

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PROTÓTIPOS
CANDIDATOS À FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DOS SINTOMAS DA
ANEMIA FALCIFORME**

JEAN LEANDRO DOS SANTOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Lúcia Moreira Lima

ARARAQUARA - SP

2009

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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PROTÓTIPOS
CANDIDATOS À FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DOS SINTOMAS DA
ANEMIA FALCIFORME**

JEAN LEANDRO DOS SANTOS

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

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

ARARAQUARA – SP

2009

Ficha Catalográfica

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

Santos, Jean Leandro dos

S237s Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme / Jean Leandro dos Santos. – Araraquara, 2009.

129 f.

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

Orientadora: Chung Man Chin

Co-orientadora: Lídia Moreira Lima

. 1. Anemia falciforme. 2. Óxido nítrico. 3. Furoxanos. 4. Ftalimidas. 5. Modificação molecular. I. Chung, Man Chin, orient. II. Lima, Lídia Moreira, co-orient. III. Título.

CDD: 615

CAPES: 40300005

Jean Leandro dos Santos

CANDIDATO: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

TÍTULO DA TESE:

Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 12/03/2009, considera o candidato:

(☒) APROVADO

(☐) REPROVADO

1) Presidente: (Profa. Dra. Chung Man Chin) _____

2) Examinador: (Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado) _____

3) Examinador: (Profa. Dra. Márcia da Silva) _____

4) Examinador: (Profa. Dr. Agnaldo Bruno Chies) _____

5) Examinador: (Profa. Dra. Carolina Lanaro) _____

Jean Leandro dos Santos

"Nada no mundo consegue tomar o lugar da persistência. O talento não consegue; nada é mais comum que homens fracassados com talento. A genialidade não consegue; gênios não recompensados é quase um provérbio. A educação não consegue; o mundo é cheio de errantes educados. A persistência e determinação sozinhas são onípotentes."

Calvin Coolidge

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

Bertrand Russell

Este trabalho é dedicado aos meus pais

Pedro e Aparecida

AGRADECIMENTOS

A DEUS, Nossa Senhora, anjos e seres de luz que me acompanham na realização deste trabalho;

Aos meus pais, Pedro e Aparecida, pela educação responsável por minha formação pessoal e pela sabedoria em acreditar no valor do conhecimento, dando-me oportunidade para estudar;

À FAPESP, pela concessão da bolsa para manutenção e desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Dra. Chung Man Chin (UNESP- Araraquara), uma das condutoras da minha etapa de formação profissional pelo valioso incentivo. Agradeço, ainda, por ter aceitado a desafiadora proposta de inserir-se em uma nova linha de pesquisa, e pela orientação, amizade, confiança e respeito;

À Profa. Dra. Lídia Moreira Lima (LASSBio – UFRJ) pela amizade, colaboração e disponibilidade em ajudar a qualquer momento na solução das adversidades que surgiram no decorrer deste trabalho;

Ao prof. Dr. Hugo Cerecetto (Universidad de La Republica – Montevideo, Uruguai) pela incomparável forma de orientação. Agradeço ainda, os ensinamentos da química orgânica e a oportunidade dada pela realização de parte deste trabalho em seu laboratório;

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira por disponibilizar seu laboratório para aquisição dos espectros de RMN. Em especial, a aluna Elisângela Boffo pela aquisição dos espectros;

Ao Prof. Fernando F. Costa (UNICAMP) pela colaboração na realização dos ensaios em cultura de células eritroleucêmicas K562 e CD34+. Gostaria de registrar um agradecimento especial à minha amiga Carolina Lanaro, pela imensa responsabilidade na execução dos ensaios, e pela valiosa contribuição no formato final deste trabalho;

Agradecimentos

À profa. Dra. Márcia da Silva, pela amizade, carinho, respeito, e compromisso na participação e na elaboração desta versão final com sugestões sempre muito pertinentes;

Ao prof. Dr. Wagner Vilegas, pela amizade e importantes indagações que levaram a melhoria da qualidade deste trabalho;

A profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, coordenadora do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo incentivo durante toda minha carreira científica e pela minuciosa análise nas correções deste trabalho;

Ao prof. Agnaldo Chies pela contribuição na elaboração final deste e pelas sugestões e colaboração firmada na avaliação dos compostos;

Ao meu amigo, Ednir Vizioli pela amizade e seriedade na execução dos ensaios biológicos deste trabalho;

Aos alunos de iniciação científica do *Lapdesf* pelo compromisso na execução do trabalho. Em especial às alunas: Renata Soares Ferreira pela amizade, responsabilidade e dedicação na execução de diversas sínteses deste trabalho e a aluna Itsia Quintino, pela amizade e compromisso que também contribuiu de forma efetiva na conclusão desta tese;

À equipe do laboratório de biologia molecular do hemocentro da UNICAMP, representados pela Shelley Gambero que prontamente se dispôs em auxiliar na execução dos ensaios e a nova integrante deste trabalho: Carla Penteado, pelas correções na versão final deste trabalho e pela parceria firmada na caracterização em nível molecular das atividades dos novos compostos;

Aos meus amigos do programa de pós-graduação, em especial aos pós-graduandos do *Lapdesf*: Antônio Távora, Ednir Vizioli, Eliana Serafim, Lorena Blau, Lúcia Fioravanti, Renato Menegon com quem tive e tenho oportunidade de aprender mais a respeito da química farmacêutica e medicinal. Obrigado por todas as discussões que sempre agregaram conhecimento a minha formação;

Jean Leandro dos Santos

Agradecimentos

Aos meus amigos: Osmar Redondo e Mateus Scontri, que ofereceram suporte para realização deste trabalho e pela disponibilidade em auxiliar sempre quando solicitados;

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

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

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente ao desenvolvimento deste trabalho. Em especial a Alexandre D. Pazoti, pela amizade e companherismo nos bons e maus momentos da realização deste trabalho, auxiliando em todas as atividades necessárias na execução desta tese;

Aos meus amigos da cidade de Franca que estiveram presentes durante o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram de forma pessoal à minha formação;

Jean Leandro dos Santos

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ESQUEMAS	VI
LISTA DE ESPECTROS	VIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVO	5
3 – PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	6
4 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
5- MATERIAL E MÉTODOS	44
6- RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	112
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3d	Clorofórmio deuterado
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N-N</i> -dimetilformamida
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
HAc	Ácido acético
Hb	Hemoglobina
HU	Hidroxiuréia
IV	Espectrofotometria no infravermelho
M	Molaridade
M.W. ou M.O	Microondas
·NO	Óxido nítrico
P.f	Faixa de fusão
P.M.	Peso molecular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
THF	Tetrahidrofurano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura da hemoglobina e da protoporfirina IX	p.10
Figura 2: Hemácias de indivíduo falciforme visualizadas sob microscópio óptico mostrando (setas) a presença de células com aspecto anômalo e alongado.....	p.11
Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme.....	p.15
Figura 4: Parcela do mercado farmacêutico mundial no contexto das doenças conhecidas.....	p.19
Figura 5: a) Estruturas químicas dos agentes quelates disponíveis para tratamento de sobrecarga de ferro pós-transfusões b) Modelo molecular representando a quelação do ferro pelo fármaco desferasirox (7)	p.21
Figura 6: a) Representação esquemática do mecanismo de ação dos inibidores de canais de Gardos; b) Estrutura química de compostos inibidores de canais de Gardos.....	p.23
Figura 7: Estrutura química dos agentes modificadores da cadeia β de HbS.....	p.24
Figura 8: Estrutura química de alguns compostos indutores da síntese de HbF.....	p.25
Figura 9: Biotransformação de HU em $\cdot\text{NO}$	p.27
Figura 10: Representação esquemática da biossíntese de óxido nítrico, a partir da l-arginina, catalisada pela enzima NO sintase	p.29
Figura 11: Estrutura dos novos nitratos orgânicos com propriedades antiinflamatórias, analgésicas e doadoras de óxido nítrico.....	p.30
Figura 12: Equilíbrio tautomérico dos derivados furoxânicos.....	p.32
Figura 13: Mecanismo proposto para liberação de $\cdot\text{NO}$ pelos derivados furoxanos (MEDANNA <i>et al</i> 1994).....	p.33
Figura 14: Mecanismo sugerido para liberação de $\cdot\text{NO}$ pelos derivados furoxanos.....	p.33
Figura 15: Confôrmers de menor energia dos dois possíveis tautômeros do composto 3.....	p.57

- Figura 16:** Mapa de potencial eletrostático do éster metílico mostrando os possíveis locais de adição da hidrazina.....p.67
- Figura 17:** Ligação hidrogênio intramolecular do derivado *orto*-ftalimídico.....p.98
- Figura 18:** Atividade analgésica dos compostos I, III, IV, V e VII no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%.....p.102
- Figura 19:** Mapa de potencial eletrostático do éster metílico.....p.105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção e frequência do gene S em alguns estados brasileiros.....	p.12
Tabela 2: Comparação dos deslocamentos químicos devido à presença do grupo R.....	p.64
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN dos derivados do ácido feniácético.....	p.73
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN H^1 e C^{13} dos intermediários e produto final (composto IV).....	p.88
Tabela 5: Deslocamento químico no RMN H^1 dos regioisômeros derivados ftalimídicos.....	p.97
Tabela 6: Deslocamento químico nos espectros RMN H^1 e C^{13} dos compostos VI, VII e VIII.....	p.100
Tabela 7: Porcentagem de produção de nitrito pelos compostos na presença e ausência de cisteína.....	p.106

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Planejamento estrutural dos compostos I-VIII	p.6
Esquema 2: Classificação dos compostos híbridos de acordo com a estratégia de hibridação utilizada	p.36
Esquema 3: Hibridação molecular na obtenção de “chaves duplas”	p.37
Esquema 4: Principais grupos funcionais (azul) e ligações lábeis (verdes) dos pró-fármacos que após hidrólise química ou enzimática libera o fármaco matriz.....	p.40
Esquema 5: Obtenção do composto I obtido a partir do álcool cinâmico	p.46
Esquema 6: Obtenção do composto II obtido a partir do crotonaldeído.....	p.47
Esquema 7: Obtenção do derivado bis-aril-sulfonil furoxano (5).....	p.48
Esquema 8: Obtenção dos derivados fenilsulfonilfuroxano funcionalizados	p.48
Esquema 9: Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais III, IV e V.....	p.50
Esquema 10: Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais VI-VIII.	p.51
Esquema 11: Efeito protetor em C2 devido à presença da subunidade N-óxido.....	p.57
Esquema 12: Mecanismo de reação para obtenção do derivado furoxânico.....	p.59
Esquema 13: Modo de ação do clorometilfuroxano (40) como agente citotóxico.....	p.60
Esquema 14: Mecanismo de reação para obtenção do composto I.....	p.61
Esquema 15: Efeito protetor em C2 devido à presença da subunidade N-óxido	p.66
Esquema 16: Mecanismo da reação para obtenção do composto II.....	p.68

Esquema 17: Síntese do composto III.....	p.71
Esquema 18: Mecanismo de reação para obtenção do derivado 45.....	p.71
Esquema 19: Mecanismo de reação para obtenção do derivado furoxânico	p.75
Esquema 20: Ataque preferencial do nucleófilo ao carbono que não sustenta a subunidade <i>N</i> -óxido.....	p.76
Esquema 21: Mecanismo de reação para obtenção do composto III.....	p.77
Esquema 22: Esquema sintético para obtenção do composto III usando síntese em paralelo.....	p.80
Esquema 23: Síntese do composto IV.....	p.81
Esquema 24: Mecanismo de reação para formação de <i>N</i> -fenil ftalimida.....	p.82
Esquema 25: Mecanismo de reação para obtenção do composto IV.....	p.86
Esquema 26: Síntese do composto V.....	p.89
Esquema 27: Mecanismo de reação para obtenção dos derivados ftalimídicos	p.89
Esquema 28: Mecanismo de reação para obtenção do cloreto de sulfonila.....	p.91
Esquema 29: Mecanismo reacional para obtenção do composto V.....	p.92
Esquema 30: Síntese dos compostos VI, VII e VIII.....	p.94
Esquema 31: Mecanismo de reação para obtenção dos derivados ftalimídicos	p.94
Esquema 32: Mecanismo de reação de formação de ésteres usando DCC como agente acoplante.....	p.99
Esquema 33: Ordem crescente de capacidade de doação de óxido nítrico pelos diferentes compostos furoxânicos (5 mmol cisteína)	p.110

Lista de Espectros

Espectro 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto furoxânico 3 (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona $_{d6}$).....	p.58
Espectro 2: Espectro no infravermelho do produto final (composto 1) (pastilha de KBr).....	p.62
Espectro 3: Espectro de RMN C13 do aldeído furoxano (4) (RMN ^{13}C ; 200 MHz; acetona $_{d6}$).....	p.65
Espectro 4: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_{d6}$)	p.69
Espectro 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^{13}C ; 400 MHz; DMSO $_{d6}$) – ampliação região aromática	p.70
Espectro 6: Espectro de RMN H^1 da mistura de sulfóxido e sulfona.....	p.72
Espectro 7: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do bis-arilsulfonilfuroxano (5) (Hetcor; 300 MHz; DMSO $_{d6}$)	p.74
Espectro 8: Espectro no infravermelho do composto III	p.78
Espectro 9: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_{d6}$)	p.79
Espectro 10: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona $_{d6}$) – ampliação região aromática	p.80
Espectro 11: Espectro no infravermelho da fenilftalimida.....	p.83
Espectro 12: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) da fenilftalimida relativo as regiões de δ 7,40 e δ 8,05 (em DMSO $_{d6}$)....	p.84
Espectro 13: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) do cloreto de sulfonila (54) relativo as regiões de δ 7,4 e δ 8,0 (em DMSO $_{d6}$; 500 MHz).....	p.85
Espectro 14: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_{d6}$)	p.86
Espectro 15: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (55) (^1H RMN; 400 MHz; DMSO $_{d6}$)	p.90

Espectro 16: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6)p.92

Espectro 17: Espectro de infravermelho do composto V (pastilha KBr).....p.93

Espectro 18: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (57) (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO- d_6) - ampliação na região de 7,45-8,15 ppmp.95

Resumo

Anemia falciforme (A.F.) é uma doença genética caracterizada pela mutação pontual que possui como base a troca de um ácido glutâmico por uma valina na cadeia beta da hemoglobina. Em estados de desoxigenação há interação das subunidades hidrofóbicas das cadeias beta levando à polimerização da hemoglobina que pode causar a deformação da estrutura do citoesqueleto do eritrócito. Em análises microscópicas frequentemente se observa glóbulos vermelhos com a forma de foice. Tem sido relatado que pacientes com A.F. apresentam aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A hidroxiuréia (HU) é o mais utilizado fármaco para tratamento, e seus efeitos benéficos estão relacionados em parte à capacidade desta se biotransformar *in vivo* em óxido nítrico (NO). Entre os efeitos benéficos do NO destacam-se: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, indução da expressão gênica de gama globina – constituinte da hemoglobina fetal.

Nesse contexto, em continuidade com uma linha de pesquisa que visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos protótipos candidatos a fármacos para tratamento dos sintomas da anemia falciforme foram sintetizados uma série de compostos híbridos (I-VIII) de acordo com o planejamento estrutural. A estratégia de doação de óxido nítrico associada à inibição de TNF- α representa uma nova abordagem terapêutica para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme, e mostrou-se promissora de acordo com os dados previamente obtidos em nosso laboratório.

Foram sintetizados e caracterizados oito compostos finais (I-VIII) obtidos através da estratégia de hibridação molecular entre a subunidade ftalimídica e o núcleo furoxânico. Na avaliação da atividade antinociceptiva periférica em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% foram avaliados os compostos I, III, IV, V e VII. Destes, os compostos III e IV apresentaram perfil de atividade analgésica semelhante ao metamizol (dipirona) usado como padrão, inibindo em torno de 45% a contorção abdominal. Estes resultados caracterizam o perfil analgésico dos novos compostos híbridos. Os oito compostos finais apresentaram distintos perfis de doação de óxido nítrico.

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disease characterized by pontual mutation that has as basis for exchange of glutamic acid valine in a beta chain of hemoglobin. In deoxygenation state there are hydrophobic interaction among the beta chains leading to polymerization of hemoglobin that may carry out to deformation of cytoskeleton structure of red blood cells. Often in microscopic analysis has seen red blood cell in the shape of sickle. It has been reported that patients with SCD has increased levels of circulating pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor $\text{TNF-}\alpha$. The hydroxyurea (HU) is the most widely used drug for treatment and its beneficial effects are related in part to the ability of this (HU) suffered biotransformation *in vivo* in nitric oxide (NO). Among the beneficial effects of NO are: vasodilatation, inhibition of platelet aggregation, induction of gamma globin gene expression - constituent of fetal hemoglobin.

In this context, in continuity with our research line aimed at planning, synthesis and evaluation of new drug candidates to treat the symptoms of sickle cell disease were synthesized, for optimization, a series of hybrid compounds (I-VIII) according to the structural planning. The strategy of nitric oxide donation and $\text{TNF-}\alpha$ inhibition represent a new therapeutical approach to treat the symptoms of sickle cell disease, and was promising according to the data previously obtained in our laboratory.

Eight compounds (I-VIII) was designed through the strategy of molecular hybridization between the phthalimide subunit and furoxanic ring. It was synthesized and characterized. The peripheric antinociceptive activity was evaluated using acetic acid-induced abdominal writhing model for the compounds I, III, IV, V and VII. Of these, the compounds III and IV showed analgesic activity profile similar to metamizol (dipyrone) used as standard, with inhibiting around 45% to abdominal writhing. These results characterized the analgesic profile of the new hybrid compounds. The final compounds showed different profile of nitric oxide donation.

1 – INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (A.F.) foi uma das primeiras doenças genéticas entendidas molecularmente (PAULING *et al.*, 1949). Tem origem, predominantemente, africana com diferentes haplotipos que recebem as denominações de acordo com seu local de origem (PAGNIER *et al.*, 1984). A grande presença do traço falciforme em regiões endêmicas para malária tem sido relacionada como uma forma de proteção seletiva contra as formas mais letais de malária.

Estima-se que anualmente nasçam cerca de 250 mil crianças com anemia falciforme. Nos Estados Unidos, a anemia falciforme afeta aproximadamente 1 em cada 350 recém-nascidos afro-americanos por ano, e aproximadamente 72.000 indivíduos no total. É considerada a doença hematológica genética mais prevalente nos Estados Unidos (BONDS, 2005).

No Brasil, cerca de 8% dos afro-descendentes têm o que é chamado de traço falcêmico. A Organização Mundial de Saúde estima que anualmente nasçam no Brasil em torno de 2500 crianças com anemia falciforme (ROCHA, 2004).

A A.F. é uma anemia hemolítica hereditária crônica, devido à herança de cada um dos progenitores do gene para hemoglobina S, e caracterizada por uma mutação pontual no gene da β -globina, mais especificamente uma simples substituição de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon do gene β -globina, resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia β -globina variante (β^S -globina) (SAFO *et al.*, 2004).

Em ambientes com baixa tensão de oxigênio, a valina “substituída” pode-se ligar complementarmente a sítios hidrofóbicos de outra subunidade β do tetrâmero de hemoglobina, em um processo de polimerização que pode levar ao afoçamento das hemácias (BUNN, 1997).

Os polímeros, por vezes, causam danos ao citoesqueleto do eritrócito e podem provocar a lise da hemácia, liberando hemoglobina. A hemoglobina é composta de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ξ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ ou epsilon- ϵ). Sua estrutura é quimicamente unida a um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (heme), que detém a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o oxigênio nos tecidos. Quando há rompimento da hemácia, o grupo heme é liberado na circulação, e o átomo de ferro central deste núcleo, é capaz de coordenar moléculas de óxido nítrico produzidas pelo endotélio vascular durante o

processo homeostático, gerando nos pacientes falciformes um “caráter vasoconstritor” (NETO & PITOMBEIRA, 2003).

Esse processo é agravado com a vaso-oclusão, decorrente da obstrução, principalmente da microcirculação, causado pelas células falciformes. Esse quadro, frequentemente, leva ao infarto de diversos tecidos por uma perfusão tissular inadequada. Ademais, contribui para crises dolorosas, disfunção dos órgãos, e em alguns casos, morte (STEINBERG, 2006).

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

Tem sido relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam significativo aumento dos níveis circulantes de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MALAVÉ *et al.*, 1993). O TNF- α exerce efeitos pró-inflamatórios aumentando as propriedades quimiotáticas. Aumenta a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular devido ao aumento das moléculas de adesão. Estimula a produção de radical livre, e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE₂. O TNF- α também induz mudanças nas propriedades coagulantes e anticoagulantes e aumenta a síntese hepática de alguns reagentes de fase aguda (SANTOS, 2007).

Desta forma, o aumento dos níveis sanguíneos de TNF- α em pacientes portadores de anemia falciforme pode agravar as crises vaso-oclusivas, e levar ao aparecimento de episódios infecciosos e inflamatórios (MALAVÉ *et al.*, 1993; FRANCIS & HAYWOOD, 1992; BUCHANAN *et al.*, 2004). Portanto, compostos que inibam essa citocina poderiam auxiliar no tratamento da doença.

A talidomida, fármaco hipnótico e sedativo, foi reconhecida como inibidora da síntese de TNF- α . Diversos análogos estruturais têm sido sintetizados e avaliados, buscando otimizar essa atividade (SHIBATA, 1995). Estudos entre a estrutura química e a atividade biológica destacaram a subunidade ftalimídica como essencial (farmacofórica) para atividade de inibição de TNF- α (LIMA, FRAGA & BARREIRO, 2001). Foi, também, verificado que a inibição desta citocina era responsável pelos efeitos analgésicos periféricos observados na talidomida (RIBEIRO, 2000).

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

Cabe mencionar que outras substâncias têm sido relatadas como potencialmente úteis no tratamento da anemia falciforme, dentre as quais destacam-se a decitabina, ácidos graxos de cadeia curta, inibidores do co-transporte de K^+-Cl^- , inibidores dos canais de Gardo (clotrimazol, L-arginina, dipiridamol) e aldeídos heterocíclicos (SANTOS, 2007).

A hidroxiuréia (HU) é um conhecido inibidor da síntese de ribonucleotídeo redutase, que é a enzima que converte ribonucleotídeos a deoxiribonucleotídeos, e limita assim a síntese de DNA. Consequentemente a HU é um agente antineoplásico e citotóxico que interrompe o ciclo celular nas fases S e G1 (YARBRO, 1992). Ademais, HU melhora aspectos reológicos das células vermelhas, melhorando o fluxo pelos vasos sanguíneos, diminui a concentração de HbS e atua como fonte de óxido nítrico (NO), o qual possui papel importante na manutenção do fluxo e da pressão sanguínea normal (SPACE et al., 2000; STEINBERG, 2006).

Sabe-se que a HU após metabolização, que ocorre principalmente no fígado, é biotransformada em óxido nítrico (NO) e este seria o responsável pelos efeitos benéficos de HU (KING, 2003).

Além da vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, o óxido nítrico também estimula a produção de hemoglobina fetal (HbF) através da via de guanilato ciclase solúvel (sGC). A ativação de sGC aumenta a expressão de γ globina em células eritroleucêmicas e eritroblastos humanos primários. A inibição de sGC previne esse aumento, o que sugere que a via sGC regula a expressão de γ globina, e consequentemente a síntese de HbF. Trabalhos têm demonstrado esta hipótese, mostrando que a HU, ativa sGC, e também induz a expressão de RNAm γ globina, aumentando os níveis de (HbF) em células eritroleucêmicas K562 e células progênitoras humanas (CONRAN et al., 2004.)

A HbF é um tetrâmero contendo duas cadeias globínicas alfa e duas cadeias gama globínicas ao invés de beta globínicas como em HbA (indivíduos normais) e HbS (indivíduos falciformes). A HbF é predominante na vida fetal, mas declina rapidamente após o 6º mês de vida e representa em adultos menos de 1%, mas essa proporção pode ser maior em indivíduos falciformes para auxiliar no transporte de oxigênio (STEINBERG, 2006).

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

Existem diversas classes de compostos que têm potencial em se decompor e produzir espécies reativas de nitrogênio. Entre elas, podem-se citar os nitritos e nitratos orgânicos, furoxanos, complexos NO-metálicos, N-nitrosaminas, S-nitrosotióis e N-hidroxiguanidinas (BARRETO, CORREA & MUSCARA, 2005).

As propriedades doadoras de óxido nítrico dos derivados do núcleo furoxânico (1,2,5-oxadiazol-2-óxido) têm sido explorada para obtenção de uma série de compostos híbridos com diferentes atividades farmacológicas (CERECETTO & PORCAL, 2005; CENA *et al.*, 2004).

Assim, durante o planejamento das novas moléculas deste trabalho buscou-se uma estratégia sinérgica de ação atuando em dois níveis: na modulação da síntese de TNF- α e no aumento os níveis de NO. A diminuição dos níveis de TNF- α leva ao maior equilíbrio das propriedades anti e pró-coagulantes, diminuição da hiperalgesia e diminuição da resposta imune celular. Enquanto o NO, conhecido por suas propriedades vasodilatadoras do endotélio vascular auxiliaria os pacientes e contribuiria estimulando a síntese de gama globina, (constituinte da cadeia da hemoglobina fetal – HbF) aumentando a produção de HbF.

Face ao exposto, este trabalho apresenta uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da doença falciforme, e é continuidade do trabalho da dissertação em que se buscou otimizar as propriedades de doação de óxido nítrico utilizando como doadora de NO a subunidade furoxânica.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho visa à síntese e avaliação farmacológica de novos protótipos candidatos a fármacos usados como alternativa no tratamento das manifestações clínicas da anemia falciforme.

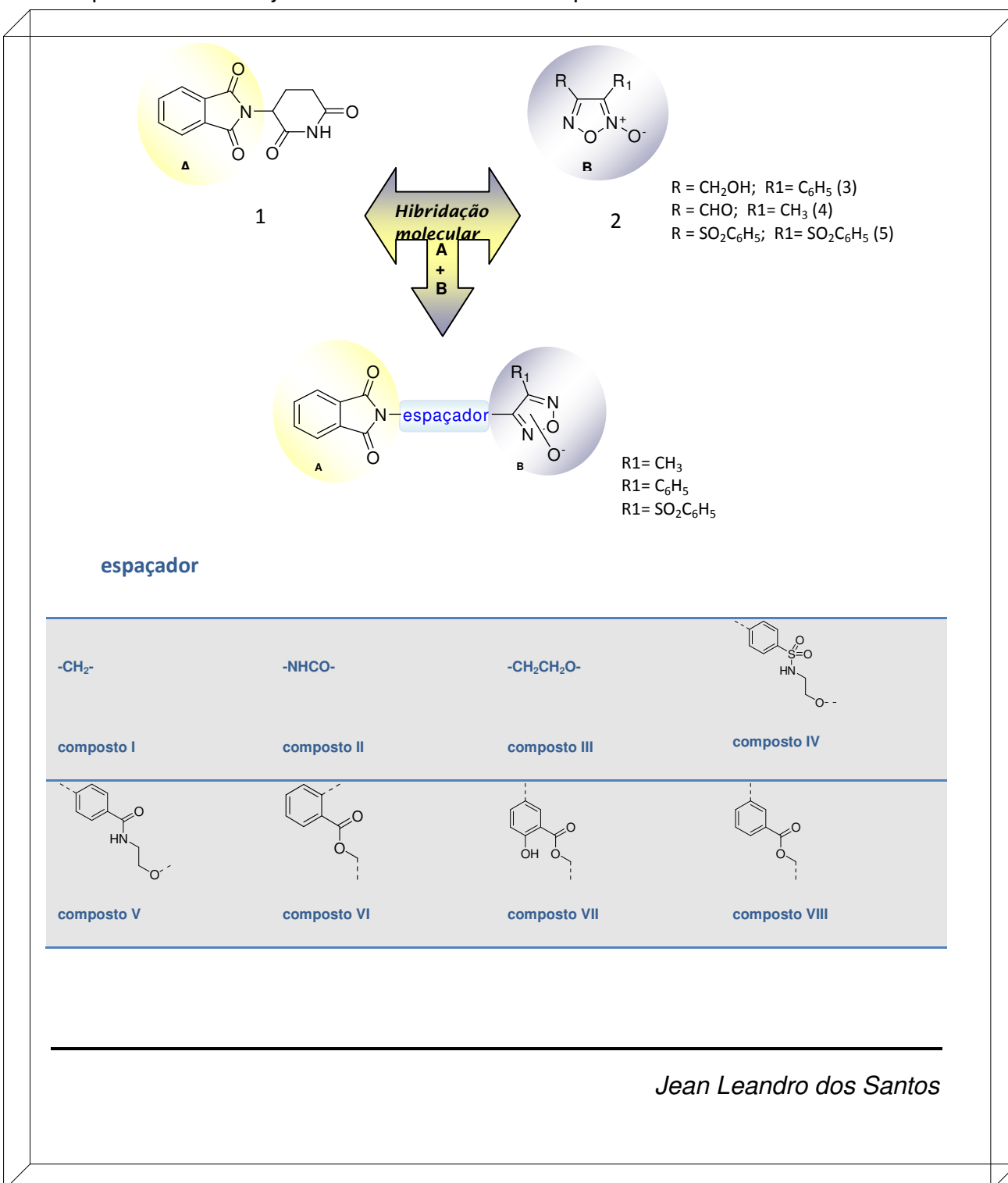
Objetivos específicos

- 1- Síntesar e caracterizar as estruturas dos compostos híbridos com atividade dual, planejados como inibidores da citocina TNF- α e doadores de óxido nítrico.
- 2- Avaliar a atividade de doação de NO através do ensaio de detecção quantitativo de nitrito.
- 3- Avaliar a atividade analgésica em ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.
- 4- Avaliar a capacidade dos compostos em inibir a síntese de TNF- α em ensaio enzimático por ELISA.
- 5- Avaliar a atividade *in vitro* dos compostos sintetizados, quanto à capacidade em induzir a síntese de RNAm de gama globina.
- 6- Avaliar a contribuição da subunidade espaçadora à atividade do híbrido.

3 – Planejamento estrutural

O planejamento estrutural dos compostos utilizou as estratégias de modificações moleculares para obtenção dos novos compostos candidatos à fármacos com funções terapêuticas úteis ao tratamento dos sintomas da doença. Esse planejamento utilizou como protótipos as moléculas da talidomida (1) e o núcleo furoxânico (2).

Esquema 01: Planejamento estrutural dos compostos I-VIII



A talidomida (1) é conhecida por suas propriedades analgésicas periféricas e antiinflamatórias, decorrentes da inibição da expressão do RNAm de TNF- α (RIBEIRO *et al.*, 2000). Mais especificamente, a subunidade ftalimídica (A), grupo farmacofórico principal para a ação moduladora direta sobre biossíntese de TNF- α , foi selecionada nos derivados planejados (I – VIII). (LIMA *et al.*, 2001; HASHIMOTO, 2002). Com a supressão da subunidade glutamirídica, houve a eliminação do centro assimétrico da talidomida. Sabe-se que a deletéria atividade teratogênica é dada pelo enantiômero S, assim procurou-se no planejamento dos novos derivados abolir o centro assimétrico, para não ocorrer formação de estereoisômeros. Avaliando uma série de derivados ftalimídicos através do teste de AMES, Santos (2007) não encontrou razões de mutagenidade que indicassem efeito genotóxico por esses derivados.

Um dos efeitos benéficos da hidroxiuréia (HU) utilizada no tratamento da doença falciforme está relacionado à sua capacidade após oxidação, de se biotransformar em óxido nítrico. O $\cdot\text{NO}$ seria o responsável por uma série de efeitos fortuitos como aumento dos níveis de hemoglobina fetal, vasodilatação e diminuição da agregação plaquetária. Entretanto, a exposição prolongada à HU em tratamentos crônicos causa lesões ao material genético (HUANG, 2004). O fato torna-se mais preocupante quando na doença falciforme doses maiores de HU são necessárias para obtenção do efeito terapêutico. Santos (2007) demonstrou que a HU possui capacidade de induzir mutação em cultura de células após exposição a uma única dose.

Na busca de fármacos mais seguros e que pudessem atuar sem os efeitos genotóxicos associados à utilização prolongada a HU abre uma nova perspectiva de tratamento, baseada na utilização da molécula do óxido nítrico. Nesse contexto, foi proposto que doadores diretos de óxido nítrico também pudessem atuar de forma benéfica no tratamento. Durante a dissertação, foi demonstrado que os nitratos orgânicos poderiam funcionar como doadores de $\cdot\text{NO}$, sem apresentar genotoxicidade quando avaliados no teste de AMES.

Estruturalmente, um dos principais efeitos indesejáveis dos nitratos é a incapacidade de se modular a doação de óxido nítrico, ou seja, não há controle sobre a velocidade de doação de $\cdot\text{NO}$. Essa incapacidade motivou a busca de novos compostos em que esse perfil de doação possa ser *a priori* antecipado. Os derivados furoxânicos são conhecidamente doadores de $\cdot\text{NO}$, atividade esta relacionada ao efeito eletrônico do substituinte ligado ao anel furoxânico. Grupos eletroatratores, ou seja, que retiram densidade eletrônica aumentam a doação de $\cdot\text{NO}$, enquanto aqueles doadores de elétrons diminuem a doação.

No planejamento estrutural para a seleção da subunidade espaçadora (arílica ou fenílica) foi levado em consideração a adequada funcionalização para possível acoplamento entre as duas subunidades (ftalimídica e furoxânica). Também foram selecionados como espaçadores os substituintes em que a modulação na inibição de TNF- α pudesse ser diferenciada. Relatos da literatura sobre a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de derivados ftalimídicos inibidores de TNF- α mostram que é maior a inibição desta citocina quando o núcleo ftalimídico está diretamente ligado a um anel aromático. Menor atividade é observada em derivados alquílicos (LIMA *et al.*, 2001; HASHIMOTO, 2002). No planejamento estrutural esse parâmetro foi levado em consideração, para selecionar espaçadores que contribuíssem à subunidade ftalimídica com distintos perfis de inibição do TNF- α .

Através das estratégias de modificação molecular, como a hibridação e a latenciação de fármacos, planejou-se compostos com caráter dual de ação em que uma mesma estrutura química tivesse a capacidade de inibir a citocina TNF- α , representada pela subunidade ftalimídica, e funcionar como doador de NO, representado pelo furoxano. Esses novos compostos teriam ação sinérgica e representariam uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da anemia falciforme.

4- Revisão Bibliográfica

Anemia falciforme

Aspectos gerais

As hemácias, também denominadas eritrócitos ou glóbulos vermelhos, são células com formato de disco bicôncavo, anucleadas presentes no sangue. São produzidos na medula óssea e vivem aproximadamente 120 dias na circulação, e são constituídas por moléculas de hemoglobina, cuja principal função é transportar oxigênio e gás carbônico aos tecidos (KUYPERS, 2008).

A molécula de hemoglobina é um tetrâmero constituído por duas subunidades de cadeias globínicas, cada qual ligada a um grupo heme (Figura 1). Este é constituído pela protoporfirina IX (anel porfirínico) ligado a um átomo de ferro central (Fe^{+2}), responsável pela ligação com oxigênio (FRENETTE & ATWEH, 2007).

As hemoglobinas são diferenciadas de acordo com a constituição das cadeias globínicas e os tipos mais comuns são: *hemoglobina A* (HbA) constituído por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$), é a hemoglobina predominante representando cerca de 96% das moléculas totais de hemoglobina em indivíduos sadios; *hemoglobina A₂* (HbA₂) constituída de duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$). Essas cadeias delta são sintetizadas a partir do primeiro trimestre após o nascimento e representam cerca de 2,5%-3% das hemoglobinas em indivíduos sadios; *hemoglobina fetal* (HbF) presentes na vida fetal, seus níveis estão diminuídos na vida adulta. A HbF é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) (NETO & PITOMBEIRA, 2003).

Na anemia falciforme há presença de hemoglobina S (HbS) que como a HbA, é constituída por duas cadeias alfa e duas beta ($\alpha_2\beta_2$). Entretanto, na cadeia beta por conta da mutação pontual há troca de aminoácidos (ácido glutâmico por valina). Essa modificação altera as propriedades isoeletricas e conformacionais da molécula de hemoglobina.

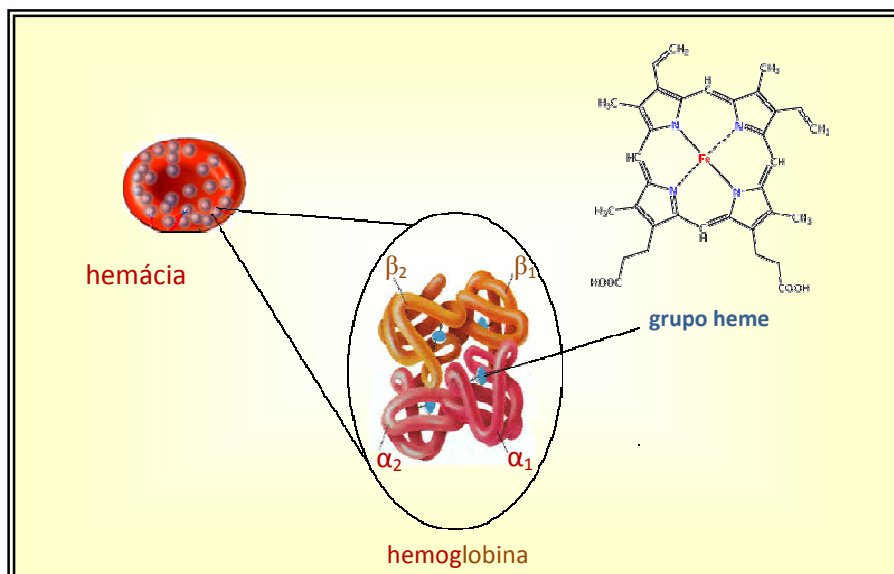


Figura 1: Estrutura da hemoglobina e da protoporfirina IX (Adaptado de: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin> acessado em 23 de outubro 2008).

A A.F. foi a primeira doença humana monogenética a ser caracterizada molecularmente. É uma doença genética autossômica recessiva caracterizada por uma mutação pontual (GTG para GAG) no sexto códon do gene da β -globina que leva à substituição do ácido glutâmico para um resíduo de valina no gene da cadeia β -globina (INGRAM, 2004).

O primeiro relato sobre um caso diferenciado de anemia falciforme foi observado em 1910 pelo médico James Herrick que observou, sob microscópio, o aspecto anômalo e alongado – em forma de foice - das hemácias (Figura 2). Linus Pauling e colaboradores, em 1949, comparando HbS (falciforme) com HbA (normal) observaram através de eletroforese diferenças nos pontos isoelétricos das diferentes hemoglobinas sugerindo diferenças no número ou tipo de grupos ionizáveis entre as hemoglobinas. Trabalhos anteriores de Watson e colaboradores observaram em crianças uma relação entre a diminuição dos níveis de HbF e o aparecimento dos sintomas da doença falciforme. Posteriormente, Ingram relatou que na A.F. havia substituição da cadeia β de HbS do aminoácido ácido glutâmico por valina. Em 1960, Perutz e colaboradores descrevem a estrutura e a função molecular da hemoglobina (PAULING *et al.*, 1949; WATSON, STAHLMAN & BILLELO, 1948; INGRAM, 1957; PERUTZ *et al.*, 1960).

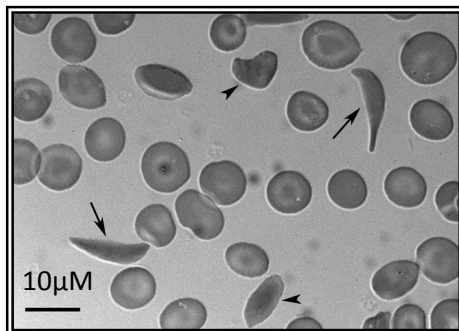


Figura 02: Hemácias de indivíduo falciforme visualizadas sob microscópio óptico mostrando (setas) a presença de células com aspecto anômalo e alongado (retirado de: FRENETTE & ATWEH, 2007)

Origem e Epidemiologia

A doença falciforme parece ter se originado nos países do centro-oeste africano, da Índia e do leste da Ásia, há cerca de 50 a 100 mil anos, entre o período paleolítico e mesolítico. Apresenta alta distribuição nos países africanos, principalmente em regiões endêmicas para malária como uma forma de proteção à infecção pelo plasmódio. De fato, embora não se compreenda os mecanismos envolvidos nessa ‘proteção’ à malária, sabe-se, por exemplo, que há diminuição da invasão, crescimento e desenvolvimento do plasmódio na célula falciforme. Além disso, a remoção mais rápida das células falciformes da circulação diminui o grau de parasitemia (WEATHERALL, 2008).

A disseminação da doença falciforme pelo mundo ocorreu principalmente por conta do tráfico negreiro e da posterior miscigenação racial. Nos Estados Unidos a anemia falciforme afeta aproximadamente um em cada 350 recém-nascidos afro-americanos por ano, e aproximadamente 72.000 indivíduos no total (BONDS, 2005).

No Brasil, a anemia falciforme é a doença hematológica hereditária mais comum, altamente disseminada por conta da miscigenação racial, e ocorrendo principalmente entre afro-descendentes. Dados do Ministério da Saúde estimam que o número de casos de portadores da doença (HbSS) alcance cerca de 25.000 – 30.000 indivíduos, e que o número de novos casos por ano seja cerca de 3.500 (CANÇADO & JESUS, 2007).

A situação torna-se um problema maior de Saúde Pública quando analisamos a prevalência estimada do gene HbS na população. Estima-se que

cerca de 4% da população é heterozigota (HbAS) para o gene S. Entre indivíduos afro-descendentes essa porcentagem é maior, atingindo entre 8% a 10% dos indivíduos. Estima-se ainda, que haja cerca de 7.200.000 portadores do traço falciforme e que nasçam anualmente 200.000 indivíduos heterozigotos para A.F. (ROCHA, 2004; CANÇADO & JESUS, 2007).

A Tabela 1 mostra a frequência do gene S na população brasileira em diferentes estados. A maior predominância da doença e do traço falciforme aparece nos estados da região nordeste, e é herança do intenso tráfico negreiro durante o período colonial. Em estados da região sul, como o Rio Grande do Sul, onde o tráfico negreiro não ocorreu na mesma proporção da região nordeste, se observa uma diminuição do número de indivíduos com a doença e o traço falciforme.

Tabela 01: Proporção e frequência do gene S em alguns estados brasileiros.

Estado	Doença Falciforme	Traço Falciforme
Pernambuco	1:1400	1:23 (4%)
Bahia	1:650	1:17 (5,3%)
Minas Gerais	1:1400	1:23 (3%)
Rio de Janeiro	1:1200	1:21 (4%)
São Paulo	1:4000	1:35 (2,6%)
Rio Grande do Sul	1:10.000	1:65 (2%)

(Fonte: Ministério da Saúde, 2005)

Fisiopatologia da anemia falciforme

A mutação pontual no gene da β -globina caracterizada pela troca de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon resulta na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia beta variante (STEINBERG, 2006).

A substituição do ácido glutâmico por uma valina modifica a estrutura tridimensional da hemoglobina. O ácido glutâmico é carregado negativamente e

a valina é um aminoácido neutro, isso permite a aproximação das moléculas de hemoglobina e, conseqüentemente, a polimerização em estados desoxigenados. Na conformação desoxi da HbS, a valina forma um bolso hidrofóbico na cadeia beta que pode interagir com a subunidade hidrofóbica de outra molécula de Hb S vizinha (na conformação oxi, o bolso é inacessível), o que não é possível no estado oxigenado (ADACHI *et al.*, 1988).

A ocorrência dessa interação em estados de baixa tensão de oxigênio, leva à polimerização da HbS. Inicialmente, há nucleação homogênea que progride para um estado de nucleação heterogênea caracterizada pela formação de espirulitas, cristais e tactóides que acabam em uma etapa posterior lesando a estrutura do citoesqueleto do eritrócito. A formação desses polímeros é agravada pelos constantes processos de oxigenação e desoxigenação da hemoglobina S, provocando alterações morfológicas na estrutura dos eritrócitos podendo levar a formação de células com forma de foice (Figura 2).

As hemácias falciformes não deformadas apresentam em sua superfície aumento na expressão das moléculas de adesão, aumentando a interação com endotélio vascular, monócitos, macrófagos e plaquetas, e são responsáveis pela obstrução dos capilares e vênulas levando ao quadro clínico conhecido como vaso-oclusão. Na célula deformada (ex. forma de foice) devido à maior rigidez da membrana há diminuição de contatos de superfície múltiplos com as células endoteliais, diminuindo a participação dessas no início do processo vaso-oclusivo (ZENNADI *et al.*, 2008).

O processo vaso-oclusivo é um dos principais responsáveis pelos sintomas clínicos da anemia falciforme e responsável pelas crises álgicas e o quadro de isquemia que pode levar à falência de órgãos. A Figura 3 representa os principais eventos que ocorrem no processo de vaso-oclusão.

Após sucessivas etapas de oxigenação-desoxigenação a polimerização de HbS pode causar danos à estrutura do eritrócito. Estes polímeros podem levar à deformação do citoesqueleto com formação de células com aspecto de foice, ou na pior das situações lesarem a estrutura da membrana – fenômeno conhecido como hemólise. A diminuição do número de eritrócitos pela hemólise leva o paciente a um quadro de anemia. Durante a hemólise há extravasamento do conteúdo citoplasmático do eritrócito e liberação de hemoglobina e arginase. A arginase é a enzima que converte a arginina em ornitina e uréia, diminuindo a concentração plasmática de arginina que atuaria como substrato da enzima óxido nítrico sintase endotelial para produção de NO. A hemoglobina liberada contendo grupo heme, também pode sequestrar o

óxido nítrico endotelial, diminuindo os níveis fisiológicos. Estes fatores associados contribuem para o caráter vasoconstritor do paciente falciforme, que apresenta menores níveis fisiológicos de óxido nítrico que os indivíduos saudáveis, e maior propensão para instalação do processo vaso-oclusivo (TAYLOR *et al.*, 2008).

A deficiência de NO induzida pela hemólise tem sido associada a diversas manifestações clínicas da doença, como por exemplo, hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de pernas e infarto (KATO *et al.*, 2006).

Outro fenômeno relevante para o processo de vaso-oclusão é adesão de eritrócitos (reticulócitos e células densas deformadas) ao endotélio venular. Na anemia falciforme os eritrócitos contendo HbS apresentam adesão ao endotélio vascular de 2 a 10 vezes mais que os eritrócitos de indivíduos saudáveis (EL NEMER *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que a presença de níveis elevados de TNF- α em pacientes com anemia falciforme tem a capacidade de aumentar a adesão do eritrócito ao endotélio vascular, mais especificamente através do aumento das interações entre $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 (WAGNER *et al.*, 2004).

A adesão de leucócitos ao endotélio com formação de agregados heterocelulares (leucócitos e células falcêmicas) também contribuem para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento da formação de polímeros de HbS, e propagação da oclusão da vasculatura adjacente. Transmigrações neutrofílicas através das junções “gap” endoteliais aumentam a inflamação na microvasculatura e contribuem para o caráter inflamatório crônico do indivíduo falciforme (OKPALA *et al.*, 2002; OKPALA, 2004).

A adesão das células sanguíneas ao endotélio das vênulas pós-capilares inicia e propaga os episódios de dor e as crises vaso-oclusivas. Ademais, o caráter inflamatório é perpetuado pela injúria constante causada pelas células falciformes e agregados celulares à parede do endotélio vascular.

Assim pode-se admitir que a polimerização da HbS é o processo inicial da vaso-oclusão, constituindo-se um importante mecanismo para intervenção terapêutica. Atualmente, a estratégia utilizada é promover aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF) que possui a capacidade de inibir a polimerização de HbS. De fato, se observa uma interessante relação inversa entre o aumento de HbF e a diminuição da mortalidade de pacientes com A.F. (MA *et al.*, 2007).

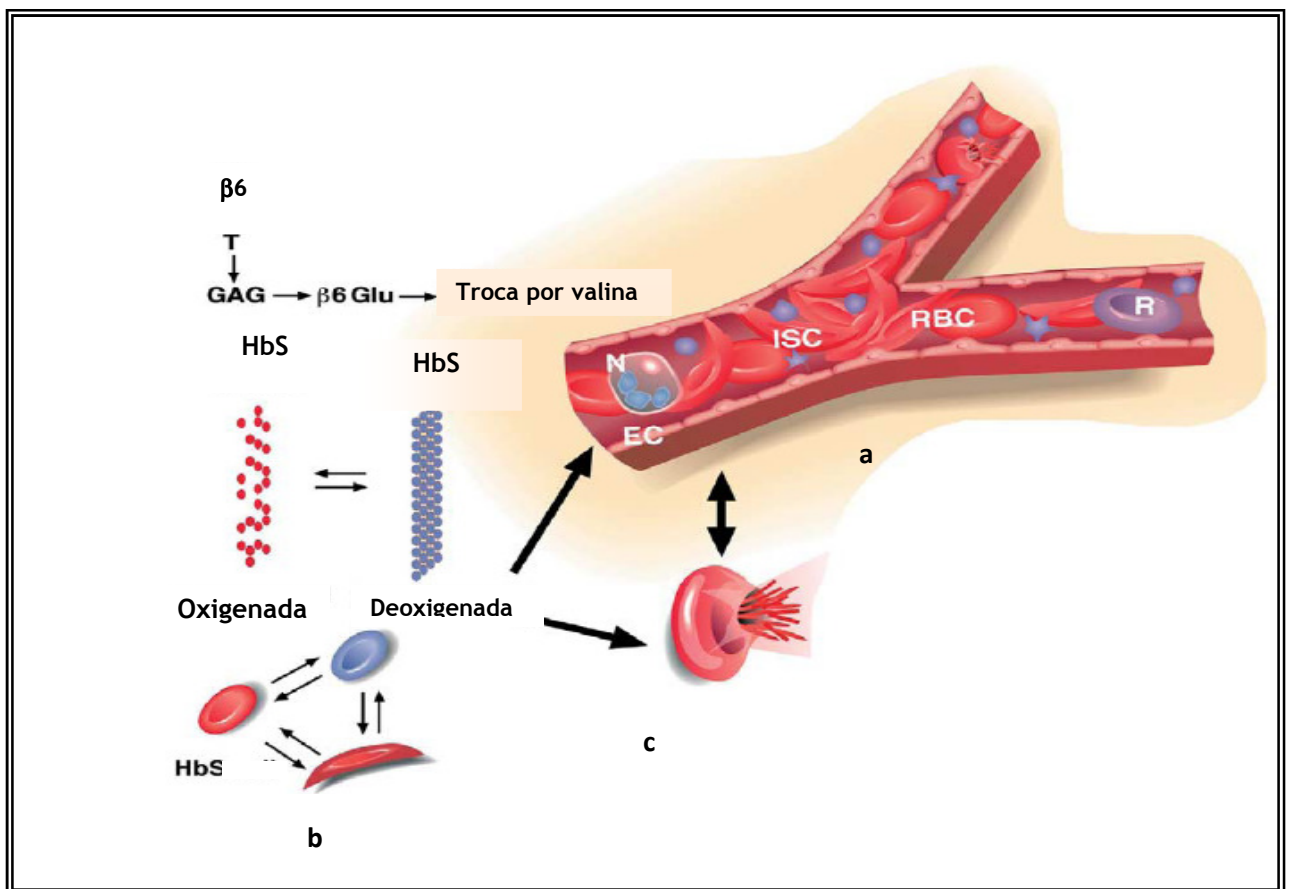


Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme (adaptada de STEINBERG, 2006: EC: endotélio vascular; N: neutrófilo; ISC: célula irreversivelmente falcizada; RBC: eritrócito; R: reticulócito; a) vaso oclusão causada pelas hemácias falciformes; b) processos constantes de oxigenação e desoxigenação levando a formação da célula em forma de foice; c) hemólise.

O Traço Falcêmico

A doença falciforme se manifesta em indivíduos homozigotos para gene S (HbSS), na heterozigose (HbAS) os indivíduos possuem o traço falciforme (T.F.). No T.F. os indivíduos não apresentam fenômenos vaso-oclusivos em condições fisiológicas e têm uma expectativa de vida semelhante ao da população em geral (ROCHA, 2004).

Apesar dos relatos de anormalidade associados à presença do T.F., não se observa aumento de mortalidade associada especificamente a essa condição. Na literatura, um dos poucos relatos de morte súbita ocorreram com

recrutas americanos portadores do traço falciforme submetidos a exercícios físicos extenuantes, entretanto, as principais causas de morte relatadas foram: acidente vascular cerebral, hipertermia e rabdomiólise associada com necrose tubular renal aguda (KARK & POSEY, 1987).

Estudos apontam que haja uma relação entre a presença do T.F. e a presença de complicações como, por exemplo: tromboembolia venosa, rabdomiólise, insuficiência renal e necrose tissular, mas esses sinais clínicos ocorrem sob condições que propiciam o processo de falcização, como hipóxia, acidose e desidratação (MURAO & FERRAZ, 2007; AUSTIN *et al.*, 2007; MAKARYUS, CATANZARO & KATONA, 2007; FAGNETE *et al.*, 2006).

A maior relevância do traço falciforme é sua alta distribuição na população, cerca de 2-8% dependendo da intensidade da população negra em cada região. A detecção de indivíduos falciformes é importante porque filhos de duas pessoas com T.F. tem cerca de 25% de probabilidade de nascerem com anemia falciforme (MURAO & FERRAZ, 2007).

Anemia falciforme como uma doença inflamatória crônica

O aumento significativo do número de leucócitos apresentados por indivíduos falciformes é o primeiro indicativo da presença de um processo inflamatório. Os leucócitos interagem com moléculas de adesão do endotélio vascular podendo agravar os episódios de vaso oclusão. Este pode ser iniciado também pela injúria tecidual causada pelas células falciformes falcizadas, que após o dano ao endotélio promovem liberação por parte deste de ADP que ativa a agregação plaquetária, aumentando o quadro de obstrução. Sucessivos episódios vaso oclusivos são capazes de ativar o processo inflamatório crônico (DALLALIO *et al.*, 2007; CHIES & NARDI, 2001).

Tem sido relatado que o aumento do número de leucócitos associados ao quadro inflamatório crônico dos indivíduos falciformes aumentaria o número de mortes, principalmente associados ao infarto (PLATT *et al.*, 1994).

Na inflamação crônica a participação das citocinas pró-inflamatórias tem um papel importante na propagação e manutenção do quadro inflamatório. Entre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se: IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (PATHARE *et al.*, 2004).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é biossintetizado por monócitos, macrófagos ativados, células T e células *natural killer* (NK). Após biossíntese

há clivagem do TNF- α ancorado à membrana plasmática pela metaloenzima, zinco dependente, conversora do fator de necrose tumoral alfa (TACE). São conhecidos 2 receptores de TNF: o TNF-R1 ou TNF-p55 e TNF-R2 ou TNF-p75 (WALLIS, 2008).

O TNF- α possui atividades pró-inflamatórias e imunomoduladoras. Aumenta as propriedades quimiotáticas, é responsável pelo aumento da aderência de neutrófilos ao endotélio vascular devido ao estímulo para produção de moléculas de adesão, estimula produção de radicais livres, e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE₂. O TNF- α também induz mudanças nas propriedades coagulantes e anticoagulantes e aumenta a síntese hepática de alguns reagentes de fase aguda. Ademais, TNF- α é um importante mediador da síndrome séptica e do choque endotóxico, sendo capaz de suprimir a biossíntese de lipases lipoproteicas e enzimas lipogênicas em tecido adiposo, prejudicando o armazenamento de lipídeos nos adipócitos (LANARO *et al.*, 2009).

O TNF- α tem um papel importante na dor inflamatória aguda e crônica. Em dor aguda, o TNF- α sensibiliza neurônios nociceptivos indiretamente via indução de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, resultando na liberação de prostaglandinas. Na dor inflamatória crônica, parece ocorrer participação do receptor TNF-R1 ou TNF-p55 (INGLIS *et al.*, 2005).

Ribeiro e colaboradores relataram a importância do TNF- α na hiperalgesia periférica, e demonstraram que sua inibição está associada à redução da dor (RIBEIRO *et al.*, 2000). O TNF- α parece também estar envolvido na dor neuropática, na qual o aumento da concentração desta citocina está relacionado à piora dos quadros dolorosos (SUD *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que tanto em condições normais quanto em situações de vaso-oclusão há aumento dos níveis de TNF- α (e outras citocinas pró-inflamatórias) o que agrava ainda mais a condição do paciente com anemia falciforme (TAVAKKOLI *et al.*, 2004; VORDERMEIER *et al.*, 1992).

Malavé e colaboradores (1993) descreveram uma correlação inversa entre a porcentagem de hemoglobina fetal (HbF) e a concentração sérica de TNF- α . Estes autores demonstraram que pacientes com altos níveis plasmáticos de TNF- α apresentam consequente diminuição dos níveis de HbF. Considerando que a HbF possui efeito benéfico, melhorando a oxigenação tecidual e diminuindo a polimerização de HbS, tal correlação inversa

potencializa os riscos de acidentes vasculares e concomitantemente dos sintomas associados à anemia falciforme (MALAVÉ *et al.*, 1993).

Assim, a estratégia de inibição da citocina TNF- α , representa uma nova abordagem terapêutica e pode contribuir no auxílio das complicações vasculares e inflamatórias da doença falciforme.

Inibidores de TNF- α

A inibição dessa citocina tem sido utilizada como estratégia em diversas doenças como artrite reumatóide, psoríase, doenças inflamatórias intestinais, asma, câncer, hanseníase entre outras. O bloqueio pode ocorrer em diferentes níveis e ser realizado por macro ou micromoléculas. Dentre os inibidores disponíveis na terapêutica destacam-se: anticorpos monoclonais (infliximab, etanercept, adalimumab) e as micromoléculas, representadas pela talidomida e lenalidomida.

O protótipo inicial no planejamento foi a talidomida, utilizada como hipnótico e sedativo nos anos 50 do século XX, e indicado para tratamento de enjoos matinais em mulheres grávidas, foi banido do mercado em 1960 por induzir teratogenicidade. Entretanto, esse fármaco renasce em 1998 com aprovação do FDA para utilização em algumas doenças como mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica, hanseníase. Essas novas indicações ocorreram devido à descoberta de que a talidomida poderia inibir o TNF- α promovendo benefícios em doenças nas quais há um aumento exacerbado desta citocina pró-inflamatória (LIMA, 2001).

Estudos de relação estrutura atividade da molécula de talidomida têm demonstrado a relevância da subunidade ftalimida tida como farmacofórica na inibição de TNF- α . Esses estudos mostraram ainda a irrelevância da subunidade glutamirídica nessa ação. A partir desse conhecimento, e utilizando as ferramentas da química farmacêutica e medicinal é possível, mantendo o grupo farmacofórico primário, planejar estruturas bioativas na inibição de TNF- α desprovidas dos grupos toxicofóricos, responsáveis pelo efeito teratogênico (SHIBATA *et al.*, 1995; LIMA, 2001; SANTOS *et al.*, 2007).

Em 2005 foi lançado no mercado o fármaco lenalidomida – análogo estrutural da talidomida - para o tratamento de mieloma múltiplo, que possui atividade 2000 vezes superior à talidomida na inibição do TNF- α (ÁVILA *et al.*, 2006).

Aerbajinai e colaboradores (2007) demonstraram que a talidomida possui a capacidade de induzir a expressão gênica de gama globina através do aumento de espécies reativas de oxigênio mediada pela via p38 MAPK e acetilação de histona H4 durante a eritropoese adulta. Esses resultados foram obtidos após observação de que a talidomida pode melhorar a anemia em alguns pacientes com síndrome mielodisplásica e estimular a eritropoese em pacientes com mieloma múltiplo (AERBAJINAI *et al.*, 2007). Assim, o desenvolvimento de análogos da talidomida pode auxiliar o paciente portador da doença falciforme em dois aspectos: primeiro induzindo a expressão gênica de gama globina, mesmo mecanismo da HU, e segundo inibindo a citocina pró-inflamatória TNF- α , envolvida nos processos vaso-oclusivos e nas crises algicas.

Tratamento da anemia falciforme

A ausência de fármacos específicos para o tratamento da anemia falciforme é talvez a característica mais cruel da doença. Este fator está relacionado em parte ao desinteresse das indústrias farmacêuticas em pesquisa de novos fármacos para doenças negligenciadas (O'CONNELL, 2007).

Quando se relaciona o mercado farmacêutico mundial com as doenças mundiais se observa que grande parcela do mercado é representada pelas doenças globais e apenas uma pequena parcela diz respeito às doenças negligenciadas (FLORENCE, 2008). Entretanto, a situação mais alarmante é a que diz respeito às doenças extremamente negligenciadas, como a anemia falciforme, que sequer estão contempladas pelo mercado farmacêutico mundial (Figura 4).

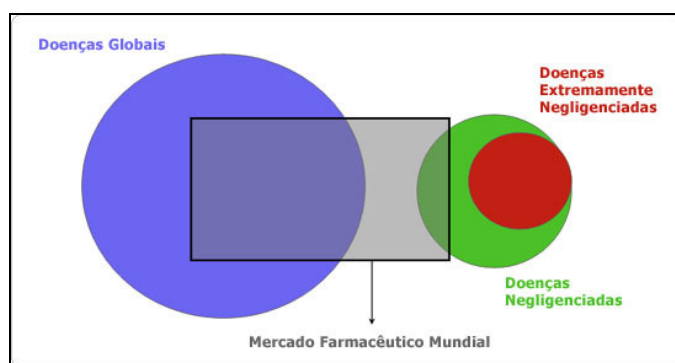


Figura 4: Parcela do mercado farmacêutico mundial no contexto das doenças conhecidas (disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx> acessado em 11 de outubro de 2008).

Como não há tratamento específico, a melhora da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes falciformes se baseia em medidas gerais e preventivas. Na maioria das situações o tratamento é apenas sintomático.

Assim, os poucos recursos terapêuticos para tratamento dos sintomas da anemia falciforme serão discutidos a seguir. Serão abordadas as principais estratégias e a busca de novos alvos terapêuticos no contexto atual da doença falciforme.

Agentes quelantes

Pacientes falciformes são frequentemente submetidos à transfusão sanguínea, este é um recurso terapêutico importante não somente na anemia falciforme, mas em doenças como talassemia beta maior e síndrome mielodisplásica. As constantes transfusões sanguíneas podem levar em algumas situações à sobrecarga de ferro, ocasionando lesão orgânica e em última instância a morte.

O ferro é essencial no metabolismo energético celular e no transporte de oxigênio. Este átomo se encontra ligado na maioria das vezes às proteínas ou enzimas porque na forma livre, é extremamente reativo e danoso ao organismo. O ferro na forma livre atua como catalisador de reações oxidativas e conseqüentemente síntese de radicais superóxidos e radical hidroxila. A conversão do superóxido em H_2O_2 pela superóxido dismutase causa peroxidação de lípideos da membrana de diversas organelas citoplasmáticas, levando ao dano celular.

Após cerca de 10-20 transfusões sanguíneas é observado sinais clínicos e laboratoriais decorrentes da sobrecarga de ferro. Os sintomas predominantes decorrentes da sobrecarga de ferro são: fadiga, dor abdominal, impotência, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, fibrose portal, cirrose hepática, insuficiência hepática, hiperpigmentação da pele, hipotireoidismo, *diabetes mellitus*. Entretanto, o comprometimento cardíaco é uma das principais complicações, responsável pela maior parte das mortes por sobrecarga de ferro (CANÇADO, 2007).

Uma estratégia terapêutica em casos de sobrecarga de ferro é a remoção deste metal do organismo através dos agentes quelantes. A desferroxamina (Desferal®) e o deferasirox (Exjade®) são os fármacos quelantes mais utilizados para pacientes falciformes (Figura 5a).

A desferroxamina, introduzida no início da década de 70, ainda é um dos mais utilizados. O caráter peptóide deste fármaco e a presença de ligações lábeis passíveis à hidrólise conferem baixa biodisponibilidade oral. Por isso a via de administração usada é geralmente intravenosa ou subcutânea. Este inconveniente acaba diminuindo a adesão ao tratamento pelos pacientes. Efeitos adversos como reações inflamatórias no local da aplicação, infecção (principalmente por *Yersinia* spp.), alterações oculares e auditivas e retardo no crescimento têm contribuído à diminuição da adesão ao tratamento pelo paciente (PORTER, 2001). Do ponto de vista estrutural, a quelação ocorre em uma estequiometria 1:1, ou seja, um átomo de ferro pode interagir com uma molécula de fármaco (BRITTENHAM *et al.*, 1994).

O desferasirox (Exjade®) aprovado em novembro de 2005 como agente quelante, é uma molécula trivalente que apresenta alta afinidade pelo ferro. São necessárias duas moléculas de desferasirox para fixar um átomo de ferro (Figura 5b). Ela apresenta a vantagem de ser administrada por via oral, e o efeito quelante perdura por 24 horas produzindo redução progressiva da concentração de ferro livre plasmático. Esta forma de tratamento mais conveniente e menos invasiva aumenta a adesão do paciente ao tratamento. Os efeitos adversos mais observados são distúrbios gastrintestinais, erupção cutânea, elevação da creatina sérica e transaminases. Entretanto, o grande problema desse fármaco é o alto custo (LINDSEY & OLIN, 2007).

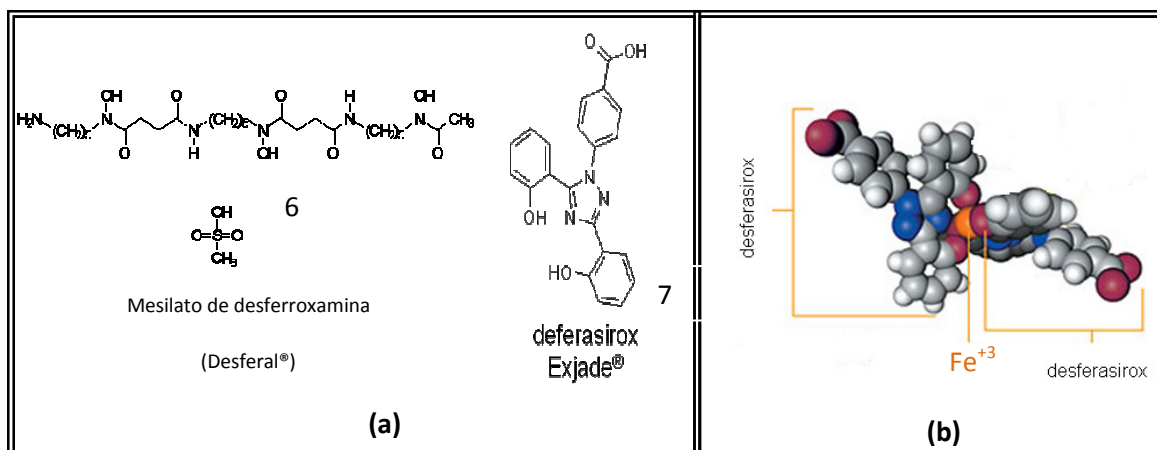


Figura 5: a) Estruturas químicas dos agentes quelantes disponíveis para tratamento de sobrecarga de ferro pós-transfusões b) Modelo molecular representando a quelação do ferro pelo fármaco desferasirox (7) (vermelho: oxigênio; azul: nitrogênio; cinza: carbono; branco: hidrogênio e laranja: ferro; disponível em <www.irondisorders.org/News/ExjadeFDA.asp> acessado em 30/10/2008).

Niprisan®

A utilização de plantas medicinais baseada no conhecimento popular foi o ponto de partida para o desenvolvimento do fitomedicamento Niprisan®. Esse fitomedicamento contém sementes de *Piper guineenses*, caule de *Pterocarpus osun*, frutos de *Eugenia caryophyllum* e folhas de *Sorghum bicolor*, plantas comumente usadas na Nigéria para alívio de alguns sintomas da anemia falciforme, como, por exemplo, as crises álgicas. Na Nigéria, dois a cada 100 recém-nascidos possuem anemia falciforme, e estima-se que a distribuição de heterozigotos seja algo em torno de 25% da população (WAMBEBE *et al.*, 2001).

O Niprisan® recebeu nos Estados Unidos o título de medicamento órfão para anemia falciforme, e é também comercializado na Europa (França) e África pela indústria farmacêutica Xechem. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial do Niprisan® em impedir a falcização das hemácias, inclusive em condições de hipóxia (IYAMU *et al.*, 2002; IYAMU *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos e recentemente na Europa, a concessão de medicamento órfão com uma série de incentivos governamentais, como redução de impostos e até investimento em pesquisa clínica, abre perspectivas para a descoberta de fármacos em doenças que não possuem interesse da indústria farmacêutica. Essa mesma lei de medicamentos órfãos promulgada em 1983 pelos Estados Unidos e em 2000 pela União Européia deveria ser repensada no Brasil no contexto da Política Nacional de Medicamentos, como uma forma de incentivar a pesquisa em doenças negligenciadas.

