

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS
ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDES

MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS ANTI-
INFLAMATÓRIOS ESTEROIDES

MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

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.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

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

Machado, Marcella Gabrielle Mendes
M149s Síntese e avaliação biológica de novos derivados anti-inflamatórios
esteroides / Marcella Gabrielle Mendes Machado. – Araraquara, 2013
122 f.

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

1. Glicocorticoides. 2. Ftalimida. 3. Fator de necrose tumoral alfa. 4.
Hibridação molecular. I. Chung, Man Chin, orient. II. Título.

MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS
ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDES**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Araraquara, 14 de junho de 2013.

Profa. Dra. Chung Man Chin

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara)

(Presidente / Orientadora)

Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara)

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo)

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais: Décio e Eliete

Exemplos de amor, perseverança e fé.

Ao amigo Rosenício Eustáquio Nunes (in memoriam)

*Seu incentivo me trouxe à Araraquara,
sua garra será sempre por mim lembrada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por poder viver os meus sonhos. Por mais um caminho árduo, porém vitorioso. Quão insondáveis e perfeitos são os seus caminhos Senhor!

Aos meus pais, Décio e Eliete, pelo apoio em mais uma jornada tão distante de casa.

À minha irmã Priscilla pelo carinho e companheirismo.

À minha avó Celina, pelas infinitas orações.

Ao meu namorado Everton, pelo amor, força e enorme paciência nos momentos de ausência.

À todos os meus familiares e amigos que torceram pela concretização deste trabalho.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Chung Man Chin, pela confiança depositada, pelos incentivos e instruções durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos pela atenção e ensinamentos dispensados em todos os momentos que precisei.

Aos amigos da ABU por tantos momentos agradáveis em meio a correria do dia a dia.

Às minhas queridas amigas Sílvia Cristina e Mariana Galeane, presentes de Deus durante essa pós-graduação.

Aos colegas do Lapdesf: Priscila Bosquesi, Paulo Yamasaki, Rafael Chelucci, Luiz Dutra, Thaís Melo, Juliana Reis, Karina Barbieri, Daniela Hartmann, Diego Chiba, Mateus Scontri, Aylime Castanho, Carla Ferreira e os demais alunos de iniciação científica, pelo aprendizado e convivência. Ednir Vizioli, Rafael e Karina, agradeço também pela contribuição nos ensaios biológicos.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos e a técnica do laboratório Marisa Placeres, pela colaboração no ensaio imunoquímico para detecção de TNF- α .

À Dra. Gisele Alborghetti pela colaboração e disponibilidade nas análises histopatológicas no ensaio de colite ulcerativa.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini pela presença e valiosa contribuição na correção deste trabalho.

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

À toda equipe da seção de Pós-Graduação pela ajuda e valiosas orientações.

À CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*"Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo".*

(Martin Luther King)

Resumo

A inflamação é caracterizada como uma resposta do organismo frente à uma agressão, a qual pode resultar em dor, edema e em alguns casos levar à disfunção do órgão ou tecido. Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de citocinas, pequenas proteínas transcritas e traduzidas pelo metabolismo intrínseco celular, que realizam uma série de comunicações intra e intercelulares. Uma importante citocina é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que atua na manutenção do quadro inflamatório em situações de inflamação crônica, sendo super expressa em diversas doenças inflamatórias. A terapia anti fator de necrose tumoral α (anti-TNF- α) tornou-se uma abordagem interessante no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, principalmente daqueles pacientes que não respondem ao tratamento convencional. Entre os fármacos utilizados no tratamento das doenças inflamatórias crônicas, encontram-se os glicocorticoides (GCs), anti-inflamatórios de natureza esteroide. Estes atuam no processo reacional de defesa do organismo minimizando o dano causado pelo agente infeccioso. Porém o uso prolongado de GCs está associado a diversos efeitos adversos, como osteoporose, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, catarata, entre outros, limitando o uso desses fármacos em terapias prolongadas. Dessa forma, nesse trabalho, buscou-se através da estratégia de hibridação molecular, a síntese de novos derivados anti-inflamatórios esteroides, com propriedades de modulação da citocina TNF- α , a fim de se alcançar um sinergismo de ação útil no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Nesse contexto, foram sintetizados e caracterizados seis compostos, série Lapdesf GL-FT, derivados dos glicocorticoides prednisolona (compostos I-III) e budesonida (compostos IV-VI), ligados ao grupamento ftalimida, responsável pela inibição da síntese de TNF- α . Os compostos obtidos foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata e colite ulcerativa distal. Os derivados I e IV apresentaram atividade anti-inflamatória aguda superior aos padrões (prednisolona e budesonida, respectivamente) no modelo de edema de pata. O derivado V apresentou atividade similar ao padrão enquanto o composto VI apresentou atividade inferior ao padrão. No ensaio de colite ulcerativa distal, o derivado I mostrou-se superior ao glicocorticoide padrão (prednisolona), com maior diminuição do infiltrado inflamatório nos cólons dos animais e exclusão dos sinais clínicos como sangramento e perda de peso.

Abstract

Inflammation is characterized as a organism response against an aggression, which can result in pain, edema and in some cases lead to organ or tissue dysfunction. During the inflammatory process are released of cytokines, small proteins transcribed and translated by intrinsic cellular metabolism, performing a variety of communication intra and intercellular. An important cytokine is tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which acts in maintaining the inflammatory in situations of chronic inflammation, being over expressed in many inflammatory diseases. Therapy anti-tumor necrosis factor α (anti-TNF- α) has become an interesting approach in the treatment of chronic inflammatory diseases, especially those patients who do not respond to conventional treatment.

Among the drugs used in the treatment of chronic inflammatory diseases are glucocorticoids (GCs), anti-inflammatory steroids. These act in the reactive process of organism defense minimizing the damage caused by the infectious agent. However, prolonged use of GCs is associated with various side effects such as osteoporosis, metabolic syndrome, cardiovascular disease, cataracts, among others, limiting the use of these drugs in prolonged therapies. Thus, in this work, we realized the viability of design and synthesis by molecular hybridization strategy of novel anti-inflammatory steroids with modulating properties of cytokine TNF- α in order to achieve a synergism of action useful in the treatment of diseases chronic inflammatory diseases. In this context, were synthesized and characterized six compounds Lapdesf series GL-FT derived from glucocorticoids prednisolone (compounds I-III) and budesonide (compounds IV-VI), connected to the phthalimide group responsible for inhibition of TNF- α . The obtained compounds were evaluated for anti-inflammatory activity in a model of paw edema and distal ulcerative colitis. Derivatives I and IV showed higher anti-inflammatory activity acute than patterns (prednisolone and budesonide, respectively) in paw edema model. The derivative V showed activity similar to the pattern while compound VI showed lower activity than budesonide. In the distal ulcerative colitis test, derivative I was superior to standard glucocorticoid (prednisolone), with greater reduction in the inflammatory infiltrate in the colon of animals and the exclusion of clinical signs such as bleeding and weight loss.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinais cardinais da inflamação.....	24
Figura 2. Doenças associadas à inflamação crônica	29
Figura 3. Citocinas envolvidas na Artrite Reumatoide	30
Figura 4. Estrutura química da talidomida	34
Figura 5. Crianças vítimas da talidomida.....	35
Figura 6. Estruturas da talidomida e seus análogos lenalidomida e pomalidomida	37
Figura 7. Classificação dos compostos híbridos.....	42
Figura 8. Representação do conceito de pró-fármaco.....	43
Figura 9. Mecanismo de reação para a formação dos intermediários ftalimídicos (1-3).....	60
Figura 10. Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Comparação entre a Carragenina, Composto Padrão (prednisolona) e o Composto I.....	104
Figura 11. Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Budesonida e seus derivados híbridos (Compostos IV, V e VI)	104
Figura 12. Imagem representativa do intestino grosso dos ratos na administração por via oral em doses repetidas (100 µM) dos grupos tratados com o composto I e o padrão prednisolona, do controle negativo e do controle positivo de colite ulcerativa	106
Figura 13. Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de prednisolona, budesonida, composto I e composto IV	108
Figura 14. Produção de TNF- α pelos compostos prednisolona, budesonida, composto I e composto IV, em diferentes concentrações	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Citocinas relacionadas ao processo inflamatório	26
Tabela 2: Efeitos colaterais da terapia prolongada de glicocorticoides	32
Tabela 3: Propriedades farmacológicas de alguns glicocorticoides	33
Tabela 4: Comparação com a literatura dos deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H dos intermediários ftalimídicos (2) e (3).....	61
Tabela 5: Rendimentos dos compostos sintetizados.....	72
Tabela 6: Principais deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos VI, V e VI.	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planejamento estrutural dos derivados série Lapdesf GL-FT	21
Esquema 2. Síntese do intermediário ftalimídico (1)	46
Esquema 3. Síntese do intermediário ftalimídico (2)	47
Esquema 4. Síntese do intermediário ftalimídico (3)	47
Esquema 5. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 1 (composto I)	48
Esquema 6. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 2 (composto II).....	49
Esquema 7. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 3 (composto III).....	49
Esquema 8. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 4 (composto IV)	50
Esquema 9. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 5 (composto V).....	51
Esquema 10. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 6 (composto VI).....	52

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (1)	63
Espectro 2. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (1) (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	64
Espectro 3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (1) (RMN ¹³ C; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	64
Espectro 4. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (2)	65
Espectro 5. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	66
Espectro 6. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática	67
Espectro 7. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ¹³ C; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	67
Espectro 8. Espectro no infravermelho do derivado ftalimídico (3)	68
Espectro 9. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (3) (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	69
Espectro 10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (3) (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática	70
Espectro 11. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (3) (RMN ¹³ C; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	70
Espectro 12. Espectro no infravermelho do composto I	74
Espectro 13. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I (RMN ¹ H; 300MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática	75
Espectro 14. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação	76
Espectro 15. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I (RMN ¹³ C; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	77
Espectro 16. Espectro de massas, modo positivo, do composto I	78
Espectro 17. Espectro no infravermelho do composto II	79
Espectro 18. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ¹ H; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática	80

Espectro 19. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	81
Espectro 20. Espectro de massas, modo negativo, do composto II.....	82
Espectro 21. Espectro no infravermelho do composto III.....	83
Espectro 22. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática.....	84
Espectro 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação	85
Espectro 24. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	86
Espectro 25. Espectro de massas, modo negativo, do composto III.....	87
Espectro 26. Espectro no infravermelho do composto IV	88
Espectro 27. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática.....	89
Espectro 28. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação	90
Espectro 29. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	91
Espectro 30. Espectro de massas, modo positivo, do composto IV	92
Espectro 31. Espectro no infravermelho do composto V.....	93
Espectro 32. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática.....	94
Espectro 33. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação	95
Espectro 34. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	96
Espectro 35. Espectro de massas, modo positivo, do composto V.....	97
Espectro 36. Espectro no infravermelho do composto VI	98
Espectro 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação região aromática.....	99
Espectro 38. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) – ampliação	100

Espectro 39. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- <i>d</i> 6)	101
Espectro 40. Espectro de massas, modo positivo, do composto VI	102

ABREVIATURAS

AIEs	Anti-inflamatórios esteroides
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	Dimetilformamida
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
GC	Glicocorticoide
HAc	Ácido acético
HCl	Ácido Clorídrico
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IV	Espectrofotometria na região do infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
MeOH	Metanol
NO	Óxido Nítrico
P.f	Faixa de fusão
P.M.	Peso Molecular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
t.a	Temperatura ambiente
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.1	Objetivos específicos.....	20
3	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	21
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
4.1	O processo inflamatório.....	23
4.1.1	Citocinas Pró-Inflamatórias	25
4.2	Doenças inflamatórias crônicas	28
4.3	Glicocorticoides (GC)	31
4.4	Terapia anti-TNF-alfa.....	33
4.4.1	Talidomida	33
4.4.2	Novas terapias anti-TNF-alfa	38
4.6	A modificação molecular no desenvolvimento de novos fármacos.....	40
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5.1	Materiais	45
5.1.1	Reagentes e Solventes	45
5.2	Métodos	46
5.2.1	Metodologias Sintéticas.....	46
5.2.1.1	Síntese do intermediário ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (1).....	46
5.2.1.2	Síntese do intermediário ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (2).....	47
5.2.1.3	Síntese do intermediário ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (3).....	47

5.2.1.4 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17- dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il) -2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisindolin-2-il) acetato (composto I).....	48
5.2.1.5 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisindolin-2-il) benzoato (composto II)	49
5.2.1.6 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il) -2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisindolin-2-il) benzoato (composto III)	49
5.2.1.7 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12, 12a, 12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisindolin-2-il)acetato (composto IV).....	50
5.2.1.8 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12, 12a,12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (composto V)	51
5.2.1.9 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12, 12a,12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (composto VI).....	52
5.2.2 Métodos Analíticos	53
5.2.2.1 Determinação da faixa de fusão	53
5.2.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.).....	53
5.2.2.3 Espectrofotometria de absorção no infravermelho (I.V.)	53
5.2.2.4 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	53
5.2.2.5 Espectrometria de Massas.....	53
5.2.3 Ensaios Biológicos	54
5.2.3.1 Animais.....	54
5.2.3.2 Atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata)	54
5.2.3.3 Atividade anti-inflamatória crônica (modelo colite ulcerativa distal)	55
5.2.3.3.1Análise histopatológica	55
5.2.3.4 Teste imunoquímico para detecção de TNF-α	56
5.2.3.4.1Obtenção dos macrófagos peritoneais	56
5.2.3.4.2Ensaio de viabilidade celular de macrófagos.....	57
5.2.3.4.3Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais	57

5.2.3.4.4	Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes	58
5.2.3.5	Análise Estatística	59
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
6.1	Síntese e caracterização estrutural	60
6.1.1	Síntese dos Intermediários Ftalimídicos.....	60
6.1.1.1	Caracterização estrutural derivado ftalimídico 1	62
6.1.1.2	Caracterização estrutural derivado ftalimídico 2	65
6.1.1.3	Caracterização estrutural derivado ftalimídico 3	68
6.1.2	Síntese dos compostos finais derivados de prednisolona e budesonida	71
6.1.2.1	Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 1 (composto I).....	74
6.1.2.2	Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 2 (composto II)	79
6.1.2.3	Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 3 (composto III).....	83
6.1.2.4	Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 4 (composto IV).....	88
6.1.2.5	Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 5 (composto V).....	93
6.1.2.6	Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 6 (composto VI).....	98
6.2	Atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata)	103
6.3	Atividade anti-inflamatória crônica (modelo colite ulcerativa distal)	105
6.4	Teste imunoquímico para detecção de TNF- α	107
6.4.1	Ensaio de viabilidade celular de macrófagos.....	107
6.4.2	Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes	108
7	CONCLUSÕES	110
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	ANEXOS.....	117

1 INTRODUÇÃO

A inflamação divide-se em padrões agudos e crônicos, sendo caracterizada por ser uma resposta de proteção do organismo desencadeada por estímulos físicos, químicos e biológicos, e esses podem resultar em dor, edema e levar à disfunção do órgão ou tecido (BRASILEIRO-FILHO, 2009).

A inflamação aguda apresenta uma curta duração, podendo ser de algumas horas ou dias. Ela é caracterizada por fenômenos vasculares e exudativos e por ser não somente uma reação local, mas também uma reação sistêmica, denominada de resposta de fase aguda. O tratamento é realizado por fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (BILATE, 2007).

No processo inflamatório agudo os macrófagos liberam citocinas e estimulam outros mediadores da inflamação com a finalidade de bloquear o estímulo inicial. Caso a inflamação persista, ela pode vir a adquirir um quadro crônico, caracterizada por ocorrências proliferativas em que há formação de fibrose (MONTENEGRO, 1999).

A inflamação crônica pode apresentar duração de semanas, meses ou anos e ocorre em condições de infecção constante, exposição prolongada a substâncias que causam irritação e em respostas autoimunes. O tratamento é composto por anti-inflamatórios esteroides (AIEs) que atuam inibindo toda a cascata do ácido araquidônico, através da fosfolipase A₂ que age de uma forma indireta (OKUYAMA & AIHARA, 1986).

No centro inflamatório crônico, os macrófagos são as células mais presentes e responsáveis pela produção de mediadores quimiotáticos e inflamatórios, além de citocinas como a interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SUZUKI et al., 2008).

A liberação de citocinas é decorrente de uma agressão, com capacidade de serem produzidas por qualquer célula, e tem por objetivo a auto-regulação por células do Sistema Nervoso Central, sistema imunológico e endócrino. Elas são responsáveis por uma série de comunicações intra e intercelulares. A atividade dessas citocinas pró-inflamatórias na inflamação crônica propaga e mantém o quadro inflamatório (BRASILEIRO-FILHO, 2009).

A super expressão da citocina fator de necrose tumoral (TNF- α) está relacionada com o processo inflamatório e, conseqüentemente, com a frequência de diversas patologias, como doenças cardiovasculares (WANG et al., 2009), câncer (AGGARWAL et al., 2009),

Alzheimer, obesidade, disfunção erétil e doenças autoimunes como a artrite reumatoide (FIRESTEIN, 2003).

A regulação da citocina TNF- α corresponde uma nova abordagem para o tratamento de doenças inflamatórias de caráter crônico e também na prevenção da rejeição de transplantes e em outras doenças autoimunes (CANTANHEDA et al., 2007).

A terapia anti-TNF- α disponível, atualmente, são proteínas potencialmente imunogênicas pela própria natureza da substância. Entre os fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e EMEA (European Medicines Agency), encontram-se infliximab, um anticorpo monoclonal quimérico contra TNF- α , Etanercept, uma proteína p75 do receptor TNF conjugado com a região Fc da imunoglobulina humana G (IgG), Adalimumab, um anticorpo monoclonal anti-TNF (CANTANHEDA et al., 2007).

Outro fármaco capaz de modular essa citocina, a talidomida, muito utilizada por gestantes nas décadas de 50 e 60 para o alívio do mal-estar matinal, foi retirada do mercado farmacêutico por causar deformações congênitas em recém-nascidos (LIMA, 2001).

Estudos realizados de relação estrutura X atividade associa a teratogenicidade ao grupamento glutarimida da talidomida. Essa descoberta possibilita o desenvolvimento de novos análogos à talidomida, mais eficazes e desprovidos do efeito teratogênico. Esses mesmos estudos indicam que o farmacóforo responsável pela inibição da citocina TNF- α é a subunidade ftalimídica, sendo assim um grupamento desejável num planejamento de análogos úteis no tratamento de processos inflamatórios crônicos (LIMA, 2001).

Assim, devido suas atividades anti-inflamatória, imunomoduladora e angiogênica aliado à capacidade de modulação da síntese de TNF- α , a talidomida foi reintroduzida na terapêutica anos depois, no tratamento de hanseníase, mieloma múltiplo e síndrome mielodisplástica (BORGES & FROEHLICH, 2003).

Os glicocorticoides (GCs), usados em situações de inflamação crônica, possuem a capacidade de agir desde inflamações causadas por patógenos invasores até em doenças autoimunes e reações de hipersensibilidade. Esses medicamentos também são usados na clínica para impedir a rejeição de transplantes e no tratamento de doenças alérgicas e asma. Possuem como alvos as células que regulam a expressão gênica e consequentemente a biossíntese de proteínas, podendo assim, reduzir a transcrição de uma série de enzimas/proteínas inflamatórias como a ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e algumas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e a IL-8 (SANTOS & CHUNG, 2011).

Sabe-se que os anti-inflamatórios esteroides disponíveis na terapêutica são frequentemente alvos de modificações moleculares afim de obter análogos com perfis farmacocinéticos e/ou farmacotécnico melhorados. Formas mais lipossolúveis são requeridas para a administração intramuscular, proporcionando uma liberação controlada do fármaco e aumentando a sua absorção. Já as formas mais hidrossolúveis, são necessárias em situações de emergência onde a via endovenosa é a melhor e mais rápida escolha (SANTOS & CHUNG, 2011).

Através da estratégia de modificação molecular, aliada ao conhecimento do grupo farmacofórico da molécula, o grupo responsável pela sua atividade, novos análogos podem ser planejados com maior potência, especificidade, melhor perfil de atividade com menor toxicidade, resultando em fármacos mais seguros e ativos (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Assim, o desenvolvimento de compostos derivados de glicocorticoides, com ação anti-inflamatória e imunossupressora conhecida, associado à propriedade de modulação da citocina TNF- α , poderia alcançar um melhor perfil de atividade em situações de doenças inflamatórias crônicas.

2 OBJETIVOS

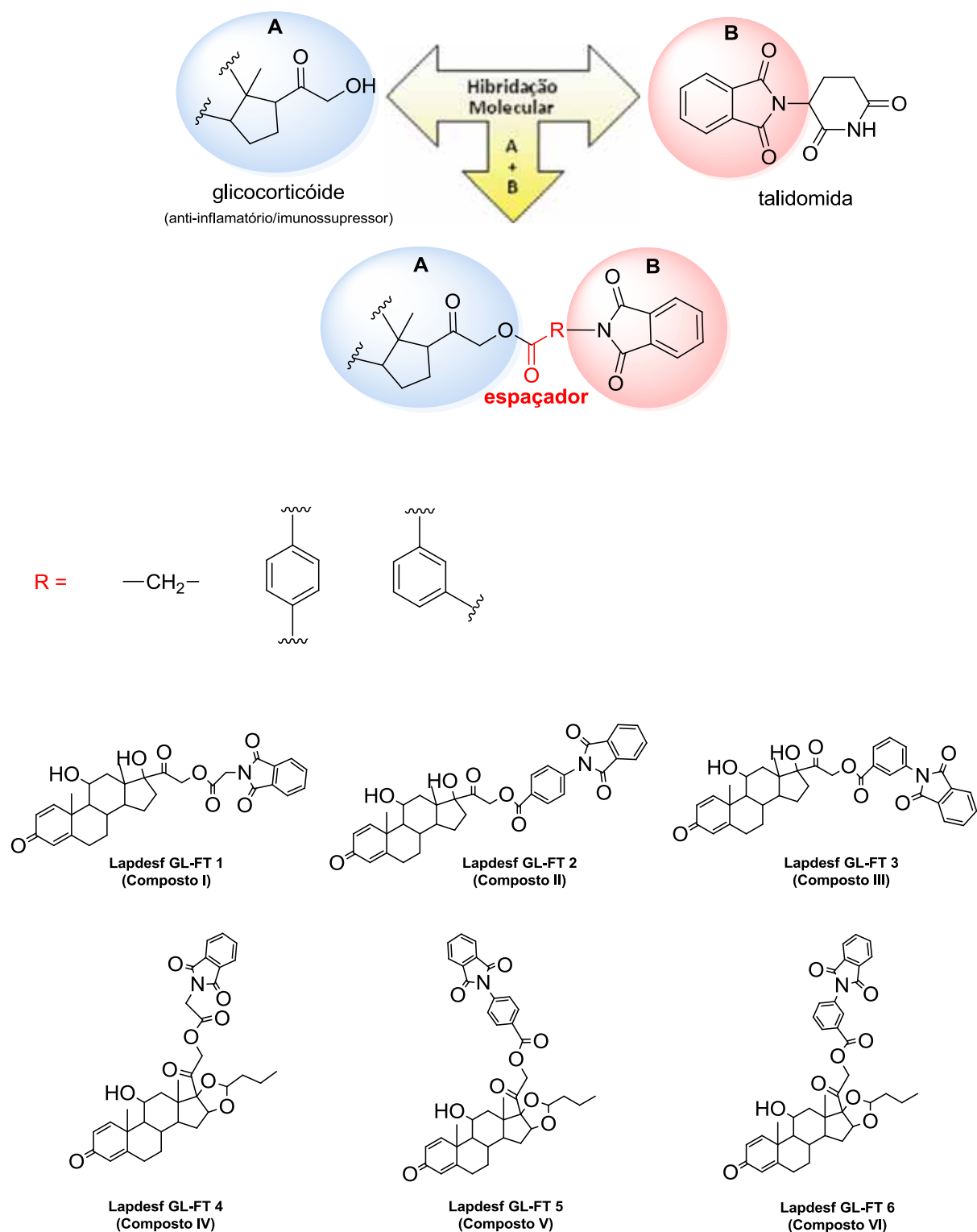
2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa à síntese e avaliação farmacológica de novos derivados anti-inflamatórios esteroides, obtidos pelo processo de hibridação molecular.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar seis compostos derivados anti-inflamatórios esteroides:
 - 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)acetato
 - 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)benzoato
 - 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)benzoato
 - 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)acetato
 - 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)benzoato
 - 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)benzoato
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos em modelo de inflamação aguda e modelo de colite ulcerativa distal;
- Avaliar a capacidade dos compostos em diminuir os níveis de TNF- α em ensaio enzimático por ELISA.

3 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

**Esquema 1.** Planejamento estrutural dos derivados série Lapdesf GL-FT (Compostos I-VI)

O planejamento estrutural utilizou a estratégia de hibridação molecular entre os glicocorticoides (prednisolona e budesonida) e o grupo farmacofórico da talidomida (ftalimida) (Esquema 1).

Os compostos sintetizados são destituídos da atividade teratogênica, uma vez que este efeito secundário é decorrente do anel glutarimida da talidomida, não utilizado nesse planejamento.

Os compostos I-III foram sintetizados baseados em uma patente do nosso grupo de pesquisa, sendo que neste trabalho buscou-se a otimização da síntese desses compostos; já os compostos IV-VI são inéditos (SANTOS & CHUNG, 2011).

A latenciação é a obtenção do fármaco em sua forma inativa (pró-fármaco), o qual libera a porção ativa original no local de ação ou próximo a ele, após uma reação química ou enzimática *in vivo* (CHUNG et al., 2005).

Assim, considerou-se nesse planejamento estrutural os compostos como híbridos, tendo em vista que para classificá-los como pró-fármacos há a necessidade de ensaios que comprovem a necessidade de hidrólise para a atividade biológica.

Os anti-inflamatórios esteroides (AIEs) prednisolona e budesonida, foram selecionados neste trabalho por apresentar as seguintes características: são glicocorticoides de ação intermediária, possuem pequeno efeito mineralocorticoide, apresentam menores efeitos adversos indesejáveis quando comparados a outros fármacos dessa classe terapêutica, possuem adequada solubilidade, são amplamente utilizados na terapêutica.

A prednisolona é um glicocorticoide (GC) utilizado em uma variedade de condições inflamatórias, inclusive como agente antirreumático. A budesonida é usada no tratamento de asma e doenças alérgicas, muitas vezes em associação com outros fármacos (NETO et al., 2010).

Espera-se que os derivados obtidos neste trabalho apresentem uma atividade anti-inflamatória superior aos glicocorticoides padrões, através de uma atividade sinérgica entre o glicocorticoide e o inibidor de TNF- α . Consequentemente, estes seriam úteis no tratamento de doenças inflamatórias crônicas onde há superexpressão da citocina TNF. Além das propriedades imunomodulatórias, que permitiriam seu uso na prevenção e tratamento de rejeição em órgãos transplantados.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação representa uma resposta inicial do hospedeiro em proteger o próprio corpo frente a infecções ou lesões de tecidos deteriorados por agressões que podem ser físicas ou térmicas (YOU-CHANG et al., 2012). A resposta inflamatória consiste em uma complexa cascata de eventos fisiológicos, mas quando esta ocorre de forma exacerbada o efeito pode passar a ser deletério e não de proteção aos tecidos (BILATE, 2007).

Classicamente, a inflamação é dividida em padrões agudos e crônicos, e, independente do agente agressor existem fenômenos comuns a qualquer tipo de inflamação (BRASILEIRO-FILHO, 2009).

A resposta inflamatória aguda é de forma geral, de rápida duração e nela ocorrem reações locais e sistêmicas. Os fenômenos que ocorrem inicialmente na resposta local são: a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Com esse aumento da permeabilidade vascular tem-se uma fase exsudativa, onde há o extravasamento de leucócitos para o local da inflamação (exsudato celular e plasmático), resultando no edema inflamatório (BILATE, 2007).

A fase aguda do processo inflamatório é caracterizada por cinco sinais típicos, conhecidos como “sinais cardinais” (Figura 1). São eles dor, rubor, calor, tumor e perda de função. Esta última pode ser decorrente do tumor gerado em articulações gerando impedimento da movimentação ou devido à dificuldade de atividades provocadas pela própria dor (BRASILEIRO-FILHO, 2009).

Nos estágios iniciais da inflamação ocorre a migração para o local da inflamação predominantemente dos neutrófilos, e com a ampliação do processo inflamatório encontram-se no foco também monócitos e linfócitos (BILATE, 2007).

Uma série de mediadores inflamatórios participam da resposta inflamatória, são exemplos: quimiocinas; enzimas plasmáticas como a bradicinina e fibrinopeptídeos; plasminina; mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos; citocinas (BILATE, 2007).

Quando o sistema imune é incapaz de destruir o agente agressor com sustentação do quadro inflamatório o processo agudo assume um caráter crônico (MONTENEGRO, 1999).

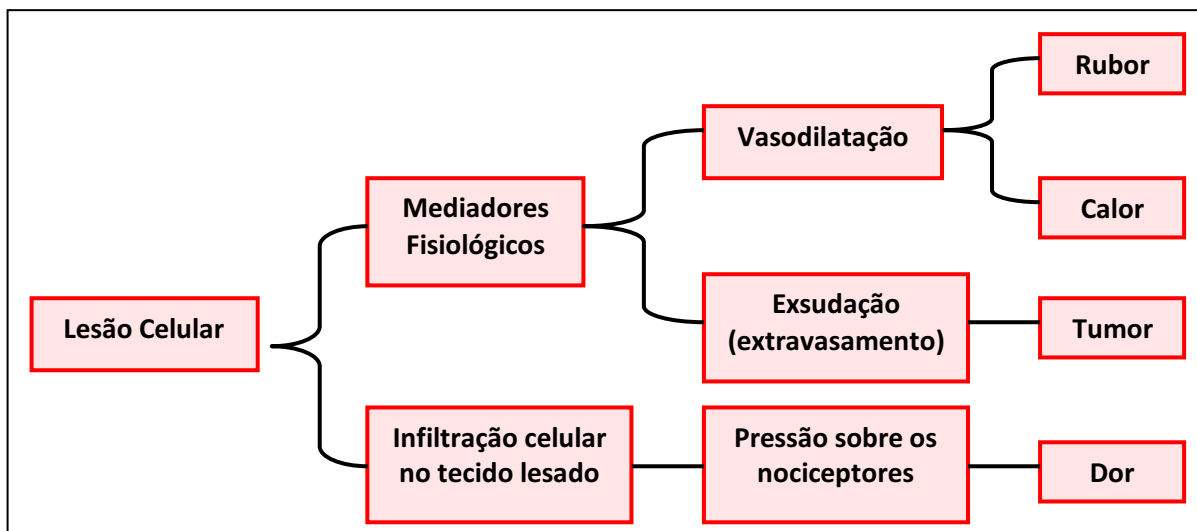


Figura 1. Sinais cardinais da inflamação (adaptado de: www.unirio.br/farmacologia/.../endocrino/corticoide%202011.ppt. Acesso em: 07/01/2013).

A inflamação crônica não apresenta os sinais cardinais da inflamação, caracterizando-se pelo aumento do número de elementos celulares e outros elementos teciduais frente a não eliminação do agente agressor (MONTENEGRO, 1999).

Morfológicamente, são características das inflamações crônicas:

- Infiltração (edema) de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos);
- Destruição de tecidos induzida por células inflamatórias ou pela persistência do agente agressor;
- Formação de fibrose, pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, com observação de angiogênese.

No sítio da inflamação crônica as principais células presentes são os macrófagos, responsáveis pela produção de diversos mediadores fisiológicos, proporcionando assim diferentes possibilidades em relação às intervenções terapêuticas (BARREIRO et al., 2002; BILATE, 2007; SUZUKI et al., 2008).

O papel dos macrófagos no sistema imunológico é o de orquestrar a resposta imune, funcionando como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Em resposta a infecção ou lesão, estes contribuem para a resposta imune inata pela fagocitose do agente infeccioso. As células dendríticas e os macrófagos fazem o reconhecimento do antígeno, processamento e exibição para as células do sistema imune adaptativo (linfócitos) (SUZUKI et al., 2008).

Dentre esses mediadores fisiológicos produzidos pelos macrófagos, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 e o fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α), que atuam na manutenção e propagação do quadro inflamatório durante um processo crônico (COSTA-PINTO & PALERMO-NETO, 2010; SUZUKI et al., 2008).

4.1.1 Citocinas Pró-Inflamatórias

As citocinas são pequenas proteínas, de baixo peso molecular, solúveis, que são transcritas e traduzidas pelo metabolismo intrínseco celular, secretadas principalmente por leucócitos, em resposta a estímulos antigênicos, atuando como mensageiros do sistema imune para autorregulação por células do Sistema Nervoso Central, sistema imunológico e endócrino (BRASILEIRO-FILHO, 2009; VIANNA et al, 2011).

Uma grande diversidade de tipos celulares são capazes de secretar citocinas, e uma mesma citocina é possível de ser produzida por mais de um tipo celular, porém destacam-se como principais produtores os macrófagos, as células dendríticas e as células T (BILATE, 2007). Essas proteínas agem no mesmo local onde são secretadas (ação autócrina), em células próximas (ação parácrina) ou à distância (ação endócrina), através de sua secreção para a corrente sanguínea (KRAYCHETE et al, 2006).

De acordo com o tipo celular responsável pela síntese e/ou os mecanismos de ação, as citocinas recebem nomeações específicas. Como exemplo, tem-se as monocinas, são aquelas citocinas sintetizadas em sua maioria por fagócitos mononucleares. As linfocinas são produzidas principalmente por linfócitos e as citocinas que agem em outros leucócitos são denominadas como interleucinas (IL). Estas últimas se encontram envolvidas na resposta e na apresentação de antígenos, principalmente por linfócitos T auxiliares (VIANNA et al, 2011). Até o momento, mais de 200 citocinas diferentes já foram descritas, estas classificadas nas famílias de hematopoietinas, interferons, quimiocinas e TNF (BILATE, 2007).

Fisiologicamente, as citocinas agem ativando a resposta imune celular e humoral, na regulação da hematopoiese (hematopoietinas) e no controle da proliferação e na diferenciação celular. Assim, funcionalmente as citocinas são divididas em três categorias: mediadoras e reguladoras da imunidade inata, mediadoras e reguladoras da imunidade adaptativa e estimuladoras da hematopoiese (BILATE, 2007).

Na Tabela 1 estão descritas as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório e suas principais funções.

Tabela 1. Citocinas relacionadas ao processo inflamatório

Citocinas relacionadas ao processo inflamatório			
<i>Citocina</i>	<i>Células produtoras</i>	<i>Alvos e efeitos</i>	<i>Implicação terapêutica</i>
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caquexia; morte celular; ativação de neutrófilos	Anti-TNF- α (Infliximab e Adalimumab) e sTNFR-Fc (Etanercept), doenças autoimunes (em uso)
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE e diferenciação de células Treg	TGF- β , câncer (ensaio clínico); anti-TGF- β , leishmaniose (modelo experimental)
IFN- α	Macrófagos	Induz resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK	IFNrec, hepatite e câncer (em uso)
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos	Actimmune, doença granulomatosa crônica, osteoporose (em uso)
IL-1	Monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); hipotálamo (febre)	IL1Ra, choque séptico (modelos experimentais); artrite reumatoide (ensaio clínico)
IL-2	Células T	Induz proliferação de células T e B, ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação	Anti-IL2R (anti-TAC), rejeição de transplantes (modelos experimentais)
IL-4	Células Th2, mastócitos	Promove a diferenciação de células Th2 e mudança de classe de anticorpos para IgE.	IL-4, leucemia (ensaio clínico)
IL-5	Células Th2	Promove diferenciação e ativação de eosinófilos	Anti-IL-5, síndrome hipereosinofílica (ensaio clínico)
IL-6	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Fígado (indução de proteínas de fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação de células Treg	IL-6, câncer (ensaio clínico)
IL-10	Macrófagos, células dendríticas, linfócitos Treg	Inibe proliferação de células Th1	IL-10, psoríase e hepatite C (ensaio clínico)
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1	IL-12, linfomas, anti-IL-12, doença de Crohn (ensaios clínicos)
IL-17	Células Th17, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais	Anti-IL-17, doenças autoimunes (modelos experimentais)
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17	Anti-IL-23, encefalomielite autoimune (modelo experimental)

Fonte: adaptado de BILATE, 2007

As citocinas desempenham um importante papel na diferenciação de células T e na ativação dos diferentes subtipos de linfócitos T. A resposta linfocitária do tipo Th1 induz citotoxicidade e resposta inflamatória decorrente da produção das citocinas pró-inflamatórias: IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Na resposta Th2 as citocinas produzidas são as IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , as quais são importantes na produção de anticorpos (BILATE, 2007).

Nas doenças inflamatórias, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) respondem à agressão tissular estimulando respostas do organismo como a febre, hiperalgesia, síntese de proteínas pelo fígado, dentre outras, na tentativa de eliminar o agente inflamatório, reduzindo a replicação de patógenos e aumentando a proliferação de células do sistema imune (KRAYCHETE et al, 2006).

Vários trabalhos têm reportado a relação da função neuroimunológica e nocicepção, sugerindo a participação das IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 na manutenção da dor crônica, principalmente em dor neuropática, sendo o TNF- α o responsável pela ativação diretamente dos transdutores de sinais, receptores e canais em fibras aferentes nociceptivas (COSTA-PINTO & PALERMO-NETO, 2010).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, que tem como principal função fisiológica a estimulação do recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção com a finalidade de se restabelecer a função inicial (mecanismo de reparo e cicatrização) (CHAPARRO et al., 2012; KRAYCHETE et al., 2006; MONTENEGRO, 1999).

Esses eventos são possíveis através das seguintes ações do TNF:

- aumento da expressão de moléculas de adesão nas células do endotélio vascular;
- aumento da secreção de IL-1;
- estimulação da secreção de quimiocinas por macrófagos e por células endoteliais.

Durante o dano neuronal, os receptores de TNF- α tipo 1 (sTNF-R1) estão super expressos, levando à uma liberação de TNF- α de diversas células, inclusive de células Schwann (KRAYCHETE et al, 2006; MONTENEGRO, 1999).

A ação do complexo TNF- α -receptor ocorre através da molécula transdutora de sinal p38 MAPK, elevando a condutividade de canais de sódio dependente de voltagem (KRAYCHETE et al, 2006).

