

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

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

**“Síntese, Caracterização e Avaliação Farmacológica de derivados**

***N*-acilhidrazônicos para a Prevenção de Aterotrombose”**

**Arthur Flohr Svendsen**

Araraquara/SP

2015

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

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

**“Síntese, Caracterização e Avaliação Farmacológica de derivados**

***N*-acilhidrazônicos para a Prevenção de Aterotrombose”**

**Arthur Flohr Svendsen**

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara/SP

2015

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*

-Marie Curie

Dedico este trabalho  
aos meus pais, John e Sandra  
por todo suporte, hoje e sempre.

## **Agradecimentos**

Aos seres humanos que mais admiro no mundo, por nunca desistirem e sempre me manterem motivado e focado nos reais objetivos da vida, meus pais, John e Sandra.

A pessoa que esteve ao meu lado ao longo da minha graduação sempre dando suporte e motivação, Thamires Marson.

Aos meus amigos por acreditarem no meu potencial, André Botelho, Bruno Cintra, Caren Monteiro, Eduardo Mestieri, Fernando Lindenberg, João Cantini, Marcelo Faria, Renata Arruda e Victor Lucena,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos por permitir realizar um sonho de longa data que era a pesquisa em desenvolvimento de fármacos e todos os ensinamentos ao longo da graduação.

Aos colegas e amigos de laboratórios, Aylime Castanho, Carla Ferreira, Daniela Hartmann Jornada, Diego Chiba, Isabela Junqueira, Leandro Rosseto, Lucas Ercolin, Luíz Dutra, Marcella Gabrielle, Mateus Scontrì, Paulo Yamasaki, Priscila Longhin, Rafael Chelucci, Renata Mota e Thaís Melo.

A Maria Elisa Lopes e Jéssica Oliveira da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas pela realização dos ensaios de Agregação Plaquetária.

As alunas de intercâmbio no LAPDESF, Christin Möser da Universidade de Jena e Nadine Johmann da Universidade de Mainz (Alemanha) pela ajuda nos ensaios de tempo de sangramento. *Vielen Dank für eure unterstützung!*

## Resumo

A aterosclerose é uma doença inflamatória de caráter crônico caracterizada pelo acúmulo de lipídio e componentes fibrosos em artérias, formando ateromas. O desenvolvimento de placas ateromatosas causa estenose arterial, causando eventos isquêmicos. A aterotrombose tem íntima associação com a aterosclerose, pois a ruptura das placas ateroscleróticas gera extravasamento de conteúdo pró-trombótico dos vasos, levando à ativação da agregação plaquetária e consequente geração de trombos. Devido à atividade essencial das plaquetas nos processos das doenças tromboembólicas, os fármacos que inibem a agregação plaquetária possuem valor na prevenção da aterotrombose, reduzindo a mortalidade de pacientes. Atualmente existem diversos fármacos que atuam na prevenção da ativação plaquetária em diversos alvos terapêuticos. Entretanto, tais terapias farmacológicas apresentam diversos efeitos adversos como trombocitopenia, neutropenia, hemorragia e baixa disponibilidade oral. Assim, a utilização de ferramentas de modificação molecular, como a hibridação, para obter novos fármacos antiagregantes plaquetários mais efetivos se mostra necessária. Neste trabalho demonstramos a síntese e caracterização de derivados *N*-acilhidrazônicos com múltiplos mecanismos de ação. Também são demonstrados resultados satisfatórios em ensaios pré-clínicos de tempo de sangramento, agregação plaquetária e analgesia. Logo, os compostos *N*-acilhidrazônicos demonstram-se como bons candidatos a fármacos para a prevenção de aterotrombose.

## Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by accumulation of lipid and fibrous components in arterial vessels, giving rise to atheromas. Development of Atheromatous plaques leads to arterial stenosis, triggering ischemic events. Atherothrombosis has a strong correlation with atherosclerosis, where rupture of atheromatous plaques cause release of vessel wall's pro-thrombotic components, activating platelet aggregation and thrombosis. Due to the major role played by platelets on thrombus-embolic conditions, drugs that inhibit platelet aggregation demonstrate great relevance for atherothrombosis prevention, reducing patient mortality. Currently, there are a variety of drugs acting on several different targets, preventing platelet activation. However, these therapies demonstrate side effects such as thrombocytopenia, neutropenia, hemorrhage and low oral availability. Thus, the application of molecular modifications such as hybridization can produce novel, more efficient antiplatelet aggregation inhibitors. In this project we describe the synthesis and characterization of novel *N*-acylhydrazone compounds, acting through multiple mechanisms such as platelet calcium chelation and nitric oxide donation by furoxanic subunits. Furthermore, we demonstrate that such compounds exhibit biological activity in *in vivo* bleeding time, *in vitro* antiplatelet aggregation and *in vivo* antinociceptive assays. Therefore, novel *N*-acylhydrazone compounds demonstrate potential as antiplatelet drugs for atherothrombosis prevention.

## SUMÁRIO

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>                                                                | <b>15</b> |
| 1.1 Aterosclerose .....                                                                  | 15        |
| 1.2 Fisiopatologia .....                                                                 | 17        |
| 1.3 Farmacoterapia .....                                                                 | 21        |
| 1.3.1 Inibidores da síntese de Tromboxanos.....                                          | 23        |
| 1.3.2 Antagonistas de receptores purinérgicos P2Y.....                                   | 24        |
| 1.3.3 Antagonistas de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ .....                          | 24        |
| 1.3.4 Inibidores de Fosfodiesterases.....                                                | 25        |
| 1.3.5 Inibidores de Trombina.....                                                        | 25        |
| 1.3.6 Desenvolvimento de novos candidatos antiplaquetários .....                         | 26        |
| 1.4 Modificações moleculares .....                                                       | 27        |
| 1.5 Planejamento estrutural.....                                                         | 28        |
| 1.4 Objetivos .....                                                                      | 32        |
| 1.4.1 Objetivos específicos.....                                                         | 32        |
| <b>2 Material e Métodos.....</b>                                                         | <b>33</b> |
| <b>2.1 Material.....</b>                                                                 | <b>33</b> |
| 2.2 Instrumentos.....                                                                    | 34        |
| 2.3 Procedimentos Sintéticos.....                                                        | 34        |
| 2.3.1 Síntese do derivado furoxânico aromático .....                                     | 34        |
| 2.3.2 Síntese do derivado benzofuroxânico .....                                          | 36        |
| 2.3.3 Síntese do composto final HBZFX ORTO .....                                         | 38        |
| 2.3.4 Síntese do composto final HBZFX PARA.....                                          | 39        |
| 2.3.5 Síntese do composto final HFXAR ORTO.....                                          | 40        |
| 2.3.6 Síntese do composto final HFXAR PARA .....                                         | 41        |
| <b>2.4 Ensaios Farmacológicos .....</b>                                                  | <b>42</b> |
| 2.4.1 Tempo de sangramento .....                                                         | 42        |
| <b>3. Resultados e Discussão .....</b>                                                   | <b>44</b> |
| 3.1 Síntese e caracterização .....                                                       | 44        |
| 3.1.1 Síntese do composto furoxânico 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído ..... | 44        |
| 3.1.2 Síntese do composto furoxânico 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol .....      | 49        |

|                                                                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1.3 Síntese dos compostos finais <i>N</i> -acilhidrazônicos com derivados furoxânicos 6-formilbenzo[c]- <i>N</i> -óxido-1,2,5-oxadiazol .....     | 52         |
| 3.1.4 Síntese dos compostos finais <i>N</i> -acilhidrazônicos com derivados furoxânicos 4-fenil-1,2,5-oxadiazol- <i>N</i> -óxido-3-carbaldeído..... | 68         |
| 3.1.5 Síntese dos compostos finais <i>N</i> -acilhidrazônicos acoplados com o ácido acetilsalicílico .....                                          | 82         |
| 3.2 Atividade biológica .....                                                                                                                       | 84         |
| 3.2.2 Avaliação da agregação plaquetária .....                                                                                                      | 84         |
| 3.2.1 Avaliação do tempo de sangramento .....                                                                                                       | 88         |
| 3.2.3 Avaliação da atividade analgésica .....                                                                                                       | 90         |
| <b>4. Conclusões .....</b>                                                                                                                          | <b>92</b>  |
| <b>5. Referências Bibliográficas .....</b>                                                                                                          | <b>94</b>  |
| <b>ANEXO I.....</b>                                                                                                                                 | <b>I</b>   |
| <b>ANEXO II.....</b>                                                                                                                                | <b>II</b>  |
| <b>Assinaturas.....</b>                                                                                                                             | <b>III</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Ultrassom da artéria coronária demonstrando a progressão da lesão aterosclerótica, resultando em diminuição do lúmen arterial.....                   | 15 |
| <b>Figura 2</b> – Mortalidade global por Doenças Cardiovasculares em homens e mulheres.....                                                                            | 16 |
| <b>Figura 3</b> - Migração de monócitos na aterogênese. ....                                                                                                           | 18 |
| <b>Figura 4</b> - Progresso do ateroma no processo patológico da Aterosclerose. ....                                                                                   | 20 |
| <b>Figura 5</b> - Principais receptores na membrana plaquetária e principais fármacos utilizados na terapia antiagregante plaquetária. ....                            | 22 |
| <b>Figura 6</b> - Planejamento estrutural dos novos compostos por hibridização, contendo a subunidade N-acilhidrazona e derivados furoxânicos e benzofuroxânicos. .... | 29 |
| <b>Figura 7</b> - Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxanos. .                                                                                 | 31 |
| <b>Figura 8</b> - Obtenção do derivado 1, 4-(hidroximetil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido.                                                                            | 34 |
| <b>Figura 9:</b> Obtenção do derivado 2, 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído (furoxano fenilado). ....                                                       | 35 |
| <b>Figura 10</b> - Obtenção do derivado 3, 4-azida-3nitrobenzaldeído.....                                                                                              | 36 |
| <b>Figura 11</b> - Obtenção do derivado 4, 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano). ....                                                              | 37 |
| <b>Figura 12:</b> Síntese do composto final HBZFX ORTO.....                                                                                                            | 38 |
| <b>Figura 13</b> - Síntese do composto final HBZFX PARA.....                                                                                                           | 39 |
| <b>Figura 14</b> - Síntese do composto final HFXAR ORTO.....                                                                                                           | 40 |
| <b>Figura 15</b> - Síntese do composto final HFXAR PARA. ....                                                                                                          | 41 |
| <b>Figura 16</b> - Obtenção do derivado 1, 4-(hidroximetil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido. ....                                                                      | 44 |
| <b>Figura 17</b> - Mecanismo de formação do composto.....                                                                                                              | 45 |
| <b>Figura 18</b> - Obtenção do derivado 2, 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído (composto 2)(Furoxano fenilado). ....                                         | 47 |

|                                                                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 19</b> – Mecanismo de oxidação por Clorocromato de Piridina (PCC). ....                                                                        | <b>48</b> |
| <b>Figura 20</b> - Obtenção do derivado 3, 4-azida-3nitrobenzaldeído (composto 3). ....                                                                  | <b>49</b> |
| <b>Figura 21</b> – Mecanismo de formação do composto intermediário 3. ....                                                                               | <b>49</b> |
| <b>Figura 22</b> - Obtenção do derivado 4, 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol<br>(benzofuroxano/ composto 4). ....                                 | <b>50</b> |
| <b>Figura 23</b> – Mecanismo de formação do benzofuroxano/composto 4. ....                                                                               | <b>50</b> |
| <b>Figura 24</b> – Mecanismo de reação para formação dos compostos <i>N</i> -acilhidrazônicos<br>.....                                                   | <b>53</b> |
| <b>Figura 25</b> - Síntese do composto final HBZFX ORTO. ....                                                                                            | <b>54</b> |
| <b>Figura 26</b> - Síntese do composto final HBZFX PARA. ....                                                                                            | <b>61</b> |
| <b>Figura 27</b> - Síntese do composto final HFXAR ORTO. ....                                                                                            | <b>68</b> |
| <b>Figura 28</b> – Síntese do composto final HFXAR PARA. ....                                                                                            | <b>75</b> |
| <b>Figura 29</b> – Síntese do acoplamento dos compostos finais com o ácido<br>acetilsalicílico (AAS). ....                                               | <b>82</b> |
| <b>Figura 30</b> – Determinação da agregação plaquetária na presença dos compostos <i>N</i> -<br>acilhidrazônicos induzida por Colágeno e Trombina. .... | <b>86</b> |
| <b>Figura 31</b> – Determinação do tempo de sangramento <i>in vivo</i> dos compostos<br><i>N</i> -acilhidrazônicos, salina e AAS. ....                   | <b>88</b> |
| <b>Figura 32</b> – Determinação do grau de proteção analgésica demonstrado pelos<br>compostos finais e dipirona. ....                                    | <b>91</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1</b> – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto intermediário 1 em experimento de $^1\text{H}$ RMN (300MHz; DMSO $_d6$ ). .....                     | <b>47</b> |
| <b>Tabela 2</b> – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo benzofuroxa em experimento de $^1\text{H}$ RMN (300MHz; CDCl $_3$ ). .....                                   | <b>52</b> |
| <b>Tabela 3</b> - Bandas de absorção no IV do composto HBZFX ORTO. ....                                                                                              | <b>55</b> |
| <b>Tabela 4</b> – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HBZFX ORTO em experimentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ RMN (300MHz; DMSO $_d6$ ). ....  | <b>60</b> |
| <b>Tabela 5</b> - Bandas de absorção no IV do composto HBZFX PARA. ....                                                                                              | <b>62</b> |
| <b>Tabela 6</b> – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HBZFX PARA em experimentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ RMN (300MHz; DMSO $_d6$ ). ....  | <b>67</b> |
| <b>Tabela 7</b> - Bandas de absorção no IV do composto HFXAR ORTO. ....                                                                                              | <b>69</b> |
| <b>Tabela 8</b> – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HFXAR ORTO em experimentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ RMN (300MHz; DMSO $_d6$ ). ....  | <b>74</b> |
| <b>Tabela 9</b> - Bandas de absorção no IV do composto HFXAR PARA. ....                                                                                              | <b>76</b> |
| <b>Tabela 10</b> – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HFXAR PARA em experimentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ RMN (300MHz; DMSO $_d6$ ). .... | <b>81</b> |
| <b>Tabela 11</b> – Valores da agregação e inibição apresentados pelos compostos induzidos por diferentes agonistas. ....                                             | <b>86</b> |
| <b>Tabela 12</b> – Valores de tempo de sangramento dos diferentes compostos. ....                                                                                    | <b>89</b> |
| <b>Tabela 13</b> – Número de contorções e potencial analgésico apresentado pelos diferentes compostos. ....                                                          | <b>91</b> |

## LISTA DE ESPECTROS

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Espectro 1</b> - Espectro de de $^1\text{H}$ RMN do composto intermediário 1 (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....              | 46 |
| <b>Espectro 2</b> - Espectro de de $^1\text{H}$ RMN do composto intermediário benzofuroxano (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ) ..... | 51 |
| <b>Espectro 3</b> - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HBZFX ORTO.....                                        | 54 |
| <b>Espectro 4</b> - Espectro de de $^1\text{H}$ RMN do composto final HBZFX ORTO (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....             | 57 |
| <b>Espectro 5</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto final HBZFX ORTO (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....             | 58 |
| <b>Espectro 6</b> - Espectro bidimensional HSQC RMN do composto final HBZFX ORTO (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ) .....            | 59 |
| <b>Espectro 7</b> - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HBZFX PARA. ....                                       | 61 |
| <b>Espectro 8</b> – Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto final HBZFX PARA (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....                | 64 |
| <b>Espectro 9</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto final HBZFX PARA (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....             | 65 |
| <b>Espectro 10</b> - Espectro bidimensional HSQC do composto final HBZFX PARA (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ) .....               | 66 |
| <b>Espectro 11</b> - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HFXAR ORTO.....                                       | 69 |
| <b>Espectro 12</b> – Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto final HFXAR ORTO (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....               | 71 |
| <b>Espectro 13</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto final HFXAR ORTO (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).....            | 72 |

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Espectro 14</b> - Espectro bidimensional HSQC do composto final HFXAR ORTO<br>(300MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) .....    | <b>73</b> |
| <b>Espectro 15</b> - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto<br>HFXAR PARA. ....                    | <b>75</b> |
| <b>Espectro 16</b> - Espectro de <sup>1</sup> H RMN do composto final HFXAR PARA (300MHz;<br>DMSO <sub>d6</sub> ).....  | <b>78</b> |
| <b>Espectro 17</b> - Espectro de <sup>13</sup> C RMN do composto final HFXAR PARA (300MHz;<br>DMSO <sub>d6</sub> )..... | <b>79</b> |
| <b>Espectro 18</b> - Espectro bidimensional HSQC do composto final HFXAR ORTO<br>(300MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) .....    | <b>80</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

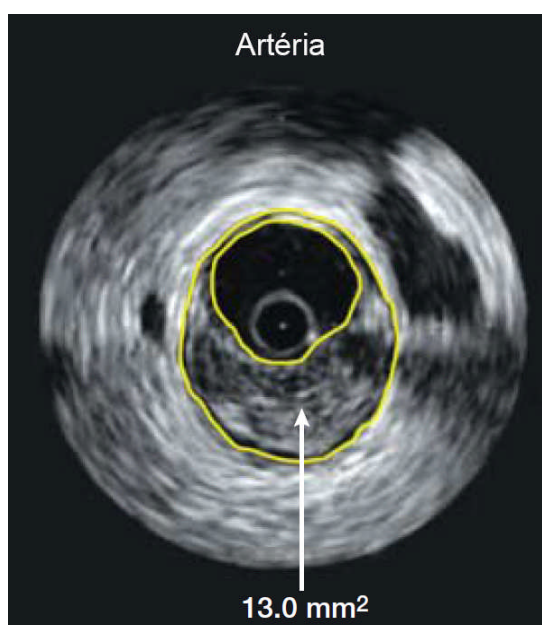
| <b>Abreviaturas</b> |                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------|
| AAS                 | Ácido Acetilsalicílico                          |
| ADP                 | Adenosina Difosfato                             |
| AINEs               | Anti-inflamatórios Não Esteroidais              |
| AMPc                | Adenosina Mono Fosfato cíclica                  |
| CC                  | Cromatografias em Coluna                        |
| CCD                 | Cromatografia de Camada Delgada                 |
| CDI                 | 1,1'-Carbonildiimidazol                         |
| CMC                 | Carboximetilcelulose                            |
| COX                 | Ciclooxygenases                                 |
| DAC                 | Doença Arterial Coronária                       |
| DMAP                | 4-Dimetilaminopiridina                          |
| DMF                 | Dimetilformamida                                |
| DMSO                | Dimetilsulfóxido                                |
| DVP                 | Doenças Vasculares Periféricas                  |
| EDC                 | 1-Etill-3-(3-Dimetilaminopropil)Carbodiimida    |
| EROs                | Espécies Reativas de Oxigênio                   |
| f <sub>w</sub>      | Von Willebrand                                  |
| GMPc                | Guanina Mono Fosfato cíclico                    |
| IL-1 $\beta$        | Interleucina-1 $\beta$                          |
| LDL                 | Lipoproteínas de Baixa Densidade                |
| MCP-1               | Proteína Quimiotática de Monócitos 1            |
| MMPs                | Matrix Metaloproteases                          |
| oxLDL               | Lipoproteínas de Baixa Densidade Oxidadas       |
| PAR                 | Receptores de Protease Ativados                 |
| PCC                 | Clorocromato de Piridina                        |
| PDGF                | Fator de Crescimento Derivado Da Plaqueta       |
| PECAM-1             | Molécula de Adesão Plaqueta-Célula Endotelial 1 |
| TGF- $\beta$        | Fator $\beta$ de Crescimento Transformador      |
| TNF- $\alpha$       | Fator de Necrose Tumoral $\alpha$               |
| TSP-1               | Trombospondina 1                                |
| TXA <sub>2</sub>    | Prostaglandina Tromboxano A <sub>2</sub>        |
| VCAM-1              | Proteína de Adesão Celular Vascular 1           |
| VEGF                | Fator de Crescimento Do Endotélio Vascular      |

## 1. Introdução

### 1.1 Aterosclerose

Uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos em artérias de grosso calibre, resultando na diminuição de fluxo sanguíneo e assim culminando em eventos isquêmicos como infartos.

**Figura 1** - Ultrassom da artéria coronária demonstrando a progressão da lesão aterosclerótica, resultando em diminuição do lúmen arterial.



**Fonte:** CHOUDHURY, 2004

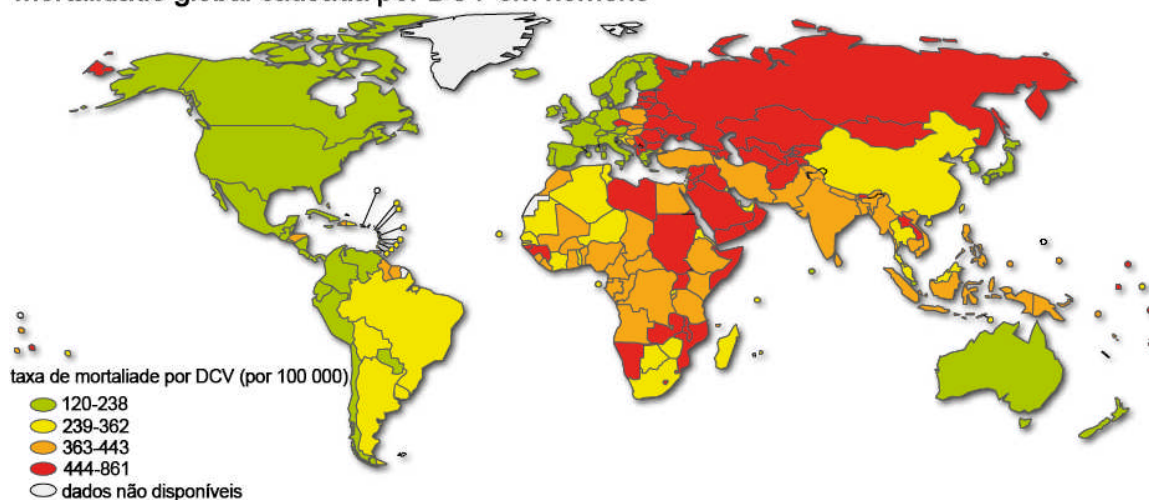
A aterosclerose é uma das principais causa de doenças cardiovasculares (DCV), como doença da artéria coronária (DAC), infarto e doenças vasculares periféricas (DVP), assim representando uma das principais causa de morbidade e mortalidade no mundo (NIH, 2011; Libby, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 foram registradas 17,3 milhões de mortes relacionadas com DCVs, sendo 7,3 milhões de óbitos devido a infarto. Também foi demonstrado que dentre as mortes por DCVs, 80% ocorreram

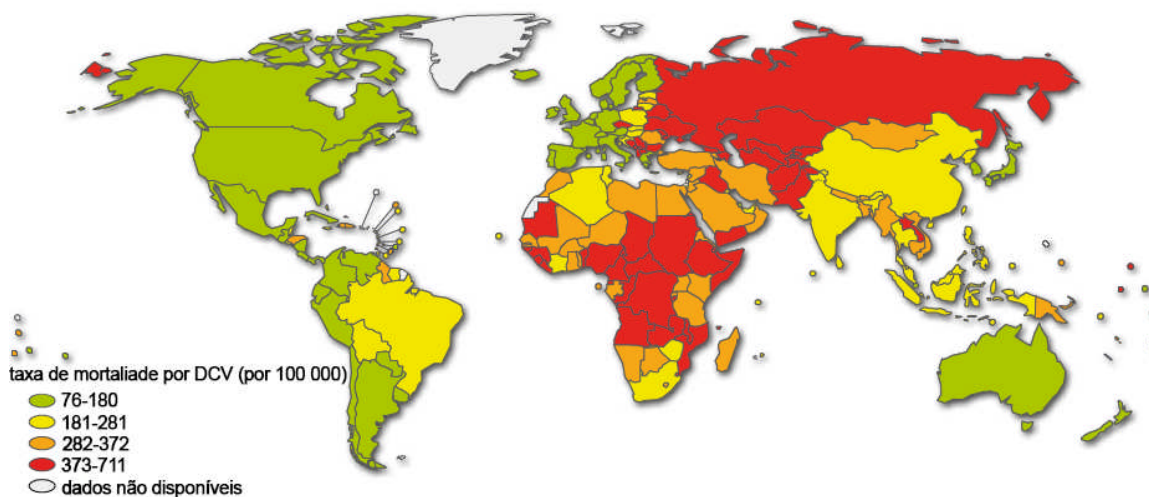
em países em desenvolvimento (Figura 2), demonstrando que a mortalidade desse tipo de patologia vem aumentando dramaticamente nos mesmos, superando a incidência em países desenvolvidos (WHO, 2008; WHO, 2011).

**Figura 2** – Mortalidade global por Doenças Cardiovasculares em homens e mulheres.

**Mortalidade global causada por DCV em homens**



**Mortalidade global causada por DCV em mulheres**



Fonte: adaptado WHO, 2011.



Mesmo não tendo atualmente uma das maiores incidências mundiais de DCVs, ainda é a principal causa de mortalidade nos Estados Unidos demonstrando uma média de 610 000 mortes por ano (25% da mortalidade), onde 370 000 são causadas por DAV (XU, KOCHANNEK; MURPHY et al, 2011).

Intervenções médicas para o tratamento das condições que são consequência da aterosclerose só podem ser realizadas em um quadro avançado da doença, porém a prevenção da aterosclerose possui extrema importância. Fatores de risco controláveis que influenciam na incidência são:

- Hiperlipidemia;
- Diabetes;
- Hipertensão;
- Tabagismo;
- Atividade física.