Inibidores de Canais de Gardos

A polimerização da hemoglobina S (HbS) é o fator central na doença falciforme, e está diretamente relacionada ao processo de hidratação/desidratação do eritrócito. Em estados de desidratação, há aumento da concentração de HbS que se polimeriza (MOZAZARELLI *et al.*, 1987). A desidratação dos eritrócitos causada pelo aumento do efluxo de íon potássio pode ocorrer por duas vias: via co-transporte potássio-cloreto e via cálcio ativada (canais de Gardos). A saída do potássio ocasiona saída de íons cloreto e água gerando um desequilíbrio osmótico na célula que leva à desidratação e ao aumento de polimerização de HbS, que em última instância culmina com a hemólise, diminuindo o número de células vermelhas levando a quadros de anemia (Figura 6a) (LEW *et al.*, 2005).

A entrada de cálcio mediada pela formação de polímeros de HbS, ativam os canais de Gardos, presentes na membrana do eritrócito, aumentando a desidratação celular (JOINER *et al.*, 2007).

Assim o planejamento de compostos inibidores dos canais de Gardos poderia impedir a desidratação, e em última instância levar a diminuição da hemólise.

O antifúngico clotrimazol mostrou-se efetivo na inibição dos canais de Gardos e foi utilizado como fármaco protótipo para posteriores modificações moleculares. A partir deste, alguns compostos, como NS3623 e o NS 1652, foram descobertos como sendo ativos na inibição de canais de Gardos, impedindo a hemólise e a formação de células falcizadas *in vivo*, usando camundongos transgênicos (Figura 6b) (MCNAUGHTON-SMITH *et al.*, 2008; BENNEKOU *et al.*, 2001). Indústrias Farmacêuticas como a Jonhson & Jonhson têm investido nessa estratégia, entretanto, até o momento nenhum fármaco foi lançado no mercado.

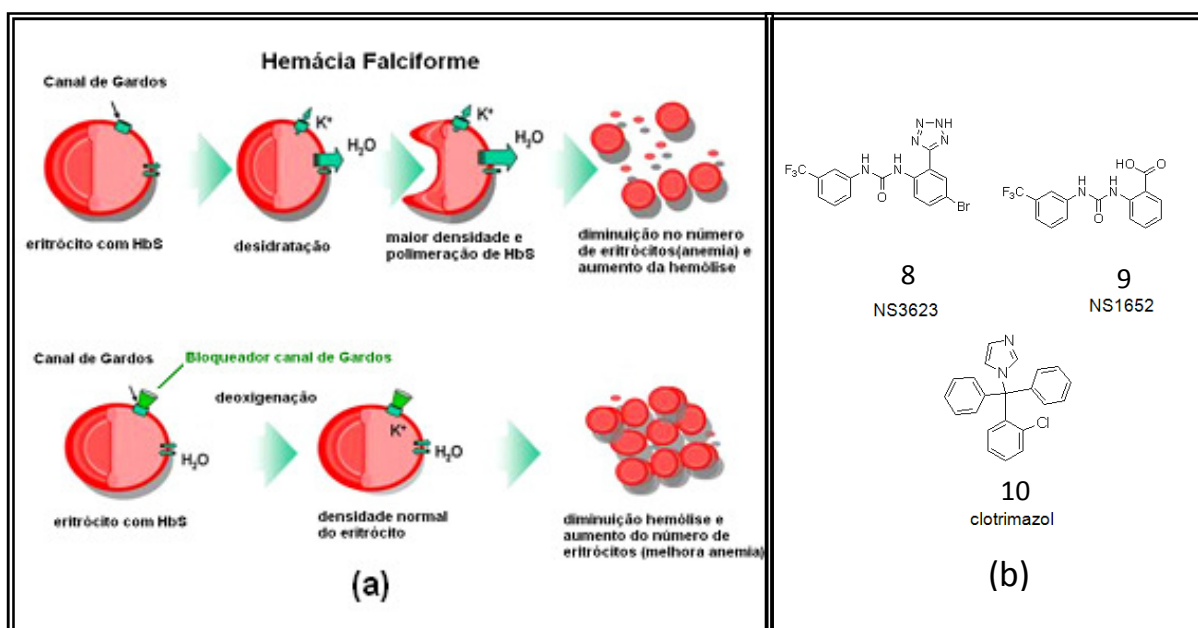


Figura 6: a) Representação esquemática do mecanismo de ação dos inibidores de canais de Gardos; b) Estrutura química de compostos inibidores de canais de Gardos.

Modificadores da cadeia β da hemoglobina S (HbS)

Estudos recentes têm demonstrado que alguns compostos contendo grupos funcionais reativos como isotiocianatos e aldeídos poderiam se ligar de forma covalente à hemoglobina modificando-a alostericamente. De forma mais específica, estudos propõem que alguns compostos como os isotiocianatos poderiam se ligar à subunidade β da cadeia da hemoglobina S (HbS) responsável pela interação hidrofóbica que culmina na polimerização. Assim, a ligação a essa subunidade hidrofóbica de um composto impediria ou diminuiria essa interação, retardando o processo de polimerização (PARK *et al.*, 2003).

Com relação a compostos aldeídicos, a ligação se daria pela formação de aduto (base Schiff) entre o grupo aldeídico e alguma amina N-terminal presente nos aminoácidos da cadeia α de HbS, especificamente trabalhos demonstraram a ligação do aldeído ao resíduo N-terminal de α Val1. Há relatos que após a ligação desses compostos há aumento da afinidade da hemoglobina ao oxigênio, e que os derivados aldeídicos apresentam toxicidade aguda em doses altas (5-hidroximetilfurfural DL_{50} = 2,5g/kg; vanilina DL_{50} = 1,58g/kg) o que justificaria sua utilização (SAFO *et al.*, 2004; SAFO *et al.*, 2005).

Os grupos isotiocianatos e aldeídos por conta de sua reatividade com alguns possíveis bionucleófilos não devem apresentar seletividade de ação. Além disso, esses grupos funcionais não são encontrados em fármacos devido às características farmacocinéticas inadequadas conferidas à estrutura química que os contenha, como por exemplo, rápido metabolismo (fase I e/ou fase II) e em algumas situações toxicidade dose-depedendente. Ainda que apresentem ação *in vitro* dificilmente essas estruturas se tornarão candidatos a fármacos (Figura 7).

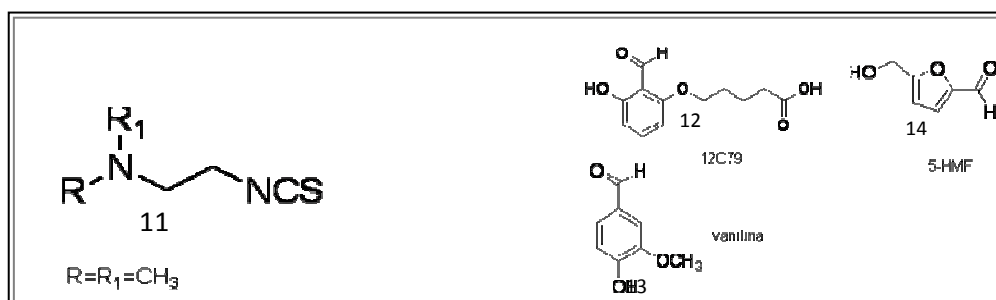


Figura 7: Estrutura química dos agentes modificadores da cadeia β de HbS.

Indutores da Síntese de Hemoglobina Fetal (HbF)

A 5-Aza-2'deoxicitidina (decitabina) é análogo de um nucleotídeo de pirimidina que apresenta importante atividade inibitória da enzima metil-transferase e é, portanto, um potente inibidor de metilação do DNA. Vários estudos demonstrariam que a demetilação de determinados genes está associada com a diferenciação celular. Em baixas concentrações, a decitabina estimula a síntese de cadeias γ globina, levando a um aumento de hemoglobina fetal em pacientes com hemoglobinopatias (QUESNEL & FENAUX, 1999). A azacitidina também apresenta atividade hipometilante, e aumenta a síntese de gama globina. Entretanto, apresenta atividade carcinogênica e teratogênica em roedores, e em humanos pode levar a leucopenia, neutropenia e trombocitopenia, razões pelas quais desestimulam seu uso restrito a pequenas dosagens em situações especiais, como por exemplo, em pacientes falciformes que não respondem a hidroxiuréia (KOSHY *et al.*, 2000).

Ácidos graxos de cadeia curta como ácido butírico e derivados mostraram-se úteis no tratamento das desordens hematológicas como anemia falciforme e β -talassemia. O efeito benéfico decorreria em parte da capacidade que estes compostos possuem em induzir a produção de hemoglobina fetal (HbF) *in vitro* e *in vivo* (DOVER *et al.*, 1992). Os derivados de ácido butírico têm como mecanismo de ação a inibição da histona deacetilase, enzima relacionada à regulação gênica. Entretanto, embora utilizado em pesquisa esses compostos não são aprovados pelas agências reguladoras para uso em humanos. Do ponto de vista estrutural, o ácido butírico e seus derivados são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, por isso sua administração ocorre por via intravenosa. Há relatos que o efeito benéfico desses compostos é reduzido após determinados períodos de tratamento (Figura 8).

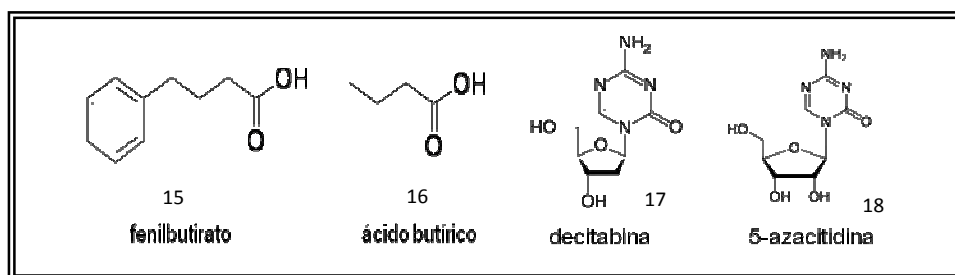


Figura 8: Estrutura química de alguns compostos indutores da síntese de HbF.

Hidroxiuréia (HU)

A hidroxiuréia (HU) é um hidroxycarbamato inibidor seletivo da síntese de ribonucleotídeo difosfato redutase, enzima necessária na conversão de ribonucleotídeos difosfatados em deoxiribonucleotídeos difosfatados, assim impede que as células saiam da fase G1/S do ciclo celular. É usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoético como, por exemplo, na leucemia mielóide crônica. Atualmente, HU é o principal fármaco disponível para o tratamento de anemia falciforme liberado pela agência reguladora norte-americana FDA (HANFT *et al.*, 2000).

Em 1994, iniciaram-se estudos multicêntricos (duplo cego) nos Estados Unidos e Canadá, que pretendiam avaliar a eficácia de HU para tratamento de anemia falciforme. Estes estudos observaram que pacientes sob tratamento apresentavam um aumento da concentração de hemoglobina fetal (HbF) e uma diminuição do número de crises (CHARACHE *et al.*, 1995). Mais ainda, estudos posteriores que durante nove anos avaliaram pacientes sob tratamento com HU apontaram uma redução significativa de 40% no número de mortes (STEINBERG *et al.*, 2003).

O protocolo médico de recomendação da utilização de HU seria em pacientes que possuem três ou mais admissões hospitalares por crises vaso-oclusivas nos últimos 12 meses e pacientes com disfunções orgânicas graves (ALIYU *et al.*, 2005). A utilização de HU para tratamento de crianças tem demonstrado resultados semelhantes aos adultos, o crescimento e o desenvolvimento parecem não estar afetados (DAVIS & GILMORE, 2003). A gravidez de pacientes falciformes é uma situação mais complexa, e frequentemente conduz a mortalidade materno-fetal. Nessa situação o aconselhamento é a prevenção da gravidez com uso de anticoncepcionais. É necessária a descontinuidade do tratamento com HU de três a seis meses antes de se engravidar devido aos possíveis efeitos teratogênicos de HU (ROBERTS, 2003).

Acredita-se que os efeitos benéficos da HU decorreria em parte de sua capacidade, após metabolização, de se biotransformar em óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e seria este o principal responsável pelos efeitos benéficos (KING, 2003) (Figura 9).

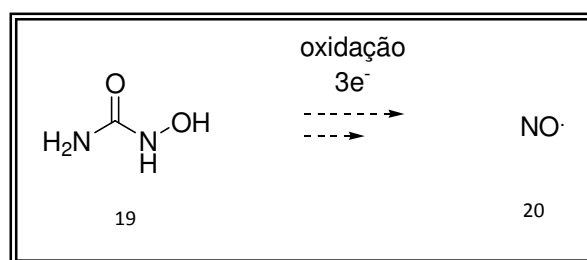


Figura 9: Biotransformação de HU em NO.

O aumento dos níveis de NO pelo tratamento com HU contribui de forma significativa auxiliando nos casos de vaso-oclusão, diminuindo a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular e inibindo a agregação plaquetária, mantendo o equilíbrio homeostático vascular (STEINBERG, 2006).

Outro efeito benéfico de HU seria a capacidade deste fármaco em aumentar os níveis de HbF. A produção de óxido nítrico através da HU estimularia a produção de HbF através da via de guanilato ciclase solúvel (GCs). A ativação de sGC aumenta a expressão de γ globina em células eritroleucêmicas e eritroblastos humanos primários. A inibição de sGC previne esse aumento, o que sugere que a via sGC regula a expressão de γ globina, e consequentemente a síntese de HbF. Trabalhos têm demonstrado esta hipótese, apontando que a HU ativa GCs e também induz a expressão de RNAm γ globina, aumentando os níveis de HbF em células eritroleucêmicas K562 e células progênitoras humanas (CONRAN *et al.*, 2004).

A despeito desta série de efeitos benéficos, o tratamento com HU pode gerar efeitos adversos como mielossupressão, hiperpigmentação cutânea, lesões ulcerativas em membros inferiores, aumento dos níveis de TNF- α , (agravando as crises álgicas) e em alguns casos o desenvolvimento de câncer (NAHAVANDI *et al.*, 2000). A capacidade em induzir a formação de câncer por HU é controversa até o presente momento. Alguns estudos demonstraram que a capacidade da HU induzir a formação de câncer em pacientes com anemia falciforme nas doses usadas é baixa (HANFT *et al.*, 2000), entretanto, estudos com maior tempo de duração e portanto aproximando-se mais a uma situação de tratamento crônico apontam o aparecimento de leucemia aguda em cerca de aproximadamente 10% dos pacientes tratados com HU (NAJEAN & RAIN, 1997; FRUCHTMAN *et al.*, 1997). Com relação à teratogênidade, há relatos na literatura a respeito desse efeito deletério em ratos e hamster (FERM, 1966; DEPASS & WEAVER, 1982.). Em relação à atividade mutagênica, SANTOS

(2007a) avaliou a atividade mutagênica da HU no ensaio de AMES usando cepas de *S. typhimurium* TA 100, TA102, TA 98 e TA 97a e encontrou razões de mutagenicidade (R.M) inferiores a 2,5 em concentrações elevadas (468 µmol/placa) ausentado HU deste efeito genotóxico no modelo usado; LIMA e colaboradores (2003) também não observaram esse efeito usando o teste do cometa, que é outro método usado para avaliação da genotoxicidade (LIMA *et al.*, 2003) .

Ainda que haja efeitos deletérios relatados ao uso crônico da HU, a redução da mortalidade e da morbidade em pacientes com A.F. tratados com HU é fato, e justifica a continuação de seu uso na prática clínica devido à ausência de outra opção terapêutica mais segura e eficaz para o tratamento da anemia falciforme. É uma relação em que se devem avaliar os riscos envolvidos com o tratamento e os benefícios da utilização de HU.

Entretanto, é importante destacar que cerca de 25% dos pacientes não respondem à terapia com HU, e em diversos casos de tratamento crônico o efeito benéfico diminui ou até mesmo se extingue, necessitando doses cada vez maiores para se obter o efeito, e obviamente aumentado a possibilidade toxicidade (ALIYU *et al.*, 2005).

Nesse contexto, é de suma importância a introdução de um novo fármaco que agregue os efeitos benéficos da HU sem sua potencial toxicidade.

Arginina e doadores de óxido nítrico

A arginina é um aminoácido sintetizado em nosso organismo e também obtido através da alimentação e participa de diversos processos fisiológicos (ex. ciclo da uréia). É utilizada na síntese de creatinina e fornece ornitina para a síntese de poliaminas (KONTUREK & KONTUREK, 1995).

Após metabolismo, a arginina é biotransformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca²⁺ sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO (Figura 10)

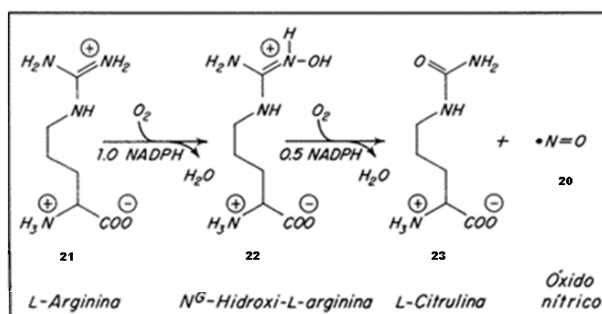


Figura 10: Representação esquemática da biossíntese de óxido nítrico, a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase (Fonte: QUEIROZ & BATISTA, 1999).

O óxido nítrico produto do metabolismo da arginina é o responsável por importantes efeitos farmacológicos como diminuição da agregação plaquetária, vasodilatação, diminuição da expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular e mediação na ativação da síntese de gama globina.

Por isso, imaginou-se que a suplementação desse aminoácido em doenças como a anemia falciforme, poderia aumentar a biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$ e conseqüentemente seus efeitos benéficos (KAUL *et al.*, 2008).

De fato Morris e colaboradores (2000) demonstraram em humanos que a terapia com arginina (via oral) aumenta a concentração de $\cdot\text{NO}$ em indivíduos falciformes, principalmente aqueles que estão em crises vaso-oclusivas (MORRIS *et al.*, 2000).

Há ainda diferença na resposta ao $\cdot\text{NO}$ entre homens e mulheres falciformes suplementados com arginina. Nas mulheres há maior biodisponibilidade e resposta ao $\cdot\text{NO}$ do que em homens, esse fenômeno determina também a diferença de expressão entre as moléculas de adesão e a interação destas com a HbS (GLADWIN *et al.*, 2003).

A terapia com suplementação de arginina é uma prática médica que tem sido adotada em algumas situações, e está pautada na utilização deste aminoácido como substrato para a enzima óxido nítrico sintase, que aumentaria os níveis de $\cdot\text{NO}$ e traria benefícios aos pacientes com A.F.

Baseado nisso, levantou-se a hipótese de que a doação de óxido nítrico auxiliaria na farmacoterapia da A.F. aumentando a expressão gênica de gama globina, promovendo a vasodilatação e inibindo a agregação plaquetária (COKIC *et al.*, 2003).

A inalação de $\cdot\text{NO}$ é um procedimento aprovado pelo FDA para recém nascidos com A.F. com hipertensão pulmonar e reduz a gravidade e a duração de crises vaso oclusivas em crianças (WEINER *et al.*, 2003). Entretanto é um método caro e que exige cuidados na manipulação. Em sua substituição se tem proposto moléculas orgânicas doadoras de óxido nítrico (MACK & KATO, 2006).

Entre os doadores de $\cdot\text{NO}$ conhecidos, os nitratos orgânicos representam uma importante classe terapêutica, conhecida há mais de cem anos, e utilizada para o tratamento de enfermidades como *angina pectoris*. Santos propôs através de estratégia de hibridação molecular estruturas químicas inéditas contendo a subunidade éster de nitrato (presente nos nitratos orgânicos) que atuassem como doadores de $\cdot\text{NO}$. Essas estruturas apresentaram atividades analgésica e antiinflamatória, e foram capazes de aumentar a expressão gênica de gama globina em quantidade superior à hidroxiuréia, fármaco disponível na terapêutica (Figura 11) (SANTOS *et al.*, 2007).

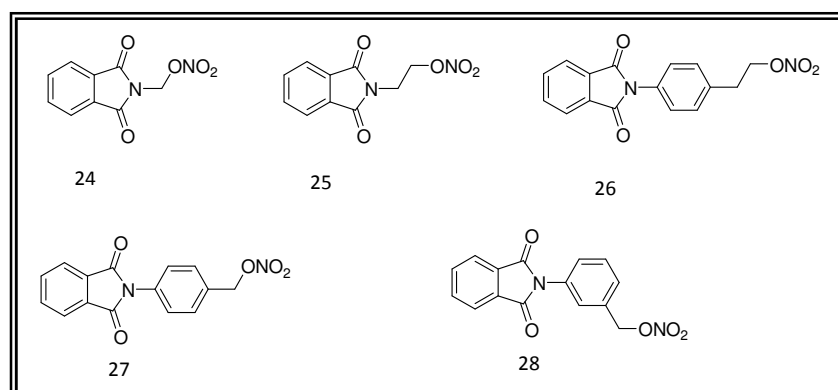


Figura 11: Estrutura dos novos nitratos orgânicos com propriedades antiinflamatórias, analgésicas e doadoras de óxido nítrico.

Furoxanos como doadores de óxido nítrico

Os nitratos orgânicos, nitritos, complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas, *N*-nitrosotióis, *N*-hidroxiguanidinas, derivados de ácido hidroxâmico e derivados furoxânicos estão entre as classes de compostos que possuem a capacidade de doar óxido nítrico.

Alguns desses doadores como complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas e *N*-nitrosotióis apresentam algumas desvantagens como instabilidade química

e física e apresentam meia-vida muito curtas perdurando por alguns minutos. A menos que seja resolvida essa instabilidade, essas desvantagens os desqualificam como potenciais fármacos doadores de $\cdot\text{NO}$ (BARRETO, CORREIA & MUSCARÁ, 2005).

Ainda que sejam incontestáveis os benefícios da utilização dos nitratos orgânicos na terapêutica como antianginosos seu uso prolongado pode levar ao mecanismo de tolerância, o que justifica a falta de eficácia destes fármacos após determinado período de tratamento. Esse fenômeno pode ser entendido pelo fato de que os nitratos necessitam reagir com grupos tióis para liberação de $\cdot\text{NO}$, depletando ou diminuindo o conteúdo de tióis nas células, levando à auto-inibição do seu metabolismo (SCHOENAFINGER, 1999).

A decomposição da estrutura e o desenvolvimento de tolerância com o uso não são fenômenos relatados para os derivados furoxânicos. Isso torna esse sistema heterocíclico aromático um interessante protótipo para utilização como doador de óxido nítrico.

O furoxano e derivados (*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) representam uma importante classe de compostos com diferentes propriedades químicas e atividades biológicas. Embora essa estrutura seja conhecida há mais de cem anos, muitos aspectos ainda permanecem obscuros e constituem um desafio aos químicos-farmacêuticos medicinais (CERECETTO & PORCAL, 2005).

São compostos estáveis do ponto de vista térmico, frente a eletrófilos e em meios ácidos. Entretanto, são menos estáveis frente a bases e nucleófilos. Do ponto de vista sintético, diversas rotas têm sido relatadas permitindo a obtenção de uma ampla variedade de derivados furoxânicos diferentemente funcionalizados (FARRAR, 1964; GASCO *et al.*, 1973; CALVINO *et al.*, 1980; FRUTTERO *et al.*, 1995; FRUTTERO *et al.*, 1997; DI STILO *et al.*, 1998; CERECETTO *et al.*, 1999; CERECETTO *et al.*, 2001; KULIKOV *et al.*, 2003; CENA *et al.*, 2004; DEL GROSSO *et al.*, 2005; GALLI *et al.*, 2005; CERECETTO *et al.*, 2006).

As vias sintéticas mais comumente utilizadas para preparação do núcleo *N*-óxido-1,2,5-oxadiazol são: a) Oxidação de [KS2][KS3]dioximas com reagentes como hipoclorito de sódio ou $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; b) Termólise de *o*-nitro-azidas; c) Dimerização de nitrilas *N*-óxidos; d) Oxidação de *o*-amino-nitro-derivados; e) Reação de alcenos com N_2O_3 (SCHONAEFINGER, 1999).

São utilizados como intermediários sintéticos para uma série de outros heterocíclicos como, por exemplo, derivados furazânicos (1,2,5-oxadiazol) e para transformação química e substituições em anéis heterocíclicos.

O anel furoxânico pode exibir equilíbrio tautomérico (Figura 12). Essa isomerização é dependente dos grupos que o substituem, e diferentemente dos benzofuroxanos, necessitam de maiores energias para interconversão (CERECETTO & PORCAL, 2005).

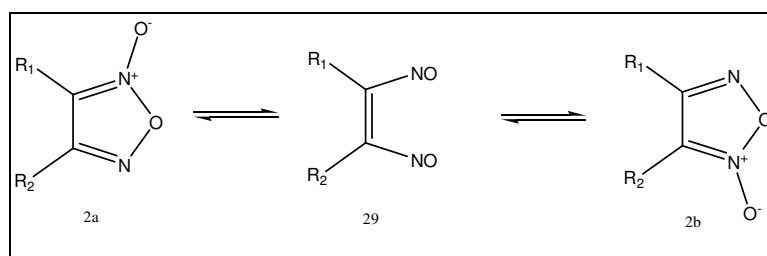


Figura 12: Equilíbrio tautomérico dos derivados furoxânicos.

Do ponto de vista da Química Farmacêutica e Medicinal o núcleo furoxânico pode ser explorado na obtenção de protótipos com perfis farmacológicos diferenciados, dependendo da modificação da cadeia lateral (R₁ e R₂) desse núcleo. Nesse sentido, é relatado que esses compostos podem possuir atividade antimalárica (GALLI *et al.*, 2005), antimicrobiana (CALVINO *et al.*, 1980), antichagásica (CERECETTO *et al.*, 1999), antineoplásica (CERECETTO *et al.*, 2001), propriedades antiagregantes (CENA *et al.*, 2004) e propriedades vasodilatadoras (DEL GROSSO *et al.*, 2005; FRUTTERO *et al.*, 1997; CENA *et al.*, 2004). Essas atividades farmacológicas são relacionadas em parte à capacidade de doação de óxido nítrico pela subunidade furoxânica.

Esta capacidade de doação de NO foi inicialmente estudada para obtenção de agentes cardiovasculares devido às suas propriedades vasodilatadoras (GALLI *et al.*, 2005). Embora a capacidade de doação de NO por parte dos derivados furoxânicos esteja bem fundamentada na literatura, os mecanismos para essa doação ainda permanecem obscuros. Sabe-se que alguns derivados furoxânicos na presença de tióis são capazes de liberar NO. Esse fato foi inicialmente relatado por Feelish e colaboradores para *N,N'*-diisopropilfuroxancarboxamida, e seus análogos *N,N'*-dimetil e em dois isômeros metilfuroxancarboxamida (FEELISCH, SCHONAEFINGER & NOAK, 1992). Estudos posteriores sobre o 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo propõem o mecanismo para doação de NO (MEDANA *et al.*, 1994) (Figura 13).

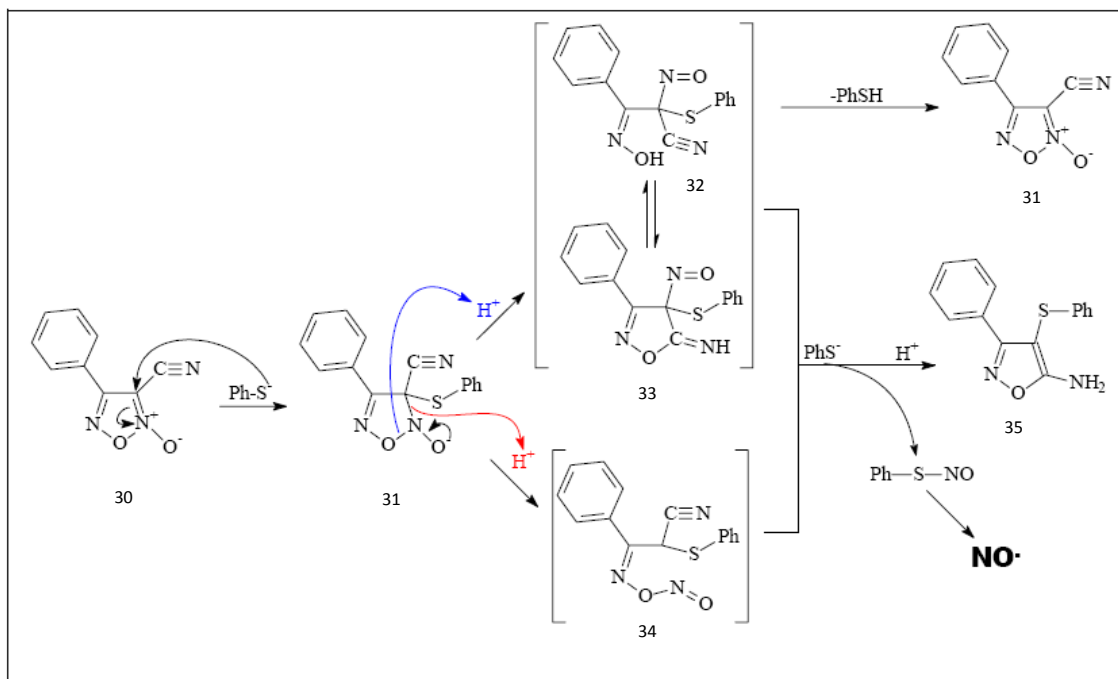


Figura 13: Mecanismo proposto para liberação de $\cdot\text{NO}$ pelos derivados furoxânicos (MEDANNA *et al.*, 1994).

Estudos mais recentes desenvolvidos por Cerecetto e colaboradores (resultados não publicados) propõem outro mecanismo de liberação de $\cdot\text{NO}$ cisteína-dependente (Figura 14).

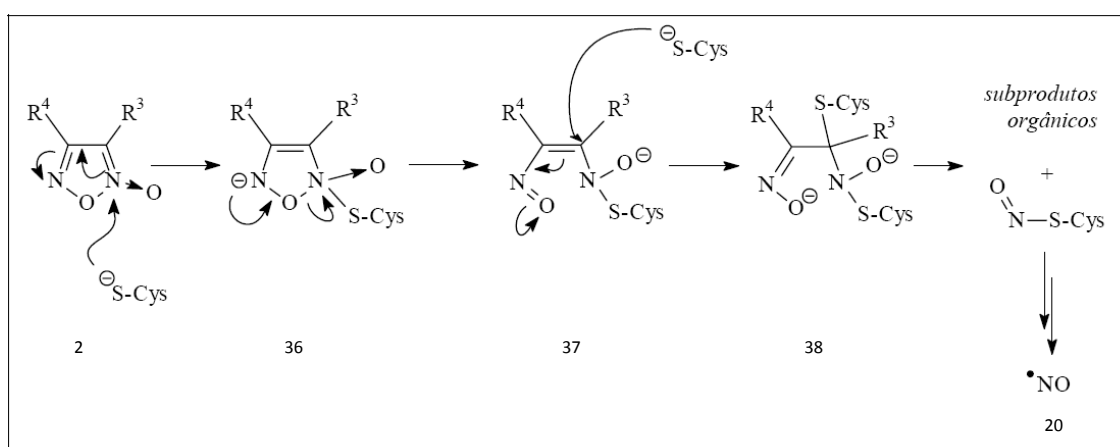


Figura 14: Mecanismo sugerido para liberação de $\cdot\text{NO}$ pelos derivados furoxânicos.

Através do mecanismo da Figura 14, podemos observar que a doação de $\cdot\text{NO}$ é dependente inicialmente do ataque do enxofre da cisteína ao carbono que contém o nitrogênio N -óxido. Assim, pode-se propor que a doação de óxido nítrico pode ser facilitada pela introdução nesse carbono de substituintes que são favoráveis estericamente e retiram a densidade eletrônica, tornando esse átomo de carbono mais deficiente eletronicamente e com maior suscetibilidade ao ataque do nucleófilo (enxofre resíduo de cisteína).

De fato, quando se relaciona a capacidade de doação de $\cdot\text{NO}$ com o substituinte do carbono ligado ao N -óxido observamos que a maior doação de $\cdot\text{NO}$ está relacionado à presença de grupos eletroatratores ligados a esse carbono (SORBA *et al.*, 1997).

Comparado com os outros doadores de $\cdot\text{NO}$, os derivados furoxânicos podem exibir um perfil farmacológico muito desejável: liberação lenta e sem o desenvolvimento de mecanismo de tolerância dos nitratos. No planejamento de doadores de óxido nítrico, para as diferentes doenças, alguns fatores devem ser levados em consideração, entre eles (SCHONAEFINGER, 1999):

- a) Sítio de doação de $\cdot\text{NO}$: intracelular ou extracelular;
- b) Cinética de doação: compostos de ação curta para tratamento agudo e de ação lenta para prevenção;
- c) Propriedades físico-químicas que permitam a obtenção de soluções para administração intravenosa, ou ainda meia vida adequada para o tratamento preventivo imaginando a via de administração sendo a oral.
- d) O estado redox da espécie doadora de $\cdot\text{NO}$: NO^0 , NO^+ e NO^- : sua interconversão e potencial nitrosante;
- e) Co-fatores necessários para doação de $\cdot\text{NO}$: tiol, oxigênio, enzimas, pH.
- f) Estabilidade térmica, em luz e pH;
- g) Taxa de liberação de NO : liberação lenta evita toxicidade.

Atualmente através da hibridação molecular, tem-se explorado a subunidade furoxânica como doadora de $\cdot\text{NO}$ em diversos processos fisiopatológicos onde a presença desse mediador é importante. Assim, em uma mesma estrutura química pode-se associar atividades farmacológicas duplas

que, se planejadas adequadamente, beneficiam o tratamento de determinadas doenças (CENA *et al.*, 2004;FRUTTERO *et al.*, 1995).

Modificações Moleculares

Estimativas sugerem que os custos envolvidos no processo de descoberta de um novo fármaco alcance 800 milhões de dólares e pode durar por até 12 anos (DIMASI, HANSEN & GRABOWSKI, 2003). Esse valor controverso poderia desestimular a pesquisa de novos fármacos em países em desenvolvimento, ainda mais em se tratando de fármacos para doenças negligenciadas, como anemia falciforme.

Nesse contexto, a utilização da estratégia baseada na modificação molecular de fármacos ou protótipos conhecidos permite obter estruturas com arquitetura molecular inovadora utilizando princípios da abordagem fisiológica no planejamento racional, sem dispendar tais valores exorbitantes.

A modificação molecular consiste, basicamente, em identificar algum protótipo de estrutura e ação biológica conhecidas, e a partir disso sintetizar congêneres, análogos ou homólogos estruturais do mesmo, obtendo compostos candidatos a fármacos com melhor eficácia e segurança para utilização na terapêutica (FERREIRA *et al.*, 1980).

Utilizando os processos especiais de modificação molecular baseados na hibridação molecular e a latenciação de fármacos foram realizadas as modificações para obtenção dos protótipos deste trabalho (CHUNG *et al.*, 2005; VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

Hibridação molecular como estratégia de obtenção de chaves duplas

A hibridação molecular é uma estratégia racional de planejamento de novos protótipos ou ligantes baseado no reconhecimento pelos receptores de subunidades de duas ou mais moléculas bioativas, que após adequada fusão, leva a uma nova arquitetura molecular que mantém características pré-selecionadas das moléculas tomadas como molde e que pode ser reconhecida por dois ou mais receptores biológicos (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

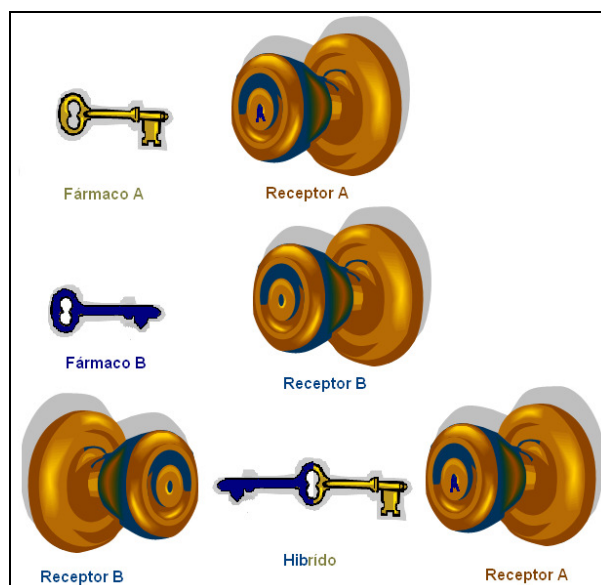
Tem sido proposta a classificação dos híbridos em: conjugados, pré-fundidos e fundidos de acordo com a hibridação do(s) grupo(s) relevantes ao reconhecimento pelo receptor(es). O esquema 2 representa os círculos como

subunidades farmacofóricas dos protótipos selecionados. Nos *híbridos conjugados*, esses farmacóforos são unidos por um espaçador através de uma ligação covalente não lábil, e atuam por si sem a necessidade de bioativação química ou enzimática. Quando as subunidades são unidas sem a presença de um espaçador temos os *híbridos fundidos*. Inúmeros são os exemplos da literatura em que as subunidades farmacofóricas se mesclam (se fundem) formando estruturas com menor tamanho, peso molecular e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes do protótipo (MORPHY & RANKOVIC, 2005).



Esquema 2: Classificação dos compostos híbridos de acordo com a estratégia de hibridação utilizada (Adaptado de MORPHY & RANKOVIC, 2005).

De uma maneira simplista, e em analogia com o modelo de chave-fechadura proposto pelo químico Karl Fischer (1901-1958) podemos imaginar a chave como um fármaco e a fechadura como o receptor biológico. Embora essa analogia tenha sua limitação por não considerar a flexibilidade dos ligantes e das biomacromoléculas, ele nos auxilia no entendimento da estratégia da modificação utilizada. Nesse sentido, uma determinada chave deve ser reconhecida por complementaridade por uma fechadura, tal qual um fármaco pelo receptor. Seria proibitiva a interação de uma chave com outra fechadura não própria. Entretanto, na hibridação molecular o reconhecimento molecular por dois receptores planejados leva à obtenção do que se denomina “chave dupla”, em que a partir de uma única chave é possível a interação com duas fechaduras distintas (Esquema 3).



Esquema 3: Hibridação molecular na obtenção de “chaves duplas”.

A utilização da hibridação molecular como ferramenta na busca de novos protótipos quebra o paradigma de “bala mágica”, por que inicialmente se propunha que uma determinada estrutura química deveria interagir seletivamente com um determinado receptor o que não ocorre na hibridação (SUN, 1981). Do ponto de vista clínico, esses híbridos poderiam diminuir a politerapia e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (WERMUTH, 2004).

Compostos que são planejados para atuar em alvos múltiplos frequentemente apresentam eficácia superior contra as doenças de etiologia complexa quando comparados com compostos de alta especificidade para um simples alvo. Ademais, o caráter múltiplo ligante da estrutura apresenta vantagens farmacocinéticas em relação à administração concomitante de dois ou mais fármacos (MORPHY, KAY & RANKOVIC, 2004).

Durante o planejamento da estrutura do composto híbrido uma série de fatores deve ser analisada para manutenção da atividade como, por exemplo, o caráter farmacofórico de cada uma das subunidades envolvidas na estrutura, e se possível o caráter eletrônico e topográfico do receptor com as principais interações envolvidas. Nesse contexto, torna-se dificultada a manutenção da atividade de compostos com relação estrutura-atividade particular (BALDWIN *et al.*, 1979).

Latenciação de fármacos

A latenciação de fármacos é uma estratégia de modificação molecular que possui como objetivo melhorar as propriedades físicas, químicas, biofarmacêuticas ou farmacocinéticas de compostos bioativos melhorando a utilização de fármacos ou novos protótipos. Os compostos obtidos por essa estratégia são denominados pró-fármacos (RAUTIO *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2008).

Segundo a IUPAC o termo pró-fármaco pode ser definido “para algum composto que após biotransformação exibe efeito farmacológico. Pró-fármacos podem ser entendidos como fármacos que contém grupos protetores específicos e não tóxicos usados de uma forma transitória para alterar ou eliminar propriedades indesejáveis de determinado fármaco matriz” (STAŃCZAK & FERRA, 2006).

Cerca de 5-7% dos fármacos utilizados no mundo podem ser considerados pró-fármacos. Dentre esses cabe destacar alguns líderes em venda no mercado farmacêutico mundial como, por exemplo: sinvastatina, lovastatina, omeprazol, enalapril e aciclovir (RAUTIO *et al.*, 2008; ETTMAYER *et al.*, 2004).

Os pró-fármacos podem ser classificados de acordo com Testa (2004) e Chung e colaboradores (2005) em: clássicos, bioprecusores, mistos, dirigidos e recíprocos e serão discutidos a seguir:

Pró-fármacos clássicos

São por si inativos ou menos ativos que o fármaco matriz, e tornam-se ativos após hidrólise (química ou enzimática) liberando o fármaco ativo. Nesse tipo de abordagem se utiliza um transportador inativo e atóxico, que promove a melhoria da atividade terapêutica por aumento de biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento de ação e aumento de seletividade. Em diversas situações a melhoria obtida está relacionada com a modulação da solubilidade do fármaco matriz pela utilização do transportador.

Bioprecursor

Cerca de 23% dos pró-fármacos disponíveis no mercado são bioprecusores (ETTMAYER *et al.*, 2004). Estes podem ser caracterizados por não apresentarem transportador, e a bioativação se dá por hidrólise ou mais frequentemente pelo sistema redox *in vivo* para gerar o metabólito ativo. A zidovudina e a lovastatina são exemplos de pró-fármacos bioprecusores.

Pró-fármacos mistos

Possuem características de pró-fármacos clássicos e de bioprecusores. São inicialmente inativos e necessitam sofrer diversas reações químicas para se converter na forma ativa, aumentando a concentração do fármaco ativo em um sítio de ação específico. Um exemplo é o sistema CDS (*Chemical Delivery System*) proposto por Bodor e Abdelalim (1985) que necessita bioativação do transportador em uma etapa prévia à liberação do fármaco por hidrólise (BODOR & ABDELALIM, 1985).

Pró-fármacos dirigidos

Esta estratégia tem como objetivo reduzir os efeitos tóxicos provocados pela ação inespecífica do fármaco em outros alvos. Utiliza o conhecimento da presença de receptores ou enzimas específicas no sítio de ação para reconhecimento do pró-fármaco que atuará seletivamente no local de ação. Os transportadores podem ser polímeros ou anticorpos. Um exemplo é o sistema ADEPT (*Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*) explorado na obtenção de compostos antineoplásicos mais seletivos (CHUNG *et al.*, 2008).

Pró-fármacos recíprocos

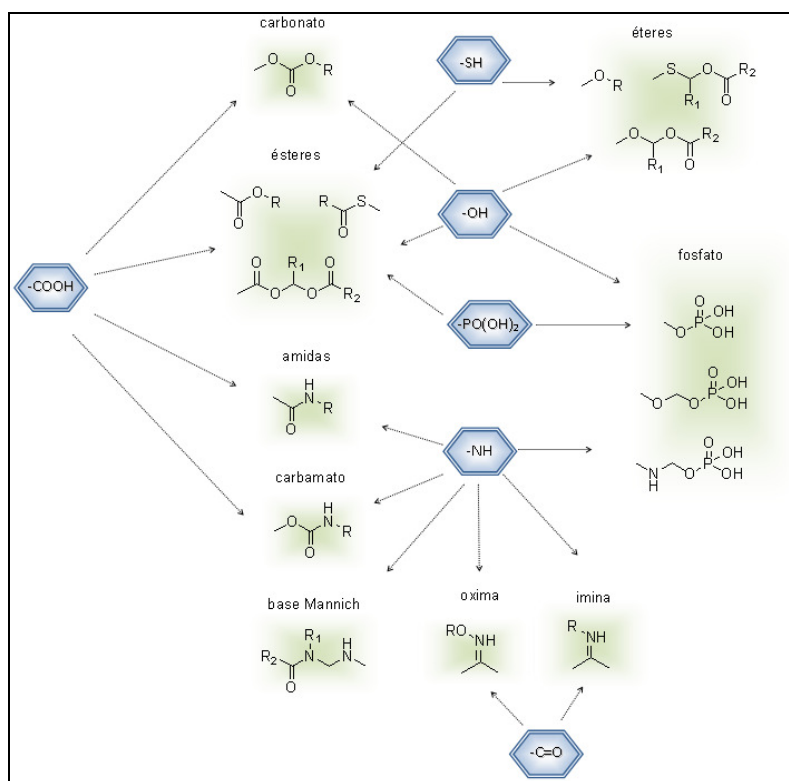
O transportador apresenta atividade biológica após a reação de hidrólise química ou enzimática. O mecanismo de ação do transportador geralmente é diferente, e o pró-fármaco após hidrólise, pode atuar de forma sinérgica em alvos distintos. A utilização dessa estratégia pode diminuir a dose inicialmente utilizada, diminuindo os efeitos adversos e contribui com maior adesão do paciente ao tratamento. A sulfassalazina, utilizada atualmente para tratamento de colite ulcerativa, é o exemplo de fármaco que após bioativação redutiva por ação das azo redutases libera a sulfassalazina e o ácido 5-aminosalicílico (CHUNG *et al.*, 2005).

Pró-fármacos são planejados para superar problemas farmacêuticos e farmacocinéticos associados com a molécula matriz que, caso contrário, poderia ter seu uso clínico limitado. Um grande número de barreiras pode limitar o uso clínico de um fármaco. Na fase farmacêutica, relacionada à obtenção do medicamento, pode-se observar falta de solubilidade, estabilidade, e propriedades organolépticas indesejáveis, etc. Com relação à farmacocinética, a latenciação tem auxiliado na obtenção de compostos com

melhor perfil de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Problema de toxicidade relacionados a irritação local ou a distribuição em outros tecidos pode ser solucionada com os pró-fármacos (FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980; ETTMAYER *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2005).

Os principais critérios a serem avaliados durante o planejamento de pró-fármacos incluem: presença de grupos funcionais passíveis de sofrer derivatização através de ligações lábeis, presença de sistemas enzimáticos que regenerem *in vivo* a molécula matriz ou bioativem o pró-fármaco e predição de fenômenos como toxicidade e instabilidade do pró-fármaco, baseados nos conceitos da química farmacêutica e medicinal, e que inviabilizariam a estrutura proposta.

Os principais grupos químicos e suas respectivas ligações lábeis são representados no esquema 4:



Esquema 4: Principais grupos funcionais (azul) e ligações lábeis (verdes) dos pró-fármacos que após hidrólise química ou enzimática libera o fármaco matriz. (adaptado de RAUTIO *et al.*, 2008).

Devido à falta de investimento em pesquisa pelas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas, esta é uma importante abordagem do ponto de vista prático e econômico que permite obter compostos (pró-fármacos) com propriedades biofarmacêuticas, físico-químicas e organolépticas mais adequadas, quando comparados ao fármaco matriz.

5- Material e Métodos

1- Reagentes

- ✦ (3-aminofenil)metanol (Across);
- ✦ (4-aminofenil)metanol (Across);
- ✦ 2-(4-aminofenil)etanol (Across);
- ✦ 2,4-dinitrofenilhidrazina (Across);
- ✦ acetato de etila (Chemis);
- ✦ ácido acético glacial (J.T. Baker);
- ✦ ácido antranílico (Fluka);
- ✦ ácido clorídrico 37% (Synth);
- ✦ ácido clorossulfônico (Vetec);
- ✦ ácido *m*-aminobenzóico (Fluka);
- ✦ ácido monocloroacético (Fluka);
- ✦ ácido nítrico 98% (Vetec);
- ✦ ácido *p*-aminobenzóico (Fluka);
- ✦ ácido sulfúrico concentrado (Synth);
- ✦ água destilada;
- ✦ álcool cinâmico (Fluka);
- ✦ anidrido ftálico (J.T. Baker);
- ✦ anilina (Synth);
- ✦ bicarbonato de sódio (Across);
- ✦ bis(trimetilsilil)amida 1 M em THF (Sigma);
- ✦ carbonato de potássio (Synth);
- ✦ carbonato de sódio (Synth);
- ✦ cianeto de potássio (Merck);
- ✦ cloreto de sódio (Synth);
- ✦ cloreto de tionila (Merck);
- ✦ cloridrato de cisteínamina (Sigma);
- ✦ crotonaldeído (Across);
- ✦ dicitlohexilcarbodiimida (Fluka);
- ✦ diclorometano (Chemis);
- ✦ dimetilaminopiridina (Sigma);
- ✦ dióxido de manganês (IV)(Merck);
- ✦ etanol (Chemis);
- ✦ etanolamina (Sigma);
- ✦ éter dietílico (Merck);
- ✦ ftalimida (Across);
- ✦ hexano (Chemis);
- ✦ hidrato de hidrazina 64% (Across);

- ✦ hidreto de sódio em óleo mineral (Merck);
- ✦ hidróxido de potássio (Merck);
- ✦ hidróxido de sódio (Merck);
- ✦ mesalazina (Henrifarma);
- ✦ metanol (Synth);
- ✦ *N*-(2-hidroxietil)ftalimida (Across);
- ✦ *N*-bromopropilftalimida (Merck);
- ✦ nitrito de sódio (Merck);
- ✦ *N,N*-dimetilformamida (Sigma);
- ✦ *p*-aminofenol (Sigma);
- ✦ permanganato de potássio (Merck);
- ✦ peróxido de hidrogênio 30% (Vetec);
- ✦ sílica para coluna 0,06-0,2 mm (Across);
- ✦ sódio metálico (Merck);
- ✦ sulfato de magnésio anidro (Synth);
- ✦ sulfato de sódio anidro (Synth);
- ✦ terra de diatomáceas (VETEC)
- ✦ tetrahidrofurano (Merck);
- ✦ tiofenol (Across);
- ✦ tricloreto de fósforo (Merck);
- ✦ trietilamina (J.T. Baker);

2- Equipamentos

- ✦ espectrômetro Bruker, modelo DRX-400 (400 MHz);
- ✦ espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu;
- ✦ espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu;
- ✦ aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific;
- ✦ analisador elementar Perkin-Elmer CHN 2400.

3- Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-30 g) machos e fêmeas, adultos, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas e com livre acesso a água. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEP 02/2009).

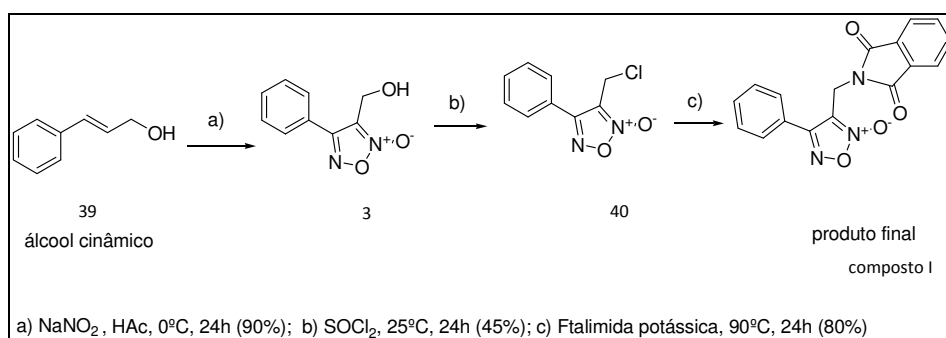
4- Métodos

4.1- Metodologias sintéticas

O planejamento sintético para obtenção dos produtos finais desejados envolve múltiplas etapas. Inicialmente foram sintetizados os derivados furoxânicos e ftalimídicos adequadamente funcionalizados. Estes intermediários sintéticos foram posteriormente acoplados para obtenção dos produtos finais.

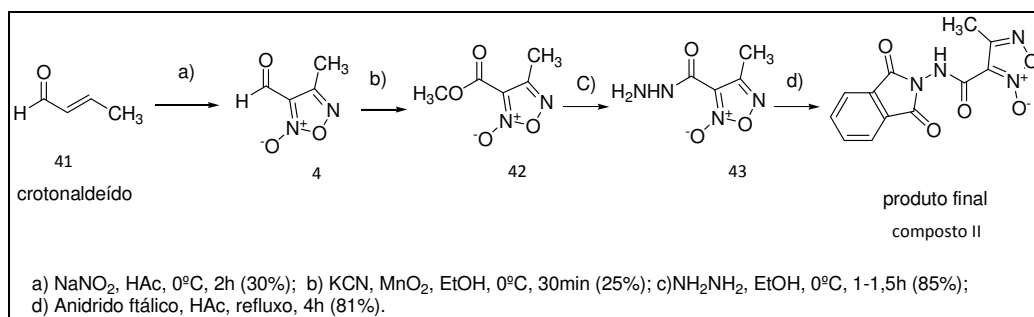
Foram obtidos três derivados furoxânicos (3-5) que foram selecionados de acordo com a capacidade variável de doação de óxido nítrico (SCHOENAFINGER, 1999; CERECETTO & PORCAL, 2005). Dois dos derivados foram obtidos explorando a reação de alcenos com trióxido de dinitrogênio para formação do sistema aromático *N*-óxido-1,2,5-oxadiazol. O derivado bis-aryl-sulfonil furoxano (5) foi obtido através de múltiplas etapas sintéticas.

No esquema 5 o produto final (composto I) foi obtido através de três etapas sintéticas. Inicialmente obteve-se o derivado hidroximetilfenilfuroxano (3) a partir da reação do álcool cinâmico (39) com nitrito de sódio em meio com ácido acético. Este derivado funcionalizado foi interconvertido em seu cloreto de alquila (40) usando cloreto de tionila como agente clorante. Na última etapa, a ftalimida atuando como nucleófilo na presença de solvente polar aprótico substitui cloro em uma reação S_N2 (substituição nucleofílica bimolecular). Este esquema sintético leva à obtenção do produto final desejado com rendimentos globais de 32,4 %.



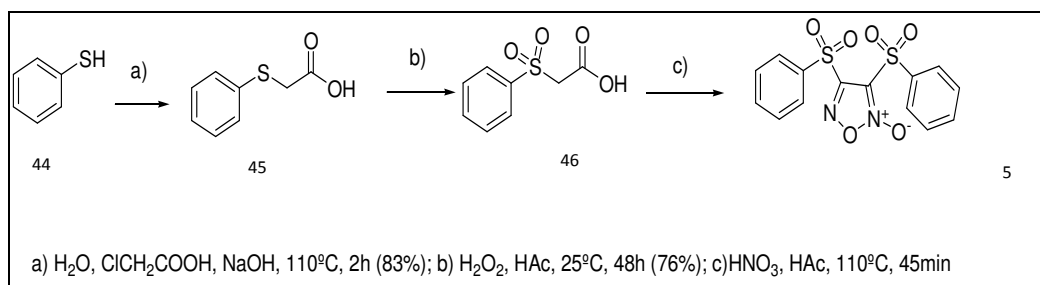
Esquema 5: Obtenção do composto I obtido a partir do álcool cinâmico (39).

A partir da reação entre crotonaldeído (41) e nitrito de sódio em meio com ácido acético se obtém o derivado furoxânico aldeídico (4). Esta função aldeído é oxidada usando dióxido de manganês e cianeto de potássio ao éster metílico (42) em baixos rendimentos (25%). Explorando as reações de substituição nucleofílica, o grupo éster é transformado na hidrazida (43) usando hidrato de hidrazina como reagente com rendimentos de 85% e tempos reacionais que variam de 1-1,5 h. Essas hidrazidas são reagidas sob refluxo com anidrido ftálico usando ácido acético como solvente durante 4 horas. Essa ultima etapa de condensação leva à obtenção do produto final desejado (composto II) com rendimento de 81%. O rendimento global para obtenção desse produto é baixo (5,16%) (Esquema 6).



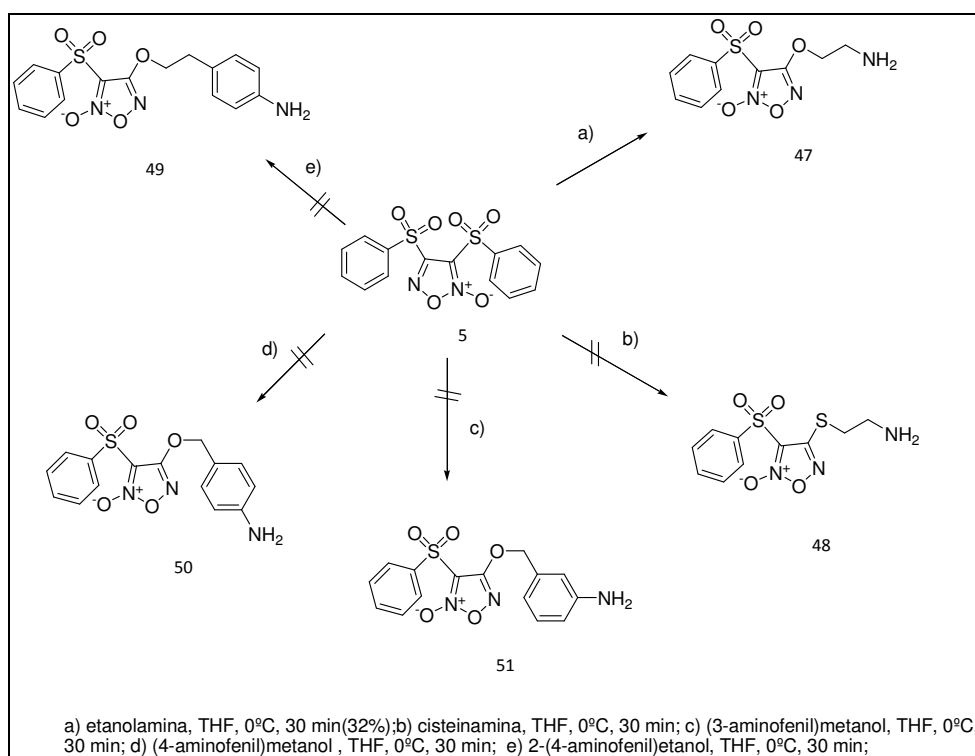
Esquema 6: Obtenção do composto II obtido a partir do crotonaldeído.

O bis-aril-sulfonil furoxânico (5) foi obtido através de três etapas sintéticas: 1) explorando a nucleofilicidade do íon tiofenóxido realizou-se uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, em que ocorre substituição do átomo de cloro do ácido monocloraacético pelo enxofre do grupo tiol formando o sulfeto; 2) em uma segunda etapa, o sulfeto (45) é oxidado à sulfona (46) usando como agente oxidante peróxido de hidrogênio 30% ou permanganato de potássio; 3) em uma última etapa, a sulfona é reagida com ácido nítrico 90% para formação do núcleo bis-aril-sulfonil *N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (5) (Esquema 7).



Esquema 7: Obtenção do derivado bis-aryl-sulfonyl furoxano (5).

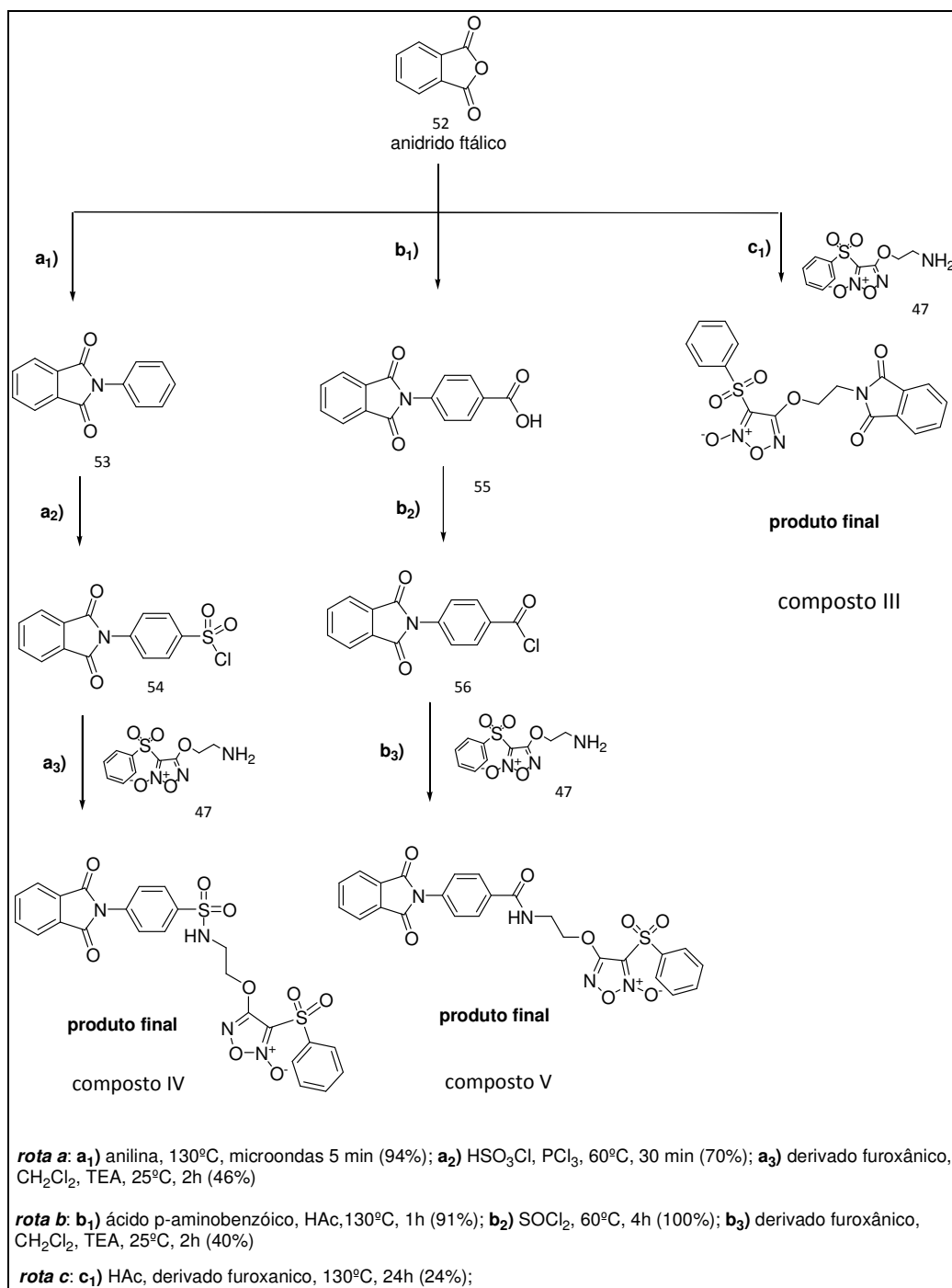
Este derivado bis-aryl-sulfonyl furoxano (5) é funcionalizado com substituintes adequados através de reações de substituição nucleofílica aromática para permitir a reação de acoplamento com os derivados ftalimídicos (Esquema 8).



Esquema 8: Obtenção dos derivados fenilsulfonylfuroxânicos funcionalizados.

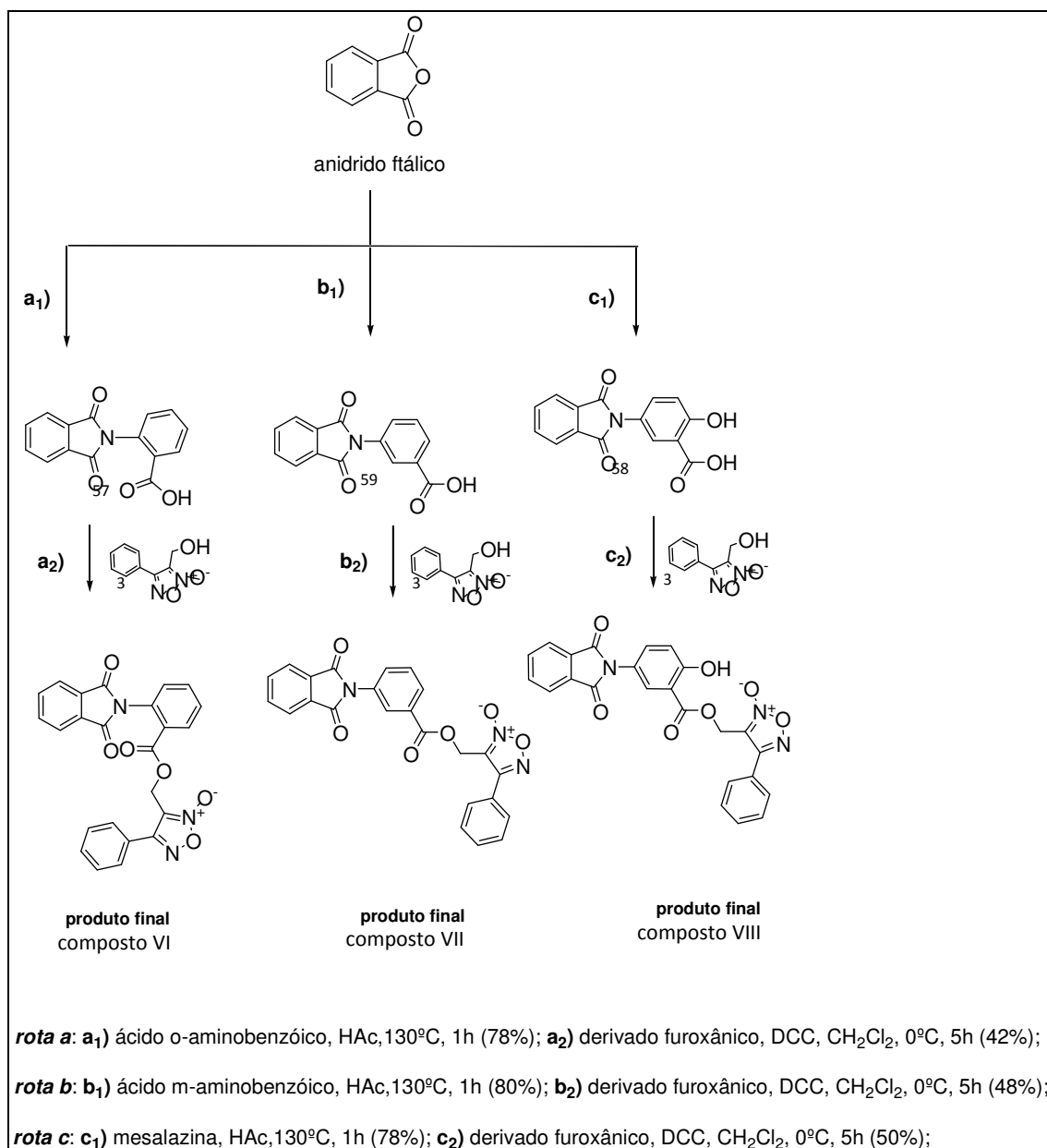
Os derivados ftalimídicos foram preparados através de reações de condensação entre o anidrido ftálico (52) e derivados aminados previamente selecionados, levando em consideração a relação estrutura-atividade biológica do núcleo ftalimídico, tido como farmacóforo na inibição da citocina pró-inflamatória TNF- α . Ademais, esses derivados deveriam estar adequadamente funcionalizados para posterior reação de acoplamento com a subunidade furoxânica. Experimentalmente os derivados ftalimídicos podem ser obtidos utilizando aquecimento convencional ou radiação em microondas com ótimos rendimentos reacionais (entre 78-91%) e mínima formação de impurezas (SANTOS, LIMA & CHUNG, 2006; HESS *et al.*, 2001).

No Esquema 9 a seguir, o intermediário 47 foi reagido com derivados ftalimídicos [cloretos de ácido (56) e cloreto de sulfonila (54)] em reações de substituição nucleofílica (SN_2), e permitiram o acoplamento entre as duas subunidades para obtenção dos produtos híbridos finais desejados (rota **a** e **b**). Explorando-se a nucleofilicidade da amina primária do intermediário 47 também se realizou a reação com anidrido ftálico para formação de outro produto final derivado ftalimídico (rota **c**).



Esquema 9: Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais III, IV e V.

Outra série de compostos foi obtida através da reação do derivado hidroximetilfenil furoxano (3) com derivados ftalimídicos funcionalizados (55, 57, 58 e 59) utilizando agentes acoplantes para formação de ésteres dos compostos híbridos desejados (compostos VI, VII e VIII) (Esquema 10).



Esquema 10: Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais VI-VIII.

4.2- Métodos Analíticos

4.2.1- Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.)

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

4.2.2. Espectrometria de RMN ¹H e RMN ¹³C

Os espectros de RMN ¹³C e ¹H foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo DRX-400 (400 MHz) utilizando como solventes D₂O, CDCl₃ e DMSO-d₆ do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e da Central Analítica – USP SP.

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

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

4.2.4. Determinação da faixa de fusão

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

4.2.5. Análise Elementar

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

4.3– Ensaios

4.3.1- Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético (COOLIER *et al.*, 1968).