O TNF- α estimula e induz a cascata de ativação de outras citocinas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), além de ativar os genes responsáveis pelo estresse oxidativo que

são responsáveis por amplificar e prolongar a inflamação (ZHOU et al., 2006; KRAYCHETE et al, 2006; MONTENEGRO, 1999).

Além disso, o TNF- α atua sinergicamente induzindo a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B é um fator nuclear (NF) e está presente no citoplasma em sua forma inativa ligado a proteína inibitória I κ B. Vários estímulos são capazes de ativá-lo, a exemplo de neurotransmissores, citocinas, glicocorticoides, irradiação ultravioleta e proteínas neurotóxicas. Possivelmente há a participação de ROS e o aumento de cálcio intracelular na ativação do NF- κ B, independente do estímulo (ZHOU et al., 2006).

Após a fosforilação e degradação do I κ B e uma vez ativado, o NF- κ B se transloca para o núcleo e se liga aos genes junto a região promotora, elevando a expressão do gene alvo. É grande a quantidade de genes que são regulados pelo NF- κ B, os quais participam de vários procedimentos celulares, como os envolvidos na produção de enzimas (como a óxido nítrico sintase e a superóxido dismutase), citocinas, moléculas de superfície celular e até mesmo genes virais como os vírus de imunodeficiência humana, importantes no estudo das disfunções causadas pela AIDS. Por outra lado, elevados níveis de TNF- α podem levar a um feedback positivo desencadeando a reativação do NF- κ B (ZHOU et al., 2006).

Uma produção exacerbada de citocinas durante o processo inflamatório resulta, muitas vezes, em efeitos deletérios ao hospedeiro. Isso ocorre em muitas doenças autoimunes, onde um autoantígeno é reconhecido pelos linfócitos T constantemente, estimulando uma produção contínua de citocinas como o TNF- α e o INF- β , mantendo assim o quadro inflamatório e contribuindo para o agravamento dessas doenças (BILATE, 2007).

4.2 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS

Diversas patologias estão associadas a uma inflamação crônica ou são decorrentes do agravamento de outra doença, como pode ser visto na figura 2 (CHUNG, 2012).

A aterosclerose, por exemplo, é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, classificada como a principal causa de doença arterial coronária (DAC) e acidente vascular cerebral (AVC). Há o desenvolvimento da aterosclerose acelerada relacionada à diabetes mellitus e aos processos inflamatórios na doença renal crônica (CASELLA FILHO et al., 2003; DUMMER, et al., 2007).

Inflamações crônicas como asma, doenças autoimunes e sepse afetam milhões de pessoas em todo o mundo e são causas de muitas mortes todos os anos (RHEN &

CIDLOWSKI, 2005).



Figura 2. Doenças associadas à inflamação crônica (CHUNG, 2012).

Dentre as doenças autoimunes, a prevalência é alta em doenças como artrite reumatoide, doença de Crohn, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, psoríase e vitiligo (RHEN & CIDLOWSKI, 2005).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune, caracterizada por ser uma artrite poliarticular, simétrica, que afeta primeiramente pequenas articulações diartrodiais das mãos e dos pés, aumentando a sua gravidade ao envolver outros órgãos (ROY et al., 2012; FIRESTEIN, 2003).

Na AR ocorre a inflamação na membrana sinovial, que é o tecido conjuntivo que envolve as articulações, levando à proliferação tecidual da membrana e o aumento do líquido sinovial, resultando no pannus reumatoide, um tecido de granulação vascular que leva a erosão do tecido articular localizado entre a cartilagem e a sinóvia. (ROY et al., 2012; FIRESTEIN, 2003).

Na propagação do processo inflamatório sinovial ocorre a produção de uma ampla variedade de citocinas de fibroblastos e macrófagos (Figura 3). Entre essas citocinas destacam-se: IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α , fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) além de várias quimiocinas (ROY et al., 2012).

Já as citocinas de células T como a IL-2 e IFN- γ estão presentes em concentrações relativamente baixas comparadas as abundantes concentrações dos produtos de macrófagos e

fibroblastos, indicando que as células T não atuam como força motriz da AR, como pensava-se até o fim de 1980 (ROY et al., 2012).

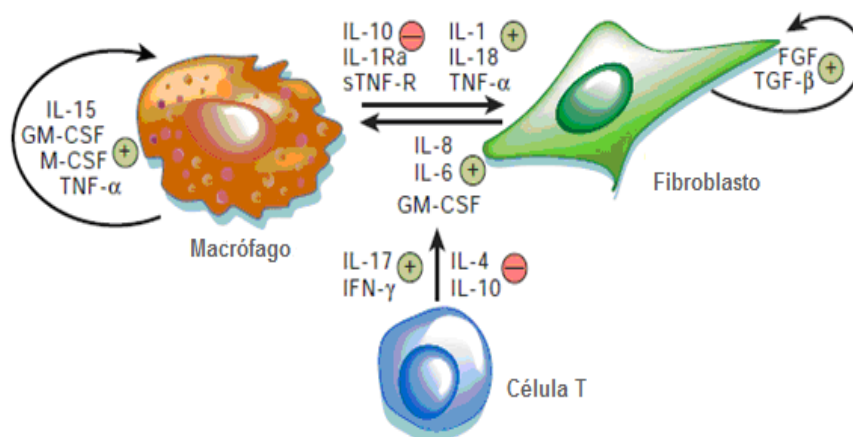


Figura 3. Citocinas envolvidas na Artrite Reumatoide (adaptado de FIRESTEIN, 2003).

As doenças inflamatórias intestinais, que incluem a doença de Crohn e a colite ulcerativa, representam um grupo de doenças crônicas caracterizadas por sangramento retal e diarreia, resultando na ruptura da barreira epitelial e formação de ulceração no epitélio. Essas inflamações, de forma prolongada e crônica no trato gastrointestinal, podem evoluir para um câncer colorretal (LIU & WANG, 2011).

A fisiopatologia e etiologia dessas doenças ainda não foram totalmente elucidadas, mas parece ser multifatorial: desregulação imune subjacente e em alguns casos pode estar associado a mutações genéticas ou são iniciadas por fatores ambientais (KOZUCH & HANAUER, 2008).

Sabe-se que o desequilíbrio na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na mucosa do cólon, desempenham um papel importante no desenvolvimento dessas doenças. A produção excessiva de EROs, induzida pela citocina $\text{TNF-}\alpha$, nas células da mucosa induz respostas inflamatórias que podem, direta ou indiretamente causar dano as células epiteliais intestinais, influenciando assim, na integridade da mucosa ou iniciando uma cascata de sinalização inflamatória que pode levar a insuficiência grave em situações de colite (ZHOU et al., 2006).

Estudos também demonstraram que a típica produção de óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante no controle da lesão tecidual. No entanto, elevados níveis de NO produzidos após o aumento da regulação da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) nas

células epiteliais tem sido associado às doenças inflamatórias intestinais (LIU & WANG, 2011; COOKE & DAVIDGE, 2002).

As terapias de doenças inflamatórias intestinais em sua maioria incluem medicamentos anti-inflamatórios, tais como glicocorticoides e o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA ou mesalamina) ou imunossupressores (azatioprina, mercaptopurina e ciclosporina). Mesmo com os progressos obtidos no desenvolvimento de novos fármacos, ainda não há terapias adequadas e eficazes para estas patologias crônicas, visto que a toxicidade é um fator limitante já que os medicamentos utilizados possuem efeitos colaterais graves e elevadas taxas de reaparecimento da doença com sintomas mais fortes e preocupantes (LIU & WANG, 2011).

4.3 GLICOCORTICOIDES (GC)

O tratamento das doenças inflamatórias é realizado pelo uso de anti-inflamatórios que podem ser de natureza esteroide ou não. Estes atuam no processo reacional de defesa do organismo minimizando o dano pelo agente infeccioso (SANTOS & CHUNG, 2011).

Os anti-inflamatórios esteroides (AIEs), comumente conhecidos como glicocorticoides (GCs), são essenciais na terapia de doenças reumáticas e inflamatórias pelos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (SEGURO et al., 2013).

Esses fármacos atuam tanto nas manifestações iniciais quanto nas manifestações da fase crônica da inflamação, agindo sobre os diferentes agentes causadores de reações inflamatórias, sendo patógenos invasores, estímulos químicos ou físicos, e até mesmo quando uma resposta imune é desencadeada inadequadamente, como ocorre nas doenças autoimunes. (BAVARESCO et al., 2005).

Philip Hench e colaboradores foram os primeiros a usar a cortisona terapeuticamente, recebendo em 1950 o prêmio Nobel por essa descoberta de GCs no tratamento da Artrite Reumatoide. Com isso, houve o crescimento do número de compostos sintéticos com atividade glicocorticoide devido sua alta atividade no tratamento de diversas doenças não endócrinas (BIJLSMA et al.; 2003).

GCs possuem um forte efeito sobre o sistema imunitário, atuando na rede de citocinas e enzimas inflamatórias, nas moléculas de adesão, fatores de permeabilidade e na função celular. Os GCs são as mais conhecidas substâncias imunossupressoras (BIJLSMA et al.; 2003).

Os AIEs agem pela ação inibitória da fosfolipase A2, inibindo a produção de prostaglandinas e leucotrienos, através da liberação de um mediador com ação anti-inflamatória, lipocortina-1 (SANTOS & CHUNG, 2011).

No entanto, a terapia com GCs provoca efeitos secundários em curto e longo prazo. Em curto prazo, as reações adversas da administração de glicocorticoides sistêmicos são infecções secundárias, hiperglicemia e uma série de mudanças no humor e comportamento (NIEWOEHNER et al., 1999).

Em longo prazo, os GCs estão associados a várias complicações em diversos órgãos e sistemas (Tabela 2), como osteoporose, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, infecções, osteonecrose, catarata entre outros. Essas propriedades nocivas contraindicam a terapia prolongada de glicocorticoides (SEGURO et al., 2013).

Tabela 2: Efeitos colaterais da terapia prolongada de glicocorticoides

Tecido	Efeitos Colaterais
Glândula adrenal	Atrofia adrenal, Síndrome de Cushing
Sistema cardiovascular	Dislipidemia, hipertensão, trombose, vasculite
Sistema Nervoso Central	Mudanças no comportamento, cognição, memória e humor (psicoses induzidas por glicocorticoides), atrofia cerebral
Trato Gastrointestinal	Hemorragia gastrointestinal, pancreatite, úlcera péptica
Sistema Imunológico	Imunossupressão ampla, ativação de vírus latentes
Pele	Atrofia, cicatrização retardada, eritema, hipertricrose, dermatite perioral, petéquias, acne induzida por glicocorticoides, estrias rubrae distensão, telangiectasia
Sistema músculo-esquelético	Necrose óssea, atrofia muscular, osteoporose, retardo do crescimento longitudinal do osso
Olhos	Catarata, glaucoma
Rins	Aumento de retenção de sódio e excreção de potássio
Sistema Reprodutor	Puberdade atrasada, retardo do crescimento fetal, hipogonadismo

Fonte: Adaptado de RHEN & CIDLOWSKI, 2005.

Os principais fármacos glicocorticoides classificadas pelo tempo de ação são:

De ação curta (≤ 12 horas): cortisona e hidrocortisona;

De ação intermediária (12 a 36 horas): prednisona, prednisolona e metilprednisolona;

De longa duração (36 a 72 horas): dexametasona, betametasona, fludrocortisona.

Os glicocorticoides, prednisona e prednisolona, são classificados como fármacos de ação intermediária com alta atividade com agentes antirreumáticos e antialergênicos. Seus efeitos adversos são menores quando comparado ao fármaco fludrocortisona, além de apresentar uma alta biodisponibilidade (80%), alta porcentagem de ligação a proteínas plasmáticas (90%) e meia vida de cerca de 2-4 horas. Esses fármacos ainda possuem a vantagem de apresentar menor ação mircocorticoide quando comparados a hidrocortisona (SANTOS & CHUNG, 2011).

Na tabela 3 estão descritas algumas propriedades farmacológicas dos principais GCs de acordo com sua classificação de tempo de ação.

Tabela 3: Propriedades farmacológicas de alguns glicocorticoides

Glicocorticoide	Potência Anti-inflamatória	Efeito Mineralocorticoide
Ação Curta		
Cortisona	0,8	0,8
Hidrocortisona	1	1
Ação Intermediária		
Prednisona	4	0,3
Prednisolona	5	0,8
Metilprednisolona	5	0,5
Ação Prolongada		
Dexametasona	30	0
Betametasona	30	0
Fludrocortisona	10	125

Adaptado de: <http://www.uff.br/farmacobiomed/glicocorticoides.pdf>. Acesso em: 9/12/2012.

4.4 TERAPIA ANTI-TNF-ALFA

4.4.1 Talidomida

A talidomida [(±) 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona] é um derivado do ácido glutâmico e estruturalmente possui dois anéis amida com um único centro

quiral (Figura 4). Farmacologicamente é classificada como um agente imunomodulatório (RICHARDSON et al., 2002).

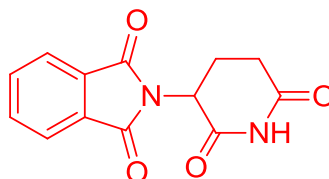


Figura 4. Estrutura química da talidomida (2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona))

Comercialmente, a talidomida é encontrada na forma de mistura racêmica, onde os seus isômeros estão presentes em quantidades equivalentes e possuem diferenças entre si em relação à ação terapêutica e aos efeitos secundários (BORGES & FROEHLICH, 2003).

A separação dos isômeros em sua forma pura não é favorável visto que as formas R e S quando são administradas separadamente sofrem rápida interconversão *in vivo*. Os efeitos teratogênicos são atribuídos ao enantiômero de configuração absoluta S, enquanto o enantiômero R é desprovido desse efeito secundário e é responsável pelos efeitos sedativos que permitiram o seu amplo uso em diversos países (KUMAR et al., 2012).

Em 1957, a talidomida foi lançada no mercado farmacêutico mundial pela empresa alemã *German Company Chemie Grunental*, como um agente hipnótico-sedativo não barbitúrico, para o tratamento de enjôos matinais em gestantes (KUMAR et al., 2012). Sob o nome comercial de Contergan[®] e vendido sem necessidade de prescrição médica, esse fármaco passou a ser utilizado por milhares de pessoas, alcançando o número de 46 países. No Brasil, diversos laboratórios investiram na comercialização desse fármaco, com nomes como: Ectiluram[®], Ondosil[®], Sedalis[®], Sedim[®], Verdil[®] e Slip[®].

Os estudos clínicos realizados naquela época não indicaram a sua toxicidade, sendo que os testes realizados não apresentaram nenhuma taxa de letalidade significativa para evitar a sua comercialização, propondo então que o fármaco era seguro e seria de melhor escolha frente à classe dos barbitúricos (MEIRA et al., 2004).

A partir do ano de 1959, os médicos alemães começaram a mencionar um incremento na incidência de crianças recém-nascidas com malformação congênita. Essas crianças apresentavam, com maior frequência, ausência de alguns ossos das extremidades superiores e inferiores (focomelia) (Figura 5). Essa malformação podia se apresentar de forma mais

severa, ocorrendo amelia, ausência total dos membros (MEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2001).

Houve também relatos de má formação/ausência dos dedos das mãos e pés e deformidades em alguns órgãos como coração e rins. Algumas crianças apresentaram fissura palatina ou labial (MEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2001).

Todos esses casos de teratogenicidade não foram ligados inicialmente a talidomida devido o elevado número de fármacos recém lançados no mercado naquela época, não sabendo-se ao certo qual era o fármaco responsável por esses efeitos secundários.

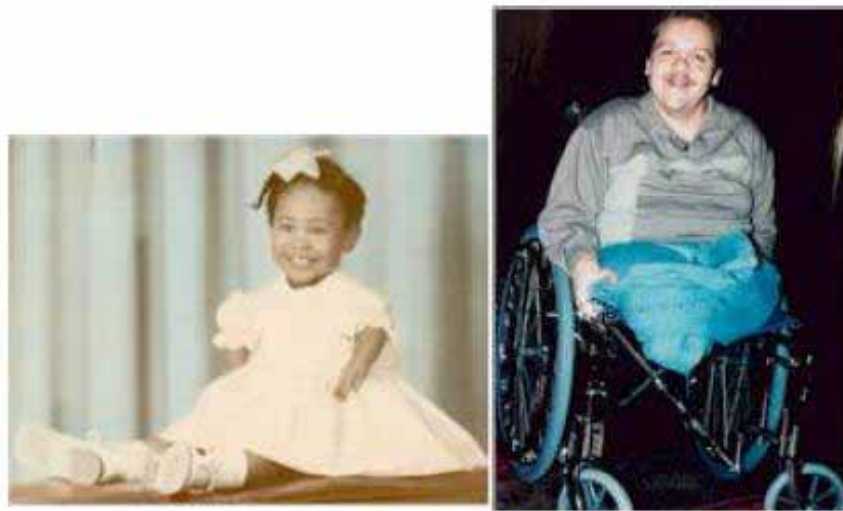


Figura 5. Crianças vítimas da talidomida (retirado de SILVEIRA et al., 2001).

O medicamento só foi retirado do mercado em 1961, após pesquisas realizadas na Alemanha e Inglaterra que relacionaram o uso de talidomida aos casos de deformidades em recém-nascidos. O risco de teratogenicidade era maior quando se fazia o uso do medicamento nos dois primeiros meses de gravidez (KUMAR et al., 2012). Em uma dessas pesquisas, o médico inglês Willian McBride observou que 20% das mulheres grávidas que foram acompanhadas por ele e usaram esse medicamento como antiemético, geraram bebês com deformidades (MEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2001).

No Brasil, relatos de más formações congênicas se iniciaram no ano de 1960, porém a suspensão da venda após a ligação da talidomida a teratogenicidade ocorreu somente no final de 1962, com atraso em relação ao panorama mundial. Isso devido ao uso indiscriminado por consequência da falta de informação, descontrole na distribuição e falta de uma conduta mais enérgica por parte do governo brasileiro (SILVEIRA et al., 2001).

Estima-se que mais de 10 mil crianças em todo o mundo nasceram com malformações decorrentes do uso de talidomida durante a gravidez (KUMAR et al., 2012). Após esse desastre marcante em todo o cenário mundial os governos se alertaram para a necessidade de estudos adequados e rigorosos dos medicamentos anteriormente a sua introdução no mercado (BORGES & FROEHLICH, 2003).

Essa associação da talidomida ao panorama de tragédia é reavaliada quando o médico israelita Jacob Sheskin, em 1965, observa que em seus pacientes leprosos que utilizaram a talidomida como sedativo, ocorreu uma diminuição considerável da dor e do processo inflamatório característico da doença. Dessa forma, passou-se a pensar nesse efeito anti-inflamatório até o momento desconhecido da talidomida (LIMA et al., 2001).

Assim, um medicamento que trouxe tantos problemas mundialmente reaparece em 1965, como um tratamento eficaz para a hanseníase (eritema nodoso leproso (ENL)). Diversos grupos de pesquisas focaram em estudar esse efeito anti-inflamatório sobre os lepromas, assim, em 1991, a Dra. Gilla Kaplan e colaboradores constataram que durante o processo inflamatório dessa doença havia níveis elevados de uma citocina nomeada de fator de necrose tumoral α (TNF- α). E ainda evidenciaram que a talidomida era capaz de inibir essa citocina em situações de super-expressão, relacionando assim a atividade anti-inflamatória com a modulação da citocina TNF- α (LIMA et al., 2001).

A partir da descoberta dessa nova atividade biológica, a Celgene Co., indústria norte-americana, em 1998 consegue junto a FDA a aprovação da talidomida para o seu uso na hanseníase, sendo até hoje uma das principais escolhas terapêuticas para o tratamento dessa doença (LIMA et al., 2001).

Evidentemente, ainda existem questionamentos em relação ao risco-benefício quanto ao uso da talidomida, agora esta é utilizada sob rigorosas diretrizes e com distribuição restrita a fim de evitar a exposição fetal a esse medicamento (RICHARDSON et al., 2002).

Estudos avaliaram a ação dos isômeros isolados da talidomida sobre a modulação do TNF- α e perceberam que não ocorrem diferenças significativas entre a mistura racêmica e os enantiômeros R e S isolados (BORGES & FROEHLICH, 2003).

A eficácia da talidomida no tratamento de várias doenças inflamatórias, inclusive em doenças autoimunes, devido a sua atividade inibidora seletiva do fator de necrose tumoral, TNF- α , tem instigado cada vez mais os pesquisadores para a busca de novos análogos com suas propriedades melhoradas (STEWART et al., 2010). O tratamento visando a inibição dessa citocina proporcionou a sua aplicação em diversas doenças graves a exemplo da artrite

reumatoide, doença de Crohn e diversos tipos de câncer, entre outras que ainda estão em estudo (RICHARDSON et al., 2002).

O número de análogos da talidomida sintetizados nos últimos anos tem crescido consideravelmente, as chamadas drogas (fármacos) imunomodulatórias (IMiDs). Essa busca de análogos similares estruturalmente a talidomida que atuem de forma mais potente na inibição do TNF- α e com propriedades anti-angiogênicas e anti-proliferativas levou a descoberta da lenalidomida (Revlimid) (Figura 6) (CHAULET et al., 2011).

A lenalidomida apresentou benefícios no tratamento de doenças da medula óssea, na síndrome mielodisplásica (SMD) e no tratamento do mieloma múltiplo. É um fármaco com propriedades imunomoduladoras, anti-angiogênicas e anti-neoplásicas, além dos seus efeitos anti-inflamatórios. Assim ela foi o primeiro IMiD testado e aprovado pelo FDA em 2005 para o tratamento das mesmas por ser mais potente que a talidomida e possuir a vantagem de não ser neurotóxica (AVILA et al., 2006).

Pomalidomida é um outro análogo da talidomida, IMiD, com uma elevada potência *in vitro*, desenvolvido com o objetivo de melhorar a eficácia clínica em pacientes com síndromes mielodisplásicas. Apresenta um bom perfil de toxicidade e está atualmente sob investigação clínica (CASTELLI et al., 2012).

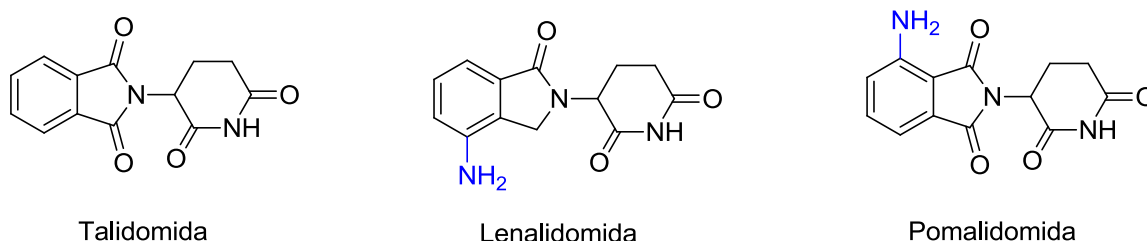


Figura 6. Estruturas da talidomida e seus análogos lenalidomida e pomalidomida

As síndromes mielodisplásicas atingem anualmente 3,3 a cada 100.000 pessoas e são caracterizadas por uma formação ineficaz de elementos do sangue com citopenia progressiva (redução do número de um determinado grupo de células sanguíneas) e possui um alto risco de se transformar em leucemia mieloide aguda (LMA) (CASTELLI et al., 2012).

Já o mieloma múltiplo é caracterizado por uma superprodução das células plasmáticas malignas na medula óssea e afeta principalmente os idosos (CHEN et al., 2012).

A talidomida e seus análogos agem contra o mieloma múltiplo das seguintes maneiras: diminuição do crescimento das células tumorais pela modulação das interações adesivas e

secreção de citocinas, tais como IL-6, IL-10 e TNF- α , e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A citocina IL-6 é conhecida por promover o crescimento de células de mieloma, já a VEGF induz a migração dessas células, assim, a talidomida bloqueia diretamente o crescimento das células tumorais e migração, bem com a inibição da angiogênese na medula óssea (RICHARDSON et al., 2002).

Outra consideração importante é o aumento da atividade antitumoral da dexametasona na presença da talidomida e dos IMiDs (KUMAR & CHHIBBER, 2011). Assim, Richardson e colaboradores, através de testes *in vitro* demonstraram que a dexametasona poderia agir de forma sinérgica quanto ao efeito antiproliferativo da talidomida e dos seus análogos, sendo o acoplamento desses agentes potencialmente úteis como novos protótipos na terapêutica (RICHARDSON et al., 2002).

4.4.2 Novas terapias anti-TNF-alfa

A terapia anti-fator de necrose tumoral α (anti-TNF- α) tornou-se uma abordagem interessante no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo a artrite reumatoide (AR) e a doença de Crohn (DC), principalmente daqueles pacientes que não respondem ao tratamento convencional (BAYRY, 2011; BRENNAN & FELDRNANNT, 1996).

Atualmente, a terapia anti-TNF- α disponível, são proteínas potencialmente imunogênicas. Entre as substâncias aprovadas para o uso clínico pelo FDA (Food and Drug Administration) e EMEA (European Medicines Agency) encontram-se: Infliximab, Etanercept e Adalimumab (BAYRY, 2011; AALTONEN et al., 2012).

- Infliximab (Remicade[®]): Foi a primeira substância anti-TNF- α aprovada pelo FDA em 1998 para uso clínico no tratamento de DC nos pacientes que não respondiam de forma adequada a terapia tradicional. É um anticorpo monoclonal quimérico, IgG1, de uso endovenoso. Constituído de 75% de um anticorpo IgG1 Kappa humano acoplado a 25% de um anticorpo monoclonal anti-TNF- α de camundongo (SANTOS et al., 2006). Esse anticorpo se liga ao TNF- α de forma específica e neutraliza o TNF transmembrana e o presente em solução, e estudos *in vitro* indicam que esse biofármaco é capaz de induzir a lise de células responsáveis pela produção de TNF (CANTANHEDA et al., 2007).

O uso de infliximab associado com metotrexato em pacientes com AR resultou em significativas melhoras clínicas em pacientes resistentes às terapias convencionais. Assim,

outras doenças inflamatórias podem ser beneficiadas com o uso de infliximab (CANTANHEDA et al., 2007).

Porém, sabe-se que de 30-40% dos pacientes que iniciam a terapia com infliximab não respondem a essa substância, sendo necessário múltiplos ajustes de dose para manter uma resposta clínica a longo prazo. Várias reações podem ocorrer durante o tratamento e pacientes com insuficiência cardíaca não podem fazer uso dessa substância (BAYRY, 2011; CHAPARRO et al., 2012).

- Etanercept (Embrei[®]): É a terapia de primeira escolha aprovada para AR moderada a grave, espondilite anquilisante (EA), artrite psoriática (AP) e artrite reumatoide juvenil (ARJ). É uma proteína de fusão onde o receptor de TNF tipo II é conjugado a região Fc da IgG1 humana (SANTOS et al., 2006). Seu uso é subcutâneo. Essa substância age reduzindo o processo inflamatório a partir do bloqueio da ligação do TNF- α aos receptores das superfícies celulares. Estudos relatam a redução dos sintomas e erosões na AR (CANTANHEDA et al., 2007). Quanto aos efeitos secundários, são relatadas infecções no trato respiratório.

- Adalimumab (Humira[®]): Essa substância recebeu aprovação para o uso em AR moderada a grave, para redução dos sinais e sintomas. Ela é capaz de inibir o desenvolvimento dos danos causados nas articulações. Seu uso é subcutâneo. Frequentemente é usado como monoterapia, mas pode ser associado com metotrexato. É um anticorpo monoclonal totalmente humano, IgG1, que bloqueia a interação do TNF- α com os receptores TNF p55 e p75 ao se ligar especificamente a essa citocina. Esse anticorpo monoclonal impede a função biológica do TNF- α além de modular os níveis de moléculas de adesão (ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1) que são responsáveis pela migração leucocitária. Alguns efeitos indesejáveis podem ocorrer como cefaleias, queda dos níveis de hemoglobina, pneumonia entre outras (SANTOS et al., 2006).

Recentemente, tem sido relatado o aparecimento de outras doenças autoimunes relacionados com os tratamentos a longo prazo, atingindo um índice de 0,03%. Ressalta-se que não há, até o momento, fármacos não protéicos como terapia alternativa anti-TNF para doenças autoimunes.

No entanto, o bloqueio do efeito fisiológico do TNF alfa deu origem a efeitos adversos em alguns pacientes. Os três agentes adalimumab, etanercept e infliximab já foram relatados por provocar uma reação de hipersensibilidade que tem sido denominada como síndrome

semelhante ao lúpus induzido por drogas (fármacos) (SLID) (WILLIAMS & COHEN, 2011).

O mecanismo da SLID ainda não é bem conhecido mas acredita-se que as substâncias anti-TNF-alfa induzem a apoptose em células inflamatórias, estimulando o desenvolvimento de auto-anticorpos em pacientes que são susceptíveis. Este fenômeno tem sido apoiado por evidências de um aumento significativo em nucleossomas antigênicos após o tratamento de infliximab (WILLIAMS & COHEN, 2011).

Novas intervenções terapêuticas podem ser realizadas a partir do direcionamento em alvos intracelulares que participam da regulação da expressão de citocinas, incluindo a TNF- α . Um alvo proposto seria a NF- κ B, responsável pela regulação dos genes que mantêm a inflamação, incluindo os mediadores TNF- α , IL-6, IL-8 e as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Estudos demonstraram um decréscimo significativo do edema articular em ratos com artrite reumatoide induzida por colágeno, utilizando um potente inibidor de NF- κ B (TAK et al., 2001).

A fosforilação do inibidor de NF- κ B (I κ B) é um passo importante na ativação desse fator nuclear e é mediada pela I κ B quinase (IKK). O complexo IKK consiste em pelo menos três subunidades, incluindo as subunidades catalíticas IKK α e IKK β e a subunidade reguladora, IKK γ . A interferência direta nessa via pode ser útil na inibição da atividade de NF- κ B sendo uma estratégia terapêutica eficaz já comprovada em muitos modelos animais de artrite (TAK et al., 2001).

Pesquisas relatam que a subunidade IKK β tem emergido como um complexo chave na regulação do fator nuclear κ B (NF- κ B) por ser a via primária para estímulos pró-inflamatórios e que esta é o ponto chave de convergência tanto para a IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 e a expressão gênica da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (TAK et al., 2001).

4.5 A MODIFICAÇÃO MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A modificação molecular é uma importante estratégia em busca de um planejamento racional de novos candidatos a fármacos sintéticos, onde se destacam os processos de hibridação molecular e latenciação. O principal objetivo dessas estratégias é a obtenção de novos compostos a partir da otimização de protótipos a fim de obter superiores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Buscando um planejamento racional desses novos protótipos, essas abordagens baseiam-se na definição do melhor alvo terapêutico, a partir do conhecimento prévio do mecanismo da doença a ser tratada. A partir dessas informações, torna-se possível o desenho de moléculas que poderão agir no alvo terapêutico indicado (BARREIRO, 2009).

Altos custos estão envolvidos na obtenção de um novo fármaco, cerca de milhões de dólares, tornando o processo dispendioso para muitos países em desenvolvimento, sendo assim, benéfica a utilização da estratégia de modificação molecular por permitir a obtenção de moléculas inovadoras sem envolver valores exorbitantes (SANTOS, 2009).

Os fármacos disponíveis na terapêutica, em sua maioria, foram desenvolvidos abordando apenas um alvo biológico para o tratamento de uma única doença. Em muitas situações eles são utilizados em combinação para o tratamento de doenças mais complexas, como é o caso das doenças cardiovasculares, inflamatórias, câncer e AIDS, onde o tratamento necessita atingir múltiplos alvos (GASCO et al., 2008). Clinicamente, esta politerapia pode ser prejudicial para a adesão do paciente ao tratamento (SANTOS, 2009).

Com isso, há o interesse da descoberta de drogas que atuem simultaneamente em mais de um alvo, problema que pode ser resolvido com a estratégia da hibridação molecular (GASCO et al., 2008).

A hibridação molecular é uma abordagem de obtenção de novos compostos com duas ou mais moléculas bioativas fundidas, obtendo uma única molécula com as mesmas características das moléculas individuais, e que possuem a capacidade de serem reconhecidas por diferentes receptores biológicos (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; SANTOS, 2009).

No planejamento de novos híbridos é possível considerar apenas o grupo farmacofórico de cada uma das subunidades que compõem a molécula, com eliminação do grupamento tóxico, resultando em um aumento da segurança (CHUNG, 2012).

Entretanto, ao eliminar o grupamento tóxico deve-se considerar os fatores eletrônicos, interação com o receptor biológico e propriedades farmacocinéticas a fim de manter a atividade das moléculas individuais (CHUNG, 2012; SANTOS, 2009).

Os híbridos são classificados como conjugados, pré-fundidos e fundidos de acordo com a forma em que as moléculas ativas estão ligadas (SANTOS, 2009).

Na figura 7, estão representados dois compostos iniciais que se ligam seletivamente a dois alvos distintos e através da hibridação molecular tornam-se uma única molécula apresentando as duas atividades (MORPHY & RANKOVIC, 2006).

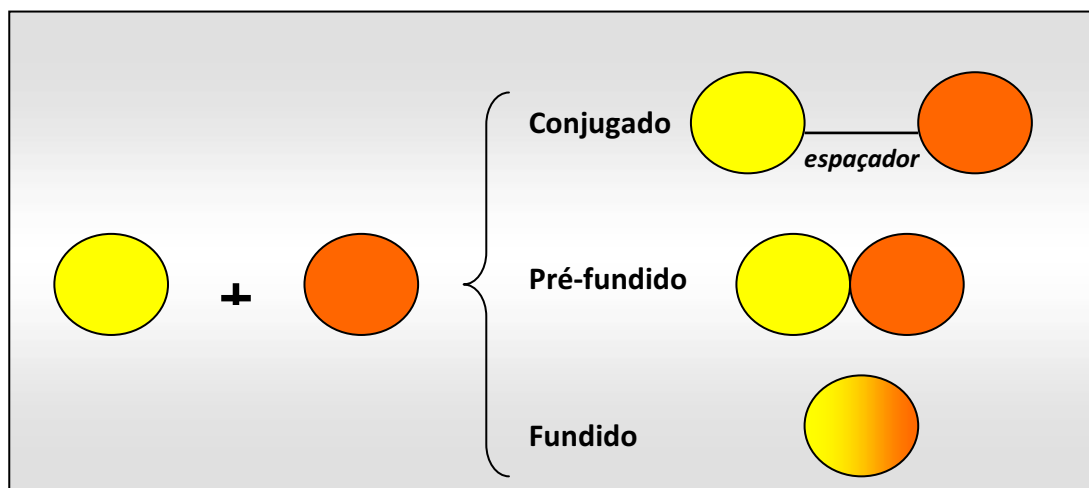


Figura 7. Classificação dos compostos híbridos (adaptado de: MORPHY & RANKOVIC, 2006).

Historicamente, as patologias mais comuns que vêm utilizando a hibridação molecular tem sido a psiquiatria, neurodegeneração, oncologia, assim como as doenças cardiovasculares, metabólicas e alérgicas. As moléculas híbridas para essas condições são geralmente desenhadas de acordo com um alvo terapêutico que já foi clinicamente validado para uma determinada doença, somando-se a ele uma ou mais atividades adicionais que foram estudadas a fim de aumentar a eficácia e segurança do novo fármaco (MORPHY & RANKOVIC, 2009).

Novos protótipos com ação anti-inflamatória sempre foram um importante alvo no planejamento de fármacos, justificado por seu amplo uso em diversas doenças onde se instala o processo inflamatório, seguida da necessidade da redução dos efeitos tóxicos de muitos fármacos disponíveis na terapêutica (VIZIOLI, 2009).

Um importante alvo da modificação molecular em busca de novos compostos anti-inflamatórios é a talidomida. Novos análogos da talidomida tem apresentado perfis melhorados quando comparados aos anti-inflamatórios não esteroides tão utilizados na terapêutica (BOSQUESI et al., 2011).

Outra estratégia de modificação molecular, a latenciação, conceitualmente é a obtenção do fármaco em sua forma inativa (pró-fármaco), o qual libera a porção ativa original no local de ação ou próximo a ele, após uma reação química ou enzimática *in vivo* (Figura 8) (CHUNG et al., 2005).

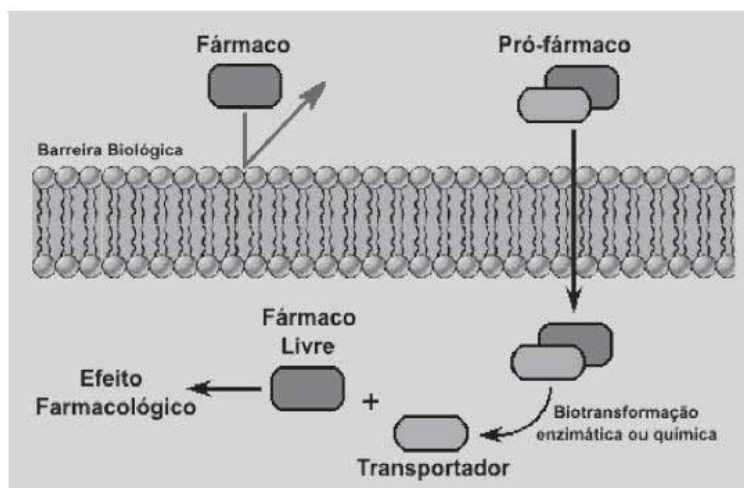


Figura 8. Representação do conceito de pró-fármaco (Retirado de: CHUNG et al., 2005).

A proposta do conceito de latenciação é originalmente de Harper, em 1959, mas apenas após avanços no conhecimento da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos no organismo, em meados de 1970, a latenciação adquiriu forma mais definida (CHUNG et al., 2005).

O planejamento de pró-fármacos tem proporcionado bons resultados na diminuição da toxicidade de diversos fármacos, além de ser uma ferramenta útil para o incremento das características físico-químicas, farmacocinéticas e/ou biofarmacêuticas dos agentes farmacológicos (JANA et al., 2010; RAUTIO et al., 2008; VIZIOLI, 2009).

Pode-se desenhar um pró-fármaco com conversão na sua forma ativa por uma ou mais reações da fase I, *in vivo*. Um bom pró-fármaco deve gerar rapidamente a forma ativa para garantir níveis de drogas eficientes no local de ação (JANA et al., 2010).