Outros fatores não controláveis para o aparecimento da doença são:

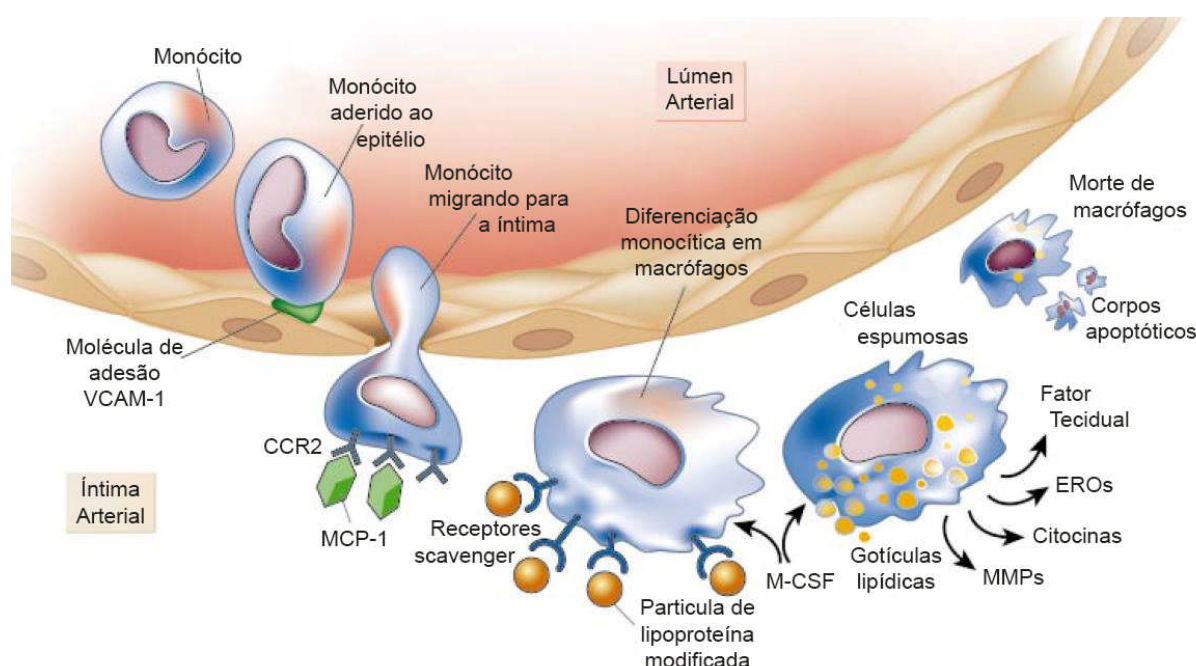
- Anormalidades genéticas;
- Antecedentes familiares para a patologia; idade.

## **1.2 Fisiopatologia**

A doença é iniciada através da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), presente na intima arterial, por espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em sua forma oxidada e imunogênica, oxLDL. Em células endoteliais, a forma oxidada do LDL induz a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, aumentando a produção de Proteína de Adesão Celular Vascular 1 (VCAM-1) e a

quimiocina Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1). Com a super expressão de VCAM-1 e MCP-1, há aumento da adesão de monócitos circulantes na parede endotelial e consequente aumento da migração dos mesmos para a íntima arterial. Após diapedese, proporcionada por MCP-1, monócitos diferenciam-se em macrófagos, que fagocitam oxLDL (COLLINS, 2001). Estas células de defesa não possuem a maquinaria celular necessária para degradar a forma oxidada do LDL, ocorrendo o acúmulo citoplasmático nos macrófagos, assim formando células espumosas (Figura 3).

**Figura 3** - Migração de monócitos na aterogênese.



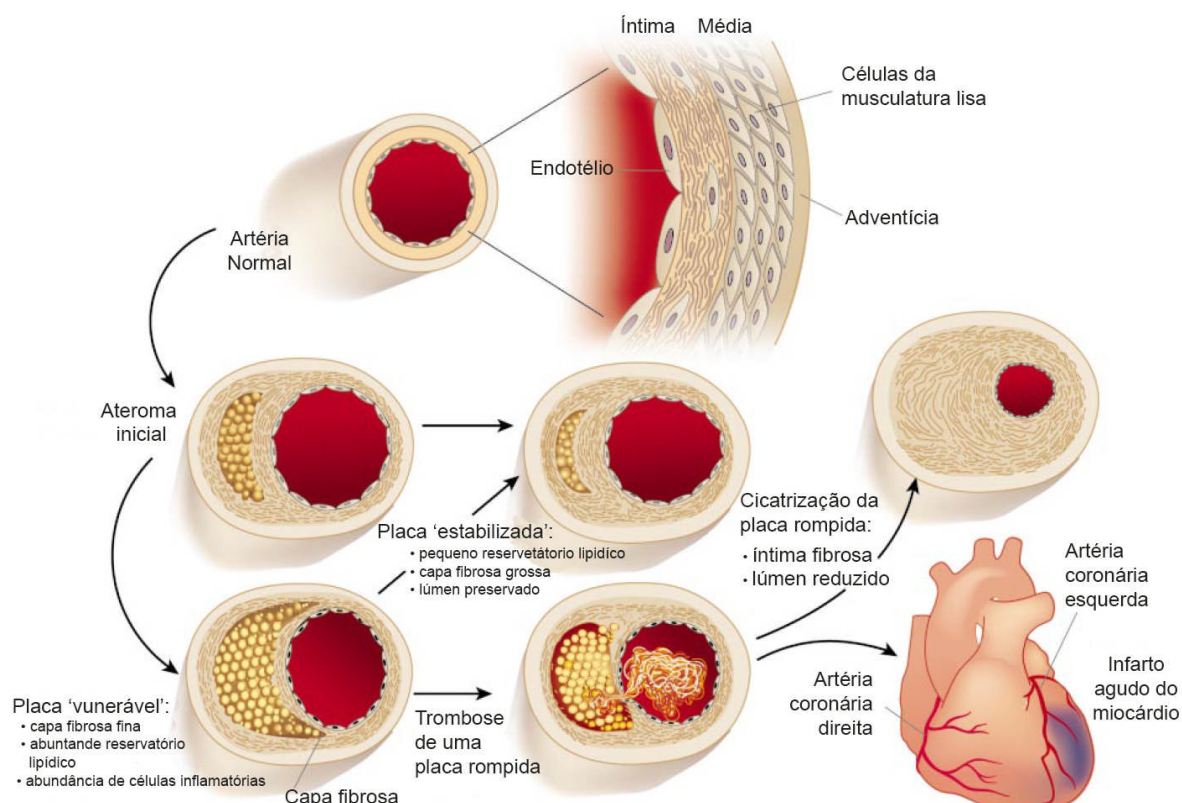
**Fonte:** adaptado de Libby, 2002.

Com a diferenciação e ativação de monócitos em macrófagos, inicia-se um processo inflamatório agudo, no qual estes macrófagos ativados produzem Matrix Metaloproteases (MMPs), EROs e citocinas pró-inflamatórias como Interleucina-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), levando a formação de estrias gordurosas (Libby, 2002).

A produção de citosinas e EROs cronifica a formação de estrias gordurosas, sendo também intensificada pelo fato que tais citosinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) também ativavam NF- $\kappa$ B, aumentando ainda mais a expressão de VCAM-1 e MCP-1. A lesão passa a possuir inflamação de caráter crônico, com aumento no recrutamento de macrófagos, linfócitos, enzimas hidrolíticas e produção de citocinas e quimiocinas. Em adição, macrófagos da região da lesão também produzem fatores de crescimento, promovendo o remodelamento da musculatura lisa dos vasos, gerando uma lesão de caráter mais complexo, denominada ateroma (CHESTER et al, 1995; LIBBY, 2002; YOKOYA et al., 1999).

Assim, após ciclos de migração, proliferação de células mononucleadas, acúmulo de células espumosas, estimulação de musculares lisa e formação de tecido fibroso, há aumento e reestruturação da lesão (esclerose), que desenvolverá um núcleo lipídico e uma superfície fibrosa. Com o avanço da lesão há estenose arterial, diminuindo gradativamente o fluxo sanguíneo da artéria. A lesão pode alcançar um tamanho insustentável para o vaso, podendo haver uma ruptura do mesmo ou embolia trombótica (Figura 4). A aterotrombose é consequência da ruptura do ateroma, que expõe o tecido sanguíneo a diversas substâncias altamente trombogênicas (colágeno, fator Von Willebrand (fvW), íons cálcio, fator tecidual) levando a adesão, ativação e agregação plaquetária, posteriormente gerando uma evento isquêmico distal.

**Figura 4 -** Progresso do ateroma no processo patológico da Aterosclerose.



**Fonte:** adaptado de Libby, 2002.

Porém, não necessariamente apenas placas ateromatosas que diminuem significativamente o lúmen do vaso serão as únicas a se romperem. Diferentemente do que se pensava antes, pequenas placas também podem gerar processos trombóticos. Embora os mecanismos ainda não sejam completamente elucidados, sabe-se que altas concentrações de proteína C-reativa estão relacionados com maior riscos de trombose. Resistência à insulina, obesidade, hipertensão, dislipidemia, entre outros, também estão envolvidos no aumento do risco de trombose (GUTHIKONDA, 2006).

A formação do trombo, por sua vez, está intimamente ligada às plaquetas. Elas, no processo inflamatório da aterosclerose, são responsáveis pela produção de moléculas que atuam na adesão ao endotélio (P-selectina (CD62P); Molécula de

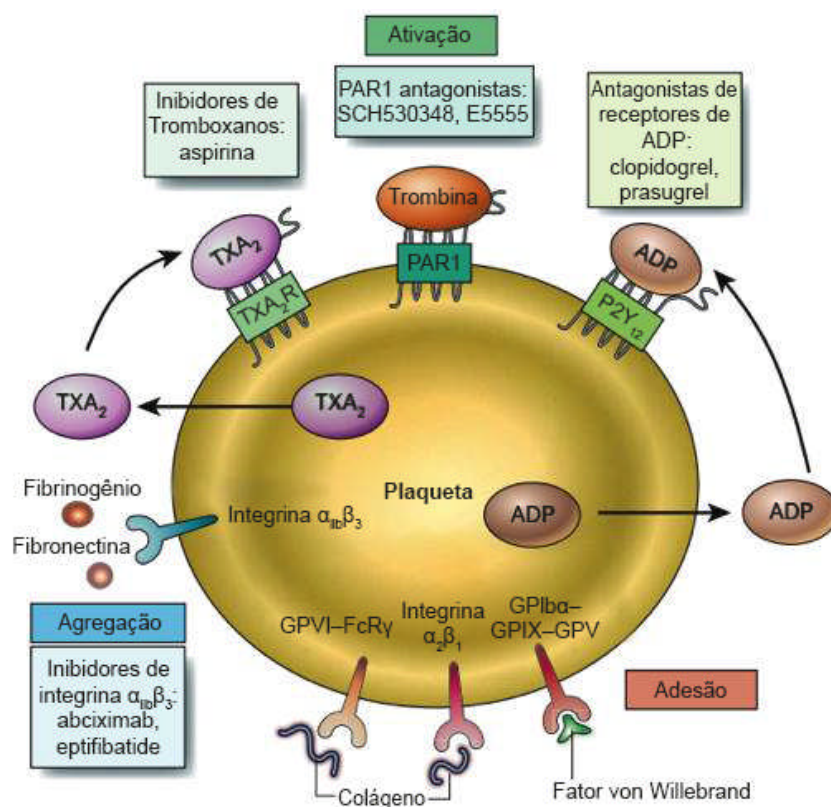
adesão Plaqueta-Célula Endotelial 1 (PECAM- 1/CD31); Glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa, Integrina  $\alpha$ IIbb3, CD41/CD61); fW; Trombospondina-1 (TSP-1) Vitronectina; Fibronectina), participam da cascata de coagulação (Fibrinogênio, Plasminogênio, Proteína S, Cininogênios, Fatores V, VII, XI, XIII), liberam substâncias mediadoras inflamatórias (Serotonina Histamina) e mitogênicas (Fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF); Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); Fator  $\beta$  de crescimento transformador (TGF-  $\beta$ ) (ZARBOCK, 2007).

As plaquetas após ativadas, desencadeiam a via extrínseca de coagulação pela indução de fatores pró-coagulantes como CD40 (CD154) e P-selectina(CD162) e também a via intrínseca, pela ligação de alta afinidade do Fator Va à fosfatidilserina presente na membrana plaquetárias. Na presença de íons cálcio, ocorre também a ligação do Fator Xa ao Fator Va e a consequente conversão de protrombina em trombina. Esta por sua vez, amplia a ativação plaquetária induzindo a expressão de fosfatidilserina na camada fosfolipídica das plaquetas, por uma via de retroalimentação positiva (BROCH et al., 2010).

### **1.3 Farmacoterapia**

Devido ao papel essencial desenvolvido pelas plaquetas na aterotrombose, os fármacos antiagregantes plaquetários possuem grande valor como fármacos preventivos para trombose e atuam em vias distintas para a prevenção da agregação plaquetária (Figura 5). A utilização de antiagregantes resulta em uma diminuição da mortalidade por doenças aterotrombóticas (HOLINSTAT; YEUNG, 2012). No contexto da aterosclerose, administração crônica de medicamentos desta classe demonstra a diminuição da atividade plaquetária reduzindo a inflamação, e ainda estabilizando as placas ateromatosas.

**Figura 5** - Principais receptores na membrana plaquetária e principais fármacos utilizados na terapia antiagregante plaquetária.



**Fonte:** MACKMAN, 2008

Na terapêutica, estão disponíveis as seguintes classes de antiagregantes plaquetários:

- Inibidores da síntese de tromboxanos (ácido acetilsalicílico);
- Antagonistas de receptores purinérgicos P2Y<sub>12</sub>;
- Antagonistas de integrina α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>;
- Inibidores de Fosfodiesterases;
- Antagonistas de trombina.

### 1.3.1 Inibidores da síntese de Tromboxanos

A farmacodinâmica desta classe, especificamente do ácido acetilsalicílico (AAS) que ainda é o padrão ouro para o tratamento antiplaquetário, envolve a inibição irreversível das enzimas ciclooxigenases (COX), também conhecidas como prostaglandina H2 sintase ou prostaglandina endoperoxidase sintase. O AAS atua bloqueando a formação do endoperóxido cíclico prostaglandina H2 e, por conseguinte, a formação dos demais produtos da via da ciclooxigenase, principalmente o Tromboxano A2 (TXA<sub>2</sub>). Este é formado nas plaquetas ativadas, produzindo efeito positivo na agregação plaquetária e vasoconstrição. Logo, a diminuição dos níveis de TXA<sub>2</sub> é uma abordagem terapêutica válida na prevenção de trombozes (TANTRY, 2009).

Os efeitos indesejados do AAS envolvem úlceras gastrointestinais e sangramento. Há estudos que apontam alto risco de eventos cardiovasculares recorrentes em pacientes com uso crônico do fármaco. Tal fato sugere que o efeito do AAS não é equivalente em todos os pacientes e que o uso crônico pode gerar resistência ao medicamento, isto é, ausência de resposta antiagregante plaquetária, que está associado com a elevação de riscos aterotrombóticos (MASON, 2005).

Outras causas para resistência são condições clínicas como insuficiência cardíaca, infecção crônica e inflamação, que levam a produção de plaquetas, assim, doses originais de ácido acetilsalicílico não conseguem inibir as novas enzimas COXs sintetizadas pelas novas plaquetas (FERRATINI, 2008; MANSOUR et al., 2009; PATEL et al., 2007).

Dentre os fatores genéticos causadores da resistência, se destacam a super expressão da isoforma COX-2 e o polimorfismo genético humano GPIIb: P1A1/A2. A

diminuição da ação do AAS pode também ser atribuída a mutações em alguns resíduos de aminoácidos das isoformas da COXs (MASON, 2005).

### **1.3.2 Antagonistas de receptores purinérgicos P2Y**

Os antagonistas de receptores purinérgicos P2Y<sub>12</sub> bloqueiam a interação entre adenosina difosfato (ADP) e seu receptor nas plaquetas. Ticlopidina e clopidogrel são os principais pró-fármacos nesta classe. A ticlopidina é um inibidor irreversível do receptor P2Y<sub>12</sub>, porém seu uso é restrito devido ao surgimento de trombocitopenia e neutropenia. O clopidogrel, por sua vez, possui aplicação clínica bem estabelecida com eficácia próxima ao do ácido acetilsalicílico na prevenção secundária ao infarto. Entretanto se tratando de pró-fármacos, a metabolização dos mesmos é necessária. Considerando a variabilidade genética e consequentemente a variação de expressão da isoforma responsável pela metabolização dos fármacos, há resposta terapêutica variável para cada indivíduo, podendo haver hipo ou hipersensibilidade (HEALEY, 2009; LIVERANI et al, 2011).

### **1.3.3 Antagonistas de integrina $\alpha$ IIb $\beta$ 3**

Os fármacos desta classe agem inibindo a via final da agregação plaquetária induzida por qualquer agonista. Alguns representantes dessa classe são o abciximab e eptifibatida. O abciximab é um anticorpo que interage com o receptor de integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, impedimento a ligação do fibrinogênio e FvW. Porém, apresenta algumas restrições quanto ao seu uso, como administração intravenosa e curta meia-vida, sendo necessário o monitoramento constante do paciente. Assim como o abciximab, outros medicamentos dessa classe também apresentam efeitos indesejados como



trombocitopenia, hemorragia e baixa disponibilidade oral, limitando seu uso por via parenteral. (KASTRATI et al, 2004; HOLINSTAT; YEUNG, 2012)

#### **1.3.4 Inibidores de Fosfodiesterases**

Outra via envolvida na ativação plaquetária, envolve a diminuição de concentrações de Adenosina Mono Fosfato cíclica (AMPc) e Guanina Mono Fosfato cíclica (GMPc), que por sua vez são hidrolisados por fosfodiesterases presentes na plaqueta. Um exemplo de fármaco desta classe é o cilostazol, atuando na inibição de tais enzimas, diminuindo a hidrólise desses nucleotídeos cíclicos, e assim diminuindo a ativação plaquetária. Apesar de demonstrar eficácia semelhante ao AAS e clopidogrel, efeitos colaterais como cefaleia, sintomas gastrointestinais e irritações cutâneas levaram a descontinuidade de seu desenvolvimento (ANGIOLILLO et al, 2008; HOLINSTAT; YEUNG, 2012).

#### **1.3.5 Inibidores de Trombina**

Os antagonistas de trombina, representado por fármacos univalentes como ximelagatran e melagatran, e fármacos bivalentes como hirudina e bivalirudina, atuam inibindo as ações da trombina, como a agregação plaquetária, ativação do fator XIII e conversão do fibrinogênio em fibrina. Os fármacos univalentes atuam bloqueando o sítio catalítico da trombina, enquanto os fármacos bivalentes atuam bloqueando o sítio catalítico e um exossítio da trombina. A inibição de trombina para uso terapêutico como antiagregante plaquetário está relacionado à ativação dos Receptores de Protease Ativados 1 e 4 (PAR-1 e PAR-4) (HO; BRIGHTON, 2006).

Outro exemplo de inibidor de trombina mais recente é o composto SCH530348, que atua como inibidor competitivo do sítio ativo do receptor PAR-1. Em ensaios pré-clínicos, foi demonstrado que não há alteração do tempo de protrombina, sugerindo que não há aumento do tempo de sangramento. Entretanto, ensaios clínicos com o composto demonstraram aumento de sangramento intracraniano (CHINTALA et al, 2010; MORROW et al, 2009).

### **1.3.6 Desenvolvimento de novos candidatos antiplaquetários**

A utilização de medicamentos que atuam em uma única via de inibição plaquetária pode resultar em um tratamento refratário, uma vez que outros ativadores plaquetários ainda estarão presentes para desencadear a adesão plaquetária. Logo, inibir uma única via não é eficientemente capaz de prevenir completamente a ocorrência de eventos trombóticos.

Assim, estratégias terapêuticas que atuam em mais de um receptor demonstram maior eficácia, diminuindo a chance de ausência de resposta terapêutica e apresentam maior probabilidade de gerar efeitos desejados. Uma abordagem importante na inibição da agregação de plaquetas é o aumento de AMPc e GMPc, nucleotídeos que interferem em todas as vias de agregação e são estimulados por prostaciclina e óxido nítrico (NO), respectivamente para adenilato ciclase e guanilato ciclase (SCHWARZ, 2001).

Em muitas doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, os níveis de óxido nítrico estão diminuídos, desenvolvendo um papel fundamental na disfunção endotelial, no processo aterogênico, na instabilidade da placa e na formação do

trombo. Assim, o aumento dos níveis de óxido nítrico é uma abordagem terapêutica importante a ser explorada (ZAFAR et al., 2007).

A terapia antiagregante plaquetária apresenta uma série de dificuldades, tais como: incapacidade de separar a redução de efeitos trombóticos de hemorragias; baixa disponibilidade na via oral de fármacos como os antagonistas de integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ; fraca inibição plaquetária; bloqueio de somente uma via e início de ação lento.

Assim sendo, as terapias atuais são insuficientes para o controle aterotrombose, tornando a descoberta de novos compostos e novos alvos terapêuticos abordagens importantes para o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos.

#### **1.4 Modificações moleculares**

Para a descoberta de novas moléculas com efeito terapêutico, a modificação molecular apresenta-se como a técnica mais promissora (WERMUTH, 2004). Entre os principais processos de modificação molecular temos:

- Hibridação;
- Latenciação;
- Bioisosterismo;

Alguns processos fisiopatológicos, como a progressão aterosclerótica, podem, por suas características, sugerir a necessidade de que, a mesma molécula possua propriedades farmacodinâmicas duplas ou triplas para assegurar melhor eficácia terapêutica (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Desta forma, a técnica de a hibridação molecular demonstra particular aplicabilidade. Ela é uma técnica racional de modificação molecular, onde os grupos farmacofóricos de 2 ou mais moléculas bioativas são devidamente conjugadas, dando origem a compostos que detém as mesmas atividades biológicas de seus precursores. Desta forma, um mesmo composto pode atuar em diferentes alvos terapêuticos. Esta classe de compostos apresenta semelhança à pró-fármacos, porém não necessitam de ativação *in vivo*. (CRAGG, 2012; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Os compostos híbridos podem ser classificados de acordo com a fusão de seus diferentes grupos farmacofóricos. Quando as subunidades nos compostos são separadas por um espaçador, os compostos são denominados híbridos conjugados. Quando não há presença de um espaçador, ou seja, as subunidades são diretamente ligadas uma a outra, são denominados híbridos pré-fundidos. Finalmente, quando as subunidades precursoras são apresentadas fusionadas, os compostos são denominados híbridos fundidos (MORPHY & RANKOVIC, 2005).

Assim o desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve considerar os fatores estruturais de modo a assegurar à molécula planejada o reconhecimento molecular por dois ou mais alvos terapêuticos de modo simultâneo, aumentando a eficiência terapêutica.

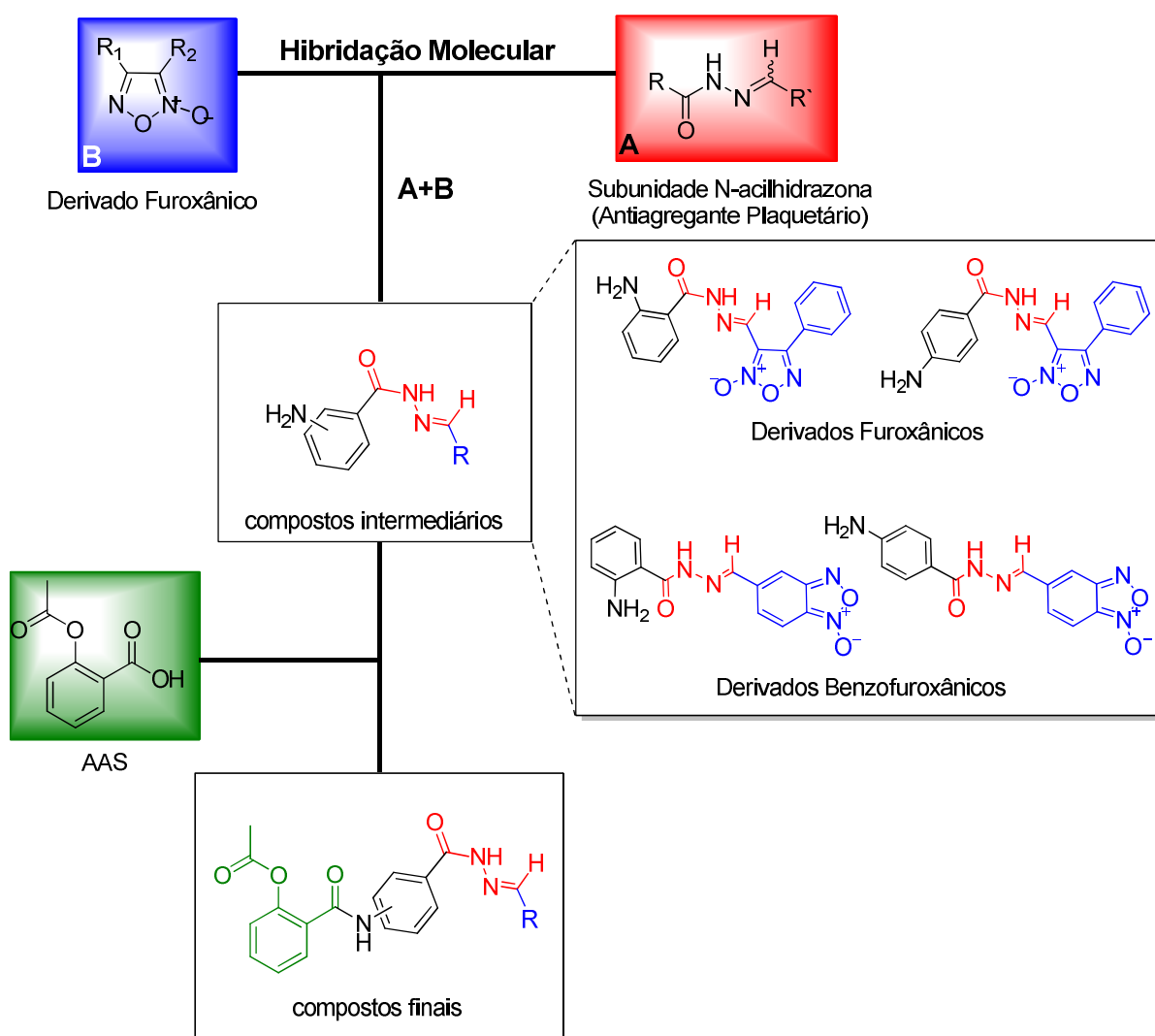
### **1.5 Planejamento estrutural**

Utilizando a estratégia de hibridação molecular, foi planejada uma nova série de composto híbridos, contendo as subunidades farmacofóricas:

a) subunidade *N*-acilhidrazônica: descrita como antiagregante plaquetária (LIMA et al., 2008; ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007);

b) núcleo furoxânico: com doação diferenciada de NO, modulada por efeito eletrônico (CERECETTO; PORCAL, 2005).

**Figura 6** - Planejamento estrutural dos novos compostos por hibridização, contendo a subunidade *N*-acilhidrazona e derivados furoxânicos e benzofuroxânicos.