A atividade analgésica periférica dos compostos foi avaliada no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Neste ensaio os animais são pré-tratados com os compostos I, III, IV, V e VII por via oral na concentração de 100 µmol/kg (0,1 mL/20g) ou com o fármaco padrão dipirona (v.o.; 100 µmol/kg; 0,1 mL/20g). No grupo controle negativo é administrado por via oral suspensão de goma arábica 5%. Após 1 hora da administração das substâncias é injetada por via intraperitonal uma solução de ácido acético 0,6% (0,1mL/10g camundongo) e registra-se durante 30 minutos o número de contorções. A diminuição do número de contorções está relacionada à atividade analgésica periférica dos compostos, e é expressa pela fórmula:

$$\% \text{ atividade analgésica} = \frac{n-n'}{100n} \quad (1)$$

Onde: n= média do número de contorções do grupo controle (goma arábica 5%);

n'= média do número de contorções do grupo teste (compostos)

Preparo das substâncias

Todas as substâncias foram preparadas em suspensão de goma arábica 5% na dose de 100 µmol/Kg. A goma arábica 5% não apresentou atividade analgésica e teve o mesmo número de contorções da solução salina (resultados não mostrados).

Análise Estatística

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

4.3.2– Detecção quantitativa de nitrito (SORBA et al., 1997)

O NO em solução rapidamente se oxida em nitritos e nitratos, por isso a quantificação da concentração de nitrito é uma forma indireta de mensurar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos. Neste ensaio uma solução do respectivo derivado furoxânico e padrões (20 μL) em DMSO foi adicionado a tubo contendo 2 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo 0,5 mM ou 5 mM de cisteína, ou ainda na ausência de cisteína. A concentração final do composto foi 10^{-4}M . Após 1 hora a 37°C , 1 mL dessa solução foi tratada com 250 μL do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente para que ocorresse a reação e a absorvância foi medida a 540 nm. Os experimentos, realizados em triplicata, foram repetidos por mais 3 vezes em dias distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO_2^-) mol/mol \pm erro padrão da média.

Preparação das amostras: Pesou-se 0,0101 mol do composto a ser testado (derivados furoxânicos e padrões) e solubilizou-os em 1 mL de dimetilsulfóxido.

Preparação do tampão fosfato 50 mM (pH 7,4): 0,68 g de fosfato de potássio monobásico foi solubilizado em 80 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado, com auxílio de equipamento, para valor de 7,4 com hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. Completou-se o volume em balão volumétrico para 100 mL com água destilada. O balão foi protegido da luz.

Preparação do tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo 0,5 mM ou 5 mM de cisteína: 0,68 g de fosfato de potássio monobásico e 60 mg (0,5mM) ou 600 mg (5 mM) de cisteína, conforme procedimento adotado, foi solubilizado em 80 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. Completou-se o volume em balão volumétrico para 100 mL com água destilada. O balão foi protegido da luz.

Preparação do reagente de Griess: Em balão volumétrico de 100 mL adiciona-se 4 g de sulfonamida, 0,2 g de dicloridrato de *N*-naftiletilenodiamina, 20 mL de água destilada e 10 mL de ácido fosfórico. O volume final do balão é completado para 100 mL.

Construção da curva analítica: Para construção da curva analítica foram preparadas soluções-padrão de nitrito de sódio nas concentrações de 10-80 nmol/mL (SORBA et al 1997). Após adição de reagente de Griess, a mistura foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido este

tempo, os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro UV/visível Shimadzu no comprimento de onda de 540 nm.

Detecção de nitrito: Uma solução do respectivo derivado furoxânico e padrões (20 μL) em DMSO foi adicionado a tubo contendo 2 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo 0,5 mM ou 5 mM de cisteína, ou ainda na ausência de cisteína. A concentração final do composto foi 10^{-4}M . Após 1 hora a 37°C , 1 mL dessa solução foi tratada com 250 μL do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro UV/visível. Os experimentos foram realizados em triplicata foram repetidos por mais 3 vezes em dias distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO_2^-) mol/mol \pm erro padrão da média.

6- Resultados e Discussões

Os procedimentos experimentais e as respectivas identificações estruturais estão dispostas na seção Anexos. Para auxílio na interpretação dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN C^{13} e H^1), foram utilizadas as seguintes referências: DYER, 1969; SILVERSTEIN *et al.*, 1994 e PAVIA *et al.*, 1996.

6.1 - Sínteses

6.1.1- Síntese do composto I

O Esquema 5 mostra a estratégia sintética utilizada para obtenção do composto I. Inicialmente o núcleo furoxânico devidamente funcionalizado é obtido através de reação entre álcool cinâmico (*trans*) (39) e nitrito de sódio em meio com ácido acético glacial. Esta reação após purificação por coluna cromatográfica forneceu rendimento de 90%. Embora não se conheça o exato mecanismo reacional para obtenção deste derivado, há proposta de que haja envolvimento de reações radicalares

Um dos aspectos fundamentais nessa reação é a posição da subunidade *N*-óxido, que se mantém predominantemente na forma representada no Esquema 5. Embora não haja na literatura discussão do porquê desse fenômeno acredita-se que a presença da hidroxila do álcool cinâmico auxilie na estabilização da carga negativa do oxigênio através de ligação de hidrogênio intramolecular, durante a formação do produto. Em última instância, esta ligação intramolecular poderia levar à formação de um derivado com menor energia conformacional, portanto com maior estabilidade.

De fato, a distribuição conformacional e as respectivas energias conformacionais (Kcal/mol) calculadas utilizando o programa de modelagem molecular Spartan pro 8.0 (método *semi empírico* AM1) permitiram visualizar 5 diferentes confôrmeros com energias que variaram entre 62,62 – 64,88 Kcal/mol para um dos tautômeros (Figura 15 A). Destes, a conformação de menor energia era aquela em que havia a possibilidade de formação dessa ligação hidrogênio intramolecular.

Quando calculada a energia conformacional do outro possível tautômero (Figura 15 B) observou-se que este apresentou três possíveis confôrmeros, sendo o de menor energia com valor correspondente a 63,4 Kcal/mol, ou seja,

com energia superior (0,78 Kcal/mol a maior) ao tautômero A, provavelmente devido à incapacidade de formação de ligação hidrogênio intramolecular e provável repulsão eletrônica do oxigênio do *N*-óxido e a nuvem eletrônica do sistema aromático.

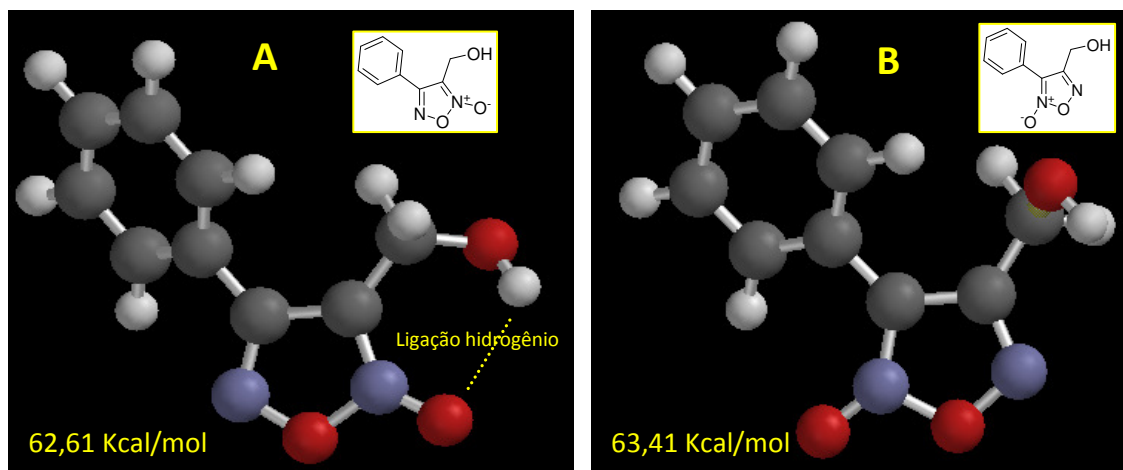
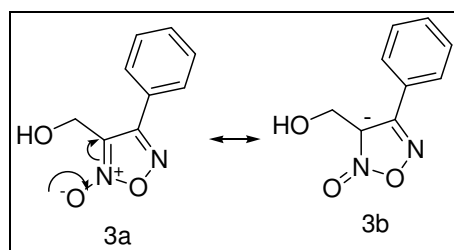


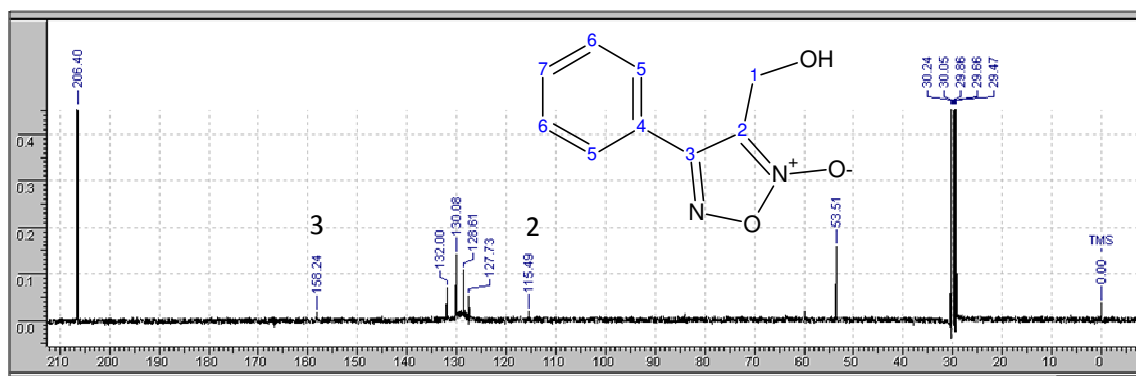
Figura 15: Confôrmeros de menor energia dos dois possíveis tautômeros do composto 3.

Essa poderia ser uma possível explicação para a formação única do tautômero A (Figura 15) durante a síntese. A correta determinação da posição da subunidade *N*-óxido é fundamental porque esta diretamente relacionada à capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos furoxânicos. A caracterização estrutural por ressonância magnética nuclear de carbono (RMN C^{13}) permite identificar inequivocadamente a correta posição desta subunidade, já que devido ao efeito de ressonância há proteção do carbono aromático que tem ligado o grupo hidroximetilênico ($-CH_2OH$) (Esquema 11).



Esquema 11: Efeito protetor em C2 devido à presença da subunidade *N*-óxido.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 1) mostra em δ 53,51 o sinal do carbono metilênico. Também podemos visualizar em δ 115,49 e δ 158,24 a presença dos carbonos do núcleo furoxânico, representados por C2 e C3 respectivamente no Espectro 1. A diferença de deslocamento químico entre esses dois carbonos vizinhos deve-se ao efeito protetor do carbono ligado ao *N*-óxido que aparece em δ 115,49, efeito este não observado com o outro carbono aromático.



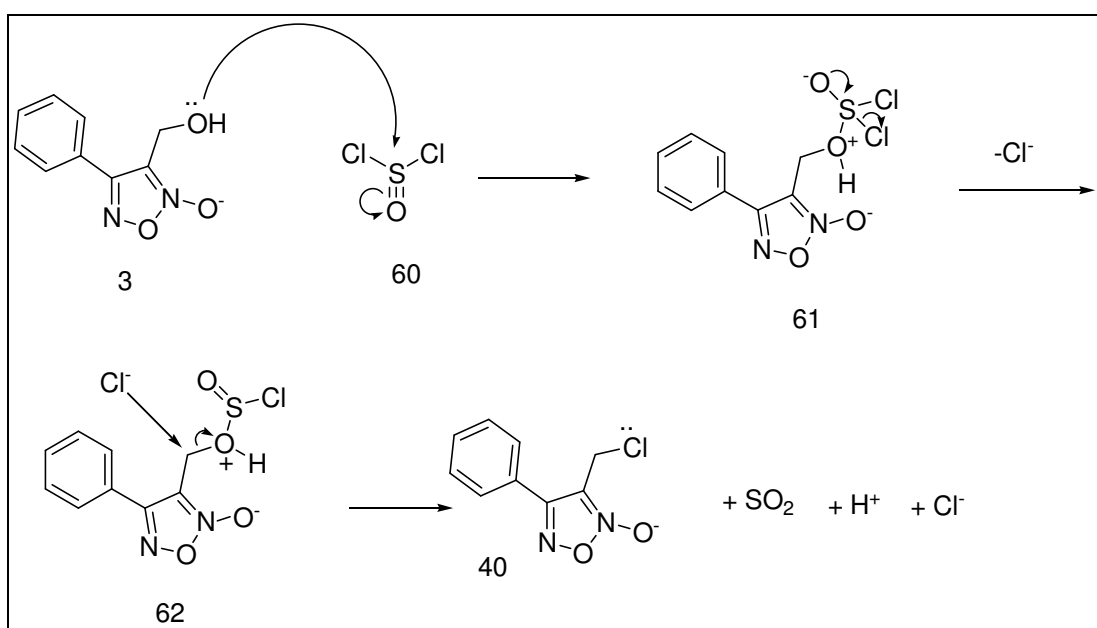
Espectro 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto furoxânico 3 (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona- d_6).

Outras técnicas de caracterização estrutural como RMN H^1 foram realizadas e se encontram no capítulo Anexos. Destaca-se a presença dos hidrogênios metilênicos (CH_2) em 4,72 ppm. A falta de definição das respectivas multiplicidades dos hidrogênios aromáticos é uma característica de muitos derivados furoxânicos, por isso, não foi possível visualizar a multiplicidade dos hidrogênios aromáticos, que a despeito disso, apresentaram correta integração do número de hidrogênios.

A interpretação dos deslocamentos químicos por RMN foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural desse intermediário, e se mostraram idênticas (CERECETTO *et al.*, 1999). A faixa de fusão medida se apresentou na faixa entre 66-67°C, de acordo com os dados descritos.

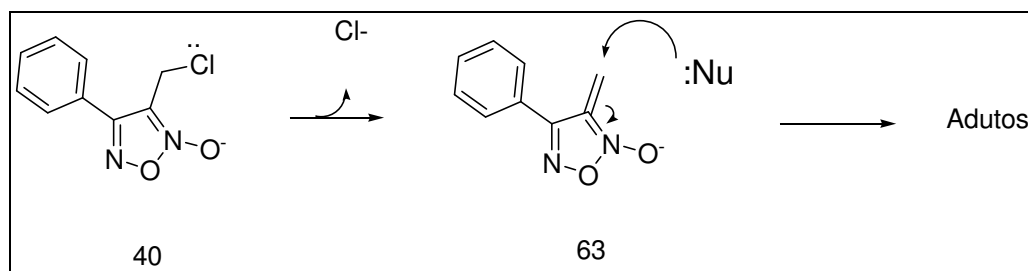
A partir da função álcool (3), de acordo com o Esquema sintético 5, foi realizada a interconversão de grupo funcional ao haleto de alquila, mais especificamente ao cloreto de alquila (40). O cloreto de tionila foi o agente utilizado como agente clorante para essa reação cujo rendimento foi de 45% após purificação cromatográfica. O objetivo dessa modificação foi introduzir um bom grupo abandonador para explorar posteriormente reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$) pela ftalimida potássica.

Do ponto de vista mecanístico, a hidroxila do álcool (3) atuando como nucleófilo ataca o átomo de enxofre do cloreto de tionila que possui deficiência eletrônica por sustentar átomos eletronegativos como cloro e oxigênio. Há formação de um intermediário reativo. Posteriormente, o átomo de carbono metilênico é atacado pelo íon cloreto que atua como nucleófilo. Há eliminação de bom grupo abandonador que se decompõe em dióxido de enxofre e HCl (Esquema 12).



Esquema 12: Mecanismo de reação para obtenção do derivado furoxânico 40.

Tem sido proposto na literatura (CERECETTO *et al.*, 1999) que compostos como o clorometilfenilfuroxano (40) poderia apresentar atividade citotóxica, devido à capacidade deste composto em formar adutos com biomacromoléculas. O mecanismo para tal ação se daria pela eliminação do cloro e formação de uma espécie $N=O$ α,β -insaturada. Esta espécie funcionando como aceptor de Michael poderia sofrer adição de um bionucleófilo (ex. ADN) e formar adutos tóxicos (Esquema 13). Esse tipo de abordagem pode ser explorado para obtenção de agentes antineoplásicos.



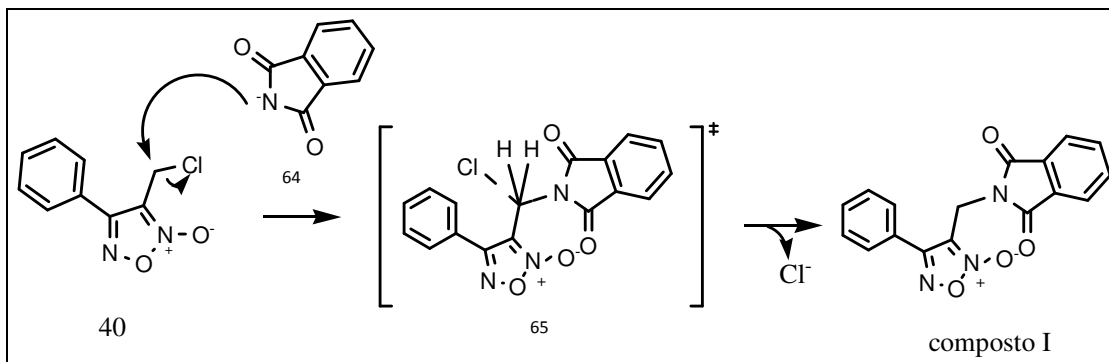
Nu - bionucleófilo

Esquema 13: Modo de ação do clorometilfuroxano (40) como agente citotóxico.

A análise pelo espectro de RMN H^1 dos hidrogênios metilênicos deste composto mostraram deslocamento de δ 4,82 aparecendo como um singlete. Quando se compara esse espectro com o reagente hidroxilado (3) observamos que os hidrogênios metilênicos deslocam-se de δ 4,72 (reagente hidroxilado) para δ 4,82 (cloreto). Esperar-se-ia efeito contrário, já que o átomo de oxigênio possui maior eletronegatividade que o átomo de cloro. Entretanto, não devemos analisar apenas o efeito indutivo, nesse caso a capacidade do átomo de oxigênio realizar ressonância poderia explicar esse efeito eletroatrator menos pronunciado que o deslocamento esperado.

Em uma última etapa, explorando a acidez do hidrogênio da ftalimida, em uma típica reação ácido-base, obteve-se o sal potássico quando a ftalimida foi reagida em meio etanólico com hidróxido de potássio.

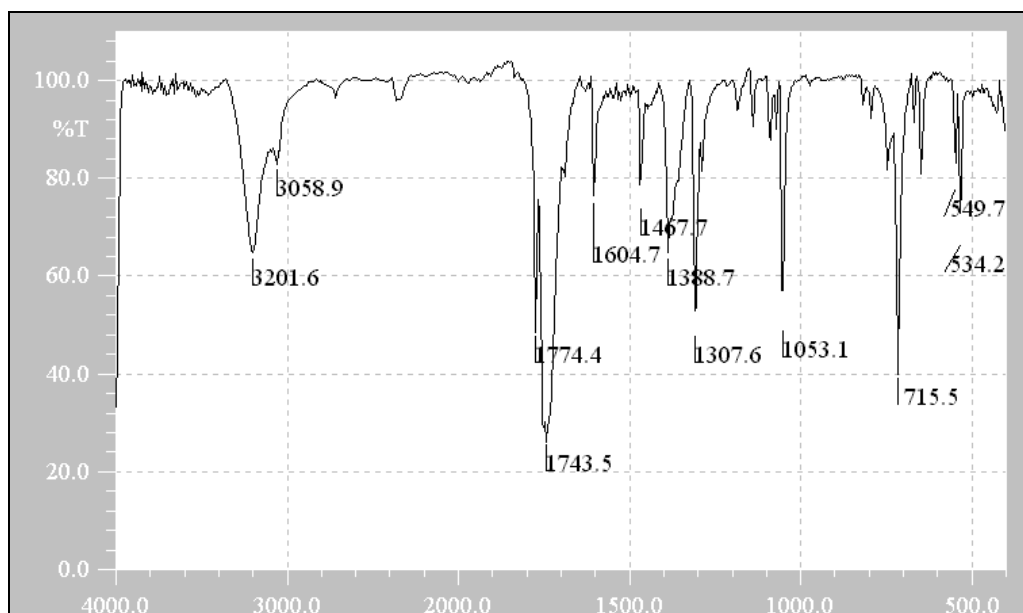
A ftalimida potássica (64) atuando como nucleófilo ataca o carbono metilênico que sustenta o átomo de cloro (40) e realiza a substituição nucleofílica bimolecular (SN_2) (Esquema 14). As reações SN_2 são favorecidas na presença de solventes polares apróticos como, por exemplo, a dimetilformamida utilizada como solvente da reação.



Esquema 14: Mecanismo de reação para obtenção do composto I.

As reações de substituição nucleofílica, explorando a ftalimida potássica como nucleófilo, são bem conhecidas na química orgânica clássica onde a subunidade ftalimídica atua como grupo protetor ou ainda é explorada em reações para obtenção de aminas primárias - síntese de Gabriel.

Obtém-se assim o composto I (produto final) que foi caracterizado por infravermelho, RMN H^1 , C^{13} e espectrometria de massas. No infravermelho, a principal modificação observada é a presença dos estiramentos axiais simétricos e assimétricos das carbonilas do sistema imídico da ftalimída que aparecem em 1774 cm^{-1} e 1743 cm^{-1} e ausência do estiramento C-Cl. Segundo a literatura, os estiramentos associados à presença do anel furoxânico aparecem em aproximadamente 1600 cm^{-1} - 1640 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} , entretanto, no espectro 2 não pode ser destacado de forma inequívoca por ser esta uma região de impressão digital, onde aparecem também os estiramentos axiais carbono-carbono aromáticos (BOYER, 1986).



Espectro 2: Espectro no infravermelho do produto final (composto 1) (pastilha de KBr).

Assim, tornam-se necessários outros métodos de caracterização estrutural como RMN e massas. No RMN H^1 além da presença dos hidrogênios aromáticos da ftalimida entre δ 4,74 e δ 4,82 observamos que os hidrogênios metilênicos deslocam quando comparados ao composto 40 (cloreto de alquila) ficando mais desprotegidos e aparecendo em δ 4,95.

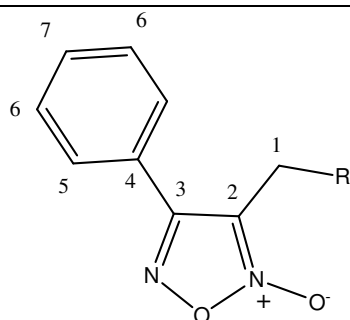
Pelo espectro de RMN C^{13} observamos a carbonila do sistema ftalimídico em δ 169,28. O sistema ftalimídico também pode ser observado nos deslocamentos químicos dos carbonos em δ 134,36 (C2), δ 122,95 (C1) e δ 131 (C3). O sistema furoxânico pode ser caracterizado pela presença dos deslocamentos δ 157,22 (C7) e δ 112,6 (C6) do núcleo furoxânico e o carbono metilênico em δ 52,12 (C5).

Devido à maior dificuldade de caracterização estrutural desse composto foi utilizada a técnica LC/MS. Neste experimento, pode-se caracterizar através da espectrometria de massas alguns dos fragmentos mais relevantes destacados a seguir: (m/Z) 321 (3% - pico íon molecular) e 305 (3,3%) relativo à perda do oxigênio da função *N*-óxido.

Este produto final, obtido com rendimentos globais de 32,4%, detém a subunidade furoxânica tida como doadora de óxido nítrico e a subunidade ftalimídica – inibidora da síntese de TNF-alfa.

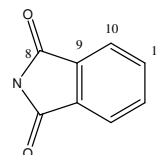
Na Tabela 2 podemos comparar o deslocamento químico dos derivados furoxânicos (3 e 40). Um dos principais efeitos eletrônicos se dá nos hidrogênios metilênicos que se deslocam no espectro de RMN de acordo com o substituinte que possui ligado a si. Dessa forma, analisando os dados do espectro de RMN H^1 podemos observar que de acordo com a maior eletronegatividade do substituinte há maior desproteção do carbono metilênico. Esperaríamos maior desproteção dos hidrogênios metilênicos ligados à hidroxila, seguido pelo nitrogênio do sistema imídico da ftalimida e por último aqueles ligados ao átomo de cloro. Entretanto, a capacidade dos átomos de oxigênio realizar ressonância explica o efeito protetor observado no deslocamento químico do derivado hidroxilado (3) em relação ao cloreto e à ftalimida (40). O composto I não pode ser usado na Tabela 2 para fins comparativos quanto ao efeito eletrônico do carbono metilênico, haja vista que o solvente utilizado no experimento foi o DMSO, que por efeito de solvatação, desprotege naturalmente.

Tabela 2 : Comparação dos deslocamentos químicos devido a presença do grupo R.



R = OH (3)

Cl (40)



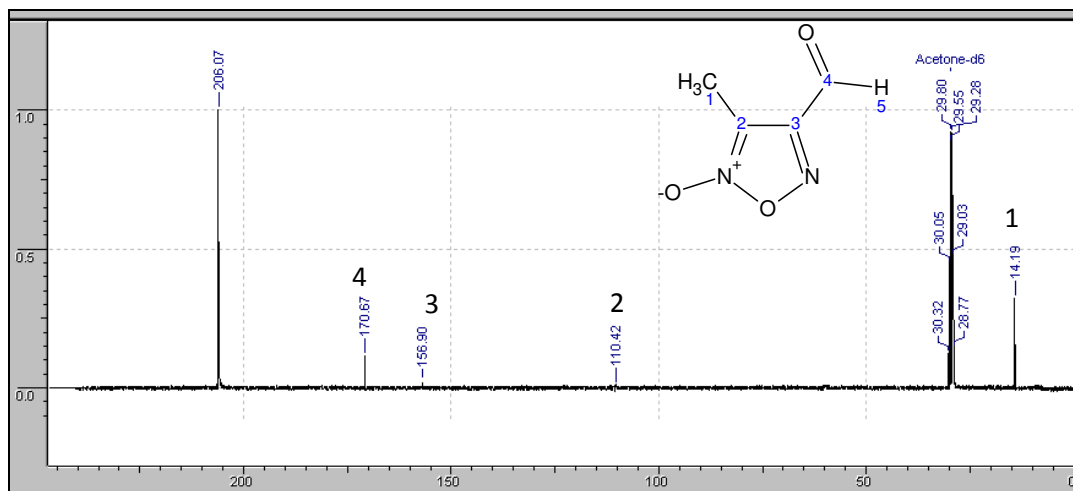
(composto I)

	Composto 3 (OH)		Composto 40 (Cl)		Composto I (ftalimídico)	
Posição	RMN H ¹ (δ)	RMN C ¹³ (δ)	RMN H ¹ (δ)	RMN C ¹³ (δ)	RMN H ¹ (δ)	RMN C ¹³ (δ)
1	4,72	53,81	4,82	34,29	4,95	52,12
2	-	158,6	-	157,4	-	157,22
3	-	115,5	-	114,5	-	112,6
4	-	132,31	-	132,63	-	132,61
5	7,97	130,39	7,84	130,63	7,87	129,35
6	7,81	128,92	7,63	128,71	7,57	128,06
7	7,81	128,03	7,63	127,13	7,57	127,65
8	-	-	-	-	-	169,2
9	-	-	-	-	-	131
10	-	-	-	-	7,82	134,6
11	-	-	-	-	7,74	122,95

6.1.2 - Síntese do composto II

O produto final (composto II) foi obtido de acordo com o planejamento sintético descrito no esquema 6. A partir da reação entre o *trans*-crotonaldeído (41) e o nitrito de sódio em meio contendo ácido acético a 0°C obteve-se o derivado furoxânico com rendimento de 30% após purificação cromatográfica. Esse baixo rendimento pode ser explicado pela formação de subprodutos com fator de retenção (*R_f*) próximo ao produto desejado, dificultando a separação. O mecanismo reacional parece ser semelhante ao descrito para formação do composto 3 e deve envolver reações radiculares.

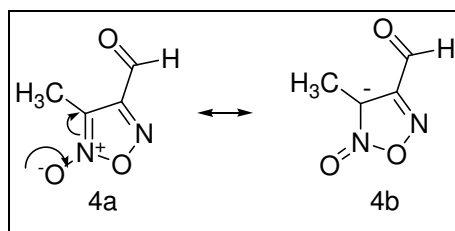
Ainda que cálculos de modelagem molecular demonstrem menor energia conformacional do tautômero contendo a subunidade *N*-óxido vizinha ao carbono detentor da grupo aldeídico, espectros de RMN C^{13} apontam que o produto majoritário identificado trata-se do tautômero representado no esquema 6 (composto 4). Isso pode ser facilmente visualizado em espectros de correlação como, por exemplo, HMBC. A seguir, no espectro 3 observamos os deslocamentos químicos dos átomos de carbono do composto 4.



Espectro 3: Espectro de RMN C^{13} do aldeído furoxano (4) (C^{13} RMN; 200 MHz; acetona- d_6).

O espectro de RMN C^{13} apresenta os sinais dos substituintes do núcleo furoxânico representados pela carbonila do aldeído em δ 170,67 e o carbono da metila em δ 14,19. O sistema aromático furoxânico apresenta dois carbonos que aparecem respectivamente em δ 156,9 (C3) e δ 110,42 (C2) (Espectro 3). Essa diferença de deslocamento químico entre esses carbonos se deve ao

efeito protetor que o oxigênio da subunidade *N*-óxido realiza no carbono conforme mostrado pela estrutura de ressonância a seguir (Esquema 15):



Esquema 15: Efeito protetor em C2 devido à presença da subunidade *N*-óxido.

A interconversão tautomérica não é um fenômeno comum em ocorrer no núcleo furoxânico, mas essa situação pode ser possível em temperaturas mais elevadas.

O derivado furoxânico aldeídico foi oxidado e convertido ao éster metílico (42) em baixos rendimentos (25%). O dióxido de manganês é agente oxidante não seletivo e poderia levar à oxidação da metila substituinte do núcleo furoxânico. Por isso, determinou-se o tempo reacional como sendo 30 minutos, porque maiores tempos reacionais levariam à formação de outros produtos de oxidação não desejados. O isolamento reacional acaba sendo realizado antes do completo consumo do reagente aldeídico fato este que justifica o baixo rendimento.

Em uma segunda etapa explorando a deficiência eletrônica da carbonila do éster metílico, é realizada a substituição nucleofílica (S_N2) com eliminação do metóxido (⁻OCH₃) que pode capturar um próton do meio e se converter a metanol. Há formação da hidrazida (43) com rendimento de 85%. O tempo reacional é curto, porque, caso essa reação prossiga por períodos maiores, pode ocorrer decomposição do núcleo furoxânico e formação de subprodutos. Isso ocorre em parte devido à presença de dois possíveis sítios eletrofílicos na estrutura do éster metílico do metilfuroxano (42): um dos sítios poderia ser o carbono carbonílico (sítio desejado) e o outro o carbono do núcleo heteroaromático furoxânico que sustenta a subunidade *N*-óxido. Assim, caso a base hidrazina, atuando como nucleófilo, ataque este carbono haveria rompimento e degradação do anel furoxânico.

Utilizando o programa Spartan pro 8.0 foi obtido o mapa de potencial eletrostático do éster metílico (42) representado na Figura 16. Em vermelho esta representado as regiões ricas eletronicamente e em azul-anil as regiões

deficientes eletronicamente e, portanto susceptíveis ao ataque nucleofílico pela hidrazina. Esses resultados corroboram com as observações experimentais.

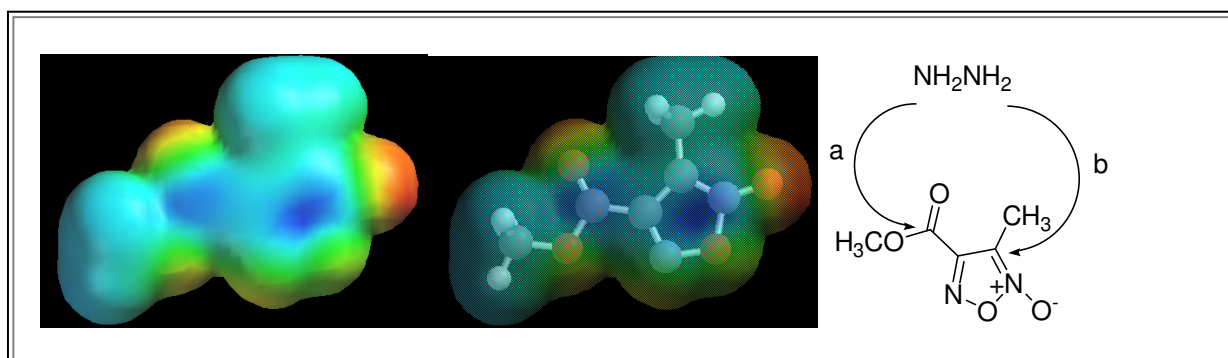
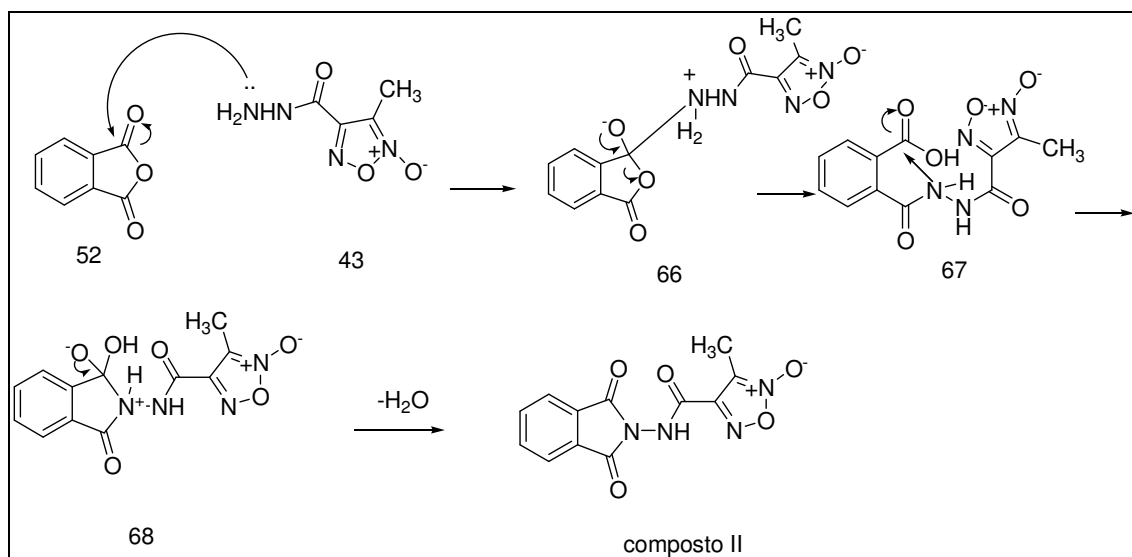


Figura 16: Mapa de potencial eletrostático do éster metílico (42) mostrando os possíveis locais de adição da hidrazina.

Durante as sínteses observou-se relativa instabilidade da hidrazida (43) formada. Por isso, optamos por reagí-la de imediato com anidrido ftálico (52) em uma reação de acoplamento para formação do derivado ftalimídico (composto II). Essas reações de condensação permitiram a obtenção do derivado com ótimos rendimentos (81%).

Do ponto de vista mecanístico a reação ocorre como representado no Esquema 16.

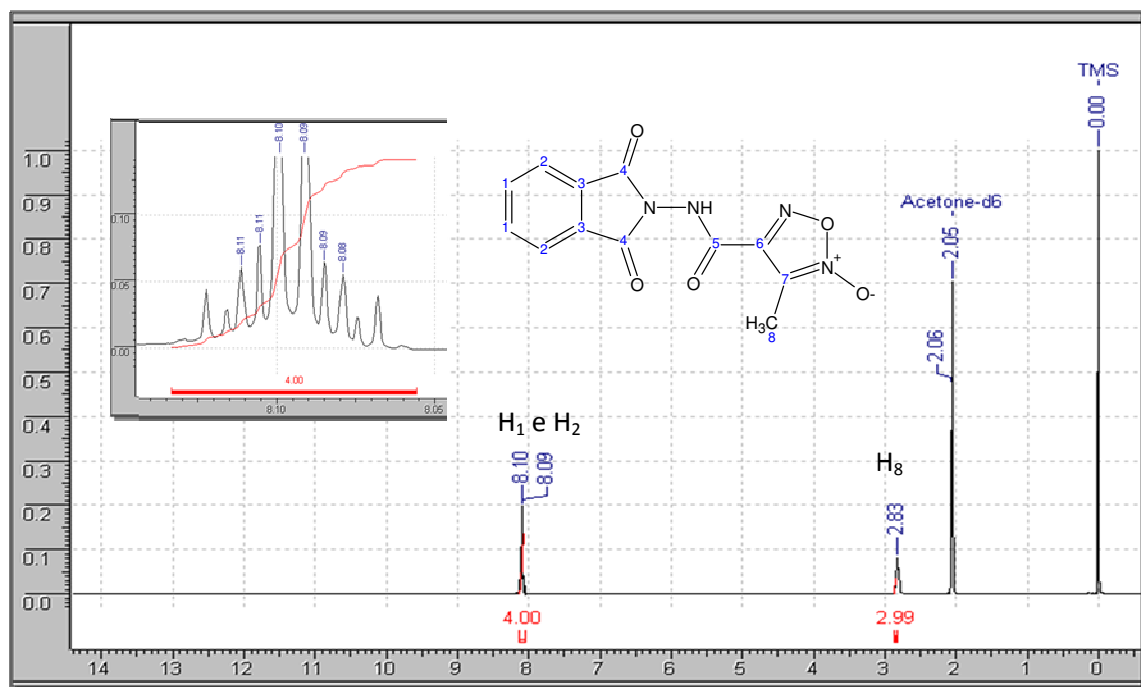


Esquema 16: Mecanismo da reação para obtenção do composto II.

Essa reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina da anilina à carbonila do anidrido ftálico (52), que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Há rompimento da ligação π , e o par de elétrons fica sustentado pelo átomo de oxigênio (66). Ao reestabelecer esta ligação, há quebra da ligação C-O. O par de elétrons da amina realiza outro ataque ao carbono carbonílico (67). Novamente há rompimento de outra ligação π que, ao ser reestabelecida, elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel (68), e formando o derivado ftalimídico (composto II) desejado (Esquema 16).

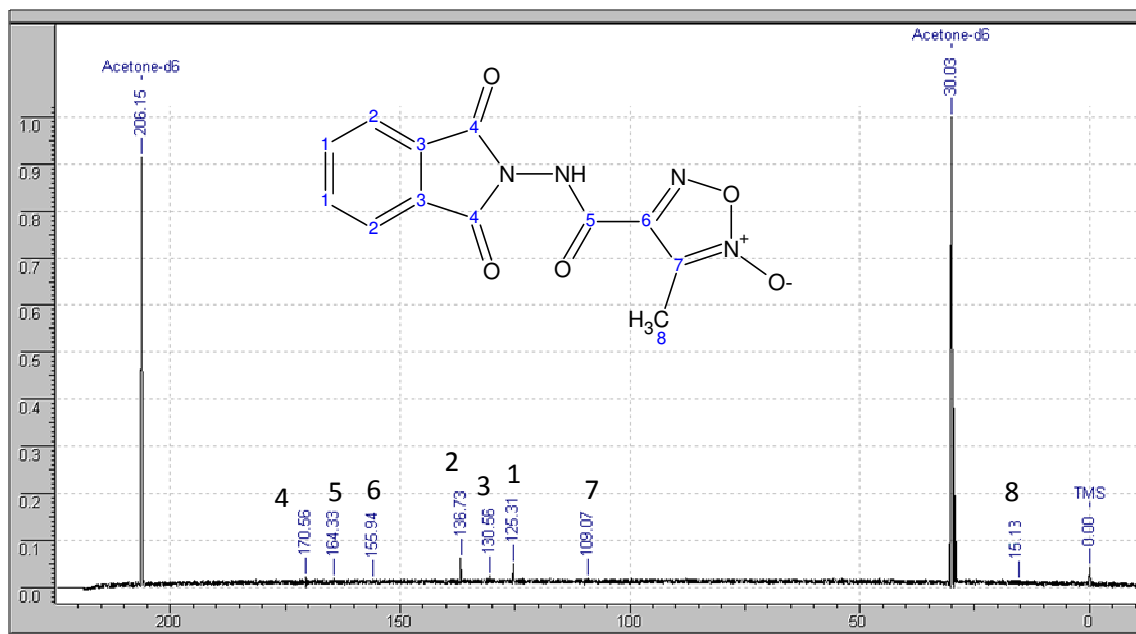
O composto foi caracterizado por RMN C^{13} e H^1 e a despeito da simplicidade estrutural podemos observar neste espectro os sinais relativos aos hidrogênios aromáticos presentes no núcleo ftalimídico representados pelo multipletto e a presença da metila como singletto em δ 2,83 (Espectro 4).

A metila em δ 2,83 do produto final (composto II) encontra-se mais desprotegida que o a do composto 4 (derivado furoxânico aldeídico) que aparece como singletto em δ 2,43, provavelmente decorrente do efeito eletrônico da subunidade ftalimídica introduzida (Espectro 4).



Espectro 4: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (^1H RMN; 400 MHz; acetona- d_6).

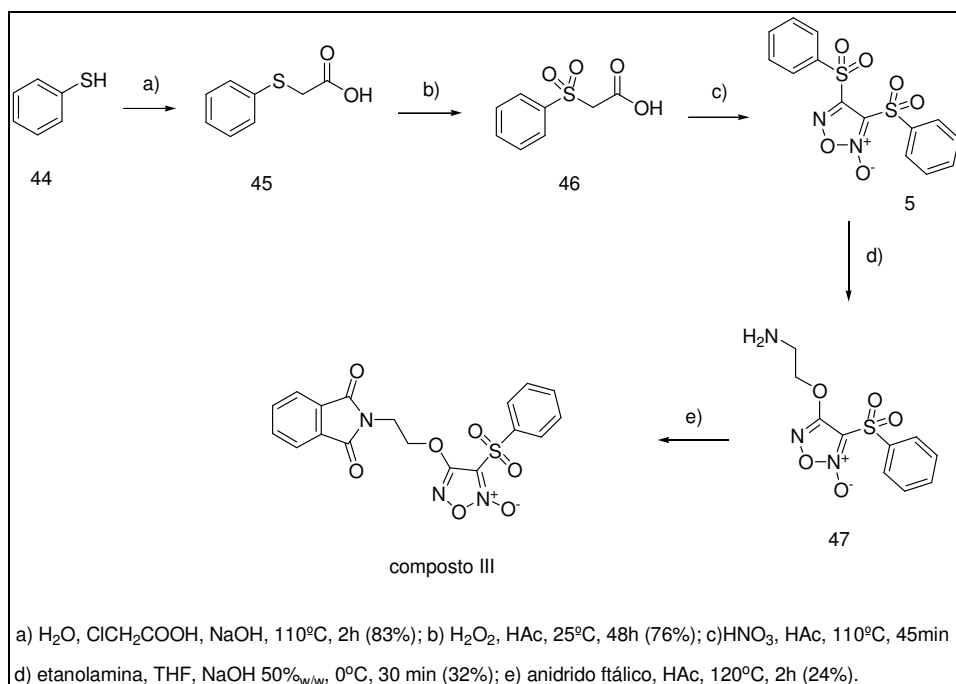
O espectro de RMN C^{13} (Espectro 5) desta estrutura é mais informativo e nos indica a presença do núcleo furoxânico contendo a subunidade *N*-óxido, caracterizado pelos carbonos nos deslocamentos químicos em δ 155,94 (C6) e δ 109,07 (C7). Este último, mais protegido devido ao efeito de ressonância do oxigênio da subunidade *N*-óxido. O espectro 5 mostra a presença da carbonila de amida no deslocamento δ 164,33 referente a C5, e das carbonilas de imida do sistema ftalimídico no deslocamento δ 170,56 em C4. Podemos ainda visualizar a presença dos outros carbonos do sistema ftalimídico em δ 136,73 (C2), δ 125,31 (C1) e δ 130,56 (C3). Esse conjunto de dados nos indica a possibilidade de obtenção do produto desejado com baixos rendimentos globais (5,16%).



Espectro 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (^{13}C RMN; 400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) – ampliação região aromática.

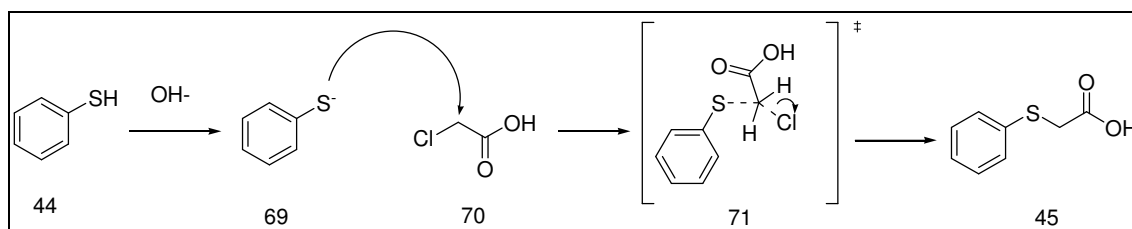
6.1.3 – Síntese do composto III

Após construção e funcionalização do núcleo furoxânico, o composto III foi sintetizado conforme Esquema 17.



Esquema 17: Síntese do composto III

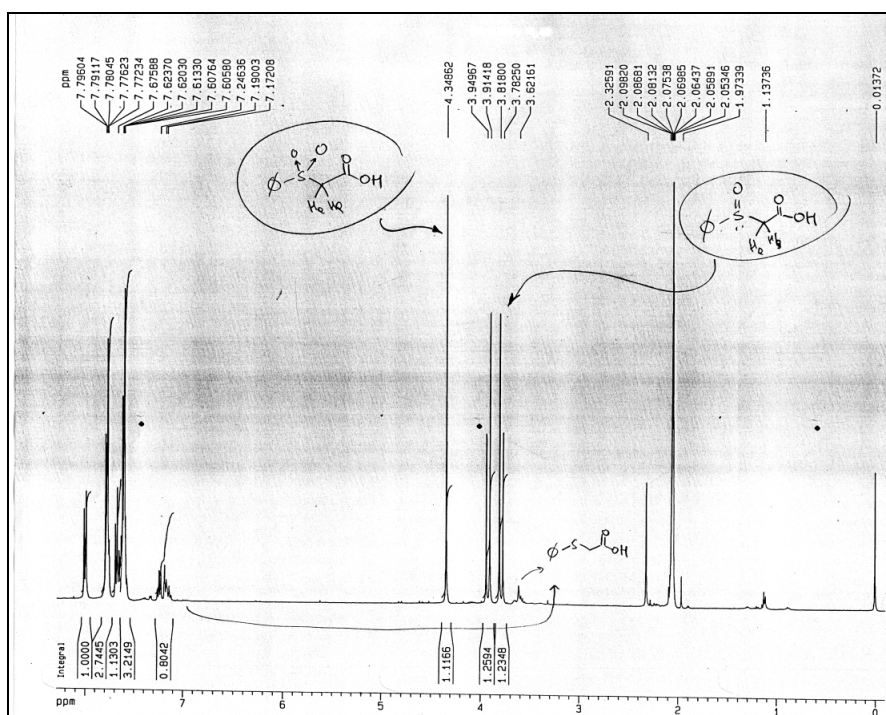
Em meio básico, o tiofenol (44) perde um hidrogênio se transforma no ânion tiofenóxido (99) que é mais nucleofílico. Este através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, ataca o carbono sp^3 do ácido monocloroacético que sustenta o átomo de cloro e apresenta uma deficiência eletrônica por conta da presença deste grupo eletronegativo. Há formação de um estado de transição tetraédrico (71), que depois da saída do íon cloreto (Cl^-) e respectiva inversão da configuração decorrente da reação $\text{S}_\text{N}2$, leva à obtenção do produto desejado (45) com rendimento de 83% e faixa de fusão entre $60\text{--}61^\circ\text{C}$ (Esquema 18).



Esquema 18: Mecanismo de reação para obtenção do derivado 45.

O composto 45 foi caracterizado por RMN H^1 e C^{13} . No espectro de RMN H^1 usando $DMSO-d_6$ como solvente, os hidrogênios metilênicos do ácido monocloroacético aparecem em δ 4,32 mais desprotegidos que os hidrogênios metilênicos do composto 45 que aparece como um singlete em δ 3,80. Este fenômeno, decorrente do maior efeito eletronegativo do cloro é que leva à desproteção os hidrogênios metilênicos.

O ácido feniltioacético é posteriormente oxidado à sulfona (46) usando peróxido de hidrogênio 30% (4 equivalentes) como agente oxidante com rendimento de 76%. Tentativas iniciais de utilização do peróxido de hidrogênio em uma relação estequiométrica 1:1 levava à formação do sulfóxido. Curiosamente, o ambiente diastereotópico caracterizado pela presença do centro assimétrico representado pelo átomo de enxofre gerava um espectro onde é possível observar o diferente ambiente químico dos hidrogênios metilênicos que se mostram como dubletos (Espectro 6).



Espectro 6: Espectro de RMN H^1 da mistura de sulfóxido e sulfona.

Esse resultado mostra a importância da utilização do excesso estequiométrico de peróxido de hidrogênio 30%.

A sulfona (46), sem traços de sulfóxido, também pode ser obtida usando permanganato de potássio como agente oxidante. Do ponto de vista prático,

esta reação tem o inconveniente do controle da temperatura reacional, que durante adição da solução de permanganato deve se manter a 0°C.

A Tabela 3 mostra os deslocamentos no espectro de RMN H^1 do sulfeto usando como reagente e da sulfona obtida após a oxidação.

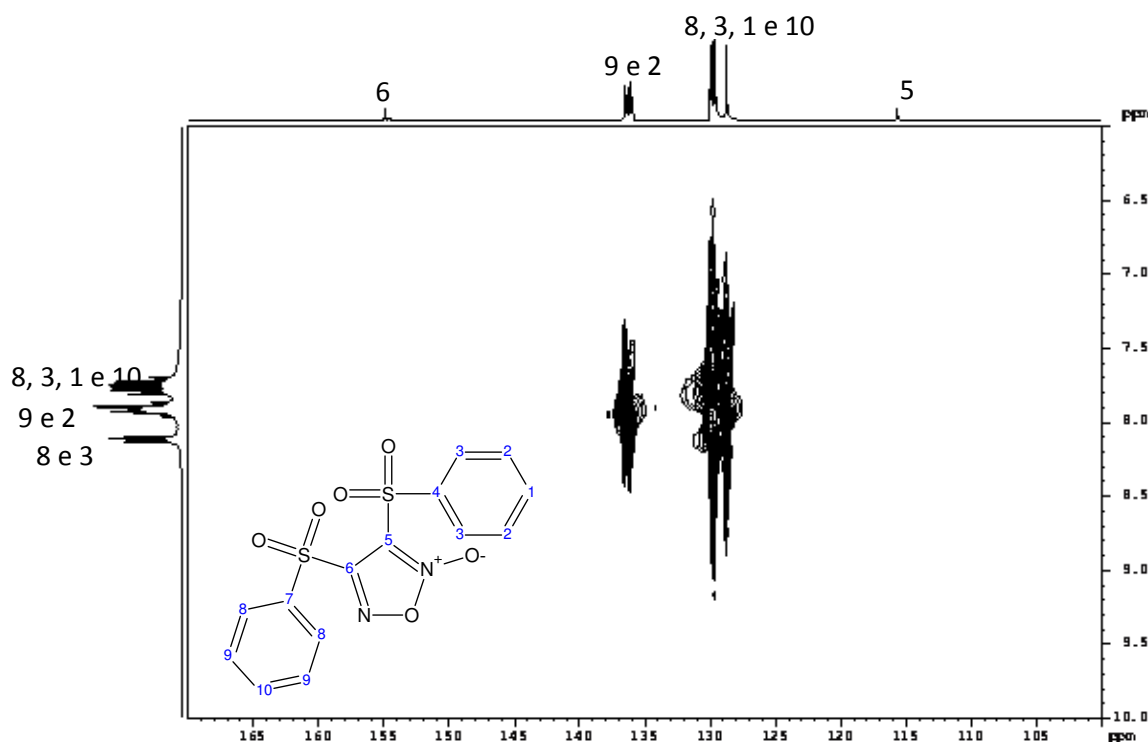
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN dos derivados do ácido feniltioacético

Composto	Hidrogênio metilênico (H3)	Solvente utilizado
Sulfeto (45)	δ 3,5	acetona _d
Sulfona (46)	δ 4,34	acetona _d

Relatos da literatura mostram que essa oxidação também pode ser realizada com oxone[®] em rendimentos superiores a 70%.

A partir da sulfona (46) e utilizando uma mistura de ácido nítrico 98% e ácido acético glacial (Esquema 17) obtém-se o derivado bis-arilsulfonilfuroxânico (5) em rendimento de 56% como sólido com faixa de fusão entre 140°-142°C (FARRER, 1964). Não há na literatura relatos do mecanismo reacional, mas acredita-se que esse deve explorar a reatividade do carbono metilênico que deve sofrer uma reação de descarboxilação e com mecanismo semelhante às reações pericíclicas.

O espectro bidimensional de correlação (Hetcor; DMSO- d_6) identifica os carbonos da subunidade heteroaromática furoxânica em δ 157 (C6) e δ 115 (C5). Novamente, o efeito de ressonância explica a maior proteção de C5 em relação a C6, conforme já discutido. Os carbonos da subunidade fenílica apresentam os seguintes deslocamentos químicos δ 136 (C9); δ 129,8 (C10) e δ 129,4 (C8) (Espectros 7).



Espectro 7: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do bisarilsulfonilfuroxano (5) (Hetcor; 300 MHz; DMSO d_6).

Esse é um importante intermediário que foi explorado em diversas reações de substituição nucleofílica aromática conforme exemplificado pelo Esquema 8.

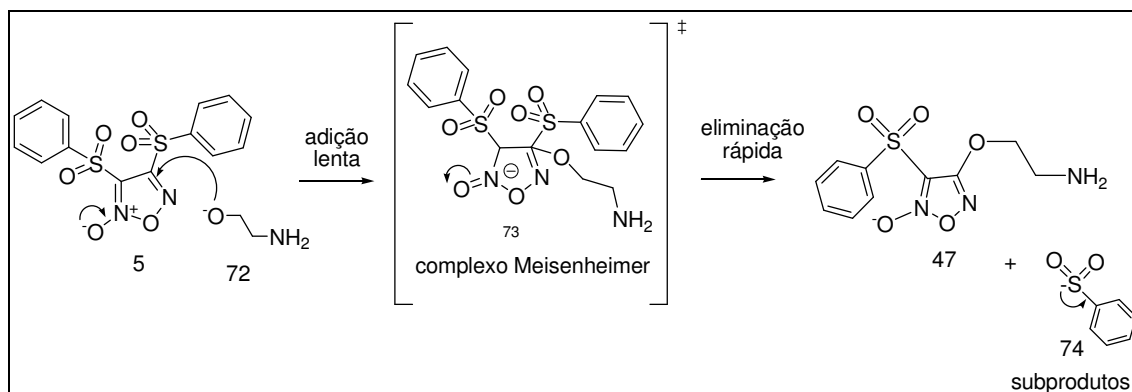
O objetivo dessas reações era obter compostos funcionalizados (47-51) que seriam reagidos posteriormente com anidrido ftálico. Entretanto, as caracterizações destes por RMN não foram conclusivas. Isso se deu por que os espectros obtidos apresentavam sinais mal definidos que não permitiam a correta identificação da estrutura desejada.

O composto 47 obtido através da reação da etanolamina com bisarilsulfonilfuroxano em meio básico já era descrito na literatura (FRUTTERO *et al.*, 1997), e foi selecionado para próximas reações muito embora ainda apresentasse um espectro mal definido e inconclusivo.

A etanolamina em meio fortemente básico (NaOH 50%) perde o próton do álcool se transformando em um etóxido que atuaria como nucleófilo,

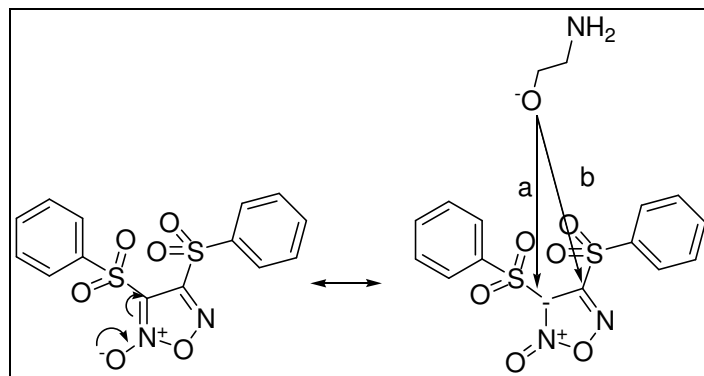
inicialmente se adicionando ao carbono heteroarômático para posteriormente eliminar a sulfona que pode se decompor em SO_3^- e benzeno (Esquema 19). A maior nucleofilicidade do etóxido justifica o motivo da substituição ocorrer pelo ataque do átomo de oxigênio, e não do átomo de nitrogênio, que nesta situação é menos nucleofílico que o etóxido.

As reações de substituição nucleofílica aromática não ocorrem com facilidade, mas podem ser favorecidas eletronicamente inserindo, por exemplo, grupos eletroatratores na subunidade aromática ou heteroarômática. O mecanismo se passa por uma adição-eliminação e envolve a formação de carbânion com elétrons delocalizados (complexos de Meisenheimer). A presença de grupos na posição *orto* e *para* estabilizam esse complexo formado e auxiliam no mecanismo (Esquema 19).



Esquema 19: Mecanismo de reação para obtenção do derivado furoxânico 47.

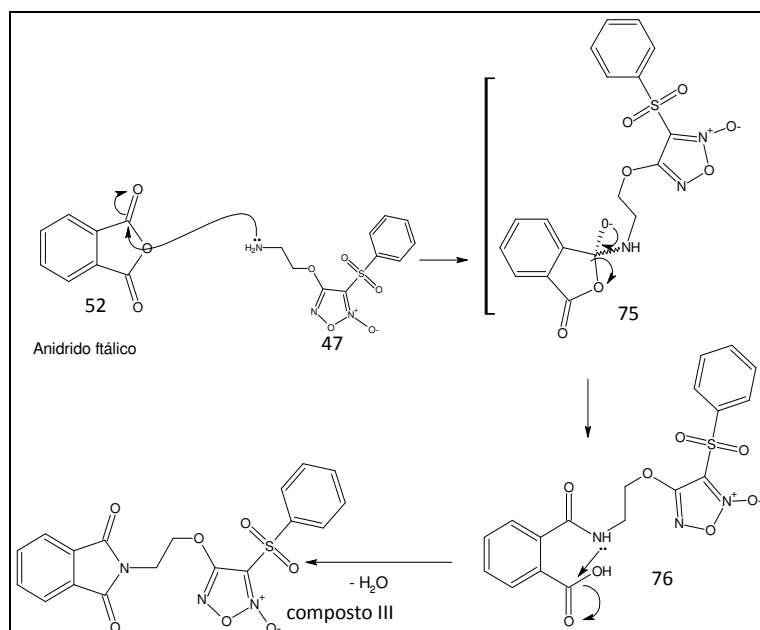
Outro aspecto extremamente relevante neste mecanismo é o ataque do oxigênio (etóxido) ao carbono que não sustenta a subunidade *N*-óxido. Esse efeito ocorre porque é este o carbono mais desprotegido, dado comprovado pelo espectro de RMN C^{13} . Sendo mais desprotegido, ele apresenta uma maior deficiência eletrônica reconhecida pelo nucleófilo que preferencialmente se adiciona nesse carbono (Esquema 20-b). A possibilidade de formação de maior densidade eletrônica no carbono que sustenta a subunidade *N*-óxido “repele” a aproximação do nucleófilo (Esquema 20-a).



Esquema 20: Ataque preferencial do nucleófilo ao carbono que não sustenta a subunidade N-óxido.

De acordo com o Esquema 17 o derivado furoxânico funcionalizado (47) foi reagido com anidrido ftálico em meio contendo ácido acético a 120°C durante 2 horas levando à obtenção do composto III com rendimento de 24%.

Com relação ao mecanismo, na primeira etapa dessa reação há ataque do par de elétrons não ligante do nitrogênio da aminoetanossulfonilfuroxano (47) ao carbono carbonílico que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Esse carbono carbonílico (sp^2) está em um anel de cinco membros tensionado (52). Há um rompimento da ligação π e deslocamento da carga negativa para o átomo de oxigênio. Essa etapa leva à geração de um intermediário tetraédrico, ocorrendo clivagem da ligação sigma do C-O do anidrido, com o deslocamento da carga negativa para o átomo de oxigênio (75). Na etapa seguinte, o intermediário teve seu anel de cinco membros aberto (76). A restauração desse anel é endergônica. No entanto, essa restauração só é possível porque o nitrogênio da ligação amídica formada ainda contém pares de elétrons não ligantes, que podem ser utilizados para realizar um segundo ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico (sp^2) do ácido carboxílico. Esse ataque gera o rompimento da ligação π , e deslocamento de elétron para o átomo de oxigênio, levando à formação de intermediário tetraédrico. Há restauração da ligação π e expulsão de uma molécula de água. Na última etapa, há uma eliminação levando à formação do composto III (Esquema 21).

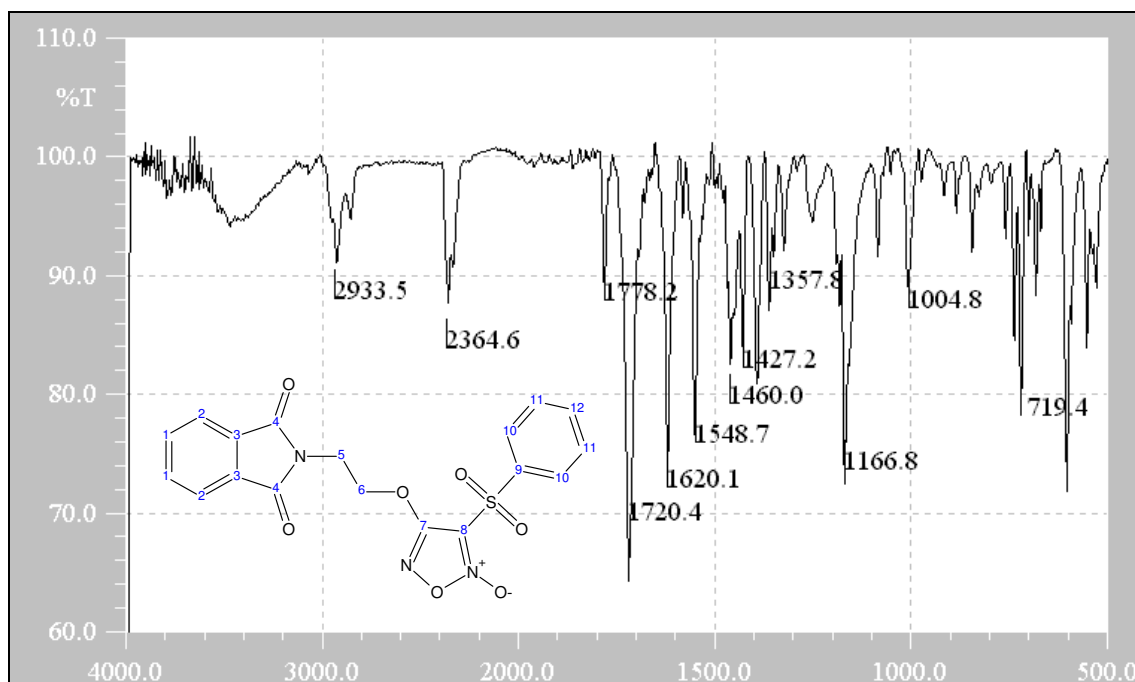


Esquema 21: Mecanismo de reação para obtenção do composto III.

A presença do meio ácido auxilia a reação, pois este pode protonar o oxigênio da carbonila e favorecer o ataque da amina. Entretanto, é importante salientar que o meio ácido pode indisponibilizar o par de elétrons da alquil amina diminuindo a nucleofilicidade desta. Este fato pode justificar o baixo rendimento (24%) observado nesta reação. Uma possibilidade de se melhorar esse rendimento poderia ser a utilização de solventes como, por exemplo, a piridina ou tolueno.

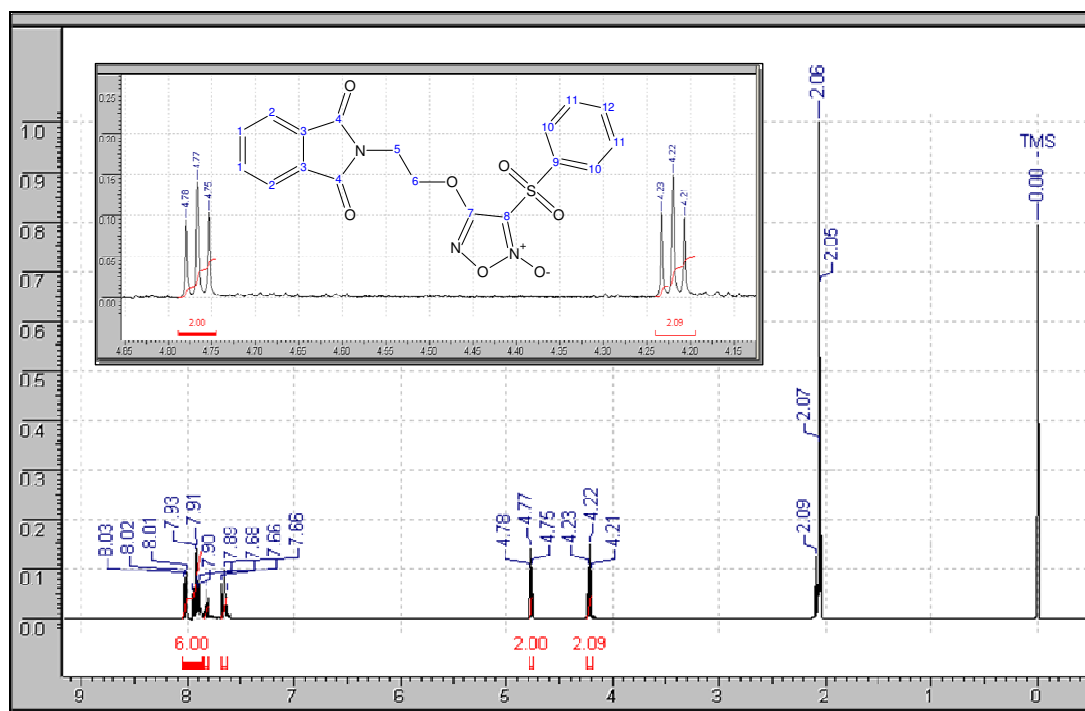
Um fato importante de ser discutido é o aquecimento, que segundo alguns relatos da literatura, poderia levar à interconversão ao outro tautômero, mudando assim a posição da subunidade *N*-óxido. Experimentos de HMBC deverão confirmar a correta posição dessa subunidade na estrutura proposta.

No espectro infravermelho (Espectro 8) do composto III destacam-se os estiramentos axiais simétricos e assimétricos da carbonila de imida em 1778 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} e ausência do estiramento axial e angular da ligação N-H da amina primária.



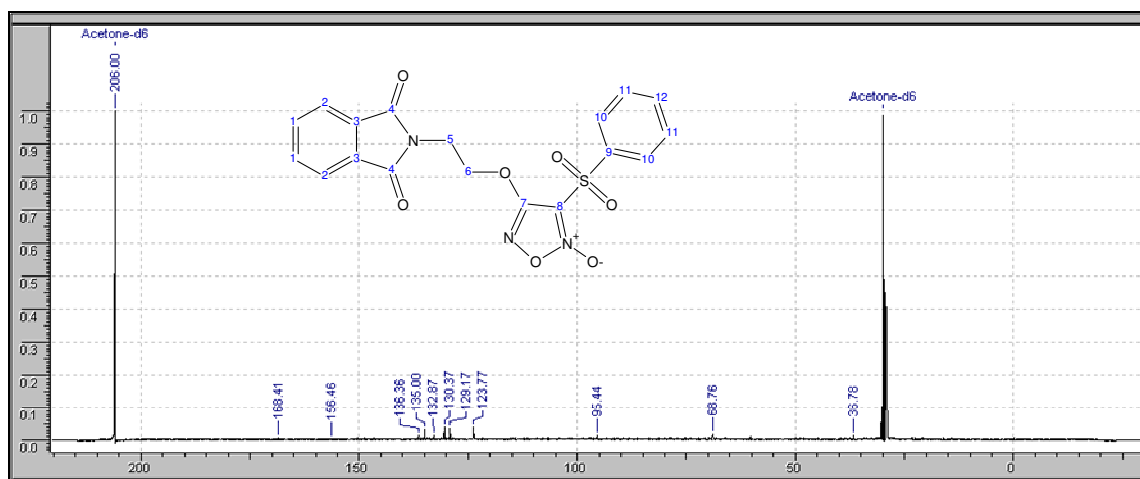
Espectro 8: Espectro no infravermelho do composto III (pastilha de KBr).

