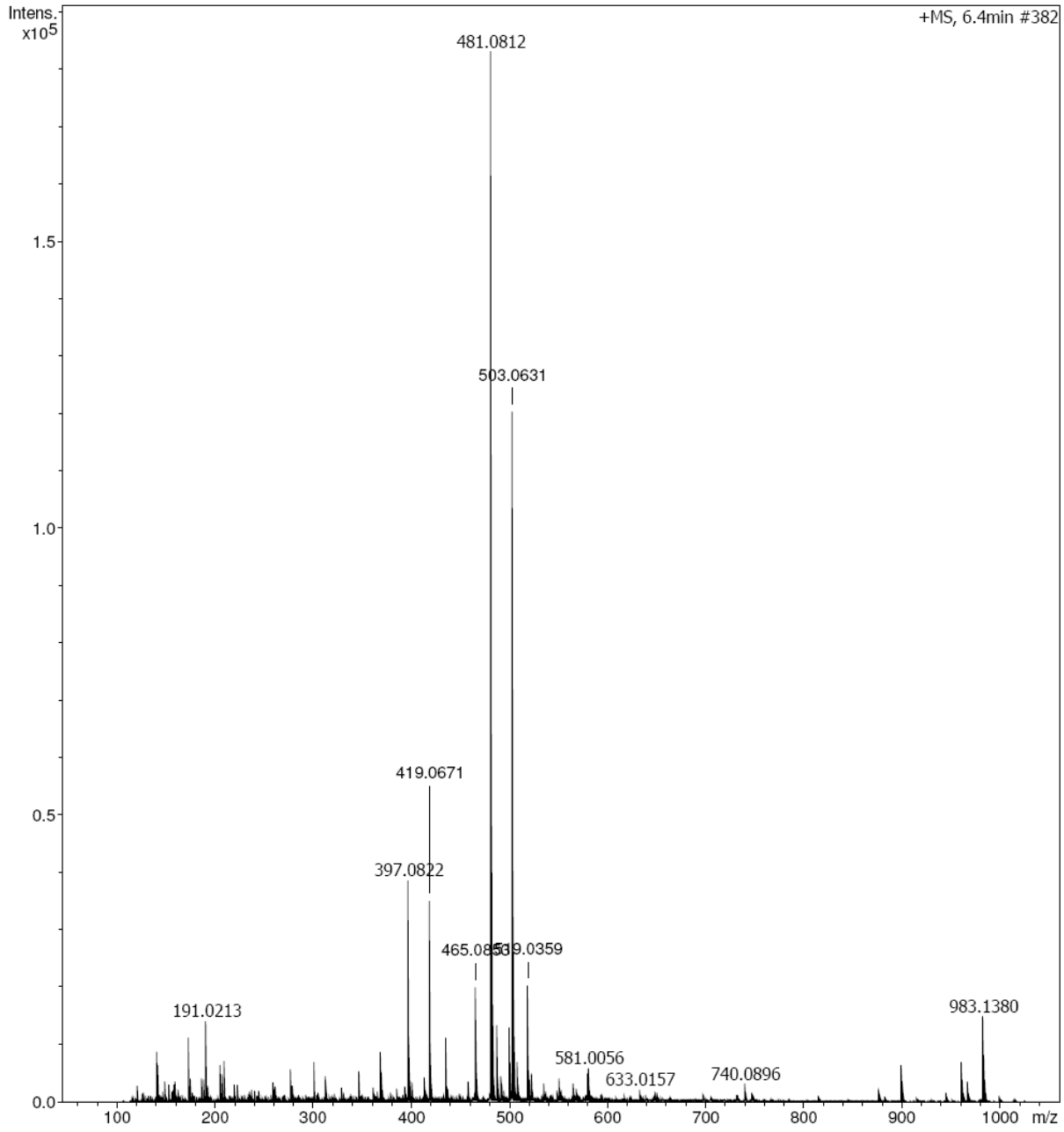


Figura: Espectro de massas de *N*-acilhidrazona **44**

ANEXO 21

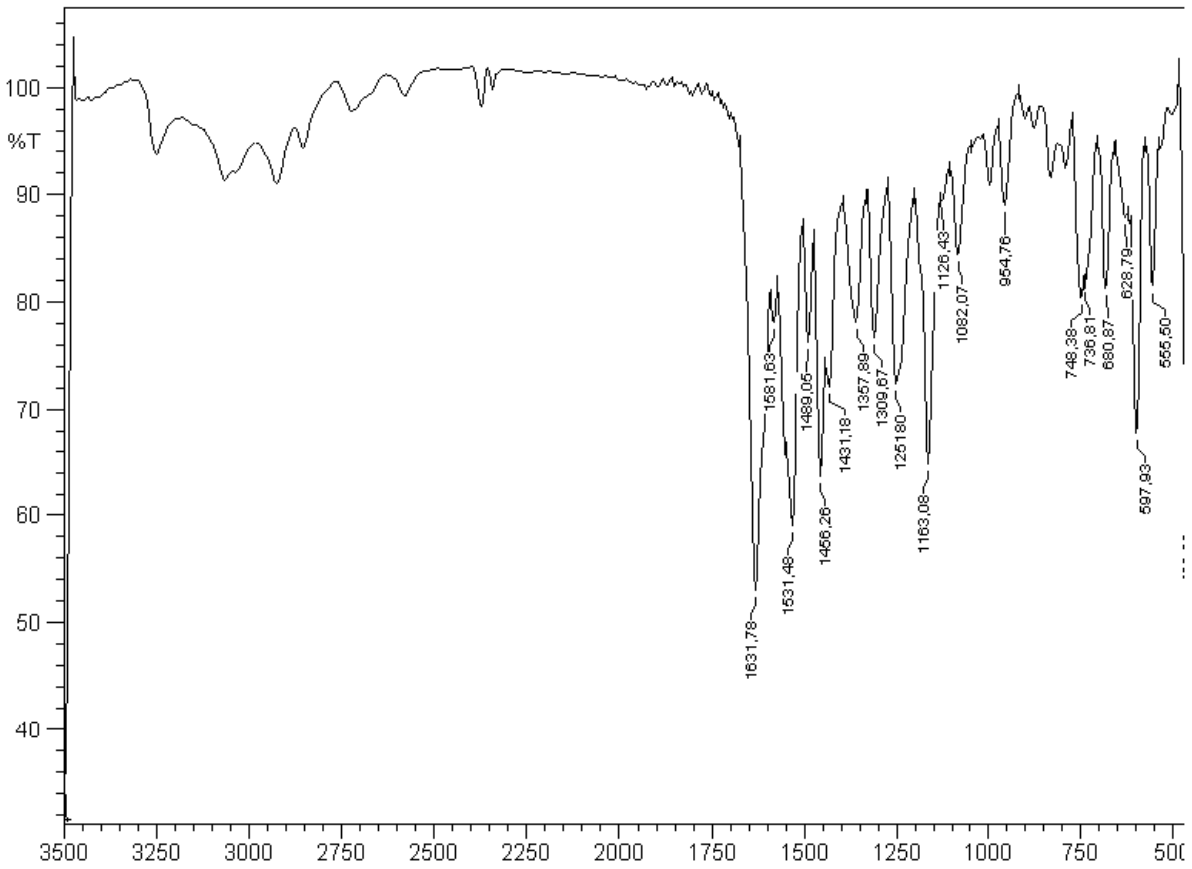


Figura: Espectro de IV para *N*-acilhidrazona **44**

ANEXO 22

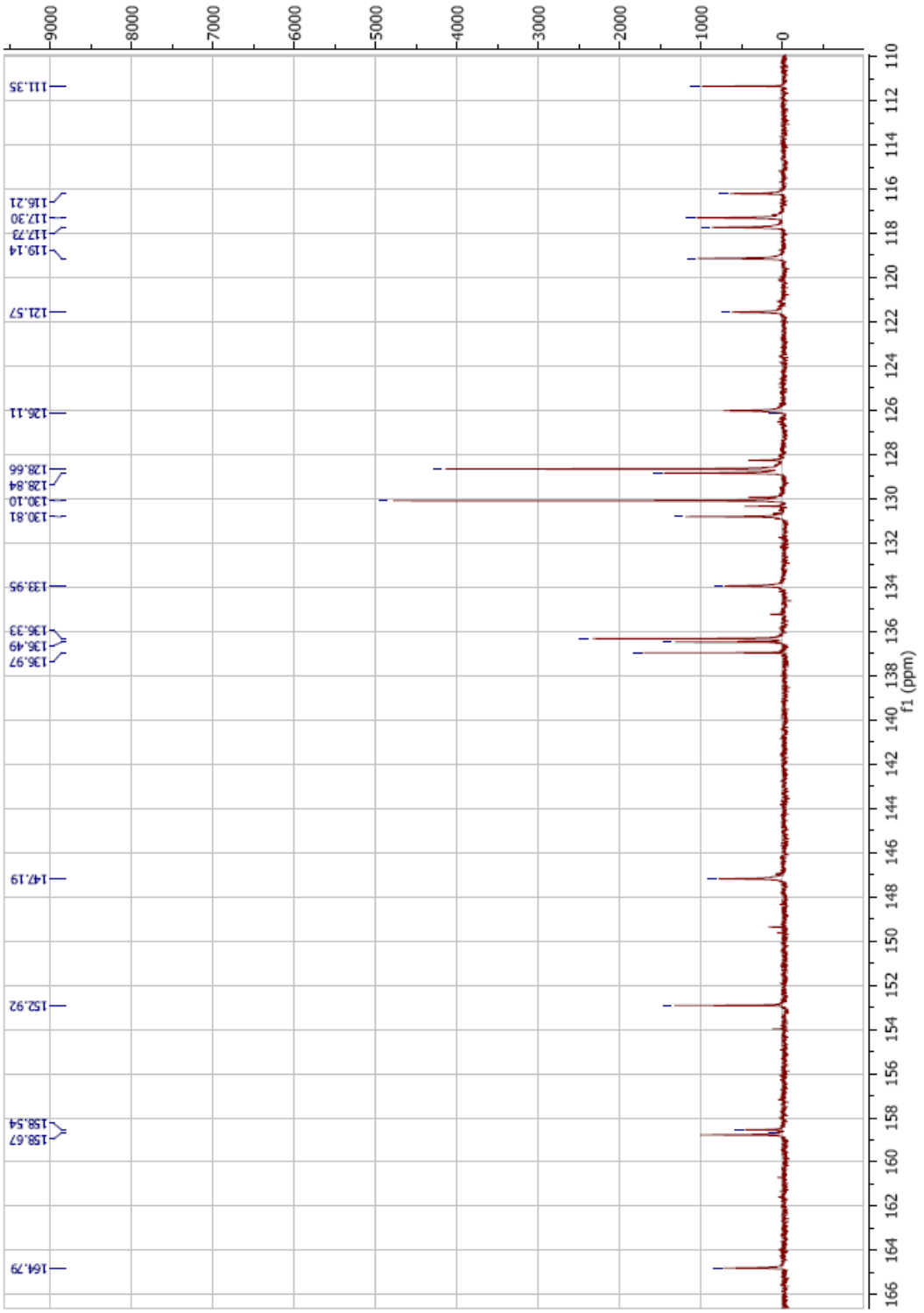


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-acilhidrazona **44** (DMSO-d_6)

ANEXO 23

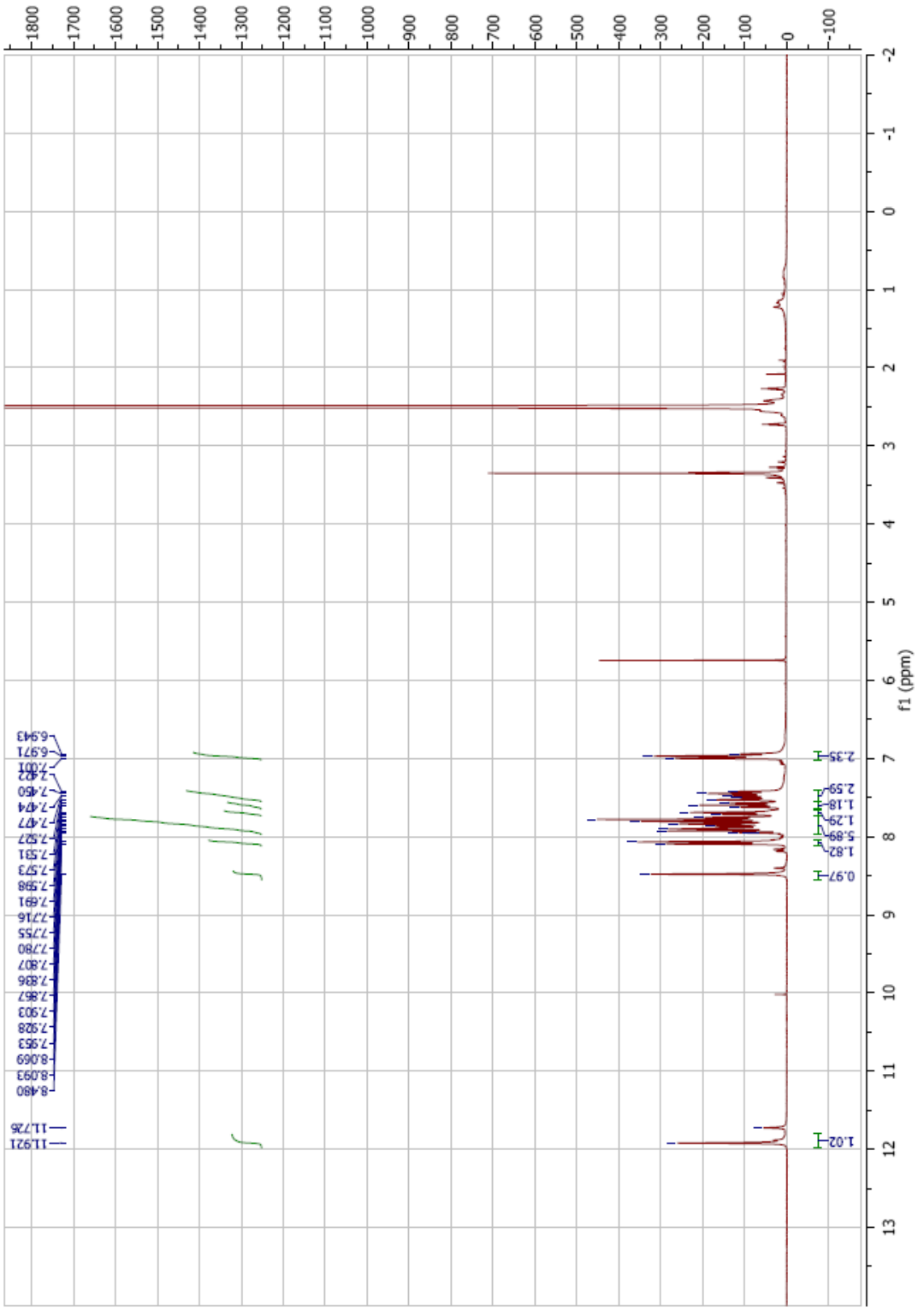


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H de *N*-acilhidrazona **44** (DMSO-d_6)

ANEXO 24

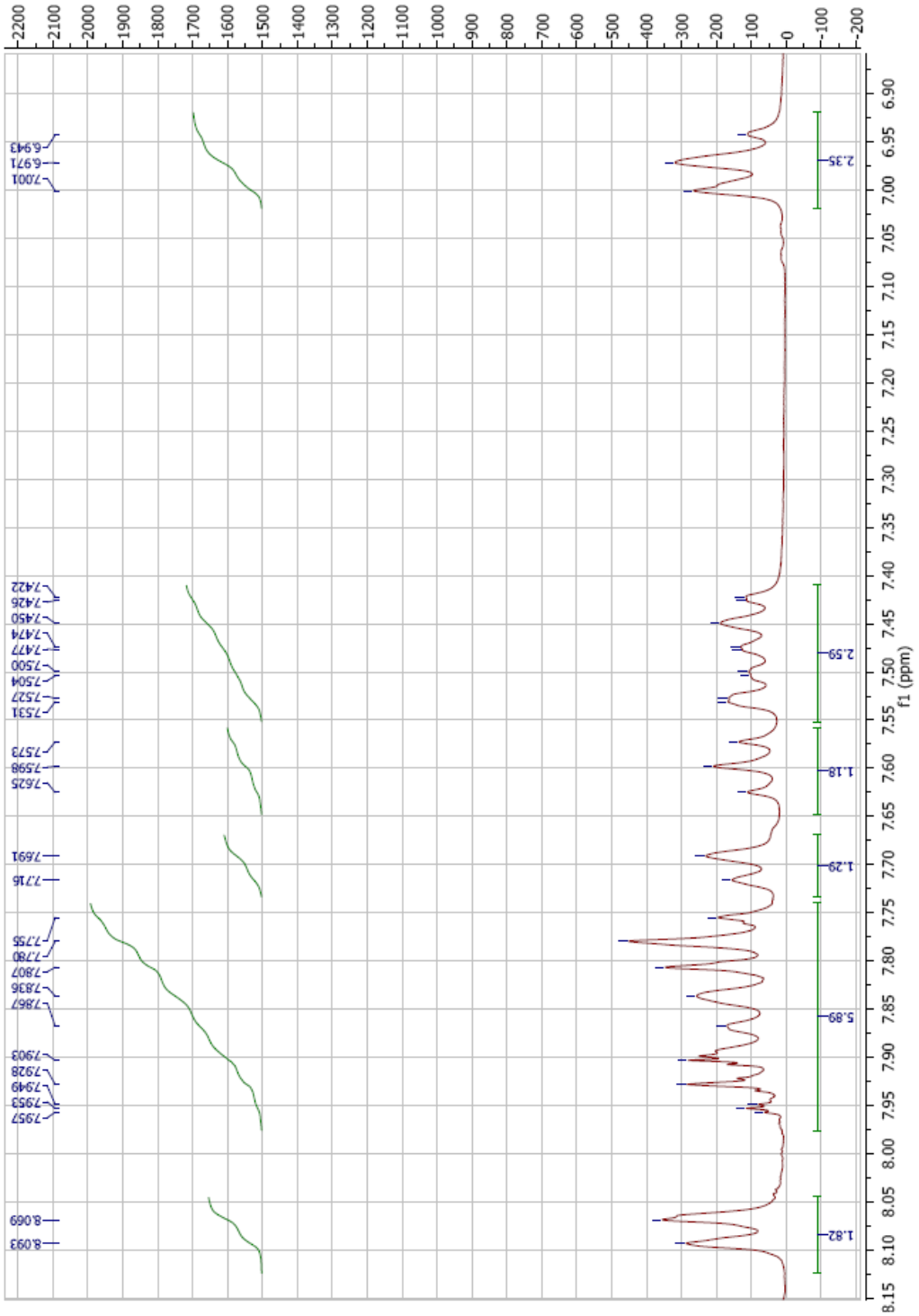


Figura: Ampliações do espectro de RMN de ^{1}H de *N*-acilhidrazona **44** (DMSO-d_6)

ANEXO 25

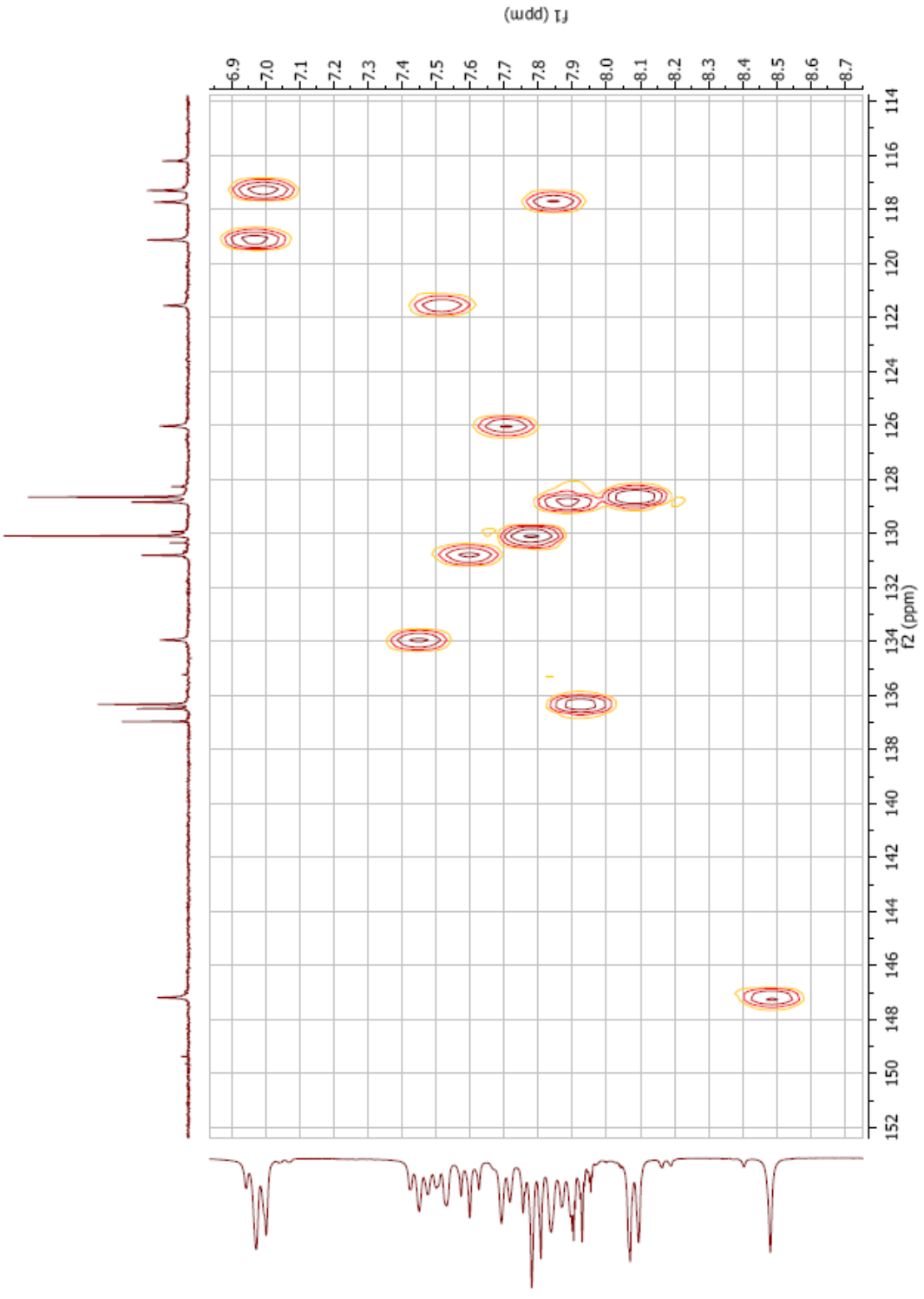


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR de *N*-acilhidrazona **44**

