



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus Araraquara



Planejamento, síntese e avaliação da capacidade de doação de óxido nítrico  
de novos derivados antiinflamatórios.

Thaís Regina Ferreira de Melo

Araraquara, 2011



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus Araraquara



## Síntese e doação de óxido nítrico de novos derivados anti-inflamatórios não esteróides.

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.

Nome: Thaís Regina Ferreira de Melo  
Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara, 2011

"É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer, nem o valor de uma ação sem sabermos o sacrifício que ela comporta." (H. W. Beecher).

# Sumário

## Resumo

## Lista de Figuras

## Lista de Tabelas

## Lista de Espectros

## Lista de Esquemas

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|          |                                                                 |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução.....</b>                                          | <b>15</b> |
| 1.1.     | Agregação plaquetária e aterosclerose.....                      | 15        |
| 1.2.     | Terapia antiplaquetária.....                                    | 19        |
| 1.3.     | Modificações moleculares.....                                   | 22        |
| 1.4.     | Planejamento estrutural .....                                   | 23        |
| <b>2</b> | <b>Objetivos.....</b>                                           | <b>28</b> |
| 2.1.     | Objetivo geral.....                                             | 28        |
| 2.2.     | Objetivos específicos.....                                      | 28        |
| <b>3</b> | <b>Metodologia.....</b>                                         | <b>29</b> |
| 3.1.     | Material (Reagentes e solventes).....                           | 29        |
| 3.2.     | Metodologia sintética.....                                      | 29        |
| 3.2.1.   | Síntese dos derivados furoxânicos funcionalizados.....          | 29        |
| 3.2.2.   | Síntese dos derivados antiinflamatórios funcionalizados.....    | 30        |
| 3.2.3.   | Síntese dos compostos híbridos (produtos finais).....           | 31        |
| 3.3.     | Métodos Analíticos.....                                         | 32        |
| 3.3.1.   | Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.).....                   | 32        |
| 3.3.2.   | Espectrometria de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C..... | 32        |
| 3.3.3.   | Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV).....           | 32        |
| 3.3.4.   | Faixa de Fusão.....                                             | 32        |
| 3.4.     | Ensaio Biológicos.....                                          | 32        |
| 3.4.1.   | Detecção quantitativa de nitrito (SORBA et al 1997).....        | 33        |
| 3.4.2.   | Ensaio de atividade analgésica (CLOSE, B. et al 1996).....      | 34        |

|          |                                                                                 |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.3.   | Atividade antiagregante plaquetária (LIMA et al 2008).....                      | 35        |
| <b>4</b> | <b>Resultados e Discussão.....</b>                                              | <b>37</b> |
| 4.1.     | Síntese dos intermediários e produtos finais.....                               | 37        |
| 4.1.1.   | Caracterização estrutural dos intermediários furoxânicos funcionalizados.....   | 37        |
| 4.1.1.1  | Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV).....                           | 37        |
| 4.1.2.   | Caracterização estrutural dos derivados anti-inflamatórios funcionalizados..... | 39        |
| 4.1.2.1  | Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV).....                           | 39        |
| 4.1.3    | Caracterização estrutural das hidrazonas do derivado furoxânico metilado.....   | 44        |
| 4.1.3.1  | Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV).....                           | 44        |
| 4.1.3.2  | Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....                                        | 50        |
| 4.1.4    | Caracterização estrutural das hidrazonas do derivado furoxânico fenilado.....   | 62        |
| 4.1.4.1  | Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV).....                           | 62        |
| 4.1.4.2  | Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....                                        | 66        |
| 4.2.     | Resultados do Ensaio para mensuração de nitrito.....                            | 81        |
| 4.3.     | Resultados do Ensaio de atividade analgésica.....                               | 82        |
| 4.4.     | Resultados do ensaio de agregação plaquetária.....                              | 84        |
| <b>5</b> | <b>Conclusão.....</b>                                                           | <b>85</b> |
| <b>6</b> | <b>Perspectivas.....</b>                                                        | <b>86</b> |
| <b>7</b> | <b>Referências Bibliográficas.....</b>                                          | <b>87</b> |

## Resumo

A formação do trombo arterial, composto predominantemente por plaquetas, se dá sob condições de estresse de cisalhamento elevado, nos locais de lesão aterosclerótica vascular e fluxo sanguíneo perturbado e tem como consequência diminuição ou obstrução do calibre dos vasos dos diferentes órgãos podendo levar a eventos isquêmicos.

As doenças cardiovasculares são consideradas as principais causas de morte no mundo. Nesse contexto, estima-se que a aterosclerose/aterotrombose seja a causa primária de doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral representado mais de 50% das causas de mortes em países ocidentais .

É sabido que a aterosclerose, primeiro evento que predispõe à aterotrombose, é considerada um processo inflamatório crônico, e que a utilização de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) COX-1, melhor estabilizam a estrutura da placa ateromatosa impedindo o rompimento e a consequente formação do trombo.

Neste contexto, no presente trabalho foram obtidos de novos candidatos a fármacos com propriedades doadoras de NO e antiagregantes plaquetárias, através da estratégia de hibridação molecular dos AINEs contendo uma subunidade doadora de óxido nítrico, representada pelos furoxanos, e espaçada por uma subunidade N-acil hidrazônica. Dessa forma, a inibição da síntese de tromboxanos associada à doação de óxido nítrico permitiu atuação nas plaquetas através de um mecanismo múltiplo de ação com fins de diminuição da agregação plaquetária.

Os produtos intermediários e finais apresentaram bons rendimentos e foram caracterizados por técnicas analíticas as quais predisseram que as estruturas propostas foram obtidas. Todos os compostos se como doadores de óxido nítrico. Os compostos 1a e 3a apresentaram atividade analgésica superior a dipirona, utilizada como controle. No ensaio de agregação plaquetária “in vitro” o composto 1a apresentou inibição inibiu significativamente a agregação plaquetária.

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura1:</b> Ateroma presente em artéria aterosclerótica cuja ruptura leva à formação do trombo (adaptado de: LIBBY, 2002).....                                                                               | 16 |
| <b>Figura 2:</b> Principais alvos de ação dos fármacos nas plaquetas.....                                                                                                                                        | 21 |
| <b>Figura 3:</b> Mecanismo sugerido para liberação de NO pelos derivados furoxânicos.(Cerecetto & Porcal, 2005 ).....                                                                                            | 25 |
| <b>Figura 4 :</b> Gráfico da porcentagem de agregação do ensaio de inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de ratos através do método turbidimétrico induzido por ADP..... | 84 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (KBr).....              | 37 |
| <b>Tabela 2:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao 4-fenil -1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (KBr) .....            | 38 |
| <b>Tabela 3:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho do derivado 2-hidroxibenzohidrazida (KBr).....                                     | 40 |
| <b>Tabela 4:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos a 2-(6-metoxi-2-naftil)propanohidrazida (KBr) .....                      | 41 |
| <b>Tabela 5:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao 2-(6-metoxi-2-naftil)propanohidrazida(KBr).....                       | 42 |
| <b>Tabela 6:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao derivado {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil} acetohidrazida (KBr)..... | 43 |
| <b>Tabela 7:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao derivado 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida (KBr) .....             | 43 |
| <b>Tabela 8:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 1a (KBr).....                                                     | 45 |
| <b>Tabela 9:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 2a (KBr).....                                                     | 46 |
| <b>Tabela 10:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 3a (KBr).....                                                    | 47 |
| <b>Tabela 11:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 4a (KBr).....                                                    | 48 |
| <b>Tabela 12:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 5a (KBr).....                                                    | 50 |
| <b>Tabela 13:</b> Deslocamentos do produto 1a. ....                                                                                                 | 51 |
| <b>Tabela 14:</b> Deslocamentos do produto 1a .....                                                                                                 | 51 |
| <b>Tabela 15:</b> Deslocamentos do produto 2a. ....                                                                                                 | 54 |
| <b>Tabela 16:</b> Deslocamentos do produto final 3a .....                                                                                           | 56 |
| <b>Tabela 17:</b> Deslocamentos do composto final 4a .....                                                                                          | 58 |
| <b>Tabela 18:</b> Deslocamentos do produto final 5a .....                                                                                           | 61 |
| <b>Tabela 19:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 1b (KBr) .....                                         | 63 |
| <b>Tabela 20:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 2b (KBr) .....                                         | 64 |
| <b>Tabela 21:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 3b(KBr) .....                                          | 65 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 22:</b> Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 4b (KBr) ..... | 66 |
| <b>Tabela 23:</b> Deslocamentos relativos ao produto final 1b. ....                                         | 67 |
| <b>Tabela 24:</b> Deslocamentos relativos ao composto final 1b. ....                                        | 67 |
| <b>Tabela 25:</b> Deslocamentos relativos ao produto final 2b. ....                                         | 70 |
| <b>Tabela 26:</b> Deslocamentos relativos ao produto final 2b. ....                                         | 71 |
| <b>Tabela 27:</b> Deslocamentos do composto 3b. ....                                                        | 73 |
| <b>Tabela 28:</b> Deslocamentos do composto 3b. ....                                                        | 74 |
| <b>Tabela 29:</b> Deslocamentos do composto 4b.....                                                         | 77 |
| <b>Tabela 30:</b> Deslocamentos do composto 4b.....                                                         | 78 |
| <b>Tabela 31:</b> Porcentagem de doação de Nitrito (mol/mol).....                                           | 81 |
| <b>Tabela 32:</b> % de inibição da contorção abdominal (+ E.P.M).....                                       | 83 |

## Lista de Espectros

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Espectro 1:</b> Infravermelho do intermediário 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído(KBr). .....                           | 37 |
| <b>Espectro 2:</b> Infravermelho do intermediário 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído(KBr) .....                            | 38 |
| <b>Espectro 3:</b> Infravermelho do derivado 2-hidroxibenzohidrazida (KBr).....                                                       | 39 |
| <b>Espectro 4:</b> Infravermelho do derivado 2-(6-metoxi-2-naftil) propanohidrazida(KBr) .....                                        | 40 |
| <b>Espectro 5:</b> Infravermelho do derivado 3-benzoilfenil)propanohidrazida (KBr).....                                               | 41 |
| <b>Espectro 6:</b> Infravermelho do derivado {2-[(2,6diclorofenil)amino]fenil}acetohidrazida (KBr).....                               | 42 |
| <b>Espectro 7:</b> Infravermelho do derivado 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida(KBr) .....                                          | 43 |
| <b>Espectro 8:</b> Infravermelho do produto final 1a (KBr) .....                                                                      | 44 |
| <b>Espectro 9:</b> Infravermelho do produto final 2a (KBr) .....                                                                      | 46 |
| <b>Espectro 10:</b> Infravermelho do produto final 3a(KBr).....                                                                       | 47 |
| <b>Espectro 11:</b> Infravermelho do produto final 4a(KBr).....                                                                       | 48 |
| <b>Espectro 12:</b> Infravermelho do produto final 5a (KBr) .....                                                                     | 49 |
| <b>Espectro 13:</b> Ressonância Magnética Nuclear bidimensional do produto 1a, utilizando como solvente DMSOd <sub>6</sub> .....      | 52 |
| <b>Espectro 14:</b> Espectro ampliado do produto 1a entre as regiões de $\delta$ 8,8 - $\delta$ 6,7 ppm. ....                         | 53 |
| <b>Espectro 15:</b> Ressonância Magnética Nuclear $H^1$ do produto 2a utilizando como solvente o DMSOd <sub>6</sub> .....             | 55 |
| <b>Espectro 16:</b> Ressonância Magnética Nuclear (RMN $H^1$ )do produto final 3a utilizando como solvente o DMSOd <sub>6</sub> ..... | 56 |
| <b>Espectro 17:</b> Espectro ampliado na região entre 1,5 e 4,0 ppm.....                                                              | 57 |
| <b>Espectro 18:</b> Ressonância Magnética Nuclear $H^1$ do composto final 4a utilizando como solvente o DMSOd <sub>6</sub> .....      | 59 |
| <b>Espectro 19:</b> Espectro ampliado na região entre 1,0 e 1,5 ppm. ....                                                             | 60 |
| <b>Espectro 20:</b> Ressonância Magnética Nuclear (RMN $H^1$ ) do produto 5a utilizando como solvente o DMSOd <sub>6</sub> . ....     | 61 |
| <b>Espectro 21:</b> Infravermelho relativo ao produto final 1b (KBr).....                                                             | 62 |
| <b>Espectro 22:</b> Infravermelho relativo ao produto final 2b (KBr).....                                                             | 63 |
| <b>Espectro 23:</b> Infravermelho relativo ao produto final 3b (KBr).....                                                             | 64 |
| <b>Espectro 24:</b> Infravermelho relativo ao produto final 4b (KBr).....                                                             | 65 |

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Espectro 25:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^1\text{H}$ do composto final 1b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....    | 68 |
| <b>Espectro 26:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^{13}\text{C}$ do composto final 1b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ ..... | 69 |
| <b>Espectro 27:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^1\text{H}$ do produto final 2b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....     | 71 |
| <b>Espectro 28:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^{13}\text{C}$ do produto final 2b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....  | 72 |
| <b>Espectro 29:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^1\text{H}$ do produto final 3b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....     | 75 |
| <b>Espectro 30:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^{13}\text{C}$ produto final 3b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....     | 76 |
| <b>Espectro 31:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^1\text{H}$ do produto final 4b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....     | 79 |
| <b>Espectro 32:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^{13}\text{C}$ do produto final 4b utilizando como solvente o $\text{DMSO-d}_6$ .....  | 79 |

## Lista de Esquemas

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 1:</b> Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos 1-5 (a-b) contendo a subunidade espaçadora N-acilhidrazona..... | 27 |
| <b>Esquema 2:</b> Síntese do 4-metil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído.....                                                        | 30 |
| <b>Esquema 3:</b> Síntese do 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído. ....                                                       | 30 |
| <b>Esquema 4:</b> Síntese das hidrazidas dos antiinflamatórios.....                                                                    | 31 |
| <b>Esquema 5:</b> Síntese dos compostos híbridos.....                                                                                  | 31 |

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

|                     |                                              |
|---------------------|----------------------------------------------|
| AAS                 | Ácido acetil salicílico                      |
| AINEs               | Anti-inflamatórios não esteroidais           |
| AMP                 | Adenosina Monofosfato Cíclico                |
| AVC                 | Acidente Vascular Cerebral                   |
| CCD                 | Cromatografia em Camada Delgada              |
| COX                 | Enzima ciclo-oxigenase                       |
| FvW                 | Fator de Von Willebrand                      |
| GMP                 | Guanosina monofosfato cíclico                |
| HDL                 | Lipoproteína de alta densidade               |
| I.V.                | Espectrometria de Absorção no Infra Vermelho |
| KBr                 | Brometo de potássio                          |
| LDL                 | Lipoproteína de baixa densidade              |
| PGHS                | Prostaglandina endoperóxido sintase          |
| NO                  | Óxido nítrico                                |
| RMN <sup>1</sup> H  | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  |
| RMN <sup>13</sup> C | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono     |
| TXA <sub>2</sub>    | Tromboxano A <sub>2</sub>                    |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E ATEROSCLEROSE

A agregação plaquetária acontece nos locais de lesão vascular e fluxo sanguíneo dificultado ou turbilhonado. O rompimento da placa aterosclerótica leva a exposição da matriz extracelular e extravasamento do conteúdo pró-trombótico, permitindo adesão e ativação das plaquetas com formação de trombo subjacente (Figura1) (GOROG, D.A., SWEENEY & FUSTER., 2009). Através dos receptores da superfície plaquetária (receptor plaquetário glicoproteína Ib(GpIb), V/ IX /,integrinas) as plaquetas se aderem a endotélio pela interação com o Fator de von Willebrand(FvW). (KULKARNI, S., TENNO & SEGBHAN 2000)

As plaquetas, após ativação, participam ainda da cascata da coagulação ativando a via extrínseca através indução de fatores teciduais pró-coagulantes, como CD40/C40L e P-selectina/PSGL-1 e a via intrínseca através expressão de fosfatidilserina que se liga aos fatores VIIa/IXa e Va/Xa. (LINDMARK et al, 2000). A ativação da cascata de coagulação leva a produção de trombina que amplifica ativação plaquetária pelo aumento da expressão de fosfatidilserina na superfície das plaquetas através de uma via de retroalimentação positiva (MUHLESTEIN, 2010).

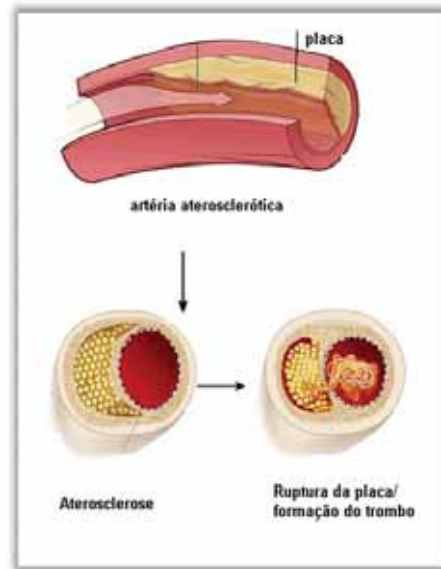


Figura1: Ateroma presente em artéria aterosclerótica cuja ruptura leva à formação do trombo (adaptado de: LIBBY, 2002).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e componentes fibrosos em artérias. Sabe-se que a mesma se apresenta não só como um simples acúmulo passivo de lipídeos na parede arterial, tido como conceito décadas atrás, mas sim como uma inflamação crônica. Nesse contexto, a doença engloba um processo complexo que envolve inflamação, distúrbios do metabolismo lipídico e ocorrência de eventos vasculares (FARMER & TORRE-AMIONE, 2002).

O início da doença se dá pela formação de ateroma nos vasos sanguíneos. Os ateromas são placas compostas por lipídeos e tecido fibroso que se formam na parede dos levando à diminuição ou obstrução do calibre dos vasos dos diferentes órgãos podendo levar a eventos isquêmicos como: síndrome coronária aguda, infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais entre outros. As placas podem ser instáveis, apresentando atividade inflamatória intensa com grande atividade proteolítica, capa fibrótica fina e núcleo lipídico proeminente e o rompimento desta leva a formação do trombo ou ainda estáveis que caracterizam-se por predomínio de colágeno organizado em capa fibrosa espessa com poucas células inflamatórias e núcleo lipídico em proporções menores. (YEH & KHAN, 2006).

Estima-se que a aterosclerose seja a causa primária de doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico (AVE). Em países ocidentais é tida como a causa de 50% das mortes (ROBERTS, 1995).

Sugere-se que o processo de aterosclerose seja iniciado pela agressão ao endotélio por diversos fatores como o estresse mecânico e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas. A LDL oxidada por mieloperoxidase, ceruloplasmina ou modulada por óxido nítrico é considerada um potencial fator de risco para a inflamação responsável por desencadear o efeito aterosclerótico (FARMER & TORRE-AMIONE, 2000). O endotélio agredido passa apresentar disfunções como maior aprisionamento de LDL no espaço subendotelial e o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial. Estas são responsáveis pela atração de monócito e linfócitos para a parede arterial. O LDL oxidado também desencadeia a produção de interleucina-1, este é fator estimulante para migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas células musculares migram para a camada íntima e iniciam a produção de citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular que formará a capa fibrosa da placa aterosclerótica. O LDL oxidado também pode causar a formação de microtrombos de plaquetas (MORA et al 1987).

O recrutamento e a adesão de células leucocitárias mononucleares que ocorre no ateroma em formação são mediados pela expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Entre as principais moléculas de adesão produzidas pelo endotélio e envolvidas na diminuição do rolamento das células destacam-se as selectinas, após a ativação leucocitária; moléculas de adesão intercelular produzidas pelo endotélio (ICAM-1, ICAM-2) e moléculas de adesão a células vasculares tipo 1 (VCAM-1) também participam da ativação inflamatória e promovem a adesão estável e a passagem dos leucócitos pelo endotélio. Estes leucócitos após adentrarem o ateroma transformam-se em células espumosas por meio de acúmulo de lipídeos. A regulação da expressão de moléculas de adesão também sofre uma

regulação negativa. O óxido nítrico, por exemplo, reduz a adesão leucocitária às artérias humanas (KHAN et al 1996).

Há íntima associação entre aterosclerose e aterotrombose, pois não raro os sintomas clínicos de um ateroma envolvem o evento trombótico. A aterotrombose é a causa mais comum de evento isquêmico agudo. Diversos fatores contribuem para a aterotrombose como, por exemplo: idade, raça, histórico familiar, fumo, hipertensão, diabetes, obesidade, inatividade física e dislipidemias elevação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL). A manifestação clínica da aterotrombose está ligada ao local arterial afetado e pode incluir síndrome coronária aguda, infarto agudo do miocárdio, infarto isquêmico e ataque de isquemia transiente. Nos Estados Unidos a aterotrombose é altamente prevalente. Cerca de 13 milhões de norte americanos possui doenças arteriais coronarianas, 5 milhões sobrevivem a infarto e 8-12 milhões possuem doença arterial periférica. Em 2004, estimou-se que os gastos do governo norte americano com doenças cardiovasculares custou cerca de 368 bilhões de dólares no ano (FAXON & NESTO, 2006).

Os processos relacionados à inflamação podem participar na erosão endotelial e indubitavelmente contribuir para a formação de trombos. Os mediadores inflamatórios e as lipoproteínas oxidadas podem estimular a expressão e produção de metaloproteinases que degradam componentes da membrana subendotelial promovendo a ruptura do endotélio. Após a lesão endotelial há exposição do colágeno subendotelial, aderência de plaquetas, exposição do fator tecidual e depleção local de prostaciclina. (LIBBY & AIKAWA, 2002; LIBBY, 2002).

A interação das plaquetas com os leucócitos e células endoteliais é uma das responsáveis pela associação entre inflamação e aterogênese. O papel das plaquetas no quadro inflamatório crônico presente na aterosclerose está relacionado à ativação, adesão das células

ao endotélio e liberação de mediadores inflamatórios e substâncias mitogênicas, que alteram a quimiotaxia, adesão e atividade proteolítica das células endoteliais. Durante a adesão ao endotélio as plaquetas ativadas liberam moléculas pró-inflamatórias e citocinas que ativam monócitos e aumentam seu recrutamento para a lesão aterosclerótica (SEMPLE & FREEDMAN, 2010).

Sendo a inflamação o papel central da aterotrombose agentes com atividades duais de ação: antiinflamatórios e antiagregantes plaquetários são fundamentais para prevenir a morbidade e mortalidade associadas à doença aterotrombótica vascular (MUHLESTEIN, 2010).

Devido à atividade essencial das plaquetas nas doenças tromboembólicas, os fármacos antiagregantes plaquetários possuem importante valor terapêutico como preventivos na aterotrombose. Diversos estudos têm demonstrando redução de morbidade e mortalidade por doenças aterotrombóticas com a utilização desses agentes. Ademais, um grande número de evidências sugere que a utilização da terapia antiplaquetária por longos períodos pode exercer efeito benéfico não somente na diminuição da ativação plaquetária, mas também pela redução da inflamação associada (KEREIAKES, 2003; MICHELSON, 2010).

## 1.2. TERAPIA ANTIPLAQUETÁRIA

A terapia antiagregante plaquetária inclui: inibidores da biossíntese de tromboxanos, antagonistas de receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub>, antagonistas de integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 e antagonistas de trombina. A terapia antiagregante mais utilizada usa ácido acetil salicílico (AAS) e clopidogrel, isoladamente ou em associação (MICHELSON, 2010).

O AAS inibe irreversivelmente a enzima prostaglandina endoperoxídeo sintase (PGHS), também denominada cicloxigenase (COX), impedindo a formação de TXA<sub>2</sub> nas plaquetas ativadas. O tromboxano é um potente indutor da agregação plaquetária e a

diminuição de seus níveis pelo AAS constituem uma importante abordagem terapêutica para prevenção de doenças tromboembólicas. O AAS é considerado ainda a terapia padrão nos eventos isquêmicos agudos e na prevenção secundária. A longo prazo, um dos inconvenientes de sua utilização são os efeitos gastrintestinais podendo causar ulceração e sangramento. Estudos ainda apontam que uma série de indivíduos apresenta “resistência” ao fármaco não respondendo à terapia adequadamente (CUNHA et al 2003; SHARMA et al 2009).

Os antagonistas do receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub> representados pelos pró-fármacos ticlopidina e clopidogrel representam outra classe de antiagregantes plaquetários. A ticlopidina inibe irreversivelmente esse receptor e possui curto tempo de meia-vida com longa duração de ação. Entretanto, seu uso clínico está restrito devido a presença de efeitos adversos como desconforto gastrointestinal e, mais gravemente, o surgimento de neutropenia e trombocitopenia. O clopidogrel, pertencente à classe das tienopiridinas, é um agente antitrombótico cuja aplicação clínica está bem estabelecida nas síndromes coronarianas agudas e nas intervenções coronarianas percutâneas. Apresenta eficácia semelhante a do AAS na prevenção secundária ao infarto. (MICHELSON, 2008; HAMILTON, 2008).

A classe de inibidores da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, receptor do fibrinogênio e do fator Von Willebrand (fvW), age inibindo a via final comum na agregação plaquetária. A ação desses fármacos bloqueia a agregação plaquetária induzida por qualquer agonista e, por isso, essa classe é constituída pelos antiplaquetários mais potentes disponíveis atualmente, como o tirofibrano, abciximabe e a eptifibatida. Entretanto, apresentam alguns inconvenientes farmacocinéticos relacionados à baixa biodisponibilidade oral limitando a utilização por via parenteral e também efeitos adversos como trombocitopenia e elevadas taxas de sangramento (HAMILTON, 2008).

Os antagonistas da ação da trombina, representados por fármacos como ximelagatran, atuam inibindo as diversas ações deste polipeptídeo plasmático como: promoção da agregação

plaquetária, formação de fibrina através da ação catalítica de conversão do fibrinogênio em fibrina, ativação do fator XIII responsável pela ligação cruzada de fibrina entre outros. Os inibidores da ação da trombina na agregação plaquetária esta relacionada à ativação dos receptores de protease ativados PAR-1 e PAR-4 (HO & BRIGHTON, 2006).

Importante abordagem terapêutica na inibição da agregação plaquetária é o aumento dos níveis dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc, os quais interferem em todas as vias da agregação e tem como estimuladores o óxido nítrico e a prostaciclina respectivamente para guanilato ciclase e adenilato ciclase (Figura 2). Clinicamente, os inibidores de fosfodiesterase (ex. dipiridamol e cilostazol) têm sido utilizados em baixas dosagens, geralmente em associação com outros antiagregantes. O objetivo é obter sinergismo de ação por aumentar os níveis desses nucleotídeos cíclicos, inibindo a função plaquetária sem interferir na musculatura lisa (SCHWARZ et al 2001).