O composto foi também caracterizado por RMN H^1 e C^{13} . No RMN H^1 , além dos sinais relativos ao sistema ftalimídico caracterizados pelo multiplete com integração para 4 hidrogênios entre δ 7,89 e δ 7,95, é possível observar os hidrogênios aromáticos da fenila ligada à sulfona e os dois tripletos da cadeia alquílica lateral que aparecem em δ 4,77 e δ 4,22 (Espectro 9).



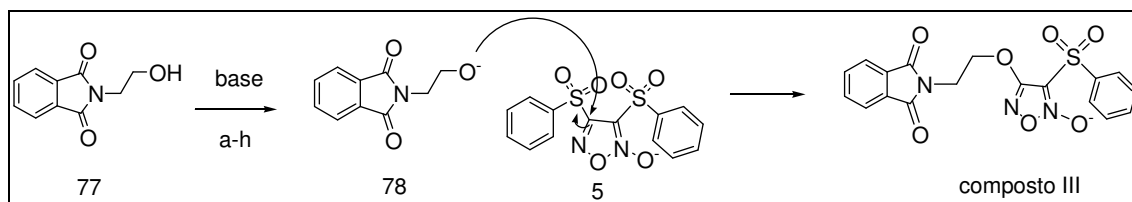
Espectro 9: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (^1H RMN; 400 MHz; acetona $_{d6}$)

No espectro de RMN C^{13} (Espectro 10) podemos visualizar o sistema ftalimídico representado pela carbonila de imida que aparece em δ 168,41, os carbonos aromáticos δ 135 (C2), δ 123,77 (C1) e δ 130,37 (C3). A cadeia etílica (derivada etanolamínica) apresenta os deslocamentos do carbono em δ 68,76 (C6) e 36,78 (C5). Essa diferença de deslocamento deve ao efeito indutivo que desprotege C6 ligado ao átomo de oxigênio, efeito menos pronunciado em C5, que se encontra ligado ao átomo de nitrogênio menos eletronegativo. Quando se analisa o efeito eletrônico no núcleo heteroaromático furoxânico se observa o deslocamento químico de C8 em δ 95,44. Normalmente, se observa nos espectros que esse carbono aparece na região aproximadamente de δ 110. A despeito do efeito indutivo do oxigênio, podemos entender esse efeito “protetor” como decorrente do efeito de ressonância realizado pelo oxigênio da subunidade “etanolamínica” e que protege essa posição no espectro de RMN C^{13} . Em δ 156,48 observamos a presença de C7 da subunidade furoxânica. Ademais, podemos visualizar nesse espectro a presença dos carbonos aromáticos C10, C11 e C12 ligados ao grupo sulfona.



Espectro 10: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (^{13}C RMN; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região aromática.

Utilizando equipamento de síntese em paralelo e diferentes bases reagiu-se hidroxietilftalimida com bis-arilsulfonilfuroxâno em meio THF anidro a 0°C . As bases testadas foram *terc*-butóxido de potássio, hidreto de sódio, bis(trimetilsilil)amida, bicarbonato de sódio, sódio metálico, trietilamina, carbonato de sódio e hidróxido de sódio 50% (Esquema 22).



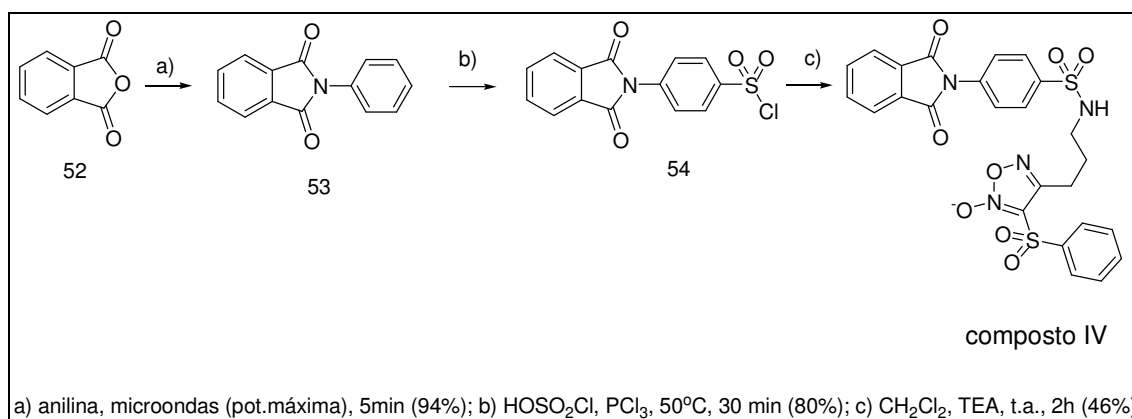
Esquema 22 : Esquema sintético para obtenção do composto III usando síntese em paralelo.

As condições reacionais também foram modificadas e realizadas em diferentes temperaturas. Do conjunto de resultados obtidos neste experimento encontrou-se que o hidreto de sódio e o sódio metálico poderiam levar à obtenção do produto desejado quando se reagia 1 equivalente de bis-arilsulfonilfuroxâno com 4 equivalentes de hidroxietilftalimida. Entretanto, havia formação de produtos com fatores de retenção próximos e de difícil separação.

O excesso do derivado ftalimídico foi usado por que, embora haja formação do produto (composto III), o meio básico hidrolisa o anel ftalimídico, gerando o derivado furoxânico aminado (47). Por isso, esta rota sintética não foi explorada.

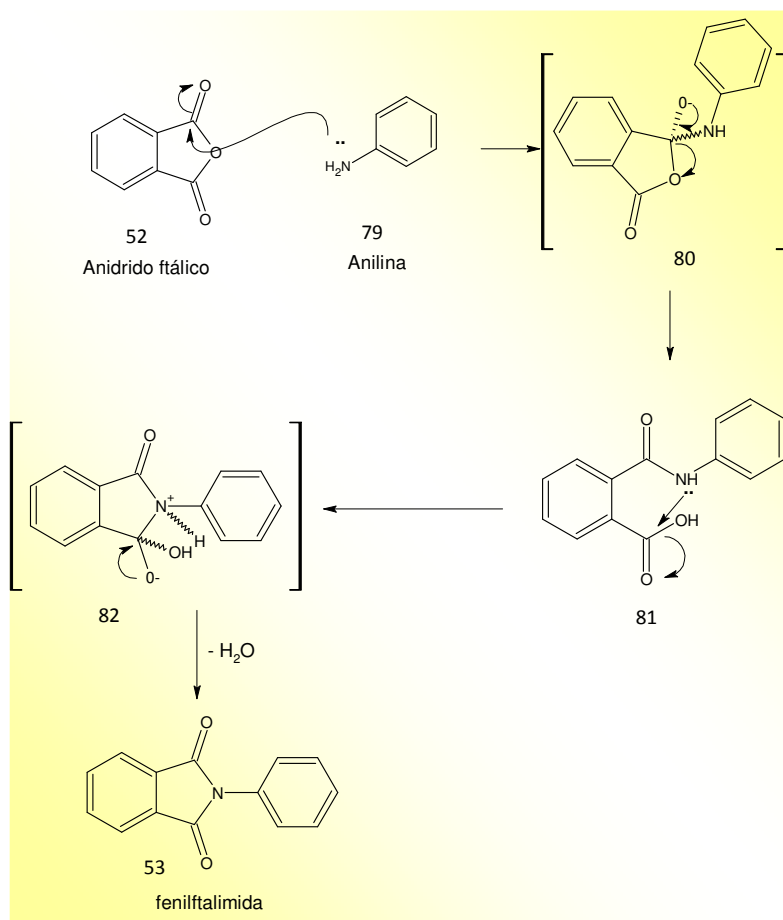
6.1.4 – Síntese do composto IV

O composto IV foi obtido através da funcionalização adequada do derivado ftalimídico (54), que foi posteriormente acoplado ao derivado furoxânico previamente preparado (47).



Esquema 23: Síntese do composto IV.

Explorando a metodologia descrita por Lima e colaboradores (2002), foi realizada a reação para obtenção de 2-fenil-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (53). Essa reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina da anilina à carbonila do anidrido ftálico (52), que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Há rompimento da ligação π , e o par de elétrons fica sustentado pelo átomo de oxigênio. Ao reestabelecer esta ligação, há quebra da ligação C-O. O par de elétrons da amina realiza outro ataque ao carbono carbonílico. Novamente há rompimento de outra ligação π que, ao ser reestabelecida, elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel, e formando o derivado fenil-ftalimídico (53) desejado (Esquema 24):



Esquema 24: Mecanismo de reação para formação de N-fenil ftalimida (53).

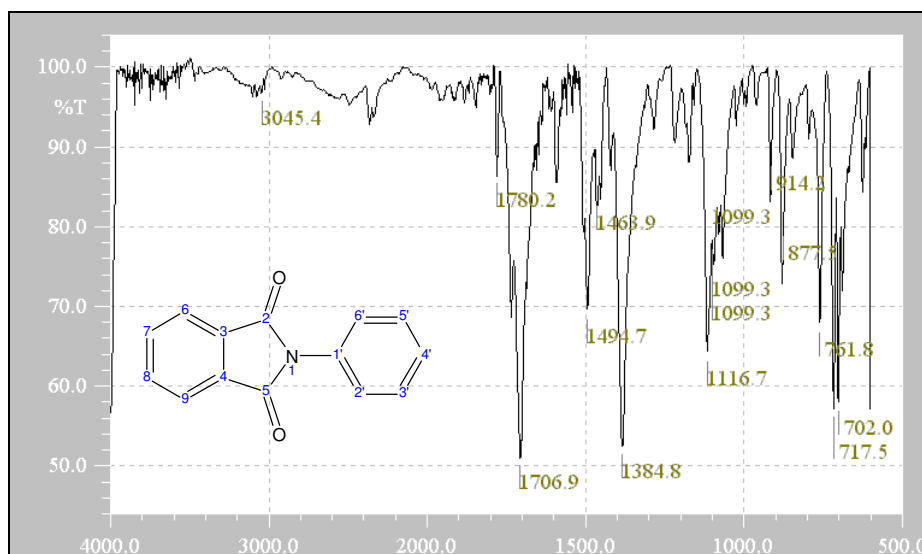
Lima e colaboradores (2002) descreveram a obtenção do composto fenilftalimídico (53), seguindo metodologia de aquecimento convencional. No entanto, atento ao fato de que as reações em microondas possam ser mais rápidas, foi realizada a mesma reação, agora sob condição de aquecimento utilizando radiação. Esse experimento nos permitiu obter rendimentos maiores (94%) e em menor tempo reacional (5 minutos) que LIMA (80%) (SANTOS *et al.*, 2005).

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

A síntese e a caracterização estrutural da fenilftalimida (53) já haviam sido descritas na literatura (LIMA *et al.*, 2002). O acompanhamento reacional por C.C.D mostrou a formação de um novo produto, que foi revelado com

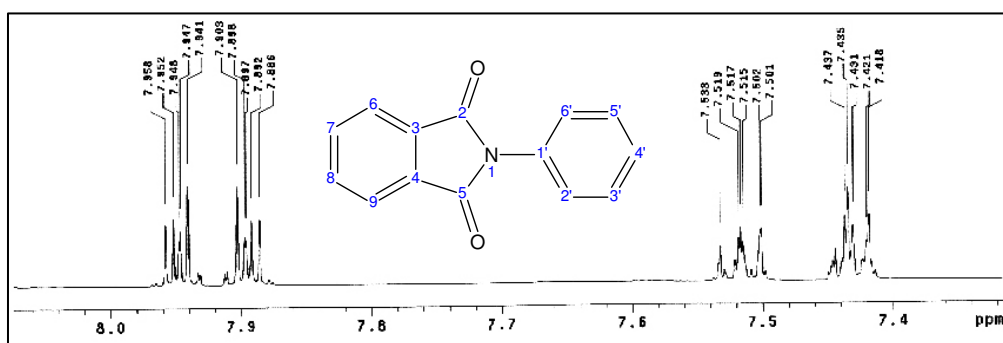
solução de ninidrina 1%, onde não se observou a mancha rosada característica de aminas primárias, e que aparece na revelação da anilina. Após isolamento, o produto obtido teve sua faixa de fusão medida e estando entre 204^o-205^oC, conforme o valor especificado na literatura.

Utilizando métodos espectroscópicos, pode-se observar pelo espectro no infravermelho (Espectro 11) da fenilftalimida (53), o estiramento axial da ligação C-N-C, presente em 1385 cm⁻¹, referente ao sistema imídico formado. Ademais, visualizamos os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico como os estiramentos: 1780 cm⁻¹ e 1706 cm⁻¹.



Espectro 11: Espectro no infravermelho da fenilftalimida (53) (Pastilha KBr).

No espectro de RMN H¹ (Espectro 12) podemos observar os hidrogênios do sistema aromático imídico em δ 7,89 e δ 7,95, respectivamente os hidrogênios: H7, H8 e H6, H9. Nos deslocamentos de δ 7,43 e δ 7,51, podemos observar os hidrogênios do sistema aromático fenílico, referentes respectivamente aos hidrogênios H2', H3', H4', H5' e H6', muito embora não haja integração destes hidrogênios para completo entendimento estrutural.



Espectro 12: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) da fenilftalimida (53) relativo as regiões de δ 7,40 e δ 8,05 (em $\text{DMSO}-d_6$).

Através dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT (anexos), podemos observar todos os carbonos presentes na molécula. No espectro de DEPT é possível visualizar os carbonos C-H aromáticos. As atribuições dos C-H aromáticos foram baseadas em dados da literatura (LIMA *et al.*, 2002).

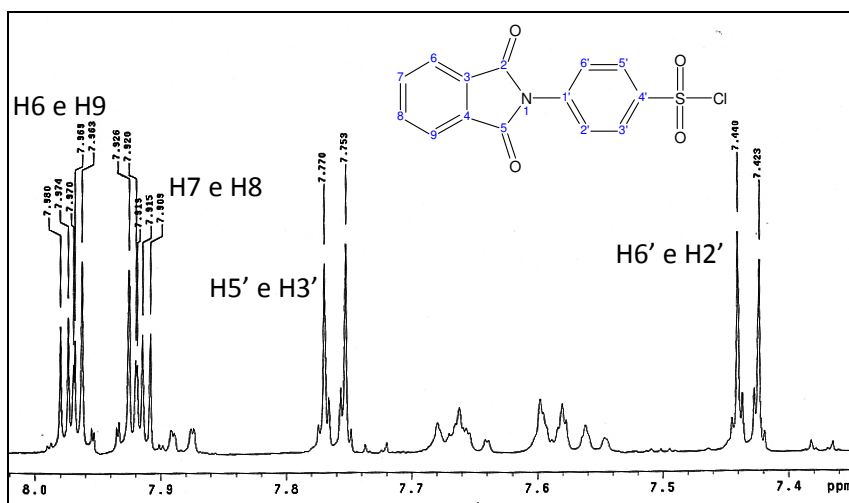
Esses resultados permitem afirmar que o composto fenilftalimida (53), previamente descrito na literatura, foi obtido com sucesso. A obtenção dos derivados ftalimídicos arílicos é de fundamental importância, haja vista que relatos da literatura apontam que esses derivados substituídos são mais potentes na inibição de TNF alfa que os derivados alquílicos (LIMA *et al.*, 2002).

O derivado fenil ftalimídico foi reagido com dois equivalentes de ácido clorossulfônico a 50°C em uma reação de substituição eletrofílica aromática que forneceu um sólido amorfo acinzentado com rendimento de 80% e faixa de fusão entre 180°C - 182°C .

Essa metodologia de obtenção do cloreto de sulfonila (54) é a mesma estratégia da já bem conhecida síntese da sulfonamida. No entanto, o grupo protetor ao invés do acetil é a própria ftalimida. A reação não ocorre no sistema aromático ftalimídico, porque este se encontra desativado para reações de substituição eletrofílica aromática.

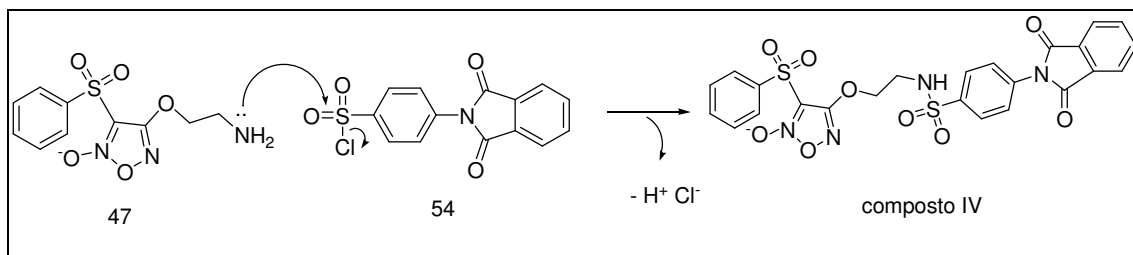
O tricloreto de fósforo foi usado em substituição ao pentacloreto de fósforo da metodologia original sem comprometimento da obtenção do produto, já que sua principal função era de fornecedor de íons cloreto para formação do produto desejado.

Este intermediário reativo foi identificado por infravermelho, RMN ^1H e C^{13} . No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Espectro 13), podemos observar que a nova subunidade introduzida levou à desproteção dos hidrogênios, principalmente àqueles vizinhos ao cloreto de sulfonila. Os hidrogênios 3' e 5', por exemplo, apresentavam desproteção de +0,33, passando do deslocamento químico δ 7,43 na fenilftalimida para δ 7,76 após clorossulfonação. Essa desproteção ocorre pelo efeito indutivo eletroatrator dessa subunidade introduzida (SO_2Cl). No espectro de RMN C^{13} observamos que o carbono que sustenta o grupo sulfonila (SO_2Cl) apresenta-se mais desprotegido, sofrendo o efeito eletroatrator desse grupo. Assim, na fenilftalimida esse carbono (C8) que estava em δ 128,25 se deslocou para δ 147,54 no derivado contendo o grupo cloreto de sulfonila.



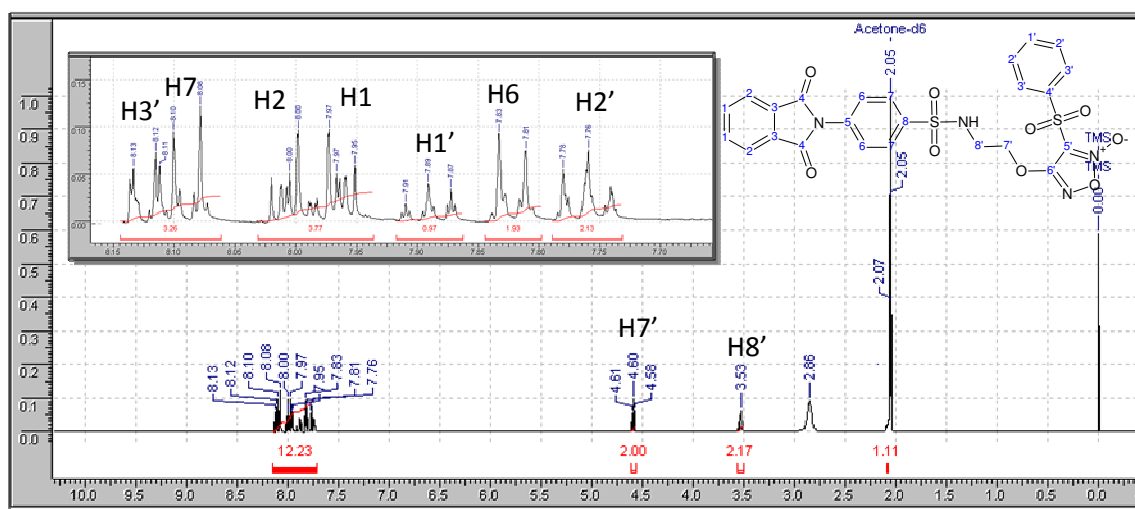
Espectro 13: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) do cloreto de sulfonila (54) relativo às regiões de δ 7,4 e δ 8,0 (em DMSO-d_6 ; 500 MHz).

Explorando a reatividade da função cloreto de sulfonila (54) realizou-se a condensação com o derivado furoxânico (47) através da reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$). Mecanicamente, essa é uma reação de substituição nucleofílica onde o par de elétrons do nitrogênio alquílico, atuando como nucleófilo ataca o átomo de enxofre do cloreto de sulfonila (deficiente em elétrons). Há eliminação do cloreto como grupo abandonador e formação do derivado sulfonamídico (Esquema 25).



Esquema 25: Mecanismo de reação para obtenção do composto IV.

Após purificação por coluna cromatográfica o produto foi obtido com rendimento de 46% e caracterizado por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C). No espectro RMN ¹H destaca-se a cadeia alquílica derivada da subunidade etanolamínica onde H8' está presente como quarteto acoplando com H7'e o hidrogênio N-H. O hidrogênio H7' é visualizado como tripleto e também integra para dois hidrogênios (Espectro 14).



Espectro 14: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (¹H RMN; 400 MHz; acetona_{d6}).

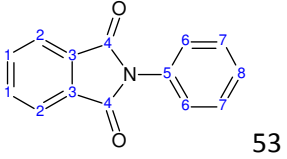
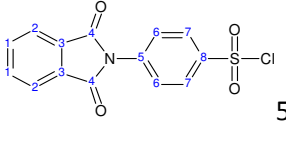
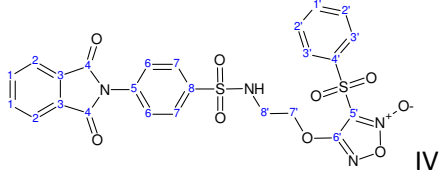
O espectro de RMN ¹³C (Anexos) mostra a presença dos carbonos metilênicos em δ 70,81 (C7') e δ 42,41 (C8'). Os carbonos do sistema heteroaromático da subunidade furoxânica aparecem em δ 159,96 (C6') ligado a N-óxido e em δ 100,93 (C5'). Conforme explicado anteriormente este carbono, apesar de estar conectado ao átomo de oxigênio eletronegativo, apresenta-se protegido devido ao efeito de ressonância. A carbonila do sistema ftalimídico está presente em δ 167,39 (C4). Os demais carbonos ftalimídicos aparecem em δ 135,64 (C2), δ 124,37 (C1) e 130,72 (C3). No espectro RMN ¹³C uma significativa alteração se dá no carbono que sustenta a subunidade

sulfonamídica (C8). Ainda que realizada em solventes diferentes, pode-se sugerir uma maior proteção do carbono (C8) quando ligado à subunidade sulfonamídica que quando ligado ao grupo cloreto de sulfonila.

Assim, obteve-se o composto IV (produto final) detentor de caráter híbrido com atividade dual – inibidor da citocina TNF-alfa e doador de óxido nítrico, representados respectivamente pela subunidade ftalimídica e furoxânica.

A Tabela 4 sumariza os dados dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN H^1 e C^{13} dos intermediários e composto IV.

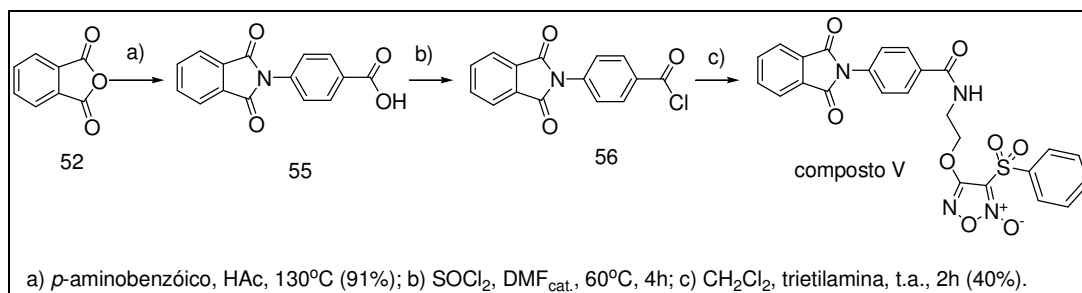
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN H^1 e C^{13} dos intermediários e produto final (composto IV).

 53			 54		 IV	
RMN (DMSO d_6) *			RMN (DMSO d_6) *		RMN (acetona $_d$) *	
	H^1	C^{13}	H^1	C^{13}	H^1	C^{13}
1	7,89	123,67	7,91	124,05	7,97	124,37
2	7,95	134,87	7,97	134,77	8,00	135,64
3	-	131,61	-	131,53	-	130,72
4	-	167,20	-	166,93	-	167,39
5	-	131,94	-	132,03	-	128,08
6	7,51	127,55	7,43	126,08	7,82	128,37
7	7,43	129,08	7,76	129,72	8,10	132,76
8	7,43	128,25	-	147,54	-	136,70
1'	-	-	-	-	7,89	-
2'	-	-	-	-	7,76	129,51
3'	-	-	-	-	8,12	132,76
4'	-	-	-	-	-	136,70
5'	-	-	-	-	-	100,83
6'	-	-	-	-	-	159,96
7'	-	-	-	-	4,60	70,81
8'	-	-	-	-	3,53	42,41

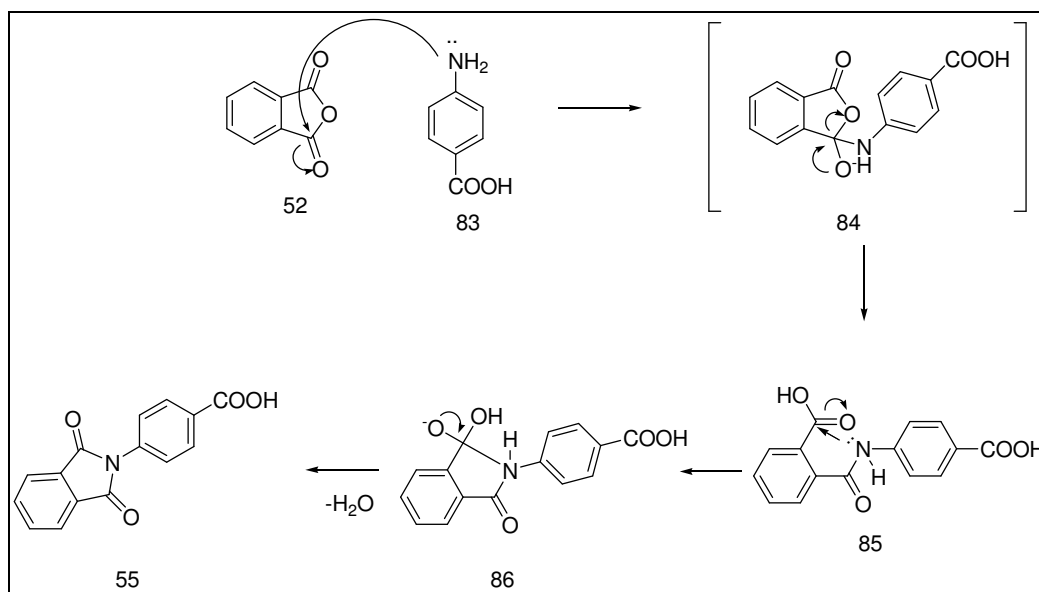
* 400 MHz

6.1.5 – Síntese do composto V

O composto V foi sintetizado segundo a rota sintética apresentada no Esquema 26 a seguir.



Esquema 26: Síntese do composto V.



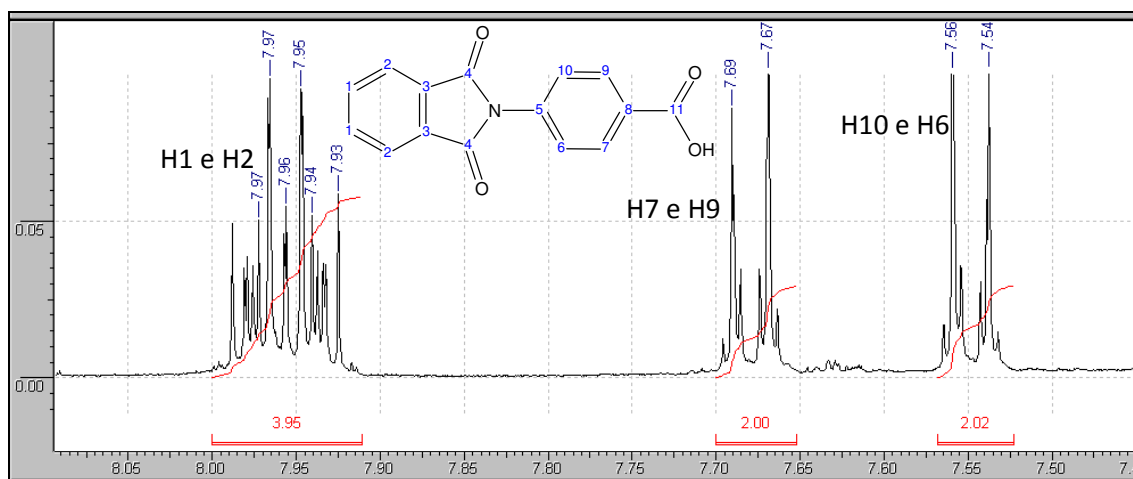
Esquema 27: Mecanismo de reação para obtenção dos derivados ftalimídicos.

Do ponto de vista mecanístico esta reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina da arilamina à carbonila do anidrido ftálico (52), que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Há rompimento da ligação π , e o par de elétrons se desloca para o átomo de oxigênio (84). Ao reestabelecer esta ligação, há quebra da ligação C-O. O par de elétrons da amina realiza outro ataque ao carbono carbonílico (85). Novamente há rompimento de outra ligação π que, ao ser reestabelecida,

elimina uma molécula de água (86), levando ao fechamento do anel, e formando o derivado ftalimídico funcionalizado (55) (Esquema 27).

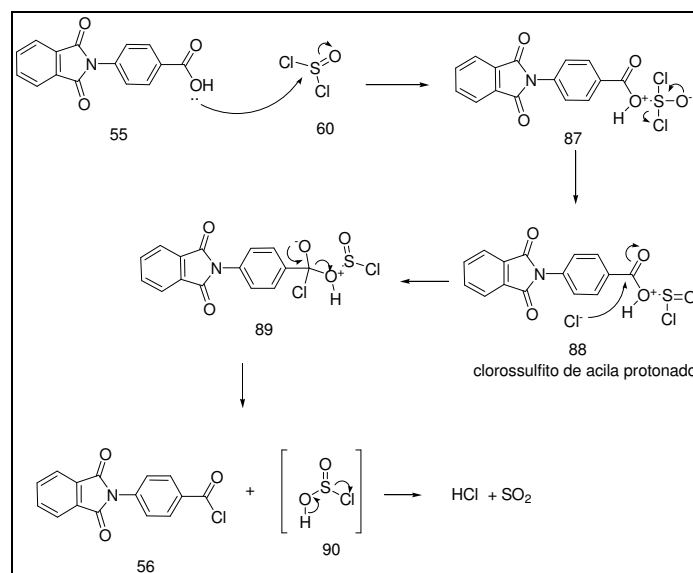
As reações de obtenção de derivados ftalimídicos podem ser obtidas por duas diferentes metodologias sintéticas: utilizando aquecimento convencional em refluxo ou irradiação em microondas. De maneira geral as reações utilizando microondas levam à obtenção dos derivados ftalimídicos mais rapidamente e com rendimentos, por vezes superiores. Nessas reações há ainda possibilidade de utilização de solventes como, por exemplo, o ácido acético, piridina e tolueno. A seleção do ácido acético na maioria das reações é por que este possui a capacidade de protonar a carbonila do anidrido ftálico, facilitando o ataque da amina (nucleófilo), favorecendo a reação. O alto ponto de ebulição do ácido acético auxilia a etapa endergônica de fechamento e formação do anel ftalimídico. Ademais, frequentemente os derivados ftalimídicos precipitam no meio reacional com ácido acético após resfriamento reacional, facilitando a etapa de isolamento do produto.

O derivado (55) foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C . O espectro RMN ^1H mostra em $\delta 7,96$ a presença do sistema ftalimídico como multipletto integrando para quatro hidrogênios. Os dois duplos dubletos são do sistema aromático ligado à subunidade ftalimida e integram respectivamente para dois hidrogênios cada. Em $\delta 7,68$ os dois hidrogênios aromáticos sofrem o efeito eletrônico desprotetor por conta da presença do ácido carboxílico (Espectro 15). Este derivado é obtido com bons rendimentos (91%) e faixa de fusão superior a 250°C .



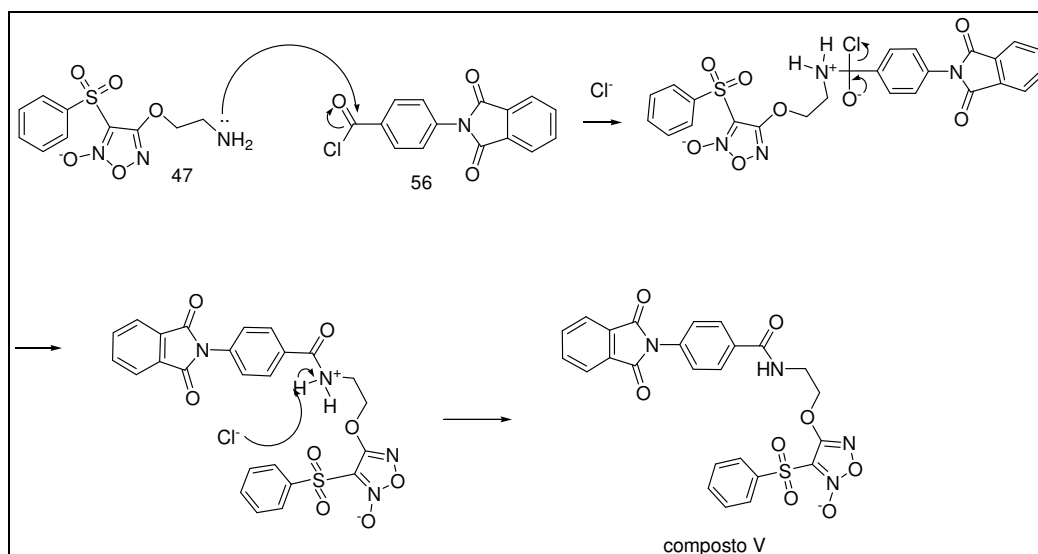
Espectro 15: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (55) (^1H RMN; 400 MHz; DMSO_{d6}).

Devido à baixa reatividade do ácido carboxílico (55) frente à substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) foi necessário transformá-lo no cloreto de acila (56). Este possuindo o cloreto como grupo abandonador pode reagir com o derivado furoxânico em uma reação de acoplamento. Para tal transformação química utilizou-se cloreto de tionila como agente de cloração segundo mecanismo representado no Esquema 28.



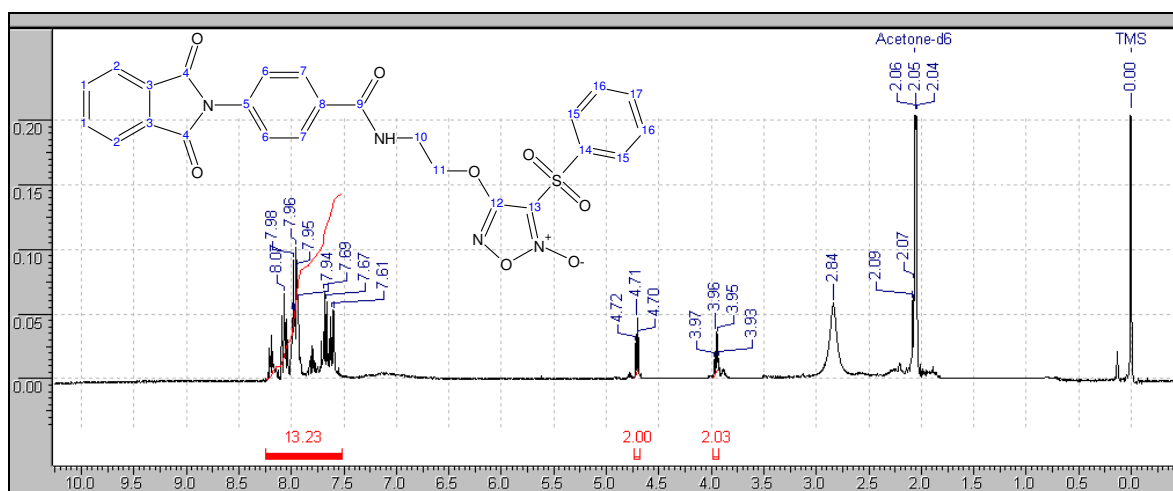
Esquema 28: Mecanismo de reação para obtenção do cloreto de sulfonila.

Devido à instabilidade do cloreto de acila (56), este produto não foi isolado e foi reagido imediatamente com o derivado furoxânico (47) em meio básico (triethylamina) usando como solvente diclorometano anidro. O derivado furoxânico aminado (47), atuando como nucleófilo, ataca o carbono carbonílico do cloreto de ácido (56) levando à formação da amida (produto V) (Esquema 29). A reação, realizada sob atmosfera de nitrogênio, levou à obtenção do composto V com rendimento de 40%.



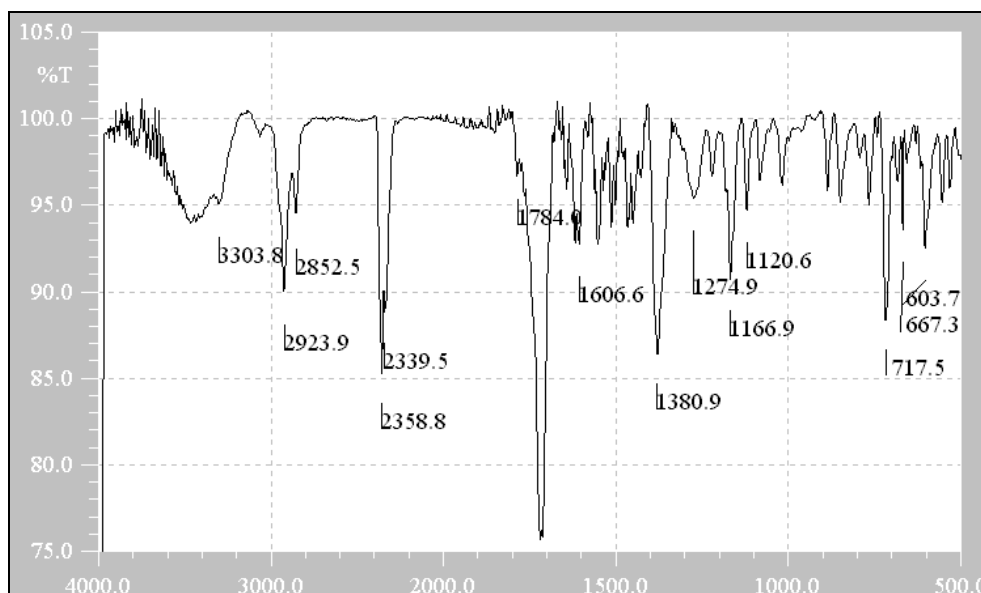
Esquema 29: Mecanismo reacional para obtenção do composto V.

No Espectro 16, visualiza-se a presença dos hidrogênios metilênicos em δ 4,71 (H11) e δ 3,95 (H10) que aparecem como um tripleto e um quarteto, respectivamente. A presença do quarteto é devido ao acoplamento de H10 com o hidrogênio N-H da subunidade amídica. A região aromática não apresenta multiplicidades bem definidas, aparecendo vários multipletos que dificultam a correta integração dos hidrogênios. Experimentos de HMBC permitirão visualizar o acoplamento entre a carbonila da amida (C9) e o carbono (C10) da cadeia alquílica.



Espectro 16: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (^1H RMN; 400 MHz; acetona $_{d6}$).

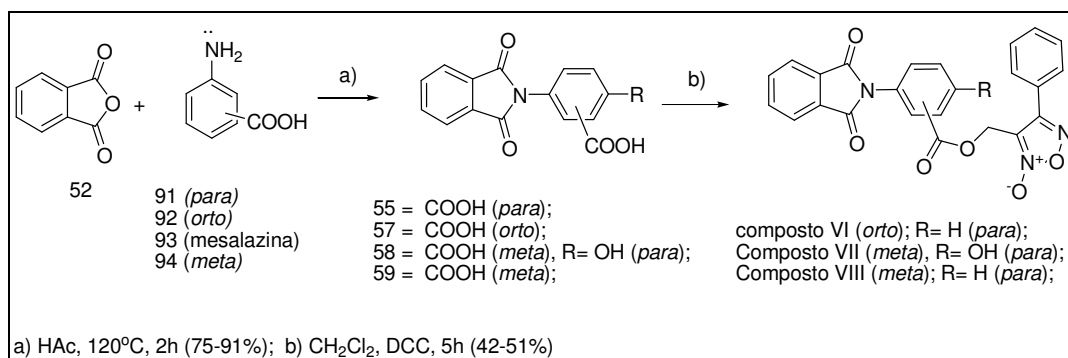
O espectro no infravermelho (Espectro 17) mostra o estiramento axial de N-H da amida em 3303 cm^{-1} ; estiramento axial de C-H aromático em 3059 cm^{-1} ; estiramento axial de C-H alquílico (simétrico e assimétrico) em 2923 e 2852 cm^{-1} ; estiramento axial de C=O_{imida} (simétrico e assimétrico) em 1784 cm^{-1} e 1718 cm^{-1} ; e estiramento axial de C=N furoxano em 1560 cm^{-1} .



Espectro 17: Espectro de infravermelho do composto V (pastilha KBr).

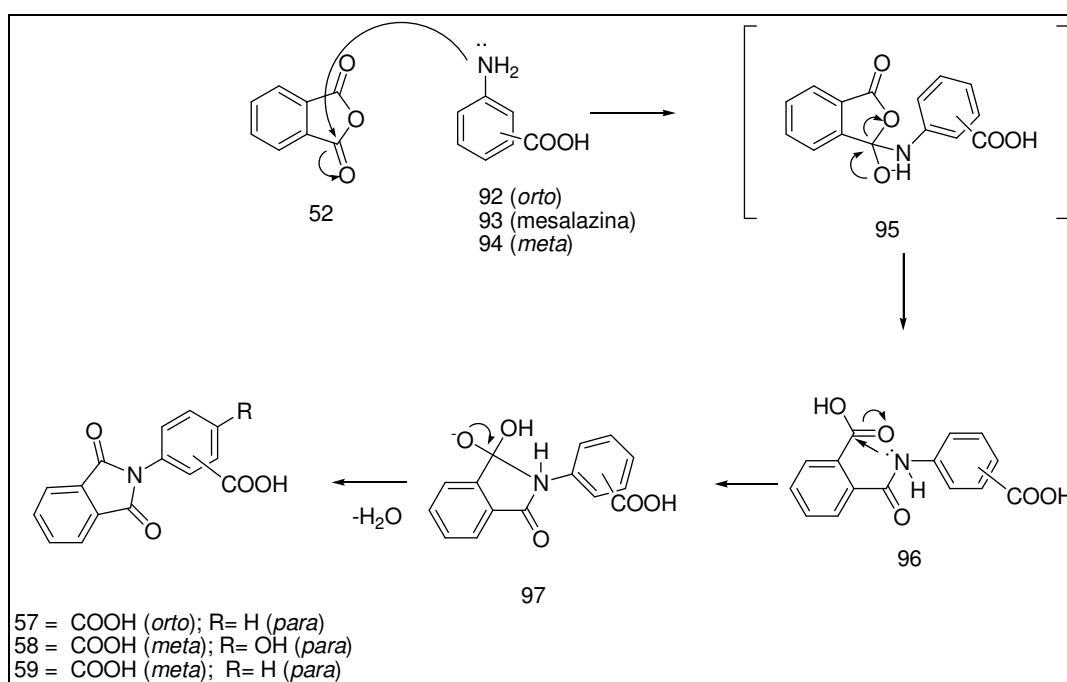
6.1.6 – Síntese dos compostos VI, VII e VIII

Devido à semelhança estrutural e mecanística de obtenção dos compostos VI, VII e VIII, estes serão discutidos em conjunto a seguir. O Esquema 30 apresenta a rota sintética utilizada para obtenção dos diferentes produtos finais.



Esquema 30: Síntese dos compostos VI, VII e VIII.

A etapa inicial é a obtenção dos regioisômeros derivados ftalimídicos usando como solvente ácido acético. As reações foram mantidas em refluxo por duas horas e os produtos foram obtidos em rendimentos que variaram entre 75-91%.

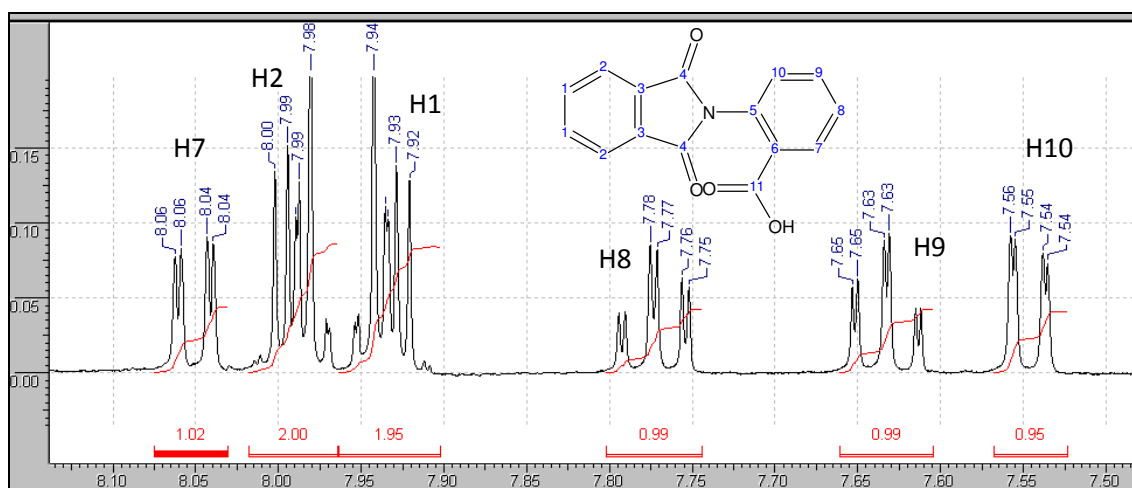


Esquema 31: Mecanismo de reação para obtenção dos derivados ftalimídicos.

O mecanismo das reações inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina da arilamina (92, 93 ou 94) à carbonila do anidrido ftálico (52), que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Há rompimento da

ligação π , e o par de elétrons se desloca para o átomo de oxigênio (95). Ao reestabelecer esta ligação, há quebra da ligação C-O. O par de elétrons da amina realiza outro ataque ao carbono carbonílico (96). 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 ftalimídico funcionalizado (57-59) (Esquema 31).

Pelos espectros de RMN ^1H exemplificado pelo composto 57 (Espectro 18) podemos visualizar a presença do sistema aromático ftalimídico como dois multipletos com integração para dois hidrogênios cada. Em δ 8,05 visualizamos um duplo dubleto integrando para apenas um hidrogênio referente ao H7 que sofre efeito indutivo do ácido carboxílico vizinho. Também é possível observar a presença dos demais hidrogênios aromáticos do substituinte fenílico de acordo com o espectro 18. Esse derivado ftalimídico, com faixa de fusão entre 216°-217°C, foi obtido com rendimentos globais de 68%.



Espectro 18: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (57) (^1H RMN; 400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) - ampliação na região de 7,45-8,15 ppm.

Da série de derivados ftalimídicos sintetizados (55, 57-59), o composto *orto* (57) apresenta menor rendimento (68%) devido ao maior impedimento estérico dado pela presença da função ácido carboxílico na posição *orto*. Estudos conformacionais utilizando o programa de modelagem molecular Spartan pro 8.0 (método semi-empírico AM1) mostraram a possibilidade de formação de 6 confôrmers distintos para o derivado ftalimídico *orto*, com energias variando de -67,92 Kcal/mol a -71,18 Kcal/mol. O confômero de menor energia observado foi aquele que possuía a capacidade de formar ligações de hidrogênio intramolecular (Figura 17). Estas conferem menor

flexibilidade à molécula e pode explicar a diminuição da reatividade, responsável pelo baixo rendimento quando comparado com os demais regioisômeros ftalimídicos.

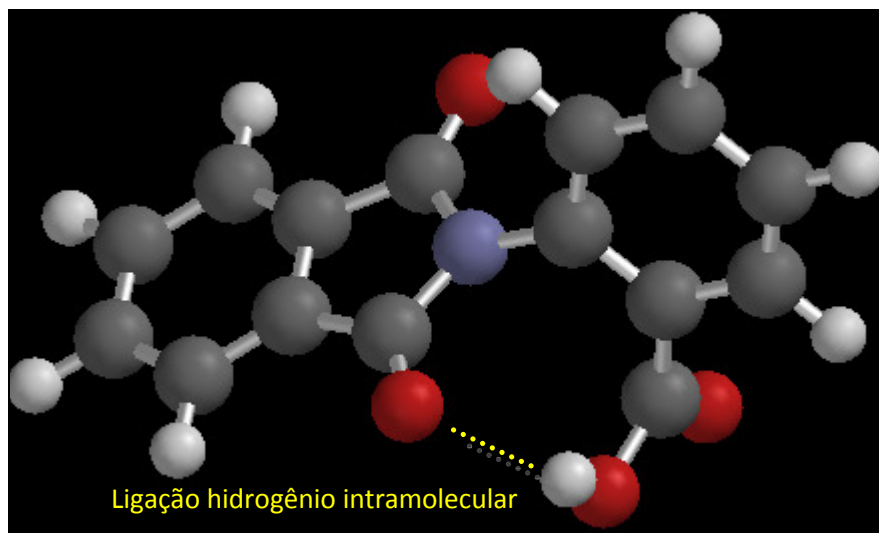
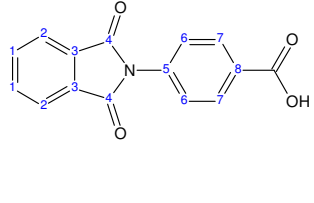
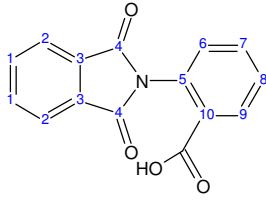
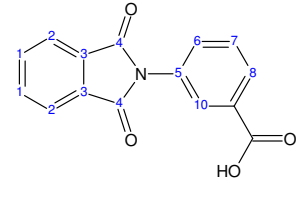
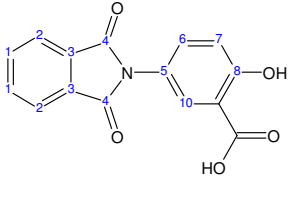


Figura 17: Ligação hidrogênio intramolecular do derivado *orto*-ftalimídico.

O derivado ftalimídico *orto* também pode apresentar atropoisomeria. Este fenômeno é atribuído a um tipo de estereoisomerismo característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida, produzindo uma barreira energética suficientemente elevada, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes rotâmeros, denominados atropoisômeros. Assim, embora retirado o centro assimétrico oriundo da talidomida, esse é um derivado que deve apresentar elemento de quiralidade.

Quanto aos regioisômeros *para* (55), *orto* (57), *meta* (59) e o derivado de mesalazina (58) estes foram obtidos através de reações utilizando aquecimento convencional (refluxo) nos respectivos rendimentos: 91%, 78%, 78% e 75%. Os espectros destes encontram-se na seção anexos e serão apresentados nesta utilizando os deslocamentos químicos de RMN H^1 apresentados da Tabela 5.

Tabela 5: Deslocamento químico no RMN H^1 dos regioisômeros derivados ftalimídicos.

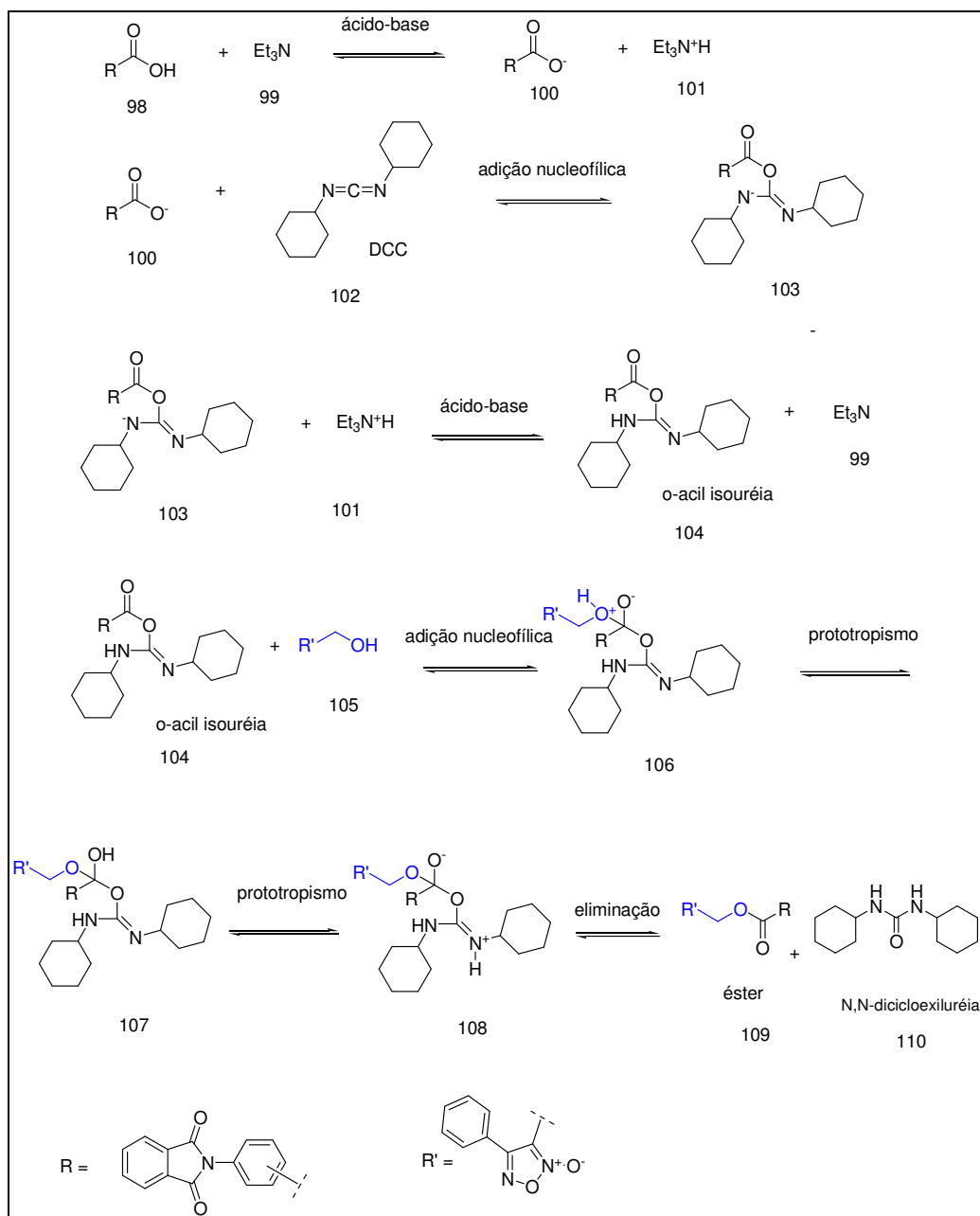
 <p>55</p>		 <p>57</p>		 <p>59</p>		 <p>58</p>	
RMN (DMSO d_6)*		RMN (DMSO d_6)*		RMN (DMSO d_6)*		RMN (DMSO d_6)*	
	H^1		H^1		H^1		H^1
1	7,96		7,93		7,92		7,92
2	7,96		7,99		7,99		7,99
3	-		-		-		-
4	-		-		-		-
5	-		-		-		-
6	7,66		7,55		7,71		7,81
7	7,55		7,77		7,66		7,02
8	-		7,63		8,01		-
9	-		8,05		-		-
10	-		-		8,05		8,20

* 400 MHz

Após identificação dos derivados ftalimídicos adequadamente funcionalizados e explorando a reatividade da função ácido carboxílico foram realizadas reações de acoplamento com a subunidade furoxânica. Para isso, os compostos foram reagidos em diclorometano com o derivado hidroximetilfenilfuroxano para obtenção de ésteres. Nestas reações utilizou-se

a dicicloexilcarbodiimida (DCC) (102) como agente acoplante para ativar o ácido carboxílico em reações de substituição nucleofílica. A DCC (102) é muito utilizado pra formação de ésteres, principalmente quando as substâncias são muito sensíveis a meio ácido ou básico, ou ainda quando o uso de excesso de um dos reagentes é inviável por razões de custo. A DCC possui o átomo de carbono extremamente eletrofílico, e na primeira etapa da reação há desprotonação do ácido carboxílico do reagente ftalimídico pelo nitrogênio da trietilamina (a trietilamina é utilizada como base e pode ser substituída por dimetilaminopiridina ou piridina). O oxigênio do íon carboxilato formado (100), atuando como nucleófilo, se adiciona à dupla ligação da DCC (102) para formar *O*-acilisouréia (104). Essas são poderosos agentes acilantes e ativam o ácido carboxílico e são muito usados para reações de formação de ésteres e amidas. A partir da formação desta *O*-acilisouréia (104) há ataque do par de elétrons do oxigênio do álcool (105) (derivado furoxânico) para formar um intermediário tetraédrico, que se desfaz em uma terceira etapa formando o éster e a *N-N'*-dicicloexiluréia (110) (Esquema 32).

Experimentalmente, *N-N'*-dicicloexiluréia (110) é insolúvel em muitos solventes orgânicos como diclorometano, piridina, clorofórmio e pode ser separado por filtração simples.



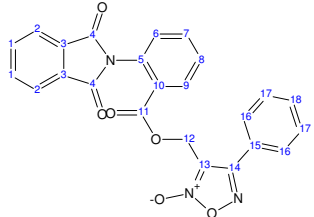
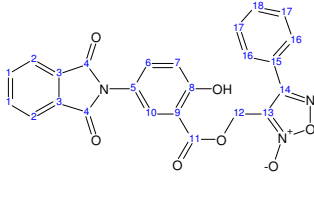
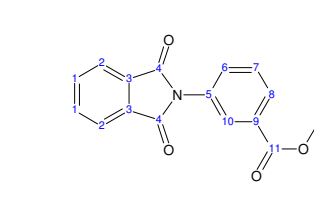
Esquema 32: Mecanismo de reação de formação de ésteres usando DCC como agente acoplante.

Os produtos finais obtidos (compostos VI –VIII) após purificação por coluna cromográfica foram obtidos com rendimentos de 42%, 50,4% e 48% para os compostos VI, VII e VIII, respectivamente.

Os compostos foram caracterizados por infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C . A Tabela 6 apresenta os respectivos deslocamentos químicos dos compostos.

Devido à má definição do espectro alguns sinais não puderam ser exatamente determinados e por isso seus valores não foram apresentados na tabela.

Tabela 6: Deslocamento químico nos espectros RMN H^1 e C^{13} dos compostos VI, VII e VIII.

 composto VI			 composto VII			 composto VIII		
RMN (DMSO d_6)*			RMN (DMSO d_6)*			RMN (DMSO d_6)*		
	H^1	C^{13}		H^1	C^{13}		H^1	C^{13}
1	7,88	124,35	1	8,10	134	1	7,9	123,5
2	7,88	135,70	2	8,10	123	2	8,1	134,5
3	-	130,10	3	-	130	3	-	**
4	-	167,90	4	-	168	4	-	168
5	-	134,84	5	-	**	5	-	**
6	7,56	131,77	6	**	**	6	**	**
7	7,70	**	7	7,40	**	7	**	**
8	7,63	133,03	8	-	**	8	**	**
9	8,05	130,17	9	-	**	9	-	**
10	-	134,18	10	7,90	**	10	**	**
11	-	165,23	11	-	168	11	-	168
12	5,33	56,06	12	5,10	55	12	5,4	55
13	-	112,22	13	-	115	13	-	115
14	-	157,99	14	-	158	14	-	158
15	-	132,54	15	-	132	15	-	**
16	7,95	130,35	16	7,97	130,5	16	**	**
17	7,83	128,73	17	7,80	129	17	**	**
18	7,81	**	18	7,80	128	18	**	**

* 400 MHz **ND – não determinado

Experimentos de HMBC permitiram visualizar o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos e a carbonila derivada da subunidade ftalimídica. Ademais, os hidrogênios metilênicos deslocam-se de δ 4,7 no derivado furoxânico para até δ 5,4 no composto VIII, mostrando o efeito desprotetor ocasionado pela formação da ligação éster nesses hidrogênios. O mesmo efeito pode ser observado no espectro de RMN C^{13} .

A ligação éster dos compostos VI-VIII apresenta labilidade metabólica e espera-se que essa possa ser hidrolisada *in vivo* mediante reação química ou enzimática para liberação da subunidade ftalimídica e furoxânica, que exercerão atividades distintas (inibição da citocina TNF-alfa e doação de óxido nítrico, respectivamente). Caso assim atue, esses compostos poderão ser denominados pró-fármacos, e auxiliarão na doença falciforme por mecanismo diferentes, mas de forma sinérgica no controle dos sintomas da doença.

6.2 – Ensaios de contorção abdominal em camundongos induzida por ácido acético 0,6%

Observações clínicas de que o tratamento com anticorpos monoclonais anti-TNF como, por exemplo, infliximabe, diminuem a dor associada à artrite reumatóide levou à proposição que esta citocina é um importante mediador da dor inflamatória no homem. Assim, terapias baseadas na inibição do TNF- α poderiam ser uma importante abordagem terapêutica na redução da dor, principalmente associada a quadros inflamatórios.

O TNF- α , interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 e IL-10 são as citocinas de maior evidência na modulação da dor. TNF- α e IL-1 β estão envolvidas com o início da dor neuropática, IL-6 com a manutenção desta e IL-10 com a inibição da dor persistente. Sabe-se que em humanos a infusão de TNF- α e IL-1 β como adjuvante na quimioterapia do câncer tem sido associado a quadros dolorosos em mais de 50% dos pacientes (ELKORDY *et al.*, 1997)

Neste contexto, não se torna surpreendente que compostos que possuem a capacidade de inibir TNF- α possam modular a dor. De fato, Ribeiro e colaboradores (2000) demonstraram que a talidomida – um dos primeiros protótipos descritos como inibidor de TNF- α – possuía efeitos analgésicos. Esses pesquisadores avaliaram a capacidade de inibição da dor inflamatória pela talidomida em modelo de contorção abdominal induzida tanto por ácido acético quanto por zimosan, e associado a estudos de PCR permitiram evidenciar o caráter inibidor de TNF- α da talidomida a despeito de uma

provável estimulação de IL-10. Este interessante trabalho mostrou ainda ausência de efeito analgésico central da talidomida avaliado em modelo de placa aquecida ('hot plate') e caracterizou o efeito analgésico como sendo periférico e relacionado à diminuição dos níveis de TNF- α .

Assim, neste trabalho foi avaliado a capacidade analgésica dos compostos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético dos diferentes derivados da talidomida planejados como inibidores da citocina TNF- α .

Experimentalmente, o ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% foi realizado administrando todos os compostos (I-VIII) por via oral. Após 1 hora foi injetado na cavidade peritoneal o agente flogístico e registrou-se durante 30 minutos o número de contorções abdominais dos camundongos. A diminuição do número de contorções após administração dos compostos é relacionada à capacidade analgésica destes. A porcentagem de inibição do número de contorções está expresso na Figura 18.

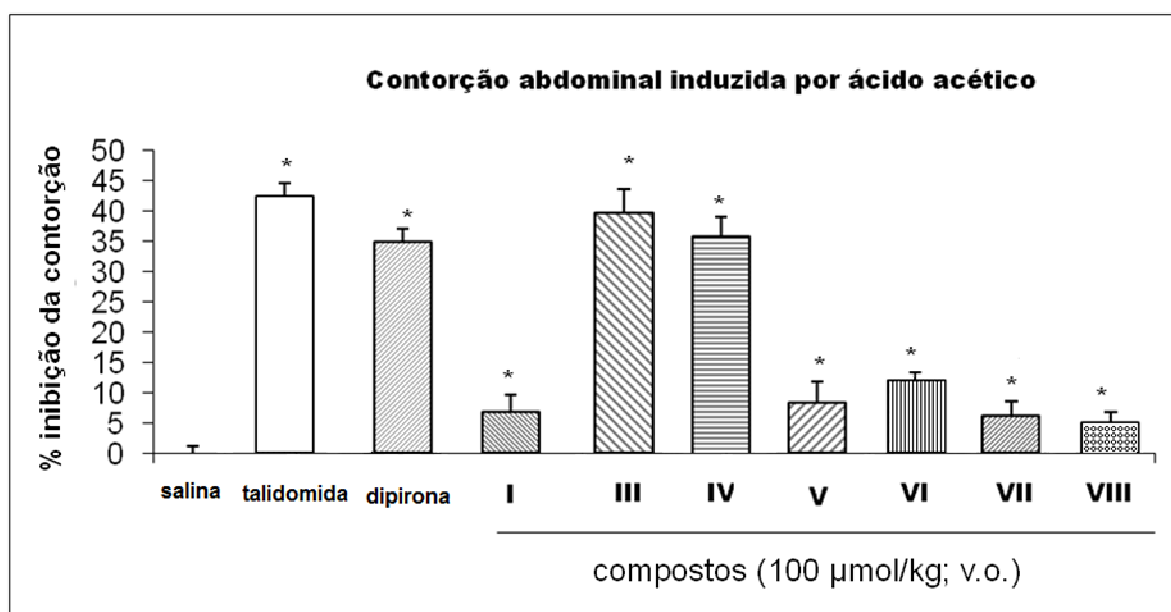


Figura 18: Atividade analgésica dos compostos I, III, IV, V, VI, VII e VIII no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Os valores representam a média e erro padrão da média de 6 animais. (* $p < 0,05$ foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de *t* Student).

Este ensaio permitiu evidenciar o caráter analgésico dos compostos III e IV a despeito da modesta atividade analgésica dos compostos I, VII e V na dose de 100 μ mol/kg administrado por via oral.

O metamizol sódico (dipirona) foi escolhido como fármaco controle neste modelo para que por fins comparativos fosse possível avaliar a capacidade analgésica dos compostos com um fármaco disponível no mercado para tratamento de quadros dolorosos. A goma arábica 5% não apresentou atividade analgésica e teve o mesmo número de contorções da solução salina (resultados não mostrados).

Ribeiro e colaboradores (2000) relatam que a talidomida avaliada neste modelo, na dose de 45 mg/kg (maior dose avaliada), inibiu em aproximadamente 40% o número de inibições (Ribeiro *et al.*, 2000). Entretanto, diferentemente dos compostos avaliados, a talidomida foi administrada por via intra peritonial, enquanto os novos análogos foram administrados por via oral. A via oral apresenta uma série de vantagens em relação à via intraperitonial, como maior comodidade de administração aumentando a adesão do paciente ao provável futuro tratamento, e permite avaliar a estabilidade do composto frente às adversidades do trato gastrointestinal como meio ácido e as membranas biológicas.

Estudos de relação estrutura-atividade de análogos da talidomida mostram que a subunidade ftalimídica quando ligada a anel aromático substituído apresenta maior porcentagem de inibição da citocina TNF- α que quando ligados a cadeia alquílica (LIMA *et al.*, 2001). Esperava-se que os compostos IV, V e VII apresentariam maior atividade quando comparados aos compostos I e III, entretanto, essa não foi a atividade observada.

Os compostos mais ativos nesse modelo (III e IV) são curiosamente aqueles que contêm a subunidade arilsulfonilfuroxânica, tida como a melhor doadora de óxido nítrico, à exceção do composto V. Enquanto a subunidade furoxânica dos compostos I e VII apresenta, de acordo com dados da literatura, menor doação de óxido nítrico.

Um aspecto estrutural relevante é a relação isostérica clássica entre o composto IV e V. Em diversas classes terapêuticas essa relação é explorada na obtenção de bioisósteros devido à semelhança estérica e eletrônica da função amida e sulfonamida. Esta relação, entretanto, não foi observada neste experimento em que o composto amídico V apresenta baixa inibição da contorção, caracterizando um pequeno perfil analgésico em comparação com IV.

Estes resultados podem indicar que a maior inibição da síntese da citocina TNF- α poderia estar relacionada à atividade dos compostos III e IV. Os compostos II, VI e VIII ainda não foram avaliados neste modelo por indisponibilidade de substância, haja vista a dificuldade sintética para obtenção dos compostos.

6.3 – Detecção quantitativa de nitrito

O óxido nítrico é uma molécula radicalar, portanto altamente instável com meia-vida extremamente curta. Quando diluído em meio aquoso, o óxido nítrico tem meia vida de menos de 10 segundos, devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Por isso, uma das formas de avaliar a capacidade de doação de óxido nítrico por compostos sintéticos é quantificar o nitrito presente em solução.