ANEXO 26



Figura: Espectros de HOMODEC de *N*-acilhidrazona **44**

ANEXO 27

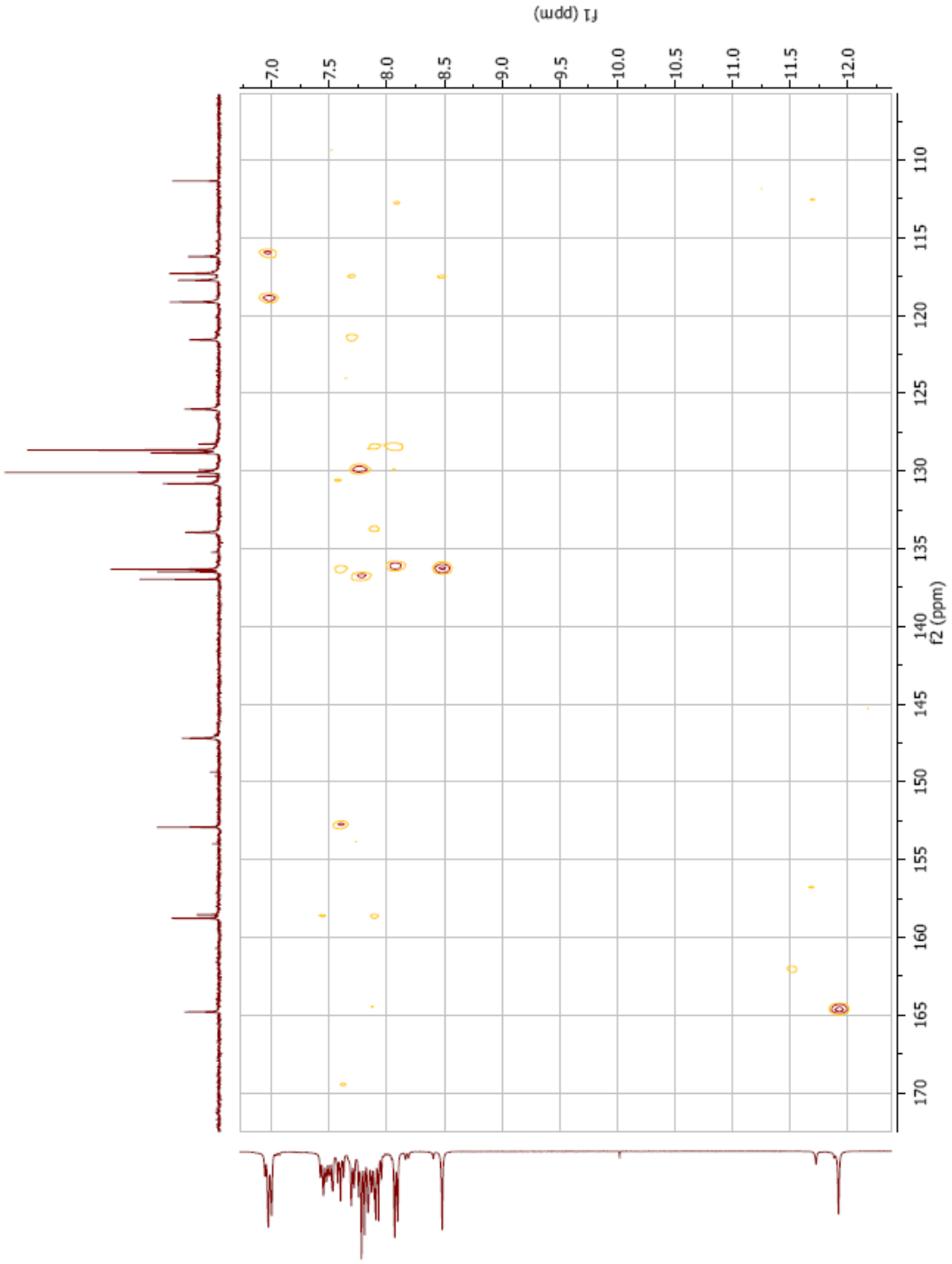


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **44**

ANEXO 28

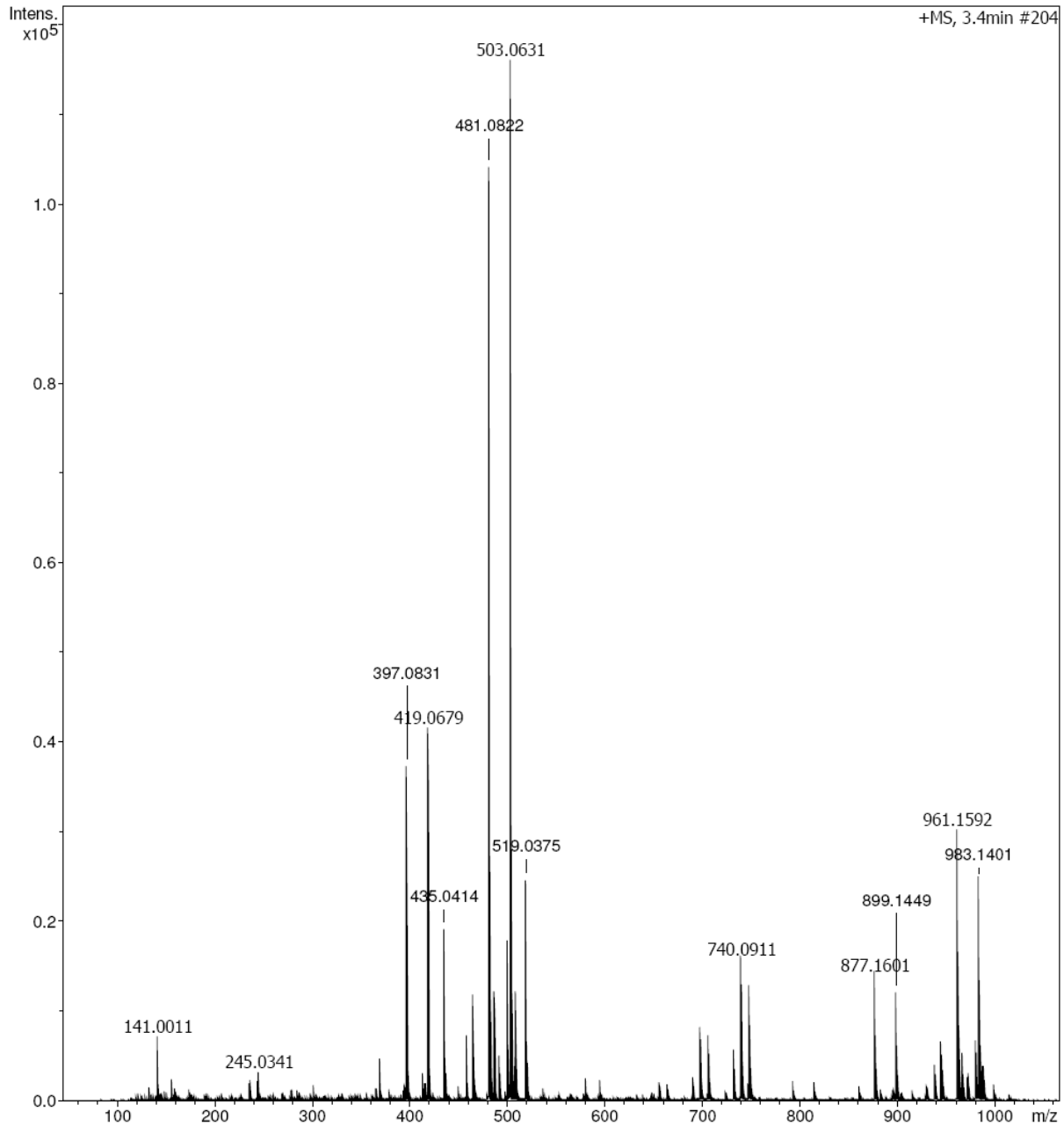


Figura: Espectro de Massas de *N*-acilhidrazona **45**

ANEXO 29

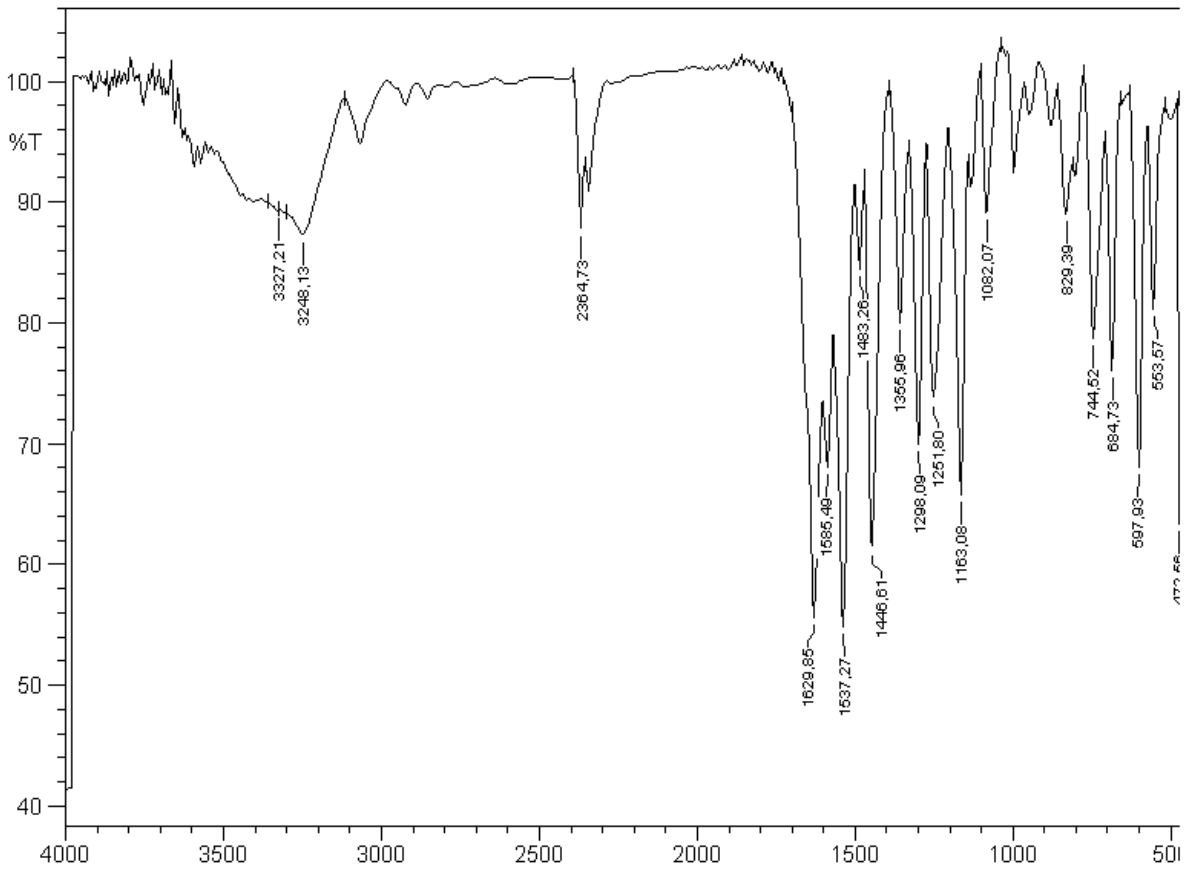


Figura: Espectro de IV de *N*-acilhidrazona **45**

ANEXO 30

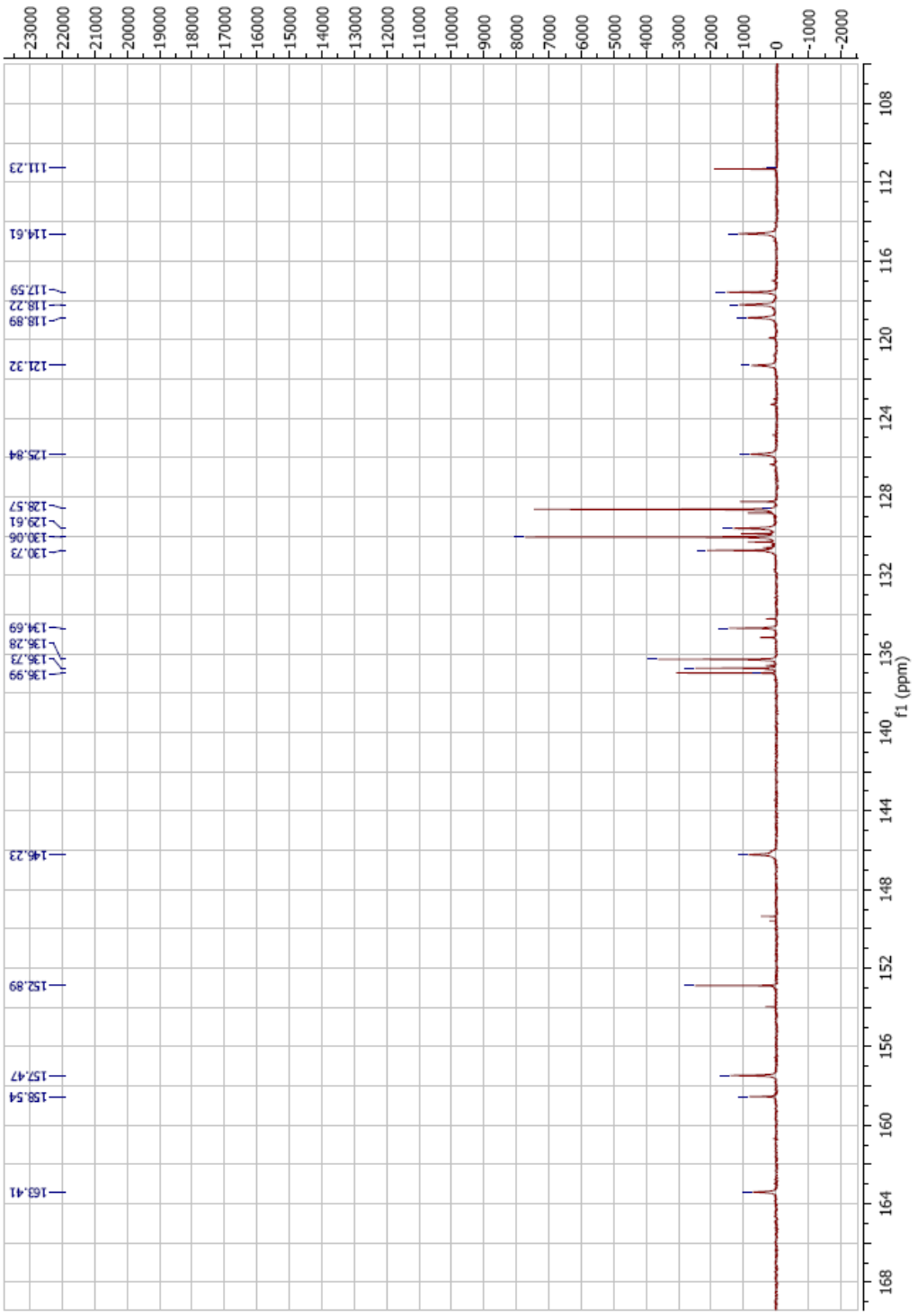


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-acilhidrazona **45** (DMSO-d_6)

ANEXO 31

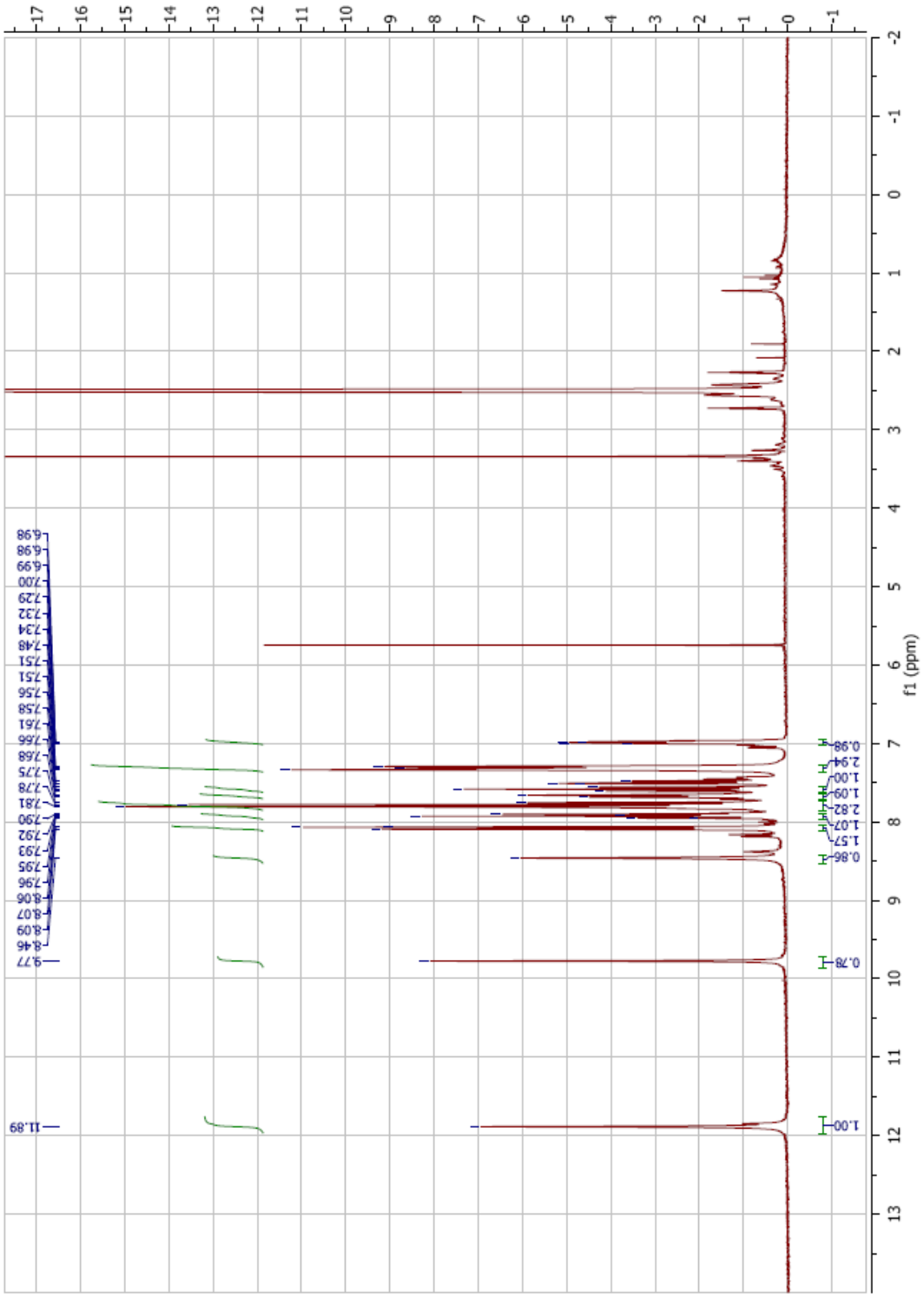


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H de *N*-acilhidrazona **45** (DMSO-d_6)

ANEXO 32

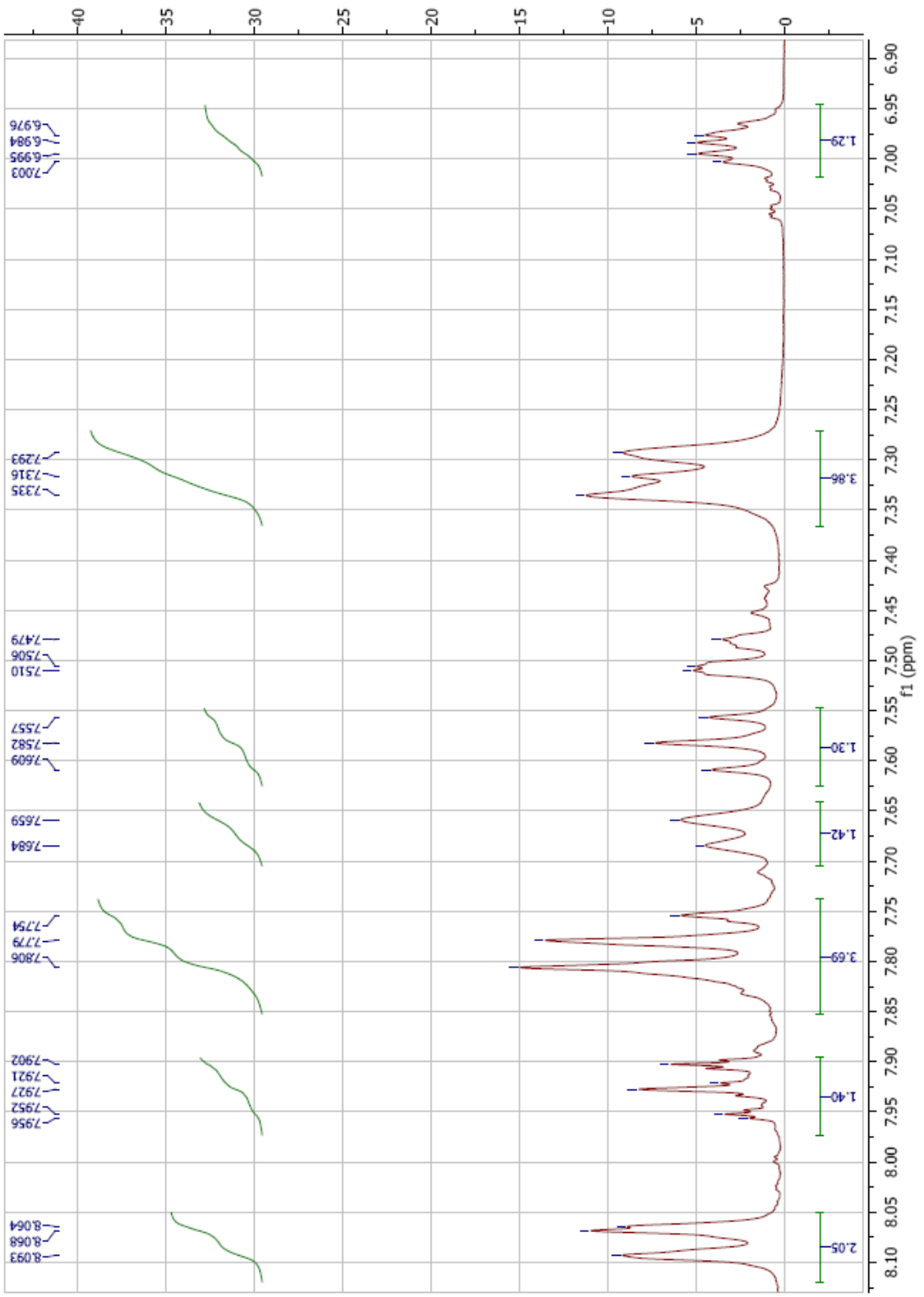


Figura: Ampliações do espectro de RMN de ^{1}H de *N*-acilhidrazona **45** (DMSO-d_6)

ANEXO 33

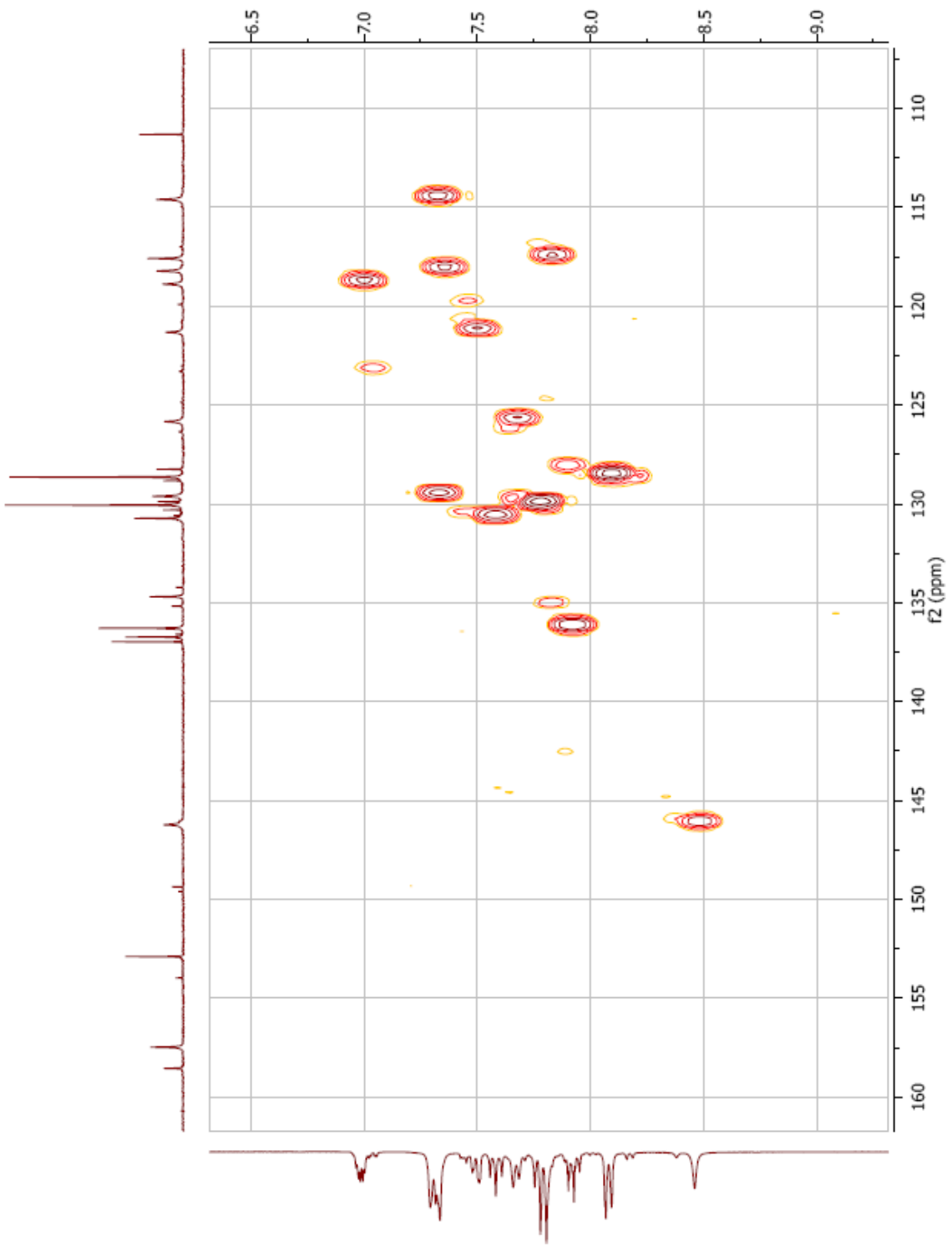


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR de *N*-acilhidrazona **45**