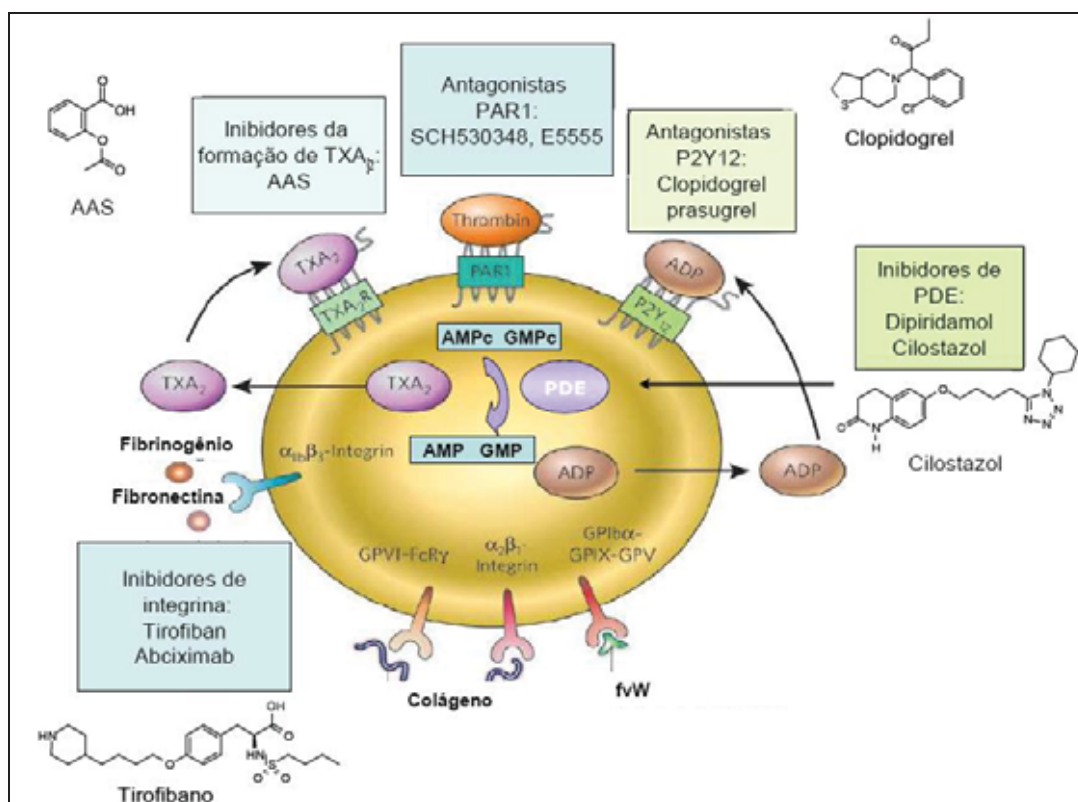


Figura 2: Principais alvos de ação dos fármacos nas plaquetas. (Adaptado de COSTA, 2008).

Uma vez que as terapias disponíveis se apresentam insuficientes para o controle efetivo dos eventos vasculares, tanto a descoberta de novos alvos terapêuticos como a de fármacos que atuem em mais de um alvo terapêutico, constituem-se abordagens importantes para o desenvolvimento de novos agentes antiplaquetários.

### 1.3. MODIFICAÇÕES MOLECULARES

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos a modificação molecular se mostra como uma das mais promissoras (WERMUTH, 2004). Entre os processos de modificação molecular destacam-se: hibridação, latenciação, bioisosterismo entre outros (SANTOS, 2007; BARREIRO, & FRAGA, 2001; CHUNG et al., 2005)

A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas de dois ou mais compostos bioativos distintos, em uma única molécula. Essa estratégia tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (STRUPEZEWSKI, 1991).

Alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças podem, por suas características, sugerir a necessidade de se desenharem bioligantes ou protótipos onde sejam incluídas, na mesma molécula, com duas ou mais propriedades farmacodinâmicas, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Neste caso, o desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve considerar fatores estruturais mais complexos, de maneira a assegurar à mesma molécula planejada o reconhecimento molecular por dois ou mais alvos terapêuticos, simultaneamente, aumentando a eficiência terapêutica.

#### 1.4. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Utilizando a estratégia de hibridação molecular foi planejada uma nova série de estruturas químicas contendo as subunidades farmacofóricas: a) dos protótipos antiinflamatórios: ácido salicílico, cetoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno, representadas pela subunidade (A); b) a subunidade N-acil-hidrazônica; (B) utilizada como agente espaçador e; c) o núcleo furoxânico (C) como doador de óxido nítrico (Esquema 1).

A inflamação possui papel importante na fisiopatologia da aterosclerose sugerindo que a utilização de AINEs como preventivo em doses anti-inflamatórias poderia reduzir as manifestações clínicas da doença arterial coronariana (ROSS, 1999; RIDKER et al 2000).

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) inibidores da enzima ciclo-oxigenase (COX-1), presente nas plaquetas podem inibir, ao contrário do AAS, reversivelmente a produção de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Nas doses em que são usados como analgésicos os AINEs inibem reversivelmente a atividade da COX-1 nas plaquetas em torno de 70-80% (PATRONO et al 2004).

Ao contrário dos fármacos inibidores seletivos da COX-2 que não inibem a síntese de tromboxanos nas plaquetas, alguns fármacos COX-1 não seletivos como o naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno, meloxicam demonstram esse potencial. Alguns trabalhos mostram que o naproxeno, por exemplo, suprime a produção de tromboxano e inibe a agregação plaquetária em 88% (VAN HECKEN et al 2000; CARR et al 1986). Embora promissor este nível de inibição da síntese de tromboxanos é insuficiente para bloquear adequadamente a agregação plaquetária “in vivo” sendo, portanto, necessárias estratégias para aumentar a inibição quase completa da atividade agregante de inibidores reversíveis (PATRONO et al 2004; PATRONO et al 2001; MASFERRER & NEEDLEMAN, 2000). Portanto, para fins de otimização os AINEs tidos como mais promissores na inibição de tromboxano A<sub>2</sub> foram selecionados com objetivo de aumentar a atividade antiagregante plaquetária de um inibidor

reversível visando melhor controle de eventos hemorrágicos associados ao uso de inibidores irreversíveis e a diminuição do processo inflamatório presente na aterosclerose. O controle do processo inflamatório auxilia na melhor estabilização da placa aterosclerótica, retardando ou impedindo sua ruptura.

Muitos estudos têm demonstrado que a presença da subunidade *N*-acil hidrazona confere aos compostos aumento na atividade antiagregante plaquetária em ensaios de indução de agregação por fator de agregação plaquetária. Acredita-se que existe melhor reconhecimento pela COX-1 dessa subunidade e consequentemente melhor perfil de inibição da enzima reduzindo a formação de tromboxano A<sub>2</sub> (CUNHA et al 2003; FRAGA et al 2000; SILVA et al 2004). Outro mecanismo proposto é baseado na propriedade quelante da subunidade *N*-acil hidrazona a qual tem sido associada com o sequestro de cálcio intracelular das plaquetas o que interfere no processo de ativação e agregação (TODESCHINI et al 1998).

O furoxano e derivados (*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) apresentam propriedades químicas e biológicas antimaláricas, antimicrobianas, antichagásicas, antineoplásicas, antiagregantes plaquetárias, vasodilatadores entre outras e todas estas atividades estão relacionadas com a capacidade de doação de óxido nítrico (NO) pela subunidade furoxânica.(CERECETTO & PORCAL, 2005).

Devido às suas propriedades vasodilatadoras, a capacidade de doação de NO foi estudada para obter novas substâncias com esse perfil farmacológico (CENA et al., 2004). Alguns estudos desenvolvidos recentemente propõe que o mecanismo de liberação de NO seja cisteína-dependente conforme esquematizado na Figura 3.

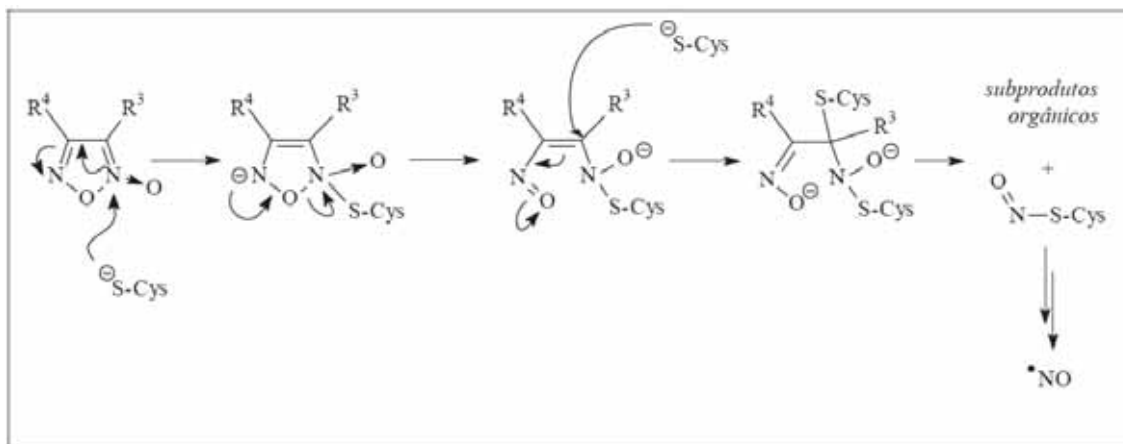


Figura 3: Mecanismo sugerido para liberação de NO pelos derivados furoxânicos. (CERECETTO & PORCAL, 2005)

No mecanismo apresentado na Figura 3, observamos que para que a doação de NO aconteça, inicialmente o enxofre da cisteína faz o ataque ao nitrogênio N-óxido. Ocorre, então, a abertura do anel furoxânico e após isto há outro ataque nucleofílico de um resíduo de cisteína ao carbono alfa da subunidade N-óxido, levando a formação de subprodutos que culminam com a formação e liberação de NO. Deste modo, se pode propor que substituintes introduzidos no carbono alfa a subunidade N-óxido que retirem densidade eletrônica, e sejam favoráveis estericamente, tornam o átomo de carbono mais deficiente do ponto de vista eletrônico e mais suscetível ao ataque do nucleófilo. Observou-se que a maior doação de NO está relacionada à presença de grupos eletroatratores ligados ao carbono alfa ligado ao N-óxido, mostrando que, de fato, a capacidade de doação de NO se relaciona com o substituinte deste carbono. (SORBA et al., 1997).

O óxido nítrico está envolvido em diversos processos vasculares como diminuição da expressão de citocinas induzidas pelo fator tissular, hiperplasia da camada íntima após lesão do endotélio vascular, adesão dos monócitos ao endotélio, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (pelo seqüestro de radicais lipídicos propagatórios), vasodilatação e inibição da adesão e agregação plaquetária. Os receptores intracelulares via guanilato ciclase solúvel que catalisa a formação do segundo mensageiro 3',5'-guanosina monofosfato (GMPc) são os mediadores de muitas destas respostas. (ZAFAR et al 2007).

Quando a biodisponibilidade de NO é reduzida, leva à disfunção endotelial, com início e progressão do processo aterogênico, instabilidade da placa e formação do trombo. Alguns relatos mostram que pacientes com síndrome coronária aguda apresentam aumento do estresse oxidativo e diminuição da produção de NO (FREEDMAN et al 1998).

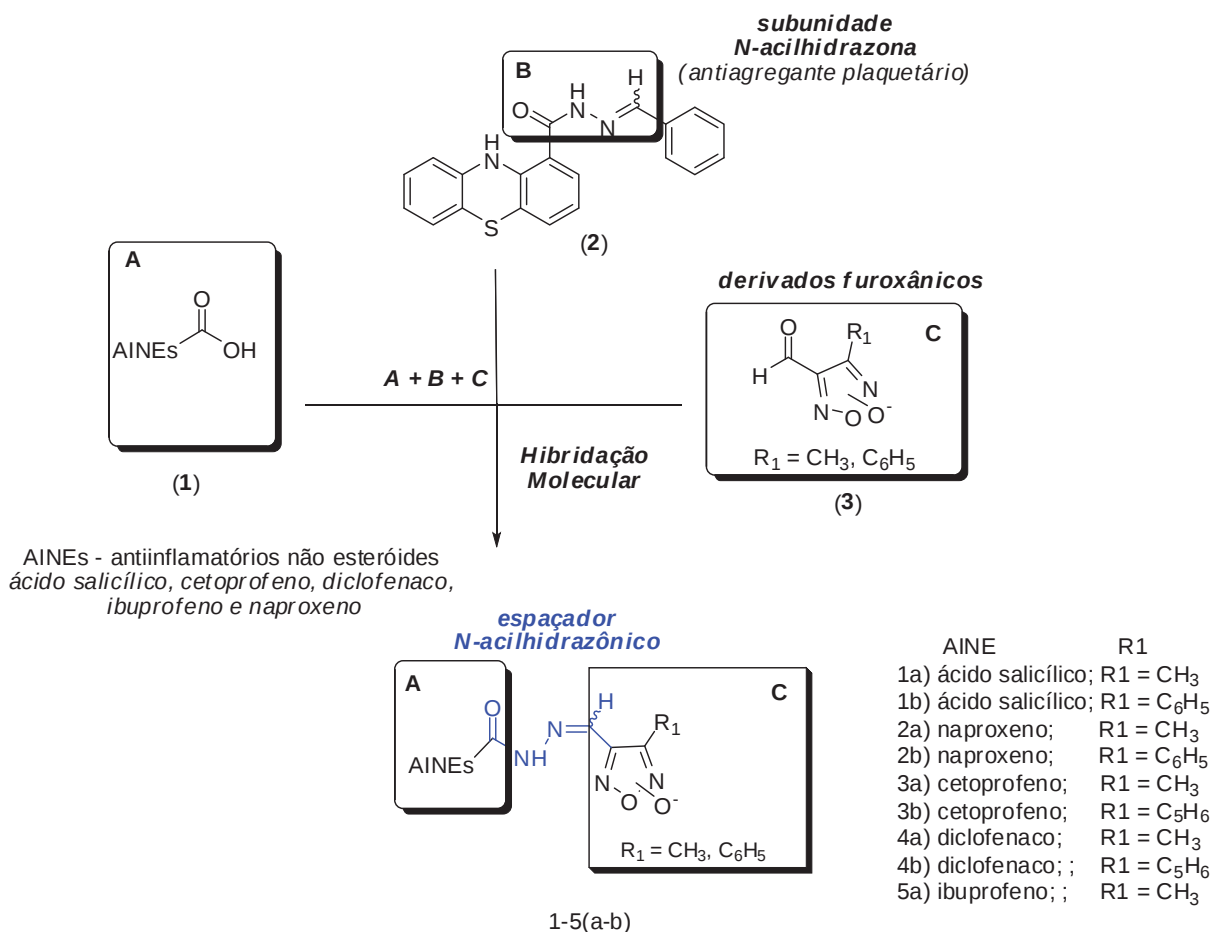
Muitos relatos da literatura demonstram que os eventos trombóticos da aterotrombose diminuem significativamente com compostos que apresentam propriedades doadoras de óxido nítrico, devido à manutenção dos níveis de NO, como derivados do ácido acetilsalicílico tendo uma função éster de nitrato que apresentaram melhora na reperfusão e atividade antitrombótica (VOETSCH et al 2004; RUSSO et al 2002). Alguns híbridos de anti-inflamatórios contendo subunidades doadoras de NO demonstraram melhor ou comparável perfil analgésico, anti-inflamatório e ainda a ausência de gastrotoxicidade. (CENA et al 2003; VELAZQUEZ et al 2005; VELÁZQUEZ et al 2008; CHIORILI et al 2003; LAZZARATO et al 2008; ABDELLATIF et al 2009) .

Atualmente, fazendo uso da hibridação molecular, tem sido explorado como doadora de NO a subunidade furoxânica em vários processos fisiopatológicos nos quais a presença desse mediador é importante. Deste modo, atividades farmacológicas duplas podem ser associadas em uma mesma estrutura química e quando planejadas adequadamente trazem benefícios para o tratamento de determinadas doenças como, por exemplo, a aterotrombose (CENA et al., 2004).

A inibição da síntese de tromboxanos associada à capacidade de doação de óxido nítrico utilizando espaçadores N-acil hidrazônicos representa uma abordagem diferenciada para o tratamento e prevenção dos eventos tromboembólicos.

Assim, utilizando a estratégia de hibridação molecular planejou-se uma série de compostos híbridos, contendo os antiinflamatórios não esteróides: ácido salicílico, diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno, e os derivados furoxânicos com perfis diferenciados de

doação de óxido nítrico espaçados pela subunidade *N*-acilhidrazona. Pretendeu-se assegurar o caráter múltiplo de ação antecipado como benéfico para a terapia antiplaquetária na prevenção e tratamento da aterotrombose.



Esquema 1: Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos 1-5 (a-b) contendo a subunidade espaçadora *N*-acilhidrazona.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho visa à pesquisa de novos compostos para tratamento e prevenção da aterotrombose através do planejamento, síntese e avaliação farmacológica de candidatos a fármacos potencialmente úteis como antiagregantes plaquetários.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Síntese, purificação e caracterização estrutural dos intermediários sintéticos.
- Síntese, purificação e caracterização estrutural dos compostos híbridos.
- Avaliação da capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos.
- Avaliação da atividade antiagregante plaquetária dos compostos híbridos.
- Avaliação da atividade analgésica em ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. MATERIAL (REAGENTES E SOLVENTES)

Acetato de etila, ácido acético, ácido clorídrico 37%, ácido salicílico, ácido fosfórico, adenosina difosfato, álcool trans-cinâmico, cetoprofeno, cisteína, clorofórmio, crotonaldeído, diclofenaco, diclorometano, dimetilsulfóxido, dinitrato de isossorbida, etanol, hexano, hidrato de hidrazina 64%, ibuprofeno, metanol, naproxeno, nitrito de sódio, sílica para coluna.

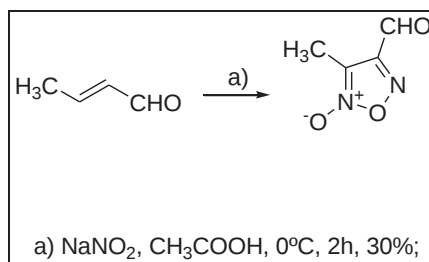
#### 3.2. METODOLOGIA SINTÉTICA

A metodologia de síntese dos intermediários e produtos finais está inserida no anexo I

##### 3.2.1. Síntese dos derivados furoxânicos funcionalizados

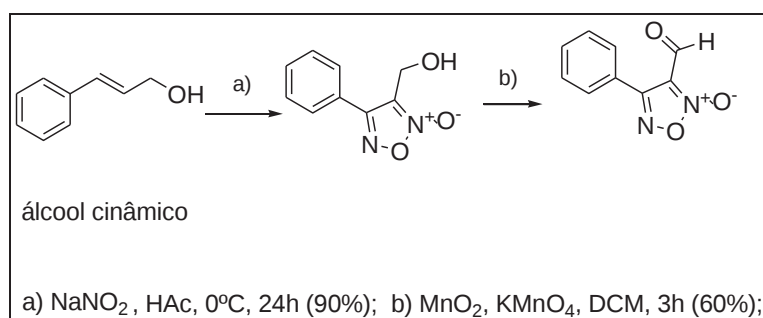
Para a obtenção dos derivados furoxânicos levou-se em conta o substituinte presente no carbono alfa à subunidade N-óxido, pois se sabe que a doação de óxido nítrico por parte dos derivados furoxânicos depende do efeito eletrônico deste substituinte. Assim, foram selecionados dois substituintes: um eletroretirador e outro eletrodoador representados respectivamente pelo grupo fenila e pelo grupo metila. Dessa forma, se pretendeu obter padrões diferenciados de doação de NO e foram traçados a relação entre o padrão de doação e a atividade antiagregante plaquetária pretendida (CERECETTO & PORCAL, 2005).

Para obtenção do derivado 4-metil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído (Esquema 2) se reagiu crotonaldeído com nitrito de sódio em meio com ácido acético, conforme procedimento previamente descrito, para obter o derivado furoxânico com rendimento de 30% (Esquema 1) (SANTOS, 2009; MONGE et al 1998).



Esquema 2: Síntese do 4-metil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído.

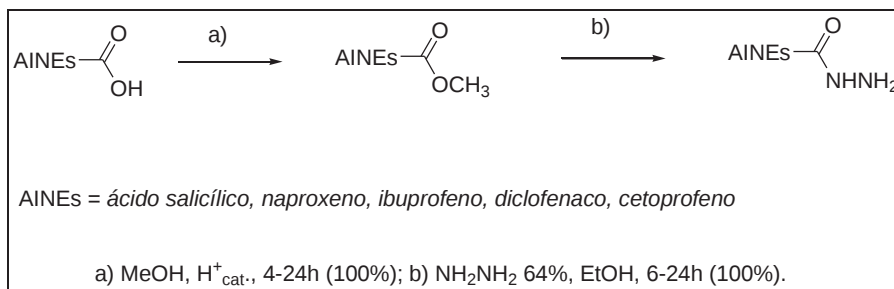
O segundo derivado furoxânico (4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído) foi obtido através da reação do álcool trans-cinâmico com nitrito de sódio em meio com ácido acético com rendimento descrito como sendo de 90% (MONGE et al 1998). A função álcool foi oxidada à função aldeído usando como agente oxidante a mistura dióxido de manganês/permanganato de potássio em clorofórmio com rendimento descrito como sendo de 60% (Esquema 3) (MONGE et al 1998; ADAMS & LUZZIO, 1989).



Esquema 3: Síntese do 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído.

### 3.2.2. Síntese dos derivados antiinflamatórios funcionalizados

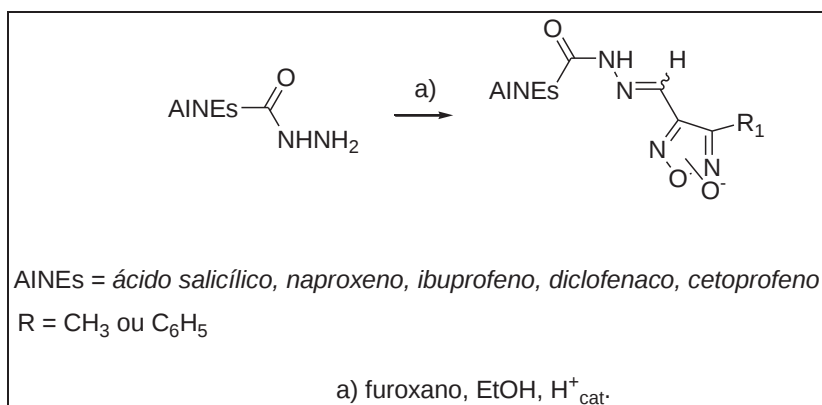
A função ácido carboxílico presente nos derivados anti-inflamatórios foi inicialmente esterificada ao éster metílico em meio contendo metanol catalisado por ácido. Posteriormente, o derivado éster metílico foi reagido com hidrato de hidrazina 64%, através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, para obtenção das hidrazidas dos anti-inflamatórios conforme procedimento previamente descrito (Esquema 4) (VIZIOLI et al 2009).



Esquema 4: Síntese das hidrazidas dos antiinflamatórios.

### 3.2.3. Síntese dos compostos híbridos (produtos finais)

A última etapa reacional envolveu a reação de acoplamento entre os derivados furoxânicos contendo a função aldeído e os derivados antiinflamatórios não esteróides contendo a função hidrazida com fins de obter a subunidade *N*-acil hidrazona. Essa reação pode ser realizada em meio etanólico ou metanólico catalisado por ácido e levou a obtenção dos compostos híbridos espaçados pela subunidade *N*-acil-hidrazona (Esquema 5) (CUNHA et al 2003; BARREIRO et al 2002; LIMA et al 2008).



Esquema 5: Síntese dos compostos híbridos

### 3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.)

Utilizou-se cromatografia em camada delgada para o acompanhamento das reações. Foram utilizadas placas de sílica gel G-60, com 0,25 mm de espessura, e placas Alugram Nano-Sil G/UV 254 da Merck para o acompanhamento das reações com o seguinte sistemas solventes: Hexano/Acetato de Etila (70:30), Hexano/Acetato de Etila (50:50)

#### 3.3.2. Espectrometria de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), utilizando-se espectrômetro, Brüker, modelo Advance DPX300 - 300 MHz.

#### 3.3.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no IV, na região de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro Shimadzu.

#### 3.3.4. Ponto de Fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas, sem correção, em aparelho de Ponto de fusão capilar “Electrothermal”

### 3.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os experimentos utilizando animais foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara e receberam parecer favorável à sua execução conforme protocolos CEP/FCF/CAr nº 05/2010 e CEP/FCF/CAr nº 06/2010, ANEXO II.

#### **3.4.1. Ensaio de atividade “in vitro” . Detecção quantitativa de nitrito (SORBA et al 1997)**

O NO em solução rapidamente se oxida em nitritos e nitratos, por isso a quantificação da concentração de nitrito é uma forma indireta de mensurar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos.

Primeiramente foram preparadas as amostras pesando-se 0,0001 mol de cada hidrazona e do padrão utilizado, dinitrato de isossorbida, a serem testados, e solubilizou-os em 1 mL de dimetilsulfóxido cada um em um tubo de ensaio.

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

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

Em seguida foi preparado reagente de Griess em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 4g de sulfonamida, 0,2g de dicloridrato de N-naftiletilenodiamina, 20 mL de água destilada e 10 mL de ácido fosfórico. O volume final do balão foi completado para 100 mL.

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

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

Uma solução do respectivo derivado furoxânico e padrões (20µL) em DMSO foi adicionado a tubo contendo 2 mL de tampão fosfato 50mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína, e ainda na ausência de cisteína. A concentração final do composto foi 10<sup>-4</sup>M. Após 1 hora a 37°C, 1 mL dessa solução foi tratada com 250µL do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro UV/visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) mol/mol ± E.P.M.

### 3.4.2. Ensaio de atividade analgésica (CLOSE, B. et al 1996)

A atividade analgésica periférica dos compostos foi avaliada no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%, conforme previamente descrito. (COLLIER et al 1968) Neste ensaio os animais são pré-tratados com os compostos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a por via oral na concentração de 100 µmol/kg (0,1 mL/20g) ou com o fármaco padrão dipirona (v.o.; 100 µmol/kg; 0,1 mL/20g). No grupo controle negativo é administrado por via oral suspensão de goma arábica 5%. Após 1 hora da administração das substâncias é injetada por via intraperitonal uma solução de ácido acético 0,6% (0,1mL/10g camundongo) e registra-se durante 30 minutos o número de contorções. A diminuição do número de contorções está relacionada à atividade analgésica periférica dos compostos, e é expressa pela fórmula:

$$\% \text{ atividade analgésica} = n - n' / 100n$$

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

A atividade analgésica foi expressa como % da inibição das contorções quando comparado com o grupo controle. Os resultados foram expressos como médias + E.P.M. do

número de animais por grupo. Os dados foram estatisticamente analisados pelo teste t-Student para um nível de significância  $*p < 0,05$ .

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

Foram utilizados 6 grupos de animais: contendo cada um 6 camundongos de linhagem Swiss, machos, de idade entre 6 a 8 semanas, peso médio de 20 a 30 gramas, do biotério de Botucatu, com padrão sanitário convencional, totalizando 36 animais.

A eutanásia foi feita em câmara de  $\text{CO}_2$ , pois o mesmo em concentrações acima de 70% atua como anestésico e produz rápida perda da consciência. É tido como um procedimento de eutanásia aceitável para rato. (CLOSE, B. et al 1996).

### **3.4.3. Atividade antiagregante plaquetária (BORN & CROSS , 1962)**

O método turbidimétrico foi utilizado conforme descrito por BORN & CROSS (1962). Ratos Wistar machos (270-340g) foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da artéria aorta. Para obtenção de plaquetas lavadas, o sangue dos ratos foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12.4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). Primeiramente o PRP foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 13 min a 800 g. O precipitado plaquetário foi ressuspensão em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 g por 13 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de

Ca<sup>++</sup> (NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, KCl 4,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,17 mM, glicose 5,6 mM) e o número de plaquetas foi ajustado para 1,2 x 10<sup>8</sup> plaquetas/mL através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM. Para avaliação do ensaio de agregação plaquetária foi usado o método turbidimétrico . 400µl de solução contendo as plaquetas foram transferidas para a cubeta de agregação e avaliada usando o equipamento agregômetro de 1 canal (Qualitem, São Paulo, Brasil). O aparelho foi calibrado para 0% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer). Em seguida a agregação foi induzida pelos diferentes indutores: ADP (3-10 mM), AA (200 µM), colágeno (5 µg/ml) e trombina (30-100 mU/mL) e monitorada por 10 min.