A subunidade *N*-acilhidrazona está presente em vários compostos de diferentes atividades farmacológicas tais como anticonvulsivantes, antimicrobianos,

antitumorais, antitrombóticos, analgésicos, anti-inflamatórios e antiagregante plaquetários (LIMA et al., 2008; ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007).

Estudos demonstraram que esta subunidade confere aos compostos melhor atividade na inibição da agregação plaquetária em ensaios de indução de agregação plaquetária, tanto por ácido araquidônico quanto por fator de agregação plaquetária. (BARREIRO; FRAGA, 1999). Um dos mecanismos prováveis é baseado na propriedade quelante da subunidade *N*-acilhidrazona. Tal propriedade tem sido associada com a quelação de íons cálcio interplaquetário, interferindo na ativação e posterior propagação da agregação plaquetária. (NORIS et al., 1998).

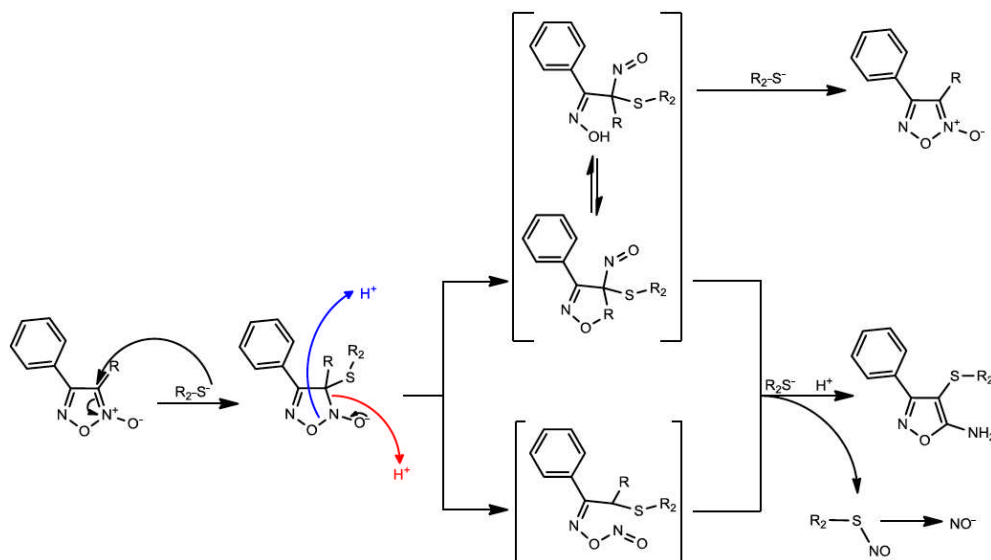
Lima et al. (2008) demonstraram que a subunidade *N*-acilhidrazona pode afetar a atividade do fármaco por alteração na conformação molecular necessária para a interação com o receptor alvo. Assim, foram selecionados os regioisômeros *orto* e *para* da subunidade para posterior exploração da atividade antiagregante.

Furoxano e derivados (*N*-óxido-1,2,5-oxidasol) representam uma classe de compostos com atividades biológicas como antimicrobianos, antichagásicos, antiagregantes plaquetários, vasodilatadores entre outros. Essas características farmacológicas estão relacionadas, em parte, com a capacidade de doação de óxido nítrico (NO) pela subunidade furoxânica (CERECETTO; PORCAL, 2005).

Devido a suas atividades vasodilatadoras, a capacidade de doação de óxido nítrico foi inicialmente estudada para uso em terapias cardiovasculares. (CENA et al., 2003). O óxido nítrico, em condições fisiológicas, está envolvido em processos vasculares como a diminuição de citocinas induzidas pelo fator tissular, hiperplasia da camada íntima após lesão do endotélio vascular, vasodilatação e inibição da agregação plaquetária (ZAFAR et al., 2007). As funções do óxido nítrico são descritas na literatura, assim como o mecanismo de doação de NO sugerido

(Figura 7). A capacidade dos derivados furoxânicos em doar óxido nítrico, foi observado que grupos eletroatratores ligados ao carbono alfa à subunidade N-óxido aumentam a doação por retirar a densidade eletrônica do carbono, facilitando um possível ataque nucleofílico a este carbono (SORBA et al., 1997).

**Figura 7** - Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxanos.



**Fonte:** adaptado de MEDANA et al., 1994 e retirado de CHELUCCI, 2013

Para uma abordagem diferenciada no tratamento e prevenção dos eventos tromboembólicos, temos a associação da doação de óxido nítrico pelos furoxanos e a subunidade *N*-acilhidrazona, atuando como antiagregante plaquetária. Tais compostos se apresentam como candidatos a fármacos, pois constituem uma alternativa à “resistência” ao ácido acetilsalicílico e ainda atuam em múltiplas vias de inibição da agregação de plaquetas.

## 1.4 Objetivos

Esse trabalho visa a síntese, caracterização e avaliação farmacológica de novos compostos candidatos à fármacos para prevenção de eventos aterotrombóticos atuando através de múltiplos mecanismos de ação na via de agregação plaquetária.

### 1.4.1 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização dos compostos intermediários furoxânicos 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído (furoxano fenilado) e 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol;
- Síntese e caracterização dos compostos finais *N*-acilhiradozônicos 6-((2-(2-aminobenzoil)hidrazona)metil)benzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HBZFX ORTO), 6-((2-(2-aminobenzoil)hidrazona)metil)benzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HBZFX PARA), (E)-4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazona)metil)-3-fenil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HFXAR ORTO), (E)-4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazona)metil)-3-fenil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HFXAR PARA);
- Avaliação Farmacológica *in vitro* da inibição plaquetária dos compostos finais *N*-acilhiradozônicos;
- Avaliação Farmacológica *in vivo* do tempo de sangramento dos compostos finais *N*-acilhiradozônicos;
- Avaliação Farmacológica *in vivo* da atividade antinociceptiva dos compostos finais *N*-acilhiradozônicos.



## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material

- 2-aminobenzohidrazida (Sigma-Aldrich);
- 4-aminobenzohidrazida (Sigma-Aldrich);
- 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (Sigma-Aldrich);
- acetato de etila (Chemis);
- ácido clorídrico 37% (Synth);
- ácido acético glacial (J.T. Baker);
- álcool trans-cinâmico (Fluka);
- álcool etílico (Chemis);
- azida de sódio (Merck);
- brometo de potássio (Sigma-Aldrich);
- colágeno(Sigma-Aldrich);
- cloreto de potássio (Chemis);
- cloreto de sódio (Chemis);
- clorocromato de piridina (PCC) (Sigma-Aldrich);
- clorofórmio (Chemis);
- diclorometano (Chemis);
- dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich);
- hidrato de hidrazina 80% (Merck);
- hexano (Chemis);
- metanol(Synth);
- sílica para coluna (Across);
- sulfato de sódio (Synth).



**Figura 9:** Obtenção do derivado 2, 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído (furoxano fenilado).



Adicionou-se em um balão de 125 mL, 900 mg (4,60 mmol) do composto 1, sendo solubilizado em 30 mL de diclorometano anidro. Em seguida foi adicionado 1,45 g (6,70 mmol) de clorocromato de piridina (PCC). A reação foi mantida em atmosfera de nitrogênio, temperatura ambiente e agitação constante durante 24 h.

Após o término da reação foram adicionados 20 mL de água destilada ao balão e então realizada uma filtração simples, filtrando-se o precipitado resultante da oxidação do PCC. Com o filtrado foram realizadas extrações com clorofórmio (5 x 40 mL) e a fase orgânica foi filtrada com sulfato de sódio para retirada de água residual. Após rotaevaporação à 50°C houve formação de um óleo de coloração amarronzada, com rendimento de 50%. CCD com fase móvel 50% acetato de etila; 50% hexano, confirmou a formação do composto, que apresentou Fator de Retenção (R.F.) de 0,89. (PM: 190,16 g/mol; C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

### 2.3.2 Síntese do derivado benzofuroxânico

**Figura 10** - Obtenção do derivado 3, 4-azida-3nitrobenzaldeído.

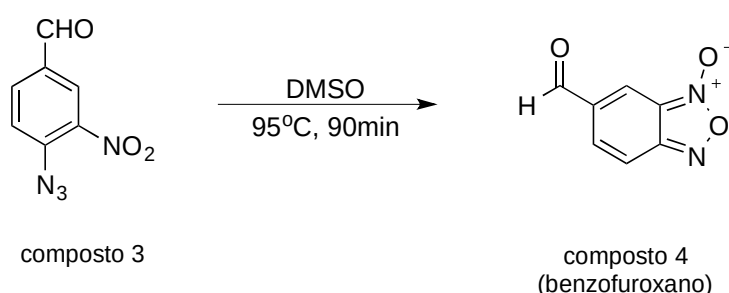


#### Procedimento

Uma solução de 3,44 g (0,0185 mmol) e 15 mL de DMSO foi adicionada em um balão de 125 mL. Em seguida, em banho de gelo, 1,21 g (0,0185 mmol) de azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) foi adicionada lentamente não ultrapassando 80°C. Ao fim da adição de NaN<sub>3</sub>, o balão é retirado do banho de gelo e colocado em banho de óleo a 75°C. A reação foi mantida em refluxo, abrigo da luz e agitação constante durante 1 h. Após o término da reação o meio reacional foi vertido em um béquer contendo 250 mL de

gelo. Em seguida, foram realizadas extrações com éter etílico (6 x 70 mL) e a fase orgânica após filtração com sulfato de sódio foi evaporada, onde o produto da reação apresentou-se como um sólido amarelo acastanhado.

**Figura 11** - Obtenção do derivado 4, 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano).

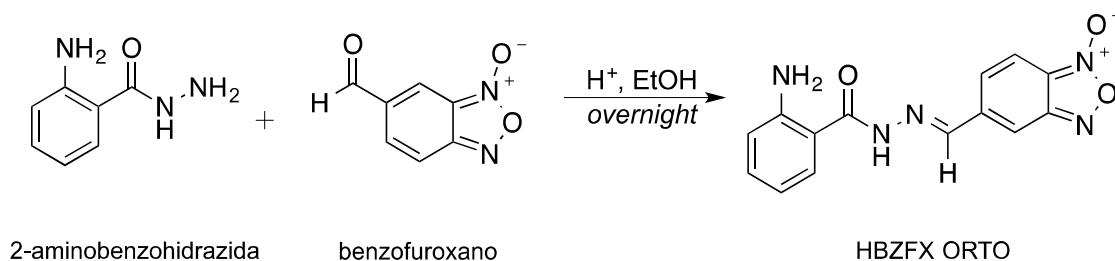


### Procedimento

Em um balão de 125 mL, foi adicionado o composto 3 e 20 mL de tolueno. O balão então foi colocado em banho de óleo mantido a 95°C. A reação foi novamente mantida sob agitação constante, abrigada da luz e em refluxo por 90 min. Com o término da reação, o tolueno foi evaporado e adicionou-se 20 mL de acetato de etila e o meio reacional foi filtrado com carvão ativado. Após filtração do carvão ativado, foi adicionado éter de petróleo para a precipitação do produto. O béquer contendo o meio reacional com éter de petróleo foi mantida *overnight* na geladeira para otimizar a precipitação do produto. Após filtração simples houve obtenção de um sólido cristalino amarelo alaranjado com rendimento de 50%. A CCD com fase móvel de 50% acetato de etila; 50% hexano confirmou a formação do produto, que apresentou R.F de 0,85. (PM: 164,12 g/mol; C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

### 2.3.3 Síntese do composto final HBZFX ORTO

**Figura 12:** Síntese do composto final HBZFX ORTO.



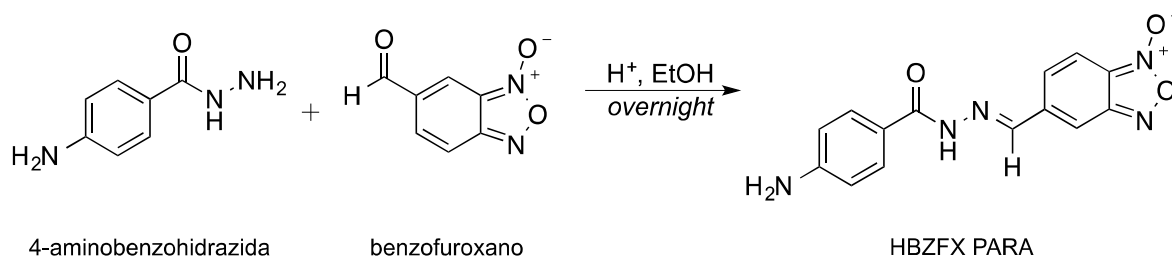
#### Procedimento

Em um balão de 50 mL foram adicionados 500 mg (2,58 mmol) de benzofuroxano e solubilizados em 8,00 mL de etanol absoluto. Em seguida, o pH do meio reacional foi ajustado com 3 gotas de ácido acético glacial, resultando em um pH levemente ácido. Posteriormente, foram adicionados 385 mg (1,29 mmol) de 2-aminobenzohidrazida ao meio reacional e o mesmo foi mantido *overnight* sob abrigo da luz, temperatura ambiente e agitação constante.

O monitoramento por CCD utilizando como fase móvel 50% acetato de Etila; 50% hexano demonstrou a formação do produto, que possui R.F. de 0,57. Posteriormente, o meio reacional foi filtrado a pressão reduzida e lavado com 50 mL de etanol absoluto gelado, obtendo-se um sólido amorfo com coloração amarelo claro e rendimento de 96%. A faixa de fusão do composto HBZFX ORTO foi estabelecida entre 202,4°C e 203°C. (PM:297,97 g/mol; C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)

### 2.3.4 Síntese do composto final HBZFX PARA

**Figura 13** - Síntese do composto final HBZFX PARA.



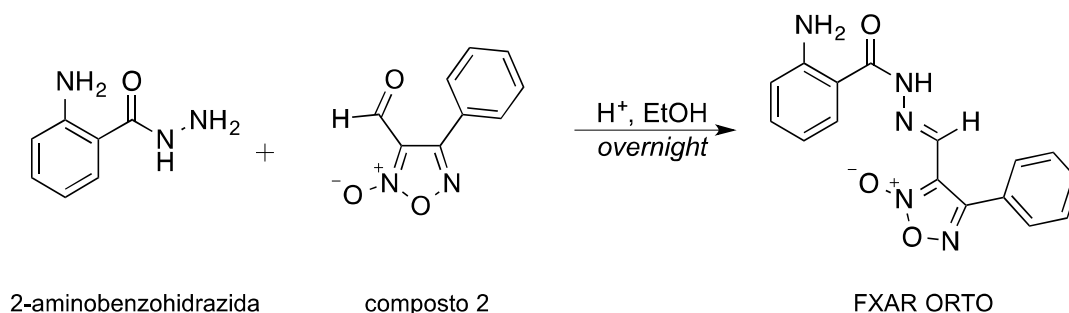
#### Procedimento

Em um balão de 125 mL foram solubilizados 575 mg (3,50 mmol) de benzofuroxano (composto 4) em 20 mL de etanol absoluto. Em seguida o meio reacional foi acidificado com adição de 3 gotas de ácido glacial. Após completa solubilização do benzofuroxano foi adicionado 530 mg (3,50 mmol) de 4-aminobenzohidrazida, e a reação foi mantida sob abrigo da luz e agitação *overnight* a temperatura ambiente.

O monitoramento da reação foi realizado por CCD com fase móvel 50% acetato de etila; 50% Hexano. Houve formação de precipitado que foi posteriormente filtrado a pressão reduzida e lavado com 50 mL de etanol absoluto gelado, obtendo-se um sólido amorfo com coloração alaranjada com rendimento de 99%. O ponto de fusão apresentado pelo composto (HBZFX PARA) foi de 225°C e RF de 0,14. (PM:297,97 g/mol; C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)

### 2.3.5 Síntese do composto final HFXAR ORTO

**Figura 14** - Síntese do composto final HFXAR ORTO.



#### Procedimento

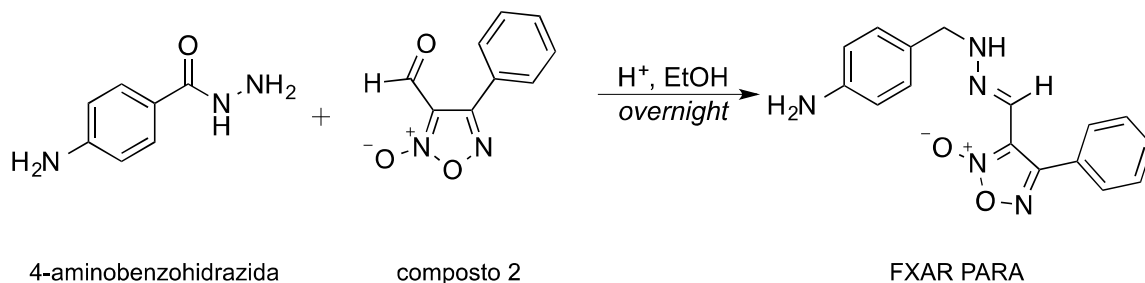
Foram adicionados em um balão de 50 mL, 502 mg (2,64 mmol) do composto 2, sendo solubilizado em 20 mL de etanol absoluto. Também foram adicionadas 3 gotas de ácido acético glacial para acidificar o meio reacional. Em seguida foram adicionados 333 mg (2,20 mmol) de 2-aminobenzohidrazida. A reação foi mantida *overnight* sob agitação constante, temperatura ambiente e abrigo da luz.

Após o término da reação, verificada através de CCD com fase móvel 50% acetato de etila; 50% hexano, onde o produto apresentou R.F de 0,11, o meio reacional foi lavado com 50 mL de etanol absoluto gelado, obtendo-se rendimento de 38%. O produto obtido apresentou-se como um sólido amorfo com coloração branco perolado. A faixa de fusão apresentada pelo composto variou de 190°C a 192°C. (PM: 323,31 g/mol; C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)



### 2.3.6 Síntese do composto final HFXAR PARA

**Figura 15** - Síntese do composto final HFXAR PARA.



#### Procedimento

Em um balão de 50 mL, foram adicionados 590 mg (3,11mmol) do composto 2 que foram solubilizados em 20 mL de etanol absoluto. Foram também adicionadas na reação 3 gotas de ácido acético glacial, acidificando o meio reacional. A reação então foi mantida *overnight* sob abrigo da luz, temperatura ambiente e agitação constante.

Com o término da reação, houve formação de precipitado no meio reacional, que por sua vez foi filtrado à pressão reduzida e o precipitado retido, lavado com 50 mL de etanol absoluto gelado. C.C.D com fase móvel 50% acetato de etila; 50% hexano demonstrou que o produto possui R.F. de 0,31. Com rendimento de 40%, o produto apresentou-se como um sólido amorfo com coloração amarelo ouro. A faixa de fusão do composto variou de 209°C a 213°C. (PM: 323,31 g/mol;  $C_{16}H_{13}N_5O_3$ )

## 2.4 Ensaios Farmacológicos

Os ensaios necessários para a determinação das atividades farmacológicas dos compostos necessitam ensaios *in vivo*, e para esses foram utilizados animais da espécie *Mus musculus* (camundongos), espécie também denominada Swiss albino. Os animais utilizados nos experimentos eram provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-UNESP localizado em Botucatu, SP. Após o recebimento dos animais na facilidades da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCF, os mesmos foram acondicionados no biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos e mantidos em condições controlas de temperatura, umidade e luz, assim como disponibilidade de água e ração. Os ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da mesma faculdade (Anexos I e II).

### 2.4.1 Tempo de sangramento

O tempo de sangramento foi realizado pelo método demonstrado por Dejana et al. 1979, adaptado. Os animais, separados em 6 grupos (salina, AAS, HBZFX PARA, HBZFX ORTO, HFXAR ORTO e HFXAR PARA), cada um com 6 camundongos *Swiss* (20-25 g), receberam as substâncias por via oral (gavage), na concentração de 100  $\mu\text{mol/Kg}$ . Para o controle positivo foram administrado AAS em mesma concentração e controle negativo, salina. As substâncias foram administradas em uma suspensão de CMC 0,5%. Decorrido o tempo de 1 h hora os animais foram anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de xilazina(10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina(100 mg/Kg), misturadas na mesma seringa. Posteriormente foram colocados num contensor para camundongos, de maneira que a cauda ficasse livre.

Uma incisão de 2 mm contados a partir do final da cauda foi feita com o auxílio de um bisturi. Um papel de filtro foi encostado na ponta da cauda do animal a cada 10-15 segundos, com o cuidado de não pressioná-la, até parada completa do sangramento. O tempo foi cronometrado a partir da incisão.

#### **2.4.2 Atividade Analgésica**

A atividade analgésica dos compostos intermediários foi determinada *in vivo* pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, demonstrado por Lima et al 2010, adaptado. Os animais foram divididos em 5 grupos (dipirona, HBZFX PARA, HBZFX ORTO, HFXAR ORTO e HFXAR PARA), cada um contendo 6 camundongos *Swiss* (18-23 g). As substâncias foram administradas via oral (gavage) na concentração de 100  $\mu\text{mol/Kg}$  e em suspensão de goma arábica 5,0%. Para o grupo negativo foi administrado salina e para o grupo positivo, dipirona sódica. Após 1 h realizou-se administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,6%. Dez minutos após a administração *i.p.* do ácido acético contou-se durante 20 min o número de contorções abdominais. A atividade analgésica é expressa como número de contorções contabilizadas neste período.

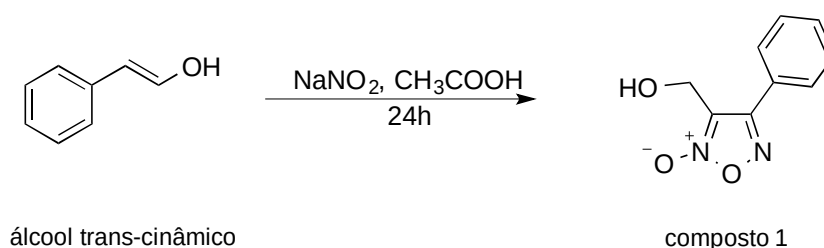
### 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Síntese e caracterização

### 3.1.1 Síntese do composto furoxânico 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído

O derivado furoxânico 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído foi obtido em duas etapas sintéticas. Primeiramente, o álcool trans-cinâmico reagiu com nitrito de sódio em meio de ácido acético durante 24h, obtendo 4-(hidroximetil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (composto1) (Figura 16) com rendimento de 90%.(BOIANI; CERECETTO; GONZÁLEZ, 2001).

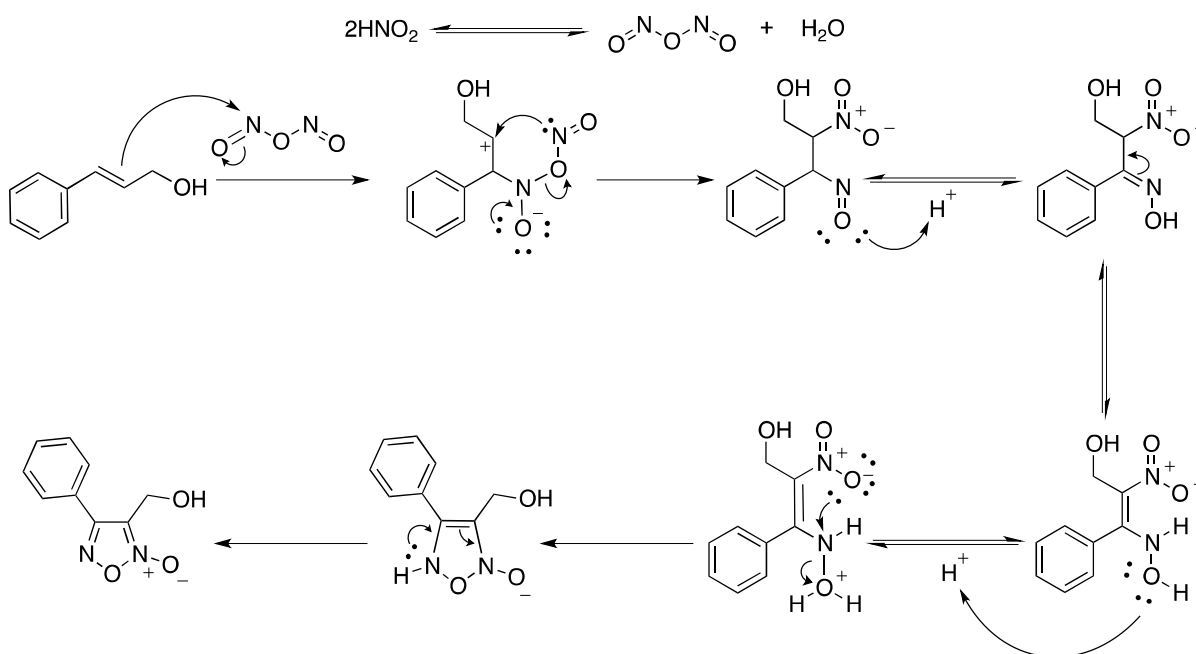
**Figura 16** - Obtenção do derivado 1, 4-(hidroximetil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido.



O mecanismo da reação envolve o mecanismo de nitrosação/nitração de alcenos, neste caso o álcool trans-cinâmico. Primeiramente, o anidrido nitroso é formado a partir do nitrio de sódio em ácido acético. Em seguida, os elétrons pertencentes a ligação  $\pi$  do álcool trans-cinâmico realizam um ataque nucleofílico em um dos nitrogênios pertencentes ao anidrido nitroso, deslocando o par de elétrons da ligação  $\pi$  N=O do anidrido nitroso para o oxigênio adjacente. A dupla ligação N=O é reestabelecida, fazendo com que a ligação N-O com o átomo central de oxigênio se

rompa. Simultaneamente, o par de elétrons disponíveis do outro nitrogênio do anidrido nitroso realiza um ataque nucleofílico no carbocátion formado no álcool trans-cinâmico, realizando um rearranjo e formação de nitro-oxima. Dando continuidade ao mecanismo, a ligação  $\pi$  C=C é reestabelecida e o oxigênio com par de elétrons não-ligantes realiza um ataque nucleofílico intramolecular no átomo de nitrogênio, havendo liberação de água. Posteriormente, há outro rearranjo molecular culminando na formação do composto 1 (Figura 17).