ANEXO 34

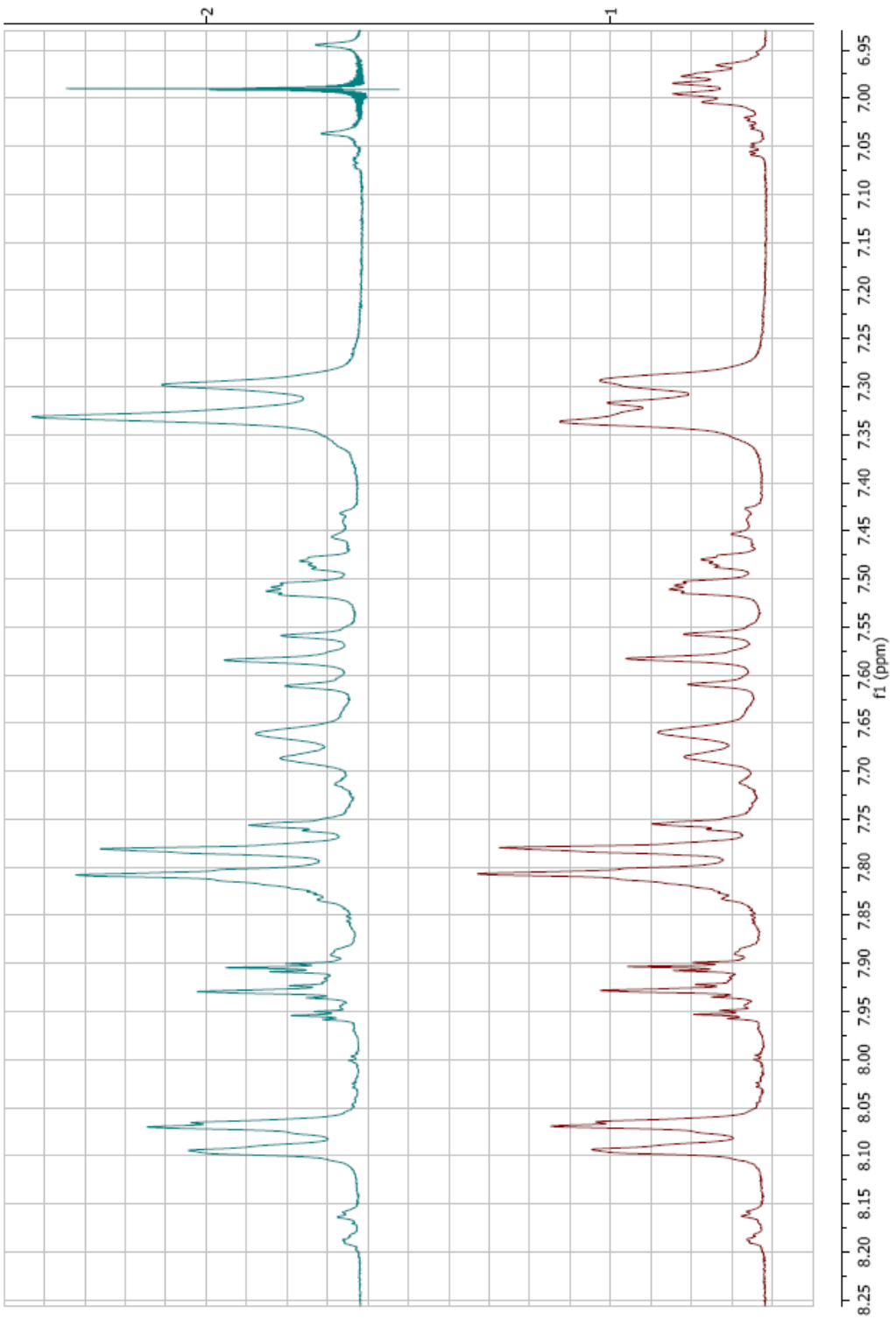


Figura: Espectros de HOMODEC de *N*-acilhidrazona **45**

ANEXO 35

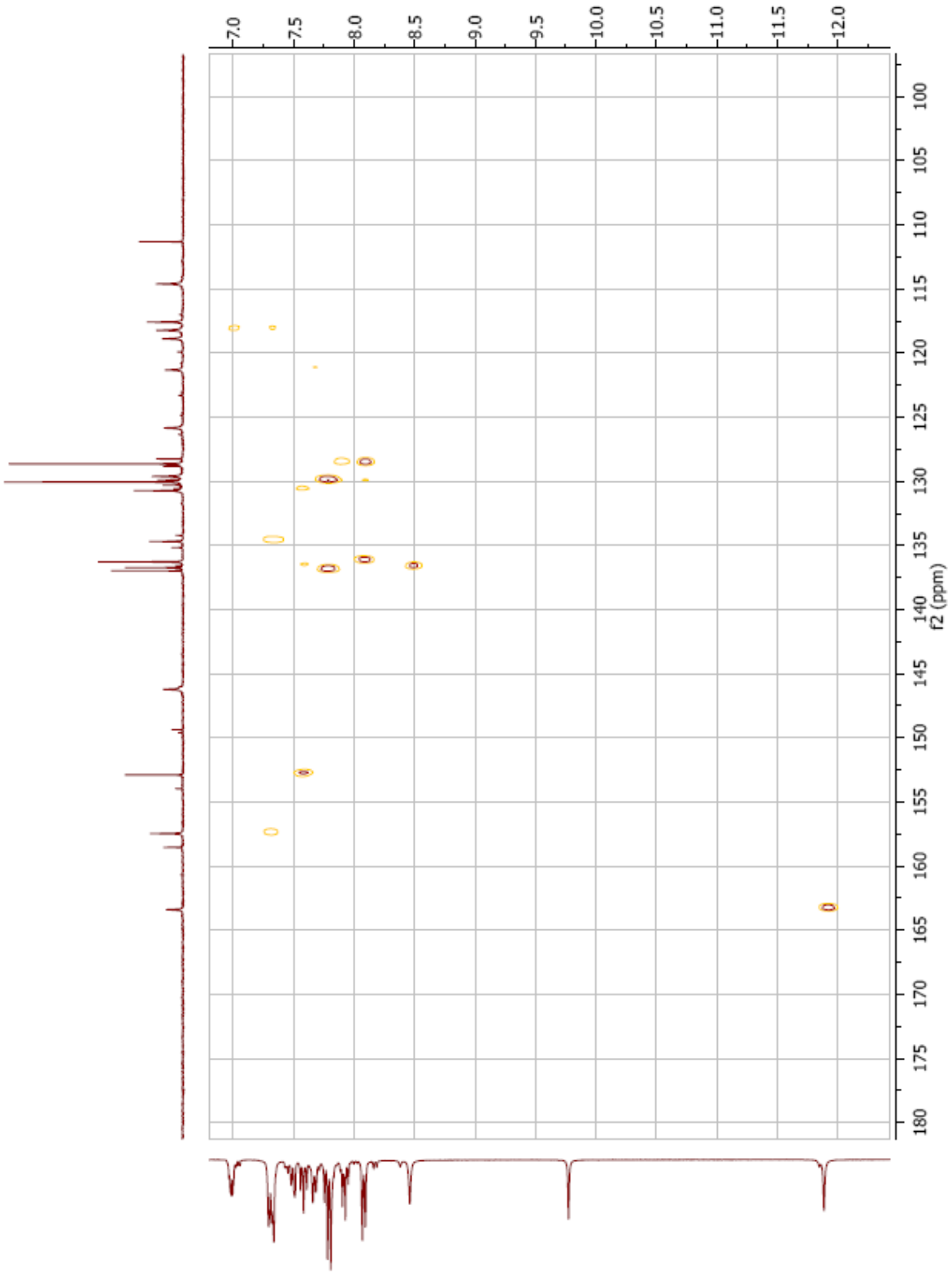


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **45**

ANEXO 36

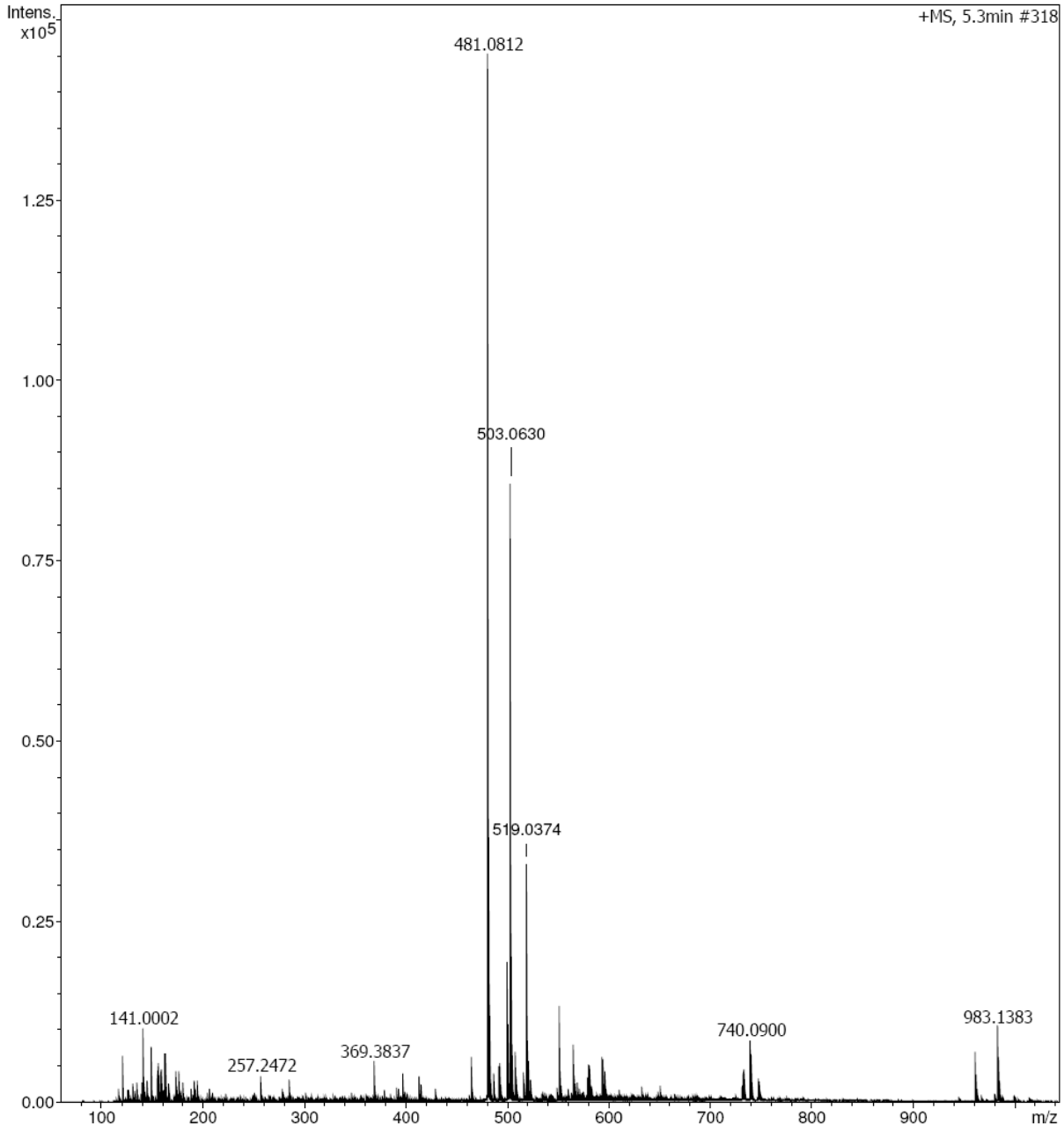


Figura: Espectro de massas de *N*-acilhidrazona **46**

ANEXO 37

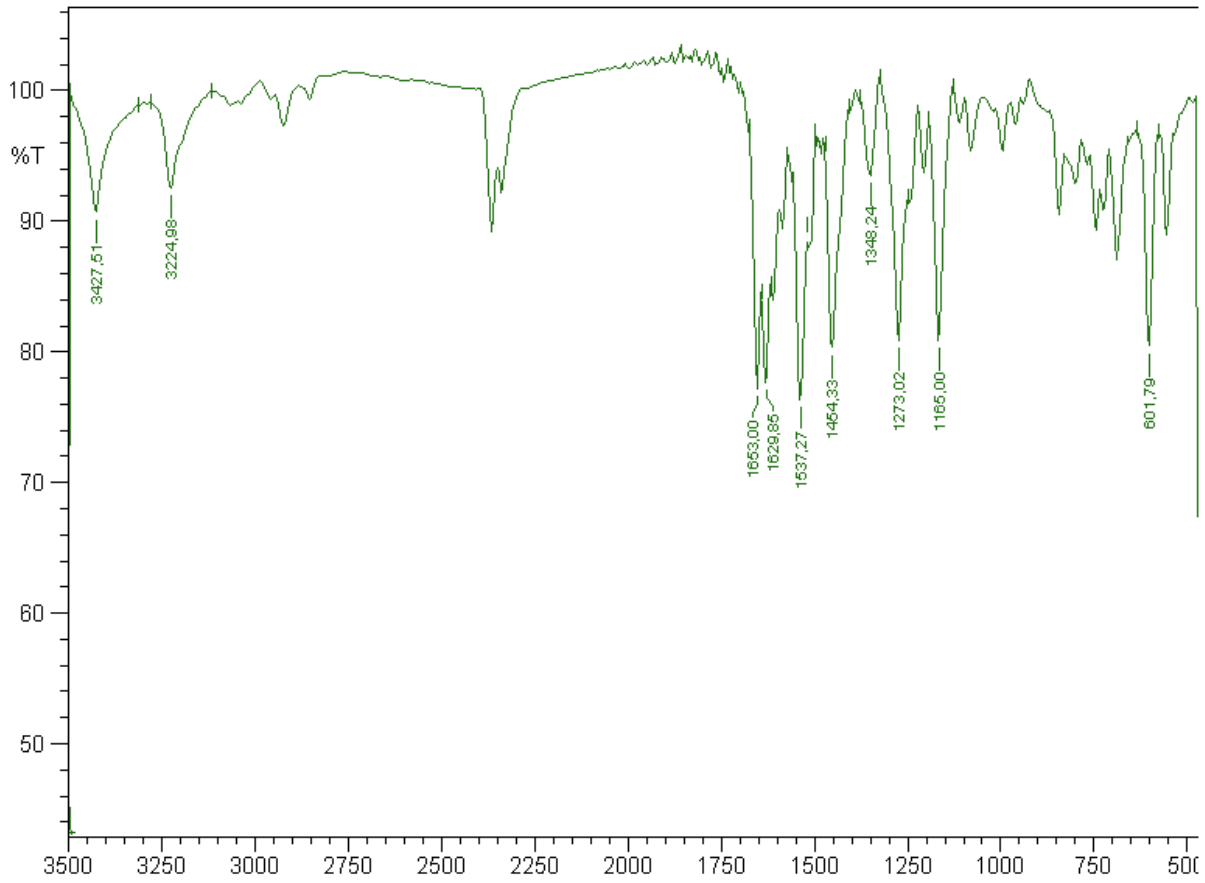


Figura: Espectro de IV de *N*-acilhidrazona **46**

ANEXO 38

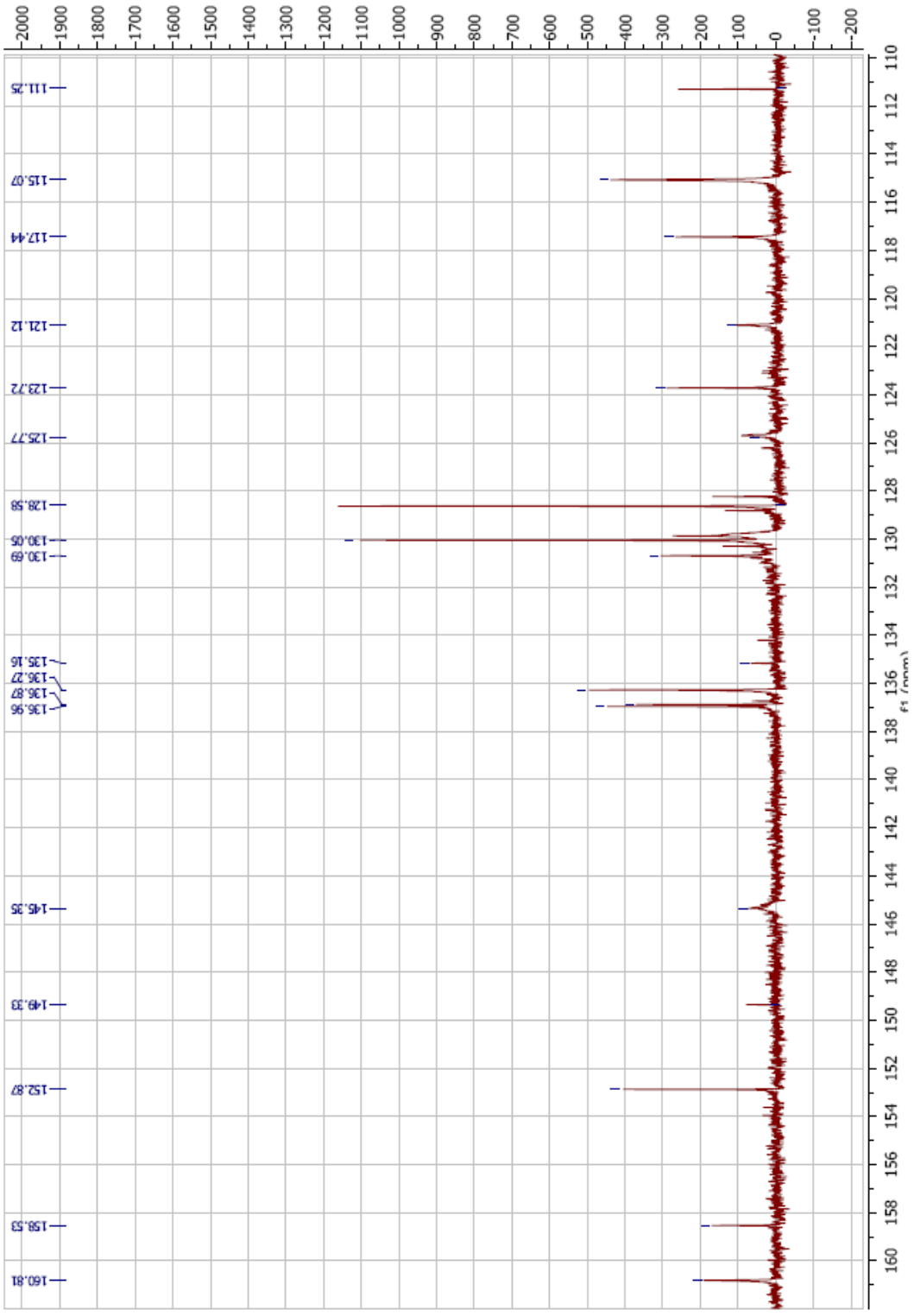


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C de N-acilhidrazona **46** (DMSO-d_6)

ANEXO 39

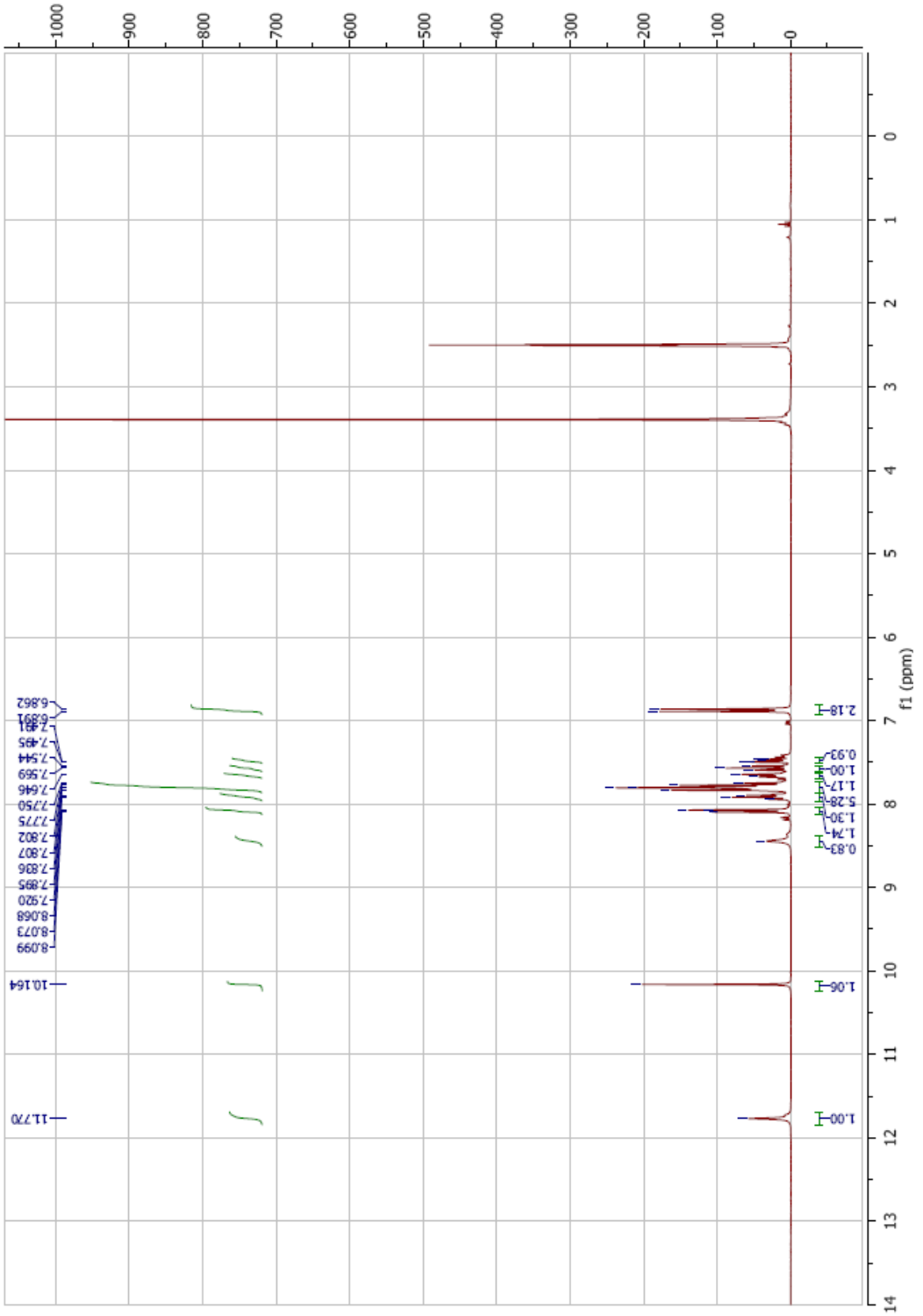


Figura: Espectro de RMN de 1H de *N*-acilhidrazona **46** (DMSO-d_6)

ANEXO 40

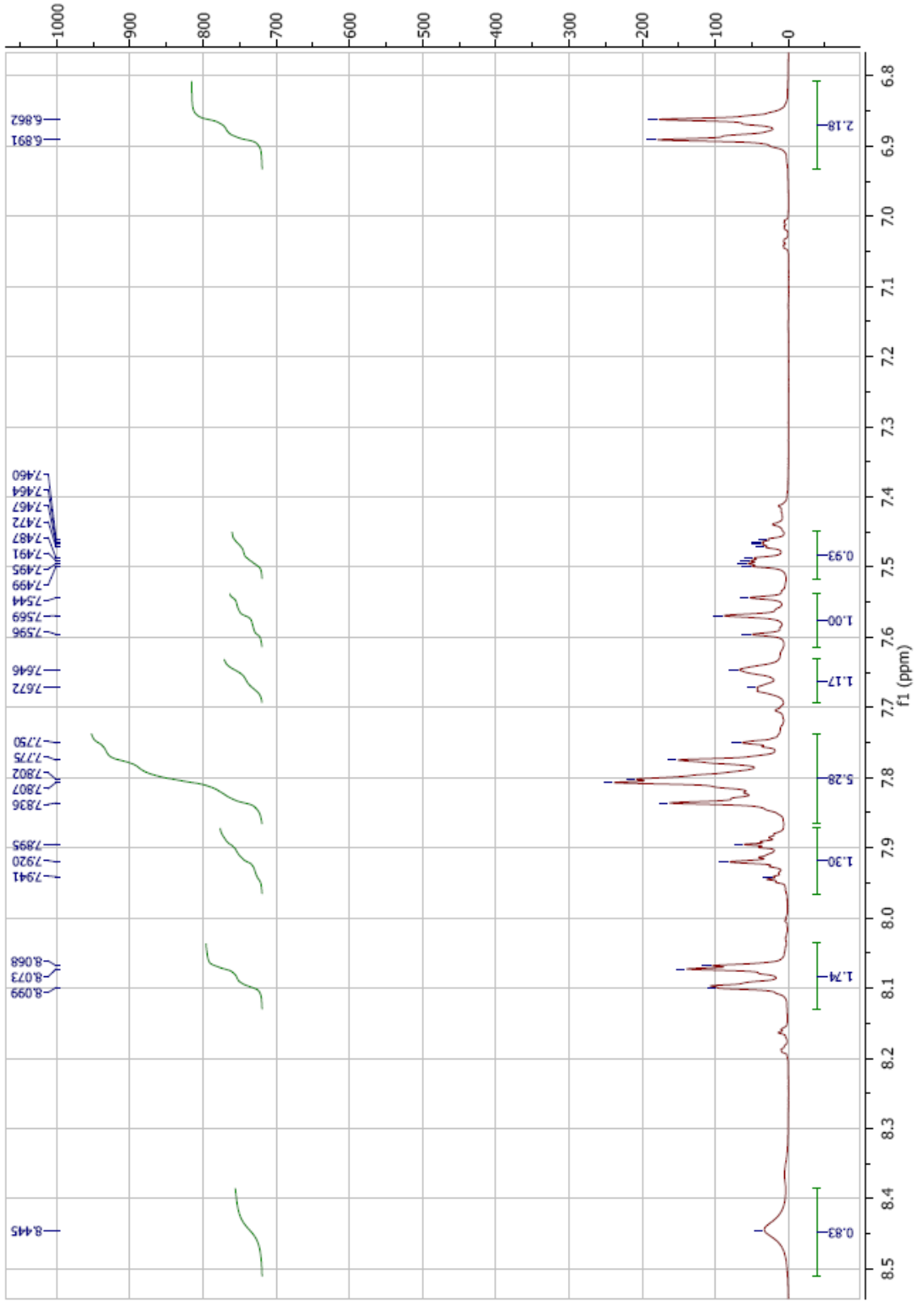


Figura: Ampliações do espectro de RMN de 1H de *N*-acilhidrazona **46** (DMSO-d_6)

ANEXO 41

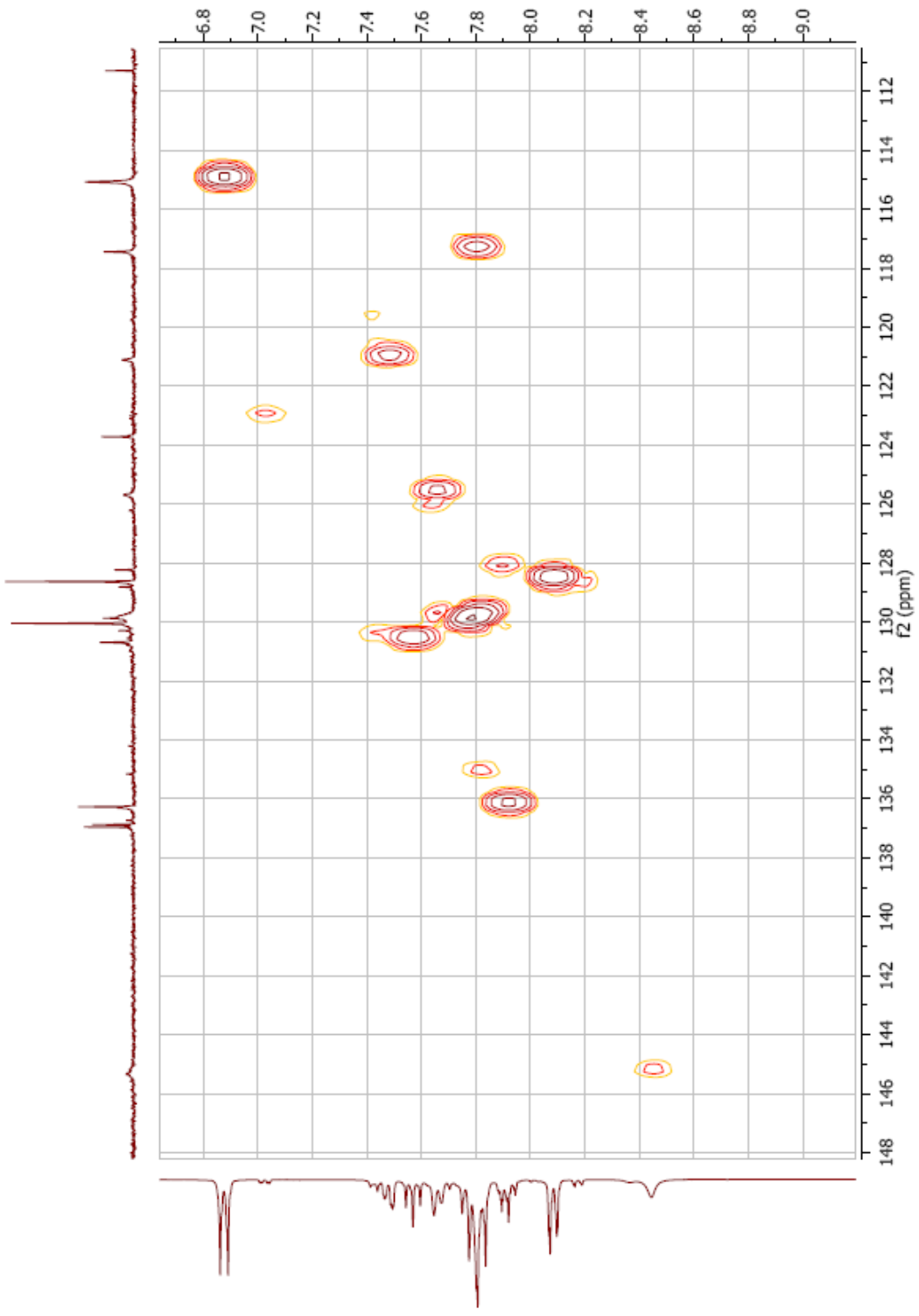


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR de *N*-acilhidrazona **46**

ANEXO 42

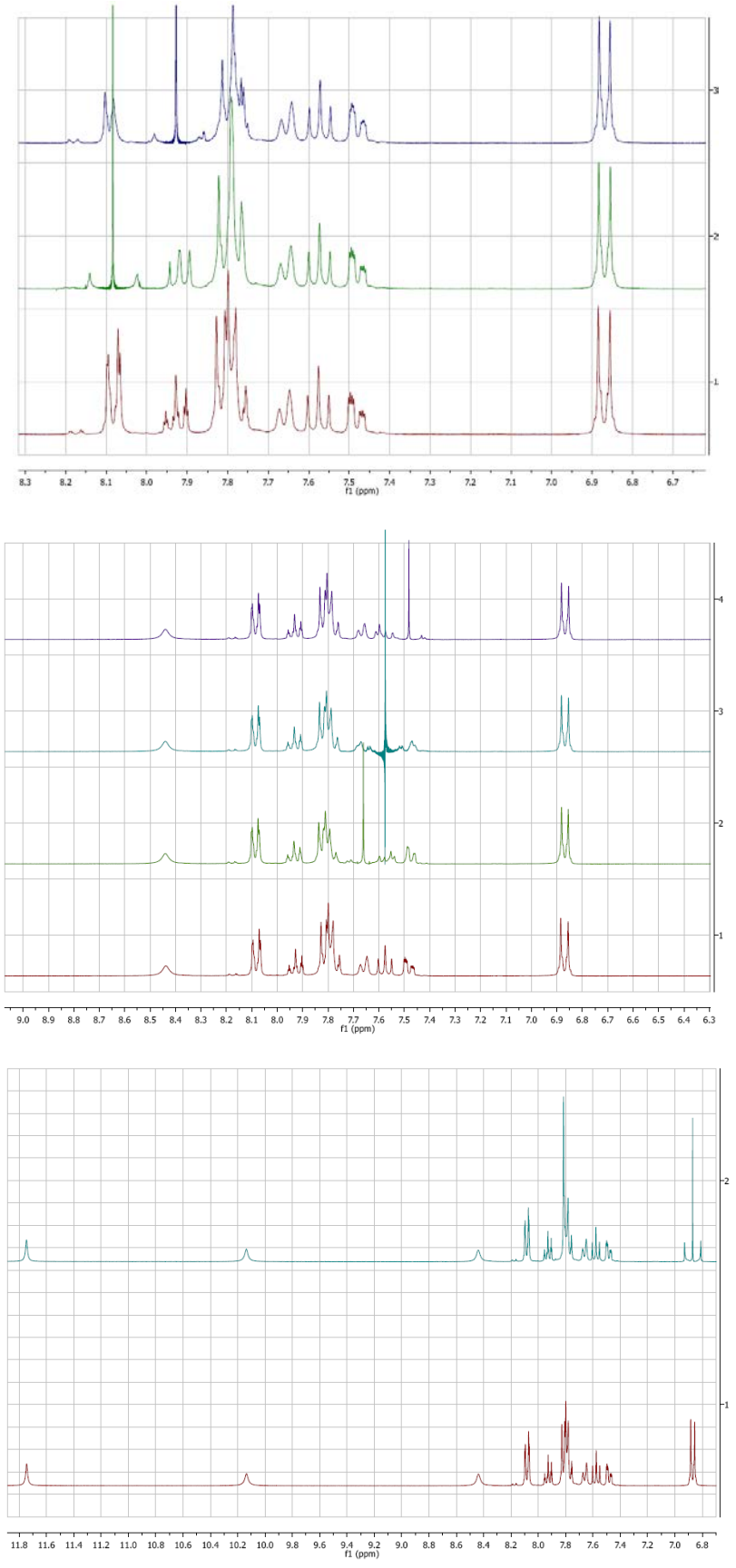


Figura: Espectros de HOMODEC DE *N*-acildrazona **46**

ANEXO 43

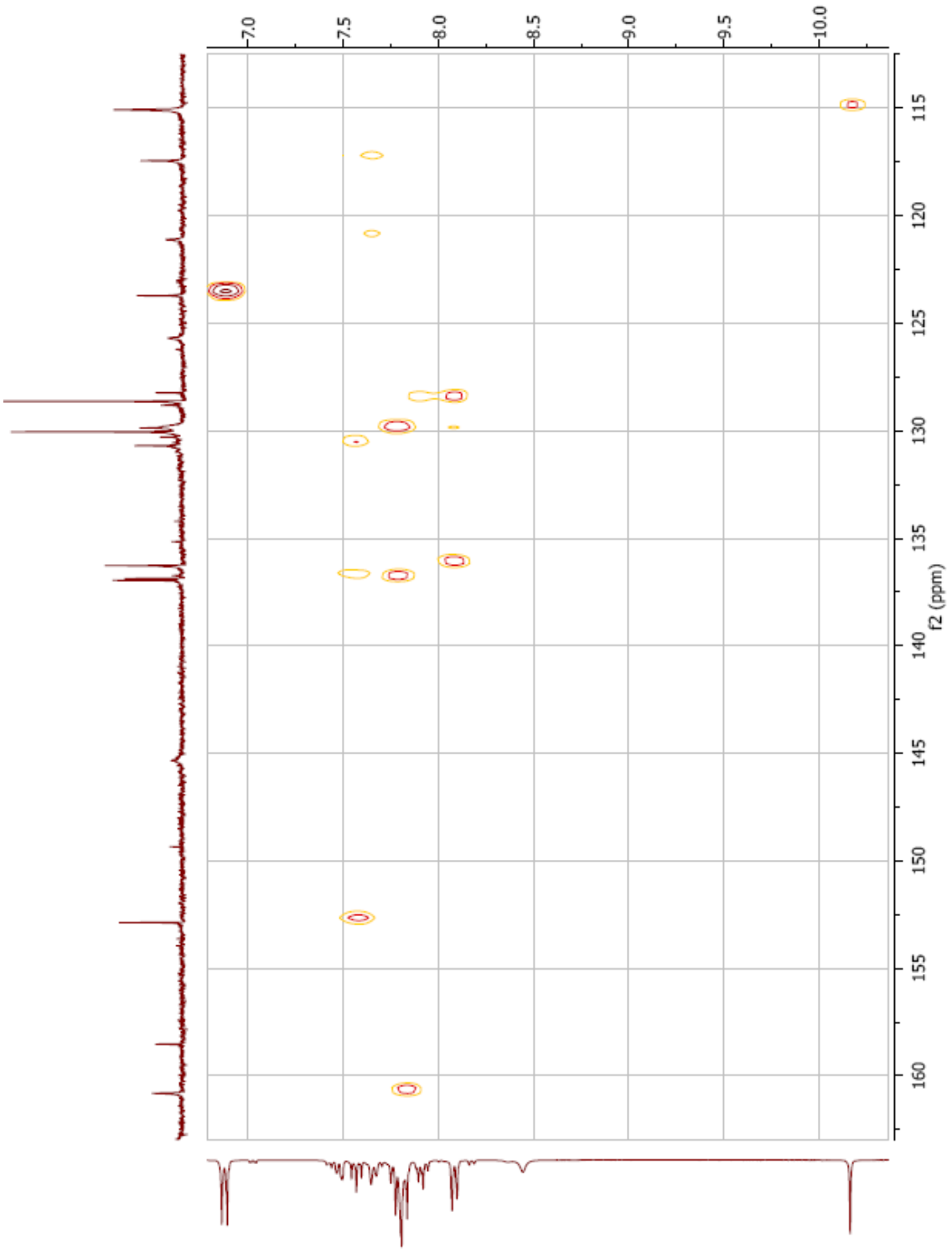


Figura: Correlações no mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **46**

