

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Isabela Junqueira de Oliveira

**Avaliação farmacológica de candidatos a
fármacos para o tratamento da anemia falciforme.**

**Araraquara
2014**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Isabela Junqueira de Oliveira

Avaliação farmacológica de candidatos a fármacos para o tratamento da anemia falciforme.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do Grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientação: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientação: Profa. Dra. Priscila Longhin Bosquesi

Araraquara

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita e Fernando, por todo esforço e dedicação oferecidos ao longo dos anos para que eu pudesse alcançar esse objetivo;

Ao Diego, que no decorrer do tempo se tornou mais que um amigo e grande companheiro para todas as horas;

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Priscila Longhin Bosquesi, pela disponibilidade em ajudar no desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pela oportunidade concedida e por contribuir para minha formação através de seus ensinamentos ao longo dos anos convividos e de execução deste trabalho;

A todos os companheiros de laboratório, Karina, Rafael, Paulo, Marcella, Diego, Daniela, Thaís, Luiz, Juliana, Carla, Aline, Aylime, Guilherme, Arthur, Lucas, Cauê, Sílvio, pela ajuda, disposição e conhecimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, por disponibilizar o Laboratório de Toxicologia para a condução do estudo de estabilidade, ao Michel Leandro de Campos, aluno de pós-graduação, pela imensa contribuição na execução do mesmo e pelos ensinamentos compartilhados, e aos outros alunos do Laboratório de Toxicologia pela disposição em ajudar no que fosse necessário;

À Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, por disponibilizar seu laboratório para a execução dos ensaios biológicos, e à técnica Marisa Campos Polesi Placeres pela ajuda na execução dos mesmos.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é a doença hematológica hereditária crônica de maior prevalência no Brasil, causada por uma mutação pontual no gene da β -globina, levando as hemácias a adquirirem formato de foice quando em estado desoxigenado. Essa alteração estrutural causa aumento da adesão celular, hipóxia local, vaso-oclusão e alterações na coagulação. O quadro clínico dos pacientes é diversificado, predominando a dor causada pelo processo inflamatório agudo e crônico, além de complicações que podem ocasionar infarto de tecidos e órgãos, levando à morte. O único fármaco aprovado pelo FDA disponível para o tratamento da doença é a hidroxiuréia (HU), mas, devido a sua toxicidade, têm sido intensificadas as buscas por novas possibilidades terapêuticas. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória presente em grande quantidade nos pacientes portadores da doença, e o óxido nítrico pode contribuir para vasodilatação e proteção vascular. Assim, propôs-se a síntese e avaliação farmacológica de candidatos a fármacos para o tratamento da AF, desenhados com o propósito de apresentar propriedades inibidoras do TNF- α e doadoras de óxido nítrico (NO). Foi avaliada a estabilidade química dos compostos sintetizados, em água, pH 1,2 e pH 7,4, sendo o Composto II o mais estável tanto em pH ácido como em água. Em pH básico, todos os compostos se mostraram instáveis. Os compostos III e VI apresentaram uma maior inibição da agregação plaquetária, atividade também atribuída à capacidade de doação de NO. O composto III foi o único a mostrar-se inibidor de TNF- α e IL-1 β , em todas as concentrações avaliadas, e, também, mostrou-se inibidor de NO, no teste induzido por LPS. Diante de todos os ensaios realizados, o composto III é o mais promissor candidato a fármaco, entre os compostos sintetizados, para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica mundial da frequência de HbS e sua correlação com as áreas onde a malária é endêmica.	18
Figura 2	Diferenças nas cadeias polipeptídicas da HbF e HbA.	21
Figura 3	Diferença estrutural da hemácia falciforme em relação à hemácia normal.	22
Figura 4	Fisiopatologia da anemia falciforme.	23
Figura 5	Fórmula estrutural de talidomida, com destaque para o anel ftalimídico.	27
Figura 6	Representação esquemática da biossíntese de NO.	28
Figura 7	Classificação dos compostos híbridos de acordo com a estratégia de hibridação utilizada.	38
Figura 8	Identificação estrutural do intermediário I.	57
Figura 9	Identificação estrutural do composto I.	60
Figura 10	Identificação estrutural do composto II.	63
Figura 11	Identificação estrutural do intermediário III.	65
Figura 12	Identificação estrutural do intermediário V.	67
Figura 13	Identificação estrutural do intermediário VI.	69
Figura 14	Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário VI incorreto obtido.	71
Figura 15	Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do intermediário VI incorreto obtido – ampliação na região aromática.	71
Figura 16	Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3) do intermediário VI incorreto obtido – ampliação na região alquílica.	71
Figura 17	Identificação estrutural do composto III.	74
Figura 18	Identificação estrutural do composto V.	75

Figura 19	Identificação estrutural do composto VI.	77
Figura 20	Tempo de sangramento em camundongos uma hora após administração dos compostos via oral.	79
Figura 21	Porcentagem de agregação plaquetária obtida com os compostos sintetizados.	80
Figura 22	Cromatograma da seletividade do método analítico para o composto I.	85
Figura 23	Curva de linearidade do composto I.	86
Figura 24	Cromatograma de seletividade do método analítico para o composto II.	87
Figura 25	Curva de linearidade do composto II.	88
Figura 26	Estabilidade do composto II em soluções.	89
Figura 27	Estabilidade do composto III em soluções (1500 ng/mL).	91
Figura 28	Cromatograma de seletividade do método analítico para o composto VI.	91
Figura 29	Curva de linearidade do composto VI.	92
Figura 30	Estabilidade do composto VI em soluções.	93
Figura 31	Comparação estrutural dos compostos I e II.	95
Figura 32	Comparação estrutural dos compostos II e VI.	95
Figura 33	Comparação estrutural dos compostos I e III.	96
Figura 34	Viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos.	98
Figura 35	Concentração de TNF- α produzido por macrófagos em meio contendo os compostos, em diferentes concentrações, utilizando LPS como controle positivo.	99
Figura 36	Concentração de IL-1 β produzido por macrófagos em meio contendo os compostos, em diferentes concentrações, utilizando LPS como controle positivo.	101

Figura 37	Porcentagem de inibição da produção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos, em meio contendo o composto III.	102
Figura 38	Inibição da liberação de óxido nítrico proveniente de macrófagos pelos compostos II, III, V e VI.	103

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Planejamento estrutural dos compostos I, II, III, V e VI.	40
Esquema 2	Mecanismo de reação para formação do Intermediário I.	56
Esquema 3	Formação do acetil nitrato.	59
Esquema 4	Formação do pentóxido de dinitrogênio.	59
Esquema 5	Formação do nitrato de metilftalimida.	60
Esquema 6	Mecanismo de formação dos derivados arilftalimídicos funcionalizados.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário I em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	57
Tabela 2	Comparação entre os deslocamentos químicos do intermediário I e o descrito em literatura por Santos, 2007.	58
Tabela 3	Bandas de absorção em IV relativas ao composto I em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	61
Tabela 4	Comparação entre os deslocamentos químicos do composto I e o descrito em literatura por Santos, 2007.	61
Tabela 5	Bandas de absorção em IV relativas ao composto II em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	63
Tabela 6	Comparação entre os deslocamentos químicos do composto II e o descrito em literatura por Santos, 2007.	63
Tabela 7	Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário III em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	66
Tabela 8	Comparação entre os deslocamentos químicos do intermediário III e o descrito em literatura por Santos, 2007.	66
Tabela 9	Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário V em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	67
Tabela 10	Comparação entre os deslocamentos químicos do intermediário V e o descrito em literatura por Santos, 2007.	68
Tabela 11	Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário VI em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	69
Tabela 12	Comparação entre os deslocamentos químicos do intermediário VI e o descrito em literatura por Santos, 2007.	69
Tabela 13	Comparação da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) do composto obtido com o descrito previamente em literatura (solvente CDCl_3 em ambos).	72
Tabela 14	Bandas de absorção em IV relativas ao composto III em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	74

Tabela 15	Comparação entre os deslocamentos químicos do composto III e o descrito em literatura por Santos, 2007.	74
Tabela 16	Bandas de absorção em IV relativas ao composto V em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	76
Tabela 17	Comparação entre os deslocamentos químicos do composto V e o descrito em literatura por Santos, 2007.	76
Tabela 18	Bandas de absorção em IV relativas ao composto VI em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.	77
Tabela 19	Comparação entre os deslocamentos químicos do composto VI e o descrito em literatura por Santos, 2007.	78
Tabela 20	Precisão e exatidão do método analítico para o composto I.	86
Tabela 21	Precisão e exatidão do método analítico para o composto II.	89
Tabela 22	Precisão e exatidão do método analítico para o composto VI.	93
Tabela 23	Tempo de estabilidade dos compostos nas condições propostas.	94

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
μ	micro
π	pi
γ	gama
δ	delta
κ	kappa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Intermediário I	2-(hidroximetil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona
Intermediário III	2-[3-(hidroximetil)fenil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona
Intermediário V	2-[4-(hidroximetil)fenil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona
Intermediário VI	2-[4-(2-hidroxietil)fenil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona
Composto I	nitrato de (1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il) metil
Composto II	nitrato de 2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)etil
Composto III	3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato
Composto V	4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato
Composto VI	nitrato de 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)fenil]etil
AF	Anemia falciforme
NO	Óxido nítrico
HU	Hidroxiuréia
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HbA	Hemoglobina A
SUS	Sistema Único de Saúde
ANOVA	Análise de variância
R	Coeficiente de correlação
CV (%)	Coeficiente de variação (%)
DP	Desvio padrão
EPM	Erro padrão da média
DPR	Desvio padrão relativo
CMC	Carboximetilcelulose
DCM	Diclorometano

DMSO	Dimetilsulfóxido
Ac ₂ O	Anidrido acético
HNO ₃	Ácido nítrico
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
IL-1 β	Interleucina 1 beta
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição endotelial
NK	Natural Killer
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
IV	Infravermelho
PM	Peso molecular
PRP	Plasma rico em plaquetas
KBr	Brometo de Potássio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
NaCl	Cloreto de sódio
KCl	Cloreto de potássio
IR	Intermediário de reação
CCD	Cromatografia de camada delgada
FDA	Food and Drug Administration
LPS	Lipopolisacarídeo
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva

OMS	Organização Mundial da Saúde
ADP	Difosfato de adenosina
AAS	Ácido acetilsalicílico
TXA ₂	Tromboxano A ₂
PgE ₂	Prostaglandina E ₂
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OS	Fosfatidil-serina
CO ₂	Dióxido de carbono
GC	Guanilato ciclase
GCa	Guanilato ciclase ativa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CQA	Controle de qualidade alto
EUA	Estados Unidos da América
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PAF	Platelet-Activating Factor
ROS	Reactive oxygen species
MAPquinase	Proteinoquinase de ativação mitogênica

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. Histórico.....	16
1.2. Origem e epidemiologia.....	17
1.3. Um Problema de Saúde Pública.....	19
1.4. Fisiopatologia.....	20
1.5. Tratamento.....	31
1.6. Modificações Moleculares.....	36
1.7. Planejamento Estrutural.....	38
2. Objetivos.....	41
3. Desenvolvimento.....	42
3.1. Material e Métodos.....	42
3.1.1. Material.....	42
3.1.2. Métodos.....	43
3.1.2.1. Metodologia sintética.....	43
3.1.2.2. Metodologia analítica.....	43
3.1.2.3. Ensaaios biológicos.....	44
3.2. Resultados e Discussões.....	56
3.2.1. Síntese dos intermediários e compostos finais.....	56
3.2.2. Avaliação do tempo de sangramento e agregação plaquetária.....	79
3.2.3. Estabilidade Química.....	85
3.2.4. Teste imunoquímico para detecção de TNF- α e IL-1 β	97
3.2.5. Teste de inibição da liberação de óxido nítrico.....	102
4. Conclusão.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
APÊNDICES.....	114
ANEXOS.....	138

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A anemia falciforme (AF) foi descrita primeiramente em 1910, por James Herrick, médico cardiologista nos EUA, após um caso em um estudante de odontologia que apresentava um quadro de anemia, úlcera dos membros inferiores e complicações pulmonares. As hemácias do estudante foram descritas como alongadas e em forma de foice, e os sintomas foram associados com casos já descritos há séculos na África, porém, era um mal desconhecido até então (HERRICK, 1910; HERRICK, 1924).

Linus Pauling, em 1945, foi o primeiro a considerar a hipótese de que a nova doença fosse originada a partir de uma anormalidade na molécula de hemoglobina (Hb). Tal hipótese foi então confirmada em 1949 através da demonstração da migração diferencial da Hb normal de um adulto, a HbA e daquela anormal, em forma de foice, a HbS, por eletroforese em gel, em ambos os estados, oxigenado e desoxigenado. Assim, demonstrou-se que existe uma diferença no número ou tipo de grupos ionizáveis entre as duas hemoglobinas (PAULING *et al.*, 1949).

Ainda no mesmo ano, em 1949, verificou-se que era uma doença genética de herança autossômica recessiva, sendo a AF a expressão homozigota, e o traço falciforme, a heterozigota (NEEL, 1949).

Janet Watson, concomitantemente, previu a importância da Hb fetal (HbF), após constatar que o tempo para o aparecimento dos sintomas em recém-nascidos era maior do que nas mães que apresentavam a doença, fazendo uma correlação benéfica com os maiores níveis de HbF circulantes (WATSON *et al.*, 1948).

Em 1954, Vernon Ingram demonstrou que a diferença existente entre a cadeia polipeptídica da Hb de indivíduos normais e daqueles com HbS estava em um único resíduo de aminoácido. A HbA contém ácido glutâmico, enquanto a HbS contém valina na mesma posição 6 da cadeia da β -globina (INGRAM, 1958). Finalmente, em 1960, Perutz decifrou então a estrutura molecular da hemoglobina e sua função. (PERUTZ, 1960).

1.2. Origem e Epidemiologia

Anualmente, aproximadamente 330 mil crianças nascem com algum tipo de hemoglobinopatia no mundo e, dessas, em torno de 250 mil são portadoras da anemia falciforme. Estima-se ainda que 85% dos portadores dessa enfermidade estejam localizados no continente africano, seguido pela Índia (AYGUN E ODAME, 2012, SARAF *et al.*, 2014).

A AF é a doença hematológica hereditária de maior prevalência no Brasil e, segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), cerca de 3.500 crianças nascem no país anualmente com a doença e 200.000 possuem o traço falciforme (FELIX *et al.*, 2010).

Cerca de 8% dos afro-americanos são portadores do gene da anemia falciforme, e estima-se que vivam cerca de 100 mil pessoas nos Estados Unidos da América (EUA) com a doença, havendo pelo menos 75 mil hospitalizações custando mais de 500 milhões de dólares anualmente para o tratamento de complicações relacionadas à doença. (SARAF *et al.*, 2014; GEE, 2013).

Acredita-se que a doença tenha surgido entre os períodos paleolítico e mesolítico, em países do centro-oeste africano, Índia e leste da Ásia (WHO, 1982).

Havia entre as tribos do continente africano o hábito de tatuar os portadores da doença como uma maneira de identificá-los (RUIZ, 2007).

A antiga distribuição geográfica da doença ocorria nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Este fato pode ser explicado pela hipótese de que os portadores heterozigóticos falcêmicos dessas regiões possuíam uma proteção contra as infecções endêmicas de malária. A África e a Índia são palco de grande morbidade e mortalidade por essa doença, e a forte seleção natural ocorrida nessas regiões culminou com a disseminação do traço falcêmico em grande parte da população. Este foi o primeiro fator de proteção descrito para malária, embora o mecanismo dessa ação protetora não tenha sido completamente elucidado (WILLIAMS *et al.*, 2005).

Figura 1. Distribuição geográfica mundial da frequência de HbS e sua correlação com as áreas onde a malária é endêmica.



(Fonte: Adaptado de PIEL *et al.*, 2013; PIEL *et al.*, 2010.)

No Brasil, o intenso tráfico de escravos africanos introduziu a HbS no país desde meados de 1550 e, após a abolição da escravatura, quando se intensificaram os movimentos migratórios para as diversas regiões do país, houve uma grande miscigenação racial, que é característica até hoje, e o gene anormal foi amplamente disseminado entre os brancos (RUIZ, 2007).

A distribuição de indivíduos com traço falciforme em nosso país se dá de maneira heterogênea, sendo mais predominante nas regiões Norte e Nordeste, chegando a acometer de 6% a 10% da população afro-descendente. Nas regiões Sul e Sudeste a prevalência é menor, sendo de cerca de 2% a 3%. A estimativa é de que existam aproximadamente 30.000 pessoas com anemia falciforme no país (CANÇADO E JESUS, 2007).

1.3. Um problema de Saúde Pública

Uma vez que a população brasileira é considerada mestiça, a AF passou a ser considerada uma questão de saúde pública, e, em virtude da intensa luta social em prol de um tratamento igualitário e acessível a todos, as políticas públicas em torno da atenção aos pacientes portadores da doença resultaram na criação de medidas importantes que ratificam o princípio de equidade do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2014).

Em 2001, foi criado o PNTN, mediante a Portaria nº822 do Ministério da Saúde, incluindo a triagem para hemoglobinopatias, que se dá pelo teste de eletroforese de hemoglobina, representando um reconhecimento da importância desse grupo de doenças como um problema de saúde pública no Brasil. (BRASIL, 2001).

Em 2005 foi publicada a Portaria nº 1.391, que instituiu, no âmbito do Sistema Público de Saúde, as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias. (BRASIL, 2005)

Foram grandes os benefícios trazidos com a instituição dessa triagem, a começar pela igualdade de direito a todos os recém-nascidos de se realizar a

investigação da presença da AF, independentemente de origem geográfica, ancestralidade e classe socioeconômica (RAMALHO *et al.*, 2003).

Além de um diagnóstico precoce, é fundamental que persista políticas públicas destinadas a toda população, e uma capacitação adequada dos profissionais de saúde para que a orientação dada sobre a conduta no tratamento seja correta. Assim, a morbimortalidade da doença tende a diminuir e o paciente pode ser prontamente inserido em programas multidisciplinares, recebendo cuidados preventivos para uma melhoria na sua qualidade e aumento da expectativa de vida, que atualmente é de cerca de 30 anos no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2014; BRASIL, 2009).

1.4. Fisiopatologia

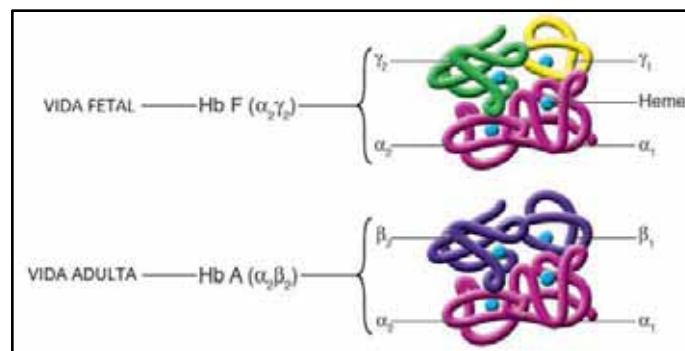
1.4.1. Âmbito celular e molecular

A AF é uma doença crônica, de transmissão autossômica recessiva, caracterizada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, onde há a substituição de uma base nitrogenada adenina por uma timina (GAG $\rightarrow$ GTG), resultando na troca de um ácido glutâmico por uma valina na superfície da cadeia β -globina variante (β^S -globina) (CANÇADO *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.* 2009; CHIRICO E PIALOUX, 2012). Essa alteração é suficiente para gerar uma modificação na estrutura da molécula de Hb (MALOWANY & BUTANY, 2012; GALIZA NETO & PITOMBEIRA, 2003).

A Hb humana normal (HbA) é uma estrutura tetramérica contendo dois pares de subunidades polipeptídicas idênticas, cada uma codificada por uma família diferente de genes. As duas cadeias polipeptídicas são denominadas α e β , constituindo a Hb majoritária no adulto, a HbA ($\alpha_2\beta_2$) (FRENETTE & ATWEH, 2007).

Durante a vida fetal, o tipo predominante de Hb é a HbF, que contém duas subunidades α e duas γ ($\alpha_2\gamma_2$) (FRIEDRICH, 2011). Após o nascimento, há uma substituição gradual de HbF à HbA, e os pacientes com distúrbios dos genes de β -globina começam a manifestar as características clínicas de suas doenças quando é concluída essa troca (Figura 2) (FRENETTE & ATWEH, 2007).

Figura 2. Diferenças nas cadeias polipeptídicas da HbF e HbA.



(Fonte: Adaptado de FRENETTE & ATWEH, 2007)

A molécula de Hb que sofreu a alteração estrutural recebe a denominação de HbS, e possui diferenças físico-químicas significativas quando comparada com a Hb normal. Tais diferenças ocorrem devido à perda de cargas elétricas, ocasionadas pela substituição do ácido glutâmico pela valina no gene da β -globina, fazendo com que a hemácia sofra deformação e enrijecimento de sua membrana celular. O ácido glutâmico é carregado negativamente, enquanto a valina é um aminoácido neutro. Esses fatores facilitam a polimerização das moléculas de HbS quando desoxigenadas, fazendo com que se organizem em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez podem se arranjar em feixes paralelos, conferindo o aspecto de foice observado por microscopia eletrônica (Figura 3) (GALIZA NETO & PITOMBEIRA, 2003; ZAGO, 2007).

Figura 3. Diferença estrutural da hemácia falciforme em relação à hemácia normal.



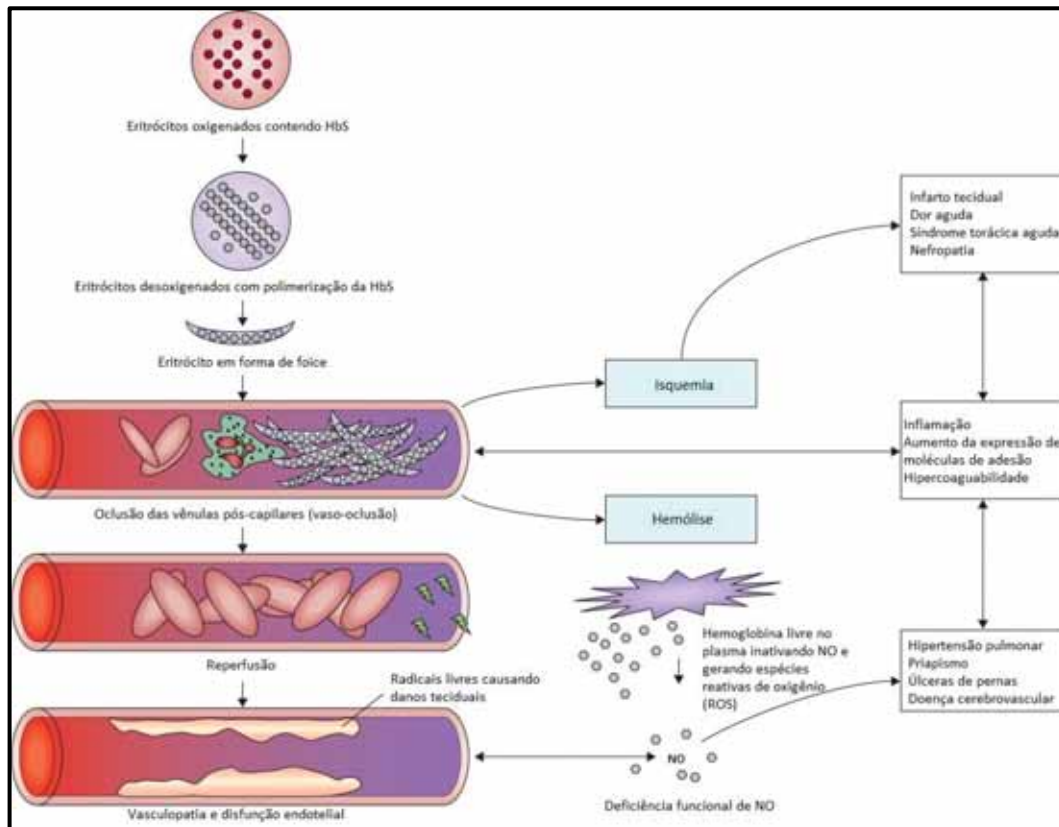
(Fonte: FRIEDRICH, 2011)

O fenômeno da falcização, porém, ocorre quando há a soma de algumas condições, devendo as moléculas de HbS estar, além de desoxigenadas, em elevada concentração, e sofrer um retardo na circulação, pois, caso ocorra uma oxigenação rápida, elas adquirem conformação normal novamente. Esse processo ocorre de maneira heterogênea, predominando em determinados órgãos, como é o caso do baço, que possui grande quantidade de hemácias falciformes (ZAGO, 2007).

As alterações causadas pela formação dos polímeros de HbS são variadas, tais como aumento do cálcio intracelular e de membrana, efluxo de potássio, desidratação, aumento da densidade dos eritrócitos e deformabilidade, além de exposição de moléculas de adesão na membrana celular, fatores que podem culminar na hemólise crônica das hemácias (Figura 4) (ZAGO, 2007).

A adesão de eritrócitos a membrana celular é o início da amplificação das alterações moleculares para os tecidos e órgãos, podendo causar obstrução e hipóxia local, além de agravar os fenômenos inflamatórios. Ocorrem ainda alterações na coagulação e recrutamento de células inflamatórias (granulócitos e monócitos) (ZAGO, 2007).

Figura 4. Fisiopatologia da anemia falciforme.



(Fonte: Adaptado de REES *et al.*, 2010)

Os eritrócitos falciformes expressam uma maior quantidade de moléculas de adesão, sendo algumas delas, inclusive, expressas somente pelos reticulócitos, células jovens presentes em maior quantidade em pacientes com AF, tendo importante papel na propagação de fenômenos vaso-oclusivos. A fosfatidil-serina (PS) é uma molécula de adesão que proporciona aos eritrócitos uma capacidade três vezes maior de adesão celular, e tem sido relacionada à geração de trombina, necessária para formação de coágulos de fibrina, com papel fundamental na cascata de coagulação desencadeada durante a crise vaso-oclusiva (HEBBEL, 1997).

O processo vaso-oclusivo gera um quadro de isquemia que pode culminar em infarto tecidual e, além disso, é o responsável pelos sintomas clínicos da doença,

como as crises álgicas, síndrome torácica aguda e nefropatia. O ciclo de isquemia seguido de reperfusão gera lesão tecidual e causa estresse oxidativo e inflamatório.

O recrutamento de células inflamatórias devido à inflamação que se instala no paciente culmina na liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que estimula a produção de radicais livres e de outras citocinas, como as interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e prostaglandina E₂ (PGE₂), agravando ainda mais o processo vaso-oclusivo (WOOD *et al.*, 2005; SANTOS, 2007).

1.4.1.1. O papel do TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica com importante atividade pró-inflamatória e imunoreguladora. É secretado primariamente por monócitos e macrófagos ativados em resposta a estímulos inflamatórios, podendo ser produzido também por linfócitos T e por células natural killer (NK) (CESSAK *et al.*, 2014; SANTOS, 2007).

Em baixas concentrações fisiológicas, é responsável por manter as defesas do organismo frente a infecções, porém, em níveis elevados, causa inflamação e lesão tissular (CESSAK *et al.*, 2014).

O TNF- α , juntamente com a IL-1 β , quando secretados pelos monócitos, sinalizam o NF- κ B, fator de transcrição endotelial, a produzir mais citocinas e quimiocinas, tais como IL-6, IL-8 e o fator de ativação plaquetária (PAF). A IL-6 liberada nos locais de vaso-oclusão estimula a produção hepática de reagentes de fase aguda, tais como a proteína C reativa e o fibrinogênio e, a alteração das propriedades anticoagulantes do endotélio vascular somada ao aumento de PAF

pode dificultar a circulação e aumentar a resistência do fluxo sanguíneo (HUSSE, 2014).

O TNF- α promove, ainda, um aumento nas propriedades quimiotáticas, aumentando a aderência de neutrófilos no endotélio vascular, que são estimulados a degranular devido à presença de IL-8. Os neutrófilos ativados contribuem com o estresse oxidativo, liberando enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido e peróxido de hidrogênio (HUSSE, 2014).

Assim, é nítida a contribuição do TNF- α para o agravamento das crises vaso-oclusivas e da inflamação na AF, uma vez que os pacientes apresentam níveis elevados dessa citocina circulante (MALAVÉ *et al.*, 1993). Além disso, suas concentrações séricas possuem uma correlação inversa com a quantidade de HbF no paciente, conforme comprovado por Malavé e colaboradores (1993). Sua inibição pode representar uma estratégia terapêutica para prevenção de complicações vasculares e inflamatórias da AF.

1.4.1.2. Inibidores de TNF- α

Os fármacos inibidores de TNF- α são representados por anticorpos monoclonais neutralizantes, inibidores da enzima conversora do TNF- α (TACE) e determinadas substâncias relacionadas estruturalmente à talidomida.

A talidomida (α -[N-ftalimido]-glutarimida), um derivado sintético do ácido glutâmico, sintetizada na Alemanha em 1954, foi, por muito tempo, considerada um bom fármaco hipnótico sedativo, com propriedade anti-emética rapidamente difundida na Europa, Austrália, Ásia e América do Sul (BARTLETT *et al.*, 2004). Ficou popular por não causar dependência e promover poucos efeitos adversos (LIMA *et al.*, 2006), sendo utilizada para prevenção de náuseas em mulheres

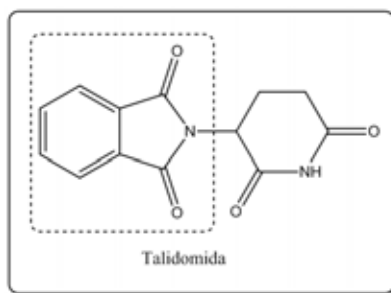
grávidas. Porém, foi observada a ocorrência de malformações congênitas (focomegalia) nos fetos devido à sua utilização contínua no primeiro trimestre da gravidez, sendo então retirada do mercado na década de 60 (ITO & HANDA, 2012).

Em 1965, apesar da teratogenicidade causada pela talidomida, o médico dermatologista israelita Jacob Sheskin observou acentuada redução da dor associada ao processo inflamatório presente na hanseníase com o uso desse fármaco, identificando então suas propriedades anti-inflamatórias (LIMA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2006). Em 1998, ela foi aprovada pelo FDA para o tratamento da hanseníase.

Os efeitos anti-inflamatórios observados foram, posteriormente, atribuídos à sua capacidade de inibir a síntese de TNF- α produzido por macrófagos ativados, conforme demonstrado primeiramente por Sampaio e colaboradores (1991). O TNF- α é importante no processo de hiperalgesia periférica, e sua inibição está relacionada à redução da dor, justificando, assim, os efeitos analgésicos periféricos da talidomida (RIBEIRO *et al* 2000).

A molécula de talidomida (Figura 5) consiste em dois sistemas de anéis, o anel ftalimídico e o anel glutarimídico. Ela possui dois isômeros opticamente ativos, R(+) e S(-), que podem formar uma mistura racêmica no organismo (MULLER *et al.*, 1996; BARTLETT *et al.*, 2004). Estudos de relação estrutura-atividade demonstraram o caráter farmacofórico da subunidade ftalimídica (SHIBATA, 1995), não só para atividade anti-inflamatória, como também imunomoduladora (BORGES & FRÖEHLICH, 2003), atribuindo-se a ela a ação anti-TNF- α (LIMA *et al.*, 2002). A subunidade glutarimídica é a responsável pelos efeitos teratogênicos da molécula (LIMA *et al.*, 2002).