Esse é um dos métodos mais utilizados na literatura (SORBA *et al.*, 1997) e foi eleito neste trabalho por ser método prático e rápido para avaliação da capacidade dos derivados furoxânicos em doar óxido nítrico.

De maneira geral, a doação de óxido nítrico ocorre por dois mecanismos: químico e enzimático. O mecanismo exato de doação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos não é bem conhecido. Não se sabe até o presente momento se no mecanismo de doação de NO há envolvimento de enzimas. Há na literatura algumas propostas quanto ao mecanismo químico.

MEDANNA e colaboradores (1994), por exemplo, propuseram que a doação de óxido nítrico se iniciaria pelo ataque de um resíduo de aminoácido cisteína presente em biomacromoléculas ao carbono que sustenta a subunidade *N*-óxido conforme representado na Figura 13.

O maior problema desta proposta, é que dados de RMN C^{13} apontam que o carbono ligado à subunidade *N*-óxido apresenta-se protegido, ou seja, enriquecido eletronicamente. Este fato dificultaria a adição nucleofílica de um resíduo de cisteína. Ademais, a repulsão eletrônica entre o carbono enriquecido eletronicamente e os pares de elétrons livres do nucleófilo impediriam a aproximação deste.

Cerectto e colaboradores (resultados não publicados) propõem que o ataque inicial do resíduo de cisteína se dá no nitrogênio da subunidade *N*-óxido, conforme representado na Figura 14.

Os cálculos de potencial eletrostático usando o programa Spartan Pro 8.0 (método semi empírico AM1) corroboram com a proposta de Cerecetto e colaboradores. Na Figura 19 podemos notar (em azul-anil) que há maior deficiência eletrônica no nitrogênio *N*-óxido do núcleo furoxânico que no carbono que sustenta esse grupo. Esses resultados estão de acordo com a proposta de que o ataque inicial ocorra nesse nitrogênio.

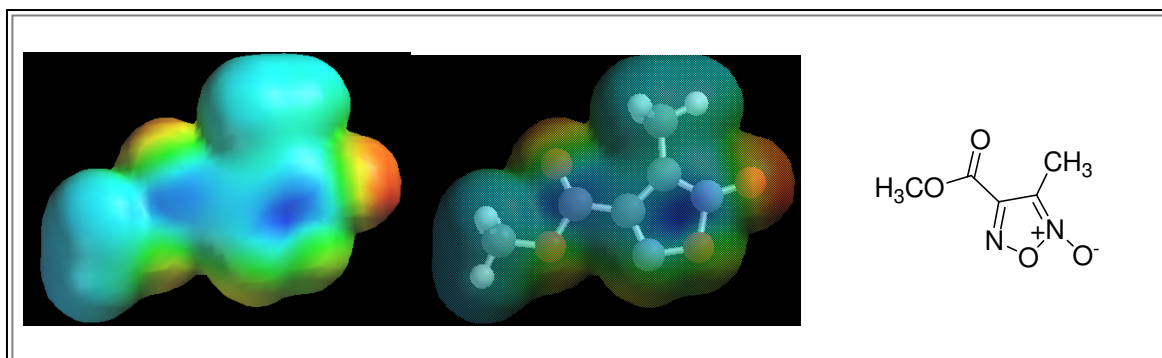


Figura 19: Mapa de potencial eletrostático do éster metílico.

O entendimento do mecanismo de doação de $\cdot\text{NO}$ é importante por que pode ser explorado no planejamento de derivados furoxânicos com diferentes perfis de doação de óxido nítrico. A introdução de grupos eletroatratores no carbono que sustenta a subunidade *N*-óxido, ou seja, substituintes que retiram a densidade eletrônica, aumentam a capacidade de doação de $\cdot\text{NO}$. De forma contrária, a introdução neste carbono de doadores de elétrons, diminui a doação de $\cdot\text{NO}$.

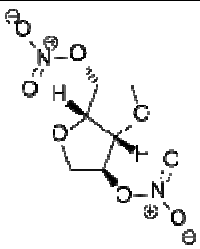
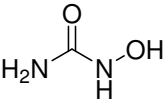
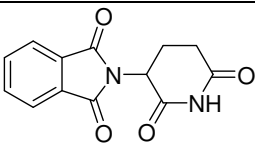
A partir desse entendimento, neste trabalho foi proposta a síntese de diferentes derivados furoxânicos, que a princípio, deveriam possuir perfis distintos de doação do óxido nítrico.

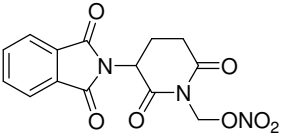
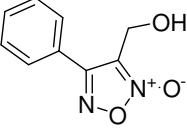
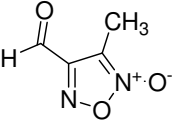
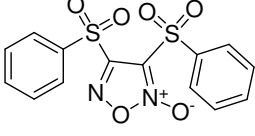
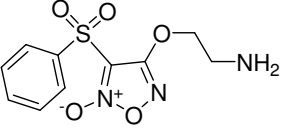
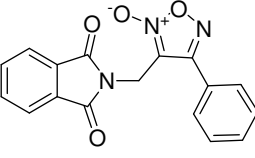
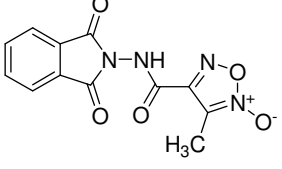
A proposta de que a doação de óxido nítrico, fundamentada em protocolos clínicos, poderia ser benéfica no tratamento dos sintomas da anemia falciforme já era conhecido, entretanto, foi pioneira a proposição de que moléculas orgânicas com caráter dual de ação poderiam contribuir à doença também doando $\cdot\text{NO}$. Sendo o óxido nítrico a molécula responsável pela indução da síntese de RNAm de gama globina, é preciso avaliar se há relação entre a velocidade de doação de $\cdot\text{NO}$ e esse efeito benéfico desejado.

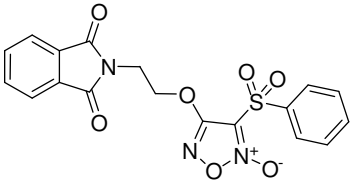
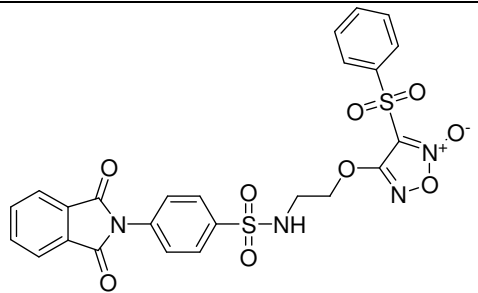
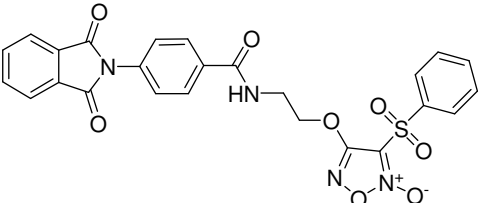
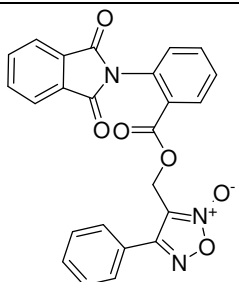
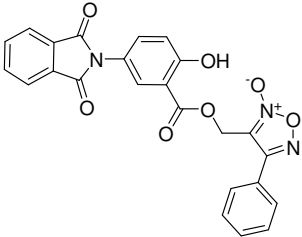
O ensaio quantitativo de nitrito produzido no meio foi realizado com objetivo de selecionar os compostos com características distintas de doação de $\cdot\text{NO}$ que serão avaliados posteriormente em modelo de cultura de células K562. Assim pode-se entender como a relação de doação de $\cdot\text{NO}$ pode interferir na capacidade da células em aumentar a expressão do RNAm de gama globina.

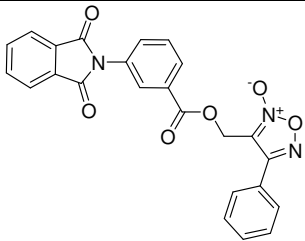
A fim de avaliar a importância da cisteína no mecanismo de doação e a influência da concentração deste aminoácido na capacidade de aumentar a concentração de nitrito no meio, foram realizadas diferentes condições neste ensaio. Os resultados, expressos em porcentagem de nitrito (\pm E.P.M), são representados para cada composto na Tabela 7.

Tabela 7: Porcentagem de produção de nitrito pelos compostos na presença e ausência de cisteína.

Compostos	Ausência	% nitrito (mol/mol)	% nitrito (mol/mol)
		Cisteína 0,5 mmol	Cisteína 5 mmol
 dinitrato de isossorbida (111)	0	0	$11,7 \pm 0,4$
 hidroxuréia (112)	0	0	$8,0 \pm 0,5$
 talidomida (1)	0	0	0

 <p>(113)</p>	0	$0,2 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
 <p>(3)</p>	0	0	$11,7 \pm 0,3$
 <p>(4)</p>	0	0	$1,0 \pm 0,5$
 <p>(5)</p>	0	$38,0 \pm 0,5$	$52,6 \pm 1,0$
 <p>(47)</p>	0	$6,4 \pm 0,2$	$19,1 \pm 0,8$
 <p>composto I</p>	0	$0,8 \pm 0,2$	$14,8 \pm 0,2$
	ND*	ND*	ND*

composto II			
 composto III	0	$0,47 \pm 0,1$	$9,53 \pm 1,0$
 composto IV	0	$20 \pm 0,3$	$28 \pm 0,1$
 composto V	0	$24 \pm 0,8$	$28,2 \pm 0,1$
 composto VI	0	$1,7 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,5$
	0	$3,1 \pm 0,6$	$10,6 \pm 0,1$

composto VII			
 <p>composto VIII</p>	0	$1,7 \pm 0,1$	$13,2 \pm 2,0$

*ND = não determinado

A porcentagem de nitrito é uma medida indireta da capacidade de doação de NO pelos compostos. As concentrações de nitrito foram determinadas através da curva analítica ($f(x) = 0,0284x + 0,0303$; $r^2 = 0,9999$) usando espectrofotômetro UV/visível na concentração compreendida entre 10-80 nmol/l.

De acordo com os dados da Tabela 7, pode-se observar que na ausência de cisteína nenhum composto foi capaz de doar óxido nítrico. Esse resultado mostra que a doação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos é dependente da presença de grupos tióis, presentes, por exemplo, na cisteína.

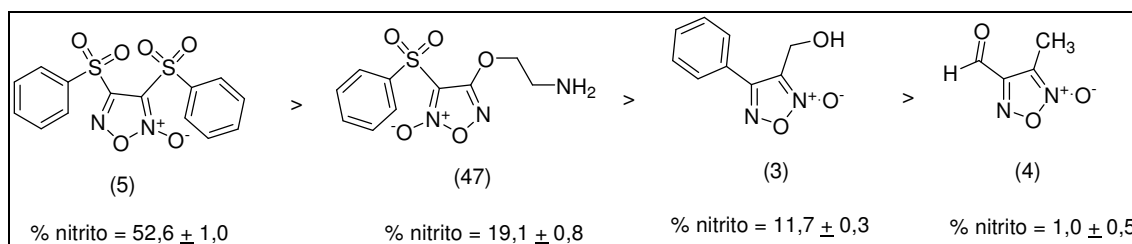
Os dados da Tabela 07 também mostram que a capacidade de formação de nitrito é dependente da concentração de cisteína (0,5 mmol e 5 mmol) utilizada. Maiores porcentagens de nitrito são encontrados na concentração de 5 mmol.

Dinitrato de isossorbida (111), talidomida (1) e hidroxiuréia (112) foram utilizados como fármacos controle. O dinitrato de isossorbida (111) é doador de óxido nítrico disponível na terapêutica para tratamento de angina *pectoris*. Estruturalmente ele possui dois grupos ésteres de nitrato que são possíveis doadores de óxido nítrico. Somente na concentração de 5 mmol de cisteína é que este fármaco foi capaz de doar óxido nítrico, produzindo cerca de 11,7% de nitrito. Relatos na literatura demonstram que outros ésteres de nitrato, como por exemplo, o trinitrato de glicerol que contém três grupos ésteres de nitrato, nestas mesmas condições possui a capacidade de gerar cerca de 45% de nitrito no meio (SORBA *et al.*, 1997).

A hidroxiuréia (112), com reconhecidas propriedades doadoras de óxido nítrico, produziu na concentração de 5 mmol de cisteína cerca de 8% de nitrito.

Ainda que não haja relatos na literatura sobre a capacidade de doação de $\cdot\text{NO}$ pela talidomida (1), resolveu-se testar esse fármaco. Não é surpreendente o fato de que este fármaco não doa óxido nítrico, já que não possui nenhum requisito estrutural para essa atividade. Santos (2009 – resultados não publicados) sintetizou o derivado da talidomida (113) contendo a subunidade éster de nitrato, conhecida por ser doadora de $\cdot\text{NO}$. Ao contrário da talidomida, este composto mostrou capacidade em gerar cerca de 5% de nitrito em solução na concentração de 5 mmol de cisteína. Ademais, essa estrutura apresentou atividade antiinflamatória e analgésica.

Neste trabalho foram utilizados diferentes derivados furoxânicos, planejados possuindo diferentes perfis de doação de $\cdot\text{NO}$. A capacidade destes em gerar nitrito na concentração de 5 mmol de cisteína pode ser esquematizada a seguir, em que os derivados são colocados em ordem crescente de doação de óxido nítrico (Esquema 33).



Esquema 33: Ordem crescente de capacidade de doação de óxido nítrico pelos diferentes compostos furoxânicos (5 mmol cisteína).

Dos compostos sintetizados (I-VIII), na concentração de 5 mmol de cisteína, aqueles que apresentaram maior perfil de geração de nitrito foram os compostos IV e V (28%) que apresentam a subunidade arilsulfonil ligada ao carbono vizinho ao *N*-óxido. Estes compostos foram planejados explorando a relação bioisostérica entre as ligações amida e sulfonamida. Interessantemente, o composto III, que também apresenta subunidade furoxânica similar aos compostos IV e V, apresentou capacidade de gerar apenas 9,53% de nitrito. Esse resultado inesperado pode ser consequência da de uma provável inversão tautomérica ocorrida durante a obtenção deste composto. A última etapa de acoplamento sintético do composto III utiliza

temperaturas superiores a 120⁰C, que pode ter levado à isomerização térmica. Experimentos de HMBC permitirão visualizar o acoplamento do carbono aromático com os hidrogênios da cadeia derivada da etanolamina, e deverão confirmar essa hipótese.

Na concentração de 5 mmol de cisteína, os compostos I, VI, VII e VIII apresentam perfil similar de geração de nitrito, variando de 9,7 a 14,8%. Estes são derivados do mesmo precursor furoxânico, que possui a capacidade de gerar cerca de 11,7% de nitrito.

O composto II derivado do composto com menor capacidade de geração de nitrito não foi avaliado neste ensaio.

Esse conjunto de dados permite inferir que os compostos obtidos neste trabalho apresentam diferentes perfis de doação de óxido nítrico.

7- Conclusões e Perspectivas

Do conjunto de resultados obtidos até o presente momento pode-se concluir que os derivados furoxânicos (3, 4 e 5) propostos no planejamento inicial foram obtidos com rendimentos globais respectivamente de 90%, 30% e 33%. Foi possível otimizar a metodologia sintética para obtenção do derivado 5, o que permitiu maiores rendimentos e menores tempos reacionais quando comparado com os dados descritos na literatura, sem a presença de contaminantes.

Foram obtidos oito produtos finais (compostos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII) e um grande número de intermediários sintéticos diferentes que serão posteriormente explorados em outros trabalhos.

Os compostos V, VI, VII e VIII apresentam ligações amidas ou ésteres conhecidas por sua labilidade metabólica. Assim, espera-se que *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, haja conversão ou liberação das duas subunidades ativas que exercerão seus efeitos benéficos por mecanismos farmacológicos diferentes objetivando sinergismo de ação. Diferente destes, os compostos I, II, III e IV apresentam um caráter híbrido.

A atividade analgésica dos compostos finais foi avaliada farmacologicamente no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%, e evidenciou o caráter analgésico dos compostos III e IV, que apresentaram porcentagem de inibição da contorção abdominal em torno de 45%, mesma atividade observada com a dipirona fármaco usado como padrão neste ensaio. Dados da literatura demonstram que a talidomida, protótipo usado para modificação molecular, apresentou a capacidade de inibir em cerca de 40% as contorções abdominais na dose de 45 mg/kg (RIBEIRO *et al.*, 2000). Esse efeito analgésico é, na talidomida, relacionado à inibição da citocina TNF- α , e este pode ser o provável mecanismo de ação dos novos derivados sintetizados (compostos I-VIII). A confirmação dessa hipótese será realizada após conclusão dos ensaios de inibição da citocina TNF- α .

Com relação à doação de óxido nítrico, foram obtidos derivados furoxânicos com diferentes perfis. A capacidade de doar $\cdot\text{NO}$ está diretamente relacionada à presença do substituinte ligado ao núcleo heteroaromático furoxânico, mais especificamente ao efeito eletroatrator deste substituinte ligado ao carbono contendo a subunidade N-óxido. Grupos químicos que retiram a densidade eletrônica aumentam a doação de $\cdot\text{NO}$, e de forma

contrária, grupos químicos que doam densidade eletrônica diminuem a doação de $\cdot\text{NO}$. Assim, os derivados contendo a subunidade arilsulfonil foram o que mais geraram nitrito (28%) – uma forma indireta de se inferir sobre a capacidade de doação de óxido nítrico.

A modulação na doação de óxido nítrico é um fator relevante a ser estudado e se pretende entender qual a relação entre a maior ou menor doação de $\cdot\text{NO}$ e a capacidade de induzir a expressão gênica de gama globina, que culminará na produção de hemoglobina fetal.

Esse conjunto de dados, valida a estratégia de planejamento inicial de obtenção de novos compostos candidatos a fármacos potencialmente úteis ao tratamento das manifestações clínicas da anemia falciforme, e constituem uma nova abordagem terapêutica ao tratamento dos sintomas da doença.

Constituem perspectivas deste trabalho:

- a) Avaliação da atividade analgésica periférica dos compostos II, VI e VIII;
- b) Avaliação da propriedade inibidora de TNF alfa, pelo teste de ELISA;
- c) Avaliação da expressão gênica de gama globina dos compostos obtidos em células K562 e cultura de células CD34+.

8- Referências Bibliográficas*

ADACHI, K.; KIM, J.; BALLAS, S.; SURREY, S.; ASAKURA, T. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at β 121. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 12, p. 5607-5610, 1988.

AERBAJINAI, W.; ZHU, J.; GAO, Z.; CHIN, K.; RODGERS, G.P. Thalidomide induces γ -globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. **Blood.**, v. 110, n.8, p. 2864-2871, 2007.

ALIYU Z.Y.; TUMBLIN, A.R.; KATO G.J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica.**, v. 90, p. 7-12, 2005.

AUSTIN, H.; KEY, N.S.; BENSON, J.M.; LALLY, C.; DOWLING, N.F.; WHITSETT, C.; HOOPER, W.C. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. **Blood.**, v. 110, n. 3, p. 908-912, 2007.

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

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

BENNEKOU, P.; FRANCESCHI, L.; PEDERSEN, O.; LIAN, L.; ASAKURA, T.; EVANS, G.; BRUGNARA, C.; CHRISTOPHERSEN, P. Treatment with NS3623, a novel Cl-conductance blocker, ameliorates erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice: a possible new therapeutic approach for sickle cell disease. **Blood.**, v. 97, n. 5, p. 1451-1457, 2001.

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

BEVILAQUA, J.V.; LIMA, L.M.; CUNHA, A.G.; BARREIRO, E.J.; ALVES, T. L.M.; PAIVA, L.M.C.; FREIRE, D.M.G. Hydrolisis of new phthalimide-derived esters catalyzed by immobilized lipase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121, p. 117-128, 2005.

BODOR, N.; ABDELALIM, A.M. Improved delivery through biological membranes XIX: Novel redox carriers for brain-specific chemical delivery systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 74, p. 241-245, 1985.

BOIANI, M.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; OLEA-AZAR, C.; CASTELLANO, E.E.; LÓPEZ, A.; ESPELETA, O.; MONGE A.V. 1,2,5-Oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: synthesis and biological evaluation. Part IV. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, p. 771–782, 2001.

BONDS, D.R. Three decades of innovation in the management of sickle cell disease: the road to understanding the sickle cell disease clinical phenotype. **Blood Rev.**, v. 19, p. 99-110, 2005.

BOYER, J.H. **Nitroazoles: The C-nitro derivatives of five-membered N- and N, O-heterocycles**. New Orleans: VCH, 1986. Organic nitro chemistry series, v.1. p.1-4. ISBN 0-89573-148-7.

BRITTENHAM, G.M.; GRIFFITH, P.M.; NIENHUIS, A.W.; MCLAREN, C.E.; YOUNG, N.S.; TUCKER, E.E.; ALLEN, C.J.; FARREL, D.E.; HARRIS, J.W. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 567-573, 1994.

BUCHANAN, G.R.; DEBAUN, M.R.; QUINN, C.T.; STEINBERG, M.H. Sickle cell disease. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**. 2004, p.35-47.

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v.337, n.11, p. 762-769, 1997.

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

CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

CANÇADO, R.D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.

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

CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships. **J. Med. Chem.**, v.42, p.1941–1950, 1999.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p.57-71, 2005.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ONETTO, S.; RISSO, M.; REY, A.; GIGLIO, J.; LÉON, E.; LÉON, A.; PILATTI, P.; FERNÁNDEZ, M. Synthesis and characterization of thiol containing furoxan derivatives as coligands for the preparation of potential bioreductive radiopharmaceuticals. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, v.339, p. 59–66, 2006.

CHARACHE, S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D.; DOVER, G.J.; BARTON, F.B.; ECKERT, S.V.; MACMAHON, R.P.; BONDS, D.R. The investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1313-1322, 1995.

CHIES, J.A.; NARDI, N.B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Med. Hypotheses**, v.57, n.1, p.46-50, 2001.

CHIRAC, P. The price of hope: strong medicine: creating incentives for pharmaceutical research on neglected diseases. **Nature**, v. 431, p. 629-630, 2004.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, n.2, p.155-179, 2005.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I.; SANTOS, J.L.; GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; ALMEIDA, A.E.; BOSQUESI, P.L.; MENEGON, R.F.; BLAU, L. Prodrugs for the treatment of neglected diseases. **Molecules.**, v. 13, n. 3, p. 616-677, 2008.

COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; NJOROGÉ, J.M.; MILLER, J.L.; GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J. Clin. Invest.**, v.111, n. 2, p. 231-239, 2003.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. Abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v.32, n.2, p.295-310, 1968.

CONRAN, N.; ORESCO-SANTOS C.; ACOSTA, H.C.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, v.124, p.547-554, 2004.

CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br. J. Haematol.**, v.87, n.3, p. 592-597, 1994.

DALLALIO, G.; BRUNSON, C.Y.; MEANS, R.T.; Cytokine concentrations in bone marrow of stable sickle cell anemia patients. **J. Investig. Med.**, v.55, n.2, p. 69-74, 2007.

DAVIES, S.C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Rev.**, v.17, p. 99-109, 2003.

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

DEPASS, L.R.; WEAVER, E.V. Comparison of teratogenic effects of aspirin and hydroxyurea in the Fischer 344 and Wistar strains. **J. Toxicol. Environ. Health.**, v. 10, n. 2, p. 297–305, 1982.

DI STILO, A.; VISENTIN, S.; CENA, C.; GASCO, A.M.; ERMONTI, G.; GASCO, A. New 1,4-dihydropyridines conjugated to furoxanyl moieties, endowed with both nitric oxide-like and calcium channel antagonist vasodilator activities. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 5393–5401, 1998.

DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J. Health Econ.**, v. 22, p. 151-185, 2003.

DOVER, G.J.; BRUSILOW, S.; SAMID, D. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. **New Engl. J. Med.**, v. 327, p. 569–570, 1992.

DYER, J.R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos**. São Paulo, Edgard Blucher., 1969. p. 24-138.

DUITS, A.J.; PIETERS, R.C.; SALEH A.W.; VAN ROSMALEN, E.; KATERBERG, H.; BEREND, K.; ROJER, R.A. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.81, n.1, p.96-98, 1996.

ELKORDY, M.; CRUMP, M.; VREDENBURG, J.J. A phase I trial of recombinant human interleukin 1- β (OCT-43) following high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 19, p.315-322, 1997.

EL NEMER, W.; WAUTIER, M.; RAHUEL, C.; GANE, P.; HERMAND, P.; GALACTEROS, F.; WAUTIER, J.; CARTRON, J.; COLIN, Y.; KIM, C.V. Endothelial Lu/BCAM glycoproteins are novel ligands for red blood cell α_1 integrin: role in adhesion of sickle red blood cells to endothelial cells. **Blood.**, v.109, n.8, p. 3544-3551, 2007.

ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 2393-2404, 2004.

FAGNETE, S.; CONNES, P.; HUE, O.; MONTOUT-HEDREVILLE, M.; ETIENNE-JULAN, M.; HARDY, M.D. Faster lactate transport across red blood cell membrane in sickle cell trait carriers. **J. Appl. Physiol.**, v. 100, n. 2, p. 427-432, 2006.

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

FEELISCH, M.; SCHÖNAEFINGER, K.; NOACK, E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. **Biochem. Pharmacol.**, v.44, p.1149-1157, 1992.

FERM, V.H. Severe development malformations: malformations induced by urethane and hydroxyurea in the hamster. **Arch. Pathol.**, v.81, p.174–177, 1966.

FERREIRA, E.I.; KOROLKOVAS, A. Pró-fármacos e latenciação. **Quim. Nova**, p.113-128, 1980.

FILHO, F.R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p.265-271, 2000.

FLORENCE, A.T. Neglected diseases, neglected technologies, neglected patients? **Int. J. Pharm.**, v. 350, p.1-2, 2008.

FRANCIS, R.B.J.R; HAYWOOD, L.J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.**, v.84, n.7, p.611-615, 1992.

FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J. Clin. Invest.**, v.117, n.4, p.850-8, 2007.

FRUCHTMAN, S.M.; MACK, K.; KAPLAN, M.E.; PETERSON, P.; BERK, P.D.; WASSERMAN, L.R. From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. **Semin. Hematol.**, v.34, p.17–23, 1997.

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

FRUTTERO, R.; DI STILO, D.; GASCO, A. The furoxan system as a useful tool for balancing “hybrids” with mixed α_1 -antagonist and NO-like vasodilator activities. **J. Med. Chem.**, v.38, p. 4944-4949, 1995.

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

GASCO, A.; MORTARINI, V.; RUA, G.; SERAFINO, A. Unsymmetrically substituted furoxans. III Methylnitrofuroxan: Its structure and behaviour toward nucleophilic substitution. **J. Heterocycl. Chem.**, v.10, p. 587-590, 1973.

GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N.; OGNIBENE, F.P.; COLES, W.A.; REITER, C.D.; SCHENKE, W.H.; CSAKO, G.; WACLAWIW, M.A.; PANZA, J.A.; CANNON, R.O. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. **Circulation**., v.107, n.2, p. 271-278, 2003.

GUY, R. K. Cures for neglected diseases: alternative strategies for finding drugs. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.11, n. 4, p. 410-411, 2007.

HANFT, V.N.; FRUCHTMAN, S.R.; PICKENS, C.V.; ROSSE, W.F.; HOWARD, T.A.; WARE, R.E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**., v.95, n.11, p. 3589-3593, 2000.

HASHIMOTO, Y. Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. **Bioorg. Med. Chem.**, v.3, p. 461-479, 2002.

HEEMSTRA, H.E.; VRUEH, R.L.A.; VANWEELY, S.; BUELLER, H.; LEUFKENS, H.G.M. Orphan drug development across Europe: bottlenecks and opportunities. **Drug Discov. Today**., v.13, n.15/16, p. 670-676, 2008.

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

INGLIS, J.J.; NISSIM, A.; LEES, D.M.; HUNT, S.P.; CHERNAJOVSKY, Y.; KIDD, B.L. The differential contribution of tumor necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v.7, n. 4, R807-R816, 2005.

INGRAM, V.M. Sickle - cell anemia hemoglobin : the molecular biology of the first "molecular disease" the crucial importance of serendipity. **Genetics.**, v.167, n.1, p. 1-7, 2004.

INGRAM, V.M. Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.36, p. 402–411, 1959.

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

IYAMU, E.W.; TURNER, E. A.; ASAKURA, T. In vitro effects of NIPRISAN (Nix-0699): a naturally occurring, potent antisickling agent. **Br. J. Haematol.**, v.118, n.1, p. 337-343, 2002.

IYAMU, E.W.; TURNER, E.A.; ASAKURA, T. Niprisan (Nix-0699) improves the survival rates of transgenic sickle cell mice under acute severe hypoxic conditions. **Br. J. Haematol.**, v. 122, n. 6, p. 1001-1008, 2003.

JOINER, C.; RETTIG, R.K.; JIANGM, R.; FRANCO, P.S. Urea stimulation of KCl cotransport induces abnormal volume reduction in sickle reticulocytes. **Blood.**, v. 109, p. 1728-1735, 2007.

KARK, J.A.; POSEY, D.M.; SCHUMACHER, H.R.; RUEHLE, C.J. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. **N. Engl. J. Med.** v.317, n.13, p. 781-787, 1987.

KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev.**, v. 21, n.1, p. 37-47, 2007.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F.; LITTLE, J.A.; TAYLOR, J. 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.

KAUL, D.K.; ZHANG, X.; DASGUPTA, T.; FABRY, M.E. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.295, p. H39-H47, 2008.

KENNY, W.J.; WALSH, J.A.; DAVENPORT, DEREK A. Acid catalyzed cleavage of sulfoxides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 83, p. 4019-4022, 1961.

KING, S.B. The nitric oxide producing reactions of hydroxyurea. **Curr. Med. Chem.**, v.10, p.437-452, 2003.

KONTUREK, S.K.; KONTUREK, P.C. Role of nitric oxid in the digestive system. **Digestion.**, v.56, p.1-13, 1995.

KOSHY, M.; DORN, L.; RESSLER, L.; MOLOKIE, R.; LAVELLE, D.; TALISCHY, N.; HOFFMAN, R.; OVERVELD, W.V.; DESIMONE, J. 2-deoxy 5-azacytidine and fetal haemoglobin induction in sickle cell anemia. **Blood.**, v. 96, n.7, p.2379-2384, 2000.

KULIKOV, A.S. Synthesis of furoxan derivatives based on 4 aminofuroxan 3 carboxylic acid azide. **Russian Chem. Bull.**, v. 52, n. 8, p. 1822-1828, 2003.

KUYPERS, F.A. Red cell membrane lipids in hemoglobinopathies. **Curr. Molecular. Med.**, v. 8, n. 7, p. 633-638, 2008.

LANARO, C.; PENTEADO, C.F.F.; ALBUQUERQUE, D.M.; SAAD, S.T.O.; CONRAN, N.; COSTA, F.F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. Leuk. Biol.**, v.85, p.235-242, 2009.

LEW, V.L.; TIFFERT, T.; ETZION, Z.; PERDOMO, D.; DAW, N.; MACDONALD, L.; BOOKCHIN, R.M. 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., CASTRO, P., MACHADO, A. L., FRAGA, C.A M., LUGNIER, C., MORAES, V.L.G., BARREIRO, E.J. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg Med. Chem.**, v. 10, p.3067-3073, 2002.

LIMA, P.D.L.; CARDOSO, P.C.S.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BURBANO, R.R. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an *in vitro* study. **Gen. Mol. Res.**, v.2, n.3, p.328-333, 2003.

LINDSEY, W.T.; OLIN, B.R. Deferasirox for transfusion-related iron overload: a clinical review. **Clin. Ther.**, v. 29, n. 10, p. 2154-2166, 2007.

MA, Q.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRELL, J.J.; KUTLAR, A.; FARRER, L. A.; BALDWIN, C.T.; STEINBERG, M.H. Fetal haemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. **Pharmacogenomics.**, v. 7, n. 6, p. 386-394, 2007.

MACK, A.K.; KATO, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.38, p. 1237–1243, 2006.

MAKARYUS, J.N.; CATANZARO, J.N.; KATONA, K.C. Exertional rhabdomyolysis and renal failure in patients with sickle cell trait : Is it time to change our approach? **Hematology.**, v. 12, n. 4, p.349-352, 2007.

MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVE, H. Level of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v. 90, p.172-176, 1993.

MCNAUGHTON-SMITH, G.A.; BURNS, J.F.; STOCKER, J.W.; RIGDON, G.C.; CREECH, C.; ARRINGTON, S.; SHELTON, T.; FRANCESCHI, L. Novel inhibitors of the gardos channel for the treatment of sickle cell disease. **J. Med. Chem.**, v. 51, n.4, p. 976-982, 2008.

MEDANA, C.; ERMONDI, G.; FRUTERO, R.; DI STILO, A.; FERRETTI, C.; GASCO, A. Furoxans as nitric oxide donors. 4-Phenyl-3-furoxancarbonitrile: thiol-mediated nitric oxide release and biological evaluation. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 4412-4416, 1994.

MORPHY, R.; KAY, C.; RANKOVIC, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. **Drug Discov. Today.**, v. 9, p.641-651, 2004.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **J. Med. Chem.**, v.48, n.21, p. 6523-6543, 2005.

MORRIS, C.R.; KUYPERS, F.A.; LARKIN, S.; SWEETERS, N.; SIMON, J.; VICHINSKY, E.P.; STYLES, L. A . Arginine therapy: anovel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. **Brit. J. Haematol.**, v.111, p.498-500, 2000.

MOZAZARELLI, A.; HOFRICHTER, J.; EATON, W.A. Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. **Science.**, v. 237, p. 500-506, 1987.

MURAO, M.; FERRAZ, M.H.C. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 223-225, 2007.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O.O.; WYCHE, M.O.; CASTRO, O.; TAVAKKOLI, F. Upregulation of TNF α by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood.**, v. 96, n.11, p.14, 2000.

NAJEAN, Y.; RAIN, J.D. Treatment of polycythemia vera: the use of hydroxyurea and pipobroman in 292 patients under the age of 65 years. **Blood.**, v. 90, p. 3370–3377, 1997.

NETO, G.C.G.; PITOMBEIRA, M.S.; Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.39, n.1, p.51-56, 2003.

O'CONNELL, D. Neglected diseases. **Nature.**, v.449, p.157, 2007.

OKPALA, I.; DANIEL, Y.; HAYNES, R.; ODOEMENE, D.; GOLDMAN, J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. **Eur. J. Haematol.**, v.69, p.135–144, 2002.

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

PAGNIER, J.; MEARS, J.G.; DUNDA-BELKHODJA, O.; SCHAEFER-REGO, K.E.; BELDJORD, C.; NAGEL, R.L.; LABIE, D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.81, n.6, p.1771-1773, 1984.

PARK, S.; HAYES, B.L.; MARANKAN, F.; MULHEARN, D.C.; WANNA, L.; MESECAR, A.D.; SANTARSIERO, B.D.; JOHNSON, M.E.; VENTON, D.L. Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 6, p. 936-953, 2003.

PATHARE, A.; KINDI, S.A.L.; ALNAQDY, A. A.; DAAR, S.; KNOX-MACAULAY, H.; DENNISON, D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am. J. Hematol.**, v. 77, n. 4, p. 323-328, 2004.

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

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

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

PERRY, C.J.; PARVEEN, Z. The cyclization of substituted phthalanilic acids in acetic acid solution. A kinetic study of substituted *N*-phenylphthalimide formation. **J. Chem. Soc.**, v.4, p. 512-521, 2001.

PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F.; MILNER, P.F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M.H.; KLUG, P.P. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1639-1644, 1994.

PORTER, J.B. Practical management of iron overload. **Br. J. Haematol.**, v. 115, p. 239-252, 2001.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova.**, v. 22, n. 4, 1999.

QUESNEL, B.; FENAUX, P. P15INK4b gene methylation and myelodysplastic syndromes. **Leuk. Lymphoma.**, v.35, n. 5-6, p. 437-443, 1999.

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

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 97-103, 2000.

ROBERTS, I. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v.120, p.177-186, 2003.

ROCHA, H.H.G. **Anemia Falciforme**. Rio de Janeiro: Rubio, 2004. 291p. ISBN 85-87600-29-X.

SAFO, M.K.; ABDULMALIK, O.; DANSO- DANQUAT, R.; BURNETT, J.C.; NOKURI, S.; JOSHI, G.S.; MUSAYEV, F.N.; ASAKURA, T.; ABRAHAM, D.J. Structural basis for the potent antisickling effects of a novel class of five membered heterocyclic aldehydic compounds. **J. Med. Chem.**, v.47, p.4665-4676, 2004.

SAFO, M.K.; DANSO-DANQUAT, R.; JOSHI, G.S.; ABRAHAM, D.J. **Antisickling agents**. US2005/ 0209199 A1; USPTO 22 set. 2005).

SANTOS, J.L.; LIMA, L.M.; CHUNG, M.C. Microondas doméstico na síntese de derivados ftalimídicos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Aplic.**, v.27, n.2, p.163-167, 2006.

SANTOS, J.L. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento da anemia falciforme**.197p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2007.

SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C.; LIMA, L.M.; COSTA, F.F.; LANARO, C. **Uso de compostos derivados ftalimídicos e/ou sulfonamídicos no tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis de TNF- α e a**

necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico, compostos derivados ftalimídicos, compostos derivados sulfonamídicos, métodos de obtenção de um composto derivado sulfonamídico. BR n. PI 0705396-7, 12 dez. 2007.

SCHOENAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **II Farmaco.**, v.54, p.316–320, 1999.

SHIBATA, Y.; SHICHITA, M.; SASAKI, K.; NISHIMURA, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. 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.

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

SPACE, S.L.; LANE, P.A.; PICKETT, C.K.; WEIL, J.V. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am. J. Hematol.**, v.63, n. 4, p.200-204, 2000.

SORBA, G.; MEDANA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; DI STILO, A.; GALLI, U.; GASCO, A. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **J. Med. Chem.**, v. 40, n. 4, p. 463-469, 1997.

STAŃCZAK, A.; FERRA, A. Prodrugs and soft drugs. **Pharmacol Rep.**, v. 58, n. 5, p.599-613, 2006.

STEINBERG, M.H.; BARTON, F.; CASTRO, O.; PEGELOW, C.H.; BALLAS, S.K.; KUTLAR, A. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia. Risk and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA.**, v.289, p.1645-1651, 2003.

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

SUD, R.; SPENGLER, R.N.; NADER, N.D.; IGNATOWSKI, T.A. Antinociception occurs with a reversal in α_2 -adrenoceptor regulation of TNF production by

peripheral monocytes/macrophages from pro- to anti-inflammatory. **Eur. J. Pharm.**, v. 588, n. 2-3, p. 217-231, 2008.

SUN, M. A million dollars for the magic bullet. **Science.**, v. 214, n.4527, p.1326-1327, 1981.

TAVAKKOLI, F.; NAHAVANDI, M.; WYCHE, M.Q.; PERLIN, E. Plasma levels of TNF - α in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Hematology.**, v.9, n.1, p. 61-64, 2004.

TAYLOR, J.G.; NOLAN, V.G.; MENDELSON, L.; KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One.**, v.3, n.5, p.1-8, 2008.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet.**, v. 359, p. 2188–2194, 2002.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI V.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Curr. Med. Chem.**, v.14, n.17, p.1829-52, 2007.

VORDERMEIER, S.; SINGH, S.; BIGGERSTAFF, J.; HARRISON, P.; GRECH, H.; PEARSON, T.C.; DUMONDE, D.C.; BROWN, K.A. Red blood cells from patients with sickle cell disease exhibit an increased adherence to cultured endothelium pretreated with tumour necrosis factor (TNF). **Br. J. Haematol.**, v. 81, n.4, p. 591-597,1992.

WAGNER, M.C.; ECKMAN, J.R.; WICK, T.M. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 144, n. 5, p. 260-267, 2004.

WALLIS, R.S. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, n. 10, p. 601-611, 2008.

WAMBEBE, C.; KHAMOFU, H.; MOMOH, J.A.; EKPEYONG, M.; AUDU, B.S.; NJOKU, O.S.; BAMGBOYE, E.A.; NASIPURI, R.N.; KUNLE, O.O.; OKOGUN, J.I.; ENWEREM, M.N.; AUDAM, J.G.; GAMANIEL, K.S.; OBODOZIE, O.O.; SAMUEL, B.; FOJULE, G.; OGUNYALE, O. Double-blind, placebo-controlled,

randomised cross-over clinical trial of NIPRISAN in patients with sickle cell disorder. **Phytomedicine.**, v. 8, n. 4, p. 252-261, 2001.

WATSON, J.; STAHPMAN, A. W.; BILLELO, F.P. The significance of the paucity of sickle cells in neighborly negro infants. **Am. J. Med. Scie.**, v. 215, p.419-423, 1948.

WEATHERALL, D. Red blood cell genes and malaria. **Genetic Suse. Infec.Diseases.**, p.107-119, 2008.

WEINER, D.L.; HIBBERD, P.L.; BETIT, P.; COOPER, A.B.; BOTELHO, C.A.; BRUGNARA, C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 289, n.9, p. 1136–1142, 2003.

WERMUTH, C. G. Multitargeted drugs: the end of the "one-target-one-disease" philosophy? **Drug Discov. Today.**, v. 9, n. 19, p. 826-827, 2004.

WUN, T.; PAGLIERONI, T.; TABLIN, F.; WELBORN, J.; NELSON, K.; CHEUNG, A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. **J. Lab. Clin. Med.**, v.129, n.5, p. 507-516, 1997.

YARBRO, J.W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Semin. Oncol.**, v.3, n. 9, p.1-10, 1992.

ZENNADI, R.; CHIEN, A.; XU, K.E.; BATCHVAROVA, M.; TELEN, M.J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood.**, v. 112, n. 8, p. 3474-3483, 2008.

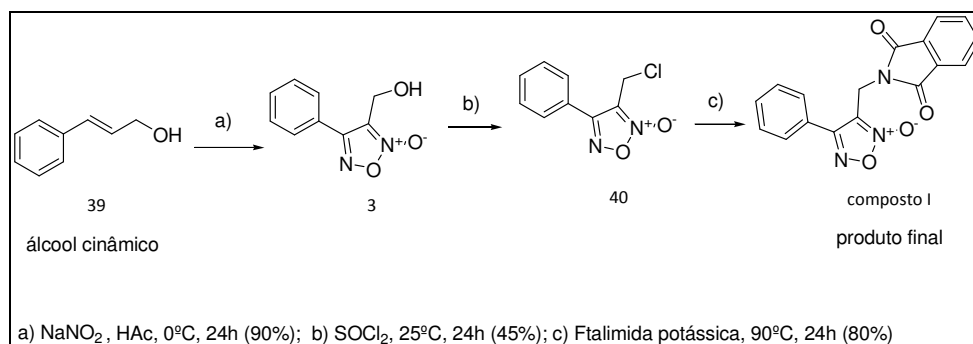
ANEXOS

Procedimentos experimentais e espectros

Todos os procedimentos sintéticos dos produtos obtidos, bem como as respectivas caracterizações estruturais serão apresentados nesta seção na sequência de obtenção dos produtos finais (compostos I-VIII). Para fins didáticos será reapresentado o esquema sintético utilizado para obtenção dos respectivos compostos.

A) PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

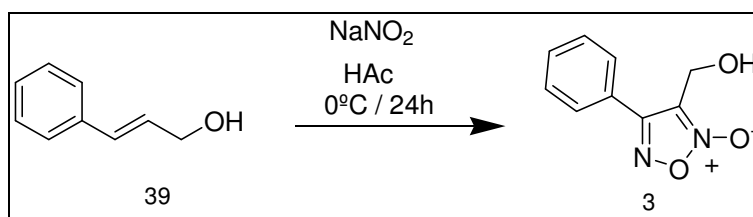
1- Síntese do composto I



Esquema 1: Obtenção do composto I obtido a partir do álcool cinâmico (40).

1.1- Síntese do 3-(hidroximetil)-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (3)

Reação



Procedimento

Em balão de 125 mL mantido em banho de gelo adicionou-se 10,8 g (0,08 mol) de álcool *trans*-cinâmico (39) e 16 mL de ácido acético. Com auxílio de funil de adição adiciona-se solução saturada de nitrito de sódio em água (15,52g (0,3 mol) em 35 mL de água destilada). A adição de nitrito de sódio é feita lentamente em banho de gelo (Figura 1). Após a adição de toda a solução de nitrito retira-se a reação do banho de gelo e mantém-se sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 50% hexano:50% éter dietílico e fase estacionária: alumina.

O isolamento reacional foi realizado por extração com porções de éter etílico (7 vezes com 30 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 lavagens de 20 mL cada). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, que foi posteriormente filtrada. A fase orgânica foi evaporada à pressão reduzida e forneceu um óleo laranja-acastanhado, posteriormente purificado por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: inicialmente 100% hexano, depois modificou-se para 90% hexano: 10% acetato de etila; e finalmente 80% hexano:20% acetato de etila) e forneceu 14 g (rendimento: 90%) do produto (3) com aspecto oleoso de coloração alaranjada ($\text{PM} = 192,18$; $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$).

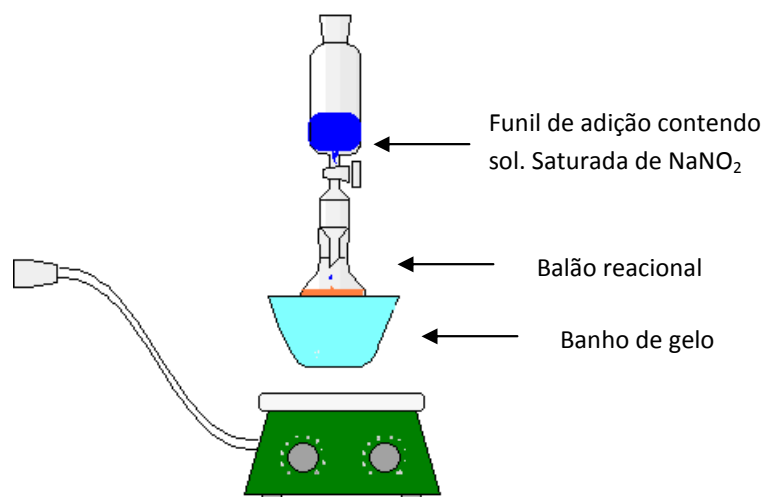
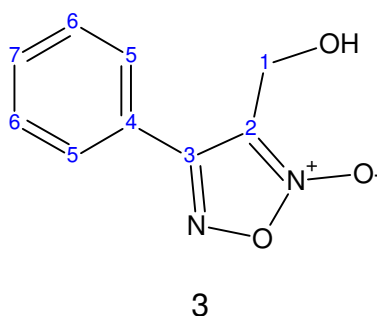


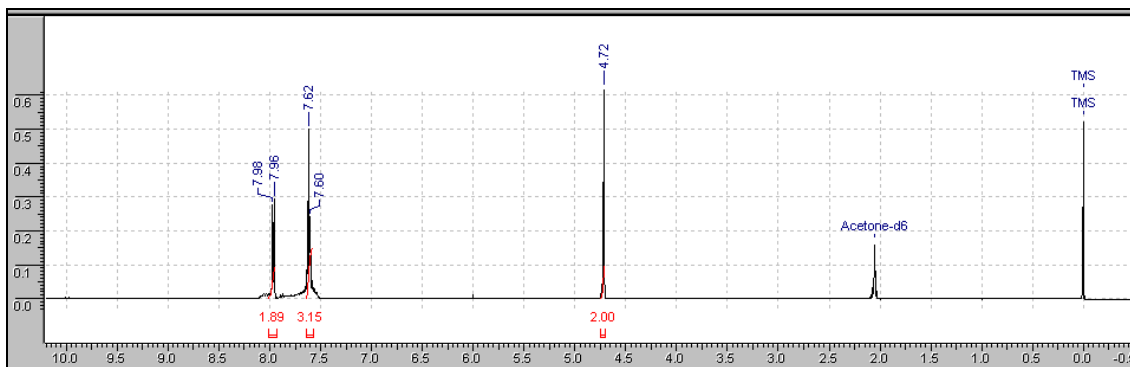
Figura 1: Esquema do aparato para obtenção do derivado furoxânico (3).

Caracterização estrutural:

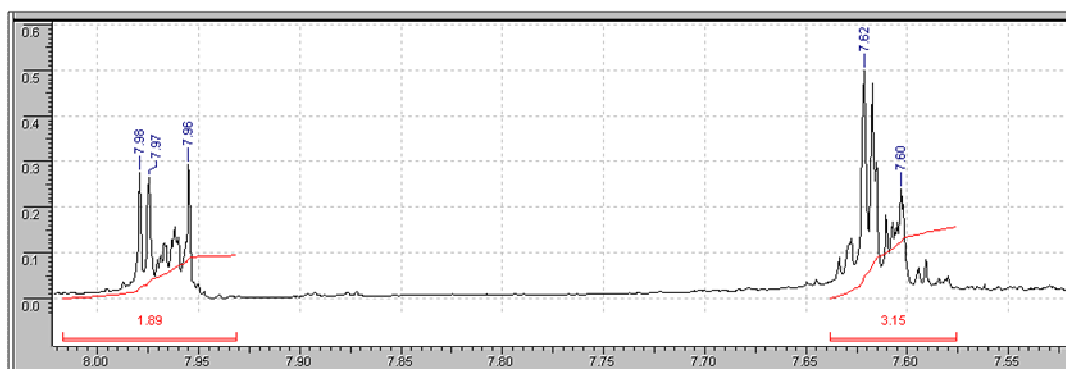


RMN ^1H (400 MHz; acetona- d_6): δ 7,97 (m; H₅; 2H); 7,81 (m; H₆ e H₇; 3H); 4,72 (s; H₁; 2H) ppm.

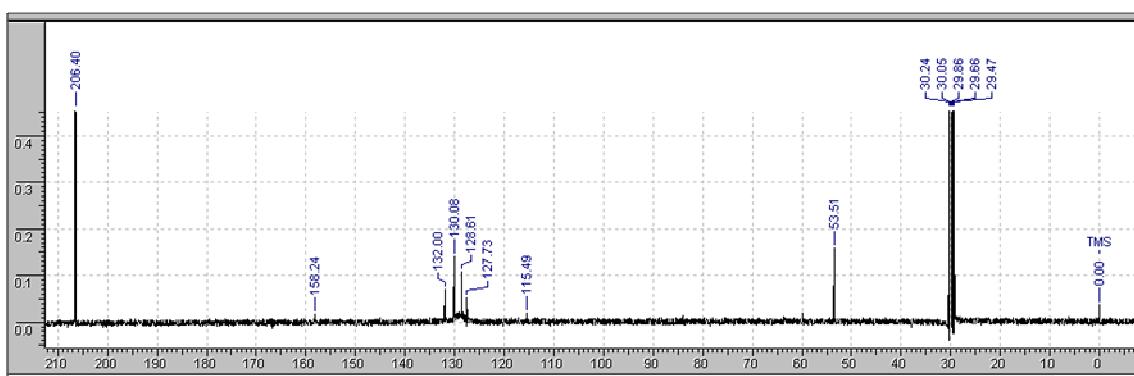
RMN ^{13}C (400 MHz; acetona- d_6): δ 158,6 (C3); 132,31 (C4); 130,39 (C5); 128,92 (C6); 128,03 (C7); 115,49 (C2); 53,81 (C1) ppm.



Espectro 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto furoxânico (3) (^1H RMN; 400MHz; acetona $_d6$).



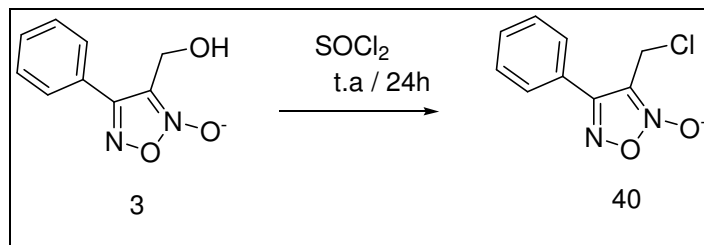
Espectro 2: Ampliação do espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto furoxânico (3) (^1H RMN; 400MHz; acetona $_d6$).



Espectro 3: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto furoxânico (3) (^{13}C RMN; 400MHz; acetona $_d6$).

1.2- Síntese do 3-(clorometil)-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (40)

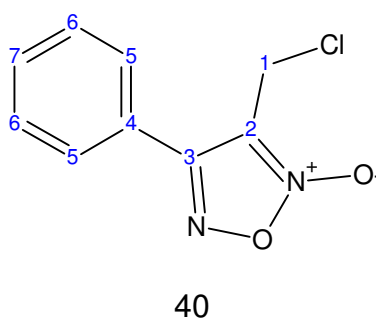
Reação



Procedimento

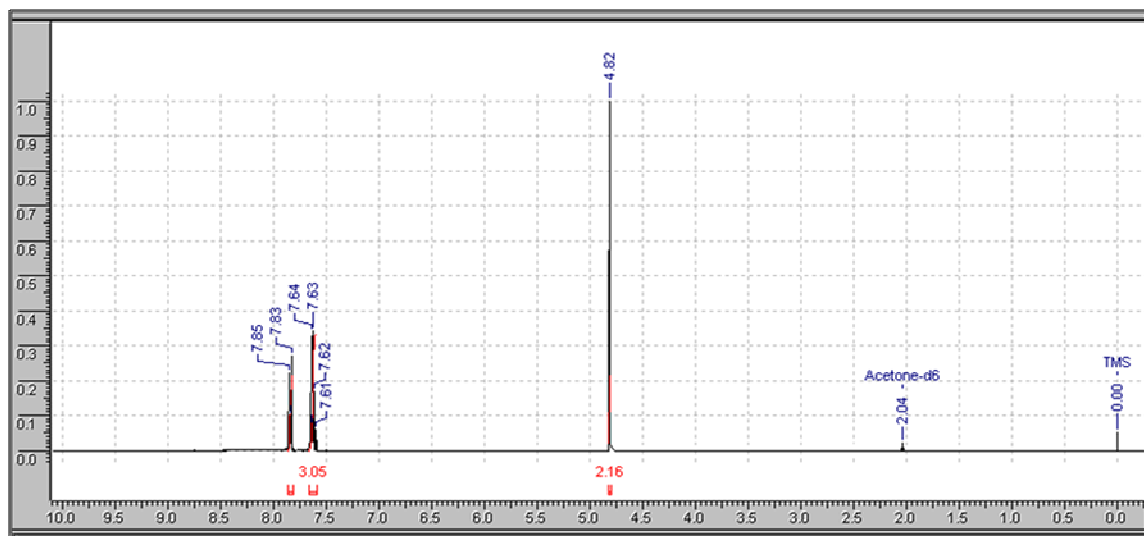
Em balão de 125 mL, adicionou-se 2 g do álcool furoxânico (0,01 mol) (3) e 1,57 mL de cloreto de tionila destilado (60) (0,02 mol; $d = 1,63 \text{ g/mL}$). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 24 horas. Adicionou-se lentamente cerca de 70 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio a 0°C . Realizou-se extrações da fase aquosa com acetato de etila (4 vezes de 30 mL). À fase orgânica, adicionou-se sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e concentrou-se o solvente à pressão reduzida para fornecer cerca de 1,53 g de uma mistura contendo o cloreto de alquila desejado e subprodutos. A purificação é realizada por cromatografia em coluna (fase estacionária: alumina; fase móvel: 95% hexano:5% acetato de etila) para fornecer 1,00 g de um óleo amarelo (40) (rendimento: 45%) ($\text{PM} = 210,6$; $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2$).

Caracterização estrutural:

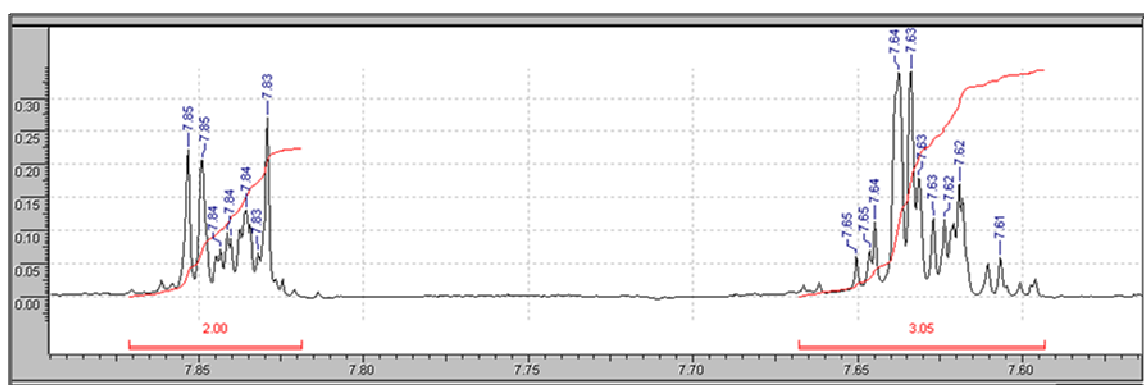


RMN ^1H (400 MHz; acetona- d_6): δ 7,84 (m; H_5 ; 2H); 7,63 (m; H_6 e H_7 ; 3H); 4,82 (s; H_1 ; 2H) ppm.

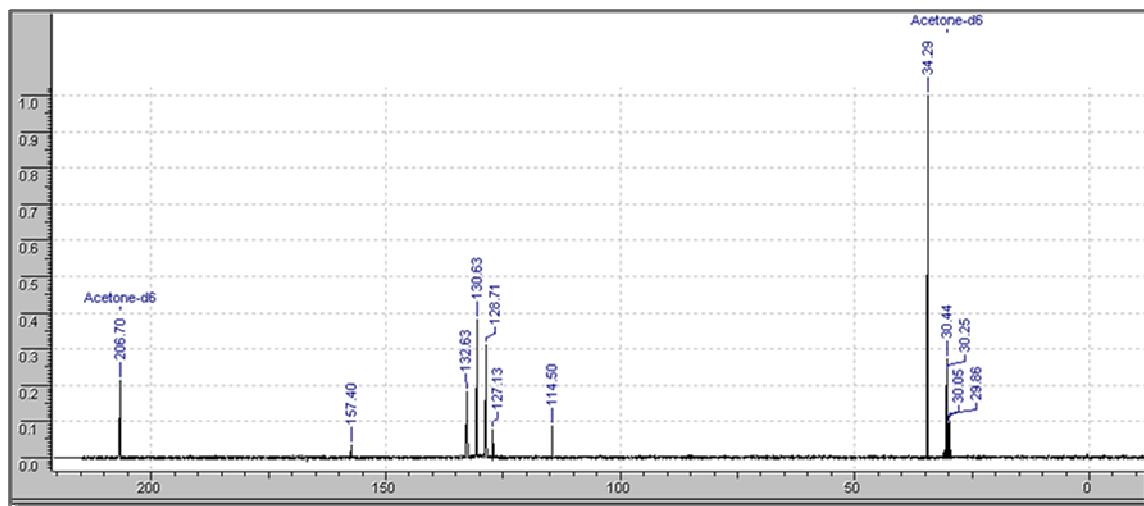
RMN ^{13}C (400 MHz; acetona- d_6): δ 157,4 (C3); 132,63 (C4); 130,63 (C5); 128,71 (C6); 127,13 (C7); 114,5 (C2); 34,29 (C1) ppm.



Espectro 4: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do clorometilfuroxano (40) (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_{d6}$).



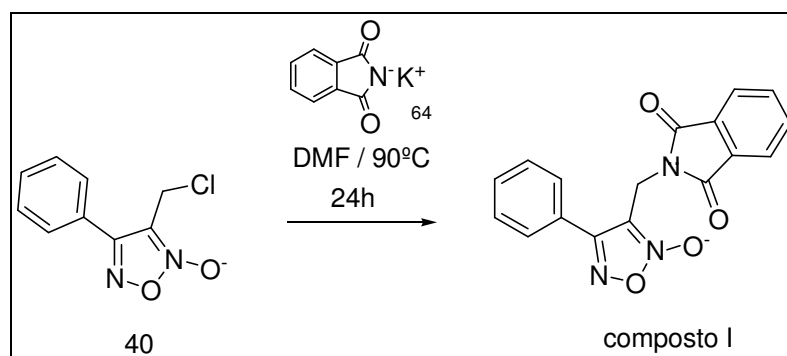
Espectro 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do clorometilfuroxano (40) (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_{d6}$) – ampliação região aromática.



Espectro 6: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do clorometilfuroxano (40) (RMN ^{13}C ; 400MHz; acetona $_{d6}$).

1.3- Síntese do 3-[(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)metil]-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (composto I).

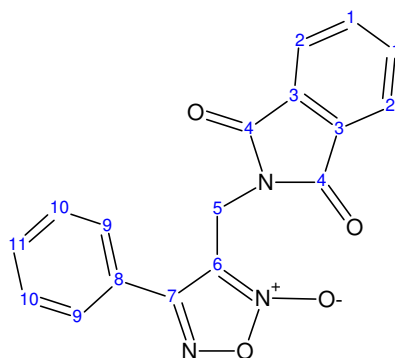
Reação



Procedimento

Em balão de 50 mL conectado a condensador de refluxo, adicionou-se 1,00g (4,80 mmol) do cloreto de metilfuroxano (40), 0,97 g (5,20 mmol) de ftalimida potássica (64) e 12 mL de *N,N*-dimetilformamida. Essa mistura reacional foi aquecida a 90°C por 24 horas. Após esse tempo, adicionou-se 8 mL de solução saturada de cloreto de sódio e se extraiu com acetato de etila (3 x 20 mL). O solvente foi eliminado à pressão reduzida e purificado por cristalização em etanol para fornecer 1,23g (80%) do composto I (faixa fusão = 159°C-160°C; PM = 316,36; C₁₇H₁₁N₃O₄).

Caracterização estrutural:

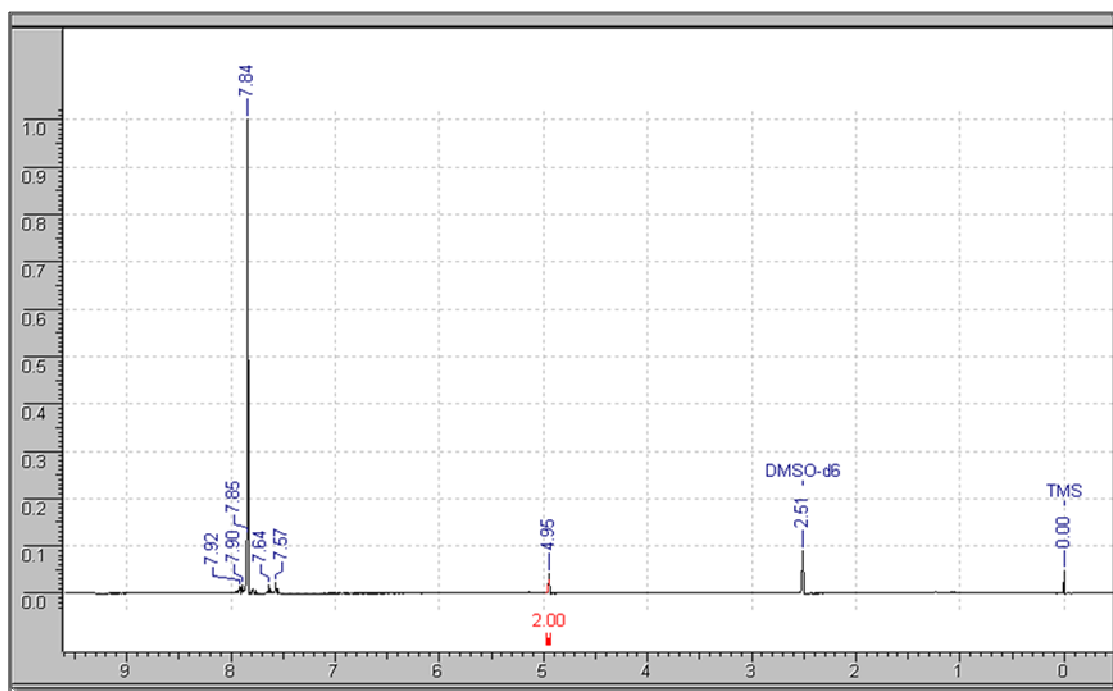
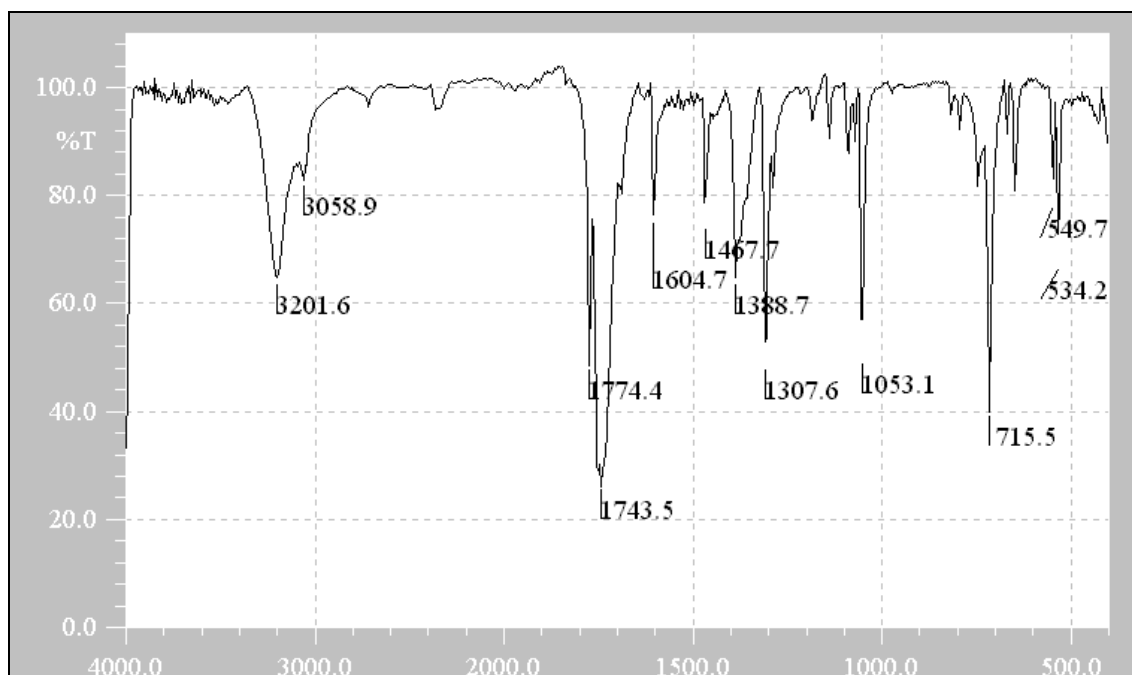


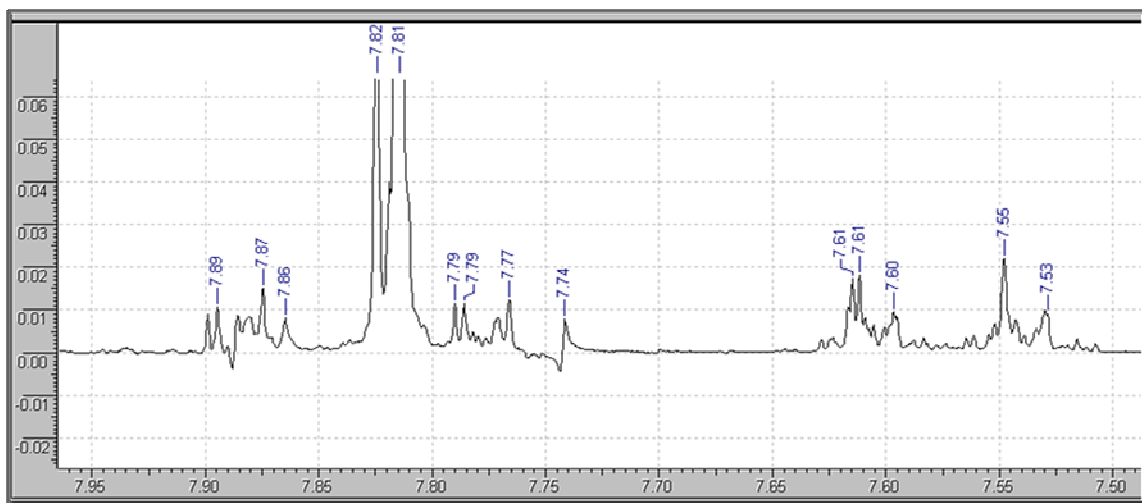
composto I

Infravermelho (pastilha de KBr): ν C-H aromático = 3059 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1774 cm^{-1} e 1743 cm^{-1} ; ν C=N furoxano = 1604 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1467 cm^{-1} ; ν C-N-C 1388 cm^{-1} .