ANEXO 44

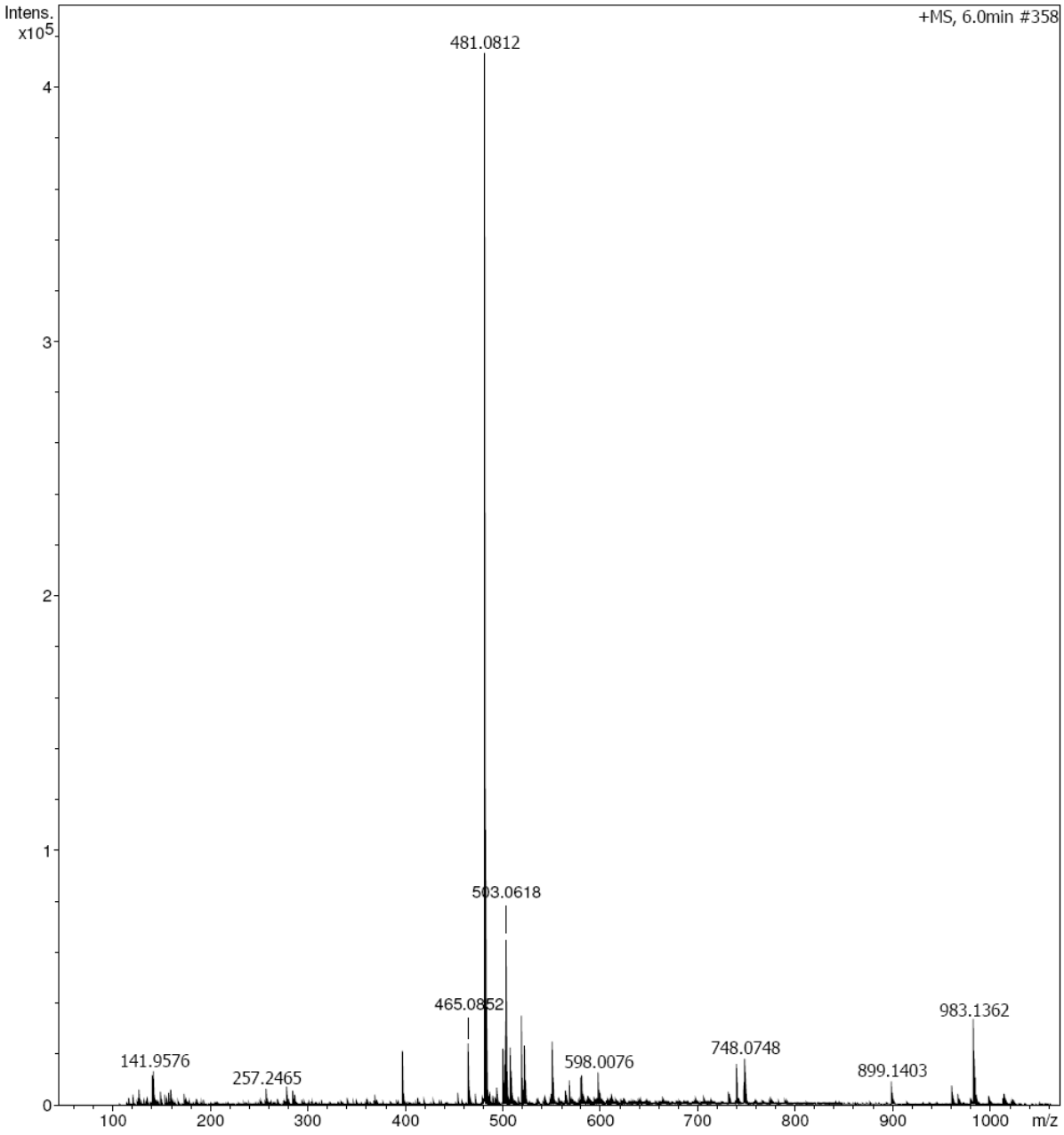


Figura: Espectro de massas de *N*-acilhidrazona **47**

ANEXO 45

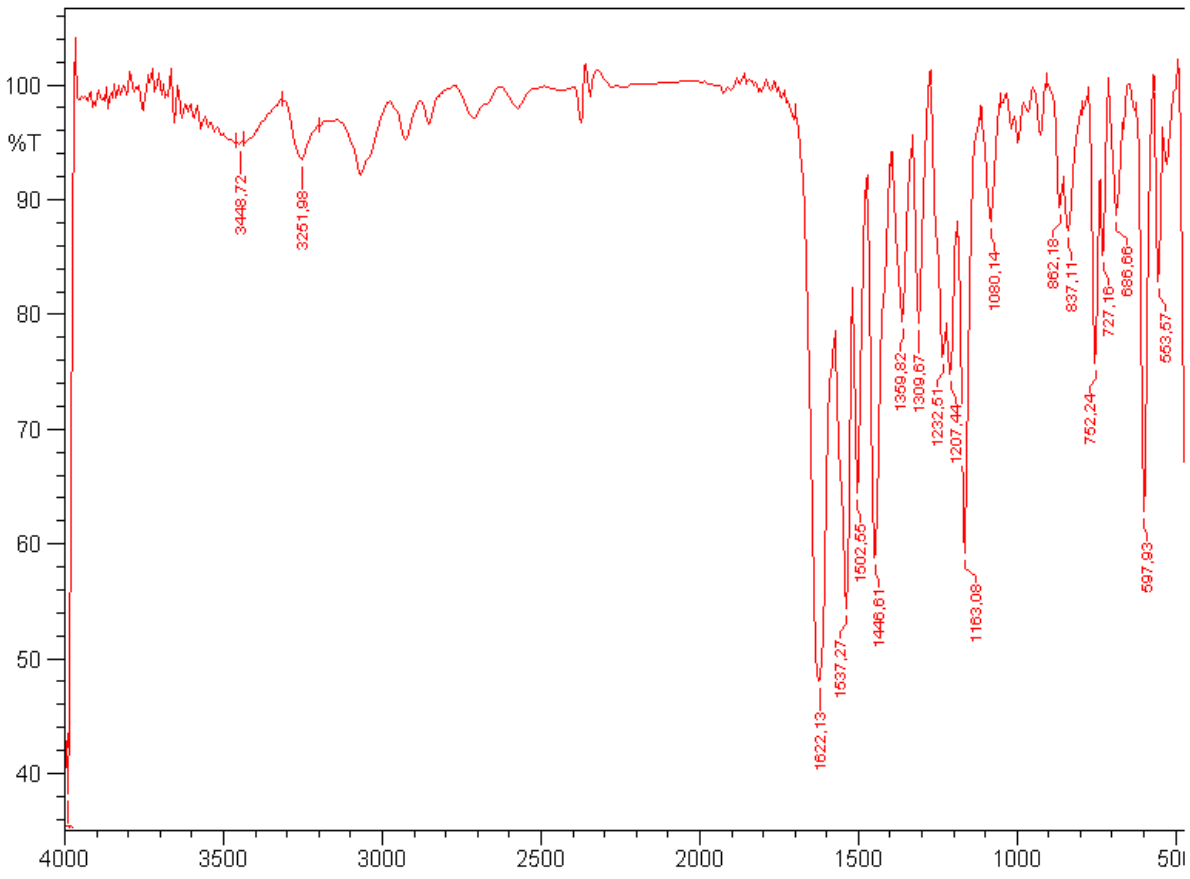


Figura: Espectro de IV de *N*-acilhidrazona **47**

ANEXO 46

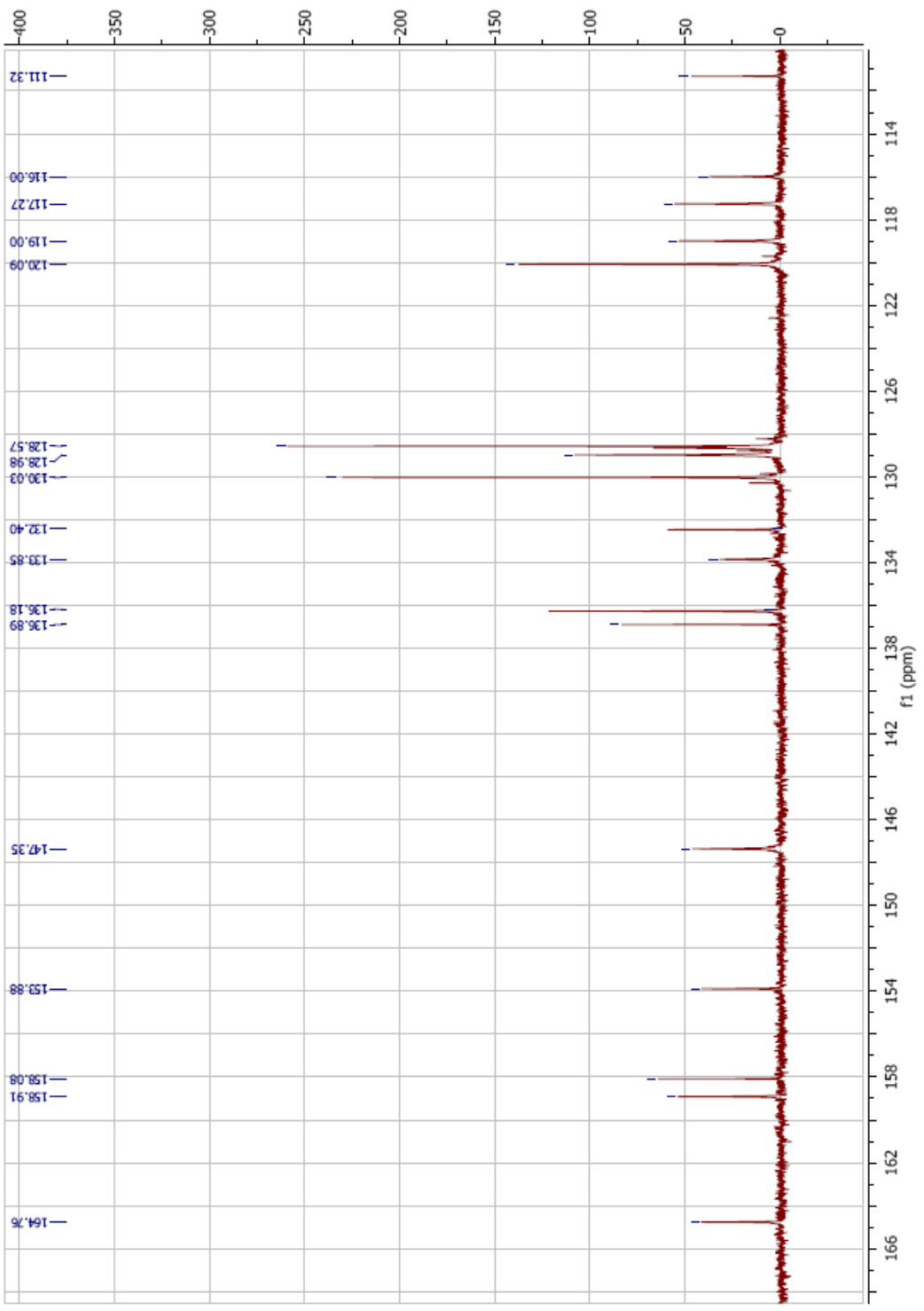


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-acilhidrazona **47** (DMSO-d_6)

ANEXO 47

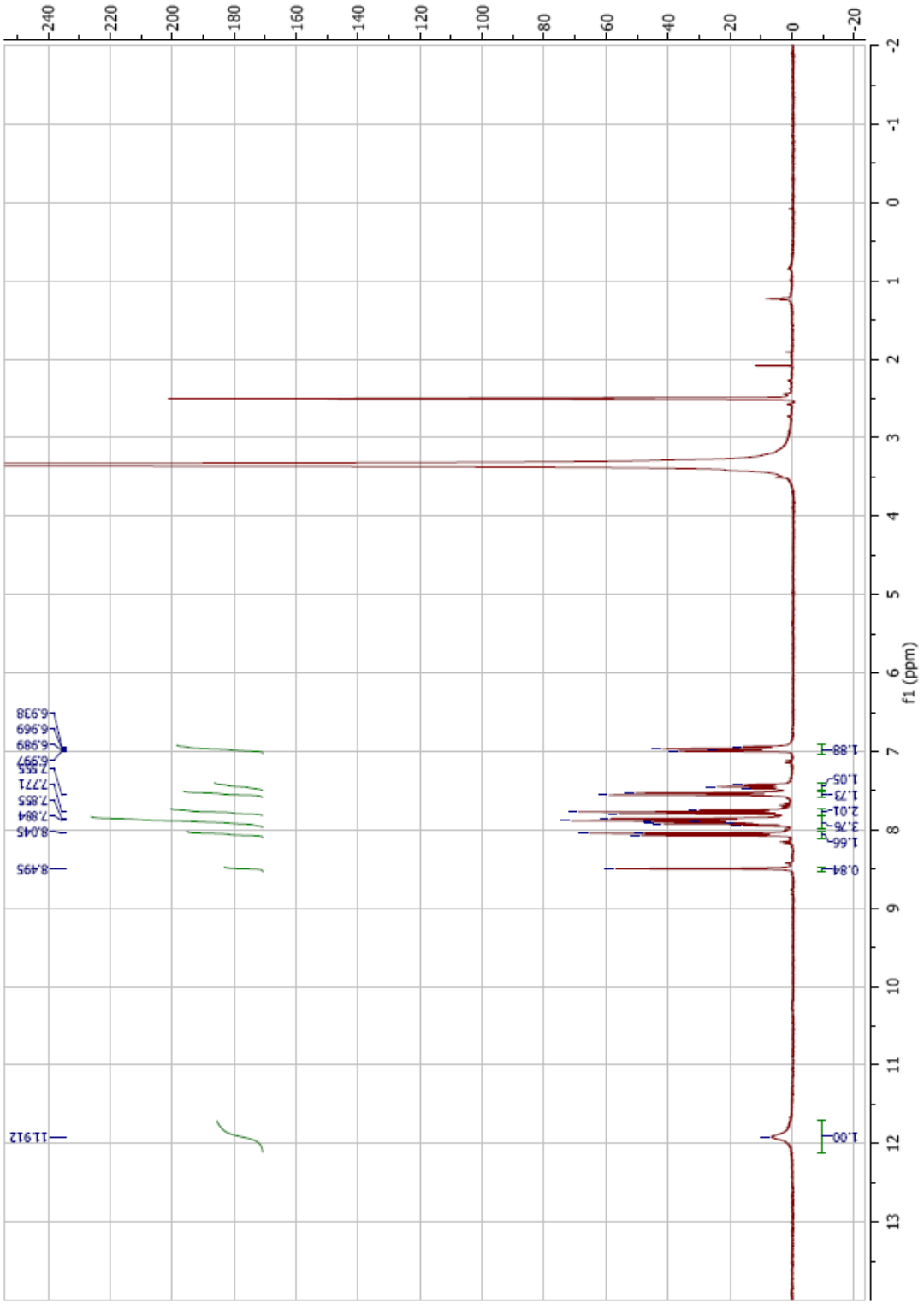


Figura: Espectro de RMN de 1H de *N*-acilhidrazona **47** (DMSO-*d6*)

ANEXO 48

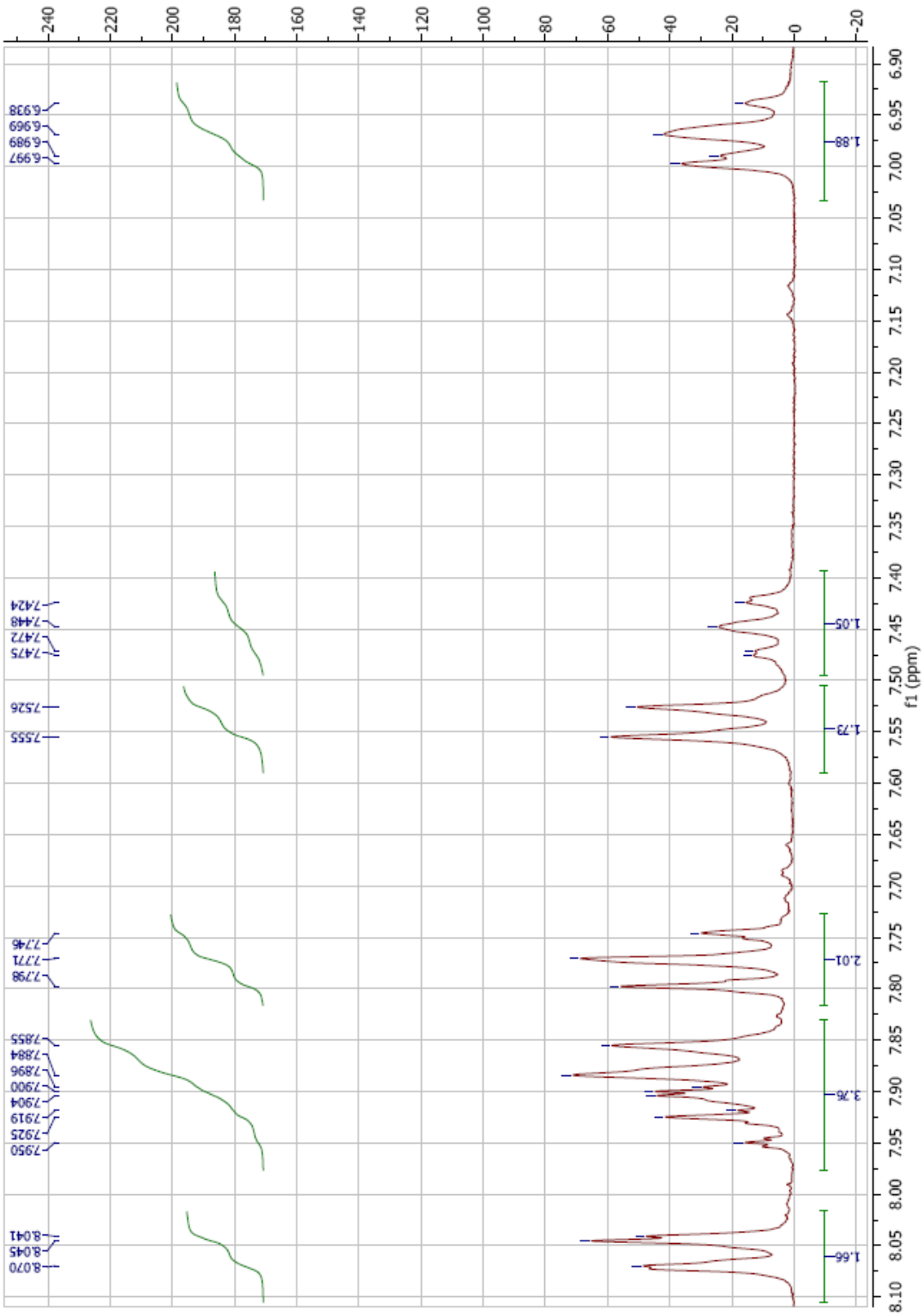


Figura: Ampliações do espectro de RMN de 1H de *N*-acilhidrazona **47** (DMSO-*d6*)

ANEXO 49

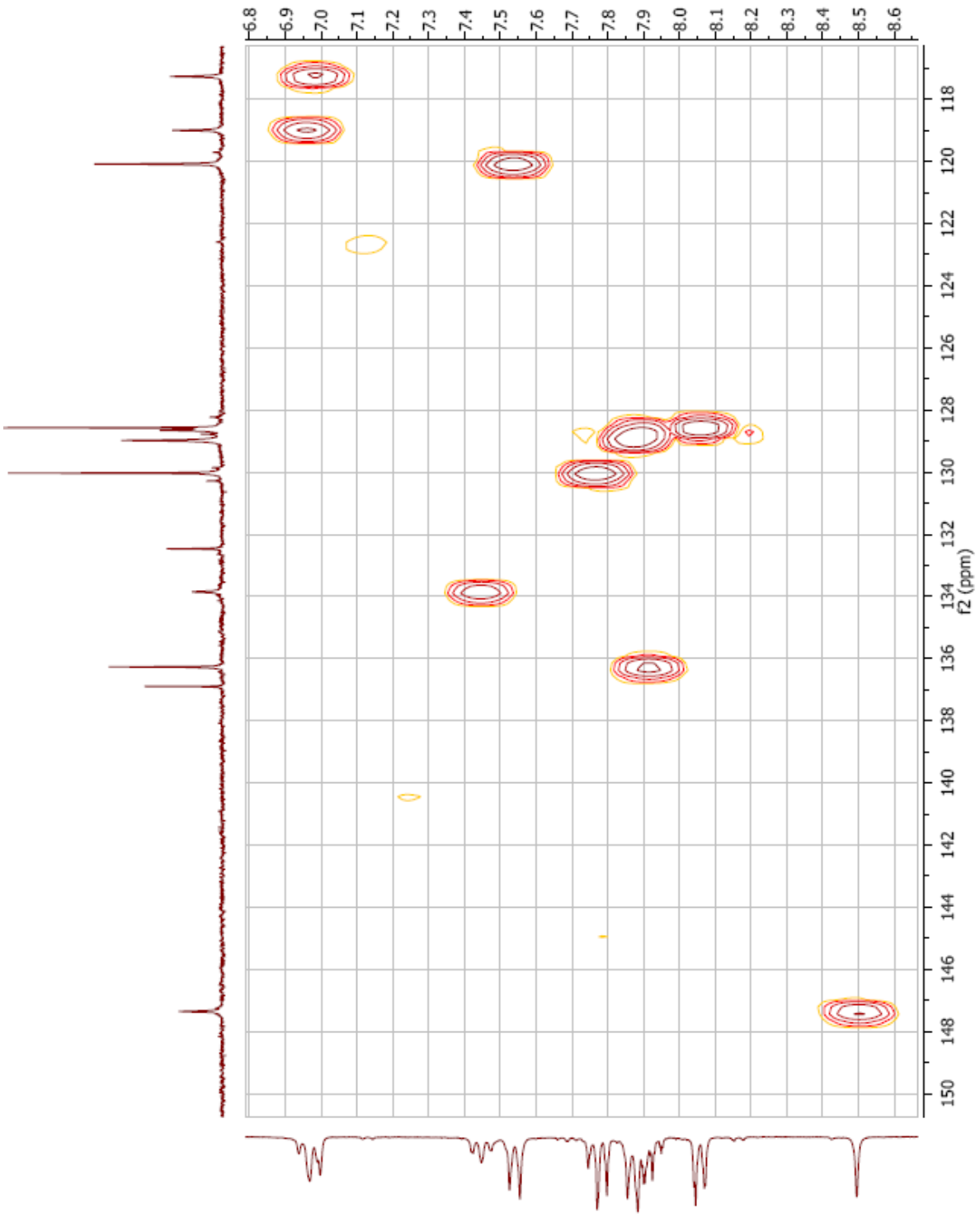


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR de *N*-acilhidrazona **47**