Figura 5. Fórmula estrutural de talidomida, com destaque para a o anel ftalimídico.

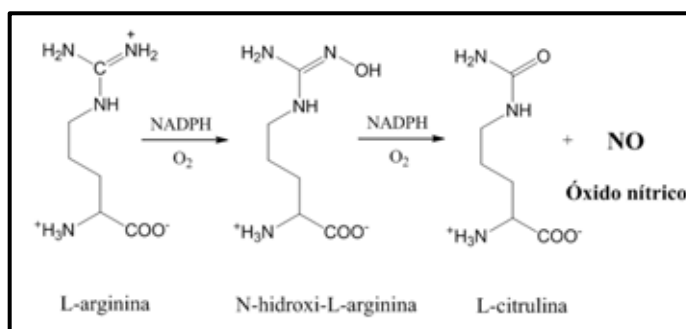


(Fonte: próprio autor)

Com isso, a busca por análogos de talidomida, contendo apenas a subunidade ftalimídica em sua estrutura, sem a toxicidade causada pelo anel glutarimídico, representa novas possibilidades terapêuticas para o tratamento de doenças onde ocorre o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , como é observado na AF.

1.4.1.3. Óxido nítrico

As células endoteliais participam fortemente da manutenção da hemostasia do organismo, produzindo óxido nítrico (NO), importante vasodilatador que regula o tônus vascular. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor (DUSSE *et al.*, 2003), e sua síntese (Figura 6) resulta da oxidação da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é agrupada em duas categorias de isoformas, a constitutiva (cNOS) e a induzível (iNOS). A constitutiva compreende a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), que está presente geralmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (CHELUCCI, 2013; SPARKENBAUGH & PAWLINSKI, 2013).

Figura 6. Representação esquemática da biossíntese de NO.(Fonte: Adaptado de DUSSE *et al.*, 2003)

No interior do músculo, ele interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando em uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). Ela então catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), formando a guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de GMPc é responsável pelo relaxamento muscular, que envolve a diminuição da entrada do íon Ca^{2+} na célula (SPARKENBAUGH & PAWLINSKI, 2013).

Ao sair da célula endotelial, o NO pode também penetrar nas plaquetas, e de maneira semelhante ao que ocorre no músculo, gerar aumento de GMPc e diminuição de Ca^{2+} . Como ele é essencial para a ativação plaquetária, tem-se uma redução do processo. As próprias plaquetas, como já mencionado, também possuem eNOS (SPARKENBAUGH & PAWLINSKI, 2013).

Durante o processo fisiopatológico da AF, o endotélio lesado expõe o fator tecidual, que desencadeia a cascata de coagulação (ATAGA *et al.*, 2012), e a hemólise crônica dos eritrócitos falciformes libera Hb livre, arginase e difosfato de adenosina (ADP). A Hb liberada pode seqüestrar o NO endotelial e, assim, diminuir seus níveis basais. A arginase pode metabolizar a arginina plasmática e assim reduzir a disponibilidade dessa molécula que atuaria como substrato para síntese de

NO. Além disso, o aumento de ADP pode contribuir para a ativação e agregação de plaquetas e agravar o processo vaso-oclusivo (REITER *et al.*, 2003; VANNI *et al.*, 2007).

Sendo assim, a diminuição dos níveis de NO contribui para a vasculopatia e hipercoaguabilidade, que retarda o fluxo sanguíneo e cria ainda uma condição favorável para a contínua falcização das hemácias (SPARKENBAUGH & PAWLINSKI, 2013), além de estar relacionada com sintomas clínicos da AF como hipertensão pulmonar, úlcera de pernas, priapismo e doença cerebrovascular (KATO *et al.*, 2006).

Assim, fármacos doadores de NO podem ser úteis no contexto da AF, uma vez que os mecanismos da vasoproteção estão ligados à manutenção do tônus vascular, manutenção da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e efeito antioxidativo através da indução da produção da enzima superóxido dismutase na camada muscular do vaso, diminuindo o oxigênio disponível e a possibilidade de geração de peroxinitrito (DUSSE *et al.*, 2003; HOPPE, 2014).

1.4.2. Aspectos clínicos

Pacientes com AF apresentam quadros clínicos diversificados, uma vez que o fenótipo da doença é multifatorial, e fatores como o genótipo da doença (homozigose para HbS), fatores genéticos agravantes para a polimerização, falcização e hemólise, fatores ambientais e condições socioeconômicas e de acesso médico podem determinar diferentes perfis de paciente (ZAGO *et al.*, 2007, GEE, 2013).

A anemia presente nos pacientes é gerada em virtude da baixa sobrevivência dos eritrócitos, sendo, portanto, uma anemia hemolítica, que pode ser agravada pela deficiência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e esplenomegalia. De maneira geral, tende a ser moderada, e, quando crônica, pouco pronunciada, não sendo necessária para a maioria dos pacientes a realização de transfusões sanguíneas. Porém, pode trazer algumas consequências como retardo na maturação sexual, insuficiência cardíaca na terceira década de vida e contribuir para a geração de úlcera de perna (ZAGO *et al.*, 2007).

A dor aguda é um sintoma presente na maioria dos pacientes. Ela está associada à isquemia tecidual aguda causada pela vaso-oclusão, e os locais mais atingidos são membros inferiores e superiores, podendo ocorrer de maneira mais grave na síndrome torácica aguda. Esta é a complicação aguda com maior índice de mortalidade na AF, caracterizando-se por intensa dor na região torácica acompanhada de febre, dispnéia e hipoxemia, e sua origem é, na maioria das vezes, associada à infecção e vaso-oclusão em conjunto. (ZAGO *et al.*, 2007; BOOTH *et al.*, 2010; GEE, 2013).

A dor crônica geralmente está associada à necrose asséptica da cabeça do úmero ou do fêmur, causada pela isquemia óssea crônica em locais de baixa vascularização. Nesses casos, é indispensável o uso contínuo de analgésicos (ZAGO *et al.*, 2007).

Níveis mais elevados de HbF nos pacientes podem contribuir para minimizar a ocorrência de crises dolorosas, visto que ela inibe a polimerização da hemoglobina falciforme (FRIEDRICH, 2011).

Além disso, outros sintomas podem ser manifestados pelo paciente, tais como asplenia funcional, seqüestro esplênico, infecções, complicações cardio-

respiratórias, insuficiência renal, cálculos biliares, priapismo, necrose avascular e acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico, cada um ocorrendo mais substancialmente em determinada faixa etária (ZAGO *et al.*, 2007).

A asplenia funcional, que é a perda da função do baço, geralmente ocorre nos primeiros anos de vida, e é extremamente perigosa por facilitar infecções por agentes causadores de meningites e septicemias graves, que tem uma elevada mortalidade associada. Já a insuficiência renal e os cálculos biliares ocorrem em pacientes mais velhos, visto que é necessária uma constância na lesão tissular para que o problema seja manifestado (ZAGO *et al.*, 2007; GEE, 2013).

1.5. Tratamento

O tratamento para a AF limita-se ao controle sintomático e manejo preventivo das complicações. A hidroxiuréia (HU) ainda é o único medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento da doença (SARAF *et al.*, 2014), e traz benefícios diretamente relacionados ao mecanismo fisiopatológico da doença, mas, além dela, outras medidas podem ser incluídas na tentativa de melhorar a qualidade de vida do paciente e aumentar sua sobrevida. O transplante de medula ainda é a única medida conhecida para a cura da doença, mas apresenta uma série de limitações que incluem reduzido número de doadores compatíveis, variação na gravidade da doença e possibilidade de rejeições (FRIEDRICH, 2011).

Devido ao elevado risco de infecções na AF, principalmente por *pneumococos*, recomenda-se o uso de penicilina profilática a partir dos três meses de idade, quando os níveis de HbF ainda são altos e a função do baço ainda não está comprometida, uma vez que esse comprometimento é um fator de predisposição para infecção por esse microrganismo (BOOTH *et al.*, 2010).

A administração contínua de antibióticos ainda é controversa, consoante o alto risco que isso representa para o desenvolvimento de resistência. É necessário avaliar o custo benefício da medida profilática, mas estudos indicam significativa redução das infecções em crianças que fazem uso dessa medida (BOOTH *et al.*, 2010).

A vacinação é outra forma de prevenir sérias infecções, destacando-se àquelas contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, e também contra os vírus da hepatite B (BOOTH *et al.*, 2010).

Transfusões sanguíneas também são comumente realizadas em pacientes com AF, principalmente naqueles que sofrem crise aplástica ou seqüestro esplênico e/ou hepático. Após sucessivas transfusões, é comum uma sobrecarga de ferro, que se deposita em órgãos como fígado e coração. Recomenda-se, assim, terapia com agentes quelantes. Um exemplo é a deferroxamina, introduzida na terapêutica desde 1963. Porém, a necessidade de administração intravenosa e seu alto custo limitam o seu uso. Ela é recomendada quando os níveis de ferro corporal total são elevados e os níveis séricos de ferritina estão acima de 2000 µg/mL (COOD, 2008).

O deferasirox é outro agente quelante, aprovado pelo FDA em 2005 e que possui vantagens em relação à deferroxamina por ser administrado via oral, aumentando a adesão do paciente ao tratamento, porém seu custo também é elevado (PORTER, 2010; SECHAUD *et al.*, 2008).

A decitabina (5-aza-2-deoxicitidina), é um análogo de pirimidina capaz de inibir a enzima metil-transferase, responsável pela metilação do gene de gama globina e consequente diminuição da produção de HbF. Assim, é capaz de induzir a maior produção de HbF (MANWANI & FRENETTE, 2013).

Ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico, inibem a enzima histona deacetilase, e com isso a acetilação das histonas é maior, afetando diretamente a estrutura da cromatina e aumentando a taxa de transcrição gênica de gama globina, aumentando, portanto, a produção de HbF. Porém, a exposição não deve ser prolongada, devido a efeitos antiproliferativos cumulativos (MCCAFFREY *et al.*, 1997; KUTLAR *et al.*, 2012).

Um surfactante não iônico, o polaxamer 188, possui propriedades antitrombóticas e antiadesivas úteis para o tratamento da AF. Estudos clínicos têm demonstrado redução do número de crises dolorosas nos pacientes que o utilizam, devido ao aumento da oxigenação tecidual (SANTOS & CHUNG, 2012).

A manutenção do equilíbrio osmótico também é importante para evitar a desidratação dos eritrócitos e com isso favorecer o aumento da concentração intracelular de Hb e sua polimerização. O bloqueio de transportadores iônicos é uma estratégia útil para controlar esse equilíbrio. O cetiedil é um fármaco analgésico, antiespasmódico, anestésico local e vasodilatador, com capacidade de alterar a permeabilidade da membrana do eritrócito aos íons potássio e cálcio (FLATMAN *et al.*, 2004; LEW *et al.*, 2005).

Há relatos na literatura de moléculas capazes de modificar estruturalmente a Hb, e com isso reduzir sua polimerização. Propõe-se que o processo de modificação ocorra devido ao aumento da afinidade pelo oxigênio e/ou aumento da solubilidade da HbS. O clofibrato e isotiocianatos são exemplos de fármacos com esse tipo de ação (PARK *et al.*, 2003; MANWANI & FRENETTE, 2013).

O prasugrel inibe a ativação e agregação plaquetária mediada por ADP, e estudos mostram redução dos níveis de P-selectina e P-selectina solúvel, biomarcadores dos processos citados. Além disso, parece diminuir a intensidade da

dor nos pacientes. Mostrou-se ainda bem tolerado por crianças em um estudo de fase III (MANWANI & FRENETTE, 2013; HOPPE, 2014).

Outra medida adotada é a suplementação dos pacientes com vitaminas e ácido fólico, visto que é comum a presença de deficiências devido à hemólise crônica.

1.5.1. Hidroxiuréia

A HU foi sintetizada pela primeira vez por Dressler e Stein, em 1869, na Alemanha, mas, somente um século depois, em 1967, foi aprovada pelo FDA norte-americano para o tratamento de doenças neoplásicas e posteriormente para o uso em pacientes com leucemia mieloide crônica, psoríase e policitemia vera (CANÇADO *et al.*, 2009).

Seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio da síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA), através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, que converte ribonucleotídeos a deoxirribonucleotídeos, mantendo as células na fase G1/S do ciclo celular (HANFT *et al* 2000; CANÇADO *et al.*, 2009).

A partir de 1998, após um estudo multicêntrico iniciado nos Estados Unidos e Canadá para avaliar a eficácia da HU como agente terapêutico na AF, a mesma foi aprovada pelo FDA e passou a ser utilizada no tratamento da doença, por agir diretamente no seu mecanismo fisiopatológico, trazendo grandes benefícios tais como o aumento da síntese de HbF e consequente redução da polimerização da hemoglobina falciforme em estado desoxigenado (CHARAGE *et al.*, 1995; STEINBERG, 2003; STROUSE *et al.*, 2012). A HU atua ainda diminuindo o número de neutrófilos e de moléculas de adesão na membrana eritrocitária, além de promover a síntese e biodisponibilidade de NO (KING, 2003; FIGUEIREDO, 2007).

Esses mecanismos refletem em uma redução da hemólise, diminuição da aderência dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas no endotélio vascular, diminuição da viscosidade sanguínea e vasodilatação, resultando na diminuição dos fenômenos inflamatórios e vaso-oclusivos. (FIGUEIREDO, 2007).

Embora o uso da HU tenha um impacto positivo na melhora da sobrevida dos pacientes, com redução do número de hospitalizações e do tempo de internação, e diminuição da mortalidade em cerca de 40% (CANÇADO *et al.*, 2009), cerca de 25% dos pacientes que a utilizam não respondem bem ao tratamento, o que tem estimulado a pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença.

A mielossupressão causada pelo uso crônico desse medicamento é seu efeito colateral mais frequente e conhecido, e o principal fator limitante da dose a ser administrada. Porém, considerando a ausência de outra opção terapêutica mais segura e eficaz, a HU continua a ser utilizada (FIGUEIREDO, 2007; GEE, 2013).

O uso do medicamento em crianças e adolescentes ainda é controverso, mas benefícios como o aumento da HbF e do volume corpuscular médio das hemácias, redução da contagem de reticulócitos e de bilirrubina total, além de melhora do funcionamento do baço, foram observados num estudo multicêntrico randomizado de Fase III conduzido em crianças de 9 a 18 meses, que receberam o medicamento por 2 anos (STROUSE *et al.*, 2012).

Um estudo de coorte retrospectivo conduzido no Brasil mostrou um aumento na sobrevida de pacientes pediátricos tratados com HU, de 66,3% para o grupo não tratado contra 97,4% para os que receberam a medicação durante aproximadamente 18 anos. Apesar da toxicidade, uma maior propensão à neutropenia moderada foi observada em crianças, não sendo evidenciadas diferenças na genotoxicidade (STROUSE *et al.*, 2012).

1.6. Modificações moleculares

Nas últimas décadas, observa-se uma revolução no processo de descoberta de novos fármacos, sendo atualmente um processo orientado pela compreensão do sítio de reconhecimento molecular ou do alvo envolvido na patologia. Entre os métodos utilizados para a obtenção de novos fármacos, os processos de modificação molecular são os mais promissores, destacando-se as estratégias de hibridação molecular, bioisosterismo e latenciação (SILVA, 2013; BARREIRO *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 1999).

A partir de uma molécula de estrutura e ação biológica já bem estabelecida, a modificação molecular propõe a obtenção de congêneres, análogos ou homólogos que apresentem uma melhor resposta biológica, com maior potência, melhores perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, redução de efeitos colaterais indesejados, além de maior segurança e aceitabilidade pelo paciente (MONTANARI, 2011; WERMUTH, 2004).

É necessário saber as contribuições de cada subunidade farmacofórica da molécula e preservá-la no desenvolvimento do novo candidato a fármaco, para que a ligação com o biorreceptor não seja prejudicada, bem como identificar possíveis grupamentos toxicofóricos, que podem ser eliminados (BARREIRO *et al.*, 2002).

A estratégia de hibridação molecular será detalhada em decorrência de sua aplicação neste trabalho.

1.6.1. Hibridação molecular

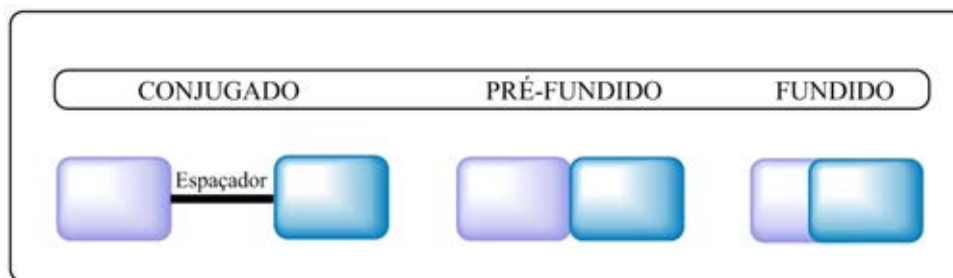
A estratégia de hibridação molecular é uma ferramenta útil no planejamento molecular de um novo composto-protótipo, e baseia-se na combinação de diferentes características estruturais de dois compostos bioativos distintos. É uma abordagem

que visa à obtenção de fármacos que sejam ligantes múltiplos, ou seja, que reconheçam mais de um receptor e, assim, possam agir em diferentes alvos. A grande vantagem é justamente o fato de que essas propriedades estão contidas em uma única molécula, sendo uma importante estratégia da química farmacêutica medicinal para o desenvolvimento de compostos (BARREIRO *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2004; BOSQUESI *et al.*, 2011).

A capacidade de apresentar propriedades farmacodinâmicas duplas pode ser interessante na abordagem de determinadas doenças em razão de suas características fisiopatológicas, assegurando uma maior eficácia terapêutica com a utilização de um único fármaco ao invés de se utilizar dois concomitantemente. Através de adequada fusão, a molécula híbrida mantém as características dos modelos originais (CHELUCCI, 2013).

Os compostos obtidos por essa técnica podem ser classificados em três diferentes grupos, conforme representado na Figura 7: conjugados, pré-fundidos ou fundidos. Nos híbridos conjugados, os farmacóforos são unidos por um espaçador por meio de uma ligação covalente não lábil, e agem sem a necessidade de uma bioativação química ou enzimática. Quando, no processo de hibridação, o tamanho do agente espaçador é diminuído a ponto das arquiteturas moleculares dos protótipos se tocarem, obtêm-se o que se denomina híbridos pré-fundidos. Os híbridos fundidos são unidos sem a presença de espaçador, podendo formar estruturas de menor tamanho e peso molecular, com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas distintas do protótipo (MORPHY & RANKOVIC, 2005; SANTOS, 2009).

Figura 7. Classificação dos compostos híbridos de acordo com a estratégia de hibridação utilizada.



(Fonte: Adaptado de MORPHY & RANKOVIC, 2005)

O planejamento de fármacos híbridos, embora promissor, deve ser feito com certos cuidados, uma vez que a união de dois fármacos distintos pode levar à obtenção de um composto inativo. A relação estrutura atividade do composto com seu receptor deve ser considerada, atentando-se às regiões de interação e àquelas estericamente impedidas e, com base nisso, planejar o espaçador a ser utilizado. Caso as duas estruturas possuam um comportamento muito particular, é provável que não seja viável a obtenção do híbrido com atividade biológica, visto que não será possível a correta interação com o respectivo receptor (SANTOS, 2007).

1.7. Planejamento estrutural dos compostos

A partir da técnica de hibridação molecular, planejou-se (SANTOS, 2007) uma série de compostos derivados ftalimídicos, através da união do grupamento farmacofórico da talidomida (subunidade A) e do produto da oxidação da hidroxiuréia (subunidade B), desenhados como inibidores de TNF- α e doadores de NO.

A HU, após oxidação, produz NO, que traz uma série de benefícios aos pacientes com anemia falciforme, tais como o aumento de HbF e vasodilatação, e, a talidomida, com suas propriedades analgésicas periféricas e anti-inflamatórias, tem suas ações mais especificamente atribuídas a sua subunidade ftalimídica, utilizada

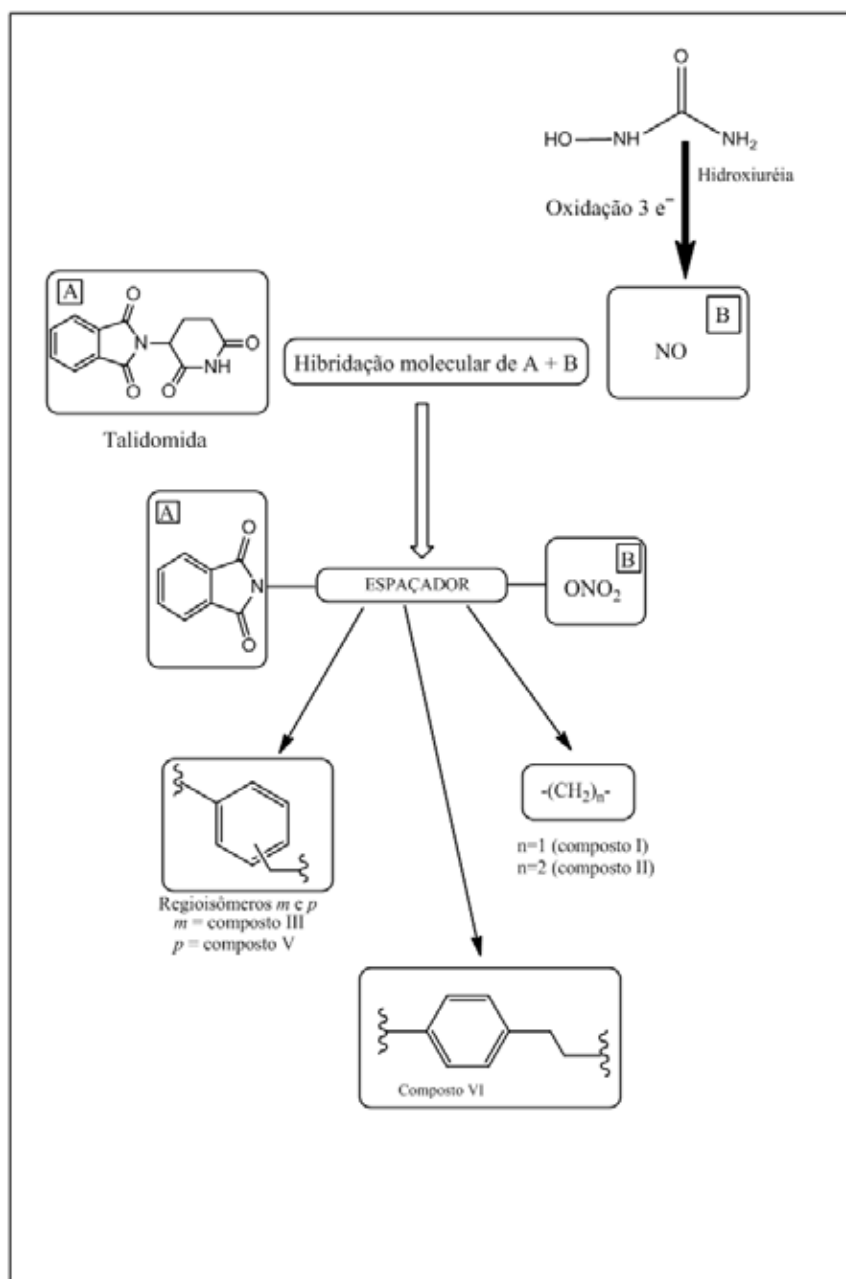
nas moléculas propostas. A atividade doadora de NO nos compostos, já comprovada anteriormente (SANTOS, 2011), é determinada pela presença do éster de nitrato orgânico na estrutura das moléculas.

A proposta no desenho dos compostos foi à obtenção de derivados ftalimídicos híbridos, através da supressão da subunidade glutarimídica da talidomida, potencialmente toxicofórica, unindo as duas subunidades farmacofóricas A e B por meio de unidades espaçadoras alquílicas (compostos I e II) e arílicas (compostos III, V e VI).

Os compostos I e II foram obtidos por homologação da cadeia alquílica espaçadora, obtendo-se os derivados metilênico e etilênico, respectivamente. Os compostos III e V são derivados interfenilênicos, análogos do composto I, e o composto VI é derivado interfenilênico análogo do composto II.

O planejamento estrutural dos compostos está representado a seguir (Esquema 1).

Esquema 1. Planejamento estrutural dos compostos I, II, III, V e VI.



(Fonte: próprio autor)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos doadores de óxido nítrico úteis para o tratamento da anemia falciforme.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese, identificação, purificação e caracterização estrutural de derivados ftalimídicos;
- Avaliação do tempo de sangramento em camundongos;
- Avaliação da capacidade antiagregante plaquetária dos derivados sintetizados;
- Avaliação da estabilidade química dos compostos em água, tampão pH 1,2 e tampão pH 7,4;
- Avaliação da capacidade de inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , provenientes de macrófagos, pelos compostos;
- Avaliação da capacidade de inibição da liberação de NO proveniente de macrófagos pelos compostos.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Material e métodos

3.1.1. Material (reagentes e solventes)

- (3-aminofenil)metanol (Sigma Aldrich®);
- 4-aminofenil)metanol (Sigma Aldrich®);
- 2-(2-hidroxietil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (Acros Organics);
- N-(2-hidroxietil)ftalimida (Acros Organics);
- 2-(4-aminofenil)etanol (Sigma Aldrich®);
- acetato de etila P.A (Chemis);
- acetonitrila P.A (J.T.Baker®);
- ácido acético glacial P.A.(J.T.Baker®);
- ácido clorídrico 37% (Synth®);
- ácido nítrico P.A. (Merck);
- anidrido acético P.A. (Merck) ;
- anidrido ftálico (J.T. Baker®);
- cloreto de potássio (Chemis);
- diclorometano P.A.(Chemis);
- formaldeído P.A. (Merck);
- fosfato de potássio (Synth®);
- hidróxido de sódio (Vetec Química Fina Ltda.);
- metanol P.A. (J.T. Baker®);
- piridina (Merck);
- sulfato de sódio anidro (Chemis);
- uréia (Vetec Química Fina Ltda.).

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Metodologia sintética

A metodologia de síntese dos intermediários e produtos finais está inserida no apêndice A, baseada na metodologia descrita por Santos, 2007.

3.1.2.2. Metodologia analítica

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

Utilizou-se cromatografia em camada delgada para o acompanhamento das reações e das purificações. Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Sigma®. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365nm), e/ou por exposição a iodo pulverizado e/ou revelador de grupos funcionais quando necessário.

3.1.2.2.2. Espectrometria de RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos com a utilização do Espectrômetro de 300 MHz Fourier com Dual probe $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ – Bruker do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP). Os solventes utilizados foram CDCl_3 (clorofórmio) e $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (dimetilsulfóxido) deuterados.

3.1.2.2.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no IV, na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU® Corporation, disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

3.1.2.2.4. Faixa de Fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas no aparelho Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®, disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

3.1.2.3. Ensaios Biológicos

3.1.2.3.1. Avaliação do tempo de sangramento em camundongos

A avaliação do tempo de sangramento em camundongos foi realizada com base na metodologia proposta por Dejana e colaboradores (1979), adaptando-se o teste para a espécie animal utilizada, uma vez que o método foi aplicado primariamente aplicado em ratos. Os animais utilizados foram da espécie *Mus musculus* (Swiss albino), com peso aproximado de 25-30g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara. Foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luz, com ração balanceada e água *ad libitum*. O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus Araraquara (nº 68/2013) (anexo B).

Os animais receberam as substâncias via oral (100 μ M), utilizando gavagem, e, decorrido o tempo de uma hora, foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) via intraperitoneal. Foram colocados em um contensor de maneira que a cauda ficasse livre e uma incisão de 2 milímetros contados a partir do final da cauda foi feita com o auxílio de um bisturi. O sangue foi recolhido com o auxílio de um papel de filtro, o qual foi encostado na ponta da cauda do animal a cada 10 segundos, com o cuidado de não pressioná-la, até parada completa do sangramento. O tempo foi cronometrado a partir da incisão, adotando-se 15 minutos como tempo máximo em caso de continuidade do sangramento. Utilizou-se carboximetilcelulose (CMC) 0,5% como controle negativo e AAS (100 μ M) como controle positivo.

3.1.2.3.1.2. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 aplicando-se ANOVA com determinação do nível de significância a 5% ($p < 0,05$), seguido de Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3.1.2.3.2. Avaliação inibitória da agregação plaquetária

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

3.1.2.3.2.1. Obtenção das plaquetas lavadas

O sangue dos ratos controles ou tratados com LPS foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12,4mM, ácido cítrico 13mM e glicose 11mM) (9:1 v/v). Primeiramente, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140mM, KCl 0.5mM, citratotrisódico 12mM, glicose 10mM e sacarose 12.5mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugado por 13 minutos a 800 g. O precipitado plaquetário foi re-suspenso em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 g por 13 minutos. Finalmente, as plaquetas foram re-suspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{2+} e o número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

3.1.2.3.2.2. Agregação plaquetária

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

3.1.2.3.2.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância a 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

3.1.2.3.3. Estabilidade em Água e Tampões

Foi desenvolvido um método analítico para cada um dos compostos I, II e VI, para posterior determinação das respectivas concentrações em solução aquosa e solução aquosa tamponada, a fim de avaliar a estabilidade dos mesmos nessas condições.

Utilizou-se um sistema cromatográfico UPLC Acquity® (Waters) com detector UV-Visível configurado para 226nm. A separação foi feita por uma coluna BEH 2,1x50mm, 1,7 μ m. A fase móvel utilizada para o composto I foi Acetonitrila:Água (35:65), para o composto II, Metanol:Água (40:60) e, para o composto VI, Metanol:Água (60:40). O fluxo foi de 0,4 mL/min para os compostos II e VI e de 0,5mL/min para o composto I. O volume de injeção foi de 2 μ L para todos. As amostras foram mantidas a uma temperatura de 10 °C e a coluna à 30 °C.

3.1.2.3.3.1. Validação do método analítico

A validação da metodologia foi realizada com base nas normas do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), resolução 899/2003, contemplando os parâmetros seletividade, linearidade, efeito residual, limite de quantificação, precisão e exatidão.

- ***Seletividade***

A seletividade é a capacidade do método de analisar a substância de interesse na presença de componentes previsivelmente passíveis de serem encontrados na amostra. Para esse experimento, a seletividade foi avaliada em relação à presença do intermediário de reação imediatamente anterior à formação do composto analisado.

- ***Linearidade***

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que ela seja determinada pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes e que o coeficiente de correlação (r) seja igual ou maior que 0,99.

- ***Limite inferior de quantificação***

Esse limite é estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do composto, até a menor delas que possa ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Também pode ser determinado pelo ruído da linha de base, onde se considera a concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

- ***Precisão e Exatidão***

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A exatidão de um

método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Ambas são verificadas a partir de três concentrações, os controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB), em três réplicas cada uma, totalizando nove determinações. Foram realizadas avaliações intra-corrida, no mesmo dia, e inter-corrida, em dias diferentes e não consecutivos.