Os pró-fármacos podem ser classificados como: *Pró-fármacos clássicos*, *Pró-fármacos recíprocos*, *Bioprecursores*, *Pró-fármacos mistos* e *Pró-fármacos dirigidos*.

Pró-fármacos clássicos são os que seguem o princípio da definição do termo de latenciação, os quais são compostos inativos ou menos ativos que a molécula matriz e necessitam de hidrólise para transformar-se em metabólito ativo. Esses compostos utilizam um transportador desprovido de atividade e necessariamente atóxico (CHUNG et al., 2005). Neste tipo de abordagem, os pró-fármacos são tipicamente ésteres, utilizados para mascarar grupos carboxilato, fosfato e funções alcoólicas e fenólicas (JANA et al., 2010).

Quando o transportador possui atividade terapêutica, este é chamado de *Pró-fármaco recíproco*, possibilitando um sinergismo de ação ou agregando ao pró-fármaco uma atividade diferente e benéfica para o tratamento (CHUNG et al., 2005).

Bioprecursores, são fármacos latentes, que não possuem transportador, mas necessitam também da biotransformação *in vivo* para apresentar atividade. São exemplos de pró-fármacos bioprecursores a lovastatina, o enalapril e o metronidazol (JANA et al., 2010; CHUNG et al., 2005).

Os *pró-fármacos mistos* são aqueles em que se encontram características de pró-fármacos clássicos e bioprecursores, enquanto os *pró-fármacos dirigidos* são fármacos carregados seletivamente para o local de ação através de transportadores específicos para os receptores ou enzimas presentes no sítio ativo do fármaco (VIZIOLI, 2009).

Os derivados desse trabalho foram desenhados utilizando o grupamento farmacofórico da talidomida, não se tratando da molécula original. Além disso, não há até o momento comprovação da necessidade de hidrólise para a atividade biológica desses compostos, dessa forma, foram considerados híbridos e não pró-fármacos.

Segundo Chung (2012):

"Estas duas estratégias de obtenção de pró-fármacos recíprocos e híbridos podem ser facilmente confundidas, pois a nova molécula pode apresentar tanto efeito per se e/ou após biotransformação, apresentando, desta forma, características mistas. Muitos pesquisadores, entre eles, relatores de projetos Fapesp gastam energias desnecessárias em definições (pró-fármacos recíprocos x híbridos ?) para moléculas que estão em fase preliminar de estudo.

Ligações aparentemente lábeis como ésteres, podem surpreender o pesquisador, apresentando estabilidade e atividade superior ao fármacos matriz, sem a necessidade de conversão posterior. Portanto, uma molécula antes planejada como pró-fármaco pode ser um híbrido e vice-versa."

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Reagentes e Solventes

- 1-hidroxibenzotriazol (Acros Organics);
- Acetato de etila P.A. (Synth);
- Ácido acético glacial P.A. (J.T. Baker);
- Ácido clorídrico (Synth);
- Ácido *m*-aminobenzóico (Fluka);
- Ácido *p*-aminobenzóico (Fluka);
- Água destilada;
- Anidrido ftálico (J.T. Baker);
- Budesonida (Deg);
- Clorofórmio (Synth);
- Diisopropilcarbodiimida (Sigma);
- Diclorometano P.A. (Synth);
- Dimetilaminopiridina (Sigma);
- Dimetilsulfóxido P.A. (Vetec);
- Glicina (Analítica);
- Goma arábica (Sigma);
- Hexano (Synth);
- Metanol P.A. (Merck);
- Prednisolona (EMS);
- Sílica para coluna 0,06-0,2 mm (Across);
- Sulfato de sódio anidro (Synth);
- Tolueno (Synth);
- Trietilamina (Merck).

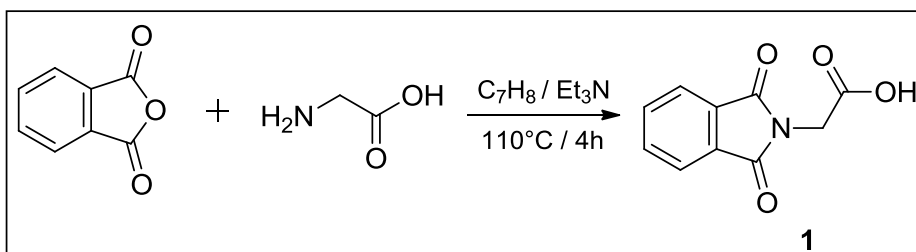
5.2 MÉTODOS

5.2.1 Metodologias Sintéticas

Os compostos foram sintetizados utilizando reações conhecidas do tipo substituição nucleofílica regioseletiva, adição nucleofílica à carbonila e condensação para a formação de imida.

A obtenção de cada um dos produtos finais desejados envolveu duas etapas sintéticas. A primeira etapa consistiu na síntese dos intermediários ftalimídicos (**1-3**), através da condensação de aminas previamente selecionadas ao anidrido ftálico, tendo com solvente o ácido acético. Estes intermediários foram em seguida acoplados com os respectivos glicocorticoides, através de uma substituição nucleofílica utilizando agente acoplantes (DCI e HOBt) em diclorometano anidro, obtendo assim os produtos finais esterificados (**compostos I-VI**).

5.2.1.1 Síntese do intermediário ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (**1**)



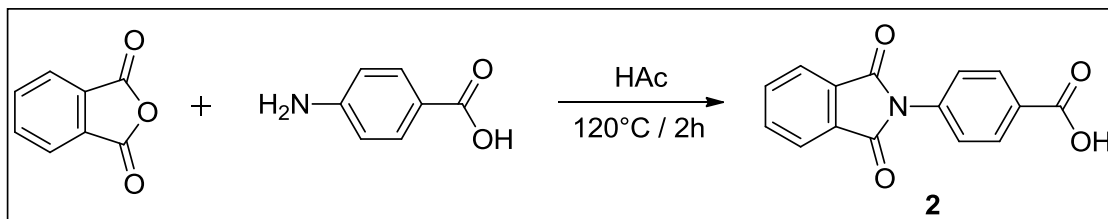
Esquema 2. Síntese do intermediário ftalimídico (**1**)

Em um balão de 125 mL, conectado a um *dean stark* sob refluxo a uma temperatura de 110°C, adicionou-se 7,4g de anidrido ftálico (0,05 mol), 3,75g de glicina (0,05 mol), 30 mL de tolueno e 0,5 mL de trietilamina. A mistura reacional foi mantida sob agitação vigorosa e aquecimento durante 4 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 80% acetato de etila: 20% hexano. Após resfriamento da mistura reacional, o solvente orgânico foi evaporado à pressão reduzida obtendo um sólido branco.

O isolamento reacional procedeu-se pela adição de 75 mL de acetato de etila a este sólido branco e com a ajuda de um funil de separação, a fase orgânica foi lavada com uma solução de HCl a 1M (4 vezes com 40 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase

orgânica, a qual foi filtrada e evaporada à pressão reduzida fornecendo 6,06g (rendimento: 59,0%) de um pó branco (**1**) cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{11}O_4N$, $PM=205,17$ e $PF= 187-193^{\circ}C$.

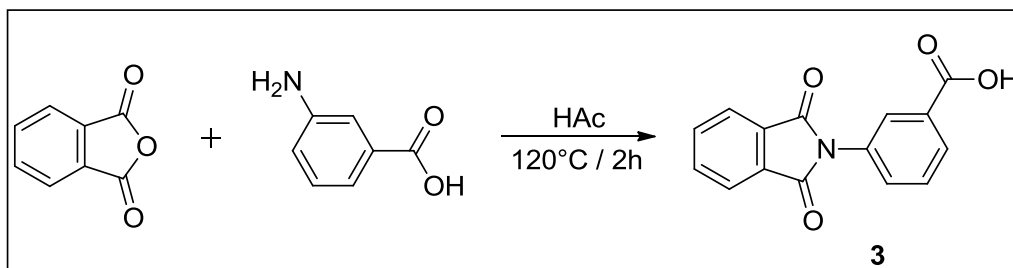
5.2.1.2 Síntese do intermediário ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**2**)



Esquema 3. Síntese do intermediário ftalimídico (**2**)

Em um balão de 50 mL adicionou-se 1 g (7,29 mmol) de ácido *p*-aminobenzóico, 1 g (6,75 mmol) de anidrido ftálico e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C, sob refluxo, por 2 horas e agitada vigorosamente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 85% $CHCl_3$: 10% MeOH : 5% HAc. Após resfriamento, a mistura reacional foi filtrada e o sólido branco formado foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida, o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95% fornecendo 1,29 g (rendimento: 71,1%) de cristais de cor branca (**2**) cuja fórmula molecular é $C_{14}H_9NO_4$, $PM = 267$ e $PF = 284^{\circ}C-289^{\circ}C$.

5.2.1.3 Síntese do intermediário ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**3**)

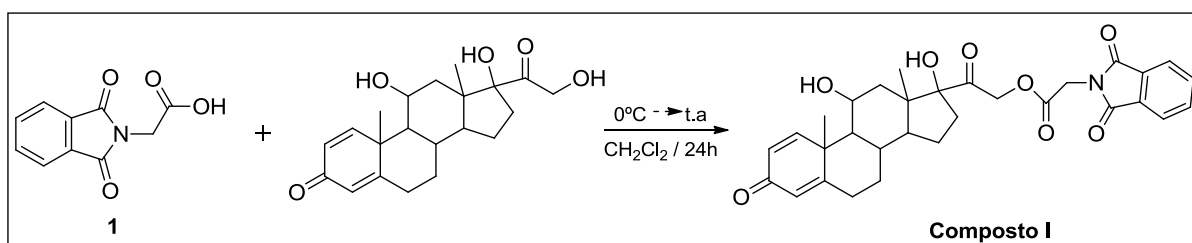


Esquema 4. Síntese do intermediário ftalimídico (**3**)

Em um balão de 50 mL adicionou-se 1 g (7,29 mmol) de ácido *m*-aminobenzóico, 1 g (6,75 mmol) de anidrido ftálico e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional fo

aquecida a 120°C, sob refluxo, por 2 horas e agitada vigorosamente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 85% CHCl₃: 10% MeOH : 5%HAc. Após resfriamento, a mistura reacional foi filtrada e o sólido branco formado foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida, o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95% fornecendo 1,49g (rendimento: 83,0%) de cristais de cor branca (**3**) cuja fórmula molecular é C₁₄H₉NO₄, PM = 267 e PF = 276°C-282°C.

5.2.1.4 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisindolin-2-il)acetato (**composto I**)

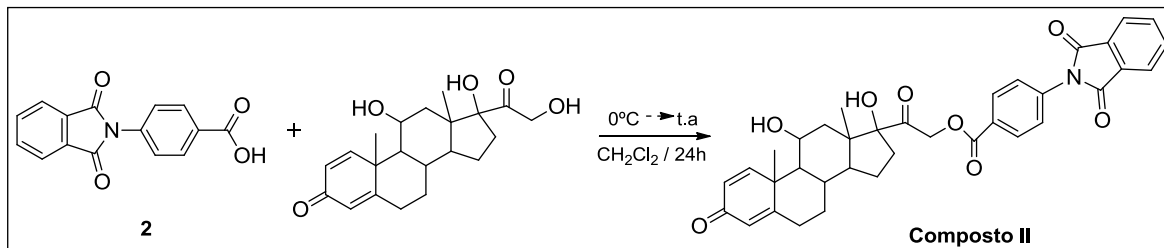


Esquema 5. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 1 (**composto I**)

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 205,17 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (**1**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C. Em seguida, 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 360,4 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e a mesma foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 80% Acetato de etila: 20% Hexano) fornecendo 215 mg (rendimento: 40,0%) de um sólido branco (**composto I**) cuja fórmula molecular é C₃₁H₃₃NO₈; PM=547,22; PF: 201°-204°C.

5.2.1.5 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**composto II**)

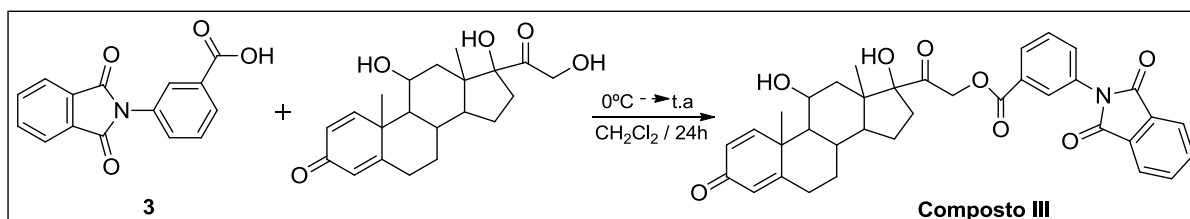


Esquema 6. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 2 (**composto II**)

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il) benzóico (**2**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C. 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 360,4 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 265 mg (rendimento: 40,0%) de um sólido branco (**composto II**) cuja fórmula molecular é $C_{36}H_{35}NO_8$; PM=609,66; PF: 188°-191°C.

5.2.1.6 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**composto III**)

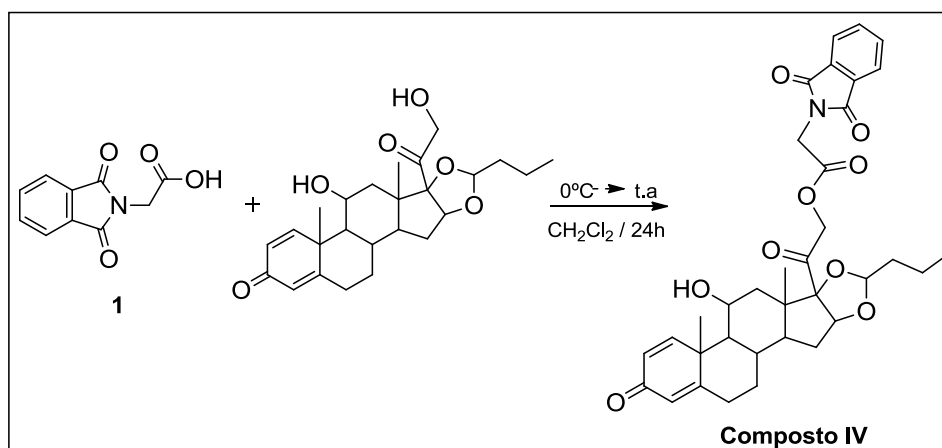


Esquema 7. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 3 (**composto III**)

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**3**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C. 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 360,4 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 243 mg (rendimento: 48%) de um sólido branco (**composto III**) cuja fórmula molecular é C₃₆H₃₅NO₈, PM=609,66; PF: 235°-238°C.

5.2.1.7 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil 2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a, 12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisindolin-2-il)acetato (**composto IV**)



Esquema 8. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 4 (composto IV)

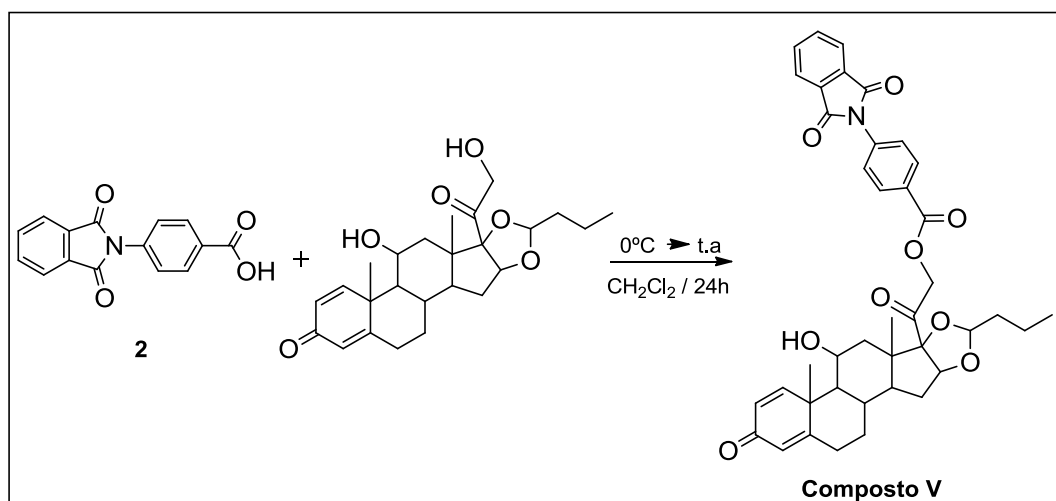
Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 205,17 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (**1**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C. 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida,

foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 430,5 mg (1 mmol) de budesonida à solução.

Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e a foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 505 mg (rendimento: 80,0%) de um sólido branco (**composto IV**) cuja fórmula molecular é $C_{35}H_{39}NO_9$; PM= 617,69; PF: 201°-204°C.

5.2.1.8 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**composto V**)

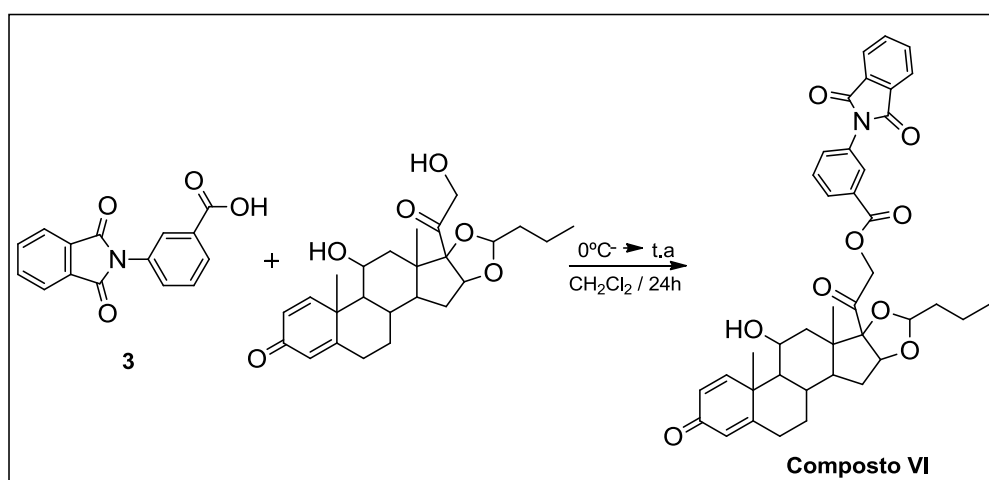


Esquema 9. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 5 (composto V)

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il) benzóico (**2**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C. 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 430,5 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 500 mg (rendimento: 70,0%) de um sólido branco (**Composto V**) cuja fórmula molecular é $C_{40}H_{41}NO_9$; PM=679,75; PF: 188°-191°C.

5.2.1.9 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**composto VI**)



Esquema 10. Síntese do derivado Lapdesf GL-FT 6 (composto VI)

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**3**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C. 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 430,5 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 552 mg (rendimento: 80,0%) de um sólido branco (**composto VI**) cuja fórmula molecular é $C_{40}H_{41}NO_9$, PM=679,75; PF: 235°-238°C.

5.2.2 Métodos Analíticos

5.2.2.1 Determinação da faixa de fusão

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

5.2.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.)

A cromatografia em camada delgada (cromatofolhas de alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm de espessura - Merck) foi utilizada para o acompanhamento das reações e das purificações dos compostos que foram sintetizados. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365 nm), e/ou por exposição à iodo pulverizado.

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

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

5.2.2.4 Espectrometria de RMN ¹H e RMN ¹³C

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos no espectrômetro Varian Inova® (300 MHz), utilizando como solvente DMSO-d₆, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araraquara.

5.2.2.5 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos no equipamento de alta resolução, ESI-TOF, nos modos de análise positivo e negativo, utilizando como solvente metanol, no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP.

5.2.3 Ensaios Biológicos

Os trabalhos foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, sob parecer favorável para execução dos ensaios biológicos, protocolos CEUA/FCF/CAr. nº 29/2012, 49/2012 e 08/2013 (ANEXO).

5.2.3.1 Animais

Para os ensaios de atividade anti-inflamatória foram utilizados ratos Wistar (250-280g), sendo 6 animais por grupo experimental, provenientes do Biotério Central da UNESP, Câmpus de Botucatu. Os animais foram mantidos em condições ambientais do biotério, com temperatura controlada em 24°C (± 1) e ciclo circadiano de 12 horas, em caixas plásticas (50 x 60 x 22 cm) com no máximo 6 animais por caixa.

Para o ensaio *in vitro*, foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss de seis semanas (20-25g), fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, mantidos sob as mesmas condições ambientais.

5.2.3.2 Atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata) (adaptado de: WINTER, RISLEY & NUSS, 1962).

O ensaio biológico de inflamação aguda foi realizado seguindo o modelo de edema de pata, no qual a formação de exudato inflamatório foi induzida pela carragenina 200 μ M / pata.

Os animais (ratos Wistar) foram mantidos em jejum por 12h, com livre acesso à água antes da realização do experimento. O grupo controle recebeu por via subplantar na pata posterior direita o agente químico irritante, carragenina, e salina na pata posterior esquerda. Os compostos testados (híbridos de anti-inflamatórios esteroides) foram administrados por via oral (gavage) a outros seis grupos de animais, 60 minutos antes da carragenina (subplantar). Os compostos tiveram como veículo goma arábica 5% e foram utilizadas doses de 100 μ g/Kg.

As espessuras (mm) das patas posteriores foram medidas, com uso de espessímetros, antes e após os tratamentos, de hora em hora, durante 6 horas após a administração da carragenina. Os resultados foram expressos pela diferença entre a leitura das patas antes e após os tratamentos. Após 7 horas do início do experimento, os animais sofreram eutanásia em câmara de CO₂.

5.2.3.3 Atividade anti-inflamatória crônica (modelo colite ulcerativa distal) (adaptado de: FABIA et al., 1992; VASSALO et al., 2007).

O ensaio biológico de atividade anti-inflamatória crônica foi realizado seguindo o modelo de indução de colite ulcerativa por ácido acético.

Os animais (ratos Wistar) foram distribuídos em quatro grupos e mantidos em jejum nas 24 horas que antecederam o procedimento. O grupo controle positivo de colite ulcerativa distal recebeu 2 mL *per rectum* do agente químico irritante, ácido acético, na concentração de 4% sob auxílio de um cateter/sonda gástrica de Levine nº 4, o qual 8 cm do mesmo foi introduzido e mantido por um período de exposição de 1 minuto.

O controle negativo recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente, porém o agente irritante foi substituído por NaCl 0,9%.

Os dois grupos tratados dos compostos a serem estudados receberam tratamento a partir do quinto dia após a indução de colite. O tratamento foi realizado diariamente, por mais 5 dias, com doses de 100 µM, via oral. Após o 5º dia do início do tratamento (10º dia de indução de colite), os animais foram autopsiados e os órgãos enviados para análise histológica.

A massa corpórea para cada grupo foi registrada no dia da indução, no início e no fim do tratamento, a fim de avaliar possíveis variações decorrentes da indução da colite.

5.2.3.3.1 Análise histopatológica

Os intestinos grossos dos animais foram removidos ao término do ensaio e enviados para a análise histopatológica pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) de Presidente Prudente, SP, e avaliados segunda a classificação fornecida pelo laboratório.

Classificação microscópica:

Observou-se a intensidade do infiltrado inflamatório e a ausência/presença de hiperplasia linfoide folicular de acordo com as seguintes graduações histopatológicas:

Infiltrado inflamatório (intensidade):

Ausente = 0

Ínfimo = 1

Leve = 2

Moderada = 3

Intensa = 4

Hiperplasia linfóide:

Ausente = 0

Presente = 1

5.2.3.4 Teste imunoquímico para detecção de TNF- α

Os testes de viabilidade celular e de detecção de TNF- α foram realizados no laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

5.2.3.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais (camundongos Swiss), foram previamente estimulados por inoculação intraperitoneal, com 3 mL de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 horas de estímulo, os animais foram eutanasiados e o peritônio exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal. Em seguida, foi inoculado intraperitonealmente 5,0 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril (pH 7,2, 4°C). Após massagem peritoneal, as células do exsudato foram coletadas em seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular.

As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS (pH 7,2) e centrifugadas (400xg/5 minutos), a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em meio de cultura RPMI-1640 completo contendo 5% de FBS, 2-mercaptoetanol (2×10^{-5} M), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 UI/mL) e L-glutamina (2 mM). Determinou-se o número de células em câmara hemocitométrica de Neubauer com azul de tripan. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio de RPMI-1640-C.

Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa com tensão constante de CO₂ para a aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram retiradas com lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

5.2.3.4.2 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos (MOSMAN, 1983)

Utilizou-se a técnica de MTT, em microplaca de 96 cavidades, incubando-se suspensões celulares do exsudato peritoneal de camundongos (100µL/cavidade), na concentração de 5×10^6 células/mL, por 60 minutos, para a aderência celular. Adicionou-se as substâncias testadas seguida de incubação por 24 horas a 37° C. Os ensaios foram realizados com as substâncias nas concentrações de 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM e 1,56 µM.

Após o período total de incubação, o conteúdo da placa foi descartado e 100 µL da solução de MTT (1g/mL) foram adicionados em cada orifício. A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de álcool isopropílico ou solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados a cada orifício. Utilizou-se como controle positivo células e como controle negativo o meio de cultura. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro.

Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, onde o controle negativo correspondia a 100% de viabilidade.

5.2.3.4.3 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da produção da citocina TNF-α.

As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades. Em cada uma das cavidades foi adicionado 1 mL de suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa de CO₂. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com meio de cultura RPMI-1164-C.

Foi adicionado às células aderentes 1 mL de RPMI-1640-C, 1 mL das substâncias testadas e 1 mL de LPS a 1 µg/mL aos macrófagos aderidos à placa. Utilizou-se como

controle positivo 1mL de LPS (1 µg/mL) e o meio de cultura RPMI-1640-C (1mL) foi utilizado como controle negativo.

Incubaram-se estas placas a 37°C em estufa de CO₂ por mais 24 horas. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para *eppendorfs* que foram centrifugados a 7800xg durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados, aliquotados em *eppendorfs* e armazenados em freezer a -80°C até a determinação da citocina TNF-α através do teste imunoenzimático, ELISA.

5.2.3.4.4 Determinação da citocina TNF-α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

A citocina TNF-α foi quantificada nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos através do teste imunoenzimático ELISA de captura, utilizando o Kit Mouse TNF ELISA, BD OptEIA™, de acordo com as instruções do fabricante.

As microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-TNF-α de camundongo, na concentração de 4 µg/mL (100 µL/cavidade) diluído em tampão PBS e incubado “overnight” à temperatura ambiente.

As placas foram posteriormente lavadas três vezes com PBS (pH 9,5) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T).

Após a lavagem, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 10% de FBS (PBS-FBS) e estas foram mantidas a temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e 100 µL da citocina padrão ou dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais de camundongos foram adicionados às placas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas cinco vezes com PBS-T.

Após incubação, foram adicionados 100 µL/cavidade de anticorpo monoclonal anti-TNF-α marcado com biotina e diluído na concentração de 400 ng/mL em PBS-FBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas cinco vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 µL do conjugado peroxidase-estreptovidina diluído em PBS-FBS e incubadas novamente à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após este processo, as placas foram lavadas sete vezes com PBS-T e 100 µL do substrato foram adicionados em cada cavidade. Após nova incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas e as

concentrações das citocinas foram obtidas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de TNF- α padrão. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

5.2.3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.2 aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância a 5% (*P < 0,05), através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os compostos sintetizados foram identificados pelas análises de espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas. Para auxílio na interpretação dos espectros foi utilizada as seguintes referências: SILVERSTEIN et al., 2006; SANTOS, 2009.

6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

6.1.1 Síntese e caracterização dos intermediários ftalimídicos

Os esquemas 2, 3 e 4 demonstram as estratégias sintéticas utilizadas para a obtenção dos intermediários ftalimídicos. Inicialmente o derivados 1, 2 e 3 foram preparados através da condensação de aminas com anidrido ftálico utilizando como solvente ácido acético ou tolueno.

Com base na metodologia empregada por Lima e colaboradores (2002), foram realizadas as reações para obtenção dos compostos intermediários ftalimídicos (1-3).

O mecanismo da reação desses produtos é baseado na formação do grupo imida, onde uma amina realiza o ataque nucleofílico a um grupamento anidrido e no final da reação há a formação de uma molécula de água.

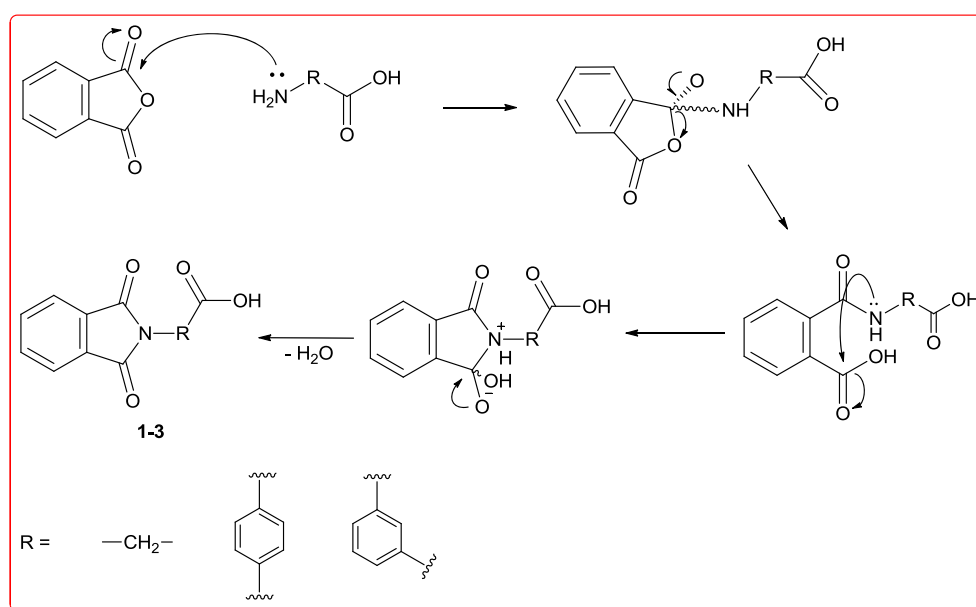
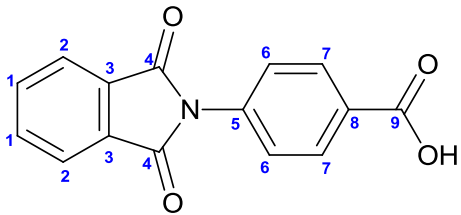
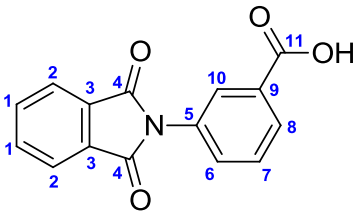


Figura 9. Mecanismo de reação para a formação dos intermediários ftalimídicos (1-3)

Nessa reação o par de elétrons livres da amina realiza um ataque nucleofílico na carbonila do anidrido ftálico, a qual possui uma carga parcial positiva (δ^+). Em seguida, rompe-se a ligação π e o par de elétrons passa a ser sustentado pelo átomo de oxigênio. Essa ligação é reestabelecida seguida do rompimento da ligação C-O. Outro ataque ao carbono carbonílico é realizado pelo par de elétrons livres da amina, com quebra da ligação π e após reestabelecimento, eliminação de uma molécula de água. Ocorre o fechamento do anel e formação do derivado ftalimídico funcionalizado. O mecanismo geral foi baseado em Santos (2009), e está descrito na figura 9.

Os deslocamentos químicos no RMN de ^1H dos intermediários ftalimídicos sintetizados foram comparados com os dados disponíveis na literatura de Santos (2009) relativos à caracterização estrutural desses intermediários.

Tabela 4: Comparação com a literatura dos deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H dos intermediários ftalimídicos (2) e (3)

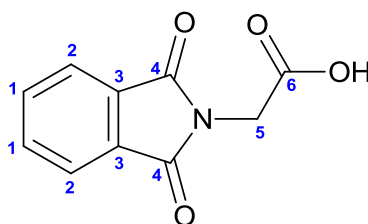
Posição	 (2)		 (3)	
	Obtido	Literatura *	Obtido	Literatura *
1	7,95 (m, 4H)	7,96 (m, 4H)	7,94 (m, 4H)	7,99 (m, 2H)
2	7,95 (m, 4H)	7,96 (m, 4H)	7,94 (m, 4H)	7,92 (m, 2H)
6	7,60 (dd; Jorto = 8,1 Hz; Jmeta = 1,5 Hz; 2H)	7,55 (dd; Jorto = 8,1 Hz; Jmeta = 2,1 Hz; 2H)	8,05 (Jmeta = 1,5Hz; 1H)	8,05 (Jmeta = 1,5Hz; 1H)
7	8,08 (dd; Jorto = 8,4Hz; Jmeta = 1,5 Hz; 2H)	7,68 (dd; Jorto = 8,1Hz; Jmeta = 2,1 Hz; 2H)	-	-
8	-	-	8,01 (Jmeta = 1,5Hz; 1H)	8,01 (Jmeta = 1,5Hz; 1H)
9	-	-	7,67 (Jorto = 8,1Hz; 1H)	7,66 (Jorto = 7,92Hz; 1H)
10	-	-	7,70 (Jorto = 7,75 Hz; Jmeta = 1,5 Hz; 1H)	7,72 (Jorto = 7,75 Hz; Jmeta = 1,4Hz; 1H)

* Fonte: SANTOS, 2009

Observando-se a Tabela 4 é possível afirmar que foram obtidos os compostos desejados, devido à proximidade dos valores dos deslocamentos químicos.

A seguir encontram-se detalhadamente as observações realizadas quanto à síntese de cada um dos intermediários ftalimídicos assim como os espectros relativos à caracterização estrutural dessas substâncias.

6.1.1.1 Caracterização estrutural intermediário ftalimídico 1



A obtenção do derivado do derivado ftalimídico 1 (ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético), se deu pela reação entre o anidrido ftálico e a glicina em tolueno e trietilamina, a uma temperatura de 110 °C durante 4 horas, seguida de isolamento por HCl 1M, fornecendo um rendimento de 59%.

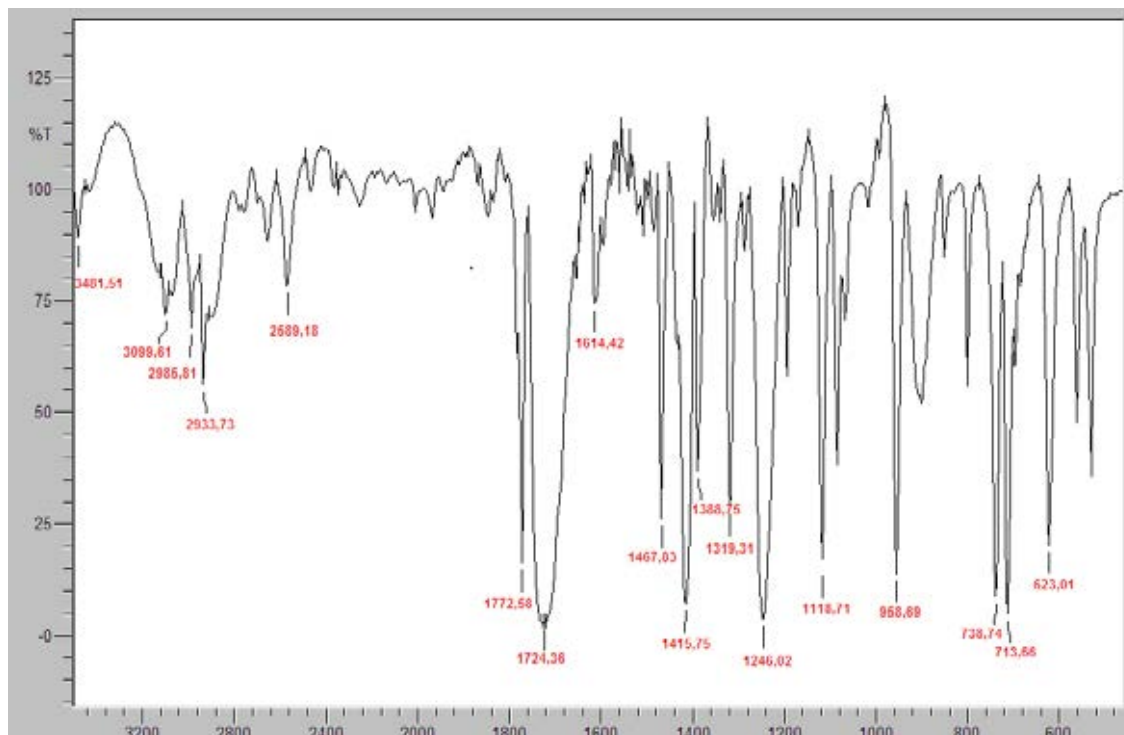
A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (C.C.D) a qual indicou a formação de um novo produto. A placa cromatográfica foi revelada com uma solução de ninidrina 1%, a qual é um revelador utilizado para a detecção de aminas primárias. A ausência da mancha rosa para o produto formado indica o sucesso da reação em consumir a glicina que possui amina primária em sua estrutura.

O produto obtido apresentou faixa de fusão entre 187-193°C, valor este comparado com os dados da literatura.

Já havia relatos na literatura a respeito da caracterização estrutural do derivado ftalimídico 1 (ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético) (SANTOS & CHUNG, 2011).

Observa-se no espectro no infravermelho do derivado ftalimídico 1 (Espectro 1) o estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, presente em 1388,75 cm^{-1} . Outros estiramentos importantes são: estiramento da hidroxila (O-H) em 3481,51 cm^{-1} e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico em 1772,58 cm^{-1} e 1724,36 cm^{-1} .

Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = 3481,51 cm^{-1} ; ν C-H aromático = 3099,61 cm^{-1} ; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2985,81 e 2933,73 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1772,58 cm^{-1} e 1724,36 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1614,42 cm^{-1} e 1467,83 cm^{-1} ; ν C-N-C = 1388,75 cm^{-1} .