ANEXO 50

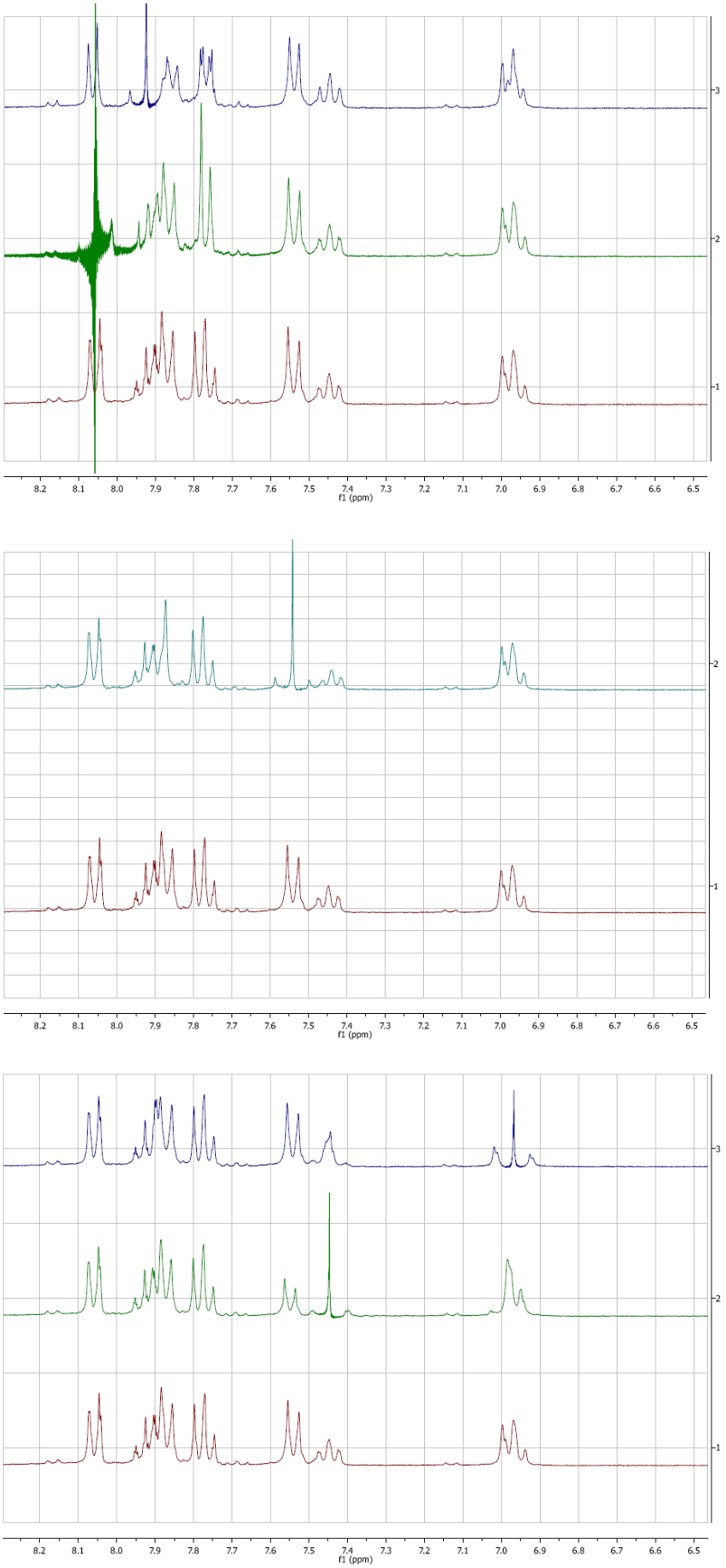


Figura: Espectros de HOMODEC de *N*-acilhidrazona **47**

ANEXO 51

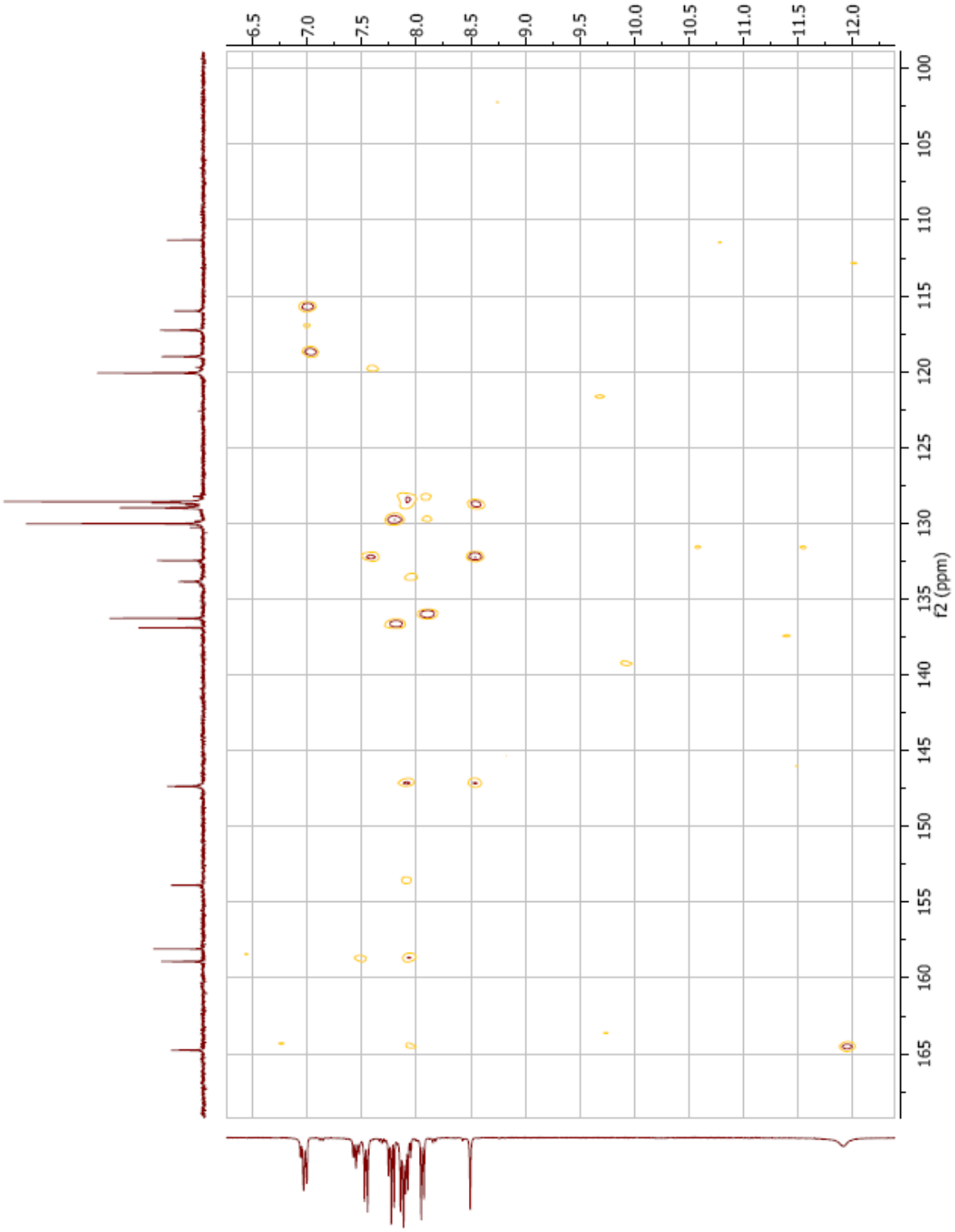


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **47**

ANEXO 52

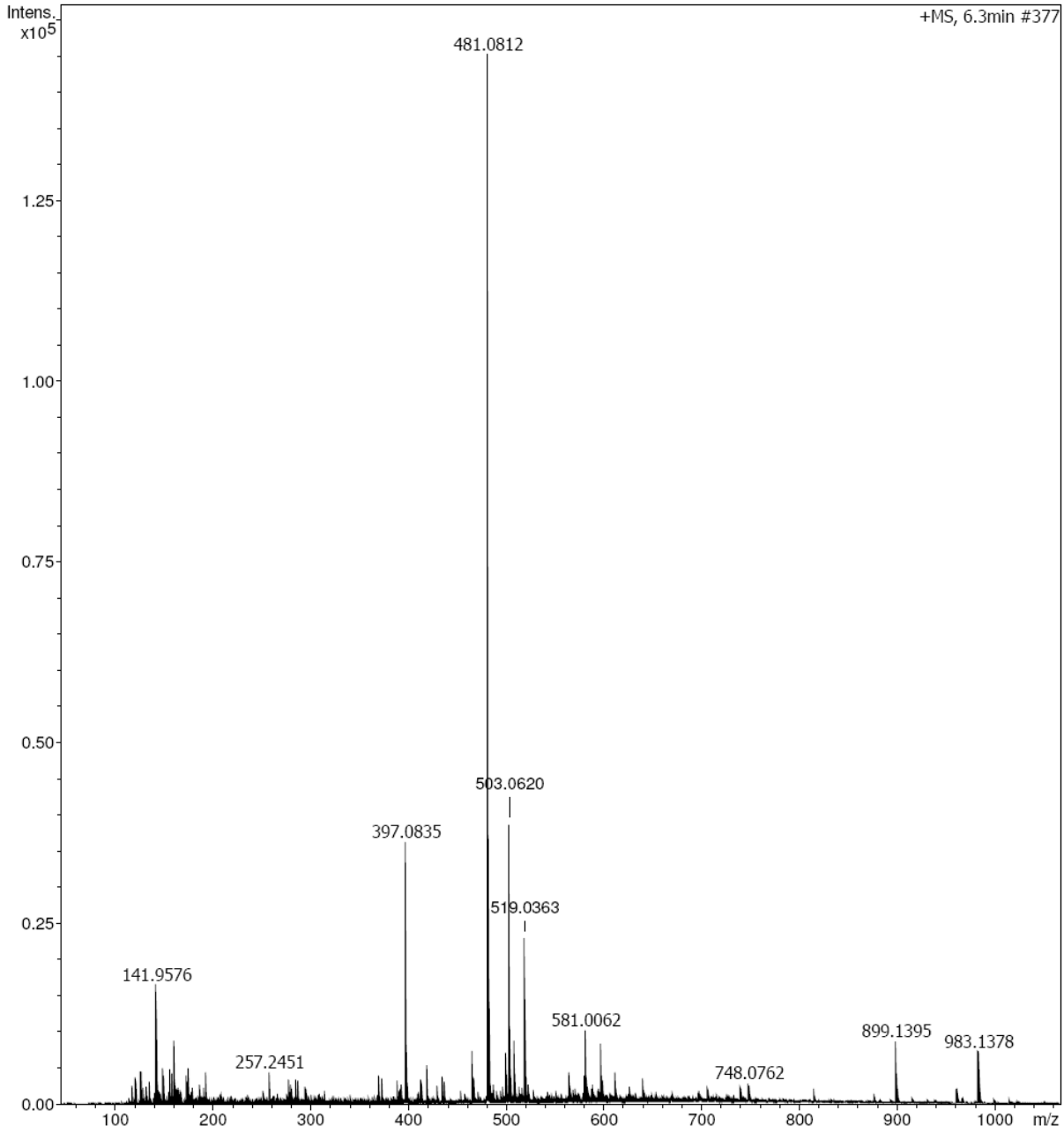


Figura: Espectro de Massas de *N*-acilhidrazona **48**

ANEXO 53

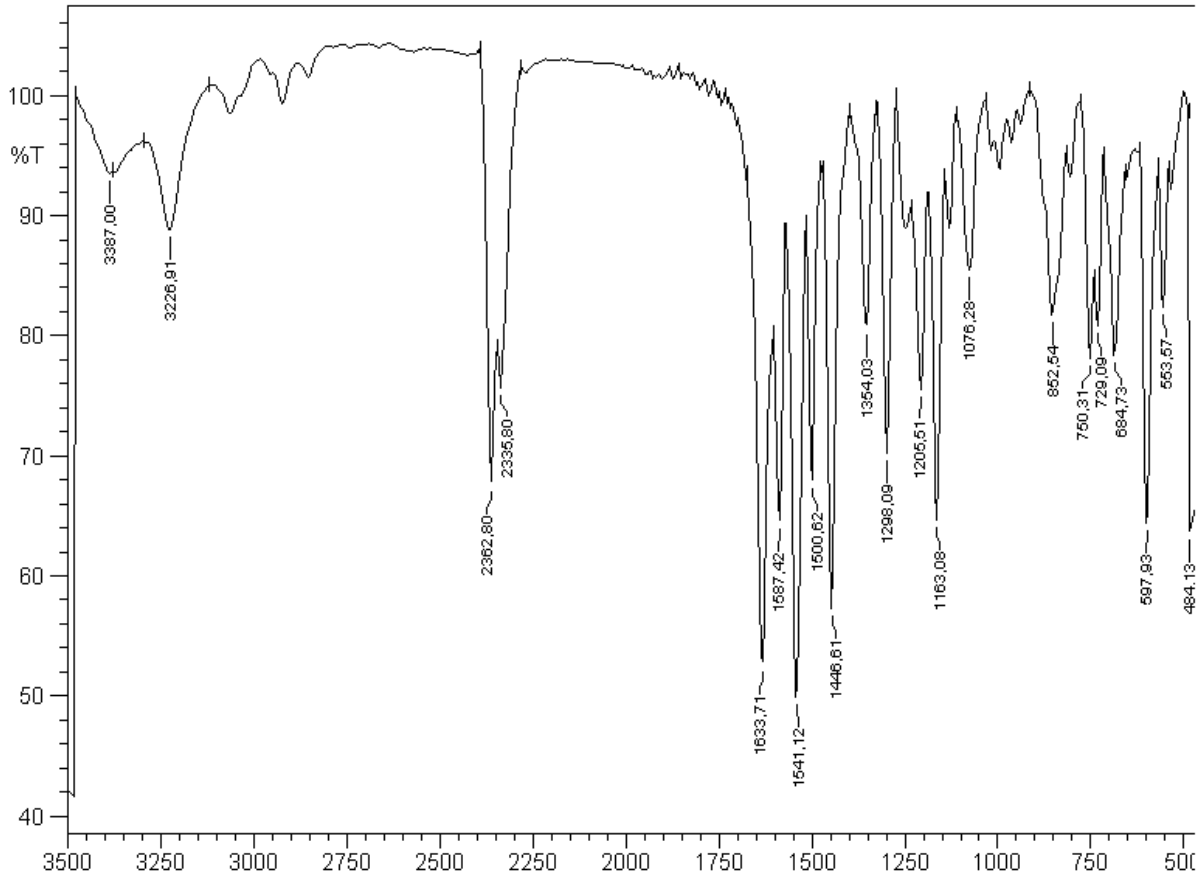


Figura: Espectro de IV de *N*-acilhidrazona **48**

ANEXO 54

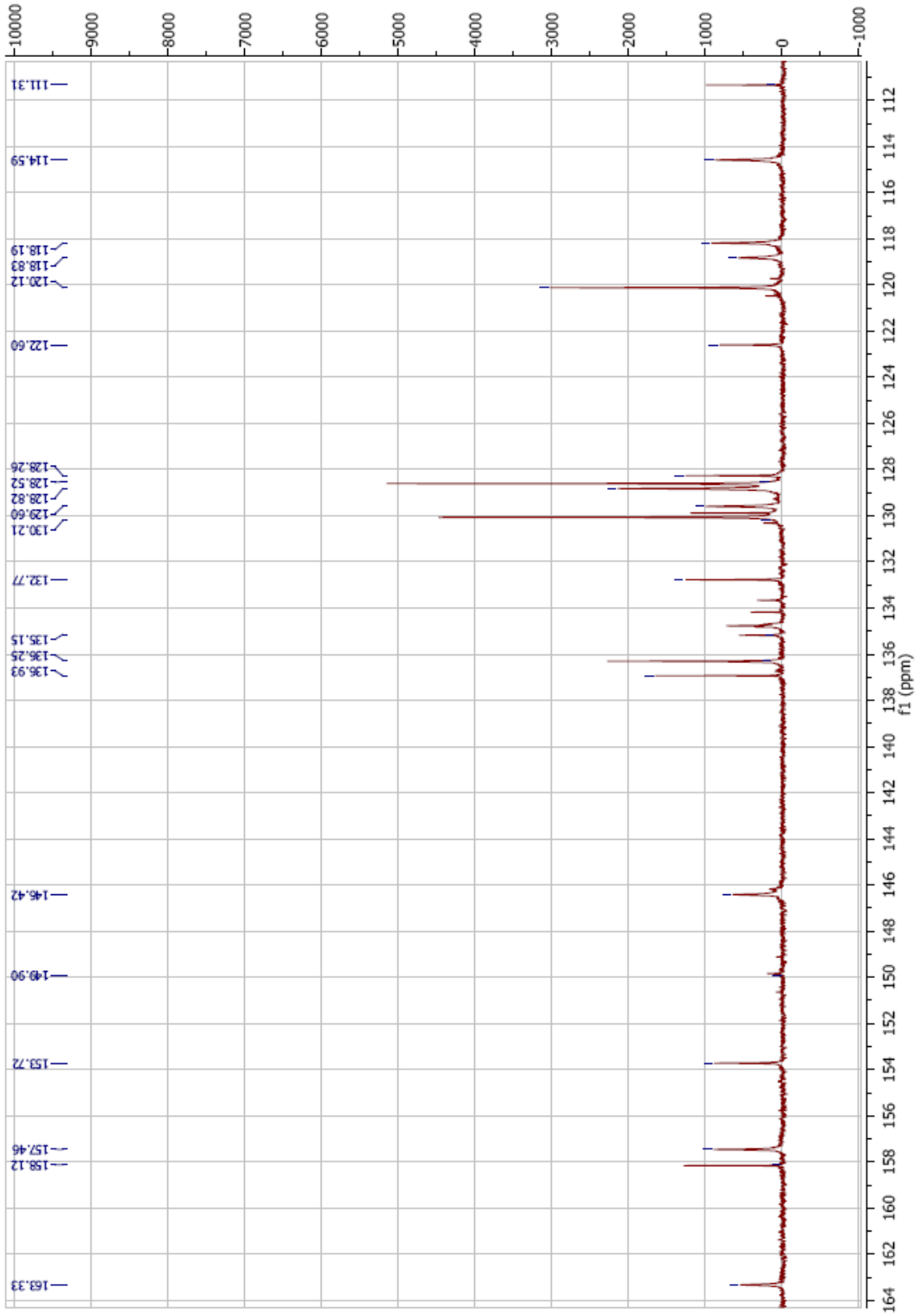


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-acilhidrazona **48** (DMSO-d_6)

ANEXO 55

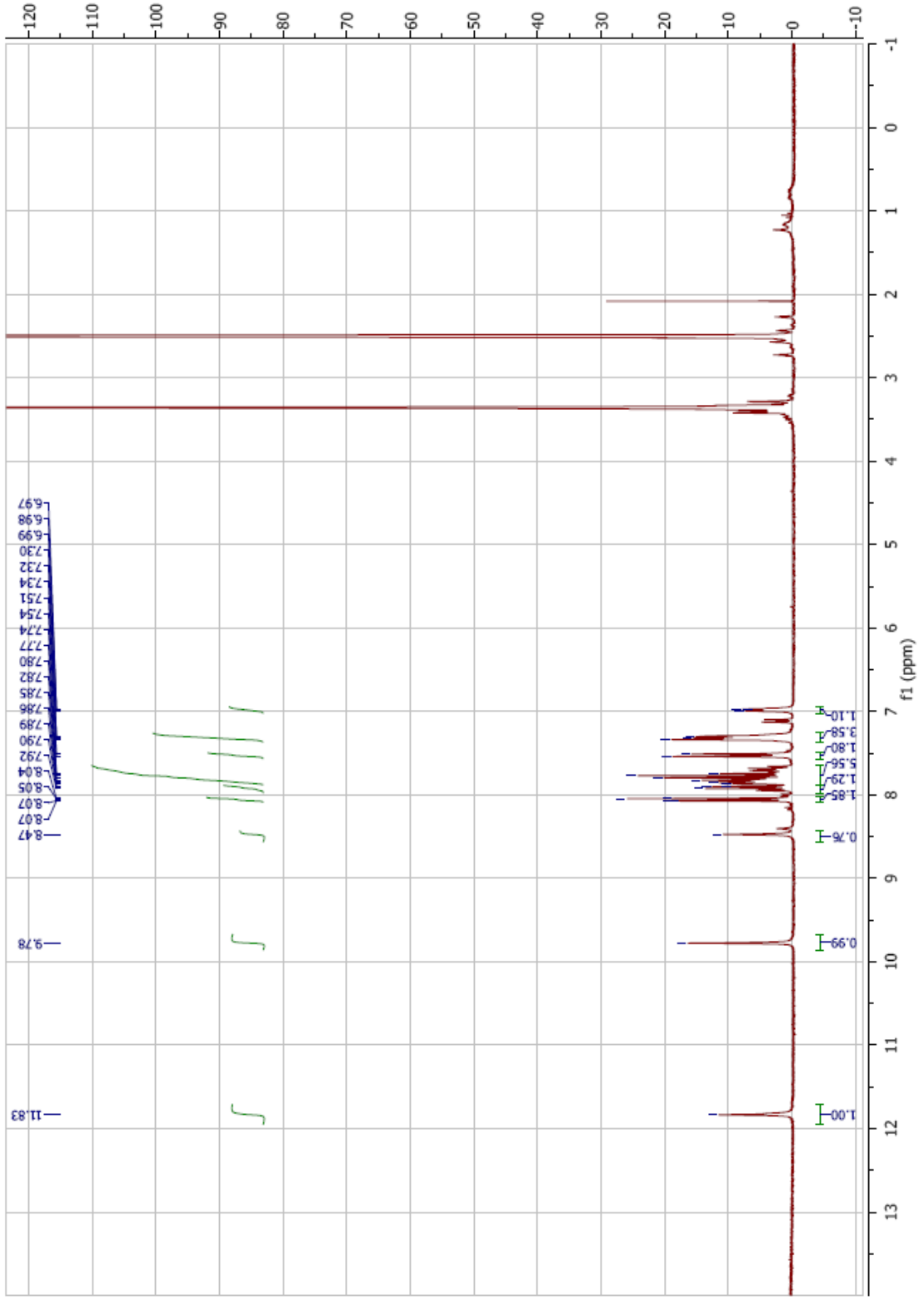


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-acilhidrazona **48** (DMSO-d_6)

ANEXO 56

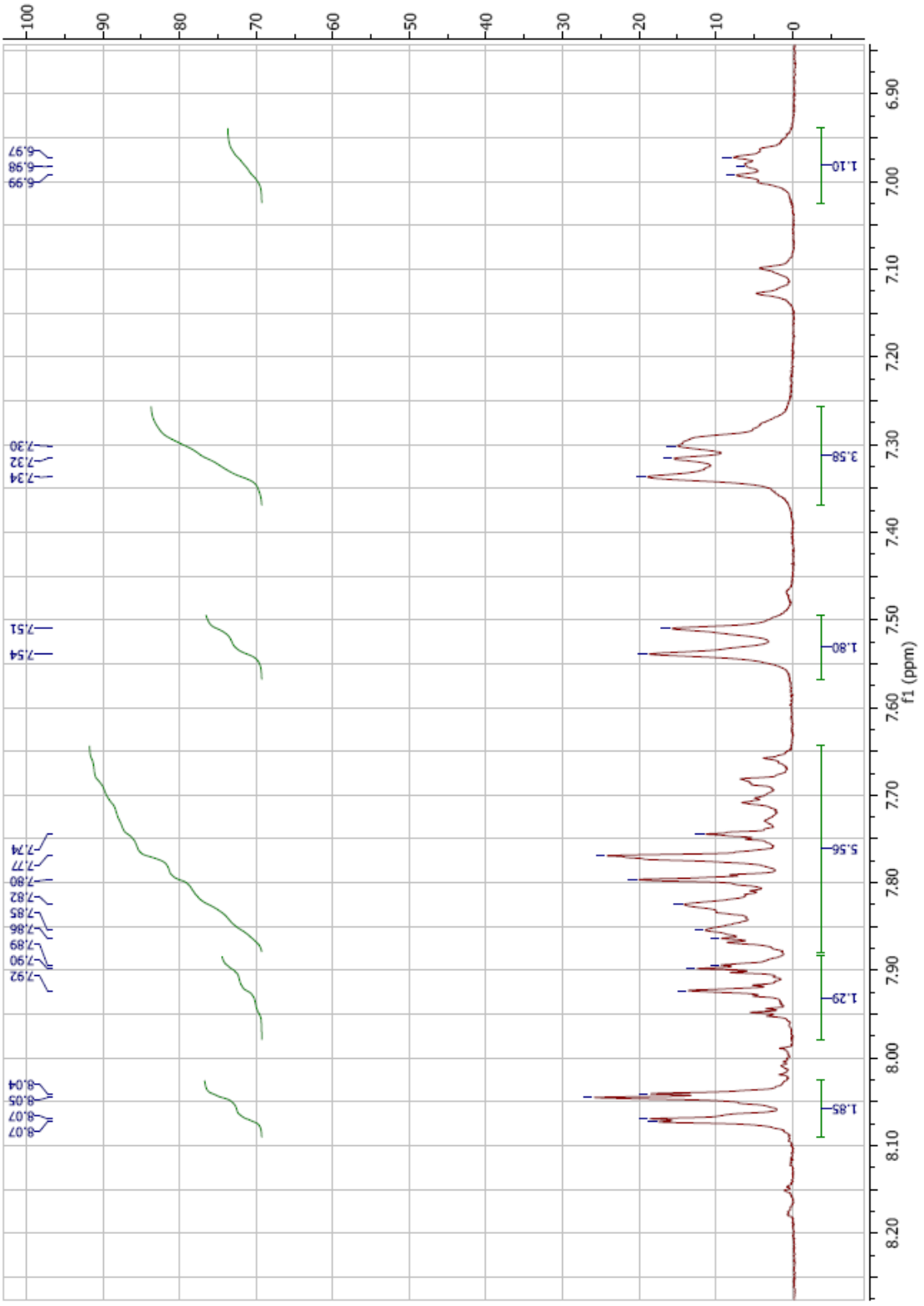


Figura: Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de *N*-acilhidrazona **48** (DMSO-d_6)

ANEXO 57

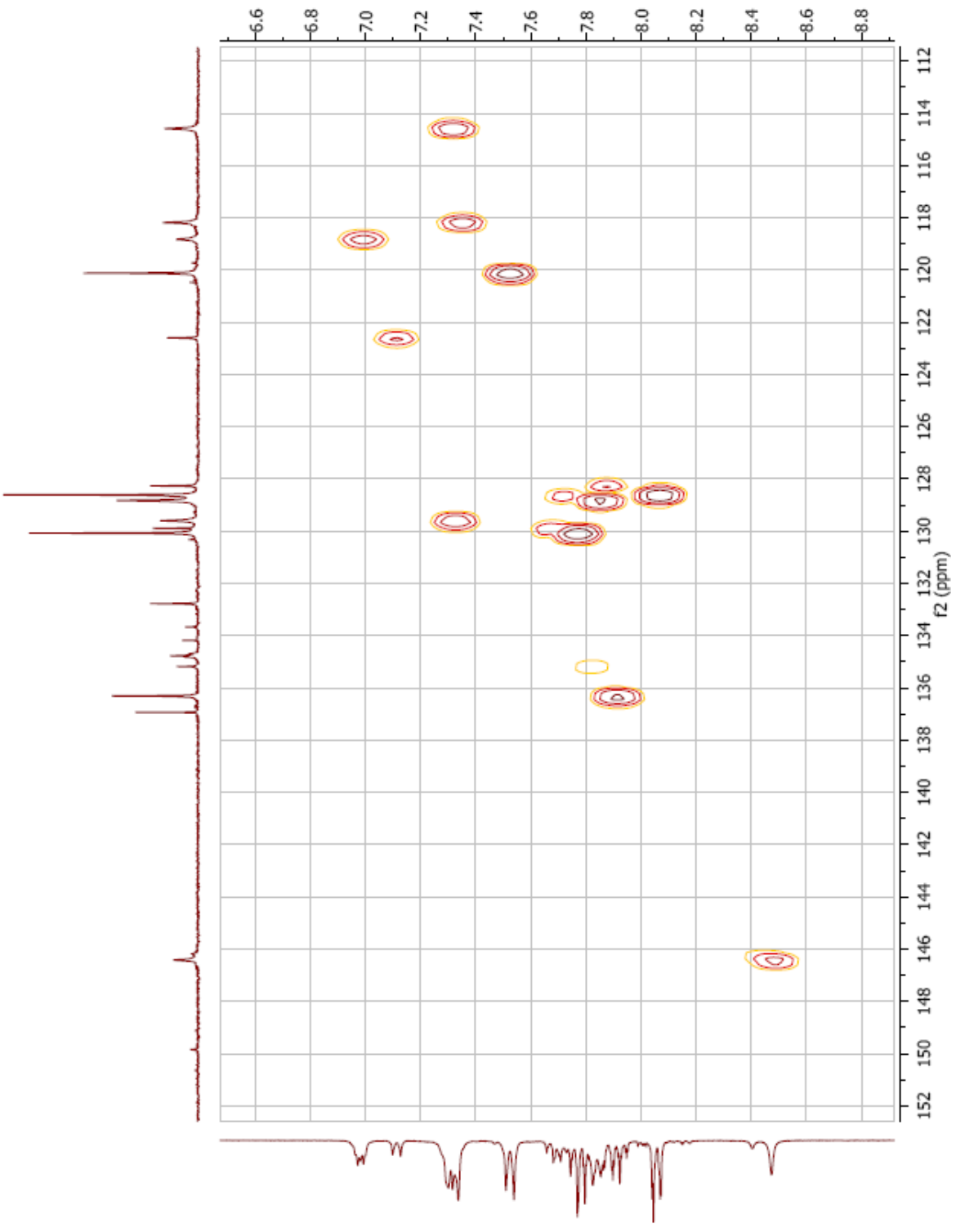


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR de *N*-acilhidrazona **48**