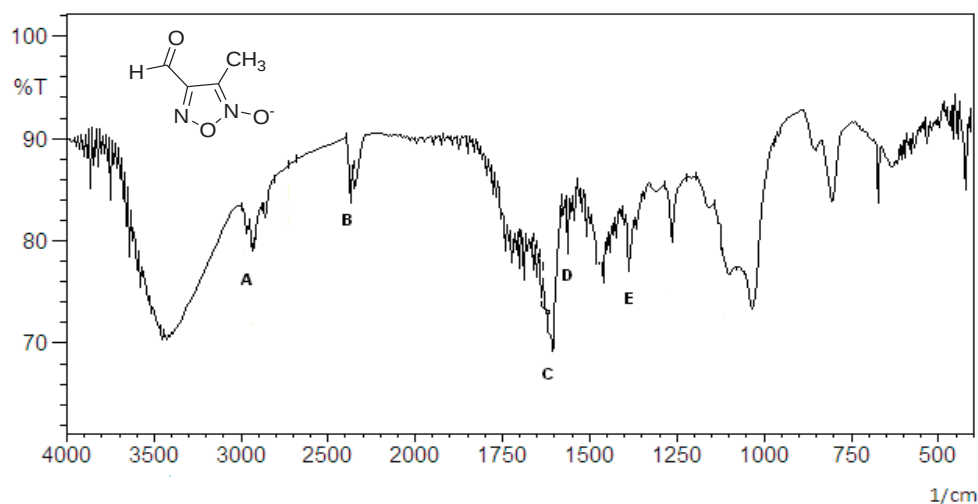
As substâncias teste e o veículo empregado (DMSO) foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição do agente agregante. A concentração de DMSO na amostra não ultrapassou o limite de 1% para não ocorrer interferência nos resultados. As amostras foram analisadas em triplicata e realizados em 3 experimentos independentes para cada substância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS E PRODUTOS FINAIS.

#### 4.1.1. Caracterização estrutural dos intermediários furoxânicos funcionalizados.

##### 4.1.1.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)



Espectro1: Espectro na região do Infravermelho do intermediário 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído(KBr).

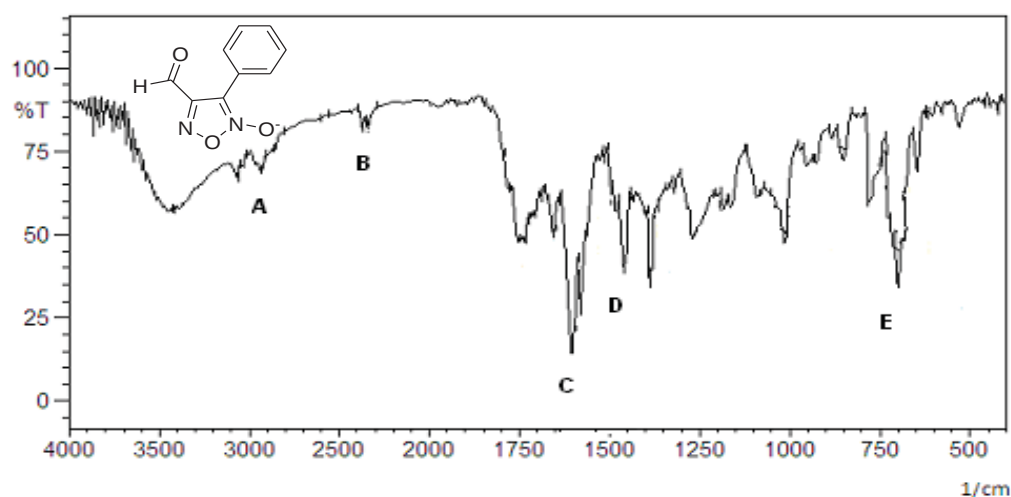
Tabela 1: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (KBr).

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico   | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|------------------------|--------------------|
| A        | 2924,21               | C-H (Aromático)        | Axial              |
| B        | 2360,01               | C-H <sub>aldeído</sub> | Axial              |
| C        | 1609,67               | C=O                    | Angular            |
| D        | 1570,71               | N-O (N-óxido)          | Angular            |
| E        | 1375,20               | CH <sub>3</sub>        | Angular Simétrica  |

Os espectros de absorção no infravermelho de todos os derivados furoxânicos funcionalizados apresentaram funções que caracterizam esses compostos. Tais estiramentos

podem ser observados na deformação axial em  $2360\text{ cm}^{-1}$  que caracteriza a ligação C-H da função aldeído. A função N-O ( N-óxido ) destes compostos também podem ser visualizada nestes nos espectros nas deformações axiais em  $1577\text{ cm}^{-1}$ ,  $1575\text{ cm}^{-1}$  e  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Em 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído podemos observar a deformação provocada pelo estiramento angular simétrico da metila em  $1375\text{ cm}^{-1}$ .

Em aproximadamente  $3400\text{ cm}^{-1}$  podemos observar a deformação provocada pelo OH referente a água contida no KBr, utilizado no preparo da amostra, devido ao excesso de umidade.



Espectro 2: Espectro na região do Infravermelho do intermediário 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído(KBr)

Tabela 2: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao 4-fenil -1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (KBr)

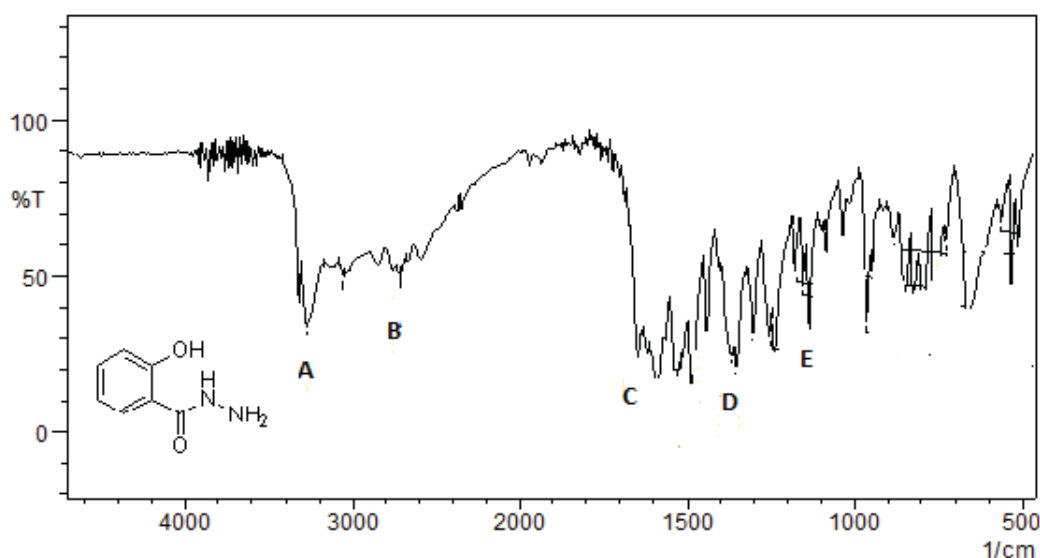
| Marcador | V ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Grupo característico   | Tipo de deformação |
|----------|------------------------|------------------------|--------------------|
| A        | 3061,16-2924,10        | C-H aromático          | Axial              |
| B        | 2336,86                | C-H <sub>aldeído</sub> | Axial              |
| C        | 1600,02                | C=O                    | Axial              |
| D        | 1577,84                | N-O (N-óxido)          | Angular            |

|   |           |                  |         |
|---|-----------|------------------|---------|
| E | Aromático |                  |         |
|   | 697,30    | Monossubstituído | Angular |

Os espectros de absorção no infravermelho de todos os derivados furoxânicos funcionalizados apresentaram funções que caracterizam esses compostos. Tais estiramentos podem ser observados nas deformações axiais em  $2336\text{ cm}^{-1}$ ,  $2360\text{ cm}^{-1}$  e  $2371\text{ cm}^{-1}$  que caracterizam a ligação C-H da função aldeído. A função N-O ( Nóxido ) destes compostos também podem ser visualizada nestes nos espectros nas deformações axiais em  $1577\text{ cm}^{-1}$ ,  $1575\text{ cm}^{-1}$  e  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Em 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído podemos observar o estiramento da fenila monossubstituída em  $697,30\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.2. Caracterização estrutural dos derivados anti-inflamatórios funcionalizados

##### 4.1.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)

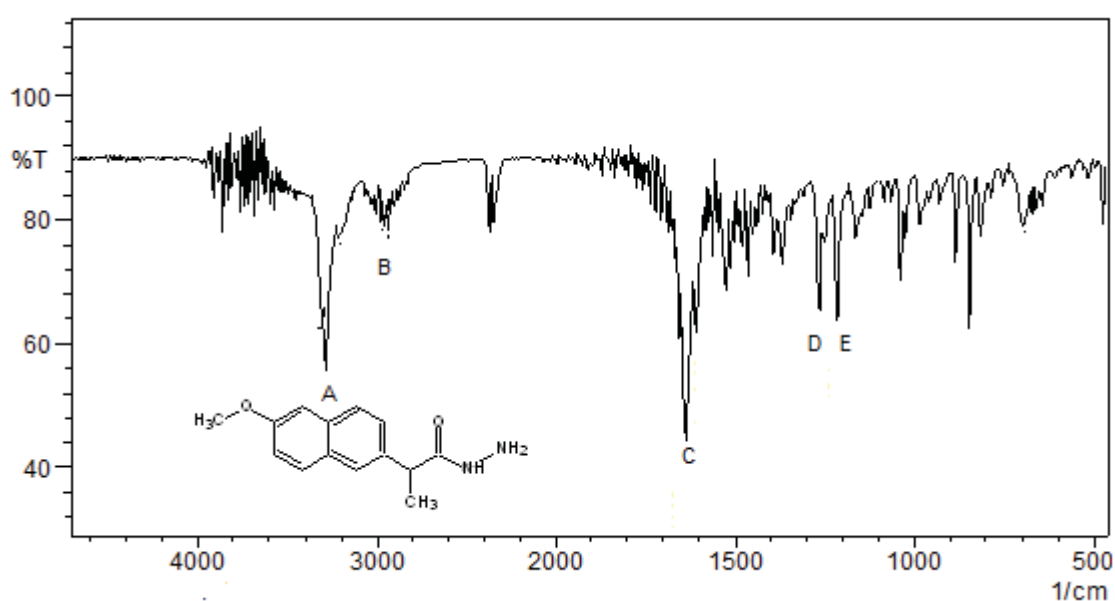


Espectro 3: Espectro na região do Infravermelho do derivado 2-hidroxibenzohidrazida (KBr)

Tabela 3: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do derivado 2-hidroxibenzohidrazida (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico            | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|---------------------------------|--------------------|
| A        | 3319,49               | N-H                             | Axial              |
| B        | 2708,13               | C-H <sub>aromático</sub>        | Axial              |
| C        | 1647,21               | C=O <sub>hidrazida</sub>        | Axial              |
| D        | 1352,10               | NH                              | Angular            |
| E        | 1134,14               | Aromático 1,2<br>dissubstituído | Angular            |

Podemos destacar os estiramentos axiais N-H em 3319 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1647 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazida. sugerindo que a reação ocorreu. Além disso, os estiramentos de NH e NH<sub>2</sub> presente na hidrazida podem ser observados em deformações angulares presentes em 1352 cm<sup>-1</sup>

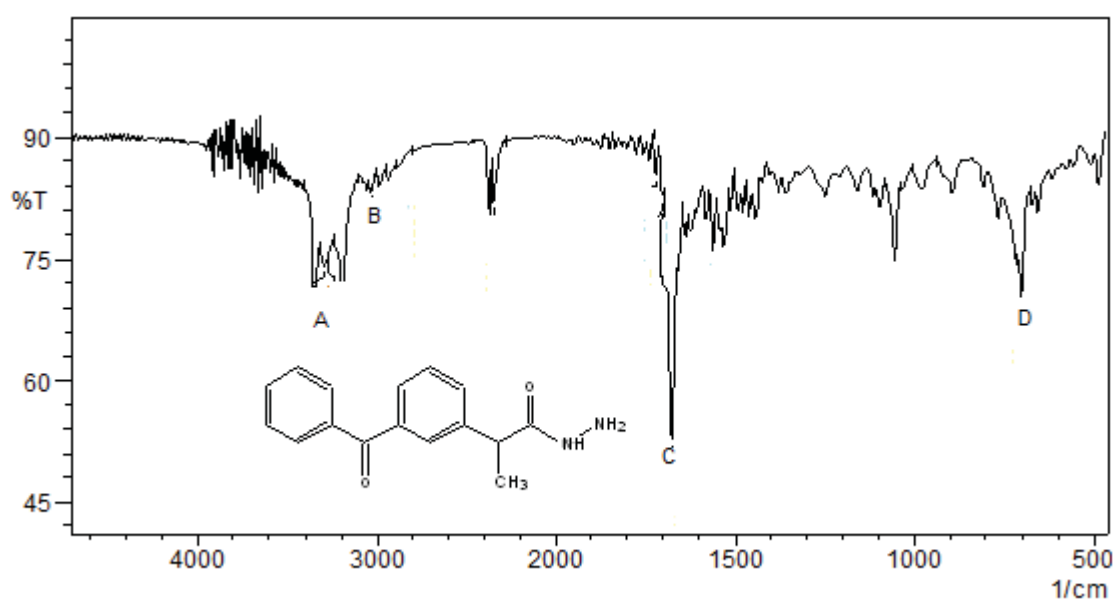


Espectro 4: Espectro na região do Infravermelho do derivado 2-(6-metoxi-2-naftil) propanohidrazida(KBr)

Tabela 4: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos a 2-(6-metoxi-2-nafil) propanohidrazida (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| A        | 3280,92               | N-H                      | Axial              |
| B        | 2970,38               | C-H <sub>aromático</sub> | Axial              |
| C        | 1635,64               | C=O <sub>hidrazida</sub> | Axial              |
| D        | 1297,10               | NH                       | Angular            |
| E        | 1215,15               | C-O-C                    | Axial              |

Os estiramentos axiais N-H em 3280 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1635 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazida podem ser observados, sugerindo que a reação ocorreu. Além disso, os estiramentos de NH e NH<sub>2</sub> presente na hidrazida podem ser observados em deformações angulares presentes em 1297 cm<sup>-1</sup>

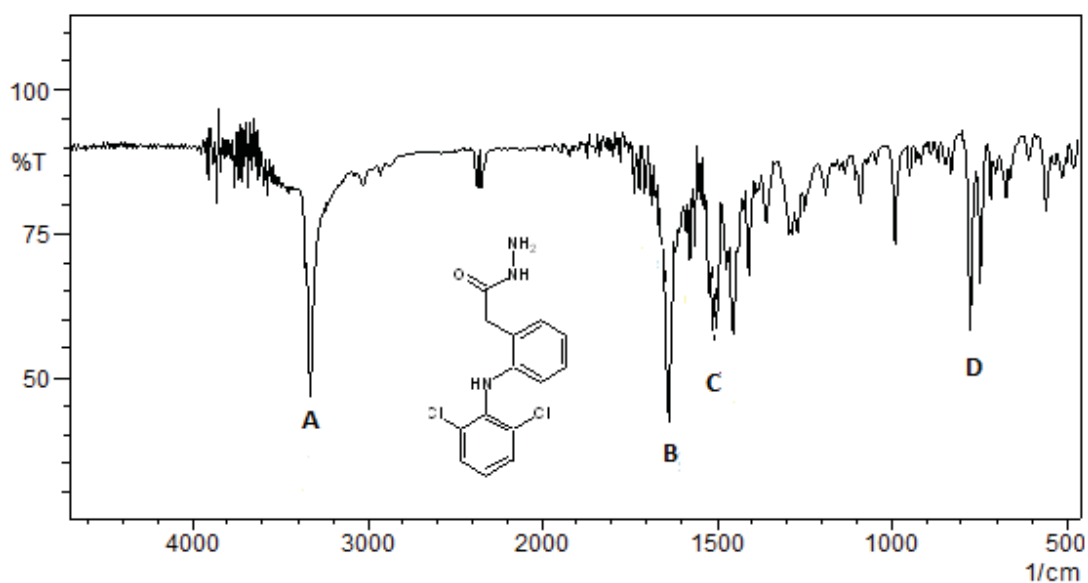


Espectro 5: Espectro na região do Infravermelho do derivado 3-benzoilfenil)propanohidrazida (KBr)

Tabela 5: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao 2-(6-metoxi-2-naftil) propanohidrazida(KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico            | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|---------------------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 3292,49               | N-H                             | Axial              |
| <b>B</b> | 2935,66               | C-H <sub>aromático</sub>        | Axial              |
| <b>C</b> | <b>1674,21</b>        | <b>C=O</b> hidrazida            | <b>Axial</b>       |
| <b>D</b> | 700,16                | 1,3 aromático<br>disubstituído. | Angular            |

Podemos destacar os estiramentos axiais N-H em 3292 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1674 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazida, sugerindo que a reação ocorreu.

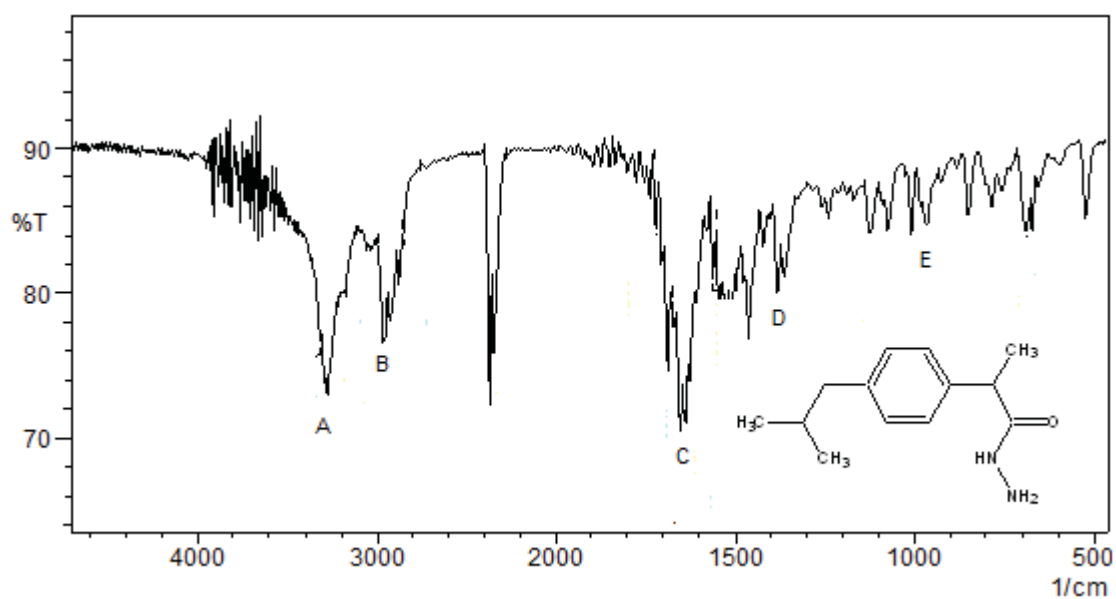


Espectro 6: Espectro na região do Infravermelho do derivado {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetohidrazida(KBr)

Tabela 6: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao derivado {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil} acetohidrazida (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico       | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|----------------------------|--------------------|
| A        | 3325,28               | N-H                        | Axial              |
| B        | 1637,56               | C=O hidrazida              | Axial              |
| C        | 1518,33               | N-H                        | Angular            |
| D        | 773                   | Aromático trissubstituído. | Angular            |

Podemos destacar os estiramentos axiais N-H em 3325 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1637 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazida. sugerindo que a reação ocorreu. <sup>1</sup>Além disso, os estiramentos de NH e NH<sub>2</sub> presente na hidrazida podem ser observados em deformações angulares presentes em 1518 cm<sup>-1</sup>



Espectro 7: Espectro na região do Infravermelho do derivado 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida(KBr)

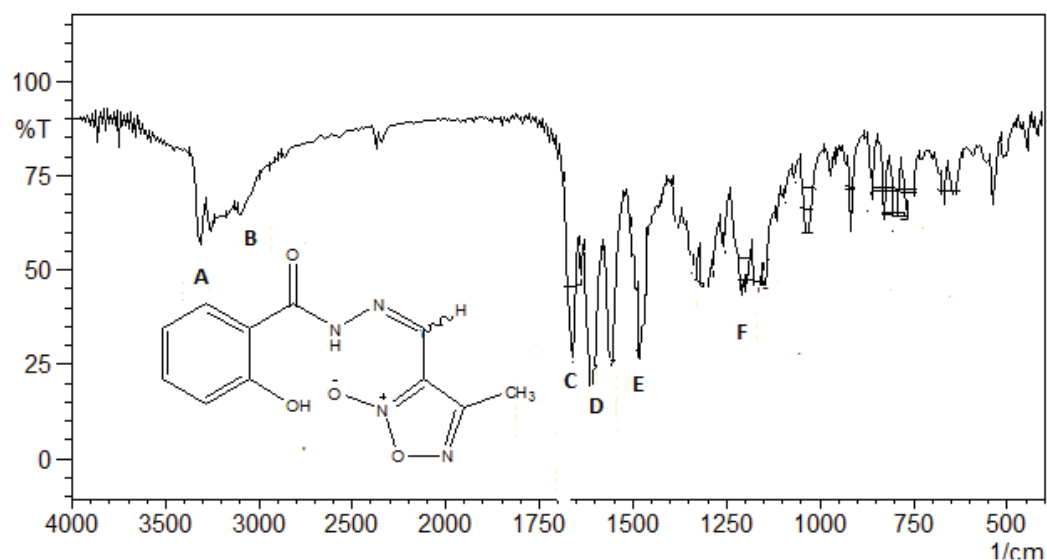
Tabela 7: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao derivado 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico            | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|---------------------------------|--------------------|
| A        | 3313,71               | N-H                             | Axial              |
| B        | 2953,02               | C-H <sub>aromático</sub>        | Axial              |
| C        | 1637,56               | C=O <sub>hidrazida</sub>        | Axial              |
| D        | 1359,10               | NH                              | Angular            |
| E        | 986,34                | Aromático 1,4<br>dissubstituído | Angular            |

Podemos destacar os estiramentos axiais N-H em 3313 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1637 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazida. sugerindo que a reação ocorreu.<sup>1</sup> Além disso, os estiramentos de NH e NH<sub>2</sub> presente na hidrazida podem ser observados em deformações angulares presentes em 1359 cm<sup>-1</sup>

### 4.1.3. Caracterização estrutural das hidrazonas do derivado furoxânico metilado

#### 4.1.3.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)

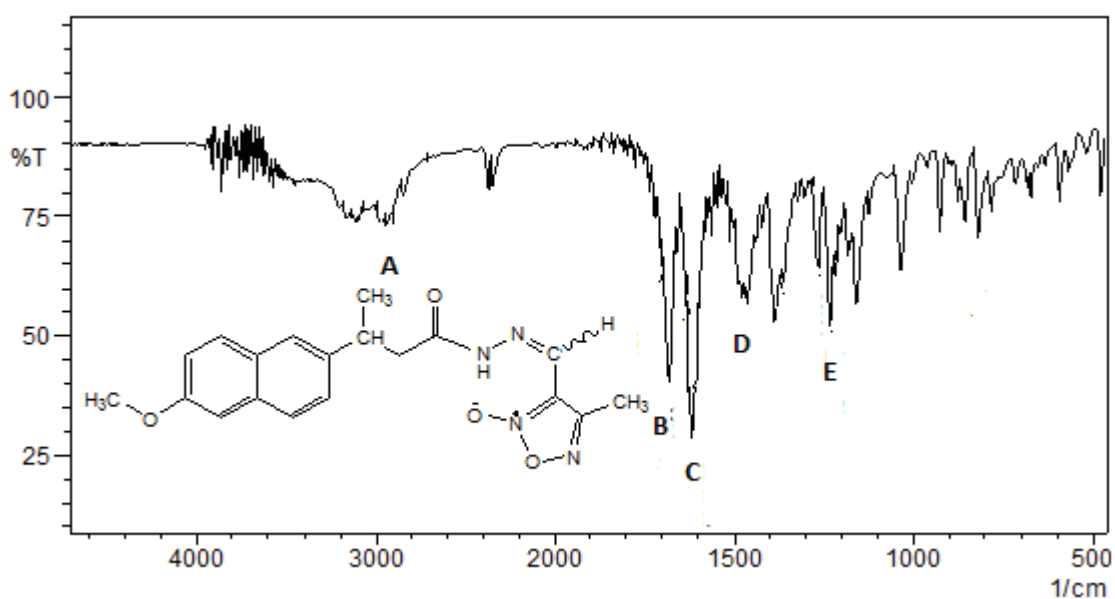


Espectro 8: Espectro na região do Infravermelho do produto final 1a (KBr)

Tabela 8: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 1a (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 3317,71               | OH                   | Axial              |
| <b>B</b> | 3098,78               | C-H (Aromático)      | Axial              |
| <b>C</b> | 1658,85               | C=O                  | Angular            |
| <b>D</b> | 1606,77               | C=N hidrazona        | Angular            |
| <b>E</b> | 1485,25               | N-O                  | Angular            |
| <b>F</b> | 1207,49               | CH <sub>3</sub>      | Angular Simétrica  |

Podemos destacar os estiramentos axiais O-H em 3317 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1658 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazona. Podemos ainda visualizar o estiramento da deformação axial do C-H aromático em 3098,78 cm<sup>-1</sup> e 1606 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C=N resultante da formação da hidrazona. Em 1485,25 é observado o estiramento N-O. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336 cm<sup>-1</sup>, evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.