Espectro 1. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (1)

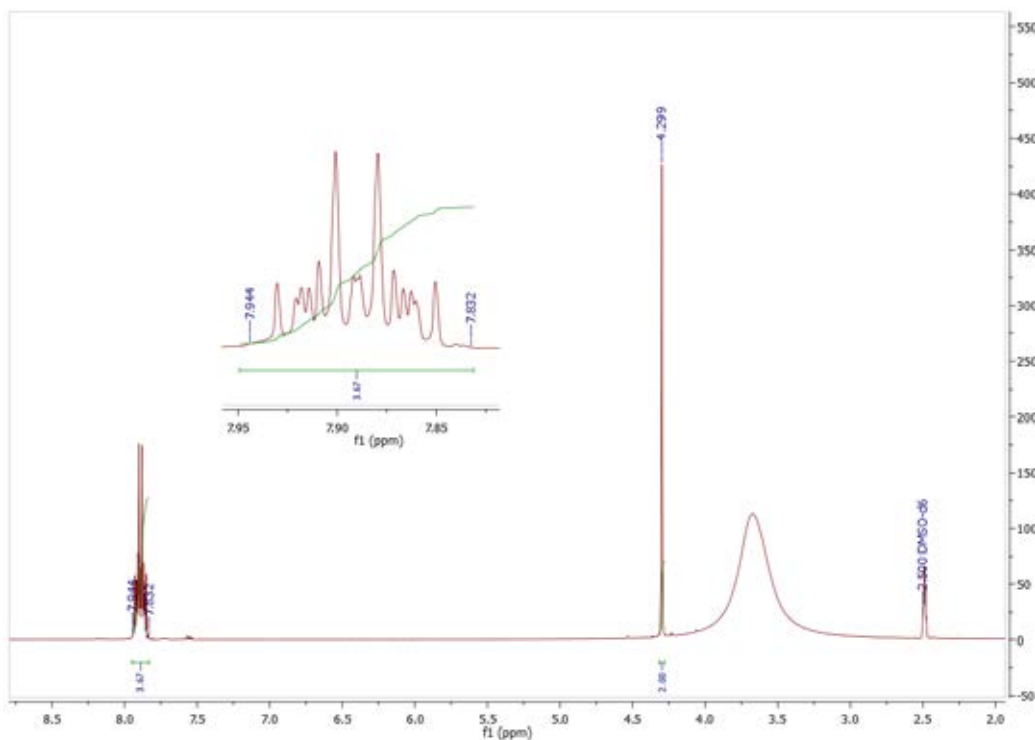
No espectro de RMN ^1H (Espectro 2) observa-se um multipletto entre δ 7,83 - 7,94 referente aos hidrogênios do sistema aromático, H1 e H2. No deslocamento δ 4,29, observa-se o hidrogênio da ligação CH_2 (H_5) apresentado em forma de singlete.

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3) observa-se todos os carbonos presentes na molécula, destacando-se os deslocamentos referentes às carbonilas C_4 e C_6 , respectivamente em δ 168,92 e δ 167,31.

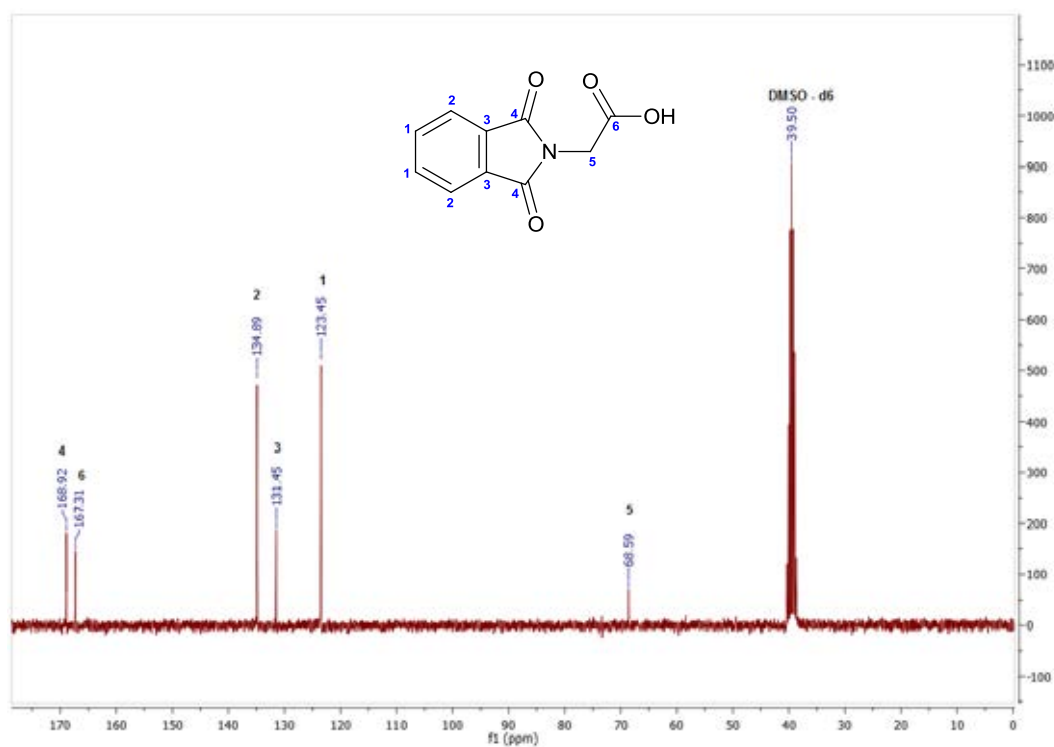
Além desses sinais, são observados deslocamentos químicos referentes ao C_2 em δ 134,89, C_3 em δ 131,45, C_1 em δ 123,45 e C_5 em δ 68,59.

Esses dados são indicativos que houve a obtenção do derivado desejado, previamente descrito na literatura.

RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6): δ 7,832 – 7,944 (m; H_1 e H_2 ; 4H); 4,299 (s; H_5 ; 2H) ppm.

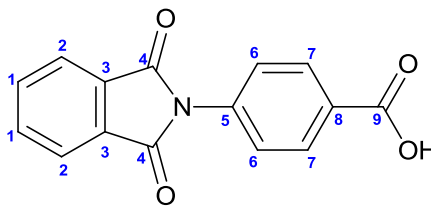


Espectro 2. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**1**) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6).



Espectro 3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**1**) (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6).

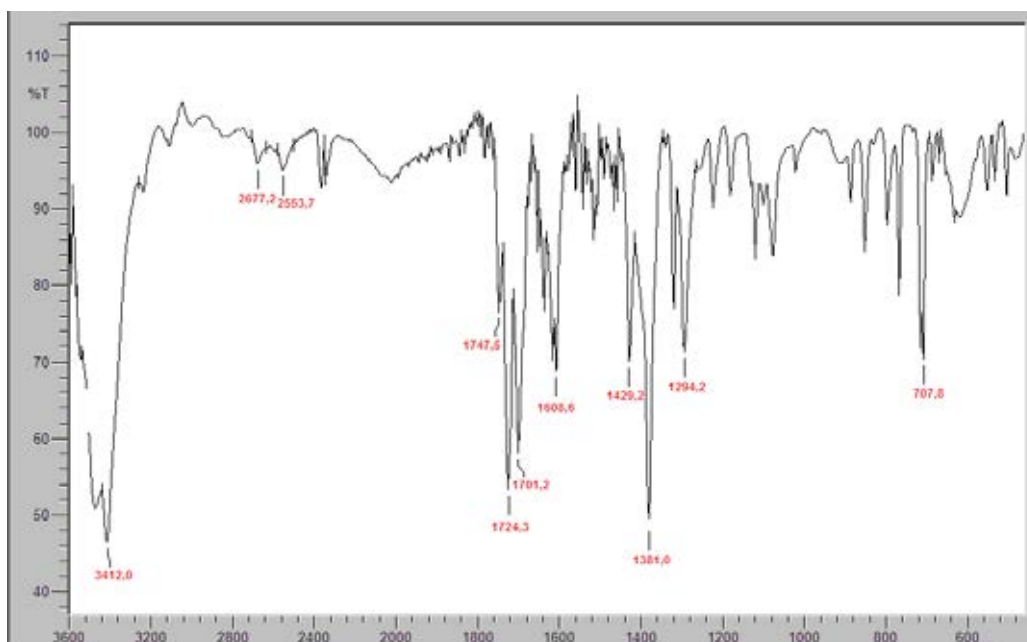
6.1.1.2 Caracterização estrutural intermediário ftalimídico 2



O derivado ftalimídico ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il) benzóico, foi obtido através da reação entre o anidrido ftálico e o ácido *p*-aminobenzóico em ácido acético, a uma temperatura de 120 °C durante 2 horas, seguida de recristalização de etanol 95%, fornecendo um rendimento de 71,1%.

A reação foi acompanhada por C.C.D., e a revelação com a solução de ninidrina 1% deu negativa para aminas primárias indicando a formação de um novo produto. A faixa de fusão do produto obtido foi de 284°C-289 °C.

A respeito da caracterização estrutural do derivado ftalimídico 2, observa-se no espectro de infravermelho (Espectro 4) o estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, presente em 1381,0 cm⁻¹. Outros estiramentos importantes são: estiramento da hidroxila (O-H) em 3412,0 cm⁻¹ e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico em 1747,5 cm⁻¹ e 1724,3 cm⁻¹.



Espectro 4. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (2)

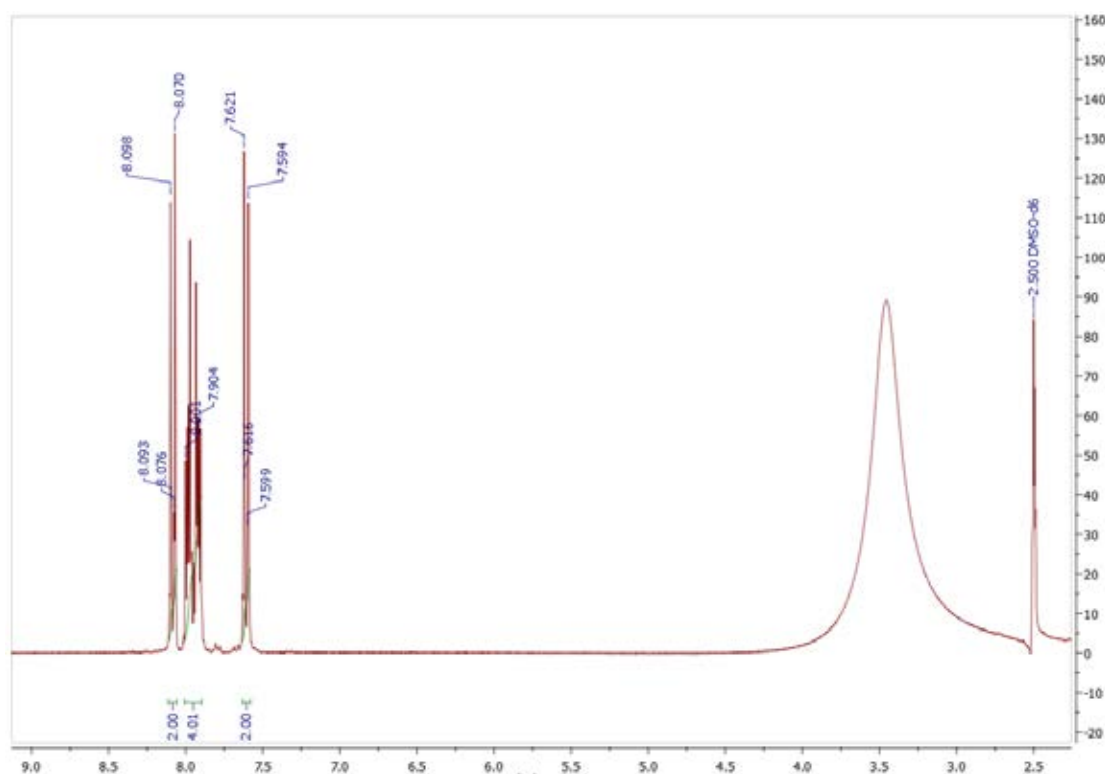
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3412,0\text{ cm}^{-1}$; ν C=O_{imida} (simétrico e assimétrico) = $1747,5\text{ cm}^{-1}$ e $1724,3\text{ cm}^{-1}$; ν C=O ácido = $1701,2\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1608,6\text{ cm}^{-1}$ e $1429,2\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1381,0\text{ cm}^{-1}$.

No espectro de RMN ^1H (Espectros 5 e 6) observa-se um multipeto entre δ 7,90 - 8,00 referente aos hidrogênios do sistema ftalimídico, H₁ e H₂. Nos deslocamentos δ 8,08 e 7,60 observam-se os hidrogênios referentes ao H₇ e H₆ respectivamente.

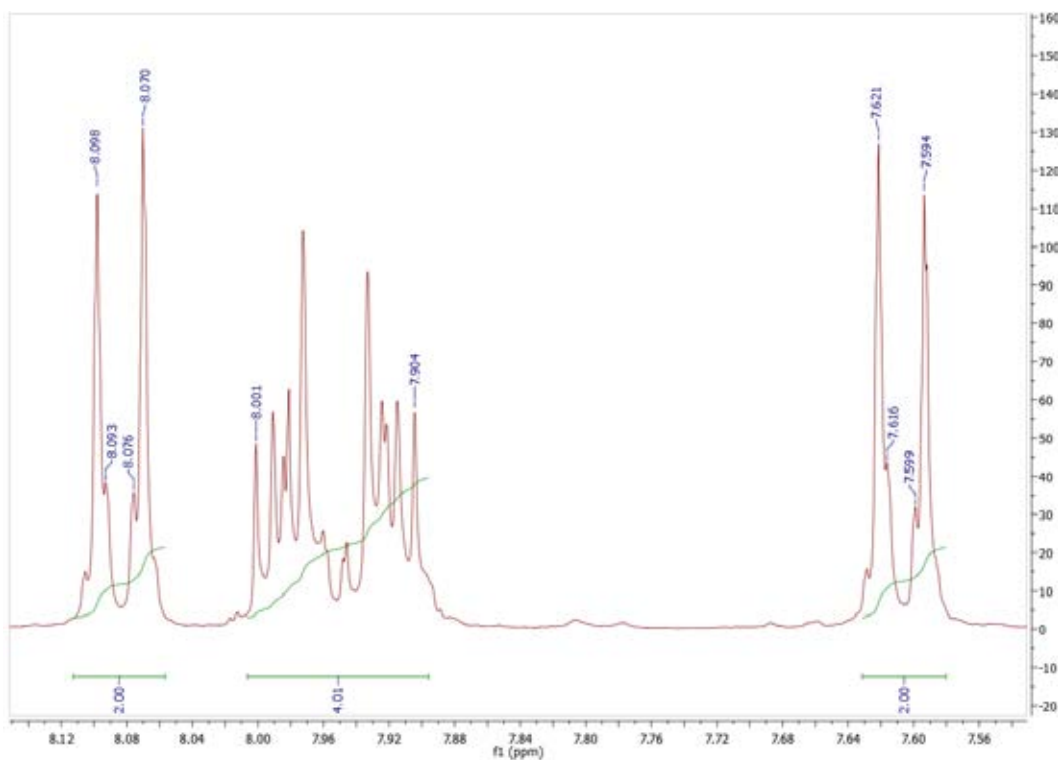
No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 7) observa-se todos os carbonos presentes na molécula, destacando-se os deslocamentos referentes às carbonilas C₄ e C₉, respectivamente em δ 166,85 e δ 166,77.

Além desses sinais, são observados deslocamentos químicos referentes ao C₈ em δ 135,88, C₂ em δ 134,95, C₃ em δ 131,56, C₅ em δ 130,16, C₇ em δ 129,93, C₆ em δ 127,11 e C₁ em δ 123,65.

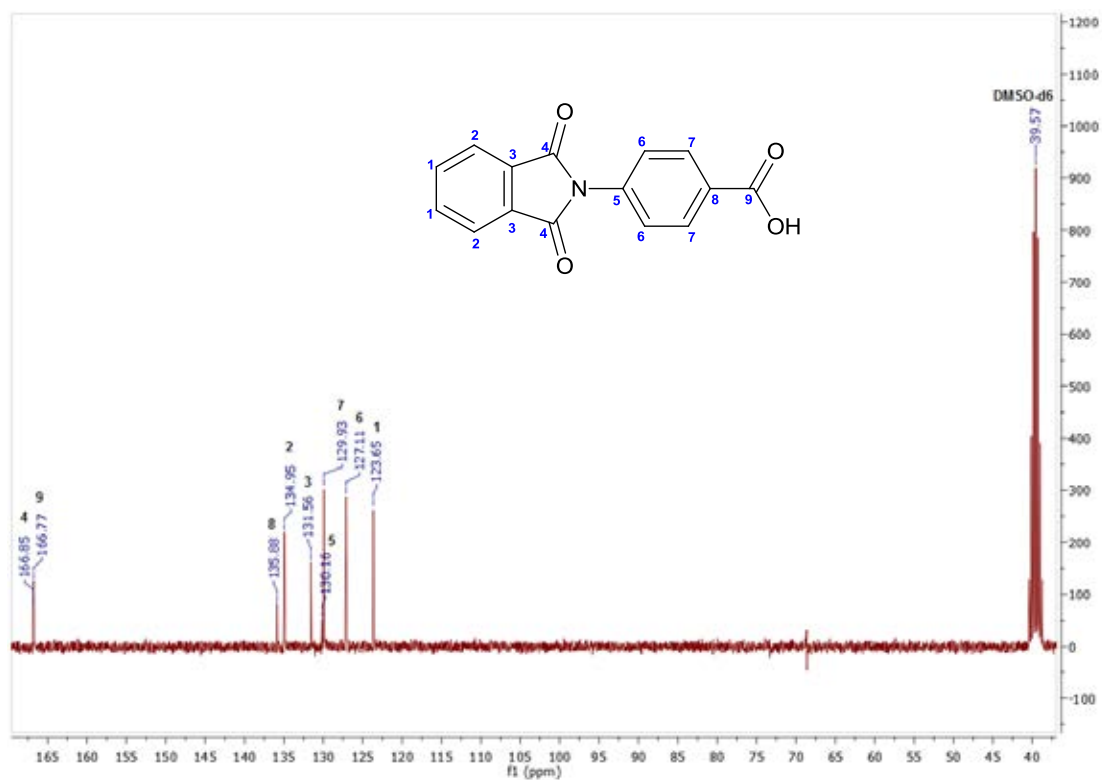
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d₆): δ 8,08 (dd; H₇; J_{orto} = 8,4 Hz; J_{meta} = 1,5 Hz; 2H); 8,00-7,90 (m; H₁ e H₂; 4H); 7,60 (dd; H₆; J_{orto} = 8,1 Hz; J_{meta} = 1,5 Hz; 2H) ppm.



Espectro 5. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d₆)

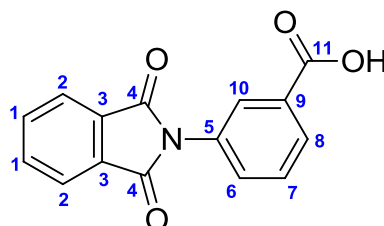


Espectro 6. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) ($\text{RMN } ^1\text{H}$; 300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) – ampliação região aromática



Espectro 7. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) ($\text{RMN } ^{13}\text{C}$; 75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

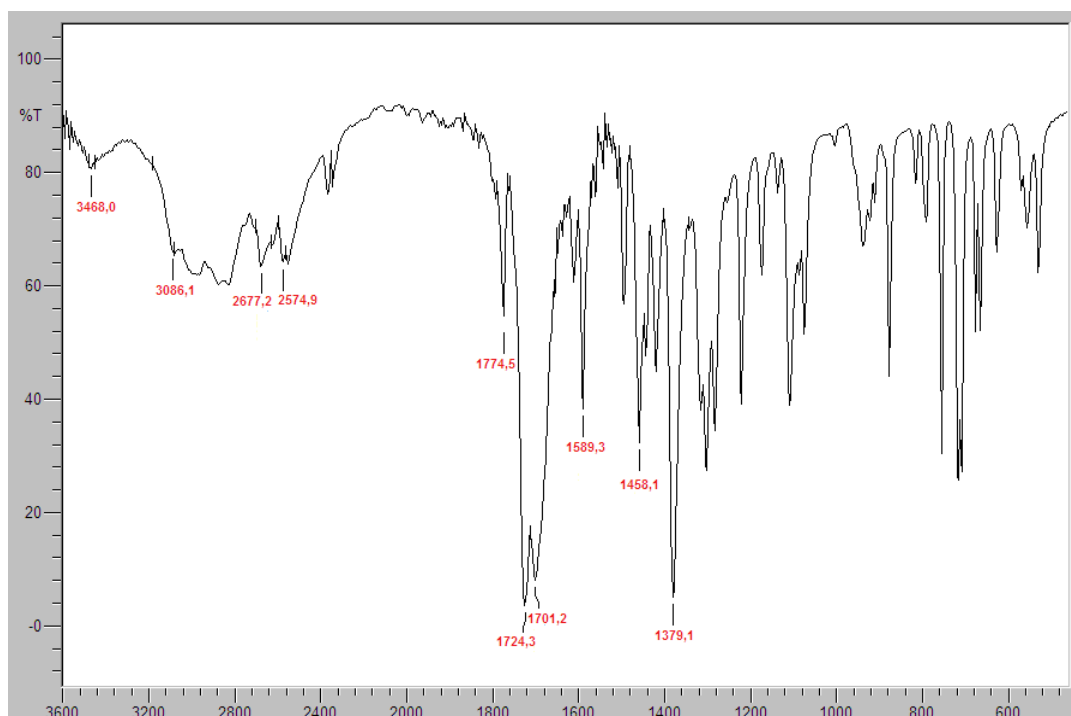
6.1.1.3 Caracterização estrutural intermediário ftalimídico 3



O derivado ácido ftalimídico 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico, foi obtido semelhantemente ao derivado ftalimídico 2. O rendimento obtido foi de 83%.

A reação foi acompanhada por C.C.D., e a revelação com a solução de ninidrina 1% foi negativa para aminas primárias indicando a formação de um novo produto. A faixa de fusão do produto obtido foi de 276°C-282°C.

A respeito da caracterização estrutural do derivado ftalimídico 3, observa-se no espectro de infravermelho (Espectro 8) o estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, presente em 1379,1 cm^{-1} . Outros estiramentos importantes são: estiramento da hidroxila (O-H) em 3468,0 cm^{-1} e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico em 1774,5 cm^{-1} e 1724,3 cm^{-1} e do ácido carboxílico em 1701,2 cm^{-1} .



Espectro 8. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (3)

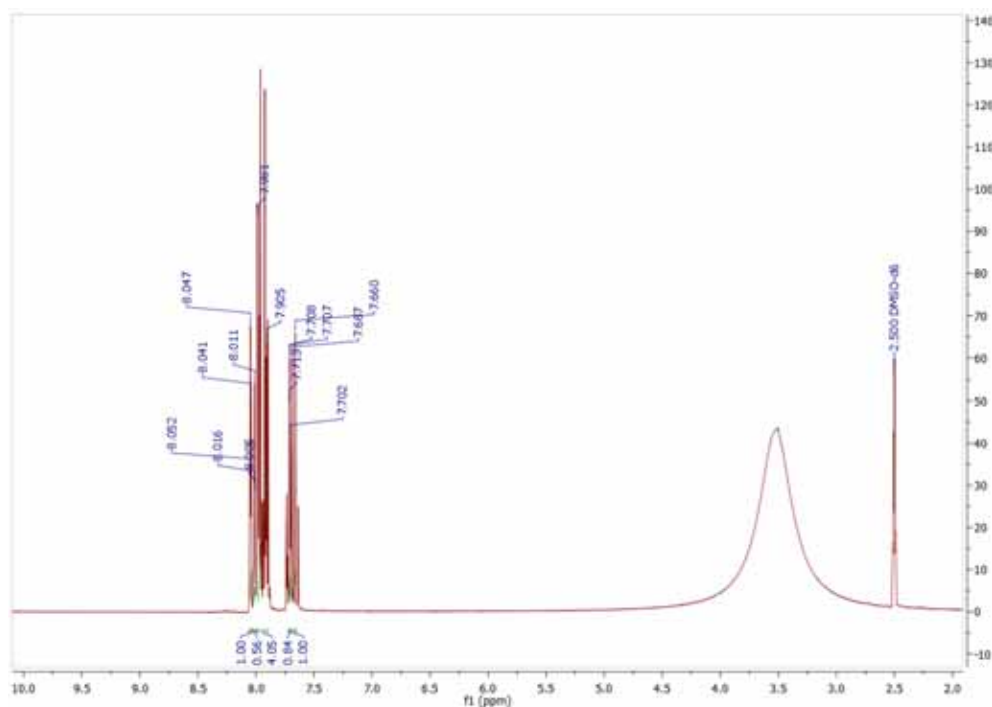
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3468,0\text{ cm}^{-1}$; ν C-H aromático = $3086,1\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1774,5\text{ cm}^{-1}$ e $1724,3\text{ cm}^{-1}$; ν C=O ácido carboxílico = $1701,2\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1589,3\text{ cm}^{-1}$ e $1458,1\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C $1379,1\text{ cm}^{-1}$.

No espectro de RMN ^1H (Espectros 9 e 10) observa-se um multipeto entre δ 7,99 - 7,89 referente aos hidrogênios do sistema aromático, H_1 e H_2 . Nos deslocamentos δ 8,05 e 8,01 observam-se os hidrogênios referentes ao H_6 e H_8 respectivamente. Em δ 7,70 e 7,67 encontram-se os hidrogênios H_{10} e H_9 , respectivamente.

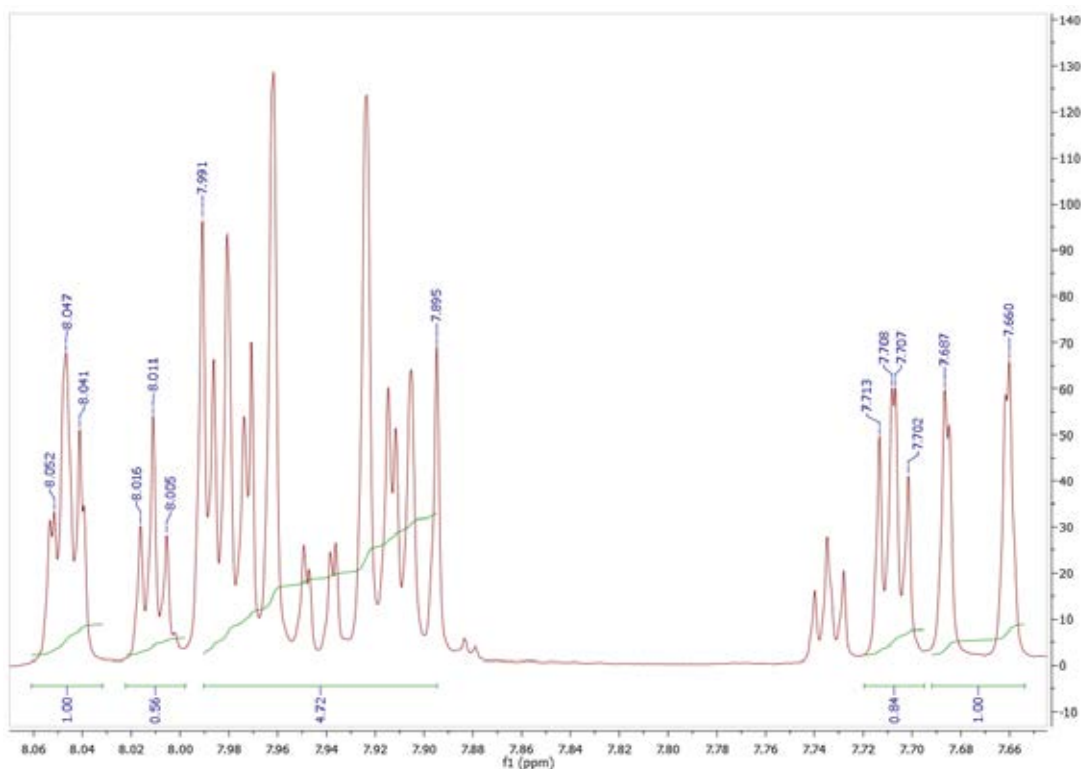
No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 11) destaca-se os deslocamentos referentes às carbonilas C_4 e C_{11} , respectivamente em δ 166,971 e δ 166,732.

Além desses sinais, são observados deslocamentos químicos referentes ao C_2 em δ 134,832, C_7 em δ 132,295, C_3 em δ 131,720, C_6 e C_8 em δ 131,643, C_9 em δ 129,289, C_5 em δ 128,798, C_{10} em δ 128,137 e C_1 em δ 123,565.

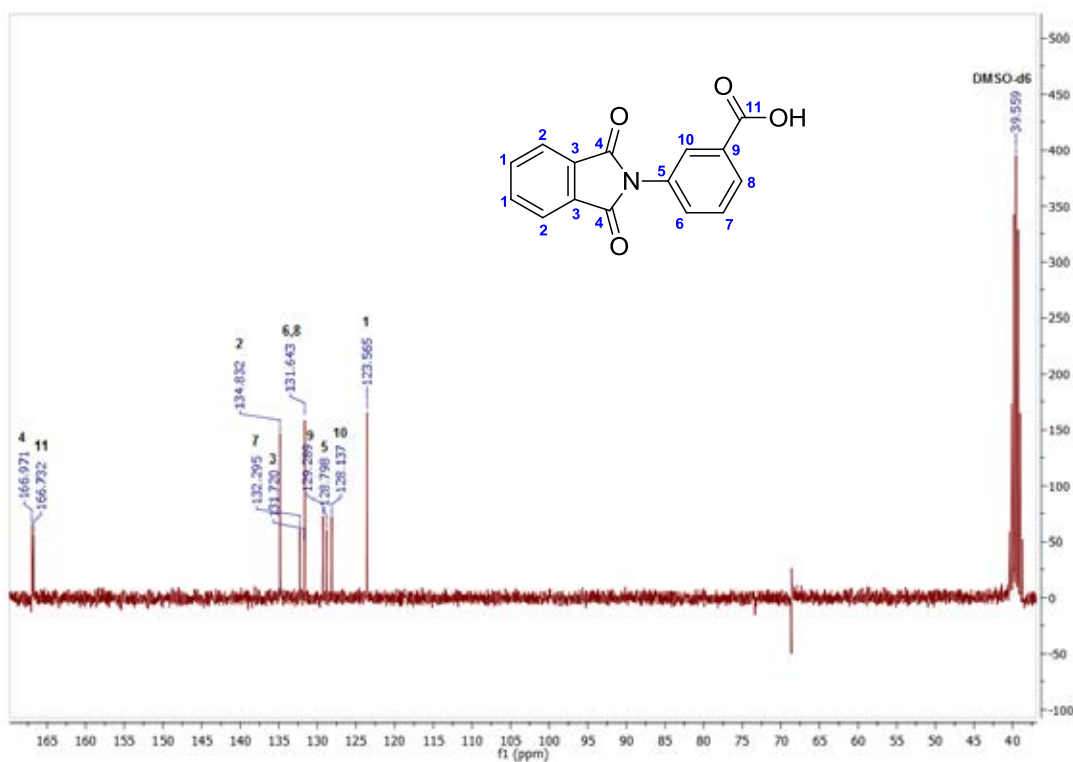
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,05 (H_6 ; $J_{\text{meta}} = 1,5\text{ Hz}$; 1H); 8,01 (H_8 ; $J_{\text{meta}} = 1,5\text{ Hz}$; 1H); 7,905 – 7,981 (m; H_1 e H_2 ; 4H); 7,70 (H_{10} ; $J_{\text{orto}} = 7,75\text{ Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,5\text{ Hz}$; 1H); 7,67 (H_9 ; $J_{\text{orto}} = 8,1\text{ Hz}$; 1H) ppm.



Espectro 9. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**3**) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)



Espectro 10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**3**) (RMN ^1H ; 300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) – ampliação região aromática



Espectro 11. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**3**) (RMN ^{13}C ; 75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

6.1.2 Síntese dos compostos finais derivados de prednisolona e budesonida

Após a obtenção dos intermediários ftalimídicos adequadamente funcionalizados, foram realizadas reações de acoplamento aos glicocorticoides selecionados: prednisolona e budesonida.

A metodologia para as sínteses dos híbridos foi baseada em Santos & Chung (2011), com algumas alterações a fim de obter a otimização do procedimento.

As reações tiveram como solvente o diclorometano anidro e foram realizadas em diversos tempos, a fim de obter o tempo ideal para o maior rendimento. Após repetir o procedimento por várias vezes, definiu-se 24h como o melhor tempo para a reação. Na reação foram substituídos os agentes acoplantes dicicloexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) pelos agentes acoplantes 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e diisopropilcarbodiimida (DIC), devido a maior facilidade de retirar os subprodutos do DIC em relação ao DCC.

O 1-hidroxibenzotriazol e o diisopropilcarbodiimida são importantes agentes acoplantes e muito utilizados em reações de formação de ésteres e amidas pela sua capacidade de ativar o ácido carboxílico.

Utilizando a metodologia segundo Santos & Chung, onde o tempo de reação era de no máximo 5 horas, o rendimento obtido foi inferior aos valores encontrados com um tempo de 24h, e ainda, devido a reação não ser completa, havia a uma grande quantidade dos reagentes no produto final. O procedimento também previa uma extração com uma solução de bicarbonato 0,02M, porém como não havia mudanças quanto a pureza do produto, essa etapa foi eliminada e após a evaporação a pressão reduzida seguiu-se diretamente para a purificação em coluna cromatográfica.

Os produtos finais foram obtidos após purificação com rendimentos entre 40-80% (Tabela 5).

Dentre os derivados de prednisolona, não se alcançou rendimentos maiores do que os previstos por Santos & Chung (2011). Houve otimização apenas do intermediário ftalimídico 3, obtendo um rendimento de 83%, superior ao descrito na literatura (78%).

É importante ressaltar que os mesmos procedimentos realizados para os derivados de prednisolona foram adotados para os derivados de budesonida, apenas com as adequações referentes à massa molar das substâncias. O procedimento foi reproduzível para os híbridos de

budesonida, resultando em um rendimento (70-80%) superior ao obtido para os híbridos de prednisolona.

Esse resultado significadamente superior dos derivados de budesonida é explicado pela menor formação de subprodutos na síntese desses compostos, resultando em uma purificação mais fácil, além das propriedades de solubilidade que permitiram uma reação mais completa.

Tabela 5: Rendimentos dos compostos sintetizados

Composto	Rendimento (%)
Intermediários Ftalimídicos	
Intermediário 1	59,0
Intermediário 2	71,1
Intermediário 3	83,0
Derivados de Prednisolona	
Composto I	40,0
Composto II	40,0
Composto III	48,0
Derivados de Budesonida	
Composto IV	80,0
Composto V	70,0
Composto VI	80,0

A obtenção dos compostos I-VI se deu a partir da reação entre os derivados ftalimídicos devidamente funcionalizados (1-3) e a prednisolona ou budesonida em diclorometano anidro, a temperatura ambiente por 24 h.

Quanto à caracterização estrutural dos compostos no espectro de infravermelho, deve-se observar os estiramentos referentes ao sistema imídico, que ocorre por volta de 1775-1780 cm^{-1} , os estiramentos das carbonilas do sistema imídico, o estiramento da hidroxila acima de 3300 cm^{-1} e a carbonila referente ao éster, na região acima de 1660 cm^{-1} .

Pouco pode se informar quanto à caracterização estrutural dos compostos utilizando apenas a espectroscopia de infravermelho.

Dessa forma, os compostos obtidos foram caracterizados também por RMN ^1H e ^{13}C , os quais estão apresentados detalhadamente a seguir, juntamente com as suas respectivas constantes de acoplamento. A confirmação da massa molecular dos compostos foi possível

através das análises realizadas em espectroscopia de massas.

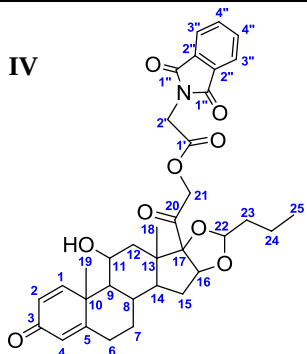
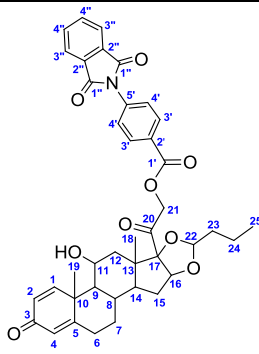
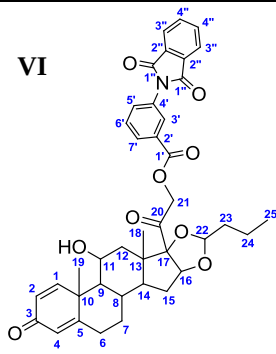
Os resultados indicaram a formação dos 6 compostos finais propostos nesse trabalho. Nos espectros de RMN ^1H dos 6 produtos pode-se observar a presença do multiplete na região aromática referente aos 4 hidrogênios da subunidade ftalimídica da molécula, além dos outros deslocamentos referentes a porção glicocorticoide.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos derivados de budesonida apresentam diferença em relação aos de prednisolona nas substituições 16 e 17, obtendo maiores deslocamentos pela proximidade aos átomos de oxigênio, ausentes na prednisolona.

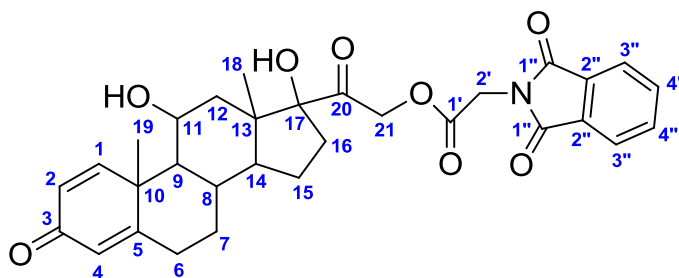
A Tabela 6 apresenta os principais deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para os compostos IV, V e VI. Observa-se que a diferença dos deslocamentos químicos refere-se ao hidrogênio e carbono 2', devido a diferença estrutural dos espaçadores utilizados.

A caracterização completa dos compostos, separadamente e com todos os deslocamentos químicos, pode ser encontrada nos tópicos seguintes.