ANEXO 58

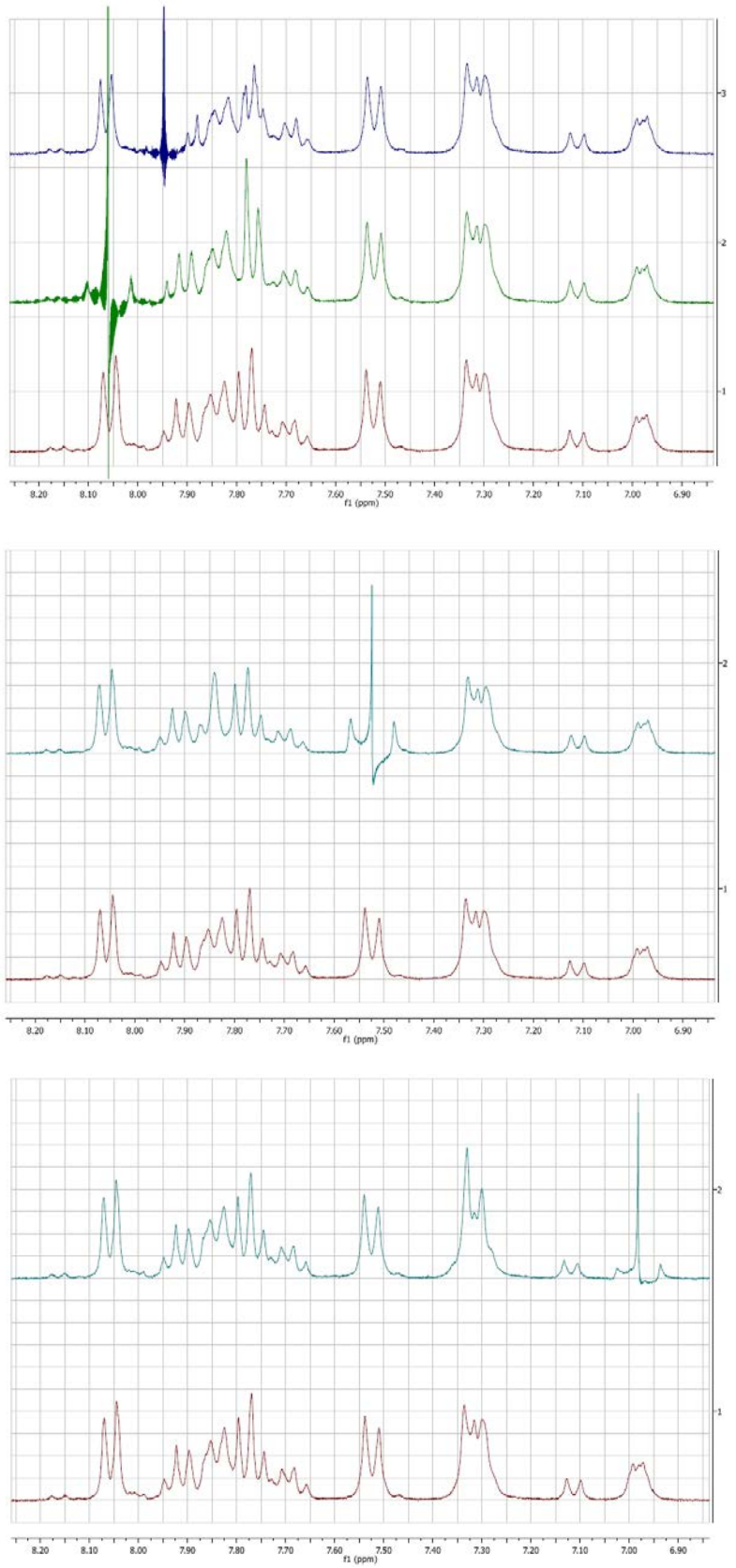


Figura: Espectros de HOMODEC de *N*-acilhidrazona **48**

ANEXO 59

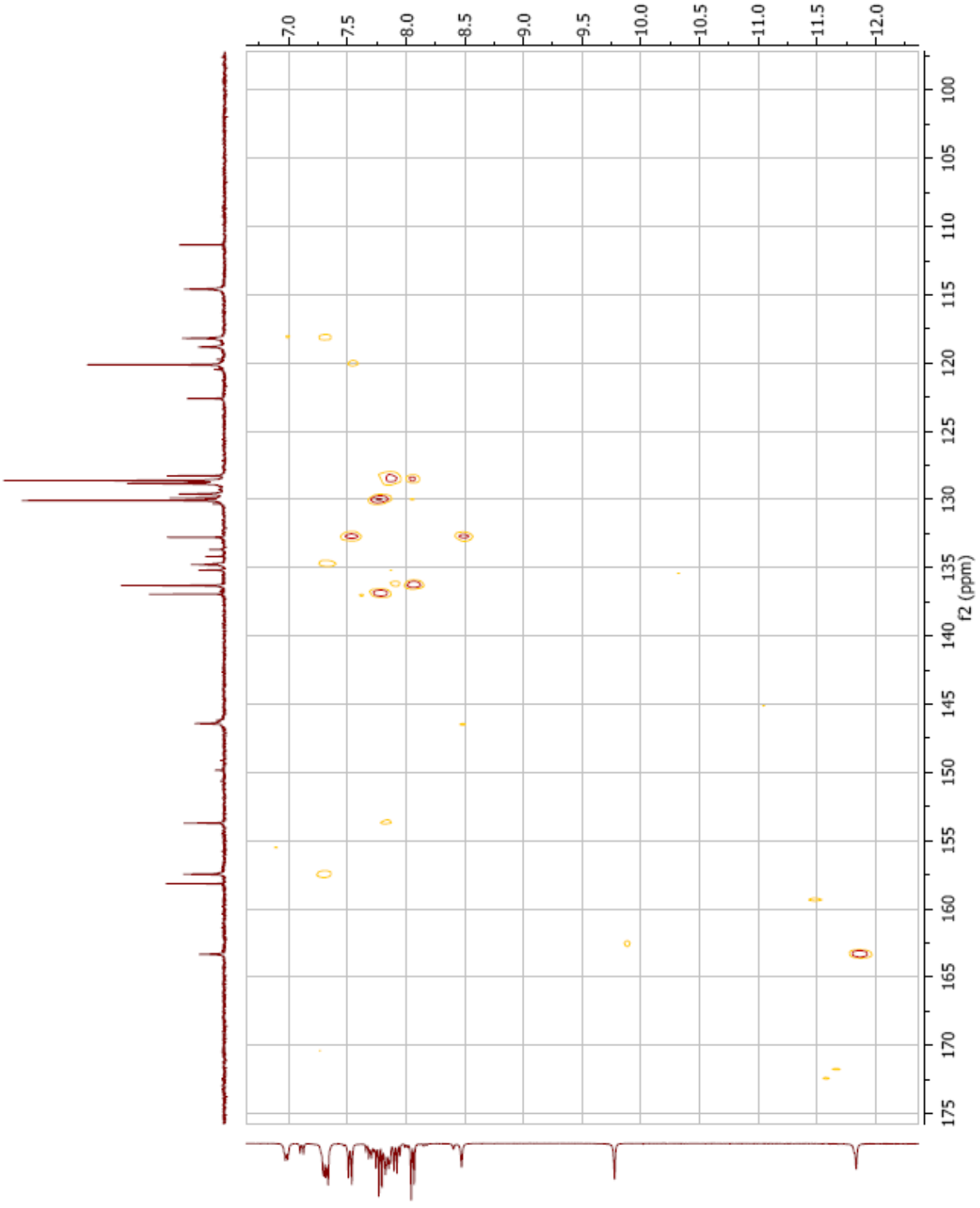


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **48**

ANEXO 60

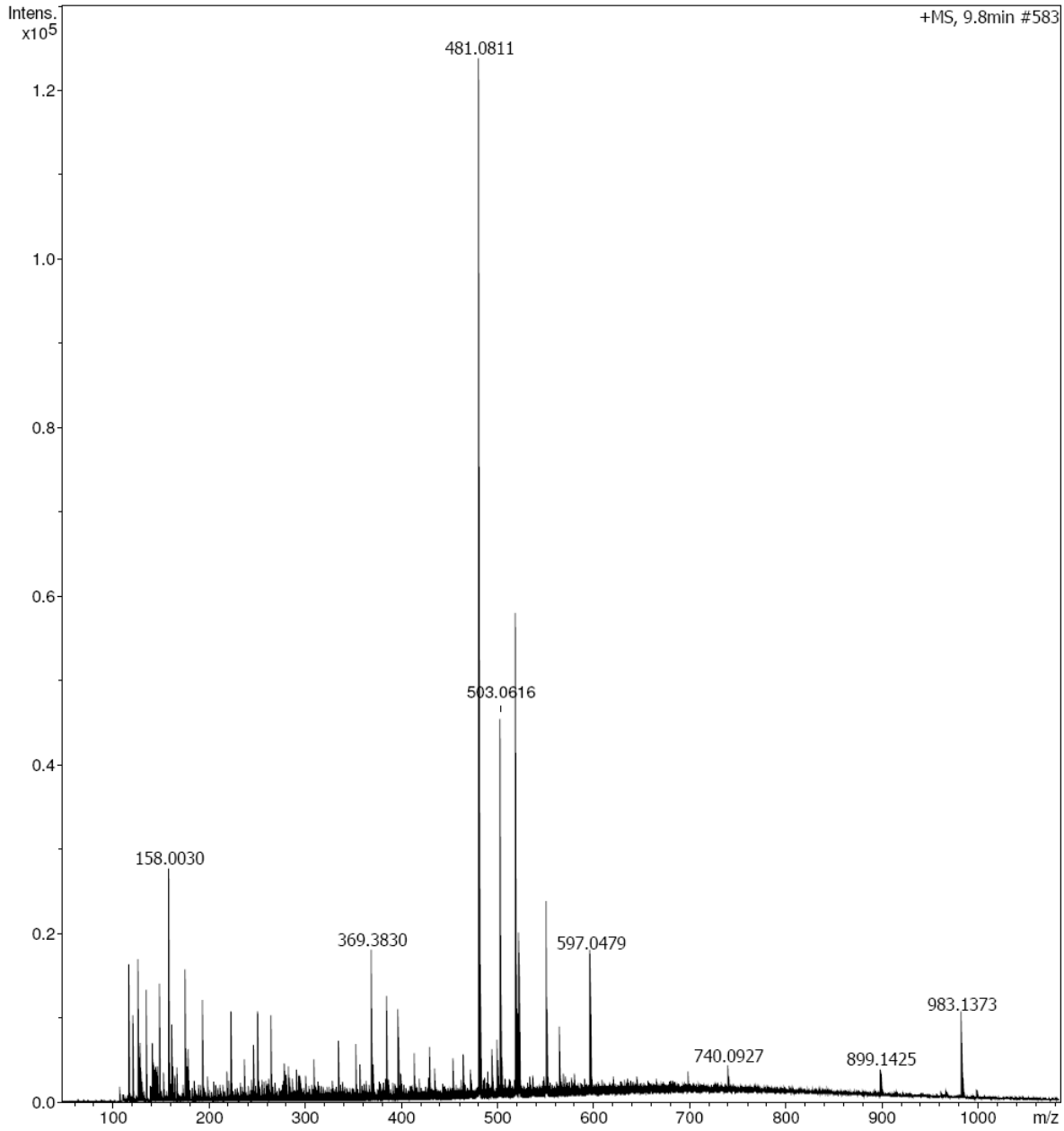


Figura: Espectro de massas de *N*-acilhidrazona **49**

ANEXO 61

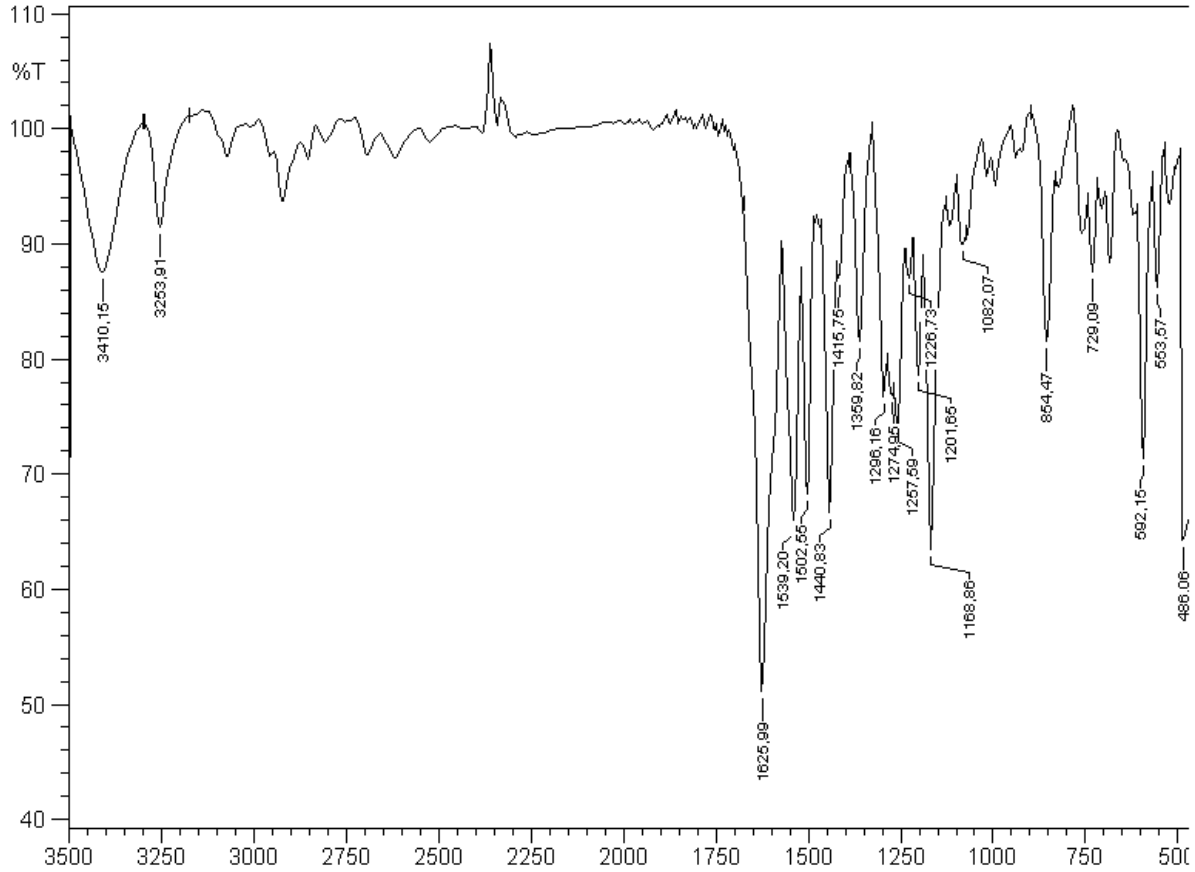


Figura: Espectro de IV de *N*-acilhidrazona **49**

ANEXO 62

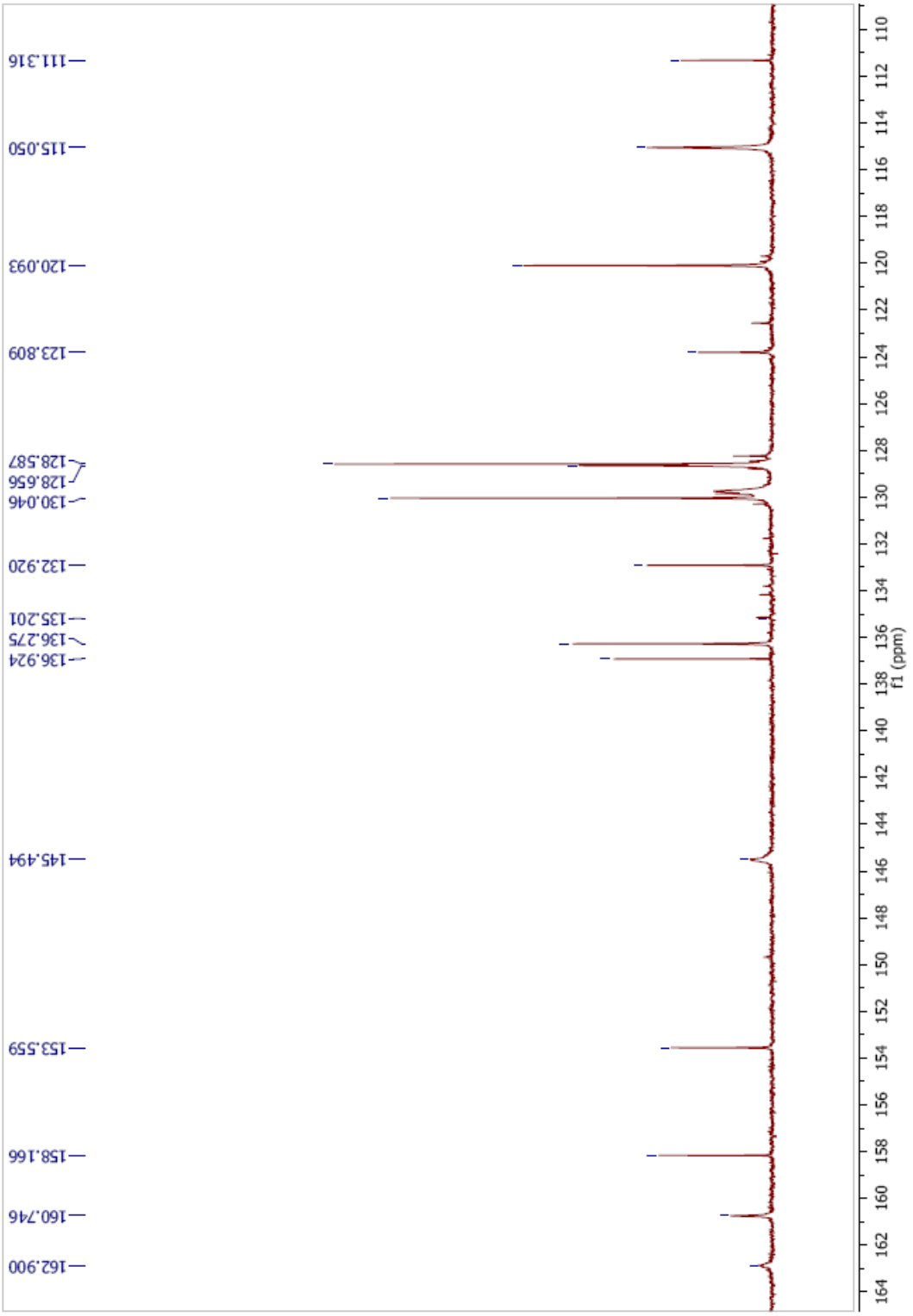


Figura: Espectro de RMN de 13C de *N*-acilhidrazona **49** (DMSO-d_6)

ANEXO 63

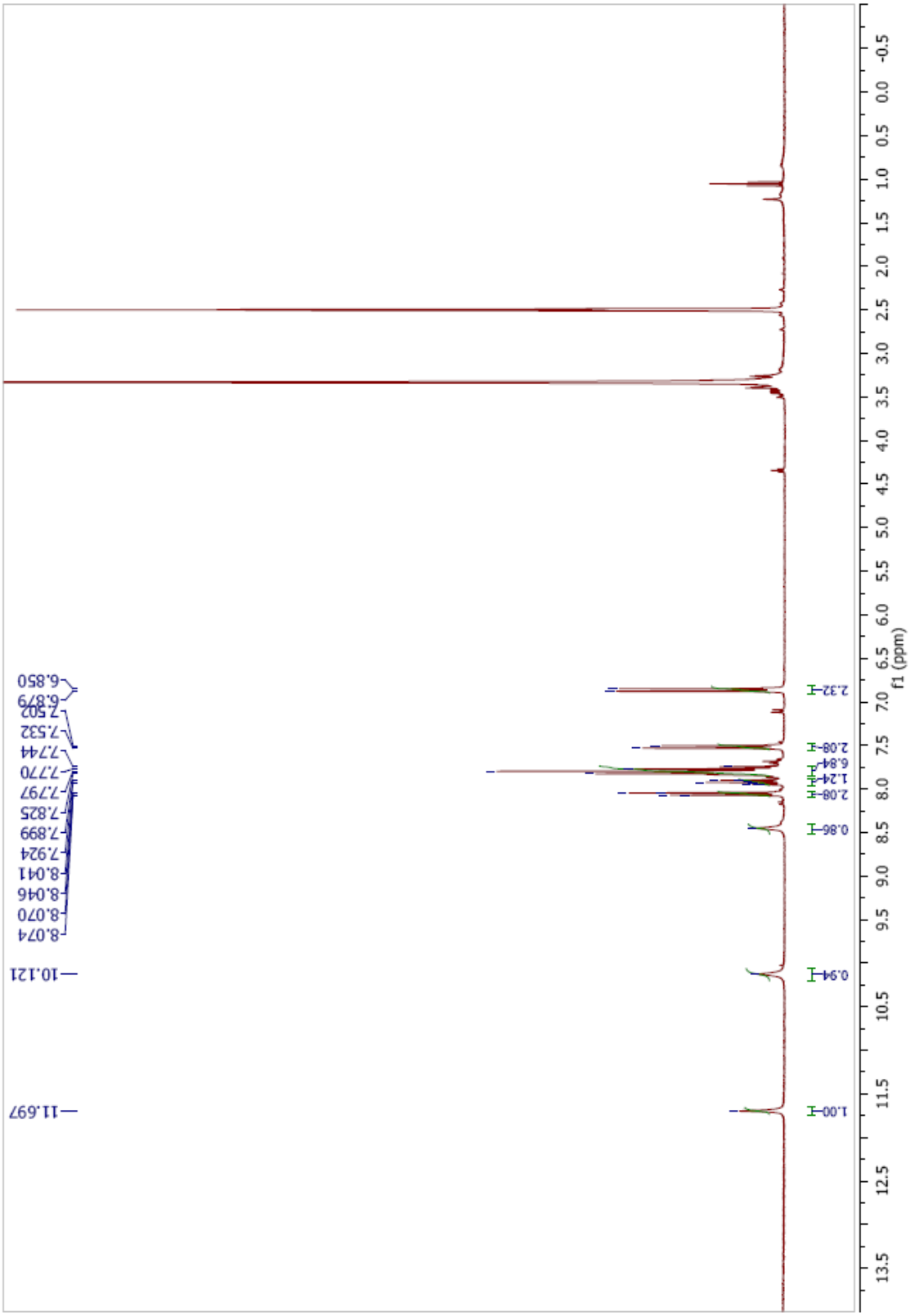


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H de *N*-acilhidrazona **49** (DMSO-d_6)

ANEXO 64

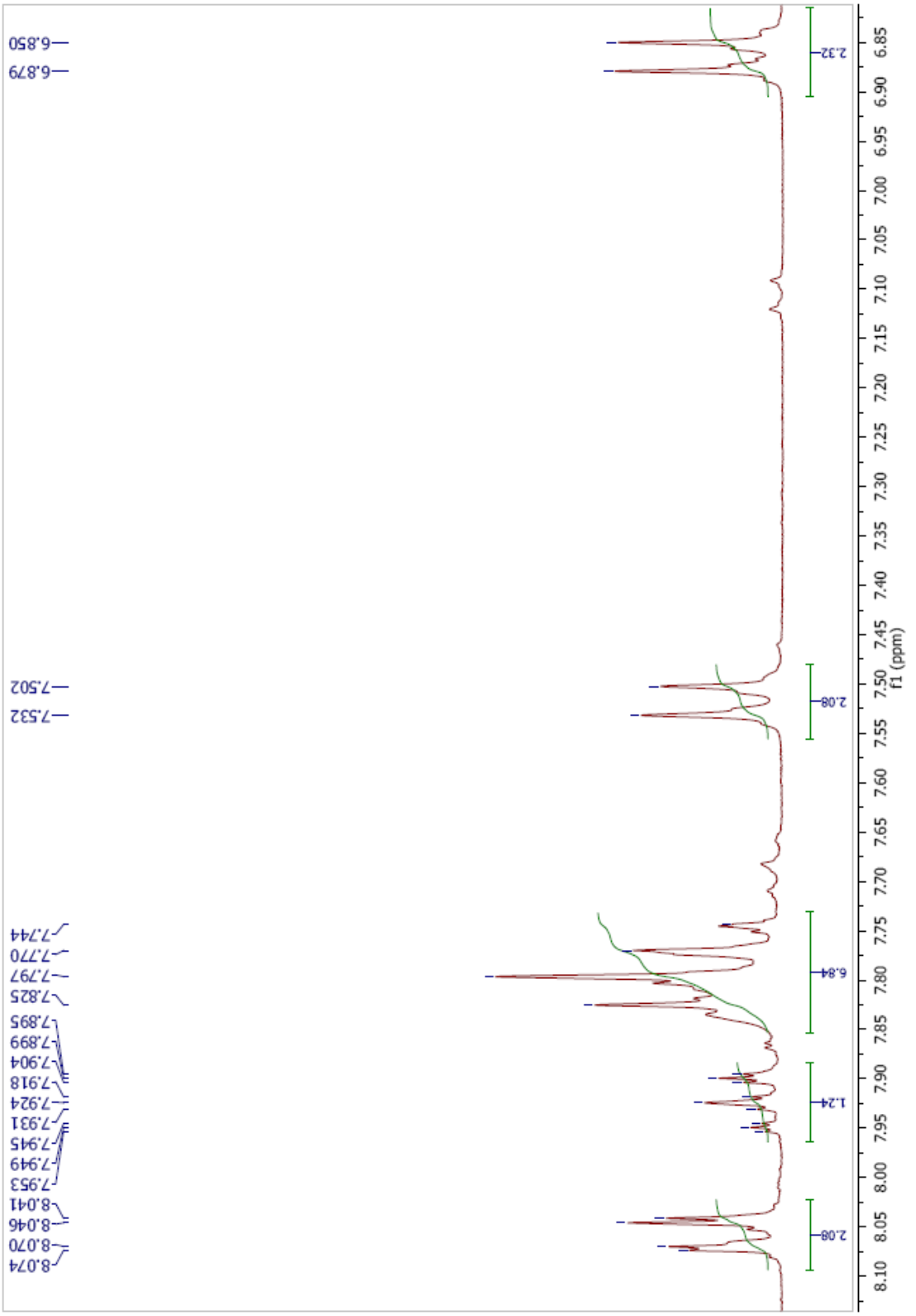


Figura: Ampliações do espectro de RMN de ^{1}H de *N*-acilhidrazona **49** (DMSO-d_6)

ANEXO 65

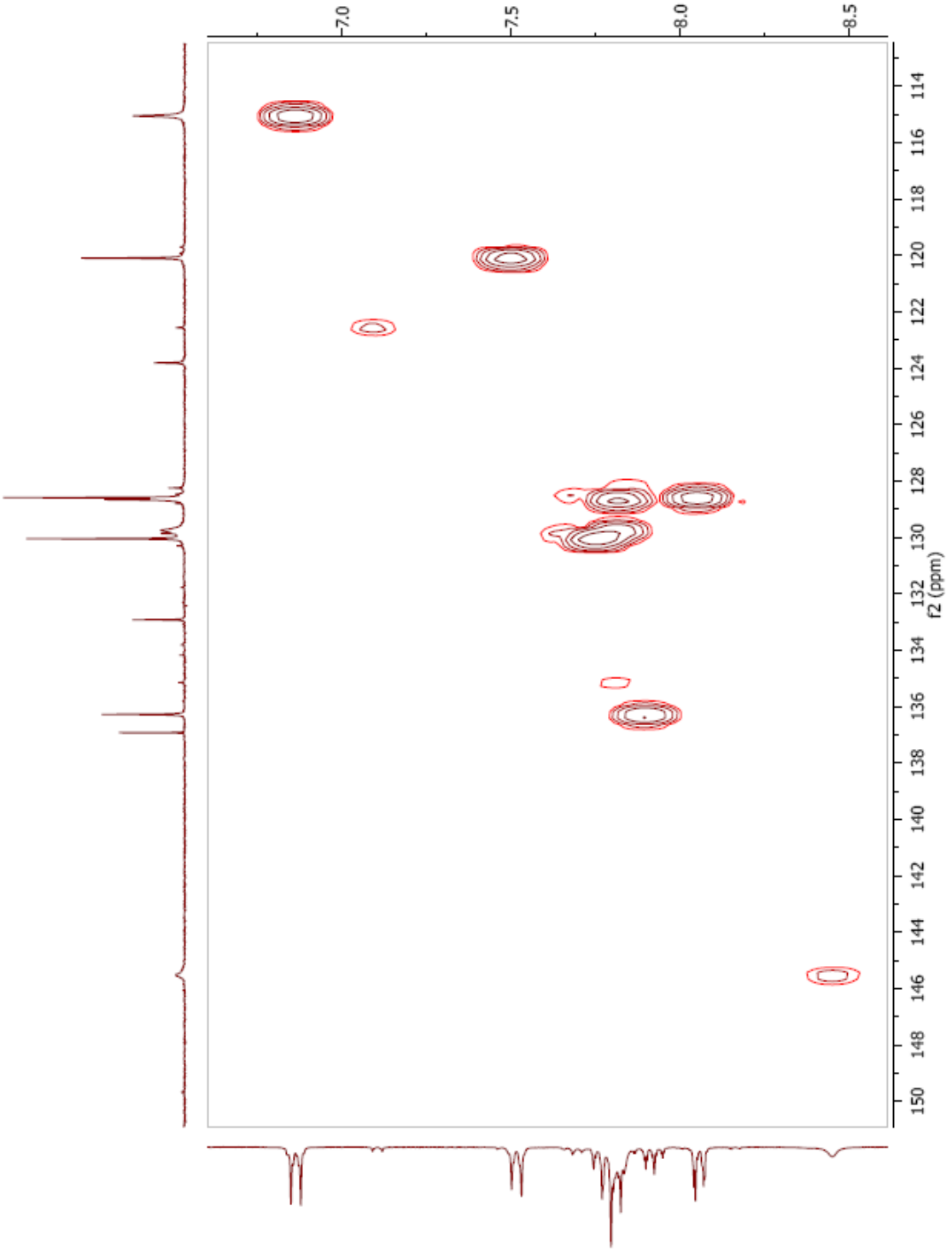


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR de *N*-acilhidrazona **49**