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, desejando-se valores próximos a 100%. A precisão, por sua vez, pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo aceitáveis valores superiores a 5% de variação.

3.1.2.3.3.2. Determinação da estabilidade em água e tampões

A estabilidade dos compostos foi realizada com base no estudo publicado por Chung e colaboradores (2009). Para estabilidade em água foi utilizada água ultrapura (sistema Milli-Q) com pH 6,5, e, para a estabilidade em tampões, foi preparada solução tampão de Clark-Lubs (pH 1,2) e solução tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio (pH 7,4), como a seguir:

- *Tampão de Clark-Lubs:* Foi preparada uma solução de cloreto de potássio na concentração de 0,2 M e uma solução de ácido clorídrico na concentração de 0,2 M. Em seguida, 100 mL da solução de cloreto de potássio recebeu o volume necessário da solução de ácido clorídrico até alcançar o pH desejado de 1,2.
- *Tampão de fosfato de potássio-hidróxido de sódio:* Foi preparada uma solução de fosfato de potássio na concentração de 0,1 M e uma solução de hidróxido

de sódio na concentração de 0,1 M. Em seguida 100 mL da solução de fosfato de potássio recebeu o volume necessário da solução de hidróxido de sódio até alcançar o pH desejado de 7,4.

O experimento foi realizado em triplicata. A água e as soluções tampão foram adicionadas de cada um dos compostos (I, II e VI) de forma a obter a concentração final utilizada. Alíquotas foram retiradas e analisadas pelo método validado para cada substância, em tempos pré-determinados (máximo de 24h), a fim de determinar se houve degradação das mesmas nas condições propostas.

Os experimentos foram realizados sob agitação (agitador magnético) e controle de temperatura (manta aquecedora, 37°C), tanto em água quanto nos tampões. Também foi realizada avaliação da estabilidade dos compostos em solução de acetonitrila, sem agitação sob resfriamento (geladeira, 5°C). A temperatura de 37°C foi escolhida por se tratar da temperatura corporal em condições fisiológicas.

3.1.2.3.3.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 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 $\pm$ EPM.

3.1.2.3.4. Ensaios de citotoxicidade e determinação de inibição da liberação de TNF- α e IL-1 β .

Para a avaliação da viabilidade e detecção de TNF- α e IL-1 β dos compostos II, III, V e VI, foi utilizado camundongos da espécie *Mus musculos* (Swiss albino), com

peso aproximado de 25 - 30g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/UNICAMP. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar UNESP, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luz (escuro/luz 12/12h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus Araraquara (nº 67/2013) (anexo A).

3.1.2.3.4.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais foram previamente inoculados via peritônio com 3mL de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 horas de estímulo, foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂). O peritônio foi então exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal. Na porção mediana superior do abdômen foi injetado 5,0 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C, com auxílio de seringas e agulhas estéreis. Uma leve massagem manual deve ser realizada e as células do exsudato coletadas com seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5mL de PBS pH 7,2 e centrifugadas a 400x g por 5 minutos em centrífuga a temperatura ambiente. O sedimento foi re-suspendido 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 a utilização de Líquido de Lázarus. 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 meio de cultura RPMI-1640.

3.1.2.3.4.2. Ensaio de viabilidade de macrófagos

Para o ensaio de viabilidade dos macrófagos, utilizou-se a técnica de MTT (MOSMANN, 1983). Em microplaca de 96 cavidades foram incubadas suspensões celulares (100µL por cavidade), na concentração de 5×10^6 células/mL, por 60 minutos, para a aderência celular. As substâncias de interesse foram adicionadas e incubou-se por 24 horas a 37° C. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100µL de solução de MTT a 1g/mL foi adicionado em cada orifício. A placa foi então incubada por 3 horas a 37°C. Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido e 100µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício. Utilizou-se como controle positivo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e controle negativo o meio de cultura. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540nm, tendo como filtro de referência uma leitura a 620nm.

3.1.2.3.4.3. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

As células peritoneais foram ajustadas na concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 48 cavidades. Em cada cavidade foi adicionado 100µL de suspensão celular, e as placas incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa de CO₂. Após essa incubação,

as células não aderentes foram retiradas por lavagens com meio de cultura RPMI-1640.

Nos ensaios de inibição da produção de citocinas foram adicionados 100µL de RPMI-1640-C, 100µL das substâncias testadas em diferentes concentrações e 100µL de LPS a 1µg/mL aos macrófagos que estão aderidos à placa. Utilizou-se como controle positivo LPS 1µg/mL (300µL) e meio de cultura RPMI-1640-C (300µL) como controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ por mais 24 horas. O conteúdo das placas foi então transferido para eppendorfs, que por sua vez foram centrifugados a 7800x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados, aliquotados em eppendorfs e estocados em freezer a -80°C até a determinação das citocinas através do teste imunoenzimático ELISA de captura.

3.1.2.3.4.4. Determinação quantitativa da inibição das citocinas

As citocinas TNF-α e IL-1β foram quantificadas no sobrenadante das culturas de células do exsudato peritoneal, pelo teste imunoenzimático ELISA. Utilizaram-se kits da BD e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

As placas de 96 orifícios foram adsorvidas com 100 µL de anticorpo de captura monoclonal, obtido de rato, e anti-citocina de camundongo, na concentração apropriada a cada citocina em PBS pH 7,0, e incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,0 contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200µL/cavidade de PBS pH 7,0 contendo 10% de diluente de ensaio à temperatura ambiente, por 1 hora. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida

adicionou-se 100µL por cavidade do padrão das citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem.

Em seguida, adicionou-se 100µL por cavidade de anticorpo anti-citocina de camundongo marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina no diluente de ensaio. Incubaram-se as placas por mais 2 horas a temperatura ambiente e lavou-se mais 3 vezes com tampão de lavagem.

Então, adicionou-se 100µL do conjugado peroxidase-estreptavidina (diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de ensaio) em cada cavidade, e incubaram-se as placas por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionou-se 100µL do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂] a cada cavidade. A reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 2N adicionado a cada cavidade. A absorvância foi lida em 450 nm com filtro de referência em 570nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas. As concentrações de cada citocina foram quantificadas através de uma curva padrão, previamente estabelecida com quantidades conhecidas de cada uma. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos em picogramas/ml.

3.1.2.3.4.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 aplicando-se análise de variância (ANOVA) com determinação do nível de significância a 5% ($p < 0,05$), seguido de comparações pelo teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP.

3.1.2.3.5. Determinação da inibição de liberação de óxido nítrico

A determinação de óxido nítrico foi realizada através da redução do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5% e cloridrato de naftil etileno diamino 0,1%) a nitrito, através da medida de absorvância.

Utilizou-se uma placa de 96 cavidades de fundo plano em que foi acrescido 50 μL do sobrenadante de células da cavidade peritoneal que foram incubadas anteriormente com LPS e com os compostos, e igual volume de reagente de Griess. Incubou-se a placa por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A absorvância foi lida em espectrofotômetro UV/visível para microplacas no comprimento de onda de 540nm.

A concentração de NO liberado nos sobrenadantes celulares foi calculada a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio, e os valores foram expressos em μmol s de nitrito/ 5×10^5 células.

3.1.2.3.5.1. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 aplicando-se análise de variância (ANOVA) com determinação do nível de significância a 5% ($p < 0,05$), seguido de comparações pelo teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP.

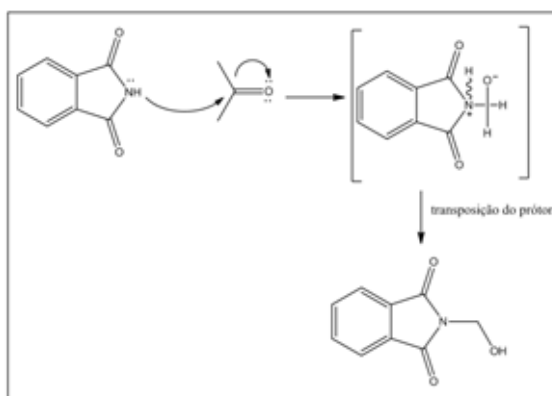
3.2. Resultados e discussões

3.2.2. Síntese dos intermediários e compostos finais

3.2.2.1. Síntese e caracterização estrutural do intermediário I

A síntese ocorre através de uma reação de adição à carbonila, onde o par de elétrons desemparelhados do nitrogênio ataca o carbono do formaldeído, que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+) (Esquema 2). Há rompimento da ligação π e posterior deslocamento da carga negativa formada para o átomo de oxigênio, levando a um intermediário, que após transposição de próton leva a formação de um composto hidroximetilado (SANTOS, 2007).

Esquema 2. Mecanismo de reação para formação do intermediário I.

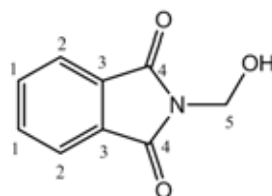


(Fonte: próprio autor)

Nesse derivado alquílico é possível observar a presença de um hidrogênio metilênico ácido, além de um carbono carbinólico que sustenta uma carga parcial positiva por estar vizinho a grupos eletroatratores. O oxigênio eletronegativo, por indução, desloca a densidade eletrônica para si, e ao mesmo tempo a ligação ao nitrogênio imídico deixa o carbono carbinólico mais positivo, tendo também efeito eletroatrator.

O intermediário I (Figura 8) foi obtido como um sólido branco com faixa de fusão entre 142-145°C e rendimento de 93% ($C_9H_7NO_3$; PM= 177,16g/mol).

Figura 8. Identificação estrutural do intermediário I.



(Fonte: próprio autor)

De acordo com os estiramentos de IV e com os deslocamentos químicos obtidos por RMN de 1H (Tabelas 1 e 2), o composto foi obtido com êxito de acordo com a literatura. É possível observar os estiramentos axiais da ligação O-H em aproximadamente 3487 cm^{-1} e os da carbonila da imida em aproximadamente 1772 cm^{-1} e 1701 cm^{-1} indicando a presença do anel ftalimídico. O singleto em 5,27 ppm no espectro de RMN de 1H indica a presença do H5 referente ao espaçador utilizado na molécula. Os espectros encontram-se no apêndice B.

Tabela 1. Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário I em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

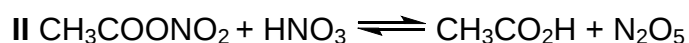
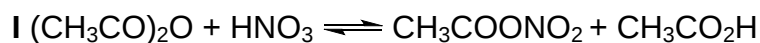
Espectrometria no Infravermelho		
	Intermediário I	Literatura
Grupo funcional	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
OH	3487	3489
C-H (sp^3)	3030	3030
C-H (sp^2)	2964	2941
C=O simétrico (imida)	1772	1770
C=O assimétrico (imida)	1701	1705
C=C aromático	1604 / 1458	1600 / 1460
C-N-C	1394	1394
Subst. Aromática	731	731

Tabela 2. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H do intermediário I e o descrito em literatura por Santos, 2007.

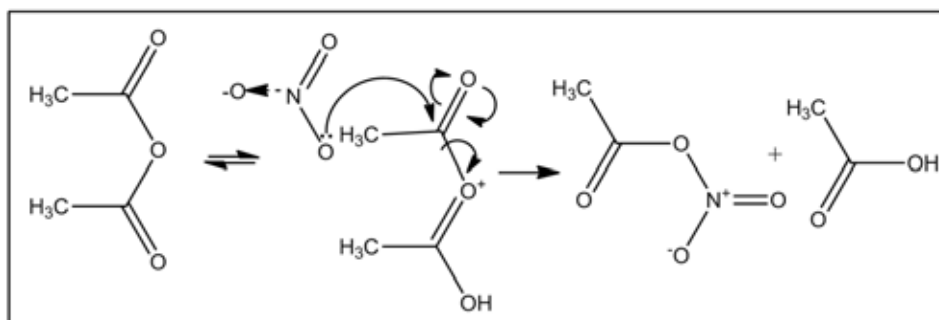
RMN ^1H		
	Intermediário I	Literatura
Posição	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,78 (m)	7,88 (m)
2	7,91 (m)	7,92 (m)
3	-	-
4	-	-
5	5,27 (s)	4,9 (d)

3.2.2.2. Síntese e caracterização estrutural do composto I

O mecanismo para formação do pentóxido de dinitrogênio, que ao final das etapas reacionais reage com o intermediário hidroximetiltalimida para formação do nitrato final, utilizando a mistura anidrido acético/ácido nítrico, envolve o seguinte equilíbrio descrito por Boyer (1986):

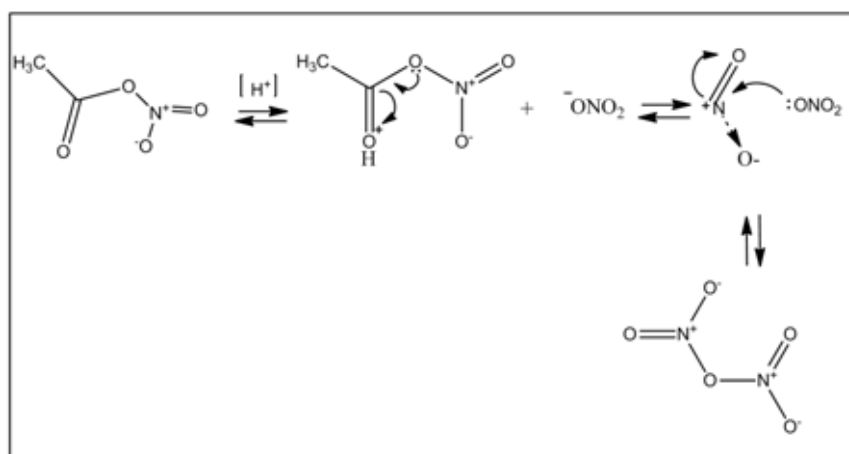


Em uma primeira etapa (Esquema 3), a catálise ácida do anidrido acético rompe a ligação π do carbono carbonílico. O par de elétrons não ligante do oxigênio é doado para restabelecer as quatro ligações do carbono, forma-se assim um intermediário reativo. O carbono carbonílico desse intermediário sofre ataque pelo NO_3^- formado um acetil nitrato e eliminando um ácido acético (SANTOS, 2007).

Esquema 3. Formação do acetil nitrato.


(Fonte: próprio autor)

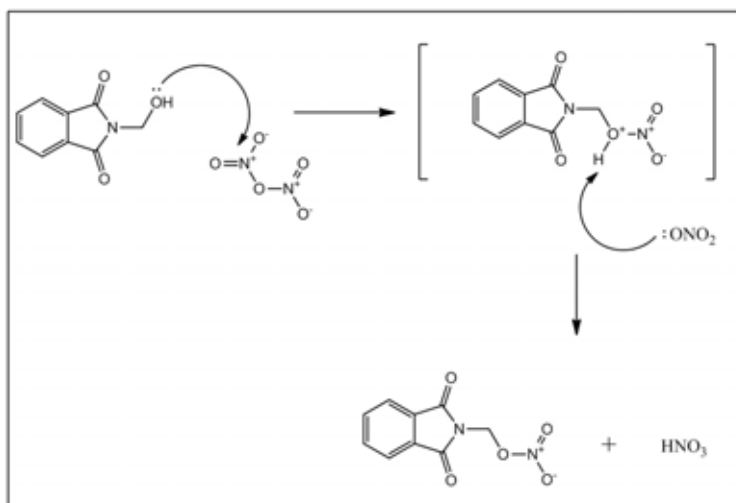
Em uma segunda etapa (Esquema 4), a catálise ácida favorece o rompimento da ligação π , e o par de elétrons do oxigênio é usado para restabelecer as ligações do carbono. Há formação de acetato e de uma espécie positivamente carregada. O nitrato (NO_3^-) do ácido nítrico ataca essa espécie positivamente carregada, para formar o pentóxido de dinitrogênio (SANTOS, 2007).

Esquema 4. Formação do pentóxido de dinitrogênio.


(Fonte: próprio autor)

Em uma última etapa (Esquema 5), há o ataque do par de elétrons do oxigênio do derivado ftalimídico ao pentóxido de dinitrogênio, levando à liberação de NO_3^- e formação do intermediário. Posteriormente, o nitrato captura um próton, e forma HNO_3 e o nitrato de metilftalimida desejado (SANTOS, 2007).

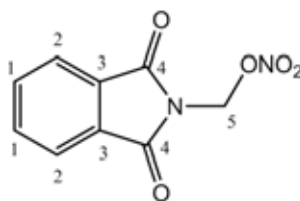
Esquema 5. Formação do nitrato de metilftalimida.



(Fonte: próprio autor)

O composto I (Figura 9) foi obtido como um sólido branco, com faixa de fusão entre 75-77 °C e rendimento de 74% ($\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5$; PM= 222,154g/mol).

Figura 9. Identificação estrutural do composto I.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 3. Bandas de absorção em IV relativas ao composto I em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
	Composto I	Literatura
Grupo funcional	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
C-H (sp ³)	3026	3066
C-H (sp ²)	2912	2925
C=O simétrico (imida)	1784	1762
C=O assimétrico (imida)	1734	1716
C=C aromático	1508/ 1458	1512/ 1465
O-NO ₂	1641 / 1280	1622 / 1278
C-N-C	1390	1388
Subst. Aromática	729	723

Tabela 4. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ¹H do composto I e o descrito em literatura por Santos, 2007.

RMN ¹ H		
	Composto I	Literatura
Posição	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,83 (m)	7,80 (dd)
2	7,95 (m)	7,93 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	6,06 (s)	6,08 (s)

É possível observar (Tabela 3) os estiramentos axiais da ligação O-NO₂ em 1641 cm⁻¹ e 1280 cm⁻¹, e a ausência do estiramento axial O-H em 3487 cm⁻¹ devido à formação do éster de nitrato. Também se observa através do estiramento axial C-N-C do anel ftalimídico que o sistema imídico não sofreu hidrólise, visto que é descrito na literatura a hidrólise ácida desse sistema. Esse fato é ainda comprovado pela presença das carbonilas de imida em 1784 cm⁻¹ e 1734 cm⁻¹.

Através dos deslocamentos obtidos por RMN de ¹H (Tabela 4), ao comparar o reagente hidroximetilftalimida com o produto final (nitrato), observa-se o

deslocamento dos hidrogênios metilênicos, que no intermediário aparece em 5,27 ppm e no produto final aparece em 6,06 ppm, efeito causado pela maior eletronegatividade do nitrato em relação à hidroxila nas posições α ao carbono metilênico, que leva a um efeito de desproteção desses hidrogênios (espectros no apêndice B).

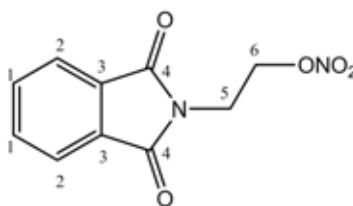
A presença de um grupamento mais eletronegativo, como no caso do nitrato, ativa ainda mais o carbono metilênico, aumentando a sua carga parcial positiva (δ^+), e favorecendo o ataque nucleofílico a esse carbono. Isso é importante para o entendimento do mecanismo de doação do NO (SANTOS, 2007).

3.2.2.3. Síntese e caracterização estrutural do composto II

Esse composto foi obtido através da reação do *N*-(2-etanol)ftalimida, adquirido comercialmente, com a mistura ácido nítrico/anidrido acético, nas mesmas condições de reação que levaram a obtenção do Composto I. O mecanismo reacional para obtenção desse composto também é similar àquele descrito para obtenção do Composto I.

O composto II (Figura 10) foi obtido como um sólido branco com faixa de fusão entre 87-89°C e rendimento de 80% ($C_{10}H_8N_2O_5$; PM= 236,181g/mol).

Figura 10. Identificação estrutural do composto II.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 5. Bandas de absorção em IV relativas ao composto II em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
	Composto II	Literatura
Grupo funcional	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
C-H (sp ³)	3066	3066
C-H (sp ²)	2960	2925
C=O simétrico (imida)	1772	1762
C=O assimétrico (imida)	1707	1716
C=C aromático	1508/ 1465	1512/ 1465
O-NO ₂	1641 / 1262	1622 / 1278
C-N-C	1423	1388
Subst. Aromática	721	723

Tabela 6. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ¹H do composto II e o descrito em literatura por Santos, 2007.

RMN ¹ H		
	Composto II	Literatura
Posição	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,75 (m)	7,73 (m)
2	7,88 (m)	7,85 (m)
3	-	-
4	-	-
5	4,06 (t)	4,05 (t)
6	4,68 (t)	4,66 (t)

É possível observar (Tabela 5) os estiramentos axiais da ligação O-NO₂ em 1641 cm⁻¹ e 1262 cm⁻¹, e ausência do estiramento axial O-H, presente no intermediário. Também é possível observar as carbonilas da imida em 1772 cm⁻¹ e 1707 cm⁻¹, indicando a presença do anel ftalimídico. No espectro de RMN de ¹H (Tabela 6), ficam evidentes os tripletos característicos da cadeia alquílica, cujos deslocamentos químicos estão em 4,06 e 4,68 ppm, condizentes com o descrito na literatura.

Os espectros encontram-se no apêndice B.

3.2.2.4. Síntese dos intermediários arilftalimídicos funcionalizados: intermediário III, intermediário V e intermediário VI.

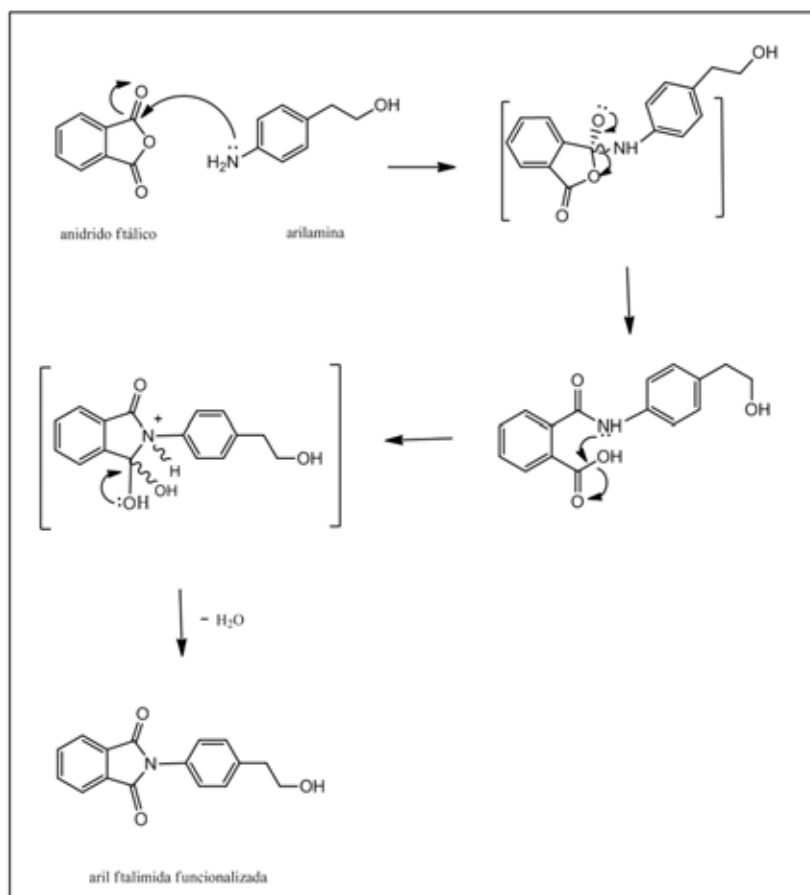
O mecanismo reacional da síntese desses intermediários é o mesmo, portanto será discutido em um único tópico.

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

A reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre do nitrogênio da arilamina à carbonila do anidrido ftálico, que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Há rompimento da ligação π , e o par de elétrons é deslocado para o átomo de oxigênio. Ao reestabelecer a ligação π , há quebra da ligação C-O do anidrido. O par de elétrons da amina ataca o carbono carbonílico localizado na posição orto aromática. Novamente, há rompimento de outra ligação π que ao ser reestabelecida elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel e formando o derivado aril-ftalimídico funcionalizado.

O mecanismo reacional está demonstrado no esquema a seguir (Esquema 6).

Esquema 6. Mecanismo de formação dos derivados arilftalimídicos funcionalizados.

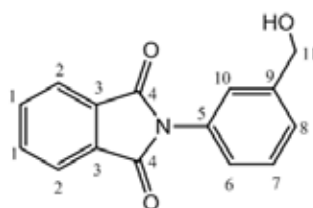


(Fonte: próprio autor)

3.2.2.4.1. Caracterização estrutural do intermediário III

O intermediário regioisômero meta (Figura 11) foi obtido como um sólido cristalino amarelo, com faixa de fusão entre 149-151°C e rendimento de 82% ($C_{15}H_{11}NO_3$; PM= 253,25g/mol).

Figura 11. Identificação estrutural do intermediário III.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 7. Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário III em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
	Intermediário III	Literatura
Grupo funcional	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
OH	3550	3541
C-H (sp^3)	3082	3066
C-H (sp^2)	2937	2933
C=O simétrico (imida)	1772	1772
C=O assimétrico (imida)	1714	1716
C=C aromático	1654 / 1488	1654 / 1488
C-N-C	1381	1381

Tabela 8. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H do intermediário III e o descrito em literatura por Santos, 2007.

RMN ^1H		
	Intermediário III	Literatura
Posição	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,82 (m)	7,78 (dd)
2	7,95 (m)	7,94 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,37 - 7,51 (m)	7,41 (dd)
7	7,37 - 7,51 (m)	7,37
8	7,37 - 7,51 (m)	7,37
9	-	-
10	7,37 - 7,51 (m)	7,49 (d)
11	4,77 (s)	4,76 (s)

É possível observar (Tabela 7) os estiramentos axiais da ligação O-H em aproximadamente 3550 cm^{-1} e os das carbonilas da imida em aproximadamente 1772 cm^{-1} e 1714 cm^{-1} indicando a presença do anel ftalimídico. A presença de dois sítios nucleofílicos no reagente (hidroxila e amina) poderia levar a obtenção de um produto onde ocorresse o ataque da hidroxila à carbonila ao invés do ataque da amina esperado. Caso tivesse ocorrido essa reação, haveria um estiramento axial de uma carbonila de éster, e uma carbonila de ácido carboxílico, referente à abertura do anel ftalimídico. Entretanto, esses estiramentos não foram observados, indicando

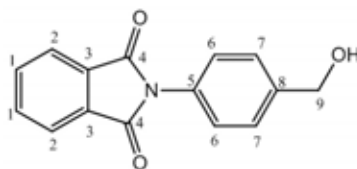
que o mecanismo reacional ocorre majoritariamente pelo ataque dos pares de elétrons do nitrogênio da arilamina, formando o derivado ftalimídico desejado.

Em relação aos deslocamentos observados no espectro de RMN de ^1H (Tabela 8), nota-se semelhança entre o composto obtido e o que foi descrito em literatura, estando o deslocamento do singlete referente ao H11 em 4,77 ppm. Os espectros encontram-se no apêndice B.

3.2.2.4.2. Caracterização estrutural do intermediário V

O intermediário regioisômero para (Figura 12) foi obtido como um sólido cristalino amarelo com faixa de fusão entre 155-158°C e rendimento de 51% ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$; PM= 253,25g/mol).

Figura 12. Identificação estrutural do intermediário V.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 9. Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário V em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
Intermediário V		Literatura
Grupo funcional	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
OH	3522	3516
C-H (sp^3)	-	3066
C-H (sp^2)	2918	2916
C=O simétrico (imida)	1761	1768
C=O assimétrico (imida)	1705	1701
C=C aromático	1600 / 1514	1600 / 1514
C-N-C	1388	1386

Tabela 10. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H do intermediário V e o descrito em literatura por Santos, 2007.

Posição	RMN ^1H	
	Intermediário V	Literatura
	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,89 - 7,98 (m)	7,80 (dd)
2	7,89 - 7,98 (m)	7,99 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,37 - 7,47 (m)	7,52 (d)
7	7,37 - 7,47 (m)	7,44 (d)
8	-	-
9	4,57 (d)	4,77 (s)

É possível observar (Tabela 9) a presença dos estiramentos axiais da ligação O-H em aproximadamente 3522 cm^{-1} e os da carbonila da imida em aproximadamente 1761 cm^{-1} e 1705 cm^{-1} , indicando a presença do anel ftalimídico.

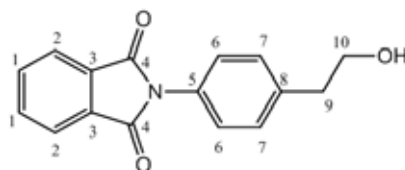
Com relação aos deslocamentos observados no RMN de ^1H (Tabela 10), nota-se diferença entre o singlete em 4,77 ppm descrito em literatura e o dubleto em 4,57 ppm obtido na síntese deste trabalho. Essa diferença no deslocamento pode ser atribuída à utilização de solventes distintos na realização das análises, mas não compromete a comprovação de igualdade entre as estruturas.

Os espectros encontram-se no apêndice B.

3.2.2.4.3. Caracterização estrutural do intermediário VI

O intermediário VI (Figura 13) foi obtido como um sólido cristalino branco amarelado, com faixa de fusão entre $172\text{-}175^\circ\text{C}$ e com rendimento de 75% ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$; PM= 267,28g/mol).

Figura 13. Identificação estrutural do intermediário VI.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 11. Bandas de absorção em IV relativas ao intermediário VI em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
Grupo funcional	Intermediário VI ν (cm^{-1})	Literatura ν (cm^{-1})
OH	3508	3516
C-H aromático	3066	3066
C-H CH_2	2931	2916
C=O simétrico	1768	1768
C=O assimétrico	1708	1701
C=C aromático	1517 / 1471	1514/ 1461
C-N-C	1388	1386

Tabela 12. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H do intermediário VI e o descrito em literatura por Santos, 2007.

RMN ^1H		
Posição	Intermediário VI Valores (δ)	Literatura Valores (δ)
1	7,82 (m)	7,81 (dd)
2	7,95 (m)	7,95 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,38 (m)	7,38 (m)
7	7,38 (m)	7,38 (m)
8	-	-
9	2,94 (t)	2,93 (t)
10	3,91 (t)	3,90 (t)

De acordo com as bandas de absorção no infravermelho (Tabela 11) e deslocamentos obtidos através de RMN de ^1H (Tabela 12) pode-se concluir que o composto foi obtido com êxito conforme descrito em literatura por Santos, 2007. É possível observar os estiramentos axiais da ligação O-H em 3508 cm^{-1} , além das carbonilas de imida em 1768 cm^{-1} e 1708 cm^{-1} . Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H referentes aos hidrogênios 9 e 10, de 2,94 ppm e 3,91 ppm, estão semelhantes ao descrito na literatura. Os espectros encontram-se no apêndice B.

A reação descrita para a síntese desse intermediário utiliza como solvente a piridina, por ser, como já mencionado, um solvente básico não nucleofílico com elevado ponto de ebulição.