Tabela 6. Principais deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos VI, V e VI

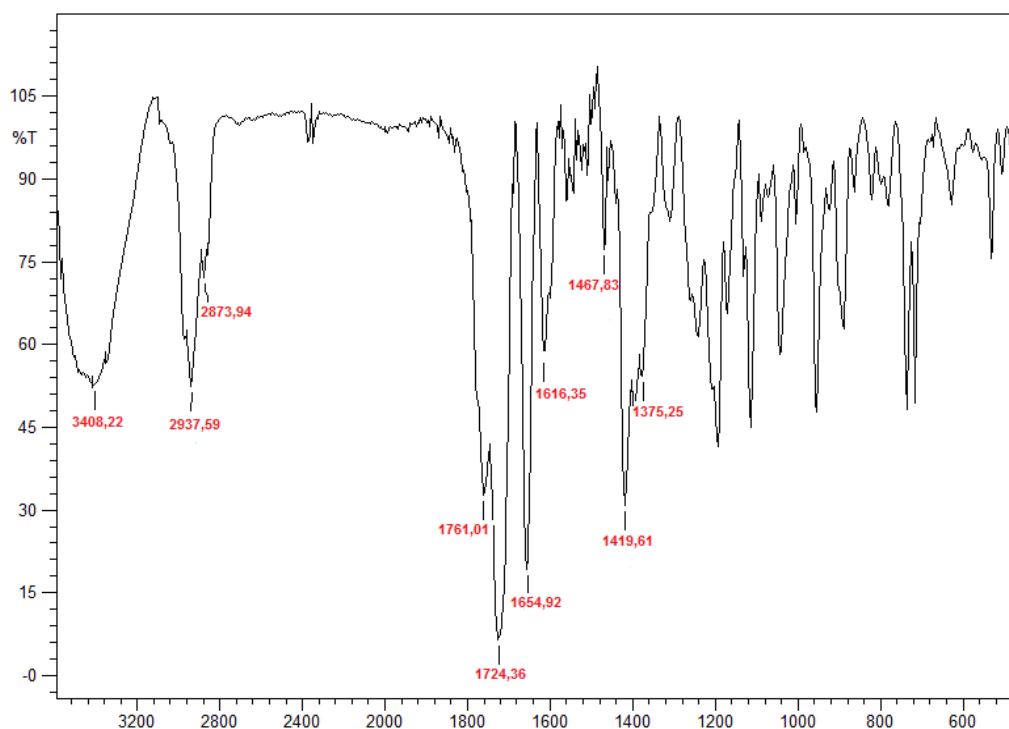
	IV		V		VI	
						
Posição	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
3	-	185,23	-	185,19	-	185,19
16	4,616	81,30	4,747	81,33	4,739	81,33
17	-	97,25	-	97,38	-	97,37
20	-	202,63	-	201,65	-	201,62
22	4,781	82,50	4,889	82,57	4,874	82,55
1'	-	170,28	-	170,24	-	170,22
2'	4,551	68,10	-	136,60	-	132,50
1''	-	167,21	-	166,61	-	166,86
2''	-	131,33	-	131,49	-	132,41
3''	7,879 – 7,962	135,01	7,915-8,014	134,93	7,904–7,999	134,80
4''	7,879 – 7,962	123,57	7,915-8,014	123,62	7,904–7,999	123,52

6.1.2.1 Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 1 (composto I)



Na caracterização estrutural do composto I, observa-se no espectro no infravermelho (Espectro 12) o estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, presente em $1375,25\text{ cm}^{-1}$. Outros estiramentos importantes são: estiramento da hidroxila (O-H) em $3408,22\text{ cm}^{-1}$ e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico em $1761,01\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$.

ν O-H = $3408,22\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2937,59$ e $2873,94\text{ cm}^{-1}$; ν C=O_{imida} (simétrico e assimétrico) = $1761,01\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1654,92\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1616,35\text{ cm}^{-1}$ e $1467,83\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1375,25\text{ cm}^{-1}$.

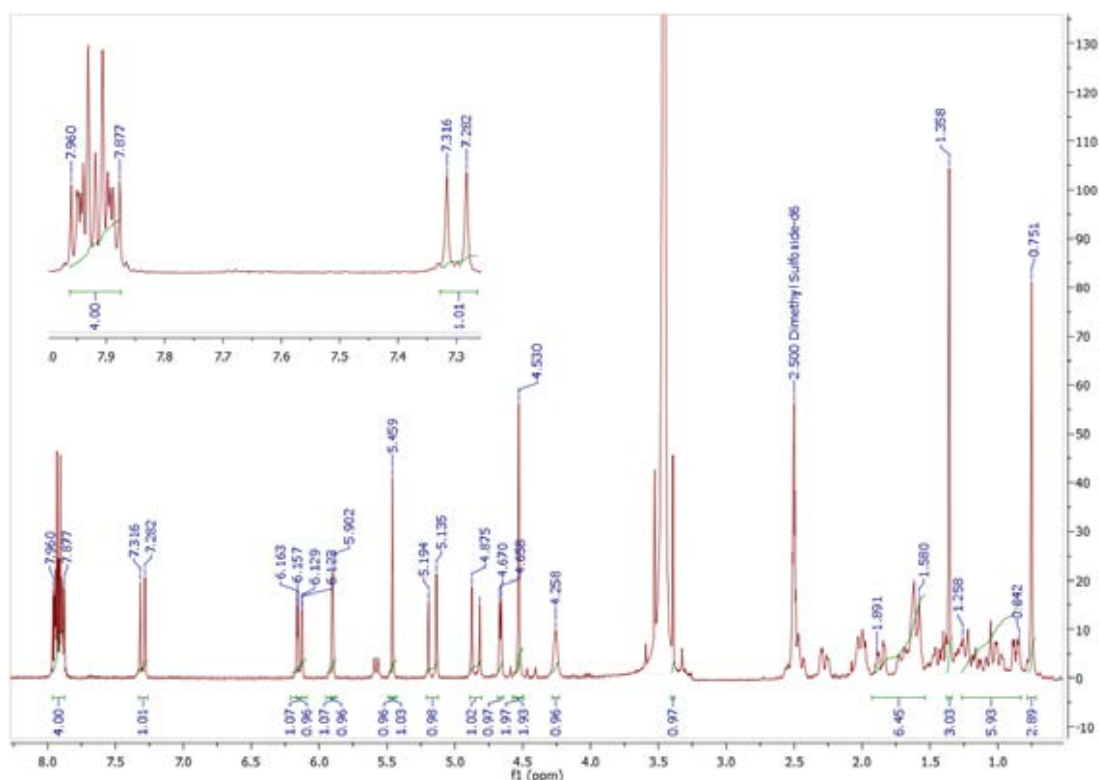


Espectro 12. Espectro no infravermelho do composto I

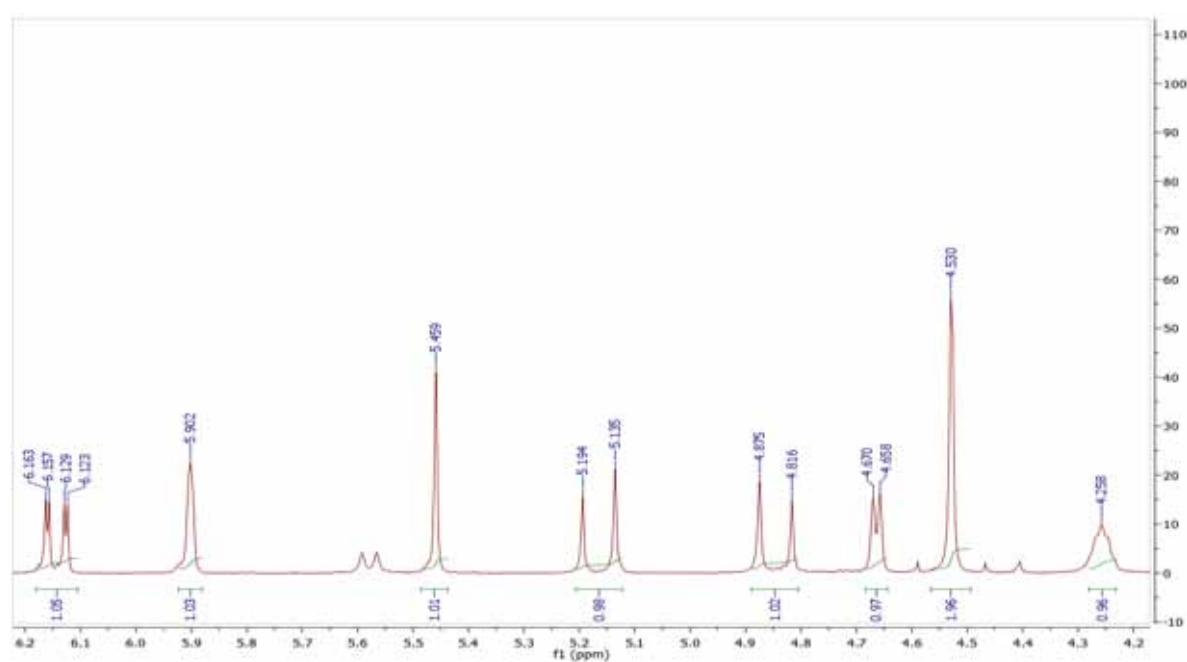
O espectro de RMN de ^1H (Espectros 13 e 14) apresenta os sinais referentes aos hidrogênios presentes na molécula e as respectivas constantes de acoplamento.

Os hidrogênios referentes à subunidade ftalimídica da molécula absorvem em δ 7,877-7,960 (H_4'' e H_3'') como um multipeto (m), integrando para 4 H. Observa-se que as carbonilas presentes na molécula influenciam diretamente no deslocamento dos hidrogênios próximos a esse grupamento. Como exemplos têm-se o hidrogênio 2 (H_2), o qual absorve em 6,143 como um duplo-dubeto (dd), integrando para 1 H com constantes de acoplamento de $J_{\text{orto}} = 10,2$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz.

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 7,877-7,960 (m; H_4'' e H_3'' ; 4H); 7,299 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; 1H); 6,143 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); 5,902 (s; H_4 ; 1H); 5,459 (s; H_{21} ; 2H); 5,164 (d; OH; 1H); 4,845 (d; OH; 1H); 4,530 (s; H_2 ; 2H); 4,277-4,235 (m; H_{11} ; 1H); 1,580-1,890 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); 0,843-1,258 (m; H_{16} , H_{12} , H_6 ; 6H); 1,358 (s; H_{19} ; 3H); 0,751 (s; H_{18} ; 3H) ppm.



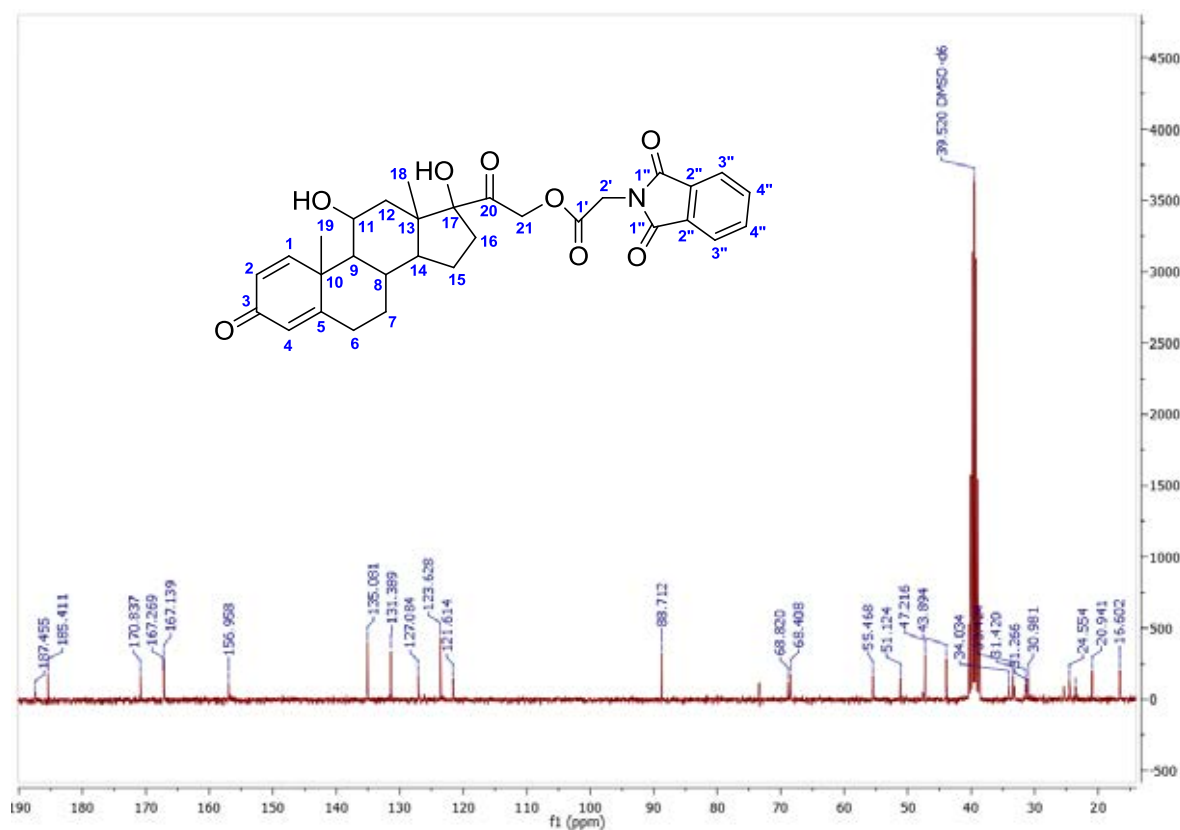
Espectro 13. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)



Espectro 14. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I – ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

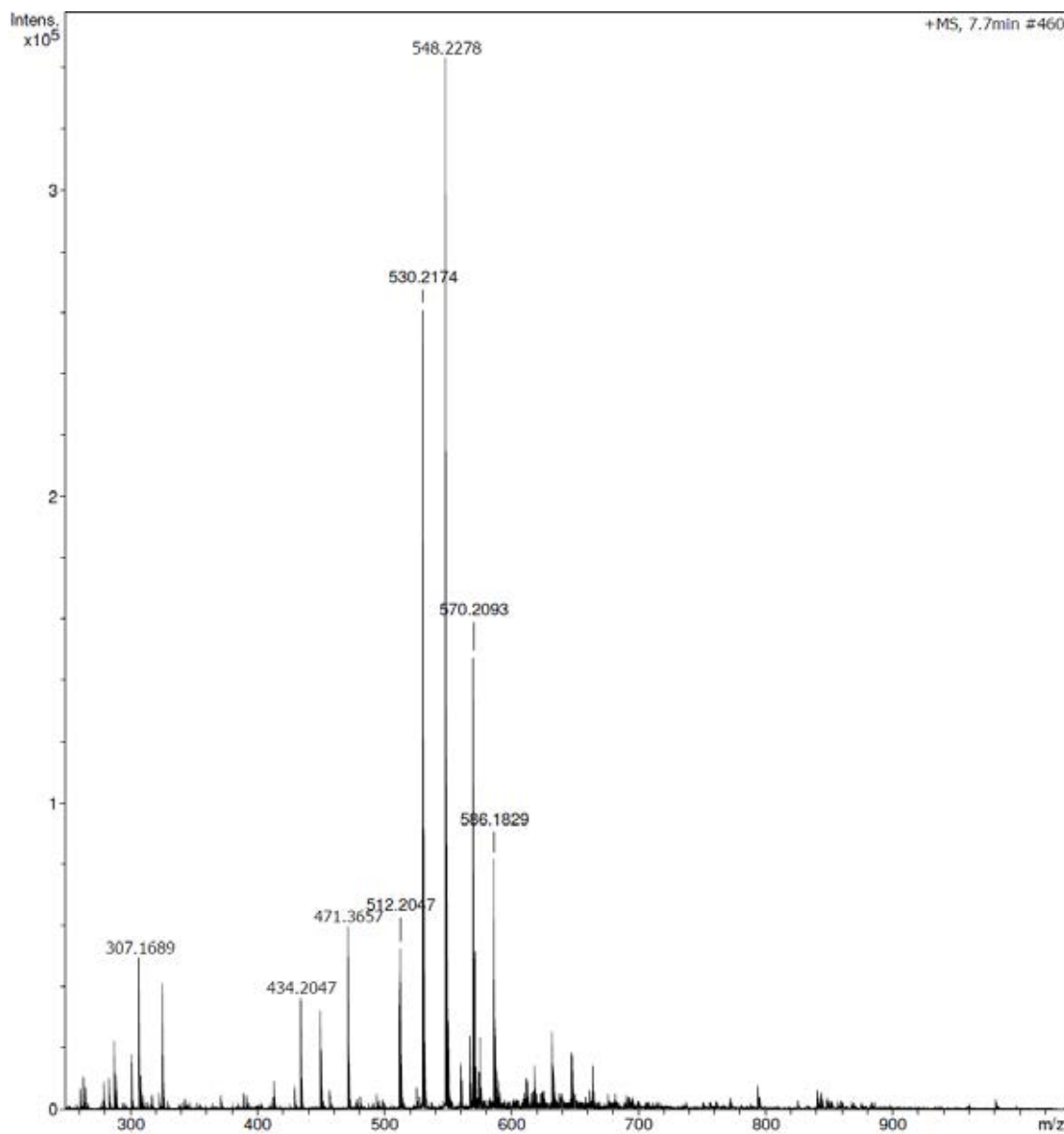
Observa-se no espectro de ^{13}C (Espectro 15) que as carbonilas da molécula apresentam maior deslocamento, os valores encontrados são: δ 187,455 (C_{20}); 185,411 (C_3); 170,837 (C_1''); 167,269 (C_1'). Os demais deslocamentos estão descritos abaixo.

RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO-d_6): δ 187,455 (C_{20}); 185,411 (C_3); 170,837 (C_1''); 167,269 (C_1'); 167,139 (C_5); 156,958 (C_1); 135,081 (C_3''); 131,389 (C_2''); 127,084 (C_2); 123,628 (C_4''); 121,614 (C_4); 88,712 (C_{17}); 68,820 (C_{21}), 68,408 (C_2'); 55,486 (C_9); 51,124 (C_{14}); 47,216 (C_{13}); 43,894 (C_{10}), 34,034 (C_{11}), 33,424 (C_{12}), 31,420 (C_{16}), 31,266 (C_6), 30,981 (C_7), 24,554 (C_8), 23,557 (C_{15}), 20,941 (C_{19}), 16,602 (C_{18}) ppm.



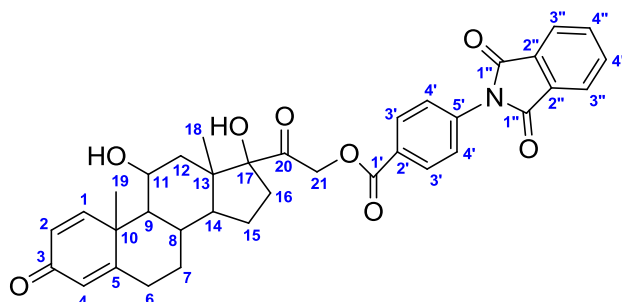
Espectro 15. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO-d_6)

O espectro de massas de alta resolução (microTOF-QII-ESI-TOF) do composto I (Espectro 16), obtido pelo modo positivo, apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de m/z 548,2278 e 570,2093, respectivamente, que são consistentes com base na fórmula molecular $C_{31}H_{33}NO_8$ e m/z 547,22.



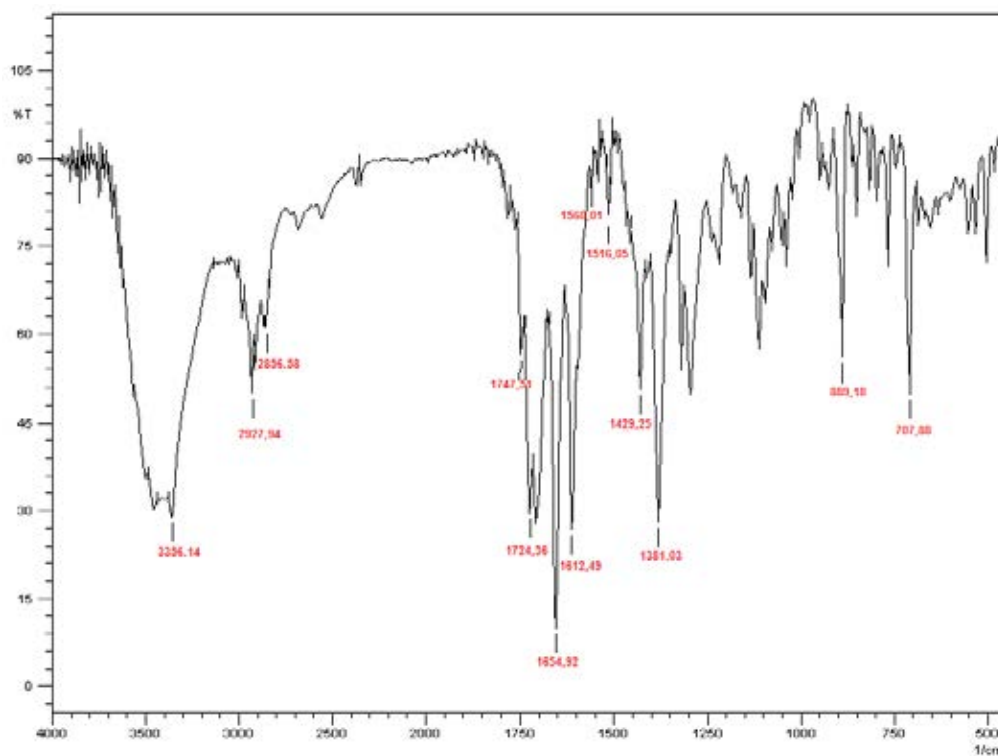
Espectro 16. Espectro de massas, modo positivo, do composto I

6.1.2.2 Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 2 (composto II)



No espectro no infravermelho do composto II (Espectro 17), observa-se o estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, presente em $1381,03\text{ cm}^{-1}$. Outros estiramentos importantes são: estiramento da hidroxila (O-H) em $3356,14\text{ cm}^{-1}$ e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico em $1747,51\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$.

Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3356,14\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2927,94$ e $2856,58\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1747,51\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1654,92\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1560,01\text{ cm}^{-1}$ e $1516,05\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1381,03\text{ cm}^{-1}$.

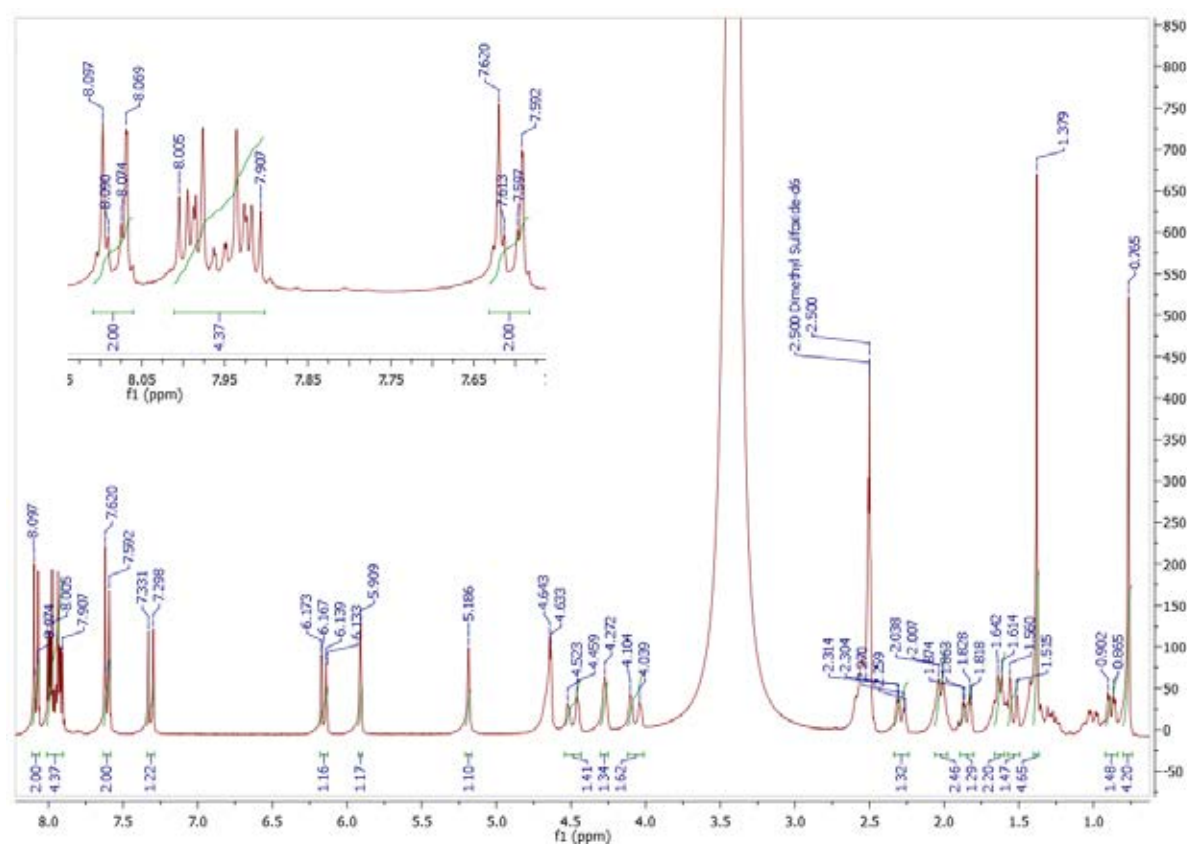


Espectro 17. Espectro no infravermelho do composto II

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 18) apresenta os sinais referentes aos hidrogênios presentes na molécula e as respectivas constantes de acoplamento.

Os hidrogênios referentes à subunidade ftalimídica da molécula absorvem em δ 7,907-8,005 (H_4'' e H_3'') como um multipeto (m), integrando para 4 H. Observa-se que as carbonilas presentes na molécula influenciam diretamente no deslocamento dos hidrogênios próximos a esse grupamento. Como exemplos têm-se o hidrogênio 2 (H_2), o qual absorve em 6,153 como um duplo-dubeto (dd), integrando para 1 H com constantes de acoplamento de $J_{\text{orto}} = 10,2$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz.

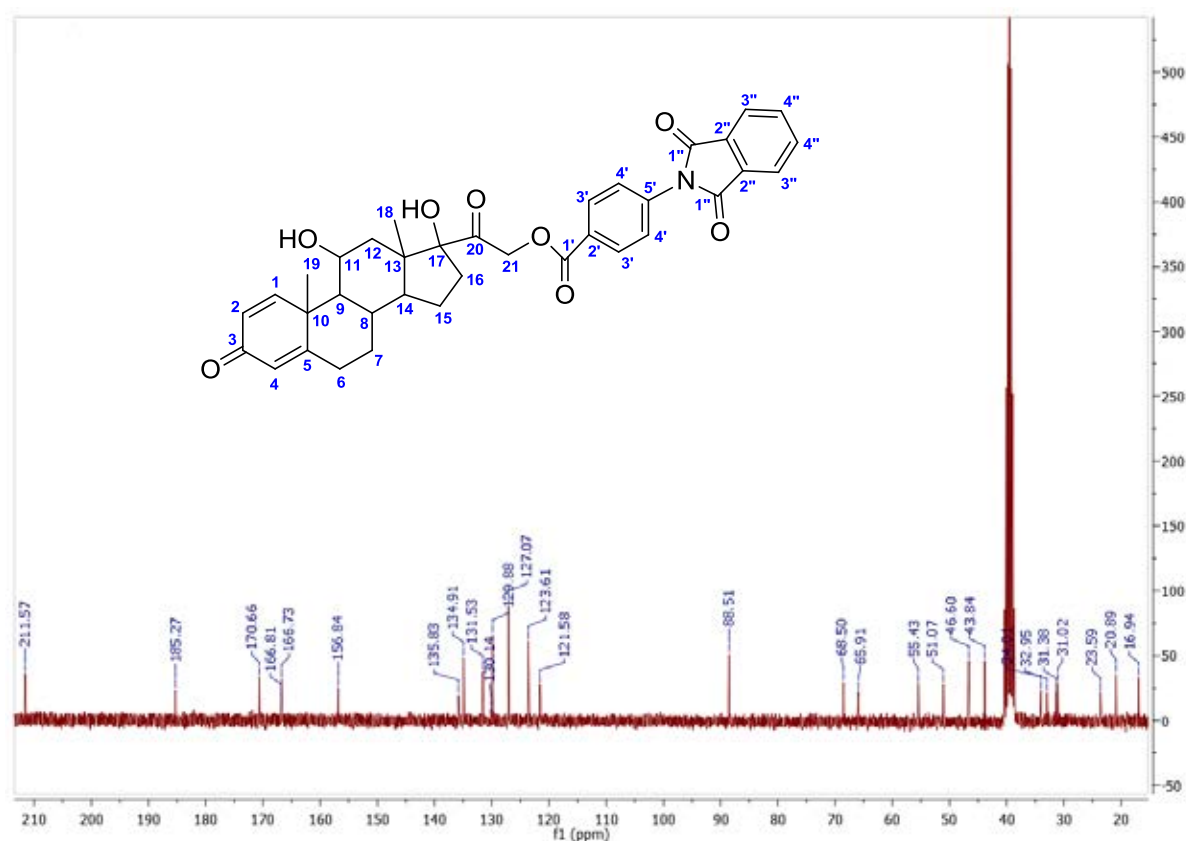
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,08 (dd; H_3' ; $J_{\text{orto}} = 8,4$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); δ 7,907-8,005 (m; H_4'' e H_3'' ; 4H); 7,60 (dd; H_4' ; $J_{\text{orto}} = 8,4$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 7,314 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; 1H); 6,153 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); 5,909 (s; H_4 ; 1H); 4,530 (s; H_5 ; 2H); 4,272 (m; H_{21} ; 2H); 1,580-1,890 (m; H_{17} , H_{18} , H_{12} , H_{11} ; 7H); 0,843-1,258 (m; H_{21} , H_{14} , H_9 ; 6H); 1,379 (s; H_6 ; 3H); 0,765 (s; H_{15} ; 3H) ppm.



Espectro 18. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

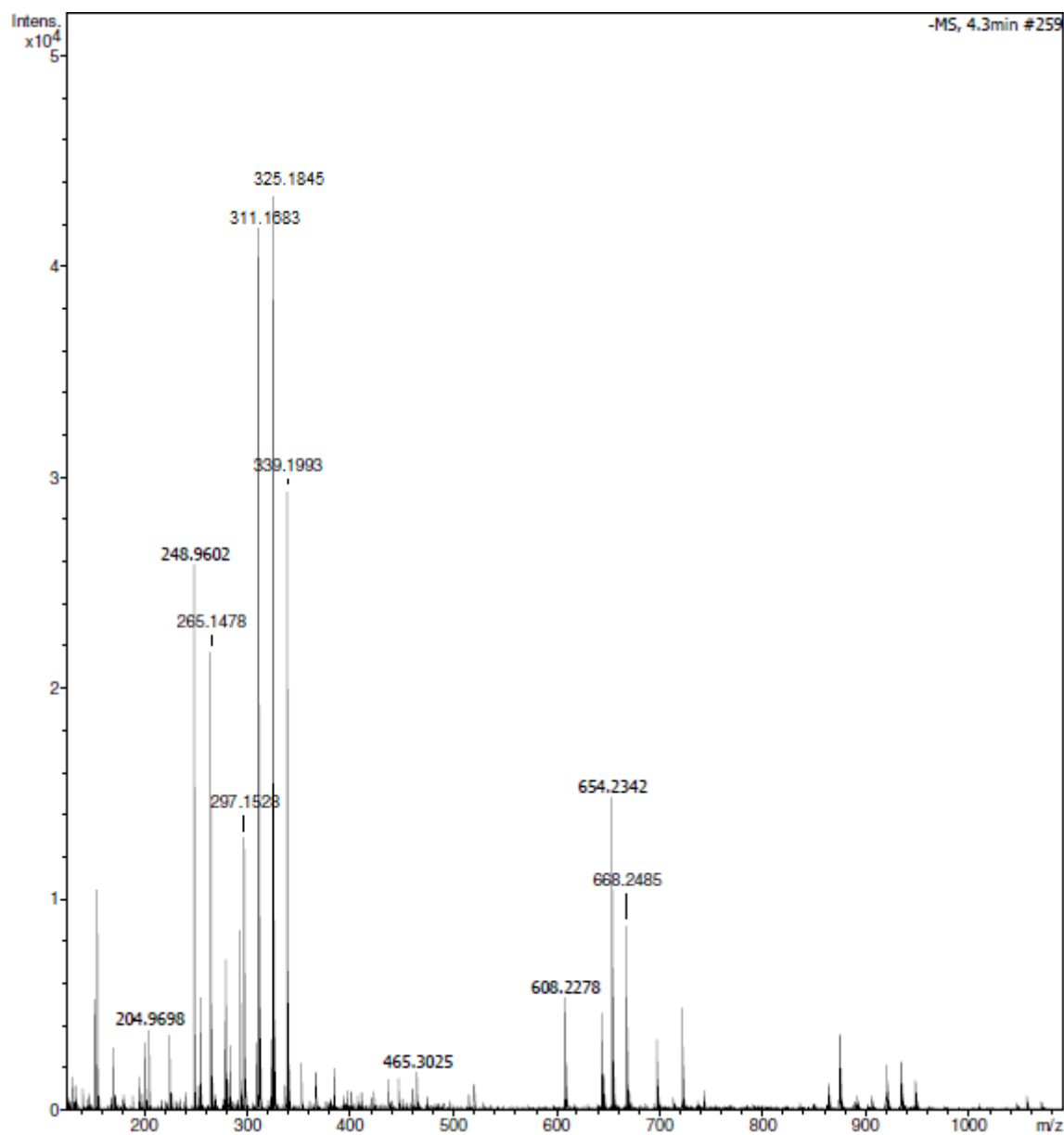
Observa-se no espectro de ^{13}C (Espectro 19) que as carbonilas da molécula apresentam maior deslocamento, os valores encontrados são: δ 211,57 (C_{20}); 185,27 (C_3); 166,81 ($\text{C}_{1''}$); 166,73 (C_1). Os demais deslocamentos estão descritos abaixo.

RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO-d_6): δ 211,57 (C_{20}); 185,27 (C_3); 170,66 ($\text{C}_{1'}$); 166,81 ($\text{C}_{1''}$); 166,73 (C_5); 156,84 (C_1); 134,91 ($\text{C}_{3''}$); 131,53 ($\text{C}_{2''}$); 130,14 ($\text{C}_{5'}$); 129,88 ($\text{C}_{3'}$); 127,07 ($\text{C}_{4'}$); 123,61 ($\text{C}_{4''}$); 121,58 (C_4); 88,51 (C_{15}); 68,50 (C_8); 65,91 (C_{17}); 55,43 (C_9); 51,07 (C_{18}); 46,60 (C_{12}); 34,01 (C_{14}); 32,95 (C_{10}); 31,02 (C_6); 23,59 (C_{13}); 20,89 (C_{11}); 16,94 (C_{19}) ppm.



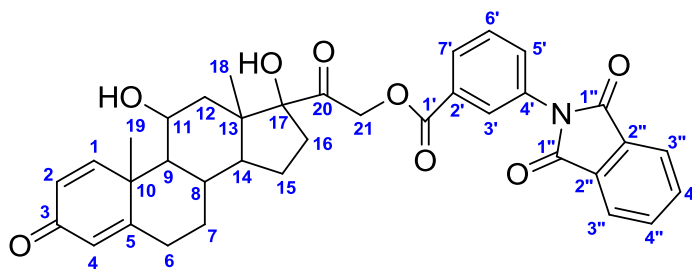
Espectro 19. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO-d_6)

O espectro de massas de alta resolução (microTOF-QII-ESI-TOF) do composto II (Espectro 20), obtido pelo modo negativo, apresentou o pico relativo ao íon $[M-H]^+$ com valor de m/z 608,2278, consistente com base na fórmula molecular $C_{36}H_{35}NO_8$ e m/z 609,66.



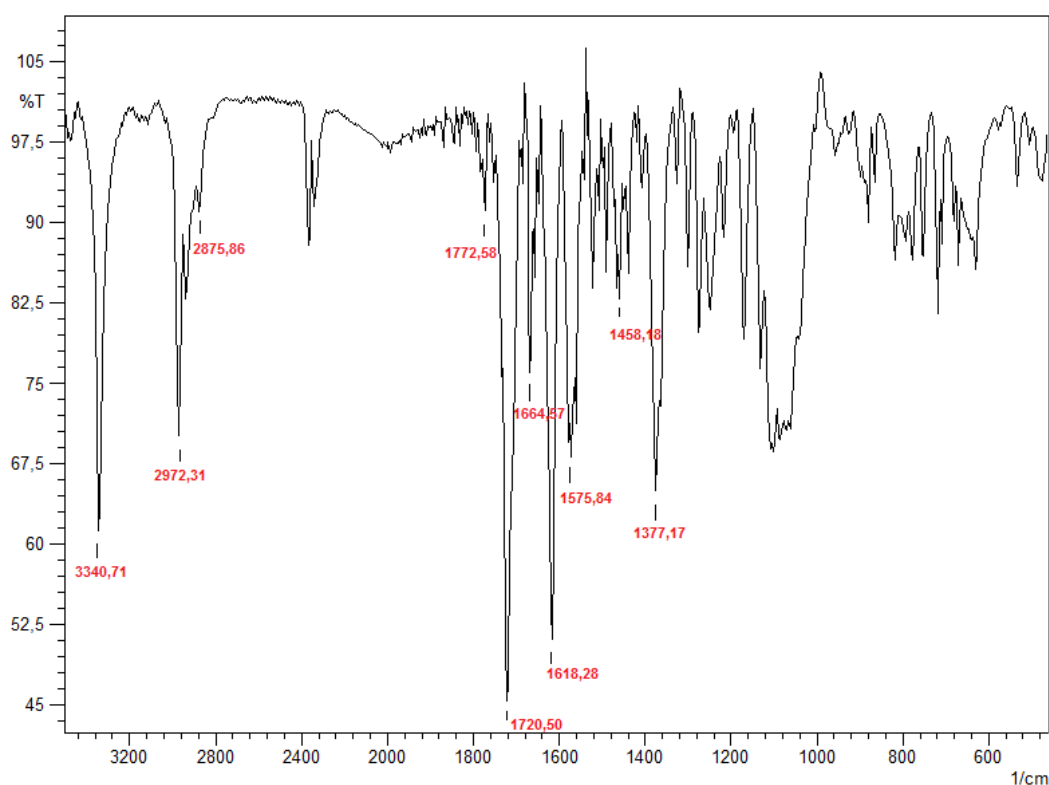
Espectro 20. Espectro de massas, modo negativo, do composto II

6.1.2.3 Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 3 (composto III)



Os principais estiramentos observados no espectro no infravermelho do composto III (Espectro 21) são: estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, presente em $1377,17\text{ cm}^{-1}$, estiramento da hidroxila (O-H) em $3340,71\text{ cm}^{-1}$ e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico em $1772,58\text{ cm}^{-1}$ e $1720,50\text{ cm}^{-1}$.