ANEXO 66

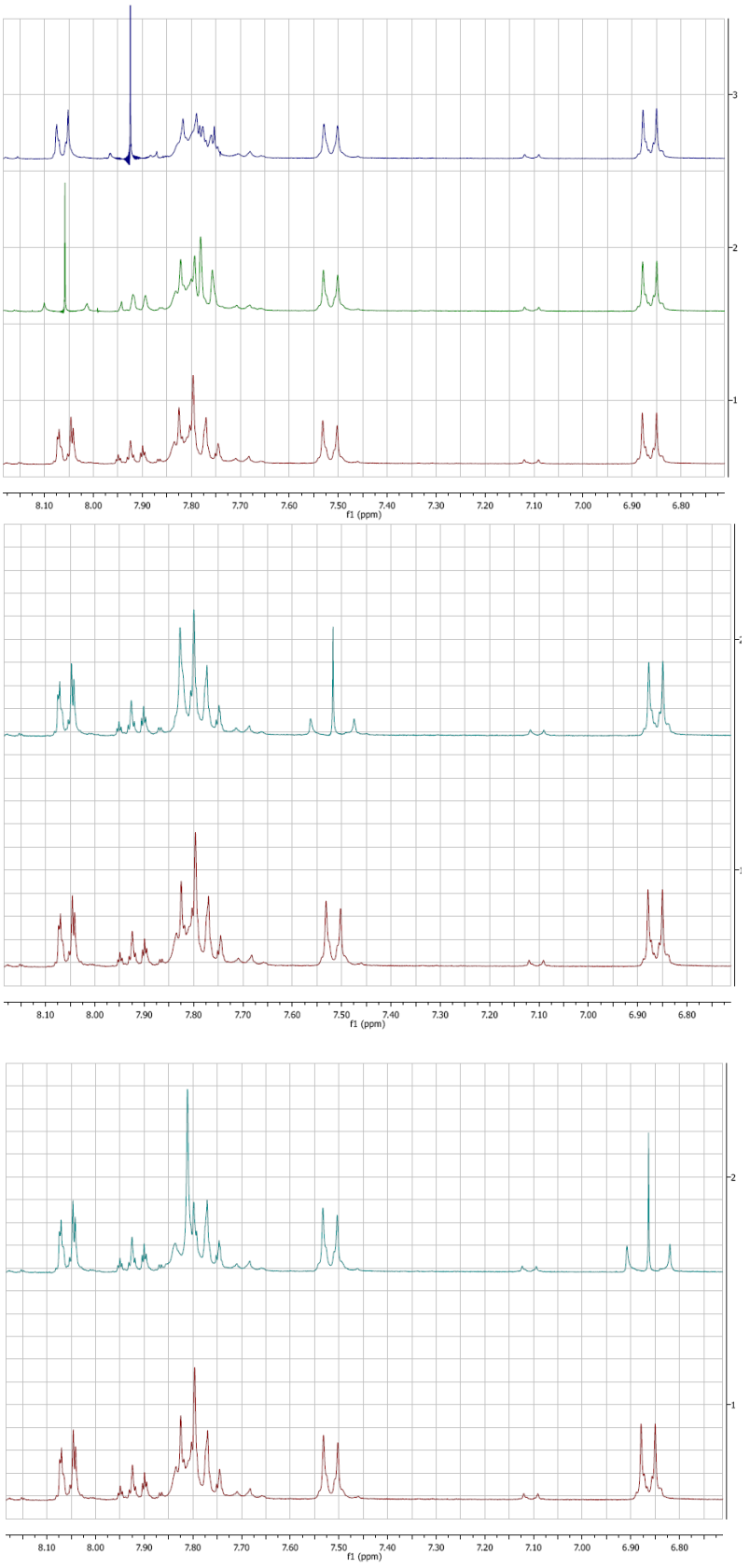


Figura: Espectros de HOMODEC de *N*-acilhidrazona **49**

ANEXO 67

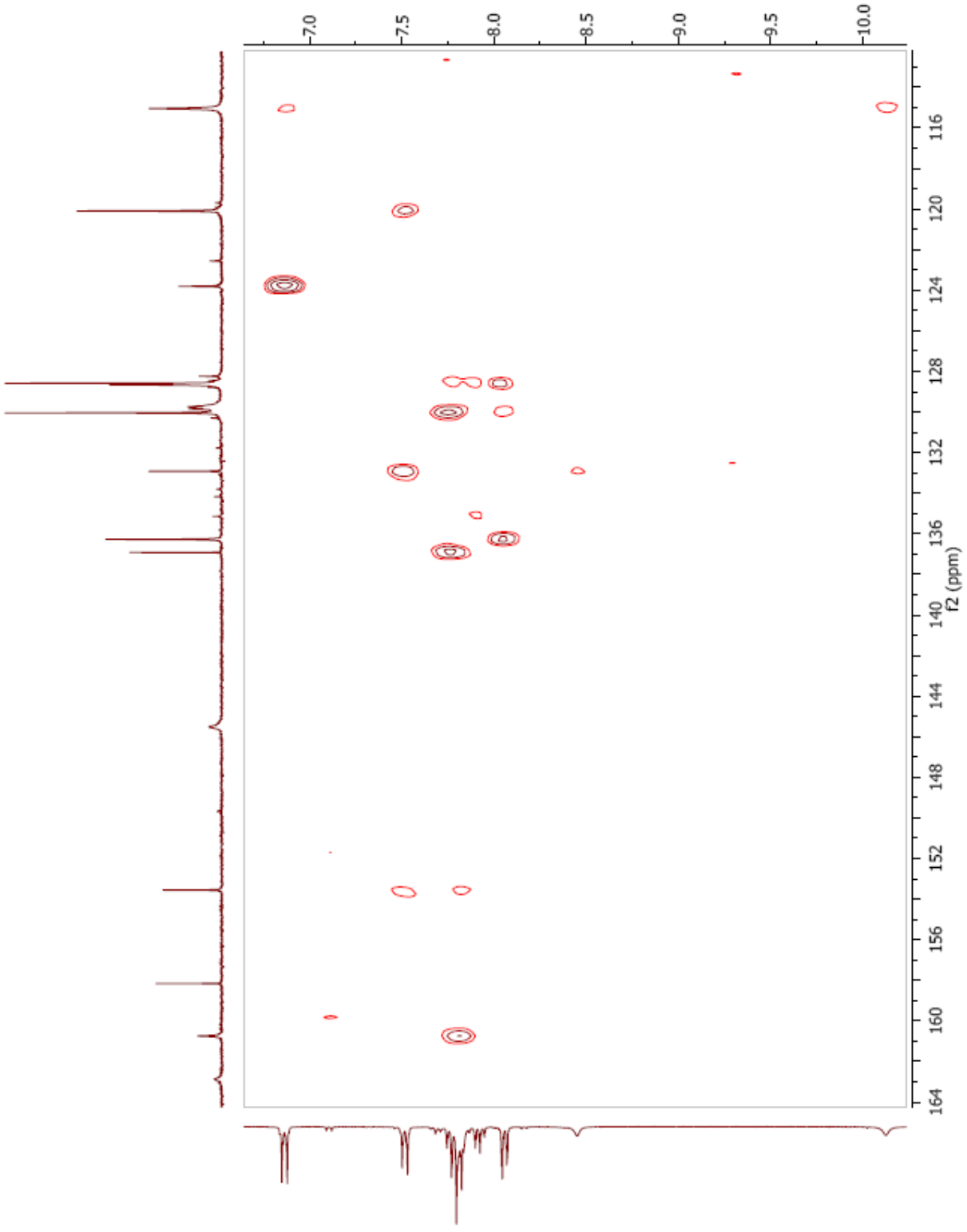


Figura: Correlações do mapa de contornos HETCOR-LR de *N*-acilhidrazona **49**

Anexo 68

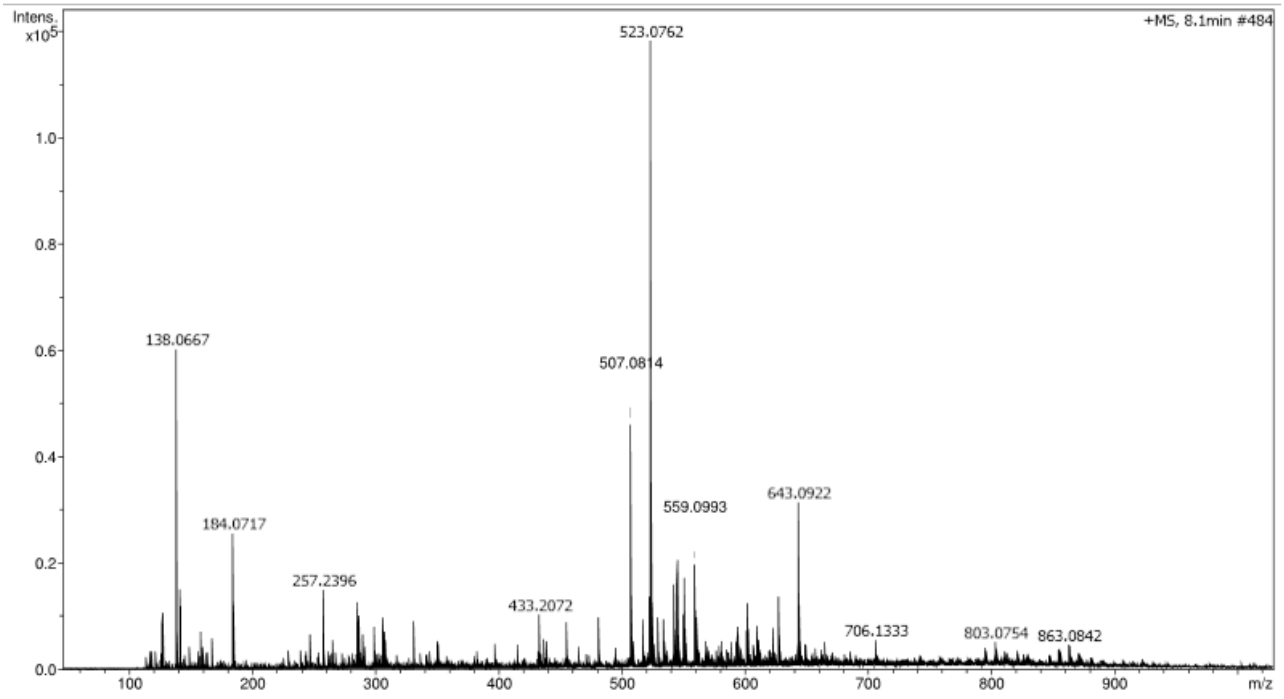


Figura: Espectro de massas do composto híbrido **51**

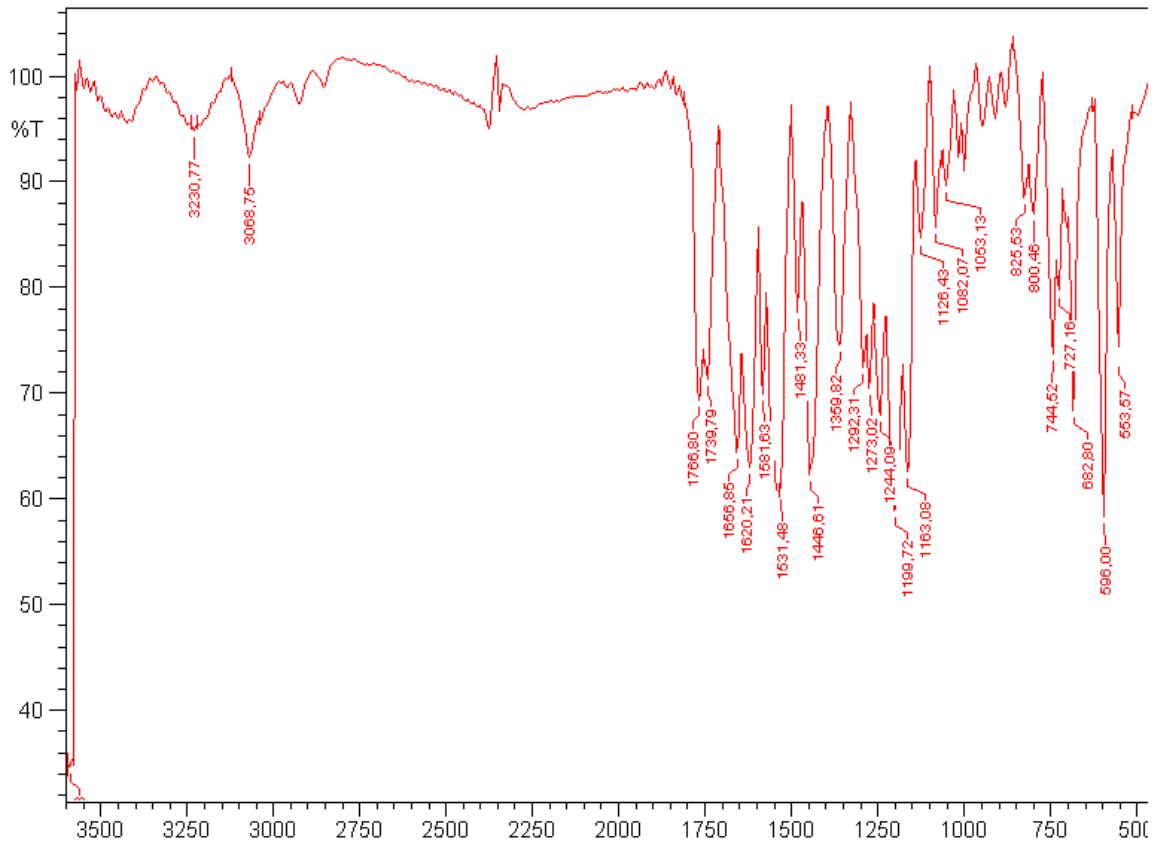


Figura: Espectro de IV do composto híbrido **51**

Anexo 69

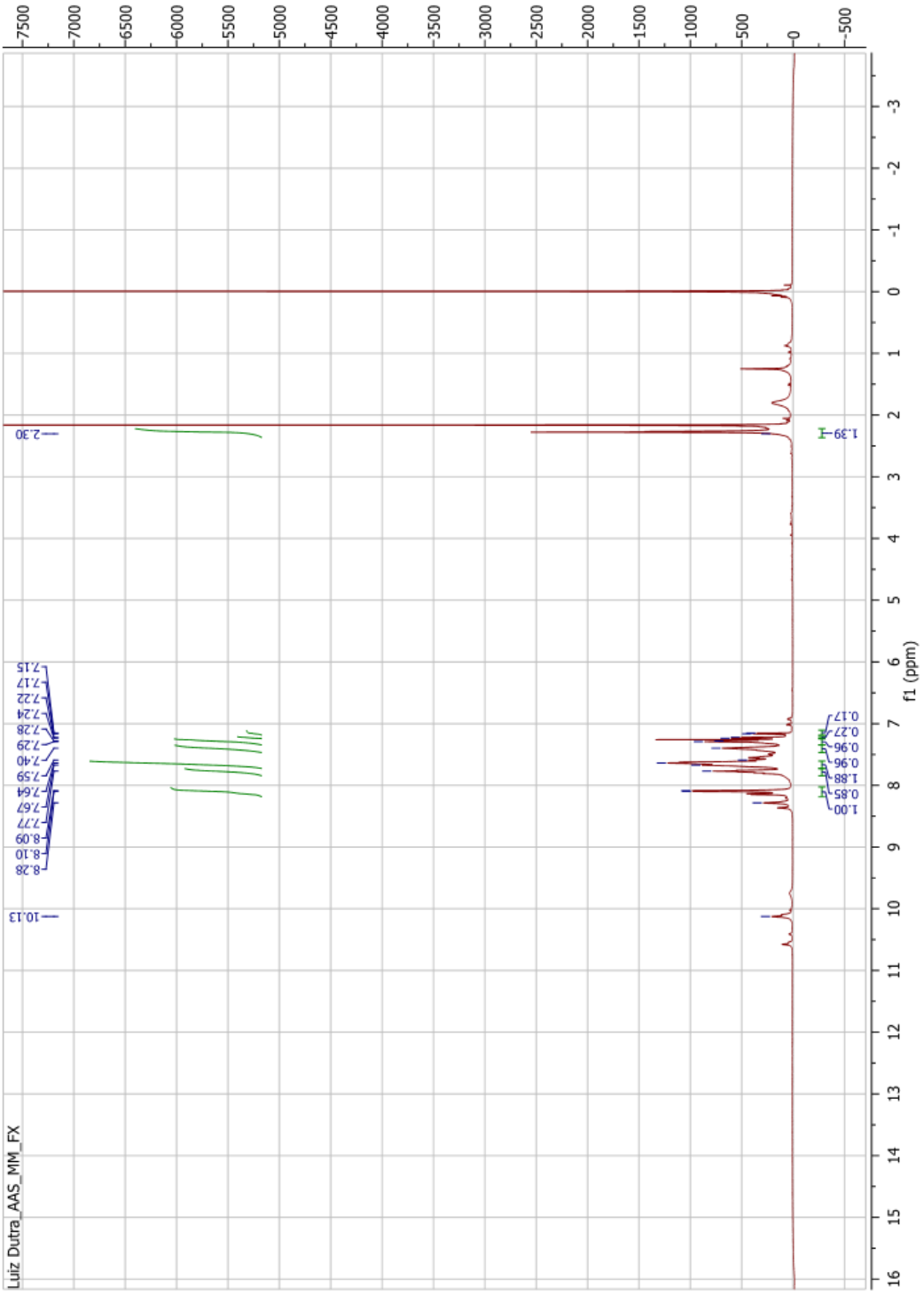


Figura: Espectro de RMN de 1H do composto híbrido **51** ($CDCl_3$)

Anexo 70

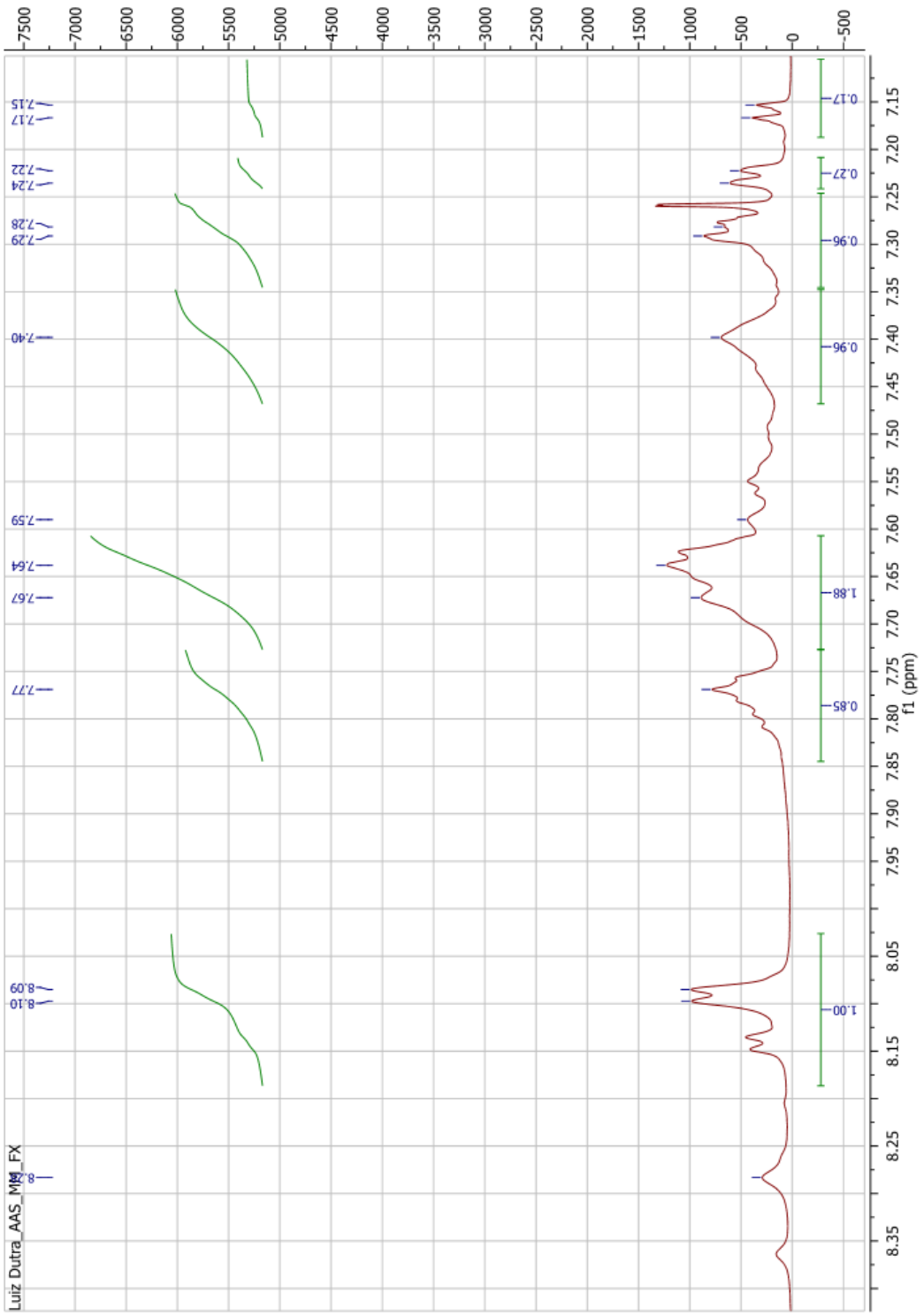


Figura: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H do composto híbrido **51** ($CDCl_3$)

Anexo 71

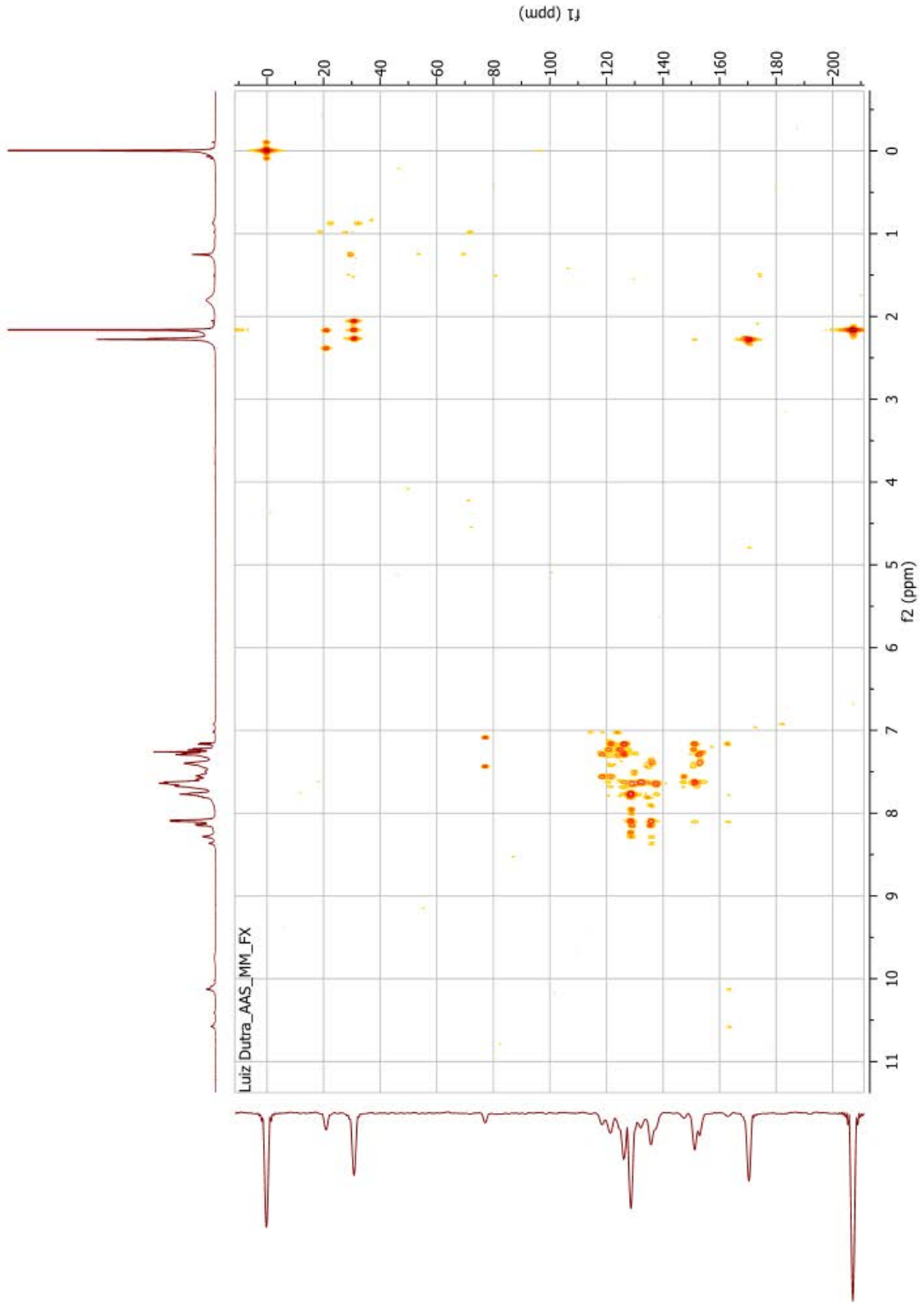


Figura: Correlações do mapa de contornos HMBC do composto híbrido **51**

Anexo 72

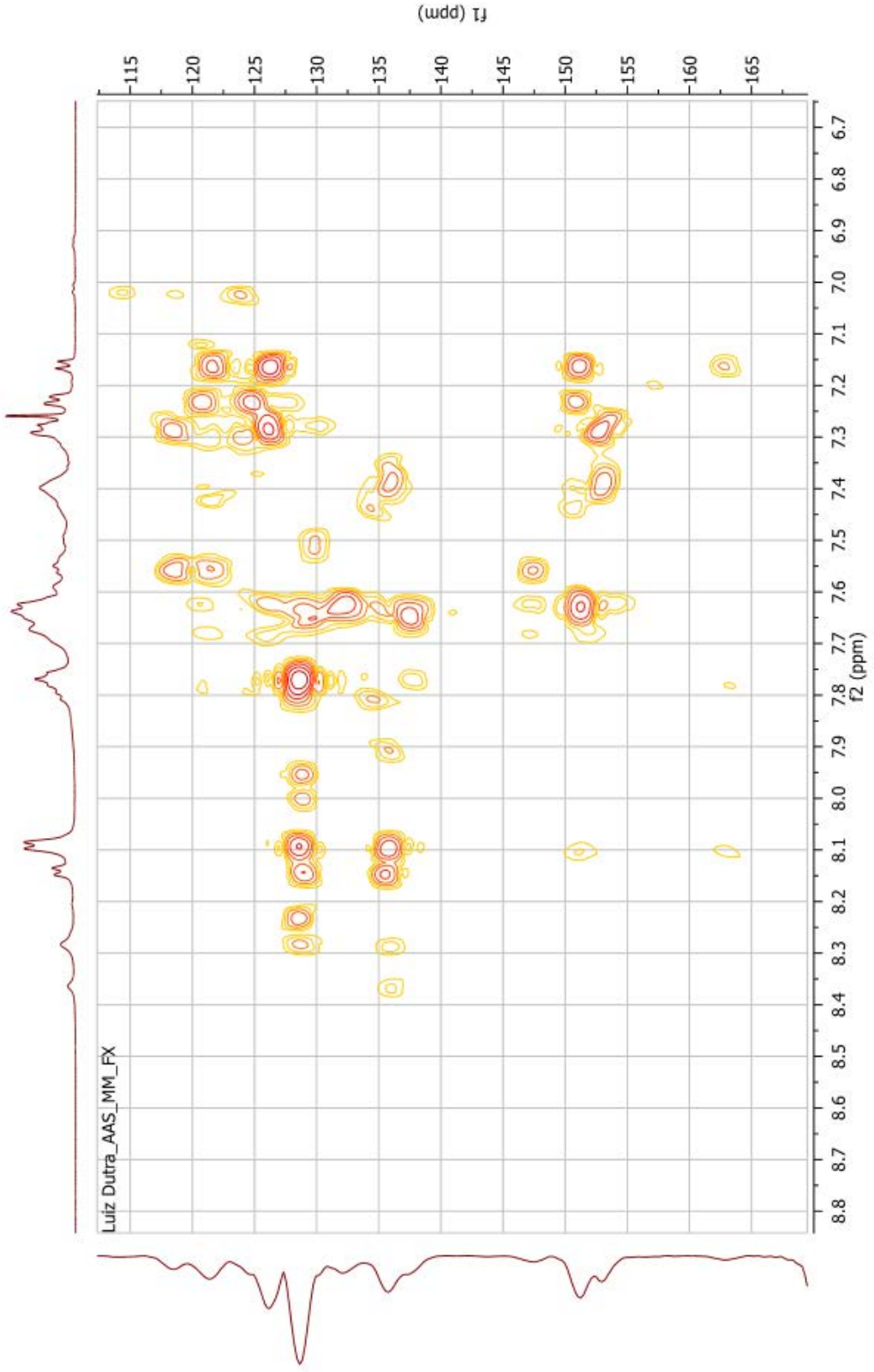


Figura: Ampliação do mapa de contornos HMBC do composto híbrido **51**

Anexo 73

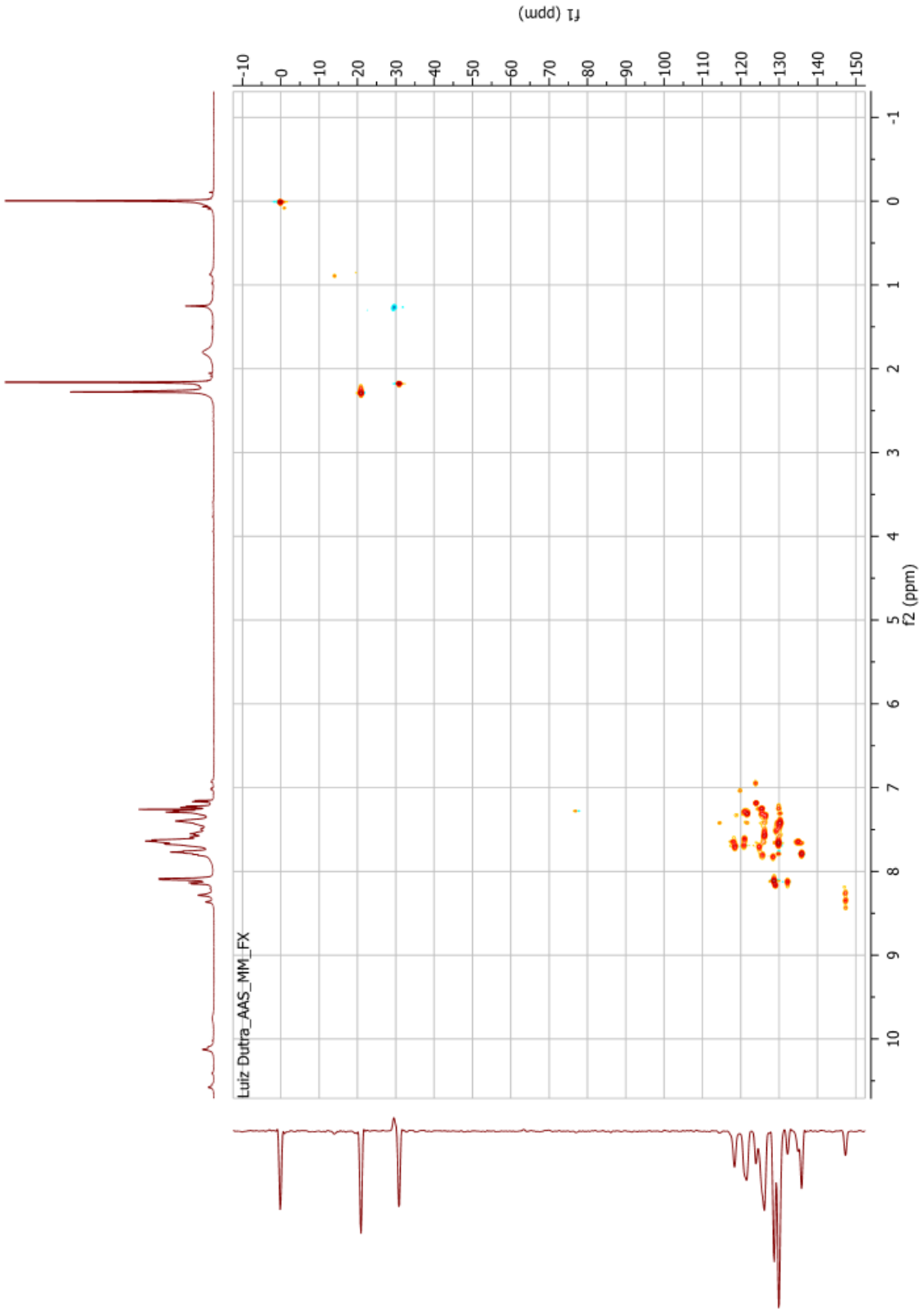


Figura: Correlações do mapa de contornos HSQC do composto híbrido **51**

Anexo 74

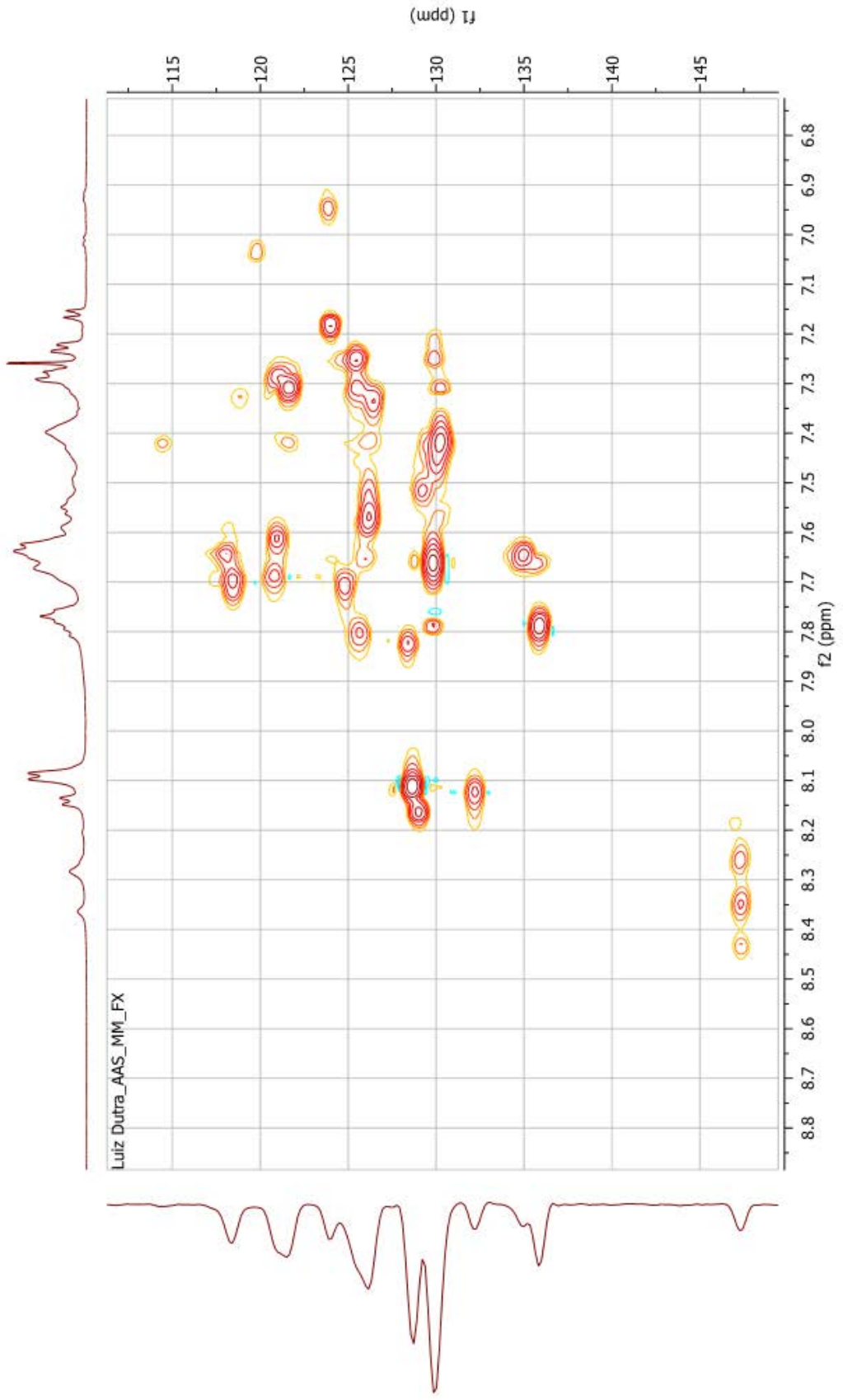


Figura: Ampliação das correlações do mapa de contornos HSQC do composto híbrido **51**