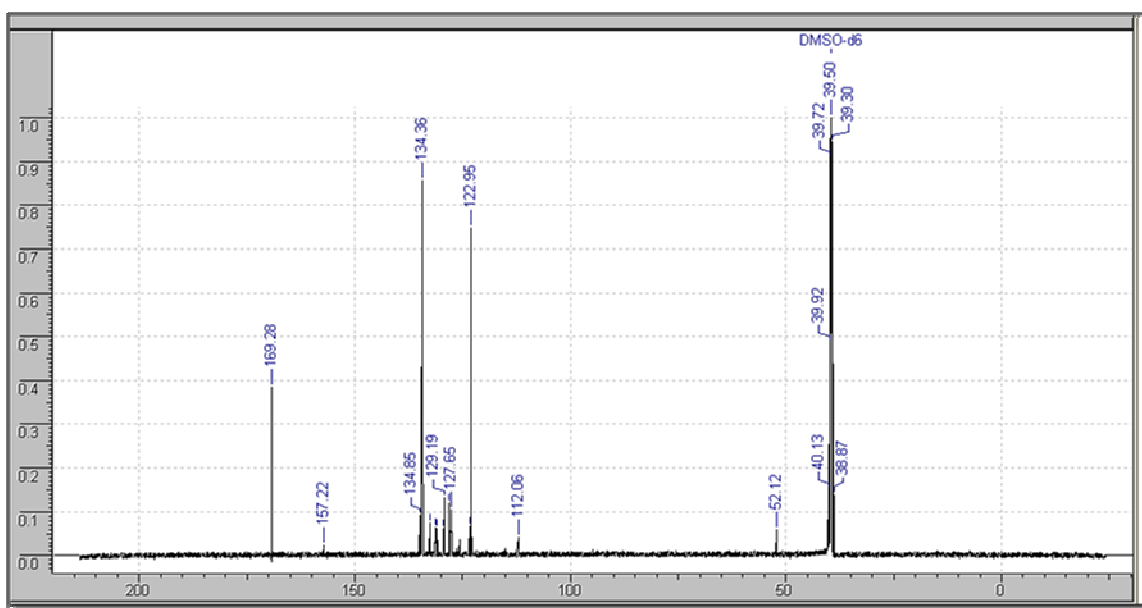
RMN ^1H (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 7,86-7,89 (m; 2H; H_9); 7,74-7,82 (m; 4H; H_1 e H_2); 7,53-7,60 (m; 3H; H_{10} e H_{11}); 4,95 (H_5 ; 2H) ppm.

RMN ^{13}C (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 169,28 (C4); 157,22 (C7); 134,36 (C2); 132,61 (C8); 131 (C3); 129,35 (C9); 128,06 (C10); 127,65 (C11); 122,95 (C1); 112,6 (C6); 52,12 (C5) ppm.



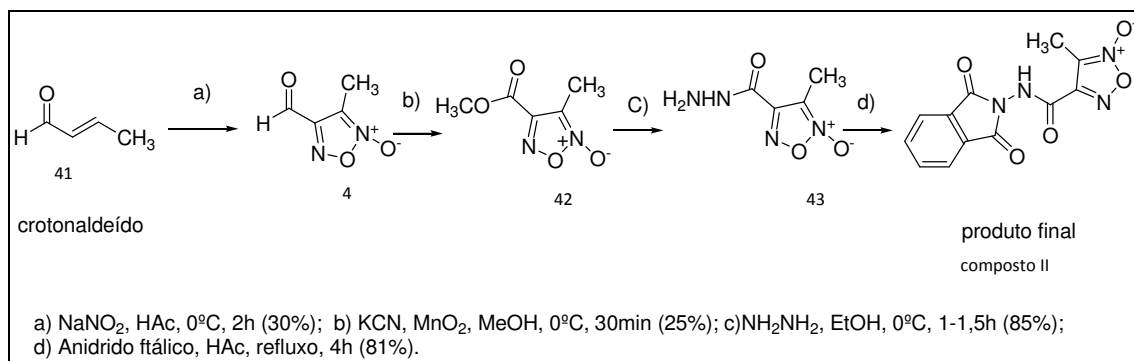


Espectro 9: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO-d_6) – ampliação região aromática.



Espectro 10: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto I (RMN ^{13}C ; 400 MHz; DMSO-d_6).

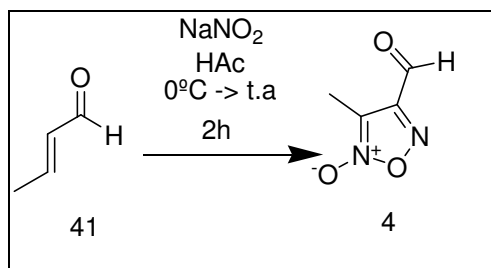
2 - Síntese do composto II



Esquema 2: Obtenção do composto II obtido a partir do crotonaldeído.

2.1- Síntese do 3-formil-4-metil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (4).

Reação

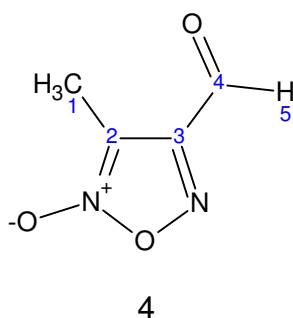


Procedimento

Em balão de 250 mL conectado a funil de adição, adicionou-se solução de 10 g (0,142 mol) de crotonaldeído (41) em 20 mL de ácido acético glacial. Gota a gota, manteve-se a temperatura abaixo de 8°C , e agregou-se, a essa mistura reacional, uma solução saturada de nitrito de sódio (0,497 mol; 34,3 g). Após a adição de todo o nitrito de sódio (Figura 1), a reação foi retirada do banho de gelo e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. O isolamento do produto foi realizado adicionando ao meio reacional 200 mL de água destilada. Realizaram-se extrações com diclorometano (7 x 40 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de magnésio. Filtrou-se e concentrou-se o produto à pressão reduzida.

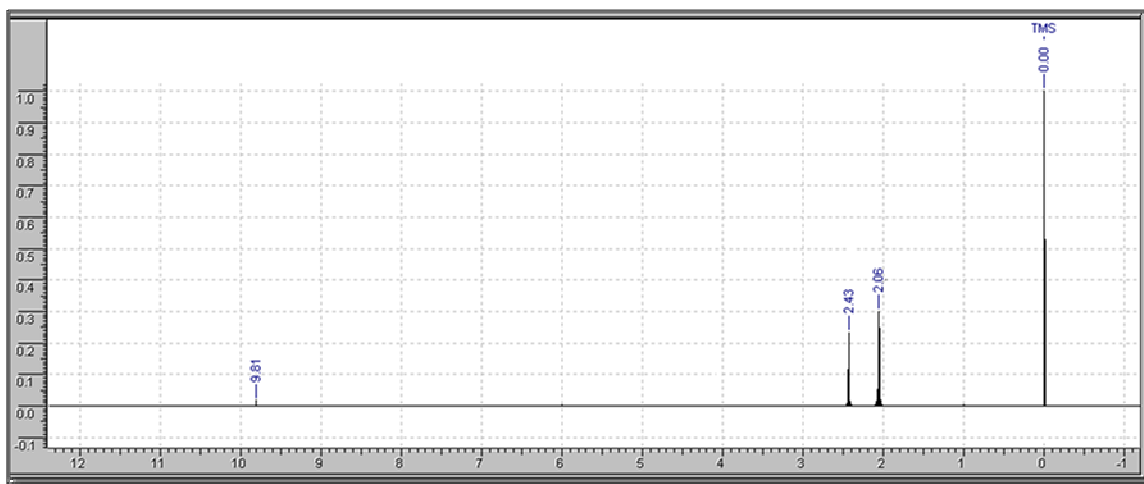
A purificação foi realizada em cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica; fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila, finalmente o produto é recolhido adicionando 100% de acetato de etila). Após purificação por coluna, o produto (4) é obtido 5,40 g de um óleo alaranjado (rendimento de 30%) (PM=128,09; C₄H₄N₂O₃).

Caracterização estrutural:

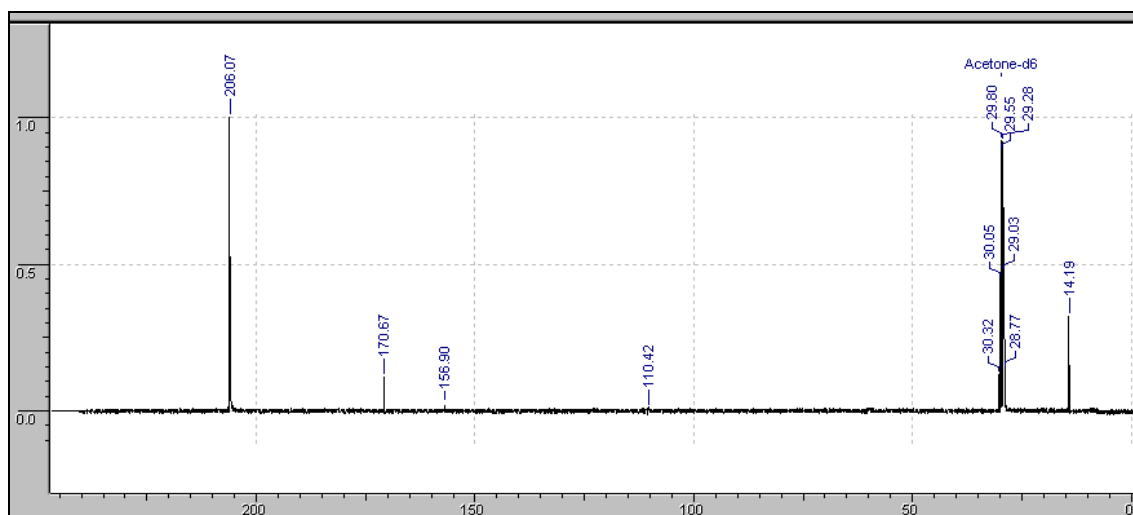


RMN ¹H (400 MHz; acetona_{d6}): δ 9,81 (s; H₅; 1H); 2,43 (s; H₁; 3H) ppm.

RMN ¹³C (200 MHz; acetona_{d6}): δ 170,67 (C4); 156,9 (C3); 110,42 (C2); 14,19(C1) ppm.



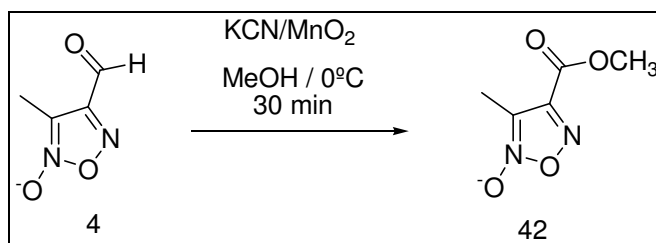
Espectro 11: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto furoxânico (4) (RMN ¹H; 400MHz; acetona_{d6}).



Espectro 12: Espectro de RMN C^{13} do aldeído furoxano (4) (RMN C^{13} ; 200 MHz; acetona- d_6).

2.2- Síntese do 3-metoxycarbonil-4-metil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (42).

Reação



Procedimento

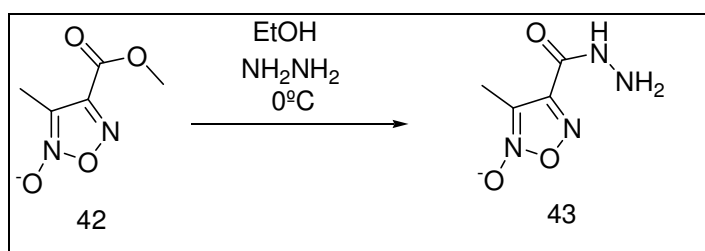
Em balão de 50 mL, uma mistura de 0,910 g do aldeído (4) em 15 mL de metanol foi mantida a 0°C em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 0,767g de KCN e na sequência pequenas quantidades de óxido de manganês (IV) (3,093 g). A adição de dióxido de manganês foi feita lentamente durante 5 minutos. Terminada a adição, retirou-se uma alíquota e realizou-se uma CCD* (fase móvel: 80% hexano:20% acetato de etila). A reação foi mantida por um tempo entre 30-45 minutos. O isolamento reacional iniciou-se com a filtração do MnO₂ usando celite e lavou-se com 3 porções de diclorometano (3 x 20mL). A fase orgânica contendo diclorometano foi lavada com água destilada (2 x 15

mL) e solução saturada de cloreto de sódio (2x15 mL) para remoção principalmente do KCN. A fase orgânica foi separada, e adicionou-se sulfato de sódio como agente secante. Filtrou-se e o solvente foi eliminado à pressão reduzida para fornecer 272 mg (25%) de um óleo de coloração alaranjada (42) (PM = 158,03; C₅H₆N₂O₄).

*Nota: as placas cromatográficas são reveladas com reagente de Brady. Este, é usado como revelador da função química aldeído. Pode ser preparado dissolvendo 3 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa solução é adicionada lentamente a uma mistura de 20 mL de água e 70 mL etanol absoluto. A mistura é homogeneizada e posteriormente filtrada.

2.3- Síntese do 3-hidrazinocarbonil-4-metil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (43).

Reação

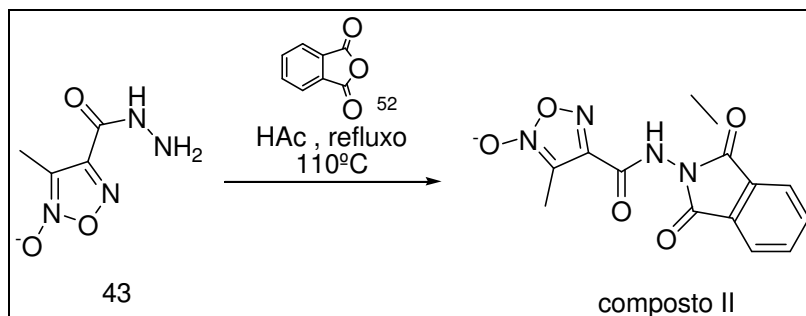


Procedimento

Em balão, adicionou-se 270 mg do éster metílico (1,7 mmol) (42) e 5,5 mL de etanol absoluto (solução A). Em béquer preparou-se uma solução contendo 1 mL de hidrazina e 9 mL de etanol (solução B). Ambas as soluções foram mantidas a 0°C. Lentamente verteu-se a solução B na solução A e manteve-se a temperatura a 0°C sob agitação vigorosa por 30 minutos. O isolamento foi realizado adicionando-se cerca de 30 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 20 mL de água e realizou-se extrações com diclorometano (4 x 20 mL). À fase orgânica, adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. O filtrado foi evaporado à pressão reduzida e obteve-se 230 mg (85% rendimento) de um óleo de coloração alaranjada (43) (PM = 158,04; C₄H₆N₄O₃).

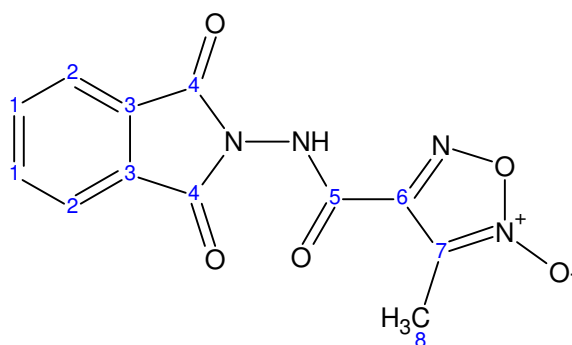
2.4- Síntese do 3-[[[(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)amino]carbonil]-4-metil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (composto II).

Reação



Procedimento

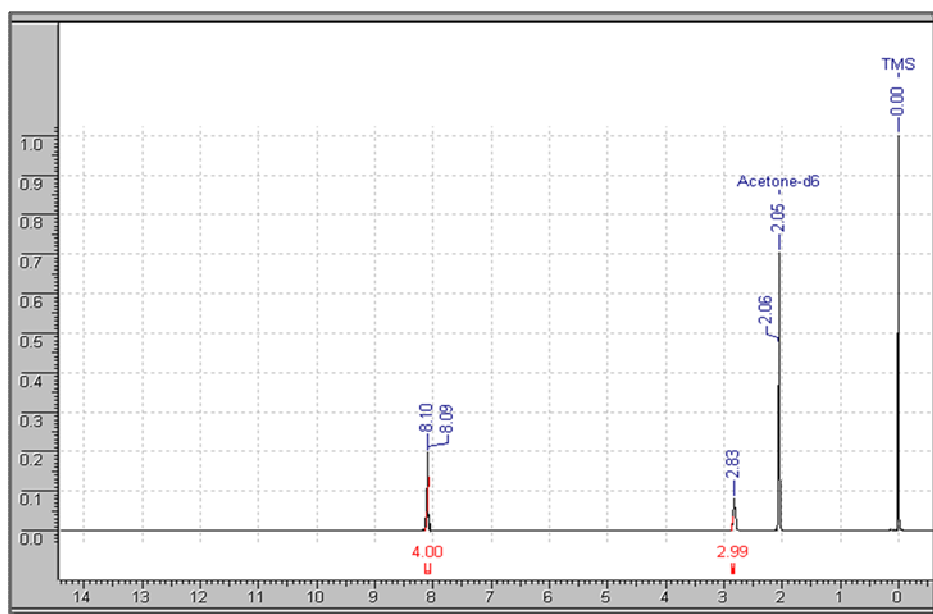
Em balão de 50 mL, adicionou-se 127 mg (0,8 mmol) da hidrazida de furoxano (43). Adicionou-se 3 mL de ácido acético glacial, e em seguida 119 mg (0,8 mmol) de anidrido ftálico (52). A reação foi mantida sob agitação vigorosa e refluxo a 110°C por 4 horas. O isolamento reacional foi realizado adicionando água gelada/gelo e solução de hidróxido de sódio 20% até que o pH fosse igual a 7. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 10 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. O solvente foi evaporado à pressão reduzida. A massa total obtida foi de 188 mg (81% de rendimento) como um sólido marrom (composto II) (PM = 288,305; C₁₂H₈N₄O₅).



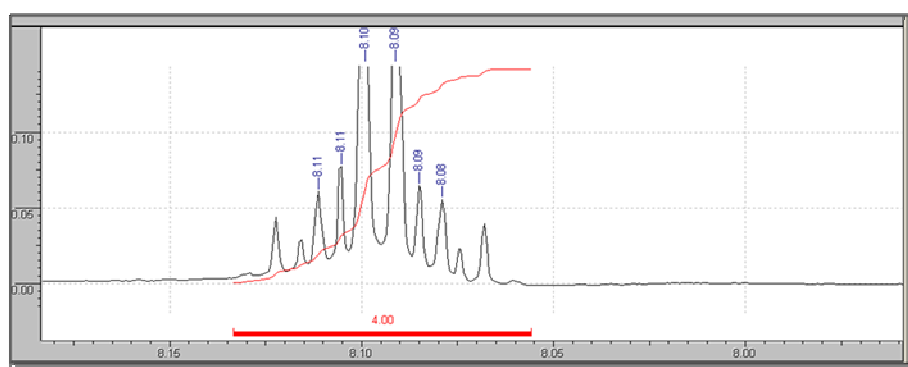
composto II

RMN ¹H (400 MHz; acetona_{d6}): δ 8,08-8,11 (m; H₁ e H₂; 4H); 2,83 (s; H₈; 3H) ppm.

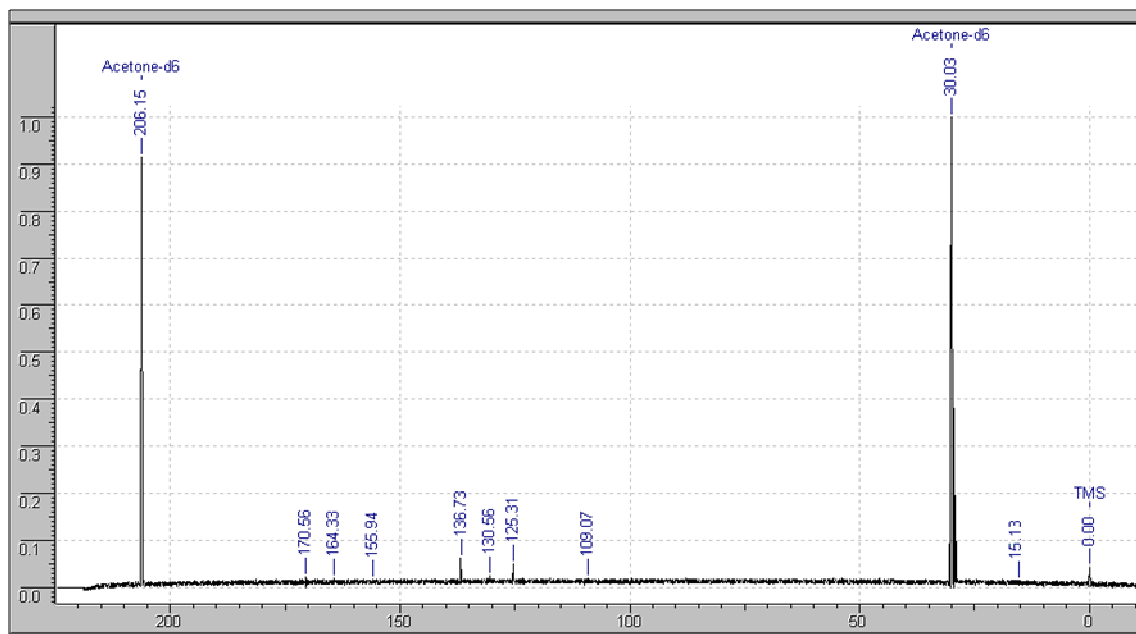
RMN ¹³C (400 MHz; acetona_{d6}): δ 170,56 (C4); 164,33 (C5); 155,94 (C6); 136,73 (C2); 130,56 (C3); 125,31 (C1); 109,07 (C7); 15,13 (C8) ppm.



Espectro 13: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6).

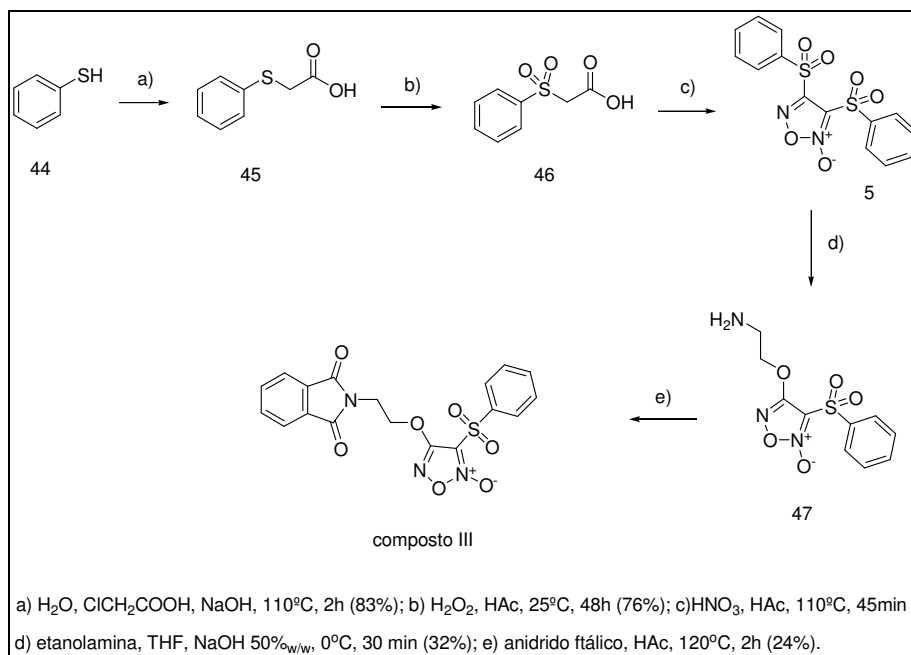


Espectro 14: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região aromática.



Espectro 15: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto II (RMN ^{13}C ; 400 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação região aromática.

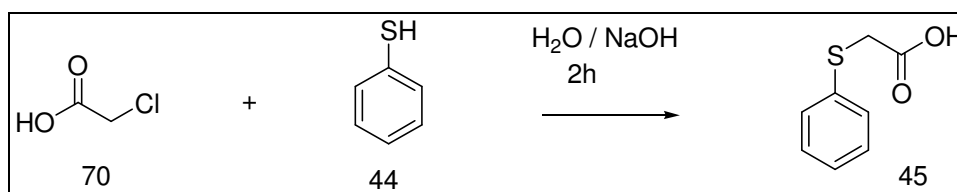
3 – Síntese do composto III



Esquema 3: Síntese do composto III

3.1- Síntese do ácido feniltioacético (45) (adaptado de KENNY, WALSH & DAVENPORT, 1961).

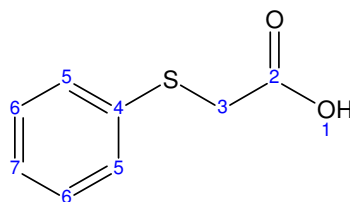
Reação



Procedimento

Em balão de 250 mL, adicionou-se 9,3 mL de tiofenol (44) (90,70 mmol; $d = 1,073 \text{ g/mL}$) em 40 mL de água destilada. Adicionou-se 7,62 g de hidróxido de sódio (190,60 mmol) e agitou-se por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 9,44g de ácido monocloroacético (70) (99,84 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação e aquecimento a 110°C por duas horas. O produto (45) foi recristalizado em etanol para fornecer 12,65 g de um sólido branco (83% rendimento), com faixa de fusão entre 60°C - 61°C ($\text{PM} = 168,21$; $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{S}$).

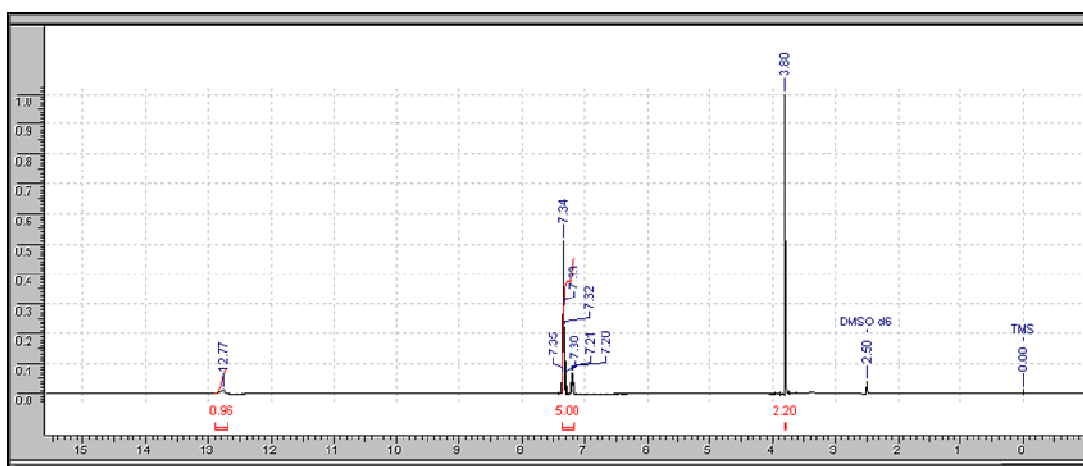
Caracterização estrutural:



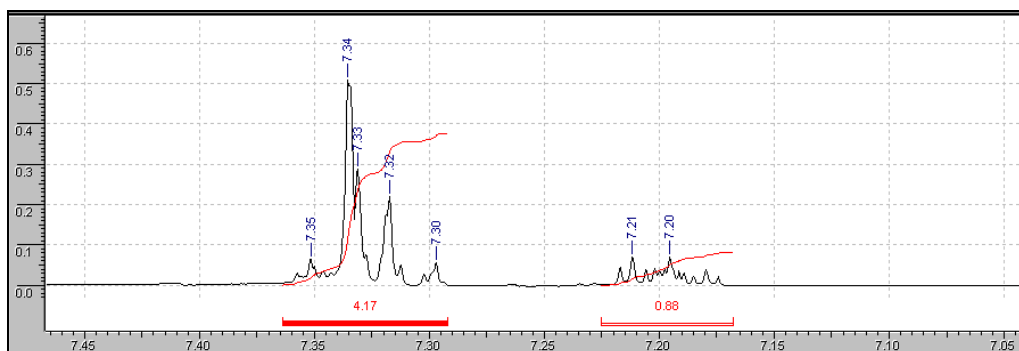
45

RMN ^1H (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 12,77 (s; H_1 ; 1H); 7,33 (m; H_5 e H_6 ; 4H; $J_{\text{orto}} = 8,3$ Hz); 7,20 (m; H_7 ; 1H; $J_{\text{orto}} = 8,3$ Hz); 3,80 (H_3 ; 2H) ppm.

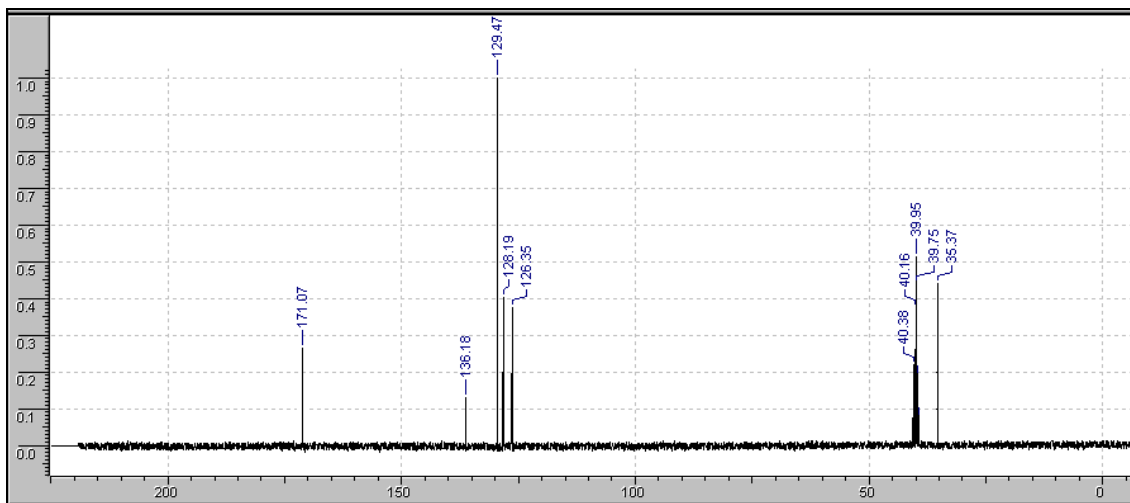
RMN ^{13}C (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 171,7 (C2); 136,18 (C4); 129,47 (C5); 128,18 (C6); 126,35 (C7); 35,37 (C3) ppm.



Espectro 16: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ácido feniltioacético (45) (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO_{d6}).



Espectro 17: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ácido feniltioacético (45) (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação da região aromática.

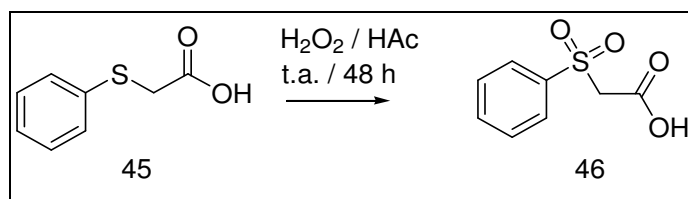


Espectro 18: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ácido feniltioacético (45) (RMN ^{13}C ; 400 MHz; DMSO_{d6}).

3.2- Síntese do ácido fenilsulfonilacético (46)

3.2.1- Síntese do ácido fenilsulfonilacético (46) (adaptado de KENNY, WALSH & DAVENPORT, 1961).

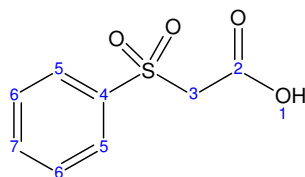
Reação



Procedimento

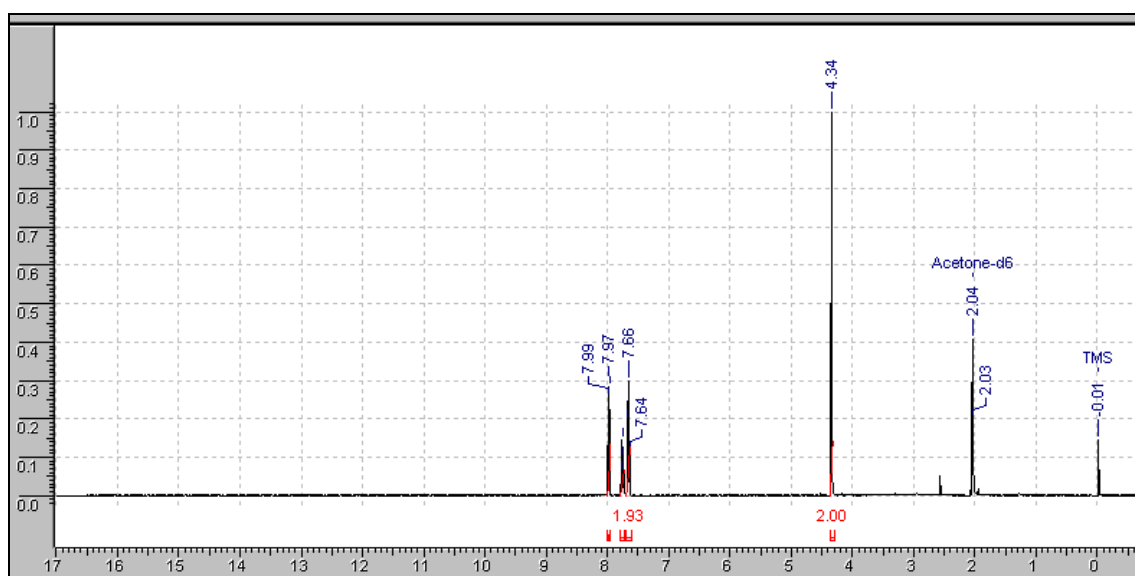
Em balão de 25 mL adicionou-se 500 mg de ácido feniltioacético (45) (1 eq mol) em 4 mL de ácido acético glacial e 1,2 mL (4 equivalentes) de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por dois dias (48 horas). O isolamento foi realizado adicionando-se cerca de 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio, em seguida realizaram-se extrações (4 x 15 mL) com acetato de etila. Foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro. Em seguida, filtrou-se e evaporou-se a fase orgânica a pressão reduzida. O produto (46) obtido com rendimento de 76% como um sólido branco (PM = 200,21; $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4\text{S}$).

Caracterização estrutural:

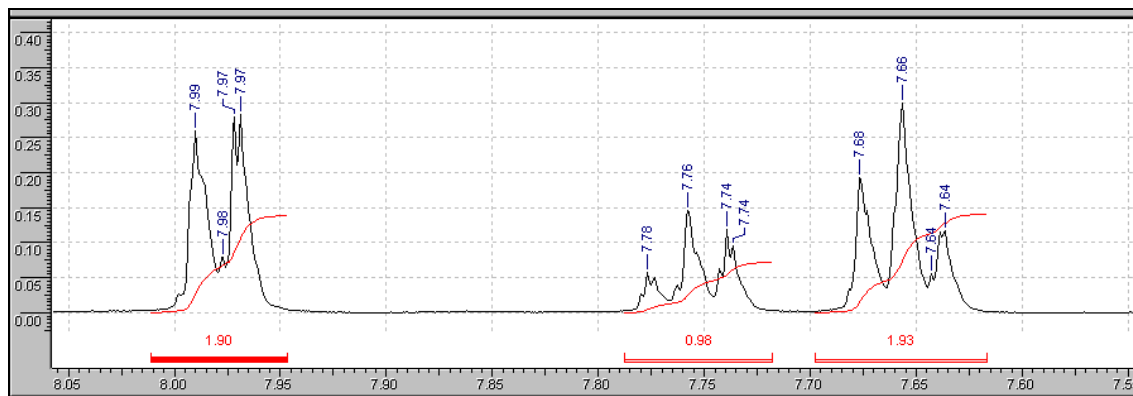


46

RMN ^1H (400 MHz; acetona $_d$): δ 7,98 (dd; H $_5$; 2H; $J_{\text{orto}} = 7,33\text{Hz}$ e $J_{\text{meta}} = 2,02$); 7,76 (ddd; H $_7$; 1H; $J_{\text{orto}} = 7,33\text{ Hz}$ e $J_{\text{meta}} = 2,02$); 7,66 (ddd; H $_6$; 2H; $J_{\text{orto}} = 7,33\text{ Hz}$ e $J_{\text{meta}} = 2,02$); 4,34 (s; H $_3$; 2H) ppm.



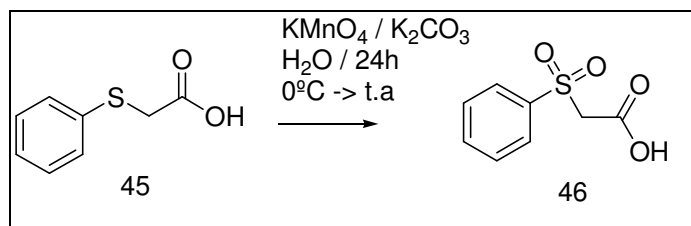
Espectro 19: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ácido sulfonilfeniltioacético (46) (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_d$).



Espectro 20: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do ácido sulfonilfeniltioacético (46) (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região aromática.

3.2.2- Síntese do ácido fenilsulfonilacético (46) (adaptado de KENNY, WALSH & DAVENPORT, 1961).

Reação



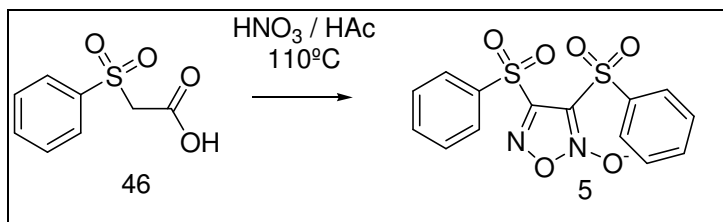
Procedimento

Em balão de 500 mL mantido em banho de gelo, adicionou-se 1 g de ácido feniltioacético (45) (5,95 mmol) em 60 mL de água. Em seguida, adicionou-se 0,82 g de carbonato de potássio (5,95 mmol). Uma solução de permanganato de potássio (1,88 g de KMnO_4 em 100 mL de água destilada) foi colocada em funil de adição. Esta solução foi adicionada gota a gota mantendo-se a temperatura a 0°C . Após o término da adição de permanganato a reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. O isolamento foi realizado por filtração do permanganato a vácuo e acidificação do meio com ácido clorídrico. O produto presente na fase aquosa foi extraído com acetato de etila (5 x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio. Adicionou-se a fase orgânica sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e concentrou-se o solvente a pressão reduzida para fornecer

750 mg do produto desejado (46) com rendimento de 63% (PM = 200,21; C₈H₈O₄S).

3.3- Síntese do 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (5).

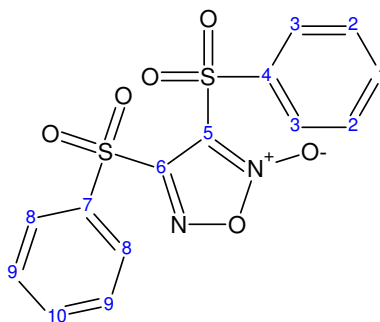
Reação



Procedimento

Em balão de 100 mL, adicionou-se 3,21 g do fenilsulfonilacético (46) em 10 mL de ácido acético glacial mantendo a temperatura a 0°C. Adicionou-se gota a gota 5 mL de ácido nítrico fumegante a 0°C. A mistura resultante permaneceu sob agitação a 0°C por 5 minutos e depois a reação foi mantida sob agitação e refluxo a 110°C por 45 minutos. Após esse tempo a mistura reacional foi resfriada e adicionou-se lentamente água gelada. Houve formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com água gelada. O produto obtido (5) foi cristalizado com uma mistura de acetato de etila/diclorometano/hexano (1:1:1) para fornecer de 2,54 g de um sólido branco com 56% de rendimento e faixa de fusão =140°C-142°C (PM = 366,38; C₁₄H₁₀N₂O₆S₂).

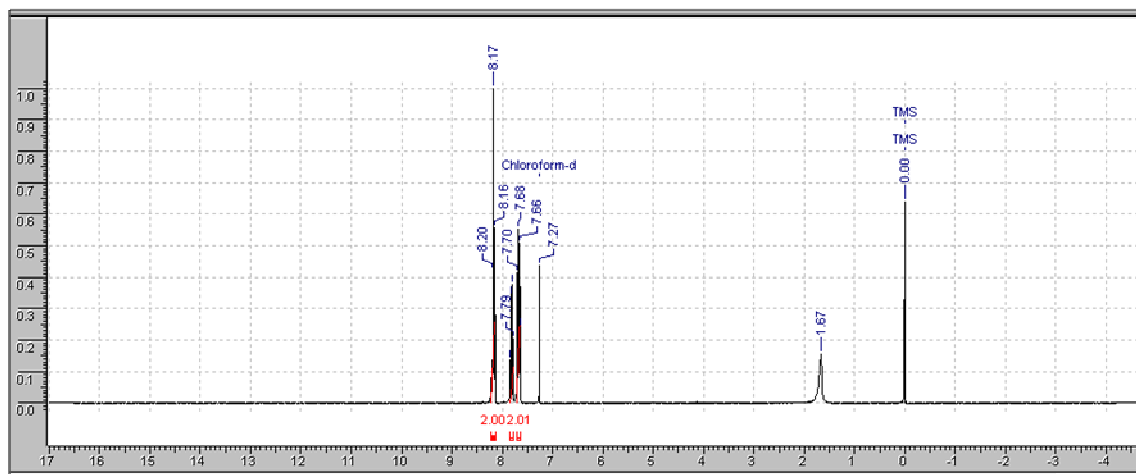
Caracterização estrutural:



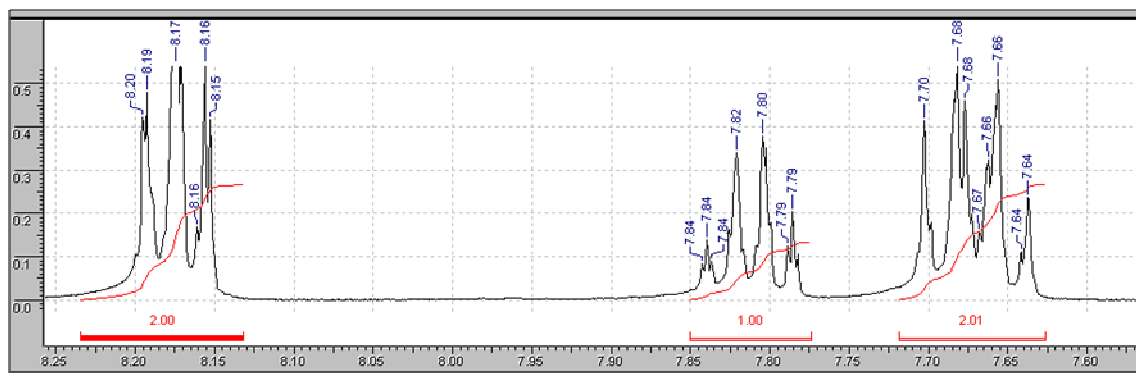
5

RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3d): δ 8,17 (H_3 e H_8 ; 4H; $J_{\text{orto}} = 7,33$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,26$ Hz); 7,80 (H_1 e H_{10} ; 2H; $J_{\text{orto}} = 7,33$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,26$ Hz); 7,67 (H_2 e H_9 ; 4H; $J_{\text{orto}} = 7,58$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,77$ Hz) ppm.

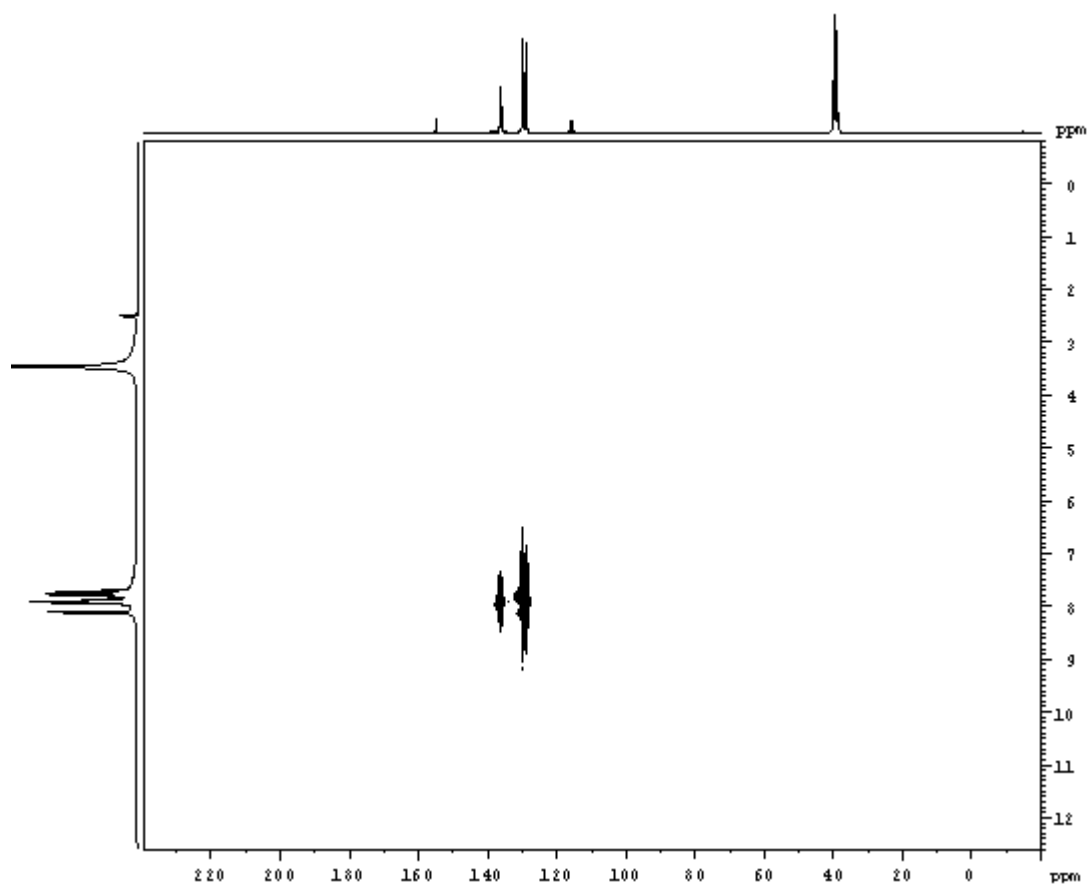
RMN ^{13}C (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 157 (C6); 136 (C9); 129,8 (C10); 129,4 (C8); 115 (C5) ppm.



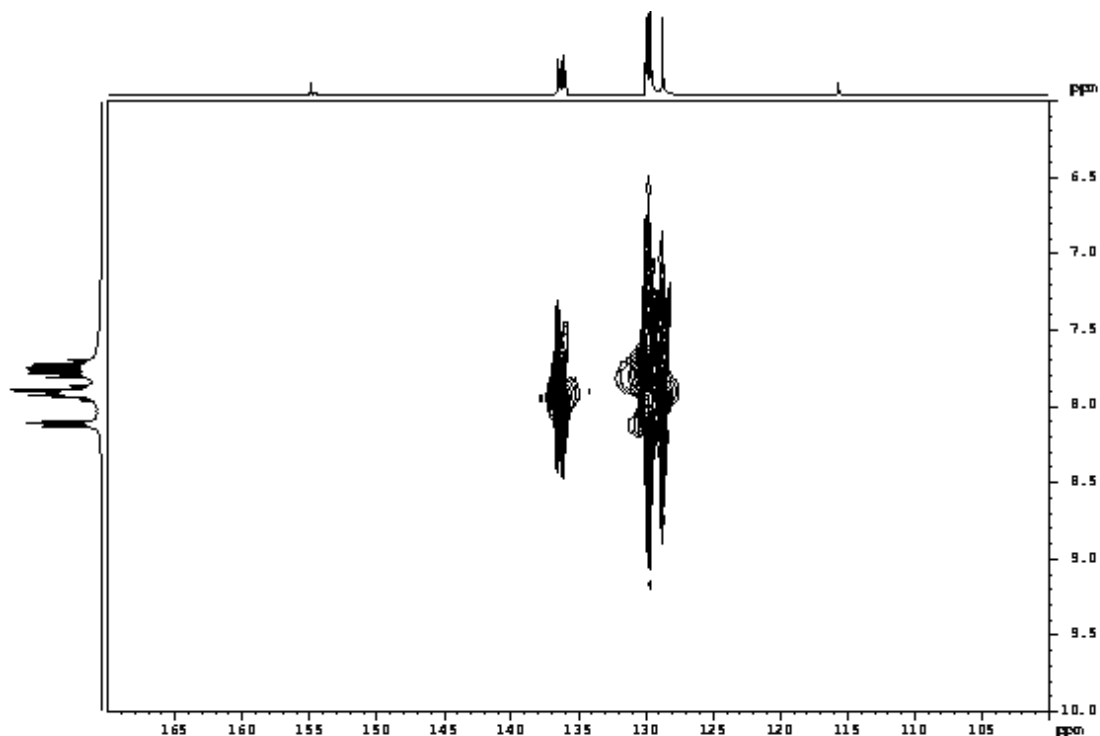
Espectro 21: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do bis-arylsulfonilfuroxano (5) (RMN ^1H ; 400 MHz; CDCl_3d).



Espectro 22: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do bis-arylsulfonilfuroxano (5) (RMN ^1H ; 400 MHz; CDCl_3d) – ampliação região aromática.



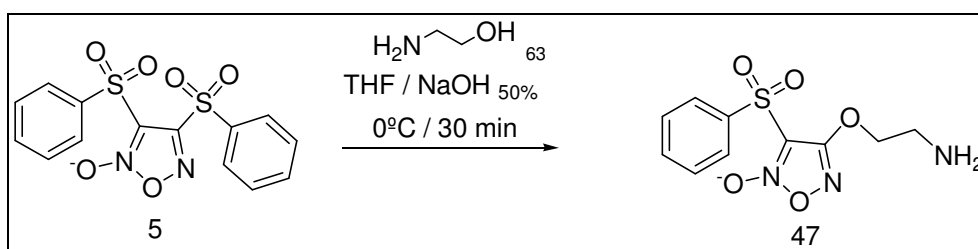
Espectro 23: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do bis-arylsulfonilfuroxano (5) (Hetcor; 300 MHz; $\text{DMSO}d_6$).



Espectro 24: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do *bis*-arilsulfonilfuroxano (5) (Hetcor; 300 MHz; DMSO d_6).

3.4- Síntese do 4-(2-aminoetoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (47).

Reação

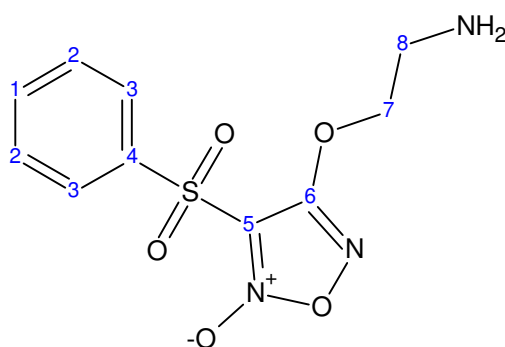


Procedimento

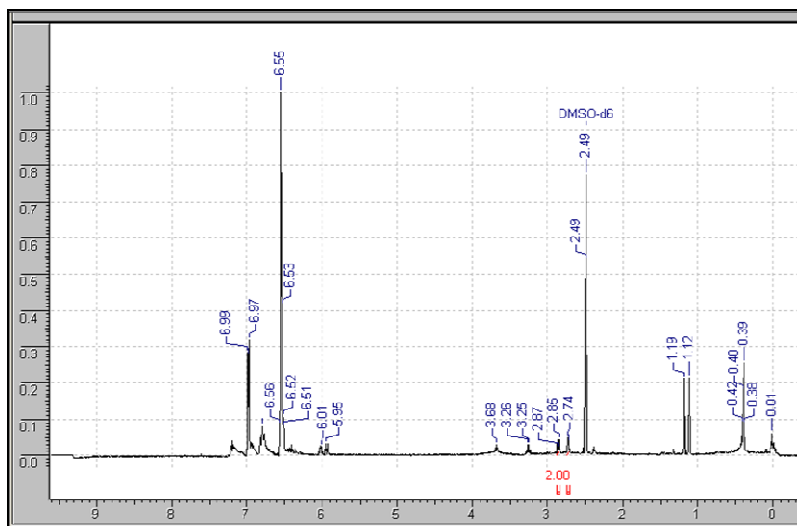
Em balão de 50 mL, adicionou-se 2 g de furoxano (5) (5,53 mmol) em 20 mL de THF. Em seguida adicionou-se 0,83 mL de etanolamina (63) (13,7 mmol;

d=1,012 g/mL) e solução de hidróxido de sódio 50% (16,6 mmol; 664 mg). A reação é mantida sob agitação vigorosa por 30 minutos a 20°C. O isolamento do produto foi realizado adicionando cerca de 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio e extração da fase aquosa com acetato de etila (4 x 30 mL). A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: 95% acetato de etila: 5% metanol). Obteve-se 500 mg de um produto com aspecto oleoso (47) com rendimento de 32% (PM = 285,04; C₁₀H₁₁N₃O₅S).

Caracterização estrutural:



47

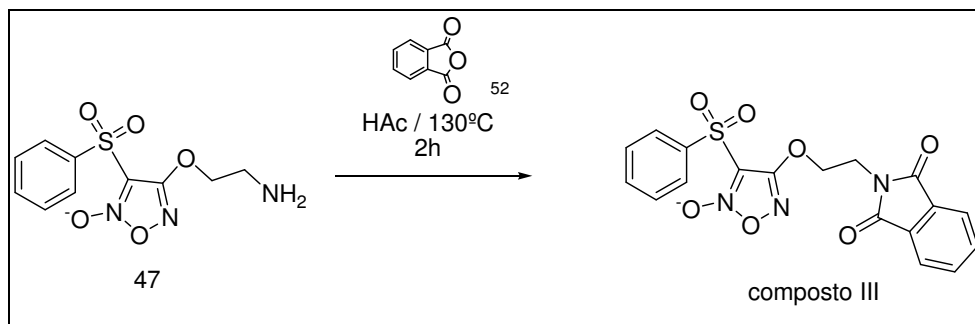


Espectro 25: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado furoxânico (47) (RMN ¹H; 400 MHz; DMSO_{d6}).

3.5- Síntese do composto III.

3.5.1- Síntese do 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)etoxi]-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-1,2,5-oxadiazol (composto III).

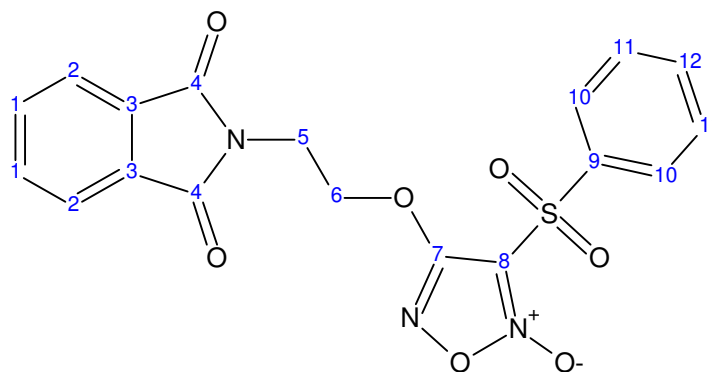
Reação



Procedimento

Em balão de 25 mL, adicionou-se 230 mg do derivado furoxânico (47) (0,598 mmol) e 88 mg de anidrido ftálico (52) (0,598 mmol) e 7 mL de ácido acético. A reação foi agitada sob refluxo em atmosfera de nitrogênio por 2 horas. O isolamento foi realizado por resfriamento do balão reacional seguido da adição de cerca de 4 mL de água gelada/gelo com adição de hidróxido de sódio 20% até pH = 7. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 40 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e evaporada a pressão reduzida para fornecer 110 mg de um sólido de coloração marrom. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase móvel: 60% hexano: 40% acetato de etila) para obtenção de 72 mg de um sólido branco (composto III) com faixa de fusão entre 136°-139°C (rendimento: 24%) (PM = 415,05; C₁₈H₁₃N₃O₇S).

Caracterização estrutural:

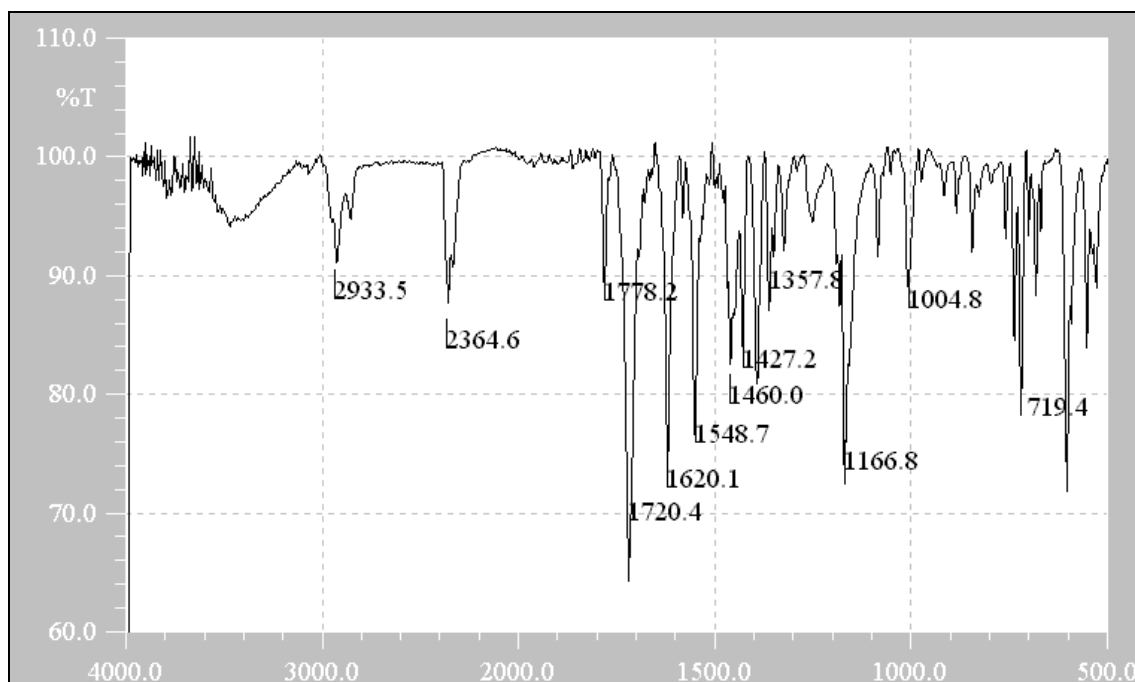


composto III

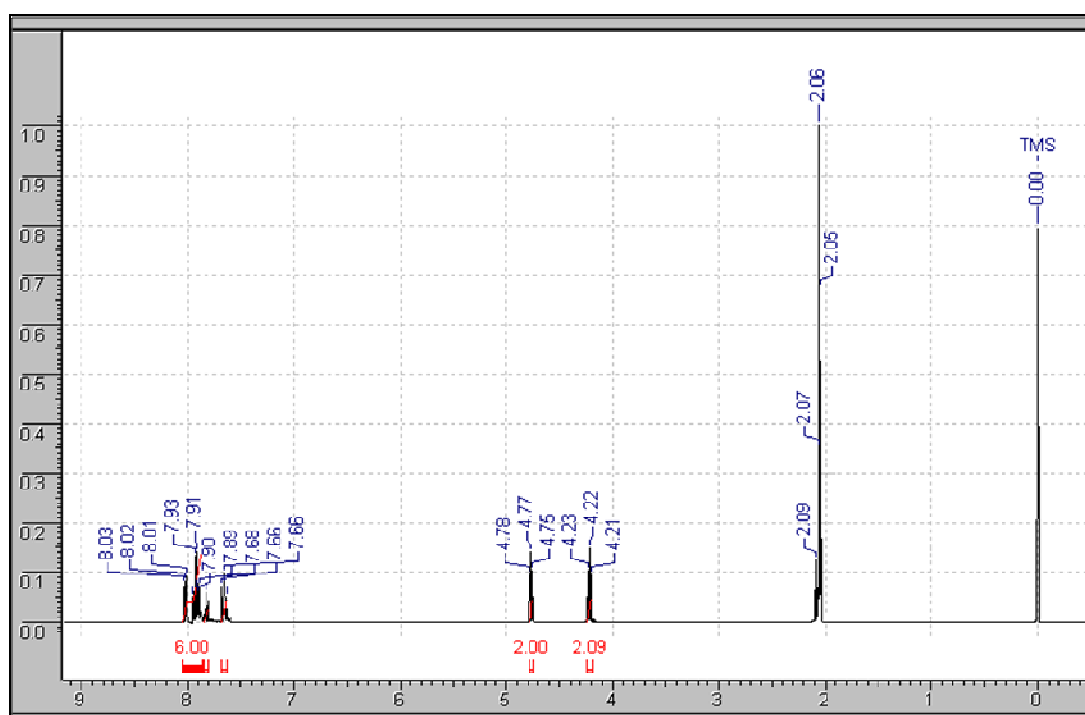
Infravermelho (pastilha de KBr): ν C-H aromático = 3059 cm^{-1} ; ν C-H alquílico = 2933 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1778 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} ; ν C=N furoxano = 1620 cm^{-1} e 1548 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1600 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} ; ν N-O 1358 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz; acetona- d_6): δ 8,01 (dd; H_{10} ; 2H; $J_{\text{orto}} = 7,41\text{ Hz}$ e $J_{\text{meta}} = 1,32\text{ Hz}$); 7,92 (m; H_1 e H_2 ; 4H); 7,82 (ddd; H_{12} ; 1H; $J_{\text{orto}} = 7,41\text{ Hz}$ e $J_{\text{meta}} = 1,3\text{ Hz}$); 7,66 (dd; H_{11} ; 2H; $J_{\text{orto}} = 7,4\text{ Hz}$ e $J_{\text{meta}} = 1,3\text{ Hz}$); 4,77 (t; H_6 ; 2H; $J = 5,41\text{ Hz}$); 4,22 (t; H_5 ; 2H; $J = 5,41\text{ Hz}$) ppm.

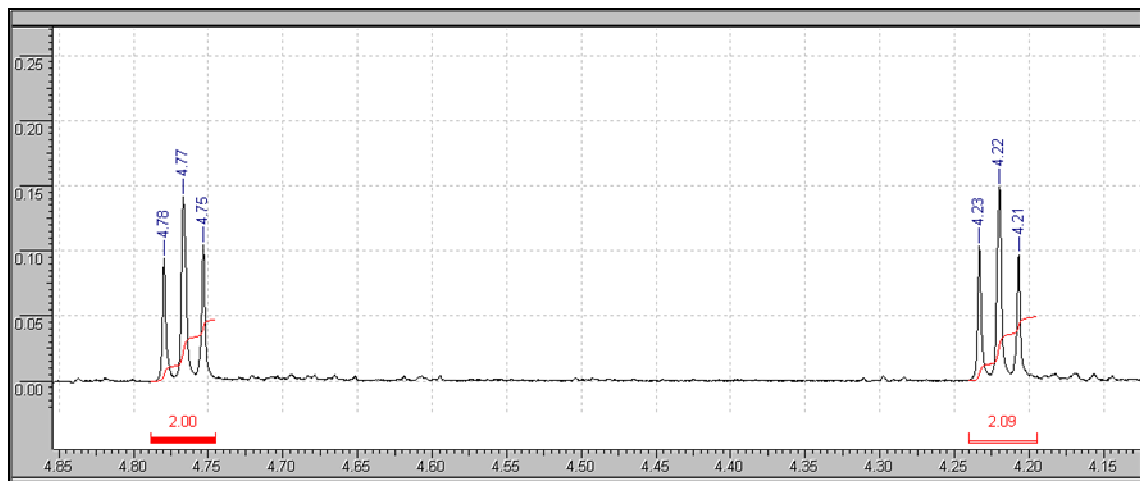
RMN ^{13}C (400 MHz; acetona- d_6): δ 168,41 (C4); 156,48 (C7); 136,36 (C9); 135 (C2); 132,87 (C10); 130,37 (C3); 129,17 (C11); 123,77 (C1); 95,44 (C8); 68,76 (C6); 36,78 (C5) ppm.



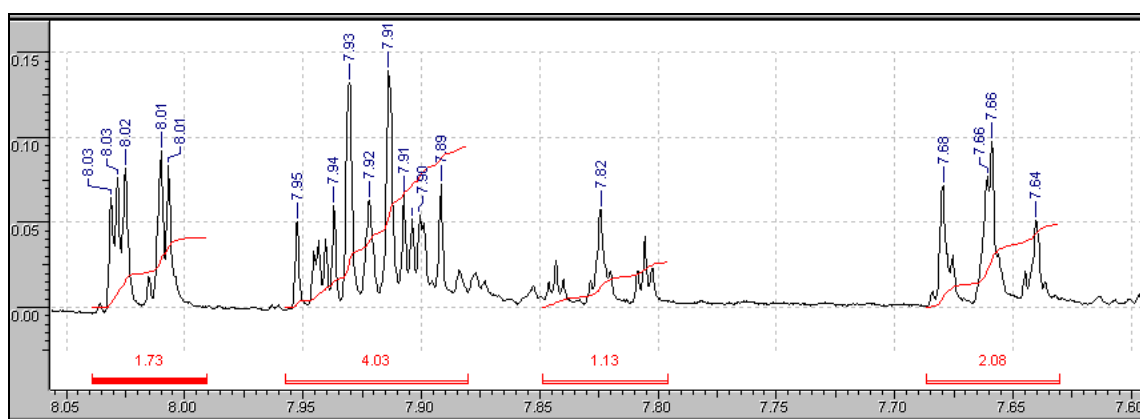
Espectro 26: Espectro no infravermelho do composto III (pastilha de KBr).



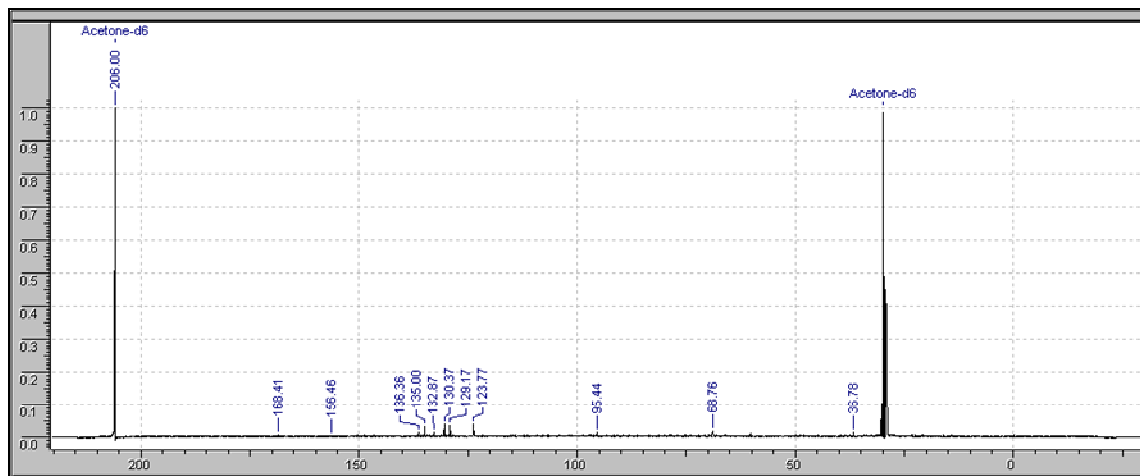
Espectro 27: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6).



Espectro 28: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região alquílica.



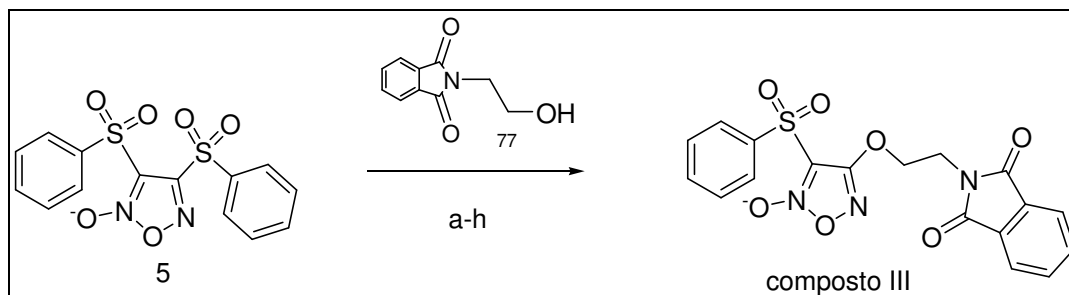
Espectro 29: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região aromática.



Espectro 30: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto III (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região aromática.

3.5.2- Síntese do 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)etoxi]-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-1,2,5-oxadiazol (composto III).

Reação



Procedimento

Em balão de 10 mL, adicionou-se 26 mg (0,136 mmol) hidroxietilftalimida (77) e 0,163 mmol de base em 4 mL de THF anidro. A reação é mantida sob agitação a 0°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 mg (0,0136 mmol) de bis-arilsulfonilfuroxano (5). A reação foi mantida sob agitação vigorosa e acompanhada por cromatografia em camada delgada (fase móvel: 60% hexano: 40% acetato de etila).

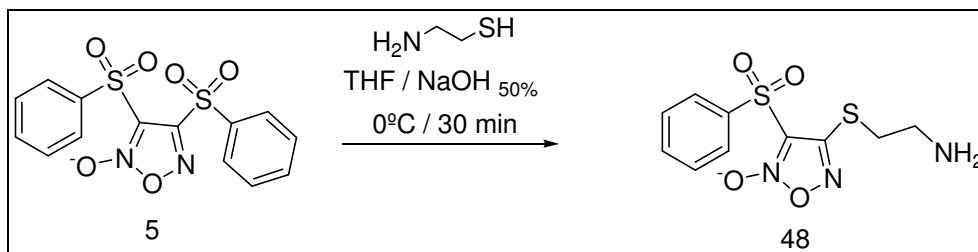
Reação	Base	Quantidade (mg ou mL)
A	terc-butóxido de potássio	26 mg
B	dispersão 60% hidreto sódio em óleo mineral	6,6 mg
C	bis(trimetilsilil)amida 1 <i>M</i>	0,16 mL
D	bicarbonato de sódio	13,7 mg
E	sódio metálico	3,7 mg
F	triethylamina	0,2 mL
G	carbonato de sódio	17,3 mg
H	hidróxido sódio 50%	0,1 mL

3.6- Obtenção dos derivados furoxânicos

Na tentativa de obtenção de derivados furoxânicos com diferentes espaçamentos da lateral, foram realizadas as sínteses descritas no procedimento a seguir. Os espectros de RMN H^1 apresentados a seguir não apresentaram boa definição impedindo a caracterização estrutural.

3.6.1- Síntese do 4-(2-aminoetiltio)-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (48).

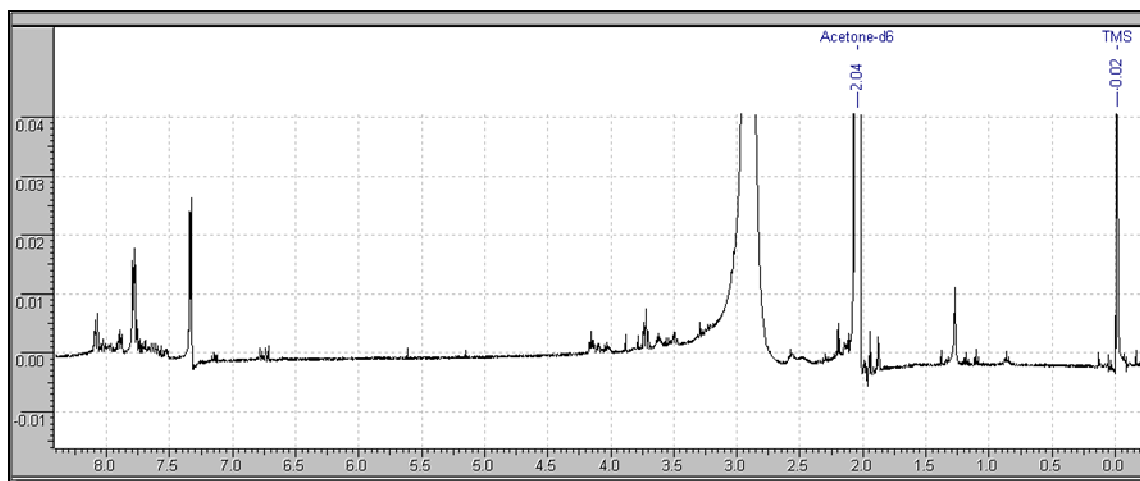
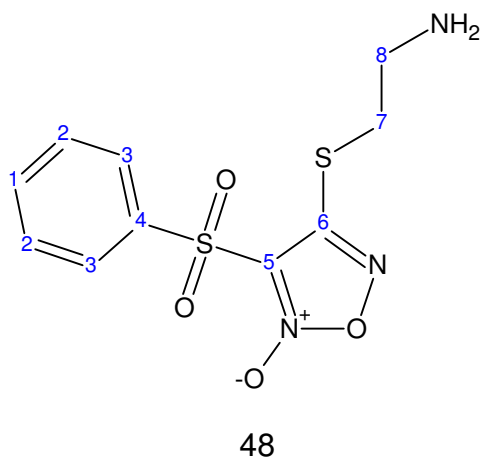
Reação



Procedimento

Em balão de 50 mL, adicionou-se 500 mg de furoxano (5) (1,36 mmol) em 5 mL de THF (solução A). Em um béquer adicionou-se 155 mg de cloridrato de cisteinamina (1,36 mmol) em 1 mL de água e 0,2 mL de solução de hidróxido de sódio 50% (solução B). Lentamente, em banho de gelo adicionou-se a solução B na solução A. Após término da adição a reação foi mantida sob agitação vigorosa a temperatura ambiente por 30 minutos. O isolamento reacional foi realizado adicionando cerca de 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio e extração da fase aquosa com acetato de etila (4 x 30 mL). A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: 95% acetato de etila: 5% metanol). Obtém-se 200 mg de um produto com aspecto oleoso de coloração marrom com rendimento de 50% (PM = 301,02; $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$).

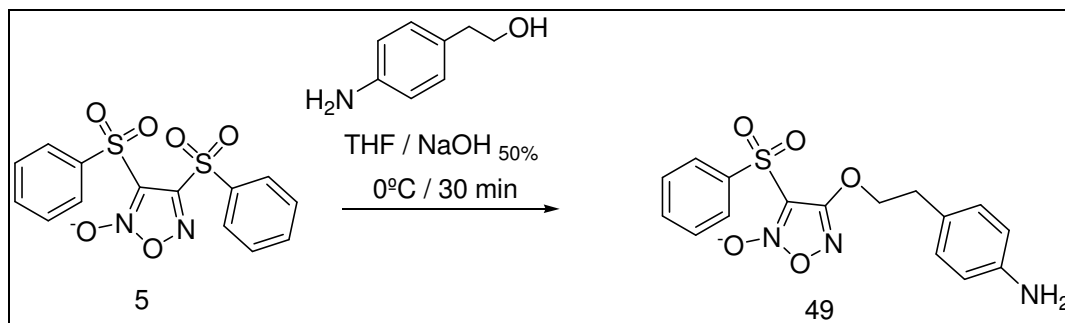
Caracterização estrutural:



Espectro 31: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado furoxânico (48) (RMN ¹H; 400 MHz; DMSO_{*d*6})

3.6.2- Síntese do 4-[2-(4-aminofenil)etoxi]-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (49).

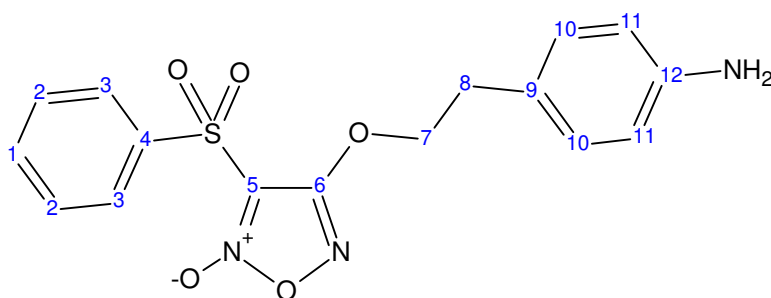
Reação



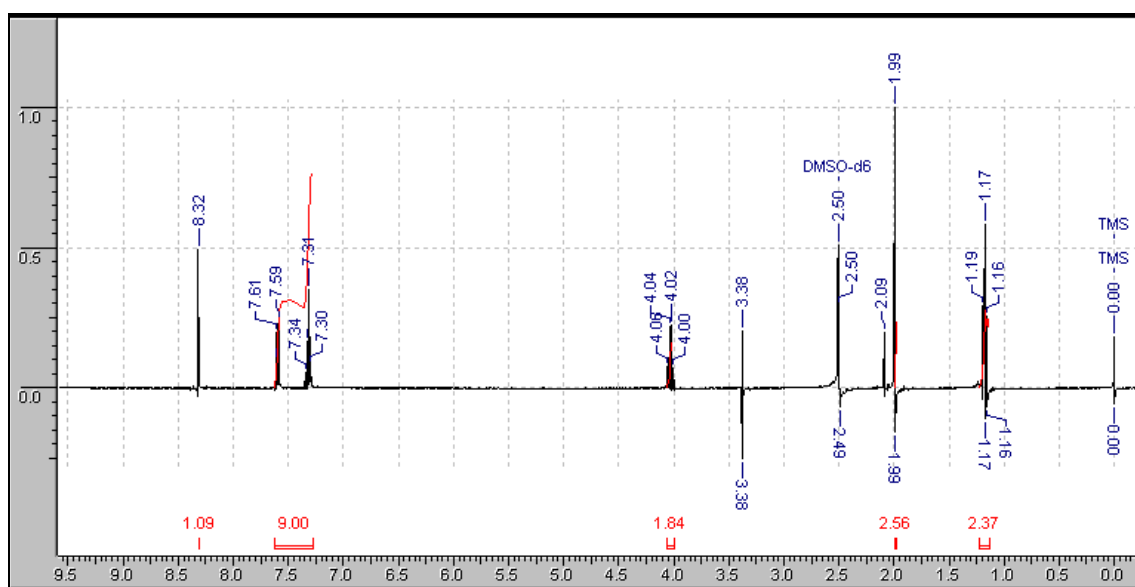
Procedimento

Em balão de 25 mL, mantido em banho de gelo, adicionou-se 1 g (2,73 mmol) de bisarilsulfonilfuroxano (5) em 3 mL de tetrahidrofurano (solução A). Em um béquer mantido a 0°C adicionou-se 0,377 g (2,73 mmol) da amina e 0,2 mL de solução de NaOH 50 em 3 mL de tetrahidrofurano (solução B). Adicionou-se lentamente a solução B na solução A a 0°C e acompanhou-se a reação por cromatografia em camada delgada por duas horas (fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila). O isolamento reacional foi realizado diluindo o meio reacional com 10 mL de ácido clorídrico e extração usando acetato de etila (6 x 20mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para fornecer 870 mg de um produto de coloração vermelho. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: 70% hexano:30% acetato de etila) para fornecer 290 mg (29%) de um produto de coloração vermelho (PM = 361,07; C₁₆H₁₅N₃O₅S).

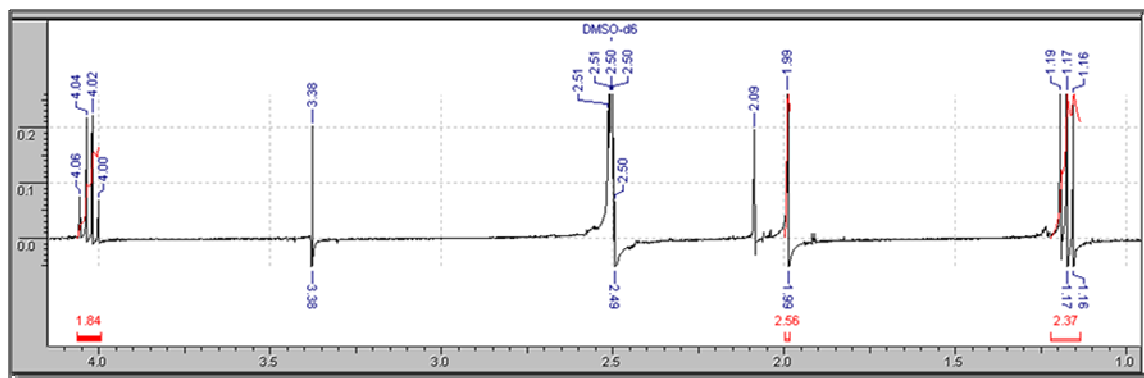
Caracterização estrutural:



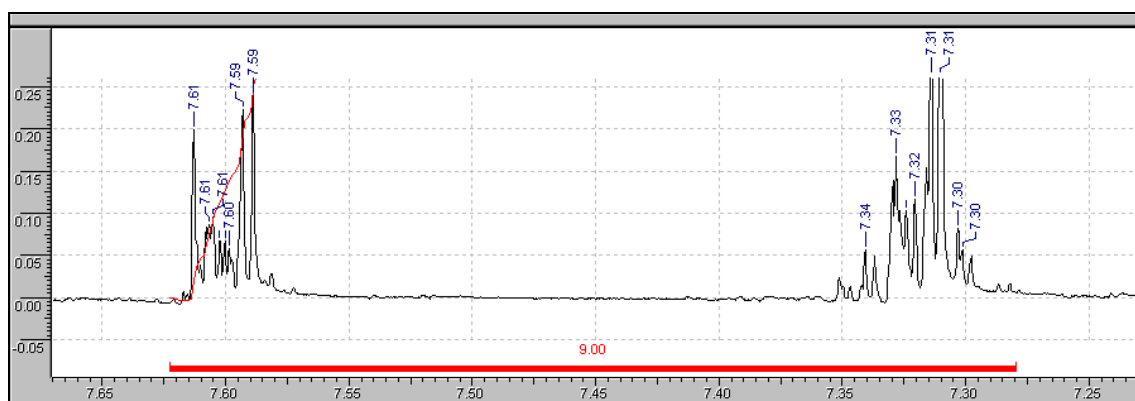
49



Espectro 32: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado furoxânico (49) (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO_{d6}).



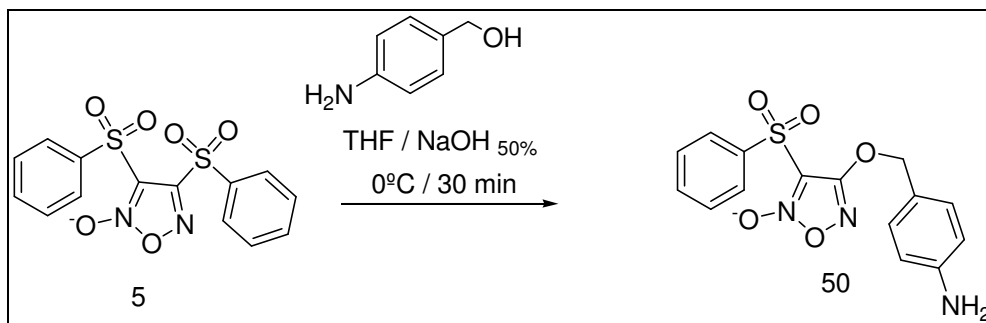
Espectro 33: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado furoxânico (49) (RMN ^1H ; 400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) – ampliação região alquílica.



Espectro 34: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear derivado furoxânico (49) (RMN ^1H ; 400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) – ampliação região aromática.

3.6.3- Síntese do 4-[2-(4-aminobenzioxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (50).

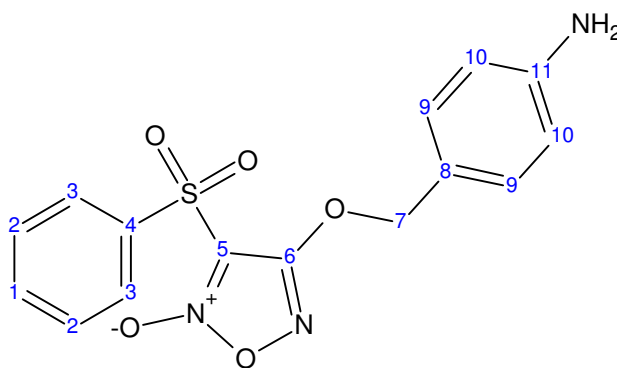
Reação



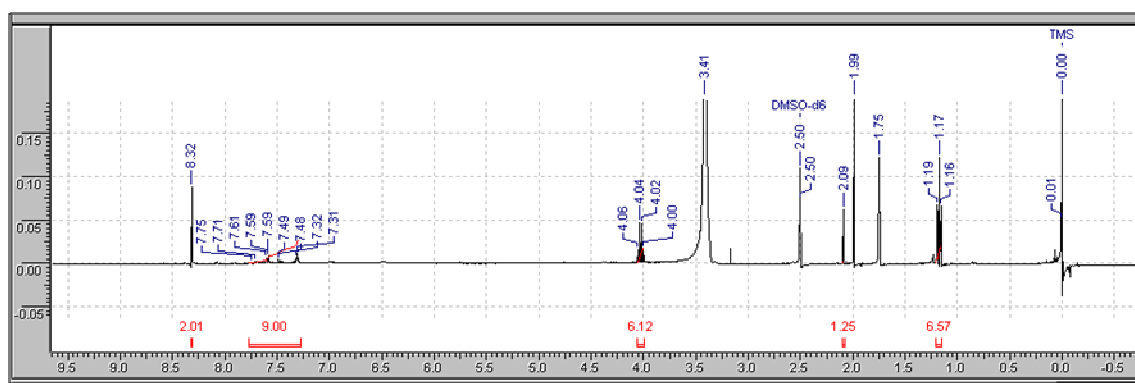
Procedimento

Em um balão de 25 mL mantido em banho de gelo adicionou-se 1 g (2,73 mmol) de bisarilsulfonilfuroxano (5) em 3 mL de tetraidrofurano (solução A). Em um béquer mantido a 0°C adicionou-se 0,336 g (2,73 mmol) da amina e 0,2 mL de solução de NaOH 50 em 3 mL de tetraidrofurano (solução B). Adicionou-se lentamente a solução B na solução A a 0°C e acompanhou-se a reação por cromatografia em camada delgada por duas horas (fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila). O isolamento reacional foi realizado diluindo o meio reacional com 10 mL de ácido clorídrico e extração usando acetato de etila (6 x 20 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. A fase orgânica foi evaporada à pressão reduzida para fornecer 800 mg de um produto de coloração vermelho. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: 70% hexano:30% acetato de etila) para fornecer 192 mg (20%) de um produto de coloração vermelho (PM = 347; C₁₅H₁₃N₃O₅S).

Caracterização estrutural:



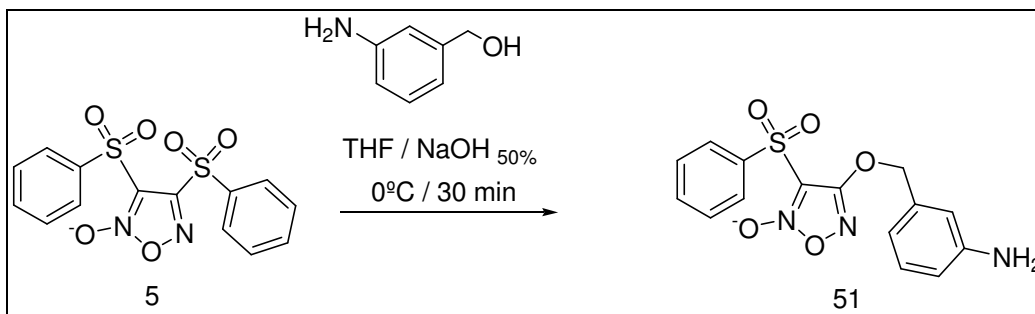
50



Espectro 35: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado furoxânico (50) (RMN ¹H; 400 MHz; DMSO_{d6}).

3.6.4- Síntese do 4-[2-(3-aminobenziloxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (51).

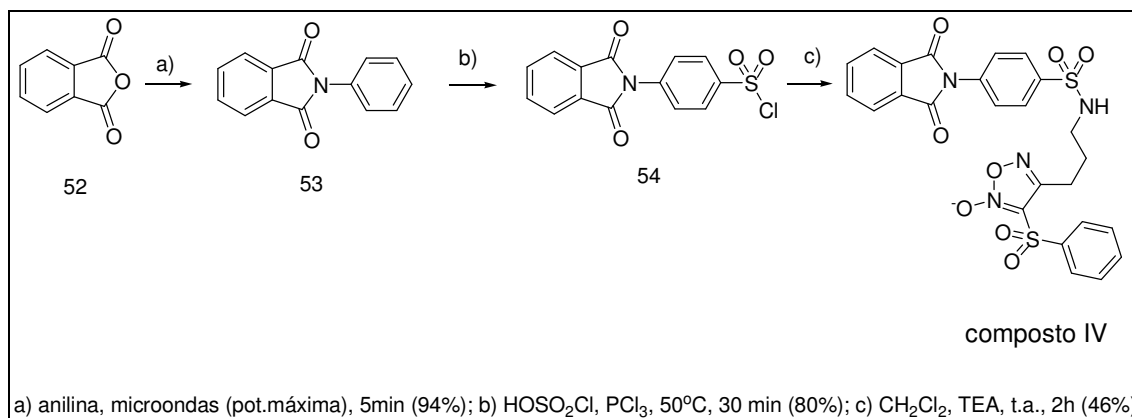
Reação



Procedimento

Em um balão de 25 mL mantido em banho de gelo adicionou-se 1 g (2,73 mmol) de bisarilsulfonilfuroxano (5) em 3 mL de tetrahidrofurano (solução A). Em um béquer mantido a 0°C adicionou-se 0,336 g (2,73 mmol) da amina e 0,2 mL de solução de NaOH 50 em 3 mL de tetrahidrofurano (solução B). Adicionou-se lentamente a solução B na solução A a 0°C e acompanhou-se a reação por cromatografia em camada delgada por duas horas (fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila). O isolamento reacional foi realizado diluindo o meio reacional com 10 mL de ácido clorídrico e extração usando acetato de etila (6 x 20mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para fornecer 890 mg de um produto de coloração vermelho. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: 70% hexano:30% acetato de etila) para fornecer 133 mg (14%) de um produto de coloração vermelho (PM = 347; C₁₅H₁₃N₃O₅S).

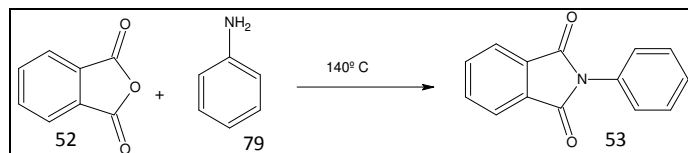
4- Síntese do composto IV



Esquema 4: Síntese do composto IV.

4.1- Síntese em microondas* do 2-fenil-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diona (53) (SANTOS *et al.*, 2005).

Reação



**NOTA: antes da reprodução desta síntese em microondas, ou de qualquer outra que utilize microondas doméstico, recomenda-se uma leitura apurada quanto aos cuidados experimentais que devem ser tomados. Todo experimento deve ser realizado em capela fechada com sistema de exaustão. É proibida a utilização de solventes inflamáveis. A reação descrita a seguir foi aquecida durante intervalos de 30 segundos e desligada em seguida até o tempo reacional recomendado, este cuidado experimental evita superaquecimento e possíveis explosões.*

Procedimento

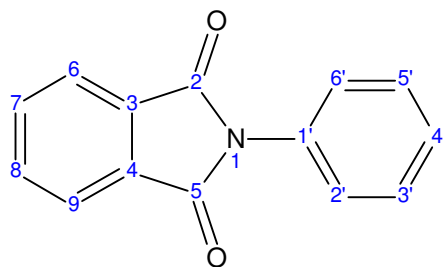
Em aparelho de microondas doméstico Electroluz modelo ME27S, foi realizada uma adaptação com abertura na porção superior do microondas para que houvesse o encaixe do condensador de refluxo (Figura 17). Uma coluna de vidro foi preparada de modo a permitir que o condensador de refluxo estivesse fora do forno, essa coluna conectava-se ao balão de 10 mL, onde foram adicionados 0,5 g de anidrido ftálico (52) e 2 mL de anilina (79). O forno foi programado em potência máxima, por 5 minutos.

Após esse tempo foi realizada transferência da mistura para um erlenmeyer de 125 mL onde foi adicionado cerca de 30 mL de etanol. Os produtos foram aquecidos até a solubilização e cristalizados em banho de gelo. Os cristais obtidos foram filtrados e analisados, fornecendo de 0,67 g (89%) do produto desejado (53), como cristais brancos com faixa de fusão= 204-205°C ($C_{14}H_9NO_2$; PM = 223).



Figura 2: Adaptação do microondas doméstico para síntese do 2-fenil-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (53) utilizando refluxo.

Caracterização estrutural:



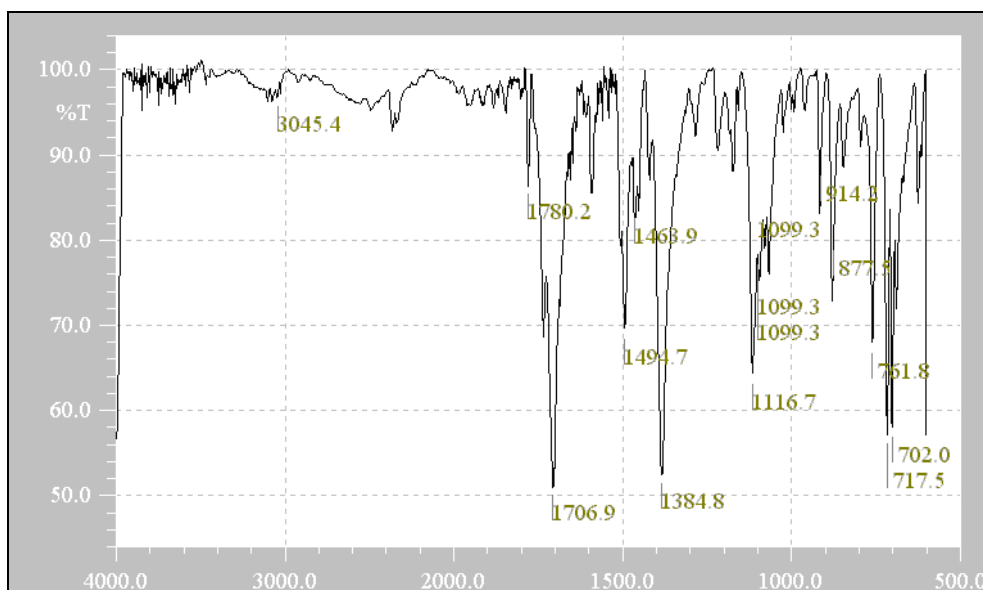
53

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

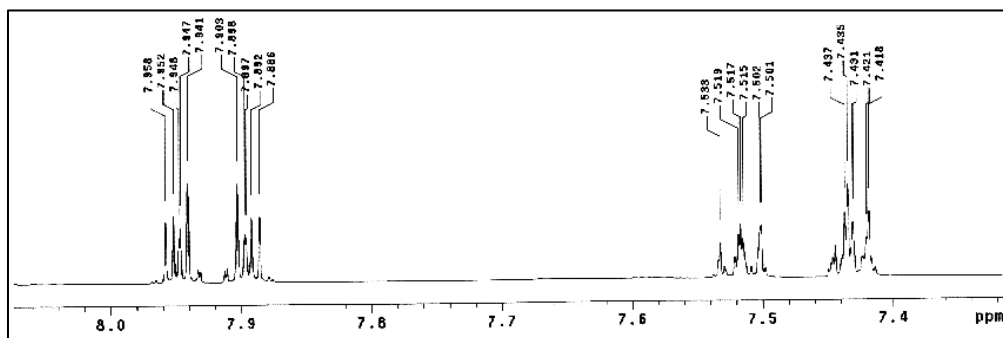
RMN ^1H (500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta 7,43$ (dd, $\text{H}5'$ e $\text{H}3'$); $\delta 7,51$ (dd; $\text{H}6'$ e $\text{H}2'$ $J_{\text{meta}}=2,1\text{ Hz}$ e $J_{\text{orto}}=8,1\text{ Hz}$); $\delta 7,89$ (m; $\text{H}7$ e $\text{H}8$); $\delta 7,95$ (m; $\text{H}6$ e $\text{H}9$; e $J_{\text{orto}}=8,3\text{ Hz}$ e $J_{\text{meta}}=2,3\text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta 123,67$ ($\text{C}7$ e $\text{C}8$); $\delta 127,55$ ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$); $\delta 128,25$ ($\text{C}4'$); $\delta 129,08$ ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$); $\delta 131,61$ ($\text{C}3$ e $\text{C}4$); $\delta 131,94$ ($\text{C}1'$); $\delta 134,87$ ($\text{C}6$ e $\text{C}9$); $\delta 167,2$ ($\text{C}2$ e $\text{C}5$).

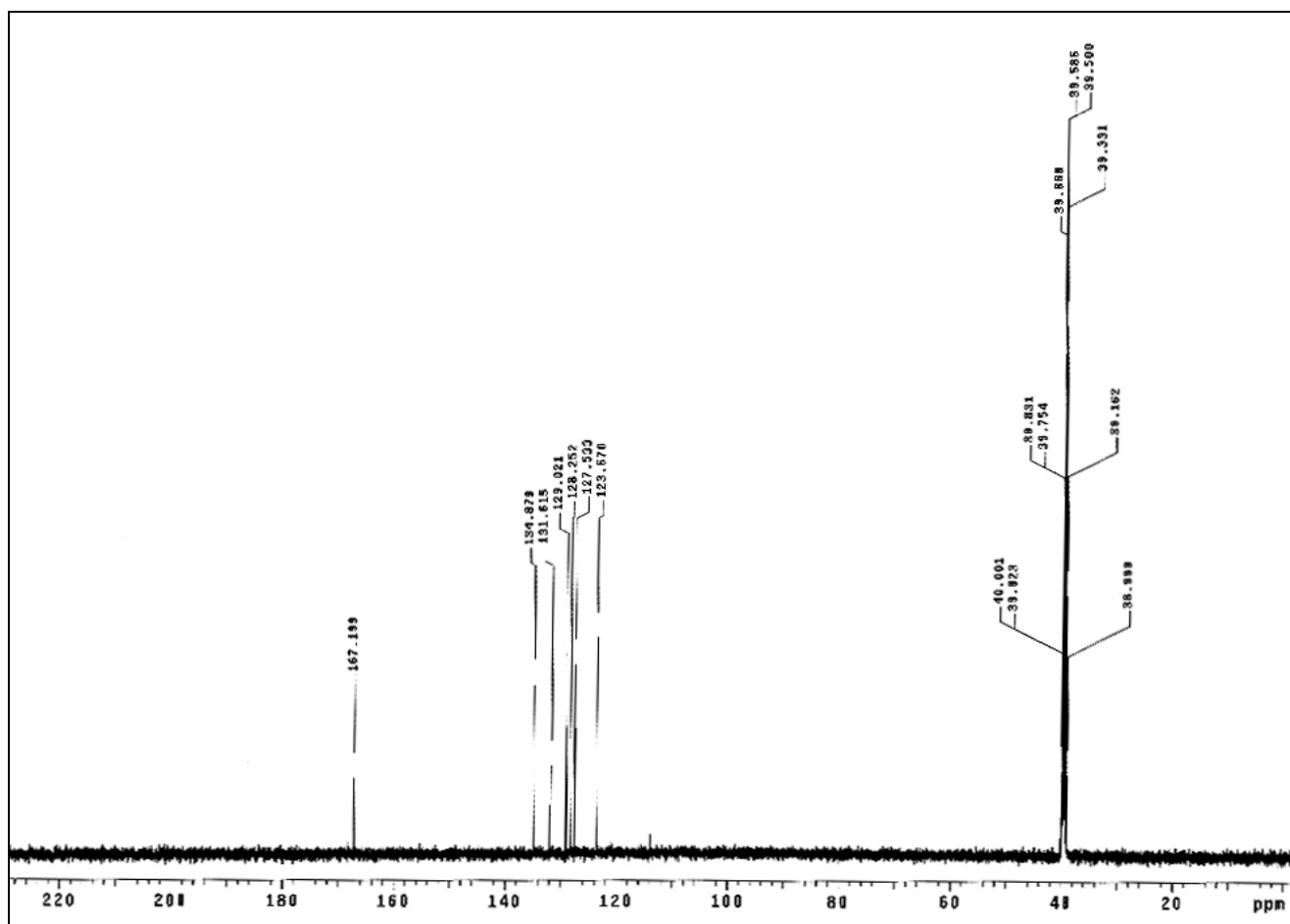
DEPT ($\text{C-H}_{\text{arom.}}$; 500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta 123,67$ ($\text{C}7$ e $\text{C}8$); $\delta 127,55$ ($\text{C}2'$ e $\text{C}3'$); $\delta 128,25$ ($\text{C}4'$); $\delta 129,08$ ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$); $\delta 134,87$ ($\text{C}6$ e $\text{C}9$).



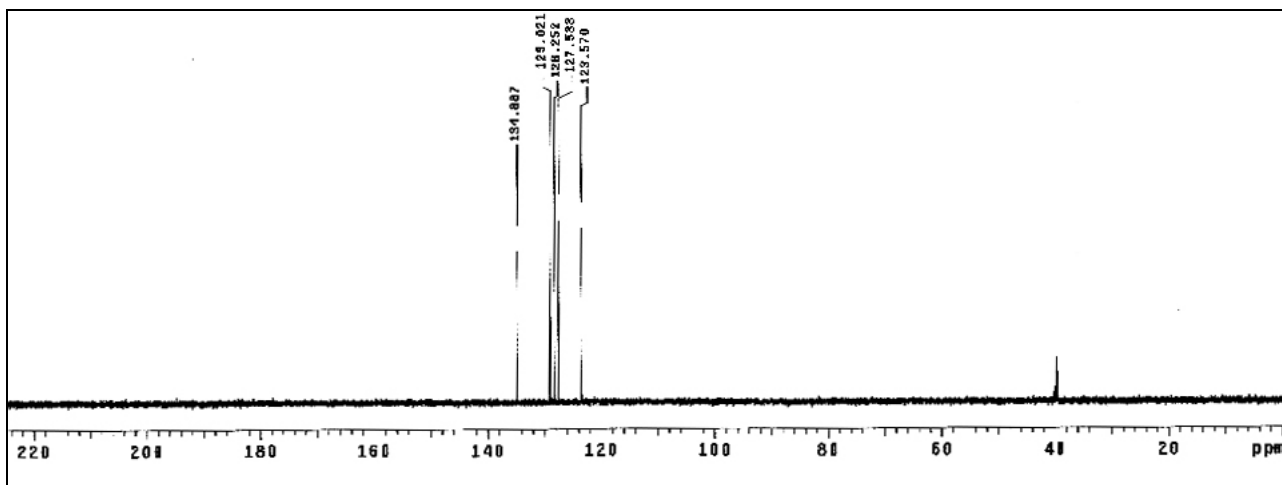
Espectro 36: Espectro no infravermelho da fenilftalimida (53) (Pastilha KBr).



Espectro 37: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) da fenilftalimida (53) relativo as regiões de δ 7,4 e δ 8,0 (em DMSO_d₆).



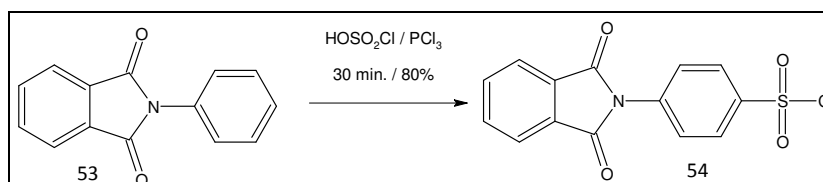
Espectro 38: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) da fenilftalimida (53) (em DMSO-d_6).



Espectro 39: Espectro de ressonância magnética nuclear de DEPT da feniltalimida (53) (em DMSO-d_6).

4.2- Síntese de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil cloreto (54) (adaptado de LIMA *et al.*, 2002).

Reação



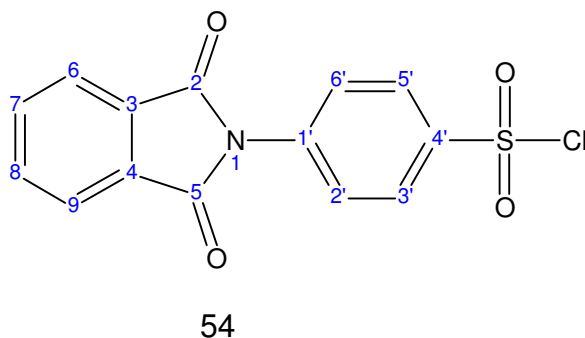
Procedimento

A uma solução de 0,16 g (0,09 mL; $d=1,753$; 1,35 mmol) de ácido clorossulfônico e 0,2 mL de PCl_3 , a qual permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 10 minutos, adicionou-se, em pequenas quantidades, 0,15 g (0,67 mmol) de *N*-fenil-ftalimida (53). A suspensão resultante foi agitada e aquecida a temperatura de 50°C por 30 minutos.

O isolamento foi feito por resfriamento do meio reacional, seguido de adição de gelo/ H_2O (ca. 20 mL) e filtração do precipitado formado, em funil de Büchner, para fornecer 0,15 g (70%) do produto desejado (54), como

sólido amorfo de cor branca e faixa de fusão= 180-182 °C ($C_{14}H_8ClNO_4S$; PM = 322).

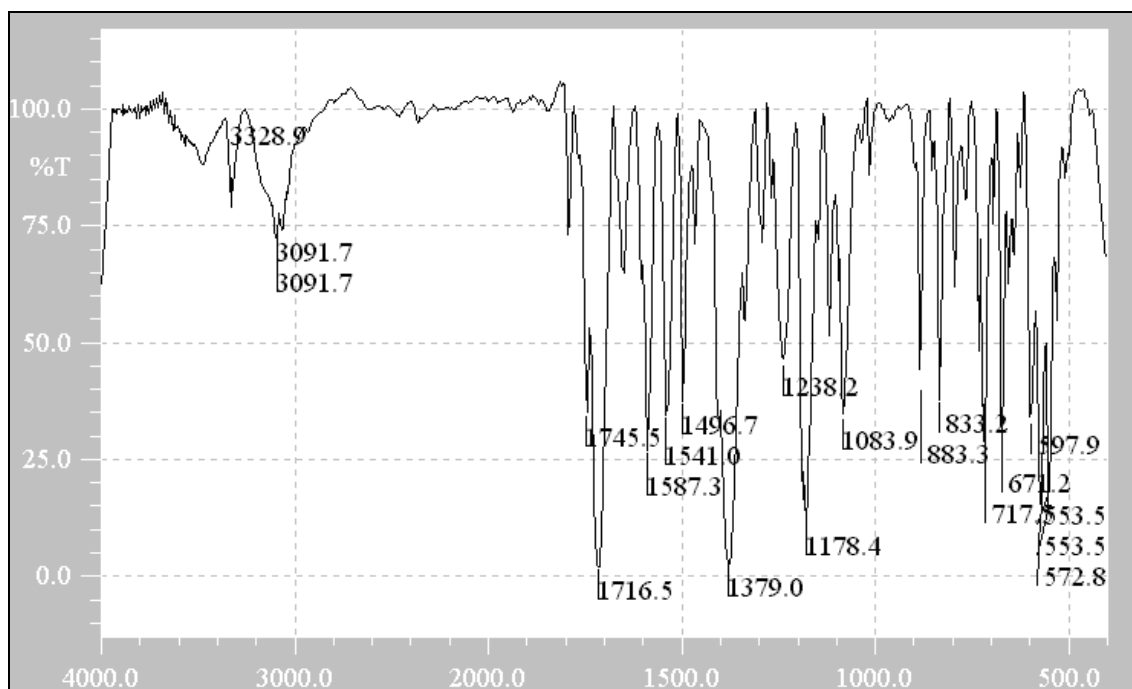
Caracterização estrutural:



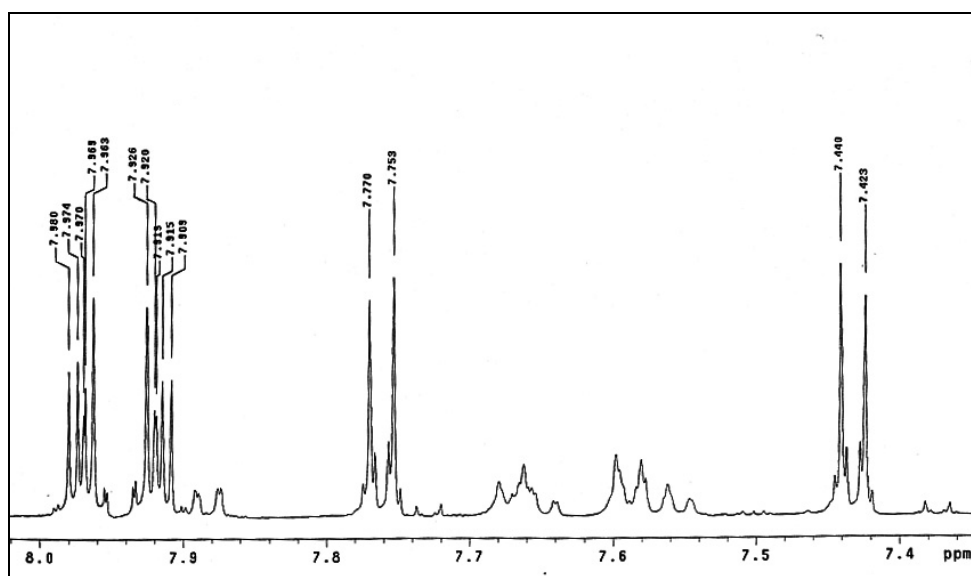
Infravermelho (Pastilha de KBr): ν C-H de aromáticos 3091 cm^{-1} ; ν C=O imida: 1780 cm^{-1} ; 1745 cm^{-1} e 1716 cm^{-1} ; ν C=C aromático: 1587 cm^{-1} , 1541 cm^{-1} ; ν N-C-O 1496 cm^{-1} ; ν C-N-C 1379 cm^{-1} ; ν S=O 1178 cm^{-1} .

RMN ^1H (500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta 7,43$ (d, $\text{H}2'$ e $\text{H}6'$ $J_{\text{orto}} = 8,2\text{ Hz}$); $\delta 7,76$ (d; $\text{H}3'$ e $\text{H}5'$ $J_{\text{orto}} = 8,2\text{ Hz}$); $\delta 7,91$ (m; $\text{H}7$ e $\text{H}8$); $\delta 7,97$ (m; $\text{H}6$ e $\text{H}9$).

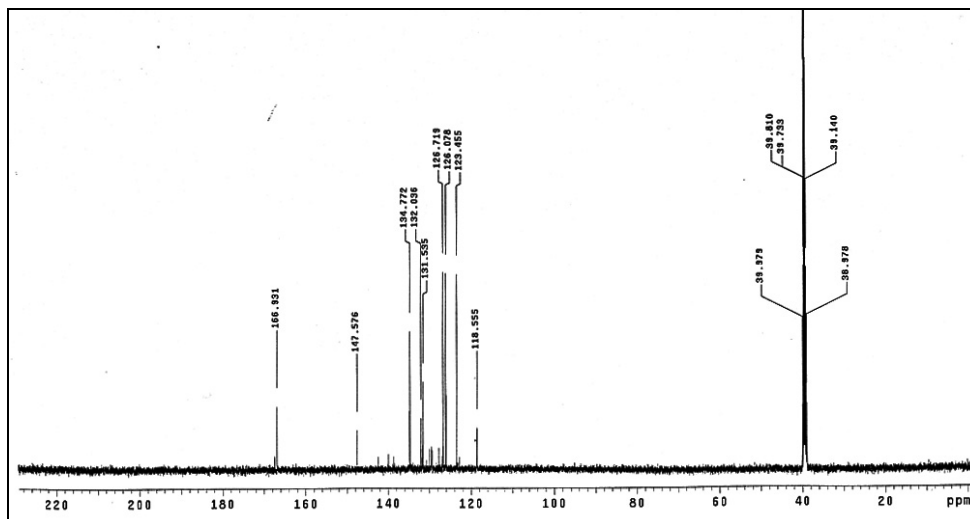
RMN ^{13}C (500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta 124,05$ ($\text{C}7$ e $\text{C}8$); $\delta 126,08$ ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$); $\delta 126,72$ ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$); $\delta 131,53$ ($\text{C}3$ e $\text{C}4$); $\delta 132,03$ ($\text{C}1'$); $\delta 134,77$ ($\text{C}6$ - $\text{C}9$); $\delta 147,57$ ($\text{C}4'$); $\delta 166,93$ ($\text{C}2$ e $\text{C}5$).



Espectro 40: Espectro no infravermelho do cloreto de sulfonila (54) (pastilha de KBr).



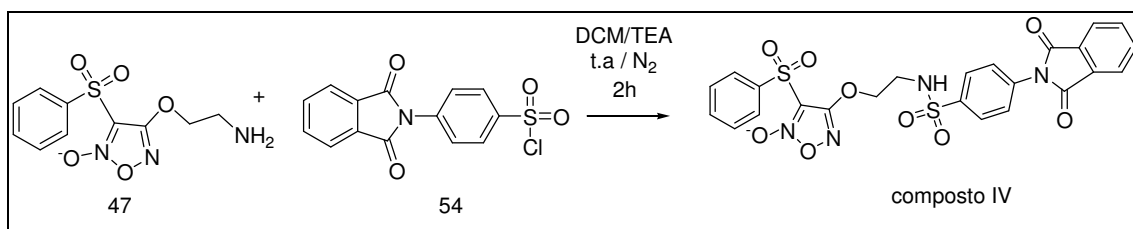
Espectro 41: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) do cloreto de sulfonila (54) relativo as regiões de δ 7,4 e δ 8,0 (em DMSO-d_6 ; 500 MHz).



Espectro 42: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) do cloreto de sulfonila (54) (em DMSO-d_6 ; 500 MHz).

4.3- Síntese do 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il-*N*-fenilbenzenosulfonamida)etoxi]-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-1,2,5-oxadiazol (composto IV).

Reação

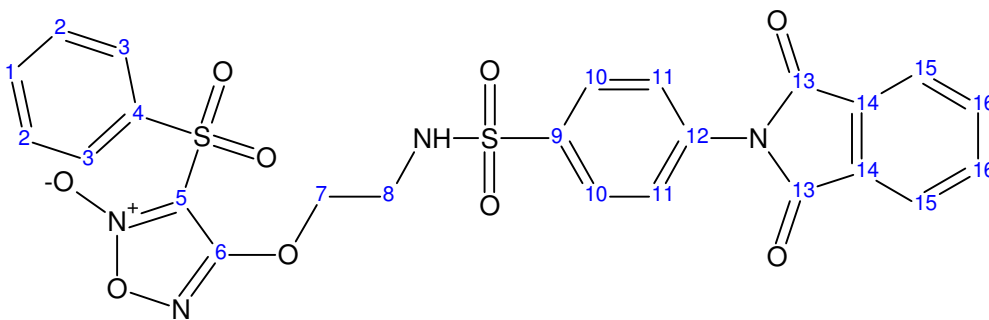


Procedimento

Em um balão de 50 mL adicionou-se 100 mg (0,35 mmol) do derivado furoxânico (47) em 5 mL de diclorometano destilado. Em seguida, adicionou-se 48 μL de trietilamina. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 100 mg (0,31 mmol) do cloreto de sulfonila (54). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 2 horas. O solvente foi evaporado a

pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica; fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila) para fornecer 80 mg (46% rendimento) de um sólido branco (composto IV) com faixa fusão entre 144^o-148^oC (PM = 570,05; C₂₄H₁₈N₄O₉S).

Caracterização estrutural:

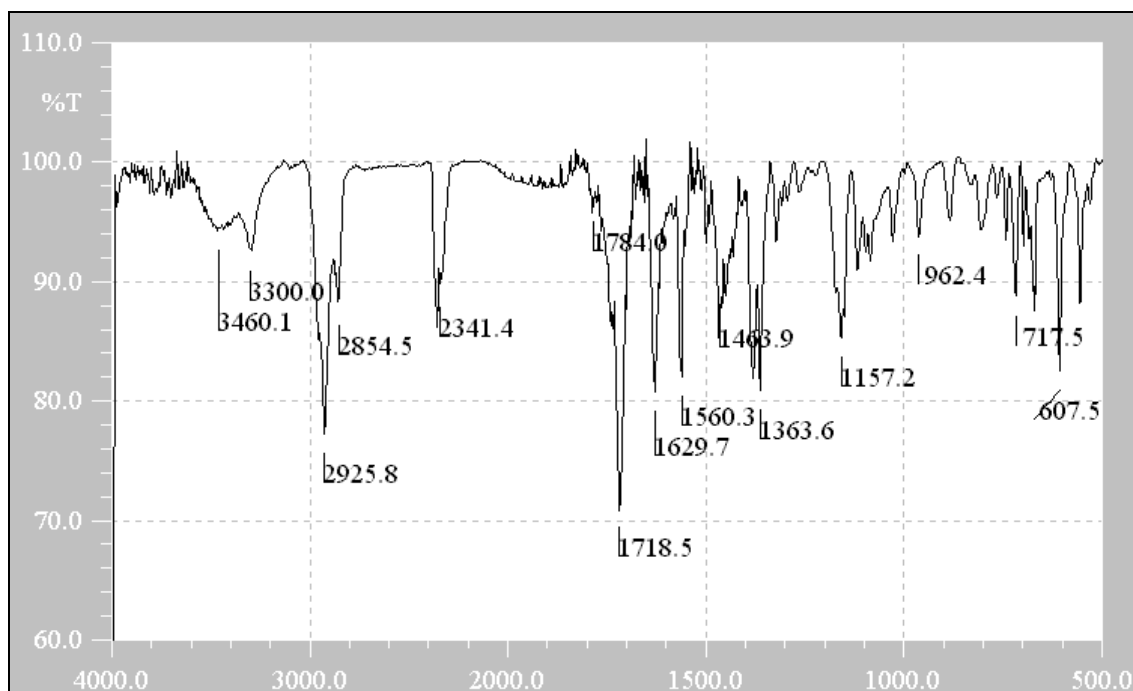


composto IV

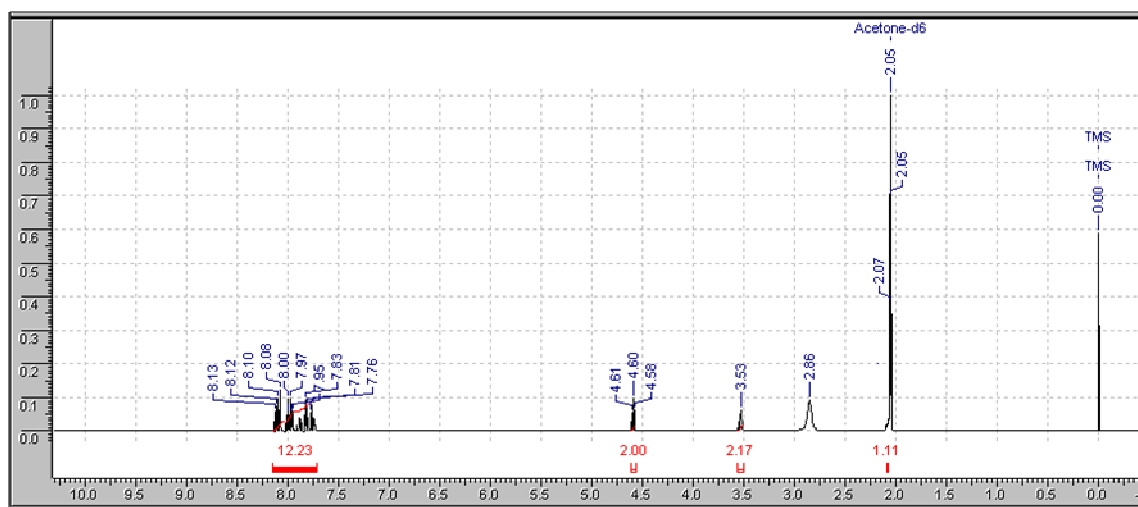
Infravermelho (pastilha de KBr): ν N-H aromático = 3300 cm⁻¹; ν C-H aromático = 3059 cm⁻¹; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2925 e 2854 cm⁻¹; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1745 cm⁻¹ e 1718 cm⁻¹; ν C=N furoxano = 1629 cm⁻¹; ν C=C aromático = 1560 cm⁻¹ e 1464 cm⁻¹; ν C-N-C 1389 cm⁻¹; ν N-O 1363 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz; acetona_{d6}): δ 8,13 (m; H₃; 2H) 8,08 (m; H₁₀; 2H); 8,30-7,95 (m; H₁₅ e H₁₆; 4H); 7,89 (ddd; H₁; 1H); 7,82 (dd; H₁₁; 2H); 7,76 (ddd; H₂; 2H); 4,6 (t; H₇; 2H); 3,53 (q; H₈; 2H) ppm.

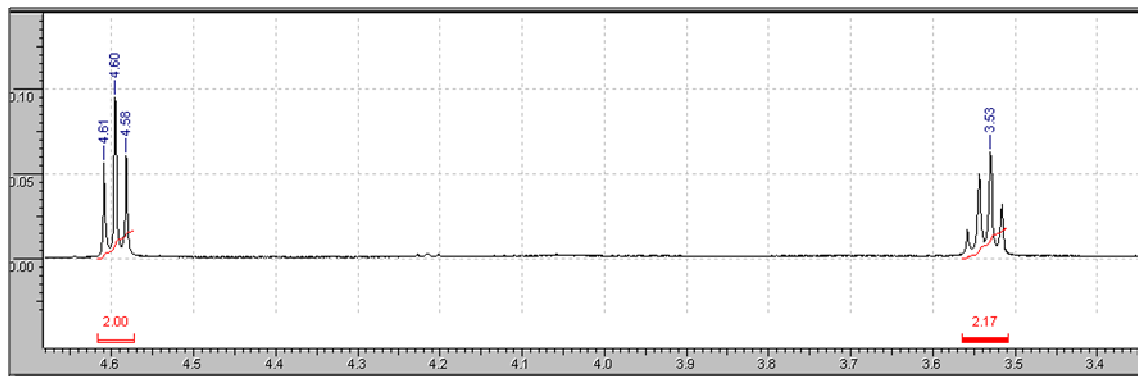
RMN ¹³C (400 MHz; acetona_{d6}): δ 167,39 (C13); 159,96 (C6); 136,7 (C4 e C9); 135,64 (C15); 132,76 (C3 e C10); 130,72 (C14); 129,51 (C2); 128,37 (C11); 128,09 (C12); 124,37 (C16); 100,83 (C5); 70,81 (C7); 42,41 (C8) ppm.



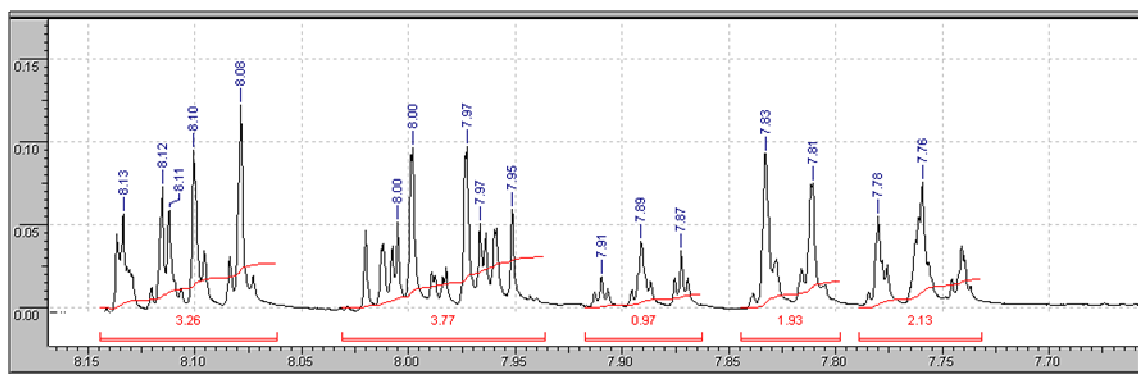
Espectro 43: Espectro no infravermelho do composto IV (pastilha KBr).



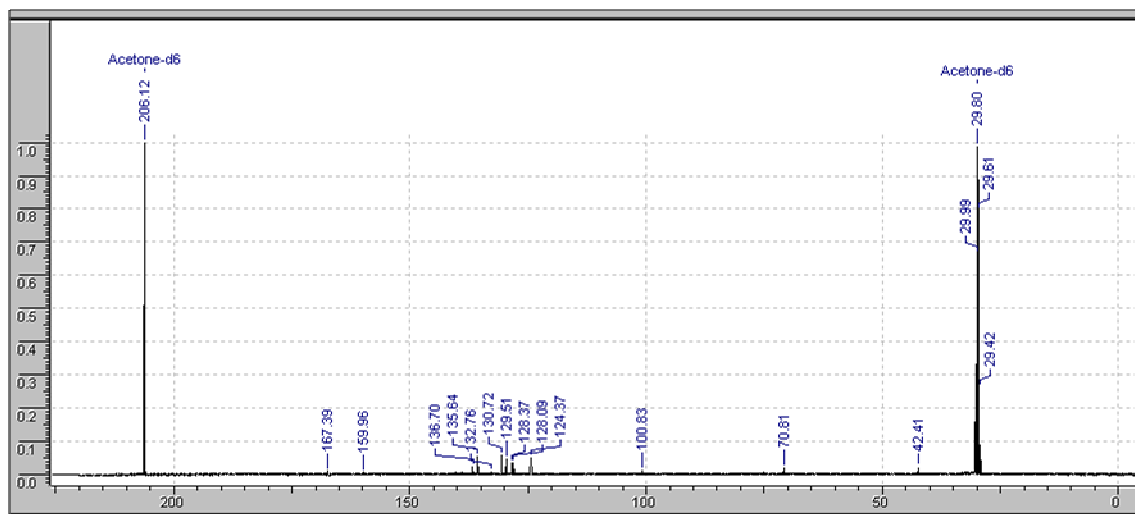
Espectro 44: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (^1H RMN; 400 MHz; acetona $_d6$).



Espectro 45: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (^1H RMN; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região 3,4-4,6 ppm.



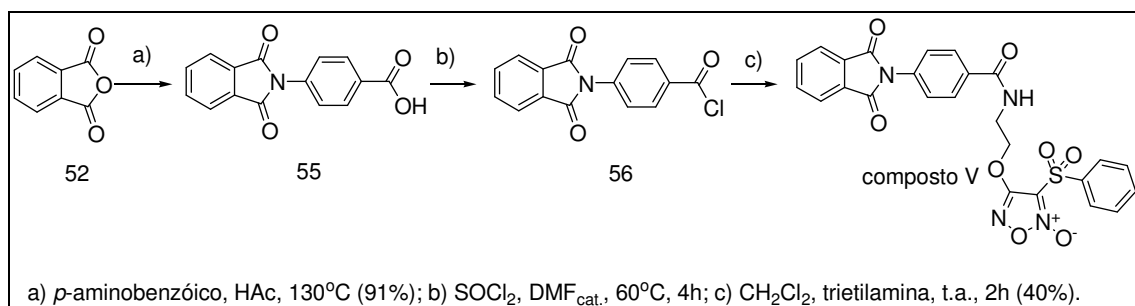
Espectro 46: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (^1H RMN; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região 7,6-8,2 ppm.



Espectro 47: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto IV (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona- d_6).

5- Síntese do composto V.

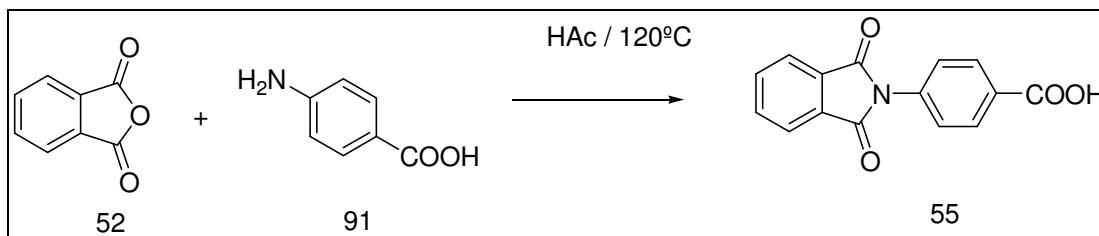
O composto V foi sintetizado segundo a rota sintética apresentada no Esquema 5.



Esquema 5: Síntese do composto V.

5.1- Síntese do ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2*H*-isoindol-2-il)benzóico (55).

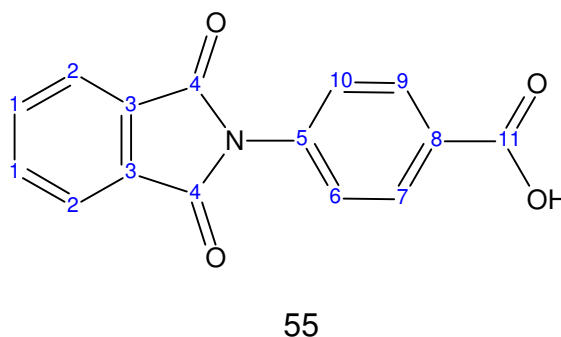
Reação



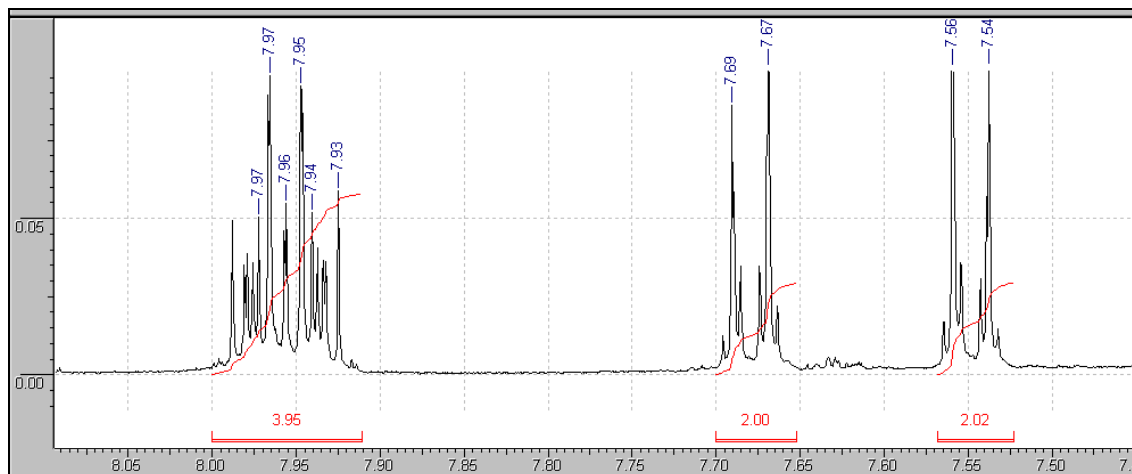
Procedimento

Em balão de 25 mL contendo 1 g (7,29 mmol) de ácido *p*-aminobenzóico (76), adicionou-se 1 g (6,75 mmol) de anidrido ftálico (52) e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C por 1 hora e agitada vigorosamente. O isolamento foi feito por resfriamento da mistura reacional, filtração do sólido formado que foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95% fornecendo 1,62 g (rendimento de 91%) da ftalimida (55) como sendo cristais de cor branca com ponto de fusão = 250°C (PM = 267; C₁₄H₉NO₄).

Caracterização estrutural:



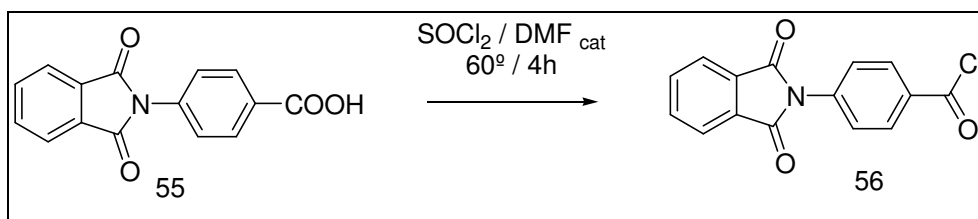
RMN ¹H (400 MHz; DMSO-*d*₆): δ 7,96 (m; H₁e H₂; 4H); 7,68 (dd; H₉ e H₇; J_{orto}= 8,1Hz; J_{meta} = 2,1Hz; 2H); 7,55 (dd; H₁₀ e H₆; J_{orto}= 8,1Hz; J_{meta} = 2,1Hz; 2H) ppm.



Espectro 48: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (55) (^1H RMN; 400 MHz; DMSO_{d6}).

5.2- Síntese do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzoíla (56)

Reação

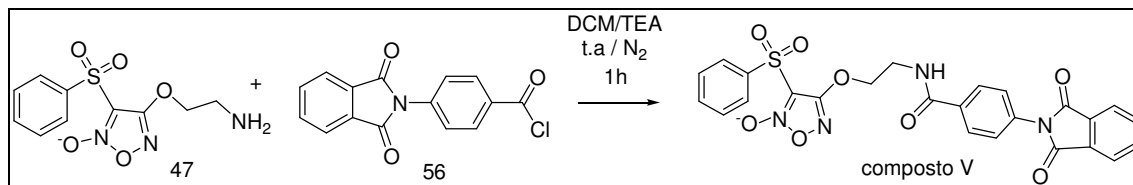


Procedimento

Em um balão de 50 mL equipado com condensador de refluxo foram adicionados, sob atmosfera de nitrogênio, 0,2 g (0,75 mmol) do ácido ftalimídico (55), 3 mL de cloreto de tionila (60) (41 mmol; $d = 1,631$) e 1 gota de DMF anidro, permanecendo a suspensão resultante sob agitação vigorosa em aquecimento à temperatura de 60°C por 4 horas. Finalizado esse tempo, a mistura reacional foi deixada esfriar a temperatura ambiente, seguida de redução do volume do solvente no rotaevaporador. O resíduo sólido (56) obtido não foi isolado, este foi diluído em 15 mL de diclorometano seguido da adição de derivados aminados.

5.3- Síntese do 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il-*N*-fenilbenzenocarboxamida)etoxi]-3-(fenilsulfonyl)-2-*N*-1,2,5-oxadiazol (composto V).

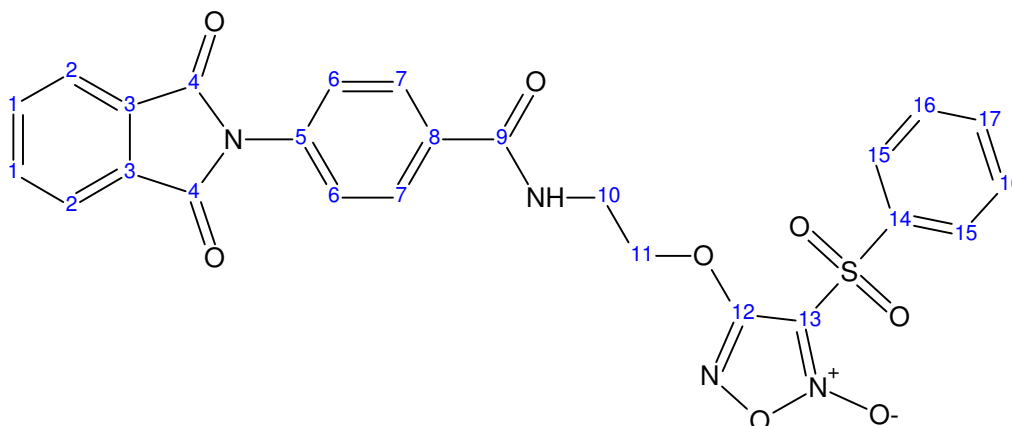
Reação



Procedimento

Em balão de 50 mL contendo 213 mg (0,75 mmol) do cloreto de ftalimida (56), adicionou-se 15 mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se 384 mg (1 mmol) do derivado furoxânico (47) e 0,1 mL de trietilamina. A reação foi mantida sob agitação vigorosa em atmosfera de nitrogênio por 1 hora. O produto foi purificado por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: 60% hexano; 40% acetato de etila) para fornecer 160 mg (40% de rendimento) de um sólido branco (composto V) com faixa de fusão entre 137^o-140^oC (PM = 534,09; C₂₅H₁₈N₄O₈S).

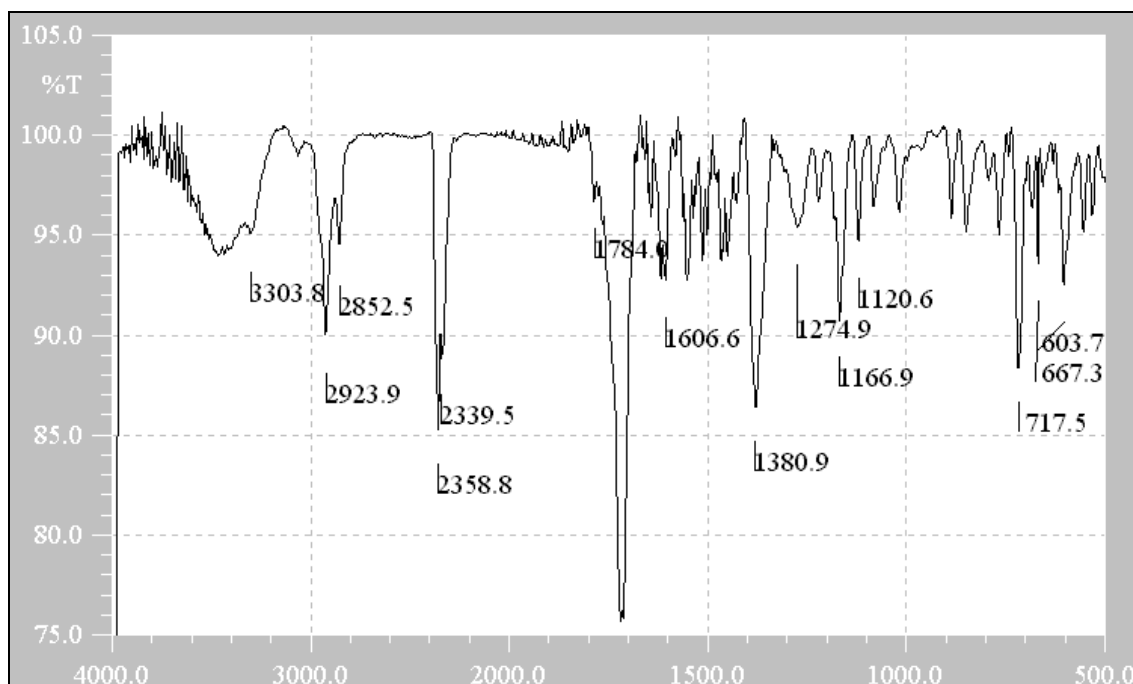
Caracterização estrutural:



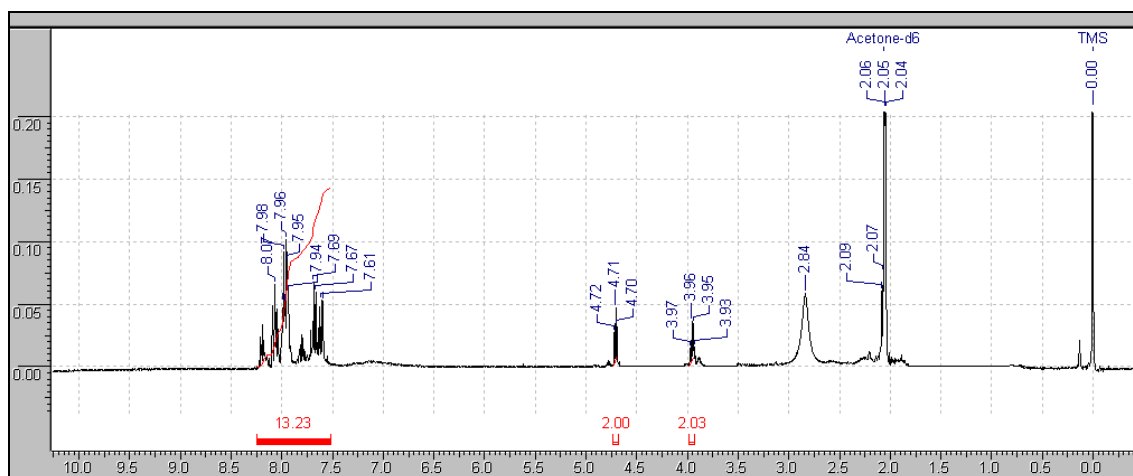
Produto V

Infravermelho (pastilha de KBr): ν N-H amida = 3303 cm^{-1} ; ν C-H aromático = 3059 cm^{-1} ; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2923 e 2852 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1784 cm^{-1} e 1718 cm^{-1} ; ν C=N furoxano = 1560 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1606 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} e 1464 cm^{-1} ; ν N-O $1380,9\text{ cm}^{-1}$.

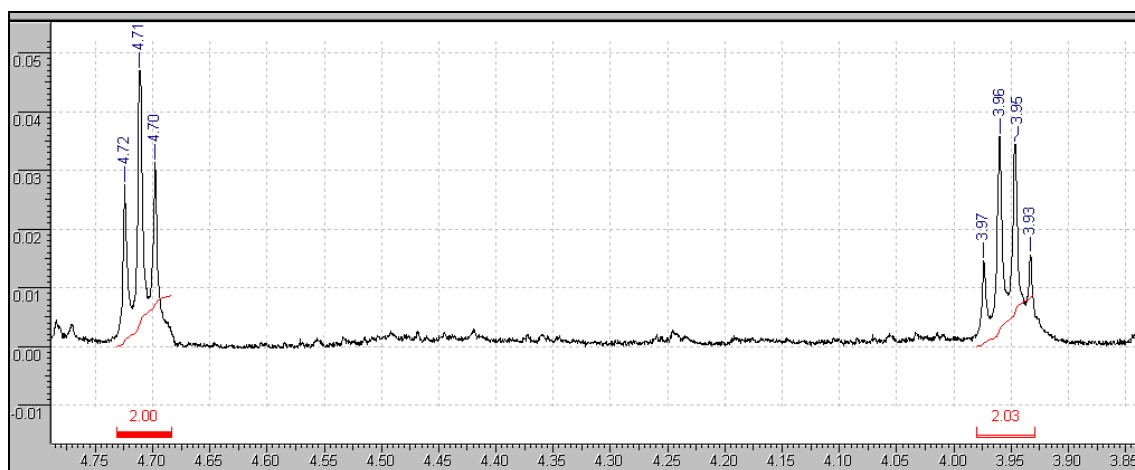
RMN ^1H (400 MHz; acetona- d_6): δ 8,16-8,21 (m; H_{15} ; 2H); 8,04-8,09 (m; H_{15} ; 2H); 7,94-8,0 (m; H_1 e H_2 ; 4H); 7,81 (ddd; H_{17} ; 1H); 7,67-7,72 (ddd; H_7 ; 2H); 7,59-7,63 (ddd; H_6 ; 2H); 4,71 (t; H_{11} ; 2H); 3,95 (q; H_{10} ; 2H) ppm.



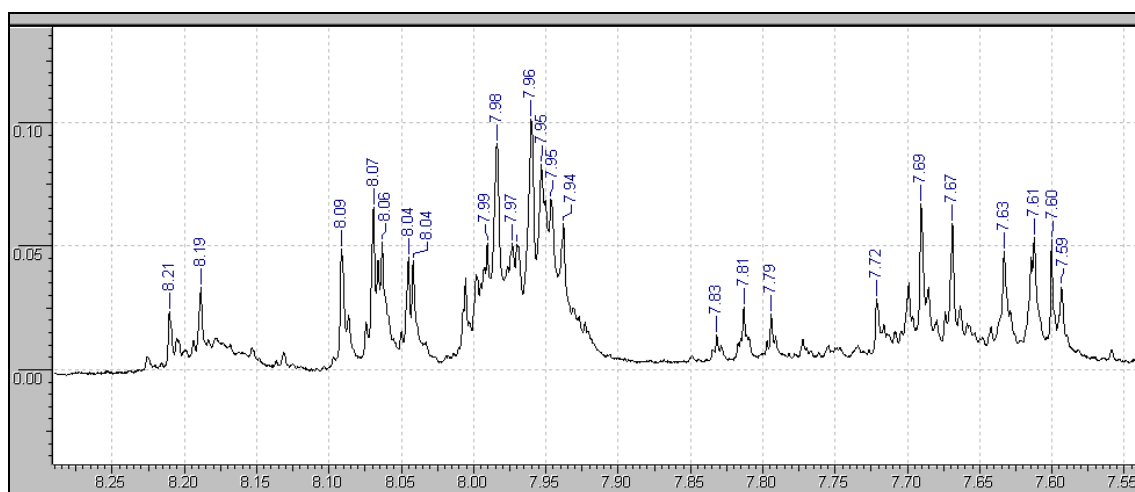
Espectro 49: Espectro de infravermelho do composto V (pastilha KBr).



Espectro 50: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (^1H RMN; 400 MHz; acetona $_{d6}$).

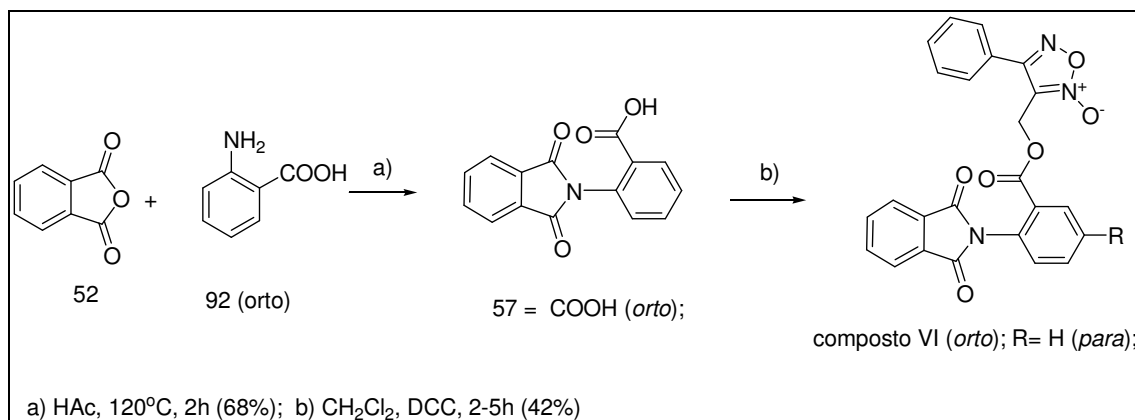


Espectro 51: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (^1H RMN; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região 3,85-4,75 ppm.



Espectro 52: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto V (^1H RMN; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região 3,85-4,75 ppm.

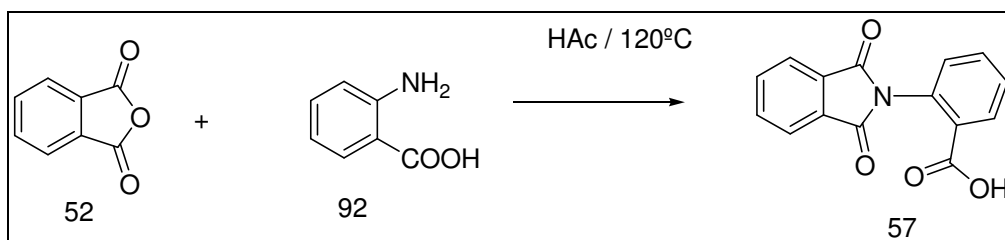
6- Síntese do composto VI.



Esquema 6: Síntese do composto VI.

6.1- Síntese do ácido 2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzóico (57).

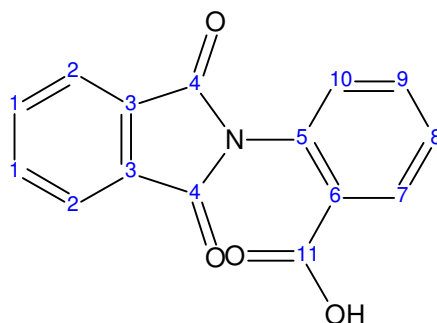
Reação



Procedimento

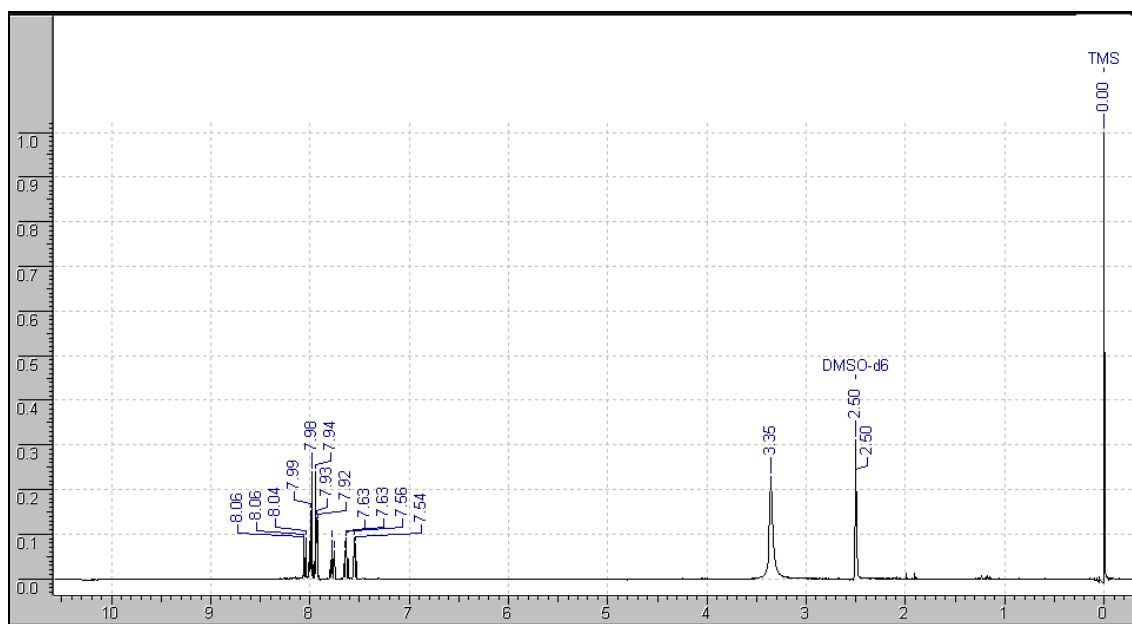
Em balão de 25 mL contendo 1 g (7,29 mmol) de ácido antranílico (77), adicionou-se 1 g (6,75 mmol) de anidrido ftálico (52) e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C e agitada vigorosamente por 1 hora. O isolamento foi feito por resfriamento da mistura reacional, filtração do sólido formado que foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95%/água (6:4) fornecendo 1,39 g (rendimento de 68%) da ftalimida (57) como sendo cristais de cor branca com faixa de fusão = 216°-219°C (PM = 267; C₁₄H₉NO₄).

Caracterização estrutural:

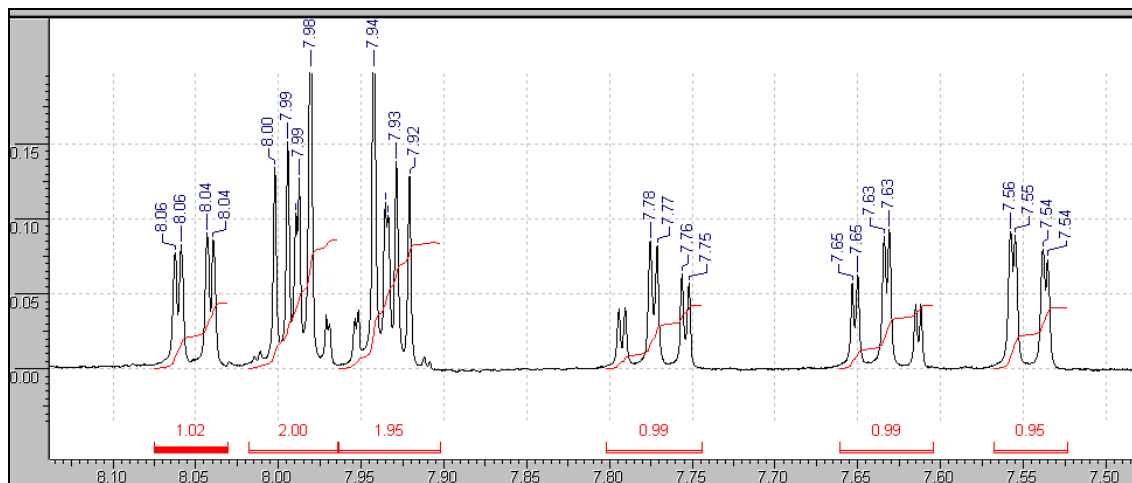


57

RMN ^1H (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 8,05 (dd; H_7 ; $J_{\text{orto}} = 7,79\text{Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,48\text{Hz}$; 1H); 7,99 (m; H_2 ; 2H); 7,93 (m; H_1 ; 2H); 7,77 (ddd; H_9 ; $J_{\text{orto}} = 7,75\text{Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,4\text{Hz}$; 1H); 7,63 (ddd; H_8 ; $J_{\text{orto}} = 7,76\text{Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,4\text{Hz}$; 1H); 7,54 (dd; H_{10} ; $J_{\text{orto}} = 7,79\text{Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,48$; 1H) ppm.



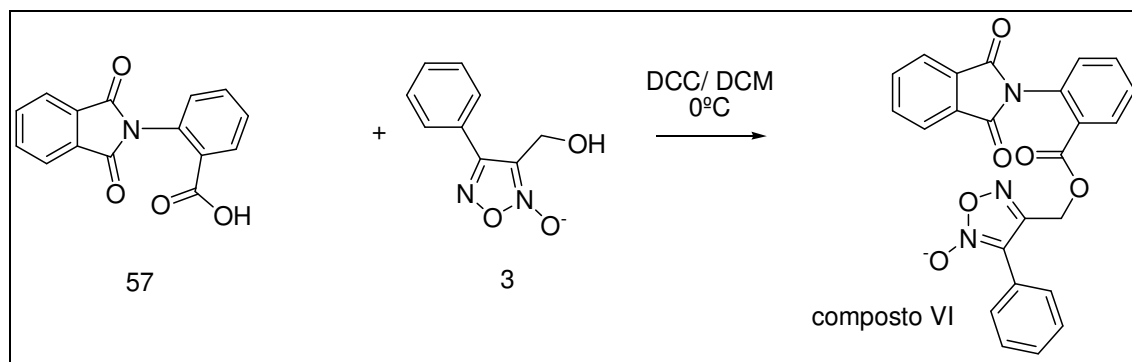
Espectro 53: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (57) (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO_{d6}).



Espectro 54: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (57) (RMN ^1H ; 400 MHz; DMSO_{d6}) - ampliação na região de 7,45-8,15 ppm.

6.2- Síntese do 3-([2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzoil]oxi)metil)-2-hidroxi-4-fenil-1,2,5-oxadiazol (composto VI).

Reação

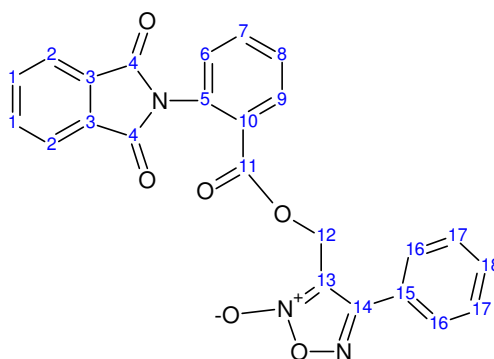


Procedimento

Em balão de 50 mL, adicionou-se 0,4 g (1,5 mmol) do derivado ftalimídico (57); 0,25 g (1,3 mmol) do derivado furoxânico (3); 0,562 g (2,72 mmol) de diciclohexilcarbodiimida e 0,018 g (0,14 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP). Adicionou-se 15 mL de diclorometano destilado e

manteve-se a reação sob agitação vigorosa a 0°C por 5 horas. O solvente do meio reacional foi eliminado a pressão reduzida e o produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica; fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila) para fornecer 280 mg (42% rendimento) um sólido branco (composto VI) (PM = 441; C₂₄H₁₅N₃O₆).

Caracterização estrutural:

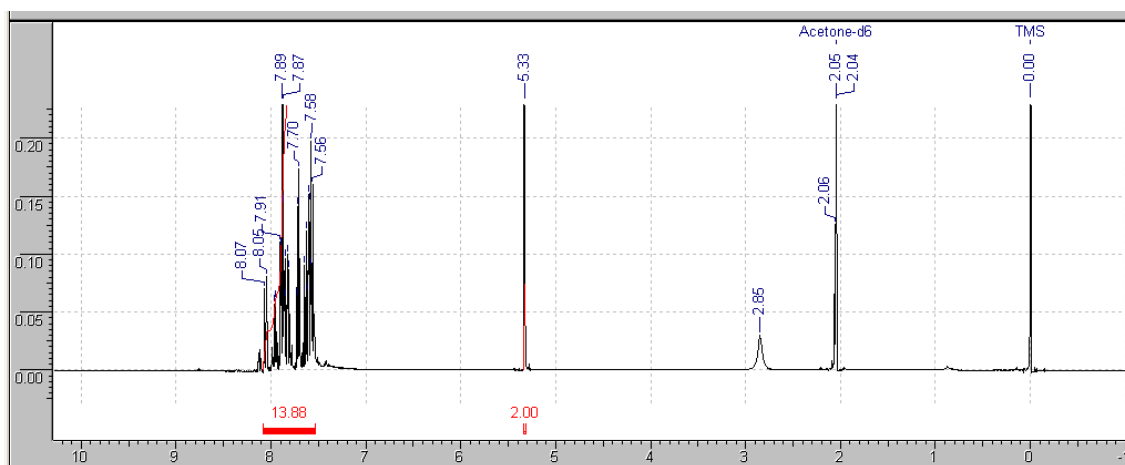
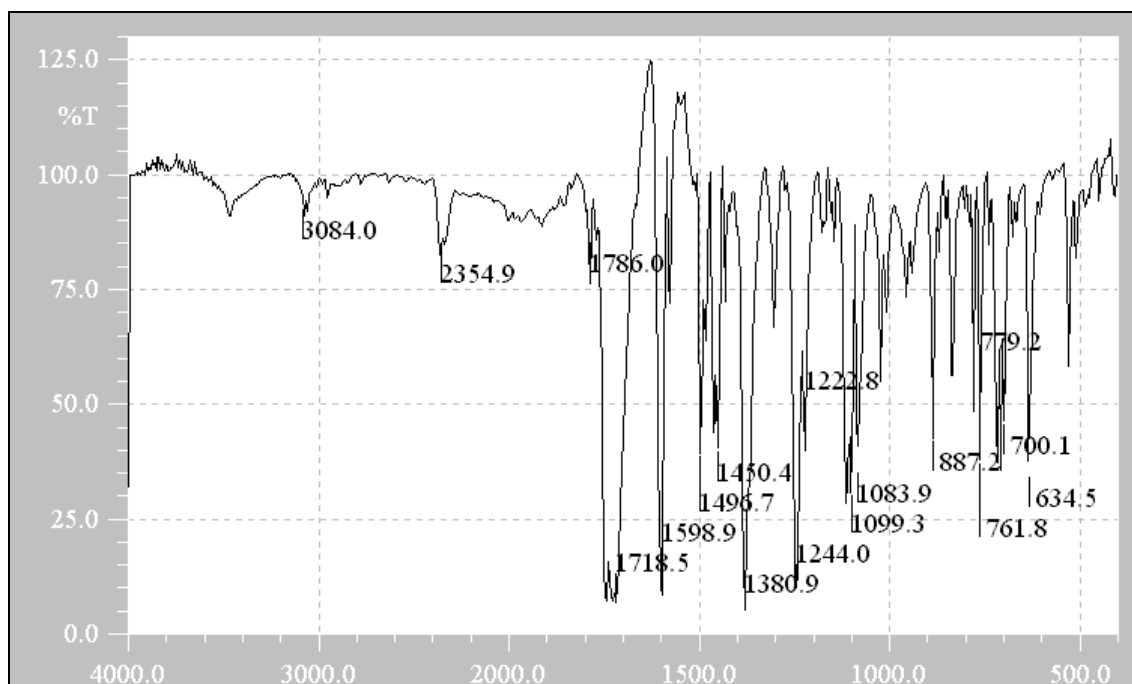


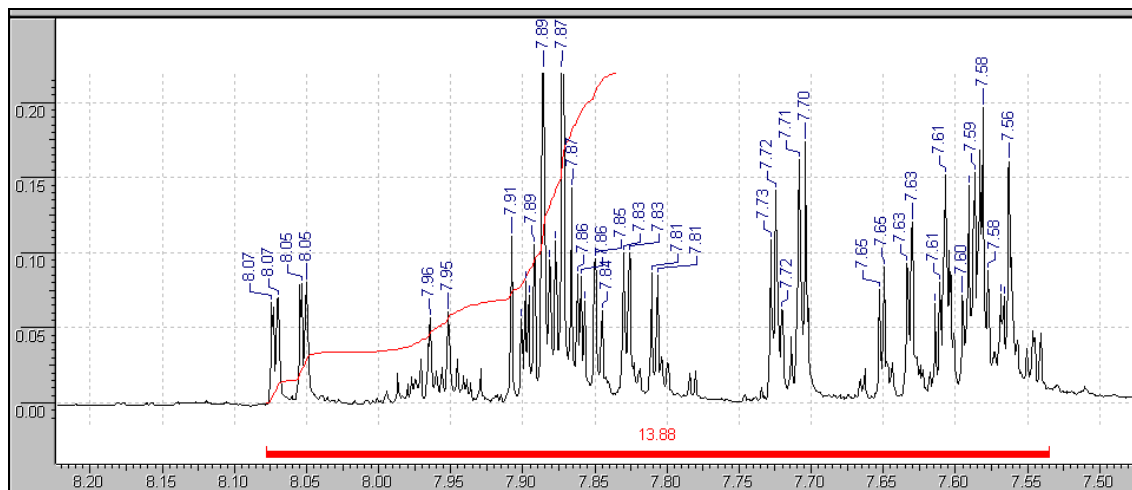
composto VI

Infravermelho (pastilha de KBr): ν C-H aromático = 3084 cm⁻¹; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2933 e 2861 cm⁻¹; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1786 cm⁻¹ e 1718 cm⁻¹; ν C=O éster = 1730 cm⁻¹; ν C=N furoxano = 1598 cm⁻¹; ν C=C aromático = 1560 cm⁻¹ e 1450 cm⁻¹; ν C-N-C 1381 cm⁻¹; ν N-O 1356 cm⁻¹.

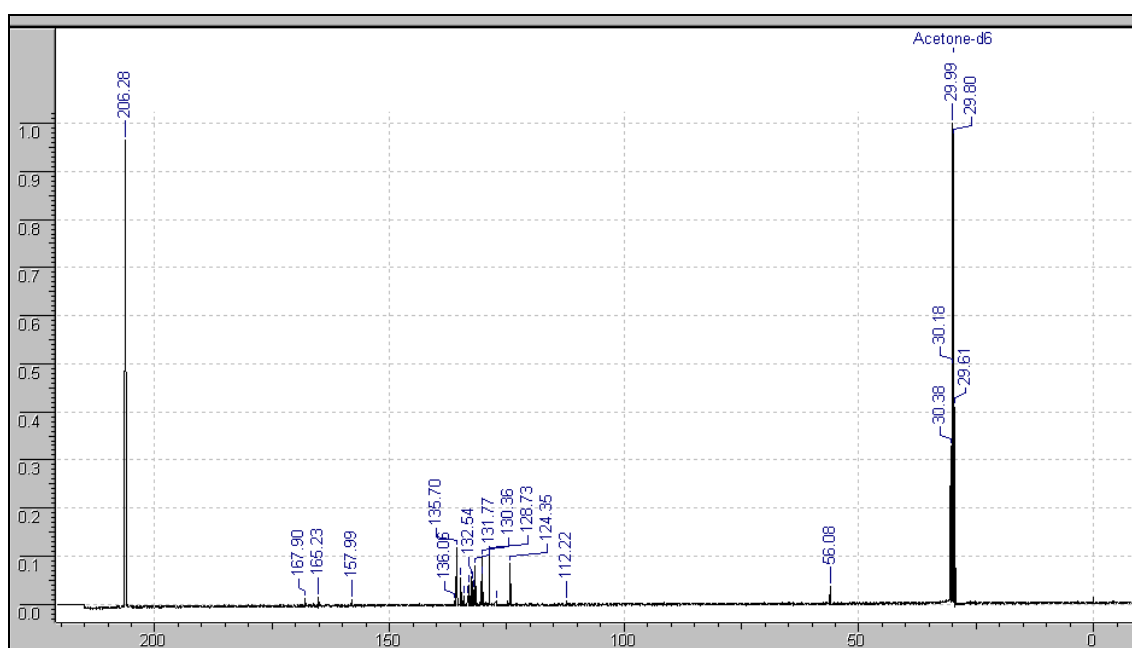
RMN ¹H (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 8,05 (dd; H₉; J_{orto} = 7,7Hz; J_{meta} = 1,4Hz; 1H); 7,95 (H₁₆; 2H); 7,91-7,81 (H₁, H₂, H₁₇ e H₁₈; 7H); 7,7 (H₇; 1H); 7,63 (H₈; 1H); 7,56 (H₆; 1H) ppm.

RMN ¹³C (400 MHz; acetona_{d6}): δ 167,9 (C4); 165,23 (C11); 157,99 (C14); 135,7 (C2); 134,84 (C5); 134,18 (C10); 133,03 (C8); 132,54 (C15); 131,77 (C6); 130,35 (C16); 130,17 (C9); 130,1 (C3); 128,73 (C17); 128,6 (C18); 124,35 (C1); 112,22 (C13); 56,06 (C12) ppm.

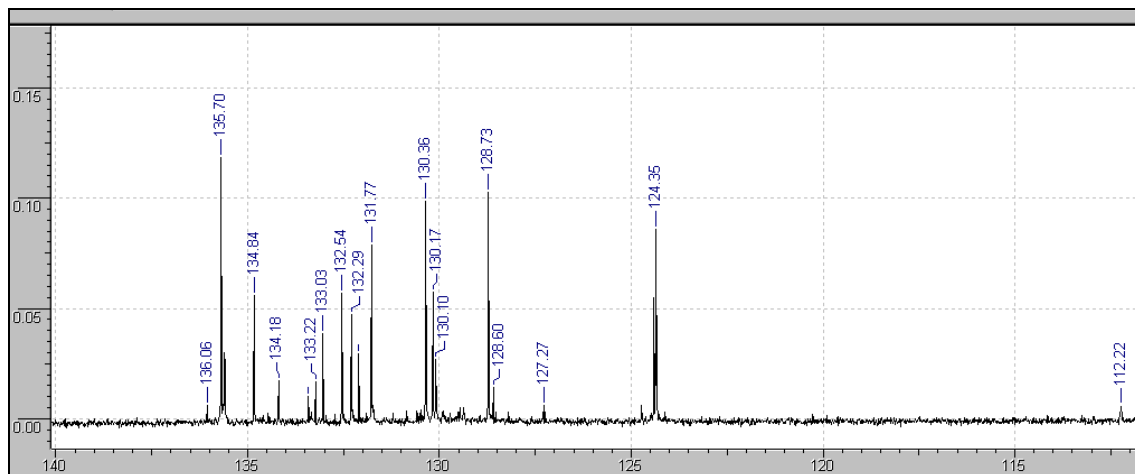




Espectro 57: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^1H ; 400 MHz; acetona $_d6$) – ampliação na região entre 7,45-8,2 ppm.

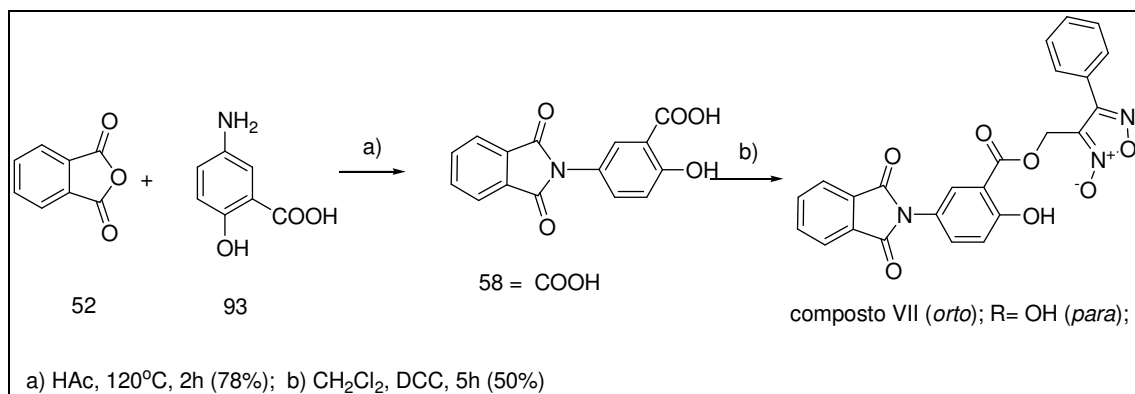


Espectro 58: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona $_d6$).



Espectro 59: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto VI (RMN ^{13}C ; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação entre 110-140 ppm.

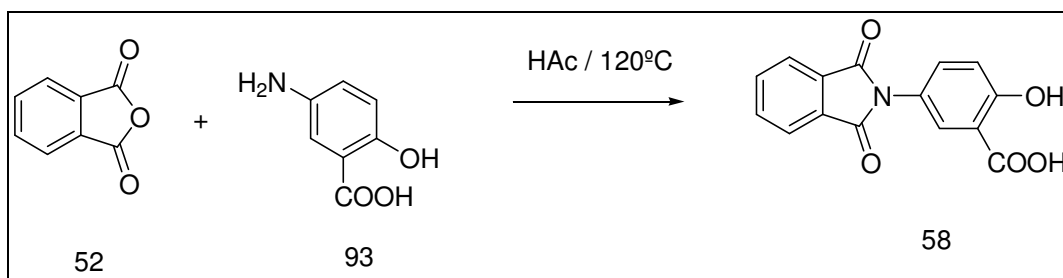
7- Síntese do composto VII



Esquema 7: Síntese do composto VII.

7.1- Síntese do 5-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-2-hidróxibenzóico (58).

Reação

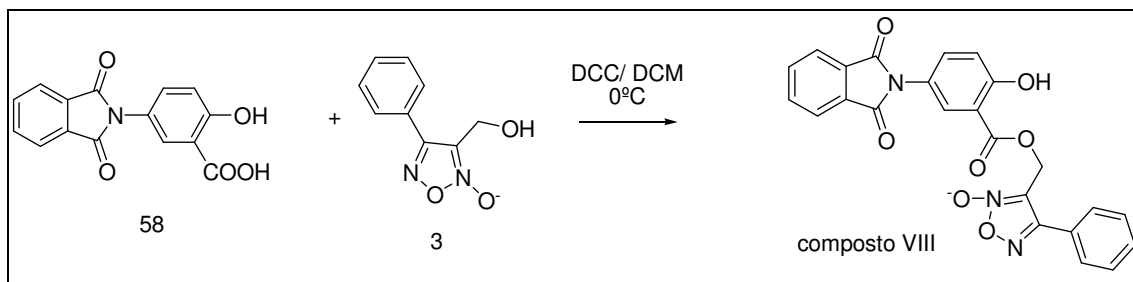


Procedimento

Em balão de 25 mL contendo 0,5g (3,26 mmol) de mesalazina (93), adicionou-se 0,5 g (3,37 mmol) de anidrido ftálico (52) e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C e agitada vigorosamente por 1 hora. O isolamento foi feito por resfriamento da mistura reacional, filtração do sólido formado que foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95%/água (6:4) fornecendo 1,41 g (rendimento de 78%) da ftalimida (58) como sendo cristais de cor cinza com faixa de fusão > 250 °C (PM = 283; C₁₅H₉NO₅).

7.2- Síntese do 3-([5-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-2-hidroxibenzoil]oxi)metil)-2-*N*-óxido-4-fenil-1,2,5-oxadiazol (composto VIII).

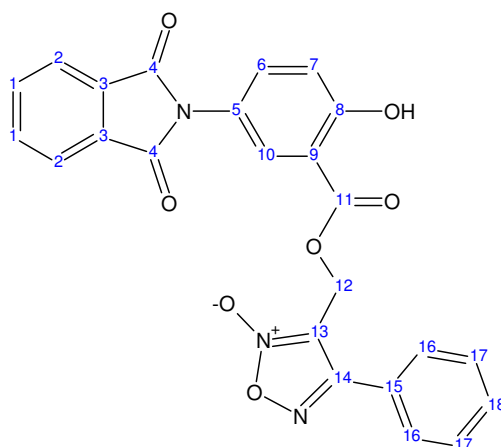
Reação



Procedimento

Em balão de 50 mL, adicionou-se 0,42g (1,50 mmol) do derivado ftalimídico (58); 0,25 g (1,30 mmol) do derivado furoxanico (3); 0,56 g (2,72 mmol) de dicitlohexilcarbodiimida e 0,02 g (0,14 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP). Adiciona-se 15 mL de diclorometano destilado e mantém a reação sob agitação vigorosa a 0°C por 5 horas. O solvente do meio reacional é eliminado a pressão reduzida e o produto obtido é purificado por cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica; fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila) para fornecer 300 mg (50,4% rendimento) um sólido branco (composto VIII) com faixa de fusão entre 153°-157°C (PM = 457; C₂₄H₁₅N₃O₇).

Caracterização estrutural:

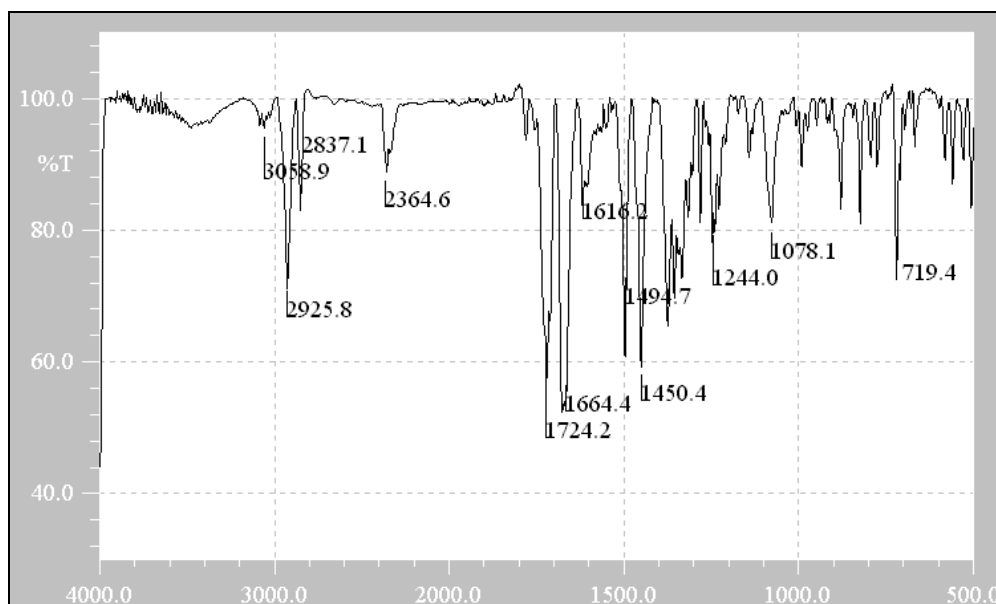


composto VIII

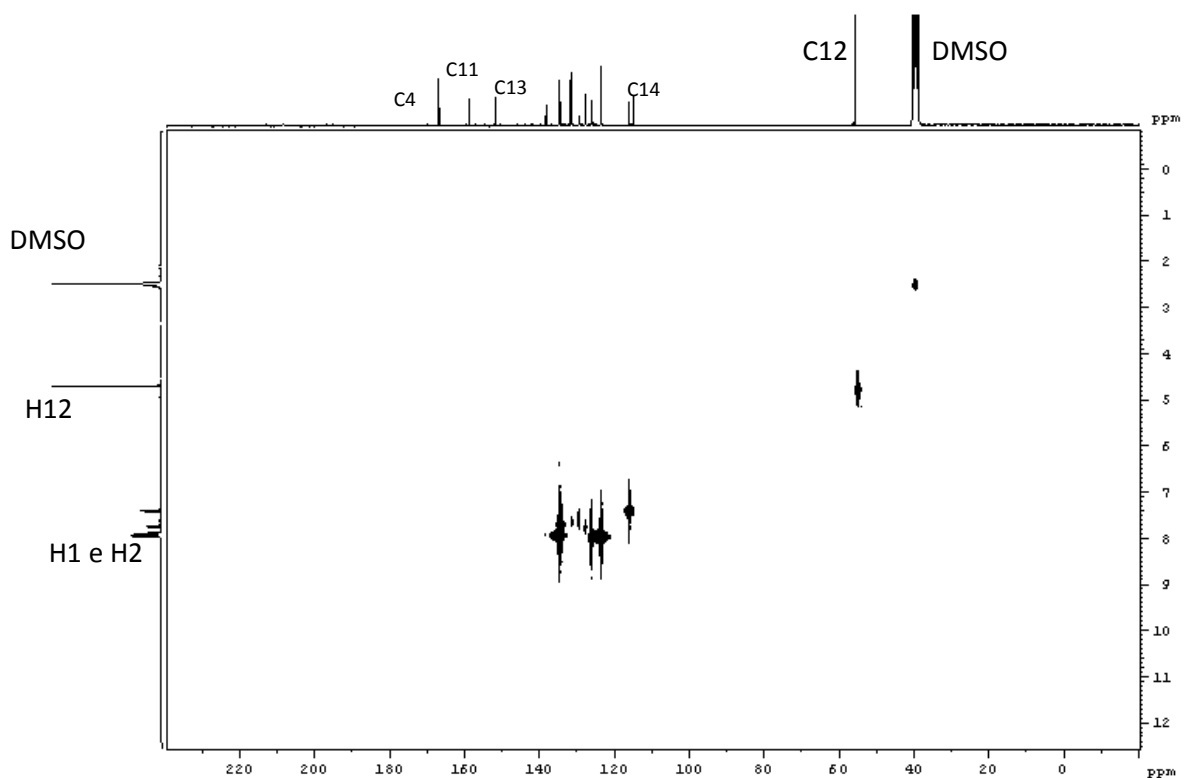
Infravermelho (pastilha de KBr): ν C-H aromático = 3058 cm^{-1} ; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2925 e 2837 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1786 cm^{-1} e 1715 cm^{-1} ; ν C=O éster = 1724 cm^{-1} ; ν C=N furoxano = 1598 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1494 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} ; ν C-N-C 1381 cm^{-1} ; ν N-O 1356 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ ~ 8,1 (H_1 e H_2); δ 7,97 (H_{16}); δ 7,9 (H_{10}), δ 7,8 (H_{17} e H_{18}); δ 7,4 (H_7); δ 5,1 (H_{12}) ppm.

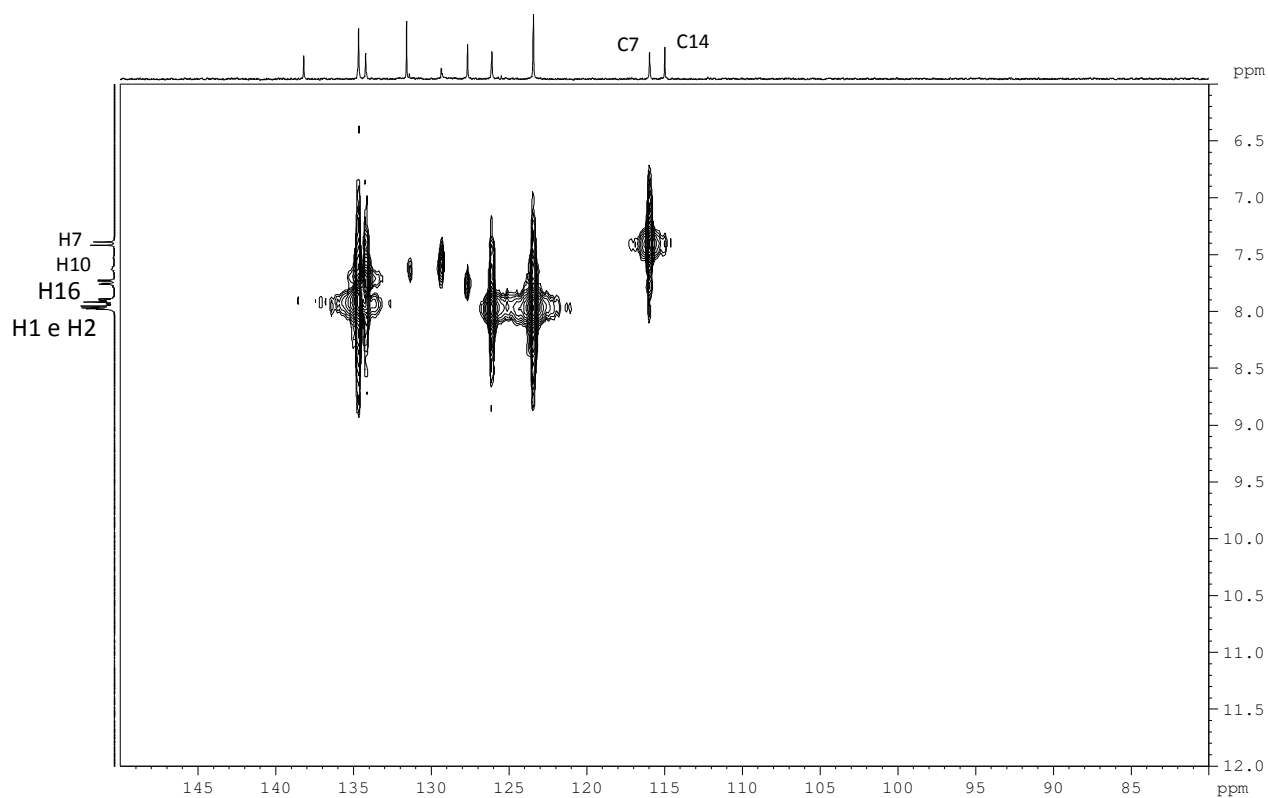
RMN ^{13}C (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 168 (C_4 e C_{11}); δ 158 (C_{13}); δ 134,5 (C_1); δ 132,31 (C_{15}); δ 130,4 (C_{16}); δ 130 (C_3); δ 128,92 (C_{17}); δ 128,03 (C_{18}); δ 123,5 (C_2); δ 115 (C_{14}); δ 55 (C_{12}) ppm.



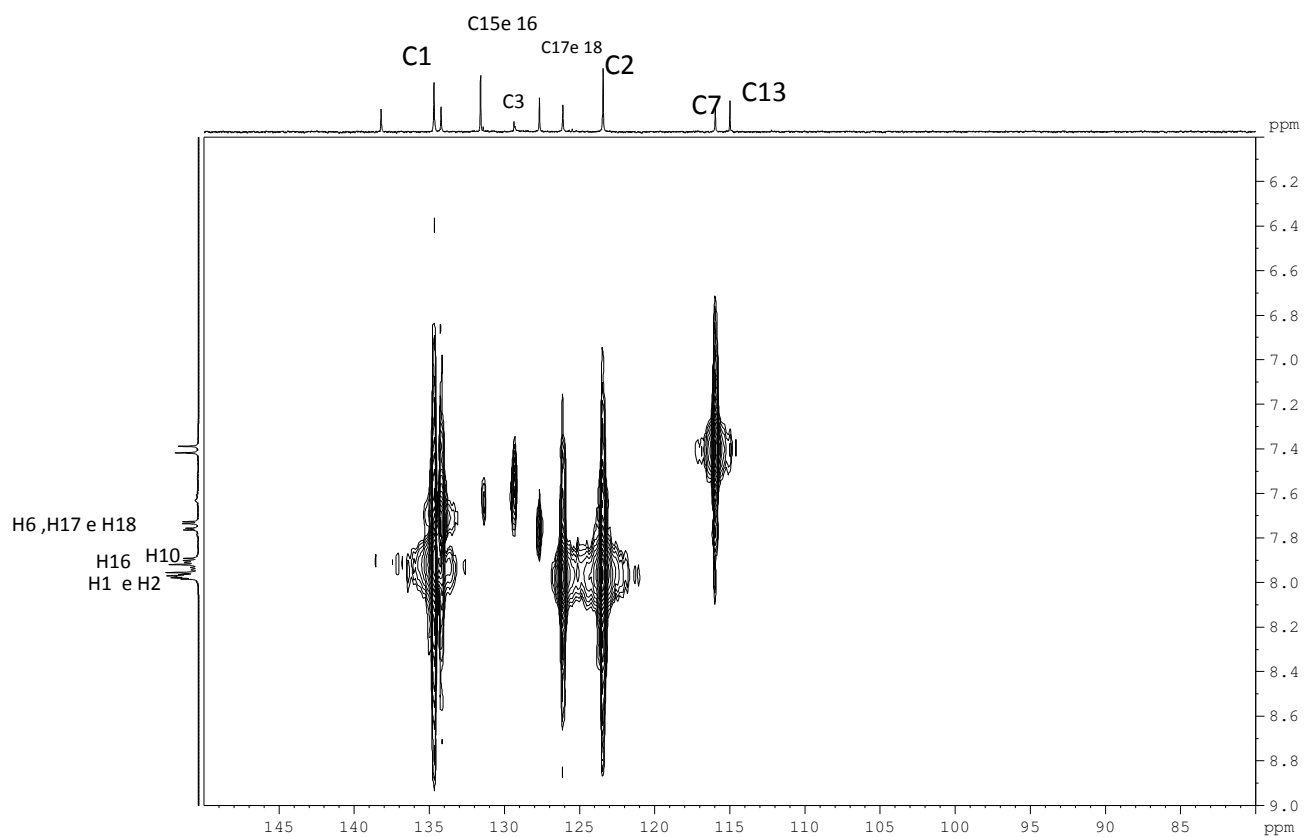
Espectro 60: Espectro na região do infravermelho do composto VIII (pastilha de KBr).



Espectro 61: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Hetero do composto VIII (400 MHz; acetona_{d6}).

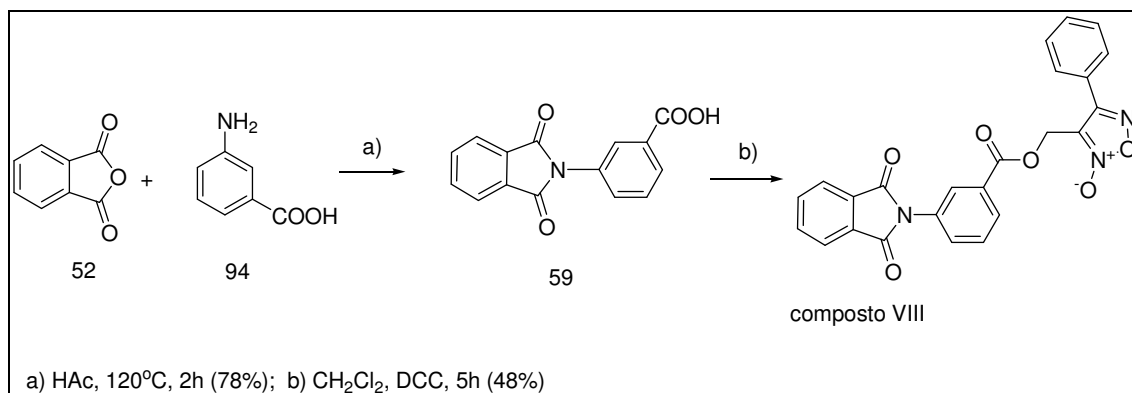


Espectro 62: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Hetcor do composto VIII (400 MHz; acetona_{d6})- ampliação.



Espectro 63: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Hetcor do composto VIII (400 MHz; acetona_{d6}) – ampliação.

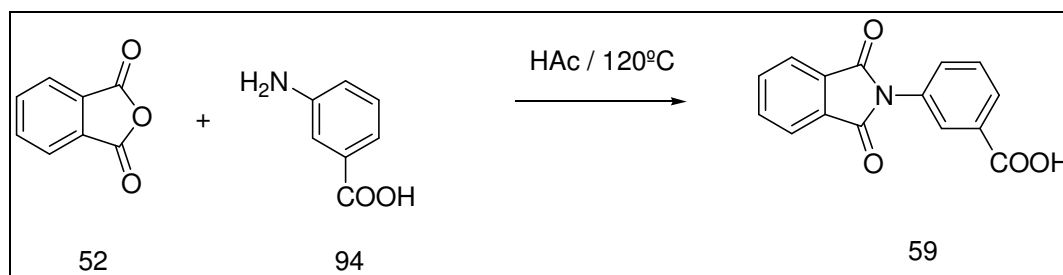
8- Síntese do composto VIII.



Esquema 8: Síntese do composto VIII.

8.1- Síntese do ácido 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzóico (59).

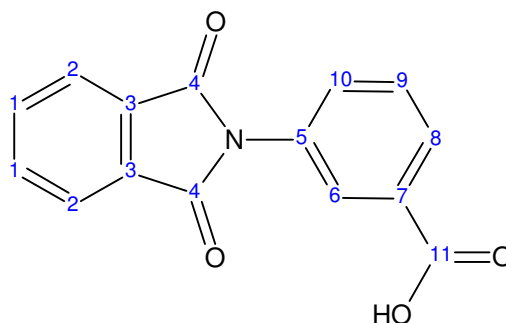
Reação



Procedimento

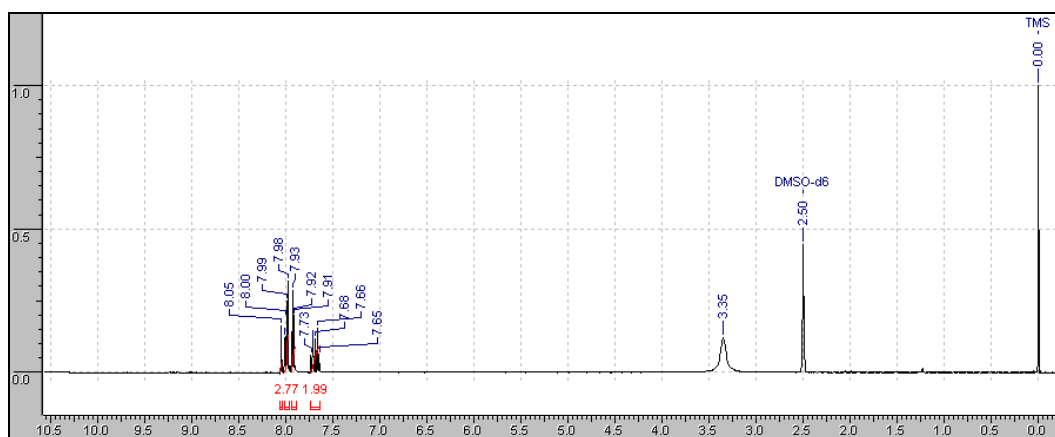
Em balão de 25 mL contendo 1g (7,29 mmol) de ácido *m*-aminobenzóico (79), adicionou-se 1g (6,75 mmol) de anidrido ftálico (52) e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C e agitada vigorosamente por 1 hora. O isolamento foi feito por resfriamento da mistura reacional, filtração do sólido formado que foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95%/água (6:4) fornecendo 1,39 g (rendimento de 78%) da ftalimida (59) como sendo cristais de cor branca com faixa de fusão = > 250°C (PM = 267; C₁₄H₉NO₄).

Caracterização estrutural:

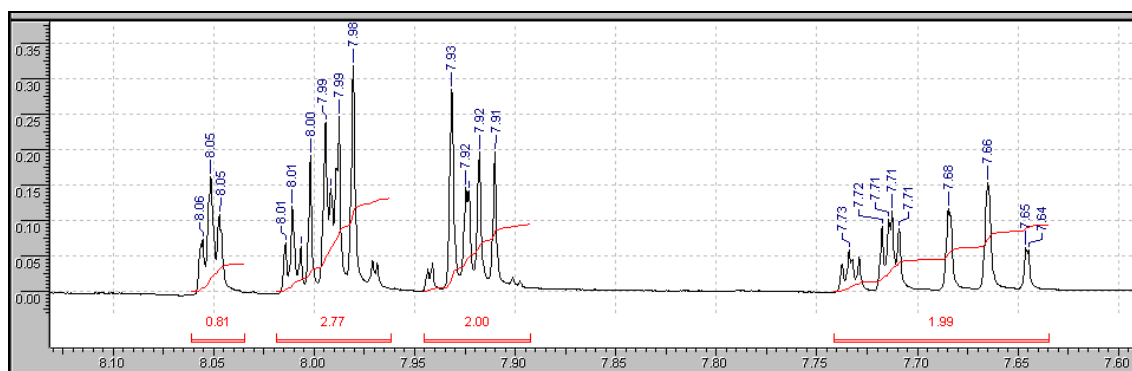


59

RMN ^1H (400 MHz; DMSO_{d6}): δ 8,05 (H_8 ; $J_{\text{meta}} = 1,5\text{Hz}$; 1H); 8,01 (H_6 ; $J_{\text{meta}} = 1,5\text{Hz}$; 1H); 7,99 (m; H_2 ; 2H); 7,92 (m; H_1 ; 2H); 7,72 (H_{10} ; $J_{\text{orto}} = 7,75\text{ Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,4\text{Hz}$; 1H); 7,66 (H_9 ; $J_{\text{orto}} = 7,92\text{ Hz}$; 1H) ppm.



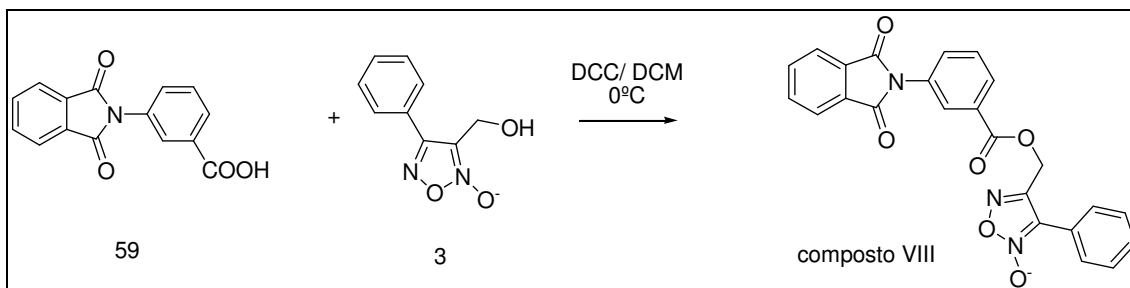
Espectro 64: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (59) (^1H RMN; 400 MHz; DMSO_{d6}).



Espectro 65: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do derivado ftalimídico (59) (^1H RMN; 400 MHz; DMSO_{d6}) - ampliação região δ 7,60- δ 8,10.

8.2- Síntese do 3-([3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzoil]oxi)metil-2-*N*-óxido-4-fenil-1,2,5-oxadiazol (composto VIII).

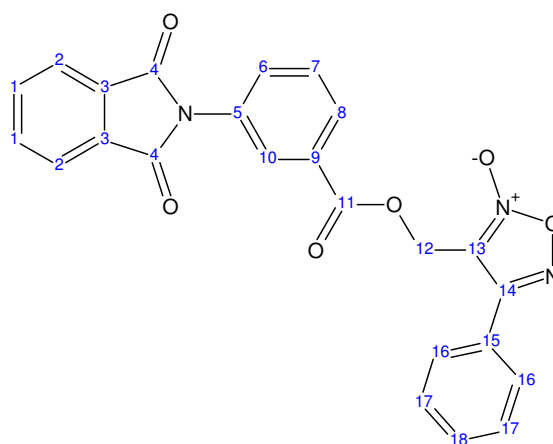
Reação



Procedimento

Em balão de 50 mL, adicionou-se 0,4 g (1,5 mmol) do derivado ftalimídico (59); 0,25 g (1,3 mmol) do derivado furoxanico (3); 0,56 g (2,72 mmol) de dicicloexilcarbodiimida e 0,02 g (0,14 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP). Adicionou-se 15 mL de diclorometano destilado e manteve-se a reação sob agitação vigorosa a 0°C por 5 horas. O solvente do meio reacional foi eliminado à pressão reduzida e o produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica; fase móvel: 60% hexano:40% acetato de etila) para fornecer 320 mg (48% rendimento) um sólido branco (composto VII) com faixa de fusão entre 150°-153°C (PM = 441; C₂₄H₁₅N₃O₆).

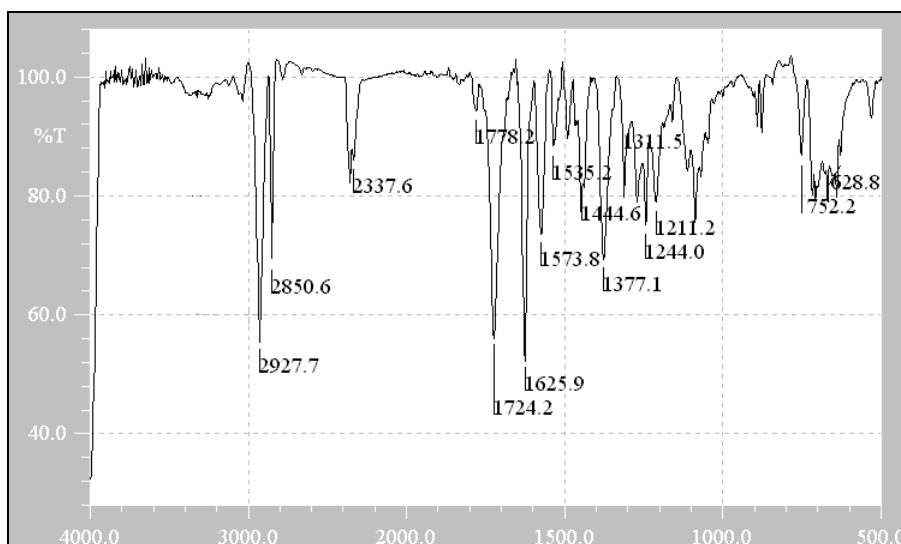
Caracterização estrutural:



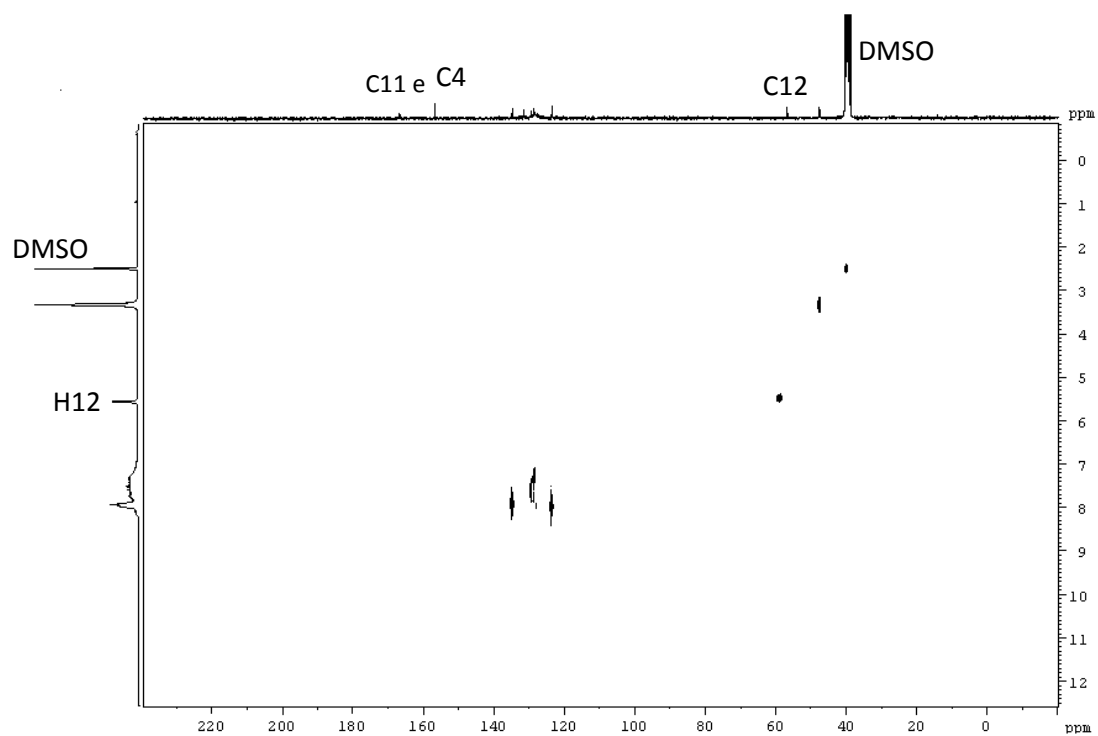
Infravermelho (pastilha de KBr): ν C-H aromático = 3084 cm^{-1} ; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2927 e 2850 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1786 cm^{-1} e 1717 cm^{-1} ; ν C=O éster = 1724 cm^{-1} ; ν C=N furoxano = 1573 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1560 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} ; ν C-N-C 1381 cm^{-1} ; ν N-O 1356 cm^{-1} .

RMN H^1 (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 7,87-8,1 (H_1 e H_2); δ 7,2-7,8 (H_6 , H_7 , H_8 , H_{10} , H_{16} , H_{17} e H_{18}); δ 5,4 (H_{12}) ppm.

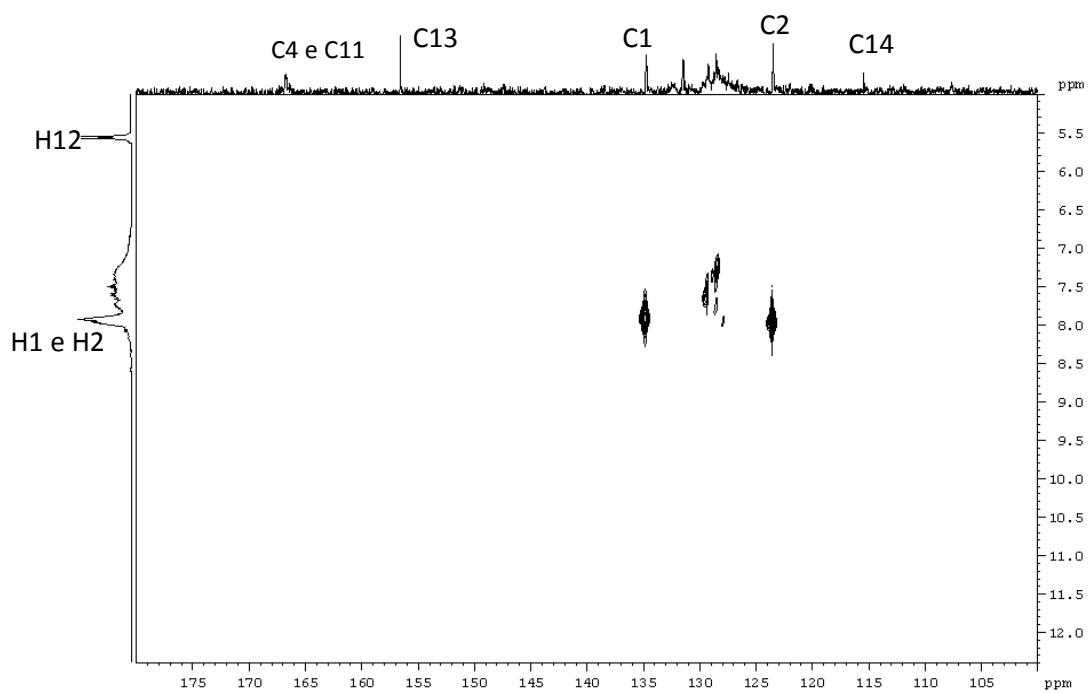
RMN C^{13} (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 168 (C_4 e C_{11}); δ 158 (C_{13}); δ 134,5 (C_1); δ 123,5 (C_2); δ 115 (C_{14}); δ 55 (C_{12}) ppm.



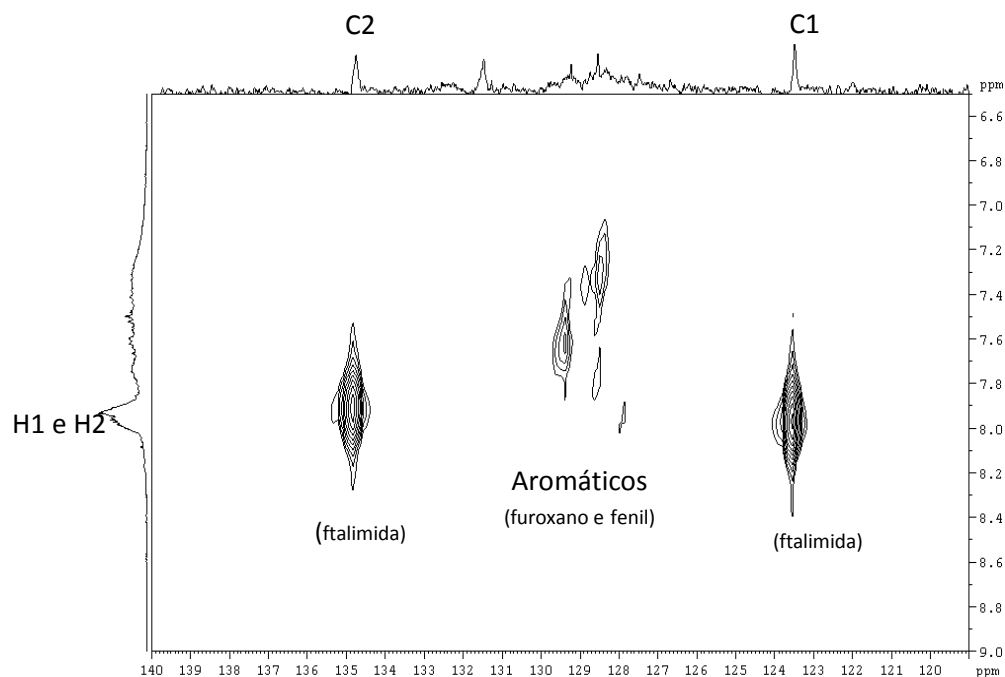
Espectro 66: Espectro na região de infravermelho do composto VIII (pastilha de KBr) .



Espectro 67: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Hetcor do composto VIII (400 MHz; acetona $_d6$).



Espectro 68: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Hetcor do composto VIII (400 MHz; acetona_{d6}).



Espectro 69: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Hetcor composto VIII - ampliação.