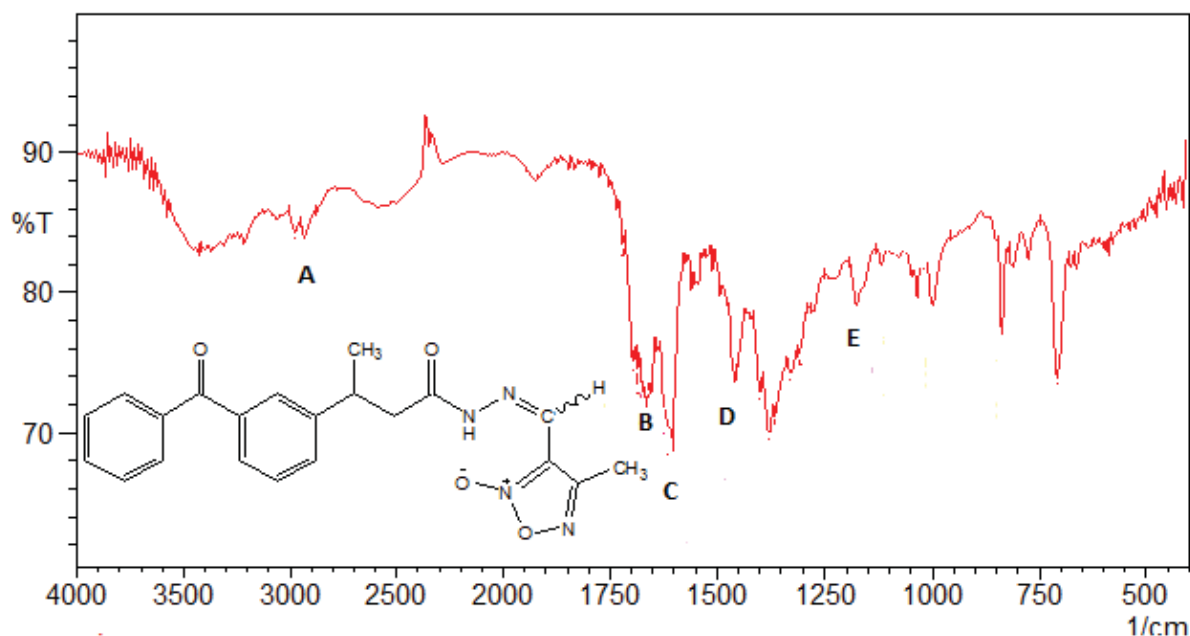
Espectro 9: Espectro na região do Infravermelho do produto final 2a (KBr)

Tabela 9: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 2a (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| A        | 2960,73               | C-H (Aromático)      | Axial              |
| B        | 1680,00               | C=O                  | Angular            |
| C        | 1616,35               | C=N hidrazona        | Angular            |
| D        | 1487,23               | N-O                  | Angular            |
| E        | 1207,49               | CH <sub>3</sub>      | Angular Simétrica  |

Podemos destacar estiramento da deformação axial do C-H aromático em 2960,73 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1680 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazona. Em 1616 cm<sup>-1</sup> é observado o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona. Em 1487,23 é encontrado o estiramento do N-O. Neste espectro não se observa

mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336  $\text{cm}^{-1}$ , evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.

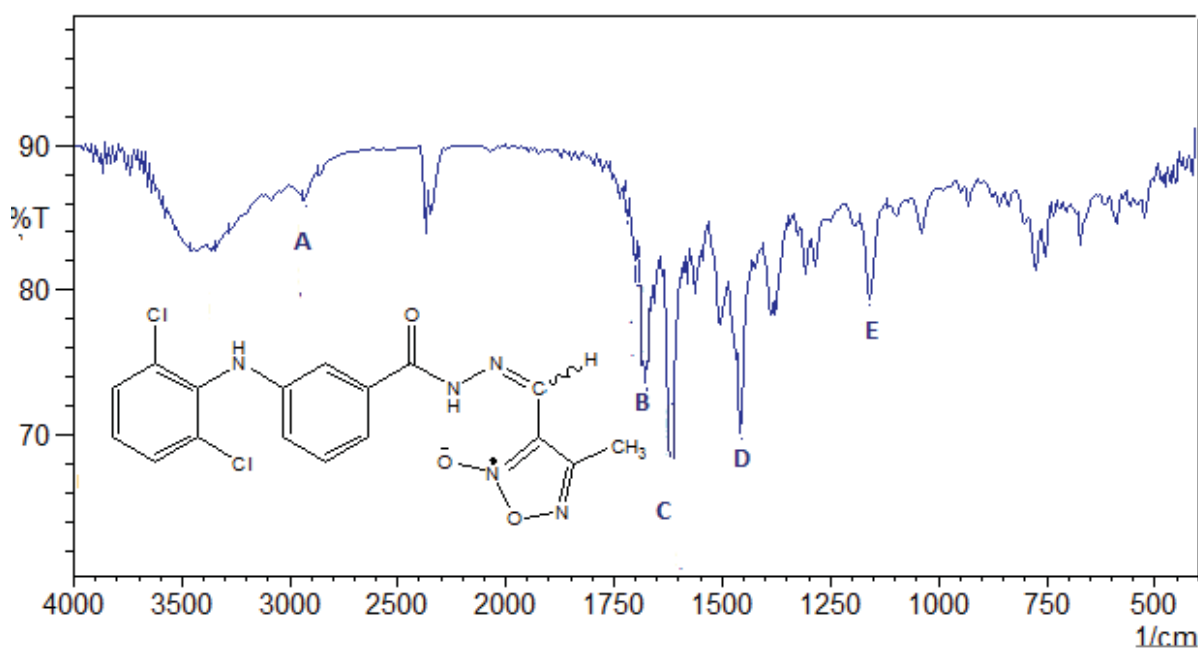


Espectro 10: Espectro na região do Infravermelho do produto final 3a (KBr)

Tabela 10: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 3a (KBr)

| Marcador | V ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| A        | 2929,03                | C-H (Aromático)          | Axial              |
| B        | 1670,43                | C=O                      | Angular            |
| C        | 1617,38                | C=N <sub>hidrazona</sub> | Angular            |
| D        | 1459,21                | N-O                      | Angular            |
| E        | 1172,77                | CH <sub>3</sub>          | Angular Simétrica  |

Pode-se destacar estiramento da deformação axial do C-H aromático em  $2929\text{ cm}^{-1}$  e o estiramento C=O em  $1670\text{ cm}^{-1}$  referente a carbonila da função amida presente na hidrazona e em  $1617\text{ cm}^{-1}$  é observado o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona e em  $1459,21\text{ cm}^{-1}$  o estiramento N-O. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre  $2371$  e  $2336\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.

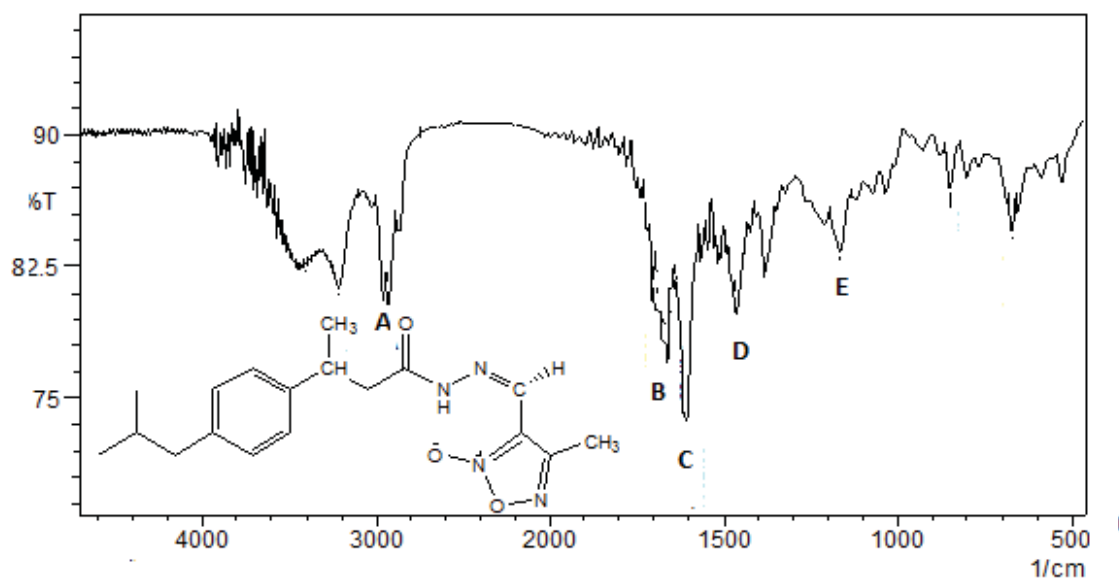


Espectro 11: Espectro na região do Infravermelho do produto final 4a (KBr)

Tabela 11: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 4a (KBr)

| Marcador | V ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| A        | 2928,07                | C-H (Aromático)          | Axial              |
| B        | 1674,28                | C=O                      | Angular            |
| C        | 1618,35                | C=N <sub>hidrazona</sub> | Angular            |
| D        | 1455,35                | N-O                      | Angular            |
| E        | 1175,340               | CH <sub>3</sub>          | Angular Simétrica  |

Podemos destacar estiramento da deformação axial do C-H aromático em 2928,07  $\text{cm}^{-1}$  e o estiramento C=O em 1674  $\text{cm}^{-1}$  referente a carbonila da função amida presente na hidrazona e em 1618  $\text{cm}^{-1}$  observa-se o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona e em 1455,35 é observado o estiramento N-O. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336  $\text{cm}^{-1}$ , evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.



Espectro 12: Espectro na região do Infravermelho do produto final 5a (KBr)

Tabela 12: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do produto final 5a (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 2924,09               | C-H (Aromático)          | Axial              |
| <b>B</b> | 1654,92               | C=O                      | Axial              |
| <b>C</b> | 1602,85               | C=N <sub>hidrazona</sub> | Angular            |
| <b>D</b> | 1460,11               | N-O                      | Angular            |
| <b>E</b> | 1165,00               | CH <sub>3</sub>          | Angular Simétrica  |

Podemos destacar estiramento da deformação axial do C-H aromático em 2924,09 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1654 referente a carbonila da função amida presente na hidrazona e em 1654 cm<sup>-1</sup> é observado o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona e em 1487,23 o estiramento N-O. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336 cm<sup>-1</sup>, evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.

#### 4.1.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

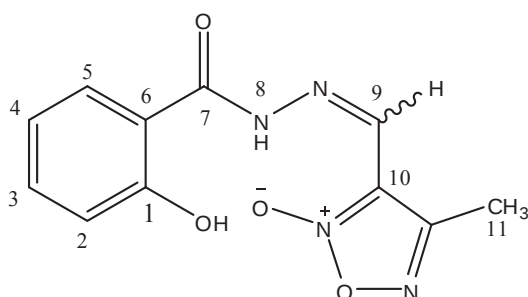
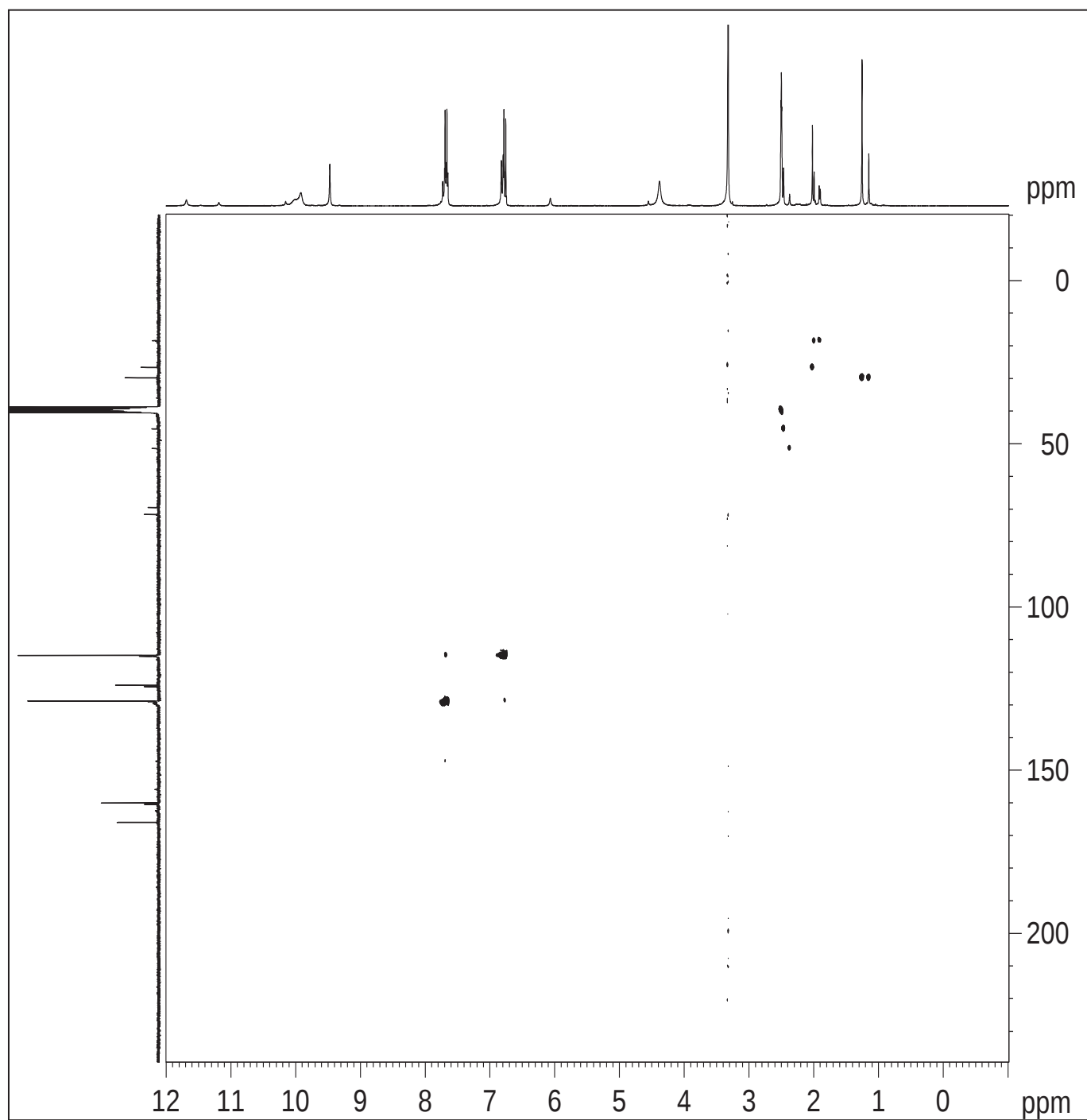


Tabela 13: Deslocamentos do produto 1a.

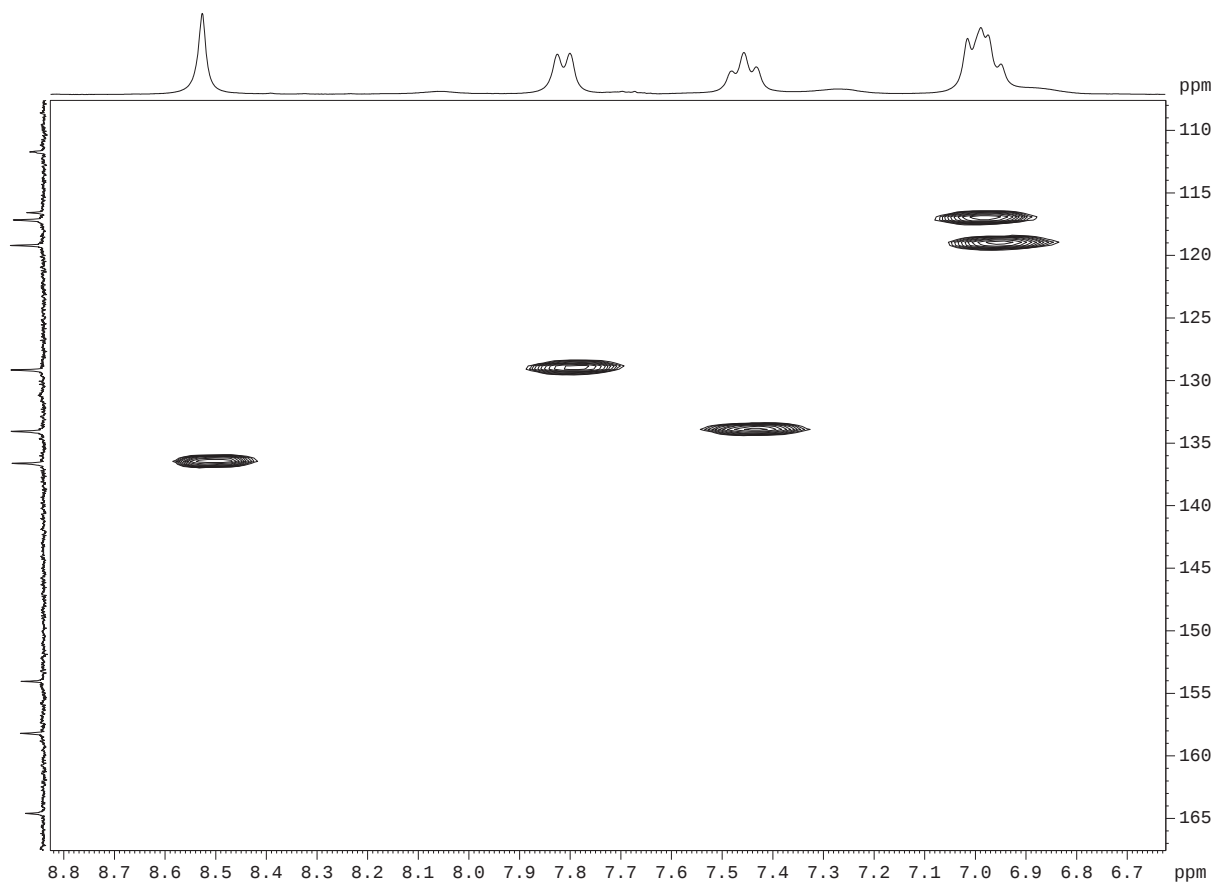
| RMN $^{13}\text{C}$ | $\delta$ (ppm) |
|---------------------|----------------|
| C <sub>2</sub>      | 134            |
| C <sub>3</sub>      | 117            |
| C <sub>4</sub>      | 119            |
| C <sub>5</sub>      | 128            |
| C <sub>9</sub>      | 136            |
| C <sub>11</sub>     | 124            |

Tabela 14: Deslocamentos do produto 1a

| RMN H <sup>1</sup>             | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|--------------------------------|----------------|----------------|
| H <sub>2</sub>                 | 7,4            | Dubleto        |
| H <sub>3</sub> ;H <sub>4</sub> | 7,0            | Duplo-dubleto  |
| H <sub>5</sub>                 | 7,8            | Dubleto        |
| CH <sub>3</sub> (furoxano)     | 2,5            | Singlete       |
| H <sub>9</sub>                 | 8,8            | Singlete       |



Espectro 13: Ressonância Magnética Nuclear bidimensional do produto 1a, utilizando como solvente DMSOd<sub>6</sub>



Espectro 14: Espectro ampliado do produto 1a entre as regiões de  $\delta$  8,8 -  $\delta$  6,7 ppm.

O composto 1a possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 13. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades.

Em 7,0, 7,4 e 7,8 podemos visualizar os hidrogênios do anel aromático orto substituído e são apresentados em dupletos. O sinal 8,51 podemos visualizar os hidrogênios da metila da hidrazona e em 2,5 observa-se os hidrogênios da metila ligada ao anel furoxano.

No espectro bidimensional 14 é permitido observar os sinais referentes aos carbonos. Os carbonos do anel aromático hidroxilado aparecem em C2 em 134 ppm, em C3 em 117,0 ppm, C4 em 119 ppm, C5 em 128,0 ppm, C7 em 166,0 ppm, C9 em 136,0 ppm, C10 em 9,0 ppm.

De acordo com os dados apresentados no espectro bidimensional 13, podemos inferir que a síntese da hidrazona do ácido salicílico foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

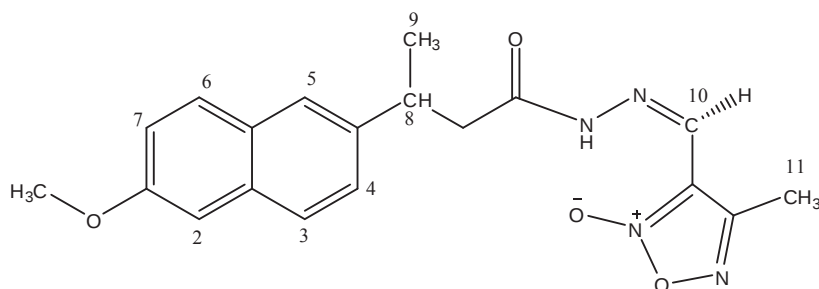
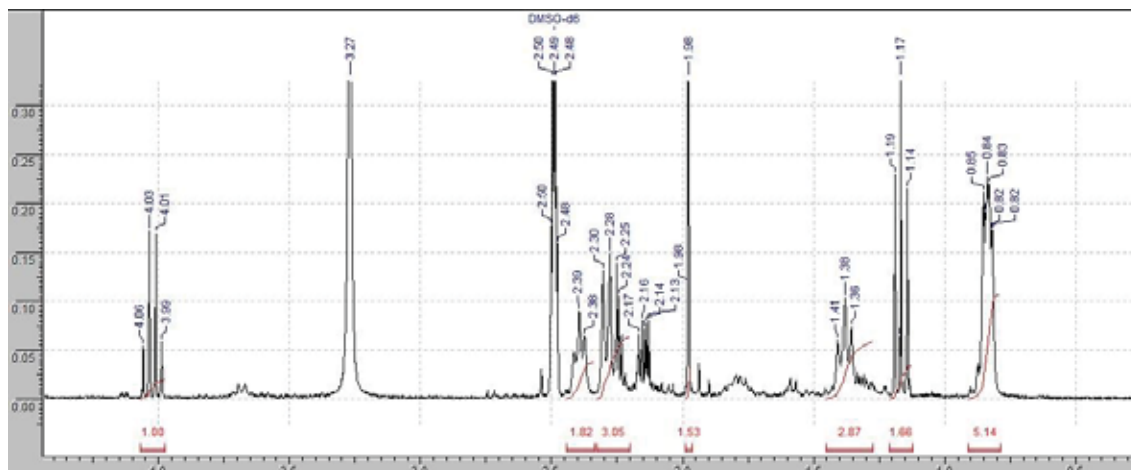


Tabela 15: Deslocamentos do produto 2a.

| RMN $H^1$     | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|---------------|----------------|----------------|
| $H_1$         | 3,4            | Singlete       |
| $H_2$ a $H_7$ | 7,8 a 7,1      | Multiplete     |
| $H_8$         | 2,51           |                |
| $H_9$         | 1,49           |                |
| $H_{10}$      | 8,27           | Singlete       |
| $H_{11}$      | 2,32           | Singlete       |



Espectro 15: Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  do produto 2a utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$ .

Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades. Entre 7,8 e 7,1 podemos visualizar o acoplamento dos hidrogênios pertencentes ao naftaleno. Em 3,4 podemos visualizar o hidrogênio da metoxila caracterizado pelo singlete, em 8,27 o hidrogênio da metila da hidrazona e por fim em 2,32 observa-se a metila ligada ao anel furoxano.

De acordo com os dados apresentados no espectro 15, há indício de que a síntese do composto 2a foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento hidrogênio da estrutura da molécula proposta porém nota-se a presença de diastereoisômeros devido a duplicação dos sinais no espectro.

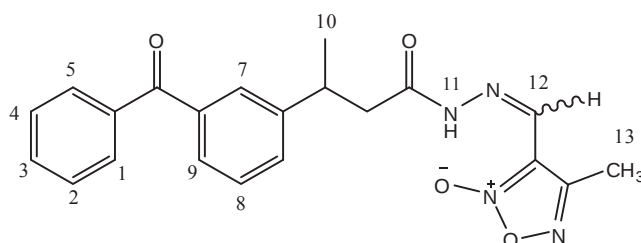
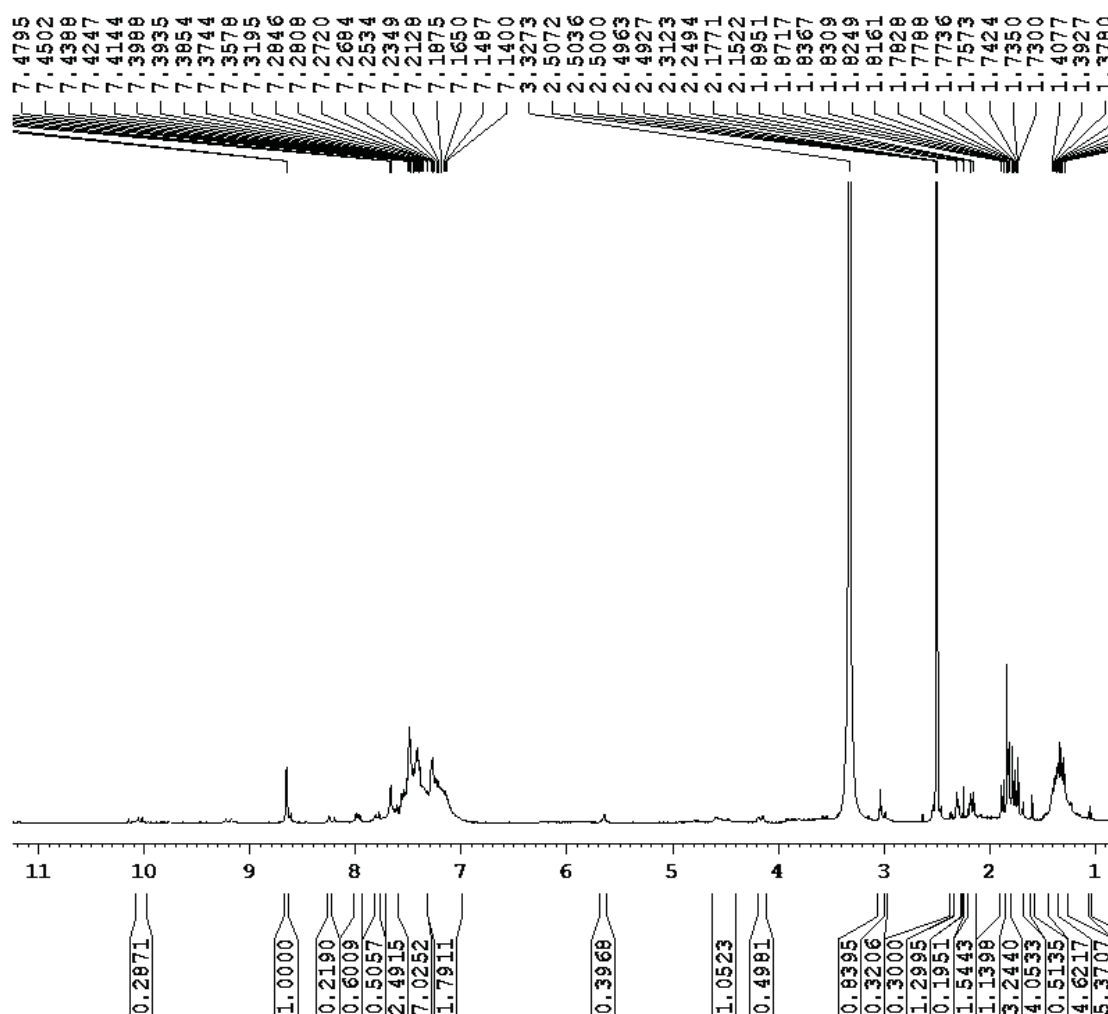
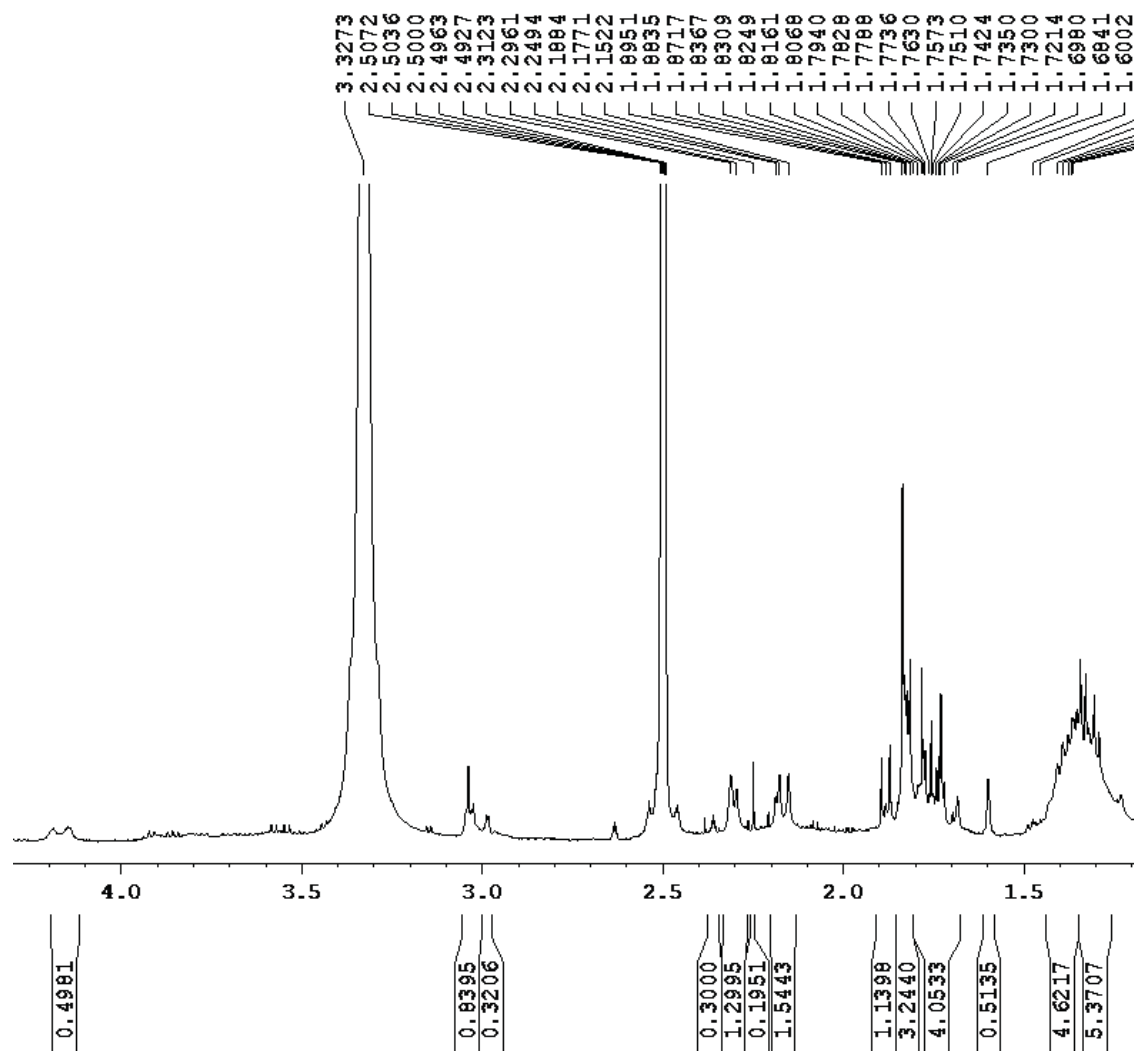


Tabela 16: Deslocamentos do produto final 3a

| RMN $H^1$ | $\delta$ (ppm)  | Multiplicidade |
|-----------|-----------------|----------------|
| $H_{3,4}$ | Entre 7,0 e 8,0 |                |
| $H_{5,1}$ | Entre 7,0 e 8,0 |                |
| $H_{10}$  | 1,6             | Singlete       |
| $H_{13}$  | 2,31            | Singlete       |

Espectro 16 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN  $H^1$ ) do produto final 3a utilizando como solvente o  $DMSO-d_6$ .



Espectro 17 - Espectro ampliado na região entre 1,5 e 4,0 ppm.

O composto 3a possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 10. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades. Entre 7,0 e 8,0 ppm corresponde ao deslocamento dos hidrogênios da estrutura aromática. O sinal 2,31 ppm corresponde ao deslocamento dos hidrogênios da metila.

Os dados apresentados no espectro 16 dão indício de que a síntese do composto 3a foi realizada com êxito, uma vez que pode-se visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

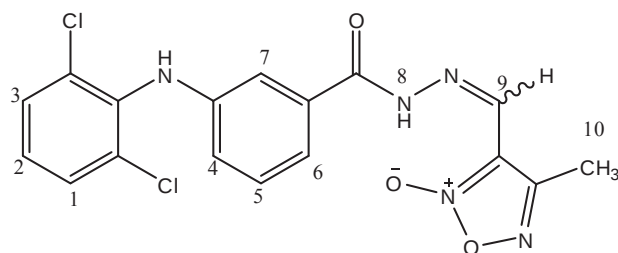
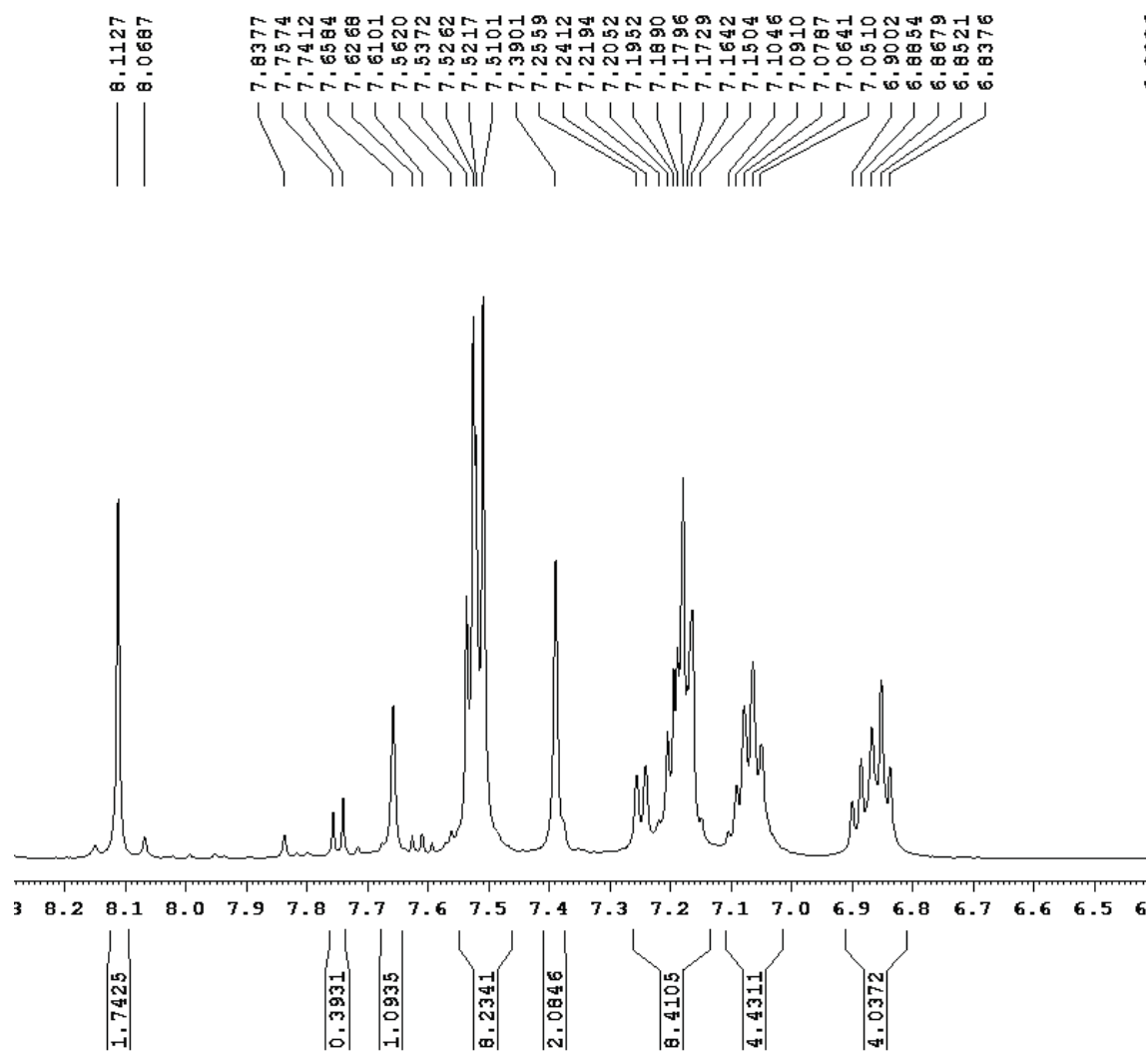
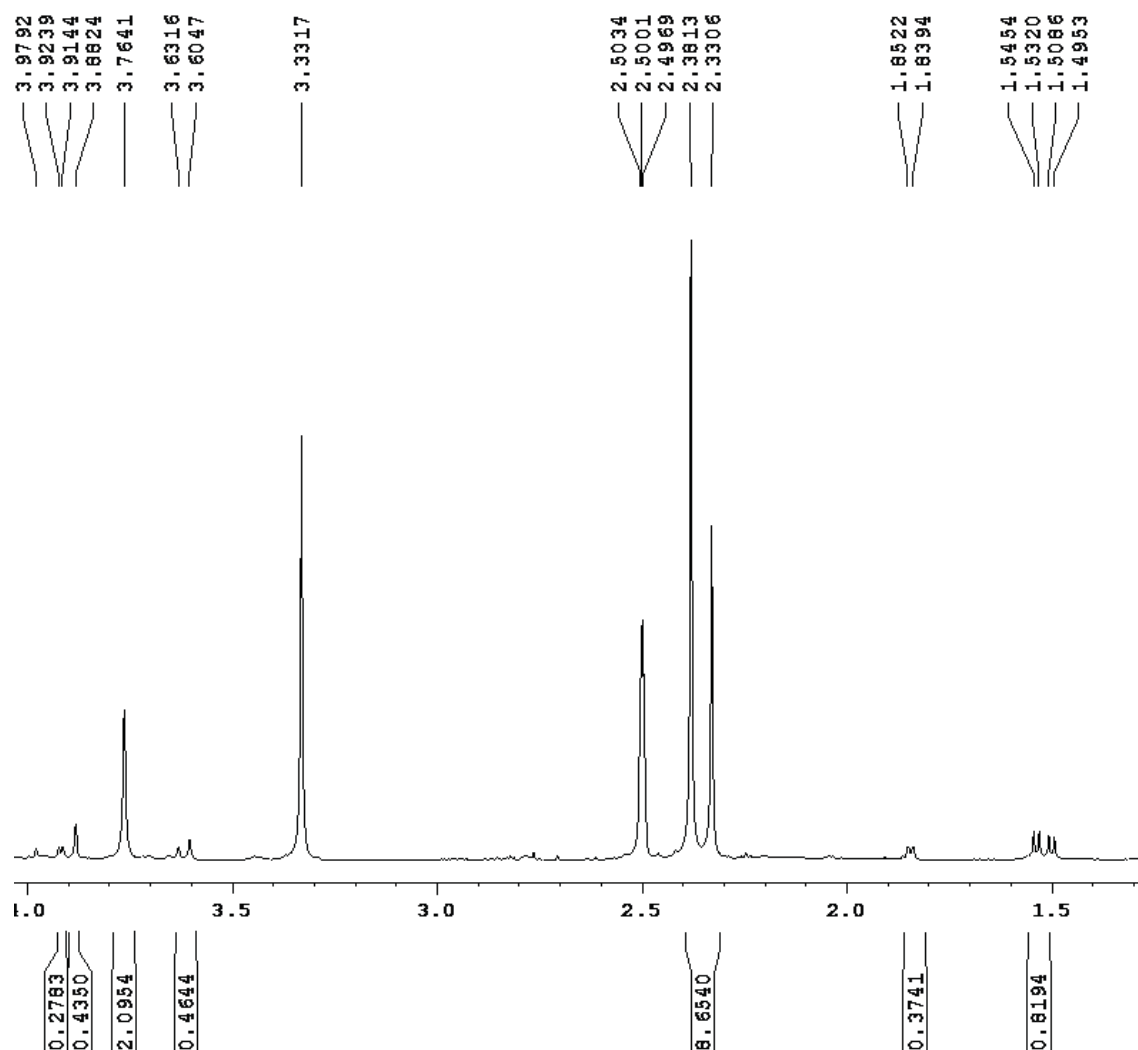


Tabela 17. Deslocamentos do composto final 4a

| RMN $H^1$  | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|------------|----------------|----------------|
| $H_1; H_3$ | 7,39           |                |
| $H_5$      | 7,18           |                |
| $H_6$      | 6,90           | Multiplero     |
| $H_8$      | 12,30          | Singlo         |
| $H_{10}$   | 2,38           | Singlo         |



Espectro 18 : Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  do composto final 4a utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$ .



Espectro 19: Espectro ampliado na região entre 1,0 e 1,5 ppm.

O composto 4a possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 5. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades. Em 7,39 ppm corresponde ao deslocamento dos hidrogênios em posição orto confirmando a presença de uma estrutura aromática 1,2,6 trissubstituída. O sinal 2,38 ppm corresponde ao deslocamento dos hidrogênios da metila.

De acordo com os dados apresentados no espectro 18 há um indicativo de que a síntese do composto final 4<sup>a</sup> foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

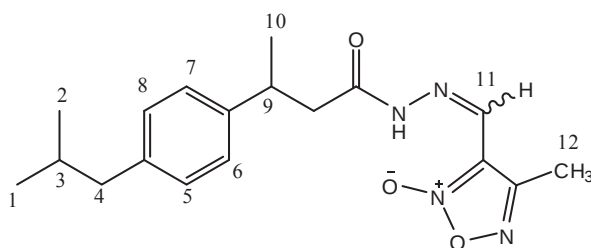
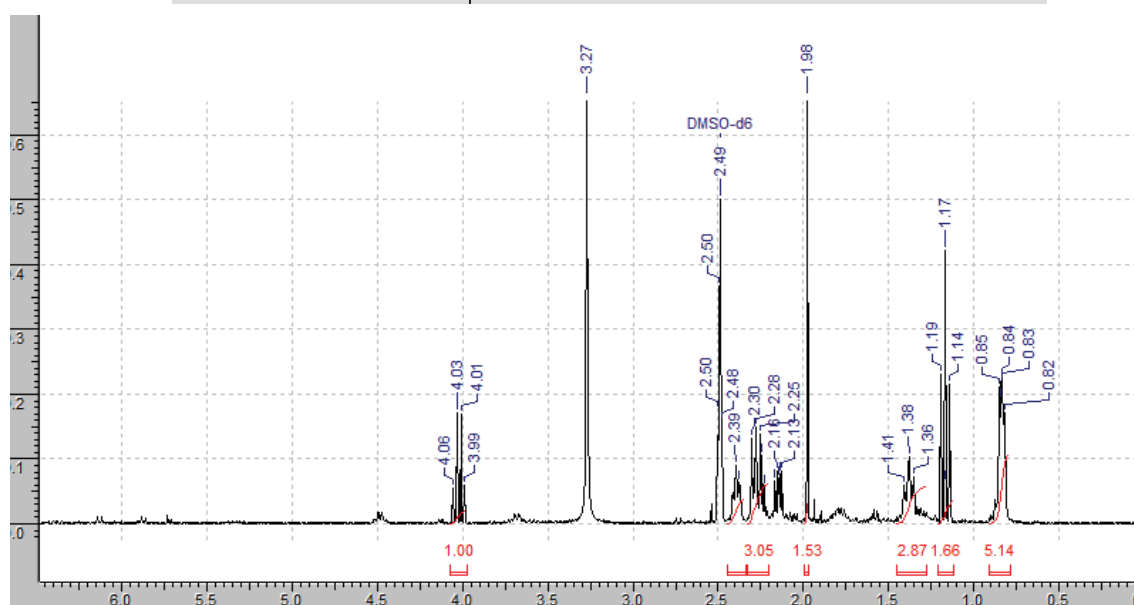


Tabela 18: Deslocamentos do produto final 5a

| RMN H <sup>1</sup>              | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| H <sub>1</sub> ; H <sub>2</sub> | 0,84           | Multipeto      |
| H <sub>5</sub> ; H <sub>6</sub> | 7,16           |                |
| H <sub>9</sub>                  | 4,03           | Multipeto      |
| H <sub>10</sub>                 | 1,38           |                |
| H <sub>11</sub>                 | 1,98           | Singeto        |
| H <sub>12</sub>                 | 2,28           | Singeto        |

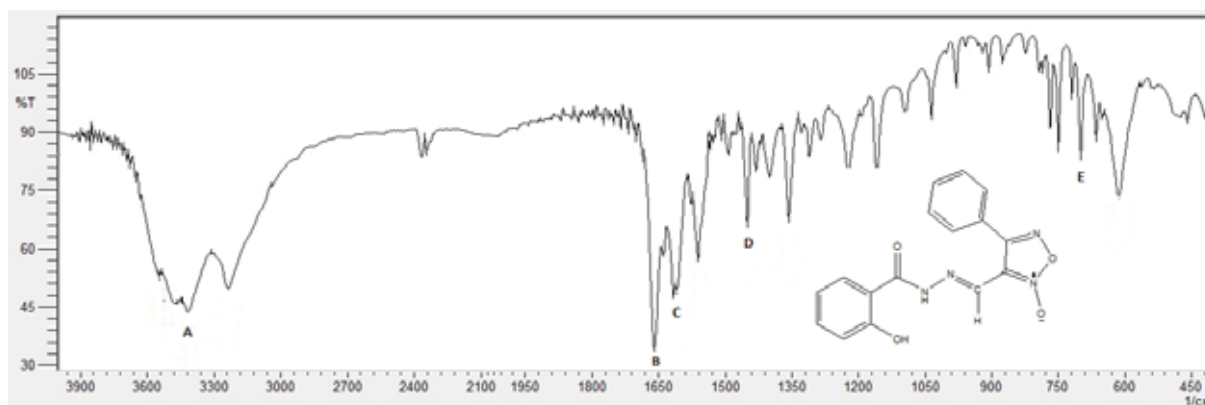
Espectro 20 : Ressonância Magnética Nuclear (RMN H<sup>1</sup>) do produto 5a utilizando como solvente o DMSOd<sub>6</sub>.

O composto 5a possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 5. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades. Em 0,84 ppm podemos observar o sinal integrado dos hidrogênios das metilas que é igual a seis. 7,16 ppm correspondem ao deslocamento dos hidrogênios em posição orto confirmando a presença de uma estrutura aromática 1,4 dissustituída. Em 4,03 podemos visualizar o hidrogênio do carbono ligado ao anel aromático 1,4 dissustituído que apresenta como multipeto e sinal integrado para um hidrogênio. O sinal 1,38 corresponde ao deslocamento dos hidrogênios da metila, e o sinal 1,98 corresponde ao hidrogênio pertencente ao carbono da hidrazona. Em 2,28 encontra-se o deslocamento do hidrogênio da metila representada pelo singeto de valor integrado igual a três.

Os dados apresentados no espectro 19, são indícios de que a síntese do composto 5a foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

#### 4.1.4. Caracterização estrutural das hidrazonas do derivado furoxânico fenilado

##### 4.1.4.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)

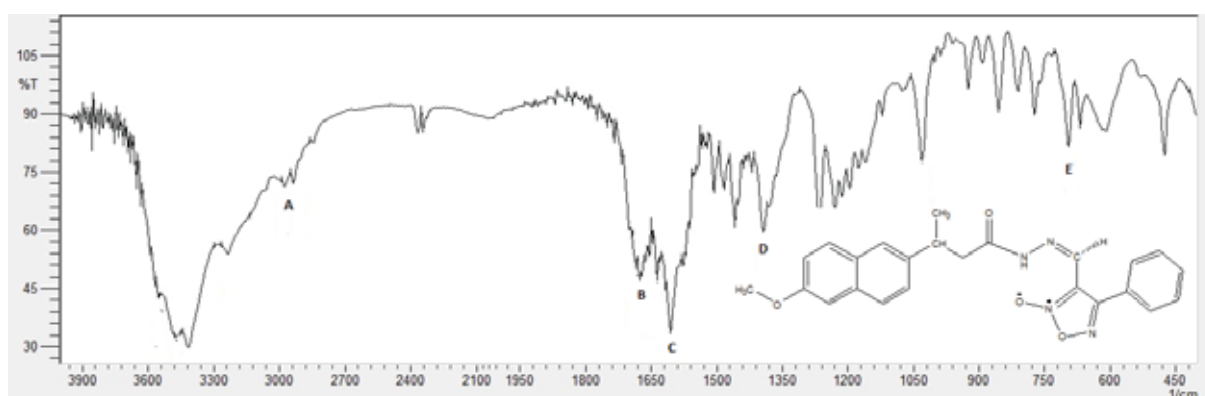


Espectro 21: Espectro na região do Infravermelho relativo ao produto final 1b (KBr)

Tabela 19: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 1b (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 3417,71               | OH                   | Axial              |
| <b>B</b> | 1668,85               | C=O                  | Angular            |
| <b>C</b> | 1608,63               | C=N hidrazona        | Angular            |
| <b>D</b> | 1450,47               | N-O                  | Angular            |
| <b>E</b> | 692,27                | Aromático            | Angular            |

Podemos destacar os estiramentos axiais O-H em 3417 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1668 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazona. Podemos ainda visualizar o estiramento da deformação angular em 1608 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C=N resultante da formação da hidrazona. Em 1450 é observado o estiramento N-O e 629 o estiramento do anel aromático. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336 cm<sup>-1</sup>, evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.

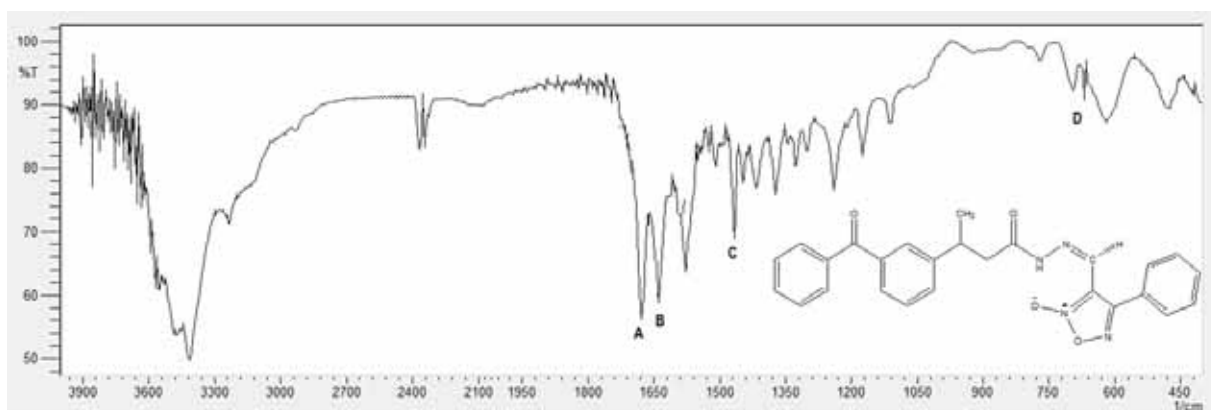


Espectro 22: Infravermelho relativo ao produto final 2b (KBr)

Tabela 20: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 2b (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| A        | 2974,23               | C-H (Aromático)          | Axial              |
| B        | 1683,86               | C=O                      | Angular            |
| C        | 1607,77               | C=N <sub>hidrazona</sub> | Angular            |
| D        | 1394,53               | N-O                      | Angular            |
| E        | 696,30                | Aromático                | Angular            |

Podemos destacar estiramento da deformação axial do C-H aromático em 2974 cm<sup>-1</sup> e o estiramento C=O em 1683 cm<sup>-1</sup> referente à carbonila da função amida presente na hidrazona. Em 1607 cm<sup>-1</sup> é observado o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona. Em 1394 cm<sup>-1</sup> é encontrado o estiramento do N-O ale do estiramento do anel aromático em 696 cm<sup>-1</sup>. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336 cm<sup>-1</sup>, evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.

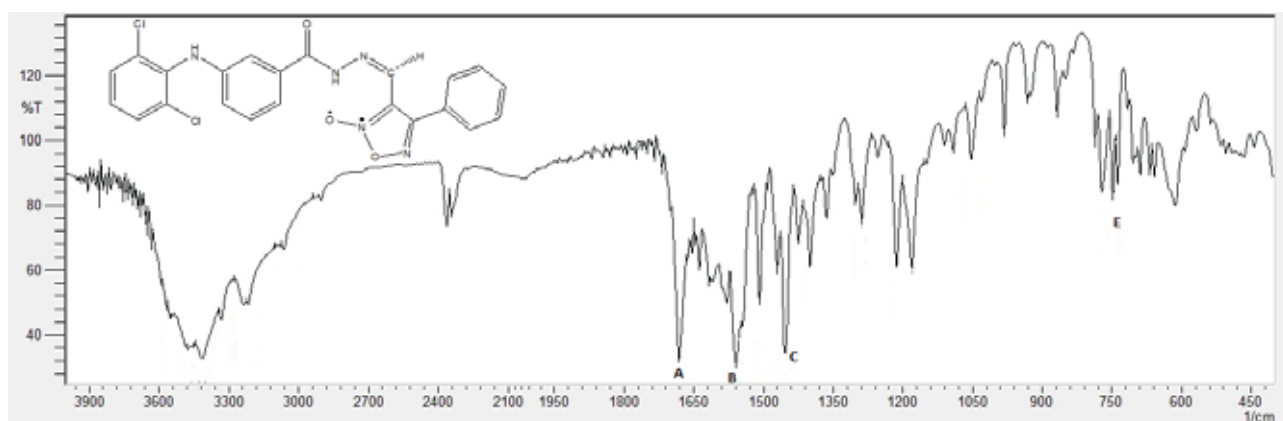


Espectro 23: Espectro na região do Infravermelho relativo ao produto final 3b (KBr)

Tabela 21: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 3b(KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>A</b> | 1664,32               | C=O                      | Angular            |
| <b>B</b> | 1605,25               | C=N <sub>hidrazona</sub> | Angular            |
| <b>C</b> | 1448,10               | N-O                      | Angular            |
| <b>D</b> | 710,38                | Aromático                | Angular            |

Podemos destacar estiramento da deformação angular do C=O em 1664 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazona e em 1605 cm<sup>-1</sup> observa-se o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona, em 1448 é observado o estiramento N-O e o estiramento do anel aromático em 710 cm<sup>-1</sup>. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336 cm<sup>-1</sup>, evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.



Espectro 24: Infravermelho relativo ao produto final 4b (KBr)

Tabela 22: Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao produto final 4b (KBr)

| Marcador | V (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico     | Tipo de deformação |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| A        | 1684,88               | C=O                      | Angular            |
| B        | 1600,35               | C=N <sub>hidrazona</sub> | Angular            |
| C        | 1408,40               | N-O                      | Angular            |
| D        | 748,38                | Aromático                | Angular            |

Podemos destacar estiramento da deformação angular do C=O em 1684 cm<sup>-1</sup> referente a carbonila da função amida presente na hidrazona e em 1600 cm<sup>-1</sup> observa-se o estiramento C=N resultante da formação da hidrazona, em 1408 é observado o estiramento N-O e o estiramento do anel aromático em 748 cm<sup>-1</sup>. Neste espectro não se observa mais a presença da ligação C-H de aldeídos que aparecia entre 2371 e 2336 cm<sup>-1</sup>, evidenciando o êxito da reação de substituição nucleofílica e ausência da função aldeído.

#### 4.1.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

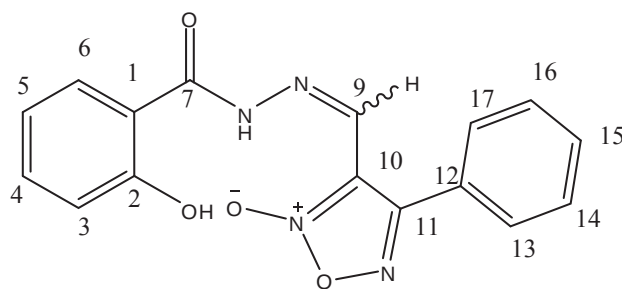


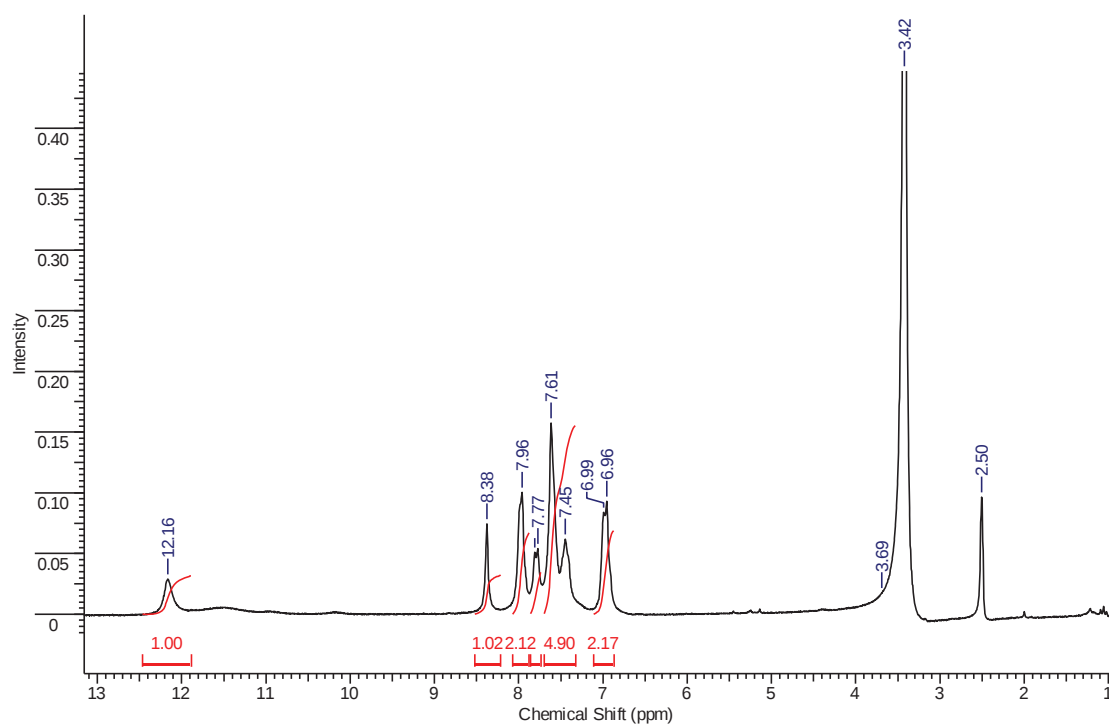
Tabela 23: Deslocamentos relativos ao produto final 1b.

| RMN $H^1$                      | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|--------------------------------|----------------|----------------|
| $H_3, H_5$                     | 6,69           |                |
| $H_4, H_{14}, H_{15}, H_{16},$ | 7.35-7,77      | Multipleteo    |
| $H_6$                          | 7,79           | Dubleto        |
| $H_8$                          | 12,17          | Singleteo      |
| $H_9$                          | 8,38           | Singleteo      |
| $H_{13}, H_{17}$               | 7,96           |                |

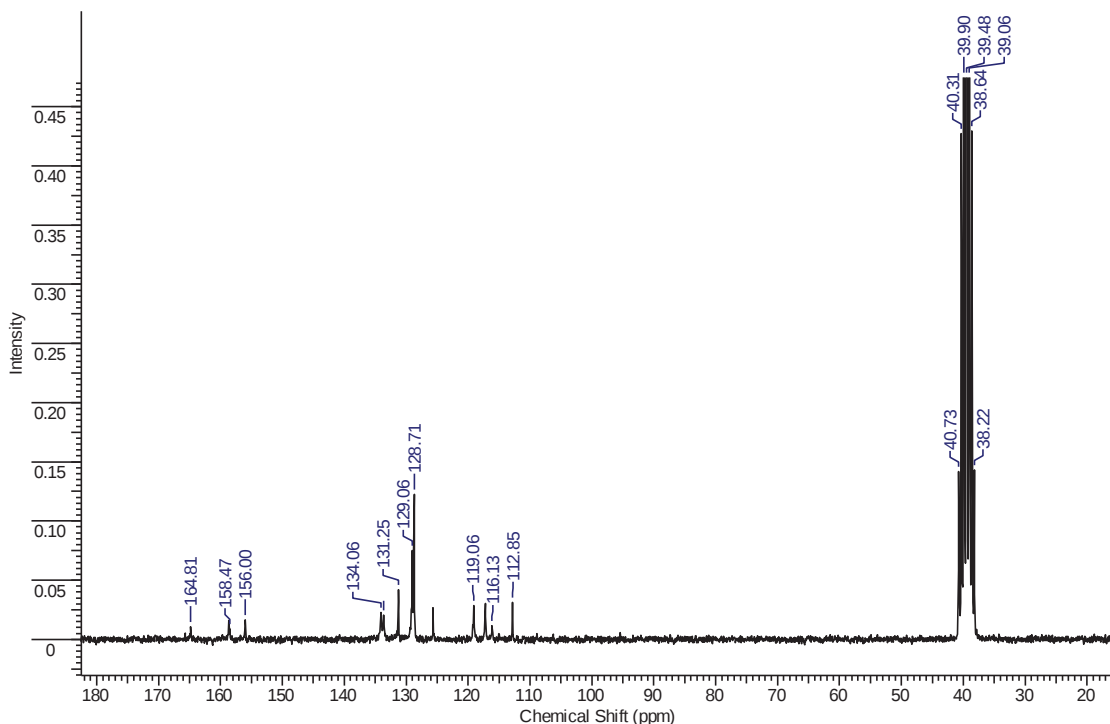
Tabela 24: Deslocamentos relativos ao composto final 1b.

| RMN $C^{13}$ | $\delta$ (ppm) |
|--------------|----------------|
| $C_2$        | 156            |
| $C_3$        | 119            |
| $C_4$        | 134            |
| $C_7$        | 164            |
| $C_{10}$     | 158            |
| $C_{11}$     | 116            |

|                 |     |
|-----------------|-----|
| $C_{12}$        | 133 |
| $C_{13};C_{17}$ | 128 |



Espectro 25: Ressonância Magnética Nuclear  $H^1$  do composto final 1b utilizando como solvente o DMSOd<sup>6</sup>.



Espectro 26: Ressonância Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  do composto final 1b utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$ .

O composto 1b possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 25. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades.

Entre 7,77 e 7,35, podemos visualizar os hidrogênios dos anéis aromáticos apresentados em multipletto. No sinal 8,38 podemos visualizar o hidrogênio da imina da hidrazona e em 12,16 observa-se o hidrogênio da amida.

No espectro 26 é permitido observar os sinais referentes aos carbonos. Os carbonos aparecem em C2 em 156 ppm, em C3 em 119ppm, C4 em 134ppm, C7 em 164ppm, C10 em 158 ppm, C11 em 116ppm, C12 em 136 ppm e C13 e C17 em 128.

De acordo com os dados apresentados nos espectros 25 e 26, há indício de que a síntese do composto 1b foi realizada com êxito, uma vez que pode-se visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

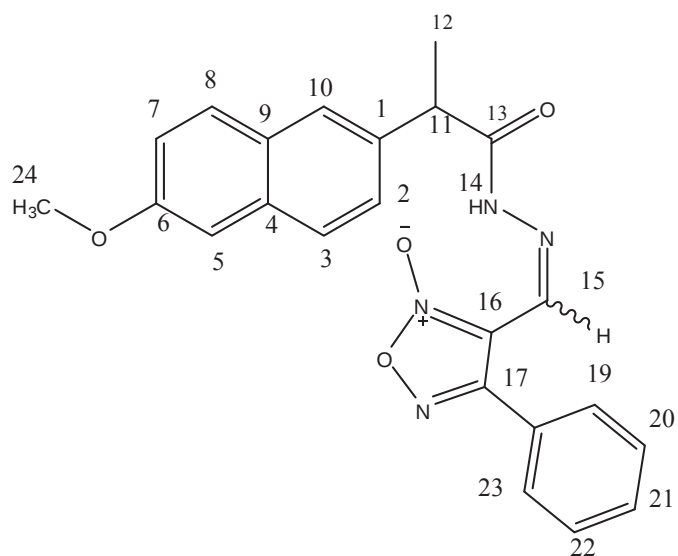
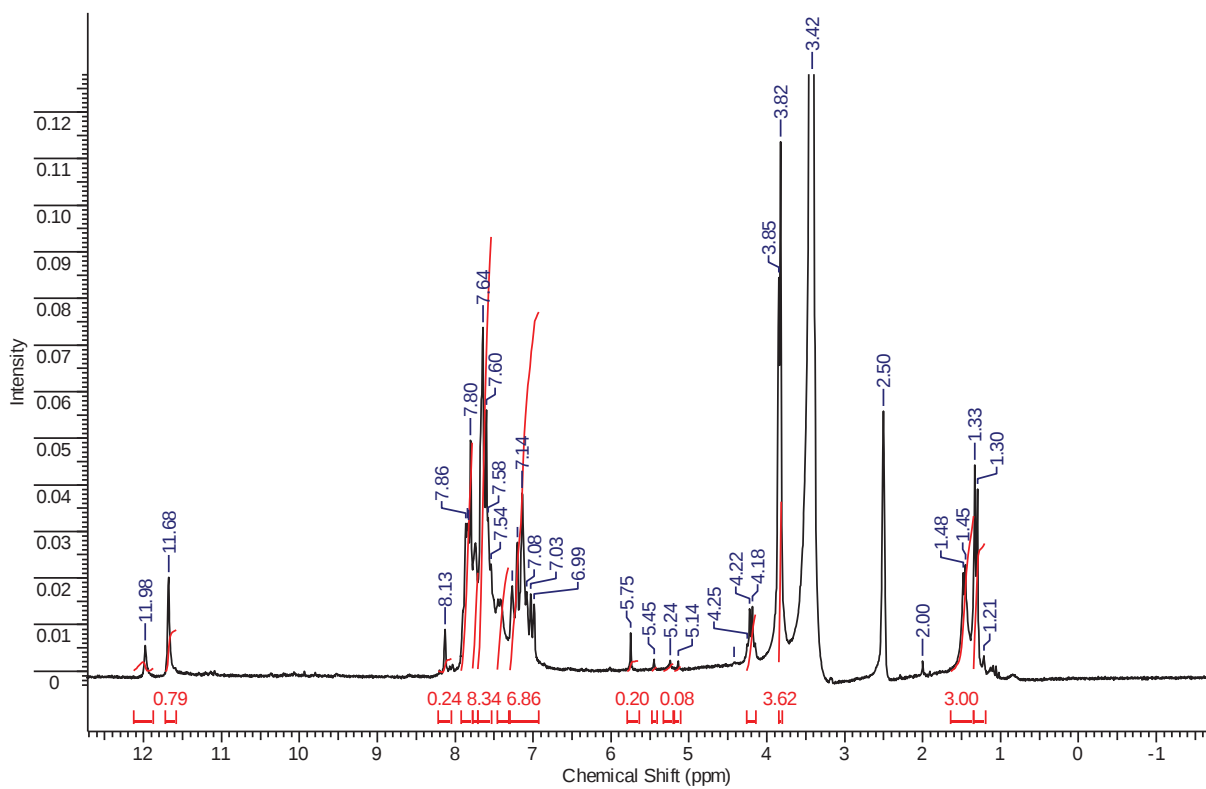


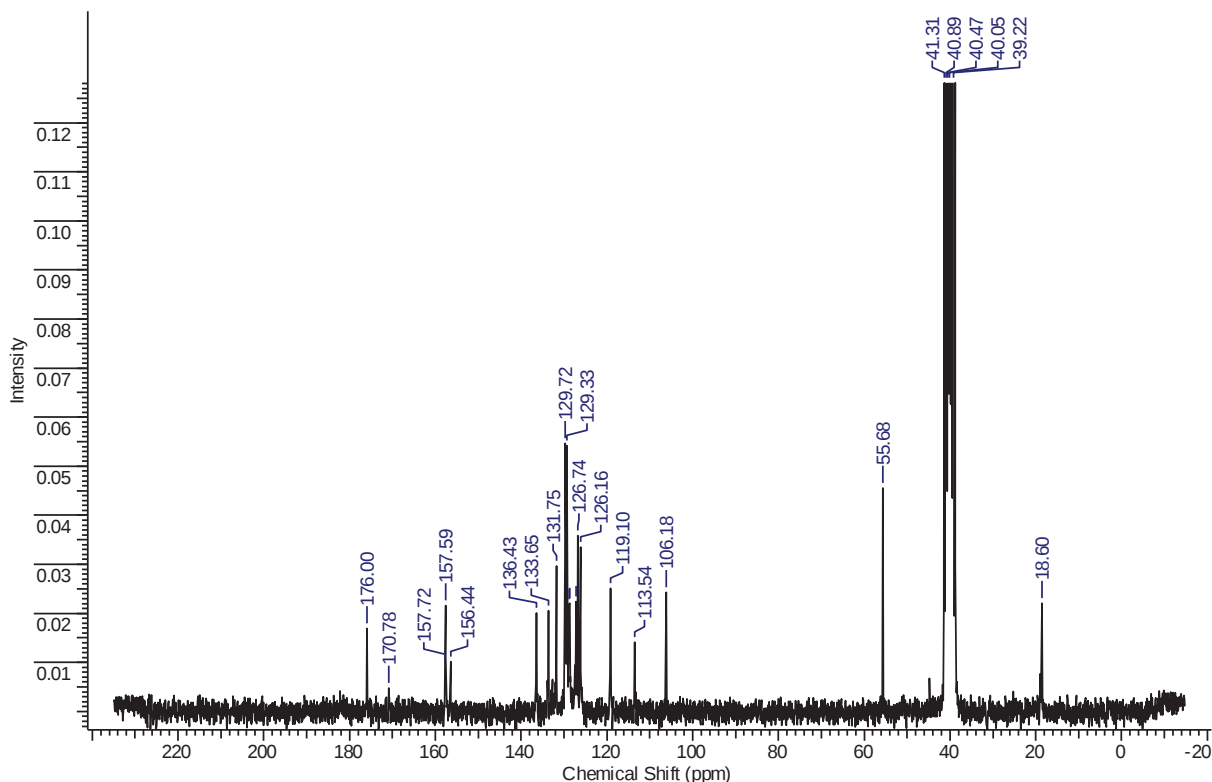
Tabela 25: Deslocamentos relativos ao produto final 2b.

| RMN $H^1$           | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|---------------------|----------------|----------------|
| $CH_3$              | 3,82           | Singlete       |
| $H_2$ a $H_{10}$    | 7,8 a 7,1      | multiplete     |
| $H_{12}$            | 1,48           |                |
| $H_{14}$            | 11,68          | Singlete       |
| $H_{19}$ - $H_{22}$ | 7,8- 7,1       | Multiplete     |

Tabela 26 : Deslocamentos relativos ao produto final 2b.

| RMN $C^{13}$ | $\delta$ (ppm) | RMN $C^{13}$ | $\delta$ (ppm) |
|--------------|----------------|--------------|----------------|
| $C_6$        | 156,40         | $C_{19}$     | 129            |
| $C_{12}$     | 18,62          | $C_{20}$     | 128            |
| $C_{13}$     | 170,90         | $C_{21}$     | 127            |
| $C_{16}$     | 157,77         | $C_{24}$     | 55,78          |
| $C_{17}$     | 113,75         |              |                |

Espectro 27: Ressonância Magnética Nuclear  $H^1$  do produto final 2b utilizando como solvente o DMSO-d<sub>6</sub>.



Espectro 28: Ressonância Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  do produto final 2b utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$

O produto 2b possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 27. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades.

Entre 7,8 e 7,1, podemos visualizar os hidrogênios dos anéis aromáticos apresentados em multipletto. No sinal 3,82 podemos visualizar o hidrogênio da metila da metoxila da hidrazona e em 11,68 observa-se o hidrogênio da amida.

No espectro 28 é permitido observar os sinais referentes aos carbonos. Os carbonos aparecem C6 em 156 ppm, em C12 em 18,62 ppm, C13 em 128, C16 em 157 ppm, C17 em 113 ppm, C18 em 158 ppm, C19 em 129 ppm, C12 em 136 ppm e C24 em 55,58.

Os dados apresentados nos espectros 27 e 28, são indicativos de que a síntese do composto 2b foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

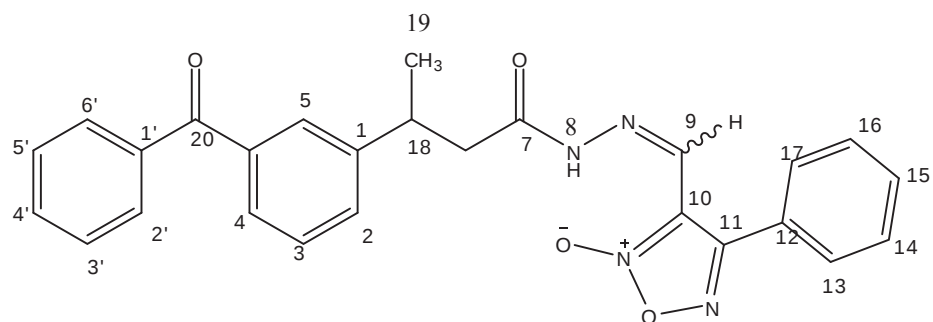
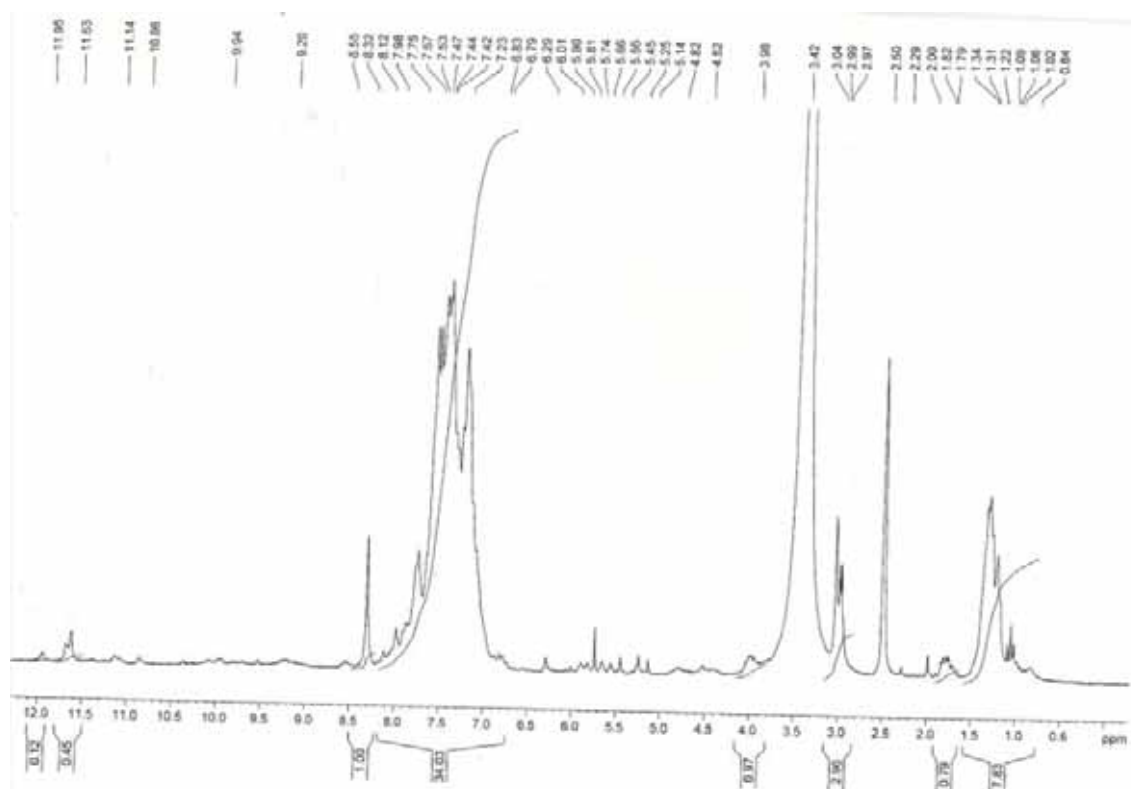


Tabela 27: Deslocamentos do composto 3b.

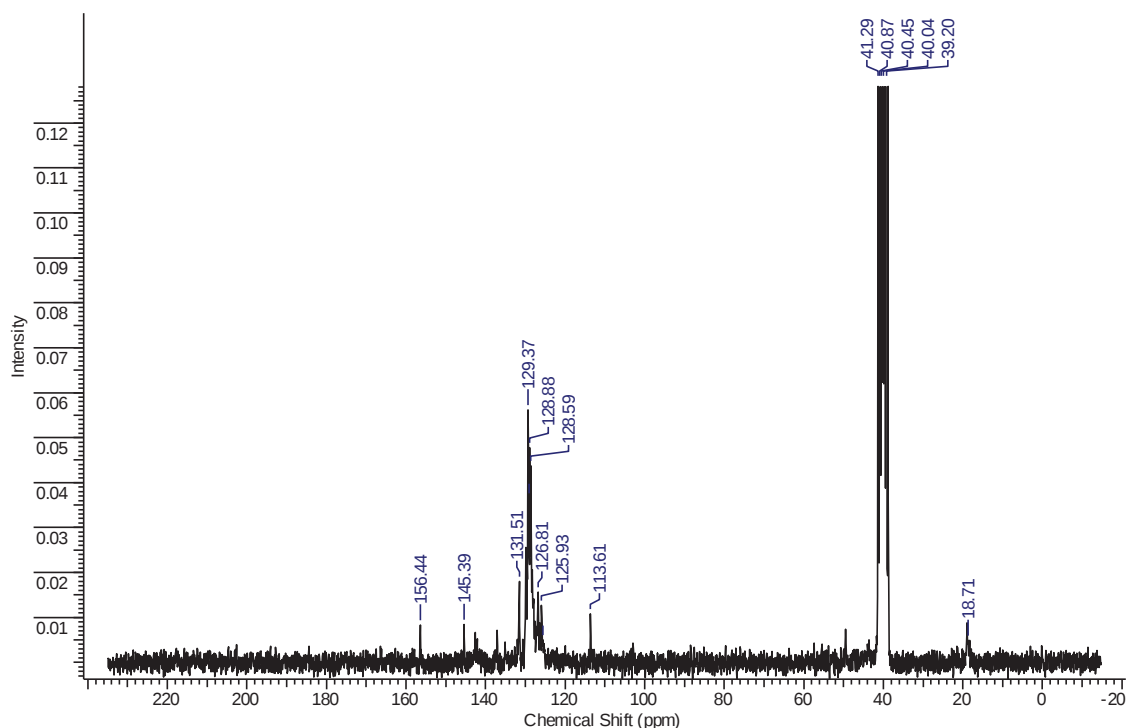
| RMN C <sup>13</sup> | δ (ppm) |
|---------------------|---------|
| C <sub>9</sub>      | 145,39  |
| C <sub>10</sub>     | 156,44  |
| C <sub>11</sub>     | 113,61  |
| C <sub>12</sub>     | 131,11  |
| C <sub>13</sub>     | 129,87  |
| C <sub>14</sub>     | 128,88  |
| C <sub>18</sub>     | 49,44   |
| C <sub>19</sub>     | 18,91   |

Tabela 28: Deslocamentos do composto 3b.

| RMN $H^1$                                                    | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|--------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| $H_2$ a $H_6$ ; $H_{13}$ a $H_{17}$ ; $H_{25}$<br>a $H_{21}$ | 7,9 a 6,8      | multipleteo    |
| $H_8$                                                        | 11,68          | Singleteo      |
| $H_9$                                                        | 8,55           | Singleteo      |
| $H_{18}$                                                     | 3,04           |                |
| $H_{19}$                                                     | 1,34           |                |



Espectro 29: Ressonância Magnética Nuclear  $\text{H}^1$  do produto final 3b utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$



Espectro 30: Ressonância Magnética Nuclear C13 produto final 3b utilizando como solvente o DMSOd<sup>6</sup>

No espectro 29 podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades. Entre 7,9 e 6,8 podemos visualizar o acoplamento dos hidrogênios dos anéis aromáticos.. Em 11,95 podemos visualizar o hidrogênio da amida caracterizado pelo singlete, em 8,55 o hidrogênio da imina da hidrazona e em 1,34 observa-se a metila.

No espectro 30 é permitido observar os sinais referentes aos carbonos. Os carbonos aparecem C9 em 145 ppm, em C10 em 156 ppm, C11 em 113 ppm, C12 em 131 ppm, C13 em 129 ppm, C14 em 128 ppm, C18 em 49ppm, C19 em 18,91 .

De acordo com os dados apresentados no espectro 29 e 30, há um indício de que a síntese do composto 3b foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento hidrogênio da estrutura da molécula proposta porém nota-se a presença de diastereoisômeros devido a duplicação dos sinais no espectro.

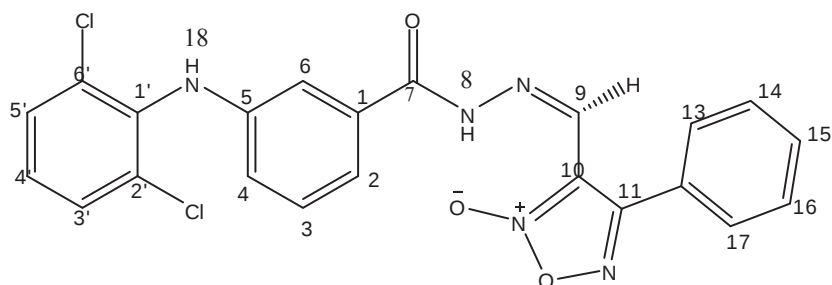
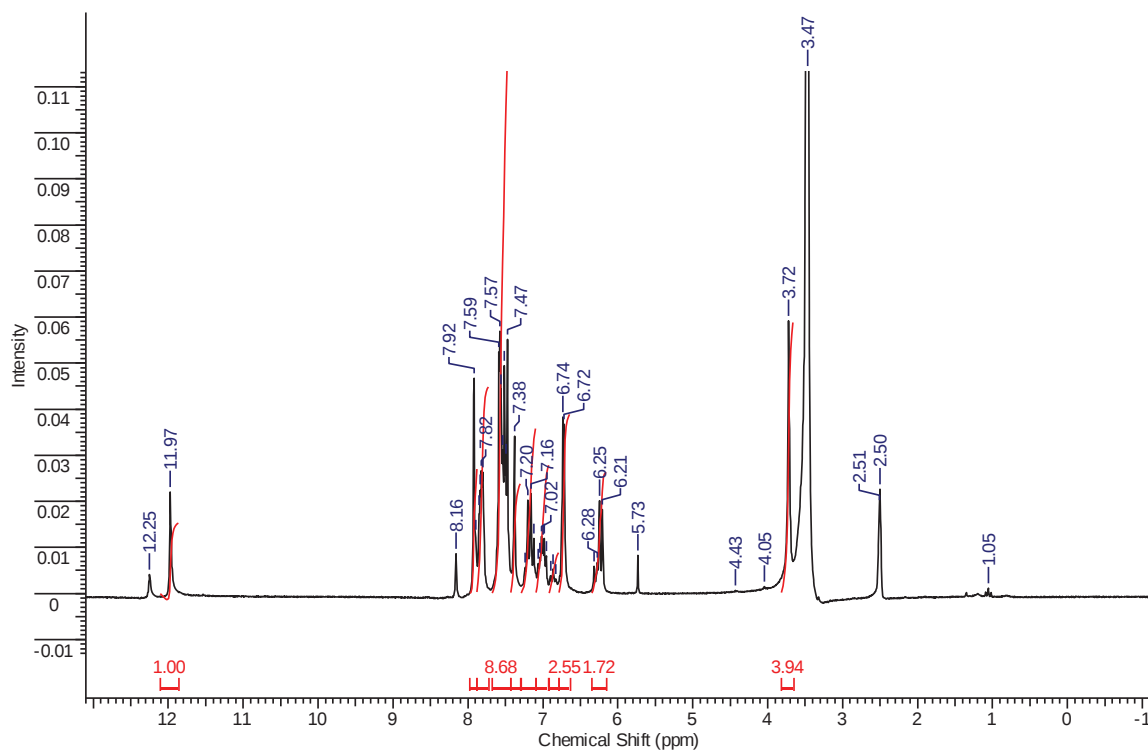


Tabela 29: Deslocamentos do composto 4b

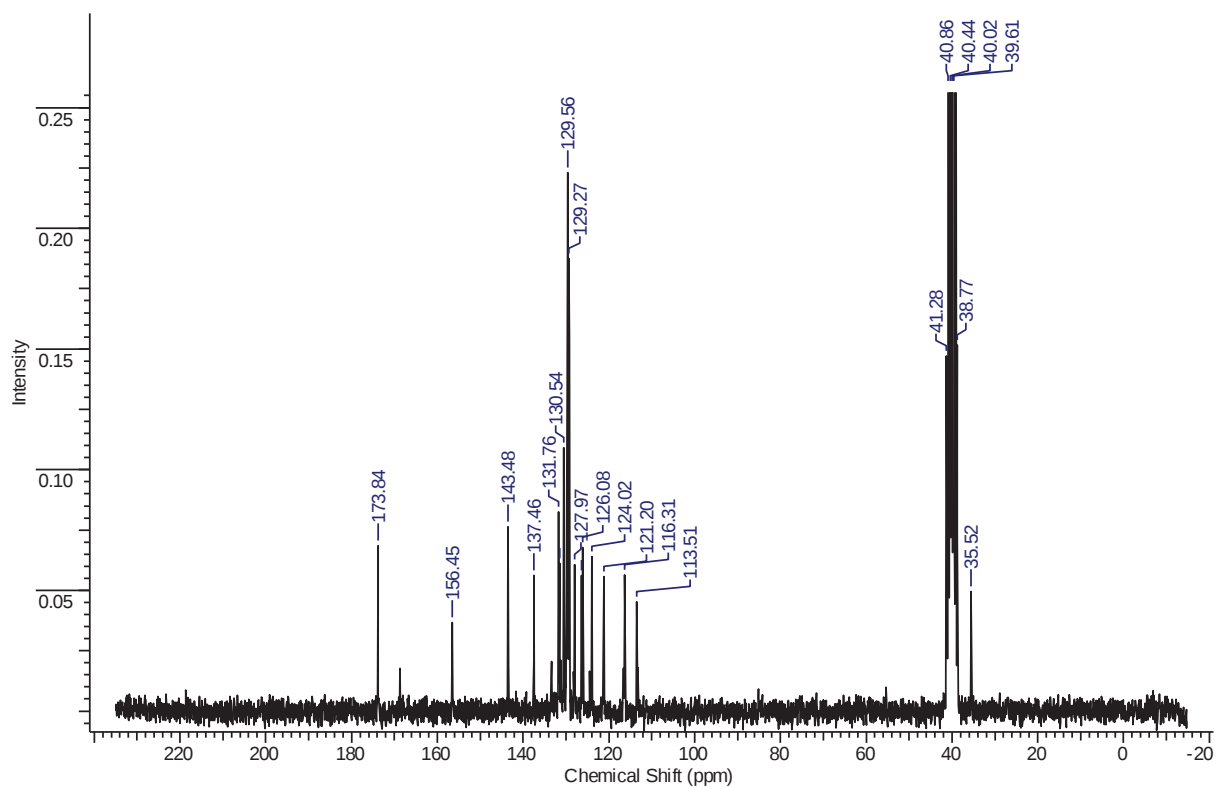
| RMN $H^1$                  | $\delta$ (ppm) | Multiplicidade |
|----------------------------|----------------|----------------|
| $H_{3'} \text{ a } H_{5'}$ | 7,80 - 7,95    | Multiplete     |
| $H_2 \text{ a } H_6$       | 7,6-7,3        | multiplete     |
| $H_8$                      | 11,97          | Singlete       |
| $H_9$                      | 8,16           | Singlete       |
| $H_{18} \text{ - } H_{22}$ | 6,7-7,2        | Multiplete     |

Tabela 30: Deslocamentos do composto 4b

| RMN C <sup>13</sup> | $\delta$ (ppm) |
|---------------------|----------------|
| C <sub>7</sub>      | 168,79         |
| C <sub>10</sub>     | 156,59         |
| C <sub>11</sub>     | 113,57         |
| C <sub>12</sub>     | 133,43         |
| C <sub>13</sub>     | 130,55         |
| C <sub>14</sub>     | 129,58         |
| C <sub>15</sub>     | 128,25         |



Espectro 31: Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  do produto final 4b utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$



Espectro 32: Ressonância Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  do produto final 4b utilizando como solvente o  $\text{DMSO-d}_6$

O composto 4b possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 31. Neste espectro podemos observar a correta interação dos hidrogênios aromáticos e suas multiplicidades.

Entre 7,8 e 7,95, podemos visualizar os hidrogênios do anel aromáticos presente na molécula do diclofenaco apresentados em multiplete. No sinal 8,12 podemos visualizar o hidrogênio da imina e em 11,68 observa-se o hidrogênio da amida.

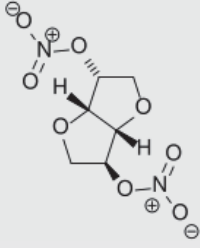
No espectro 32 e é permitido observar os sinais referentes aos carbonos. Os carbonos aparecem C7 em 168 ppm, em C10 em 156 ppm, C11 em 113 ppm, C12 em 133 ppm, C13 em 130 ppm, C14 em 129 ppm e C15 em 128.

Os dados apresentados nos espectros 31 e 32, são indicativos de que o composto 4b foi realizada com êxito, uma vez que se podem visualizar os principais sinais de deslocamento de carbono e hidrogênio da estrutura da molécula proposta.

## 4.2. RESULTADOS DO ENSAIO PARA MENSURAÇÃO DE NITRITO

A tabela 31 apresenta os dados de doção de nitrito dos compostos finais e do padrão dinitrato de isossorbida.

Tabela 31: Porcentagem de doação de Nitrito (mol/mol)

| COMPOSTOS                                                                                                      | % NITRITO (mol/mol)<br>Cisteína 5 mmol |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Dinitrato de isossorbida<br> | 10,7 ±0,2                              |
| Composto 1a                                                                                                    | 1 ± 0.5                                |
| Composto 2a                                                                                                    | 2,3± 0,1                               |
| Composto 3a                                                                                                    | 0,3± 0,1                               |
| Composto 4a                                                                                                    | 2± 0,5                                 |
| Composto 5a                                                                                                    | 2± 0,2                                 |
| Composto 1b                                                                                                    | 5,1 ±0,9                               |
| Composto 2b                                                                                                    | 5,8± 0,8                               |
| Composto 3b                                                                                                    | 3,8±0,7                                |
| Composto 4b                                                                                                    | 4,6±0,9                                |

A quantificação da concentração de nitrito é uma forma indireta de mensurar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos, pois o NO em solução rapidamente reage formando nitritos e nitratos solúveis em meio aquoso. As concentrações de nitrito foram determinadas através da curva analítica ( $f(x) = 0,032x + 0,025$ ;  $r^2 = 0,9997$ ) usando espectrofotômetro UV/visível na concentração compreendida entre 10-80 nmol/L.

Podemos observar que a porcentagem de nitrito liberada pelos compostos **b** foram maiores que os compostos **a**, isso se deve ao fato de terem diferentes substituintes no carbono alfa ligado a subunidade N-óxido, Os compostos **b** possuem uma fenila como substituinte, a qual é responsável pela retirada da densidade eletrônica, tornando o átomo de carbono mais deficiente do ponto de vista eletrônico e mais suscetível ao ataque pela cisteína, liberando mais NO do que os compostos **a** que possuem uma metila como substituinte, comprovando, conforme descrito que compostos com substituintes eletroatratores demonstram maior doação de NO (SORBA et al., 1997).

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que os compostos são doadores de óxido nítrico. Vale ressaltar que o padrão utilizado, dinitrato de isossorbida, possui dois grupos ésteres de nitrato em sua molécula passíveis de doação e os compostos testados tem somente uma, o que explica a grande diferença na porcentagem de nitrito obtida entre os compostos e o padrão.

#### 4.3. RESULTADOS DO ENSAIO DE ATIVIDADE ANALGÉSICA

A reação inflamatória libera mediadores químicos como a bradicinina (BK), prostaglandinas (PGI e PGE2), entre outros, que podem desencadear a dor. Assim, compostos que tenham ação analgésica e antiplaquetária podem contribuir para o tratamento na terapia antiplaquetária. Com este propósito, a atividade analgésica de alguns compostos foi avaliada e está apresentada na Tabela 32:

Tabela 32: % de inibição da contorção abdominal ( $\pm$  E.P.M)

| COMPOSTOS   | % de inibição da contorção abdominal ( $\pm$ E.P.M) |
|-------------|-----------------------------------------------------|
| Dipirona    | 35 $\pm$ 3.65                                       |
| Composto 1a | 68 $\pm$ 7.0                                        |
| Composto 2a | 38.8 $\pm$ 5.4                                      |
| Compsto 3a  | 66.4 $\pm$ 5.0                                      |
| Composto 4a | 22.37 $\pm$ 8                                       |
| Composto 5a | 20,9 $\pm$ 6.8                                      |

Os compostos apresentaram atividade analgésica no modelo animal usado. De acordo com a tabela a acima, a exceção dos compostos 4a e 5a, todos os compostos apresentaram analgésica superior a dipirona usada como controle.

#### 4.4. RESULTADOS DO ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A Figura 4 apresenta o gráfico com os valores obtidos no ensaio de agregação plaquetária dos compostos 1a e 1b:

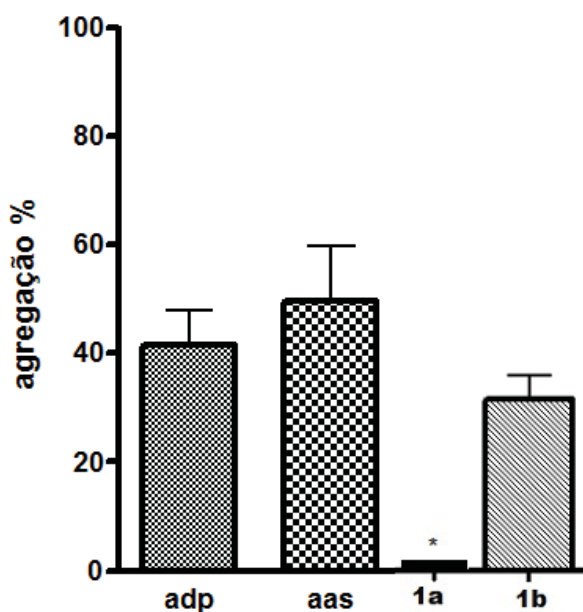


Figura 4: Gráfico da porcentagem de agregação do ensaio de inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de ratos através do método turbidimétrico induzido por ADP.

Os compostos foram capazes de diminuir a agregação plaquetária quando comparados ao ADP e o ácido acetil salicílico conforme mostrado no gráfico acima. Isto demonstra que tais compostos possuem uma atividade antiagregante e poderão ser úteis na terapia antiplaquetária, visto que a agregação das plaquetas possui atividade essencial na formação do trombo e consequentemente nas doenças trombóticas.

## 5 CONCLUSÃO

Todos os compostos intermediários (hidrazidas e furoxanos) foram sintetizados com rendimento entre 60% e 80% e os compostos finais foram obtidos por hibridação molecular das hidrazidas dos anti-inflamatórios com os derivados furoxânicos espaçados pela subunidade *N*-acilhidrazona com rendimentos entre 30 % e 70%. Todos os compostos foram analisados e caracterizados por meio de técnicas analíticas tais como: Faixa de Fusão, Espectrofotometria de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que dão indício de que as respectivas estruturas almejadas foram obtidas.

Foram realizados ensaios farmacológicos de analgesia pelo modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% no qual os compostos apresentaram atividades analgésica superior a dipirona utilizada como controle. No ensaio de agregação plaquetária o composto 1a inibiu significativamente a agregação das plaquetas quando comparado ao ácido acetil salicílico e apresentaram-se ainda como doadores de óxido nítrico no ensaio de doação de óxido nítrico utilizando reagente de Griess.

Tendo em vista os processos que envolvem a formação do trombo, principalmente inflamação e agregação de plaquetas, os compostos sintetizados por serem úteis como antiagregantes plaquetários, poderão ser utilizados na terapia da aterotrombose.

## 6 PERSPECTIVAS

Os métodos de caracterização por RMN e espectro de massas serão concluídos para confirmar que as estruturas almejadas foram obtidas. Serão realizados os ensaios de analgesia e agregação plaquetária com todos os compostos finais sintetizados e ainda o ensaio de atividade anti-inflamatória aguda pelo modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina (WINTER, RISLEY & NUSS, 1962), uma vez que a inflamação possui um papel importante na fisiopatologia das doenças trombóticas. Os dados obtidos nesses ensaios possibilitarão traçar um perfil mais detalhado de atividade dos compostos sintetizados, os quais já são promissores para tratamento da aterotrombose considerando os resultados aqui apresentados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLATIF, K.R.A.; CHOWDHURY, M. A.; DONG, Y.; DAS, D. YU, G.; VELÁZQUEZ, C. A.; SURESH, M. R.; KNAUS, E. E. Dinitroglyceryl and diazen-1-ium-1,2-diolated nitric oxide donor ester prodrugs of aspirin, indomethacin and ibuprofen: Synthesis, biological evaluation and nitric oxide release studies. **Bioorg Med. Chem. Lett.**, v.19, p.3014–3018, 2009.
- ADAMS, L. L.; LUZZIO, F. A. Ultrasound in oxochromium(VI)-amine-mediated oxidations - modifications of the Corey-Suggs oxidation for the facile conversion of alcohols to carbonyl compounds. *J. Org. Chem.*, v. 54, p. 5387-5390, 1989.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos. Editora Artmed. Porto Alegre, p. 189-206, 2001.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quim. Nova.** v. 25(1), p. 129-148, 2002..
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Quím. Nova.** v.22, n. 5, p.744-759, 1999.
- BORN, G.V.; CROSS, M.J. The aggregation of blood platelets. **J. Physiol.** v.168, p.178-195, 1963.
- CARR, D.P.; HENN, R.; GREEN, J. R.; BÖTTCHER, I. Comparison of the systemic inhibition of thromboxane synthesis, anti-inflammatory activity and gastro-intestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the rat **Inflam. Res.** v.19, n.5-6, p.374-375, 1986.
- CENA, C.; BOSCHI, D.; TRON, G.C.; CHEGAEV, K.; LAZZARATO, L.; DISTILO, A.; ARAGNO, M.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Development of a new class of potential antiatherosclerosis agents: NO-donor antioxidants. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 5971–5974, 2004.
- CENA, C.; LOLLI, M.L.; LAZZARATO, L.; GUAITA, E.; MORINI, G.; CORUZZI, G.; MCELROY, S.P.; MEGSON, I.L.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Antiinflammatory, gastrosparing, and antiplatelet properties of new NO-donor esters of aspirin. **J Med Chem.** v. 46 (5), p. 747-754, 2003.
- CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p.57-71, 2005.
- CHIROLI, V.; BENEDINI, F.; ONGINI, E.; DEL SOLDATO, P. Nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drugs: the case of nitroderivatives of aspirin **Eur. J. Med. Chem.** v.38, p.441-446, 2003.

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

CLOSE, B.; Recommendations for euthanasia of experimental animals. Part 1. **Laboratory Animals**, v.30, p.293-316, 1996.

COCCO, M.T; CONGIU, C.; ONNIS, V.; MORELLI, M.; FELIPO, V.; CAULI, O. Synthesis of new 2-arylamino-6-trifluoromethylpyridine-3-carboxylic acid derivatives and investigation of their analgesic activity. **Bioorg. Med. Chem.** v.12, p. 4169-4177, 2004.

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

COSTA, L.M.M. **Estudo do perfil antiagregante plaquetário de uma nova série de derivados N- acilhidrazônicos otimizados a partir do protótipo Lassbio-129.** 117p Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2008.

CUNHA, A.C.; FIGUEIREDO, J. M.; TRIBUTINO, J. L.M.; MIRANDA, A. L.P.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; FRAGA, C. A. M.; SOUZA, M. C. B.V.; FERREIRA, V. F.; BARREIRO, E. J. Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v.11, p. 2051-2059, 2003.

FARMER, J.A.; TORRE-AMIONE, G. Atherosclerosis and inflammation **Curr. Atheroscler. Rep.** v.4, p.92-98, 2002.

FAXON, D.P.; NESTO, R.W. Antiplatelet therapy in populations at high risk of atherothrombosis. **J Natl Med Assoc.** v.98, n.5, p.711-721, 2006.

FRAGA, A.G.M.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, A. L. P.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterocyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.11, p.285-290, 2000.

FREEDMAN, J.E.; TING, B. ; HANKIN, B.; LOSCALZO, J. ; KEANEY, J. F.; VITA, J. A. Impaired Platelet Production of Nitric Oxide Predicts Presence of Acute Coronary Syndromes **Circulation.** v.98, p. 1481-1486, 1998.

GOROG, D.A.; SWEENEY, J. M.; FUSTER, V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs—fact or artifact? **Nat. Rev. Cardiol.** V.6, p. 365, 2009.

HAMILTON, J. R. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy **Blood Rev.** v. 23, n.2, p.61-65, 2009.

HO, S.J.; BRIGHTON, T.A. Ximelagatran: Direct Thrombin Inhibitor **Vasc Health Risk Manag.** v.2, n.1, p. 49-58, 2006.

KEREIAKES, D.J. Adjunctive Pharmacotherapy before Percutaneous Coronary Intervention in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: The Role of Modulating Inflammation **Circulation**. v. 108, p. III22-III27, 2003.

KHAN, B.V.; HARRISON, D. G.; OLBRYCH, M. T. R.; ALEXANDER, W.; MEDFORD R. M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.93, p.9114-9119, 1996.

KULKARNI, S.; DOPHEIDE, S. M.; YAP, C. L.; RAVANAT, C.; FREUND, M.; MANGIN, P.; HEEL, K. A. ; STREET, A.; HARPER, I. S.; LANZA, F.; JACKSON, S. P. A revised model of platelet aggregation **J. Clin. Invest.** v.105, p.783–791, 2000.

LAZZARATO, L.; DONNOLA, M.; ROLANDO, B., MARINI, E.; CENA, C. , CORUZZI, G., GUAITA, E. MORINI, G.; FRUTTERO, R. ; GASCO, A.; BIONDI, S.; ONGINI, E. Searching for New NO-Donor Aspirin-like Molecules: A New Class of Nitrooxy-acyl Derivatives of Salicylic Acid **J. Med. Chem.** v. 51, p.1894–1903, 2008.

LIBBY P, AIKAWA M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. **Nat Med.** v. 8, p. 1257–1262, 2002.

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

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

LINDMARK, E.; TENNO, T.; SIEGBAHN, A. Role of Platelet P-Selectin and CD40 Ligand in the Induction of Monocytic Tissue Factor Expression **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.20, p.2322–2328, 2000.

MASFERRER, J.L.; NEEDLEMAN, P. Anti-inflammatories for cardiovascular disease. **Proc Natl Acad Sci.** v. 97, p. 12400–12401, 2000.

MICHELSON, A.D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. **Nature**. v.9, p. 154-169, 2010.

MICHELSON, A.D. Translational Therapeutics at the Platelet Vascular Interface: A CME-Certified Activity **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, s33-s38, 2008.

MONGE, A.; LÓPEZ DE CERÁIN, A.; EZPELETA, O.; CERECETTO, H.; DIAS, E; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; ONETTO, S.; SEOANE, G.; SUESCUN, L.; MARIEZCURRENA, R. Synthesis and biological evaluation of 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as hypoxia-selective cytotoxins. **Pharmazie**. v.53, n.11, p. 758-764, 1998.

MORA, R.. Prelesional events in atherogenesis: Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit **Atherosclerosis**. v.63, p.143-154, 1987.

MUHLESTEIN, J.B. Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients. **Thromb. Haemos.**, v.103.1, p.71-82, 2010.

PATRONO, C.; COLLIER, B.; DALEN, J.E.; FITZGERALD, G.A.; FUSTER, V.; GENT, M.; HIRSH, J.; ROTH, G. Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. **Chest.** v. 119, p. 39S–63S, 2001.

PATRONO, C.; PATRONO, C. ; COLLIER, B.; FITZGERALD, G. A.; HIRSH, J.; ROTH, G. Platelet-active drugs: The relationships among dose, effectiveness, and side effects: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. **Chest.** v.126, n.3, p. 234S-264S, 2004.

RIDKER, P.M; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; RIFAI, N. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women **N. Engl. J. Med.** v.342, p. 836–843, 2000.

ROSS, R. N. Atherosclerosis is an inflammatory disease **N. Engl. J. Med.** v.340, p. 115–126, 1999.

ROBERTS, W.C. Preventing and arresting coronary atherosclerosis. **Am. Heart. J.** v.130, p.580-600, 1995.

RUSSO, G. Vasoactive substances: Nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis **Vasc. Pharmacol.** v.38, p. 259– 269, 2002.

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

SANTOS, J.L. Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme. 129p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara,. 2009.

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

SEMPLE, JW, FREEDMAN, J. Platelets and innate immunity **Cell Mol. Life Sci.** v.67, n.4, p.499-511, 2010.

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

SILVA,G.A; COSTA, L. M. M.; BRITO, F.C.F.; MIRANDA, A. L.P. ; BARREIRO, E. J. FRAGA, C.A.M. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v.12, p.3149-3158, 2004.

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

STRUPEZEWSKI, J.D. Ellis DB, Allen RC, "To Market, to Market 1990" **Ann. Rept. Med. Chem.** v. 26, 297-313, 1991.

TODESCHINI, A.R. Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v.33, p.189-199, 1998.

VAN HECKEN, A.; SCHWARTZ, J.I.; DEPRÉ, M; DE LEPELEIRE, I.; DALLOB, A.; TANAKA, W.; WYNANTS, K.; BUNTINX, A.; ARNOUT, J.; WONG, P.H.; EBEL, D.L.; GERTZ, B.J.; DE SCHEPPER, P.J. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers **J Clin Pharmacol.** v.40, n.10, p.1109-1120, 2000.

VELÁZQUEZ, C.A.; CHEN, Q.H.; CITRO, M. L.; KEEFER, L. K. ; KNAUS. E. E. Second-Generation Aspirin and Indomethacin Prodrugs Possessing an O2-(Acetoxymethyl)-1-(2-carboxypyrrolidin-1-yl)diazenium-1,2-diolate Nitric Oxide Donor Moiety: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Nitric Oxide Release Studies **J. Med. Chem.** v.51, p.1954–1961, 2008.

VOETSCH, B.; JIN, R. C. ; LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis **Histochem. Cell Biol.** v.122, p.353–367, 2004.

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

VIZIOLI, E.O.; CHUNG, M.C.; MENEGON, R.F.; BLAU, L.; SANTOS, J.L.; LONGO, M.C. "Novel compounds derived from taurine, process of their preparation and pharmaceutical compositions containing these" depositada em 09 de abril de 2009, **PCT/BR 2009/0409** e 15 de outubro de 2009, **WO/2009/124371**.

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

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

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 111, p. 544-547, 1962

## ANEXOS

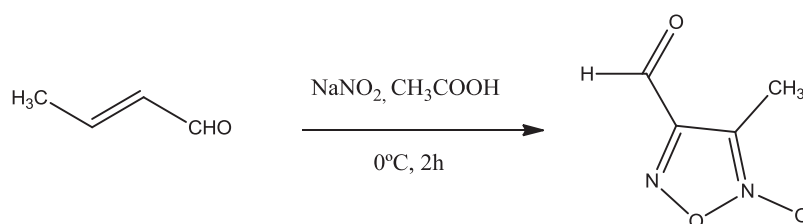
### Metodologia de sínteses e purificação dos compostos intermediários e finais

#### ANEXO I

#### 1.0 METODOLOGIA DE SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS E PRODUTOS FINAIS

##### 1.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS FUROXÂNICOS FUNCIONALIZADOS

##### 1.1.1 Síntese do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (SANTOS, 2009)

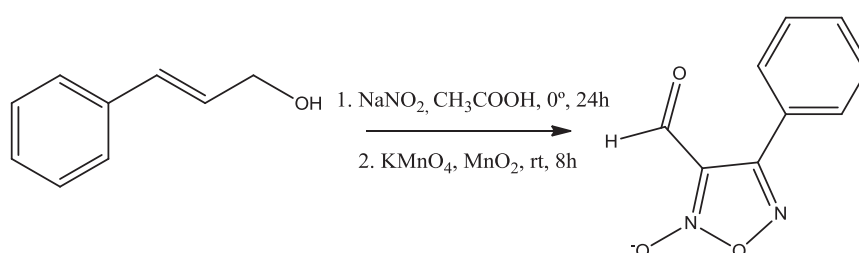


Esquema 1: Obtenção do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído

Para obtenção do derivado 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído adicionou-se a uma solução de crotonaldeído (10g de crotonaldeído ou 0,142 mol em 20mL de ácido acético glacial) em balão de fundo redondo de 125 mL, uma solução saturada de nitrito de sódio (0,497 mol). Essa adição é feita gota a gota, mantendo a reação a uma temperatura abaixo de 14°C e sob agitação magnética constante. Após a completa adição da solução de nitrito de sódio, a reação foi mantida em temperatura ambiente por uma hora.

O isolamento foi feito diluindo-se o conteúdo reacional em 200 mL de água com posterior extração em porções de diclorometano em funil de separação. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl e o agente secante sulfato de sódio anidro foi utilizado para remoção da água residual. Após a evaporação do diclorometano, a separação do produto desejado foi feita em coluna de cromatografia utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano como fase móvel. O rendimento da reação é de 30% e o fator de Retenção 0,19(Rf).

### 1.1.2 Síntese do 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (SANTOS, 2009)



Esquema 2: Obtenção do 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído

O derivado furoxânico 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído foi obtido adicionando-se 10,8g do álcool trans-cinâmico em 16mL de ácido acético em balão de fundo redondo de 125 mL sob agitação magnética constante. Em seguida, foi adicionada gota a gota solução saturada de nitrito de sódio mantendo a reação em banho de gelo. Após a completa adição da solução de nitrito de sódio, a reação foi retirada do banho de gelo e mantida em temperatura ambiente por um período de vinte e quatro horas.

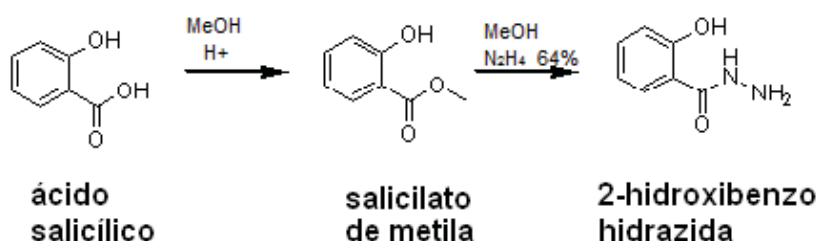
A extração foi feita em porções de éter etílico, até que as frações de éter começassem a sair transparentes (as primeiras frações saem com uma coloração amarelo intensa). A fase orgânica foi então lavada com solução saturada de NaCl e foi adicionado o agente secante sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. O volume do conteúdo foi reduzido sob pressão reduzida e a purificação do produto desejado foi feita em coluna de cromatografia utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano como fase móvel. O rendimento da reação é de 90% e o fator de Retenção 0,71 (Rf).

Após a purificação, a função álcool foi oxidada a aldeído diluindo-se 900mg do derivado furoxânico em 30 mL de diclorometano anidro em balão de fundo redondo de 125 mL e adicionando 1,45g de PCC (13,44 mmol). Este meio reacional foi mantido sob vigorosa

agitação sob temperatura ambiente durante um período de 24 horas. Uma vez completada a reação, o conteúdo do meio reacional foi filtrado em coluna de terra diatomácea sob pressão reduzida para remoção da mistura do óxido. O fator de Retenção é 0,85 (Rf), e a reação tem rendimento de 60%.

## 1.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS ANTIINFLAMATÓRIOS FUNCIONALIZADOS

### 1.2.1 Síntese do derivado 2-hidroxibenzohidrazida



Esquema 3: Obtenção do derivado 2-hidroxibenzohidrazida

Na primeira etapa foi obtido o salicilato de metila . Em um balão de 100mL, adicionou-se 7 gramas de ácido salicílico, 30 mL de metanol e 2mL ácido sulfúrico concentrado. A reação foi mantida sob aquecimento e refluxo pelo período de 4 horas.

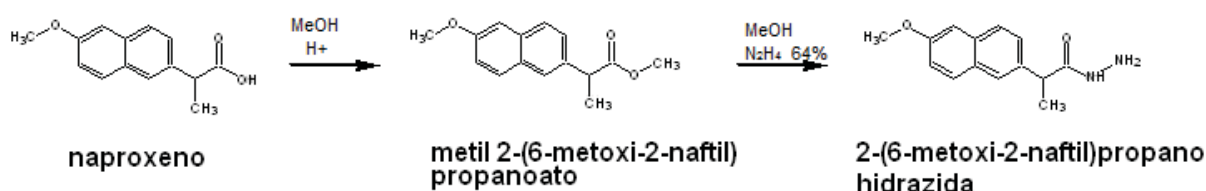
A extração foi feita com diclorometano (4 vezes de 50mL) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio e adicionado sulfato de sódio anidro que é um agente secante para remoção da água residual e fez-se uma filtração simples.O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e após evaporação, o produto foi obtido na forma de um óleo incolor, com rendimento de 70 %.

Para a obtenção do 2-hidroxibenzohidrazida foi adicionado em um balão de 125 mL 10 mL do salicilato de metila (77,5 mmol), 50 mL de metanol e 31 mL de hidrato de hidrazina. A reação foi mantida sob refluxo e agitação por 16 horas até que a cromatografia

em camada delgada indicasse o término da reação (Fase móvel: 90% diclorometano; 10% metanol).

A reação foi resfriada e o volume de solvente é foi diminuído à pressão reduzida para fornecer um sólido branco amorfo com faixa de fusão entre 146°-149°C. O rendimento obtido foi de 80%.

### 1.2.2 Síntese do derivado do 2-(6-metoxi-2-naftil)propanohidrazida



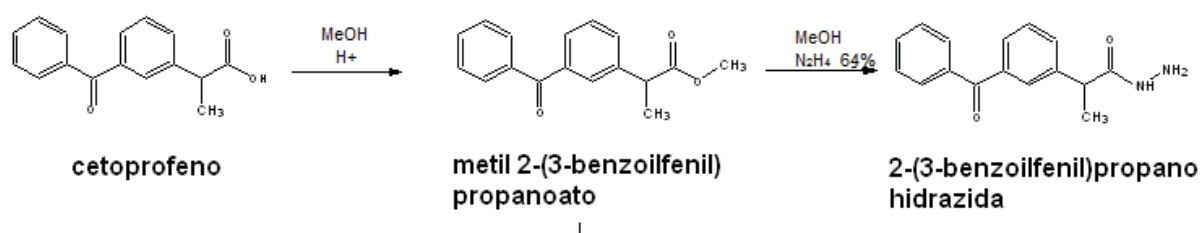
Esquema 4: Obtenção do derivado 2-(6-metoxi-2-naftil)propanohidrazida

Na primeira etapa em um balão de 250 mL conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados 0,7 g (3 mmol) de naproxeno, 50 mL de metanol e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A reação foi mantida sob refluxo e agitação por 6 horas até que por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (fase móvel: 90% diclorometano; 10% metanol). O produto foi obtido por eliminação do solvente à pressão reduzida para fornecer 0,74 g um sólido amorfo de coloração alaranjado com faixa de fusão entre 88°-94°C .

Na segunda etapa um balão de 250 mL conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados 0,5 g de éster de naproxeno, 50 mL de metanol e 8 mL de hidrato de hidrazina 25%. A reação foi mantida sob refluxo e agitação por 24 horas até que por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (fase móvel: 1:1; hexano:acetato de etila).

O produto foi obtido por redução do solvente à pressão reduzida, seguido de adição de cerca de 4 mL de água/gelo. Houve formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com água gelada para fornecer 0,38 g um sólido amorfo de coloração branca com faixa de fusão entre 129°C-133°C. O rendimento foi de 68%.

### 1.2.3 Síntese do derivado do cetoprofeno (3-benzoilfenil)propanohidrazida



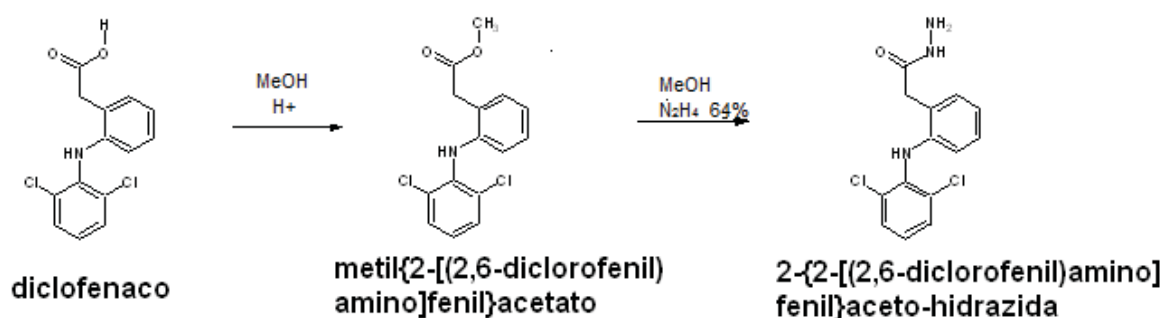
Esquema 5: Obtenção do derivado (3-benzoilfenil)propanohidrazida

Na primeira etapa o metil 2-(3-benzoilfenil)propanoato foi obtido adicionando-se a um balão de 250 mL conectado a um condensador de refluxo, 0,5 g (1,96 mmol) de cetoprofeno, 50 mL de metanol e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A reação foi mantida em agitação por 8 horas até que por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (fase móvel: 70% hexano; 30% acetato de etila). O produto foi obtido por eliminação do solvente à pressão reduzida em temperatura ambiente para fornecer 0,527 g um sólido amorfo de coloração branca. Em um balão de 250 mL conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados 0,5 g (1,86 mmol) de éster de cetoprofeno, 50 mL de metanol e 9 mL de hidrato de hidrazina 25%. A reação foi mantida sob aquecimento e agitação por 24 horas até que por cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (fase móvel: 70% hexano; 30% acetato de etila).

A (3-benzoilfenil)propanohidrazida, foi obtida por redução do solvente à pressão reduzida em temperatura ambiente, seguido de adição de cerca de 4 mL de água/gelo. Houve formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com água gelada para fornecer 0,375 g

um sólido amorfo de coloração branco com faixa de fusão maior que 332°C. O rendimento foi de 60%.

#### 1.2.4 Síntese do derivado do diclofenaco {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil} aceto-hidrazida



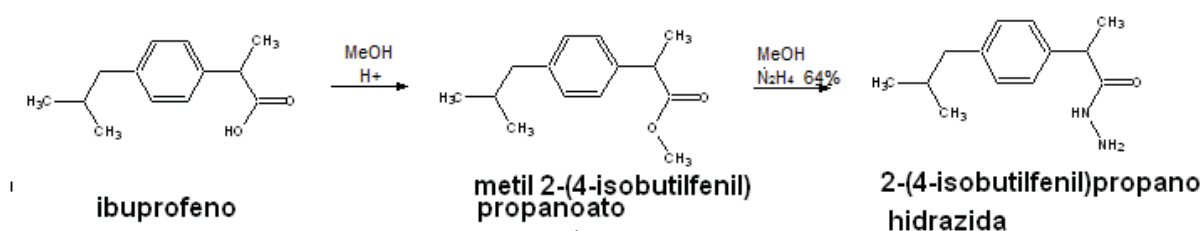
Esquema 6: Obtenção do derivado {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil} aceto-hidrazida

A obtenção do intermediário metil {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato foi feita em um balão de 125 mL, onde foram adicionados 500 mg (1,68 mmol) de diclofenaco, 40 mL de metanol e 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. A reação foi mantida sob agitação e refluxo por 6 horas até que o acompanhamento reacional por cromatografia em camada delgada (C.C.D.) indicasse o término da reação (Fase móvel: 90%CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 10% MeOH). O volume reacional foi reduzido a ~15 mL, adicionou-se gelo à mistura reacional (~ 4 mL) e o pH foi neutralizado utilizando solução de bicarbonato de sódio saturada. Houve a formação de precipitado de cor branco que foi filtrado e lavado com água gelada para fornecer 480 mg (91%) do éster metílico.

Na segunda etapa em um balão de 125 mL, foram adicionados 500 mg (1,61 mmol) de éster metílico de diclofenaco obtido na etapa anterior, 20 mL de metanol e 6 mL de hidrato de hidrazina 25%. A reação foi mantida sob agitação e refluxo por 24 horas até que o acompanhamento reacional por cromatografia em camada delgada (C.C.D.) indicasse o

término da reação (Fase móvel: 90%CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:10% MeOH). O volume reacional foi reduzido a ~8 mL, adicionou-se gelo à mistura reacional (~ 4 mL). A mistura foi armazenada “overnight” em geladeira. Houve a formação de precipitado de cor branco que foi filtrado e lavado com água gelada para fornecer 450 mg (90%) da hidrazida de diclofenaco (faixa fusão= 160°C – 161,6 °C).

### 1.2.5 Síntese do derivado do 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida



Esquema 7: Obtenção do derivado 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida

Na primeira etapa da síntese foi feita a esterificação do ibuprofeno adicionando em um balão de 125 mL, 0,3 g (1,45 mmol) de ibuprofeno, 20 mL de metanol (CH<sub>3</sub>OH) e 2 gotas de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas até que a cromatografia em camada delgada indicasse o término da reação (fase móvel: 95% diclorometano; 5% metanol).

O solvente foi evaporado em temperatura ambiente à pressão reduzida para obtenção de 0,32 g de um sólido amorfo de coloração branco com rendimento de 90%.

Para obtenção do 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida, em um balão de 125 mL de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados 0,32 g do éster de ibuprofeno (1,45 mmol), 20 mL de metanol (CH<sub>3</sub>OH) e 10 mL de hidrato de hidrazina 25%.

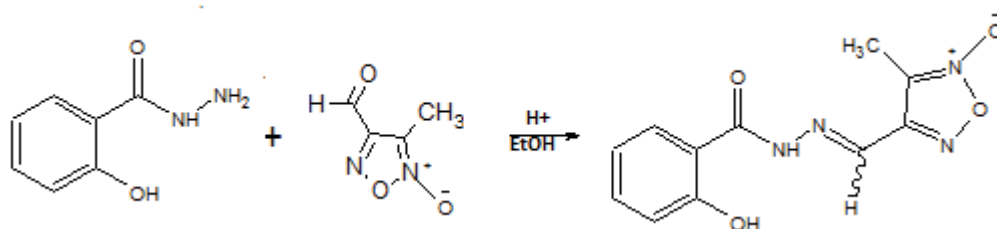
A reação foi mantida a 45°C-50°C por 24 horas até que por cromatografia em camada delgada (fase móvel: 90% diclorometano; 10% metanol) pudesse se observar o término da reação. Quando a reação não ocorria no tempo descrito adicionava-se cerca de 2 mL de

hidrato de hidrazina 25% e acompanhava-se a reação por cerca de 4 horas. O isolamento reacional foi feito reduzindo o volume de solvente, e adicionando em seguida cerca de 4 mL água/gelo. Foi, então, observada a formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com cerca de 10 mL de água gelada para fornecer 0,186 g de um sólido amorfo de coloração branca com faixa de fusão entre 78°-81°C. O rendimento obtido foi de 60%.

Caso o produto não precipite com esse processo, deve-se adicionar ácido sulfúrico até que o pH seja neutro, nesse pH há formação de precipitado que, da mesma forma que o procedimento acima descrito, pode ser filtrado e lavado com água gelada.

### 1.3 SÍNTESE DAS HIDRAZONAS DO DERIVADO FUROXÂNICO METILADO

#### 1.3.1 Síntese do produto final (1a)



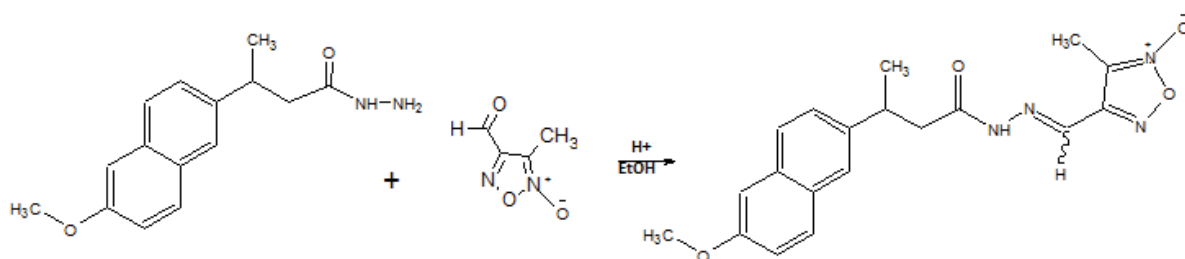
Esquema 8: Obtenção do produto final (1a)

Para obter o composto 1a, 200mg do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído foram dissolvidos em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 237 mg 2-hidroxibenzohidrazida. O 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído foi colocado em excesso pois é muito solúvel em etanol, meio em que ocorre a reação. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 7 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As

placas cromatográficas foram reveladas com ninidrina, reagente que cora em rosa os grupos com amina livre. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Este foi separado por filtração e lavado com água fria. A hidrazona do derivado furoxânico metílico é um sólido amarelo com ponto de fusão entre 216 -218°C, e rendimento de 62%.

### 1.3.2 Síntese do produto final 2a



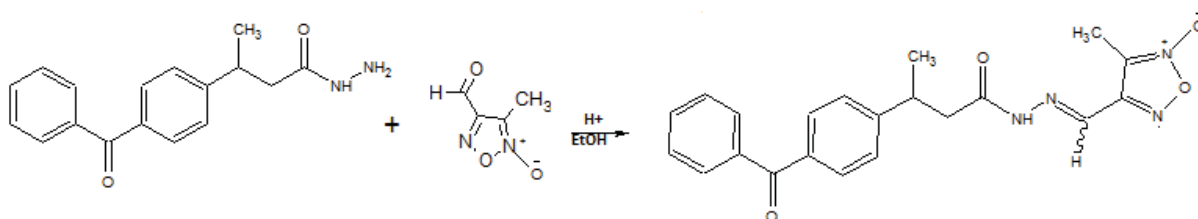
Esquema 9: Obtenção do produto final 2a

A obtenção do composto 2a, foi feita dissolvendo 300mg do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 600mg 2-(6-metoxi-2-naftil) propanohidrazida. O 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído foi colocado em excesso pois é muito solúvel em etanol, meio em que ocorre a reação. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 12 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente reveladas com ninidrina, reagente que cora em rosa os grupos com amina livre. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do

meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Como não houve precipitação do produto foram feitas extrações com porções de diclorometano até que este estivesse transparente. O solvente foi evaporado a sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica na qual foi utilizada como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano. A hidrazona obtida não tem ponto de fusão definido por ser um produto oleoso e rendimento de 58%.

### 1.3.3 Síntese do produto final 3a



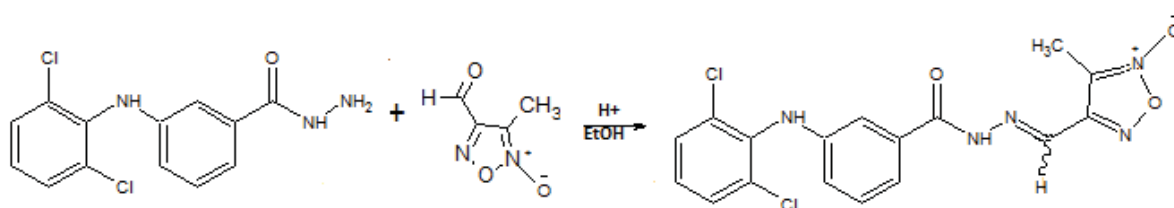
Esquema 10: Obtenção do produto final 3a

O composto 3a, foi obtido, dissolvendo 100mg do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 200mg 3-benzoilfenil)propanohidrazida. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 20 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente reveladas com ninidrina, reagente que cora em rosa os grupos com amina livre. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Como não houve precipitação do produto foram feitas extrações com porções de

diclorometano até que este estivesse transparente. O solvente foi evaporado a sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica na qual foi utilizada como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano. O produto não tem ponto de fusão definido por ser um produto oleoso, fator de retenção ( $R_f$ ) e rendimento de 50%.

#### 1.3.4 Síntese do produto final 4a

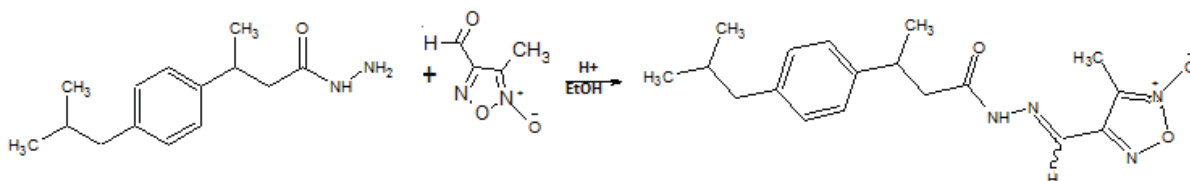


Esquema 11: Obtenção do produto 4a

O composto 4a foi obtido, dissolvendo 90mg do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 200mg {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetohidrazida. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 8 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente 2,4-difenilaminopiridina (Revelador de Brad) que cora em amarelo os grupos com a função aldeído. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Foi feita então uma filtração a vácuo para isolamento do produto. A faixa de fusão do produto foi entre 190 e 192,7°C e rendimento de 80%.

### 1.3.5 Síntese do produto final 5a



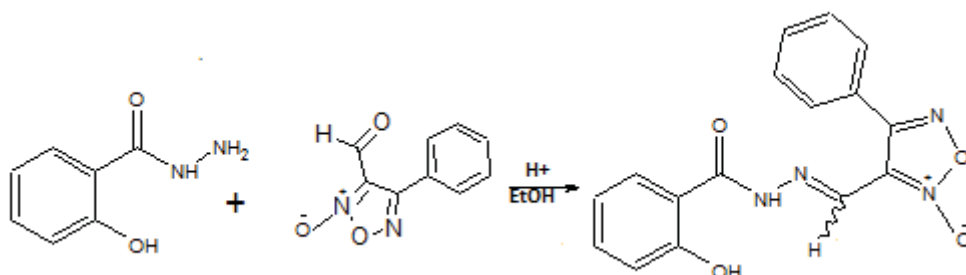
Esquema 12: Obtenção do produto 5a

Para obter o composto 5a 240mg do 4-metil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 400mg da 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 17 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente reveladas com ninidrina, reagente que cora em rosa os grupos com amina livre. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Como não houve precipitação do produto foram feitas extrações com porções de diclorometano até que este estivesse transparente. O solvente foi evaporado a sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica na qual foi utilizada como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano. A hidrazona não tem ponto de fusão definido por ser um produto oleoso, e rendimento de 53%.

## 1.4 SÍNTESE DAS HIDRAZONAS DO DERIVADO FUROXÂNICO

### 1.4.1 Síntese do produto final 1b

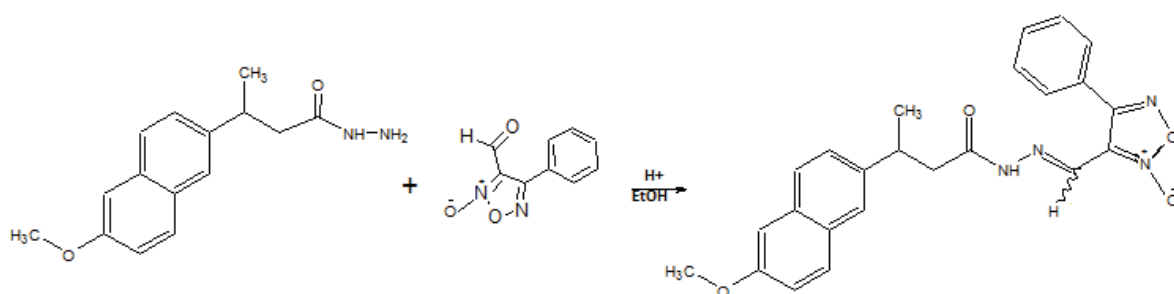


Esquema 13: obtenção do produto final 1b

Para obter o produto final 1b foram dissolvidos 910mg do 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 600mg . A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 7 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com ninidrina, reagente que cora em rosa os grupos com amina livre. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Como não houve precipitação do produto foram feitas extrações com porções de diclorometano até que este estivesse transparente. O solvente foi evaporado a sob pressão reduzida. A hidrazona apresentou faixa de fusão entre 180° C – 183°C e rendimento de 50%.

### 1.4.2 Síntese do produto final 2b

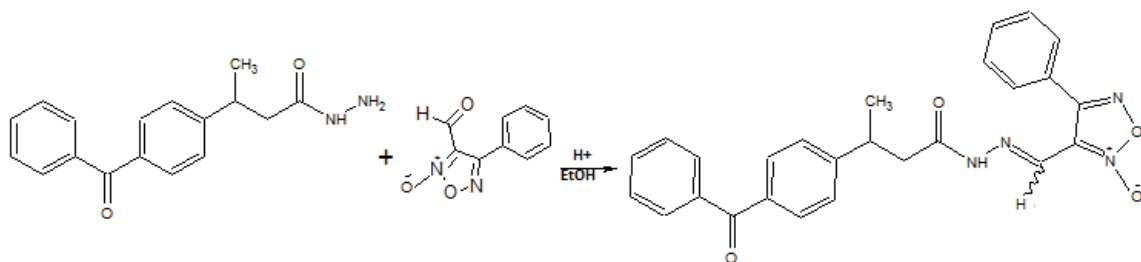


Esquema 14: Obtenção do produto final 2b

A obtenção do produto final 2b, foi feita dissolvendo 380mg do 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 400mg 2-(6-metoxi-2-naftil) propanohidrazida. O 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído foi colocado em excesso pois é muito solúvel em etanol, meio em que ocorre a reação. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 12 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com ninidrina, reagente que cora em rosa os grupos com amina livre. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Como não houve precipitação do produto foram feitas extrações com porções de diclorometano até que este estivesse transparente. O solvente foi evaporado a sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica na qual foi utilizada como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano. A hidrazona tem faixa de fusão entre 170°C- 174°C e rendimento de 55%.

### 1.4.3 Síntese do produto final 3b

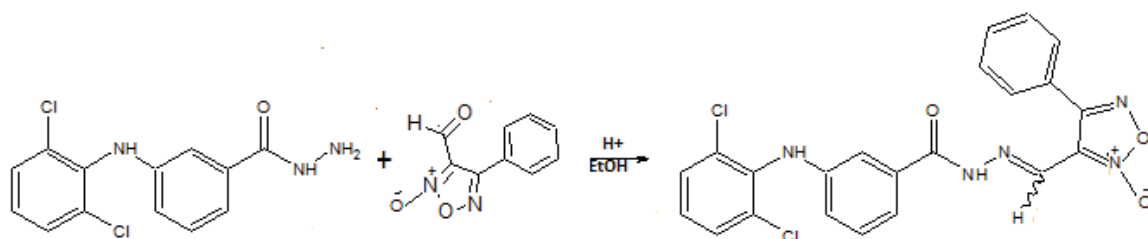


Esquema 15: Obtenção do produto final 3b

O composto 3b, foi obtido, dissolvendo 500mg do 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 600mg da 3-benzoilfenil)propanohidrazida. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 20 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente 2,4-difenilaminopiridina (Revelador de Brad) que cora em amarelo os grupos com a função aldeído. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto. Como não houve precipitação do produto foram feitas extrações com porções de diclorometano até que este estivesse transparente. O solvente foi evaporado a sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica na qual foi utilizada como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de 50% Acetato de Etila e 50% Hexano. O produto tem faixa de fusão entre 190°C e 195°C e rendimento de 42%.

### 1.4.4 Síntese do produto final 4b



Esquema 16: Obtenção do produto final 4b

O produto final 4b foi obtido, dissolvendo 380 mg do 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído em 5 mL de etanol e adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, com posterior adição de 2-3 gotas de ácido acético glacial. Em seguida foram adicionados 600mg {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetohidrazida. A reação ocorreu sob agitação constante e temperatura ambiente, por um período de 8 horas.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% Acetato de Etila e 30% Hexano. As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente 2,4-difenilaminopiridina (Revelador de Brad) que cora em amarelo os grupos com a função aldeído. Os resultados mostraram que essa função não estava presente no produto desejado. Decorrido o tempo de reação, reduziu-se o volume do meio reacional sob pressão reduzida, e adicionou-se gelo para ocorrer precipitação do produto foi feita então uma filtração a vácuo para isolamento do produto. A faixa de fusão do produto está entre 176°C-178°C e rendimento foi de 63%.

## ANEXO II

### Protocolos Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 06/2010

Interessado: THAIS REGINA FERREIRA DE MELO  
Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos  
Projeto: Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos na Anemia Falciforme (Edema de Pata de Rato).

#### Parecer nº 11/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos na Anemia Falciforme (Edema de Pata de Rato)", apresentado pela Acadêmica em Iniciação Científica Thais Regina Ferreira de Melo, orientada pelo Professor Doutor Jean Leandro dos Santos, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em setembro de 2010.

Araraquara, 27 de abril de 2010.



Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE  
Coordenadora do CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAR nº 05/2010

Interessado: THAIS REGINA FERREIRA DE MELO

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Projeto: Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos na Anemia Falciforme (analgesia).

#### **Parecer nº 10/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos na Anemia Falciforme (analgesia)", apresentado pela Acadêmica em Iniciação Científica Thais Regina Ferreira de Melo, orientada pelo Professor Doutor Jean Leandro dos Santos, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em outubro de 2010.

Araraquara, 27 de abril de 2010.

  
Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE  
Coordenadora do CEP