A mesma síntese foi realizada neste trabalho utilizando ácido acético glacial como solvente, o que demonstrou não ser eficaz na formação do produto desejado. Mecanicamente, a reação em meio ácido poderia favorecer a formação do derivado ftalimídico visto que o ácido agiria como catalisador, protonando o oxigênio da carbonila do anidrido ftálico e auxiliando o rompimento da ligação π quando houvesse o ataque do par de elétrons da amina. Porém, desfavorece a reação devido à protonação do par de elétrons da amina, levando a uma diminuição da reatividade da mesma.

A faixa de fusão apresentada pelo produto obtido em meio ácido ($152^\circ\text{-}155^\circ\text{C}$) se mostrou inferior ao do produto obtido na síntese em piridina ($172^\circ\text{-}175^\circ\text{C}$), inviabilizando a continuidade das sínteses. Por isso, este produto foi caracterizado por espectrofotometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Figura 14. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do intermediário VI incorreto obtido.

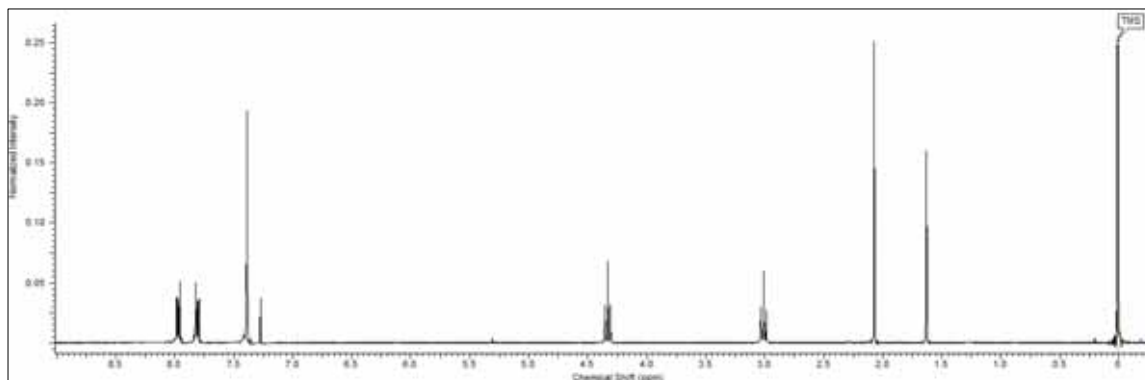


Figura 15. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do intermediário VI incorreto obtido – ampliação na região aromática.

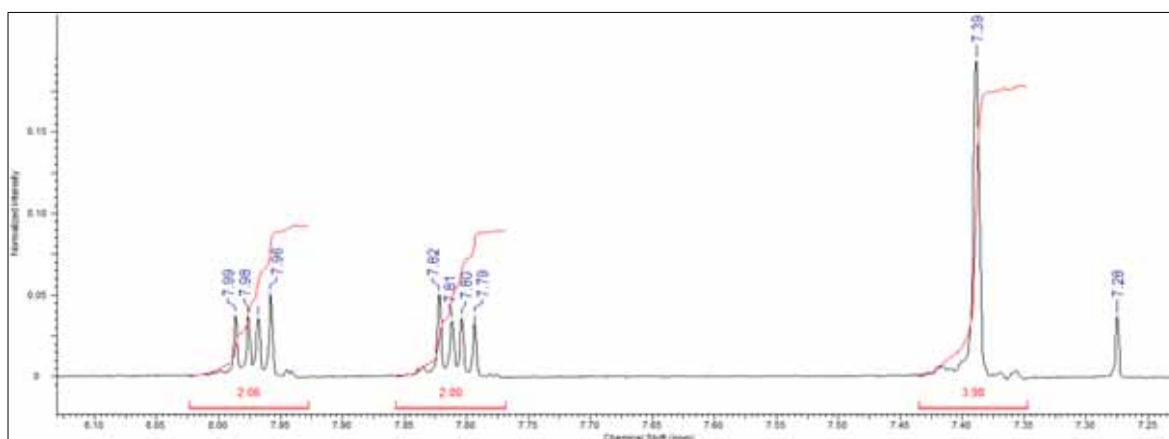
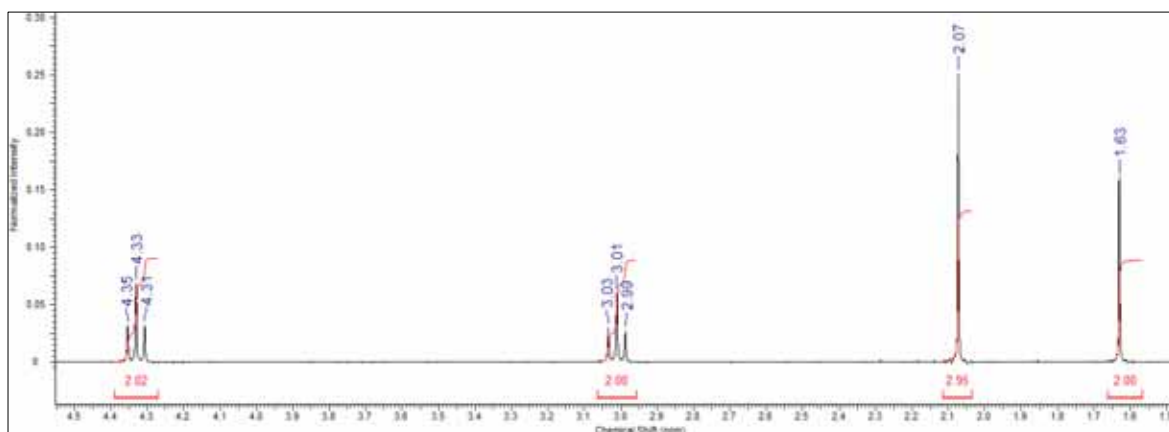


Figura 16. Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3) do intermediário VI incorreto obtido – ampliação na região alquílica.



Analizando o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do produto obtido em meio ácido (Figuras 14,15 e 16), pode-se sugerir que houve formação de um éster na subunidade aromática arílica introduzida. Possivelmente ocorreu uma reação de esterificação catalisada por ácido, na qual a carbonila do ácido carboxílico, protonada pelo ácido do meio, sofre ataque do álcool (reagente), formando um intermediário tetraédrico que, posteriormente, após sofrer transferência de prótons, perde uma molécula de água, tornando-se um éster protonado (SOLOMONS, 2006). A comparação dos resultados obtidos na síntese com os relatados na literatura (SANTOS, 2007), encontra-se apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Comparação da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) do composto VI incorreto obtido com o descrito previamente em literatura (solvente CDCl_3 em ambos).

RMN ^1H		
	Composto obtido	Literatura
Posição	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,81 (m)	7,81 (dd)
2	7,98 (m)	7,95 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,39 (m)	7,38 (m)
7	7,39 (m)	7,38 (m)
8	-	-
9	3,01 (t)	2,93 (t)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,39 (m)	7,38 (m)
7	7,39 (m)	7,38 (m)
8	-	-
9	3,01 (t)	2,93 (t)
10	4,33 (t)	3,90 (t)
11	-	-
12	2,07 (s)	-

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios das posições 1, 2, 6, 7 e 9 se encontram em conformidade com o que é descrito em literatura. O mesmo não é observado para o hidrogênio da posição 10, que se desloca de δ 3,9 para δ 4,33, indicando que há ligação a grupamentos mais eletronegativos que o oxigênio (também existente na molécula correta). Assim, a carbonila do éster formado ocasionou esse efeito. O singlete em δ 2,07 do hidrogênio 12 indica a presença da metila da estrutura.

Com isso, conclui-se que o mecanismo reacional não ocorre conforme o esperado, não sendo, portanto, viável realizar a síntese utilizando ácido acético glacial como solvente.

O mesmo problema foi verificado na síntese de outro intermediário da série arílica de compostos, havendo formação de um éster majoritariamente, porém com um pequeno rendimento da arilamina funcionalizada.

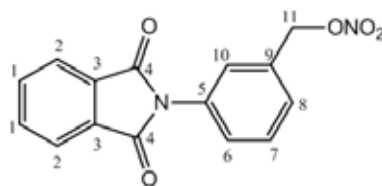
3.2.2.5. Síntese dos compostos finais: composto III, composto V e composto VI.

Seguindo a metodologia que utiliza ácido nítrico/anidrido acético, os compostos III, V e VI foram obtidos com bons rendimentos. O mecanismo para obtenção dos compostos nitratos já foi descrito e discutido anteriormente.

3.2.2.5.1. Caracterização estrutural do composto III

O composto III (Figura 17) foi obtido como um sólido amarelo com faixa de fusão entre 126-129°C, com rendimento de 90 % ($C_{15}H_{10}N_2O_5$; PM= 298,25g/mol).

Figura 17. Identificação estrutural do composto III.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 14. Bandas de absorção em IV relativas ao composto III em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
Grupo funcional	Composto III	Literatura
	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
C-H (sp ³)	3066	3066
C-H (sp ²)	2960	2926
C=O simétrico (imida)	1774	1774
C=O assimétrico (imida)	1718	1722
C=C aromático	1490/ 1467/1450	1490/ 1488/1450
O-NO ₂	1618 / 1279	1620 / 1279
C-N-C	1379	1379

Tabela 15. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ¹H do composto III e o descrito em literatura por Santos, 2007.

RMN ¹ H		
Posição	Composto III	Literatura
	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,83 (dd)	7,82 (dd)
2	7,98 (dd)	7,98 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,45 - 7,60 (m)	7,55 (d)
7	7,45 - 7,60 (m)	7,53 (dd)
8	7,45 - 7,60 (m)	7,45 (d)
9	-	-
10	7,45 - 7,60 (m)	7,57 (d)
11	5,51 (s)	5,5 (s)

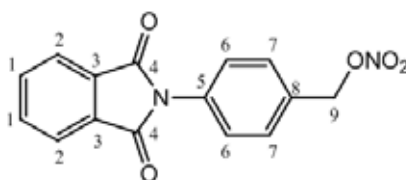
De acordo com as bandas de absorção no infravermelho e deslocamentos obtidos através de RMN de ^1H (Tabelas 14 e 15), pode-se concluir que o composto foi obtido com êxito conforme descrito em literatura.

Observa-se no espectro de IV a ausência dos estiramentos axiais O-H em 3550 cm^{-1} e a presença dos estiramentos axiais O-NO₂ no produto final em 1618 cm^{-1} e 1279 cm^{-1} . Os estiramentos referentes às carbonilas de imida, em 1774 cm^{-1} e 1718 cm^{-1} e a ligação C-N-C em 1379 cm^{-1} se mantiveram presentes, indicando a manutenção do anel ftalimídico fechado. Além disso, ocorre uma mudança no deslocamento químico do singlete em $\delta\ 4,77\text{ ppm}$ no espectro de RMN de ^1H do intermediário para $\delta\ 5,51\text{ ppm}$ no espectro do produto nitrato final, indicando a substituição da hidroxila por um grupamento mais eletronegativo, o nitrato, que exerce um efeito de “desproteção” no hidrogênio 11. Os espectros encontram-se no apêndice B.

3.2.2.5.2. Caracterização estrutural do composto V

O composto V (Figura 18) foi obtido como um sólido branco amarelado com faixa de fusão entre $159\text{-}162^\circ\text{C}$, com rendimento de 88% ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$; PM= 298,25g/mol).

Figura 18. Identificação estrutural do composto V.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 16. Bandas de absorção em IV relativas ao composto V em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
	Composto V	Literatura
Grupo funcional	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
C-H (sp ³)	3066	3066
C-H (sp ²)	2922	2924
C=O simétrico (imida)	1786	1786
C=O assimétrico (imida)	1716	1718
C=C aromático	1517/ 1458	1517/1455
O-NO ₂	1610 / 1282	1620 / 1279
C-N-C	1387	1389

Tabela 17. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ¹H do composto V e o descrito em literatura por Santos, 2007.

RMN ¹ H		
	Composto V	Literatura
Posição	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,90 (m)	7,81 (dd)
2	7,99 (m)	7,98 (dd)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,50 - 7,64 (m)	7,53 (d)
7	7,50 - 7,64 (m)	7,49 (d)
8	-	-
9	5,64 (s)	5,48 (s)

De acordo com as bandas de absorção no infravermelho e deslocamentos obtidos através de RMN de ¹H (Tabelas 16 e 17), pode-se concluir que o composto foi obtido com êxito conforme descrito em literatura.

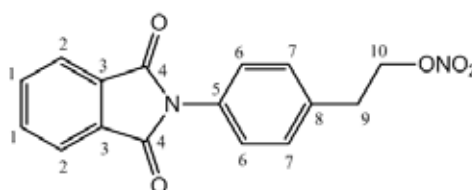
Observa-se a ausência dos estiramentos axiais O-H em 3550 cm⁻¹ e a presença dos estiramentos axiais O-NO₂ em 1610 cm⁻¹ e 1282 cm⁻¹ no produto final. Além disso, as carbonilas de imida estão presentes em 1786 cm⁻¹ e 1716 cm⁻¹, reforçando o fechamento do anel ftalimídico, conforme planejado. Em relação aos deslocamentos químicos apresentados pelo composto no espectro de RMN de ¹H,

pode-se inferir que a pequena diferença observada com relação à literatura se deu em virtude da utilização de solventes diferentes na execução da análise. Neste trabalho foi utilizado dimetilsulfóxido deuterado, enquanto que os dados da literatura foram obtidos utilizando-se clorofórmio deuterado. Os espectros encontram-se no apêndice B.

3.2.2.5.3. Caracterização estrutural do composto VI

O composto VI (Figura 19) foi obtido como um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 141-144°C, com rendimento de 76% ($C_{16}H_{12}N_2O_5$; PM= 312,23g/mol).

Figura 19. Identificação estrutural do composto VI.



(Fonte: próprio autor)

Tabela 18. Bandas de absorção em IV relativas ao composto VI em comparação ao descrito em literatura por Santos, 2007.

Espectrometria no Infravermelho		
	Composto VI	Literatura
Grupo funcional	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
C-H (sp^3)	3066	3066
C-H (sp^2)	2922	2924
C=O simétrico (imida)	1786	1786
C=O assimétrico (imida)	1718	1718
C=C aromático	1515/ 1465	1514/1465
O-NO ₂	1618 / 1280	1610 / 1283
C-N-C	1391	1389

Tabela 19. Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H do composto VI e o descrito em literatura por Santos, 2007.

Posição	RMN ^1H	
	Composto VI	Literatura
	Valores (δ)	Valores (δ)
1	7,82 (m)	7,79 (m)
2	7,95 (m)	7,95 (m)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7,41 (m)	7,41 (d)
7	7,39 (m)	7,37 (d)
8	-	-
9	3,09 (t)	3,08 (t)
10	4,68 (t)	4,66 (t)

De acordo com as bandas de absorção no infravermelho e deslocamentos obtidos através de RMN ^1H (Tabelas 18 e 19), pode-se concluir que o composto foi obtido com êxito conforme descrito em literatura.

Através dos estiramentos de IV pode-se observar a ligação O-NO₂ em 1618 cm⁻¹ e 1280 cm⁻¹ e a ausência dos estiramentos axiais O-H em 3522 cm⁻¹, devido à formação do éster de nitrato. Ainda, observa-se através do estiramento axial C-N-C em 1391 cm⁻¹ e do estiramento axial C=O das carbonilas de imida em 1786 cm⁻¹ e 1718 cm⁻¹, a presença do sistema imídico no núcleo isoindolin-1,3-diona.

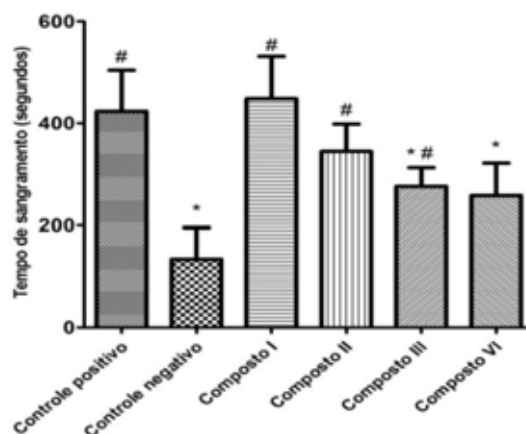
Ao comparar os espectros de RMN de ^1H , observa-se um deslocamento dos hidrogênios α e β ao nitrato, que no reagente é visualizado em 3,91 ppm (H10) e 2,94 ppm (H9), e no produto final aparece em 4,68 ppm (H10) e 3,09 ppm (H9), respectivamente. Este efeito ocorre devido à desproteção causada pelo efeito indutivo do grupamento nitrato.

Os espectros encontram-se no apêndice B.

3.2.3. Avaliação do tempo de sangramento e teste de agregação plaquetária

A avaliação do tempo de sangramento foi realizada para os compostos I, II, III e VI, e os resultados foram comparados ao controle positivo (AAS) e negativo (CMC 0,5%). Os resultados estão apresentados no gráfico abaixo.

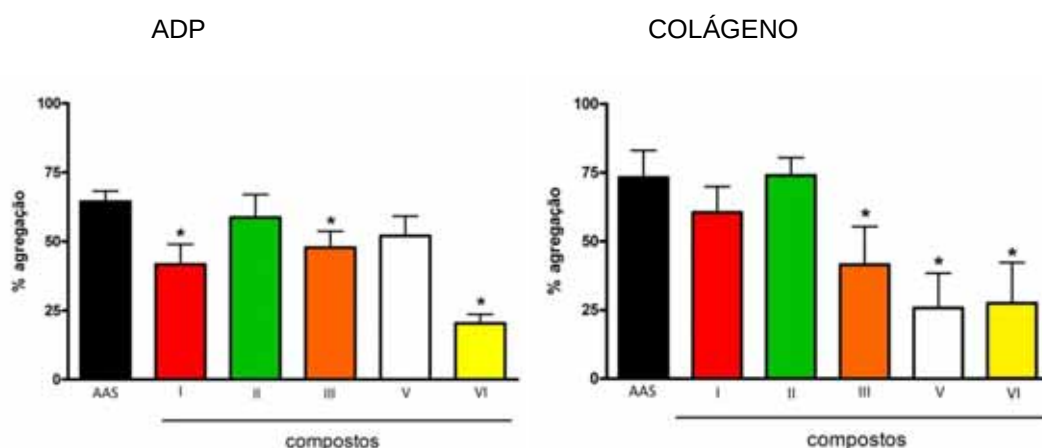
Figura 20. Tempo de sangramento em camundongos uma hora após administração dos compostos via oral.



* ($p < 0,05$) com relação ao controle positivo. # ($p < 0,05$) com relação ao controle negativo. ANOVA seguido de Tukey. (Fonte: próprio autor)

É possível observar que os compostos I e II não apresentaram resultados diferentes estatisticamente em relação ao controle positivo (AAS), indicando resultados semelhantes ao mesmo, com um elevado tempo de sangramento. O composto VI apresentou tempo de sangramento estatisticamente menor que o controle positivo, sendo o único composto com resultado comparável ao controle negativo, ou seja, não diferiu significativamente do mesmo. O composto III mostrou-se diferente tanto do controle positivo quanto do negativo, sendo o resultado inferior ao tempo de sangramento promovido pelo AAS, mas superior ao nível basal representado pelo controle negativo.

Figura 21. Porcentagem de agregação plaquetária obtida com os compostos sintetizados.



* ($p < 0,05$) com relação ao controle positivo. ANOVA. (Fonte: próprio autor)

Com relação ao ensaio de agregação plaquetária, os compostos III e VI inibiram a agregação de plaquetas induzidas por ADP e colágeno com resultados de atividade superior ao controle positivo utilizado. O composto V também apresentou atividade superior no ensaio com colágeno, já com indução por ADP não mostrou uma inibição significativa em relação ao controle positivo. O composto I foi capaz de gerar uma diminuição na agregação de plaquetas somente na indução feita por ADP.

Os compostos I e II, embora tenham apresentado um elevado tempo de sangramento, mostraram-se pouco eficazes em inibir a agregação de plaquetas induzida por colágeno. O composto I, no teste induzido por ADP, mostrou-se com atividade antiagregante plaquetária significativa em relação ao controle utilizado (AAS).

De uma maneira geral, excetuando-se o composto II, pode-se concluir que os compostos possuem atividade antiagregante plaquetária induzida pelas vias ADP e colágeno, aliando-se os resultados obtidos nos dois testes, sendo que cada

composto atua mais fortemente em uma parte do processo de hemostasia primária do organismo.

A hemostasia primária é um processo biológico que para o sangramento decorrente de injúria vascular por meio da formação de um tampão plaquetário. Para que o processo ocorra, é necessária a integridade dos três componentes da função plaquetária: adesão, atividade e agregação (VANNI *et al.*, 2007). As plaquetas são pequenos fragmentos subcelulares anucleados, formados a partir dos prolongamentos citoplasmáticos dos megacariócitos na medula óssea, e estão presentes em alta concentração no sangue (CASTRO *et al.*, 2006).

O processo se inicia quando ocorre injúria vascular, com exposição de colágeno subendotelial às plaquetas circulantes no plasma, e, na sequência, há a fase de adesão, mediada por receptores de adesão plaquetários primários, a glicoproteína VI (GPVI), que se liga ao colágeno e às proteínas do colágeno, e o complexo glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V), que se liga ao fator de von Willebrand (FvW), às integrinas leucocitárias e à P-selectina, expressa pela célula endotelial ativada. Essas ligações aumentam a expressão de integrinas plaquetárias, mediando o processo de agregação (WALLACE, 2005).

Após a adesão, as plaquetas iniciam o processo de ativação, através da ação de agonistas plaquetários, como o colágeno, trombina e epinefrina. Eles se ligam à receptores de membrana das plaquetas e ativam cascatas bioquímicas no citosol, que irão culminar com a elevação do cálcio intracelular e ativação da proteína quinase C, que, por sua vez, promovem a liberação de componentes dos grânulos intracelulares das plaquetas. Os grânulos plaquetários podem ser do tipo α , que liberam FvW, plasminogênio, fibronectina e P-selectina, sendo responsáveis por manter a adesão e integração entre as células, ou grânulos densos, que liberam

serotonina e ADP, as quais promovem o recrutamento de mais plaquetas para o tampão plaquetário (VANNI *et al.*, 2007).

A ligação do ADP e dos outros agonistas aos seus respectivos receptores promove ativação da cascata de proteinoquinase de ativação mitogênica (MAPquinase), liberando, em última instância, tromboxano A_2 (Tx A_2), importante agonista plaquetário e vasoconstritor. Além disso, a MAPquinase também libera mais cálcio para o citosol (HARTWIG *et al.*, 2003).

A proteína quinase C, já mencionada, também é responsável pela ativação do receptor de membrana glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) que, junto com o fibrinogênio, medeia o processo de agregação plaquetária e de formação do tampão plaquetário (VANNI *et al.*, 2007).

No que diz respeito à atividade antiagregante plaquetária observada nos compostos sintetizados, esta pode ser atribuída também à atividade doadora de NO que possuem, já comprovada anteriormente por SANTOS (2011). Ou seja, os compostos também podem inibir a agregação por atuarem como doadores de NO.

Uma das funções do NO, entre tantas no organismo, é a inibição da adesão, ativação, agregação e recrutamento plaquetários, principalmente mediante vias GMPc dependentes. O GMPc, segundo mensageiro, é a principal via de atuação do NO, sendo originado pela ação da GCs no citosol. Os mecanismos do NO sobre as plaquetas incluem redução do nível de cálcio citoplasmático, bloqueio do receptor de Tx A_2 , modulação da expressão de P-selectina e modulação da ligação de fibrinogênio via receptor GPIIb/IIIa. A redução dos níveis de cálcio intracelular se dá pela inibição da sua liberação via receptor tubular denso, aumento de sua taxa de extrusão e redução da entrada do meio extravascular. O NO também catalisa a fosforilação do receptor de Tx A_2 , impedindo assim a ativação plaquetária que ele

medeia. Além disso, ele induz a diminuição da expressão de P-selectina, promovendo uma inibição da adesão plaquetária. Por fim, ocorre ainda uma diminuição dos receptores GPIIb/IIIa na superfície da plaqueta e aumento da constante de dissociação desse receptor pelo fibrinogênio, dificultando o processo de agregação (VANNI *et al.*, 2007).

Muitos autores defendem a ideia de que mecanismos independentes de GMPc possam estar envolvidos no papel do NO frente a inibição da agregação plaquetária. No estudo de Gordge e colaboradores (1998), e Tsikas e colaboradores (1999), observou-se que o bloqueio da via GMPc dependente não revoga totalmente a inibição da agregação plaquetária pelo NO, e outras vias possivelmente devem envolver nitrosilação de resíduos de tirosina via OONO- (peroxinitrito) ou inibição através da nitrosilação de proteínas da síntese de TxA₂ (STANKEVICIUS *et al.*, 2003; EGBRINK *et al.*, 2005).

Beghetti e colaboradores (2003), mostraram que agregação *in vitro* é inibida se os estudos são feitos de forma rápida, mas que os níveis de GMPc intraplaquetários não estão elevados, indicando assim que um mecanismo GMPc independente pode estar envolvido (STANKEVICIUS *et al.*, 2003; EGBRINK *et al.*, 2005).

Outro estudo conduzido por Marjanovic e colaboradores, nos EUA, demonstrou que a produção de pequena concentração de NO produzido por eNOS plaquetário estimula a secreção e agregação plaquetárias e, dessa forma, amplifica e estabiliza a agregação plaquetária (EGBRINK *et al.*, 2005).

Combinando os resultados de diversos estudos conduzidos sobre a atuação do NO frente às plaquetas, os autores acreditam em um papel bifásico do NO na ativação plaquetária, no qual, em baixa concentração dele, há um estímulo da

ativação plaquetária, mas, em alta concentração, ocorre inibição dessa ativação (VANNI *et al.*, 2007).

Assim, pode-se sugerir que os resultados observados para os compostos sintetizados neste trabalho se deram em razão da liberação de quantidade significativa de NO por eles, obtendo-se o efeito protetor na formação de trombo, e com isso, podendo ser úteis no tratamento da anemia falciforme.

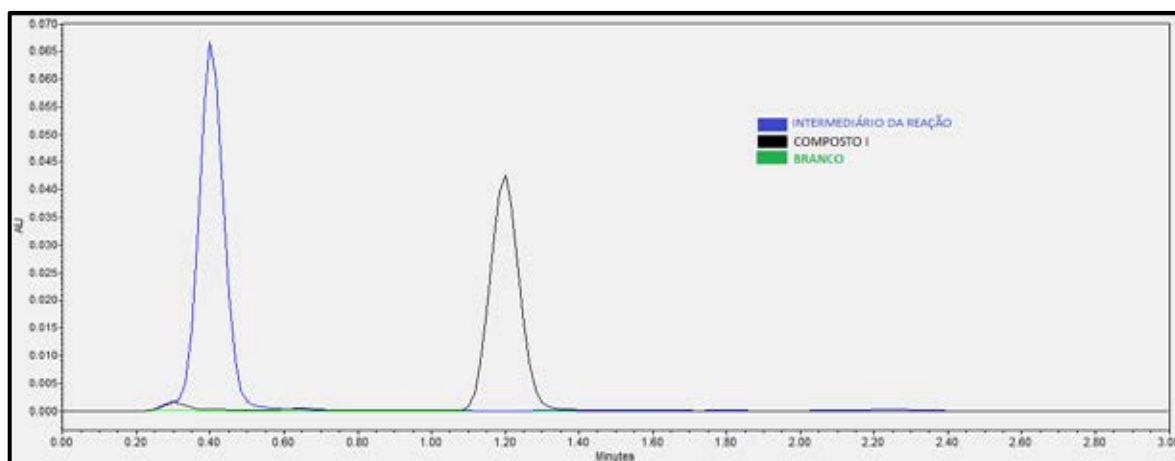
3.2.4. Estabilidade Química

3.2.4.1. Composto I

- **Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada em relação ao intermediário da reação (IR). Como mostrado na Figura 22, é possível observar tempos de retenção diferentes para as duas moléculas, ambas na concentração de 10 µg/mL.

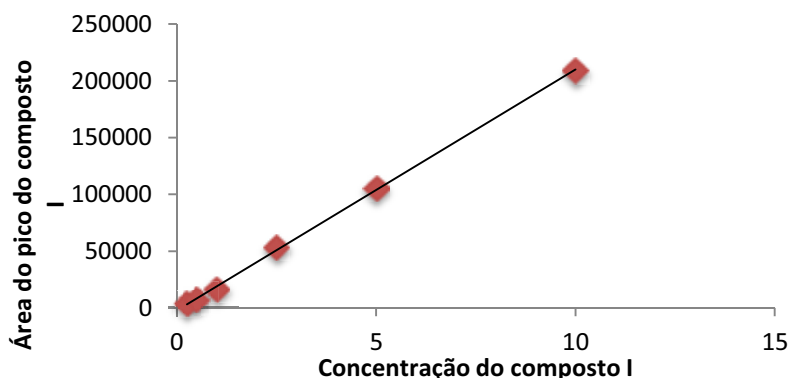
Figura 22. Cromatograma da seletividade do método analítico para o composto I.



(Fonte: próprio autor)

- **Linearidade**

Para avaliação da linearidade foi construída uma curva analítica (Figura 23) por regressão linear nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5 e 10 µg/mL, em triplicata para cada concentração. A reta encontrada foi $y = 21225x - 2160$ e o coeficiente de regressão linear (r) foi 0,9995. A exatidão (concentração experimental/ concentração nominal x 100) dos pontos da curva foi de 87,5 a 112%.

Figura 23. Curva de linearidade do composto I.

(Fonte: próprio autor)

- Limite de Quantificação**

O limite de quantificação foi de 0,25µg/mL, sendo esta a menor concentração que apresentou precisão (CV% = 1,6) e exatidão (112%) aceitáveis.

- Precisão e exatidão**

A precisão e a exatidão foram avaliadas para três concentrações (CQB=0,5µg/mL; CQM=2,5µg/mL e CQA=8µg/mL) em triplicatas, no mesmo dia e em dois dias não consecutivos. Os resultados estão mostrados na Tabela 20.

Tabela 20. Precisão e exatidão do método analítico para o composto I.

		Concentração nominal (µg/mL)		
		0,5	2,5	8
Replicatas intra-dia	Conc. Experimental (µg/mL)	0,456	2,618	8,753
	Precisão (CV %)	1,20	1,85	0,15
	Exatidão (%)	91,28	104,74	109,42
	N	3	3	3
Replicatas inter-dia	Conc. Experimental (µg/mL)	0,510	2,678	8,749
	Precisão (CV %)	0,117	0,028	0,001
	Exatidão (%)	102,17	107,19	109,36
	N	6	6	6

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

Exatidão % = [(concentração experimental/concentração nominal) x 100]

- **Estabilidade em água e tampões (pH 1,2 e pH 7,4)**

A quantificação do composto I foi realizada em triplicata usando diferentes condições experimentais: Água (37°C, com agitação), tampão pH 1,2 (37°C, com agitação) e tampão pH 7,4 (37°C, com agitação).

Contudo, o composto I apresentou-se instável nas condições analisadas, tendo sua concentração decaído para um valor abaixo do limite de quantificação do método no tempo de 15 minutos após o início dos experimentos, tanto para água como para os tampões.