Anexo 75

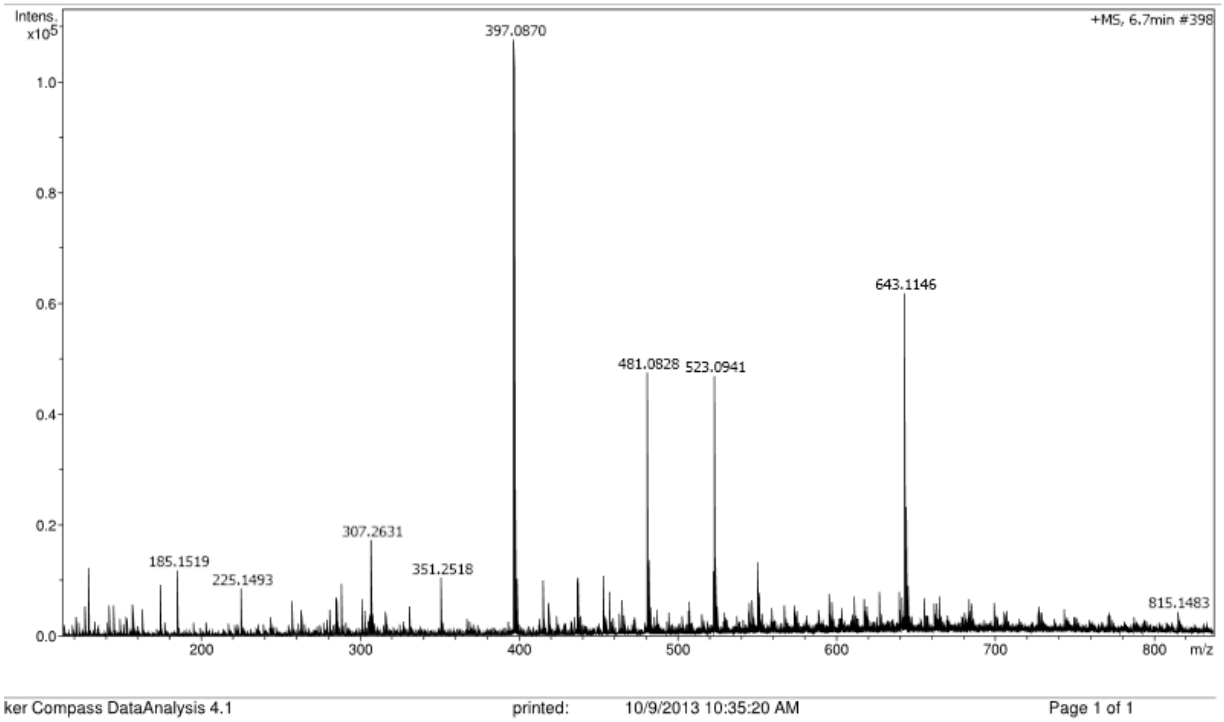


Figura: Espectro de Massas do composto híbrido **52**

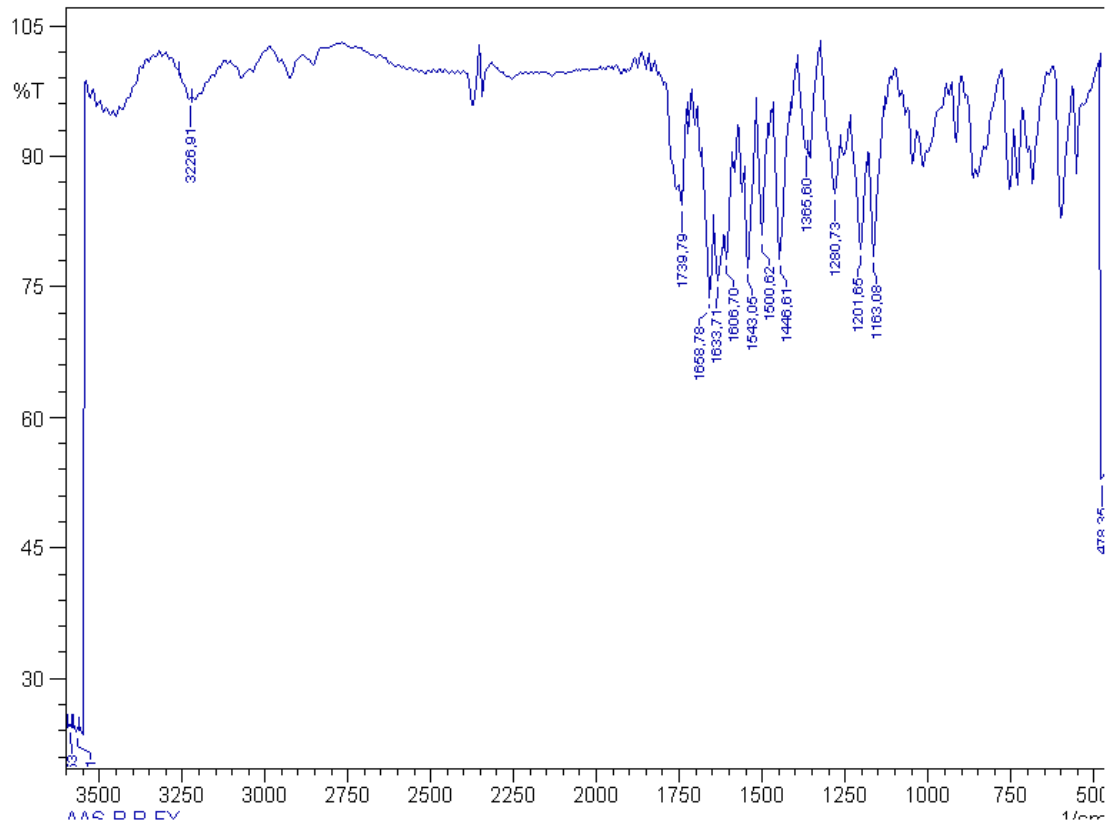


Figura: Espectro de IV do composto híbrido **52**

Anexo 76

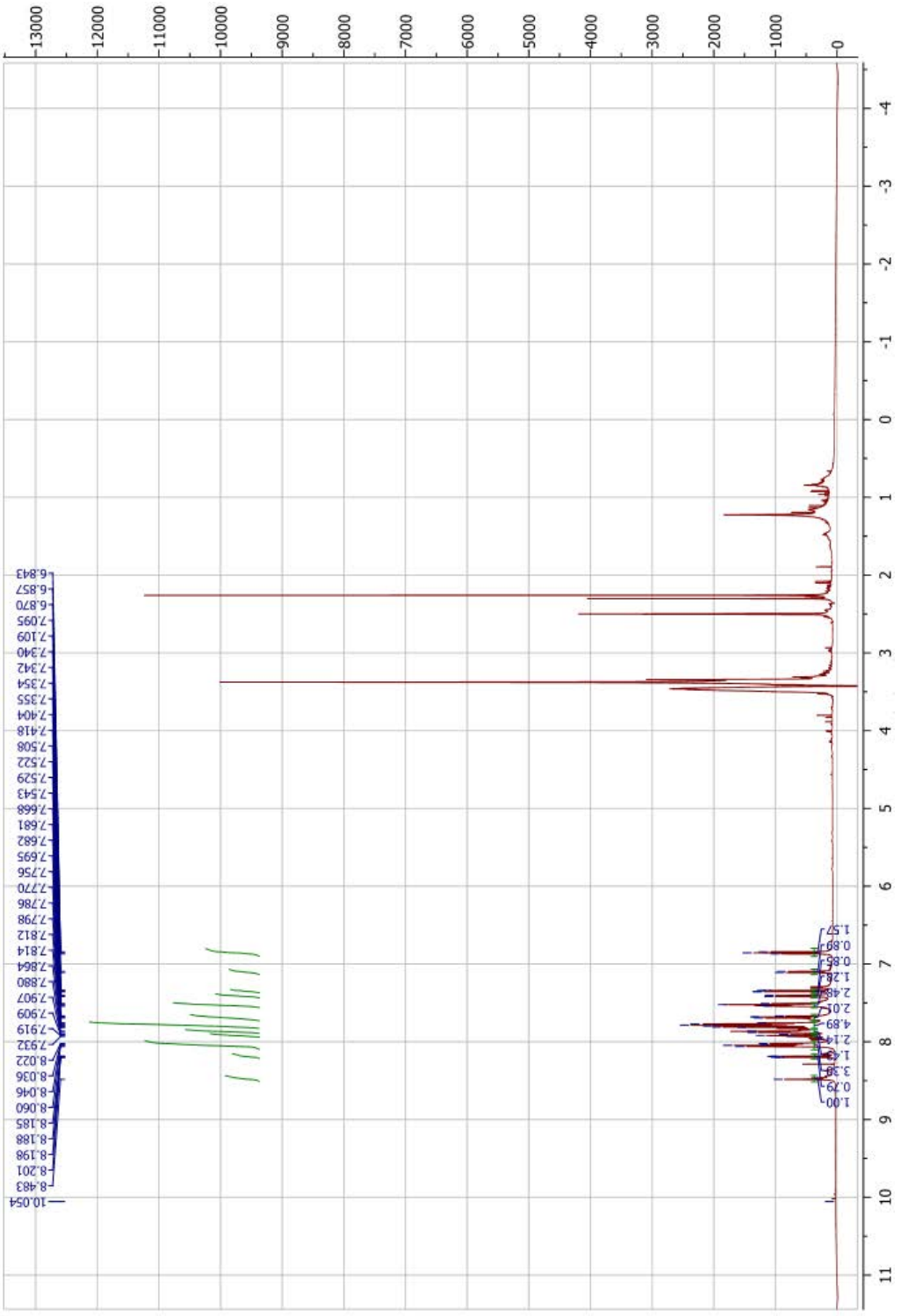


Figura: Espectro de RMN de ^{1}H do composto híbrido **52** (DMSO-d_6)

Anexo 77

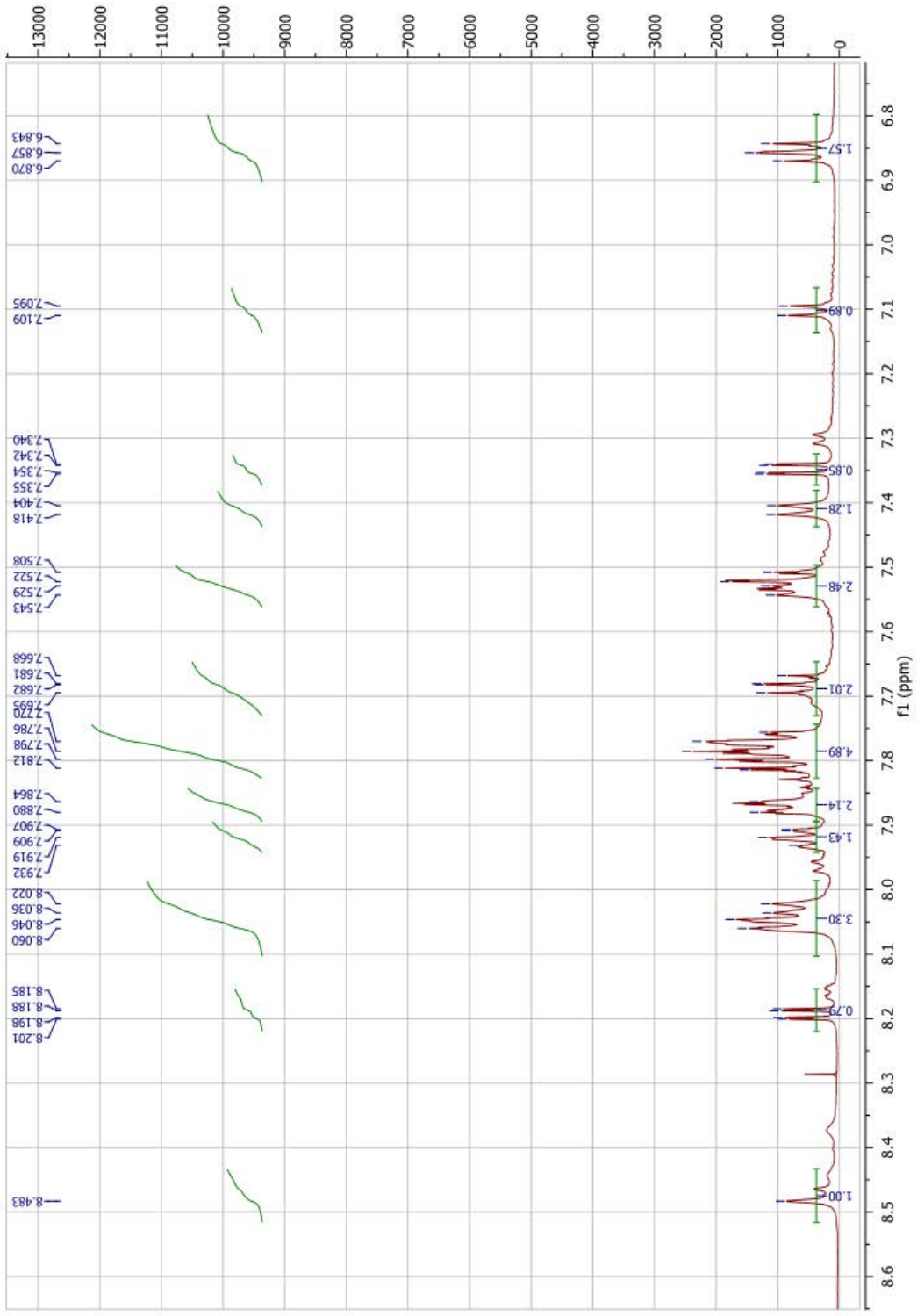


Figura: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H do composto híbrido **52** (DMSO-d_6)

Anexo 78

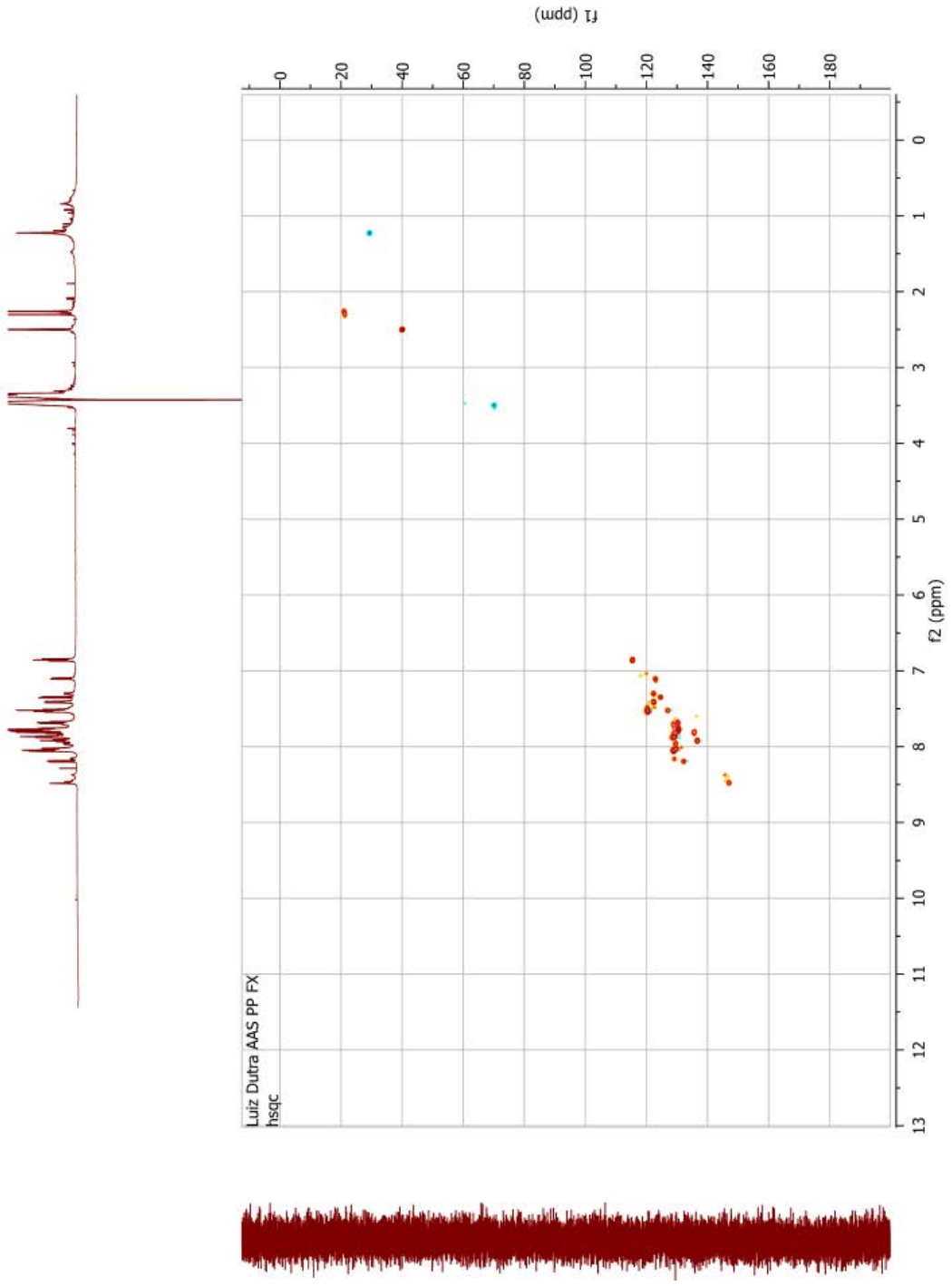


Figura: Correlações do mapa de contornos HSQC do composto híbrido **52** (DMSO-d_6)

Anexo 79

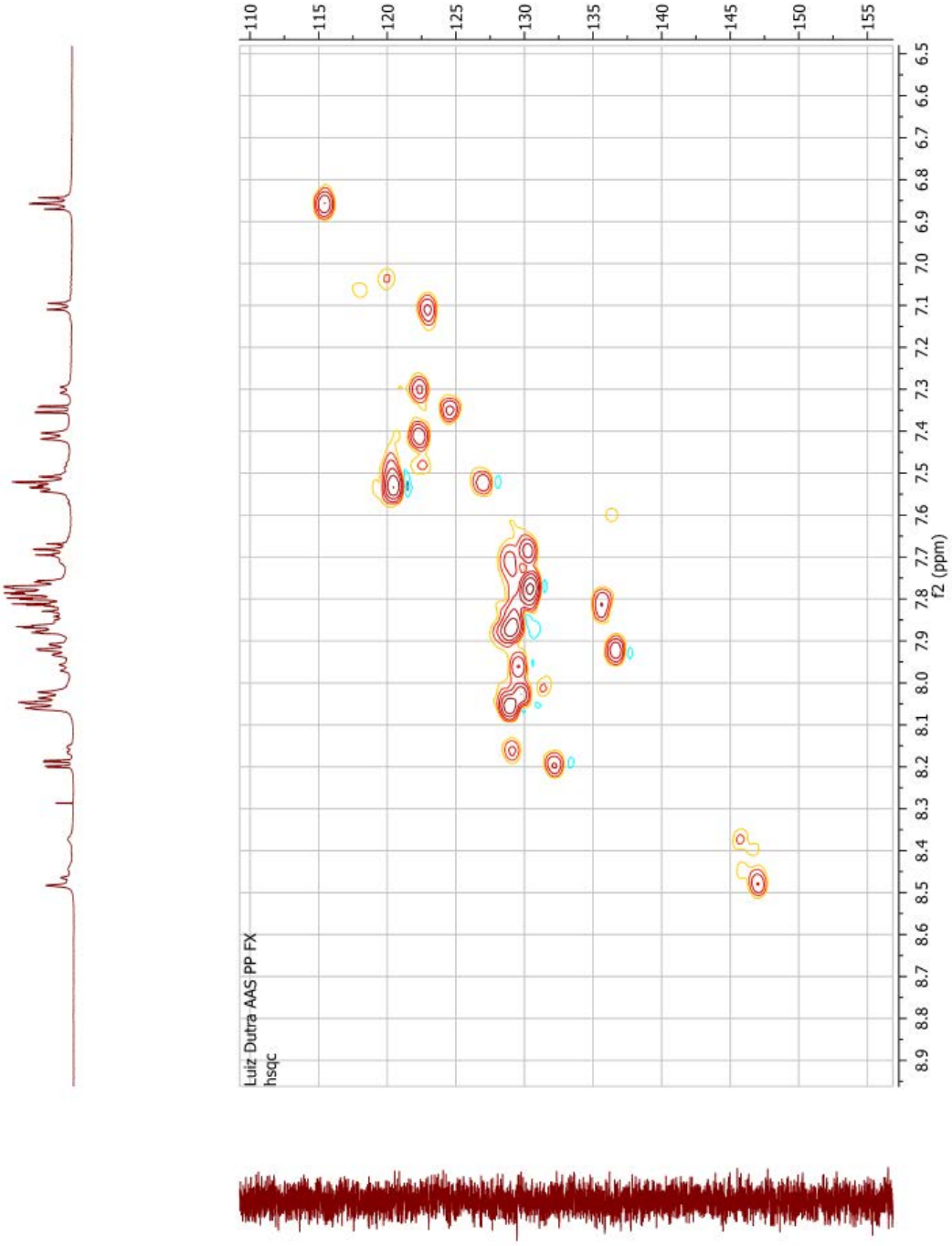


Figura: Ampliação das correlações do mapa de contornos HSQC do composto híbrido **52** (DMSO-d_6)

Anexo 80

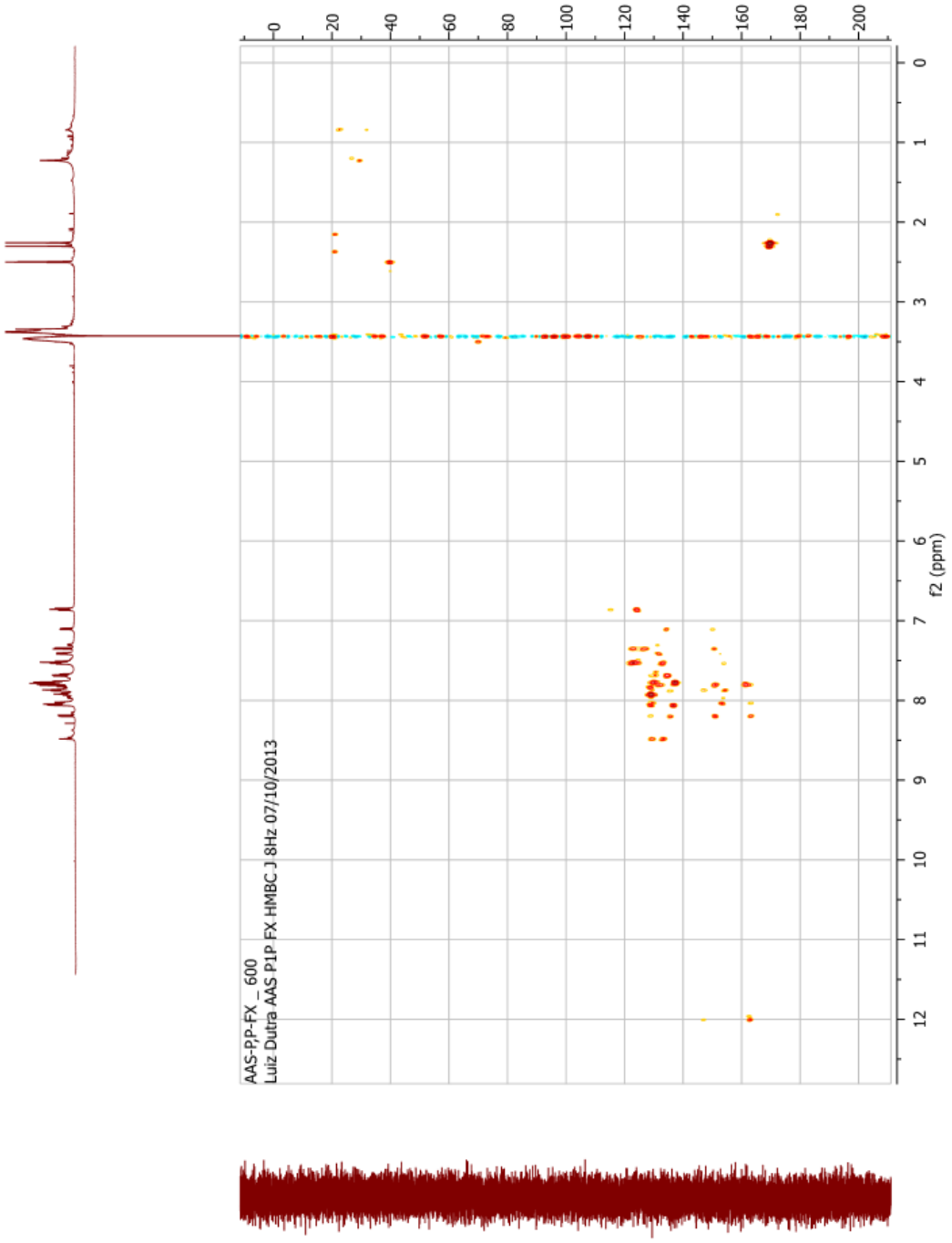


Figura: Correlações do mapa de contornos HMBC do composto híbrido **52** (DMSO-d_6)

Anexo 81

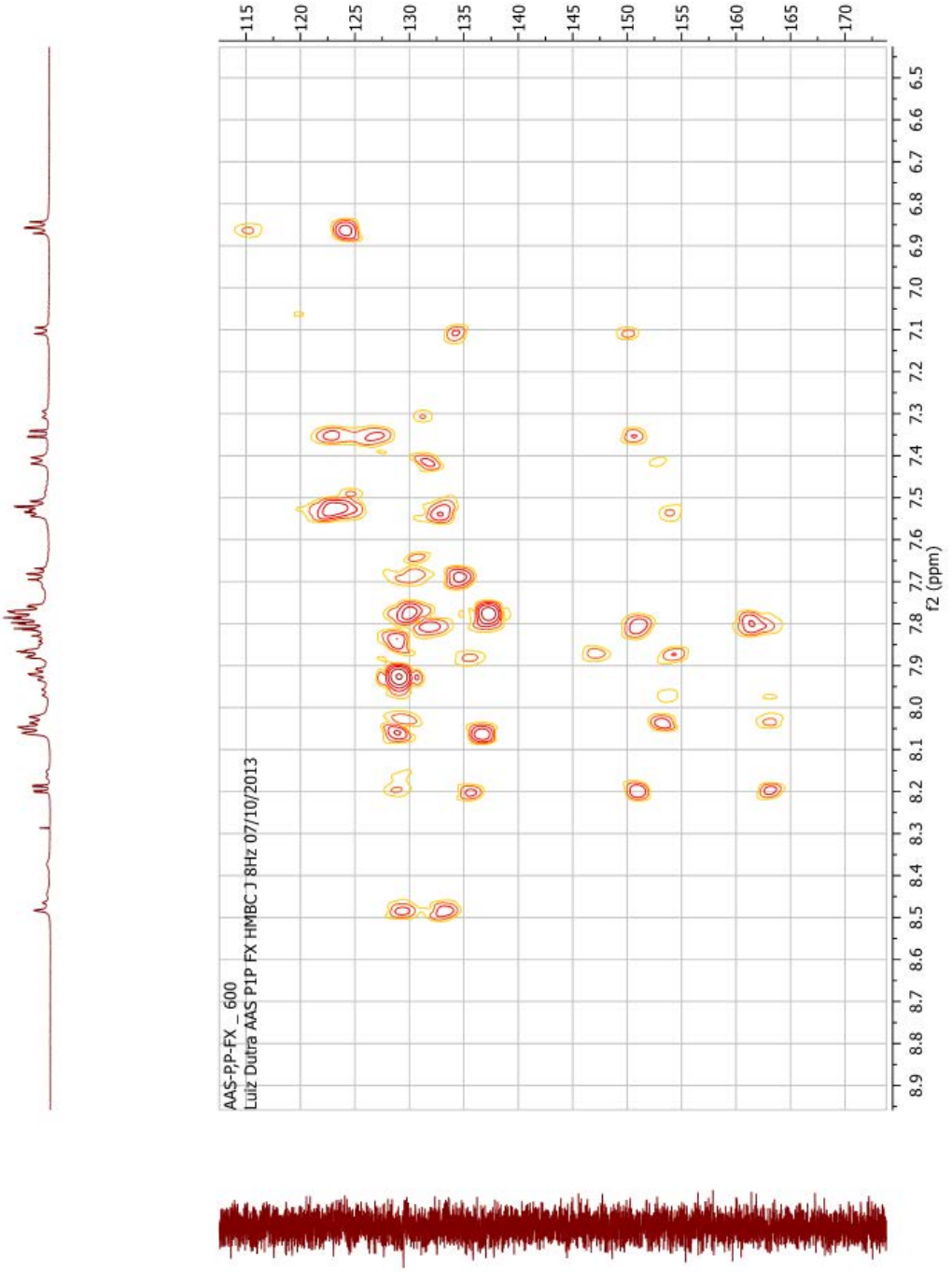


Figura: Ampliação das correlações do mapa de contornos HMBC do composto híbrido **52** (DMSO-d_6)