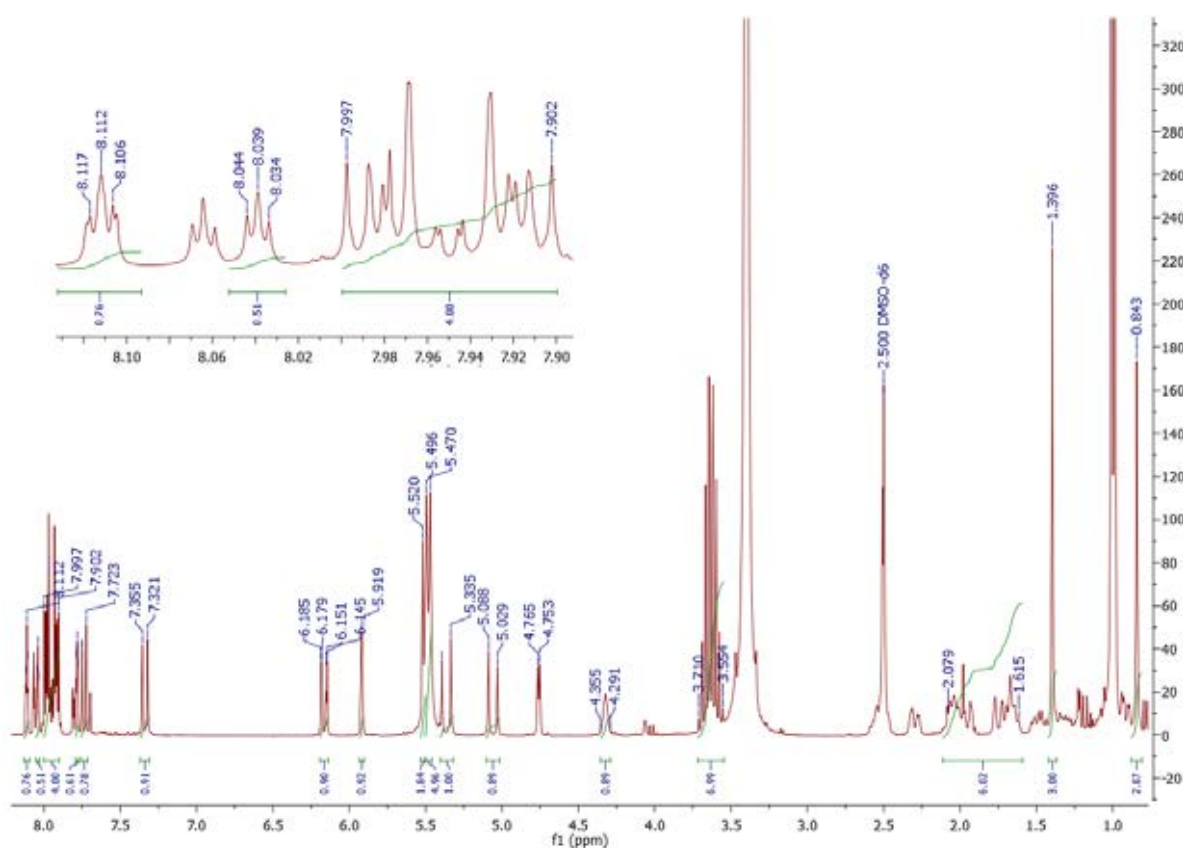
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3340,71\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2972,31$ e $2875,86\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1772,58\text{ cm}^{-1}$ e $1720,50\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1664,57\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1575,84\text{ cm}^{-1}$ e $1458,18\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1377,17\text{ cm}^{-1}$.



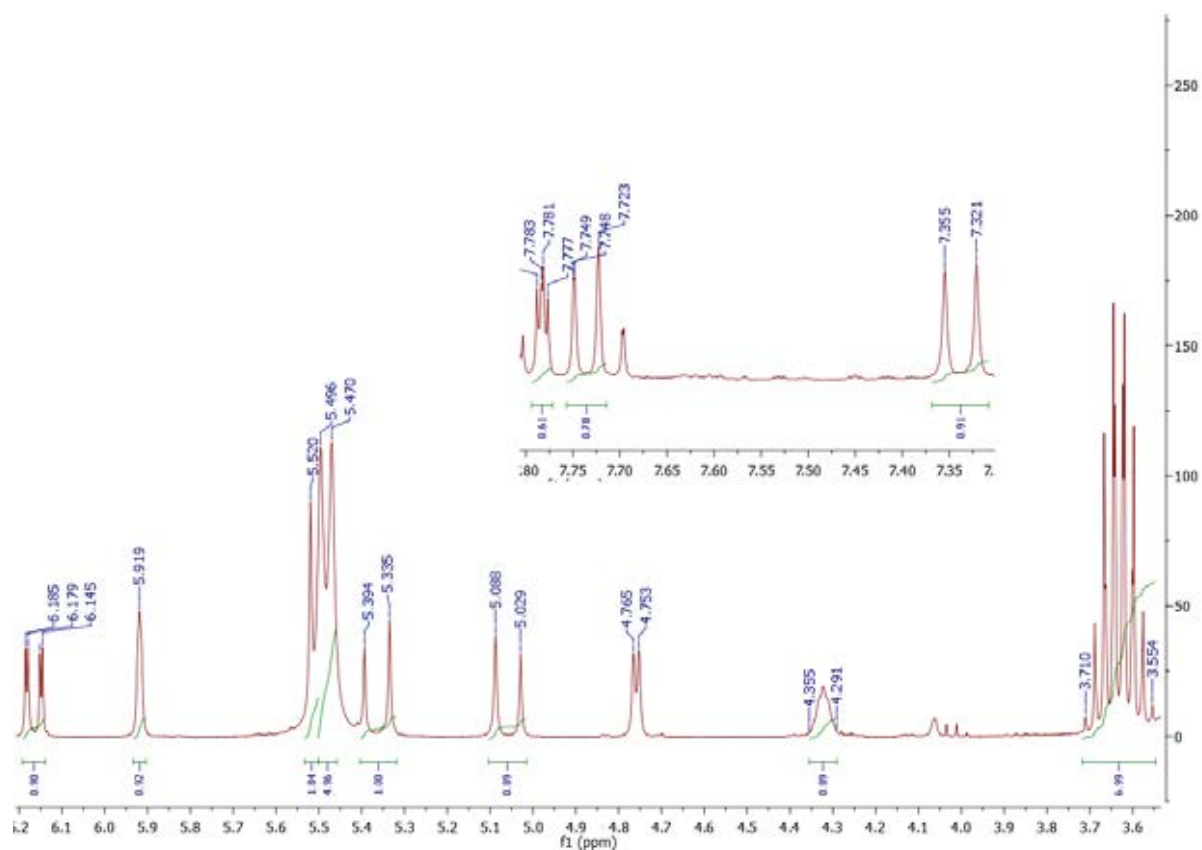
Espectro 21. Espectro no infravermelho do composto III

No espectro de RMN ^1H (Espectro 22 e 23), os hidrogênios referentes à subunidade ftalimídica da molécula absorvem em δ 7,997-7,902 (H_4'' e H_3'') como um multipeto (m), integrando para 4 H. No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 24), foi possível identificar todos os carbonos da molécula sintetizada.

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,111 (H_3 ; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); δ 8,039 (H_7 ; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); δ 7,902 – 7,997 (m; H_4'' e H_3'' ; 4H); δ 7,782 (H_5 ; $J_{\text{orto}} = 7,75$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); δ 7,736 (H_6 ; $J_{\text{orto}} = 7,8$ Hz; 1H); δ 7,338 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; 1H); δ 6,165 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); δ 5,919 (s; H_4 ; 1H); δ 5,520 (s; H_{21} ; 2H); δ 5,364 (d; OH; 1H); δ 5,058 (d; OH; 1H); δ 4,355-4,291 (m; H_{11} ; 1H); δ 3,710-3,555 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); δ 1,615-2,079 (m; H_{16} , H_{12} , H_6 ; 6H); δ 1,396 (s; H_{19} ; 3H); δ 0,843 (s; H_{18} ; 3H) ppm.

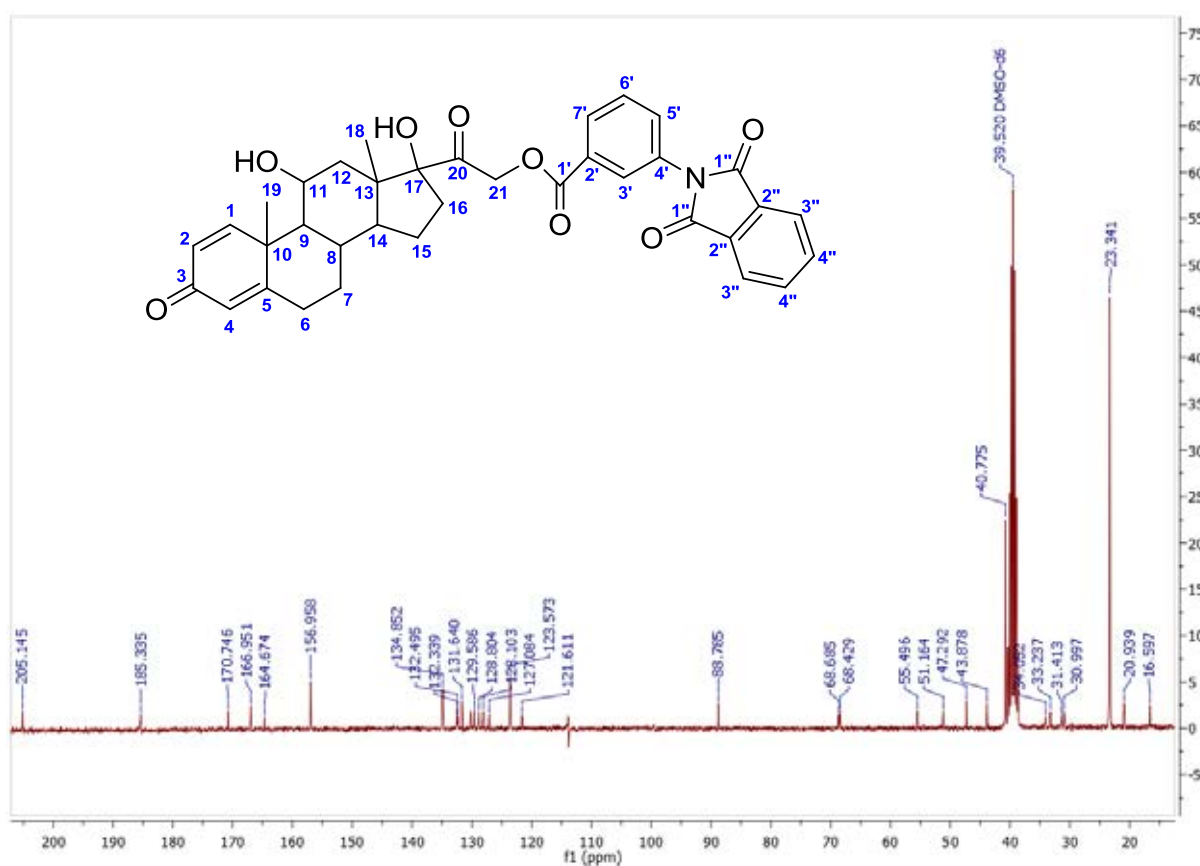


Espectro 22. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)



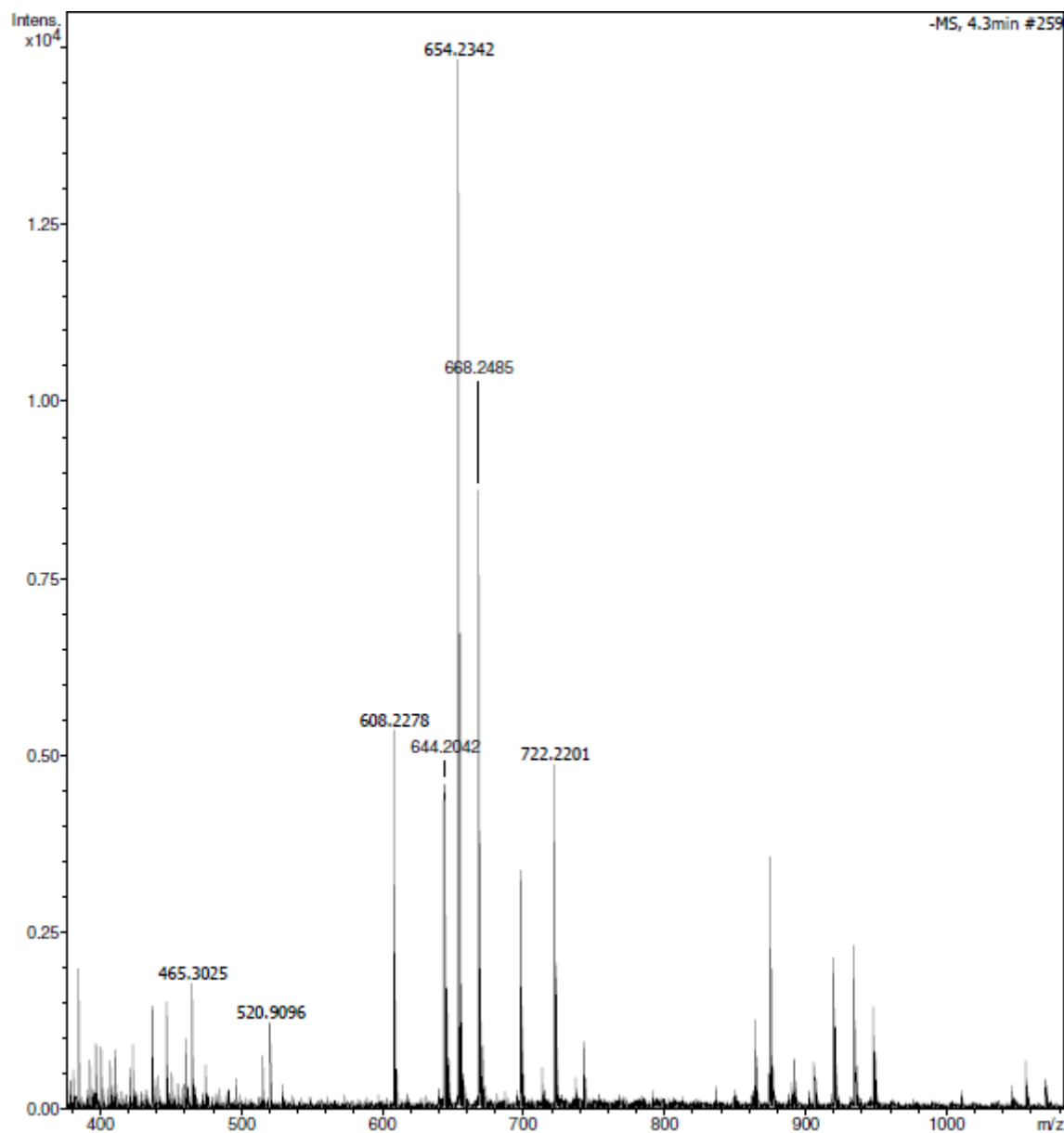
Espectro 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III - ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO-d₆): δ 205,145 (C₂₀); 185,335 (C₃); 170,746 (C₅); 166,951 (C_{1''}); 164,674 (C_{1'}); 156,958 (C₂); 134,852 (C_{3''}); 132,495 (C_{2'}); 132,339 (C_{2''}); 131,640 (C_{3'} e C_{7'}); 129,586 (C_{6'}); 128,804 (C_{4'}); 128,103 (C_{5'}); 127,084 (C₁); 123,573 (C_{4''}); 121,611 (C₄); 88,785 (C₁₇); 68,685 (C₁₁); 68,429 (C₂₁); 55,496 (C₉); 51,164 (C₁₄); 47,292 (C₁₃); 43,878 (C₁₀); 40,775 (C₁₂); 34,052 (C₁₆); 33,237 (C₆); 31,413 (C₇); 30,997 (C₈); 23,341 (C₁₅); 20,939 (C₁₉); 16,597 (C₁₈) ppm.



Espectro 24. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO-d₆)

O espectro de massas de alta resolução (microTOF-QII-ESI-TOF) do composto III (Espectro 25), obtido pelo modo negativo, apresentou o pico relativo ao íon $[M-H]^+$ com valor de m/z 608,2278, consistente com base na fórmula molecular $C_{36}H_{35}NO_8$ e m/z 609,66.

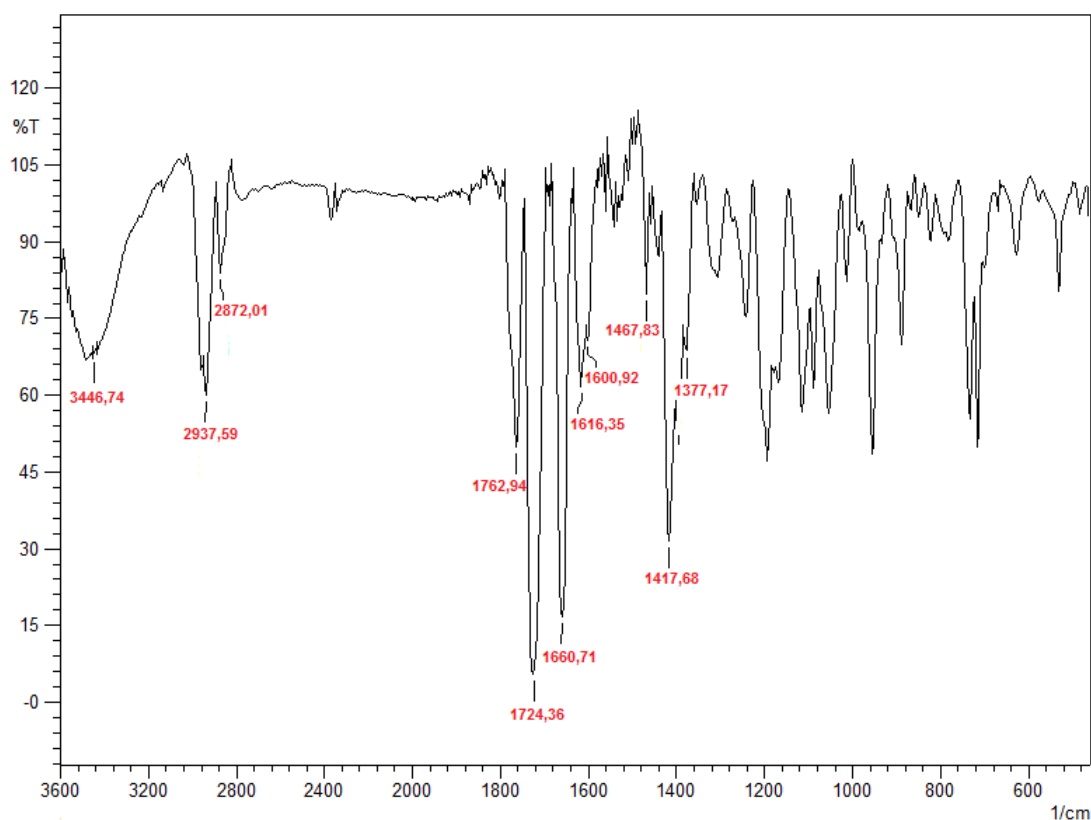


Espectro 25. Espectro de massas, modo negativo, do composto III

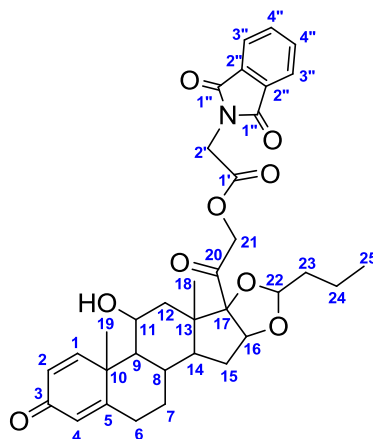
6.1.2.4 Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 4 (composto IV)

O derivado Lapdesf GL-FT 4 (composto IV) foi obtido através da metodologia utilizando diclorometano anidro, com um rendimento global de 80%. Através do espectro no infravermelho (Espectro 26) pode-se observar o estiramento axial C-N-C do anel ftalimídico em $1377,17\text{ cm}^{-1}$, indicando que o acoplamento do intermediário ftalimídico com a budesonida foi bem sucedido. A presença da subunidade ftalimídica é ainda comprovada pela presença das carbonilas de imida, em $1762,94\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$. Observa-se ainda o estiramento referente a hidroxila em $3446,74\text{ cm}^{-1}$.

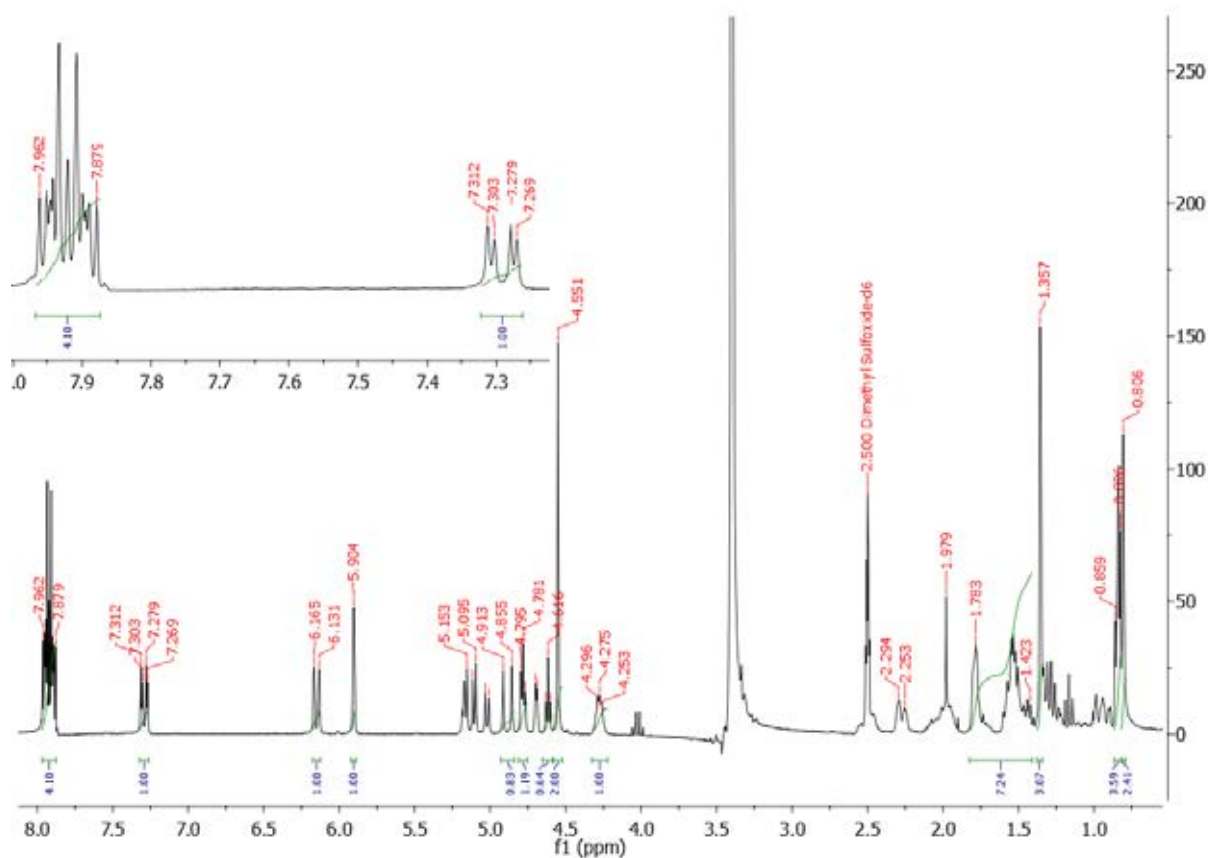
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3446,74\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2937,59$ e $2872,01\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1762,94\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1660,71\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1600,92\text{ cm}^{-1}$ e $1467,83\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1377,17\text{ cm}^{-1}$.



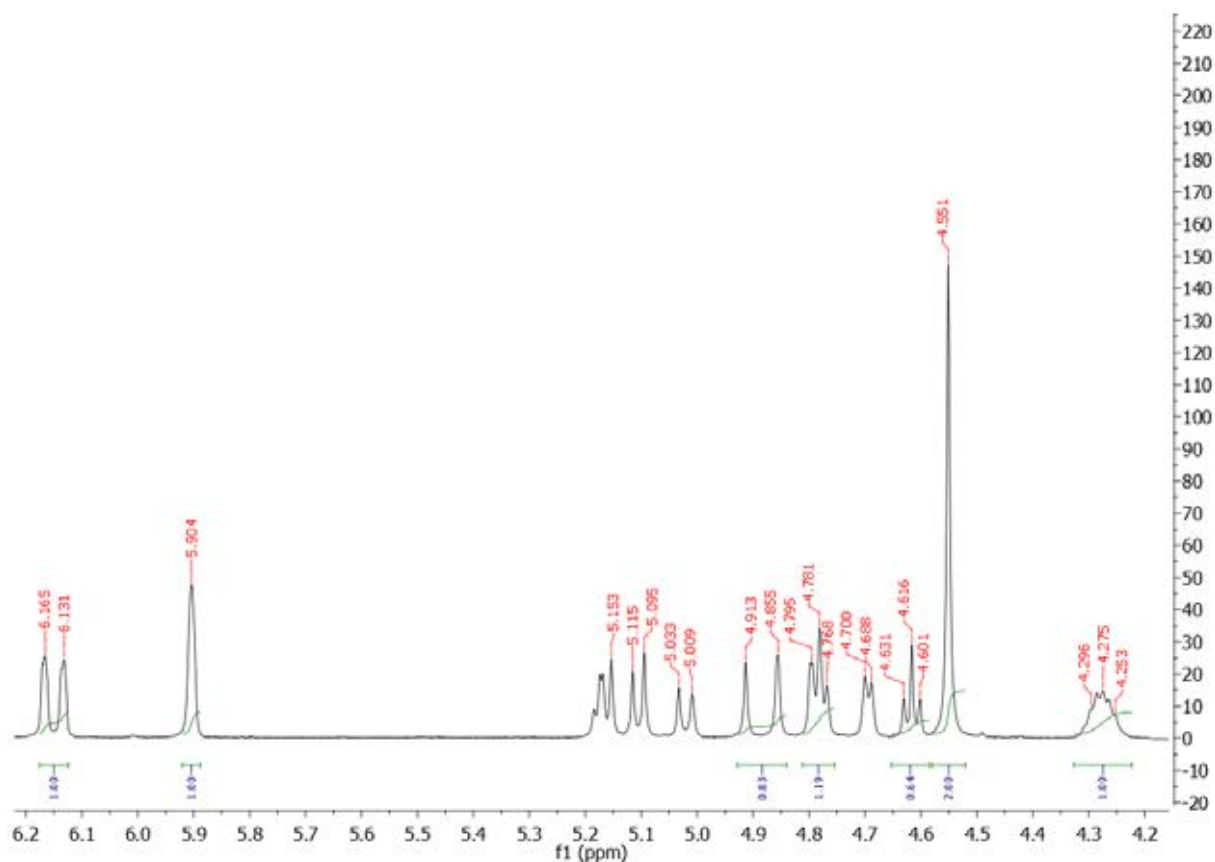
Espectro 26. Espectro no infravermelho do composto IV



RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 7,879 – 7,962 (m; $\text{H}_{4''}$ e $\text{H}_{3''}$; 4H); δ 7,290 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 9,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 2,7$ Hz; 1H); δ 6,148 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,2$ Hz; 1H); δ 5,904 (s; H_4 ; 1H); δ 4,884 (d; OH; 1H); δ 4,781 (t; H_{22} ; 1H); δ 4,616 (t; H_{16} ; 1H); δ 4,551 (s; H_2 ; 2H); δ 4,275 (s; H_{21} ; 2H); δ 1,783-1,423 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); δ 1,357 (s; H_{19} ; 3H); δ 0,859-0,826 (m; H_{23} , H_{12} ; 4H); δ 0,806 (s; H_{18} ; 3H) ppm.



Espectro 27. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV – ampliação região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)



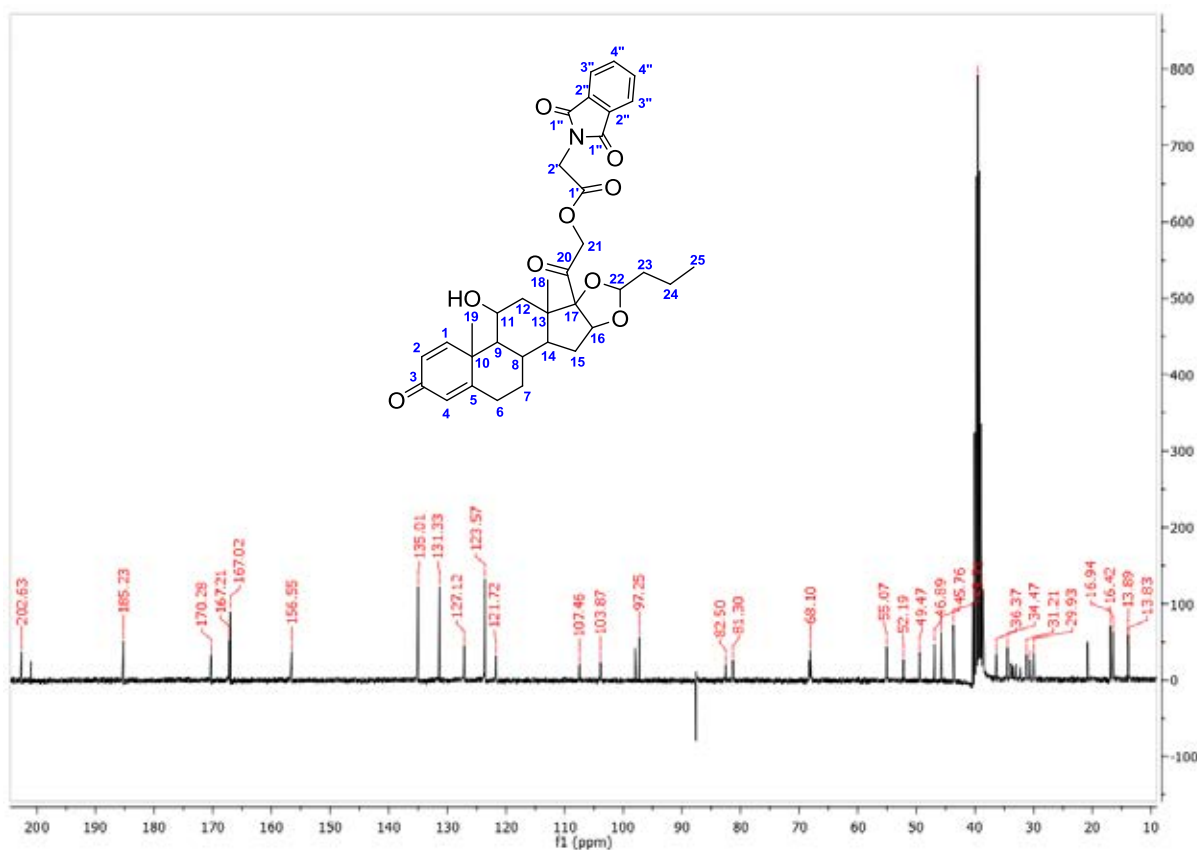
Espectro 28. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV - ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

Pelo espectro de RMN ^1H (Espectros 27 e 28), é possível identificar o deslocamento referente aos hidrogênios da subunidade ftalimídica da molécula, os quais absorvem em $\delta 7,96 - 7,87$ (H_4'' e H_3'') como um multipeto (m), integrando para 4 H.

Outra confirmação da presença da ligação C-N-C na molécula sintetizada é o deslocamento do CH_2 (H_2) em $\delta 4,55$, aparecendo como um singlete e integrando para 2 hidrogênios.

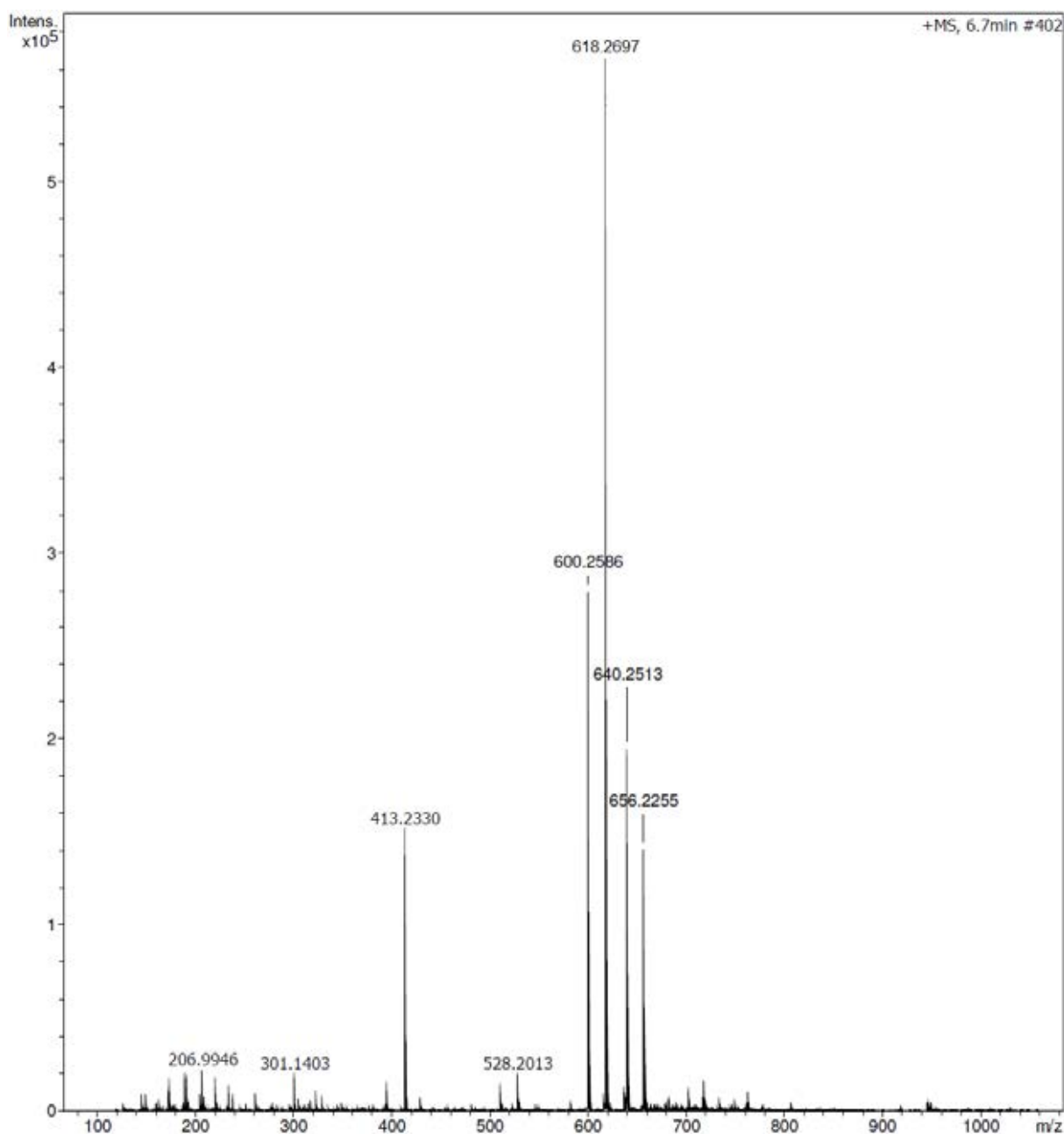
Já no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 29) foi possível observar todos os carbonos presentes na estrutura.

RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO- d_6): δ 202,63 (C_{20}); 185,23 (C_3); 170,28 ($\text{C}_{1'}$); 167,21 ($\text{C}_{1''}$); 167,02 (C_5); 156,55 (C_2); 135,01 ($\text{C}_{3''}$); 131,33 ($\text{C}_{2''}$); 127,12 (C_1); 123,57 ($\text{C}_{4''}$); 121,72 (C_4); 103,87 (C_{21}); 97,25 (C_{17}); 82,50 (C_{22}); 81,30 (C_{16}); 68,10 (C_2); 55,07 (C_9); 52,19 (C_{13}); 49,47 (C_{10}); 46,89 (C_{14}); 43,71 (C_{12}); 36,37 (C_{23}); 34,47 (C_8); 31,21 (C_6); 30,60 (C_{15}); 29,93 (C_7); 16,94 (C_{19}); 16,42 (C_{18}); 13,89 (C_{25}); 13,83 (C_{24}) ppm.



Espectro 29. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

O espectro de massas de alta resolução (microTOF-QII-ESI-TOF) do composto IV (Espectro 30), obtido pelo modo positivo, apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de m/z 618,2697 e 640,2513, respectivamente, que são consistentes com base na fórmula molecular $C_{35}H_{39}NO_9$ e m/z 617,69.