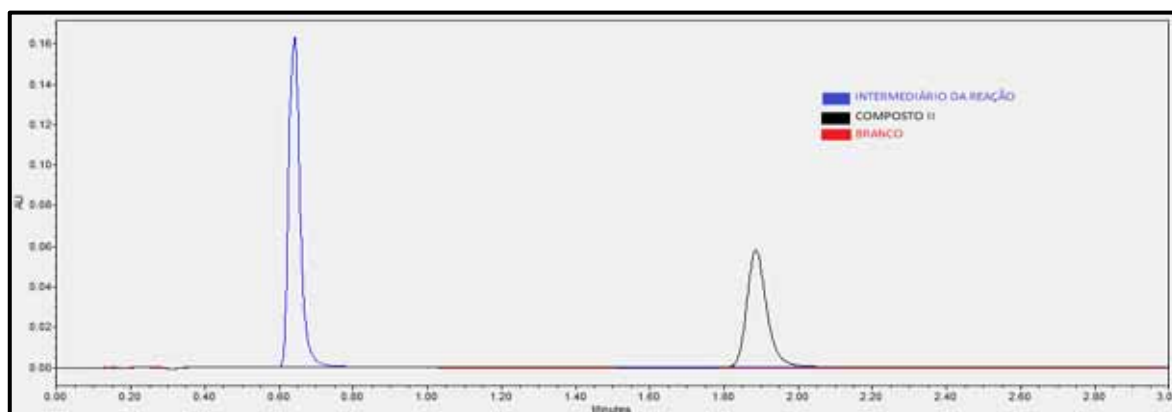
O composto I em solução de acetonitrila foi estável por um período máximo de 7 dias quando armazenado em geladeira (5°C).

3.2.4.2. Composto II

- **Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada em relação ao intermediário da reação (IR). Como mostrado na Figura 24, é possível observar tempos de retenção diferentes para as duas moléculas, ambas na concentração de 5µg/mL.

Figura 24. Cromatograma de seletividade do método analítico para o composto II.

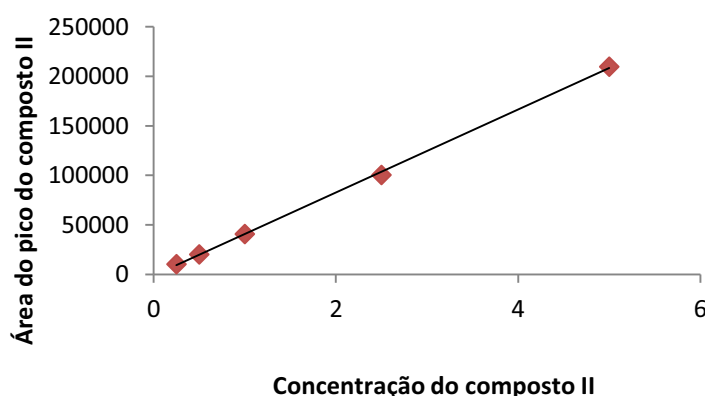


(Fonte: próprio autor)

- **Linearidade**

Para avaliação da linearidade foi construída uma curva analítica (Figura 25) por regressão linear nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5 µg/mL, em triplicata para cada concentração. A reta encontrada foi $y = 41915x - 1268$ e o coeficiente de regressão linear (r) foi 0,9995. A exatidão (concentração experimental/ concentração nominal x 100) dos pontos da curva foi de 97 a 110%.

Figura 25. Curva de linearidade do composto II.



(Fonte: próprio autor)

- **Limite de Quantificação**

O limite de quantificação foi de 0,25 µg/mL, sendo esta a menor concentração que apresentou precisão (CV% = 1,07) e exatidão (110,44%) aceitáveis.

- **Precisão e exatidão**

A precisão e a exatidão foram avaliadas para três concentrações (CQB=0,5 µg/mL; CQM=1 µg/mL e CQA=4 µg/mL) em triplicatas, no mesmo dia e em dois dias não consecutivos. Os resultados estão mostrados na Tabela 21.

Tabela 21. Precisão e exatidão do método analítico para o composto II.

		Concentração nominal (µg/mL)		
		0,5	1,0	4,0
Replicatas intra-dia	Conc. Experimental (µg/mL)	0,51	1,07	3,77
	Precisão (CV %)	0,005	0,002	0,01
	Exatidão (%)	98,37	93,58	106,04
	N	3	3	3
Replicatas inter-dia	Conc. Experimental (µg/mL)	0,51	1,05	3,77
	Precisão (CV %)	0,005	0,02	0,007
	Exatidão (%)	98,04	95,01	106,12
	N	6	6	6

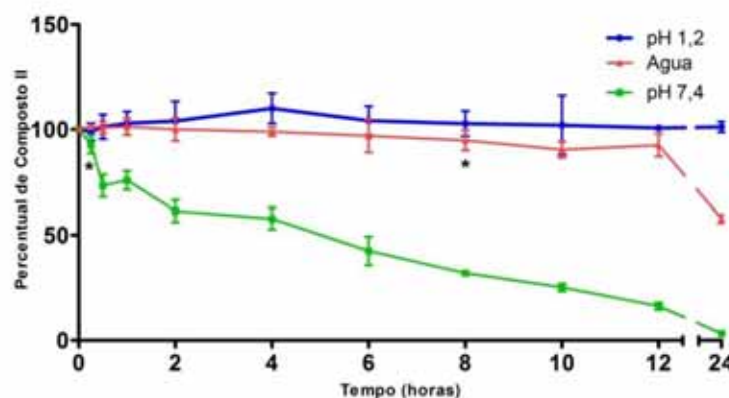
CV %= coeficiente de variação $[(\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$

Exatidão % = $[(\text{concentração experimental}/\text{concentração nominal}) \times 100]$

- Estabilidade em água e tampões (pH 1,2 e pH 7,4)**

A quantificação do composto II foi realizada em triplicata usando diferentes condições experimentais: Água (37°C, com agitação), tampão pH 1,2 (37°C, com agitação) e tampão pH 7,4 (37°C, com agitação).

A partir da quantificação da substância foi possível construir um gráfico apresentando os resultados obtidos (Figura 26).

Figura 26. Estabilidade do composto II em soluções.

* $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey)
(Fonte: próprio autor)

O composto II foi estável em pH 1,2 por 24 horas, não apresentando degradação para nenhum dos tempos analisados. Em água, foi estável por 6 horas, apresentando degradação somente a partir de 8 horas. Já em pH 7,4, em apenas 15 minutos houve degradação significativa em relação ao tempo 0, e em todos os tempos seguintes continuou-se a observar degradação, demonstrando a instabilidade do candidato à fármaco nesse pH.

O composto II em solução de acetonitrila foi estável em geladeira (5°C) por um período de 40 dias.

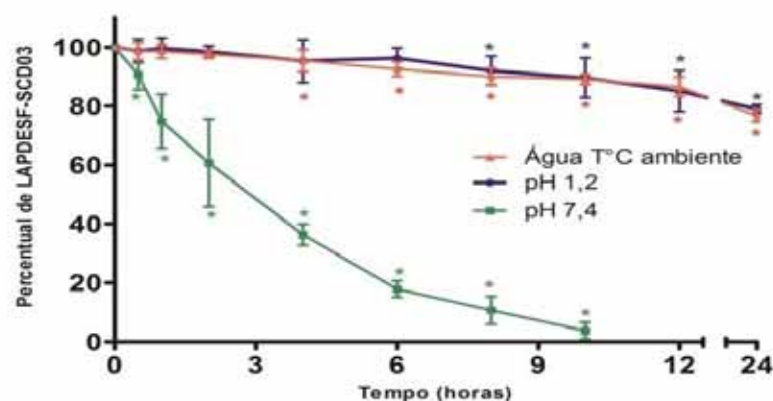
3.2.4.3. Composto III

O experimento tomado como base para execução desse estudo foi anteriormente realizado com o composto III, sendo os parâmetros adotados para validação do método analítico os mesmos adotados para ele. O composto apresentou os seguintes resultados:

Em pH 1,2, foi estável por 6 horas, apresentando degradação no tempo de 8 horas ($p < 0,05$). Em pH 7,4, houve degradação a cada tempo de análise em relação ao anterior. O ensaio da estabilidade em água a temperatura ambiente (25°C) mostrou perfil semelhante ao do pH 1,2, contudo a degradação começou em 4 horas. No estudo de estabilidade em água na temperatura de 37°C, em 30 minutos o analito já estava abaixo do limite de quantificação (Figura 27).

O composto III foi mantido em geladeira (5,0°C) por 24 horas, sem agitação, não ocorrendo degradação.

Figura 27. Estabilidade do composto III em soluções (1500 ng/mL).



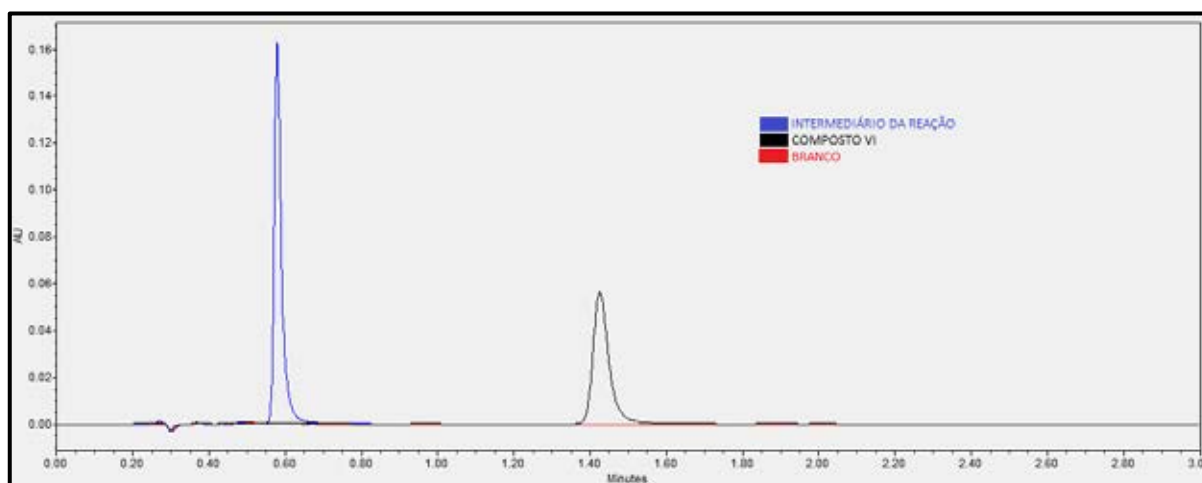
* $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey)
(Fonte: Campos, M.L.*)

3.2.4.4. Composto VI

- Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada em relação ao intermediário da reação (IR). Como mostrado na Figura 28, é possível observar tempos de retenção diferentes para as duas moléculas, ambas na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 28. Cromatograma de seletividade do método analítico para o composto VI.

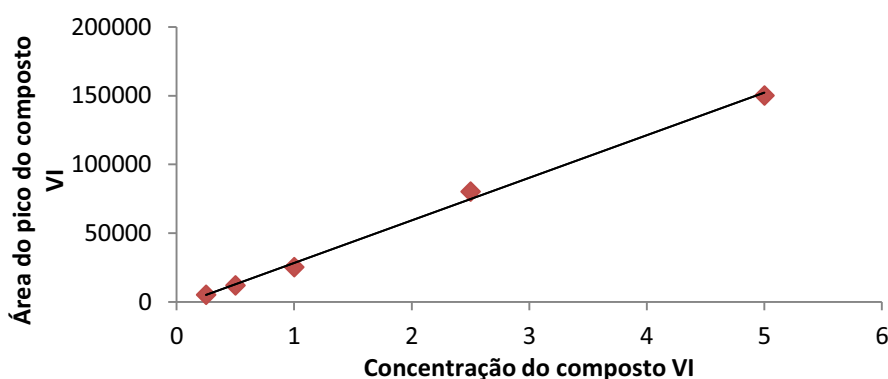


(Fonte: próprio autor)

- **Linearidade**

Para avaliação da linearidade foi construída uma curva analítica (Figura 29) por regressão linear nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5 µg/mL, em triplicata para cada concentração. A reta encontrada foi $y = 31017x - 2834$ e o coeficiente de regressão linear (r) foi 0,9985. A exatidão (concentração experimental/ concentração nominal x 100) dos pontos da curva foi de 90,5 a 102,9%.

Figura 29. Curva de linearidade do composto VI.



(Fonte: próprio autor)

- **Limite de Quantificação**

O limite de quantificação foi de 0,25 µg/mL, sendo esta a menor concentração que apresentou precisão (CV% = 1,16) e exatidão (102,9%) aceitáveis.

- **Precisão e exatidão**

A precisão e a exatidão foram avaliadas para três concentrações (CQB=0,5 µg/mL; CQM=1 µg/mL e CQA=4 µg/mL) em triplicatas, no mesmo dia e em dois dias não consecutivos. Os resultados estão mostrados na Tabela 22.

Tabela 22. Precisão e exatidão do método analítico para o composto VI.

		Concentração nominal (µg/mL)		
		0,5	1,0	4,0
Replicatas intra-dia	Conc. Experimental (µg/mL)	0,53	1,05	4,02
	Precisão (CV %)	0,013	0,014	0,008
	Exatidão (%)	94,97	95,07	99,57
	N	3	3	3
Replicatas inter-dia	Conc. Experimental (µg/mL)	0,53	1,05	3,89
	Precisão (CV %)	0,019	0,010	0,003
	Exatidão (%)	93,45	95,48	102,89
	N	6	6	6

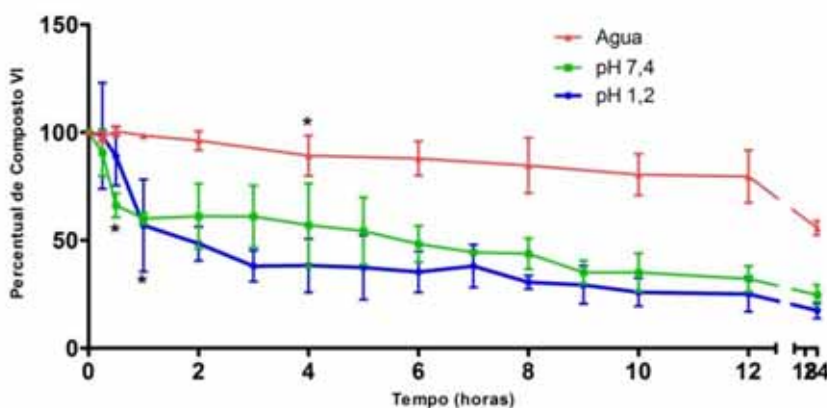
CV %= coeficiente de variação $[(\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$

Exatidão % = $[(\text{concentração experimental}/\text{concentração nominal}) \times 100]$

- Estabilidade em água e tampões (pH 1,2 e pH 7,4)**

O composto VI foi quantificado em diferentes tempos pré-determinados, retirando-se alíquotas, em triplicata, das condições experimentais propostas: Água (37°C, com agitação), tampão pH 1,2 (37°C, com agitação) e pH 7,4 (37°C, com agitação).

A partir da quantificação da substância foi possível construir um gráfico apresentando os resultados obtidos (Figura 30).

Figura 30. Estabilidade do composto VI em soluções.

* $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey)

(Fonte: próprio autor)

O composto VI foi estável em pH 1,2 por 30 minutos, sendo constatada uma degradação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo seguinte analisado (de 1 hora) em relação ao tempo zero. Em água, foi constatada degradação significativa após 4 horas em relação ao tempo zero. Já em pH 7,4, após 30 minutos houve degradação estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

O composto VI em solução de acetonitrila foi estável em geladeira (5°C) por um período de 40 dias.

Com o intuito de melhor comparar os perfis de degradação obtidos pelos compostos analisados, os resultados estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 23. Tempo de estabilidade dos compostos nas condições propostas.

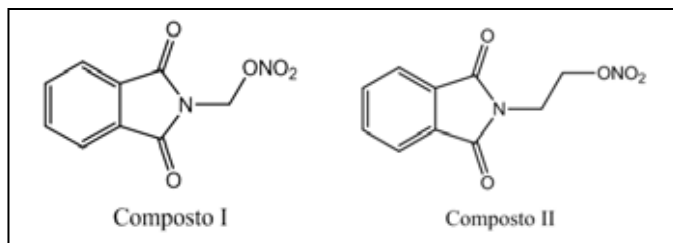
	Condição à 37°C		
	pH 1.2	pH 7.4	Água
Composto I	15 min	15 min	15 min
Composto II	24 h	15 min	6 h
Composto III	6h	15 min	30 min
Composto VI	30 min	30 min	4 h

Analisando os resultados obtidos, observa-se que, de maneira geral, todos os compostos apresentaram notável instabilidade em tampão pH 7,4, sendo hidrolisados em cerca de 15 minutos a partir do início do experimento. Apenas o composto VI apresentou degradação estatisticamente significativa em relação ao tempo zero aos 30 minutos, sendo, ainda assim, muito rapidamente degradado.

Em pH 1,2, o composto II se mostrou estável por 24h, apresentando perfil completamente contrário ao composto I, que em 15 minutos estava completamente hidrolisado. Em termos estruturais, os dois compostos diferem entre si pelo espaçador utilizado, sendo o composto I o derivado metilênico e o II o etilênico.

Estruturas:

Figura 31. Comparação estrutural dos compostos I e II.

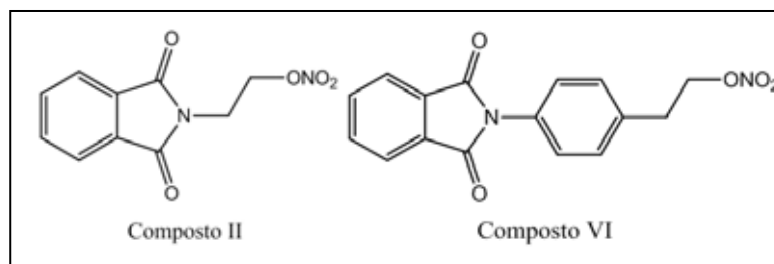


(Fonte: próprio autor)

Em água, os melhores resultados foram obtidos com os compostos II e VI, que se mostraram estáveis por 6 e 4 horas, respectivamente. O composto VI é derivado interfenilênico do composto II, diferindo pela presença do anel aromático em sua estrutura, substituído na posição para, fator que não contribuiu para uma maior estabilidade em água, mas fez diferença em pH ácido, onde o Composto VI resistiu apenas 30 minutos.

Estruturas:

Figura 32. Comparação estrutural dos compostos II e VI.



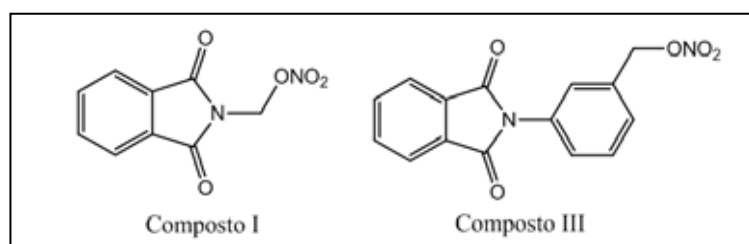
(Fonte: próprio autor)

O composto III é derivado interfenilênico do composto I, e, diferente da relação observada entre os compostos II e VI, a inserção do anel aromático, com o

substituinte na posição meta, contribuiu para aumentar a estabilidade em pH ácido, ficando em cerca de 6 horas em contrapartida do composto I, que após 15 minutos estava completamente hidrolisado.

Estruturas:

Figura 33. Comparação estrutural dos compostos I e III.



(Fonte: próprio autor)

3.2.5. Teste imunológico para detecção de TNF- α e IL-1 β

3.2.5.1. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos

Para determinar a citotoxicidade dos compostos, foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), desenvolvido por Mosmann (1983). O método baseia-se na conversão do substrato, o sal de tetrazólio MTT, um corante amarelo solúvel em água. Na presença de células vivas, ele é convertido pelas desidrogenases mitocondriais em cristais insolúveis de formazana, decorrente da clivagem do anel tetrazólico presente no MTT, que apresentam coloração azul. Os cristais são então solubilizados, em meio adequado, para medida no espectrofotômetro (540 e 620nm) (SHCHARBIN, *et al.*; 2010). Quanto menor a citotoxicidade das substâncias, maior será a intensidade metabólica e consequentemente maior será a absorvância da solução.

Os compostos foram testados nas concentrações de 400 μ M; 200 μ M; 100 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M. Foi considerado como satisfatória viabilidade igual ou superior a 70%.

O composto I demonstrou não ser citotóxico em nenhuma das concentrações avaliadas. A viabilidade celular foi de 83% a 90%.

O composto II demonstrou não ser citotóxico em nenhuma das concentrações avaliadas. A viabilidade celular foi de 84% a 93%.

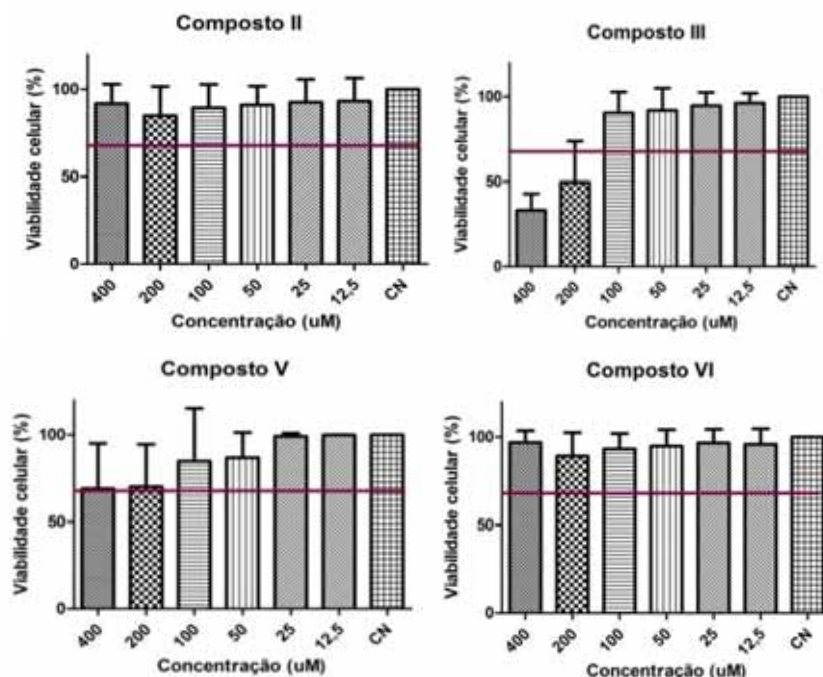
O composto III apresentou uma viabilidade celular inferior a 70% nas concentrações de 400 μ M e 200 μ M (33% e 49%, respectivamente), inviabilizando o uso dessa substância nas mesmas. Já nas concentrações inferiores a 100 μ M, a viabilidade foi de 90% a 96%.

O composto V foi citotóxico na concentração de 400 μ M (68% de viabilidade celular). Nas concentrações inferiores a ela, a viabilidade foi de 70% a 100%.

O composto VI demonstrou não ser citotóxico em nenhuma das concentrações analisadas. A viabilidade celular foi de 89% a 97%.

Os resultados estão demonstrados na Figura 34.

Figura 34. Viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos.



(Fonte: próprio autor)

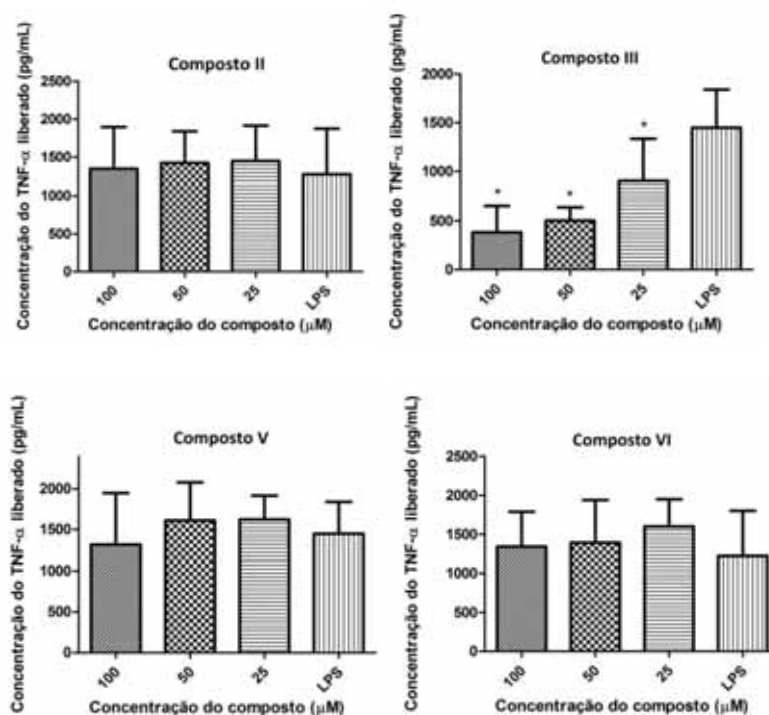
Assim, através desses resultados de viabilidade celular, foi possível determinar as concentrações a serem utilizadas no teste para determinação das citocinas TNF- α e IL-1 β no sobrenadante das culturas de macrófagos. A viabilidade ficou superior a 70% para todos os compostos nas concentrações de 100 μ M ou menores.

3.2.5.2. Determinação das citocinas TNF- α e IL-1 β nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

Os compostos II, III, V e VI foram testados em três diferentes concentrações, escolhidas com base nos resultados obtidos no teste de viabilidade celular de macrófagos.

As concentrações de TNF- α e IL-1 β foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos como concentração de TNF- α ou IL-1 β detectado pelo imunoensaio enzimático (ELISA), onde os valores estão expressos como a média $\pm$ EPM (Figura 35).

Figura 35. Concentração de TNF- α produzido por macrófagos em meio contendo os compostos, em diferentes concentrações, utilizando LPS como controle positivo.



*p<0,05 (em comparação ao grupo tratado com LPS.). ANOVA seguido de Dunnett.

(Fonte: próprio autor)

O composto III foi o único entre os compostos analisados que apresentou uma inibição significativa da citocina TNF- α em relação ao controle positivo (LPS), nas três concentrações testadas (100 μ M, 50 μ M e 25 μ M).

Relatos da literatura sobre a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de derivados ftalimídicos inibidores de TNF- α mostram que a inibição desta citocina é maior quando o núcleo ftalimídico está diretamente ligado a um anel aromático, e menor atividade é observada quando o núcleo ftalimídico está ligado a derivados alquílicos (SANTOS, 2007).

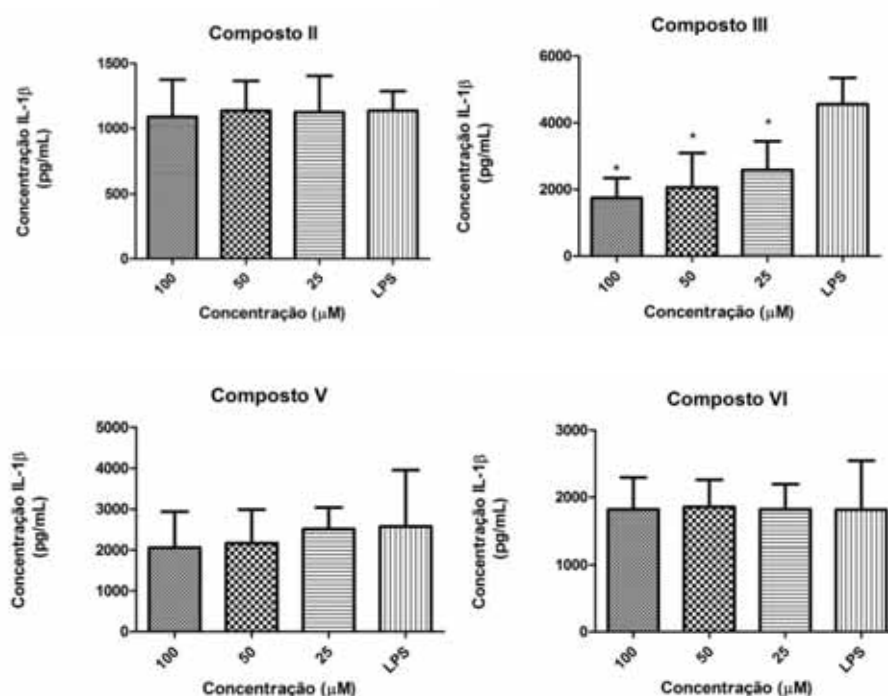
Embora os compostos V e VI também apresentem, assim como o composto III, o núcleo ftalimídico ligado diretamente a um anel aromático, estes não mostraram-se capazes de inibir a citocina TNF- α nas concentrações testadas. O composto V difere do composto III apenas na posição em que o substituinte está ligado ao anel aromático, em para e meta, respectivamente, fator que pode ter influenciado o resultado obtido.

O composto II não apresenta anel aromático em sua estrutura, e não mostrou-se capaz de inibir a citocina TNF- α em nenhuma das concentrações avaliadas neste trabalho.

Com relação ao ensaio de inibição da liberação de IL-1 β , os resultados apresentaram o mesmo perfil daqueles obtidos para inibição de TNF- α , sendo apenas o composto III capaz de inibir essa citocina nas três concentrações testadas (100 μ M, 50 μ M e 25 μ M).

Os resultados estão apresentados na figura a seguir (Figura 36).

Figura 36. Concentração de IL-1 β produzida por macrófagos em meio contendo os compostos, em diferentes concentrações, utilizando LPS como controle positivo.



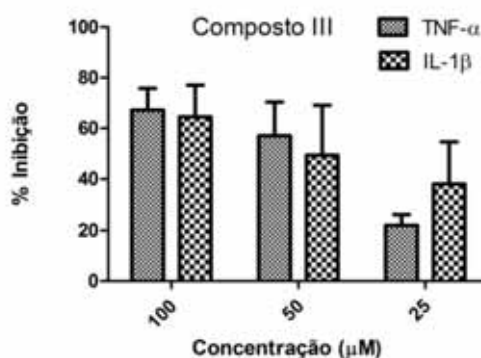
*p<0,05 (em comparação ao grupo tratado com LPS). ANOVA seguido de Dunnett.

(Fonte: próprio autor)

Diante dos resultados obtidos no teste de inibição da liberação de TNF- α e IL-1 β , pode-se concluir que o composto III foi o único a apresentar resultados significativos em relação ao controle positivo (LPS). Nas três concentrações utilizadas, o composto foi capaz de inibir significativamente a liberação de ambas as citocinas.

A figura a seguir (Figura 37) mostra a comparação dos resultados para TNF- α e IL-1 β , nas três concentrações testadas, como porcentagem de inibição das mesmas em relação ao controle positivo utilizado (LPS).

Figura 37. Porcentagem de inibição da produção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos, em meio contendo o composto III.



(Fonte: próprio autor)

Na concentração de 100 μ M, a taxa de inibição de ambas as citocinas foi de aproximadamente 65%. Com 50 μ M, a inibição de TNF- α foi ligeiramente superior, 57% contra 49% de inibição de IL-1 β . Já com 25 μ M, a inibição de IL-1 β foi maior, 38%, ficando em aproximadamente 22% a inibição de TNF- α .

Assim, conclui-se que o composto apresentou de forma satisfatória atividade inibitória das citocinas pró-inflamatórias analisadas, condizendo com o planejamento estrutural proposto para a molécula.

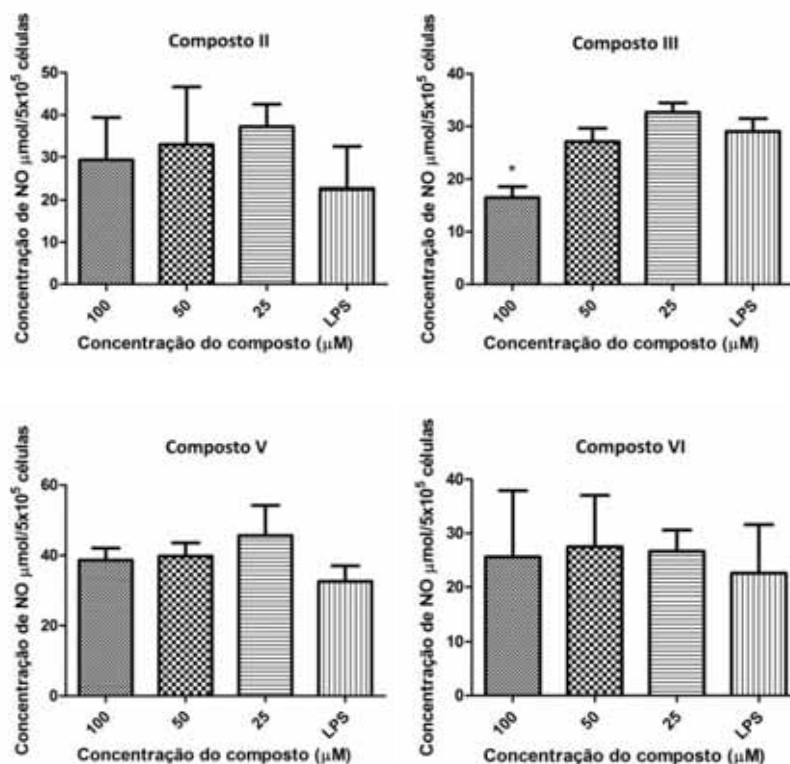
3.2.6. Determinação da inibição de liberação de NO

Como já mencionado anteriormente, a NOS é a enzima responsável pela síntese do NO e três isoformas são descritas para ela, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (cNOS). A isoforma II (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas como TNF- α , IL-1 β ou IF- γ , endotoxinas bacterianas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular, não é regulada pelo cálcio e produz grande quantidade desse mediador (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

O teste de inibição da liberação de NO objetivou avaliar se os compostos sintetizados possuem essa atividade, em células previamente estimuladas por LPS. Após a indução, a iNOS pode ficar ativa por 20 horas, sintetizando NO em quantidades 1000 vezes maiores que a cNOS, sendo responsável pelos seus efeitos citotóxicos. Em respostas inflamatórias crônicas localizadas, observa-se um efeito nocivo dessa alta produção de NO dependente de iNOS por macrófagos nos espaços subendoteliais (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

Apenas o composto III se mostrou capaz de inibir a liberação de NO induzida por LPS, em aproximadamente 40% (100 μ M). Os resultados estão mostrados na figura abaixo (Figura 38).

Figura 38. Inibição da liberação de óxido nítrico proveniente de macrófagos pelos compostos II, III, V e VI.



(Fonte: próprio autor)

Pacientes com anemia falciforme, por apresentarem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β , estão susceptíveis à produção de grandes quantidades de NO via iNOS. Como já dito, a quantidade de NO produzida pode determinar se ele é protetório ou tóxico. Pequenas quantidades são importantes para a homeostasia do organismo, porém grandes quantidades são citotóxicas (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

A atividade apresentada pelo composto III mostra-se interessante no contexto fisiopatológico da anemia falciforme, e, embora não seja possível, somente através do teste realizado, afirmar que o NO inibido foi proveniente somente da via de produção pela iNOS, pode-se, a partir desses resultados preliminares, intensificar os estudos acerca do comportamento do composto frente à produção e inibição de NO.

4. CONCLUSÃO

Os intermediários e compostos finais propostos foram sintetizados com êxito, conforme o descrito em literatura, apresentando rendimentos superiores a 51%.

Os ensaios de tempo de sangramento e agregação plaquetária mostraram que os compostos, de maneira geral, inibem a agregação de plaquetas no modelo proposto (indução por ADP e colágeno), interferindo no processo de hemostasia primária do organismo e, assim, podendo contribuir para proteção do vaso sanguíneo e para o tratamento de pacientes com anemia falciforme. O composto II foi o único que não apresentou inibição da agregação plaquetária estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, porém observou-se que, no teste de tempo de sangramento, o animal que recebeu o composto apresentou uma elevação do tempo de sangramento comparável ao controle positivo (AAS), sugerindo a existência de atividade anticoagulante.

A partir do ensaio de estabilidade química, conclui-se que o composto mais estável nas três condições testadas é o composto II, estável por 24 horas em pH 1,2 e por 6 horas em água, seguido pelo composto III, estável por 6 horas em pH 1,2, e pelo composto VI, estável por 4 horas em água. O composto I mostrou-se instável em todas as condições. Todos os compostos testados (I, II, III e VI) mostraram-se instáveis em pH 7,4, permanecendo íntegros por no máximo 30 minutos a partir do início do experimento.

Com relação à inibição da liberação das citocinas TNF- α e IL-1 β , o composto III foi o único a apresentar atividade inibitória, nas três concentrações testadas (100 μ M, 50 μ M e 25 μ M), mostrando-se, assim, com importante atividade anti-inflamatória.

No teste de inibição da liberação de NO, o composto III foi o único a apresentar resultado estatisticamente significativo, com aproximadamente 40% de inibição, sendo importante para controlar a liberação excessiva do NO em um quadro inflamatório crônico, como ocorre na anemia falciforme, e evitar seu efeito citotóxico.

Diante de todos os testes e ensaios biológicos realizados, conclui-se que o candidato a fármaco mais promissor dentre a série de compostos sintetizada neste trabalho é o composto III, tornando-se interessante prosseguir os estudos acerca de suas propriedades farmacológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYGUN, B.; ODAME, I. A Global Perspective on Sickle Cell Disease. **Pediatric Blood Cancer**, v. 59, p. 386–390, 2012.

ATAGA, K. I. et al. Association of Coagulation Activation with Clinical Complications in Sickle Cell Disease. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2012.

BARLETT, J. B.; DREDGE, K.; DALGLEISH, A.G.; The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nat. Ver.**, v.4, p.314-322, 2004.

BARREIRO, E. J. et al. A Química Medicinal de N-acilidrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos Analgésicos, Anti-inflamatórios e Anti-trombóticos. **Quim. Nova**, v.25, p.129-148, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente**. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 822, de 6 de junho de 2001. Institui no âmbito do Sistema Único de Saúde o Programa Nacional de Triagem Neonatal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001. Seção 1, p. 33.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 872, de 6 de novembro de 2002. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme - Hidroxiuréia. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 1391, de 16 de agosto de 2005. Institui no âmbito do Sistema Único de Saúde as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e Outras Hemoglobinopatias. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2005. Seção 1, p. 40.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Departamento de Apoio à Gestão Participativa. Política Nacional de Saúde Integral da População Negra: uma política para o SUS. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Atencao a Saude. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de Educação em Saúde: linha de cuidado em anemia falciforme**. Brasília: editora do Ministério da Saúde, v. 2, 2009.

BRAWLEY, O. W. et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **Ann. Intern. Med.**, v.148, n. 12, p. 932-938, 2008.

BOOTH, C. et al. Infection in sickle cell disease: A review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14. p. 2-12. 2010.

BORGES, L. G.; FRÖEHLICH, E. Talidomida – novas perspectivas para utilização como anti-inflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.49, p.96-102, 2003.

BOSQUESI, P. L. et al. Anti-inflammatory drug design using a molecular hybridization approach. **Pharma**, v.4, p.1450-1474, 2011.

CANCADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v.29, n.3, p. 203-206, 2007.

CANCADO, R. D. et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v.31, n.5, p. 361-366, 2009.

CARVALHO, S. C. et al. Em busca da equidade no sistema de saúde brasileiro: o caso da doença falciforme. **Saúde Soc. São Paulo**, v.23, n.2, p.711-718, 2014.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CESSAK, G. et al. TNF inhibitors – Mechanisms of action, approved and off-label indications. **Pharmacological Reports**, v. 66. p. 836–844, 2014.

CHARAGE, S. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 20, p. 1317-1322, 1995.

CHARAGE, S. et al. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **Medicine**, v.75, p.300-326, 1996.

CHELUCCI, R. C. **Obtenção de híbridos lapdesf fur-fd e atividade anti-inflamatória com potencial atividade neuroprotetora.** 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. **Life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, 2012.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis, ex Vivo and in Vitro Hydrolysis Study of an Indoline Derivative Designed as an Anti-Inflammatory with Reduced Gastric Ulceration Properties. **Molecules**, v. 14, p. 3187-3197, 2009.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v.22, n.1, p.75-84, 1999.

CODD, R. Traversing the Coordination Chemistry and Chemical Biology of Hydroxamic Acids. **Coord. Chem. Rev.**, v.252, p.1387-1408, 2008.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231-240, 2003.

DEJANA, E. et al. Bleeding time in laboratory animals. ii - a comparison of different assay conditions in rats. **Thrombosis Research**, v. 15, n. 1/2, p. 191-197, 1979.

DUSSE, L. M. S. et al. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EGBRINK, O. et al. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. **Microcirculation**, v. 12, n. 3, p. 287-300, 2005.

FELIX, A. A. et al. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n.3, p. 203-208, 2010.

FIGUEIREDO, M. S. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n.3, p. 313-315, 2007.

FLATMAN, P. W. Regulation of Na-K-2Cl cotransport in red cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.559, p.77-88, 2004.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.

FRIEDRICH, M. J. Advances Reshaping Sick Cell Therapy. **JAMA**, v. 305, n. 3, 2011.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GEE, B. E. Biologic Complexity in Sick Cell Disease: Implications for Developing Targeted Therapeutics. **The Scientific World Journal**. p. 1-12. 2013.

GUIMARAES, T. M. R. et al. O cotidiano das famílias de crianças e adolescentes portadores de anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n.1, p. 9-14, 2009

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

HARTWIG, J.; ITALIANO JR., J. E. The Birth of the platelet. **J. Thromb. Haemost.**, v. 1, p. 1580-1586, 2003.

HEBBEL, R. P. Adhesive interactions of sickle cell erythrocytes with endothelium. **The American Society for Clinical Investigation**, v.99, n.11, p. 2561-2564, 1997.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, v. 6, n. 5, p. 517, 1910.

HERRICK, J. B. Abstract of discussion. **JAMA**. v. 83, p. 16, 1924.

HOPPE, C. C. Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. **Hematol. Oncol. Clin.**, v. 28, p. 265-286, 2014.

INGRAM, V. M. Abnormal human haemoglobins: I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by "fingerprinting". **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 28, n. 3, p. 539-545, 1958.

ITO, T.; HANDA, H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. **Con. Anomalies**, v.52, p.1-7, 2012.

KATO, G. J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v.107, p. 2279–2285, 2006.

KING, S. B. The Nitric Oxide Producing Reactions of Hydroxyurea. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 437-452, 2003.

KUTLAR, A. et al. A potent oral Pselectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. **Am. J. Hematol.**, v.87, n.5, p.536-539, 2012.

LEW, V. L. et al. Distribution of dehydration rates generated by maximal Gardos - channel activation in normal and sickle red blood cells. **Blood**, v. 105, n. 1, p. 361-367, 2005.

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

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg. Med. Chem.**, v.10, p.3067-3073, 2002.

LIMA, L. M. et al. Thalidomide and analogs as anti-inflammatory and immunomodulator drug candidates. **Agents in Med. Chem.**, v.5, p.79-95, 2006.

MALAVÉ, I. et al. Level of Tumor Necrosis Factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v. 90, p.172-176, 1993.

MALOWANY, J. I.; BUTANY, J. Pathology of sickle cell disease. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 29, p. 49-55, 2012.

MCCAFFREY, P. G. et al. Induction of gamma-globin by histone deacetylase inhibitors. **Blood**, v.90, p.2075–2083, 1997.

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. 1. ed., São Paulo: USP, p. 28-39, 2011.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed Multiple Ligands: An Emerging Drug Discovery Paradigm. **J. Med. Chem.**, v.48, n°21, p.6523-6543, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. of Immun. Meth.**, v.65, p. 55-63, 1983.

MULLER, G. W. et al. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. **J. Med. Chem.**, v.39, p.3238-3240, 1996.

NEEL, J. V. The Inheritance of Sick Cell Anemia. **Science**, v. 110. n. 2846. p. 64-66. 1949.

PARK, S. et al. Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 6, p. 936-953, 2003.

PAULING, L. et al. Sick Cell Anemia: A Molecular Disease. **Science**, v. 110, p. 543-548, 1949.

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

PORTER, J. B. Deferasirox - current knowledge and future challenges. **Ann N.Y. Acad Sci**, v. 1202, p. 87-93, 2010.

PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Comms.**, v. 1, n. 104, p. 1-7, 2010.

PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **Lancet**, v. 381, p. 142-151, 2013.

REITER, C. D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nat. Med.**, v.8, p.1383–1389, 2002.

RESOLUÇÃO nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

RIBEIRO, R.A. et al. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v.391, p.97-103, 2000.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme: objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

SAFO, M. K. et al. Structural basis for the potent antisickling effects of a novel class of five membered heterocyclic aldehydic compounds. **J. Med. Chem.**, v.47, p.4665-4676, 2004.

SAMPAIO, E. P. et al. Thalidomide selectively inhibits tumour necrosis factor α production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v.173, p.699–703, 1991.

SANTOS, J. L. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento da Anemia Falciforme.** Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos). 2007. 197f. Faculdade de ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

SANTOS, J. L. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da Anemia Falciforme.** Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos). 2009. Faculdade de ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

SANTOS, J. L. et al. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds To Treat Sick Cell Disease Symptoms. **J. Med. Chem.**, v. 54, p. 5811–5819, 2011.

SANTOS, J. L.; CHUNG, M.C. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 35, n. 4, p. 783-790, 2012.

SARAF, S. L. et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 15, p. 4-12, 2014.

SÉCHAUD, R. et al. Absolute oral bioavailability and disposition of deferasirox in healthy human subjects. **J. Clin. Pharmacol.**, v.48, n.8, p.919-925, 2008.

SHIBATA, Y. et al. N-Alkylphthalimides: structural requirement of thalidomidal action on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor alpha production by human leukemia HL-60 cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v.43, n.1, p.177-179, 1995.

SILVA, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 5, p. 921-933, 2013.

SILVERSTAIN, R. M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 387p. Rio de Janeiro: LTC, 5 ed, 1994.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica.** v.2. 534p. Rio de Janeiro: LTC S.A. tradução: Horácio Macedo. p. 214-216, 1996.

SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 162. p. 3–14. 2013.

STANKEVICIUS, E. et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Med.**, v. 39, p. 4, 2003.

STEINBERG, M. H. et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to nine years of treatment. **JAMA**. v.289, p.1645-1651, 2003.

STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **T. Pharmacol. Scienc.**, v. 27, n.4, p. 204-210, 2006.

STEVENS, M. R. Hydroxyurea: an overview. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v. 13, n. 3, p. 172-175, 1999.

STROUSE, J. J.; HEENEY, M.M. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Disease: Efficacy, Barriers, Toxicity, and Management in Children. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 59, p. 365–371, 2012.

VANNI, D. S. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.

WALLACE, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, supl. 1, p. 5-9, 2005.

WATSON, J. et al. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 215, n. 4, p. 419-423, 1948.

WEBER, A. et al. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: New pharmacological opportunities due to related binding site recognition. **J. Med. Chem.** v.46, p.550-557, 2004.

WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J. Med. Chem.** v.47, n.6, p.1303-1312, 2004.

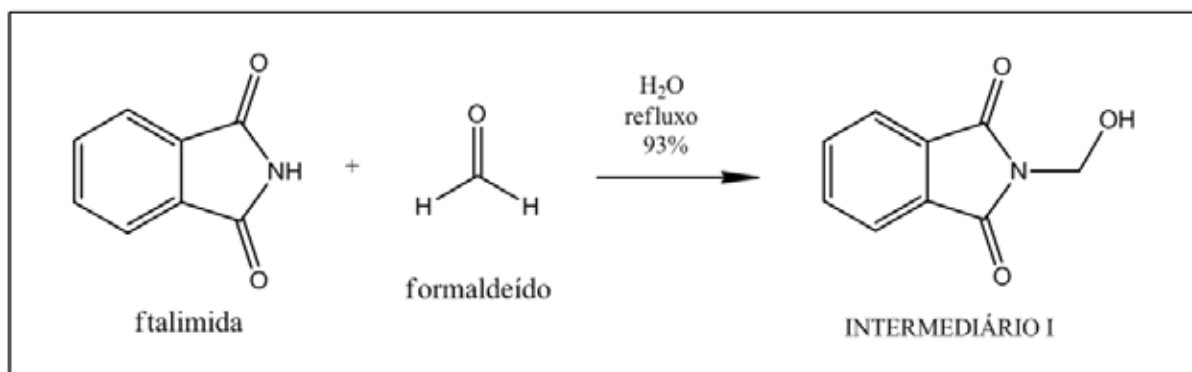
WILLIAMS, N. T. et al. Negative epistasis between the malaria protective effects of α^+ thalassemia and the sickle cell trait. **Nature Gen.**, v.37, n.11, 2005.

WHO. Working group – Hereditary anemias: genetic basis, clinical features, diagnosis and treatment. **Bull WHO**, v.60, p.643-660, 1982.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. Hemoter.**, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

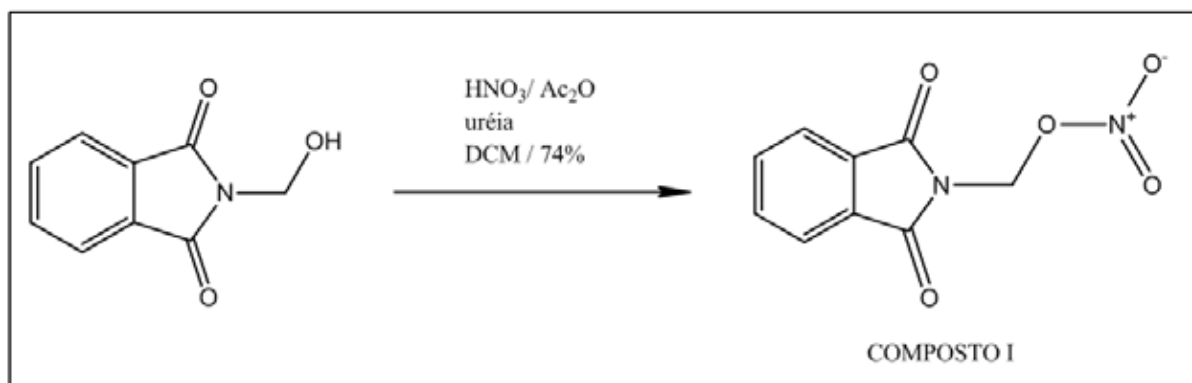
APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE

1A. Síntese do Intermediário I (SANTOS, 2007).



Em um balão de 250 mL de fundo redondo, adicionou-se 25g de ftalimida (0,17 mol), 16,2 g de formol (0,2 mol; 14,7 mL de solução 37% aldeído fórmico com densidade = 1,10 g/mL) e 90 mL de água destilada. Utilizando condensador de refluxo, aqueceu-se por cerca de 1 hora até obter uma solução límpida. Filtrou-se a solução a quente através de papel de filtro pregueado, utilizando banho de aquecimento para o funil. O produto cristalizou, após resfriamento externo através de banho de gelo e água. Os cristais obtidos foram filtrados em funil de büchner. Lavou-se com água gelada, e o produto obtido foi seco em estufa a 50°C para obter 28 g (93%) de cristais de cor branca e faixa de fusão entre 142-145°C ($C_9H_7NO_3$; PM= 177,16g/mol).

2A. Síntese do Composto I (SANTOS, 2007).

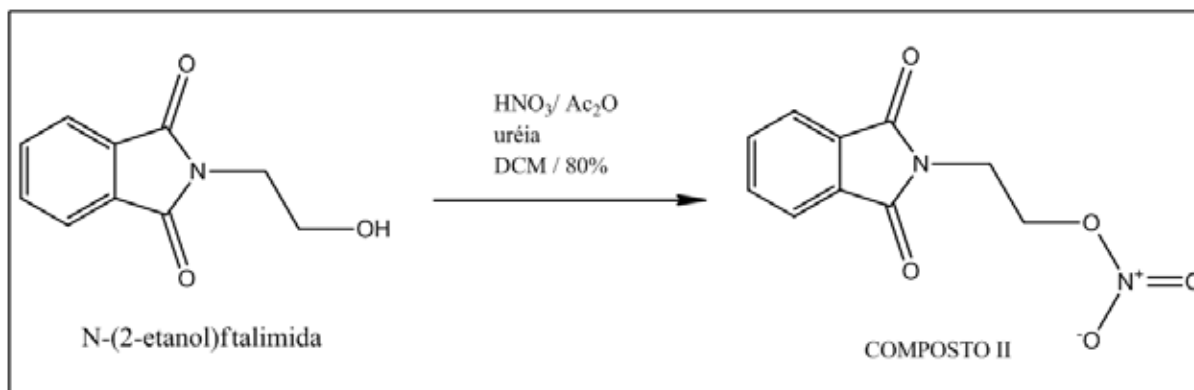


Em um balão de 125 mL adicionou-se 0,5 g (2,82 mmol) do composto obtido na reação descrita no item 1A e 17 mL de diclorometano (DCM). Após solubilização do produto adicionou-se 0,0062 g (0,103 mmol) de uréia. A mistura reacional foi resfriada a 0°C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em béquer de 0,42 mL HNO_3 (9,56 mmol) e 1,16 mL (10,44 mmol) de anidrido acético e 3 mL de DCM. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (Fase móvel: 100% DCM).

Após esse tempo reacional, foram adicionados ao meio 40 mL de DCM e 30 mL de água/gelo. A mistura foi vertida para um funil de separação, onde se recolheu a fase orgânica, que foi lavada mais 3 vezes com aproximadamente 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para obtenção de 0,475 g (74%) do produto desejado, como sólido branco com faixa de fusão entre 75-77°C ($\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5$; PM= 222,154g/mol).

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

3A. Síntese do Composto II (SANTOS, 2007).



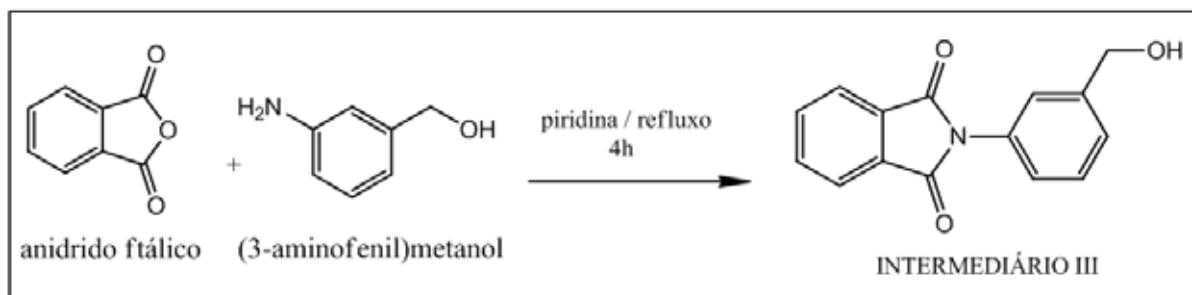
Em um balão de 125 mL adicionou-se 0,5 g do composto *N*-(2-etanol)ftalimida (2,61 mmol) – obtido comercialmente - e 17 mL de DCM. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0062 g (0,103 mmol) de uréia. A mistura reacional foi resfriada a 0 °C em banho de gelo.

Após resfriamento, foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em béquer de 0,42 mL HNO₃ (9,56 mmol) e 1,16 mL (10,44 mmol) de anidrido acético e 3 mL de DCM. Após a adição dos reagentes a reação é mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (Fase móvel: 100% DCM).

Após esse tempo reacional, foram adicionados ao meio 40 mL de DCM e 30 mL de água/gelo. Essa mistura foi vertida para um funil de separação, onde se recolheu a fase orgânica, que foi lavada mais 3 vezes com aproximadamente 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para obtenção de 0,494 g (80%) do produto desejado, como sólido branco com faixa de fusão entre 87-89°C (C₁₀H₈N₂O₅; PM= 236,181g/mol).

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

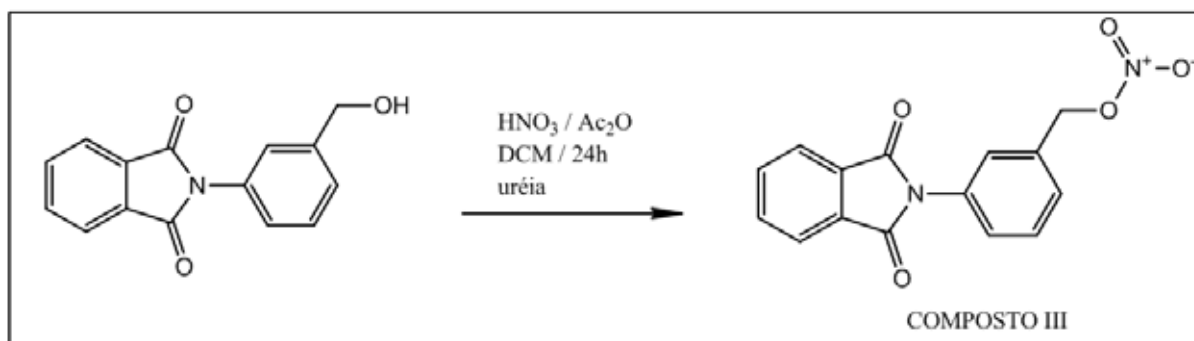
4A. Síntese do intermediário III (SANTOS, 2007).



Em um balão de 50 mL conectado em condensador de refluxo, adicionou-se 0,3g de anidrido ftálico (2,02 mmol) e 0,270 g de (3-aminofenil)metanol (2,02 mmol) em 10 mL de piridina. A reação foi mantida a 140°C durante 4 horas, até que a cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% diclorometano). Após resfriamento não houve precipitação do produto. Então, adicionou-se ao meio 50 mL de DCM, e realizaram-se lavagens sucessivas com sulfato de cobre 10% até eliminação da piridina. A fase orgânica foi lavada duas vezes com aproximadamente 30 mL de água, adicionou-se sulfato de sódio como agente secante e procedeu-se uma filtração simples. Após evaporação a pressão reduzida, obteve-se o produto desejado. (C₁₅H₁₁NO₃; PM= 253,25g/mol).

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

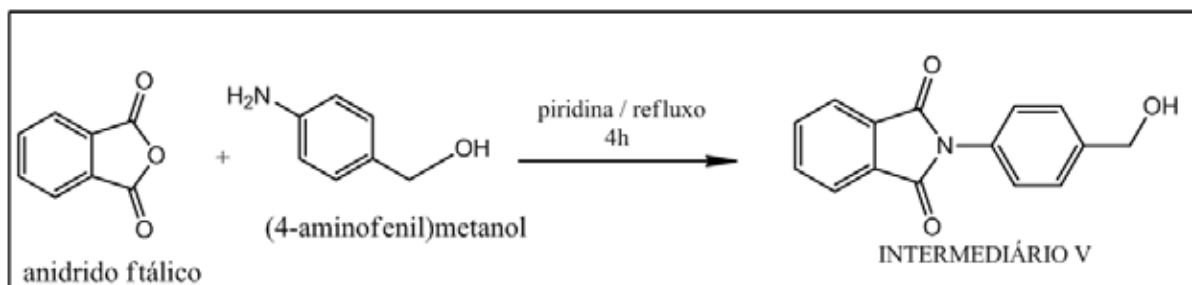
5A. Síntese do Composto III (SANTOS, 2007).



Em um balão de 10 mL adicionou-se 75 mg do derivado ftalimídico obtido no item 4A (0,296 mmol) em 3 mL de DCM. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0013 g (0,022 mmol) de uréia. A mistura reacional foi resfriada a 0 °C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em um béquer de 0,1 mL HNO₃ (2,39 mmol) e 0,2 mL (2,09 mmol) de anidrido acético e 2 mL de diclorometano. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (Fase móvel:100% DCM).

Após esse tempo reacional, foi adicionado ao meio 20 mL de DCM e 15 mL de água/gelo. Essa mistura foi vertida para um funil, onde se recolheu a fase orgânica, que foi então lavada mais três vezes com aproximadamente 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para fornecer o produto desejado (C₁₅H₁₀N₂O₅; PM= 298,25g/mol).

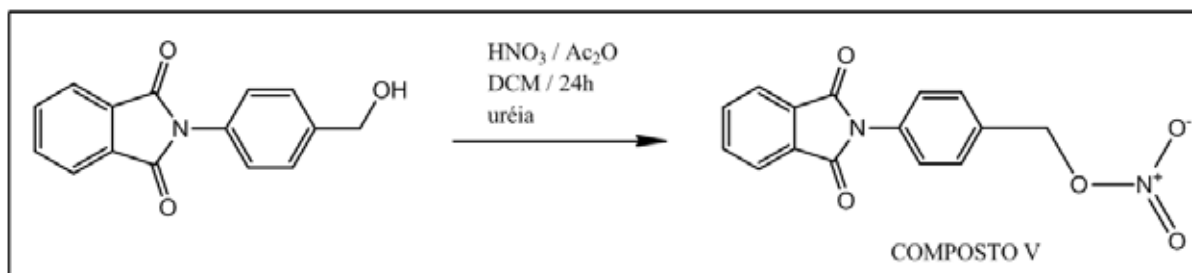
Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de DCM.

6A. Síntese do intermediário Intermediário V (SANTOS, 2007).

Em um balão de 50 mL conectado em condensador de refluxo, adicionou-se 0,3g de anidrido ftálico (2,02 mmol) e 0,270 g de (4-aminofenil)metanol (2,02 mmol) em 10 mL de piridina. A reação foi mantida a 140°C durante 4 horas, até que a cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% diclorometano). Após resfriamento não houve precipitação do produto. Então, adicionou-se ao meio 50 mL de DCM, e realizaram-se lavagens sucessivas com sulfato de cobre 10% até eliminação da piridina. A fase orgânica foi lavada duas vezes com aproximadamente 30 mL de água, adicionou-se sulfato de sódio como agente secante e procedeu-se uma filtração simples. Após evaporação a pressão reduzida, obteve-se o produto desejado. ($C_{15}H_{11}NO_3$; PM= 253,25g/mol).

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

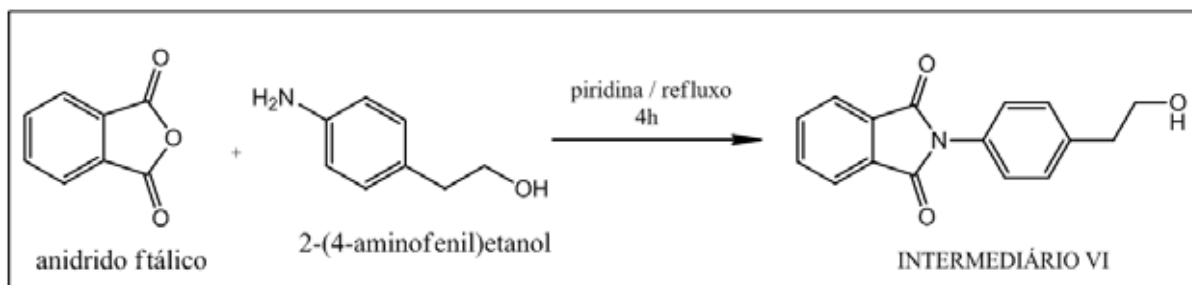
7A. Síntese do Composto V (SANTOS, 2007).



Em um balão de 10 mL adicionou-se 75 mg do derivado ftalimídico obtido no item 6A (0,296 mmol) em 3 mL de DCM. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0013 g (0,022 mmol) de uréia. A mistura reacional foi resfriada a 0 °C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em um béquer de 0,1 mL HNO₃ (2,39 mmol) e 0,2 mL (2,09 mmol) de anidrido acético e 2 mL de DCM. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (Fase móvel: 100% DCM).

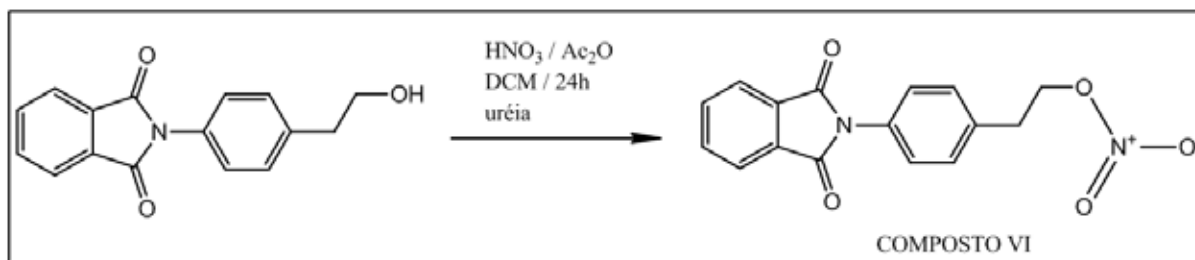
Após esse tempo reacional, foi adicionado ao meio 20 mL de DCM e 15 mL de água/gelo. Essa mistura foi vertida para um funil, onde se recolheu a fase orgânica, que foi então lavada mais três vezes com aproximadamente 20 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para fornecer o produto desejado (C₁₅H₁₀N₂O₅; PM= 298,25g/mol).

Em condições onde se observou a presença de traços do reagente como impureza, foi realizada purificação por coluna cromatográfica de sílica gel usando como fase móvel 100% de DCM. A eficiência desta separação, quando necessária, foi em torno de 54%.

8A. Síntese do Intermediário VI (SANTOS, 2007).

Em um balão de 50 mL conectado em condensador de refluxo, adicionou-se 0,3g de anidrido ftálico (2,02 mmol) e 0,277 g da 2-(4-aminofenil)etanol (2,02 mmol) em 10 mL de piridina. A reação foi mantida a 140°C durante 4 horas, até que a cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (eluente: 100% DCM). Após resfriamento não houve precipitação do produto. Então, foi adicionado ao meio 50 mL de DCM, e realizado lavagens sucessivas com sulfato de cobre 10% para eliminação da piridina. A fase orgânica foi lavada duas vezes com aproximadamente 30 mL de água, e adicionado sulfato de sódio. Após filtração e concentração à pressão reduzida, se obteve 0,4 g (74%) de sólido verde cristalino com faixa de fusão entre 172°-175°C ($C_{16}H_{13}NO_3$; PM= 267,28g/mol).

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

9A. Síntese Composto VI (SANTOS, 2007).

Em um balão de 10 mL adicionou-se 0,135 g (0,561 mmol) do produto obtido no item 8A, em 3 mL de DCM. Após solubilização do produto adicionou-se 0,0013 g de uréia.

Essa mistura reacional foi resfriada a 0°C em banho de gelo. Após resfriamento foi adicionado gota a gota uma mistura preparada em um béquer de 0,1 mL HNO₃ (2,27 mmol) e 1,16 mL (1,91 mmol) de anidrido acético e 2 mL de DCM. Após a adição dos reagentes a reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio, até que o acompanhamento realizado por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (Fase Móvel: 100% DCM).

Após esse tempo reacional, foram adicionados ao meio 20 mL de DCM e 10 mL de água/gelo. A mistura foi vertida para um funil de separação, onde se recolheu a fase orgânica, que foi lavada mais 3 vezes com cerca de 10 mL de solução saturada de bicarbonato sódico. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para obtenção de 0,120 g (76%) do produto desejado, como sólido amarelo com faixa de fusão entre 141-144°C (C₁₆H₁₂N₂O₅; PM= 312,23g/mol).

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

APÊNDICE B - ESPECTROS DE RMN DE ^1H E INFRAVERMELHO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

1B. Intermediário I

Figura 1B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário I (CDCl_3).

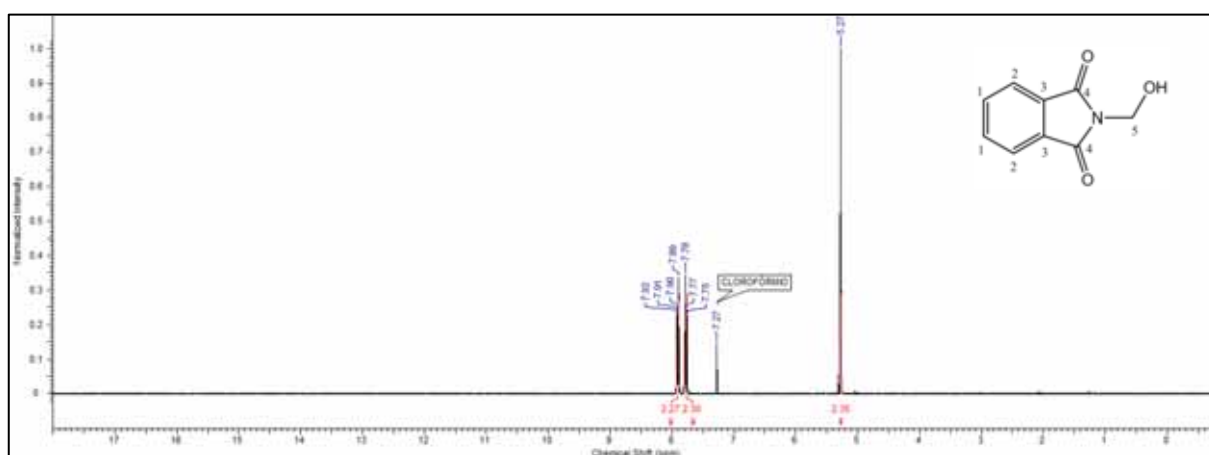


Figura 2B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário I – Ampliação na região aromática (CDCl_3).

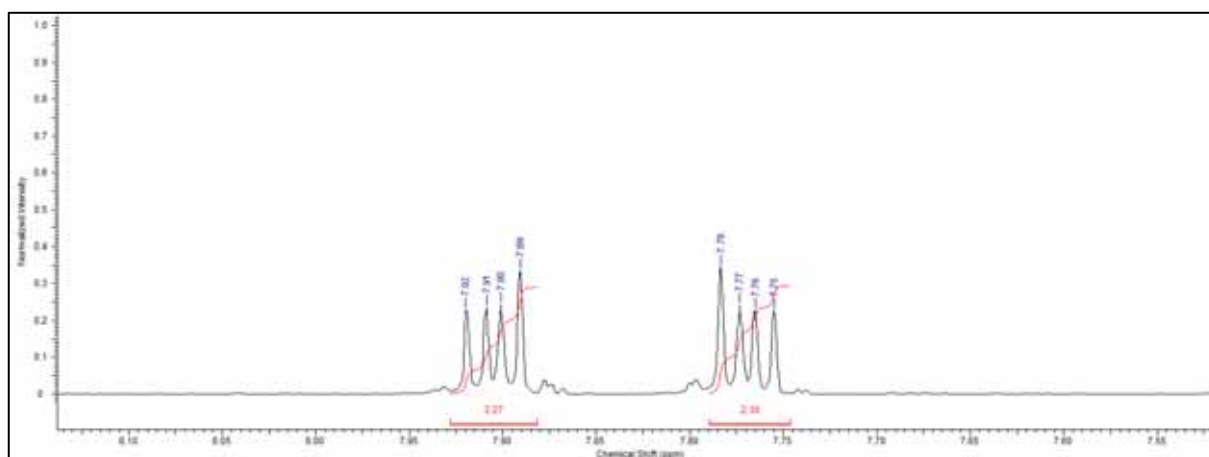
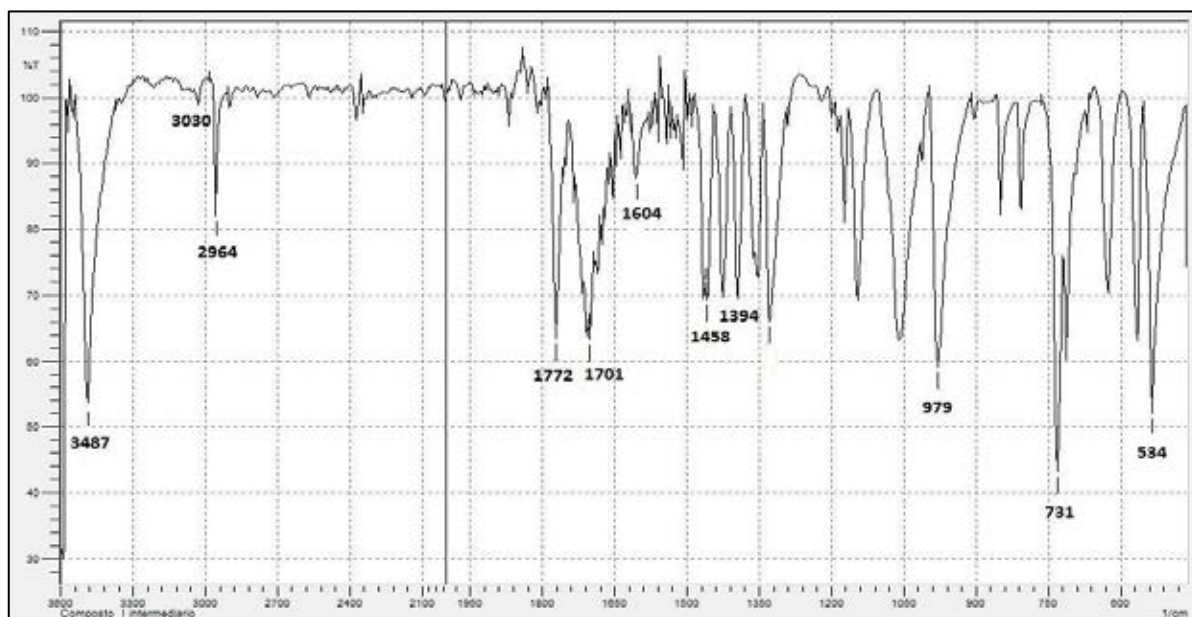


Figura 3B. Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário I.



2B. Composto I

Figura 4B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto I (CDCl_3).

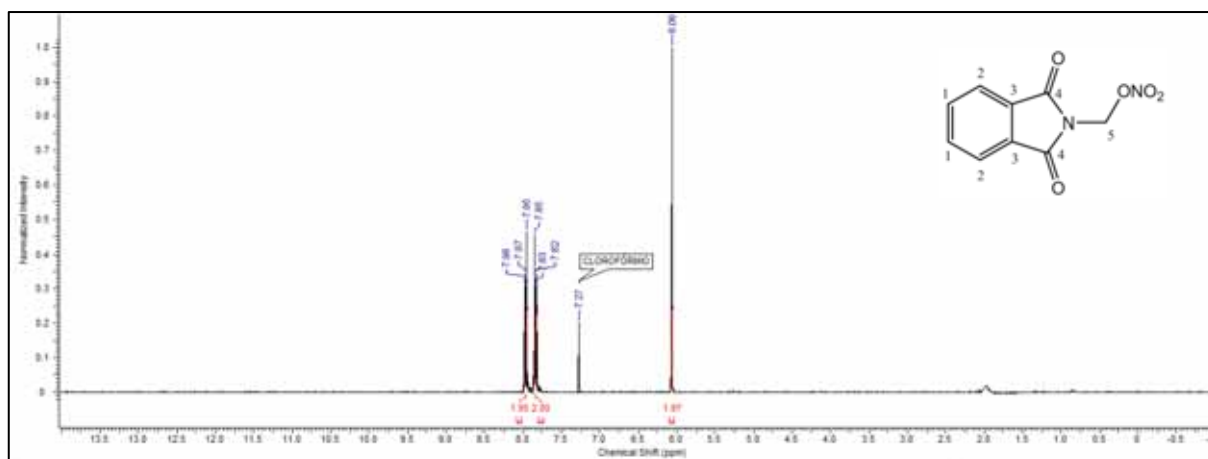


Figura 5B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto I – Ampliação na região aromática (CDCl_3).

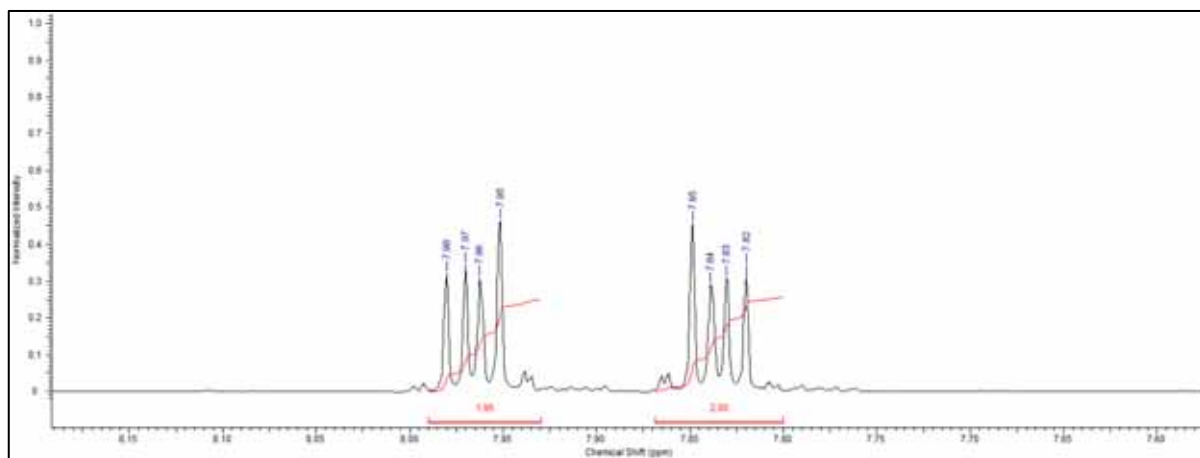
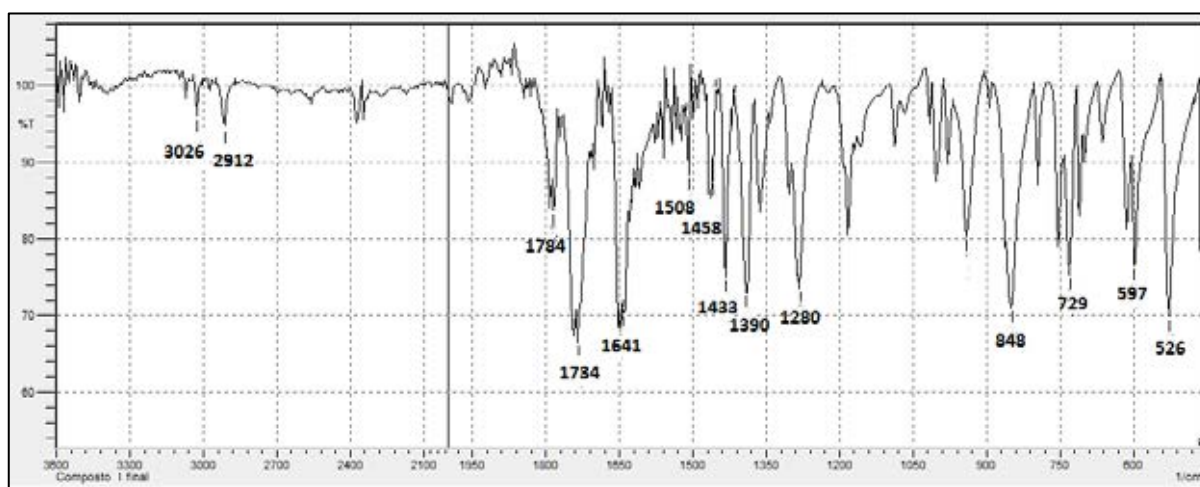


Figura 6B. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto I.



3B. Composto II

Figura 7B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto II (CDCl_3).

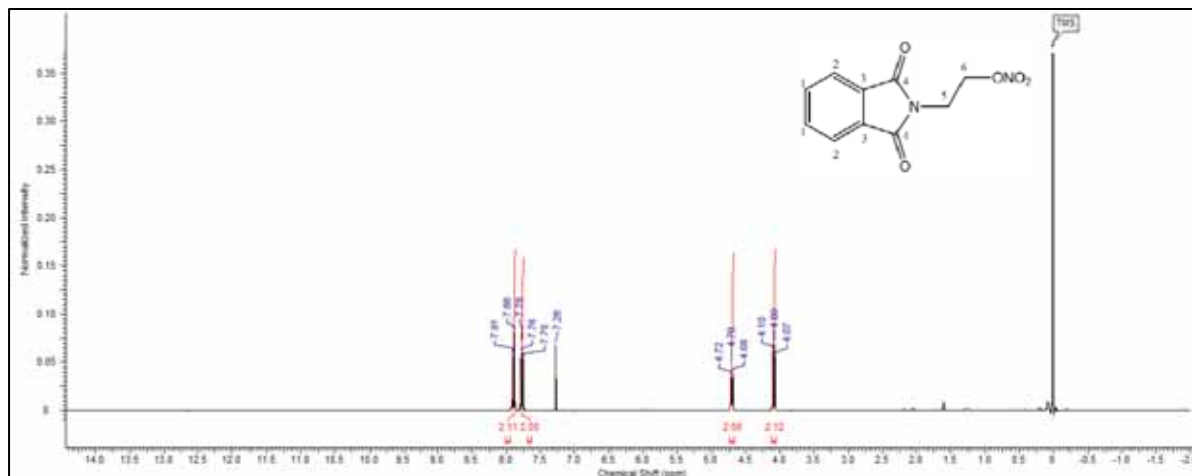


Figura 8B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto II – Ampliação da região aromática (CDCl_3).

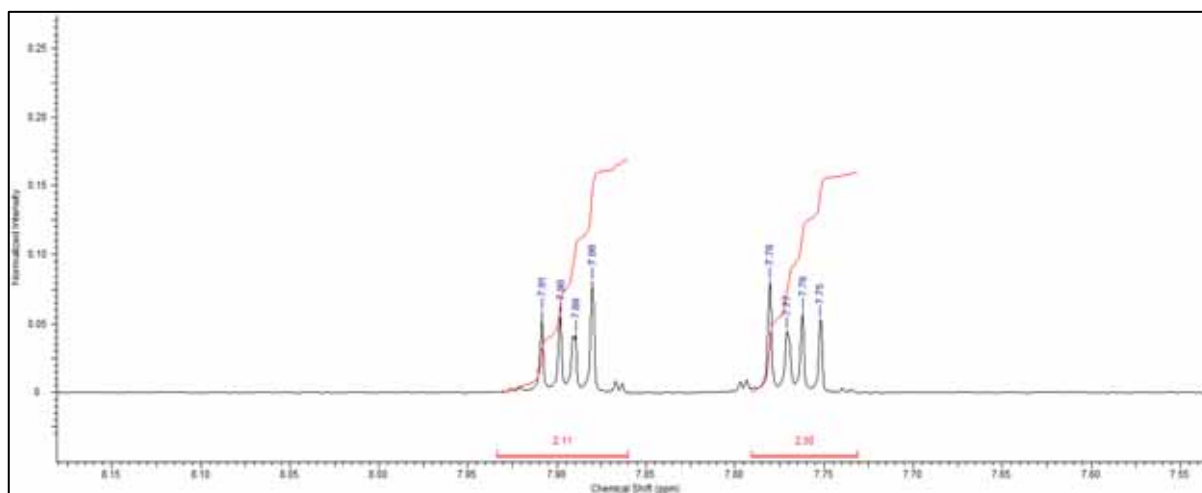


Figura 9B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto II – Ampliação na região dos tripletos (CDCl_3).

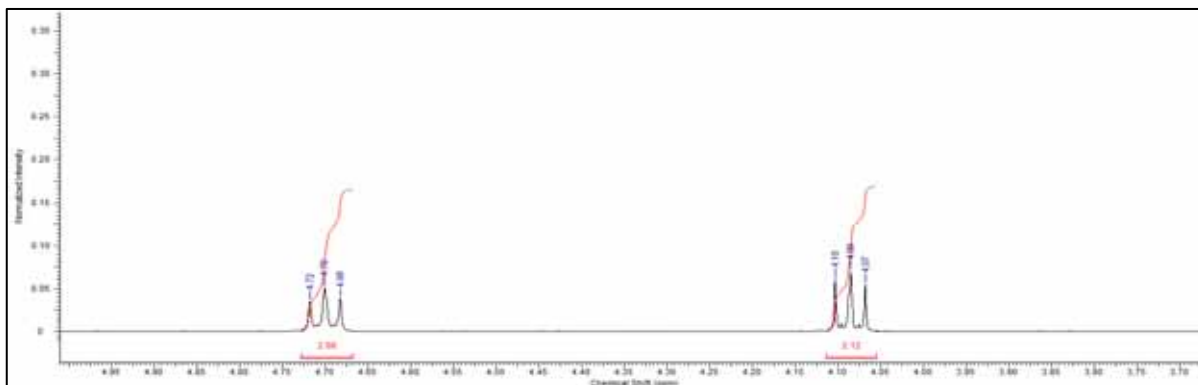
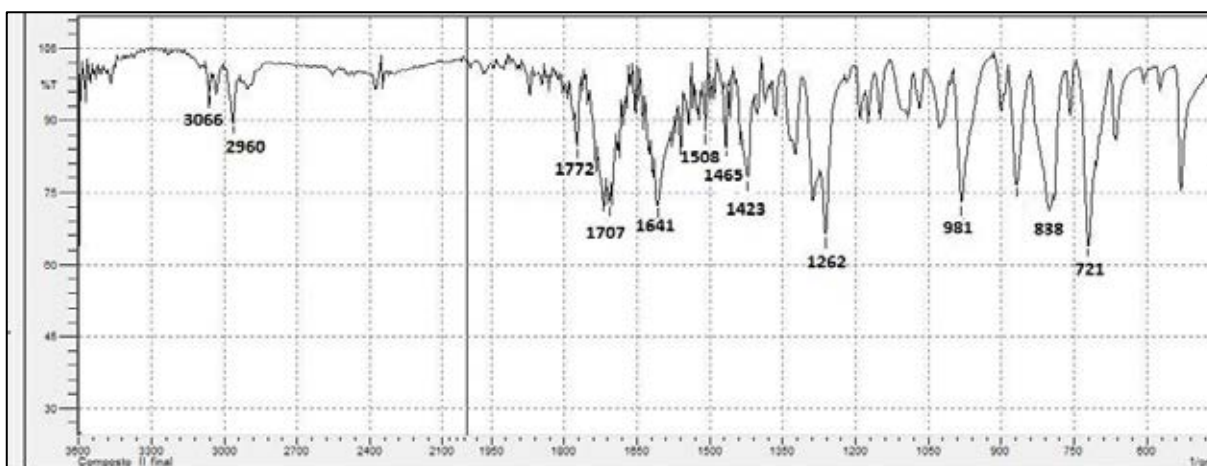


Figura 10B. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto II.



4B. Intermediário III

Figura 11B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário III (CDCl₃)

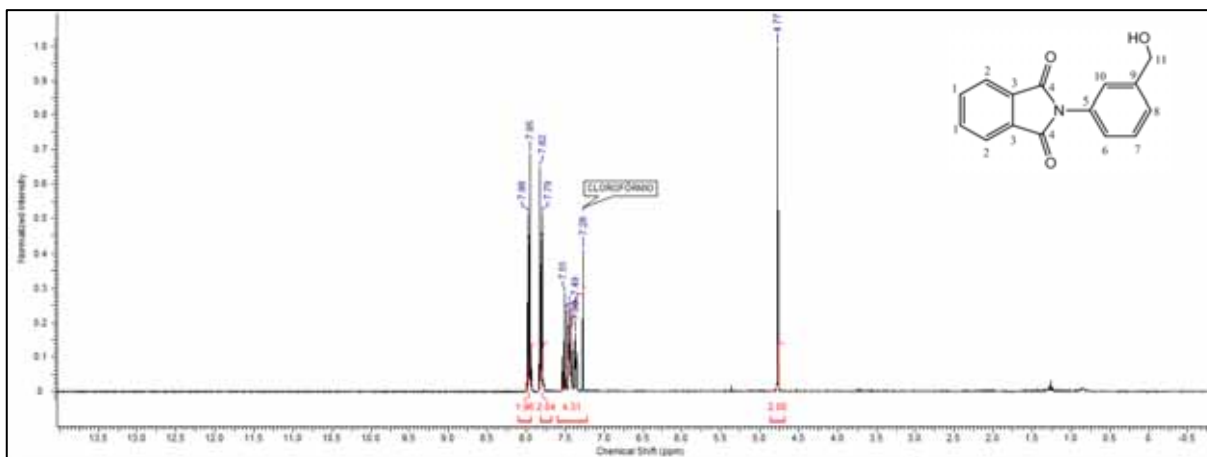


Figura 12B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário III – Ampliação da região aromática (CDCl₃).

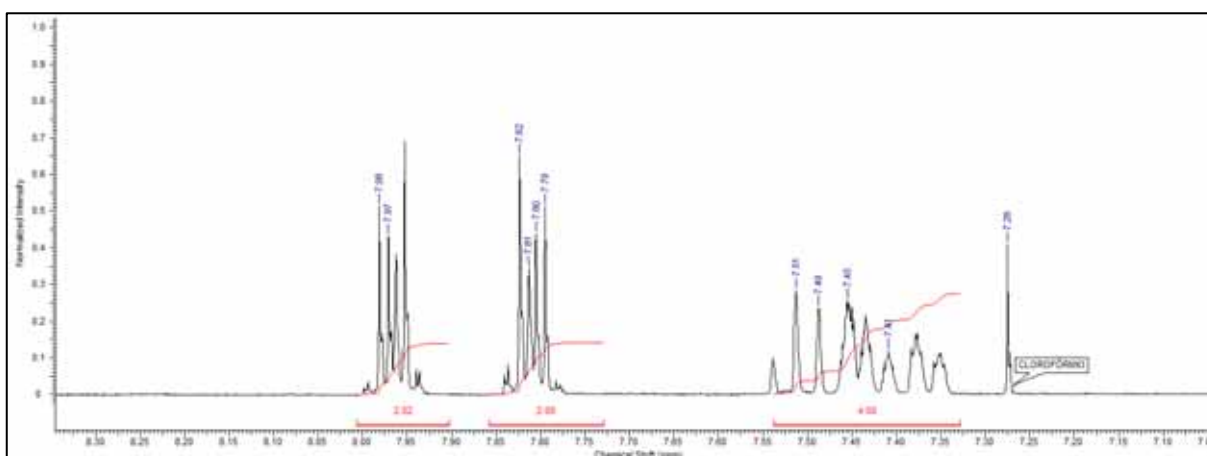
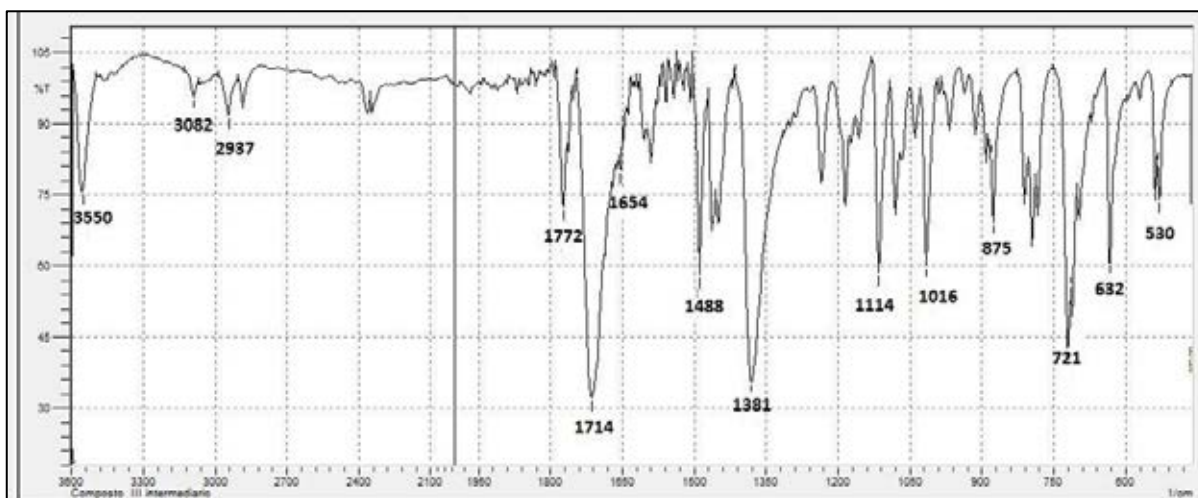


Figura 13B. Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário III.



5B. Composto III

Figura 14B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto III (CDCl₃).

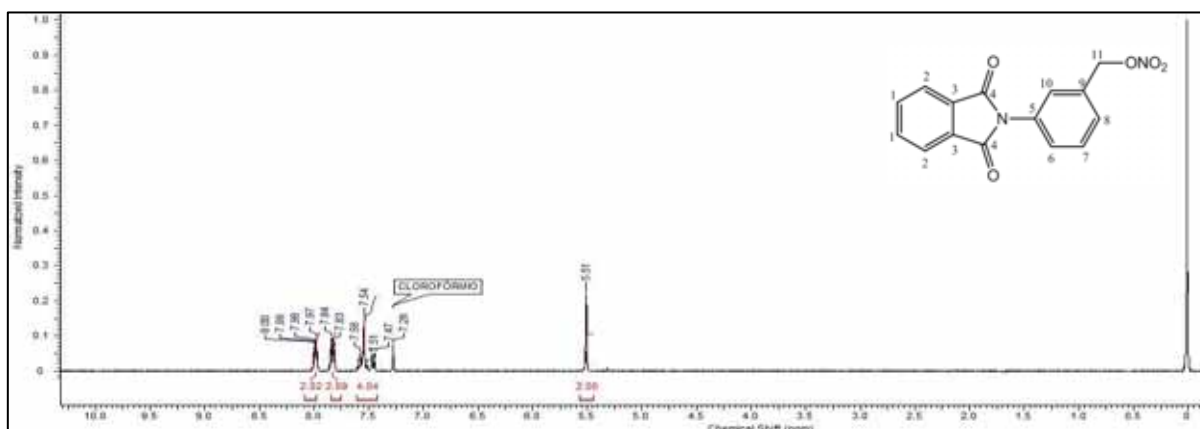


Figura 15B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto III – ampliação na região aromática (CDCl_3).

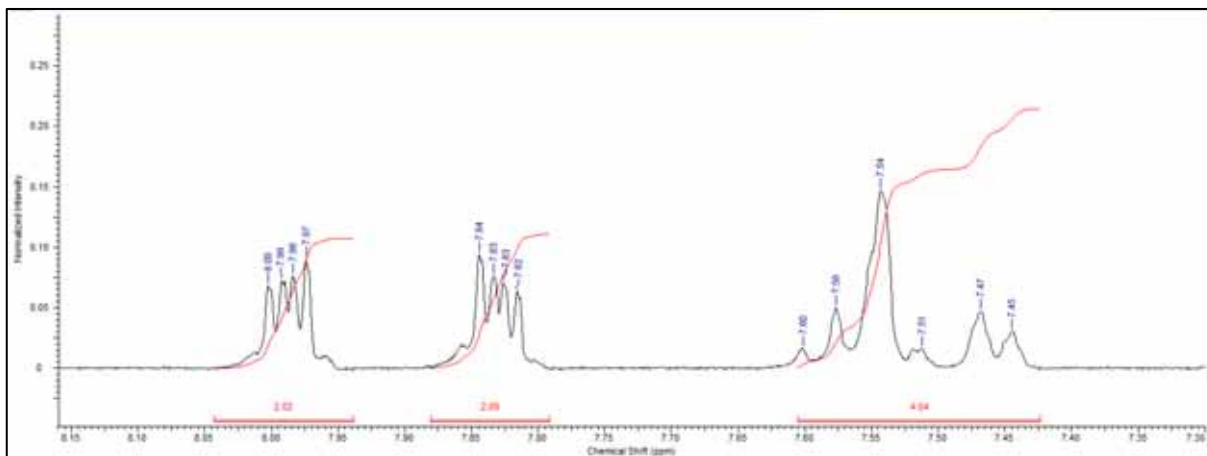
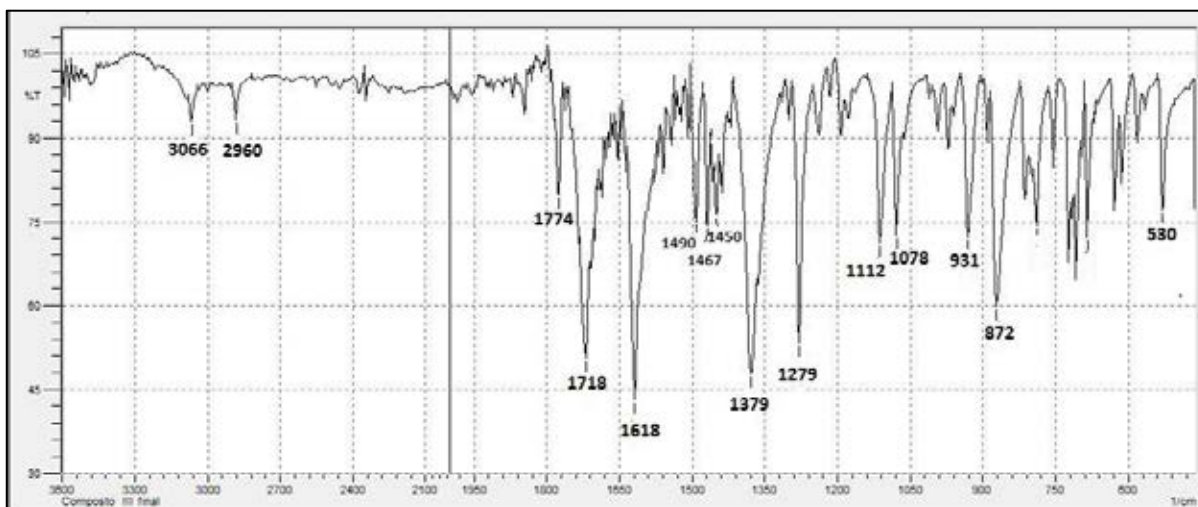


Figura 16B. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto III.



6B. Intermediário V

Figura 17B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário V ((CD₃)₂SO)

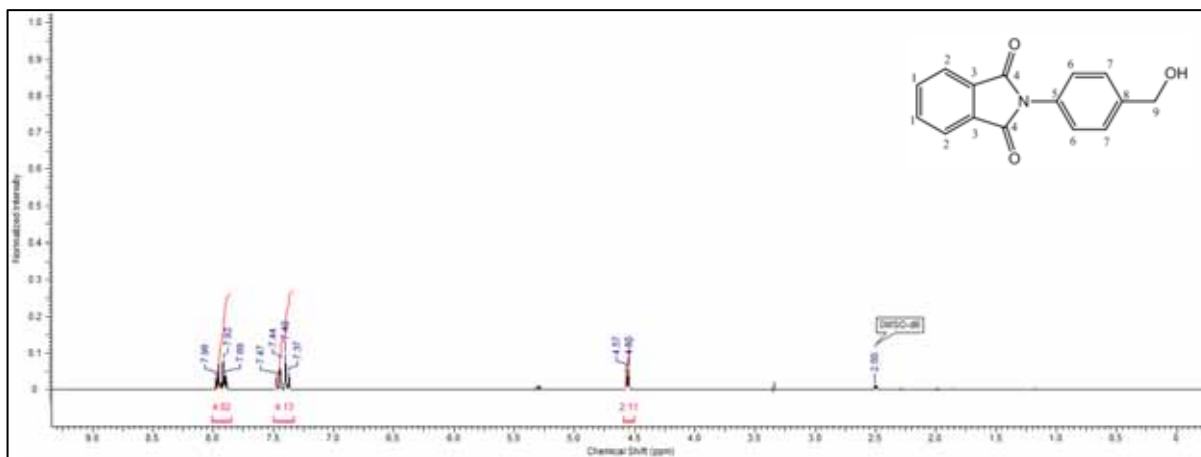


Figura 18B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário V – Ampliação na região aromática ((CD₃)₂SO).

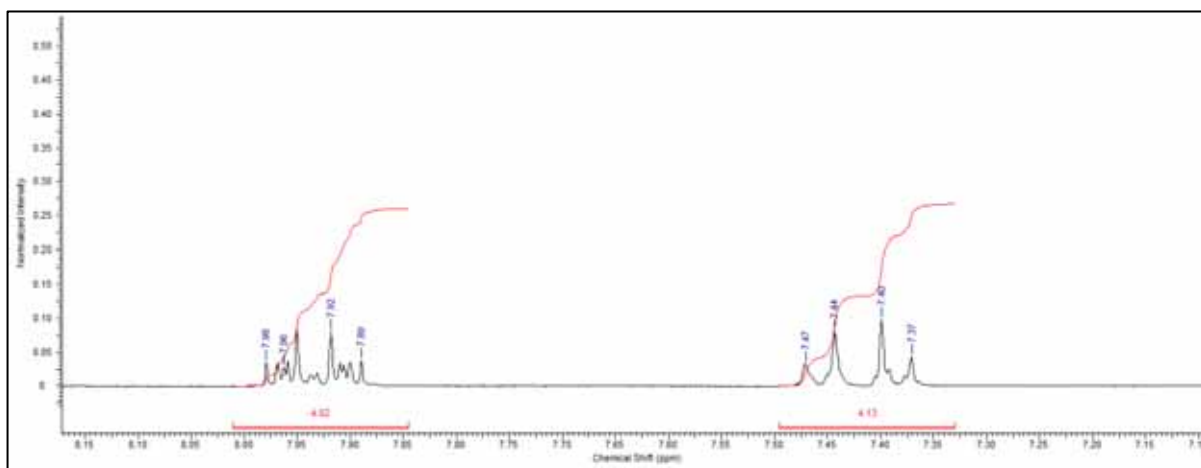
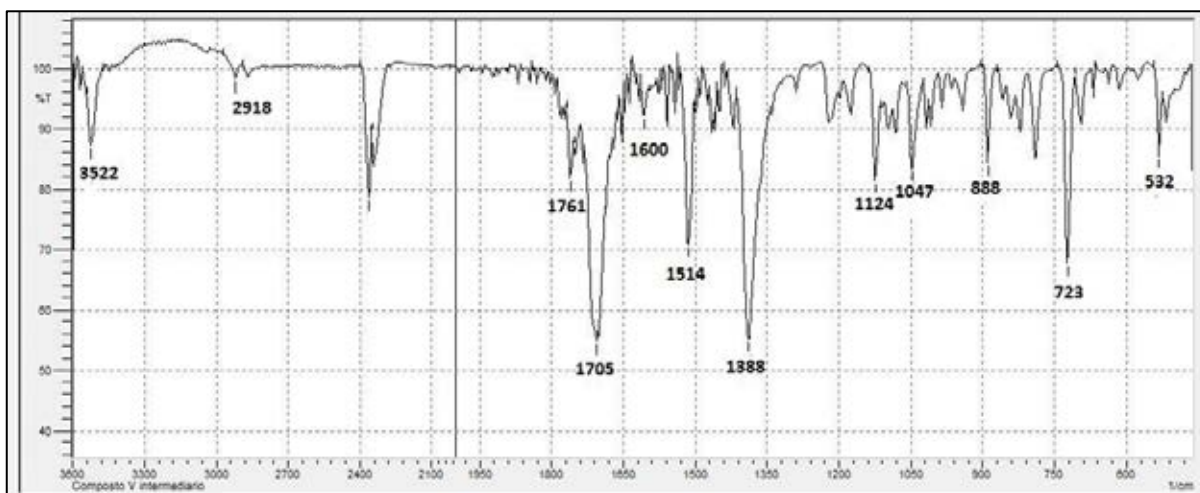


Figura 19B. Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário V.



7B. Composto V

Figura 20B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto V ((CD₃)₂SO).

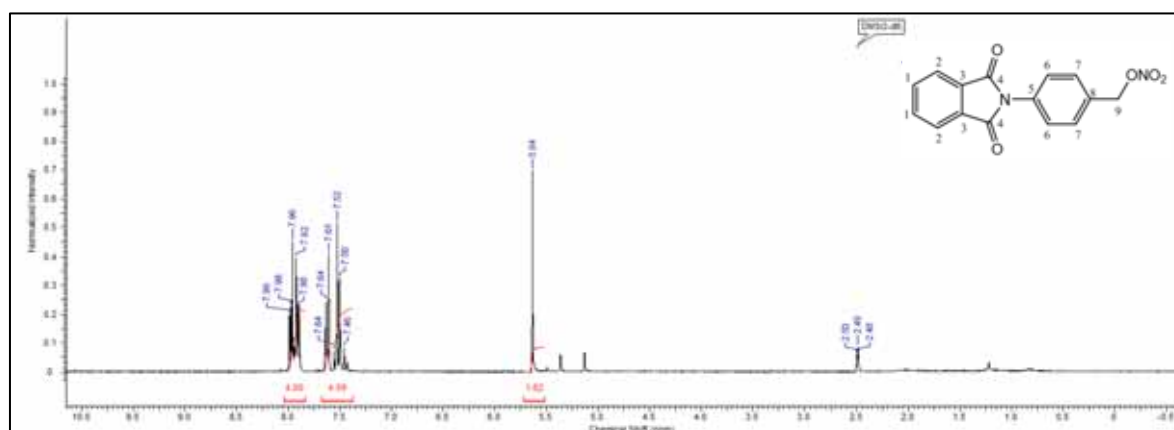


Figura 21B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto V ((CD₃)₂SO).

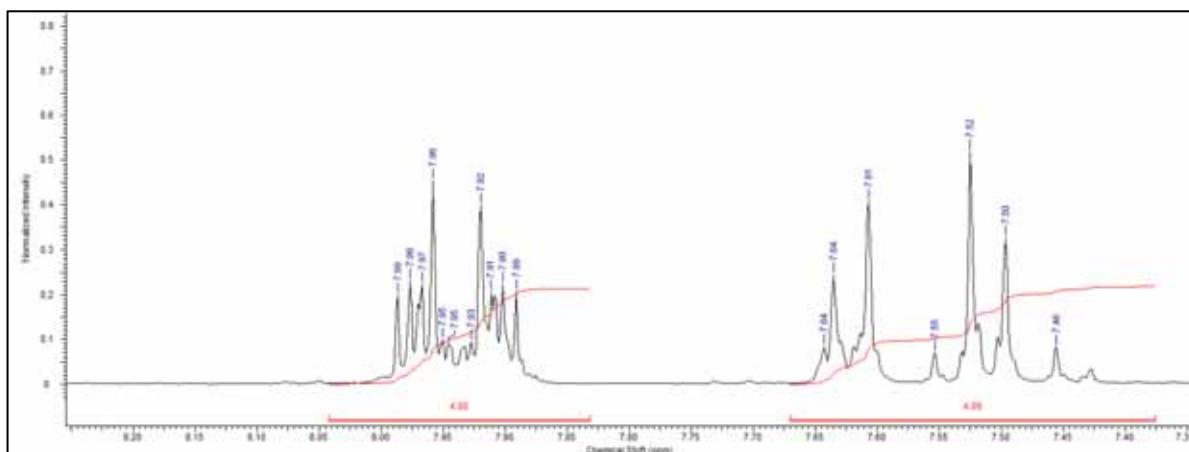
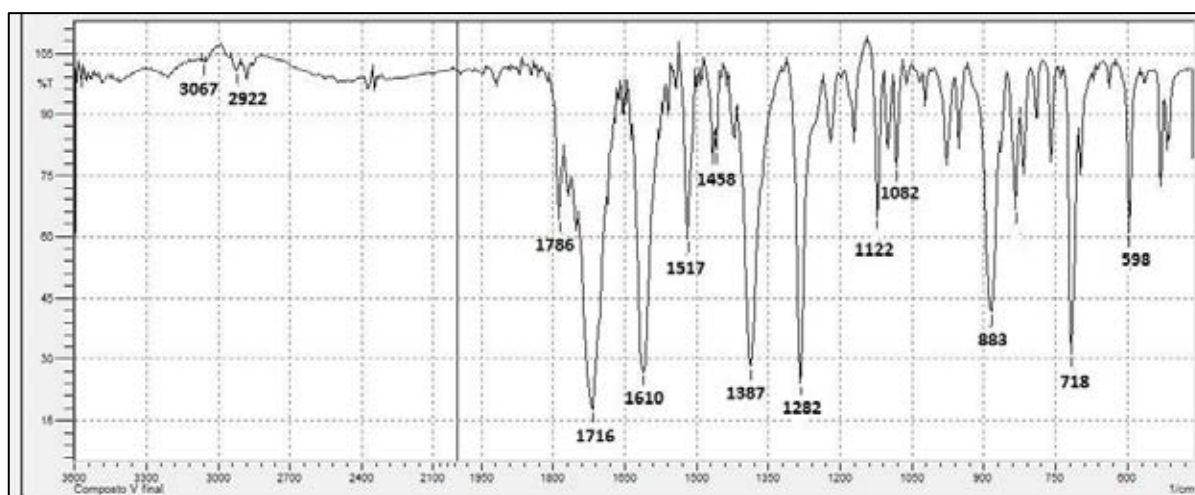


Figura 22B. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto V.



8B. Intermediário VI

Figura 23B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário VI (CDCl_3).

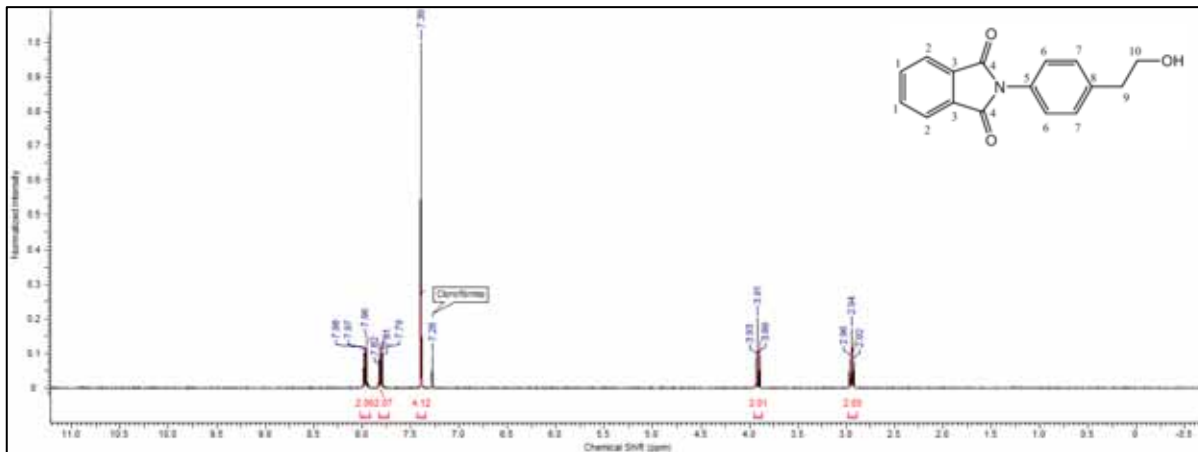


Figura 24B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário VI – Ampliação da região aromática (CDCl_3).

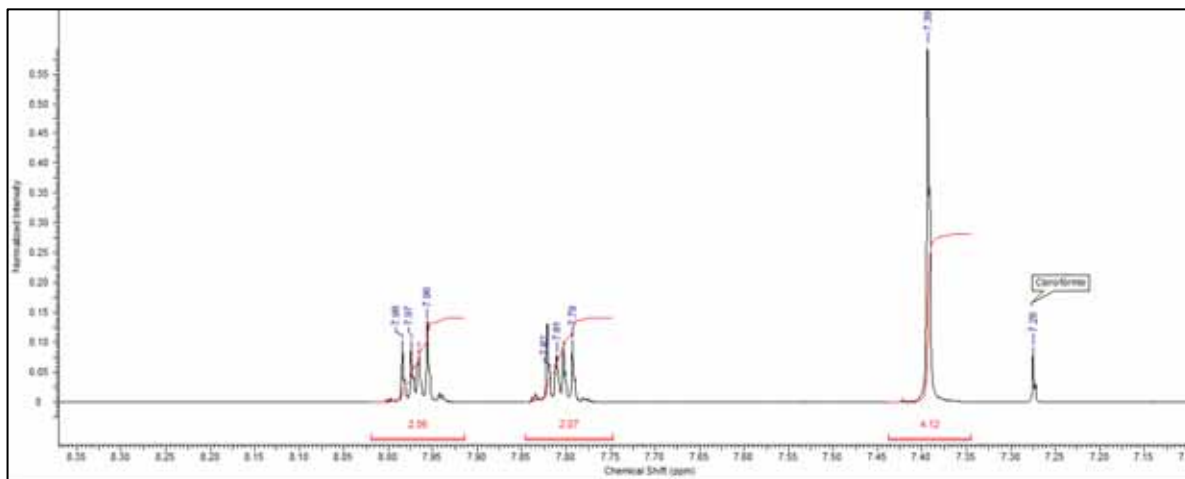


Figura 25B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do intermediário VI - Ampliação na região dos tripletos (CDCl_3).

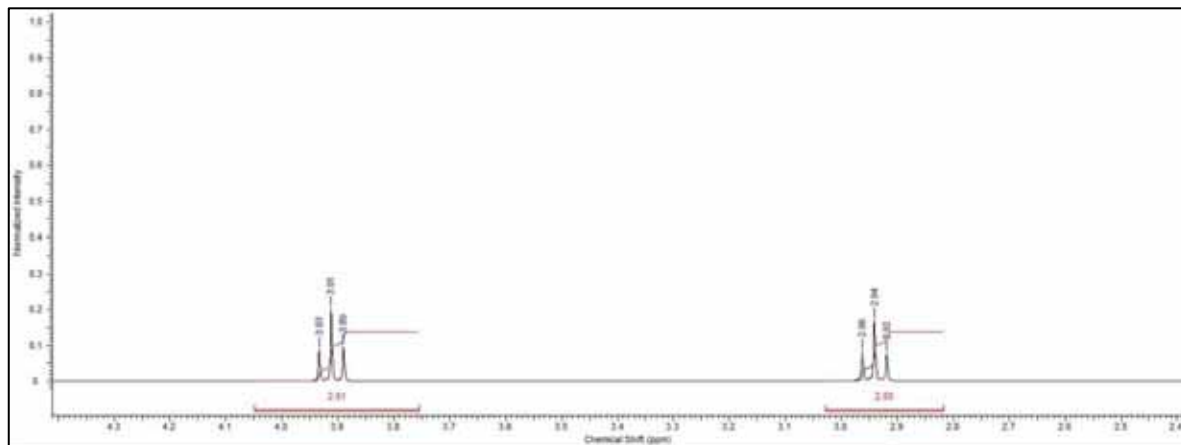
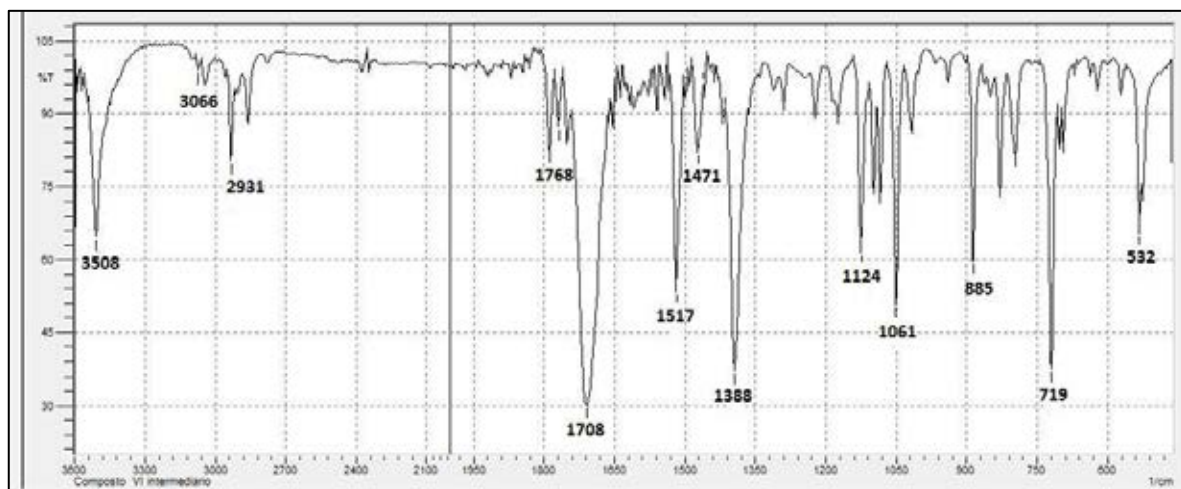


Figura 26B. Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário VI.



9B. Composto VI

Figura 27B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto VI (CDCl_3).

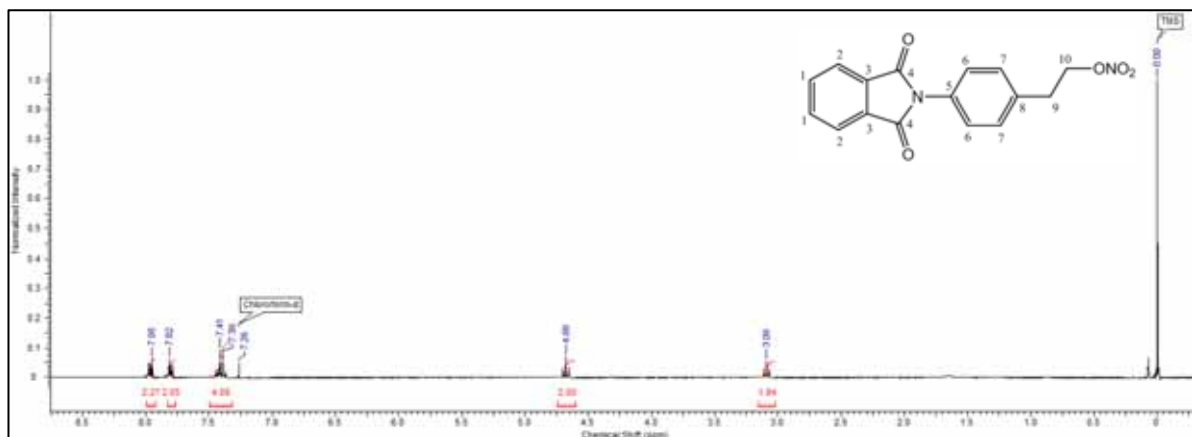


Figura 28B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto VI – Ampliação na região aromática (CDCl_3).

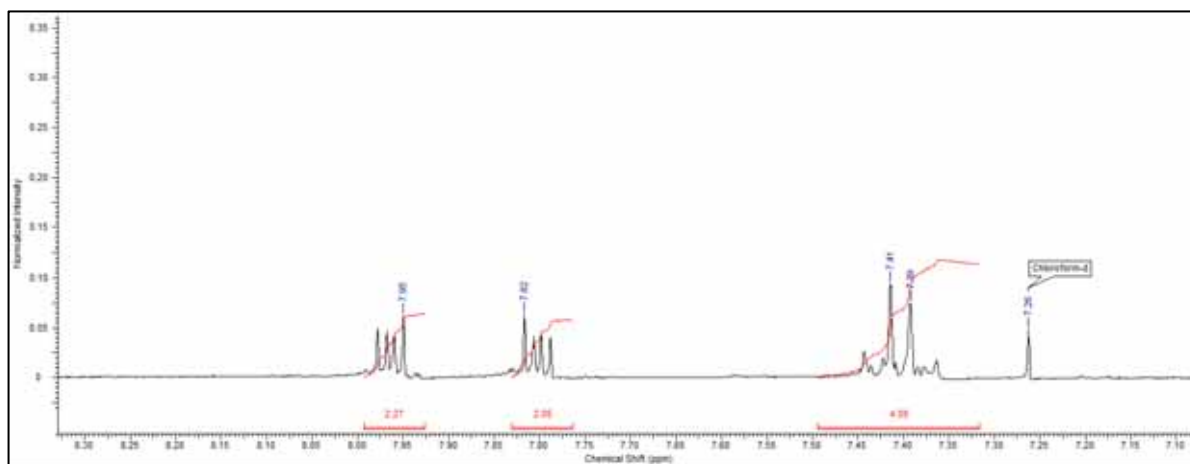


Figura 29B. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto VI – Ampliação na região dos tripletos (CDCl_3).

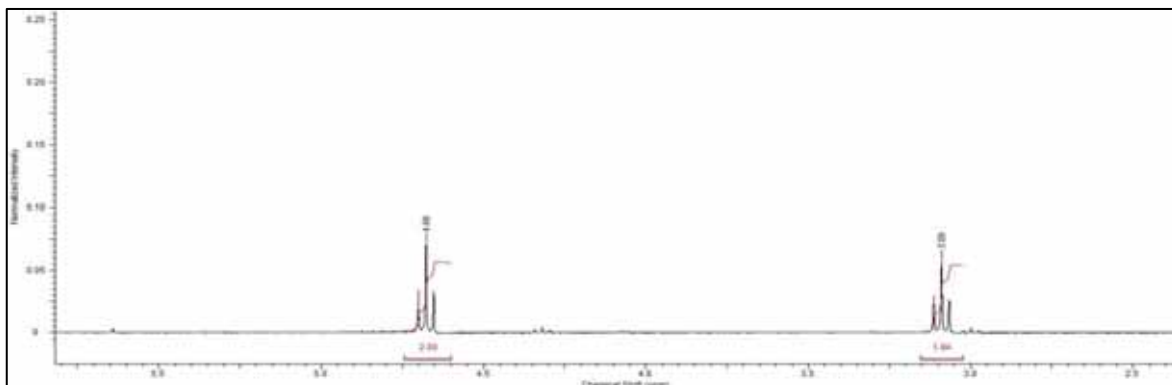
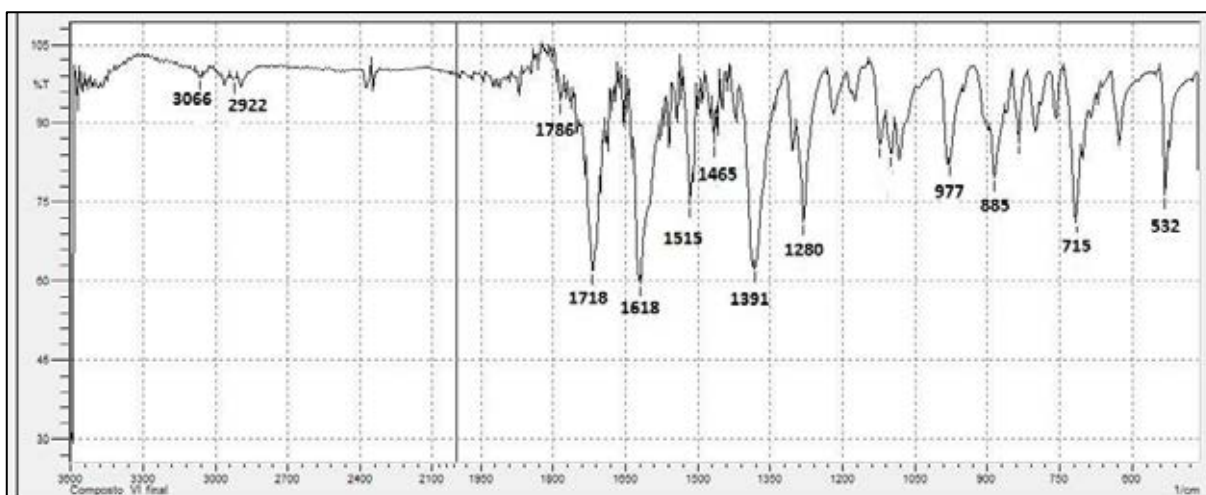


Figura 30B. Espectro de absorção na região do infravermelho do composto VI.



ANEXO A – PARECER Nº 67/2013 – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 37/2013

Interessada: ISABELA JUNQUEIRA DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Projeto: Avaliação farmacológica de candidatos a fármacos para tratamento da anemia falciforme

Parecer nº 67/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 11 de dezembro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação farmacológica de candidatos a fármacos para tratamento da anemia falciforme", apresentado pela graduanda ISABELA JUNQUEIRA DE OLIVEIRA, sob orientação do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, 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 MARÇO de 2015 em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de dezembro de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO B – PARECER Nº 68/2013 - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 38/2013

Interessada: ISABELA JUNQUEIRA DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Projeto: Avaliação farmacológica de candidatos a fármacos para tratamento da anemia falciforme

Parecer nº 68/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 11 de dezembro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação farmacológica de candidatos a fármacos para tratamento da anemia falciforme", apresentado pela graduanda ISABELA JUNQUEIRA DE OLIVEIRA, sob orientação do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, 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 MARÇO de 2015 em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de dezembro de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Isabela Junqueira de Oliveira

De acordo,

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
(Orientador)

Araraquara, 20 de outubro de 2014.