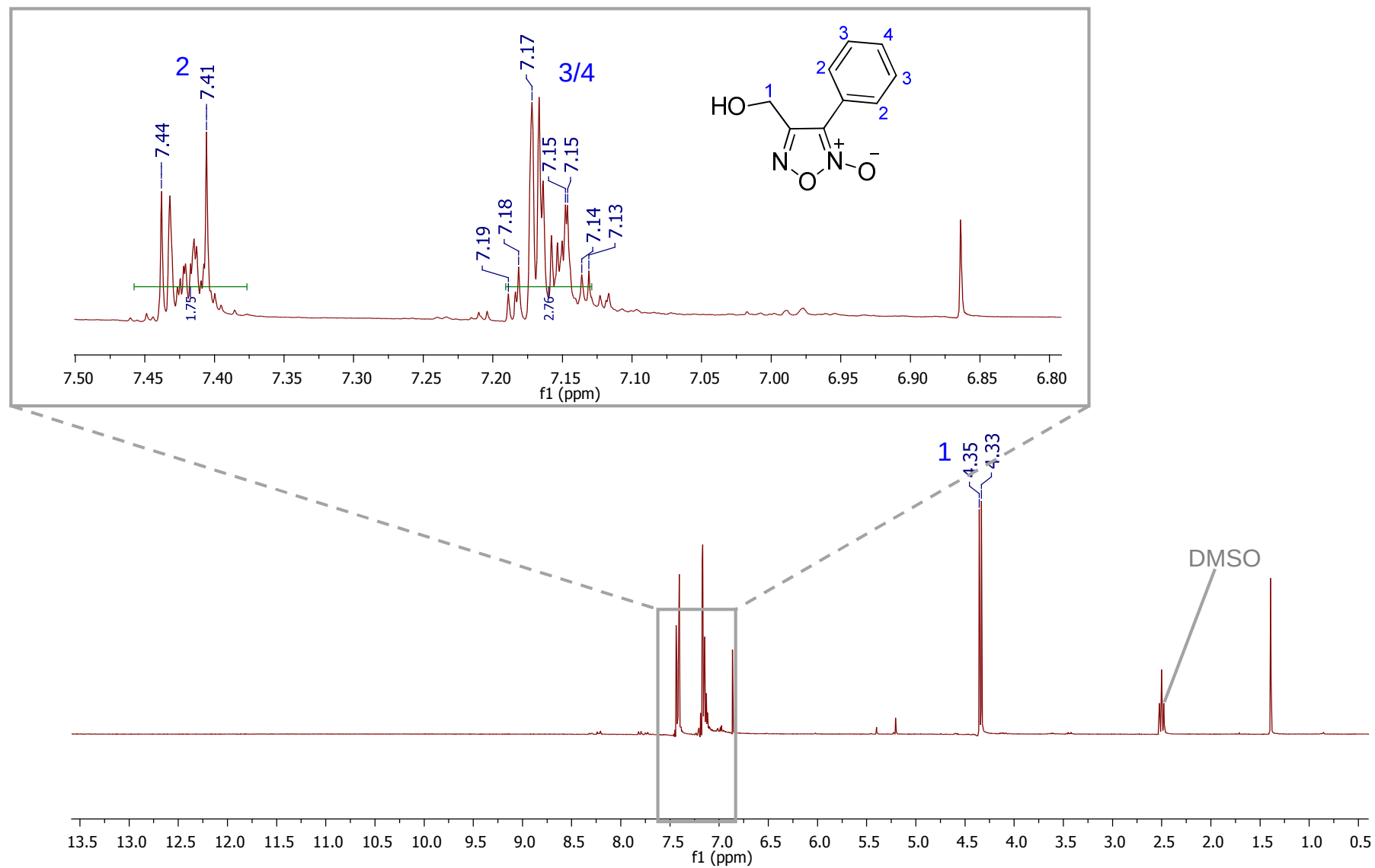
**Figura 17** - Mecanismo de formação do composto 1.



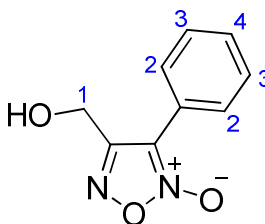
**Fonte:** Fruttero, 1989

Como se trata de um composto previamente descrito na literatura e sintetizado frequentemente em nosso laboratório, sua estrutura foi confirmada através de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN), sendo demonstrada no Espectro 1.

**Espectro 1** - Espectro de de  $^1\text{H}$  RMN do composto intermediário 1 (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).



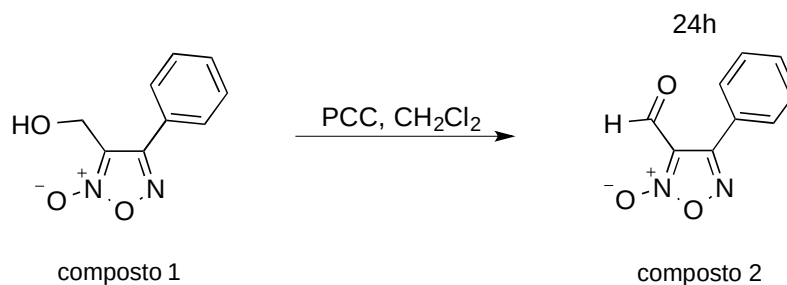
**Tabela 1** – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto intermediário 1 em experimento de  $^1\text{H}$  RMN (300MHz; DMSOd6).



| Posição | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) | Constante de Acoplamento<br>$J_0$ Hz/ $J_m$ Hz |
|---------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| 1       | 4,33/4,35 (d)               | 6,8Hz                                          |
| 2       | 7,41-7,44 (m)               | -                                              |
| 3       | 7,13-7,19 (m)               | -                                              |
| 4       | 7,13-7,19 (m)               | -                                              |

Posteriormente, a função álcool foi oxidada à aldeído utilizando-se como agente oxidante clorocromato de piridina(PCC) durante 24h. A formação do composto 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído (composto 2) apresentou rendimento aproximado de 60% (Figura 18) (BOIANI; CERECETTO; GONZÁLEZ, 2001).

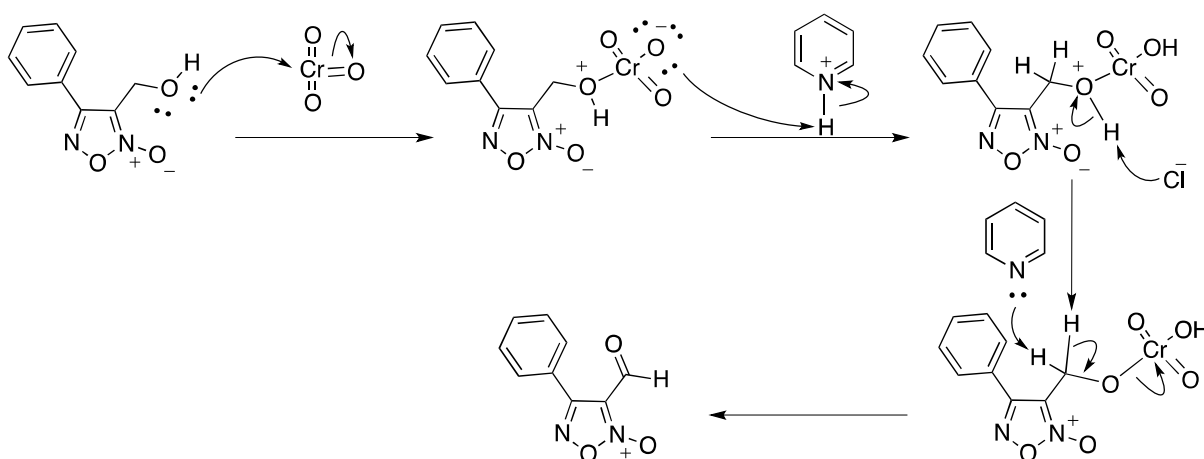
**Figura 18** - Obtenção do derivado 2, 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído (composto 2)(Furoxano fenilado).



Seu mecanismo, demonstrado na Figura 19 inicia-se com a oxidação do composto 1 é iniciada pelo ataque nucleofílico dos pares de elétrons não-ligantes presentes no oxigênio da função álcool do composto 1 ao átomo de cromo, que devido a 3 ligações  $\pi$  com átomos de oxigênio possui  $\delta^+$  facilitando o ataque. Em consequência há formação de uma ligação  $\sigma$  O-Cr com o átomo de oxigênio proveniente do composto 1, uma das ligações  $\pi$  O=Cr é quebrada, deixando esse átomo de oxigênio com carga negativa e um par de elétrons não-ligante adicional.

Em seguida, esse átomo de oxigênio proveniente do íon cromato e o íon cloreto presente no meio reacional, abstraem prótons do íon piridínico e do oxigênio, respectivamente, neutralizando a carga da molécula. Na etapa final, o par de elétrons disponível do nitrogênio piridínico retira outro próton estabelecendo uma ligação  $\pi$  C=O e liberando o íon cromato, formando o grupo funcional aldeído.

**Figura 19** – Mecanismo de oxidação por Clorocromato de Piridina (PCC).



**Fonte:** Solomons, 2009



### 3.1.2 Síntese do composto furoxânico 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol

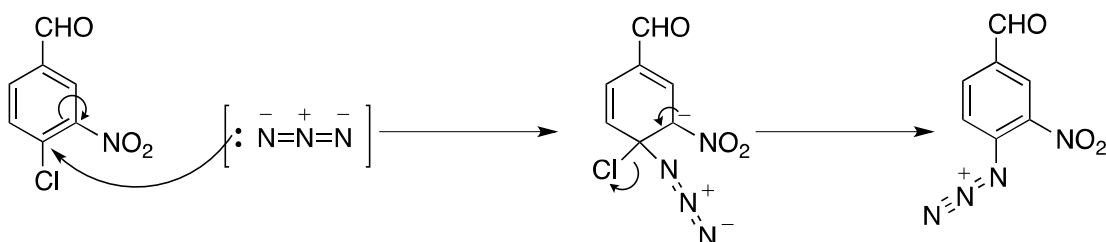
A síntese do composto 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano) foi realizada em 2 etapas sintéticas. Na etapa inicial, o sal azida de sódio é lentamente adicionado ao meu reacional que contem 4-cloro-3-nitro-benzaldeídeo e DMSO, devido ao caráter exotérmico da reação, assim prevenindo a degradação do produto.

**Figura 20** - Obtenção do derivado 3, 4-azida-3nitrobenzaldeído (composto 3).



A reação é iniciada por uma reação de substituição nucleofílica aromática (S<sub>N</sub>Ar), promovido pelo par de elétrons não-ligante do átomo de nitrogênio presente no sal azídico, sendo formado um intermediário carbânico. Com o reestabelecimento da ligação  $\pi$  C=C, há a saída do grupo abandonador cloreto, assim formando o composto intermediário 3 (Figura 21).

**Figura 21** – Mecanismo de formação do composto intermediário 3.



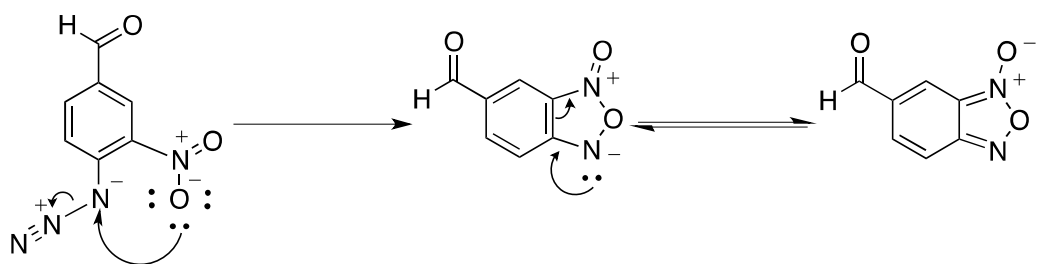
A etapa final foi realizada pelo aquecimento do intermediário 4-azida-3-nitrobenzaldeído (composto 3) em refluxo com tolueno a 95°C durante 90 minutos, obtendo rendimento de 50% (Figura 22).

**Figura 22** - Obtenção do derivado 4, 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano/ composto 4).



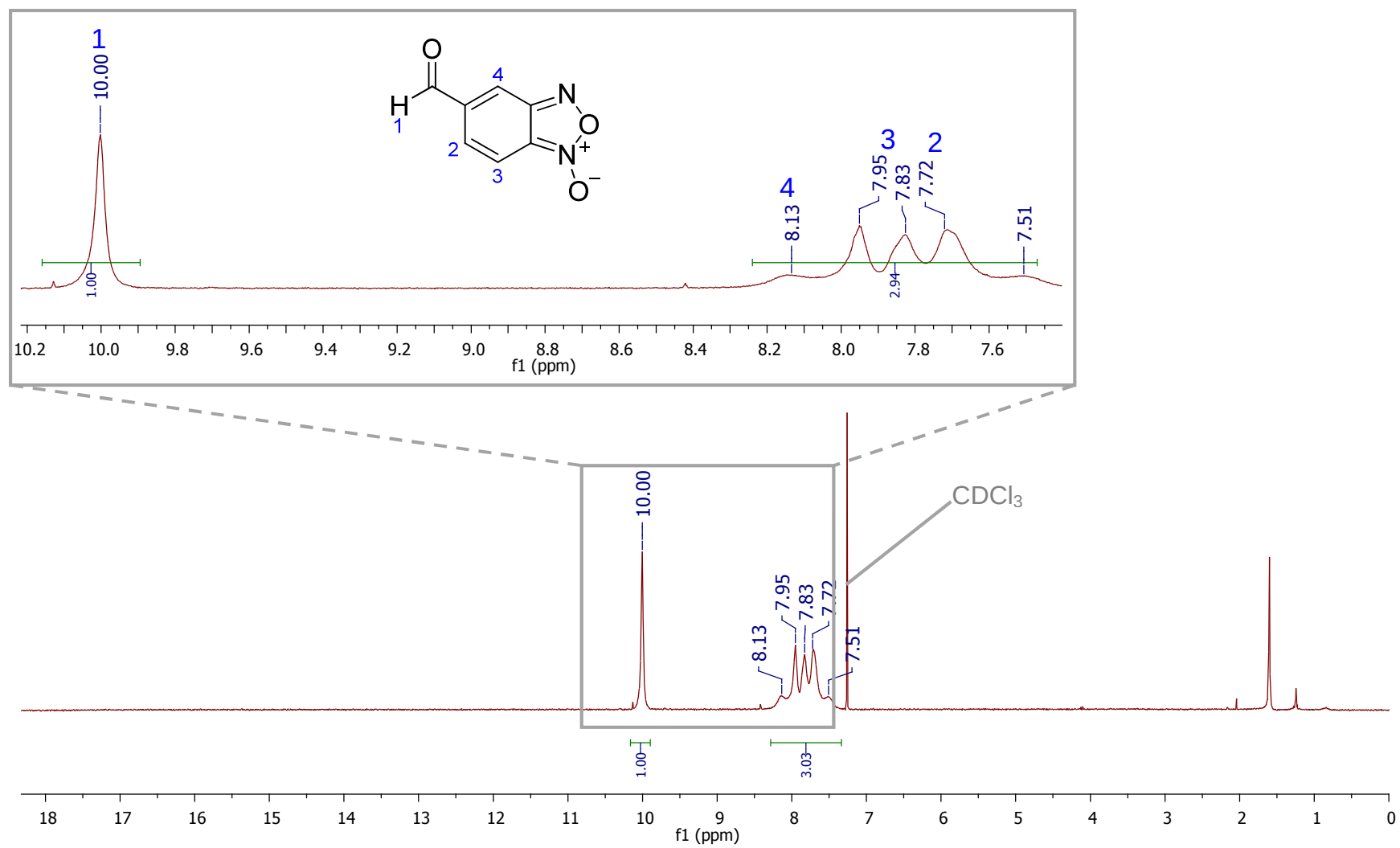
O aquecimento promove ciclocondensação intramolecular com liberação de nitrogênio gasoso, obtendo assim, o composto 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano/ composto 4) (Figura 23).

**Figura 23 – Mecanismo de formação do benzofuroxano/composto 4.**

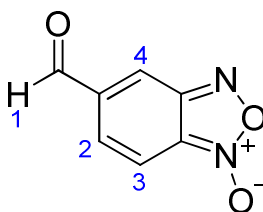


Após obtenção e purificação do composto, o mesmo foi caracterizado por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  RMN), onde os respectivos hidrogênios aromáticos e o hidrogênio pertencente à função aldeído estão presentes, demonstrado no Espectro 2.

**Espectro 2** - Espectro de de  $^1\text{H}$  RMN do composto intermediário benzofuroxano (300MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )



**Tabela 2** – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo benzofuroxa em experimento de  $^1\text{H}$  RMN (300MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

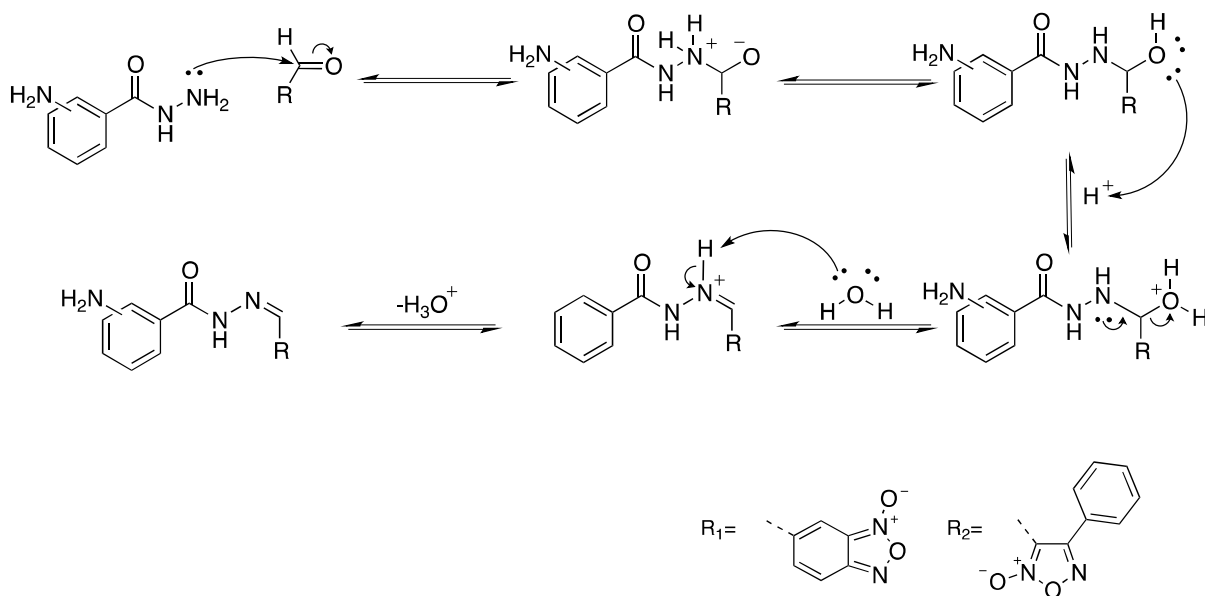


| Posição | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) | Constante de Acoplamento<br>$J_0$ Hz/ $J_m$ Hz |
|---------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| 1       | 10,00(s)                    | -                                              |
| 2       | 7,83/7.95 (dd)              | 8,64Hz/1,32Hz                                  |
| 3       | 8,13(s)                     | -                                              |
| 4       | 7,75 (s)                    |                                                |

### 3.1.3 Síntese dos compostos finais *N*-acilhidrazônicos com derivados furoxânicos 6-formilbenzo[c]-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol

Os compostos finais foram obtidos a partir da reação dos derivados furoxânicos, previamente descritos e isômeros *orto* e *para* de aminobenzohidrazidas, assim formando compostos *N*-acilhidrazônicos.

O resultado do acoplamento dos compostos é a formação de uma ligação imídica, caracterizando assim a subunidade *N*-acilhidrazona. O mecanismo geral da reação é descrito na Figura 24.

**Figura24** – Mecanismo de reação para formação dos compostos *N*-acilhidrazônicos

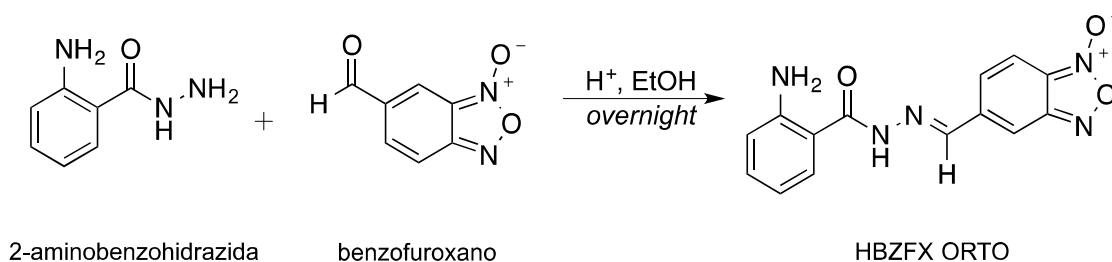
**Fonte:** McMurry, 2008

O par de elétrons não-ligante presente na amina primária da aminobenzohiradiza realiza um ataque nucleofílico na carbonila presente na função aldeído, sendo que este possui um  $\delta^+$  devido a ligação  $\text{C}=\text{O}$ , facilitando o ataque. Em seguida, há rearranjo de prótons entre os átomos de nitrogênio e oxigênio, Na próxima etapa da reação, há formação de uma ligação  $\pi$   $\text{C}=\text{O}$  e formação de água, devido ao sequestro de um próton do meio ácido da reação por um dos pares de elétrons não-ligante presente na hidroxila formada na etapa anterior. Na última etapa da reação, o próton ligado ao átomo de nitrogênio é abstraído pelo meio reacional, formado assim uma ligação imínica e restaurando o catalisador da reação.

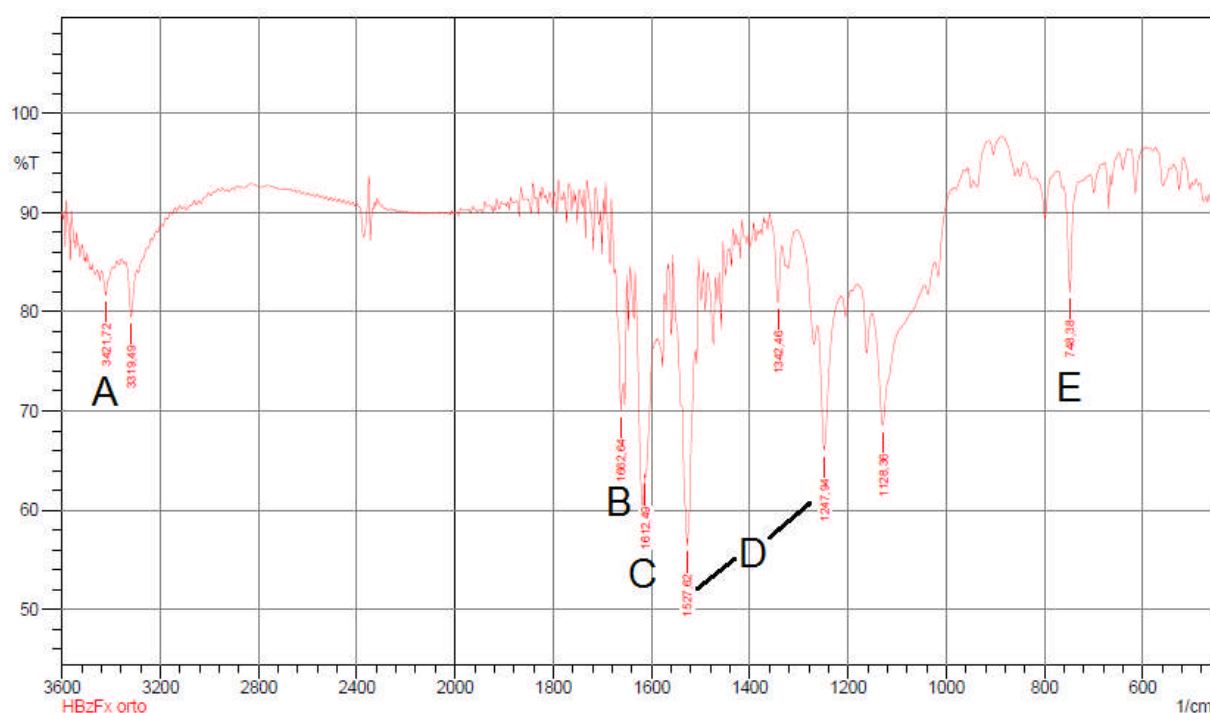
### 3.1.3.1 Síntese do composto final HBZFX ORTO

A ligação iminíca entre a hidrazida 2-aminobenzohidrazida e o composto benzofuroxano forma a subunidade *N*-acilhidrazona e resulta no composto final 6-((2-(2-aminobenzoi)hidrazona)metil)benzo[c]-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (HBZFX ORTO), obtido com rendimento de 96% (Figura 25).

**Figura 25** - Síntese do composto final HBZFX ORTO.



O composto foi caracterizado por espectrofotometria na região do infravermelho e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.



**Espectro 3** - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HBZFX ORTO.

**Tabela 3** - Bandas de absorção no IV do composto HBZFX ORTO.

| Marcador | V(cm <sup>-1</sup> ) | Grupo Característico                 | Tipo de deformação |
|----------|----------------------|--------------------------------------|--------------------|
| A        | 3421,72/3319,42      | amina primária aromática (N-H)       | axial              |
| B        | 1662,64              | carbonila (C=O)                      | axial              |
| C        | 1612,49              | Imina (C=N)                          | axial              |
| D        | 1527,62/1247,94      | N-O                                  | axial              |
| E        | 748,38               | aromático 1,2 dissustituído<br>(C-H) | angular            |

O espectro na região do infravermelho indica a presença dos principais grupos funcionais do composto final HBZFX ORTO (Espectro 3). O estiramento da ligação N-H aromático e C=O amídica estão presentes em 3421,72/3319,42 cm<sup>-1</sup> e 166,63 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. O grupo aromático dissustituído é visualizado em 748,38 cm<sup>-1</sup>. Já o estiramento N-O presentes em 1527,62 cm<sup>-1</sup> e 1247,94 cm<sup>-1</sup> são característicos do derivado furoxânico. O sinal que caracteriza a o estiramento imínico (C=N), é observado em 1612,49 cm<sup>-1</sup>, sugerindo o acoplamento dos reagentes na formação do grupo *N*-acilhidrazônico (Tabela 3).

Para a determinação dos da estrutura foram utilizados sondas de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C além da análise bidimensional *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy* (HSQC).

Segundo o espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto final HBZFX ORTO (Espectro 4), os hidrogênios dos principais grupos funcionais e anéis aromáticos estão presentes na estrutura. Os hidrogênios referentes à amina primária (posição 1') apresentam-se como um simpleto com deslocamento de 6,45 ppm. O hidrogênio pertencente ao grupo funcional amida (posição 8) está representado como um simpleto com

deslocamento de 11,95 ppm. Já o hidrogênio imínico (posição 9) está representado como um simpleto com deslocamento de 8,42 ppm (Tabela 4).

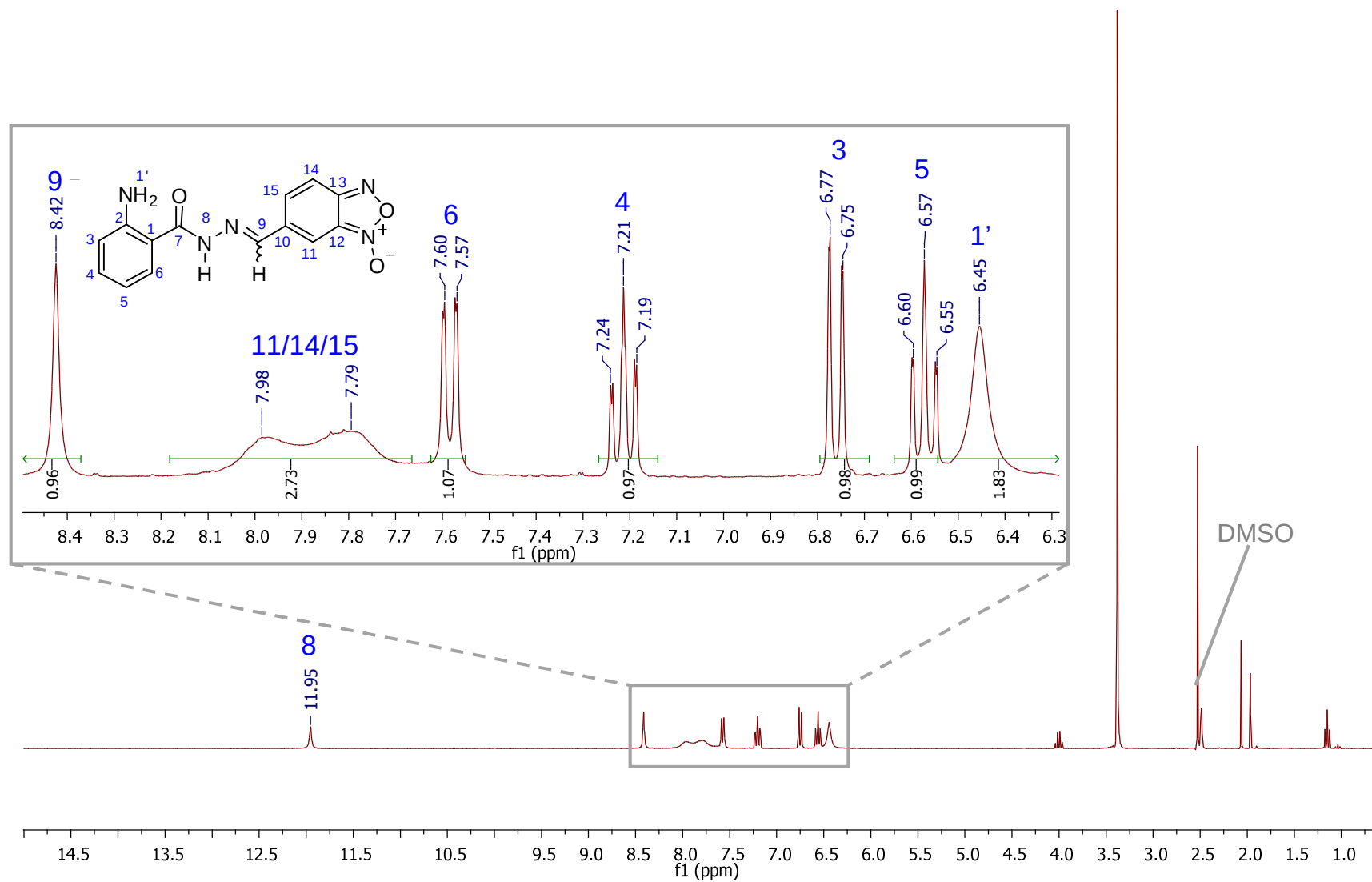
O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para o mesmo compostos (Espectro 5) demonstra que os principais carbonos do composto final também estão presentes. Os pico com deslocamento de 165,73 ppm demonstra o carbono presente no grupo funcional amida (posição 7), e o carbono imínico (posição 9) tem seu deslocamento em 143,88 ppm.

O espectro bidimensional HSQC (espectro 6) também confirma a presença de ligações hidrogênios e carbonos aromáticos (posições 3; 4; 5; 6; 11; 14 e 15) (Tabela 4). O carbono na posição 13 foi apenas detectado na análise de  $^{13}\text{C}$ .

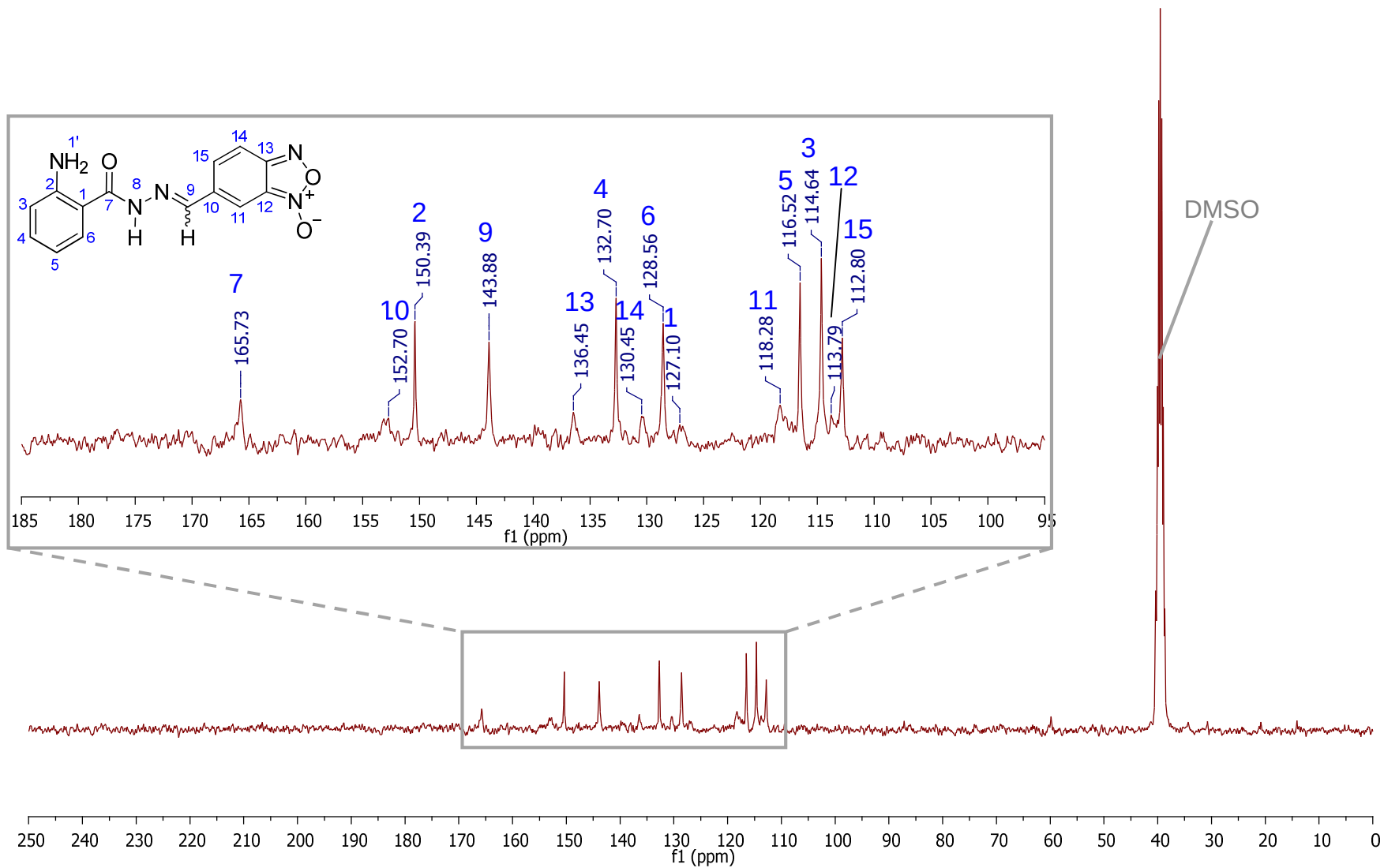
Assim, com base nos dados analíticos como a espectrometria de RMN e espectrofotometria de IV, pode-se sugerir que o composto final HBZFX ORTO foi obtido.



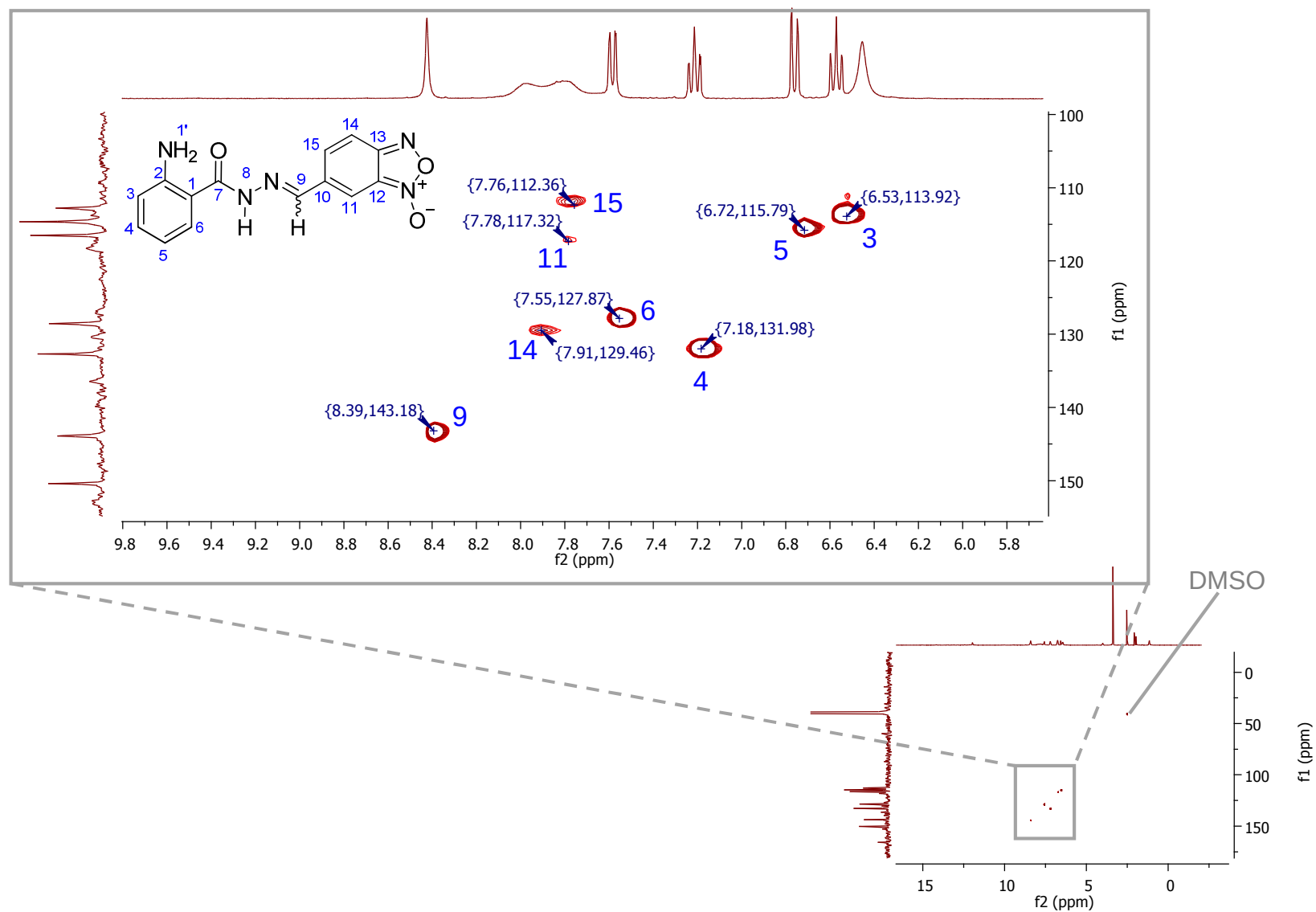
**Espectro 4** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HBZFX ORTO (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )



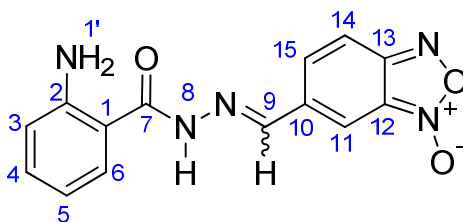
**Espectro 5** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto final HBZFX ORTO (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )



**Espectro 6** - Espectro bidimensional HSQC RMN do composto final HBZFX ORTO (300MHz; DMSO<sub>d6</sub>)



**Tabela 4** – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HBZFX ORTO em experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz; DMSOd6).

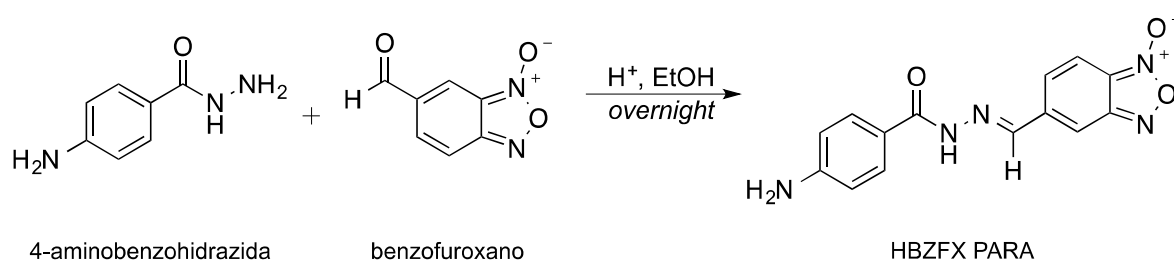


| Posição | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) | Constante de Acoplamento<br>$J_0$ Hz/ $J_m$ Hz | $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) |
|---------|-----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1       | -                           | -                                              | 127,10                         |
| 2       | -                           | -                                              | 150,39                         |
| 3       | 6,75/6 (d)                  | 3,0 Hz/9,0 Hz                                  | 114,64                         |
| 4       | 7,19/7,21/7,24 (t)          | 3,0 Hz/9,0 Hz                                  | 132,70                         |
| 5       | 6,55/6,57/6,60 (t)          | 3,0 Hz/9,0 Hz                                  | 116,52                         |
| 6       | 7,57/7,60 (d)               | 3,0 Hz/9,0 Hz                                  | 128,56                         |
| 7       | -                           | -                                              | 165,73                         |
| 8       | 11,95 (s)                   | -                                              | -                              |
| 9       | 8,42 (s)                    | -                                              | 143,88                         |
| 10      | -                           | -                                              | 152,70                         |
| 11      | 7,79/7,98 (m)               | -                                              | 118,28                         |
| 12      | -                           | -                                              | 113,79                         |
| 13      | -                           | -                                              | 136,45                         |
| 14      | 7,79-7,98 (m)               | -                                              | 130,45                         |
| 15      | 7,79-7,98 (m)               | -                                              | 112,80                         |
| 1'      | 6,45 (s)                    | -                                              | -                              |

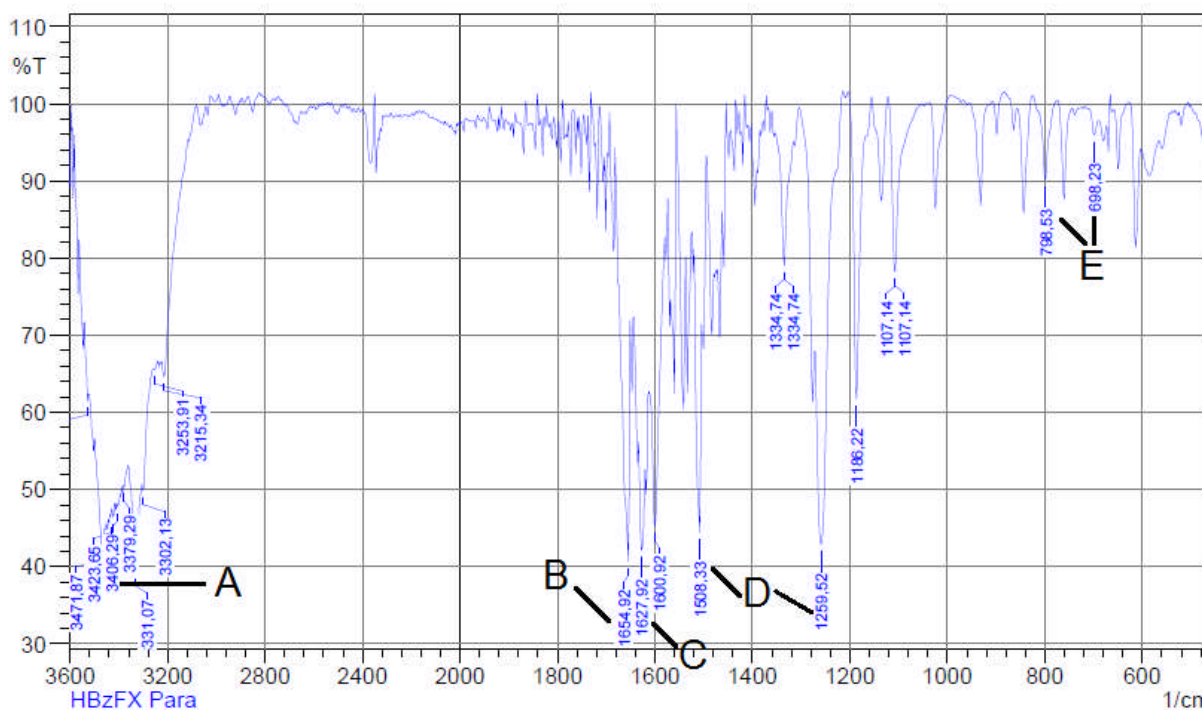
### 3.1.3.2 Síntese do composto final HBZFX PARA

De forma semelhante ao processo sintético do composto final HBZFX ORTO, a formação de seu regioisômero, HBZFX PARA, foi realizada pelo acoplamento do benzofuroxano com 4-aminobenzohidrazida. O composto 6-((2-(2-aminobenzoyl)hidrazona)metil)benzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HBZFX PARA) foi obtido com rendimento de 99% (Figura 26).

**Figura 26** - Síntese do composto final HBZFX PARA.



A caracterização é demonstrada a seguir nos Espectros 7-10.



**Espectro 7** - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HBZFX PARA.

**Tabela 5** - Bandas de absorção no IV do composto HBZFX PARA.

| Marcador | V(1/cm)         | Grupo Característico                 | Tipo de deformação |
|----------|-----------------|--------------------------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 3406,29/3379,00 | amina primária aromática (N-H)       | axial              |
| <b>B</b> | 1654,92         | carbonila (C=O)                      | axial              |
| <b>C</b> | 1627,92         | Imina (C=N)                          | axial              |
| <b>D</b> | 1508,33/1259,52 | N-O                                  | axial              |
| <b>E</b> | 798,53/698,23   | aromático 1,2 dissustituído<br>(C-H) | angular            |

Os principais grupos estiramentos são destacados (por letras A-E) no espectro (Espectro 7). Os grupos provenientes da hidrazida, amina primária e carbonila são demonstrados em estiramento N-H aromáticos em 3406,29/3379,00  $\text{cm}^{-1}$  e C=O em 1654,92  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. O grupo aromático dissustituído apresenta estiramento em 798,53  $\text{cm}^{-1}$  e 698,23  $\text{cm}^{-1}$ . A ligação N-O, característicos do derivado furoxânico, aparecem estiramento em 1508,33  $\text{cm}^{-1}$  e 1259,52  $\text{cm}^{-1}$ ; e, o estiramento C=O, carbonila é observada em 1627,92  $\text{cm}^{-1}$  é referente à imina (Tabela 5).

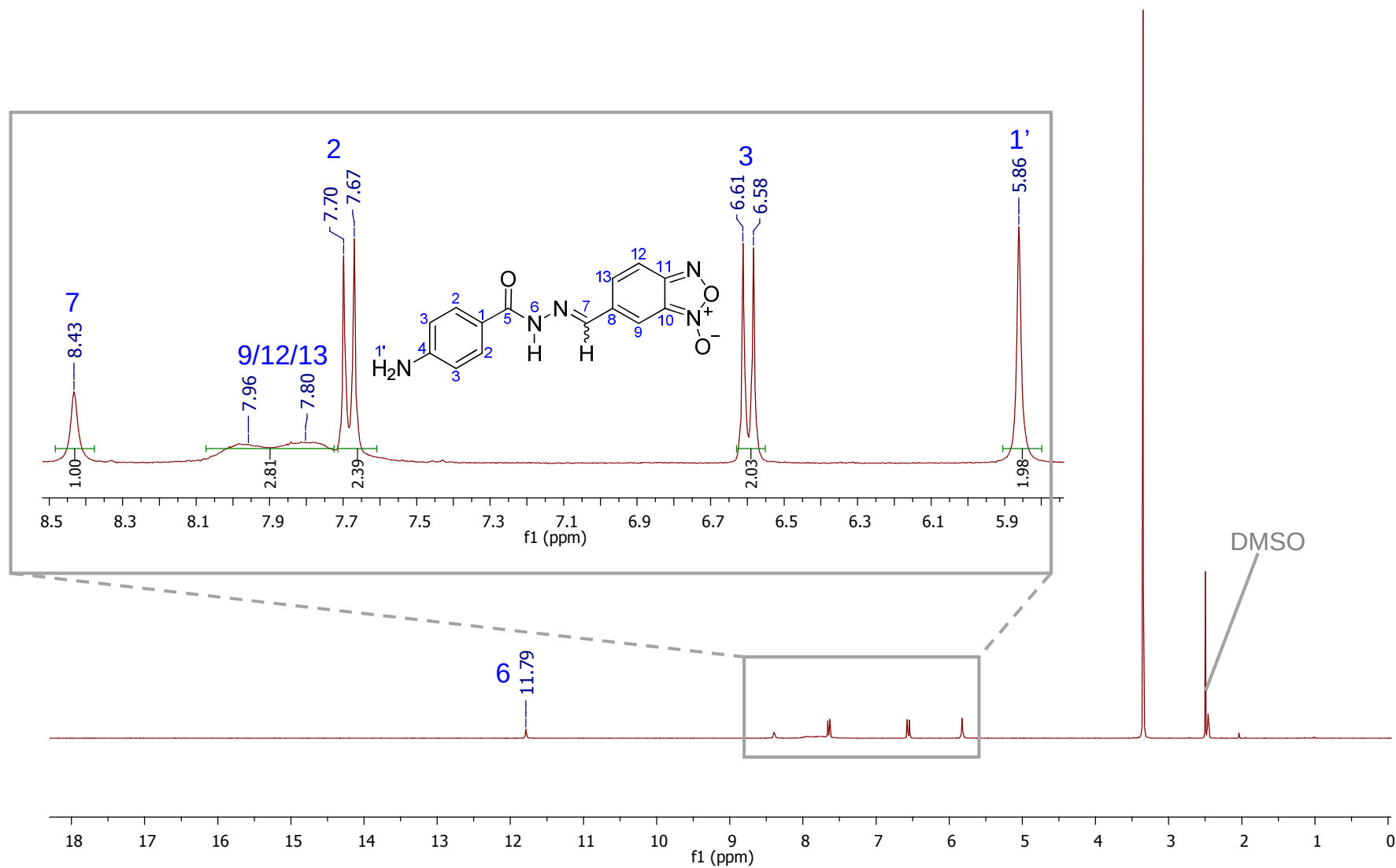
O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HBZFX PARA (Espectro 8) apresenta os hidrogênios do grupo amínico primário (posição 1') e do grupo funcional amida (posição 6) como simpletos de deslocamentos de 5,86 ppm e 11,86 ppm, respectivamente. O simpleto de deslocamento de 8,43 ppm indica o grupo funcional imínico (posição 7), principal grupo funcional que representa o acoplamento entre os reagentes utilizados para a formação do composto. Os hidrogênios provenientes de anéis aromáticos estão presentes como dupletos (posições 2 e 3) e multipletos (posições 9,12 e 13).

O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Espectro 9) por sua vez, também apresenta sinais com deslocamentos referentes aos principais grupos funcionais presente na molécula do composto final. Os carbonos dos grupos amida (posição 5) e imina (posição 7) possuem deslocamento de 163,40 ppm e 142,96 ppm, respectivamente. A maioria dos carbonos pertencentes aos anéis aromáticos também são demonstrados no espectro, com deslocamentos de 113,98 ppm (posição 1), 112,63 ppm (posição 2), 118,92 ppm (posição 3), 130,36 ppm (posição 8), 114,59 ppm (posição 9), 114,59 ppm (posição 10), 136,63 ppm (posição 11), 129,74 ppm (posição 12) e 126,74 ppm (posição 13).

O espectro bidimensional de HSQC confirma as ligações entre hidrogênios com seus respectivos carbonos, nas posições 2; 3; 7; 9 e 12 (Espectro 10).

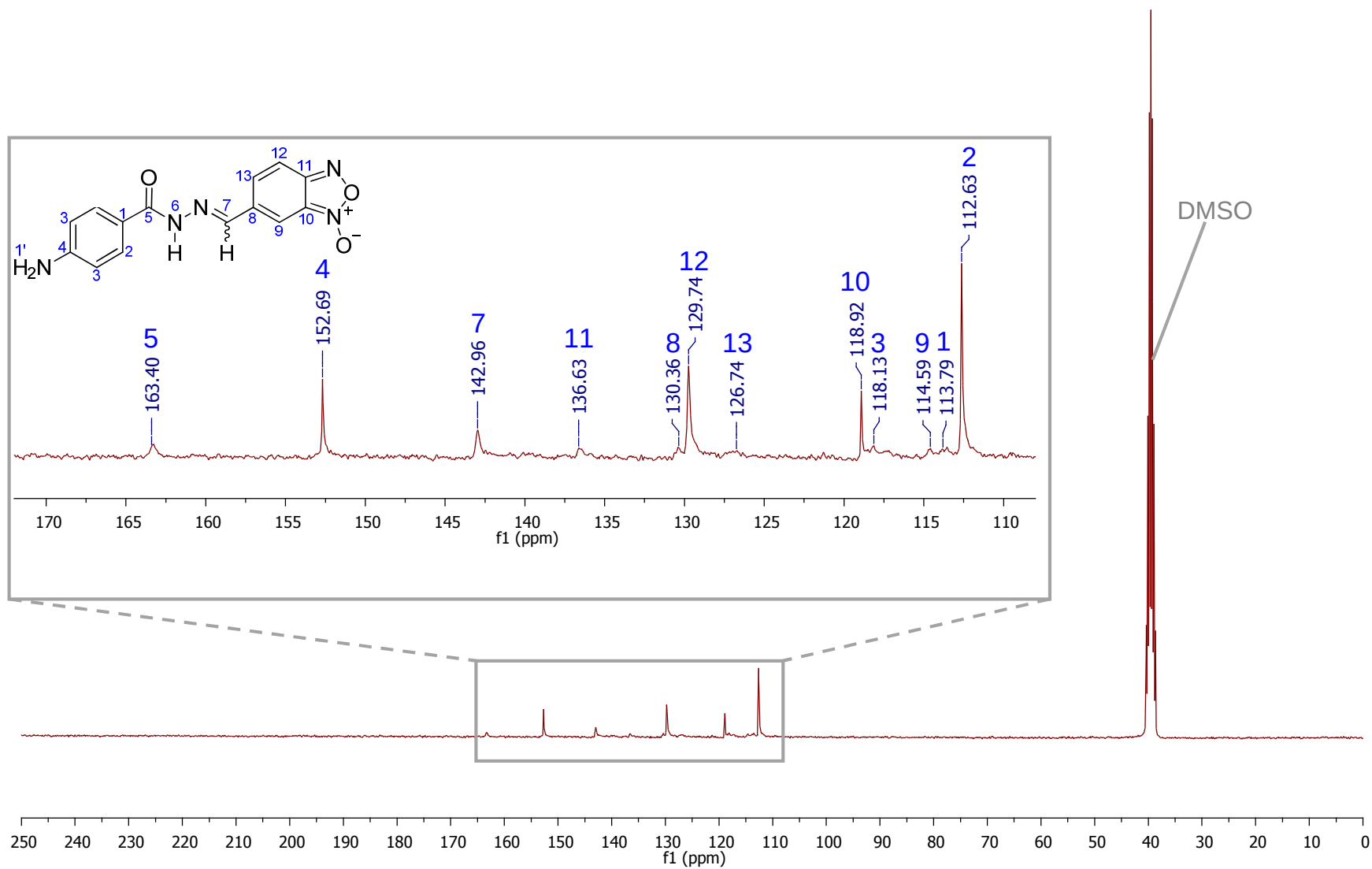
Em conjunto, os dados dos espectros de RMN e IV sugerem a obtenção do composto final HBZFX PARA.

**Espectro 8** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HBZFX PARA (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )

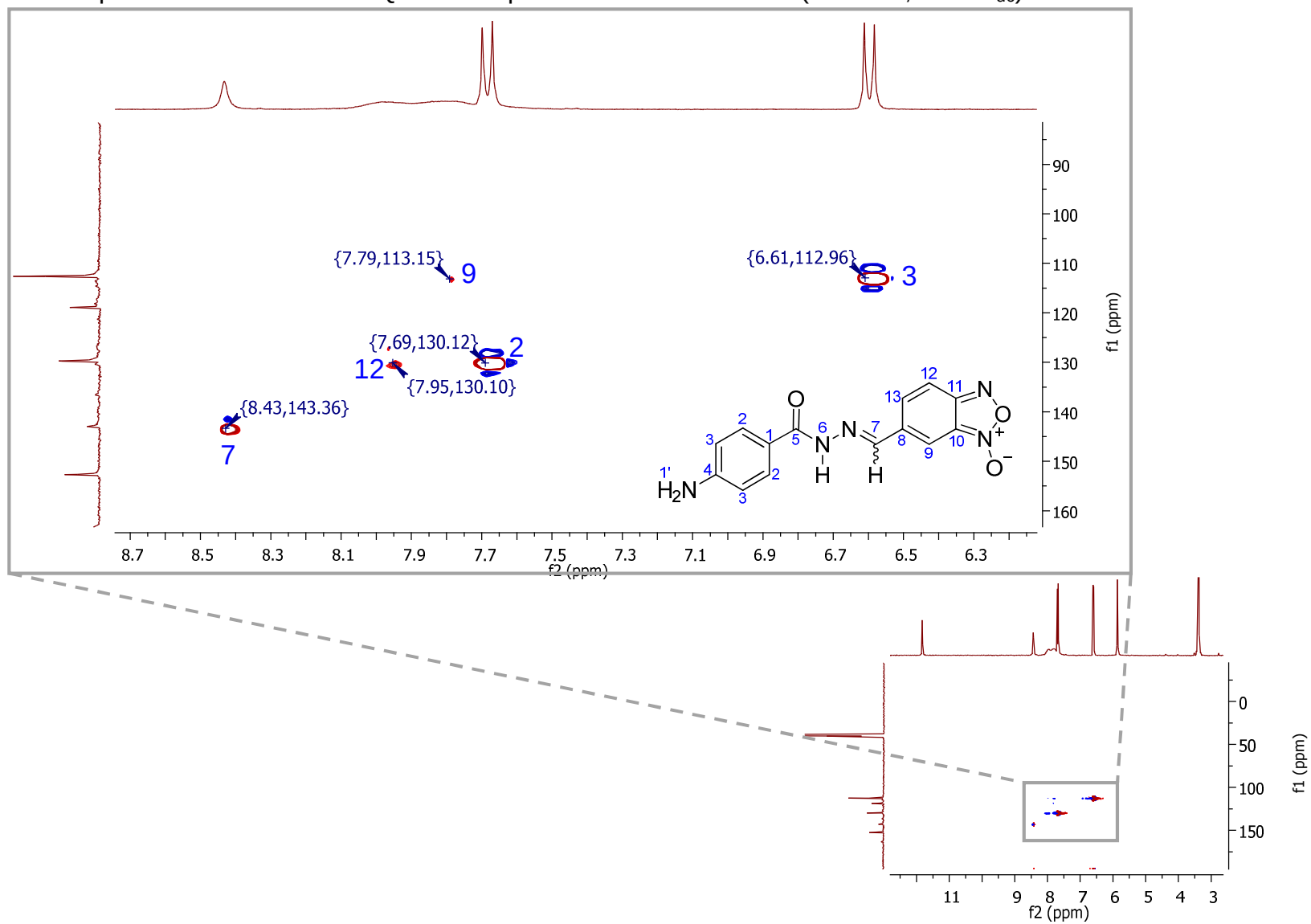




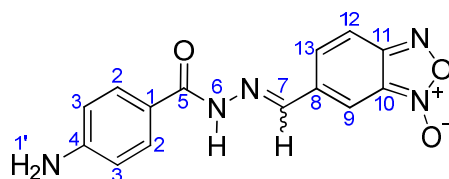
**Espectro 9** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto final HBZFX PARA (300MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )



**Espectro 10** - Espectro bidimensional HSQC do composto final HBZFX PARA (300MHz; DMSO<sub>d6</sub>)



**Tabela 6** – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HBZFX PARA em experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).



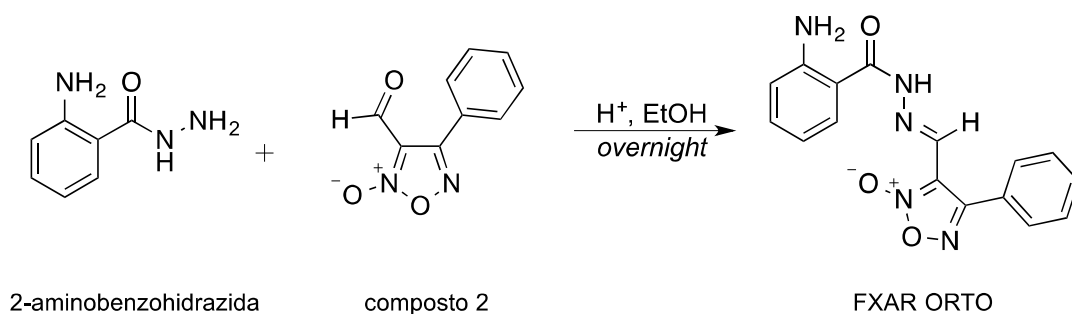
| Posição   | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) | Constante de Acoplamento<br>$J_0$ Hz/ $J_m$ Hz | $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) |
|-----------|-----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>1</b>  | -                           | -                                              | 113,79                         |
| <b>2'</b> | 7,67/7,70 (d)               | -                                              | -                              |
| <b>2</b>  | 5,86 (s)                    | 8,0 Hz/2,0 Hz                                  | 112,63                         |
| <b>3</b>  | 6,58/6,61 (d)               | -                                              | 118,92                         |
| <b>4</b>  | -                           | -                                              | 152,69                         |
| <b>5</b>  | -                           | -                                              | 163,40                         |
| <b>6</b>  | 11,83 (s)                   | -                                              | -                              |
| <b>7</b>  | 8,43 (s)                    | -                                              | 142,96                         |
| <b>8</b>  | -                           | -                                              | 130,36                         |
| <b>9</b>  | 7,80/7,96 (m)               | -                                              | 114,59                         |
| <b>10</b> | -                           | -                                              | 118,13                         |
| <b>11</b> | -                           | -                                              | 136,63                         |
| <b>12</b> | 7,80/7,96 (m)               | -                                              | 129,74                         |
| <b>13</b> | 7,80/7,96 (m)               | -                                              | 126,74                         |
| <b>1'</b> | 5,86 (s)                    | 8,0 Hz/2,0 Hz                                  | -                              |

### 3.1.4 Síntese dos compostos finais N-acilhidrazônicos com derivados furoxânicos 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído

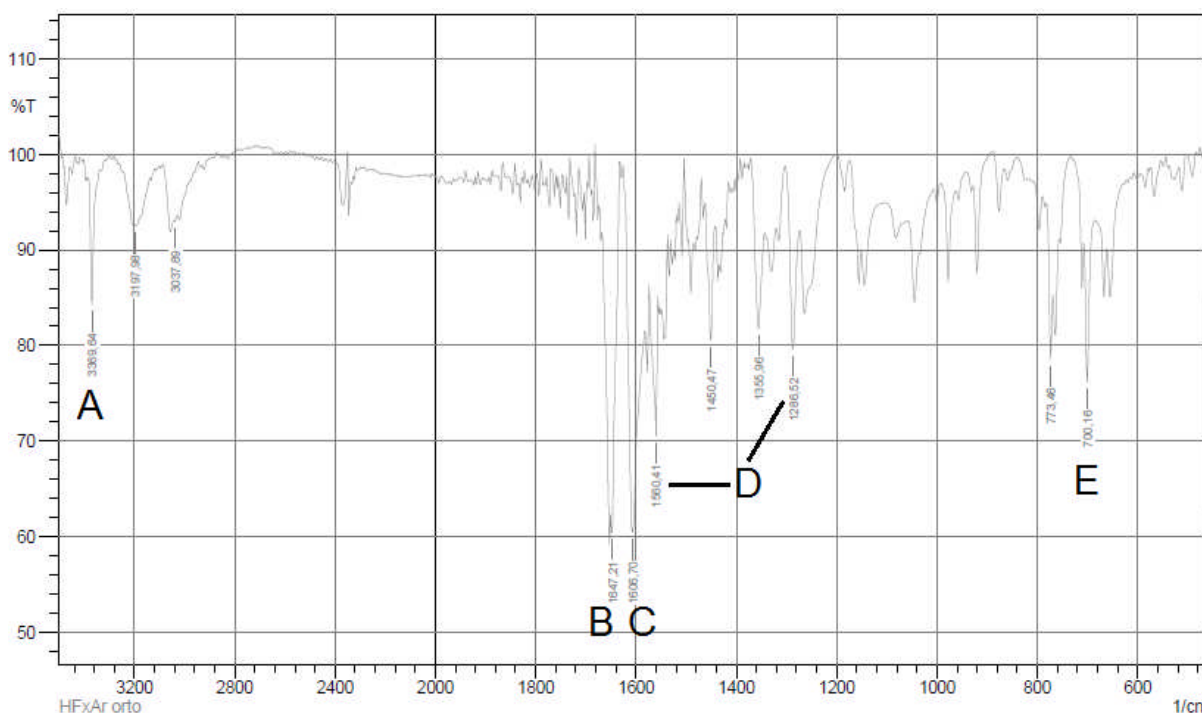
#### 3.1.4.1 Síntese do composto final HFXAR ORTO

Utilizando-se da mesma metodologia sintética adotada para a síntese dos compostos finais com derivados 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (composto 4), dando origem ao composto (E)-4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazona)metil)-3-fenil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HFXAR ORTO). A reação foi realizada em uma única etapa sintetiza onde houve acoplamento entre o composto furoxânico aromático (composto 2), e 2-aminobenzohidrazida. A reação foi mantida *overnight* a temperatura ambiente, sob agitação constante e ao abrigo da luz, obtendo-se rendimento de 38% (Figura 27). O baixo rendimento da reação pode ser explicado por 2 principais motivos. Primeiramente a carbonila presente na função aldeído do composto 2 não apresenta uma configuração eletrônica tão favorável ao ataque nucleofílico quando comparado ao benzofuroxano. O segundo motivo que explicaria o tal rendimento é o impedimento estérico da amina primária presente na hidrazida e a possibilidade de formação neste reagente de ligações de hidrogênio intramoleculares, o que diminui a sua reatividade.

**Figura 27** - Síntese do composto final HFXAR ORTO.



Com o objetivo de caracterizar o produto, foram realizadas análises por espectrofotometria de infravermelho e espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (Espectros 11-14).



**Espectro 11** - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HFXAR ORTO.

**Tabela 7** - Bandas de absorção no IV do composto HFXAR ORTO.

| Marcador | V(1/cm)             | Grupo Característico                 | Tipo de deformação |
|----------|---------------------|--------------------------------------|--------------------|
| A        | 3369,64/3421        | amina primária aromática (N-H)       | axial              |
| B        | 1647,21             | carbonila (C=O)                      | axial              |
| C        | 1606,70             | Imina (C=N)                          | axial              |
| D        | 1560,41/1286,5<br>2 | N-O                                  | axial              |
| E        | 700,16              | aromático 1,2 dissustituído<br>(C-H) | angular            |

A função amina primária e carbonila referentes a hidrazida são representados por estiramentos N-H aromático e C=O em 3369,64/3421  $\text{cm}^{-1}$  e 1647,21  $\text{cm}^{-1}$ ,

respectivamente. Os grupos funcionais referentes ao derivado furoxânico como o grupo aromático dissustituído em  $700,16\text{ cm}^{-1}$ . A ligação N-O é visualizada nas bandas  $1560,41\text{ cm}^{-1}$  e  $1286,52\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento N=C, referente a carbonila imínica da subunidade *N*-acilhidrazona encontra-se em  $1606,70\text{ cm}^{-1}$  (Tabela 7).

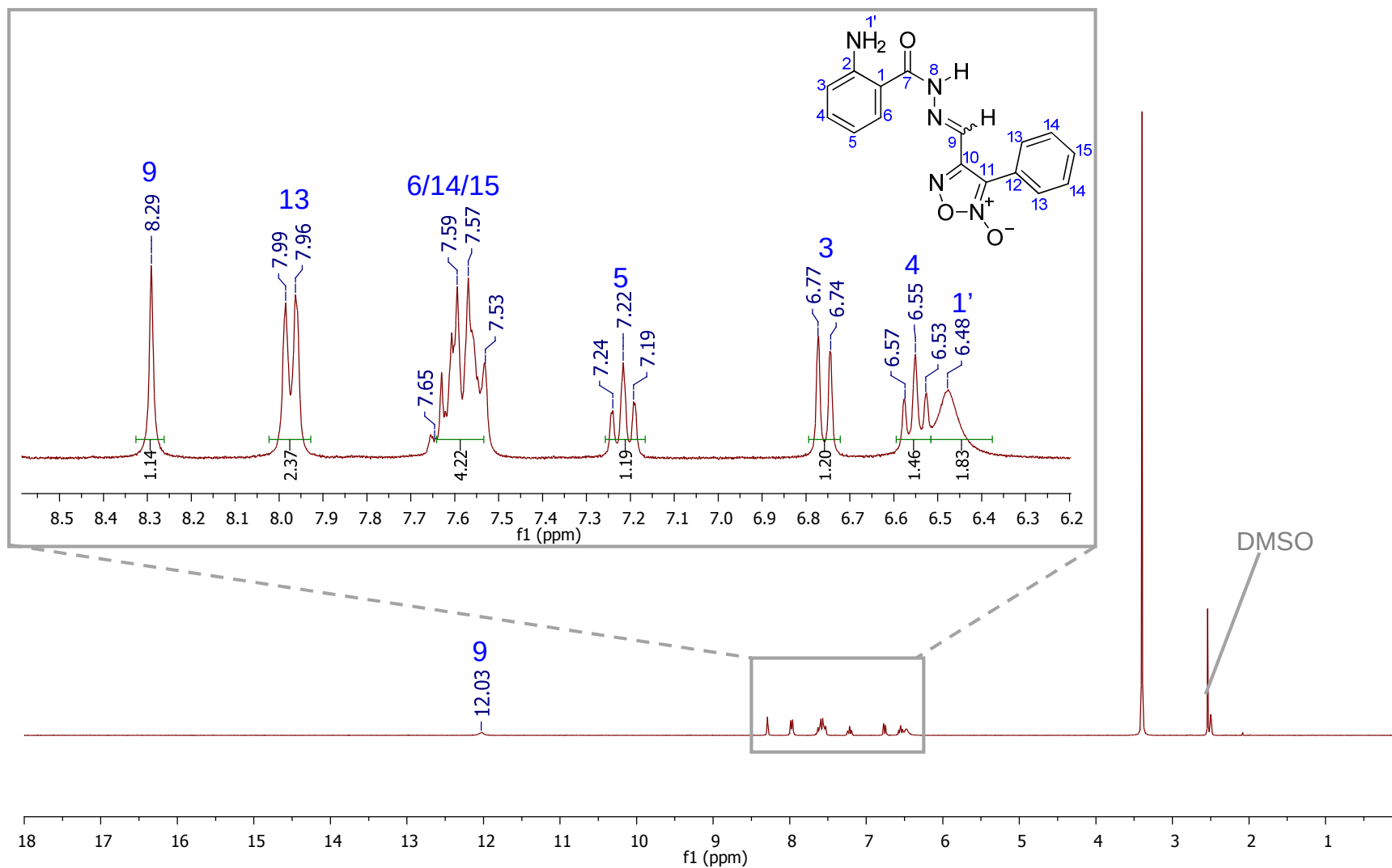
Analisando o espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HFXAR ORTO (Espectro 12), observa-se que os hidrogênios dos principais grupos funcionais também estão presentes. O simpleto com deslocamento de 6,48 ppm é referente ao grupamento amínico primário (posição 1'). Simpletos com deslocamentos 12,03 ppm e 8,29 ppm são referentes aos hidrogênios presentes nas funções amida (posição 8) e amina primária (posição 9), respectivamente. A presença do deslocamento imínico tem fundamental importância, pois demonstra o acoplamento entre a 2-aminobenzohidrazida e o composto 2.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do mesmo composto (Espectro 13) demonstra a presença dos principais carbonos presentes na molécula. Os deslocamentos de 131,78 ppm e 150,61 ppm são referentes ao carbono imínico (posição 9) e carbono referente ao grupo éster (posição 7), respectivamente. Referente aos carbonos pertencentes aos anéis aromáticos, todos foram detectados e são demonstrando na Tabela 8.

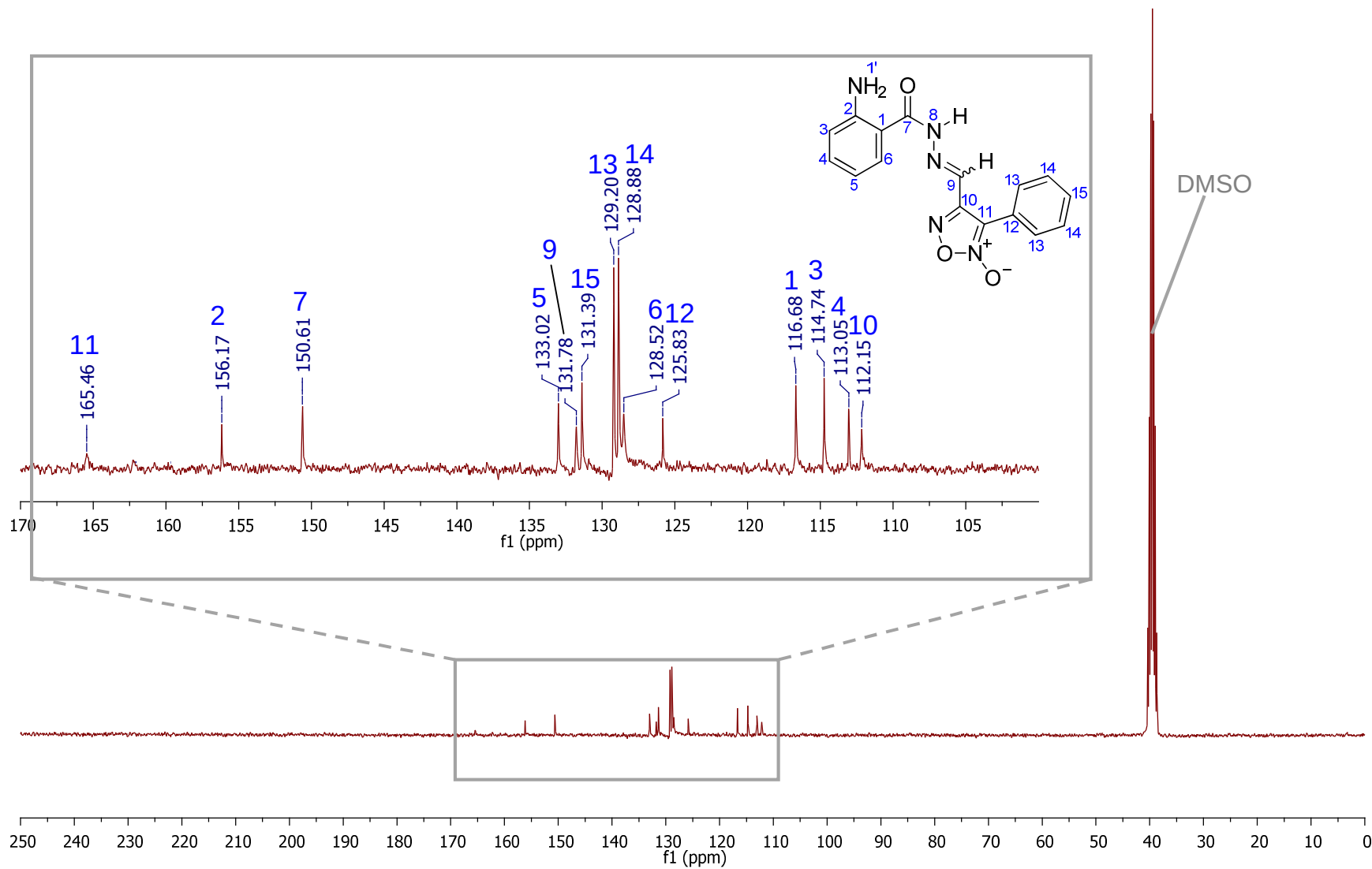
O espectro bidimensional HSQC (Espectro 14) confirma a ligação dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. São observados as ligações das posições 3; 4; 6; 9; 14 e 15.

Assim, as análises de espectrometria de RMN e espectrofotometria de IV, sugerem que o composto final HFXAR ORTO foi obtido.

**Espectro 12** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HFXAR ORTO (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )

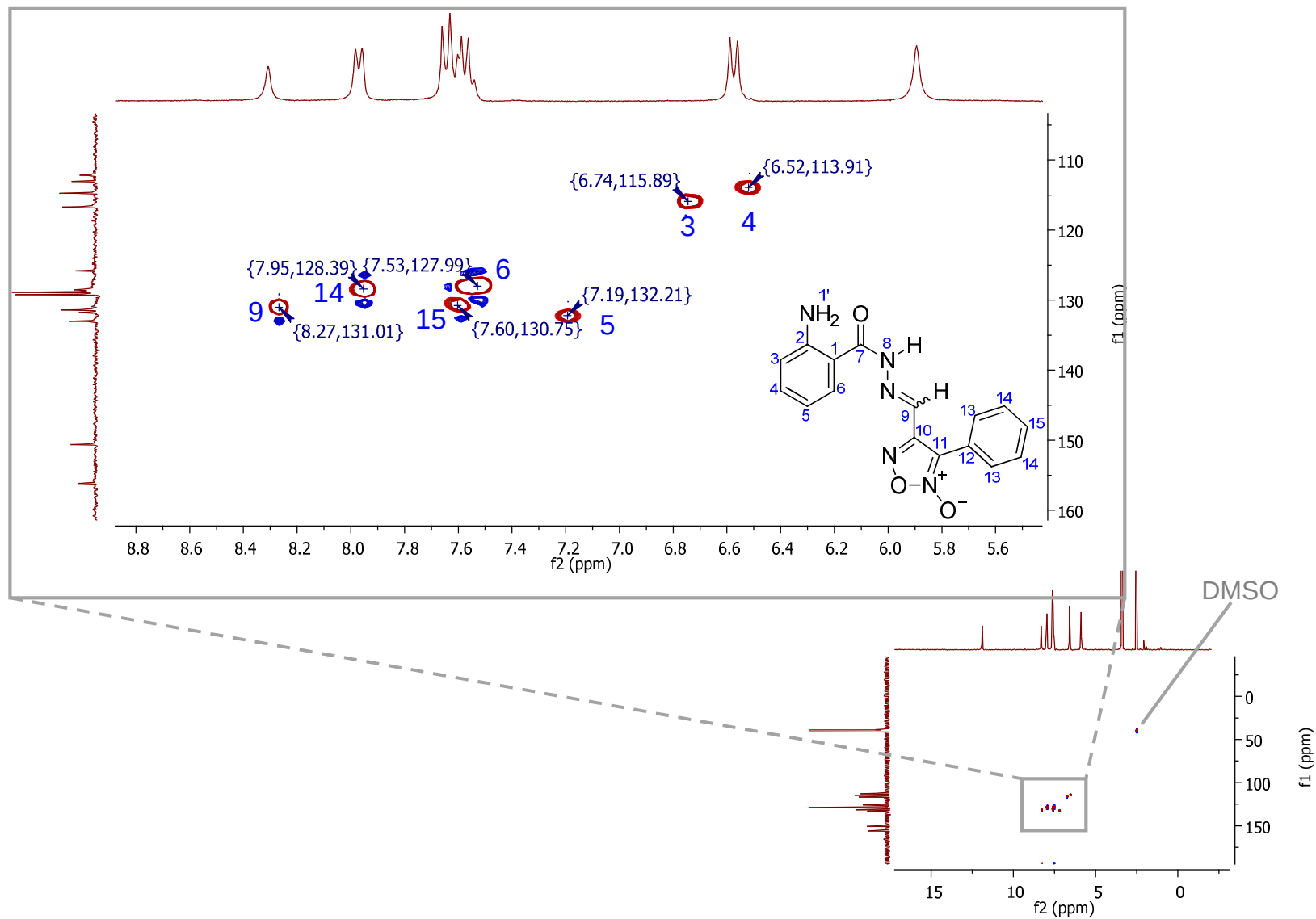


**Espectro 13** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto final HFXAR ORTO (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )

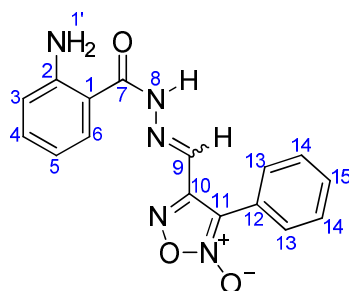




**Espectro 14** - Espectro bidimensional HSQC do composto final HFXAR ORTO (300MHz; DMSO<sub>d6</sub>)



**Tabela 8** – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HFXAR ORTO em experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).

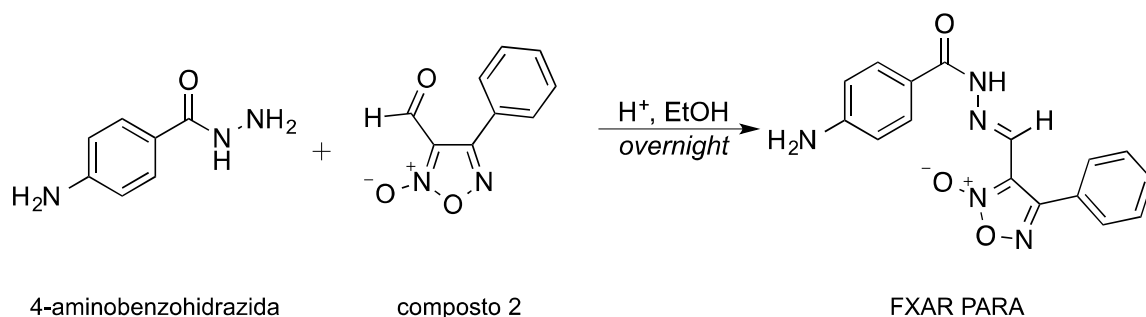


| Posição   | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) | Constante de Acoplamento<br>$J_0$ Hz/ $J_m$ Hz | $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) |
|-----------|-----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>1</b>  | -                           | -                                              | 116,68                         |
| <b>2</b>  | -                           | -                                              | 156,17                         |
| <b>3</b>  | 6,74/6,77 (d)               | -                                              | 114,74                         |
| <b>4</b>  | 6,53/6,55/6,57 (t)          | 8,0 Hz/1,7 Hz                                  | 113,05                         |
| <b>5</b>  | 7,19/7,22/7,24 (t)          | 8,0 Hz/1,7 Hz                                  | 133,02                         |
| <b>6</b>  | 7,53-7,65 (m)               | 8,0 Hz/1,7 Hz                                  | 128,52                         |
| <b>7</b>  | -                           | -                                              | 150,61                         |
| <b>8</b>  | 12,03                       | -                                              | -                              |
| <b>9</b>  | 8,29                        | -                                              | 131,78                         |
| <b>10</b> | -                           | -                                              | 112,15                         |
| <b>11</b> | -                           | -                                              | 156,17                         |
| <b>12</b> | -                           | -                                              | 125,83                         |
| <b>13</b> | 7,96/7,98 (d)               | -                                              | 129,20                         |
| <b>14</b> | 7,53-7,65 (m)               | 8,0 Hz/1,7 Hz                                  | 128,88                         |
| <b>15</b> | 7,53-7,65 (m)               | 8,0 Hz/1,7 Hz                                  | 131,39                         |
| <b>1'</b> | 6,48 (s)                    | -                                              | -                              |

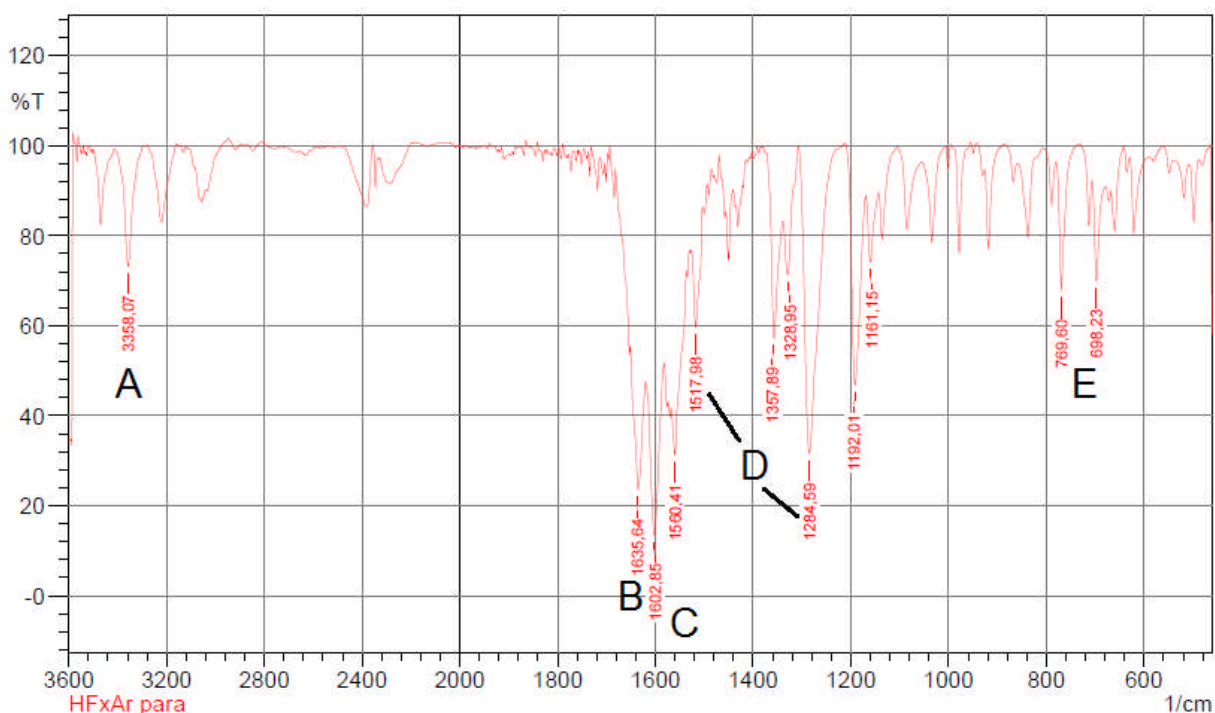
### 3.1.4.2 Síntese do composto final HFXAR PARA

O último composto da série, (E)-4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazona)metil)-3-fenil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (HFXAR PARA) foi obtido com rendimento de 40% (Figura 28).

**Figura 28** – Síntese do composto final HFXAR PARA.



A caracterização foi realizada por meio de espectrofotometria na região do infravermelho e espectroscopia de Ressonância Magnética são demonstrados nos espectros 15-18, a seguir.



**Espectro 15** - Espectro de absorção na região de infravermelho do composto HFXAR PARA.

**Tabela 9** - Bandas de absorção no IV do composto HFXAR PARA.

| Marcador | V(1/cm)         | Grupo Característico                  | Tipo de deformação |
|----------|-----------------|---------------------------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 3358,07/3440    | amina primária aromática (N-H)        | axial              |
| <b>B</b> | 1635,65         | carbonila (C=O)                       | axial              |
| <b>C</b> | 1602,85         | Imina (C=N)                           | axial              |
| <b>D</b> | 1517,98/1284,59 | N-O                                   | axial              |
| <b>E</b> | 769,60/698,23   | aromático 1,2 dissubstituído<br>(C-H) | angular            |

Os grupos provenientes da hidrazida, como amina primária e carbonila possuem estiramento N-H aromático e C=O em 3358,07/3440  $\text{cm}^{-1}$  e 1635,65  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Os grupos funcionais provenientes do derivado furoxânico também estão presentes sendo que o estiramento N-O é visualizado em 1517,98  $\text{cm}^{-1}$  e 1284,59  $\text{cm}^{-1}$ . A carbonila imínica, visualizada com estiramento C=N, que caracteriza o acoplamento dos reagentes e consequentemente a formação da N-acilhidrazona está presente em 1602,85  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 9).

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HFXAR PARA (Espectro 16) demonstra a presença dos hidrogênios dos principais grupos funcionais assim como os hidrogênios presentes nos anéis aromáticos. O hidrogênio presente no grupo amida (posição 6) é representado por um simpleto com deslocamento 11,90 ppm. Os hidrogênios referentes a amina primária (N-H) e ao grupo imínico (posição 7) são representados simpletos com deslocamentos de 5,89 ppm e 8,31 ppm, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos da posição 2 são representados por dupletos com deslocamentos entre 6,56 ppm e 6,59 ppm. Os hidrogênios aromáticos da posição 3 também apresentam-se como dupletos, porém com deslocamento entre 7,96 ppm e 7,98 ppm. Por fim, os hidrogênios aromáticos

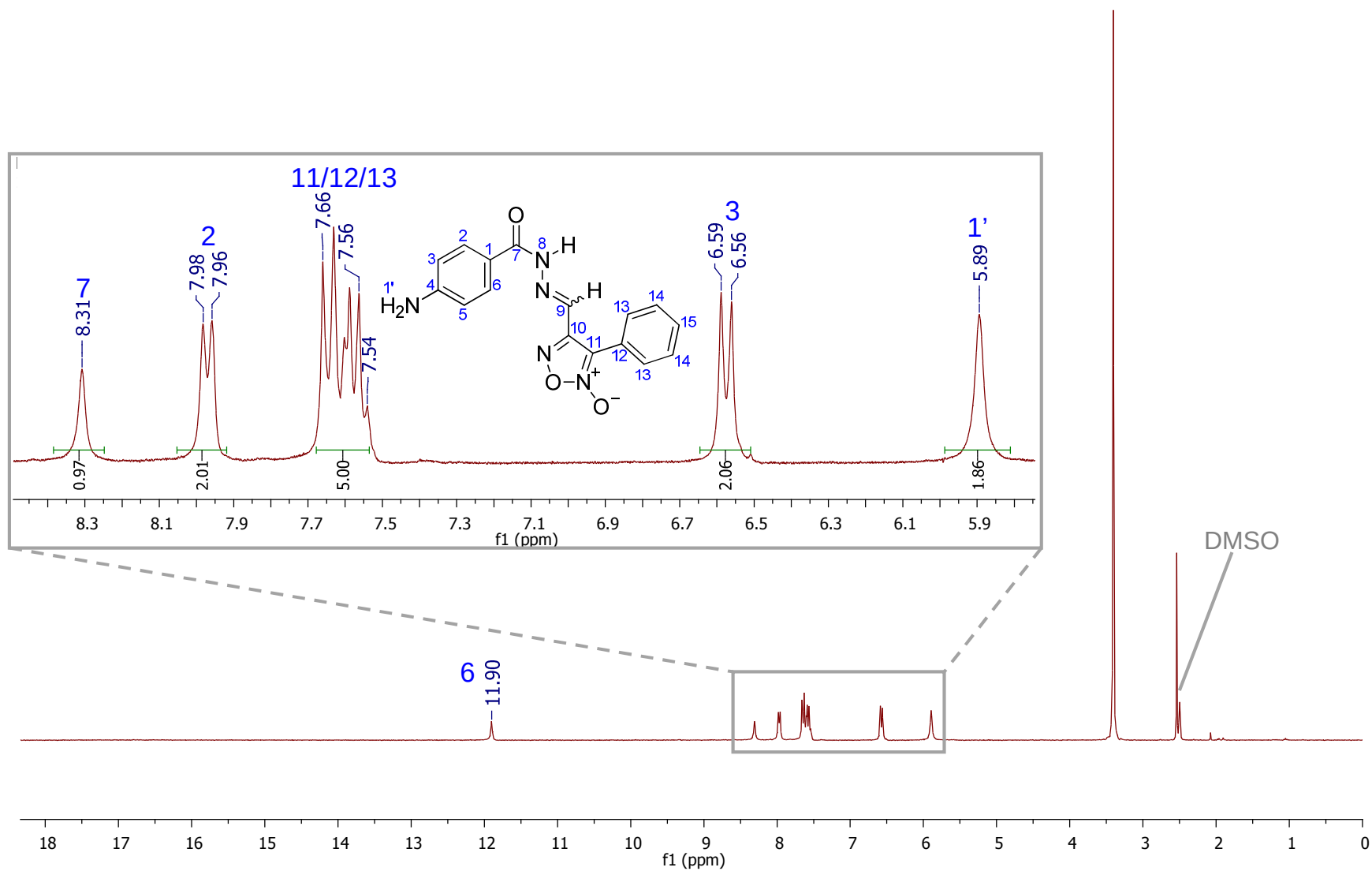
provenientes do outro anel aromático na molécula (posições 11; 12 e 13) apresentam-se como um multiplete com deslocamento entre 7,54 ppm e 7,66 ppm.

A análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para o mesmo composto (Espectro 17) demonstra que os principais carbonos do composto estão presentes. Os carbonos referentes ao grupamento amida (posição 5) e imínico (posição 7) apresentam deslocamentos de 152,86 ppm e 130,73 ppm, respectivamente. A presença do grupo imínico, novamente confirma que houve acoplamento entre as moléculas dos reagentes. Os carbonos pertencentes aos anéis aromáticos também estão presentes no espectro com deslocamentos de 125,85 ppm (posição 1), 129,81 ppm (posição 2), 112,67 ppm (posição 3), 129,85 ppm (posição 11), 128,81 ppm (posição 12) e 131,28 ppm (posição 13)

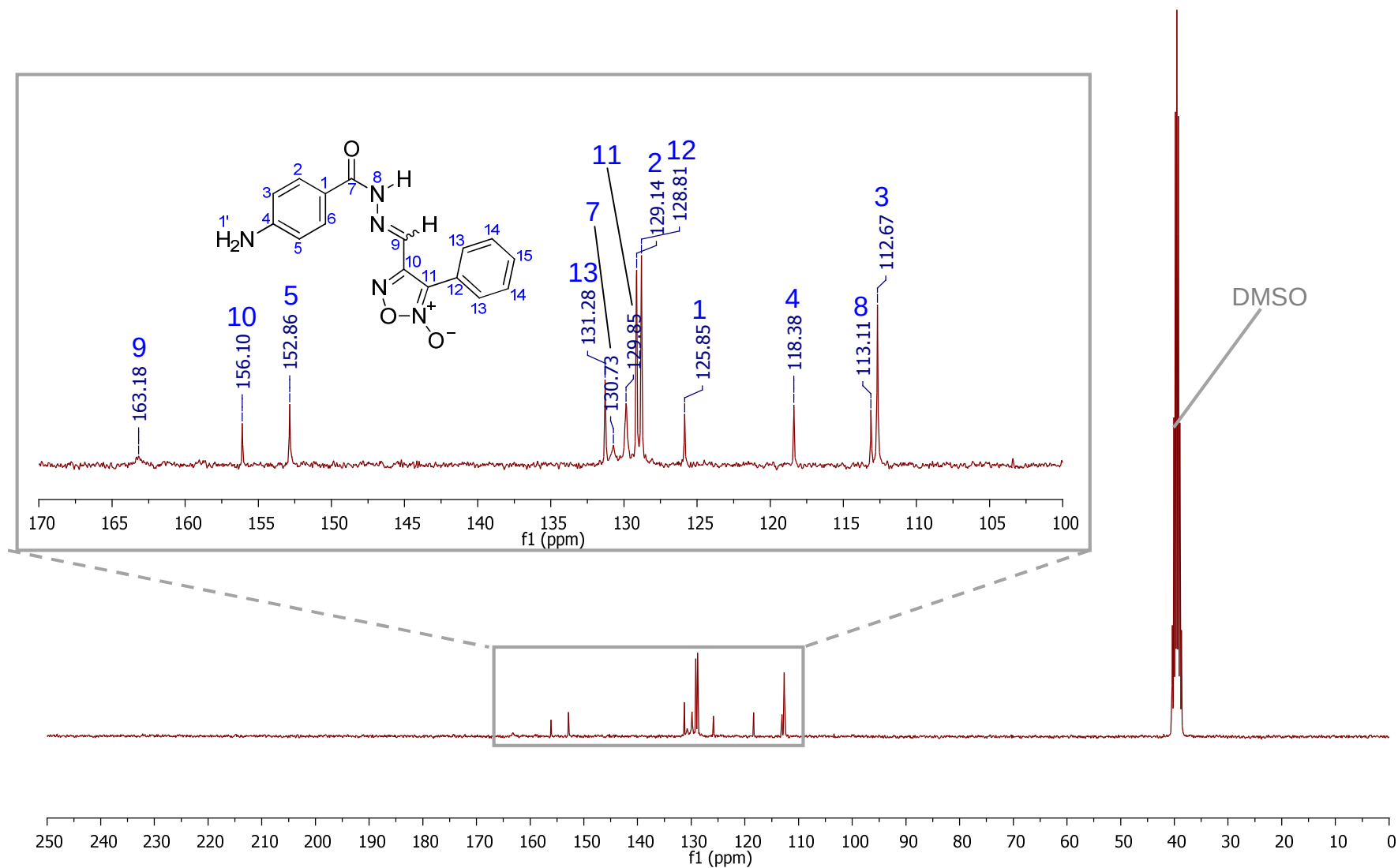
O espectro bidimensional HSQC (Espectro 18) novamente demonstra a presença de ligações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos nas posições 2; 3; 7; 11;12 e 13.

Assim, com base na espectrometria de RMN e espectrofotometria de IV, pode-se sugerir que o composto final HFXAR PARA foi obtido.

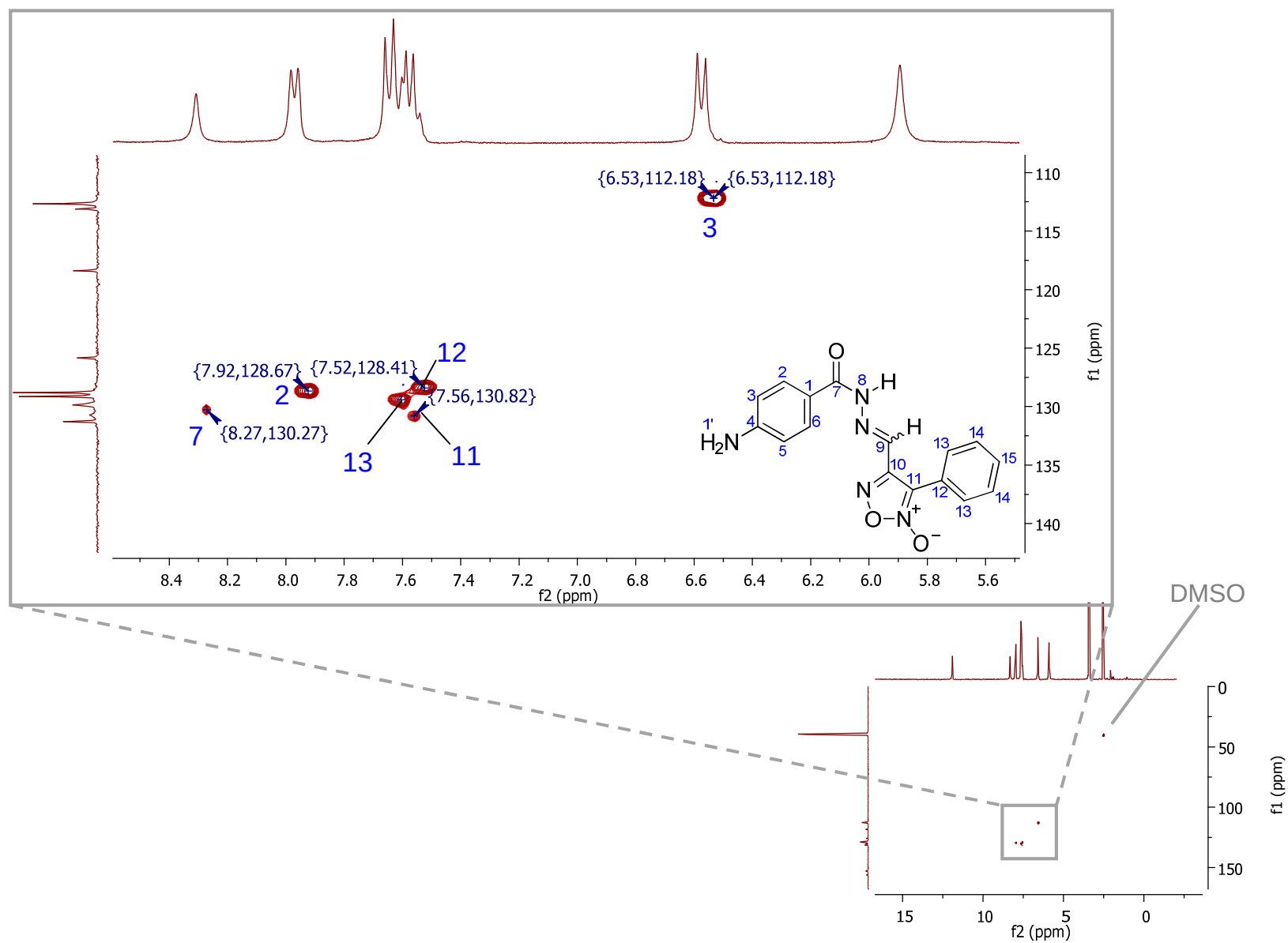
**Espectro 16** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto final HFXAR PARA (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )



**Espectro 17** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto final HFXAR PARA (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ )

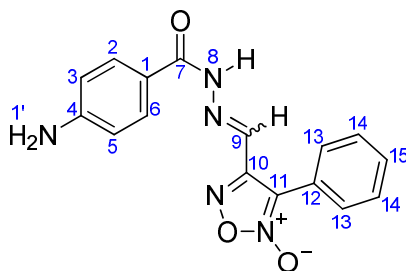


**Espectro 18** - Espectro bidimensional HSQC do composto final HFXAR ORTO (300MHz; DMSO<sub>d6</sub>)





**Tabela 10** – Deslocamentos (ppm) apresentados pelo composto final HFXAR PARA em experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz;  $\text{DMSO}_{\text{d6}}$ ).

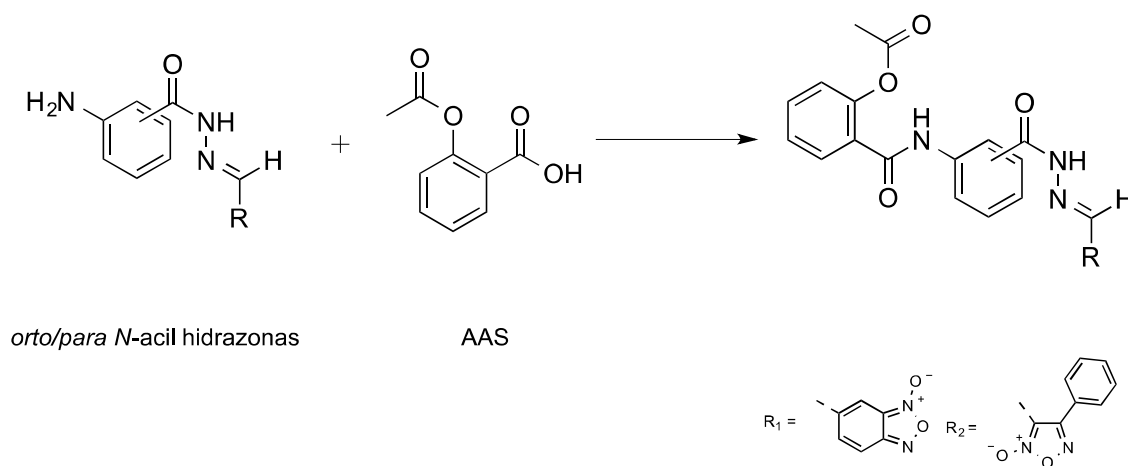


| Posição | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) | Constante de Acoplamento<br>$J_0$ Hz/ $J_m$ Hz | $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) |
|---------|-----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1       | -                           | -                                              | 125,85                         |
| 2       | 7,96/7,98 (d)               | 7,54 Hz/2,0 Hz                                 | 129,14                         |
| 3       | 6,56/6,59 (d)               | 8,20 Hz/2,0 Hz                                 | 112,67                         |
| 4       | -                           | -                                              | 118,38                         |
| 5       | -                           | -                                              | 152,86                         |
| 6       | 11,90 (s)                   | -                                              | -                              |
| 7       | 8,31 (s)                    | -                                              | 130,73                         |
| 8       | -                           | -                                              | 118,11                         |
| 9       | -                           | -                                              | 163,18                         |
| 10      | -                           | -                                              | 156,10                         |
| 11      | 7,54/7,66 (m)               | -                                              | 129,85                         |
| 12      | 7,54/7,66 (m)               | -                                              | 128,81                         |
| 13      | 7,54/7,66 (m)               | -                                              | 131,28                         |
| 1'      | 5,89 (s)                    | -                                              | -                              |

### 3.1.5 Síntese dos compostos finais *N*-acilhidrazônicos acoplados com o ácido acetilsalicílico

Um dos objetivos deste projeto visa à síntese e caracterização de derivados *N*-acilhidrazônicos acoplados com o ácido acetilsalicílico (Figura 29). Tal planejamento estrutural é justificado pelo provável efeito sinérgico que as subunidades possuem, aumentando a inibição plaquetária e assim desenvolvendo um candidato a fármaco que apresenta múltiplos mecanismos de ação, possuindo vantagem em relação aos demais fármacos atualmente disponíveis.

**Figura 29** – Síntese do acoplamento dos compostos finais com o ácido acetilsalicílico (AAS).



A reação consiste em uma formação de éster, na qual a carbonila do grupo funcional ácido carboxílico presente no AAS sofre um ataque nucleofílico da amina primária presente nas *N*-acilhidrazonas. Como a hidroxila presente no ácido carboxílico não é um bom grupo abandonador, a reação não é favorável termodinamicamente. Nesse caso, são utilizados agentes acoplantes, compostos que atuam como catalisadores que facilitam a saída do grupo abandonador.

As metodologias realizadas foram baseadas em artigos que demonstravam formações de ésteres, como Sugiyama et al., 2012, onde foi utilizado como solvente da reação diclorometano e respectiva estequiométrica de reagentes 1 ácido carboxílico(AAS): 3 trietilamina 1: DMAP: 1:amina (*N*-acilhidrazonas). Outra metodologia utilizada, demonstrada por Vermeersch et al., 1985, descreve a reação sendo realizada com o agente acoplante CDI e DMF como meio reacional.

Para a otimização da formação dos produtos, foram adotadas diversas metodologias e adaptações sintéticas como, desde a utilização de diferentes agente acoplante (EDC e CDI), até a mudança do meio reacional (clorofórmio, diclorometano, DMF), com o objetivo de aumentar o rendimento da reação, posto que após a realização de CCD com diversas fases móveis foi observada formação de múltiplos subprodutos.

Uma possível hipótese para os baixos rendimentos e múltiplos subprodutos observados é a baixa solubilidade dos compostos *N*-aci hidrazônicos em todos os solventes utilizados como meio reacional. Foram realizadas diversas tentativas de solubilizar os compostos em diversos solventes como clorofórmio, diclorometano, THF e DMF. Com a utilização deste último, DMF, houve um aumento relativo no rendimento da reação, porém não significativo. Foram realizadas diversas cromatografias em coluna (CC) de diferentes fase estacionárias, como sílica comum para CC e sílica flash; diferentes fases móveis com diferentes solventes e diferentes gradientes, mas nenhuma das opções resultou em um rendimento significativo.

Ainda com o objetivo de aumentar o rendimento, o AAS foi substituído por seu respectivo cloreto de acila. A substituição da hidroxila por um bom grupo abandonador (cloreto) deveria facilitar o ataque nucleofílico da amina presente nas

*N*-acilhidrazonas, assim aumentando o rendimento da reação e diminuindo a formação de subprodutos. Novamente não foram observados resultados favoráveis, que foram atribuídos à impureza do cloreto de acila utilizado, que após avaliação por CCD demonstrou estar impuro. A impureza do composto está relacionada com a baixa estabilidade do mesmo. Assim, estes produtos finais contendo a subunidade do AAS não foram obtidos até o momento.

### **3.2 Atividade biológica**

Após o planejamento estrutural, síntese e caracterização, os compostos finais foram submetidos a ensaios pré-clínicos com o intuito de observar se os mesmos apresentam atividade biológica.

Paras análises de significância dos resultados dos diferentes experimentos, foi adotada análise estatística ANOVA monofatorial e teste de Tukey, como pós-teste. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0.05$  e representada como “\*” quando comparado ao controle negativo, e “\*\*\*” quando comparado ao controle positivo.

#### **3.2.2 Avaliação da agregação plaquetária**

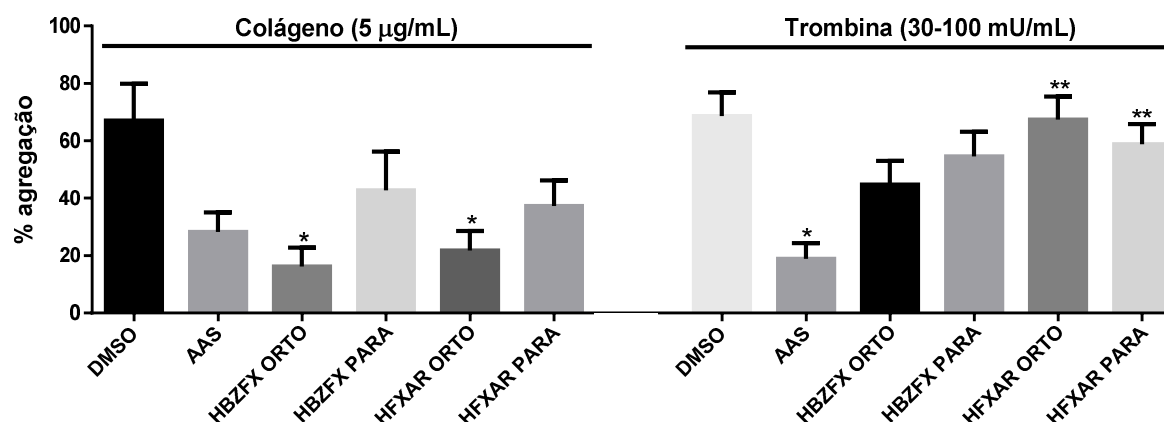
Sabendo-se que os compostos atuam em alvos envolvidos com a formação de trombos, a determinação da via por qualos compostos atuam demonstra-se necessária. Para tal, foram realizados ensaios *in vitro* para a determinação da porcentagem de agregação plaquetária na presença dos diferentes compostos e diferentes agonistas que ativam a agregação plaquetária por vias distintas, mimetizando a sua ativação *in vivo*.

Os ensaios foram realizados na Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em colaboração com Dr. Maria Elisa Lopez e sua aluna, Jéssica Oliveira. No ensaio, previamente descrito por Born et al 1963, plaquetas são separadas dos demais componentes sanguíneos de ratos e a sua agregação é determinada por método turbidimétrico, onde a absorbância medida no agregometro é inversamente proporcional a agregação.

Como controle negativo, a agregação *in vitro* foi induzida pelos diferentes agonistas apenas na presença do solvente utilizado para solubilizar os compostos, DMSO. Assim, a determinação do potencial antiagregante dos compostos pôde ser determinada, independente da interferência do solvente.

Os resultados são demonstrados em porcentagem de agregação (Figura 30), e porcentagem de inibição (Tabela 11).

**Figura 30** – Determinação da agregação plaquetária na presença dos compostos *N*-acilhidrazônicos induzida por Colágeno e Trombina.



**Tabela 11** – Valores da agregação e inibição apresentados pelos compostos induzidos por diferentes agonistas. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com controle negativo e \*\* quando comparado com controle positivo.

| Composto          | Concentração<br>(µM/kg) | n | Colágeno (5µg/mL) |              | n | Trombina (30-100mU/mL) |               |
|-------------------|-------------------------|---|-------------------|--------------|---|------------------------|---------------|
|                   |                         |   | Agregação (%)     | Inibição (%) |   | Agregação (%)          | Inibição (%)  |
| Controle negativo | -                       | 4 | 67,00±12,87       | -            | 5 | 68,60±8,24             | -             |
| AAS               | 100                     | 4 | 28,25±6,86        | 57,84±8,05   | 3 | 18,88±4,94*            | 8,05±10,24    |
| HBZFX ORTO        | 100                     | 4 | 16,25±6,54*       | 75,75±11,96  | 5 | 44,80±8,21             | 11,96±9,76**  |
| HBZFX PARA        | 100                     | 4 | 42,75±13,55       | 36,19±12,52  | 5 | 54,60±8,59             | 12,52±20,23   |
| HFXAR ORTO        | 100                     | 4 | 21,75±6,86*       | 67,54±11,57  | 5 | 67,40±7,93**           | 11,57±10,24** |
| HFXAR ORTO        | 100                     | 4 | 37,25±8,98        | 44,40±10,36  | 5 | 58,80±7,11**           | 10,36±13,41** |

No ensaio de agregação plaquetária induzida por colágeno, os compostos finais HBZFX ORTO e HFXAR ORTO demonstraram valores significantes. O AAS (controle positivo) não apresentou diferença significativa do controle negativo, pois o mesmo atua na inibição de síntese de tromboxanos, e não de colágeno. Entretanto, os compostos que apresentaram inibição significativa da agregação não possuem diferença quando comparado com o AAS.

Os compostos também foram testados na presença de trombina, sendo esta responsável pela ativação plaquetária por uma via distinta do que o colágeno. Os resultados demonstraram que apenas o AAS obteve inibição significativa da agregação plaquetária, sendo que os compostos HFXAR ORTO e HFXAR PARA possuem valores distintos do controle negativo.

Assim, após da realização de ensaios de agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas, foi demonstrado que os compostos atuam possivelmente inibindo a via do colágeno nas plaquetas, interferindo com o processo de agregação e consequentemente formação de trombos. Os compostos HBZFX ORTO e HFXAR ORTO demonstraram maior atividade inibitória, sugerindo que a amina primária da subunidade *N*-acilhidrazona em posição *orto* possui maior afinidade e consequentemente maior atividade antiagregante.

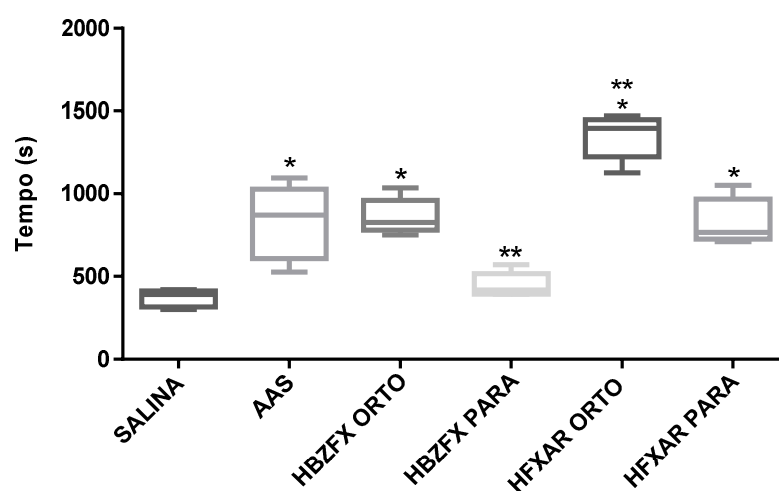
### 3.2.1 Avaliação do tempo de sangramento

O ensaio de tempo de sangramento permite avaliar se o uso dos compostos aumentará o tempo necessário para que haja formação do coagulo. Esse ensaio é necessário, pois caracteriza se os compostos apresentam segurança superior aos fármacos antiagregantes plaquetários disponíveis.

O ensaio utilizou camundongos como modelo experimental e consistiu em administração via oral dos compostos 1 h antes da incisão na cauda do animal afim de medir o tempo que o mesmo demorou para parar de sangrar.

Para a realização do ensaio foi adotado a metodologia descrita por Buchanan et al., 1979, com adaptações. Os compostos foram administrados em concentrações de 100  $\mu\text{mol/kg}$ , utilizando-se como veículo CMC. Para os controles positivo e negativo, foram administrados ácido acetilsalicílico (100  $\mu\text{mol/Kg}$ ) e salina, respectivamente.

**Figura 31** – Determinação do tempo de sangramento *in vivo* dos compostos *N*-acilhidrazônicos, salina e AAS.





**Tabela 12** – Valores de tempo de sangramento dos diferentes compostos. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com controle negativo, enquanto \*\* demonstra diferença significativa quando comparado com AAS.

| Composto          | Concentração ( $\mu\text{M/Kg}$ ) | n | Tempo de sangramento (s) |
|-------------------|-----------------------------------|---|--------------------------|
| Controle negativo | -                                 | 5 | 369,00 $\pm$ 23,04       |
| AAS               | 100                               | 5 | 828,00 $\pm$ 100,33*     |
| HBZFX ORTO        | 100                               | 5 | 861,00 $\pm$ 48,51*      |
| HBZFX PARA        | 100                               | 5 | 448,20 $\pm$ 33,14**     |
| HFXAR ORTO        | 100                               | 5 | 1347,00 $\pm$ 60,63*/**  |
| HFXAR ORTO        | 100                               | 5 | 830,00 $\pm$ 62,51*      |

Os animais do grupo controle negativo (salina) apresentaram tempo de sangramento médio de 369s, sendo este tempo considerado o tempo médio normal para formação do coágulo sem interferência no seu processo de formação do mesmo. Já o grupo administrado com AAS (controle negativo) demonstrou diferença significativa em comparação com o controle negativo, apresentando tempo de sangramento médio de 828s. O AAS foi utilizado como controle positivo, pois demonstra aumento no tempo médio de sangramento de pacientes de tal forma que podendo causar hemorragias. Assim, compostos que demonstram tempo de sangramento menor do que o AAS são interessantes para a inibição plaquetária.

Os compostos finais, com exceção do HBZFX PARA, demonstraram tempos de sangramento médios significativamente diferentes do controle negativo. Os compostos HBZFX ORTO e HFXAR PARA apresentaram tempos médios de sangramento semelhantes ao AAS, 861s e 830s, respectivamente. Já o grupo administrado com o composto HFXAR ORTO demorou em média 1347s, valor superior ao controle negativo e ao próprio AAS.

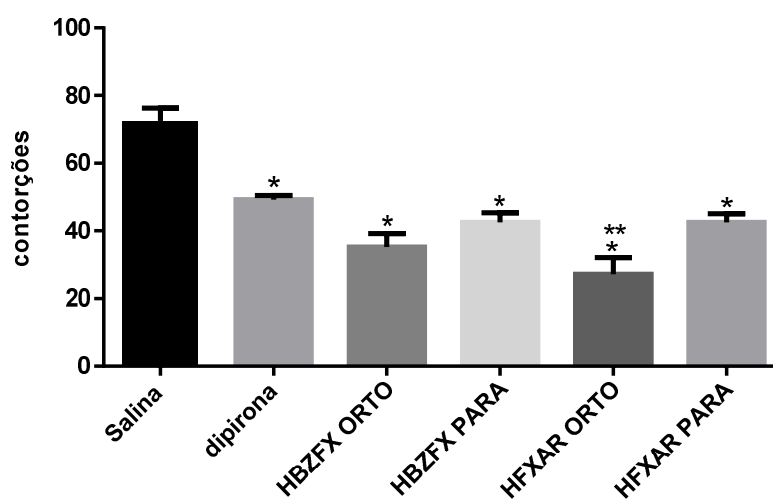
Os tempos de sangramento elevados apresentados pelos compostos podem ser consequentes das doses que os mesmos foram administrados. Com a redução das doses administradas, os compostos podem apresentar tempos de sangramento mais seguros e simultaneamente, doses menores poderiam diminuir possíveis efeitos colaterais. Um estudo de dose-resposta é necessário para demonstrar a dose ideal dos mesmos.

Entretanto, os derivados benzofuroxânicos apresentam menor tempo de sangramento que os derivados furoxânicos. Uma das possíveis explicações pode ser o fato de que benzofuroxanos não doam óxido nítrico da mesma forma que os derivados furoxânicos. O composto HBZFX PARÁ demonstrou tempo de sangramento inferior ao AAS, podendo assim ser mais seguro com relação ao uso como antitrombótico quando comparado ao AAS.

### **3.2.3 Avaliação da atividade analgésica**

Foi avaliada a atividade analgésica dos compostos utilizando o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético *in vivo*. O mesmo consiste em administração intra peritoneal (*i.p*) de ácido acético em camundongos e durante 20 minutos são contabilizadas o número de contorções realizadas pelo animal. Foi adotada a metodologia descrita por Lima et al., 2011, com adaptações. Os compostos foram administrados em concentração de 100  $\mu\text{mol/Kg}$ , 1 h antes do ensaio. Como controle positivo para inibição da analgesia foi utilizado dipirona sódica, e como controle negativo salina e suspensão de goma arábica (também utilizada como veículo para os compostos).

**Figura 32** – Determinação do grau de proteção analgésica demonstrado pelos compostos finais e dipirona.



**Tabela 13** – Número de contorções e potencial analgésico apresentado pelos diferentes compostos. \* indica diferença estatisticamente significativa comparado com dipirona ( $p < 0,05$ ).

| Composto          | Concentração ( $\mu\text{M/kg}$ ) | n | Contorções          | Potencial analgésico (%) |
|-------------------|-----------------------------------|---|---------------------|--------------------------|
| Controle negativo | -                                 | 5 | 72,50 $\pm$ 03,80   | -                        |
| dipirona          | 100                               | 5 | 49,17 $\pm$ 01,30*  | 32,18 $\pm$ 1,80         |
| HBZFX ORTO        | 100                               | 4 | 35,17 $\pm$ 4,50*   | 51,45 $\pm$ 5,56         |
| HBZFX PARA        | 100                               | 5 | 42,50 $\pm$ 02,91*  | 41,38 $\pm$ 4,01         |
| HFXAR ORTO        | 100                               | 4 | 27,17 $\pm$ 04,96** | 62,48 $\pm$ 6,85*        |
| HFXAR PARA        | 100                               | 5 | 42,50 $\pm$ 02,58*  | 41,38 $\pm$ 3,56         |

Todos os compostos apresentaram número de contorções menor do que a dipirona (média de 49,17 contorções), demonstrando que os mesmos possuem atividade analgésica. Entretanto, apenas o composto HFXAR ORTO apresenta

diferença estatística em relação a dipirona (27,17 contorções), demonstrando maior atividade analgésica. Os demais compostos apresentam atividade semelhante a dipirona, tendo diferença significativa do controle negativo.

Assim, com a realização de ensaios de contorção induzida por ácido acético foi determinado que os compostos também apresentam atividade analgésica, sendo que o composto HFXAR ORTO apresentam atividade significativamente maior do que o controle positivo utilizado como referência.

#### **4. Conclusões**

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os compostos planejados foram sintetizados com sucesso, obtendo rendimentos entre 38% e 99%, e suas estruturas foram confirmadas através de diferentes métodos analíticos como espectrofotometria na região do infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e análise bidimensional HSQC.

Através de ensaios *in vitro* de agregação plaquetária foi determinado que os mesmos atuam inibindo a via do colágeno na ativação plaquetária, sendo que o composto HBZFX ORTO demonstrou maior atividade do que os demais compostos sintetizados e tendo atividade significativamente melhor do que o AAS.

Em ensaios *in vivo* para a avaliação do tempo de sangramento, o candidato HBZFX PARA demonstrou tempo de sangramento semelhante ao controle negativo (salina), não demonstrando tempo exacerbado de sangramento, significando que o mesmo tem menores chances de desenvolver hemorragia, sendo assim possivelmente mais seguro que o controle positivo, AAS.

Também foi observado que os compostos apresentam atividade analgésica, onde em ensaios *in vivo* de contorção abdominal induzida por ácido acético, os compostos apresentaram potencial analgésico, enquanto o composto HFXAR demonstrou maior eficácia, apresentando potencial analgésico maior do que o controle positivo.

Estudos pré-clínicos mais aprofundados como toxicidade e farmacodinâmica ainda são necessários para que esses compostos possam ser eventualmente testados em ensaios clínicos. Através desse estudo demonstramos que os compostos *N*-acilhidrazônicos acoplados com doadores de óxido nítrico apresentam características que classificam-os como bons candidatos a fármaco para prevenção de aterotromboses.

## 5. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K. et al. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8<sup>a</sup> Edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 495–536

AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY. National Healthcare Quality Report. **Quality**, p. 1–221, 2011.

ANDRÉ, A. L. et al. Studies on antiplatelet agents from natural safrole. II. Synthesis and pharmacological properties of novel functionalized oxime O-benzylether derivatives. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 19–28, 1999.

ANGIOLILLO, D. J. et al. A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: Results of the OPTIMUS-2 study. **European Heart Journal**, v. 29, n. 18, p. 2202–2211, 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos**. 1<sup>a</sup> Edição ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 189–206

BOIANI, M.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 1, 2, 5-Oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: synthesis and biological evaluation. Part IV. **European journal of ...**, v. 36, p. 771–782, 2001.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **The Journal of Physiology**, v. 168, n. 1, p. 178–195, 1 ago. 1963.

BROCH, S. et al. Synthesis and biological activities of new di- and trimeric quinoline derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 19, p. 7132–7143, 2010.

BUCHANAN, M. R. et al. Shortening of the bleeding time in thrombocytopenic rabbits after exposure of jugular vein to high aspirin concentration. **Prostaglandins and medicine**, v. 3, p. 333–342, 1979.

CENA, C. et al. Antiinflammatory, gastrosparring, and antiplatelet properties of new NO-donor esters of aspirin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 747–754, 2003.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, p. 57–71, 2005.

CHOUDHURY, R. P.; FUSTER, V.; FAYAD, Z. A. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. November, p. 913–925, 2004.

CHELUCCI, R. C. **Obtenção de híbridos lapdesf fur-fd e atividade anti-inflamatória com potencial atividade neuroprotetora**. 2013.129 f. Tese (Mestrado

em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade estadual Paulista, Araraquara, 2013

CHESTER, M. R. et al. Differential progression of complex and smooth stenoses within the same coronary tree in men with stable coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 25, n. 4, p. 837–842, 1995.

CHINTALA, M. et al. SCH 602539, a protease-activated receptor-1 antagonist, inhibits thrombosis alone and in combination with cangrelor in a Folts model of arterial thrombosis in cynomolgus monkeys. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 11, p. 2143–2149, 2010.

COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF- $\kappa$ B: Pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 255–264, 2001.

FERRATINI, M.; MODICA, M.; SPEZZAFERRI, R. Living Wills and Therapeutic Remorselessness in Cardiology. **American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 553–554, 2008.

FRUTTERO, R.; FERRAROTTI, B.; SERAFINO, A.; DI STILO, A.; GASCO, A. Unsymmetrically substituted furoxans. Part 11. Methylfuroxancarbaldehydes. **J Heterocyclic Chem**, v.26: p. 1345–1347, 1989.

GM, N. D. AND C. NIH Public Access. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

GUTHIKONDA, S.; HAYNES, W. G. Homocysteine: Role and implications in atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 8, p. 100–106, 2006.

HEALEY, J. S. Pro: “Anti-platelet therapy is an alternative to oral anticoagulation for atrial fibrillation”. **Thrombosis and haemostasis**, v. 102, p. 912–913, 2009.

HO, S.-J.; BRIGHTON, T. A. Ximelagatran: direct thrombin inhibitor. **Vascular health and risk management**, v. 2, n. 1, p. 49–58, 2006.

HOLINSTADT, M.; YEUNG, J. Newer agents in antiplatelet therapy: a review. **Journal of Blood Medicine**, p. 33, 2012.

KASTRATI, A. et al. A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel. **The New England journal of medicine**, v. 350, n. 3, p. 232–238, 2004.

LEE, P.-Y. et al. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. **The American journal of medicine**, v. 118, p. 723–727, 2005.

LIBBY, P.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. December, p. 868–74, 2002.

LIMA, G. M. et al. Assessment of antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Asteraceae, aqueous extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. January 2008, p. 486–490, 2011.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 348–356, 2008.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, n. February, p. 914–918, 2008.

MANSOUR, K. et al. Aspirin resistance. **Advances in hematology**, v. 2009, p. 937352, 2009.

MASON, P. J.; JACOBS, A. K.; FREEDMAN, J. E. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, n. 6, p. 986–993, 2005.

MEDANA, C. et al. Furoxans as nitric oxide donors. 4-Phenyl-3-furoxan carbonitrile: thiol-mediated nitric oxide release and biological evaluation. **Journal of medicinal chemistry**, v. 37, p. 4412–4416, 1994.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. **World Health Organization**, p. 2–14, 2011.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 2005.

MORROW, D. A. et al. Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: Design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2??P)-TIMI . **American Heart Journal**, v. 158, n. 3, p. 335–341.e3, 2009.

NORIS, M. et al. Effect of acetate, bicarbonate dialysis, and acetate-free biofiltration on nitric oxide synthesis: implications for dialysis hypotension. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 32, n. 1, p. 115–124, 1998.

PATEL, R. T. et al. Platelet reactivity among Asian Indians and Caucasians. **Platelets**, v. 18, n. June, p. 261–265, 2007.

PRODRUGS, M. et al. ' . - 591 -. n. 111, p. 591–596, 1985.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, p. 1910–1939, 2007.

SCHWARZ, U. R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 1153–1161, 2001.



SHARMA, R. K. et al. Aspirin and clopidogrel hyporesponsiveness and nonresponsiveness in patients with coronary artery stenting. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 965–972, 2009.

SORBA, G. et al. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 463–469, 1997.

SUGIYAMA, Y. et al. A fluorous Mukaiyama coupling reagent for a concise condensation reaction: Utility of medium-fluorous strategy. **Tetrahedron**, v. 68, n. 20, p. 3885–3892, 2012.

TANTRY, U. S.; MAHLA, E.; GURBEL, P. A. Aspirin Resistance. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, n. 2, p. 141–152, 2009.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

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

WORLD HEALTH STATISTICS. Causes of death 2008 : data sources and methods. **World Health**, v. 2010, n. September 2010, p. 1–28, 2011.

XU, J.; KOCHANKE, K. D.; MURPHY, S. L. National Vital Statistics Reports Deaths : Final Data for 2007. **Statistics**, v. 58, n. 3, p. 135, 2010.

YOKOYA, K. et al. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year. **Circulation**, v. 100, n. 9, p. 903–909, 1999.

ZAFAR, M. U. et al. A novel anti-ischemic nitric oxide donor (LA419) reduces thrombogenesis in healthy human subjects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 1195–1200, 2007.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. **Blood Reviews**, v. 21, p. 99–111, 2007.

## ANEXO I

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 44/2013

Interessado: ARTHUR FLOHR SVENDSEN

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

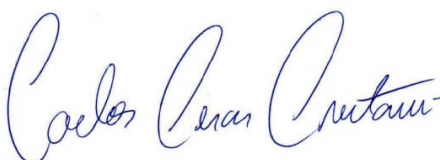
Projeto: Planejamento e síntese de novos derivados de ácido acetil salicílico com mecanismo múltiplo de ação para aterotrombose

### **Parecer nº 71/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 11 de dezembro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Planejamento e síntese de novos derivados de ácido acetil salicílico com mecanismo múltiplo de ação para aterotrombose”, apresentado pelo graduando ARTHUR FLOHR SVENDSEN, sob orientação do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2015 em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de dezembro de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA

## ANEXO II

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 45/2013

Interessado: ARTHUR FLOHR SVENDSEN

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Projeto: Planejamento e síntese de novos derivados de ácido acetil salicílico com mecanismo múltiplo de ação para aterotrombose

### **Parecer nº 72/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 11 de dezembro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Planejamento e síntese de novos derivados de ácido acetil salicílico com mecanismo múltiplo de ação para aterotrombose”, apresentado pelo graduando ARTHUR FLOHR SVENDSEN, sob orientação do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2015 em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de dezembro de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA

De acordo,

Aluno:



---

Arthur Flohr Svendsen

Orientador:



---

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara, 19 de maio de 2015