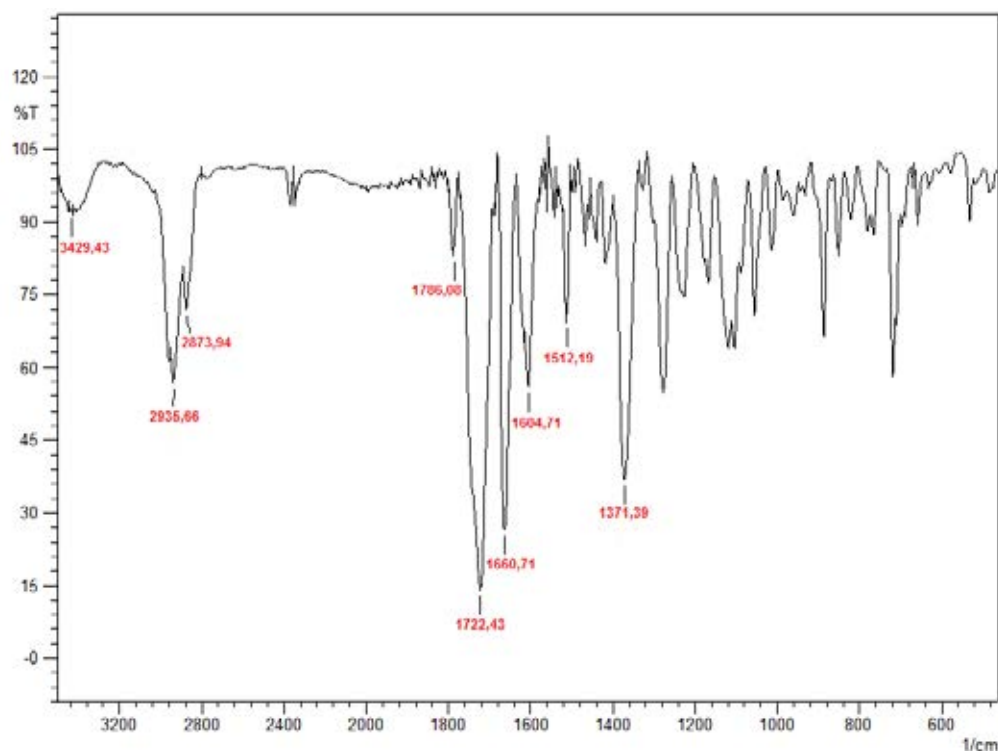
Espectro 30. Espectro de massas, modo positivo, do composto IV

6.1.2.5 Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 5 (composto V)

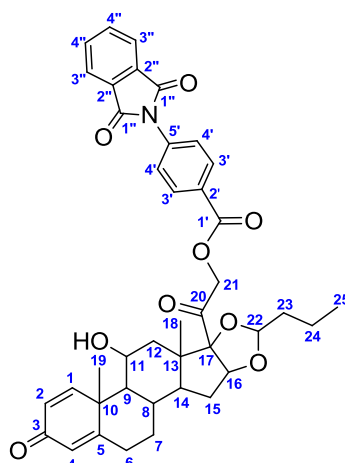
O derivado Lapdesf GL-FT 5 (composto V) foi obtido com um rendimento global de 70%. Através do espectro no infravermelho (Espectro 31) observa-se o estiramento axial C-N-C do anel ftalimídico em $1371,39\text{ cm}^{-1}$, indicando que o acoplamento do intermediário ftalimídico com a budesonida foi bem sucedido. A presença da subunidade ftalimídica é ainda comprovada pela presença das carbonilas de imida, em $1786,08\text{ cm}^{-1}$ e $1722,43\text{ cm}^{-1}$. Observa-se ainda o estiramento referente à hidroxila em $3429,43\text{ cm}^{-1}$.

Ademais, no espectro de RMN ^1H (Espectros 32 e 33) evidencia-se o multiplete do grupamento ftalimídico em 8,014-7,915, integrando em 4 hidrogênios, correspondendo a H_4'' e H_3'' .

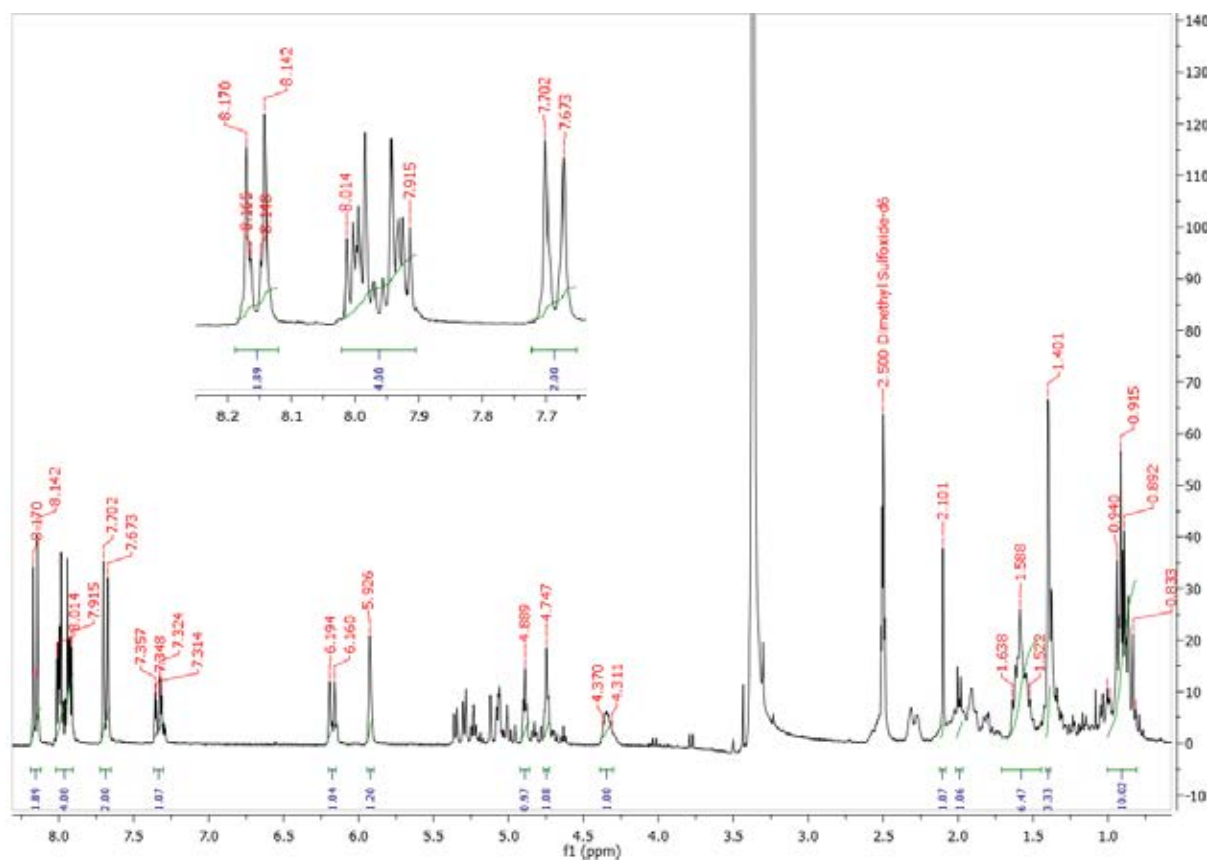
Infravermelho (pastilha de KBr): $\nu\text{ O-H} = 3429,43\text{ cm}^{-1}$; $\nu\text{ C-H}$ alquílico (simétrico e assimétrico) = $2935,66$ e $2873,94\text{ cm}^{-1}$; $\nu\text{ C=O}_{\text{imida}}$ (simétrico e assimétrico) = $1786,08\text{ cm}^{-1}$ e $1722,43\text{ cm}^{-1}$; $\nu\text{ C=O}_{\text{éster}} = 1660,71\text{ cm}^{-1}$; $\nu\text{ C=C}$ aromático = $1604,71\text{ cm}^{-1}$ e $1512,19\text{ cm}^{-1}$; $\nu\text{ C-N-C} = 1371,39\text{ cm}^{-1}$.



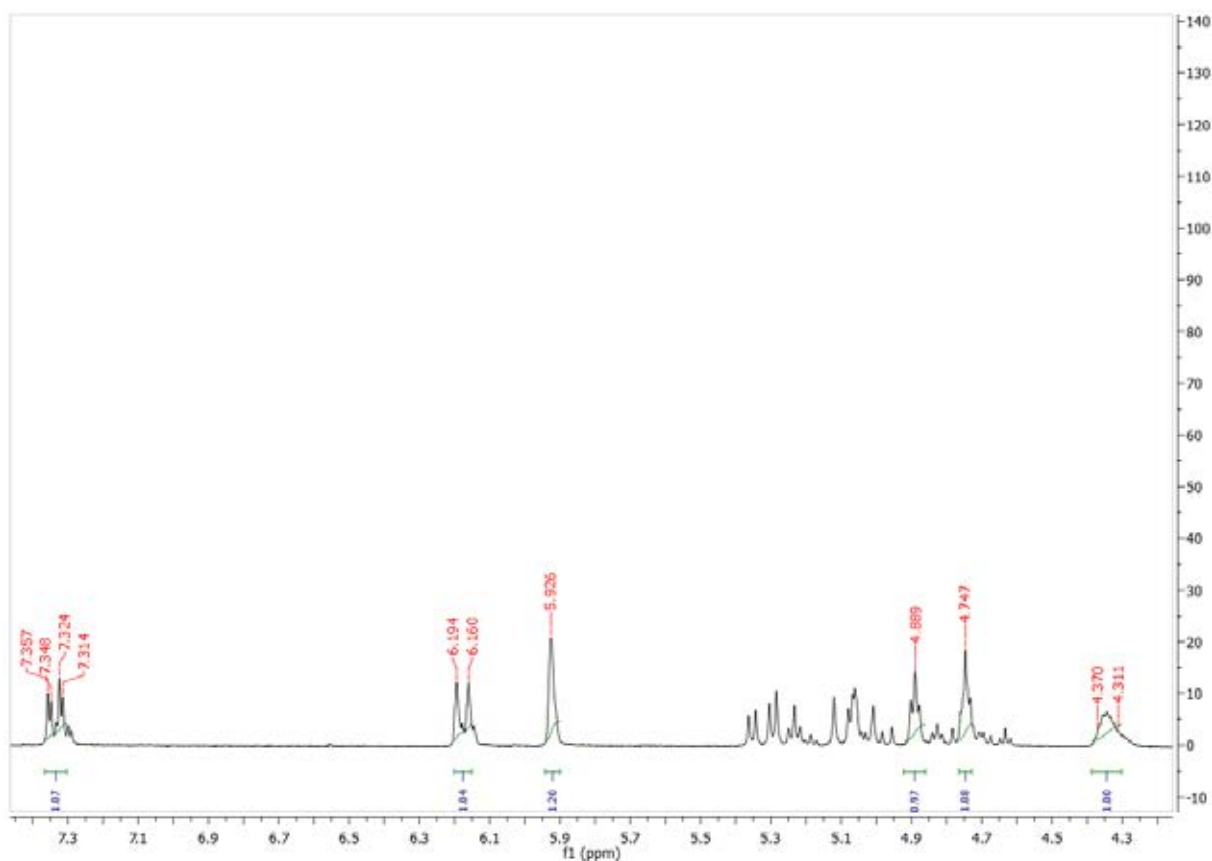
Espectro 31. Espectro no infravermelho do composto V



RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,156 (dd; H_3 ; $J_{\text{orto}} = 6,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 8,014-7,915 (m; $\text{H}_{4''}$ e $\text{H}_{3''}$; 4H); 7,687 (dd; H_4 ; $J_{\text{orto}} = 8,7$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 7,335 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 9,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 2,7$ Hz; 1H); 6,177 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,2$ Hz; 1H); 5,926 (s; H_4 ; 1H); 4,889 (t; H_{22} ; 1H); δ 4,747 (t; H_{16} ; 1H); 4,370-4,311 (m; H_{11} ; 1H); δ 1,638-1,522 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); 1,401 (s; H_{19} ; 3H); 1,005-0,814 (m; H_{23} , H_{24} ; H_{25} ; H_{18} ; 10H) ppm.



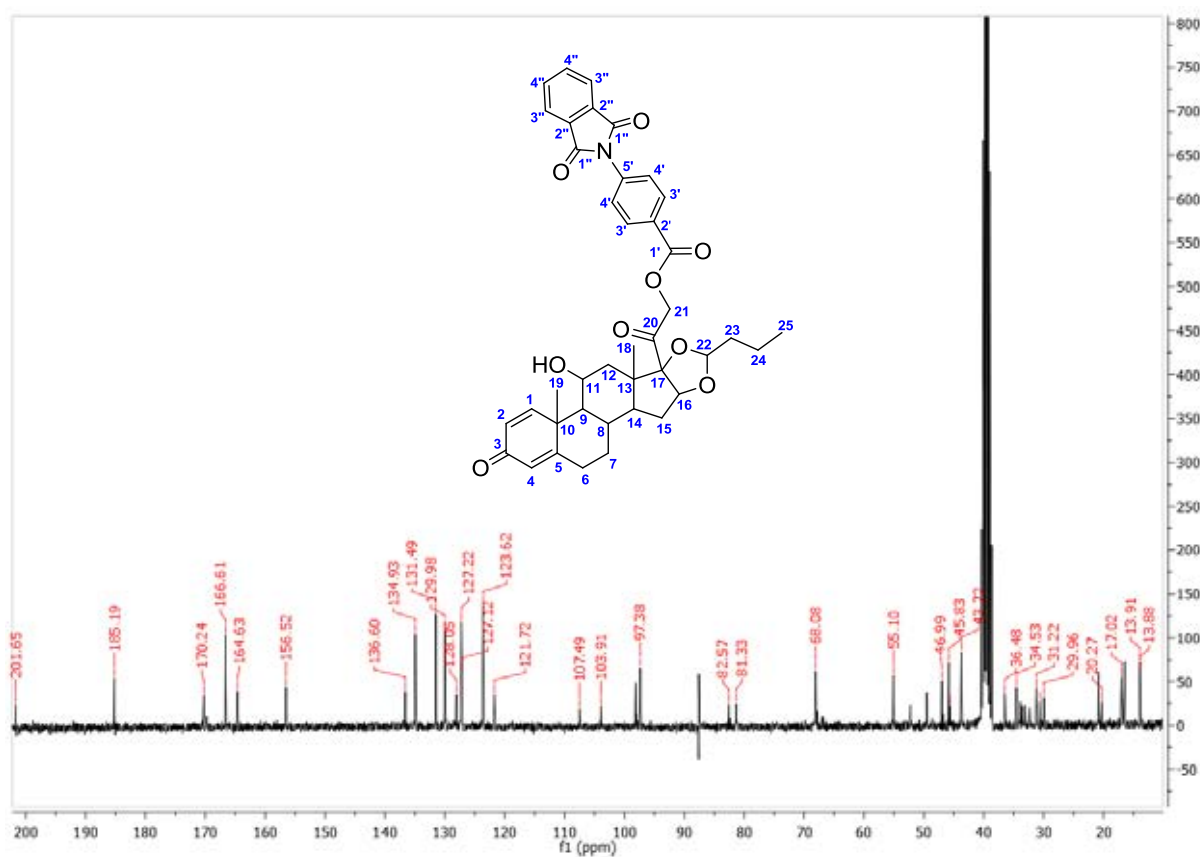
Espectro 32. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V – ampliação região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)



Espectro 33. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V – ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

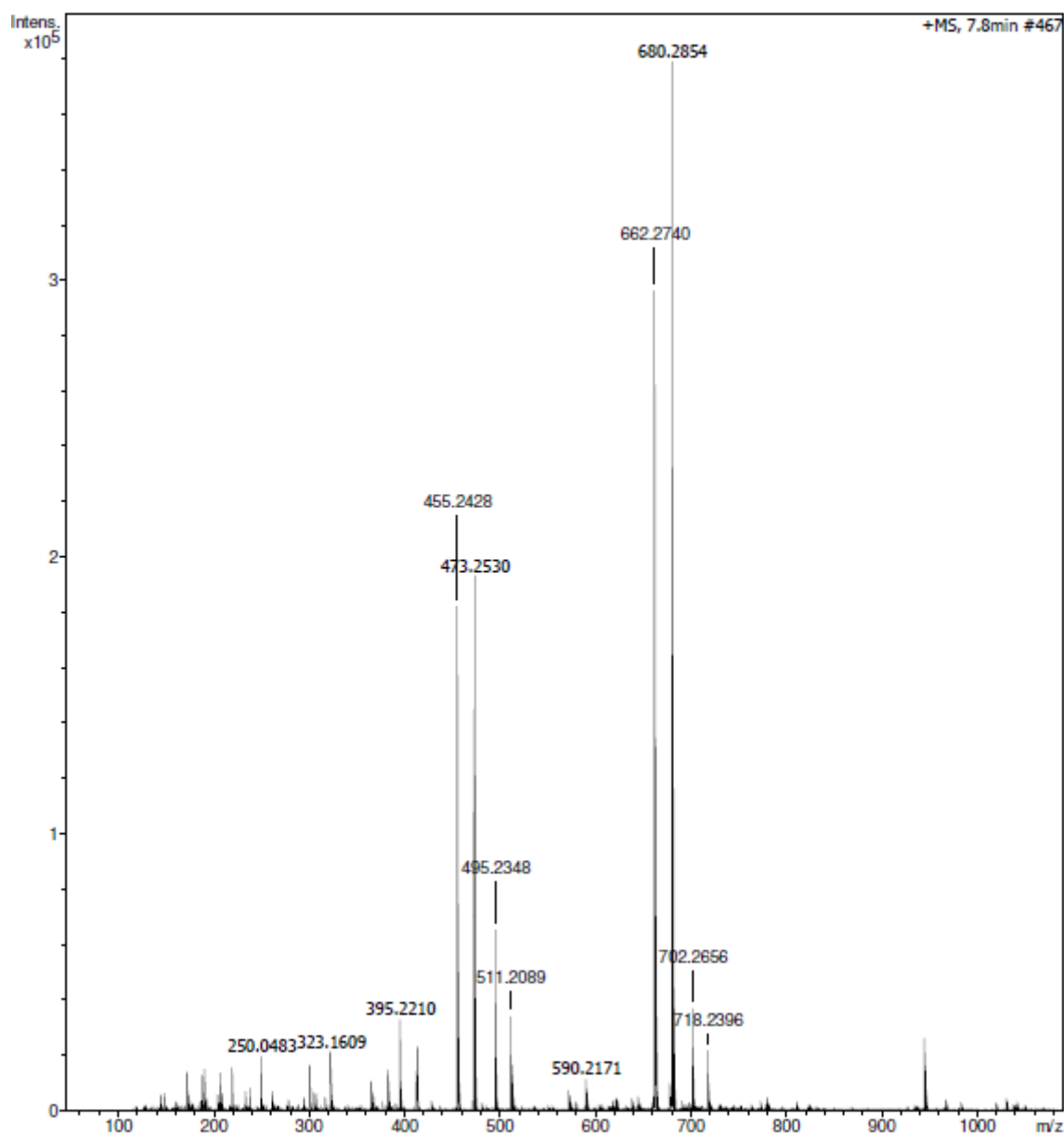
Através do espectro de RMN ^{13}C foi possível observar todos os carbonos presentes na estrutura, sendo assim um indicativo que o composto V foi obtido com sucesso.

RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO- d_6): δ 201,65 (C_{20}); 185,19 (C_3); 170,24 ($\text{C}_{1'}$); 166,61 ($\text{C}_{1''}$); 164,63 (C_5); 156,52 (C_2); 136,60 (C_2'); 134,93 (C_3''); 131,49 (C_2''); 129,98 (C_3'); 128,05 (C_5'), 127,72 (C_4'); 127,12 (C_1), 123,62 (C_4''); 121,72 (C_4), 103,91 (C_{21}); 97,38 (C_{17}); 82,57 (C_{22}), 81,33 (C_{16}), 55,10 (C_9), 46,99 (C_{13}), 45,83 (C_{10}), 45,67 (C_{14}), 43,72 (C_{12}), 36,48 (C_{23}), 34,53 (C_8), 31,22 (C_6), 30,62 (C_{15}), 29,96 (C_7), 20,27 (C_{19}), 17,02 (C_{18}), 13,91 (C_{25}), 13,88 (C_{24}) ppm.



Espectro 34. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

O espectro de massas de alta resolução (microTOF-QII-ESI-TOF) do composto V (Espectro 35), obtido pelo modo positivo, apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de m/z 680,2854 e 702,2656, respectivamente, que são consistentes com base na fórmula molecular $C_{40}H_{41}NO_9$ e m/z 679,75.

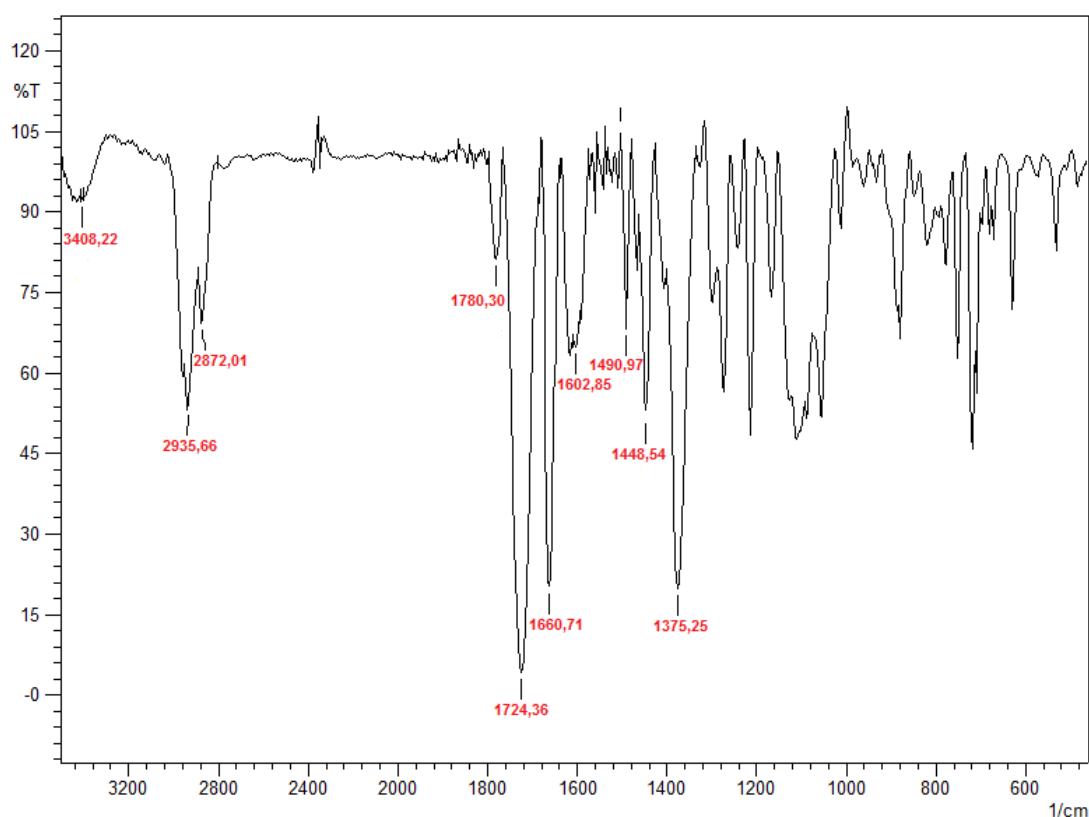


Espectro 35. Espectro de massas, modo positivo, do composto V

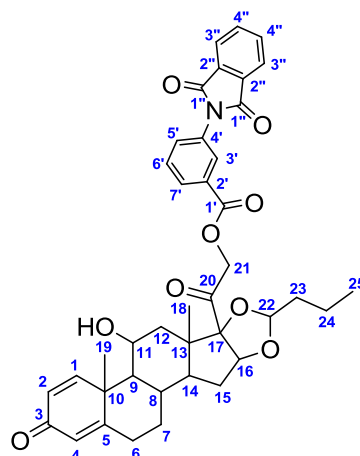
6.1.2.6 Caracterização estrutural Lapdesf GL-FT 6 (composto VI)

De acordo com o planejamento sintético, também foi obtido o derivado Lapdesf GL-FT 6 (composto VI), com um rendimento global de 80%. Através do espectro no infravermelho (Espectro 36) observa-se o estiramento axial C-N-C do anel ftalimídico em $1375,25\text{ cm}^{-1}$, indicando que o acoplamento do intermediário ftalimídico com a budesonida foi bem sucedido. Em $1780,30\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$ é possível observar a carbonila da imida. Observa-se ainda o estiramento referente à hidroxila em $3408,22\text{ cm}^{-1}$.

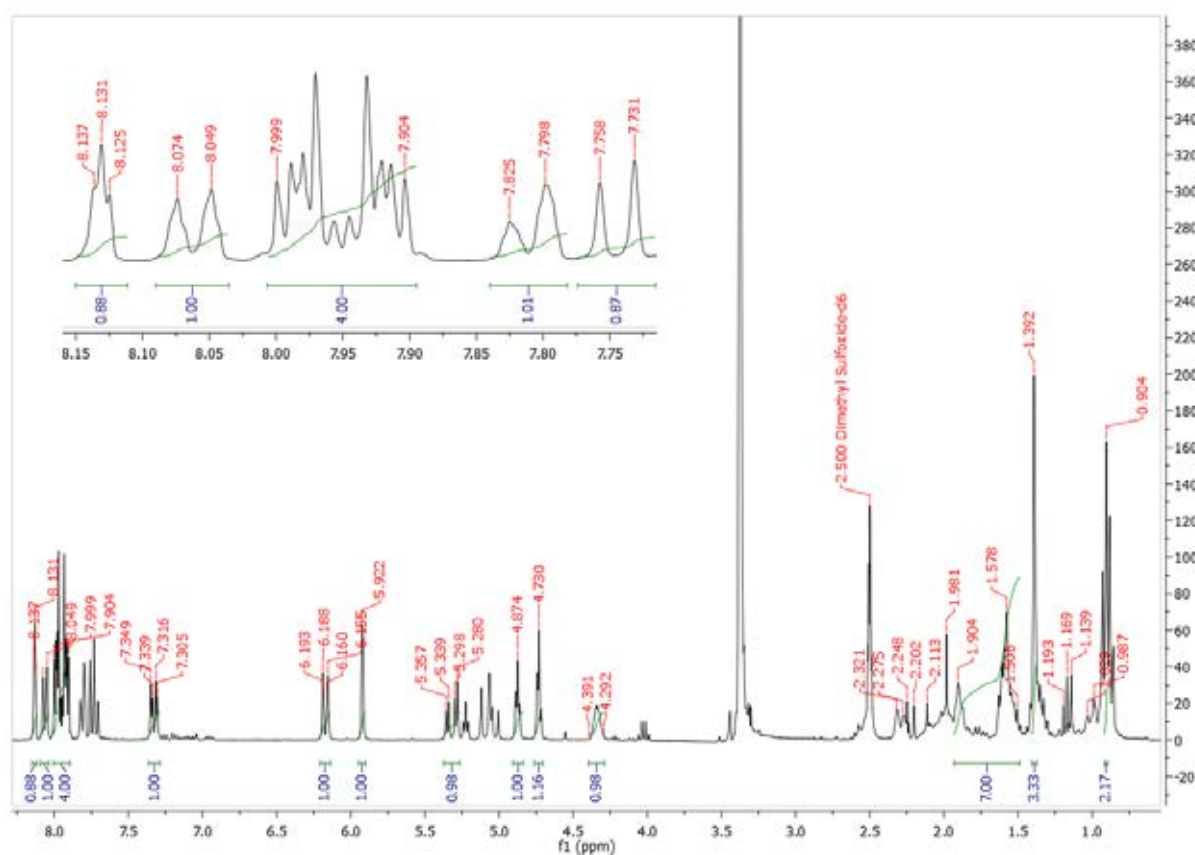
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3408,22\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2935,66$ e $2872,01\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1780,30\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1660,71\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1602,85\text{ cm}^{-1}$, $1490,97$ e $1448,54\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1375,25\text{ cm}^{-1}$.



Espectro 36. Espectro no infravermelho do composto VI



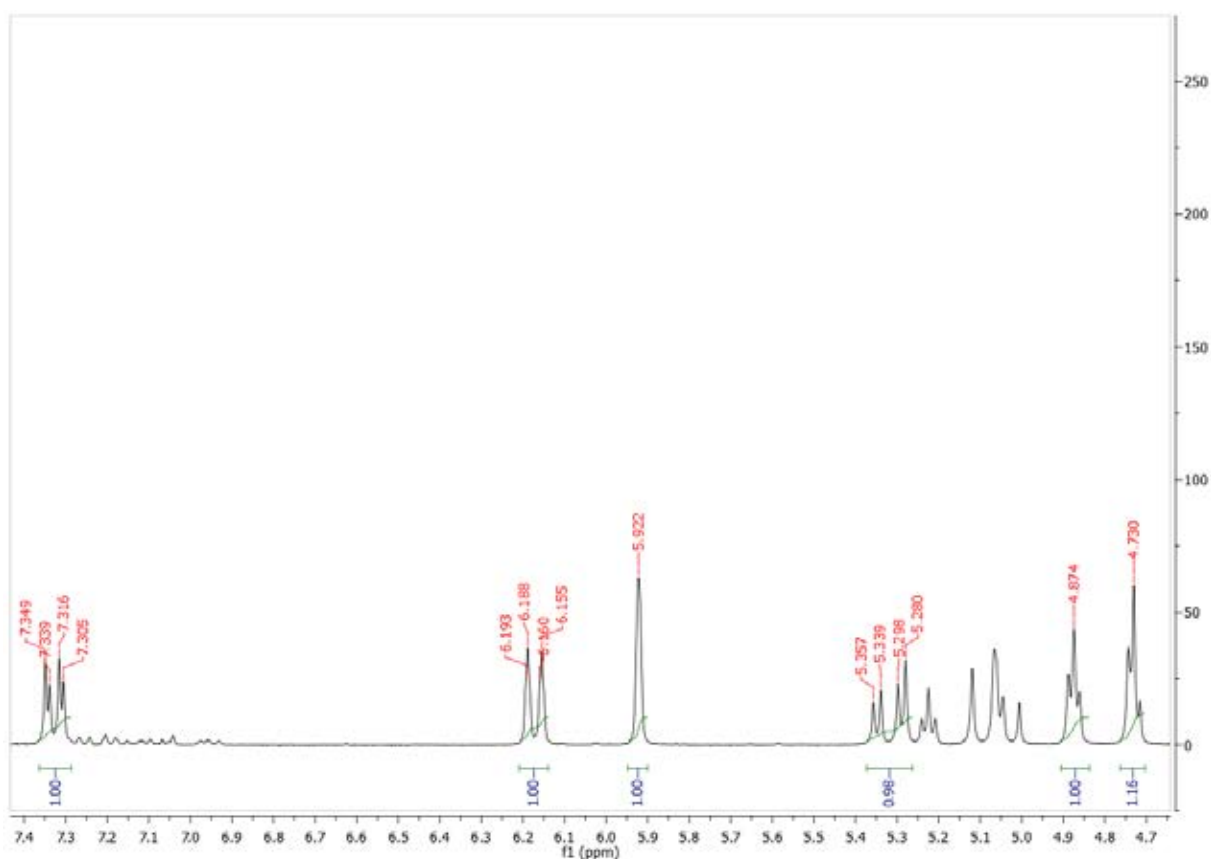
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,131 (H_3 ; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); 8,061 (H_7 ; $J_{\text{orto}} = 7,5$ Hz; 1H); 7,999 – 7,904 (m; $\text{H}_{4''}$ e $\text{H}_{3''}$; 4H); 7,811 (H_6 ; $J_{\text{orto}} = 8,1$ Hz; 1H); 7,744 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 8,1$ Hz; 1H); 7,327 (dd; H_5 ; $J_{\text{orto}} = 9,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 3,0$ Hz; 1H); 6,174 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 9,90$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); 5,922 (s; H_4 ; 1H); 4,874 (t; H_{22} ; 1H); 4,739 (t; H_{16} ; 1H); 4,391-4,292 (m; H_{11} ; 1H); δ 1,392 (s; H_{19} ; 3H); 1,629-1,525 (m; H_{23} ; H_{24} ; 4H); 0,929-0,856 (m; H_{25} ; H_{18} ; 6H) ppm.



Espectro 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI – ampliação região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

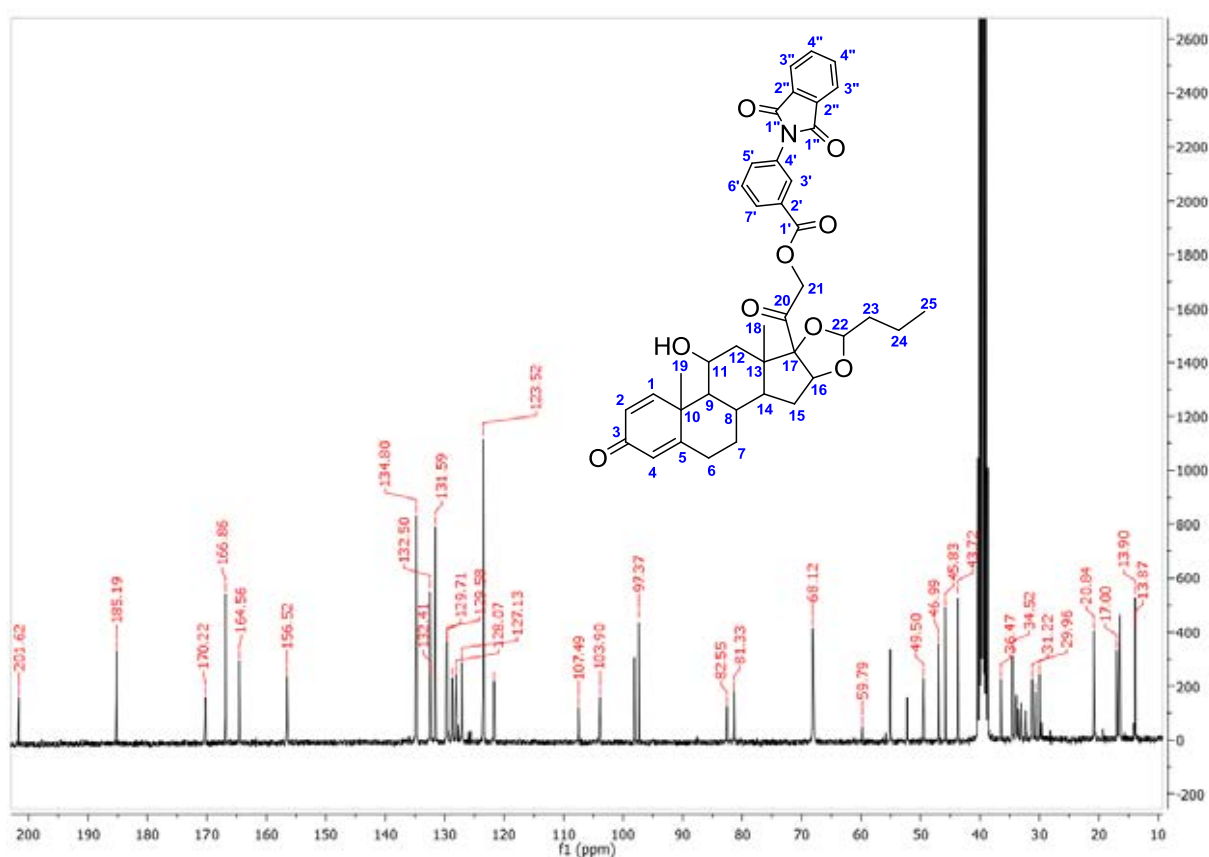
No espectro de RMN ^1H (Espectro 37) fica evidente o multipletto característico do grupamento ftalimídico. No espectro 38, é possível observar os tripletos referentes aos H_{22} e H_{16} (δ 4,874 e 4,739, respectivamente), que apresentam maior deslocamento por se posicionarem ao lado de átomos de oxigênio.

Ademais, pelo espectro de RMN ^{13}C (Espectro 39) observa-se todos os carbonos correspondentes ao composto VI.



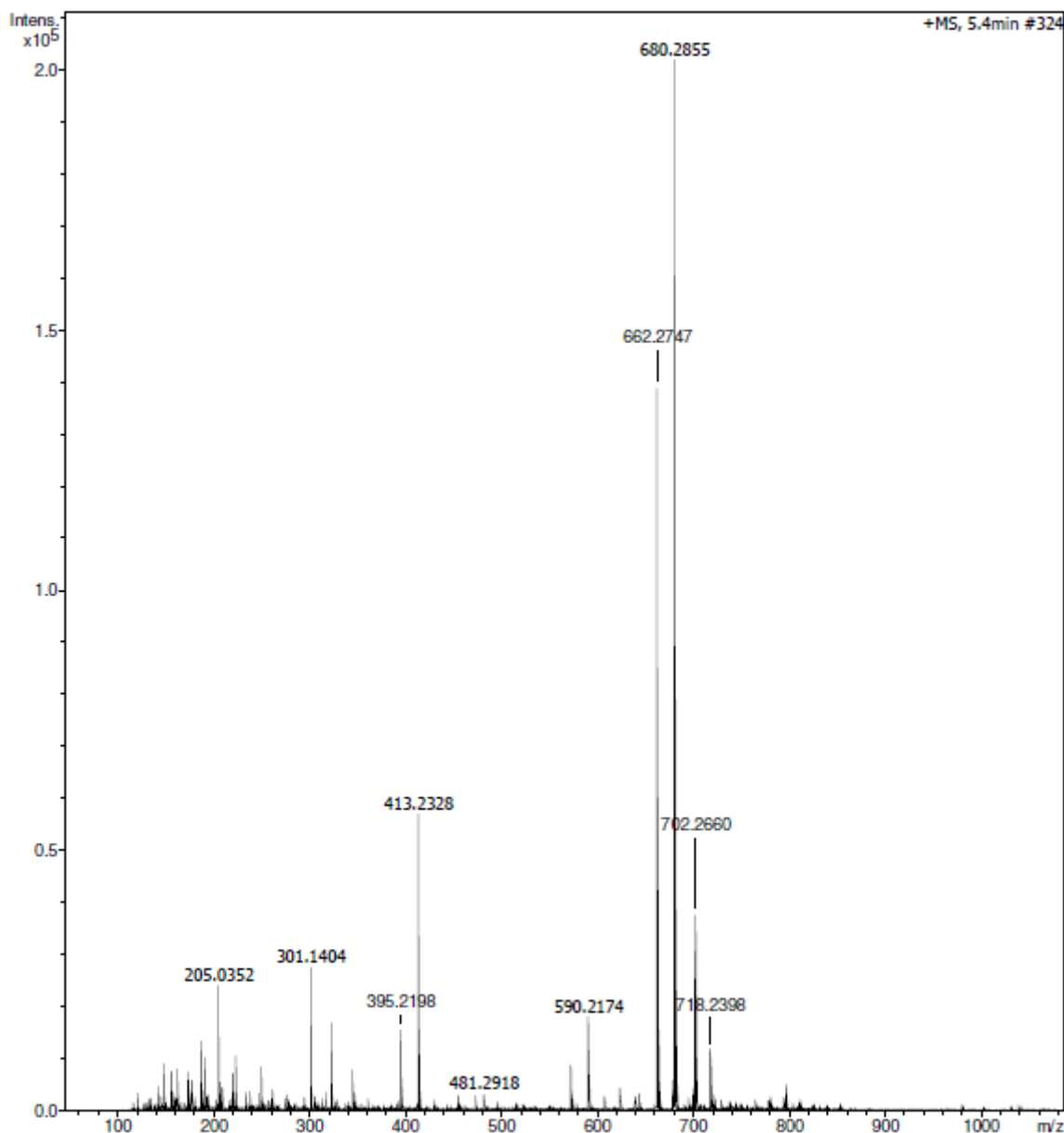
Espectro 38. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI – ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO-d_6): δ 201,62 (C_{20}); 185,19 (C_3); 170,22 ($\text{C}_{1'}$); 166,86 ($\text{C}_{1''}$); 164,56 (C_5); 156,52 (C_2); 134,80 ($\text{C}_{3''}$); 132,50 ($\text{C}_{2'}$); 132,41 ($\text{C}_{2''}$); 131,59 (C_3 ; C_7); 129,58 (C_6); 128,75 ($\text{C}_{4'}$); 128,07 (C_5); 127,13 (C_1); 123,52 ($\text{C}_{4''}$); 121,71 (C_4); 103,90 (C_{21}); 97,37 (C_{17}); 82,55 (C_{22}); 81,33 (C_{16}); 68,12 (C_{11}); 59,79 (C_9); 49,50 (C_{13}); 46,99 (C_{10}); 45,83 (C_{14}); 43,72 (C_{12}); 36,47 (C_{23}); 34,52 (C_8); 31,22 (C_6); 30,62 (C_{15}); 29,96 (C_7); 20,84 (C_{19}); 17,00 (C_{18}); 13,90 (C_{25}); 13,87 (C_{24}) ppm.



Espectro 39. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO-d_6)

O espectro de massas de alta resolução (microTOF-QII-ESI-TOF) do composto VI (Espectro 40), obtido pelo modo positivo, apresentou picos relativos aos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de m/z 680,2855 e 702,2660, respectivamente, que são consistentes com base na fórmula molecular $C_{40}H_{41}NO_9$ e m/z 679,75.



Espectro 40. Espectro de massas, modo positivo, do composto VI

6.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA AGUDA (MODELO DE EDEMA DE PATA)

O ensaio de edema de pata induzido por carragenina em ratos foi escolhido a fim de avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos híbridos sintetizados **I, IV, V e VI**. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e expressos em gráficos.

Entre os derivados de prednisolona, o Lapdesf GL-FT 1 (composto I) foi avaliado frente a esse teste, visto que em testes anteriores dos híbridos de prednisolona realizados pelo nosso grupo de pesquisa, esse foi o derivado que apresentou maior atividade no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético.

A Figura 10 aponta a atividade anti-inflamatória do composto I (100 μ mol/kg) no modelo utilizado, comparando-o com a carragenina, indicadora do controle da inflamação, e a prednisolona (100 μ mol/kg) que foi o fármaco utilizado como controle (SANTOS & CHUNG, 2011).

Analizando os resultados, percebe-se que o composto I apresentou atividade anti-inflamatória superior à prednisolona. A atividade anti-inflamatória do composto I é observada a partir da segunda hora de observação e apresenta diferença significativa em relação a prednisolona até a sexta hora.

Os resultados obtidos para a atividade anti-inflamatória dos compostos derivados de budesonida (100 μ mol/kg) encontram-se na Figura 11.

Para o derivado Lapdesf GL-FT 4 (composto IV) a atividade anti-inflamatória foi superior a budesonida, a partir da terceira hora, sendo similar ao padrão nas horas iniciais.

O derivado Lapdesf GL-FT 5 (composto V) apresentou uma atividade bastante similar à budesonida durante todos os tempos avaliados. Já o derivado Lapdesf GL-FT 6 (composto VI), não apresentou atividade anti-inflamatória.

Esses dados apresentados indicam o incremento da atividade anti-inflamatória em glicocorticoides quando ocorre a introdução da subunidade ftalimídica da talidomida, isso é possível devido ao sinergismo de ação característico desses novos híbridos.

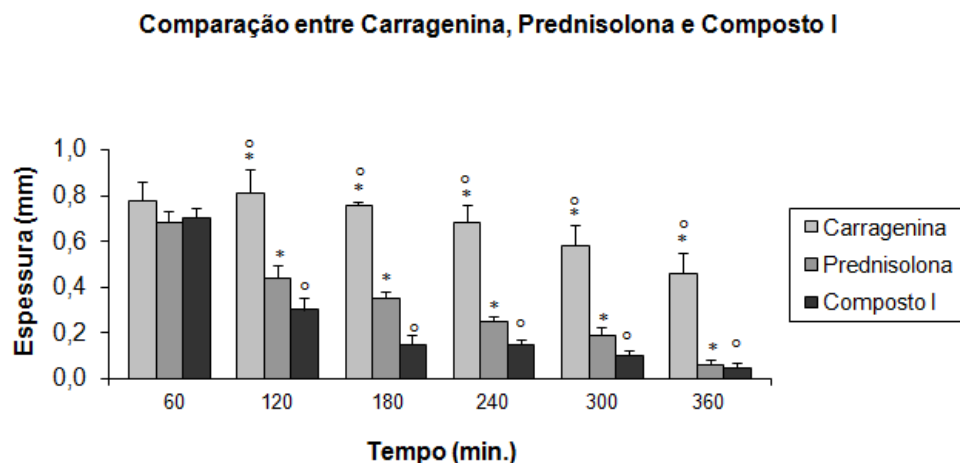


Figura 10. Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Comparação entre a carragenina, composto padrão (prednisolona) e o composto I (SANTOS & CHUNG, 2011).

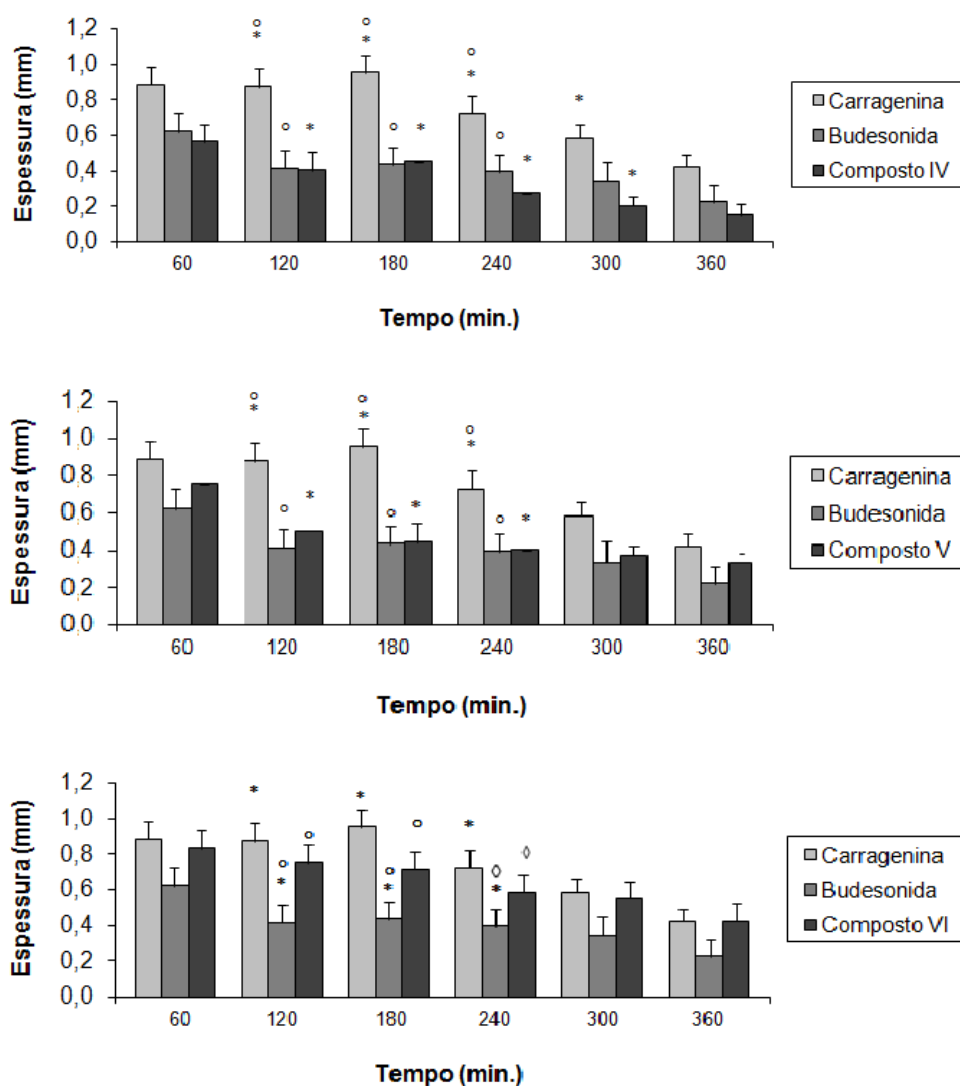


Figura 11. Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Budesonida e seus derivados híbridos (Compostos IV, V e VI).

6.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CRÔNICA (modelo colite ulcerativa distal)

O ensaio de atividade anti-inflamatória crônica foi realizado apenas com o composto mais ativo no modelo de inflamação aguda (composto I).

Os resultados das análises microscópicas indicaram diminuição da intensidade do infiltrado inflamatório pelo composto I quando comparado ao grupo controle positivo e ao composto padrão (prednisolona).

Na figura 12 verifica-se as imagens dos cólons de cada um dos grupos utilizados no teste, indicando a intensidade do infiltrado inflamatório e a presença/ausência de hiperplasia linfóide folicular.

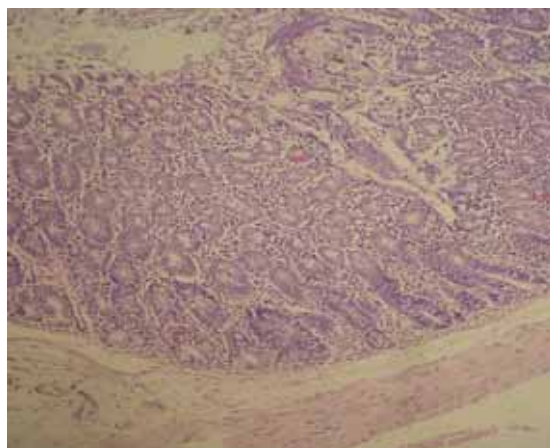
O grupo controle negativo apresentou intensidade leve (grau= 2) do infiltrado inflamatório e presença de hiperplasia linfóide folicular. Ressalta-se que a introdução do cateter/sonda gástrica de Levine nº 4, gera um estímulo mecânico imunológico, resultando em uma resposta hiperplásica. Porém esse ensaio biológico indicou que os animais já apresentavam anteriormente ao teste um quadro inflamatório.

O controle positivo apresentou infiltrado inflamatório com intensidade moderada (grau= 3).

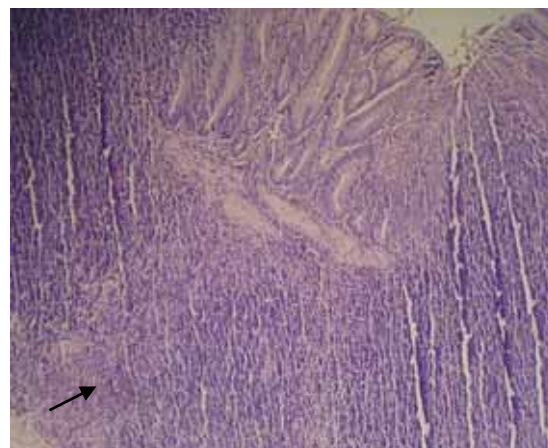
O fármaco utilizado como padrão neste teste, foi a prednisolona, o qual apresentou infiltrado inflamatório com intensidade leve (grau= 2). Esse grupo também apresentou hiperplasia linfóide, semelhantemente ao grupo negativo.

A mucosa do grupo tratado com o composto I, apresentou intensidade de inflamação ínfima (grau= 1), sugerindo ação anti-inflamatória superior em relação ao composto padrão prednisolona. Esse composto mostrou ser capaz de reverter o quadro inflamatório até mesmo do grupo negativo, o qual apresentou grau= 2 de inflamação.

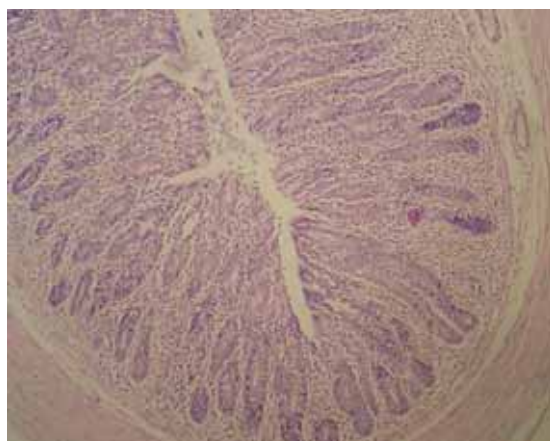
No processo inflamatório desencadeado pela indução de colite são ativados mediadores pró-inflamatórios, a exemplo do TNF- α . Sugere-se que o composto I por apresentar a subunidade ftalimídica em sua estrutura, atue na modulação dessa citocina, resultando em um incremento da atividade anti-inflamatória quando comparado ao seu padrão, prednisolona.



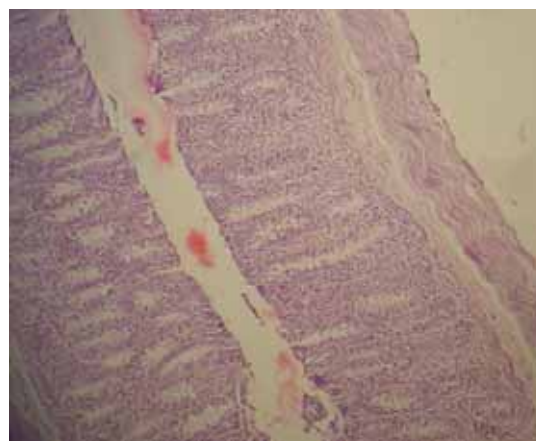
Controle negativo
Intestino com leve infiltrado inflamatório entre as vilosidades



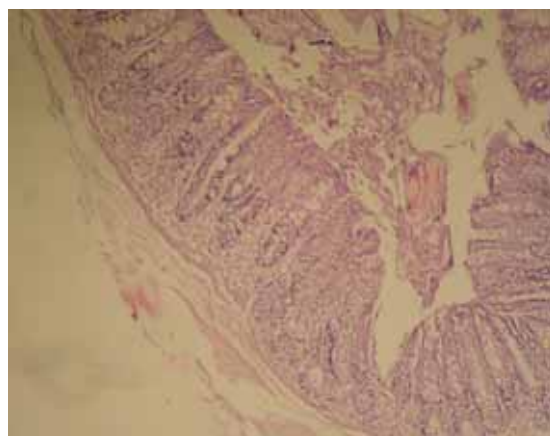
Controle negativo
Hiperplasia linfóide (seta)



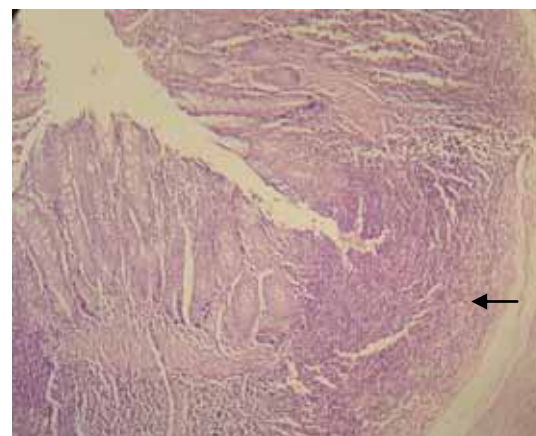
Controle positivo
Intestino com moderado infiltrado inflamatório entre as vilosidades



Composto I
Intestino com ínfimo infiltrado inflamatório entre as vilosidades



Prednisolona
Intestino com leve infiltrado inflamatório entre as vilosidades



Prednisolona
Hiperplasia linfóide (seta)

Figura 12. Imagem representativa do intestino grosso dos ratos na administração por via oral em doses repetidas (100 μ M) dos grupos tratados com o composto I e o padrão prednisolona, do controle negativo (salina 0,9% de NaCl, *per rectum*, sem tratamento) e do controle positivo de colite ulcerativa (indução com ácido acético, *per rectum* sem tratamento).

Quanto à variação do peso, os animais doentes que não receberam tratamento (grupo controle positivo) perderam peso (-16,8%) e apresentaram fezes com melema (fezes com sangue digerido). Já os animais tratados com a prednisolona não apresentaram fezes com melema porém perderam peso durante o tratamento, cerca de -1,64%.

Os animais tratados com o composto I além de não apresentaram fezes com melema, ganharam peso durante o tratamento (+2,61%), indicando um perfil de alimentação normal, possivelmente devido o restabelecimento da condição normal antes da indução de colite.

6.4 TESTE IMUNOQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE TNF- α

6.4.1 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos

A avaliação da viabilidade de macrófagos foi realizada utilizando-se o teste de MTT desenvolvido por Mosmann (1983). Nessa técnica, verifica-se nas células viáveis a formação de cristais de formazana, de coloração púrpura, decorrente da clivagem do anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio). Quanto menor a citotoxicidade das substâncias, maior será a intensidade metabólica e consequentemente maior será a absorvância da solução.

Foram testadas quatro substâncias no ensaio de viabilidade: prednisolona, budesonida, composto I e composto IV; nas concentrações de 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,65 μM .

Observa-se na figura 13 altos valores de viabilidade celular para todos os compostos, chegando a 100% nas concentrações mais baixas de prednisolona, compostos I e IV. Das substâncias avaliadas observou-se que a budesonida apresentou maior citotoxicidade celular em todas as concentrações avaliadas, porém com resultados satisfatórios de viabilidade celular a partir da concentração 12,5 μM .

Após a definição da viabilidade celular dos compostos sintetizados e os seus padrões (prednisolona e budesonida) foi possível realizar o teste imunoquímico para determinação de TNF- α proposto nesse trabalho.

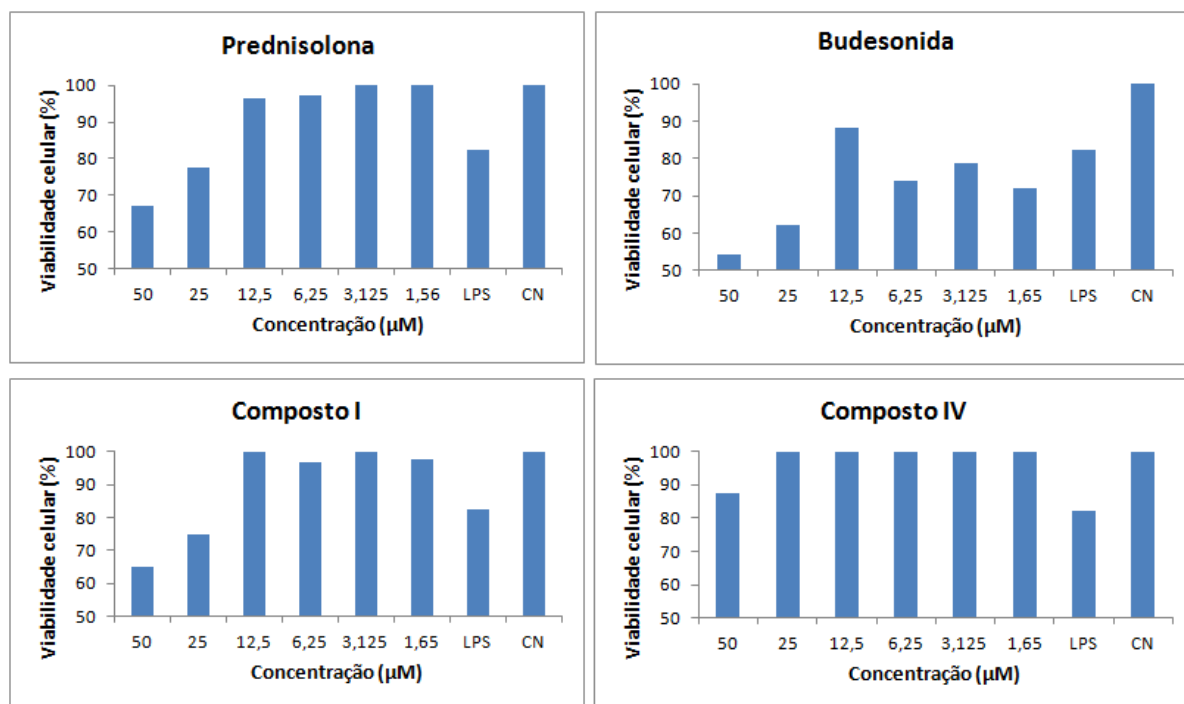


Figura 13. Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de prednisolona, budesonida, composto I e composto IV. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (CN), equivalendo a 100% de viabilidade.

6.4.2 Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

Apenas os compostos mais ativos no ensaio de atividade anti-inflamatória aguda foram avaliados nesse ensaio (compostos I e IV) e comparados com os seus respectivos padrões, prednisolona e budesonida.

Os compostos foram avaliados em 3 diferentes concentrações não citotóxicas para as células: 12,5 μ M, 1,25 μ M e 0,125 μ M.

As concentrações de TNF- α foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de duplicatas de 5 animais (Figura 14).

Não houve produção de TNF- α pelos controles e pelos compostos avaliados, indicando a necessidade de novos testes com concentrações menores destas substâncias do que as utilizadas nesse ensaio.

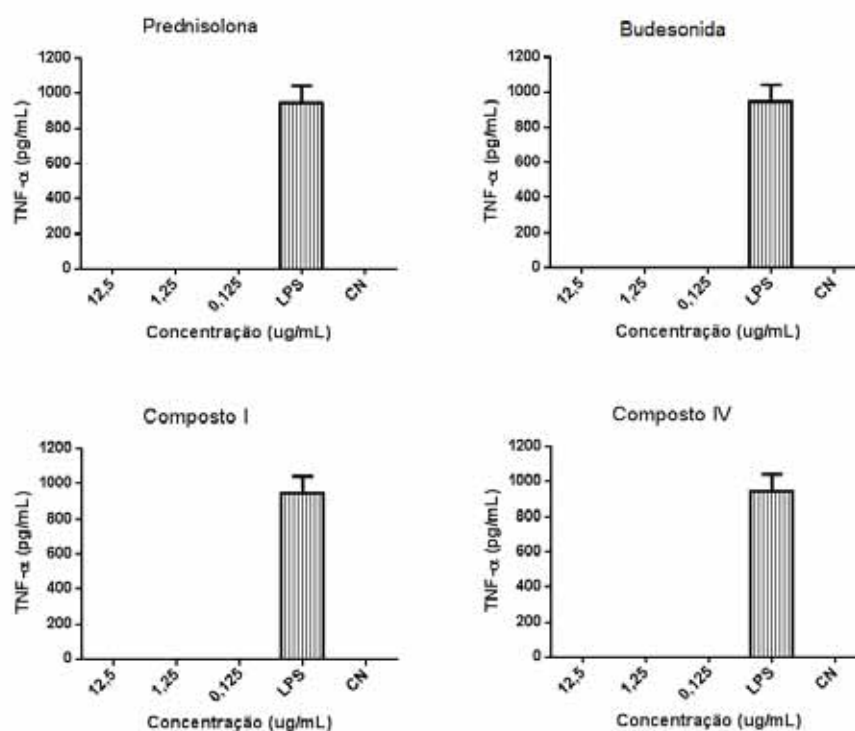


Figura 14. Produção de TNF- α pelos compostos prednisolona, budesonida, composto I e composto IV, em diferentes concentrações. Foi utilizado RPMI-1640-C (controle negativo, CN) e LPS (controle positivo, LPS).

7. CONCLUSÕES

Foram obtidos três diferentes intermediários sintéticos (1-3) e seis produtos finais (compostos I, II, III, IV, V e VI), com rendimentos satisfatórios, evidenciando que a metodologia sintética empregada foi adequada.

A atividade anti-inflamatória aguda dos compostos finais foi avaliada no modelo de edema de pata e os resultados obtidos demonstraram que os compostos I e IV apresentaram atividade anti-inflamatória significativa quando comparado aos padrões prednisolona e budesonida, respectivamente. O composto I também apresentou atividade anti-inflamatória superior à prednisolona no ensaio de colite ulcerativa distal.

Em relação à determinação da citocina TNF- α pelos compostos sintetizados, não houve produção do TNF- α nas concentrações utilizadas, inclusive dos glicocorticoides utilizados como controle.

Esses dados evidenciam que a estratégia utilizada, hibridação molecular, a fim de conseguir um incremento da atividade anti-inflamatória em glicocorticoides com a introdução da subunidade ftalimídica da talidomida é possível, reprodutível e fornece resultados satisfatórios.

Diante dos resultados promissores obtidos para os compostos anti-inflamatórios sintetizados, será realizado um ensaio de atividade anti-inflamatória em modelo de asma brônquica, bem como a realização de novos testes de inibição da citocina TNF- α com concentrações inferiores às utilizadas neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AALTONEN, K.J.; VIRKKI, L.M.; MALMIVAARA, A.; KONTTINEN, Y.T.; NORDSTRÖM, D.C.; BLOM, M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. **Plos One**, v. 7 (1), p. 1-14, 2012.

AGGARWAL, B.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; HARIKUMAR, K.B.; GUPTA, S.R. THARAKAN, S.T.; KOCA, C.; DEY, S.; SUNG, B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1171, p. 59-76, 2009.

AVILA, C.M.; ROMEIRO, N.C.; SILVA, G.M.S; SANT'ANNA, C.M.R.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Development of new CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR models for anti-inflammatory phthalimide-containing TNF α modulators. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14 (20), p. 6874-6885, 2006.

BARREIRO, E.J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1 (1), p. 26-34, 2009.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quim. Nova**, v. 25 (1), p. 129-148, 2002.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O. Glicocorticóides: Usos Clássicos e Emprego no Tratamento do Câncer. **Infarma**, v.17 (7/9), p. 58-60, 2005.

BAYRY, J. New horizons in natural TNF- α antagonist research. **Trends Mol. Med.**, v. 17 (10), p. 538-540, 2011.

BIJLSMA, J.W.J; BOERS, M.; SAAG, K.G.; FURST, D.E. Glucocorticoids in the treatment of early and late RA. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, p. 1033-1037, 2003.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **T. Reumat. Clín.**, v. 8 (2), p. 47-51, 2007.

BORGES, L.G.; FROEHLICH, P.E. Talidomida: novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49 (1), p. 96-102, 2003.

BOSQUESI, P.L.; MELO, T.R.F.; VIZIOLI, E.O., SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Anti-Inflammatory Drug Design Using a Molecular Hybridization Approach. **Pharmaceuticals**, v.4, p. 1450-1474, 2011.

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

- BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 364 p.
- BRENNAN, F.M.; FELDRNANNT, M. 1996. Cytokines in autoimmunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8 (6), p. 872-877, 1996.
- CANTANHEDA, C.; ASSIS, E.; AZEVEDO, V.; ROMÃO, V.A.; SIMAS, H. Infliximab e Artrite Reumatóide. UNIMED-RIO. **Recom. Med.**, p. 1-24, 2007.
- CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, R.G.; GALVÃO, T.G.; CHAGAS, A.C.P. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Rev. Bras. Cardiol. Invas.** v. 11 (3), p. 14-19, 2003.
- CASTELLI, R.; CASSIN, R.; CANNAVO, A.; CUGNO, M. Immunomodulatory drugs: New options for the treatment of myelodysplastic syndromes. **Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.**, p. 1-7, 2012.
- CHAPARRO, M.; GUERRA, I.; MUÑOZ-LINARES, P.; GISBERT, J.P. Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 35, p. 971-986, 2012.
- CHAULET, C.; CROIX, C.; ALAGILLE, D.; NORMAND, S.; DELWAIL, A.; FAVOT, L.; LECRON, J.C.; VIAUD-MASSUARD, M.C. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- α and IL-6 production inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21 (3), p. 1019-1022, 2011.
- CHEN, H.F.; LI, Z.Y.; TANG, J.Q.; SHEN, H.S.; CUI, Q.Y.; REN, Y.Y.; QIN, L.M.; JIN, L.J.; ZHU, J.J.; WANG, J.; DING, J.; WANG, K.Y.; YU, Z.Q.; WANG, Z.Y.; WU, T.Q. Clinical study of thalidomide combined with dexamethasone for the treatment of elderly patients with newly diagnosed. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.**, v. 13 (9), p. 4777-4781, 2012.
- CHUNG, M.C. **Interações medicamentosas no planejamento de novos fármacos**. 446p. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2012.
- CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 41 (2), p. 155-179, 2005.
- COOKE, C.L.M.; DAVIDGE, S.T. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 282 (2), p. 395-402, 2002.
- COSTA-PINTO, F.A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune Interactions in Stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17 (3), p. 196-199, 2010.
- DUMMER, C.D.; THOMÉ, F.S.; VERONESE, F.V. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. **Rev. Assoc. Med. Bras.**; v. 53 (5), p. 446-450, 2007.

FABIA, R.; WILLÉN, R.; AR'RAJAB, A.; ANDERSSON, R.; AHRÉN, B.; BENGMARK, S. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. **Eur. Surg. Res.** v. 24 (4), p. 211- 225, 1992.

FIRESTEIN ,G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-361, 2003.

GASCO, A.; BOSCHI, D.; CHEGAEV, K.; CENA, C.; STILO, A.; FRUTTERO, R.; LAZZARATO, L.; ROLANDO, B.; TOSCO, P. Multitarget drugs: Focus on the NO-donor hybrid drugs. **Pure Appl. Chem.**, v. 80 (8), p. 1693-1701, 2008.

JANA, S.; MANDLEKAR, S.; MARATHE, P. Prodrug Design to Improve Pharmacokinetic and Drug Delivery Properties: Challenges to the Discovery Scientists. **Curr. Med. Chem.**, v. 17 (32), p. 3874-3908, 2010.

KOZUCH, P.L.; HANAUER, S.B. Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy. **World J. Gastroenterol.**, v. 14 (3), p. 354-377, 2008.

KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A.; VALENTE, C.M.L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46 (3). p. 199-206, 2006.

KUMAR, N.; SHARMA, U.; SINGH, C.; SINGH, B. Thalidomide: chemistry, therapeutic potential and oxidative stress induced teratogenicity. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 12 (13), p. 1436-1455, 2012.

KUMAR, V.; CHHIBBER, S. Thalidomide: an old drug with new action. **J. Chemother.**, v. 23 (6), p. 326-334, 2011.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quím. Nova**, v. 24 (5), p. 683-688, 2001.

LIMA, L.M., CASTRO, P., MACHADO, A. L., FRAGA, C.A M., LUGNIER, C., MORAES, V.L.G., BARREIRO, E.J. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10 (9), p. 3067-3073, 2002.

LIU, X.; WANG, J. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of Folium syringae leaves on TNBS-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 133 (2), p. 780–787, 2011.

MEIRA, M.E.C.; BITTENCOURT, M.O.; NEGREIROS, R.L. **Talidomida: Revisão bibliográfica e atualização da bula, conforme Resolução RDC nº 140/03.** 174p. Monografia de Especialização. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2004.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais.** 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 320 p.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designing Multiple Ligands – Medicinal Chemistry Strategies and Challenges. **Curr. Pharma. Des.**, v. 15 (6), p. 587-600, 2009.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. The Physicochemical Challenges of Designing Multiple Ligands. **J. Med. Chem.**, v. 49 (16), p. 4961-4970, 2006.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NETO, H.J.C.; ROSÁRIO, C.S.; ROSÁRIO, N.A. Corticosteroides intranasais. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 33 (2), p. 51-57, 2010.

NIWEOEHNER, D.E.; ERBLAND, M.L.; DEUPREE, R.H.; COLLINS, D.; GROSS, N.J.; LIGHT, R.W.; ANDERSON, P.; MORGAN, N.A. Effect of Systemic Glucocorticoids on Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340 (25), p. 1941-1947, 1999.

OKUYAMA, S.; AIHARA, H. Hyperalgesic action in mice of intracerebroventricularly administered arachidonic acid, PG E2, PG F2 alpha and PG D2: effects of analgesic drugs on hyperalgesia. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 9 (11), p. 902-908, 1986.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; DOOMAN, O.L.; JAERVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 7 (3), p. 255-270, 2008.

RICHARDSON, P.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. Thalidomide: emerging role in cancer medicine. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 629-657, 2002.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 353 (16), p. 1711-1723, 2005.

ROY, S.; SANNIGRAHI, S.; GHOSH, B.; PUSP, P.; ROY, T. Combination therapy of dexamethasone with epigallocatechin enhances tibiotarsal bone articulation and modulates oxidative status correlates with cartilage cytokines expression in the early phase of experimental arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 698 (1-3), p. 444-454, 2012.

SANTOS, J.L. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.** 226p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2009.

SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. **Processo de Obtenção de Compostos Derivados de Anti-Inflamatórios Esteróides (AIEs), Composições Farmacêuticas Contendo tais Compostos e seus Usos no Tratamento de Doenças de Caráter Inflamatório.** BR n. PI110005943, 18 fev. 2011.

SANTOS, J.L.; OLIVEIRA, E.V.; MENEGON, R.F.; BLAU, L.; CHUNG, M.C. **Derivados ftalimídicos de compostos antiinflamatórios não-esteróide e/ou moduladores de TNF alfa, processo de sua obtenção, composições farmacêuticas contendo os mesmos e seus usos no tratamento de doenças inflamatórias.** BR n. PI0901298-2A2, 06 abr. 2009.

SANTOS, R. V.; LIMA, P. M. G.; NITSCHKE, A.; HARTH, F. M.; MELO, F. Y.; AKAMATSU, H. T.; LIMA, H. C. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 29 (2), p. 77-85, 2006.

SEGURO, L.P.C.; ROSARIO, C.; SHOENFELD, Y. Long-term complications of past glucocorticoid use. **Autoimmun. Rev.**, v. 12 (5), p. 629-632, 2013.

SILVEIRA, A.R.J.; PARDINHO, E.C.; GOMES, M.A.R., BAPTISTA, E. R. Talidomida: um fantasma do passado - Esperança do futuro. **Rev. Virtual Inic. Acad. UFPA**, v. 1 (2), p. 1-15, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006, 490p.

STEWART, S.G.; BRAUN, C.J.; NG, S.L.; POLOMSKA, M.E.; KARIMI, M.; ABRAHAM, L.J. New thalidomide analogues derived through Sonogashira or Suzuki reactions and their TNF expression inhibition profiles. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18 (2), p. 650-662, 2010.

SUZUKI, T.; CHUNG-WAI, C.; DOWNEY, G.P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40 (6-7), p. 1348-1361, 2008.

TAK, P.P.; GERLAG, D.M.; AUPPERLE, K.R.; VAN DE GEEST, D.A.; OVERBEEK, M.; BENNETT, B.L.; BOYLE, D.L.; MANNING, A.M.; FIRESTEIN, G.S. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 44 (8), p. 1897-1907, 2001.

VASSALO, E.C.; POVEDANO, A.; PUPO-NETO, J.A.; PAULO, F.L. Influência da administração da *Plantago ovata* (fibra dietética) na proteção da parede colônica em colite inflamatória induzida por ácido acético: estudo estereológico experimental em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 44 (6), p. 385-391, 2007.

VIANNA, H.R.; SOARES, C.M.B.M.; TAVARES, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, A.C.S. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J. Bras. Nefrol.**, v. 33 (3), p. 351-364, 2011.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Curr. Med. Chem.**, v. 14 (17), p. 1829-1852, 2007.

VIZIOLI, E.O. **Ensaio pré-clínicos de híbridos ftalimídicos e pró-fármacos taurínicos derivados de antiinflamatórios não esteróides**. 128p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2009.

WANG, H.; ZHANG, W.; ZHU, C.; BUCHER, C.; BLAZAR, B.R.; ZHANG, C.; CHEN, J.F.; LINDEN, J.; WU, C.; HUO, Y. Inactivation of the adenosine A2A receptor protects apolipoprotein E-deficient mice from atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29 (7), p. 1046-1052, 2009.

WILLIAMS, V.L.; COHEN, P.R. TNF alpha antagonist-induced lupus-like syndrome: report and review of the literature with implications for treatment with alternative TNF alpha antagonists. **Int. J. Dermatol.**, v. 50 (5), p. 619-625, 2011.

YOU-CHANG, O.; WON-KYUNG, C.; JEONG, Y.H.; IM, G.Y.; KIM, A.; YOUN-HWAN, H.; KIM, T.; SONG, K.H.; MA, J.Y. A Novel Herbal Medicine KIOM-MA Exerts an Anti-Inflammatory Effect in Lps-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

ZHOU, Y.H.; YU, J.P.; LIU, Y.F.; TENG, X.J.; MING, M.; LV, P.; AN, P.; LIU, S.Q.; YU, H.G. Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 2006 (5), p. 1-9, 2006.

ANEXOS

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 29/2012

Interessado: MARCELA GABRIELLE M. MACHADO

Orientador: ProfªDrª Chung Man Chin

Projeto: Preparação e ensaio anti-inflamatório in vitro (TNF - alfa) de novos compostos imunomoduladores

Parecer nº 61/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Preparação e ensaio antiinflamatório in vitro (TNF - alfa) de novos compostos imunomoduladores”, apresentado pela pós-graduanda MARCELLA GABRIELLE M. MACHADO, sob orientação da Professora Doutora Chung Man Chin, desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MAIO de 2013, em formulário para este fim.

Araraquara, 23 de novembro de 2012.



Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 49 /2012

Pesquisador: MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

Orientador: Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin

Projeto: Preparação e ensaio anti-inflamatório in vitro (TNF-alfa) de novos compostos imunomoduladores

Parecer nº 02/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 20 de Fevereiro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Preparação e ensaio anti-inflamatório in vitro (TNF-alfa) de novos compostos imunomoduladores”, apresentado pela pós-graduanda Marcella Gabrielle Mendes Machado, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MAIO de 2013, em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de Fevereiro de 2013



Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 08/2013

Interessado: MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

Orientador: Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin

Projeto: Preparação e ensaio anti-inflamatório in vitro (TNF-alfa) de novos compostos imunomoduladores

Parecer nº 21/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Preparação e ensaio anti-inflamatório in vitro (TNF-alfa) de novos compostos imunomoduladores”, apresentado pela pós-graduanda MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO, sob orientação da Professora Doutora Chun Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JULHO de 2013, em formulário para este fim.

Araraquara, 07 de maio de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA