

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS LAPDES FUR-FD E ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA COM POTENCIAL ATIVIDADE
NEUROPROTETORA

RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Chung Man Chin
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP
2013

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

OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS LAPDES FUR-FD E ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA COM POTENCIAL ATIVIDADE
NEUROPROTETORA

RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI

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

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Chung Man Chin
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

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

Chelucci, Rafael Consolin
C521o Obtenção de híbridos Lapdesf FUR-FD e atividade anti-inflamatória com
potencial atividade neuroprotetora. / Rafael Consolin Chelucci. –
Araraquara, 2013
147 f.

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

Orientador: Chung Man Chin

Coorientador: Jean Leandro dos Santos

1. Neuroinflamação. 2. Alzheimer. 3. Ftálimida. 4. Furoxano. 5. Óxido
Nítrico. 6. Inflamação. I. Chung, Man Chin, orient. II. Santos, Jean Leandro
dos, coorient. III. Título.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas graças a Deus
não sou o que era antes.”

Martin Luther King

Este trabalho é dedicado a meus pais Antonio e Sueli,
devo a eles tudo que conquistei em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Antonio e Sueli, pela educação que me deram, pelos incentivos em continuar estudando cada vez mais, acreditando sempre em minha capacidade de desenvolver o melhor, e que tudo daria certo.

A minha namorada Tatiane, pela sua infinita paciência e tolerância com minha sempre constante displicência com nosso relacionamento. Por estar sempre presente nos momentos em que mais precisei de ajuda durante a realização deste trabalho.

A minha orientadora, prof.^a Dra. Chung Man Chin, por toda confiança em meu trabalho, sempre me dando total liberdade para a realização deste projeto.

Ao prof.^o Dr. Jean Leandro dos Santos, pela inestimável ajuda e colaboração para a realização deste trabalho.

A prof.^a Dra. Iracilda Zeppone Carlos por abrir a porta de seu laboratório para a realização de ensaios biológicos, e a técnica Marisa Campos Polesi Placeres por ajudar na execução dos mesmos.

Ao aluno de pós-graduação Michel L. de Campos por se dispor a ensinar como realizar o ensaio de determinação do Log P.

Aos companheiros do laboratório, alunos de iniciação científica e pós-graduação, Diego, Escobar, Karina, Luiz, Isabela, Juliana, Thaís, Aylime, Daniela, Marcella, Arthur, Lucas (Barata), Carla, Priscila, Luiza, Zé Ricardo, entre outros tantos que passaram por aqui, pela ajuda que sempre me ofereceram e pelos bons momentos vividos no dia-a-dia do laboratório, sempre com boas conversas e risadas.

Ao técnico Matheus Scontrì pela ajuda e suporte para o bom andamento do trabalho, disponibilizando o material necessário para a execução dos experimentos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo suporte financeiro à realização do trabalho.

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

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Resumo

Doenças neurodegenerativas são definidas como distúrbios que acarretam na perda progressiva de estrutura e/ou função, e até mesmo morte de células neuronais específicas, em diferentes distribuições anatômicas, e, conseqüentemente, dando origem a diferentes sintomas clínicos. Entre as varias doenças neurodegenerativas a doença de Alzheimer (DA) é a principal e a mais comum forma de demência. A DA é uma condição progressiva complexa que envolve interações sequenciais de cascatas patológicas, incluindo a interação dos peptídeos β -amiloides (β A) que se agregam levando ao desenvolvimento de placas senis, e a hiperfosforilação e agregação da proteína *tau* formando emaranhados neurofibrilares (ENF), juntamente a processos associados, como a inflamação e o estresse oxidativo. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma das principais citocinas pró-inflamatórias cujos níveis elevados são observados em diversas doenças neurodegenerativas. O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula de sinalização na modulação da plasticidade sináptica e está associada ao processo de aprendizagem e memória, assim como seus efeitos neuroprotetores quando presente em baixas concentrações. Assim, compostos derivados ftalimídicos, capazes de inibir TNF- α , poderiam reduzir o processo de neuroinflamação que é descrita na DA, retardando a progressão da doença, e derivados doadores de NO poderiam contribuir na plasticidade sináptica, cognição e memória dos pacientes acometidos pela DA. Foi objetivo deste trabalho a obtenção dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, planejados por meio da estratégia de hibridação molecular entre a subunidade ftalimídica e o núcleo furoxânico. Os compostos obtidos foram avaliados para determinar o potencial efeito anti-inflamatório através do modelo de inflamação aguda (edema de pata), a determinação do Log P experimentalmente para avaliar sua capacidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE), mutagenicidade *in vivo* com o teste de micronúcleo em reticulócitos obtidos do sangue periférico de camundongos, a capacidade dos compostos em inibir a síntese de TNF- α em ensaio imunoenzimático (ELISA) e a atividade antioxidante dos compostos utilizando método de DPPH. Os compostos Lapdesf FUR-FD IV e V apresentaram atividade anti-inflamatória equivalente aos seus controles positivos, enquanto os demais compostos apresentaram atividade somente superior ao controle negativo. O log P obtido experimentalmente apresentou valores condizentes para fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC). Também, observou-se que nenhum dos compostos foi mutagênico quando comparados ao controle positivo utilizado. Os compostos apresentaram resultados semelhantes à talidomida na inibição a síntese de TNF- α em macrófagos ativados com lipopolissacarídeos (LPS), e não demonstraram possuir atividade antioxidante no modelo de DPPH.

Abstract

Neurodegenerative diseases are defined as disorders that result in progressive loss of structure and/or function, and even cell death in neuronal specific in different anatomical distributions, and hence giving rise to varying clinical symptoms. Among the various neurodegenerative diseases Alzheimer's disease (AD) is the main and most common form of dementia. AD is a progressive condition that involves complex interactions and sequential pathological cascades, including the interaction of β -amyloid peptide (β A) which clump together leading to the development of senile plaques, and hyperphosphorylation and aggregation of tau forming neurofibrillary tangles (ENF) along the associated processes, such as inflammation and oxidative stress. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a major proinflammatory cytokines whose high levels are observed in several neurodegenerative diseases. Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule in the modulation of synaptic plasticity and its correlation with the process of learning and memory, as well as its neuroprotective effects when present in low concentrations. Thus phthalimidic derived compounds capable of inhibiting TNF- α , could reduce the neuroinflammation process that is described in AD, slowing the disease progression, and NO donors derived may contribute to synaptic plasticity, cognition and memory of patients affected by AD. This work aims to obtain the compounds (Lapdesf FUR-FD I-VI), designed by molecular hybridization strategy between the subunit and core phthalimidic and furoxan. The compounds obtained were evaluated for potential anti-inflammatory effect through the model of acute inflammation (paw edema), their ability to permeate the blood-brain barrier (BBB) using a tool of the partition coefficient (log P) obtained experimentally mutagenicity with the in vivo micronucleus test in reticulocytes obtained in peripheral blood, the ability of the compounds to inhibit the synthesis of TNF- α in enzyme assay by ELISA and antioxidant activity of compounds by using DPPH. Compounds Lapdesf FUR-FD IV and V showed anti-inflammatory activity higher than their positive controls, while the other compounds showed activity only superior to their negative controls. The log P obtained experimentally showed values between 2 and 4, these values are consistent for drugs that cross the BBB and act on the central nervous system (CNS). Also, it was noted that neither genotoxic compounds were compared to the positive control used. The compounds were similar to thalidomide in inhibiting the synthesis of TNF- α in macrophages activated with lipopolysaccharide (LPS). And it demonstrated to possess antioxidant activity in DPPH model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Alois Alzheimer (1864-1915). (B) Auguste Deter (1850-1906)	22
Figura 2 - Desenhos de emaranhados neurofibrilares (ENF) publicados por Alzheimer em 1911.....	24
Figura 3 - Fotografia retirada do corte histológico do córtex cerebral de um paciente com DA.....	26
Figura 4 - Representação esquemática da clivagem de APP.....	28
Figura 5 - Representação esquemática da biossíntese de óxido nítrico, a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase.....	34
Figura 6 – Produção de NO para atuar como neurotransmissor, sendo produzido pela enzima constitucional nNOS, dependente do íon cálcio.....	35
Figura 7 - Estrutura química dos núcleos furoxânico (2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol)	36
Figura 8 - Mecanismo sugerido para liberação de NO pelos derivados furoxânicos...	37
Figura 9 - Fórmula estrutural da talidomida, mostrando seus diferentes isômeros.	39
Figura 10 - Fórmula estrutural de inibidores de acetilcolinesterase (AChE) utilizados no tratamento da DA.....	40
Figura 11 - Classificação dos compostos híbridos de acordo com a estratégia de hibridação utilizada	44
Figura 12 - Representação esquemática do conceito de pró-fármacos	45
Figura 13 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD I (L01)	78
Figura 14 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD II (L02)	79
Figura 15 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD III (L03)	79
Figura 16 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD IV (L04)	80
Figura 17 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD V (L05)	81
Figura 18 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD VI (L06)	81

Figura 19 - Reticulócitos normais e micronucleado (coloração: laranja de acridina; 1000 x).....	82
Figura 20 – Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão (DP) para 1000 células obtidas de camundongos tratados com ciclofosfamida (controle positivo), CMC/Tween (controle negativo) e água (controle branco)..	84
Figura 21 - Frequência média de MNRET e DP para 1000 células obtidas de camundongos tratados com L01, L02, L03, L04, L05 e L06, na concentração de 200, 100 e 50mg/Kg, com controle negativo e água..	85
Figura 22 – Curva de linearidade dos padrões obtida experimentalmente.	87
Figura 23 - Redução da absorbância de DPPH (%) tratados com os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI e ácido ascórbico (C+) nas concentrações de 1mM, 400, 200, 100, 50 e 25µM.....	90
Figura 24 - Viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI.....	92
Figura 25 – (A) Concentração de TNF- α produzido por macrófagos em meio contendo Lapdesf FUR-FD I-III, em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, LPS); (B) Porcentagem de inibição da citocina TNF- α pelos compostos Lapdesf FUR-FD I-III em comparação a talidomida (50µM) e meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-)	94
Figura 26 - (A) Concentração de TNF- α produzido por macrófagos em meio contendo Lapdesf FUR-FD IV-VI, em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, LPS); (B) Porcentagem de inibição da citocina TNF- α pelos compostos Lapdesf FUR-FD I-III em comparação a talidomida (50µM) e meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-)	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrões utilizados na determinação da curva log K x log P.	55
Tabela 2 - Bandas de absorção e IV relativos ao composto Lapdesf FUR-FD I (pastilha de KBr).	64
Tabela 3 – Comparação entre os deslocamentos químicos no RMN ¹ H.	65
Tabela 4 - Bandas de absorção e IV relativos ao composto Lapdesf FUR-FD II (pastilha de KBr).	69
Tabela 5 - Deslocamento químico no RMN ¹ H dos regioisômeros derivados ftalimídicos.	72
Tabela 6 - Comparação entre os deslocamentos químicos no RMN ¹ H dos compostos Lapdesf FUR-FD III-V.	73
Tabela 7 - Bandas de absorção em IV relativos ao composto Lapdesf FUR-FD III, IV e V (KBr).	74
Tabela 8 - Comparação entre os deslocamentos químicos no RMN ¹ H dos compostos 17 e Lapdesf FUR-FD VI.	76
Tabela 9 - Frequência de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (DP).	83
Tabela 10 – Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (Log P) e valores calculados (ClogP)	88
Tabela 11 – Concentrações avaliadas para determinação de citocina TNF- α , dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI.	93

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Planejamento estrutural dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI.....	19
Esquema 2 - Estrutura química dos compostos obtidos.....	20
Esquema 3 - Obtenção do composto Lapdesf FUR-FD I obtido a partir do álcool cinâmico.	50
Esquema 4 - Obtenção do derivado bis-aril-sulfonil furoxano.....	50
Esquema 5 - Obtenção do derivado fenilsulfonilfuroxânico e hidroxipropilfuroxânico.	51
Esquema 6 - Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais Lapdesf FUR-FD II e VI.	52
Esquema 7 - Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais Lapdesf FUR-FD III-V.	53
Esquema 8 - Mecanismo de reação para obtenção do derivado furoxânico (3).	63
Esquema 9 - Mecanismo de reação para obtenção do composto Lapdesf FUR-FD I.	64
Esquema 10 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD II.	66
Esquema 11 - Mecanismo de reação para obtenção do derivado 5.	66
Esquema 12 - Mecanismo de reação para obtenção do composto Lapdesf FUR-FD II.	69
Esquema 13 - Síntese dos compostos Lapdesf FUR-FD III-V.....	70
Esquema 14 - Mecanismo de reação para obtenção dos derivados ftalimídicos.....	71
Esquema 15 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD VI.....	75

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (2) (300MHz; CD_3Cl_3).....	63
Espectro 2 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (3) (300MHz; CD_3Cl_3).....	64
Espectro 3 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (5) (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d}6}$).....	67
Espectro 4 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (6) (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d}6}$).....	67
Espectro 5 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (7) (300MHz; $\text{DMSO}_{\text{d}6}$).....	68
Espectro 6 - Espectro de ^1H RMN do composto Lapdesf FUR-FD II (300 MHz; $\text{DMSO}_{\text{d}6}$)	70

ABREVIATURAS

Lapdesf FUR-FD I	3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-oxido
Lapdesf FUR-FD II	4-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-oxido
Lapdesf FUR-FD III	3-(((2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)oxi)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-oxido
Lapdesf FUR-FD IV	3-(((3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)oxi)methyl)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-oxido
Lapdesf FUR-FD V	3-(((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2-hidroxibenzoil)oxi)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-oxido
Lapdesf FUR-FD VI	4-(3-((4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)oxi)propoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-oxido
DPPH	2,2-difenil-2-picrilhidrazida
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
BACE1	β -secretase
BuChE	Butirilcolinesterase
CMC	Carboximetilcelulose
CCD	Cromatografia em camada delgada
Log P	Coeficiente de partição
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DA	Doença de Alzheimer
ENF	Emaranhados neurofibrilares
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
SRNS	Espécies de azoto reativo
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
FF	Faixa de fusão
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvel

Abreviaturas

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
FHP	Filamentos helicoidais pareados
FDA	Food and drug administration
IACHÉ	Inibidores de acetilcolinesterase
LPS	Lipopolissacarídeos
MN	Micronúcleo
MT	Microtúbulos
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio
NMDA	N-metil-D-aspartato
DCI	N,N'-Diisopropilcarbodiimida.
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
NOSs	NO sintases
nNOS	NO sintase neuronal
eNOS	NO sintase endotelial
iNOS	NO sintase induzida
OMS	Organização mundial de saúde
NO	Óxido nítrico
β A	Peptídeos β -amiloides
ONOO ⁻	Peroxinitrito
APP	Proteína precursora amiloide
SNC	Sistema nervoso central
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
IP	Via intraperitoneal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	18
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
4.1. Histórico da doença de Alzheimer	22
4.2. Epidemiologia e prevalência da doença de Alzheimer	24
4.3. Fisiopatologias da doença de Alzheimer	25
4.4. Óxido nítrico (NO).....	33
4.5. Doadores de NO e derivados furoxanos.....	36
4.6. Talidomida e derivados ftalimídicos	38
4.7. Tratamentos existente para DA	39
4.8. Modificação molecular	42
4.9. Hibridação	43
4.10. Latenciação de Fármacos.....	45
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1. Reagentes	48
5.2. Equipamentos	49
5.3. Metodologia sintética.....	49
5.5. Métodos analíticos.....	54
5.6. Ensaios	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
6.1. Síntese	62
6.2. Modelo agudo de inflamação.....	77
6.3. Teste de mutagenicidade <i>in vivo</i> (teste de Micronúcleo).....	82
6.3. Coeficiente de partição (log P)	86
6.4. Avaliação de atividade antioxidante (método de DPPH).....	88
6.5. Teste imunoquímico para detecção de TNF- α	91
7. CONCLUSÕES.....	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS I.....	I
ANEXOS II.....	XXXV
ANEXOS III.....	XXXVI
ANEXOS IV	XXXVII

1. INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas compreendem uma condição que leva a perda progressiva de estrutura e/ou função dos neurônios, tanto no cérebro quanto na medula espinhal, levando o paciente a uma perda de função motora (ataxia) ou disfunção sensorial (demência), podendo acarretar em óbito do paciente. (UTTARA *et al.*, 2009; CARLESI *et al.*, 2011)

As formas mais comuns de doenças neurodegenerativas são: a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, demência frontotemporal, doença de Huntington e esclerose múltipla (UTTARA *et al.*, 2009; NIEOULLON, 2011). Com o envelhecimento da população mundial, devido as melhorias e avanços nos cuidados de saúde, há um aumento nos casos de doenças crônico degenerativas, como as doenças neurodegenerativas que estão se tornando mais prevalentes. Doenças neurodegenerativas ainda não possuem prevenção ou cura, e a confirmação do diagnóstico somente é possível no *post mortem*. (VILELA & CARAMELLI, 2006; TELPOUKHOVSKAIA & ORVIG, 2012)

O número total de pessoas com demência no mundo em 2010 foi estimado em 35.6 milhões, projeções indicam que esses valores devem dobrar nos próximos 20 anos, atingindo aproximadamente 65.7 milhões de pessoas em 2030. O número total de novos casos de demência no mundo a cada ano é de 7.7 milhões, o que corresponde a um novo caso sendo diagnosticado a cada quatro segundos (WHO, 2012). Os dados epidemiológicos no Brasil são semelhantes aos observados no resto do mundo, com taxa de incidência de 7,7 para cada 1000 indivíduos ao ano se tornando portadores da doença, valores estes referentes a pessoas com idade superior a 65 anos. (LEMOS *et al.*, 2012)

A demência pode ser dividida em formas corticais e subcorticais. A DA é uma forma de demência cortical (BASSIL & MOLLAEI, 2012). DA é uma doença cerebral progressiva que afeta as regiões do cérebro que controlam a memória e funções cognitivas, pacientes com DA também mostram uma extensa perda de sinapses e neurônios no hipocampo e nos córtex frontal e temporal, gradualmente comprometendo a memória e capacidade de aprendizado, raciocínio, comunicação e realização de atividades diárias. (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012; VARNUM & IKEZU, 2012)

A DA é hoje a forma mais comum de demência contribuindo entre 60-70% dos casos diagnosticados no mundo (WHO, 2012). Como uma condição progressiva complexa a DA envolve interações sequenciais de cascatas patológicas, incluindo a interação dos peptídeos β -amiloides (β A) que se agregam levando ao desenvolvimento de placas, também

denominadas de placas senis, e a hiperfosforilação e agregação da proteína *tau* formando os emaranhados neurofibrilares (ENF). Juntamente a esses processos ocorrem processos associados, como à inflamação (neuroinflamação) e o estresse oxidativo, estas cascatas patológicas são os principais causadores para a perda da integridade sináptica e neurodegeneração. (HAMPEL *et al.*, 2010)

A idade avançada é um fator de risco para o desenvolvimento da DA, sua incidência é de 1-2% em pessoas com idade entre 60 e 64 anos, se elevando para até 30% entre pessoas com 85 anos ou mais, e podendo atingir valores de prevalência superiores a 50% para pessoas com idade igual ou superior a 95 anos. (VILELA & CARAMELLI, 2006; AGOSTINHO *et al.*, 2010)

Enquanto a exata fisiopatologia da DA ainda não foi determinada (VARNUM & IKEZU, 2012) evidências sugerem o envolvimento da inflamação como importante fator para o desenvolvimento da doença. (TUPPO & ARIAS, 2005)

A identificação de marcadores inflamatórios no plasma e líquido cefalorraquidiano de cérebros *post mortem*, tornou-se um marcador da DA. Este fato sugere que a inflamação no sistema nervoso central (SNC) é um fator importante que contribui diretamente com a neurodegeneração. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), um importante mediador da inflamação, no cérebro é primariamente sintetizado e liberado pelas células da glia, as quais podem ser ativadas por trauma, infecção ou a presença de componentes endógenos, e agregados de proteínas anormais, tais como os peptídeos β A na DA (TWEEDIE *et al.*, 2012). Portanto compostos capazes de inibir esta citocina pró-inflamatória poderiam auxiliar no tratamento da doença diminuindo sua progressão.

A talidomida, inicialmente descrita como um fármaco hipnótico e sedativo, hoje é reconhecido por também possuir atividade inibidora da síntese de TNF- α , modulando sua biossíntese. A inibição de TNF- α é responsável pelos efeitos analgésicos periféricos observados na talidomida. A ação da talidomida como anti-inflamatório deve-se a sua subunidade ftalimídica. Análogos estruturais estão sendo desenvolvidos e avaliados, buscando melhorar essa atividade. (SHIBATA *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001)

O potencial da talidomida para o tratamento da DA foi demonstrado por Ryu & McLarnon (2008), em seus estudos observou-se que a talidomida foi capaz de impedir a perda de neurônios no hipocampo, pela inibição do TNF- α , e apresentou atividade antiangiogênica. (APPLEBY *et al.*, 2013)

Compostos análogos de talidomida (LI *et al.*, 2005) podem ser considerados interessantes no tratamento da DA, sendo capazes de estabilizar microtúbulos, diretamente relacionado a hiperfosforilação de proteína *tau*. (BALLATORE *et al.*, 2012)

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula de sinalização envolvida na modulação da plasticidade sináptica, e possui correlação com o processo de aprendizagem e memória, demonstrando inclusive efeitos neuroprotetores. Enquanto concentrações fisiológicas de NO são essenciais para a função neuronal, em altas concentrações o NO pode desencadear efeitos citotóxicos, capazes de levar a perda de neurônios por morte celular. (SCHIEFER *et al.*, 2012)

O desenvolvimento de compostos com capacidade neuroprotetora que sejam doadores de NO devem possuir a capacidade de produzir NO de maneira lenta e por um longo período de tempo, uma vez que doadores de NO de liberação rápida podem gerar grandes quantidades de NO, levando à formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), capazes de gerar dano às células.

O trabalho de Schiefer e colaboradores (2012) mostra o uso de derivados de furoxano como agentes neuroprotetores e capazes de melhorar a cognição com potencial aplicação na DA.

Assim, compostos derivados ftalimídicos, capazes de inibir TNF- α , poderiam reduzir o processo de neuroinflamação que é descrita na DA, retardando a progressão da doença, e derivados doadores de NO podem contribuir na plasticidade sináptica, cognição e memória dos pacientes acometidos pela DA.

2. OBJETIVOS**Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo a obtenção dos híbridos Lapdesf FUR-FD I-VI com propriedades anti-inflamatórias e doadoras de óxido nítrico úteis para o tratamento dos sintomas associados à doença de Alzheimer.

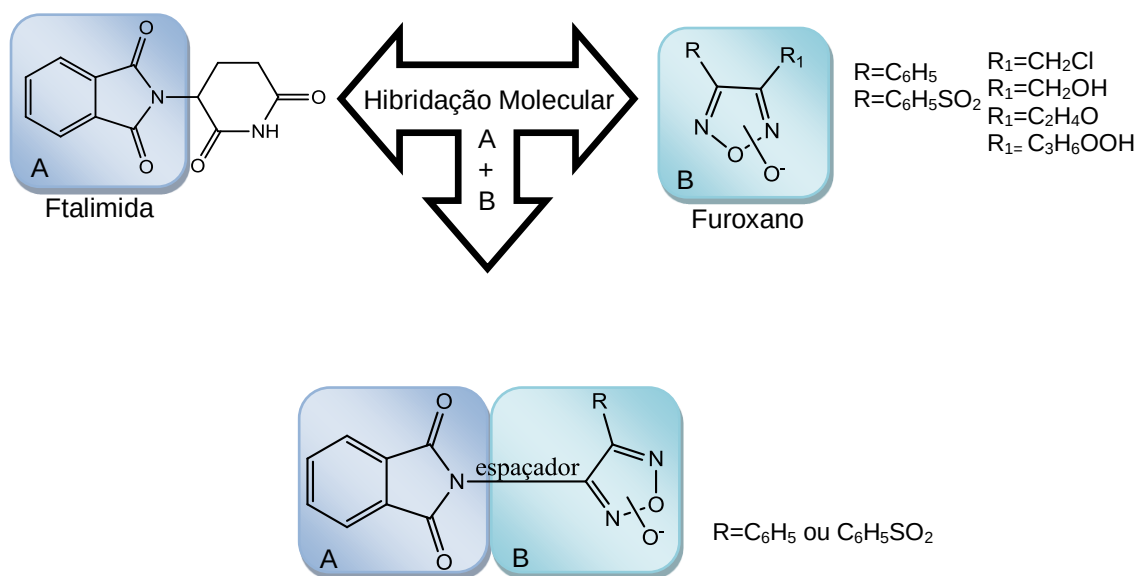
Objetivos específicos

- 1- Obtenção dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI.
- 2- Avaliar a atividade anti-inflamatória através do modelo de edema de pata induzido por carragenina.
- 3- Avaliação de possíveis danos cromossômicos causados pelos compostos obtidos, empregando-se o teste de micronúcleo.
- 4- Determinar experimentalmente a propriedade físico-química Log P.
- 5- Avaliar a capacidade dos compostos em inibir a síntese de TNF- α em ensaio enzimático por ELISA.
- 6- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos utilizando método de DPPH.

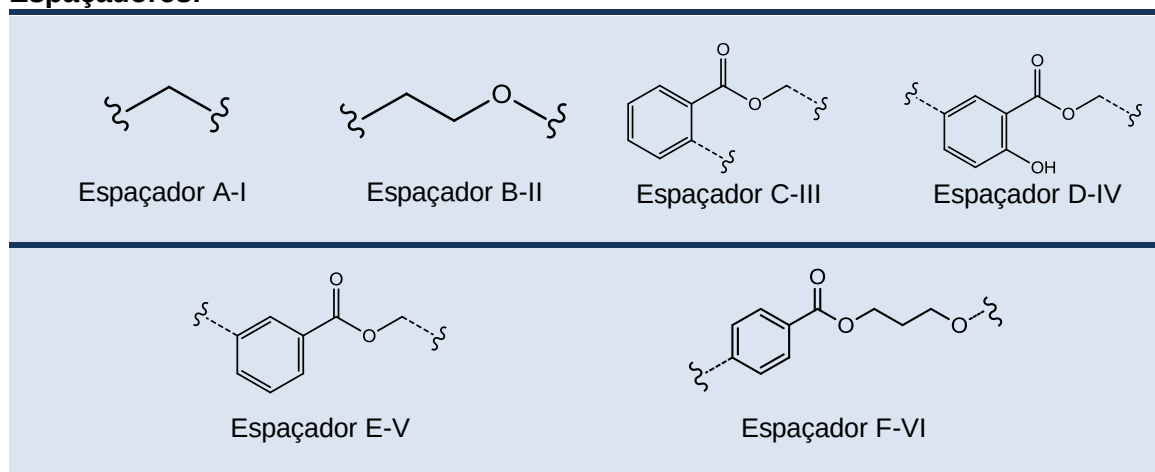
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Para a obtenção dos compostos candidato a fármaco utilizou-se o processo de hibridação molecular com base nos protótipos talidomida e furoxano, adicionando um espaçador entre os grupos.

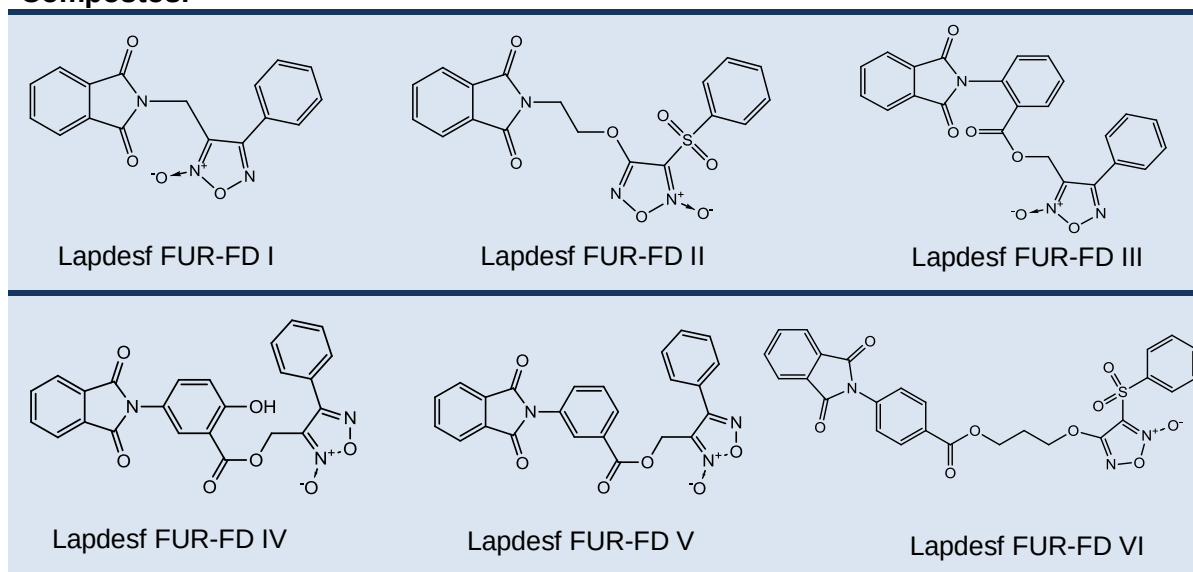
Esquema 1 – Planejamento estrutural dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI.



Espaçadores:



Esquema 2 – Estrutura química dos compostos obtidos.

Compostos:

Os relatos da relação estrutura-atividade da talidomida e análogos revelaram o potencial farmacofórico do anel ftalimídico na atividade anti-TNF- α , mecanismo evidenciado como responsável pelos seus novos efeitos terapêuticos, ao mesmo tempo em que denotam a irrelevância do grupamento glutarimida, responsável pela toxicidade. A hipótese relaciona a teratogenicidade da talidomida ao seu grupamento glutarimida, o qual viabiliza o planejamento e síntese de novos análogos à talidomida, com maior eficácia terapêutica e desprovidos de seu efeito teratogênico (LIMA *et al.*, 2001, LIMA *et al.*, 2002).

Os derivados furoxânicos são conhecidamente doadores de NO, atividade esta relacionada ao efeito eletrônico do substituinte ligado ao anel furoxânico. Grupos eletroatratores, ou seja, que retiram densidade eletrônica contribui para um aumento na doação de NO, enquanto aqueles doadores de elétrons diminuem a doação. (CERECETTO & PORCAL, 2005)

No planejamento estrutural para a seleção da subunidade espaçadora (arílica) foi levado em consideração à adequada funcionalização para possível acoplamento entre as duas subunidades (ftalimídica e furoxânica). Também foram selecionados como espaçadores os substituintes em que a modulação na inibição de TNF- α pudesse ser diferenciada. Relatos da literatura sobre a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de derivados ftalimídicos inibidores de TNF- α mostram que a inibição desta citocina é maior quando o núcleo ftalimídico está diretamente ligado a um anel aromático, e menor atividade é observada quando o núcleo ftalimídico esta ligado a derivados alquílicos

(LIMA *et al.*, 2001; HASHIMOTO, 2002). No planejamento estrutural esse parâmetro foi levado em consideração, para selecionar espaçadores que contribuíssem à subunidade ftalimídica distintos perfis de inibição do TNF- α . (SANTOS, 2012)

Através das estratégias de modificação molecular, como a hibridação e a latenciação de fármacos, planejaram-se compostos com caráter dual de ação em que uma mesma estrutura química tivesse a capacidade de inibir a citocina TNF- α , representada pela subunidade ftalimídica, e doadores de NO, representado pela subunidade furoxânica. Esses novos compostos foram planejados inicialmente para o tratamento da anemia falciforme (SANTOS, 2009), exceção feita ao composto Lapdesf FUR-FD VI, que foi planejado inicialmente neste trabalho. A ação sinérgica observada nos compostos deve representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da DA.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Histórico da doença de Alzheimer

Alois Alzheimer (1864-1915), em dezembro de 1888 iniciou seus trabalhos no Asilo Municipal para Doentes Mentais e Epiléticos (*Städtische Heilanstalt für Irre und Epileptische*), localizado em Frankfurt, local este que viria a permanecer por 14 anos. O foco dos estudos de Alzheimer se baseava na análise dos sintomas psiquiátricos observados em seus pacientes com resultados histopatológicos obtidos de autopsias do cérebro dos mesmos. (GOEDERT & GHETTI, 2007; CIPRIANI *et al.*, 2010)

A história da DA começa em 25 de Novembro de 1901, quando Alzheimer, agora diretor médico assistente do asilo de Frankfurt, admite como sua paciente Auguste Deter, de 51 anos (GOEDERT & GHETTI, 2007). Auguste D., havia sido internada no dia anterior por seu marido. Durante o último ano, ela vinha sofrendo de alterações progressivas em sua personalidade (DAHLM, 2006; RAMIREZ-BERMUDEZ, 2012), com o aparecimento de distúrbios cognitivos severos, desorientação, afasia, delírios e comportamento imprevisível foram listados como os principais sintomas clínicos. (MÖLLER & GRAEBER, 1998)

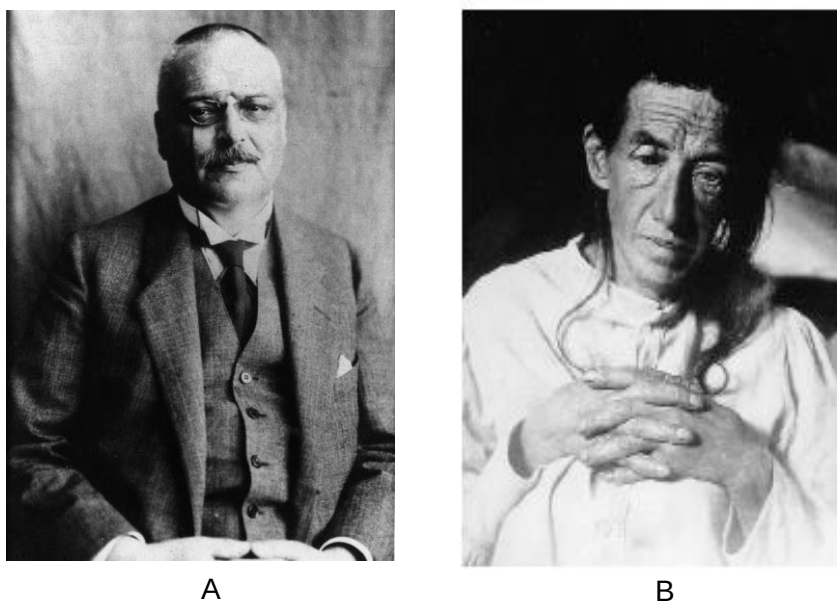


Figura 1 – (A) Alois Alzheimer (1864-1915). (B) Auguste Deter (1850-1906)

O marido de Auguste D. afirmou que a memória de sua esposa começou a falhar e ela passou a ter dificuldades com atividades diárias, desenvolveu medo de pessoas até então conhecidas e começou a apresentar sintomas de paranoia que a levavam a gritar e agir de maneira incontrolável (DAHLM, 2006; GOEDERT & GHETTI, 2007). De acordo com as palavras de Alzheimer em seu artigo de 1907, “*ela mostrou rápido aumento na perda de*

memória, estava desorientada carregando objetos para lá e para cá em seu quarto e os escondendo. Às vezes, ela sentiu que alguém queria matá-la e começou a gritar bem alto”.

Auguste D., foi descrita como uma mulher delirante, esquecida, desorientada, ansiosa, desconfiada, rebelde e negativa (RAMIREZ-BERMUDEZ, 2012). Alzheimer nunca havia encontrado uma paciente com tais sintomas antes. Ele era fascinado pelo caso de Auguste D. e decidiu examiná-la mais de perto. (DAHM, 2006)

No decorrer dos anos o estado de Auguste D. piorou, na clínica, ela estava desorientada e confusa em relação a tempo e espaço. Seu discurso se tornou completamente ininteligível e suas atividades cada vez mais aleatórias e sem sentido. Em seu último ano de vida Auguste Deter deteriorou a uma condição de mudez e apatia passando boa parte de seu tempo em repouso na sua cama. Em 08 de Abril de 1906, Auguste Deter morreu em decorrência de uma septicemia resultante de uma úlcera de decúbito no sacro e região trocantérica esquerda. (DAHM, 2006; VERHEY, 2009; CIPRIANI *et al.*, 2010)

Alzheimer então pediu que o cérebro da paciente fosse enviado a Munique, cidade alemã em que Alois Alzheimer passou a desenvolver seus trabalhos, para análise e exames patológicos. Isto deu a Alzheimer a oportunidade de descobrir alterações histológicas responsáveis pelos sintomas por ele observados. (DAHM, 2006; GOEDERT & GHETTI, 2007)

Os primeiros estudos do cérebro de Auguste D. já confirmavam a suspeita de Alzheimer (DAHM, 2006) o exame anatômico-patológico revelou uma atrofia difusa de todo o cérebro e alterações características de suas estruturas internas, em especial nos conjuntos de células corticais (MÖLLER & GRAEBER, 1998). Assim como os cortes histológicos demonstravam uma perda massiva de células em todo o cérebro. (DAHM, 2006)

Além da atrofia, Alzheimer observou filamentos grossos e fortemente corados nos neurônios restantes. Observou, também, o depósito de uma substância não identificada sob a forma de placas em todo o córtex cerebral. Mostrando o que hoje são considerados os marcadores histopatológicos da DA: a perda de neurônios, bem como o acúmulo de ENF e β A. (DAHM, 2006)

Em 3 de novembro de 1906, Alzheimer apresentou seus resultados do caso de Auguste D. pela primeira vez, a palestra intitulada, “O processo de uma doença rara do

córtex cerebral" (*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*), era uma versão mais curta do que foi mais tarde publicado por Alzheimer em 1907. (MÖLLER & GRAEBER, 1998)

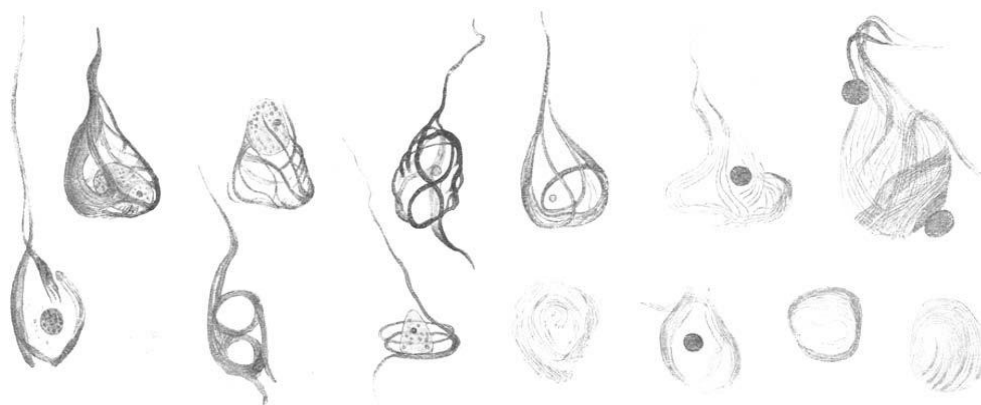


Figura 2 - Desenhos de emaranhados neurofibrilares (ENF) publicados por Alzheimer em 1911.

Entre 1908 e 1910, Emil Kraepelin (1856-1926) trabalhava na 8ª edição do seu livro sobre psiquiatria. Kraepelin, considerado um dos psiquiatras mais influentes do início do século XX, tornou-se leitura padrão para psiquiatras e psicólogos em todo o mundo. No capítulo sobre demências senis e pré-senis, Kraepelin introduziu a doença de Alzheimer pela primeira vez. Ele escreveu "um grupo peculiar de casos com graves alterações celulares tem sido descrita por Alzheimer" e passou a resumir os sintomas clínicos e alterações histológicas desta nova doença. (DAHM, 2006)

De acordo com a história oficial da DA, não há dúvida que Alois Alzheimer fez uma autêntica descoberta que mudou o paradigma clínico-patológico da demência. (RAMIREZ-BERMUDEZ, 2012)

4.2. Epidemiologia e prevalência da doença de Alzheimer

A média de idade da população mundial está aumentando. As melhorias no sistema de saúde no século passado contribuíram para as pessoas viverem mais e melhor. No entanto, esse fato também resulta no aumento do número de pessoas com doenças não transmissíveis e crônico-degenerativas, incluindo a demência. Embora pessoas de idade, sejam os principais afetados pela demência, a doença não é parte normal do envelhecimento. (CORBETT, *et al.*, 2012; WHO, 2012)

As projeções para prevalência e incidência indicam que o número de pessoas com demência deve continuar a crescer, em especial entre os mais idosos. Países em franco desenvolvimento que enfrentam o fenômeno de transição demográfica devem experimentar os maiores crescimentos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em conjunto com Alzheimer's Disease International, divulgado no relatório "*Dementia: a public health priority*" de 2012, o número total de pessoas, no mundo, com algum tipo de demência em 2010 foi estimado em 35.6 milhões e é projetado para quase dobrar a cada 20 anos, podendo atingir 65.7 milhões de pessoas em 2030 e 115.4 milhões em 2050. O número total de novos casos de demência a cada ano é de 7.7 milhões.

Baseado em dados clínicos e patológicos, a DA é claramente a causa mais comum de demência senil no mundo, em quase toda sua totalidade, nos indivíduos com idades entre 65 e 85 anos. (KAWAS & CORRADA, 2006)

Mundialmente, a prevalência da demência é estimada em 3,9% das pessoas com 60 anos ou mais. Em países desenvolvidos, cerca de 1 em cada 10 idosos, com 65 anos ou mais, possui algum grau de demência, enquanto mais de um terço das pessoas consideradas como muito idosas, com mais de 85 anos, apresentam sintomas e sinais de demência (FERRI *et al.*, 2011; STRAUSS *et al.*, 1999; CORRADA *et al.*, 2008; QIU *et al.*, 2009). A DA se tornou a principal causa de demência em todo o mundo e a quarta causa de morte nos países desenvolvidos depois do câncer, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral. (SHARMA *et al.*, 2012)

4.3. Fisiopatologias da doença de Alzheimer

A DA geralmente inicia-se como um comprometimento cognitivo leve, afetando principalmente memória de longo prazo, evoluindo gradualmente até atingir o estágio de demência grave. A maioria dos casos de DA são esporádicos, de origem desconhecida, provavelmente resultante da ação sinérgica de fatores genéticos e ambientais. (AGOSTINHO *et al.*, 2010)

Patologicamente, a DA é caracterizada pelos depósitos extracelulares de proteína β A, sob a forma de placas senis, depósitos β A nos vasos sanguíneos cerebrais, e inclusões intracelulares de proteína *tau* hiperfosforilada, sob a forma de ENF (GAMBA *et al.*, 2012; WOLFE, 2012). Outro marcador da DA é a extensiva neurodegeneração, a morte celular e perda de sinapses. Até agora, a maioria dos estudos sobre a progressão da doença

investigou individualmente cada uma das alterações encontradas no cérebro de pacientes. No entanto, evidências mostram uma estreita interação entre as diferentes alterações que levam a doença. (TAKATA & KITAMURA, 2012; LANE *et al.*, 2012)

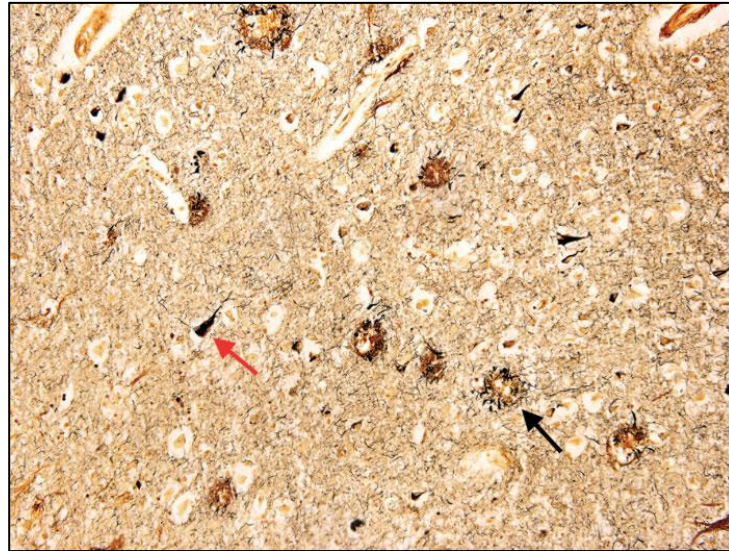


Figura 3 - Fotografia retirada do corte histológico do córtex cerebral de um paciente com DA, placas senis (seta preta) e os ENF (seta vermelha). (retirado de PERL, 2010)

Na fase inicial da doença, o córtex e hipocampo são particularmente afetados, fazendo com que o paciente passe a apresentar déficits de cognição e memória. Com o decorrer da DA, até 80% dos neurónios no hipocampo se degeneram, e os sintomas progressivos da DA se manifestam como distúrbios cognitivos e reduzida capacidade de lidar com a vida cotidiana. (DANYSZ & PARSONS, 2012)

No ultimo estágio da doença, há uma difundida neurodegeneração em varias regiões do cérebro, incluindo os lobos temporal, parietal e frontal. Enquanto a maioria dos neurônios perdidos nas regiões corticais são glutamatérgicos, certas populações de neurônios subcorticais também apresentam vulnerabilidade seletiva na DA, em particular os neurónios noradrenérgicos do *locus coeruleus* e os neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal perdem suas funções relativamente cedo na doença (LANE *et al.*, 2012; TELPOUKHOVSKAIA & ORVIG, 2012)

A deficiência cognitiva e posterior demência provocada pela DA esta intimamente associada à neurodegeneração provocada no sistema límbico e neocórtex. (CREWS & MASLIAH, 2010)

4.3.1. Peptídeos β -amiloide (β A) e placas senis

Embora os principais mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento da DA não estejam claramente entendidos devido à sua complexidade, avanços recentes têm demonstrado que a polimerização de β A, originando as placas senis, possui grande importância para o desenvolvimento da patologia. (GENG *et al.*, 2012)

O principal componente das placas senis é o peptídeo β A. Com função desconhecida este se origina a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) (TELPOUKHOVSKAIA & ORVIG, 2012). O peptídeo β A pode variar entre 39-43 resíduos de aminoácidos, e é o principal componente presente nas placas amiloides no cérebro de pacientes diagnosticados com DA (DI CARLO *et al.*, 2012). Os principais fragmentos de β A formados são os de 40 aminoácidos (β A¹⁻⁴⁰), forma solúvel, e 42 aminoácidos (β A¹⁻⁴²), forma insolúvel. Os fragmentos de 42 aminoácidos são a forma mais prevalente encontrada nas placas senis. (TELPOUKHOVSKAIA & ORVIG, 2012)

A APP é uma proteína transmembranar composta por 695 aminoácidos (TELPOUKHOVSKAIA & ORVIG, 2012). Esta proteína é clivada em vários pequenos fragmentos de polipeptídios através da ação conjunta de três proteases: α -secretase, β -secretase (BACE1) e γ -secretase. (EFREMOV *et al.*, 2011). Os peptídeos β A são obtidos pela clivagem sequencial somente de β -secretases e γ -secretases. A terceira secretase, α -secretase, cliva a APP na transição dos segmentos intramembranar e extracelular, no meio da sequência de aminoácidos que da origem ao fragmento β A, portanto não é considerada como amilogênica (DI CARLO *et al.*, 2012). A clivagem da APP pode seguir duas vias distintas (fig. 4), dando origem à formação dos peptídeos β A (via amiloidogênica), e outra via dando origem a fragmentos não amiloidogênicos.

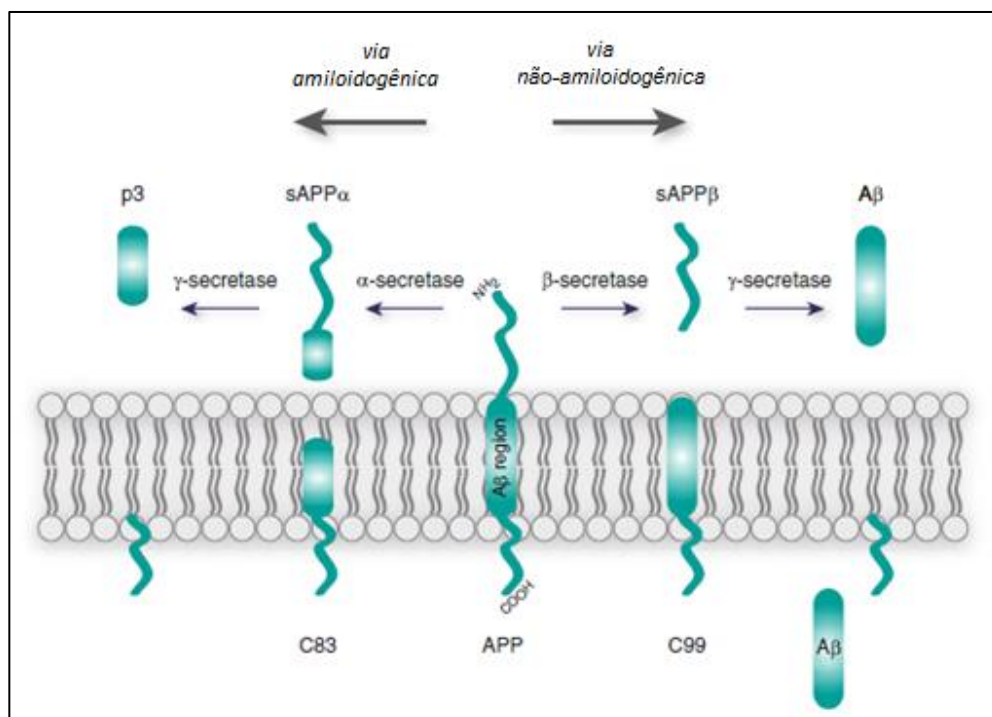


Figura 4 - Representação esquemática da clivagem de APP. (adaptado de CAVALLUCCI *et al.*, 2012)

O acúmulo anormal de βA é o resultado do desequilíbrio entre os níveis de produção de βA , agregação e depuração (*clearance*). A depuração βA é realizada por enzimas proteolíticas como neprilisina, proteínas auxiliares chaperonas, tais como APOE, lisossomal (autofagia) e não lisossomal (proteassoma). (CREWS & MASLIAH, 2010)

Em condições fisiológicas normais a proporção entre βA^{1-42} e βA^{1-40} é de 1:10. βA^{1-42} possui neurotoxicidade muito maior que o resíduo de 40 aminoácidos e sua agregação é mais rápida do que a cinética de outros β -peptídeos. (DI CARLO *et al.*, 2012)

O acúmulo progressivo de βA resulta na formação de oligômeros e fibrilas, os principais componentes encontrados nas placas senis. Evidências sugerem que a formação das placas senis é diretamente responsável pelos efeitos citotóxicos observados aos neurônios (CREWS & MASLIAH, 2010), efeito esse associado ao processo de neuroinflamação, que leva a morte neuronal. (GHOSH *et al.*, 2012)

4.3.2. Hiperfosforilação de proteína *tau* e emaranhados neurofibrilares

Outra característica histopatológica da DA é a deposição de ENF normalmente encontrados nos corpos celulares e dendritos de neurônios. Estes feixes de proteínas

anormais consistem de depósitos helicoidais de proteína *tau* hiperfosforilada (BRUNDEN *et al.*, 2009; DANYSZ & PARSONS, 2012). Além de DA, a agregação de *tau* é uma característica observada em muitas doenças conhecidas como tauopatias (QUERFURTH & LAFERLA, 2010; BULIC *et al.*, 2012), como demência frontotemporal (DE PAULA, *et al.*, 2009), doença de Parkinson, doença de Pick, degeneração córtico-basal, paralisia supranuclear progressiva e encefalopatia traumática crônica (demência pugilística). (GARCIA & CLEVELAND, 2001; RAMACHANDRAN & UDGAONKAR, 2013)

Em neurônios saudáveis, a proteína *tau* é normalmente encontrada nos axônios e interage com a tubulina para estabilizar e promover a montagem de microtúbulos (MT) para o transporte de vesículas e organelas (AKOURY *et al.*, 2013), ao contrário dos achados descritos nas tauopatias, em que a proteína encontra-se distribuída no corpo celular e nos dendritos. A proteína *tau* pode ser encontrada na forma solúvel ou insolúvel; esta última é identificada nos filamentos helicoidais pareados (FHP), que é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares. A proteína *tau* controla a dinâmica dos MT durante a maturação e o crescimento dos neuritos, sendo a maior proteína do citoesqueleto. (DE PAULA *et al.*, 2009)

A fosforilação normal de *tau* é de vital importância para que ocorra interação com MT. No entanto, em condições patológicas, há um desequilíbrio entre a ligação de *tau* aos MT resultando em um anormal aumento da fração livre de *tau*. Quando fosforilada em excesso, hiperfosforilação, resulta em emparelhamento helicoidal dos filamentos levando à agregação e formação de emaranhados neurofibrilares prejudicando a ligação com MT, e eventualmente, levando à desmontagem dos mesmos e morte neuronal. (BALLATORE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2012; KOLAROVA *et al.*, 2012)

A proteína *tau* humana no SNC existe em seis isoformas variando em comprimento de 352-441 resíduos de aminoácidos. Derivadas por *splicing* alternativo de mRNA de um único gene (MAPT) localizado no cromossoma 17 e possui 16 éxons. O *splicing* alternativo dos éxons 2, 3 e 10 resulta na presença de seis diferentes isoformas que contêm, respectivamente, nenhuma, uma ou duas inserções no segmento aminoterminal. O *splicing* alternativo do éxon 10 produz isoformas 4R ou 3R da *tau*, dependendo, respectivamente, da presença ou da ausência da sequência de aminoácidos codificada por ele. (DE PAULA *et al.*, 2009; HARRINGTON, 2012; SAVELIEFF *et al.*, 2013)

MT são constituintes essenciais do citoesqueleto em células eucarióticas e estão envolvidos em uma série de importantes funções estruturais e reguladoras, como a manutenção do formato da célula, o transporte intracelular, bem como o crescimento e

divisão celular. Estruturalmente, MT são tubos ocos de aproximadamente 24 nm de diâmetro, que resultam da polimerização de cabeça a calda de heterodímeros α e β -tubulina. (BALLATORE *et al.*, 2012)

Estudos têm demonstrado que a extensão e distribuição de emaranhados neurofibrilares em casos de DA correlaciona com o grau de demência e a duração da doença, e isto sugere que estas anormalidades têm algum impacto direto sobre a capacidade de funcionamento do cérebro. (PERL, 2010)

4.3.3. Neuroinflamação

O cérebro foi considerado durante muito tempo como um local imunologicamente privilegiado, por possuir a barreira hematoencefálica que controla a entrada e saída de substâncias, e a ausência de um sistema. Porém no final de 1980, McGeer & McGeer publicaram um trabalho propondo que a imunidade inata desempenha papel significativo em desordens neurodegenerativas linfático (SCHULTZBERG *et al.*, 2007). Embora vista com ceticismo na época, hoje o papel da resposta imune em condições como doença de Parkinson e Alzheimer deixou de ser questão de debate (DROUIN-OUELLET & CICHETTI, 2012). Hoje o SNC é conhecido por possuir um sistema imune endógeno que é coordenado por células imunocompetentes da micróglia. (TUPPO & ARIAS, 2005)

O processo inflamatório associado ao SNC, neuroinflamação, difere do processo que ocorre na periferia do corpo. O cérebro não possui fibras nervosas de dor, o que torna difícil reconhecer a ocorrência do processo inflamatório e seus sinais clássicos, como rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor e dor. Esses processos não são tipicamente observados no SNC (TUPPO & ARIAS, 2005). Nos processos de neuroinflamação observamos um processo crônico ao invés da inflamação aguda. (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2011)

A neuroinflamação é uma característica patológica da DA (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2011). Evidências sugerem que as respostas inflamatórias contribuem para o progresso da DA (LEE *et al.*, 2010). Há uma convergência de mecanismos responsáveis pelo processo inflamatório que conduzem à produção de mediadores neurotóxicos. Na neuropatologia da DA, a inflamação do sistema nervoso central é um componente invariável relacionado às placas amiloides extracelulares (FERRETTI *et al.*, 2011). Os peptídeos β A, ENF e degeneração neuronal parecem ser as fontes mais

prováveis de inflamação. Além disso, a presença de células da glia reativas (astrócitos e micróglia) nos locais onde há depósito de placas amiloides sugerem que a DA é uma cascata neuroinflamatória. (SHARMA, 2011; BERNHARDI & EUGENÍN, 2004)

Os principais agentes envolvidos no processo inflamatório na DA são provavelmente a micróglia e astrócitos e possivelmente em menor grau os neurónios, todos que são componentes celulares do cérebro têm muitos papéis críticos na homeostase. (TUPPO & ARIAS, 2005)

As células da micróglia estão envolvidas em processos reguladores críticos para o desenvolvimento, manutenção do ambiente neuronal e reparo de ferimentos. No cérebro normal e saudável, as células da micróglia estão em um "estado de repouso" caracterizada por baixa expressão de receptores de membrana que atuam em funções imunológicas. Os astrócitos são as células da glia mais abundantes e são essenciais para a homeostase e funções neuronais. (GIATTI *et al.*, 2012)

A micróglia ativada desencadeia o recrutamento e proliferação de astrócitos, que ativamente reforça a resposta inflamatória a depósitos extracelulares de β A (AGOSTINHO *et al.*, 2010). Uma vez ativada as células da micróglia e astrócitos passam a liberar mediadores inflamatórios, citocinas como interleucinas (IL-1 β e IL-6) e TNF- α , espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), prostaglandinas e proteínas do sistema complemento (AGOSTINHO *et al.*, 2010; SHARMA, 2011). Estes produtos liberados pelas células possuem papel no dano neuronal. (SHARMA, 2011)

Todos esses mediadores do processo inflamatório imunitários aparecem associados a lesões de doenças neurodegenerativas, o que sugere um estado de inflamação crônica (BERNHARDI & EUGENÍN, 2004). A geração e a secreção de mediadores pró-inflamatórios podem interagir em diversos níveis com a neurodegeneração. Assim, citocinas pró-inflamatórias não só contribuem para a morte neuronal, mas podem também influenciar as vias clássicas neurodegenerativas, tais como processamento de APP e fosforilação *tau*. (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2011)

TNF- α é um importante mediador da inflamação e proeminente entre citocinas pró-inflamatórias, e ao que se sabe, está associado a efeitos neuropatológicos subjacentes as várias doenças neurodegenerativas. (SHARMA *et al.*, 2012; TWEEDIE *et al.*, 2012)

O TNF- α no SNC atua na plasticidade sináptica, apoptose, neurogênese, e outras funções biológicas em nível molecular. Também influencia mecanismos celulares

relacionados à aprendizagem, memória e cognição, quando em condições fisiológicas. No entanto em condições patológicas, o TNF- α pode conduzir a disfunções colinérgicas, estresse oxidativo e nitrosativo, ativação de caspases e efeitos sobre a hiperfosforilação de proteína *tau* e morte celular. (SHARMA *et al.*, 2012)

Um mecanismo através do qual o TNF- α é neurotóxico é por estimulação dos receptores de glutamato, tais como o receptor de NMDA. A excitotoxicidade, em geral, está ligada a ativação excessiva de receptores de glutamato, particularmente o receptor de NMDA. (SHARMA *et al.*, 2012)

4.3.4. Estresse oxidativo

Os processos neuronais dependem criticamente da função mitocondrial. Este fato pode ser observado na necessidade elevada de oxigênio pelo SNC, que chega a consumir 20% de todo o oxigênio que respiramos, enquanto corresponde a apenas 2% do peso corporal. A intensa demanda metabólica dos neurônios ocorre pelo seu papel na neurotransmissão, uma vez, que os neurônios devem manter diferentes gradientes de concentração para os íons, utilizando proteínas de alto consumo energético. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são continuamente formadas como consequência do metabolismo celular. (BRAWEK *et al.*, 2009)

Em condições fisiológicas normais, há um equilíbrio entre a formação de ROS e sua eliminação. Baixos níveis de ROS são considerados fisiológicos e desempenham papéis importantes na transdução de sinais e comunicação entre o núcleo e as mitocôndrias. Níveis elevados de ROS têm efeitos prejudiciais às estruturas celulares, lipídios, DNA e proteínas, podendo conduzir a célula a morte. Quando há um desequilíbrio entre produção e eliminação levando a um acúmulo de ROS, diz-se que existe o estresse oxidativo. (BRAWEK *et al.*, 2009; PÔRTO, 2001)

O cérebro é particularmente vulnerável aos danos oxidativos, devido a seu elevado consumo de oxigênio, níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados (muito vulnerável a oxidação por radicais livres), os baixos níveis de antioxidantes e os níveis relativamente elevados de íons de metais de transição. (AGOSTINHO *et al.*, 2010; UTTARA *et al.*, 2009)

Seguindo a teoria da neuroproteção com a utilização profilática de antioxidantes, os radicais livres ganham posição de destaque na explicação mais convincente para

diversificadas alterações degenerativas associadas ao envelhecimento (NOHL, 1993; FUKAGAWA, 1999).

ROS são continuamente formados como consequência de metabolismo celular de oxigênio: cerca de 1-5% do total de oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido em ROS pela redução parcial de oxigênio para o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet}$), que é convertido enzimaticamente e não enzimaticamente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser transformado no altamente reativo radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) na presença de metais de transição (BRAWEK *et al.*, 2009; LÖFFLER, 2010).

O estresse oxidativo é uma resposta excessiva de adaptação do organismo, aumentando a ativação intracelular de proteases e lipases dependentes de cálcio, levando a um prejuízo na fosforilação oxidativa mitocondrial e geração de espécies reativas, mais eficientemente do que as vias fisiológicas (CHOI, 1988; FADDA & ROSSETTI, 1998).

O peptídeo βA , particularmente as formas solúveis, podem levar à ativação da micróglia que por longos períodos de tempo geram ROS, contribuindo para o dano neuronal. (BRIEGER, 2012)

4.4. Óxido nítrico (NO)

Descoberta nos anos 80, a concepção de que células vasculares eram capazes de sintetizar NO a partir do aminoácido L-arginina, foi recebida com ceticismo, porém hoje essa ideia já foi comprovada de forma irrefutável (QUEIROZ & BATISTA, 1998). O estudo da sinalização do NO se tornou uma área de extensa investigação e de rápido crescimento na pesquisa biomédica. (PANNU & SINGH, 2006)

Após o metabolismo, a arginina é biotransformada em um intermediário, a N^G -hidroxil-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{2+} sendo necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO. (SANTOS, 2009)

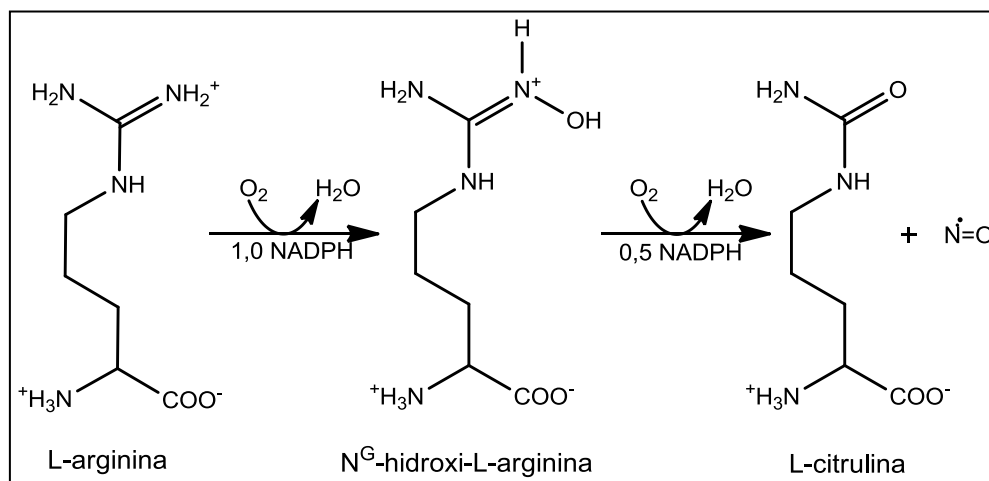


Figura 5 - Representação esquemática da biossíntese de óxido nítrico, a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase (adaptado de QUEIROZ & BATISTA, 1999).

O NO é uma molécula pequena, altamente difusível e reativa que apresenta meia vida curta (STEINERT *et al.*, 2010). Importante molécula de sinalização que controla uma grande variedade de processos biológicos (SHAHANI & SAWA, 2011), dependendo do ambiente na qual o NO é gerado, pode mediar a regulação de uma série de funções fisiológicas, que ainda não estão esclarecidas em sua totalidade. De fato é aceito hoje que o NO é essencial como molécula efetora ou mensageira, no controle do tônus vascular, controlando a adesão e agregação plaquetária, em processos relacionados à imunidade e inflamação, atenua a adesão e ativação de leucócitos, possui atividade neurotransmissora, mediação na ativação da síntese de gama globina, entre outras (CERECETTO & PORCAL, 2005; PANNU & SINGH, 2006; CALABRESE *et al.*, 2007; SCATENA *et al.*, 2010; SANTOS, 2009). Mas pode também reagir com os radicais superóxido para gerar destrutivas espécies de azoto reativo (SRNS), tais como o trióxido de diazoto (N_2O_3) e peroxinitrito ($ONOO^-$) como observado em condições neurodegenerativas. (PANNU & SINGH, 2006; CALABRESE *et al.*, 2007)

NO é produzido por três diferentes isoformas de NO sintases (NOSs), duas delas são expressas de maneira constitutiva, a forma neuronal (nNOS) que é predominantemente expressa no tecido neuronal, e a forma endotelial (eNOS) predominantemente expressa nas células do endotélio vascular, são essencialmente reguladas pelo influxo de Ca^{2+} e subsequente ligação a calmodulina. A terceira isoforma, a forma induzida (iNOS) produz NO em resposta a uma grande variedade de estímulos, principalmente a endotoxinas e mediadores pró-inflamatórios endógenos, esta isoforma independe da presença do ion Ca^{2+} para ativação. Uma vez induzida iNOS gera grande quantidade de NO durante um longo período de tempo, o que tem sido relacionado a manifestações patológicas

observadas em doenças neurodegenerativas. (PANNU & SINGH, 2006; SHAHANI & SAWA, 2011; ADLER *et al.*, 2010)

O NO desempenha várias funções no SNC. Sob condições fisiológicas, contribui para a regulação, proliferação, sobrevivência e diferenciação de neurónios. O NO está envolvido no controle do sono, apetite, temperatura corporal, em atividade sináptica, plasticidade neural, aprendizagem e memória, e exerce efeitos duradouros através da regulação dos fatores de transcrição e na modulação do gene expressão. (CALABRESE *et al.*, 2007; STEINERT *et al.*, 2010)

Como neurotransmissor sua produção ocorre quando há liberação de glutamato na fenda sináptica e se liga ao receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) em um neurônio pós-sináptico. Esta ligação provoca a abertura dos canais no neurônio pós-sináptico, permitindo a entrada de Ca^{2+} na célula, e sua posterior ligação a calmodulina. O complexo Ca^{2+} /calmodulina liga-se então à forma da NO sintase encontrada nas células nervosas, nNOS, e esta ligação ativa a enzima que catalisa a oxidação da L-arginina para L-citrulina e NO. (THATCHER *et al.*, 2006; QUEIROZ & BATISTA, 1999)

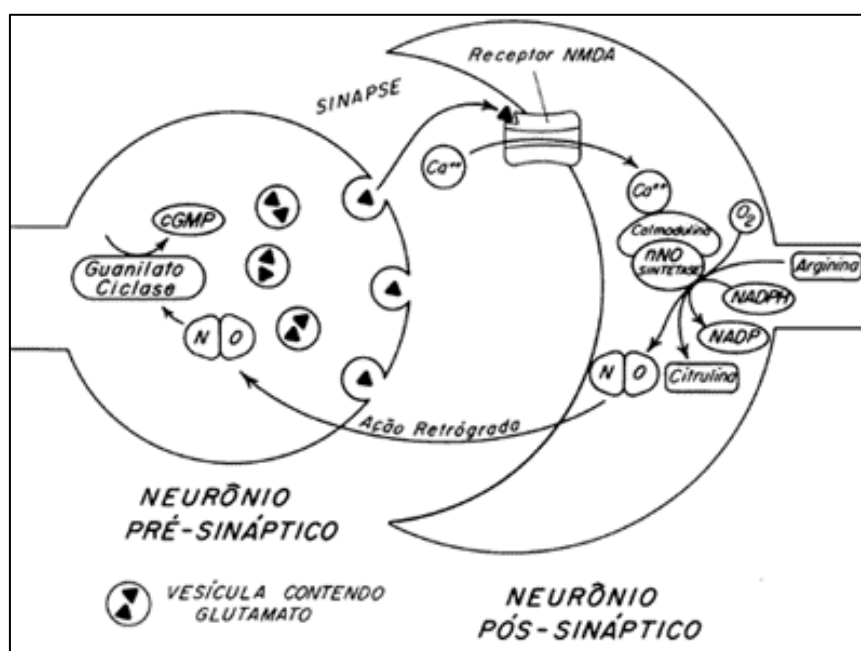


Figura 6 – Produção de NO para atuar como neurotransmissor, sendo produzido pela enzima constitucional nNOS, dependente do íon cálcio. (retirado de QUEIROZ & BATISTA, 1999).

Esse sistema de liberação de NO é considerado importante para a modulação da transmissão sináptica e plasticidade em regiões do cérebro tais como o hipocampo e no córtex cerebral, que são essenciais para a aprendizagem e memória. Há muito tempo se postulou que o NO desempenha um papel crítico em cascatas de transdução de sinais que

estão comprometidos na DA, contribuindo para amenizar os sintomas de comprometimento cognitivo e demência que caracterizam DA. (THATCHER *et al.*, 2006)

Enquanto concentrações fisiológicas de NO são essenciais para a função neuronal, em altas concentrações o NO possui efeito citotóxico, podendo conduzir à morte celular, portanto, um neuroprotetor mimético de NO ideal, deve possuir a capacidade de produzir um menor fluxo de NO durante um período de tempo longo. (SCHIEFER *et al.*, 2012)

4.5. Doadores de NO e derivados furoxanos

Os nitratos orgânicos, nitritos, complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas, *N*-nitrosotióis, *N*-hidroxiguanidinas, derivados de ácido hidroxâmico e derivados furoxânicos estão entre as classes de compostos que possuem a capacidade de doar NO. (SANTOS, 2009)

Alguns desses doadores como complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas e *N*-nitrosotióis apresentam algumas desvantagens como instabilidade química e física e apresentam meia-vida muito curtas perdurando por alguns minutos. A menos que seja resolvida essa instabilidade, essas desvantagens os desqualificam como potenciais fármacos doadores de NO. (BARRETO *et al.*, 2005).

A química dos furoxanos (2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) (fig. 7) é muito bem conhecida. Estes sistemas são amplamente utilizados em química orgânica como compostos intermediários na síntese de vários heterocíclicos (CERECETTO & PORCAL, 2005). Furoxanos são compostos termicamente estáveis e representam uma classe importante de doadores de NO, que podem produzir altos níveis de NO *in vitro*. (LING, *et al.*, 2011)

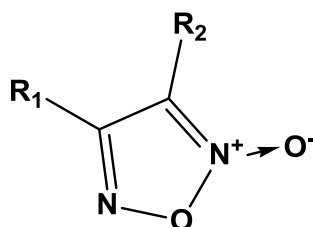


Figura 7 - Estrutura química dos núcleos furoxânico (2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol)

Em pouco mais de 50 anos, um amplo espectro de atividades biológicas tem sido relatado para os furoxanos. No entanto recentemente, os compostos que incorporam o 2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol têm cada vez mais chamado a atenção de químicos medicinais,

devido a seu grande número de propriedades químicas e atividades biológicas em diferentes alvos. (CERECETTO & PORCAL, 2005)

De fato, quando se relaciona a capacidade de doação de NO com o substituinte do carbono ligado ao *N*-óxido observamos que a maior doação de NO está relacionado à presença de grupos eletroatratores ligados a esse carbono (SORBA *et al.*, 1997; SANTOS, 2009).

Embora a capacidade de doação de NO por parte dos derivados furoxânicos esteja bem fundamentada na literatura, os mecanismos para essa doação ainda permanecem obscuros. Derivados furoxânicos podem produzir NO, quando em solução fisiológica na presença de tióis, como a L-cisteína. Um mecanismo proposto para justificar a liberação de NO é o ataque do ion tiolato, na posição 3- e/ou 4- do anel, seguido por abertura do anel para dar um derivado nitroso, que liberta o ânion NO-nitroxilo, que por sua vez é oxidado a NO. (CENA *et al.*, 2006; SCATENA *et al.*, 2010)

Podemos observar (fig. 8) que a doação de NO é dependente inicialmente do ataque do enxofre do ion tiolato ao carbono que contém o nitrogênio *N*-óxido. Assim, pode-se propor que a doação de NO pode ser facilitada pela introdução nesse carbono de substituintes que são favoráveis estericamente e retiram a densidade eletrônica, tornando esse átomo de carbono mais deficiente eletronicamente e com maior suscetibilidade ao ataque do nucleófilo. (SANTOS, 2009)

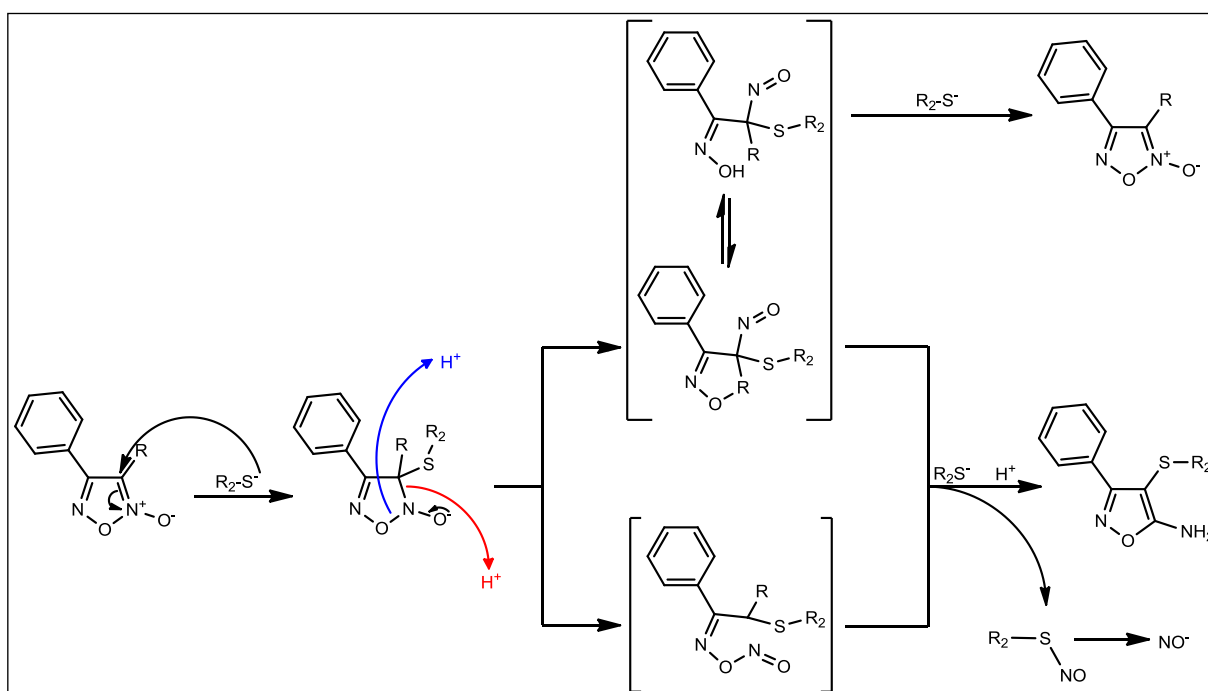


Figura 8 - Mecanismo sugerido para liberação de NO pelos derivados furoxânicos. (adaptado de MEDANNA, *et al.*, 1999)

Curiosamente, alguns furoxanos também pode produzir NO espontaneamente sem a assistência de tióis. Em conclusão, a libertação de NO pelos furoxanos pode ocorrer tiol-induzida ou espontânea dependendo do substituinte no anel, pode ocorrer em valores de pH fisiológicos através de mecanismos complexos que ainda requerem maior investigação. Além disso, tanto a taxa e a quantidade de NO gerado pode ser modulada através da introdução de substituintes adequados para o anel. (CENA *et al.*, 2006; SCATENA *et al.*, 2011)

4.6. Talidomida e derivados ftalimídicos

A talidomida α -[N-ftalimido]-glutarimida é um derivado sintético do ácido glutâmico, foi sintetizada em 1954 na Alemanha Ocidental, pela empresa Chemie Grünenthal e introduzida no mercado alemão em 1956 para o tratamento de ansiedade, insônia, náuseas e vômitos. Devido a sua aparente falta de toxicidade, a talidomida passou a ser prescrito para mulheres grávidas. No ano de 1958 já era comercializada na maioria dos países industrializados. No início, a talidomida foi considerada um dos mais seguros hipnóticos sedativos do mercado, uma vez que não causava dependência e eram descritos poucos efeitos adversos, diferentemente dos barbitúricos que ocasionavam comprometimento da função respiratória e/ou perda da coordenação motora. (STIRLING, 1998; LIMA *et al.*, 2006; MARTÍNEZ-FRÍAS, 2012)

No entanto, a talidomida possuía efeitos adversos graves, que acabou resultando em uma tragédia mundial entre os anos de 1957 a 1962. Descobriu-se que o uso de talidomida durante o primeiro trimestre de gravidez causava a má formação (focomegalia) nos fetos (ITO & HANDA, 2012). A focomegalia causada pela talidomida foi responsável por aproximadamente 12.000 casos de defeitos congênitos graves em todo o mundo (LIMA *et al.*, 2006), sendo então retirada do mercado. (BHATA & AL-OMAR, 2011)

Apesar dos efeitos teratogênicos causados pela talidomida, em 1965 o médico dermatologista israelita, Jacob Sheskin, prescreveu a talidomida como sedativo para pacientes acometidos pela hanseníase, observando acentuada redução da dor associada ao processo inflamatório do eritema nodoso hanseniano, identificando as propriedades anti-inflamatórias até então desconhecidas. (BARTLETT *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2006)

A molécula da talidomida possui estrutura química relativamente simples, consistindo em dois sistemas de anéis, o anel ftalimídico e o anel de glutarimida, com um único centro assimétrico. A talidomida possui dois isômeros (fig. 9) opticamente ativos, forma R(+) e S(-), sendo a forma S(-) a responsável pela teratogenicidade. (MULLER *et al.*, 1996; STIRLING, 1998; BARTLETT *et al.*, 2004)

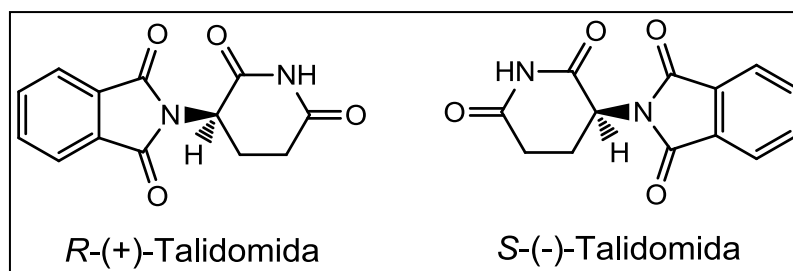


Figura 9 - Fórmula estrutural da talidomida, mostrando seus diferentes isômeros.

Hoje a molécula da talidomida, é descrita possuindo propriedade anti-inflamatória, imunomoduladora, e efeitos antiangiogênicos (UEYAMA *et al.*, 2008). A explicação para a atividade anti-inflamatória da talidomida surgiu em 1991 quando se descobriu sua capacidade de inibir a síntese de TNF- α produzido por macrófagos (SAMPAIO *et al.*, 1991). Estudos também mostram a capacidade da talidomida em inibir o TNF- α originário de outras células diferentes dos macrófagos, mas que também tenham sido ativadas por estímulos inflamatórios, como a micróglia (LOKENS GARD *et al.*, 2005).

O anel ftalimídico é relatado como um interessante bióforo, constituindo a subunidade estrutural de caráter farmacofórico para uma série de compostos com diferentes atividades farmacológicas, entre elas anticonvulsivante, ansiolítica, anti-Parkinson, anti-Alzheimer, inibidoras de HIV integrase (LIMA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2002; VERSCHUEREN *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006), anti-inflamatória, atividade analgésica, hipolipemiante (BHTA & AL-OMAR, 2011) e imunomoduladora. (BORGES & FRÖHLICH, 2003).

4.7. Tratamentos existente para DA

Nas últimas décadas, o registro de medicamentos para o tratamento de novas patologias ou que representam inovações terapêuticas em doenças conhecidas, principalmente infecciosas e com alto impacto socioeconômico, como câncer e doenças

neurodegenerativas, tem diminuído de forma contínua, contrastando com os avanços tecnológicos e científicos que permitem uma melhor qualidade de vida. (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007)

Alguns dos grandes desafios para os químicos medicinais no século XXI é a descoberta e desenvolvimento de compostos capazes de prevenir e tratar pacientes acometidos pela DA (WOLFE, 2012). Atualmente não há tratamento capaz de curar ou modificar de maneira eficaz a doença (FAN & CHIU, 2010). Os medicamentos disponíveis no mercado atuam apenas reduzindo alguns sintomas manifestados pelos pacientes da DA. (MAHLEY & HUANG, 2012).

O tratamento atualmente disponível é baseado em inibidores das duas enzimas responsáveis pela degradação da acetilcolina: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). (RELIGA & WINBLAD, 2003; ONOR *et al.*, 2007)

Quatro fármacos que pertencem a diferentes grupos químicos foram aprovados para o tratamento da DA em diferentes fases, que variam de ligeira a moderada: tacrina (já retirada do mercado), donepezila, rivastigmina e galantamina (fig. 10). Inibidores de acetilcolinesterase podem aliviar sintomas em pacientes com DA e melhorar sua habilidade cognitiva elevando os níveis de acetilcolina nas regiões das sinapses (BEEDESSEE *et al.*, 2013), uma vez que no decorrer da doença, há uma perda substancial de neurônios colinérgicos (RELIGA & WINBLAD, 2003; MUSIAL *et al.*, 2007).

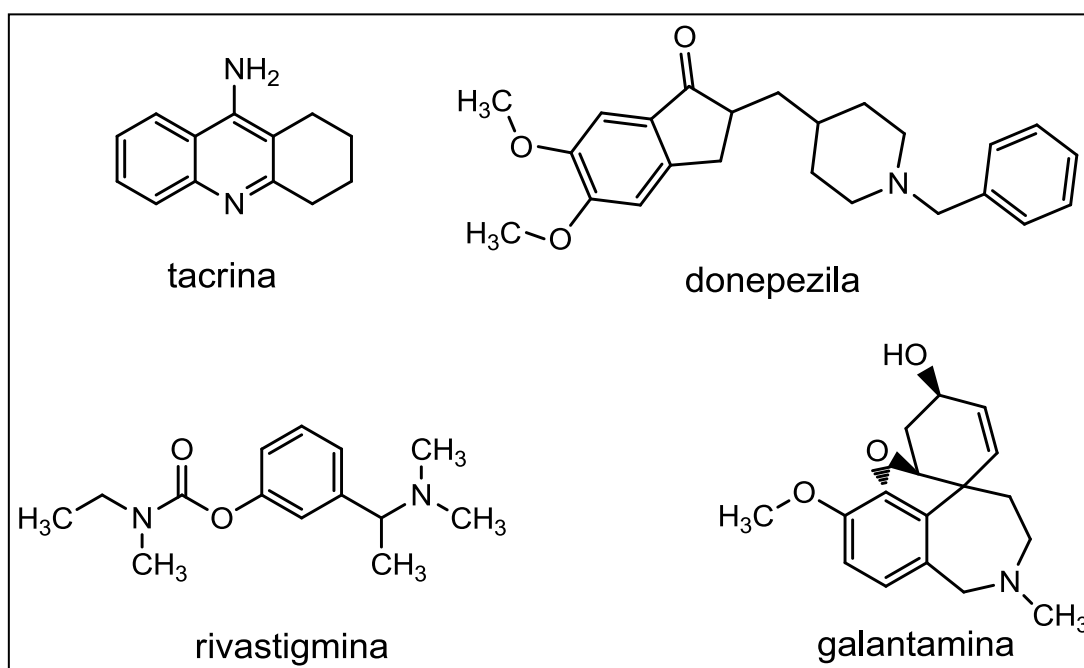


Figura 10 - Fórmula estrutural de inibidores de acetilcolinesterase (AChE) utilizados no tratamento da DA.

A tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina), uma aminoacridina, foi descrita pela primeira vez em 1961 como um inibidor reversível da AChE e BuChE. Trinta e dois anos depois, em 1993, foi aprovado como o primeiro fármaco que tem efeitos benéficos sobre a cognição em pacientes com DA. No entanto, pouco tempo depois, foi descoberto que também teve efeitos colaterais muito sérios, como a hepatotoxicidade que levou a retirada do medicamento do mercado. (MUSIAL *et al.*, 2007)

Donepezila foi o segundo fármaco aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA, indicado para pacientes que apresentavam estágios leve a moderado da doença. É uma nova classe de inibidores da AChE com uma *N*-benzilpiperidina e uma porção indanona, que possui uma ação mais longa seletiva aos receptores AChE. (SUGIMOTO, 2000)

A rivastigmina é um fármaco amplamente utilizado em pacientes com DA. Este fármaco pertence a uma nova geração de inibidores da colinesterase com uma fracção carbamato, que é capaz de reagir covalentemente com o sítio ativo da AChE. Rivastigmina exibe 10 vezes maior afinidade para AChE cerebral do que para a forma periférica. A seletividade para a enzima cerebral e atividade inibidora de AChE e BuChE fazem da rivastigmina um fármaco com bom perfil farmacológico. (MUSIAL *et al.*, 2007)

A galantamina é um alcaloide isolado a partir de várias espécies diferentes da família *Amaryllidaceae*, como a, *Galanthus woronowii*. É um inibidor de ação central reversível da AChE usado no tratamento da DA, a galantamina mostrou-se capaz de melhorar as funções cognitivas dos pacientes. A galantamina possui atividade menor que a tacrina porém apresenta menor toxicidade. (MUSIAL *et al.*, 2007)

A outra classe de fármacos disponíveis para o tratamento da DA atua no sistema glutamatérgico, bloqueando a N-metil-D-aspartato (NMDA). Nesta categoria, a memantina é o único fármaco aprovado pela FDA (BASSIL & MOLLAEI, 2012). A memantina é um antagonista não competitivo moderado de receptores NMDA, que modula a transmissão do sinal do glutamato. O bloqueio do canal de NMDA modula os efeitos de níveis tônicos elevados do neurotransmissor glutamato. (McKEAGE, 2009)

A memantina foi aprovada pelo FDA para o tratamento DA em casos moderados e severos, podendo interferir com a excitotoxicidade glutamatérgica ou proporcionando uma melhora sintomática através dos efeitos sobre a função dos neurónios do hipocampo. (CUMMINGS, 2004)

Em muitos casos, os inibidores da AChE ou memantina utilizados em monoterapia ou em associação não alteram o quadro de deficiência cognitiva dos pacientes. Os fármacos disponíveis apresentam diminuição no efeito terapêutico durante a progressão da doença. (POTTER, 2010)

4.8. Modificação molecular

Por ser um processo demorado e dispendioso, a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos busca utilizar diferentes metodologias para a obtenção de candidatos a fármacos de maneira mais rápida e barata. Entre os métodos de introdução de novos fármacos na terapêutica, os processos de modificação molecular são os mais promissores. (CHUNG & FERREIRA, 1999; DIMASI *et al.*, 2003)

A modificação molecular basicamente consiste em tomar uma substância química bem determinada e de ação biológica conhecida como molécula protótipo e a partir disso sintetizar congêneres, análogos ou homólogos estruturais do mesmo (FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980), que possuam não apenas melhoria da resposta biológica como aumento de potência, melhor perfil de atividade específica, mas também modificações na farmacocinética, ou então minimização de efeitos colaterais indesejados que estão normalmente presentes na molécula protótipo e que impedem sua aplicação na clínica (MONTANARI, 2011), melhor segurança e formulação mais adequada ao manuseio pelos profissionais da saúde, além de melhor aceitabilidade pelos pacientes. (VERMUTH, 2004; FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980).

A modificação molecular exige a prévia hierarquização das distintas contribuições farmacofóricas das diferentes subunidades estruturais da molécula do ligante, de maneira a preservá-las, assegurando seu reconhecimento molecular pelo biorreceptor. (BARREIRO *et al.*, 2002)

O planejamento racional de novos protótipos sintéticos utiliza uma série de métodos de modificação estrutural que objetivam gerar novos compostos que apresentem melhores propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, explorando substâncias bioativas, metabólitos ativos de fármacos, bioisosterismo, otimização seletiva de efeitos colaterais dos fármacos e latenciação de fármacos. (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007)

Diversas estratégias são conhecidas para introduzir modificações estruturais em um composto-protótipo, objetivando sua otimização, seja farmacocinética ou farmacodinâmica

(BARREIRO *et al.*, 2002). Entre as técnicas de modificação molecular, podemos citar: latenciação, bioisosterismo, hibridação, anelação (WERMUTH, 2004) e restrição conformacional (BARREIRO *et al.*, 2002).

Nas estratégias de latenciação e hibridação podem ser facilmente confundidas, pois a nova molécula pode apresentar tanto efeito *per se* e/ou após biotransformação, apresentando, desta forma, características mistas. (CHUNG, 2012)

4.9. Hibridação

A descoberta de novos fármacos está associada à ideia de um único alvo para uma única doença. Muitos medicamentos de sucesso surgiram a partir dessa estratégia, e isso, sem dúvida, deve permanecer dominante por muitos anos. No entanto, apesar dos esforços dos pesquisadores, muitas doenças permanecem inadequadamente tratadas. Há uma disposição crescente para desafiar o paradigma atual e considerar o desenvolvimento de agentes que modulem vários alvos simultaneamente (polifarmacologia), com o objetivo de reforçar a eficácia ou melhorar a segurança em relação aos medicamentos que abordam apenas um alvo único. (MORPHY & RANKOVIC, 2005)

A hibridação molecular é uma abordagem de modificação molecular que tem por objetivo obter compostos que sejam ligantes múltiplos, fármacos que reconheçam mais do que um receptor, com vantagens farmacocinéticas em relação à administração concomitante de dois medicamentos diferentes. As vantagens de ligantes múltiplos são a sua capacidade de: ativar diferentes alvos partindo de uma única molécula, aumentando assim a eficácia terapêutica, e alterar o perfil de biodisponibilidade na célula sendo eliminado de maneira eficaz após exercer os seus efeitos terapêuticos. (BARREIRO, *et al.* 2002; MORPHY, *et al.*, 2004; BOSQUESI *et al.*, 2011)

A capacidade de um fármaco ser reconhecido por mais de um receptor no sistema biológico, que por vezes era considerado um problema, passou a ser uma estratégia da química farmacêutica medicinal para o desenvolvimento de compostos. A aspirina, por exemplo, que inicialmente foi usada para o alívio da dor, hoje também é indicada na redução da agregação plaquetária, prevenção de pré-eclâmpsia, câncer e anti-artrite, demonstrando o potencial multi-ligante desse fármaco (WEBER *et al.*, 2004).

A hibridação molecular é uma estratégia de desenho racional de novos ligantes ou protótipos baseado no reconhecimento de subunidades farmacofóricas na estrutura

molecular de dois ou mais derivados bioativos conhecidos que, através da adequada fusão destas sub-unidades, leva à concepção de novas moléculas híbridas que mantêm as características pré-selecionadas dos modelos originais. (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007)

Apesar do desafio maior no desenho e otimização de ligantes oriundos da técnica de hibridização molecular, esta estratégia tem vantagens claras sobre coquetéis de medicamentos, por ser mais fácil o controle farmacocinético de uma única entidade química e a diminuição do risco de interação fármaco-fármaco. (BARREIRO & FRAGA, 2008)

Os compostos obtidos através da hibridação molecular podem ser classificados em: conjugados, pré-fundidos e fundidos (fig. 11), de acordo com a hibridação do(s) grupo(s) relevantes ao reconhecimento pelo(s) receptor(es). Nos híbridos conjugados, esses farmacóforos são unidos por um espaçador por meio de uma ligação covalente não lábil, e atuam por si sem a necessidade de bioativação química ou enzimática. Quando as subunidades são unidas sem a presença de um espaçador, temos os híbridos fundidos. Inúmeros são os exemplos da literatura em que as subunidades farmacofóricas se mesclam (se fundem) formando estruturas com menor tamanho, peso molecular e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes do protótipo (MORPHY & RANKOVIC, 2005; SANTOS, 2009).



Figura 11 - Classificação dos compostos híbridos de acordo com a estratégia de hibridação utilizada (adaptado de MORPHY & RANKOVIC, 2005).

Alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças podem, por suas características, sugerir a necessidade de desenharem bioligantes ou protótipos em que sejam incluídas, na mesma molécula, propriedades farmacodinâmicas duplas, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica (BARREIRO & FRAGA, 2002). A atividade dupla pode ser desejada em inibidores de duas enzimas distintas, envolvidas na mesma patologia, ou pode estar relacionada com o antagonismo de dois bioreceptores diferentes ou mesmo ainda podem envolver ambos os casos, ser um composto capaz de inibir uma determinada

enzima e, simultaneamente, modular um determinado biorreceptor. (BARREIRO & FRAGA, 2008)

4.10. Latenciação de Fármacos

As estratégias de modificação molecular, como a preparação de pró-fármacos, também denominada de latenciação de fármacos, tem recebido especial atenção (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982; PERREIRA, 2007). Dentre os diversos fármacos disponíveis no mercado, atualmente de 5 a 7% são classificados como pró-fármacos (RAUTIO *et al.*, 2008). Podendo-se citar, o enalapril, omeprazol, sinvastatina e aciclovir, considerados “blockbusters” devido ao potencial mercadológico (ETTMAYER *et al* 2004; SANTOS, 2007).

O processo de latenciação de fármacos foi proposto inicialmente em 1959, por Harper (CHUNG *et al.*, 2005). A definição de pró-fármaco, considera-o como um fármaco ativo, quimicamente transformado em um derivado inativo que requer uma etapa de ativação, *in vivo*, metabólica ou química, antes que apresente seus efeitos farmacológicos no tecido alvo. (CHUNG *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2008)

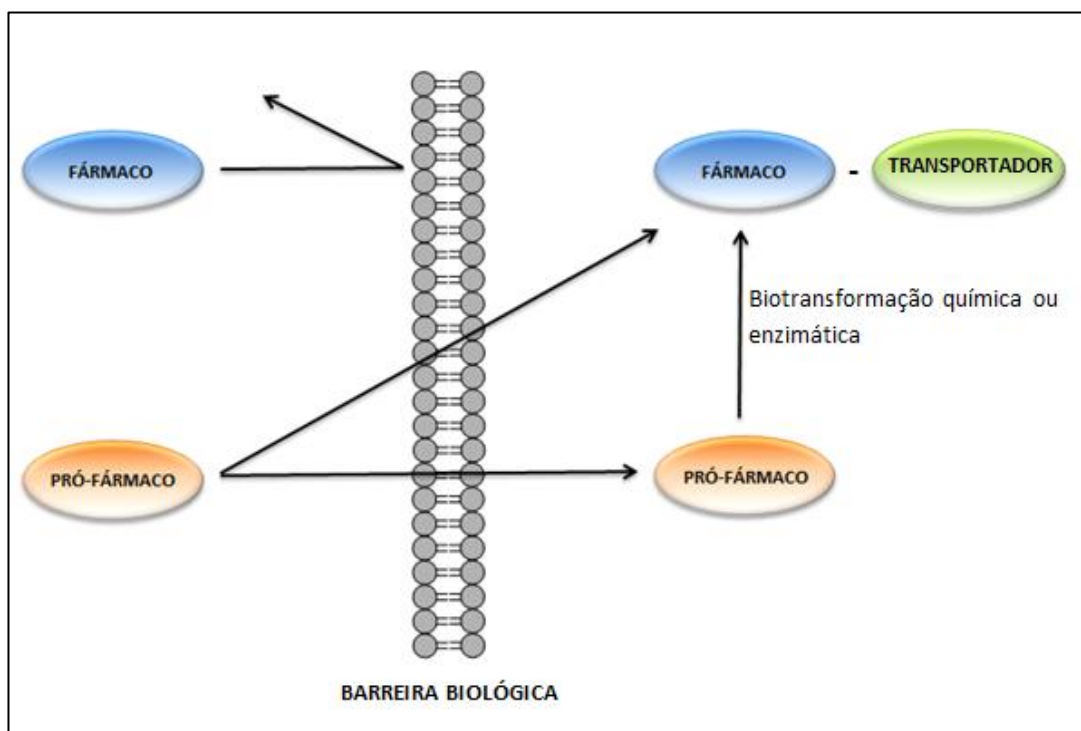


Figura 12 - Representação esquemática do conceito de pró-fármacos (adaptado de CHUNG *et al.*, 1999)

O desenvolvimento de pró-fármacos é interessante e promissor como alternativa para solucionar alguns problemas apresentados pelos fármacos atuais, entre eles os problemas farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, toxicidade, baixa estabilidade química e melhora na seletividade para tecido ou célula alvo. (CHUNG *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2008)

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

Os pró-fármacos foram classificados em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores, pró-fármacos mistos, pró-fármacos dirigidos e pró-fármacos recíprocos. (TESTA, 2004; CHUNG *et al.*, 2005).

Bioprecursores:

Segundo Chung e colaboradores (2005), bioprecursores são fármacos latentes que não apresentam um transportador, sendo moléculas inativas que sofrem Biotransformação *in vivo*, normalmente por hidrólise ou pelo sistema redox, dando origem ao metabólito ativo.

Pró-fármacos clássicos:

Os pró-fármacos clássicos seguem a definição clássica de latenciação, são inativos por si ou menos inativos que o fármaco matriz, somente se tornando ativo após sofrer hidrólise química ou enzimática para liberar sua porção ativa. Os pró-fármacos clássicos são obtidos mediante ligação do fármaco matriz a um transportador adequado, com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas, aumentando sua atividade terapêutica, seletividade, e reduzindo toxicidade. (SANTOS, 2009; CHUNG *et al.*, 2005; STEFFANSEN *et al.*, 2004)

Pró-fármacos mistos:

Os pró-fármacos mistos possuem características de pró-fármacos clássicos e de bioprecursores. São inicialmente inativos e necessitam sofrer diversas reações químicas para se converter na forma ativa, aumentando a concentração do fármaco ativo em um sítio de ação específico. (BODOR & ABDELALIM, 1985; CHUNG *et al.*, 2005; SANTOS, 2009)

Pró-fármacos dirigidos:

Esta estratégia tem como objetivo reduzir os efeitos tóxicos provocados pela ação inespecífica do fármaco em outros alvos. Utiliza o conhecimento da presença de receptores ou enzimas específicas no sítio de ação para reconhecimento do pró-fármaco que atuará seletivamente no local de ação. Entre os transportadores mais comumente utilizados estão os polímeros e anticorpos (CHUNG *et al.*, 2008).

Pró-fármacos recíprocos:

O transportador apresenta atividade biológica após a reação de hidrólise química ou enzimática. O mecanismo de ação do transportador geralmente é diferente, e o pró-fármaco após hidrólise, pode atuar de forma sinérgica em alvos distintos. A utilização dessa estratégia pode diminuir a dose inicialmente utilizada, diminuindo os efeitos adversos e contribui com maior adesão do paciente ao tratamento. (CHUNG *et al.*, 2005).

5. MATERIAIS E MÉTODOS**5.1. Reagentes**

acetato de etila (Chemis);	diclorometano (Chemis);
ácido 2-amino5-hidroxibenzóico (Henrifarma);	dimetilaminopiridina (Sigma);
ácido acético glacial (J.T. Baker);	etanol (Chemis);
ácido clorídrico 37% (Synth);	etanolamina (Sigma);
ácido clorossulfônico (Vetec);	éter dietílico (Merck);
ácido m-aminobenzóico (Fluka)	ftalimida (Across);
ácido p-aminobenzóico (Fluka);	hexano (Chemis);
ácido o-aminobenzóico (Fluka)	hidróxido de potássio (Merck);
ácido monocloroacético (Fluka);	hidróxido de sódio (Merck);
ácido nítrico 98% (Vetec);	metanol (Synth);
ácido sulfúrico concentrado (Synth);	nitrito de sódio (Merck);
água destilada;	N-N-dimetilformamida (Sigma);
alcool cinâmico (Fluka);	peróxido de hidrogênio 30% (Vetec);
anidrido ftálico (J.T. Baker);	sílica para coluna 0,06-0,2 mm (Across);
anilina (Synth);	sulfato de sódio anidro (Synth);
bicarbonato de sódio (Across);	tetrahidrofurano (Merck);
cloreto de sódio (Synth);	tiofenol (Across);
cloreto de tionila (Merck);	tricloreto de fósforo (Merck);
diciclohexilcarbodiimida (Fluka);	triethylamina (J.T. Baker);

5.2. Equipamentos

Agitador magnético IKA® modelo C-Mag HS4

Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific®;

Balança analítica Marte® - modelo AY 220

Balança semi-analítica Gehaka® modelo BG 200

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® modelo DPX-300 operando a 300MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C ;

Espectrofotômetro no infravermelho Shimadzu® modelo IR Prestige-21;

Microscópio de fluorescência Leica Leitz® modelo DM RXE

Módulo de concentração Spead Vac Savant® modelo SPD 131 DDA acoplado a bomba à vácuo Thermo Savant modelo VLP 80 e sistema de refrigeração Vapor Trap modelos RVT 405 DDA e RVT 4104;

Rotaevaporador Ika® modelo RV10

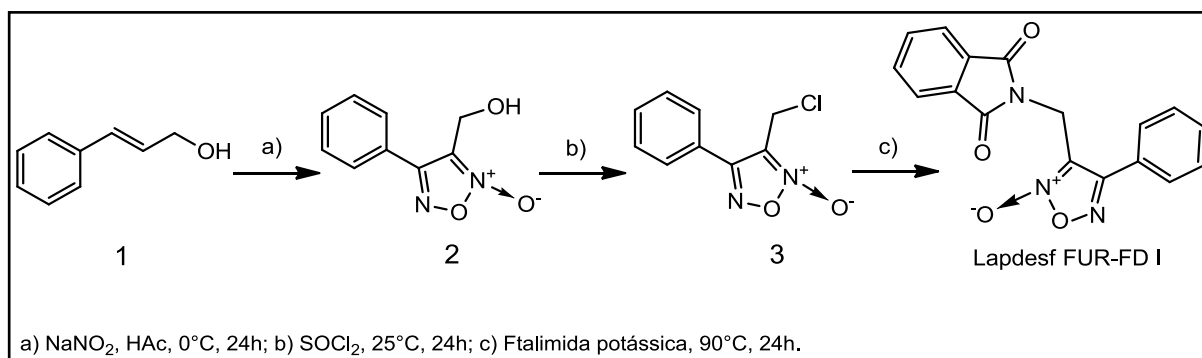
Sonicador Unique® modelo UltraSonic Cleaner

5.3. Metodologia sintética

O planejamento sintético para obtenção dos produtos finais Lapdesf FUR-FD I-VI foi baseado na metodologia utilizada por Santos (2009). A obtenção dos compostos propostos envolve múltiplas etapas não divergentes. Inicialmente foram sintetizados os derivados furoxânicos e ftalimídicos devidamente funcionalizados. Posteriormente estes intermediários foram acoplados levando à obtenção dos produtos finais.

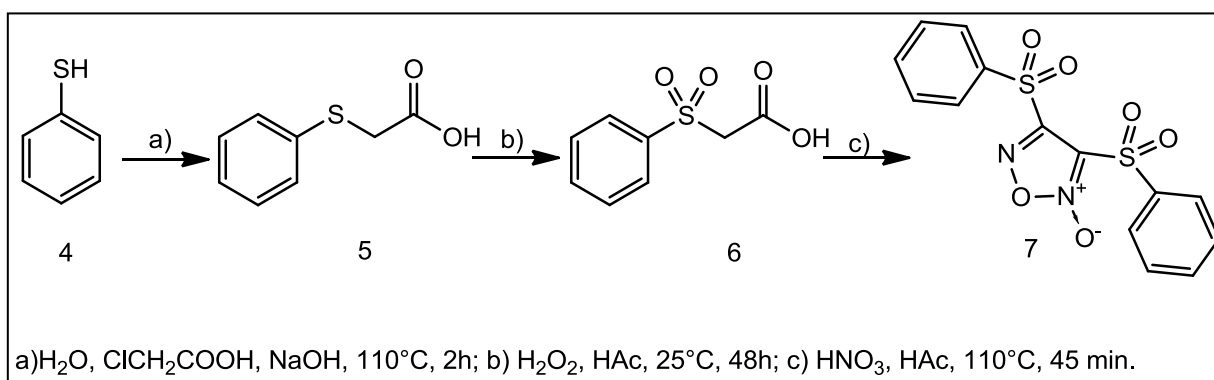
Foram obtidos dois derivados furoxânicos selecionados devido à capacidade variável de doação de NO (SCHOENAFINGER, 1999; CERECETTO & PORCAL, 2005). O derivado 3-(hidroximetil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido foi obtido explorando a reação de alcenos com trióxido de dinitrogênio. O derivado bis-aril-sulfonil furoxano obtido por meio da reação entre o ácido fenilsulfoniltioacético e ácido nítrico fumegante em meio de ácido acético.

Para a obtenção do composto Lapdesf FUR-FD I (esq. 3) inicialmente deve-se obter o derivado (2) a partir da reação do álcool cinâmico (1) com nitrito de sódio em meio com ácido acético. Este derivado funcionalizado foi interconvertido em seu cloreto de alquila usando cloreto de tionila como agente clorante. Na última etapa, a ftalimida atuando como nucleófilo na presença de solvente polar aprótico substitui o cloro em uma reação S_N2 (substituição nucleofílica bimolecular).



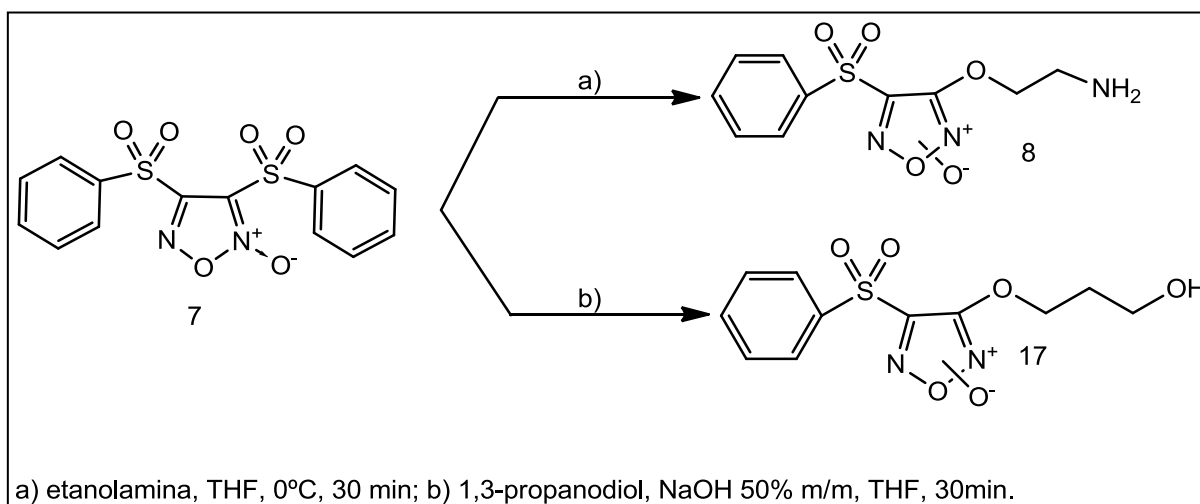
Esquema 3 - Obtenção do composto Lapdesf FUR-FD I obtido a partir do álcool cinâmico.

Para a obtenção dos compostos Lapdesf FUR-FD II e VI foi sintetizado inicialmente o 3,4-bis(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (7) obtido através de três etapas sintéticas (esq. 4): a) explorando a nucleofilicidade do íon tiofenóxido realizou-se uma reação do tipo S_N2 , em que ocorre substituição do átomo de cloro do ácido monocloroacético pelo enxofre do grupo tiol formando o sulfeto; b) em uma segunda etapa, o sulfeto é oxidado à sulfona usando como agente oxidante peróxido de hidrogênio 30%; c) em uma última etapa, a sulfona é reagida com ácido nítrico 90% para formação do intermediário (7).



Esquema 4 - Obtenção do derivado bis-aril-sulfonil furoxano.

Este derivado furoxano (7) foi funcionalizado através de reações de substituição nucleofílica aromática com a etanolamina e 1,3-propanodiol para permitir a reação de acoplamento com os derivados ftalimídicos.

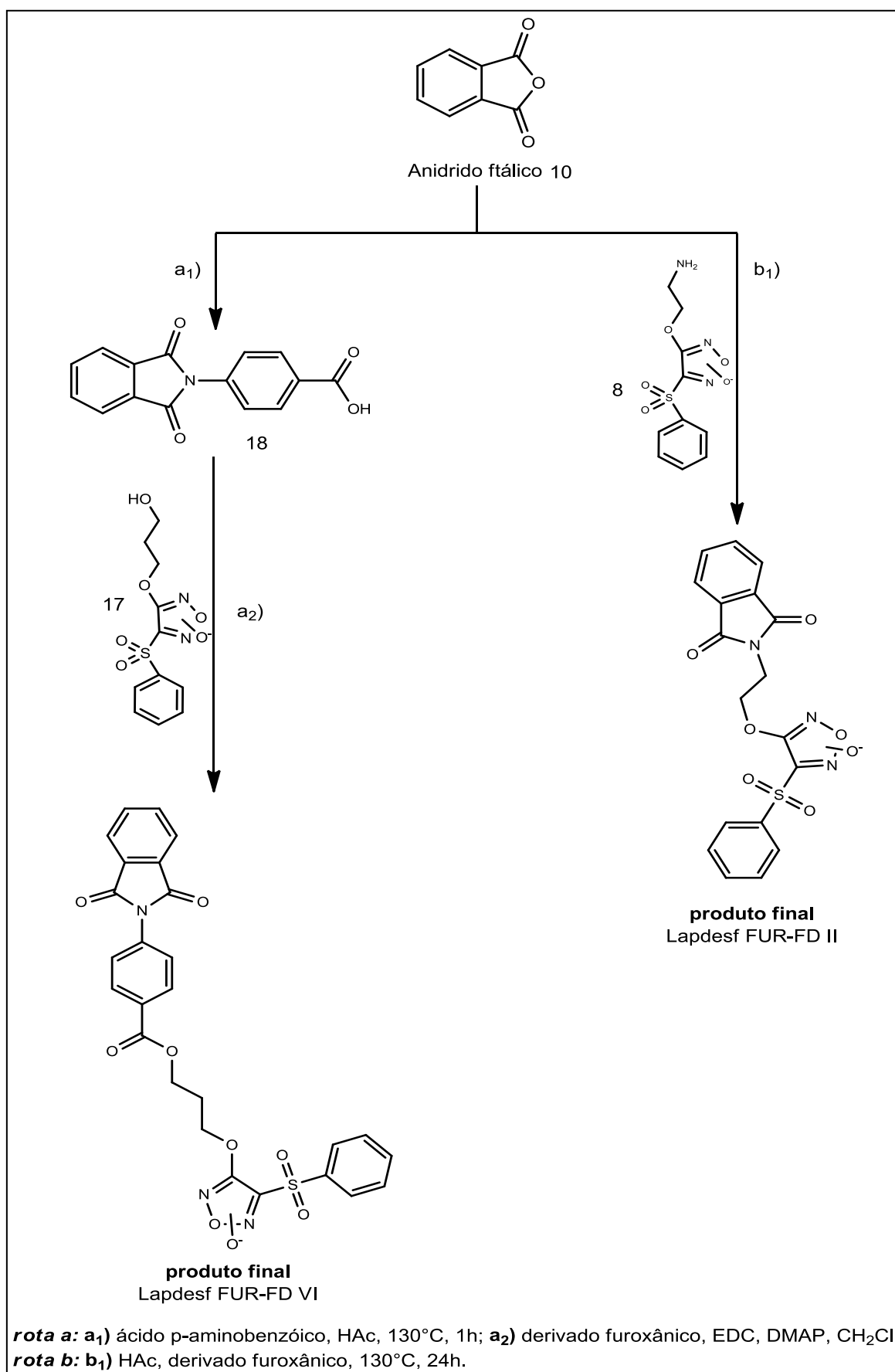


a) etanolamina, THF, 0°C, 30 min; b) 1,3-propanodiol, NaOH 50% m/m, THF, 30min.

Esquema 5 - Obtenção do derivado fenilsulfonilfuroxânico e hidroxipropilfuroxânico.

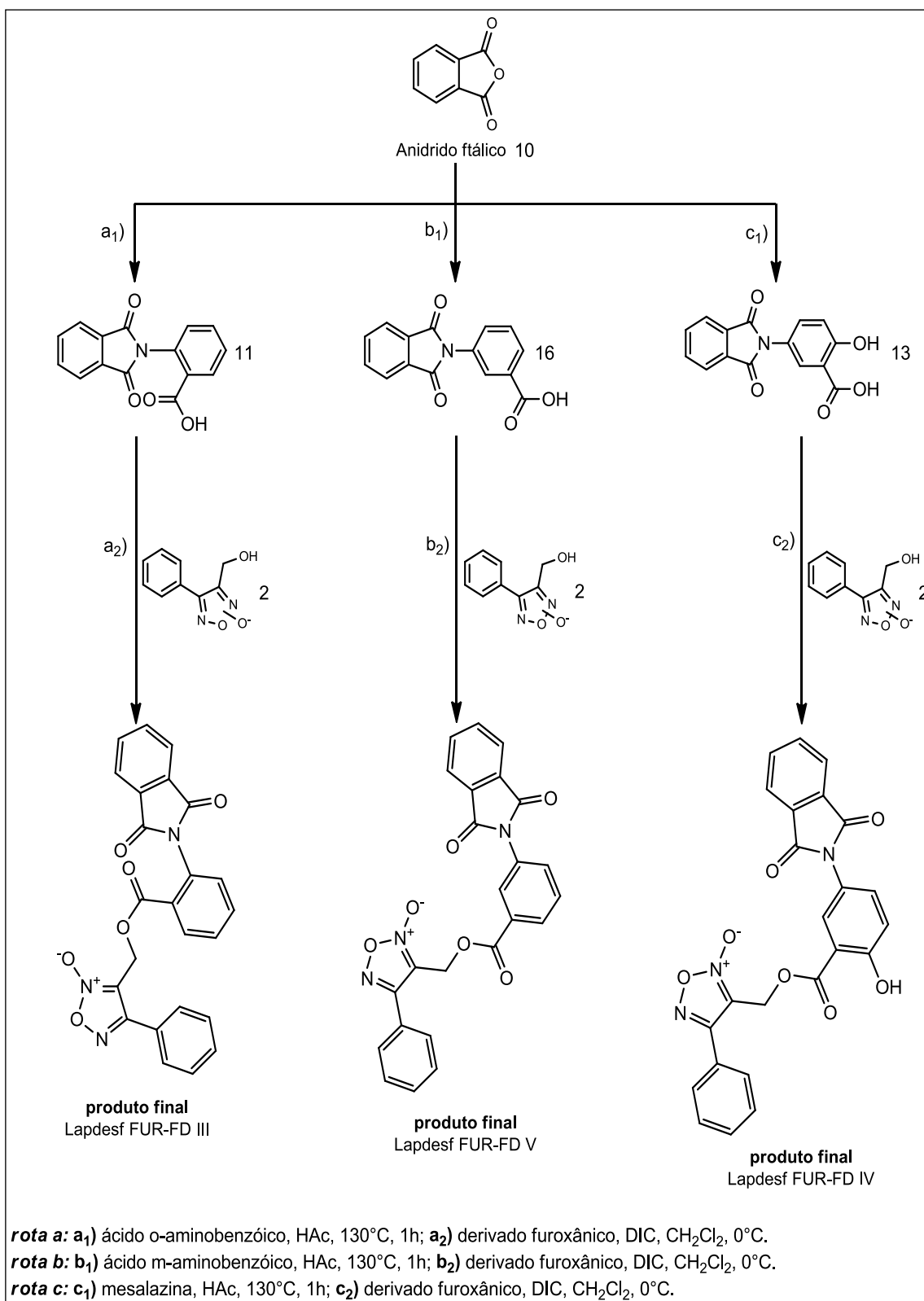
Os derivados ftalimídicos foram preparados através de reações de condensação entre o anidrido ftálico e derivados aminados previamente selecionados, levando em consideração a relação estrutura-atividade biológica do núcleo ftalimídico, tido como farmacóforo na inibição da citocina pró-inflamatória TNF- α . Ademais, esses derivados deveriam estar adequadamente funcionalizados para posterior reação de acoplamento com a subunidade furoxânica. (SANTOS, LIMA & CHUNG, 2006; HESS et al., 2001).

O intermediário obtidos pela reação entre o intermediário (7), etanolamina (8) e 1,3-propanodiol (17) foram reagidos com derivados ftalimídicos em reações do tipo S_N2, permitindo o acoplamento de ambos com as subunidades ftalimídica funcionalizadas (10) e (18) para obtenção dos produtos híbridos finais desejados, compostas Lapdesf FUR-FD II-VI.



Esquema 6 - Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais Lapdesf FUR-FD II e VI.

Os compostos Lapdesf FUR-FD III, IV e V foram sintetizados através da reação entre o intermediário (7) com derivados ftalimídicos funcionalizados (11), (16) e (13) utilizando agentes acoplantes para formação de ésteres dos compostos híbridos desejados.



Esquema 7 - Síntese dos derivados ftalimídicos e dos produtos finais Lapdesf FUR-FD III-V.

5.5. Métodos analíticos

5.5.1. Cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F₂₅₄ Sigma®, para o acompanhamento das reações e das purificações dos compostos sintetizados. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365nm), e/ou por exposição à iodo pulverizado ou ninidrina para a detecção de aminas.

5.5.2. Espectrometria de RMN ¹H e RMN ¹³C

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos com a utilização do Espectrômetro de 300MHz Fourier com Dual probe ¹H e 75MHz Fourier com Dual probe ¹³C – Bruker, do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP). Utilizando como solvente CDCl₃ (clorofórmio), (CD₃)₂SO (dimetilsulfoxido) e C₃D₆O (acetona).

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

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

5.5.4. Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão (ou decomposição) foram determinadas em aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®, disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

5.6. Ensaios

5.6.1. Coeficiente de partição (Log P)

Para determinação do coeficiente de partição foi utilizado um sistema cromatográfico da Shimadzu® com módulo de controle modelo SCL-10A, detector UV-VIS modelo SPD-10A, sistema de bombeamento de fase móvel quaternário modelo LC-10AD, degaseificador modelo DGU-14A (à vácuo), e loop do injetor de 20µL. O controle e o registro das informações foi realizado como programa CLASS A-VP da Shimadzu®, a coluna utilizada foi a Agilent® Zorbax ODS C-18 (250mm x 4,6mm; 5µm).

O método para determinação do coeficiente de partição foi adaptado do OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* n°117. A fase móvel empregada foi metanol:água (70:30) e o fluxo de 0,5mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 0,4µL. Ambiente de temperatura controlada de 20° C e com detector selecionado em 245nm.

As estruturas químicas dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI foram desenhadas no software ChemDraw® Ultra 12.0 e no software on-line ALOGPS 2.1, para a determinação do Log P estimado. Foram utilizadas as substâncias descritas na tabela 1, pra obtenção da curva log K x log P, sendo K o fator de retenção dado pela expressão: $(T_r - T_0)/T_0$, onde, T_r representa o tempo de retenção da substância teste, e T_0 é o tempo morto, ou seja, o tempo médio que uma molécula de solvente necessita para passar a coluna.

Tabela 1 – Padrões utilizados na determinação da curva log K x log P.

Substância	Log P
Acetanilida	1,00
Acetofenona	1,70
Nifedipina	2,00
Diazepam	2,70
Clorobenzeno	2,80
Naftaleno	3,60
Bifenila	4,00
Fenantreno	4,50

5.6.2. Teste de mutagenicidade *in vivo* (Hayashi *et al.*, 1999)

Para a avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, foi utilizado o teste de micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino), com peso aproximado de 25 - 30g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar UNESP, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luz (escuro/luz 12/12h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus Araraquara (nº 02/2013) (anexo II).

Cada grupo testado foi composto por 6 animais, sendo todos machos. Cada grupo recebeu diferentes concentrações dos compostos testados em 50mg/Kg, 100mg/Kg e 200mg/Kg via oral. Foi estabelecido um grupo controle positivo, no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50mg/kg p.c.). O grupo controle negativo recebeu via oral 0,3mL da suspensão de carboximetilcelulose (CMC) 1% e *tween* 0,2% e o grupo controle branco foi tratado apenas com água.

5.6.2.1. Preparo das lâminas com laranja de acridina (*acridine orange*)

As lâminas limpas foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70°C. Com as lâminas quentes, colocou-se 10µL de solução de laranja de acridina (1mg/ml) sobre a lâmina e espalhou-se utilizando a extremidade de outra lâmina limpa. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, à temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

5.6.2.2. Obtenção do sangue e preparo das células

Com o auxílio de uma agulha, perfurou-se a cauda do animal, coletando-se 5µL de sangue (aproximadamente uma gota) e depositando-o no centro da lâmina previamente preparada, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a - 20°C no escuro por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material. Esta análise deve ser realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro

amarelo. Foram contados 1000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

5.6.2.3. Análise estatística dos resultados

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os compostos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir desses resultados foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico Graph Pad Prism[®], versão 5.01.

5.6.3. Atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata induzido por carragenina)

O experimento de inflamação aguda foi realizado seguindo o modelo de edema de pata, na qual induziu-se a formação de exsudato inflamatório utilizando-se a carragenina (200 μ g/pata) por via subplantar. (WINTER *et al.*, 1962; CHUNG *et al.*, 2009).

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar), com peso aproximado de 150-200g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar UNESP, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luz (escuro/luz 12/12h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus Araraquara (nº04/ 2012) (anexo III).

Cada grupo testado foi composto por 6 animais, sendo todos machos. Cada grupo recebeu os diferentes compostos a serem testados, todos na mesma dose de 300 μ mol/Kg, via oral. Foi estabelecido como grupo controle positivo o fármaco talidomida (300 μ mol/Kg) e indometacina (100 μ mol/Kg). O grupo controle negativo recebeu via oral solução salina 0,9% (0,1ml/100g).

5.6.3.1. Procedimento experimental

Na execução dos experimentos, os derivados híbridos Lapdesf FUR-FD I-VI, foram solubilizados em goma arábica e administrados via oral. As espessuras (mm) das patas posteriores foram medidas antes e após os tratamentos, de hora em hora, durante o período de 6 horas após a administração do agente irritante carragenina. Decorrido o final do experimento, os animais sofreram eutanásia com CO₂.

5.6.3.2. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram expressos pela diferença entre as leituras das patas antes e após os tratamentos. Os resultados também foram submetidos à análise de variância (ANOVA) monofatorial. Quando os resultados foram significativos na análise estatística, foi realizado em seguida o teste de comparações múltiplas (análises *post hoc*), como o teste de Newman-Keuls. Os valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05 são considerados significativos. (CONFORTI, *et al.*, 2007)

5.6.4. Ensaio de inibição de TNF- α

Para a avaliação da viabilidade e detecção de TNF- α dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, foi utilizado camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino), com peso aproximado de 25 - 30g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/UNICAMP. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar UNESP, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luz (escuro/luz 12/12h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus Araraquara (nº 03/2013) (anexo IV).

5.6.4.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais foram previamente inoculados, por via intraperitoneal (IP), com 3mL de uma solução de tioglicolato de sódio a 3%. Decorridas 72 horas de estímulo, os animais foram eutanasiados, em câmara de CO₂. O peritônio foi então exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal. Em seguida, foram administrados 5,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril (pH 7,2; 4°C). Após uma leve massagem, para

desprendimento dos macrófagos, o exsudato foi coletado com uma seringa e dispensado em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular.

As células retiradas do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5,0mL de solução PBS e centrifugadas (400xg/5 minutos), em temperatura ambiente. As células sedimentadas foram então ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640-C completo, contendo 5% de FBS, 2-mercaptoetanol (2×10^{-5} M), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100UI/mL) e L-glutamina (2mM). O número de células foi determinado utilizando-se câmara hemocitométrica de Neubauer, e azul de tripan como corante. A concentração das células foi então diluídas para 5×10^6 células/mL, adicionando-se meio RPMI-1640 completo. Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa com tensão constante de CO₂ (atmosfera de 5%) para a aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram retiradas com lavagens utilizando o meio de cultura RPMI-1640.

5.6.4.2. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos (MOSMAN, 1983)

Utilizou-se como ensaio para determinação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em microplaca de 96 cavidades. As células obtidas no exsudato peritoneal dos camundongos, previamente lavadas e com concentração de 5×10^6 células/mL, foram incubadas na microplaca (100µL/cavidade), durante 60 minutos para a aderência celular. Em seguida, foram adicionados os compostos a serem testados e nova incubação por 24 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa é descartado e 100µL de solução de MTT (1g/mL) foi adicionado em cada um dos poços. A placa é então incubada por 3 horas a 37°C. Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente descartado e 100µL de álcool isopropílico ou duodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados a cada orifício. Utiliza-se como controle positivo células e controle negativo meio de cultura. A leitura da absorbância foi realizada utilizando-se espectrofotômetro UV/Visível com comprimento de onda (λ) de 540 e 620nm. Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, onde o controle negativo correspondia a 100% de viabilidade.

5.6.4.3. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

As células retiradas do exsudato peritoneal foram ajustadas para uma concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades. Em cada cavidade foi adicionado 1,0mL de suspensão celular, as placas

foram incubadas a 37°C por 60 minutos em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após esta incubação, as células não aderentes são retiradas por lavagens com meio de cultura RPMI-1640-C.

Para a produção de citocinas adicionou-se 0,15mL de RPMI-1640-C adicionado de LPS a 1µg/mL, e 0,15mL dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI ou talidomida (controle positivo) aos macrófagos aderidos à placa. Utiliza-se como controle positivo LPS 1,0µg/mL e meio de cultura RPMI-1640-C como controle negativo.

Incubaram-se estas placas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ por mais 24 horas. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para *eppendorfs* que foram centrifugados a 7800xg durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -80°C até a determinação da citocina TNF-α através do teste imunoenzimático (ELISA).

5.6.4.4. Determinação das citocinas TNF-α por método imunoenzimático

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

Utilizando-se microplacas de 96 cavidades, adicionou-se a estas os anticorpos de captura anti-TNF-α de camundongo na concentração de 4µg/mL (100µL/cavidade) diluído em tampão PBS. A placa foi então incubada *overnight* em temperatura ambiente.

As placas foram posteriormente lavadas três vezes com PBS (pH 9,5) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 10% de FBS (PBS-FBS) e estas foram mantidas a temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e 100µL da citocina padrão ou dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais de camundongos foram adicionados às placas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas cinco vezes com PBS-T.

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

Após este processo, as placas foram lavadas sete vezes com PBS-T e 100µL do substrato foram adicionados em cada cavidade. Após nova incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas e as concentrações das citocinas foram obtidas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de TNF-α padrão. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

5.6.4.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância a 5% (p<0,05), através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

5.6.5. Atividade antioxidante (método DPPH) (adaptado de TÖRÖK, *et al.*, 2013)

Inicialmente preparou-se uma solução-estoque do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) em metanol (0,04g/L), a solução de DPPH foi armazenada em ausência de luz. Utilizou-se como controle positivo ácido ascórbico, e como controle negativo, tomou-se 150 µL de DMSO e 1350 µL de metanol. As soluções a serem testadas, Lapdesf FUR-FD I-VI e ácido ascórbico, foram preparadas também em metanol nas concentrações de 25µM, 50µM, 100µM, 200µM e 400µM, utilizou-se DMSO (concentração máxima de 0,1%) como co-solvente para aumentar a solubilidade dos compostos.

Em seguida, adicionou-se na microplaca 50µL, em triplicata, dos compostos a serem testados, e 100µL da solução de DPPH. A microplaca foi mantida em abrigo da luz e mantida a 37°C durante 30 min.

Após incubação, a diminuição na absorção de DPPH foi medida por um leitor de microplacas (espectrofotômetro) UV/Vis em 519nm. A porcentagem de redução na absorbância do DPPH foi expressa pela fórmula:

$$= \frac{(\text{absorbância controle negativo} - \text{absorbância amostra}) \times 100}{\text{absorbância controle negativo}}$$

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Síntese

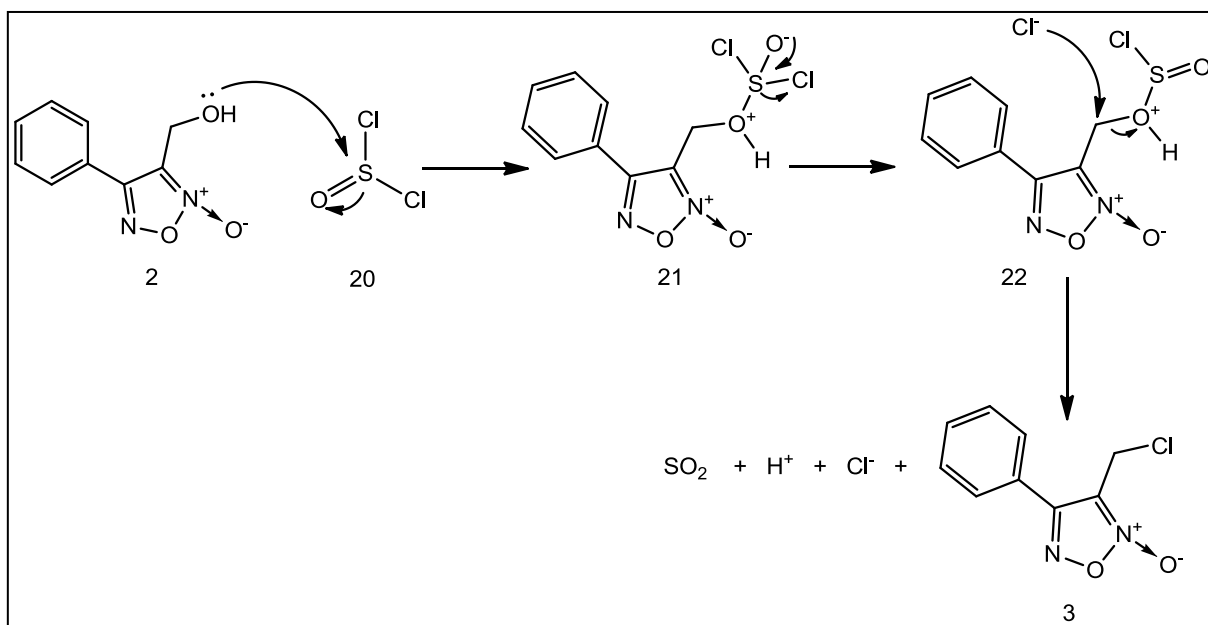
A interpretação dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) dos compostos finais obtidos Lapdesf FUR-FD I-VI foi realizada baseando-se nas referências SILVERSTEIN *et al.*, 2007 e PAVIA, *et al.*, 2009. A interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos derivados que apresentam o núcleo furoxânico foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural dessas moléculas (CERECETTO *et al.*, 1999; CENA, *et al.*, 2001; SANTOS, 2009). Os espectros dos compostos finais estão disponíveis na seção de anexos.

6.1.1. Síntese do composto Lapdesf FUR-FD I

A estratégia utilizada para a obtenção do produto Lapdesf FUR-FD I (esquema 3), foi inicialmente a síntese do derivado furoxânico (2), utilizando-se álcool *trans*-cinâmico e nitrito de sódio em meio contendo ácido acético glacial. Esta reação apresenta um alto rendimento mesmo após purificação em coluna cromatográfica, aproximadamente 83%. Embora não se conheça o exato mecanismo reacional, Santos (2009), propõe que a obtenção deste derivado ocorra por meio de reações radicalares.

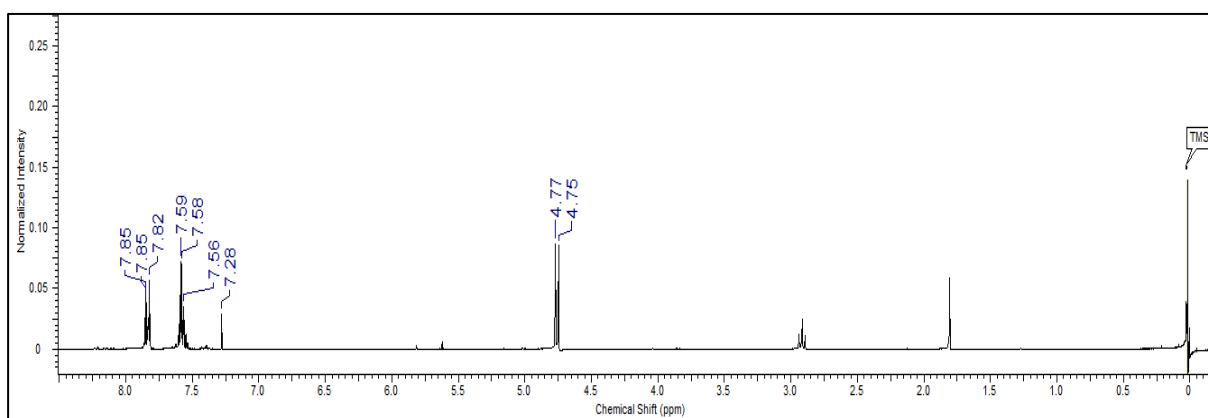
Após obtenção do derivado furoxânico (2), foi realizada a reação para alterar a hidroxila da função álcool para o grupo funcional haleto de alquila, mais precisamente o cloreto de alquila. A reação foi realizada utilizando-se cloreto de tionila como agente clorante. Após a purificação por coluna cromatográfica, obteve-se rendimento de 60%. A alteração do grupo funcional álcool para haleto de alquila ocorreu para introduzir um bom grupo abandonador à molécula, a fim de explorar posteriormente a reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) com a ftalimídica potássica.

No mecanismo da reação para obtenção do haleto de alquila (3), reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, a hidroxila da função álcool atua como um nucleófilo atacando o átomo de enxofre do cloreto de tionila, que possui deficiência eletrônica por sustentar átomos eletronegativos como cloro e oxigênio. Ocorre a formação de um intermediário reativo e posteriormente ocorre o ataque ao átomo do carbono metilênico pelo íon cloreto, atuando como nucleófilo. Na última etapa ocorre a eliminação do grupo abandonador, que se decompõe em dióxido de enxofre e ácido clorídrico.

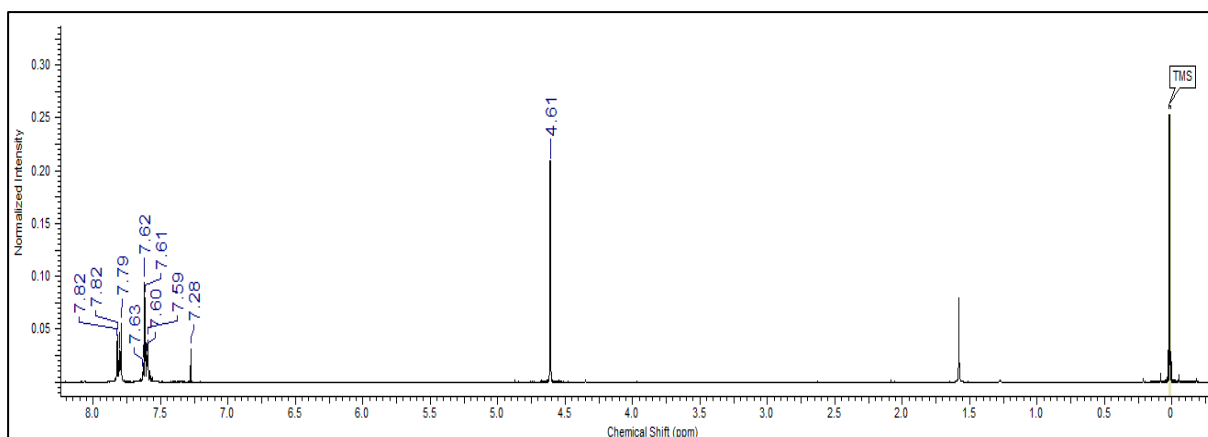


Esquema 8 - Mecanismo de reação para obtenção do derivado furoxânico (3).

Analisando-se o espectro de RMN ^1H dos compostos obtidos é possível observar diferenças significativas no deslocamento dos hidrogênios metilênicos. O composto hidroxilado (2) apresentou deslocamento de δ 4,77ppm (espectro 1), aparecendo como um dubleto, devido ao acoplamento com o hidrogênio da hidroxila. Ao se comparar com o espectro do composto clorado (3) observa-se que os hidrogênios metilênicos deslocam-se para δ 4,61ppm (espectro 2), como um singlete. O resultado obtido é esperado uma vez que o átomo de oxigênio é mais eletronegativo que o cloro.

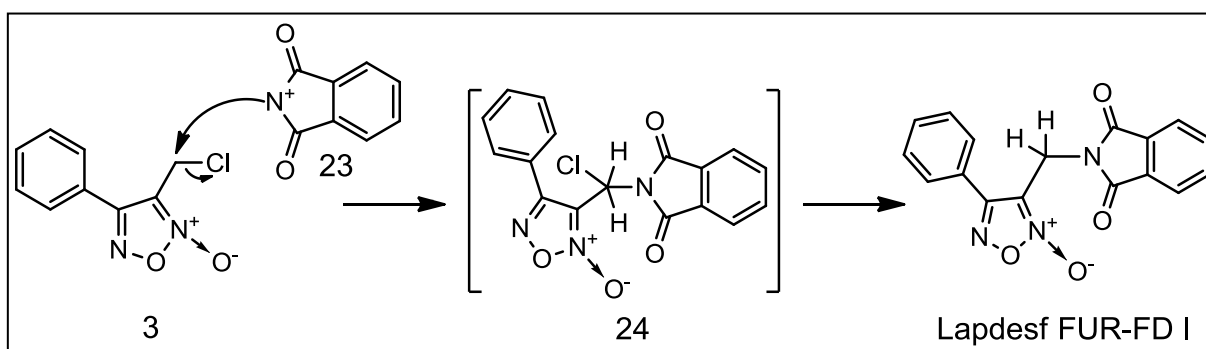


Espectro 1 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (2) (300MHz; CD_3Cl_3 – 7.28ppm).



Espectro 2 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (3) (300MHz; $\text{CD}_3\text{Cl}_3 - 7.28\text{ppm}$).

Na última etapa sintética antes da obtenção do produto final, a ftalimida potássica, atuando como nucleófilo, ataca o carbono metilênico do haleto, e por reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, há a formação do produto Lapdesf FUR-FD I, com rendimento de 91% na etapa final.



Esquema 9 - Mecanismo de reação para obtenção do composto Lapdesf FUR-FD I.

O composto Lapdesf FUR-FD I foi caracterizado utilizando espectrofotometria de infravermelho (IV) e RMN ^1H . Pelo IV (tab. 2) foi possível observar a presença de carbonilas de imidas, estiramentos simétricos e assimétricos, em $1776,44\text{cm}^{-1}$ e $1716,65\text{cm}^{-1}$. Outro estiramento possível de ser observado é referente a $\text{C}=\text{N}$ do furoxano, em $1602,85\text{cm}^{-1}$.

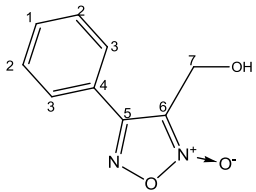
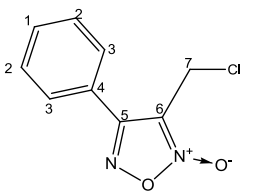
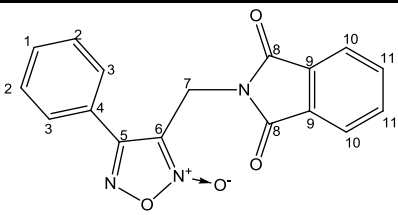
Tabela 2 - Bandas de absorção e IV relativos ao composto Lapdesf FUR-FD I (pastilha de KBr).

ν (cm^{-1})	Grupo Funcional
3064,98	C-H (aromático)
1776,44 e 1716,65	C=O (imida)
1602,85	C=N
1575,84 e 1460,11	C=C (aromático)
1354,93	C-N-C

Resultados e Discussões

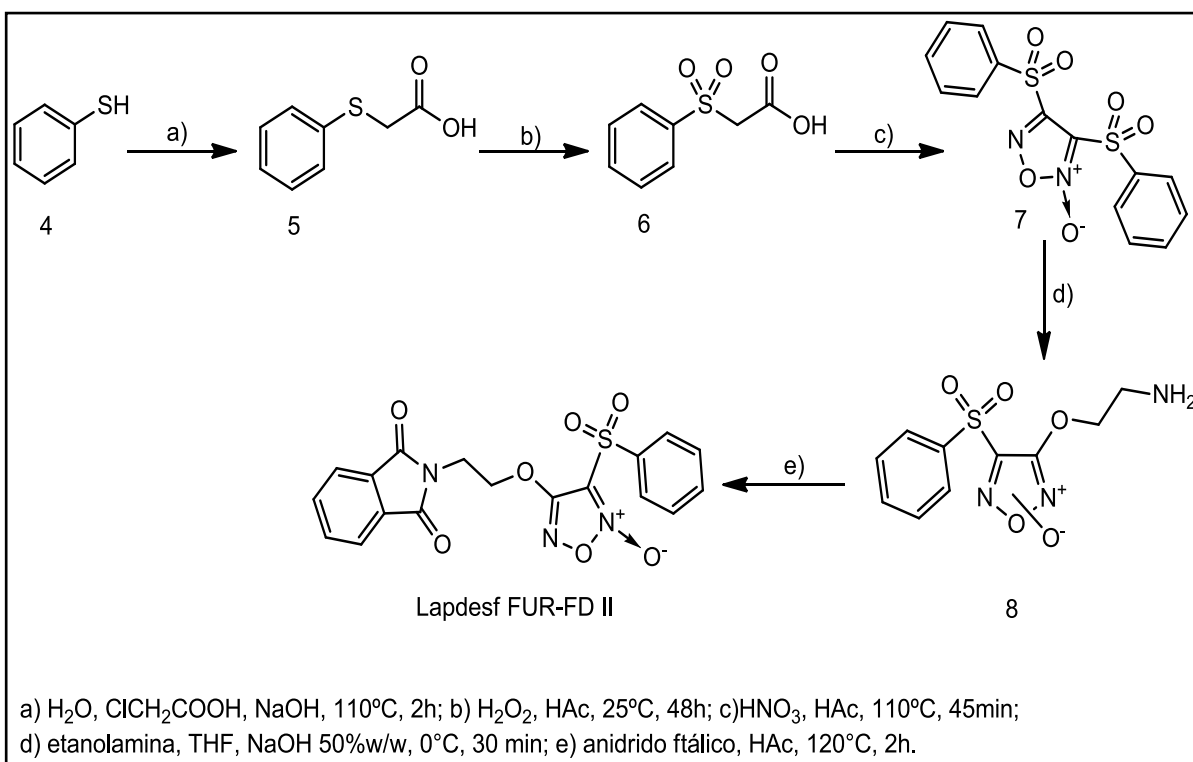
Usando o RMN ^1H (anexos I, espectro 2) foi possível identificar a presença dos hidrogênios aromáticos da ftalimida em δ 7,84ppm, os hidrogênios fenílicos em δ 7,81-7,78ppm e δ 7,57-7,54ppm e os hidrogênios da porção alquílica em δ 4,95ppm.

Tabela 3 – Comparação entre os deslocamentos químicos no RMN ^1H .

  			
	Composto (2)	Composto (3)	Lapdesf FUR-FD I
Posição	RMN ^1H (δ) ppm	RMN ^1H (δ) ppm	RMN ^1H (δ) ppm
1	7,85-7,82 (m)	7,82-7,79 (m)	7,57-7,54 (m)
2	7,85-7,82 (m)	7,82-7,79 (m)	7,57-7,54 (m)
3	7,60-7,55 (m)	7,63-7,53 (m)	7,81-7,78 (dd)
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	4,47 (d)	4,61 (s)	4,95 (s)
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	7,84 (m)
11	-	-	7,84 (m)

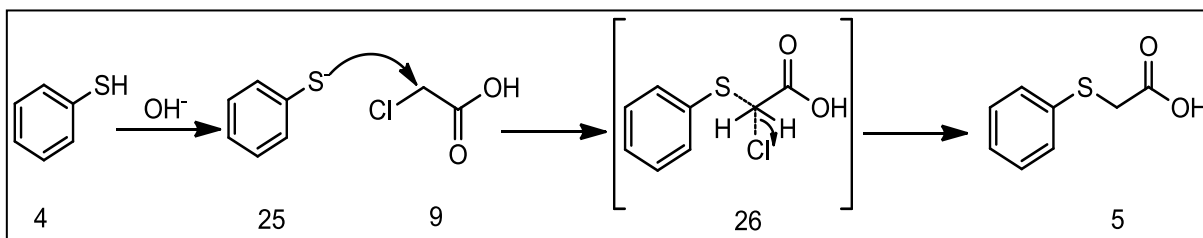
6.1.2. Síntese do composto Lapdesf FUR-FD II

O composto Lapdesf FUR-FD II foi obtido conforme esquema (10).



Esquema 10 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD II.

A reação para obtenção do composto (5) parte da adição do tiofenol (4) em meio básico e a perda do hidrogênio pelo tiofenol leva a formação do ânion tiofenóxido (25), um bom nucleófilo. O ânion formado ataca o carbono (sp^3) do ácido monocloroacético, diretamente ligado ao átomo de cloro, em uma reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$. Na etapa seguinte da mecanística há a formação de um estado intermediário (26), que depois da saída do íon cloreto leva à formação do produto desejado (5). A reação apresentou rendimento de 87%.

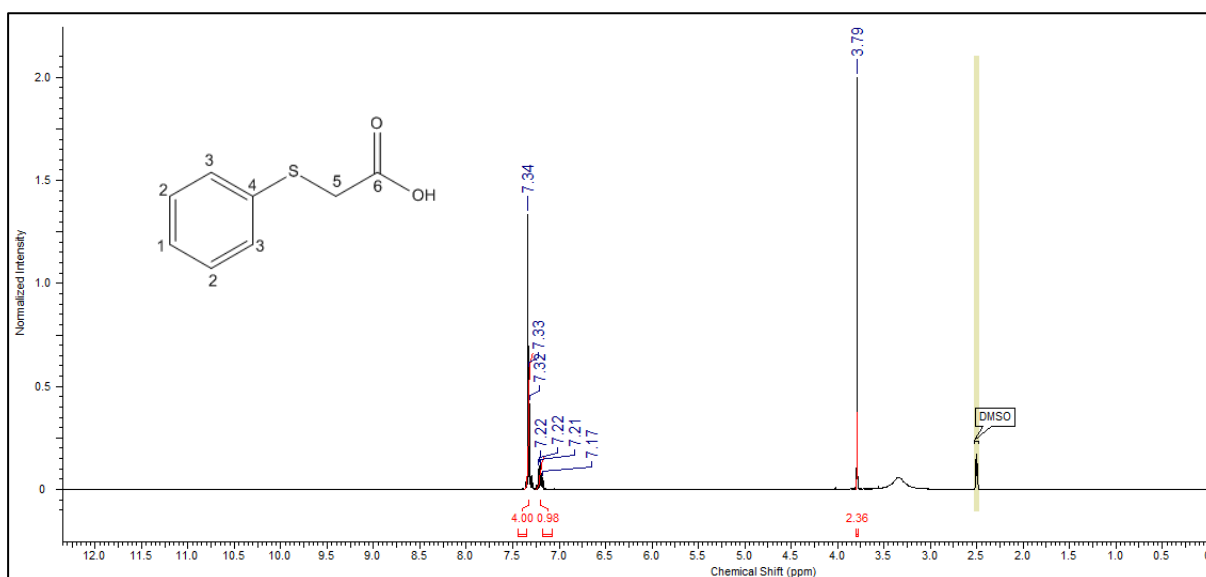


Esquema 11 - Mecanismo de reação para obtenção do derivado 5.

A identificação do intermediário (5) foi realizada por RMN ^1H . Segundo Santos (2009), o deslocamento químico dos átomos de hidrogênio do carbono metilênico do ácido monocloroacético aparece em δ 4,32ppm. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados ao carbono metilênico no composto (5) aparecem em δ 3,79ppm. O fato do

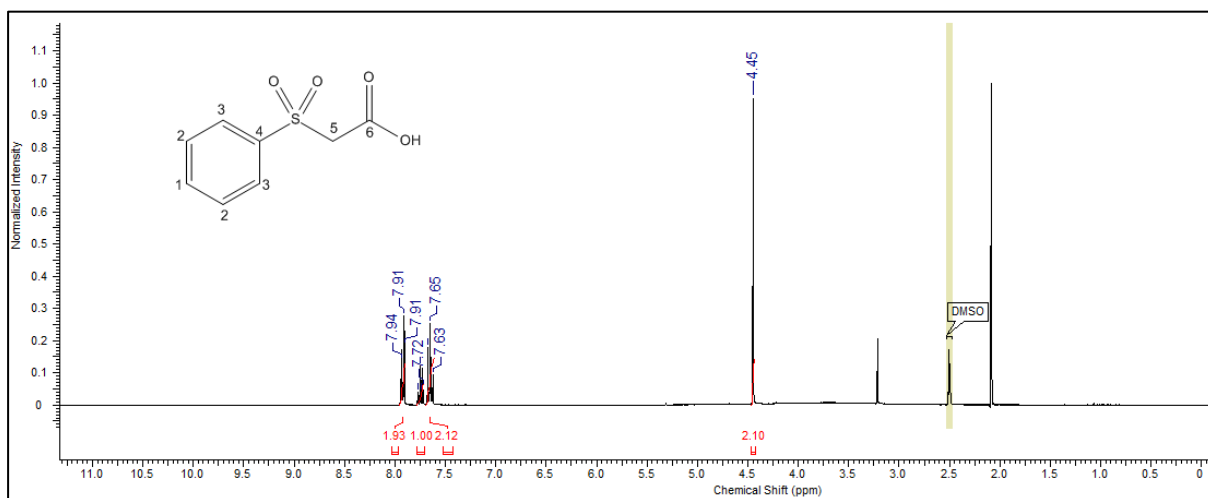
Resultados e Discussões

deslocamento químico do ácido monocloroacético estar mais desprotegido que os hidrogênios metilênicos do composto (5) ocorre devido a maior eletronegatividade do cloro.



Espectro 3 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (5) (300MHz; DMSO-d_6).

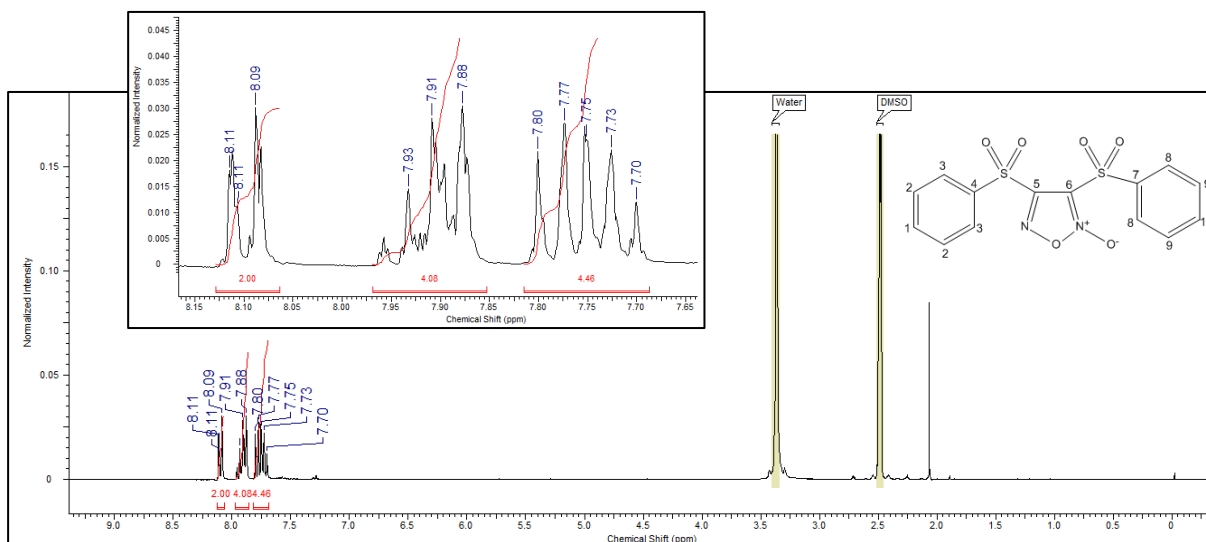
O intermediário (5), ácido feniltioacético, foi então oxidado para a formação de uma sulfona (6), e para tanto, foi utilizado peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2), em excesso. A reação apresentou rendimento de 94%. A identificação por RMN ^1H mostra que os deslocamentos químicos dos hidrogênios do carbono metilênico estão em δ 4,45ppm. Comparando-se com o ácido feniltioacético (5), o deslocamento dos mesmos hidrogênios estão em δ 3,79ppm. A diferença ocorre devido aos oxigênios da sulfona que desprotegem os hidrogênios metilênicos do composto (6).



Espectro 4 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (6) (300MHz; DMSO-d_6).

Após a obtenção da sulfona (6), seguiu-se a metodologia de reação proposta por Farrer (1964), utilizando-se ácido acético glacial e ácido nítrico 98%, para se obter o intermediário (7), a reação apresentou rendimento de 37,2% e faixa de fusão de 140°C-142°C. Não existem relatos na literatura do mecanismo reacional para esta reação, mas acredita-se que o mesmo deve explorar a reatividade do carbono metilênico que deve sofrer uma reação de descarboxilação e com mecanismo semelhante às reações pericíclicas. (SANTOS, 2009)

No espectro de RMN ^1H , foi possível identificar a presença dos deslocamentos químicos somente na região comum aos hidrogênios aromáticos e heteroaromáticos (9,0 a 6,0ppm), indicando a ausência de hidrogênios alifáticos neste espectro, como era possível identificar no intermediário (6) em δ 4,45ppm. No espectro 5, os deslocamentos químicos são δ 8,11-8,09ppm (H_3 e H_8), δ 7,96-7,88ppm (H_1 e H_{10}) e δ 7,80-7,60ppm (H_2 e H_9).

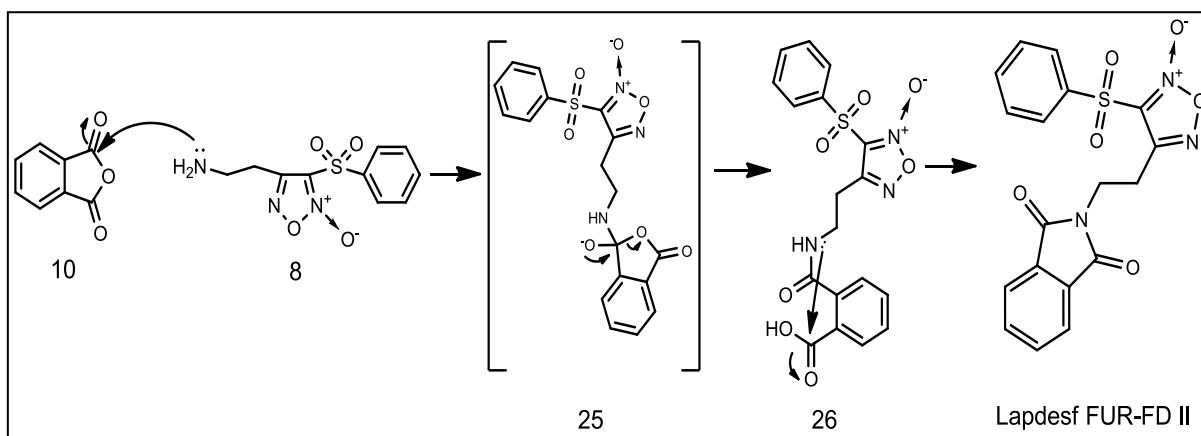


Espectro 5 - Espectro de ^1H RMN do intermediário (7) (300MHz; DMSO-d_6).

A síntese para obtenção do composto (8) foi realizada utilizando etanolamina, em meio básico, juntamente com o intermediário (7), como descrito por Fruttero e colaboradores (1997). Em meio contendo bases fortes como o hidróxido de sódio, a etanolamina perde seu próton do grupamento álcool, formando um etóxido, em nucleófilo mais forte que a amina, justificando o ataque pelo átomo de oxigênio e não de nitrogênio, menos nucleofílico que o etóxido. O etóxido então reage com o carbono heteroaromático, e posteriormente elimina a sulfona. A reação de formação do composto (8), uma reação de substituição nucleofílica aromática, apresentou rendimento baixo de 28%.

Na última etapa de síntese para obtenção do composto Lapdesf FUR-FD II, o derivado furoxânico funcionalizado (8) reagiu com o anidrido ftálico (10) em meio de ácido acético glacial. Ao fim da reação obteve-se o produto final com rendimento de 24%.

O mecanismo para esta reação envolve duas etapas, na primeira ocorre o ataque do par de elétrons não ligantes do nitrogênio do intermediário (8), ao carbono carbonílico da ftalimida (10), essa etapa leva à formação de um intermediário tetraédrico, que irá romper sua ligação σ C-O. A segunda etapa de síntese envolve a restauração do anel de cinco membros, que, através da ligação entre o nitrogênio da ligação amídica, realiza um segundo ataque nucleofílico à carbonila do ácido carboxílico, com a eliminação de uma molécula de água e subsequente restauração da ligação π .



Esquema 12 - Mecanismo de reação para obtenção do composto Lapdesf FUR-FD II.

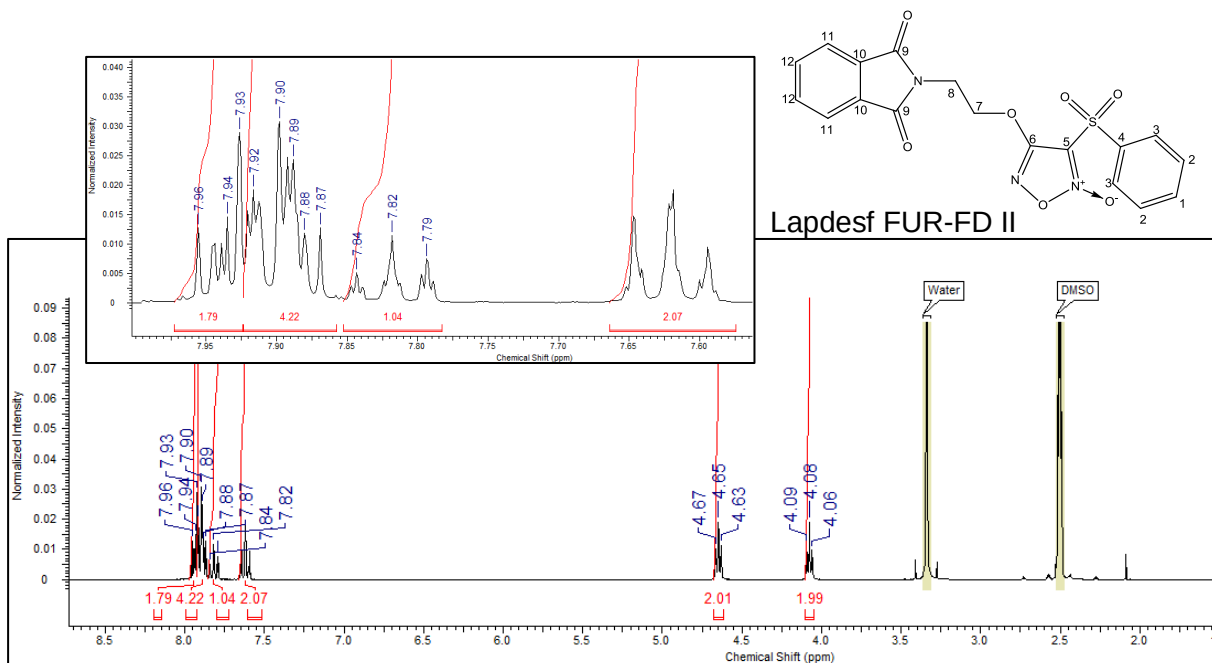
A espectrofotometria na região do infravermelho realizado para identificação do composto Lapdesf FUR-FD II destacou os estiramentos demonstrados na tabela 4:

Tabela 4 - Bandas de absorção e IV relativos ao composto Lapdesf FUR-FD II (pastilha de KBr).

ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
1780,30	C=O imida (simétrico)
1718,58	C=O imida (assimétrico)
1620,21 e 1550,77	C=N furoxano
1460,11	C=C aromático
1363,67 e 1168,86	O=S=O

A caracterização do composto Lapdesf FUR-FD II também foi realizada utilizando RMN ¹H (300MHz; DMSO_{d6}). É possível observar (anexos I, espectro 5) os deslocamentos químicos dos hidrogênios da cadeia alquílica em δ 4,65ppm (H₇; t) e δ 4,08ppm (H₈; t), e

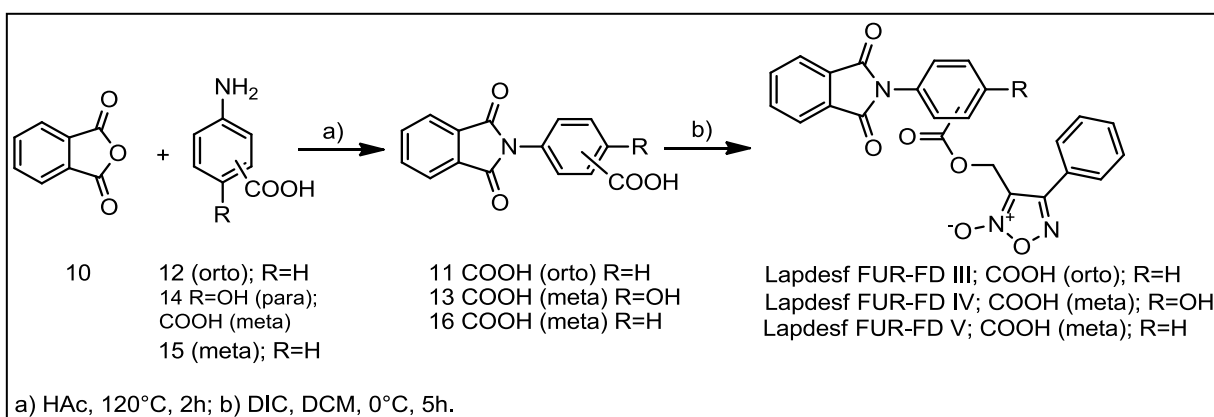
determinar os deslocamentos químicos para os hidrogênios aromáticos do sistema ftalimídico em δ 7,92-7,87ppm (H_{11} , H_{12} ; m). Os deslocamentos químicos da fenila ligada a sulfona estão em δ 7,96-7,93ppm (H_3 ; m) acoplando para 2 hidrogênios, δ 7,65-7,59ppm (H_2 ; m) acoplando para 2 hidrogênios e δ 7,84-7,79ppm (H_1 ; tt) acoplando para 1 hidrogênio.



Espectro 6 - Espectro de ^1H RMN do composto Lapdesf FUR-FD II (300 MHz; DMSO-d_6)

6.1.3. Síntese do composto Lapdesf FUR-FD III, IV e V

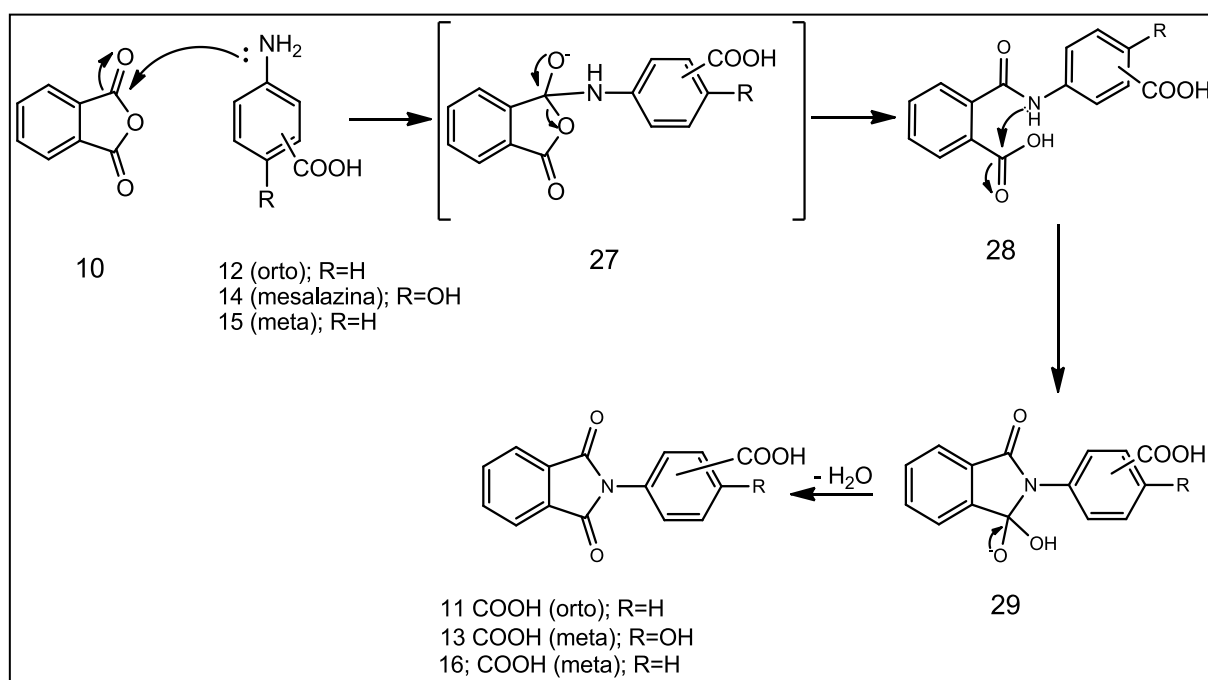
Os compostos Lapdesf FUR-FD III, IV e V apresentam similaridades em suas estruturas e mecanismo de síntese, portanto serão abordados em um único tópico. O esquema 13, demonstra a rota sintética utilizada para a obtenção dos diferentes produtos finais.



Esquema 13 - Síntese dos compostos Lapdesf FUR-FD III-V.

A primeira etapa de síntese para obtenção dos compostos Lapdesf FUR-FD III-V consiste na formação dos derivados ftalimídicos em meio contendo ácido acético glacial. Os compostos apresentaram rendimento de 58% (11), 87% (13) e 79% (16).

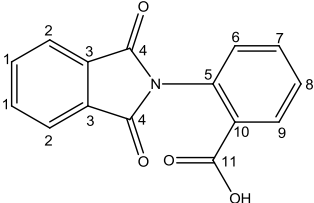
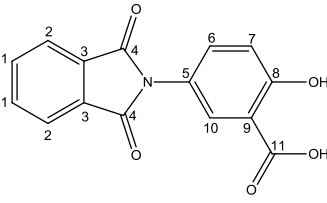
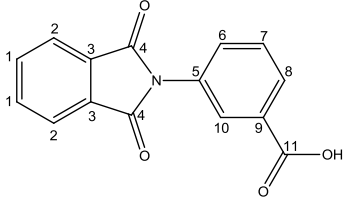
O mecanismo da reação utilizada para sintetizar os compostos 11, 13 e 16 envolve duas etapas. Na primeira ocorre o ataque do par de elétrons não ligantes do nitrogênio amidico dos compostos 12, 14 e 15 ao carbono carbonílico da ftalimida (10), levando à formação de um intermediário tetraédrico, que irá então romper sua ligação π C-O. A segunda etapa de síntese envolve a restauração do anel de cinco membros, que através da ligação entre o nitrogênio da ligação amídica realiza um segundo ataque nucleofílico a carbonila do ácido carboxílico, com a eliminação de uma molécula de água e subsequente restauração da ligação π .



Esquema 14 - Mecanismo de reação para obtenção dos derivados ftalimídicos.

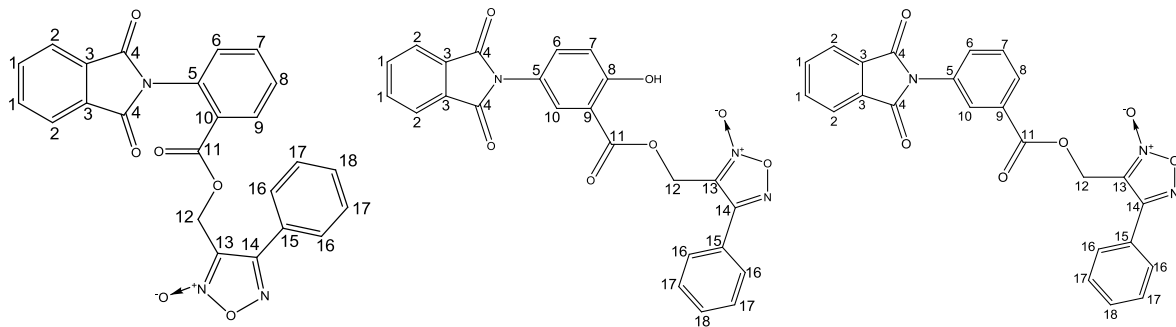
Os deslocamentos químicos dos hidrogênios para os compostos 11, 13 e 16 estão apresentados na tabela 5.

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

 (11)  (13)  (16)			
	Composto (11)	Composto (13)	Composto (16)
Posição	RMN ^1H (DMSO_{d6})	RMN ^1H (DMSO_{d6})	RMN ^1H (DMSO_{d6})
1	7,93 (m)	7,91-7,88 (m)	8,0 (m)
2	7,99 (m)	7,91-7,88 (m)	7,93 (m)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	7,55 (dd)	7,60-7,56 (dd)	7,73 (dd)
7	7,64 (ddd)	7,12-7,04 (d)	7,66 (t)
8	7,78 (ddd)	-	8,01 (dd)
9	8,07 (dd)	-	-
10	-	7,97 (m)	8,07 (t)
11	-	-	-

Uma vez identificados os derivados ftalimídicos funcionalizados, foram realizadas reações de acoplamento com o derivado furoxânico (2). Para isso, os compostos foram reagidos em diclorometano destilado com o intermediário (2). Utilizou-se *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) como agente acoplante para ativar o ácido carboxílico em reações de substituição nucleofílica. Os produtos finais Lapdesf FUR-FD III, IV e V foram obtidos com rendimentos de 49%, 36% e 39% respectivamente. Os espectros de RMN ^1H (anexos I, espectros 9, 13 e 17), a comparação entre os deslocamentos químicos podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 - Comparação entre os deslocamentos químicos no RMN ^1H dos compostos Lapdesf FUR-FD III-V.

			
	Lapdesf FUR-FD III	Lapdesf FUR-FD IV	Lapdesf FUR-FD V
Posição	RMN ^1H (DMSO $_{d6}$)	RMN ^1H (DMSO $_{d6}$)	RMN ^1H (DMSO $_{d6}$)
1	7,91-7,81 (m)	7,95-7,88 (m)	7,93-7,86 (m)
2	7,91-7,81 (m)	7,95-7,88 (m)	7,93-7,86 (m)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	7,67-7,53 (m)	7,57-7,50 (m)	7,75 (m)
7	7,67-7,53 (m)	7,09 (d)	7,67-7,62 (t)
8	7,67-7,53 (m)	-	7,99-7,96 (m)
9	7,97 (dd)	-	-
10	-	7,57-7,50 (m)	7,99-7,96 (m)
11	-	-	-
12	5,23 (s)	5,42 (s)	5,46 (s)
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	7,67-7,53 (m)	7,83-7,78 (m)	7,83-7,80 (m)
17	7,67-7,53 (m)	7,58-7,50 (m)	7,58-7,55 (m)
18	7,91-7,81 (m)	7,58-7,50 (m)	7,58-7,55 (m)

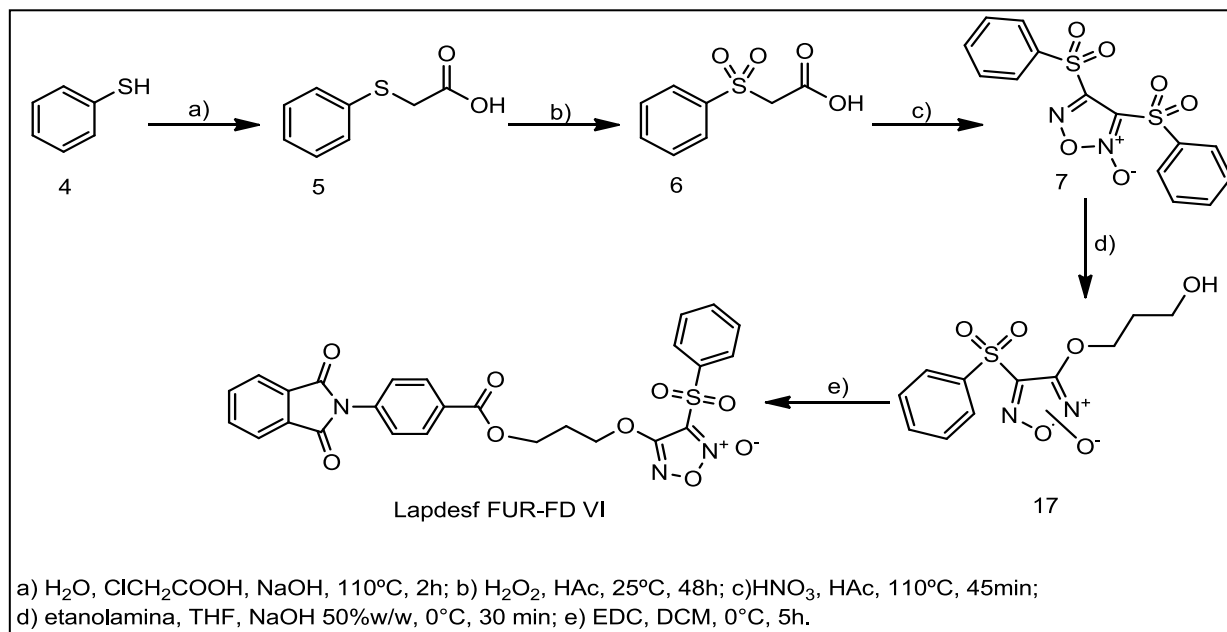
Resultados e Discussões

Os espectros de infravermelho (pastilha de KBr) dos compostos Lapdesf FUR-FD III-V estão em comparação na tabela 7.

Tabela 7 - Bandas de absorção em IV relativos ao composto Lapdesf FUR-FD III, IV e V (KBr).

	Lapdesf FUR-FD III	Lapdesf FUR-FD IV	Lapdesf FUR-FD V
Grupo funcional	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
C-H aromático	-	-	3074,53
C-H alquílico	-	-	2937,59
C=O imida (simétrico)	1786,08	1772,58	1774,51
C=O imida (assimétrico)	1718,58	1693,50	1707,00
C=O éster	1745,58	1718,58	1718,58
C=N furoxano	1600,92	1610,56	1598,99
C=C aromático	1577,7	1577,77 e 1490,97	1577,77
C-N-C	1381,06	1386,82	1377,17
C-O éster	-	1188,15 e 18087,85	-

6.1.4. Síntese do composto Lapdesf FUR-FD VI



Esquema 15 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD VI.

A síntese para obtenção do composto (17) foi realizada utilizando o 1,3-propanodiol, em meio básico, juntamente com o intermediário (7), metodologia descrita por Cena e colaboradores (2001). Em meio contendo bases fortes como o hidróxido de sódio, o 1,3-propanodiol perde seu próton do grupamento álcool, formando um etóxido (nucleófilo forte). O etóxido então reage com o carbono heteroaromático, e posteriormente elimina a sulfona. A reação para obtenção do composto (17) é uma reação de substituição nucleofílica aromática, apresentou rendimento de para esta etapa de 72,9%. A caracterização foi realizada por RMN ^1H (300MHz) e ^{13}C (75MHz), (anexo I, espectro 22 e 26).

Após obtenção do derivado ftalimídico (18), foi realizada reação de acoplamento com o intermediário (17). Utilizou-se *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) como agente acoplante, ativando o ácido carboxílico em reações de substituição nucleofílica. O produto final Lapdesf FUR-FD VI foi obtido com rendimento de 41% na etapa final. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , encontram-se na seção anexos I (espectros 29 e 33) e a comparação entre os deslocamentos químicos podem ser observados na tabela 8.

Resultados e Discussões**Tabela 8** - Comparação entre os deslocamentos químicos no RMN ^1H dos compostos 17 e Lapdesf FUR-FD VI.

Composto 17			Lapdesf FUR-FD IV	
Posição	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
1	7,80-7,75 (m)	129,93	7,87-7,85 (tt)	128,41
2	7,66-7,61 (m)	128,76	7,65-7,62 (dd)	127,24
3	8,08-8,05 (m)	135,90	8,15-8,12 (dd)	129,94
4	-	138,19	-	137,23
5	-	110,68	-	110,64
6	-	159,13	-	158,94
7	4,61 (t)	59,51	4,58 (t)	61,33
8	2,14 (q)	31,54	2,27 (q)	30,78
9	3,89 (t)	69,50	4,42 (t)	68,42
10	-	-	-	165,27
11	-	-	-	136,26
12	-	-	8,03-8,00 (m)	129,94
13	-	-	7,74-7,70 (m)	127,24
14	-	-	-	131,56
15	-	-	-	166,75
16	-	-	-	130,12
17	-	-	7,99-7,89 (m)	135,00
18	-	-	7,99-7,89 (m)	123,69

O espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto Lapdesf FUR-FD VI (espectro 30 – anexos I), mostra os estiramentos C-H alquílico: $2927,94\text{cm}^{-1}$ e $2850,79\text{cm}^{-1}$; C=O amida: $1716,58\text{cm}^{-1}$; C=O éster: $1650,23\text{cm}^{-1}$; C-O-C éter: $1085,92\text{cm}^{-1}$; S=O axial assimétrica: $1384,89\text{cm}^{-1}$; C=C aromático: $1577,77\text{cm}^{-1}$.

6.2. Modelo agudo de inflamação

A inflamação produzida pela ação da carragenina no modelo agudo de inflamação, descrito por Winter e colaboradores (1962), envolve a ativação da cascata do ácido araquidônico, desencadeando o processo inflamatório com a formação dos principais mediadores da inflamação (prostaglandinas e tromboxanos). Este modelo é comumente usado para o “*screening*” de fármacos anti-inflamatórios. (CONFORTI, *et al.*, 2007).

Os sinais clássicos da inflamação, edema, hiperalgesia e eritema, desenvolvem-se logo após inoculação da carragenina, como resultado da ação de bradicinina, histamina, ROS e RNS. Estas substâncias podem ser geradas *in situ* no local da inoculação, ou por células como os neutrófilos que migram para o local da inflamação e podem gerar substâncias pró-inflamatórias. (MORRIS, 2003)

A análise estatística ANOVA monofatorial apresentou resultados significativos para todos os períodos de leitura decorrentes do modelo de inflamação aguda (edema de pata). Após resultado positivo na análise estatística foi realizada a análise *post hoc* de Newman-Keuls.

Os resultados obtidos mostram que os grupos utilizados como controles positivos, talidomida e indometacina, apresentaram atividade quando comparados ao grupo controle negativo, salina. Porém apesar de sua atividade já confirmada na literatura, como anti-inflamatório (STIRLING, 1998) a talidomida, não apresentou resultados estatisticamente significativos, no modelo proposto, exceção feita somente no período referente de 120 a 240 minutos, onde os resultados obtidos são estatisticamente significativos pela análise de Newman–Keuls ($p < 0,05$). Já o grupo controle positivo, indometacina, também descrito na literatura por possuir atividade anti-inflamatória (VANE, J.R.; 1971) foi estatisticamente significativo pela análise de Newman–Keuls nos períodos de 120 a 360 minutos ($p < 0,05$). As indicações referentes às significâncias entre os controles positivo e negativo não estão demonstradas nos gráficos abaixo, uma vez que intenção é demonstrar a atividade apresentada entre os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, e os controles utilizados.

Os resultados obtidos para o composto Lapdesf FUR-FD I estão expressos na figura 13. O composto apresentou atividade significativa a partir do tempo de 120 minutos decorrendo até o final do experimento quando comparado com o grupo controle negativo. Contudo, os resultados obtidos não se mostraram significativos quando comparados ao grupo controle positivo Tal. em nenhum dos tempos de leitura determinados no procedimento experimental. Em comparação feita ao grupo controle positivo Ind., somente houve valor significativo no período de 120 minutos, significância essa favorável ao grupo indometacina, uma vez que seus valores de espessura estiveram menores que os referentes ao composto Lapdesf FUR-FD I durante todo o experimento.

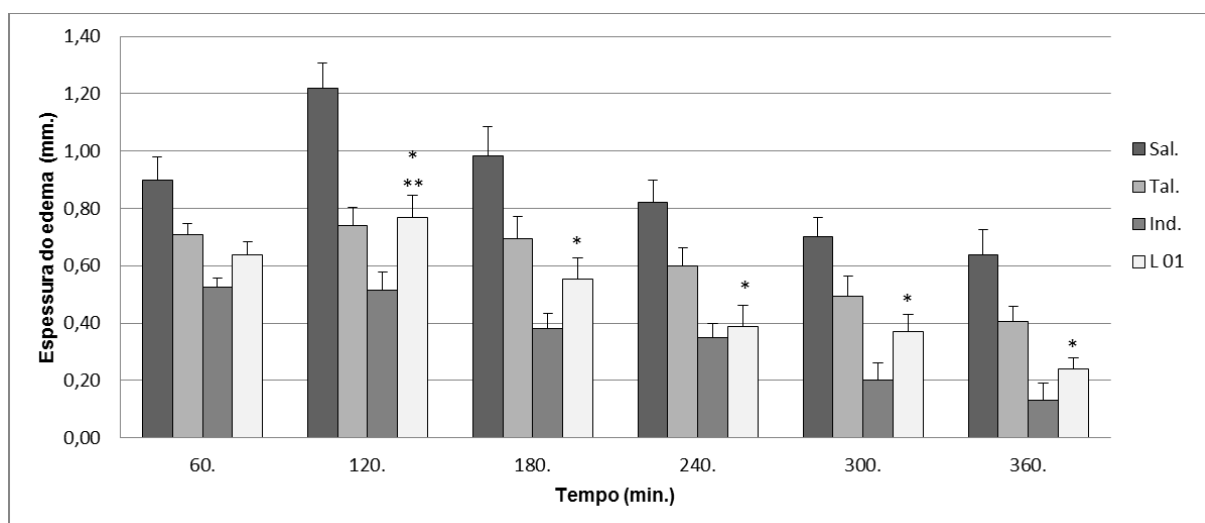


Figura 13 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD I (L01). * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Sal.); ** $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Ind.)

A figura 14 indica os resultados obtidos com o composto Lapdesf FUR-FD II. O composto mostrou atividade significativa quando comparado ao grupo controle Sal., exceção feita ao período referente a 60 e 180 minutos. Quando comparado aos controles positivos o composto Lapdesf FUR-FD II somente obteve resultados estatisticamente significativos quando comparado ao grupo Tal. no tempo de 120 minutos. O resultado obtido em comparação ao grupo controle positivo Ind. foi significativo para o tempo de 180 minutos, porém pode-se observar que a indometacina foi capaz de inibir o aparecimento de edema, portanto o resultado significativo se mostra favorável ao grupo Ind..

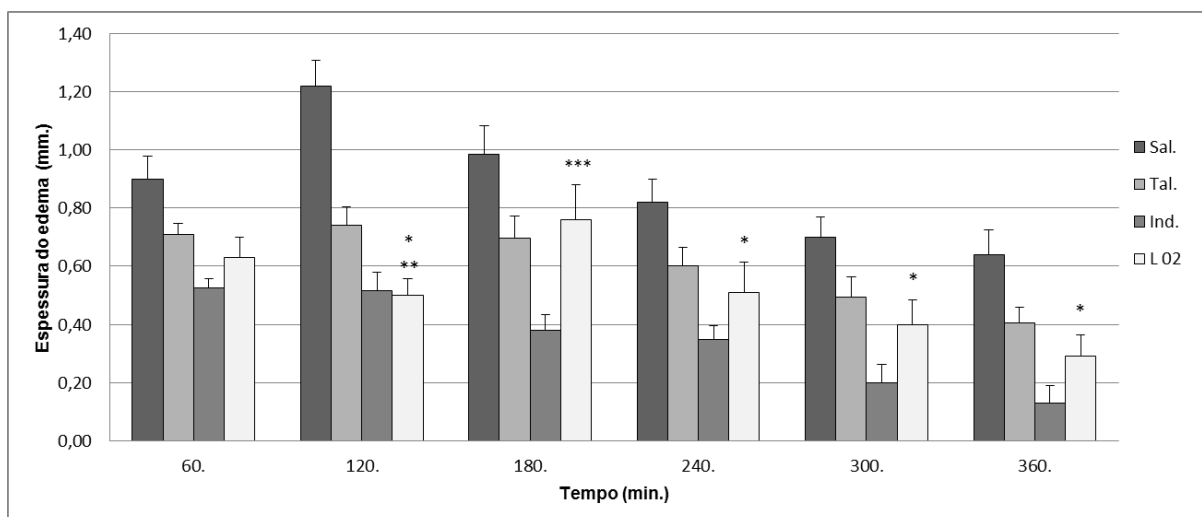


Figura 14 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD II (L02). * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Sal.); ** $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Tal.); *** $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Ind.).

Os resultados obtidos neste modelo de experimentação animal para o composto Lapdesf FUR-FD III estão representados na figura 15. O composto apresentou atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle Sal. durante os períodos de leitura que compreenderam o tempo de 120 a 360 minutos. Os resultados de comparação estatística feitos entre Lapdesf FUR-FD III e o grupo controle positivo somente foi significativo no período de 120 minutos em relação ao grupo Tal., em todos os demais momentos em que foi realizada a leitura das patas os resultados de comparação não demonstraram ser significativos em relação a Tal. tão pouco em relação a Indometacina (Ind.), o que demonstra que o composto Lapdesf FUR-FD III apresentou para este modelo atividade anti-inflamatória próxima à dos controles positivos utilizados.

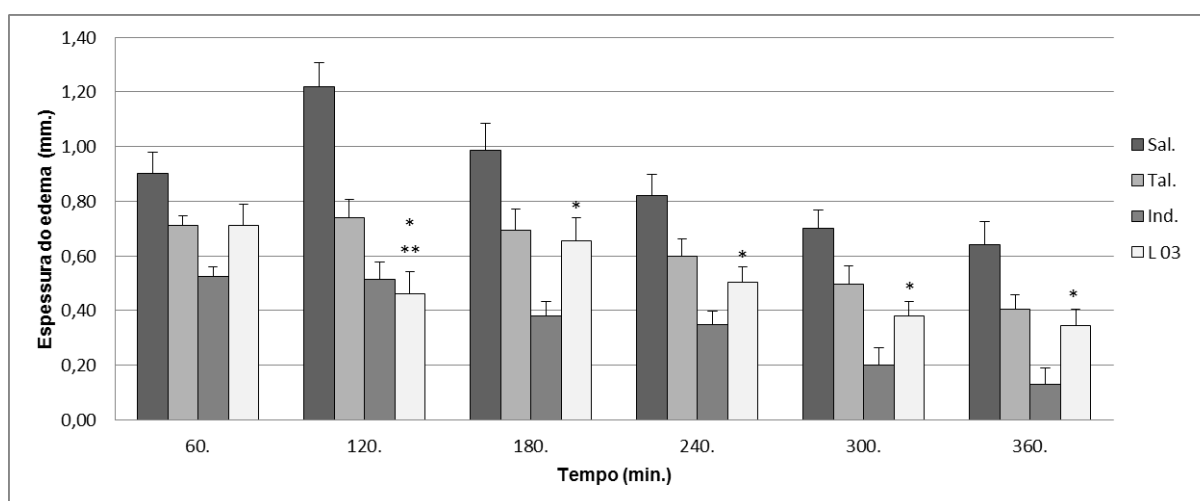


Figura 15 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD III (L03). * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Sal.); ** $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Tal.).

Os resultados obtidos neste modelo de experimentação animal para o composto Lapdesf FUR-FD IV estão representados na figura 16. O composto apresentou atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle Sal. durante os períodos de leitura que compreenderam o tempo de 120 a 360 minutos. Os resultados de comparação estatística feitos entre Lapdesf FUR-FD IV e o grupo controle positivo somente foram significativos no período de 120 e 300 minutos em relação ao grupo Tal.. Em todos os demais momentos em que foi realizada a leitura das patas os resultados de comparação não demonstraram resultados significativos, em relação à Tal. nem em relação à Ind., o que demonstra que o composto Lapdesf FUR-FD IV, apresentou para este modelo atividade anti-inflamatória próxima aos controles positivos utilizados.

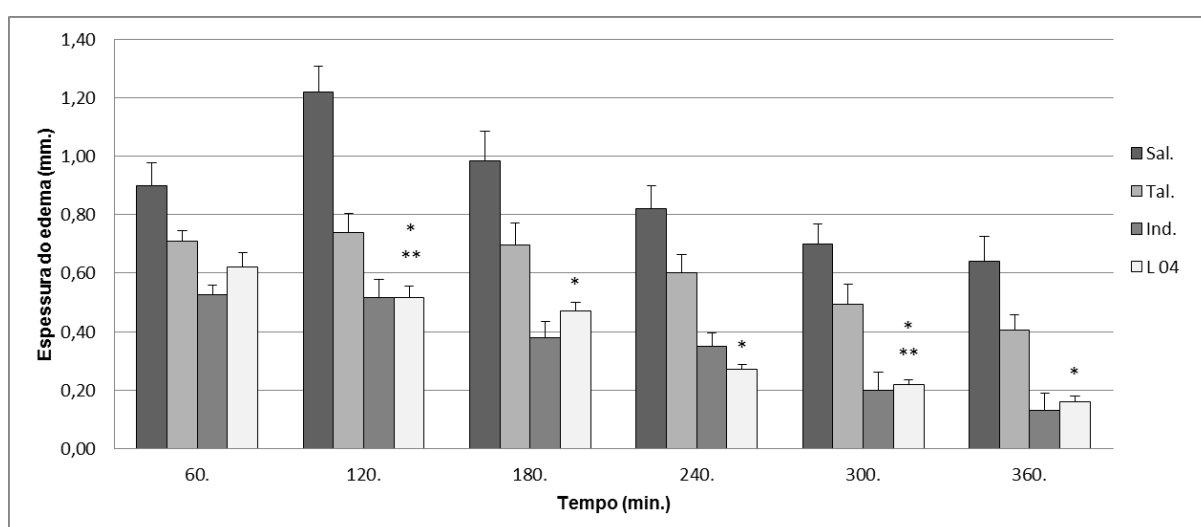


Figura 16 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD IV (L04). * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Sal.); ** $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Tal.).

Os resultados obtidos neste modelo de experimentação animal para o composto Lapdesf FUR-FD V estão representados na figura 17. O composto apresentou atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle Sal., durante os períodos de leitura que compreenderam o tempo de 120 a 360 minutos. Os resultados de comparação estatística feitos entre Lapdesf FUR-FD V e os grupos controles positivos foram significativos no período de 120 a 360 minutos em relação ao grupo Tal., indicando que o composto Lapdesf FUR-FD V possui atividade anti-inflamatória para o modelo agudo superior ao grupo Tal. Quando comparado ao grupo controle positivo Ind., os resultados não foram significativos o que demonstra que o composto Lapdesf FUR-FD V apresentou para este modelo atividade anti-inflamatória próxima ao controle positivo Ind..

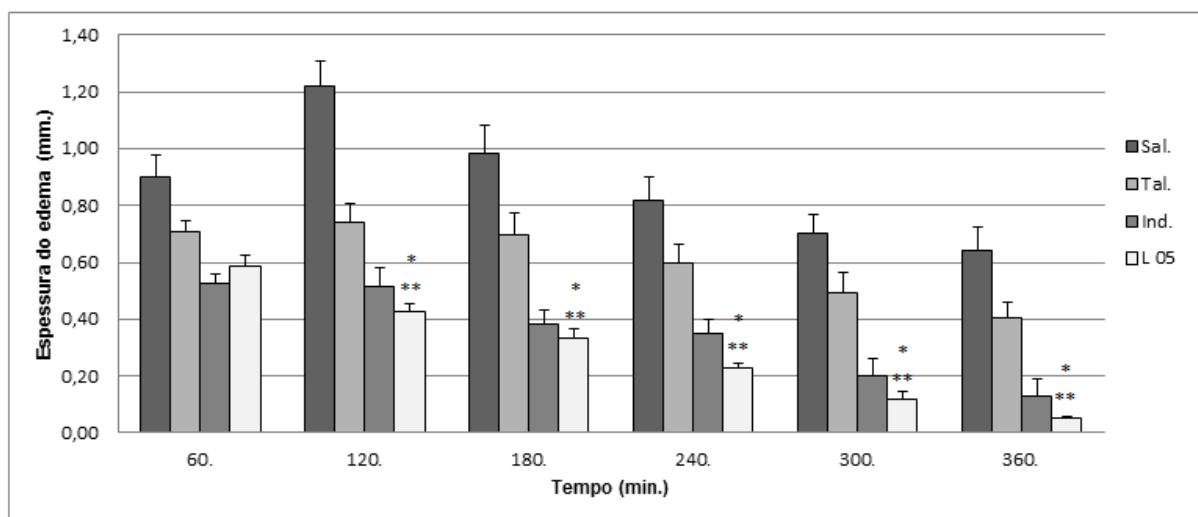


Figura 17 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD V (L05). * $p<0,05$ (em comparação ao grupo Sal.); ** $p<0,05$ (em comparação ao grupo Tal.)

Os resultados obtidos neste modelo de experimentação animal para o composto Lapdesf FUR-FD VI estão representados na figura 18. O composto apresentou atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle Sal., durante os períodos de leitura que compreenderam o tempo de 120 a 360 minutos. Os resultados de comparação estatística feitos entre Lapdesf FUR-FD VI e os grupos utilizados como controle positivo foi significativo somente no período de 60 minutos em relação ao grupo Tal. e ao grupo Ind., não apresentando atividade estatisticamente significativa comparado a esses grupos nos demais períodos.

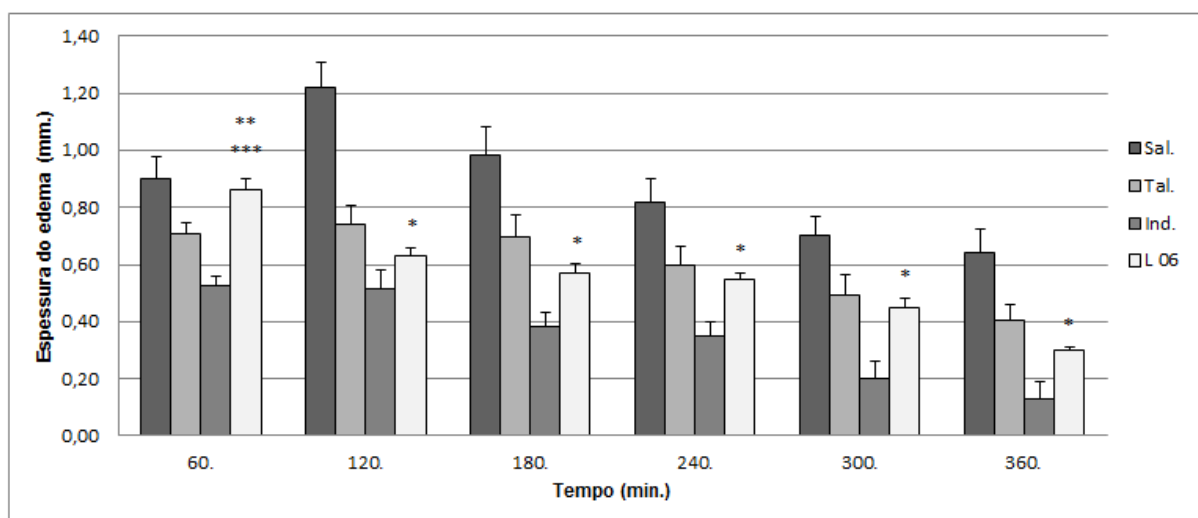


Figura 18 – Comparação entre os controles salina (Sal.), talidomida (Tal.), indometacina (Ind.) e Lapdesf FUR-FD VI (L06). * $p<0,05$ (em comparação ao grupo Sal.); ** $p<0,05$ (em comparação ao grupo Ind.); *** $p<0,05$ (em comparação ao grupo Tal.)

6.3. Teste de mutagenicidade *in vivo* (teste de Micronúcleo)

O método utilizado neste trabalho foi o ensaio de micronúcleo (MN) em sangue periférico de camundongos utilizando lâminas pré-coradas por um corante fluorescente laranja de acridina (acridine orange), o qual foi descrito por Hayashi et al., (1999).

Dentre os testes de avaliação de mutagenicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em sangue periférico de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

O teste de micronúcleo *in vivo* é utilizado para a detecção de lesões induzidas pela substância de ensaio nos cromossomos ou aparelho mitóticos de eritoblastos por análise de eritrócitos retirados do sangue periférico de animais. O objetivo do ensaio é identificar substâncias que causam dano citogenético o que resulta na formação de micronúcleos com fragmentos de DNA ou cromossomos inteiros. (HEDDLE et al., 1983; MACGREGOR et al., 1990)

Quando um eritroblasto da medula óssea se desenvolve para dar um eritrócito policromático, o núcleo principal é expulso, então qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode ficar no citoplasma de células anucleadas. Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronúcleos nos animais tratados é uma indicação de danos cromossômicos induzidos. (HEDDLE et al., 1983; MACGREGOR et al., 1990)

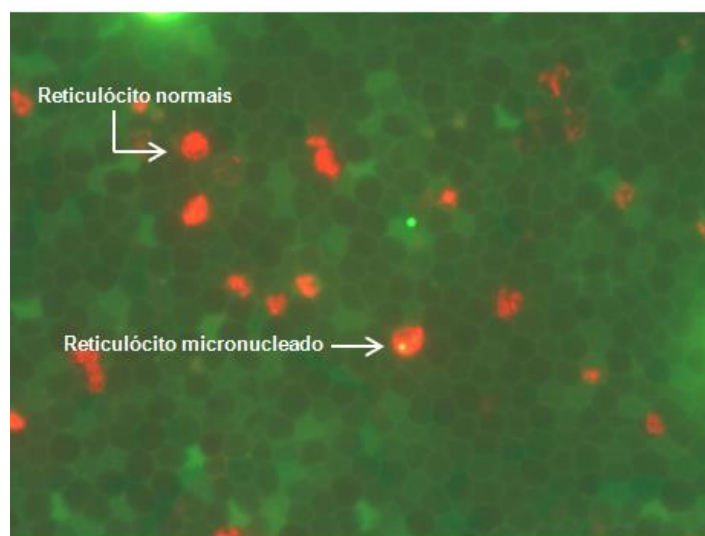


Figura 19- Reticulócitos normais e micronucleado (coloração: laranja de acridina; 1000 x)

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9- Frequência de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (DP).

Tratamento (mg/Kg)	Animais						Média	DP
	1	2	3	4	5	6		
Água	1	0	1	0	2	1	0,8	0,75
Controle (-)	2	0	1	2	1	1	1,1	0,75
Controle (+)	44	31	53	49	38	47	43,6	7,99
L 01								
200	2	2	4	4	1	8	3,5	2,51
100	0	3	2	2	3	3	2,1	1,16
50	3	8	2	4	1	3	3,5	2,42
L 02								
200	4	5	9	5	7	8	6,3	1,96
100	6	5	7	4	7	8	6,1	1,47
50	3	4	6	5	6	5	4,8	1,16
L 03								
200	5	0	2	4	1	3	2,5	1,87
100	0	1	7	3	4	2	2,8	2,48
50	2	2	6	2	3	1	2,6	1,75
L 04								
200	1	4	7	0	1	3	2,6	2,58
100	3	2	2	4	4	2	2,8	0,98
50	4	2	4	3	4	3	3,3	0,81
L 05								
200	0	1	1	2	1	3	1,3	1,03
100	2	2	1	1	3	2	1,8	0,75
50	2	0	1	3	1	2	1,5	1,04
L 06								
200	4	8	2	3	5	4	4,3	2,06
100	3	3	3	3	2	2	2,6	0,51
50	0	1	2	3	3	4	2,1	1,47

Controle + (controle positivo): ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.; Controle – (controle negativo): CMC (1%)/Tween (0,2%); *P≤0,001.

Os resultados (fig. 20) demonstraram que a frequência de micronúcleos nos grupos de camundongos que foram expostos à ação do agente genotóxico ciclofosfamida foi significativamente maior em comparação ao grupo controle negativo (CMC 1%/Tween 0,2%) e água, o que corrobora dados da literatura. (RIBEIRO, 2003)

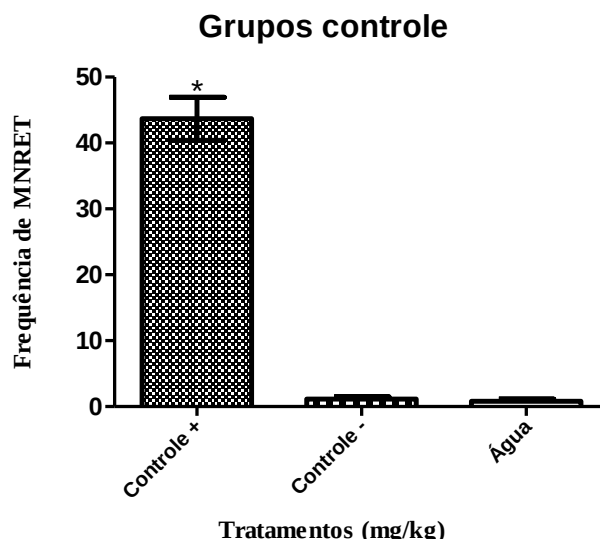


Figura 20 – Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão (DP) para 1000 células obtidas de camundongos tratados com ciclofosfamida (controle positivo), CMC/Tween (controle negativo) e água (controle branco). * $p < 0,05$ CMC/Tween (controle negativo) e água (controle branco). * $p < 0,05$.

A figura 21 apresenta os resultados obtidos da formação de micronúcleos nos grupos de animais expostos aos diferentes tratamentos ($p < 0,05$). Os gráficos demonstram a frequência média de reticulócitos micronucleados dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI (L01, L02, L03, L04, L05, L06) nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg, do controle negativo (veículo) e água (branco).

Em todos os grupos tratados com os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, os resultados obtidos estão muito abaixo do resultado referente ao controle positivo (ciclofosfamida), que apresentou resultados significativos para a indução de micronúcleo comparado a todos os grupos e concentrações testadas. O composto Lapdesf FUR-FD II foi o único que apresentou resultado significativo em relação ao controle negativo em todas as concentrações testadas. Porém não pode-se afirmar que os compostos são mutagênicos devido a diferença em relação ao controle positivo.

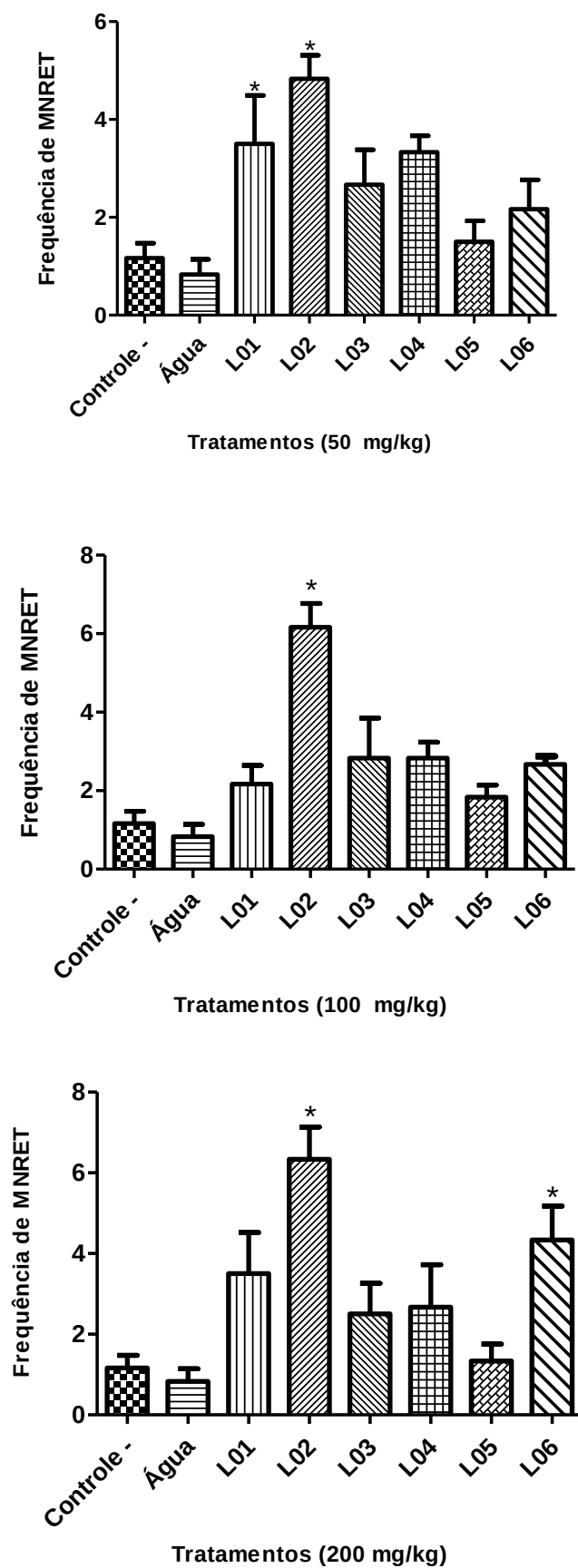


Figura 21 - Frequência média de MNRET e DP para 1000 células obtidas de camundongos tratados com L01, L02, L03, L04, L05 e L06, na concentração de 200, 100 e 50mg/Kg, com controle negativo e água. * $p < 0,05$ (em relação ao controle negativo).

6.3. Coeficiente de partição (log P)

A entrada de muitas substâncias no SNC, tanto exógenas quanto endógenas - incluindo os fármacos - é limitada pela barreira hematoencefálica (BHE) e líquido cefalorraquidiano, que em conjunto garantem a função neuronal adequada. (DJUKIC, 2011)

A BHE separa o SNC da corrente sanguínea. Para a grande maioria dos fármacos que tem como alvo o SNC, atravessar essa barreira é essencial para que seu efeito terapêutico seja exercido. Por outro lado para fármacos que não possuem o SNC como alvo, atravessar esta barreira pode levar a efeitos adversos. (CLARK, 2003)

A permeabilidade de um fármaco no SNC depende diretamente da sua lipofilicidade, devido à barreira hematoencefálica (HOSOYA, 2010).

A lipofilicidade é reconhecida como um parâmetro significativo nas relações entre estrutura/atividade. A lipofilicidade é uma importante propriedade físico-química que afeta a absorção oral, permeabilidade, absorção celular, ligação a proteínas, penetração na BHE e no metabolismo de substâncias bioativas. Acredita-se que os compostos mais lipofílicos têm maior afinidade para a ligação de proteínas plasmáticas e são facilmente transportados através da BHE. (DABROWSKA, 2011)

Lipofilicidade é expressa pelo logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (log P) ou o coeficiente de distribuição (log D) para compostos ionizáveis (TESTA, 1999; DABROWSKA, 2011), Fujita e colaboradores (1964) foram os primeiros a propor o coeficiente de partição octanol/água. (TESTA, 1999).

Conhecer a lipofilicidade de candidatos à fármacos é de grande importância e interesse para a química medicinal, uma vez que este parâmetro físico-químico desempenha um papel importante na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, bem como em o perfil farmacodinâmico e toxicológico de fármacos. (TESTA, 1999; PALLICER, 2012)

Para determinação do coeficiente de partição (Log P), foi utilizado como base o método OECD *Guideline for the Testing of Chemicals* nº117, método de determinação de Log P por HPLC, baseado no tempo de retenção dos compostos quando comparados a padrões previamente estabelecidos.

6.3.1. Determinação do Clog P

Inicialmente foi feita a determinação do coeficiente de partição calculado (Clog P) dos compostos obtidos Lapdesf FUR-FD I-VI, utilizando os softwares ChemDraw® Ultra 12.0 e ALOGPS 2.1 (*online*), utilizou-se dois softwares distintos devido as suas diferentes formas de determinação do Clog P. O software ALOGPS 2.1 utiliza a análise associativa que combina modelos para prever a lipofilicidade, enquanto o software ChemDraw® Ultra 12.0 utiliza-se de diferentes métodos de fragmentação para determinar o Clog P das moléculas propostas.

Após estipulados os valores pode-se então selecionar os padrões que seriam utilizados no ensaio, os quais deveriam compreender valores de log P que fossem acima e abaixo dos calculados para os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI e para que se pudesse através dos padrões obter a curva log K x log P.

6.3.2. Determinação do log P

A curva de linearidade das substâncias utilizadas como padrões foi feita utilizando-se os valores dos tempos de retenção obtidos, feitos em triplicata, após a obtenção dos tempos de retenção e com o log P já conhecido, foi possível obter o calculo da equação $y = 0,3984x - 0,579$ e coeficiente angular, $r^2 = 0,9926$. O log K dos compostos Lapdesf FUR-FD foi determinado a partir de seu tempo de retenção e interpolado na curva de linearidade log K x log P. Os valores de log P alcançados estão expressos na tabela 10.

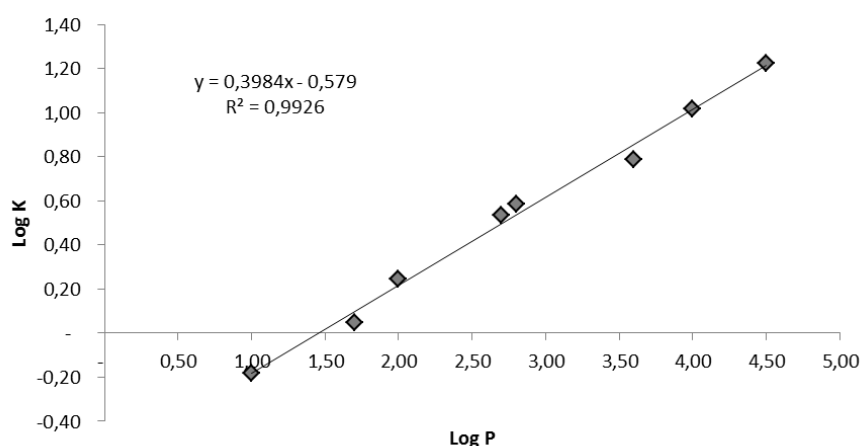


Figura 22 – Curva de linearidade dos padrões obtida experimentalmente.

Tabela 10 – Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (Log P) e valores calculados (ClogP)

Substância	Log P	ChemDraw® Ultra 12.0 (Clog P)	ALOGPS 2.1 (Clog P)
Lapdesf FUR-FD I	2,58 ($\pm 0,003$)	2,55	2,84
Lapdesf FUR-FD II	2,49 ($\pm 0,128$)	1,04	2,70
Lapdesf FUR-FD III	2,76 ($\pm 0,007$)	3,96	4,09
Lapdesf FUR-FD IV	ND*	3,96	4,15
Lapdesf FUR-FD V	2,83 ($\pm 0,051$)	3,83	4,27
Lapdesf FUR-FD VI	4,02 ($\pm 0,015$)	2,87	3,94

ND* 1 - não determinado, pois o composto não foi solúvel na fase móvel utilizada.

Devido às propriedades únicas encontradas na barreira hematoencefálica, o transporte paracelular de fármacos hidrofílicos é praticamente ausente e o transporte transcelular por difusão passiva só ocorre com moléculas que atendem a alguns requisitos entre estes o valor de log P do fármaco deve estar em cerca de 2 (CHEN, 2011). De acordo com os resultados encontrados os valores de log P dos compostos Lapdesf FUR-FD atende ao requisito proposto para permear a barreira hematoencefálica.

6.4. Avaliação de atividade antioxidante (método de DPPH)

A potencial atividade antioxidante dos compostos foi determinada baseada na atividade sequestrante da solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS, *et al.*, 1995). O mecanismo de reação é baseado na transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável DPPH foi inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples (ROESLER *et al.*, 2007).

Considerou-se que os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI seriam ser testados nas concentrações de 1mM até 25 μ M. Esses valores se mostraram interessantes pois estavam dentro da variação de valores do padrão utilizado, ácido ascórbico (controle positivo), cujos valores de IC₅₀ variam bastante (SHARMA & BHAT, 2009), valores entre 56 μ M (KANO, *et al.*, 2005) e 629 μ M (RICCI, *et al.*, 2005), são encontrados na literatura.

Após a realização dos testes e tabulação dos resultados (fig. 23), pode-se observar que os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI não apresentaram atividade antioxidante para o modelo proposto em nenhuma das concentrações testadas.

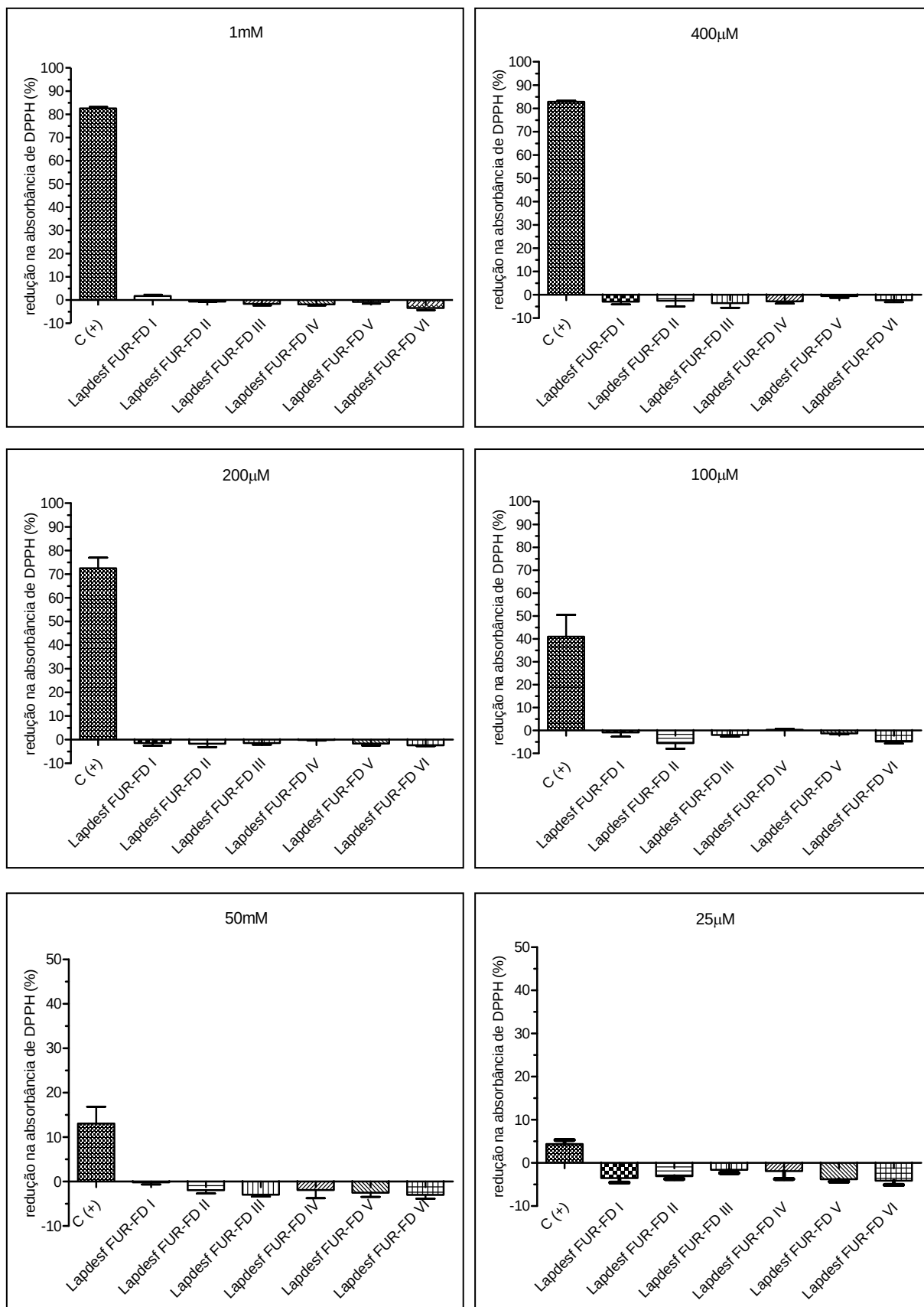


Figura 23 - Redução da absorvância de DPPH (%) tratados com os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI e ácido ascórbico (C+) nas concentrações de 1mM, 400, 200, 100, 50 e 25µM.

Como parte da análise dos resultados foi também obtido os gráficos de dispersão, (concentração x absorbância), a fim de obter o IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI e ácido ascórbico.

6.5. Teste imunológico para detecção de TNF- α

6.5.1. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos

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

Foram testados no ensaio de viabilidade os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, nas concentrações de 400 μ M; 200 μ M; 100 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 12,2 μ M. Foi considerado como satisfatória viabilidade igual ou superior a 70%. Os resultados obtidos estão expressos na figura 24.

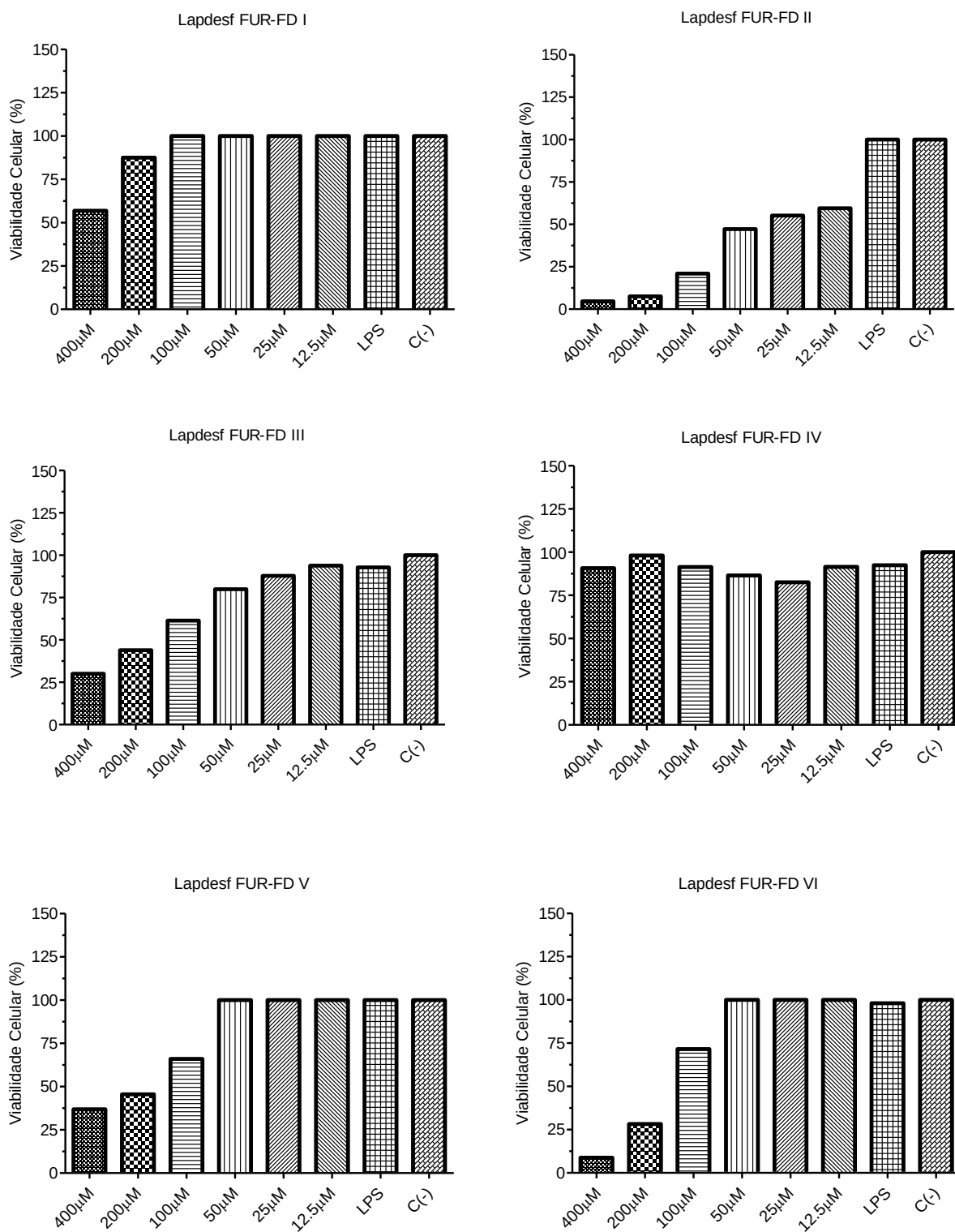


Figura 24 - Viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (C-), equivalendo a 100% de viabilidade.

Os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI, apresentaram em geral boa viabilidade celular, sendo considerados pouco citotóxicos. Os compostos Lapdesf FUR-FD I e IV foram consideradas viáveis em concentrações a partir de 200µM, o composto Lapdesf FUR-FD VI apresentou viabilidade a partir de 100µM, os compostos Lapdesf FUR-FD III e V foram considerados viáveis para a concentração de 50µM, a exceção é feita ao composto Lapdesf FUR-FD II, que apresentou resultados com maior citotoxicidade, em nenhuma das concentrações testadas o composto mostrou-se viável.

Após a definição da viabilidade celular dos compostos sintetizados foi possível realizar o teste imunoquímico para determinação de TNF- α .

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

Os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI foram testados em três diferentes concentrações, porém estas variam de acordo com o resultado obtido no ensaio de viabilidade celular. As concentrações testadas estão dispostas na tabela 11.

Tabela 11 – Concentrações avaliadas para determinação de citocina TNF- α , dos compostos Lapdesf FUR-FD I-VI.

Compostos	Concentrações avaliadas
Lapdesf FUR-FD I	200µM; 50µM; 12,5µM
Lapdesf FUR-FD II	6,25µM; 3,125µM; 1,56µM
Lapdesf FUR-FD III	50µM; 25µM; 12,5µM
Lapdesf FUR-FD IV	200µM; 50µM; 12,5µM
Lapdesf FUR-FD V	50µM; 25µM; 12,5µM
Lapdesf FUR-FD VI	100µM; 50µM; 25µM

As concentrações de TNF- α foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos de duas maneiras distintas: como concentração de TNF- α detectado pelo imunoensaio enzimático (ELISA), na qual os valores estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média; e em porcentagem de inibição, comparando os valores obtidos com os da talidomida (controle positivo) em concentração de 50µM, os valores também estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média. (fig. 25 e 26)

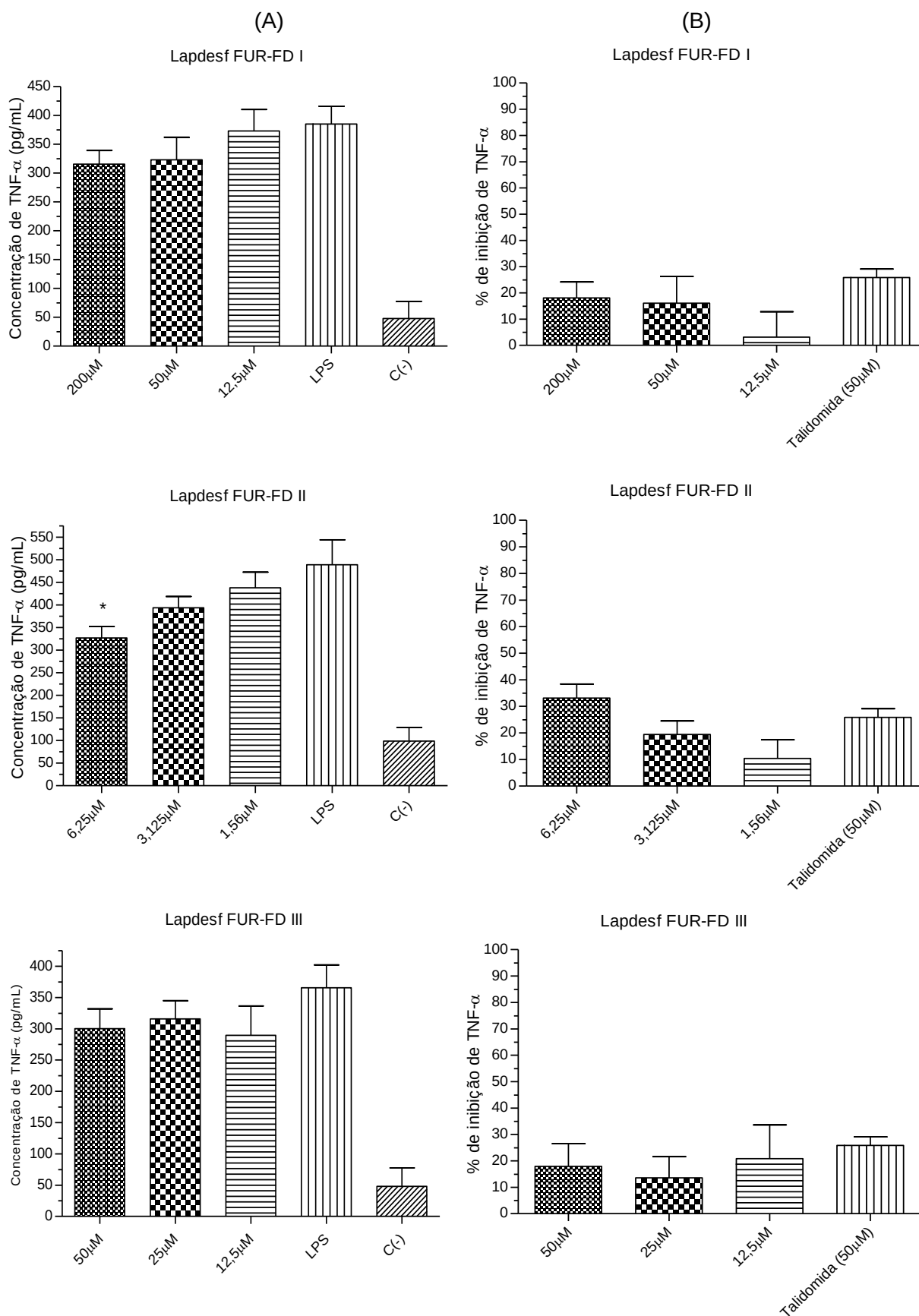


Figura 25 – (A) Concentração de TNF-α produzido por macrófagos em meio contendo Lapdesf FUR-FD I-III, em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, LPS); * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo LPS.). **(B)** Porcentagem de inibição da citocina TNF-α pelos compostos Lapdesf FUR-FD I-III em comparação a talidomida (50μM) e meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-). * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo LPS.)

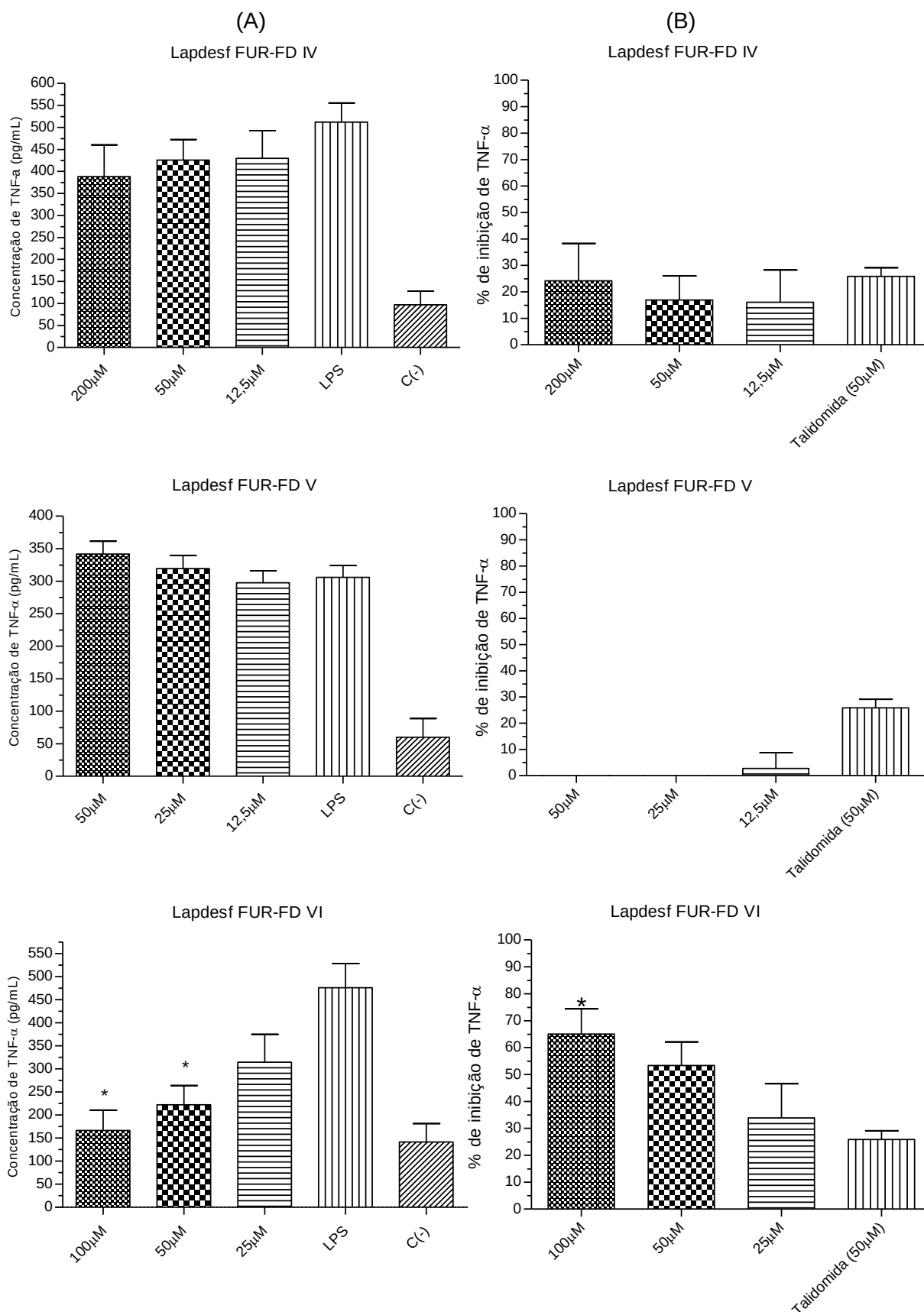


Figura 26 - (A) Concentração de TNF-α produzido por macrófagos em meio contendo Lapdesf FUR-FD IV-VI, em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, LPS); * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo LPS.). **(B)** Porcentagem de inibição da citocina TNF-α pelos compostos Lapdesf FUR-FD I-III em comparação a talidomida (50 μM) e meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-); * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo Talidomida.)

Os compostos Lapdesf FUR-FD II e VI foram os únicos a apresentarem valores estatisticamente significativos com relação à concentração de TNF- α (pg/mL) quando comparado ao controle contendo somente LPS. O composto Lapdesf FUR-FD II foi significativo somente na concentração de 6,25 μ M, enquanto o composto Lapdesf FUR-FD VI foi significativo em concentrações de 100 e 50 μ M.

Os resultados de porcentagem de inibição mostram que o composto Lapdesf FUR-FD VI apresentou resultados superiores, em todas as concentrações avaliadas (100 μ M, 50 μ M e 25 μ M) em relação ao controle talidomida (50 μ M), também é possível observar que na concentração de 100 μ M o candidato a fármaco apresentou resultado estatisticamente significativo em relação à talidomida. Os demais compostos apresentaram valores de inibição próximos aos observados no grupo talidomida, indicando que as modificações moleculares propostas mantiveram a atividade inibidora da síntese de TNF- α do grupo farmacofórico ftalimida. Exceção feita ao composto Lapdesf FUR-FD V que não apresentou redução nos valores observados para a detecção da citocina.

7. CONCLUSÕES

Foi obtido um total de 6 produtos finais Lapdesf FUR-FD I-VI e 13 intermediários sintéticos diferentes com potencial para serem testados e explorados em diferentes trabalhos.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os derivados furoxânicos Lapdesf FUR-FD I e Lapdesf FUR-FD II propostos foram obtidos com rendimentos globais de 91% e 24%, respectivamente. Foi possível otimizar os resultados obtidos no derivado Lapdesf FUR-FD I, apesar de utilizar a mesma metodologia de Santos (2009), o produto obtido apresentou maior rendimento e ausência de contaminantes. Os compostos Lapdesf FUR-FD III-VI foram obtidos com rendimentos de 49%, 36%, 39% e 41%.

Os compostos Lapdesf FUR-FD III-VI apresentam ligações ésteres, com labilidade metabólica. Dessa forma, espera-se que *in vivo*, por reação enzimática ou química, possa ocorrer a conversão ou liberação das duas subunidades ativas que podem exercer seus efeitos benéficos por mecanismos diferentes levando a um sinergismo de ação. Diferente destes, os compostos Lapdesf FUR-FD I-II apresentam caráter híbrido.

A atividade dos compostos finais obtidos foi avaliado farmacologicamente pelo modelo agudo de inflamação (edema de para induzido por carragenina), evidenciando que os compostos apresentaram atividade no modelo proposto, sendo os compostos Lapdesf FUR-FD I e II apresentaram menor atividade, os compostos Lapdesf FUR-FD III e VI apresentou atividade equivalente a talidomida, enquanto os compostos Lapdesf FUR-FD V e IV apresentaram atividade equivalente ao controle indometacina.

A avaliação da atividade *in vivo* pelo ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos demonstrou que os compostos obtidos não demonstraram ser mutagênicos quando comparados ao controle positivo (ciclofosfamida) em nenhuma das concentrações testadas. Quando comparados aos controles negativos (veículo e água) observou-se que os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI apesar de apresentarem valores superiores, não se pode afirmar que os compostos são mutagênicos devido a diferença observada em relação ao controle positivo.

O calculo experimental do coeficiente de partição (log P) por HPLC, mostrou que os compostos obtidos possuem valores log P variando entre 2,5 e 4,02, condizentes com fármacos que possuem ação no SNC (CHENG, 2011). Também foi possível determinar que

Conclusões

em comparação com os valores calculados para os produtos finais, o software ALOGPS 2.1, mostrou valores mais próximos dos obtidos experimentalmente.

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de DPPH mostrou que os compostos Lapdesf FUR-FD I-VI não apresentaram atividade para o modelo proposto. As concentrações utilizadas, valores próximos ao IC₅₀ do controle utilizado (ácido ascórbico) não mostraram correlação com a atividade.

O imunoensaio enzimático (ELISA) mostrou que os compostos apresentaram atividade inibidora da síntese de TNF- α como havia sido proposto no planejamento estrutural inicial. O composto Lapdesf FUR-FD VI apresentou porcentagem de inibição de 65%, 53% e 33%, respectivamente as concentrações de 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M. Mesmo quando comparado a talidomida em concentrações de 50 μ M, o resultado foi superior.

Os dados obtidos até o presente momento valida a estratégia de planejamento inicial de obtenção de novos compostos candidatos a fármacos com potencial atividade anti-inflamatória e neuroprotetora, possivelmente úteis para a redução do processo de inflamação observado na doença de Alzheimer.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, H.S.; SIMON, A.; GRAULICH, E.; HABERMEIER, A.; BACHER, N.; FRIEBE, A.; CLOSS, E.I.; HABERMEIER, A.; STEINBRINK, K.; Neuronal nitric oxide synthase modulates maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.**, v.184, p.6025-6034, 2010.

ALZHEIMER, A.; Über eigenartige krankheitsfälle des späteren alters. 356-385, 1911.

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R.A.; OLIVEIRA, C.; Neuroinflammation, oxidative estresse and the pathogenesis of alzheimer's disease. **Current Pharm. Design.**, v.16, p.2766-2778, 2010.

AKOURY, E.; GAJDA, M.; PICKHARDT, M.; BIERNAT, J.; SORAYA, P.; GRIESINGER, C.; MANDELKOW, E.; ZWECKSTETTER, M.; Inhibition of *tau* filament formation by conformational modulation. **J. Am. Chem. Soc.**, v.135, p.2853-2862, 2013.

APPLEBY, B.S.; NACOPOULOS, D.; MILANO, N.; ZHONG, K.; CUMMINGS, J.L.; A review: treatment os Alzheimer's disease discovered in repurposed agentes. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, v.35, p.1-22, 2013.

BALLATORE, C.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; *Tau*-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nat. Rev.**, v.8, p.663-672, 2007.

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

BARREIRO, E. J.; JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quím. Nova**, v 29, p.326-337, 2006.

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

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A Química Medicinal de N-acilidrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos Analgésicos, Antiinflamatórios e Anti-trombóticos. **Quím. Nova**, v.25, p.129-148, 2002.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.; New insights for multifactorial disease therapy: the challenge of the symbiotic drugs. **Cur. D. Therapy**, v.3, p.1-13, 2008.

BASSIL, N.; MOLLAEI, C.; Alzheimer's dementia: a brief review. **J. Med. Liban.** V.60, nº4, p.192-199, 2012.

BEEDESSEE, G.; RAMANJOOLOO, A.; SURNAM-BOODHUN, R.; SOEST, R.W.; MARIE, D.E.; Acetylcholinesterase-inhibitory activities of the extracts from sponges collected in mauritis waters. **Chem. Biodivers.**, v.10, nº3, p.442-451, 2013.

BERNHARDIA, R.; EUGENÍN, J.; Microglial reactivity to β -amilod id modulated by astrocytes and proinflammatory factors. **Brain Res.**, v.1025, p.186-193, 2004.

BHAT, M. A.; AL-OMAR, M. A.; Synthesis, Characterization and in vivo Anticonvulsant and Neurotoxicity Screening of Schiff Bases of Phthalimide. **Acta Poloniae Pharmaceutica & Drug Research**, v.68 nº 3, p.375-380, 2011.

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

Referências Bibliográficas

- BORGES, L.G.; FRÖEHLICH, E.; Talidomida – novas perspectivas para utilização como anti-inflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Ver. Assoc. Med. Bras.**, v.49, p.96-102, 2003.
- BOSQUESI, P.L.; MELO, T.R.; VIZIOLI, E.O.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C.; Anti-inflammatory drug design using a molecular hybridization approach. **Pharma.**, v.4, p.1450-1474, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.28, p. 25-30, 1995.
- BRAWEKA, B.; LÖFFLERA, M.; WAGNERB, K.; HUPPERTZC, J.; WENDLINGD, A.; WEYERBROCKE, A.; JACKISCHF, R.; FEUERSTEINA, T.J.; Reactive oxygen species (ROS) in the human neocortex: role of aging and cognition. **Brain Res. Bull.**, v.81, p.484-490, 2010.
- BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER, F.J.; KRAUSE, K.; Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Med. Mkly.**, v.142, p.1-14, 2012.
- BRUNDEN, K.R.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M.; Advances in *tau*-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related *tau*opathies. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.8, nº10, p.783-793, 2009.
- BULIC, B.; PICKHARDT, M.; MANDELKOW, E.; Progress and developments in *tau* aggregation inhibitors for Alzheimer disease. **J. Med. Chem.**, ASAP.
- CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D.A.; STELLA, A.G.; Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat. Rev.**, v.8, 766-775, 2007.
- CARLES, C.; PASQUALI, L.; PIAZZA, S.; LOGERFO, A.; LENCO, E.C.; ALESSI, F.; SICILIANO, G.; Strategies for clinical approach to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Arch. It. de Bio.**, v.149, p.151-167, 2011.
- CAVALLUCCI, V.; D'AMELIO, M.; CECCONI, F.; A β toxicity in Alzheimer's disease. **Mol. Neurobiol.**, v.45, p.366-378, 2012.
- CENA, C.; BERTINARIA, M.; BOSCHI, D.; GIORGIS, M.; GACO, A.; Use of the furoxans (1,2,5-oxadiazole 2-oxide) system in the design of new NO-donor antioxidante hybrids. **ARKIVOK**, v.7, p.301-309, 2006.
- CENA, C.; VISENTIN, S.; DI STILO, A.; BOSCHI, D.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; Studies on agents with mixed no-dependent and calcium channel antagonistic vasodilating activities, **Phar. Res.**, v.18, nº 2, p.157-165, 2001.
- CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.5, p.57-71, 2005.
- CHEN, Z.; CHEN, B.; XU, W.; LIU, R.; YANG, J.; YU, C.; Effects of PTEN inhibition on regulation of *tau* phosphorylation in an okadaic acid-induced neurodegeneration model. **Int. J. Devl. Neuroscienc.**, p.411-419, 2012.
- CHEN, Y.; LIU, L.; Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Adv. Drug Deliv.Rev.**, v.64, p.640-665, 2012.

Referências Bibliográficas

CHOI, D. W. Calcium-Mediated Neurotoxicity - Relationship to Specific Channel Types and Role in Ischemic Damage. **Trends in Neuro.**, v.11, p.465-469, 1988.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, W. N.ed.), Marcel Dekker, Inc, New York,, 2001.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I.; O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v.22, nº1, p.75-84, 1999.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I.; Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. de Ciên. Farma.**, v.41, nº2, p.155-179, 2005.

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

CHUNG, M.C.; SANTOS, J.L.; VIZIOLI, E.O.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; PECCININI, R.G.: Synthesis, ex vivo and in vitro hydrolysis study of an indoline derivative designed as an anti-inflammatory with reduced gastric ulceration properties. **Molecules**, v.14, p.3187-3197, 2009.

CHUNG, M.C.; Interações medicamentosas no planejamento de novos fármacos. **Livre docência. Araraquara: Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, UNESP**, 2012.

CIPRIANI, G.; DOLCIOTTI, C.; PICCHI, L.; BONUCCELLI, U.; Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurol. Sci.**, v.32, p.275-279, 2011.

CLARK, D.E.; *In silico* prediction of blood-brain barrier permeation. **DDT**, v.8, p.927-933, 2003.

CONFORTI, A.; BELLAVITE, P.; BERTANI, S.; CHIAROTTI, F.; MENNITI-IPPOLITO, F.; RASCHETTI, R.; Rat models of acute inflammation: a randomized controlled study on the effects of homeopathic remedies. **BMC Com. and Alt. Med.**, v.7, p.1-10, 2007.

CORBETT, A.; PICKETT, J.; BURNS, A.; CORCORAN, J.; DUNNETT, S.B.; EDISON, P.; HAGAN, J.J.; HOLMES, C.; JONES, E.; KATONA, C.; KEARNS, I.; KEHOE, P.; MUDHER, A.; PASSMORE, A.; SHEPHERD, N.; WALSH, F.; BALLARD, C.; Drug repositioning for Alzheimer's disease. **Nat. Rev.**, v.11, p.833-846, 2012.

CORRADA, M.M.; BROOKMEYER, R.; BERLAU, D.; PAGANINI-HILL, A.; KAWAS, C.H.; Prevalence of dementia after age 90: results from the 90+ study. **Neurology.**, v.71, p.337-343, 2008.

CREWS, L.; MASLIAH, E.; Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **H. Mol. Genetics**, v.19, R12-R20, 2010.

CUMMINGS, J.L.; Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v.351, p.59-67, 2004.

DAHM, R.; Alzheimer's discovery. **Current Biology**, v.16, nº21, R906-R-910, 2006.

DANYZ, W.; PARSONS, C.G.; Alzheimer's disease, β -amiloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. **B. J. of Pharma.**, v.167, p.324-352, 2012.

Referências Bibliográficas

- DE PAULA, V.J.R.; GUIMARÃES, F.M.; FORLENZA, O.V.; Papel da proteína *tau* na fisiopatologia da demência frontotemporal. **Ver. Psiq. Clín.**, v.36, nº5, p.197-202, 2009.
- DI CARLO, M.; GIACOMAZZA, D.; SAN BIAGIO, P.L.; Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspective and diagnostic tools. **J. Phys.: Condens. Matter.**, v.24, p.1-17, 2012.
- DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J. Health Econ.**, v.22, p.151-185, 2003.
- DRABROWSKAA, M.; STAREKA, M.; SKUCINUSKI, J.; Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: a review. **Talanta**, v.86, p.35-51, 2011.
- DROUIN-OUELLET, J.; CICCHETTI, F.; Inflammation and neurodegeneration: the story "retolled". **T. in Pharma. Sci.**, v.33, p.542-551, 2012.
- EFREMOV, I.V.; VAJDOS, F.F.; BORZILLERI, K.A.; CAPETTA, S.; CHEN, H.; DORFF, P.H.; DUTRA, J.K.; GOLDSTEIN, S.W.; MANSOUR, M.; McCOLL, A.; NOELL, S.; OBORSKI, C.E.; O'CONNELL, T.N.; O'SULLIVAN, T.J.; PANDIT, J.; WANG, H.; WEI, B.; WITHKA, J.M.; Discovery and optimization of a novel spiropyrrolidine inhibitor of β -secretase (BACE1) through fragment-based drug design. **J. Med. Chem.**, v.55, p.9069-9088, 2012.
- FADDA, F. e ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog.Neurobiol.**, v.56, p.385-431,1998.
- FAN, L.; CHIU, M.; Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. **Accta Neurologica Taiwanica**, v.19, nº4, p.228-245, 2010.
- FARRAR, W.V. The 3,4-bisarenesulfonylfuroxans. **J. Chem. Soc.**, p.904-906,1964.
- FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol Med.**, v.111, p.3-32, 2005.
- FERREIRA, E.I.; KOROLKOVAS, A. Pró-fármacos e latenciação. **Quim. Nova**, p.113-128, 1980.
- FERETTI, M.T.; BRUNO, M.A.; DUCATENZEILER, A.; KLEIN, W.L.; Intracellular $\alpha\beta$ -oligomers and early inflammation in a model of Alzheimer's disease. **Neurobio. of Aging**, v.33, p.1329-1342, 2012.
- FERRI, C.P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATICLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; MATHERS, C.; MENEZES, P.R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M.; Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet.**, v.366, p.2112-2117, 2005.
- FUJITA, T.; IWASA, J.; HANSCH, C.; A new substituent constant π derived from partition coefficients. p.5175-5180, 1964
- FUKAGAWA, N.L. Aging: Oxidative Estresse a Marker or Is It Casual? **P.S.E.B.M**, v.222, p.293-298, 1999.
- GARCIA, M.L.; CLEVELAND, D.W.; Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. **Curr. Opin. In Cell Bio.**, v. 13, p.41-48, 2001

Referências Bibliográficas

GAMBA, P.; TESTA, G.; SOTTERO, B.; GARGIULO, S.; POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1259, p.54-64, 2012.

GENG, J.; MENG, L.; WU, L.; REN, J.; QU, X.; Liberation of copper from amyloid plaques: making a risk factor useful for Alzheimer's disease treatment. **J. Med. Chem.**, v.55, p.9146-9155, 2012.

GIATTI, S.; BORASO, M.; MELCANGI, R.C.; VIVIANI, B.; Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. **J. of Mol. Endocrinology**, v.49, R125-R134, 2012.

GOEDERT, M.; GHERTTI, B.; Alois Alzheimer: his life and times. **Brain Pathol.**, v.17, p.57-62, 2007.

GHOSH, A.K.; VENKATESWARA, R.; YADAV, N.D.; ANDERSON, D.D.; Structure-based design of highly selective β -secretase inhibitors: synthesis, biological evaluation, and protein-ligand x-ray crystal structure. **J. Med. Chem.**, v.55, p.9195-9207, 2012.

HAMPEL, H.; FRANK, R.; BROICH, K.; TEIPEL, S.J.; KATZ, R.G.; HARDY, J.; HERHOLZ, K.; BOKDE, A.L.; JESSEN, F.; HOESSLER, Y.C.; SANHAI, W.R.; ZETTERBERG, H.; WOODCOOK, J.; BLENNOW, K.; Biomarkers for alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. **Nat. Rev.**, v.9, p.560-574, 2010.

HARPER, N.J.; Drug latentiation. **J. of Med. and Pharma. Chem.**, v.1, nº6, p.467-500, 1959

HARRINGTON, C.R.; The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuroimag. Clin. N. Am.**, v.22, p.11-22, 2012.

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

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res.**, v.245, p.245-249, 1990.

HEDDLE, J.A., SALAMONE, M.F., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MACGREGOR, J.G.; NEWELL, G.W.; The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Res.** 123, 61-118, 1983.

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

HOSOYA, K.; YAMAMOTO, A.; AKANUMA, S.; TACHIKAWA, M.; Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability. **Pharm. Res.**, v.27, p.2715-2724, 2010.

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

LING, Y.; YE, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; LAI, Y.; JI, H.; PENG, S.; TIAN, J.; Novel nitric oxide-releasing derivatives of farnesylthiosalicylic acid: synthesis and evaluation of antihepatocellular carcinoma activity. **J. Med. Chem.**, v.54, p.3251-3259, 2011.

- KANO, M.; TAKAYANAGI, T.; HARADA, K.; MAKINO, K.; ISHIKAWA, F.; Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* cultivar. **Biosci. Biotech. and Biochem.**, v.69, p.979-988, 2005.
- KAWAS, C.H.; CORRADA, M.M.; Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. **Curr. Alzheimer Res.**, v.3, nº5, p.411-419, 2006.
- KENNY, W.J.; WALSH, J.A.; DAVENPORT, DEREK A. Acid catalyzed cleavage of sulfoxides. **J. Am. Chem. Soc.**, v.83, p.4019-4022, 1961.
- KOLAROVA, M.; GARCÍA-SIERRA, F.; BARTOS, A.; RICNY, J.; RIPOVAL, D.; Structure and pathology of *tau* protein in Alzheimer disease. **Inter. J. of Alzheimer's Disease**, v.12, p.1-13, 2012.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H.; **Química Farmacêutica**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, cap.2, 1982.
- LANE, R.F.; SHINEMAN, D.W.; STEELE, J.W.; LEE, L.H.; FILLIT, H.M.; Beyond amyloid: the future of therapeutics for Alzheimer's disease. **Adv. in Pharma.**, v.64, p.213-271, 2012.
- LEE, Y.; HAN, S.B.; NAM, S.; OH, K.; HONG, J.T.; Inflammation and Alzheimer's disease. **Arch. Pharm. Res.**, v.33, nº10, 1539-1556, 2010.
- LEMOES, C.A.; HAZIN, I.; FALCÃO, J.T.; Investigação da memória autobiográfica em idosos com demência de Alzheimer nas fases leve e moderada. **Estudos de Psicologia**. v.17, nº1, p.135-144, 2012.
- LI, P.K.; PANDIT, B.; SACKETT, D.L.; HU, Z.; ZINK, J.; ZHI, J.; FREEMAN, D.; ROBEY, R.W.; WERBOVETZ, K.; LEWIS, A.; LI, C.; A thalidomide with in vitro antiproliferative, antimitotic, and microtubule-stabilizing activities. **Mol. Cancer Ther.**, v.5, nº2, p.450-456, 2006.
- LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quim. Nova.**, v.24, n.5, p.683-688, 2001.
- LIMA, L.M., CASTRO, P., MACHADO, A. L., FRAGA, C.A M., LUGNIER, C., MORAES, V.L.G., BARREIRO, E.J. Synthesis and anti inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg Med. Chem.**, v.10, p.3067-3073, 2002.
- LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.; KOATZ, V.L.; BARREIRO, E.J.; Thalidomide and analogs as anti-inflammatory and immunomodulator drug candidates. **A. & A. Agents in Med. Chem.**, v.5, p.79-95, 2006.
- LING, Y.; YE, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; LAI, Y.; JI, H.; PENG, S.; Novel nitric oxide-releasing derivatives of farnesylthiosalicylic acid: synthesis and evaluation of antihepatocellular carcinoma activity. **J. Med. Chem.**, 54, 3251–3259, 2011.
- LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FREENEY, P.J.; Experimental and computational approach to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.46, p.3-26, 2001.
- LOKENS-GARD, J.R.; HU, S.; FENEMA, E.M.; SHENG, W.S.; PETERSON, P.; Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.983–987, 2000.

MACGREGOR, J.T., WEHR, C.M., HENIKA, P.R., AND SHELBY, M.E.; The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. **Fund. Appl. Toxicol.**, 14, 513-522, 1990.

MAHLEY, R.W.; HUANG, Y.; Small-molecule structure correctors target abnormal protein structure and function: structure corrector rescue of apolipoprotein E4 – associated neuropathology. **J. Med. Chem.**, v.55, p.8997-9008, 2012.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S.K.; Rational drug design. **Eur. J. of Pharma.**, v.625, p.90-100, 2009.

MARTINÉS-FRÍAS, M.L.; Talidomida: 50 años después?. **Med. Clin. (Barc.)**, v.139, p.25-32, 2012.

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

McKEAGE, K.; Memantine a review of its use in moderate to severe Alzheimer's disease. **CNS Drugs**, v.23, n°10, p.881-897, 2009.

McGEER, P.L.; McGEER, E.; History of innate immunity in neurodegenerative disorders. **Frontiers in Pharma.**, v.2, p.1-5, 2011.

MÖLLER, H.J.; GRAEBER, M.B.; The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, v.248, p.111-122, 1998.

MONTARI, C. A.; **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. 1ª ed., Editora USP, p. 28-39.

MORRIS, C.J.; Carrageenan-induced paw edema in rat and mouse, **Methods in Mol. Bio.**, v.225, p.115-121, 2003.

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

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

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

MULLER, G.W.; CORRAL, L.G.; SHIRE, M.G.; WANG, H.; MOREIRA, A.; KAPLAN, G.; STIRLING, D.I.; Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. **J. Med. Chem.**, v.39, p.3238-3240, 1996.

MUSIAL, A.; BANJA, M; MALAWSKA, B.; Recent development in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. **Current Med. Chem.**, v.14, p.2654-2679, 2007.

NIEOULLON, A.; Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. **J. Appl. Biomed.**, v.9, p.173-183, 2011.

NOHL, H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **Br.Med.Bull.**, v.49, p.653-667, 1993.

OECD. Guideline Test for Chemicals n°117; Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948177.pdf>. Acesso em: 08 de Dezembro de 2011.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ONOR, M.L.; TREVISIOL, M.; AGUGLIA, E.; Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. **Clinical Intervention in Aging**, v.2, p.17-32, 2007.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova.**, v. 22, n. 4, p.584-590, 1999.

QUERFURTH, H.W.; LAFERLA, F.M.; Mechanisms of disease: Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v.362, p.329-344, 2010.

QUI, C.; KIVIPERTO, M.D.; STRAUSS, E.; Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention, **Dialog. in Clin. Neuro.**, v.11, n°2, 111-128, 2009.

PANNU, R.; SINGH, I.; Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxid synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. **Neurochem. Inter.**, v.49, p.170-182, 2006.

PALLICER, J.M.; PASCUAL, R.; PORT, A.; ROSES, M.; RAFOLS, C.; BOSCH, E.; The contribution of the hydrogen bond acidity on the lipophilicity of drugs estimates from chromatographic measurements. **Euro. J. of Pharma. Sci.**, v.48, p.484-493, 2013.

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

PEREIRA, D.G.; Importancia do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v.31, n°1, 171-177, 2007.

PERL, D.P.; Neuropathology of Alzheimer's disease. **Mount Sinai J. of Med.**, v.77, p.32-42, 2010.

PÔRTO, W.G.; Radicais livres e neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para nova terapia?. **Rev. Neurociências**, v.9, n°2, p.70-76, 2001.

POTTER, P.E.; With Alzheimer disease this supplement is supported by na independent educational grant from the Alzheimer's association. **J. Am. Osteopath. Assoc.**, v.110, S27-S36, 2010.

PRITCHARD, J.F.; JURIMA-ROMET, M.; REIMER, M.L.; MORTIMERS, E.; ROLFE, B.; CAYEN, M.; Making better drugs: decision gates in non-clinical drug development. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.2, p.542-553, 2003.

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

RAMIREZ-BERMUDEZ, J.; Alzheimer's disease: critical notes on the history of medical concepit. **Archives of Medicinal Research**, v.43, p.595-599, 2012.

- RAMACHANDRAN, G.; UDGAONKAR, J.B.; Mechanistic studies unravel the complexity inherent in tau aggregation leading to Alzheimer's disease and the tauopathies. **Biochem.**, v.52, p.4107-4126, 2013.
- RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAS, R.; OH, D.; JÄRVINEN, T.; SAVOLAINEN, J.; Prodrug: design and clinical applications. **Nat. Rev.**, v.7, p.255-270, 2008.
- RELIGA, D.; WINBLAD, B.; Therapeutic strategies for Alzheimer's disease based on new molecular mechanisms. **Acta Neurobiol. Exp.**, v.63, p.393-396, 2003.
- RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v.391, p.97-103, 2000.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003.
- RICCI, D.; FRATERNALE, D.; GIAMPERI, L.; BUCCHINI, A.; EPIFANO, F.; BURINI, G.; CURINI, M.; Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). **J. of Ethnopharma.** 98, p.195-200, 2005.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUZA, C. A. S.; PASTORE, G. M.; Atividade antioxidante das frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27(1), p.53-60, 2007.
- RUBIO-PEREZ, J.M.; MORILLA-RUIZ, J.M.; A review: inflammatory process in alzheimer's disease, role of cytokines. **The Sci. World J.**, v.2012, p.1-15, 2011.
- RYU, J.K.; McLARNON, J.G.; Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived tumor necrosis factor- α in an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. **Neurobiology of Disease.** V.29, p.254-266, 2008.
- SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G.; Thalidomide selectively inhibits tumour necrosis factor α production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v.173, p.699-703, 1991.
- SANTOS, J.L.; LIMA, L.M.; CHUNG, M.C.; Microondas doméstico na síntese de derivados ftalimídicos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.27, n°2, 163-167, 2006.
- SANTOS, J.L. Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da Anemia Falciforme. **Tese. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP**, 2009.
- SANTOS, J.L.; LANARO, C.; CHELUCCI, R.C.; GAMBERO, S.; BOSQUESI, P.L.; REIS, J.S.; LIMA, L.M.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; COSTA, F.F.; CHUNG, M.C.; Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. Part II: furoxan derivatives. **J. Med. Chem.**, v.55, p.7583-7592, 2012.
- SAVELIEFF, M.G.; LEE, S.; LIU, Y.; LIM, M.H.; Untangling amyloid- β , *tau*, and metals in Alzheimer's disease. **Chem. Biol.**, ASAP.
- SCATENA, R.; BOTTONI, P.; PONTOGLIO, A.; GIARDINA, B.; Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p.61-73, 2010.
- SCHOENAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **Il Farmaco.**, v.54, p.316-320, 1999.

SCHIEFER, I.T.; VANDEVREDE, L.; FA', M.; ARANCIO, O.; THATCHER, G.R.; Furoxans (1,2,5-oxadiazole-N-oxides) as novel NO mimetic neuroprotective and procognitive agents. **J. Med. Chem.**, v.55, p.3076-3087, 2012.

SCHULTZBERG, M.; LINDBERG, C.; ARANSSON, A.F.; HJORTH, E.; SPULBER, S.D.; OPRICA, M.; Inflammation in the nervous system – physiological and pathophysiological aspects. **Physiology & Behavior**, v.92, p.121-128, 2007.

SHAHANI, N.; SAWA, A.; Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for s-nitrosylation. **Antioxidants & redox signaling**, v.14, n°8, p.1493-1504, 2011.

SHARMA, V.; Neuroinflammation in Alzheimer's disease and involvement of interleukin-1: a mechanistic view. **IJPSDR**, v.3, n°4, p.287-291, 2011.

SHARMA, O.P.; BHAT, T.K.; DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chem.** 113, p.1202-1205, 2009.

SHARMA, V.; THAKUR, V.; SINGH, S.N.; GULERIA, R.; Tumor Necrosis Factor and Alzheimer's disease: a cause and consequence relationship. **Bulletin of Clinical Psy.**, v.22, n°1, p.86-97, 2012.

SHCHARBIN, D.; PEDZIWIATR, E.; BLASIAK, J.; BRYSEWSKA, M.; How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. **J. of Control. Release.** 141, p. 110-127, 2010.

SHIBATA, Y.; SHICHITA, M.; SASAKI, K.; NISHIMURA, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. N-Alkylphthalimides: structural requirement of thalidomide action on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor alpha production by human leukemia HL-60 cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v.43, n.1, p.177-179, 1995.

SILVERSTEIN, R.M.; WBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 387, 2007.

SORBA, G.; MEDENA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; STOLO, A.; GALLI, U.; GASCO, A.; Water soluble furoxans derivatives as NO prodrugs. **J. Med. Chem.**, v.40, p.463-469, 1997.

STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; ERIKSSON, A. H.; ANDERSEN, R.; ROKJAER, S.; Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.21, p.3-16, 2004.

STELZMA, R.A.; SCHNITZLEIN, H.N.; MURTAGH, F.R.; An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde". **Clinical Anatomy**, v.8, p.429-443, 1995.

STEINERT, J.R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I.D.; Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **The Neurosci.**, v.16, n°4, p.435-452, 2010.

STIRLING, D.I.; Thalidomide and its impact in dermatology. **Seminar in Cutaneous Medicine and Surgery**, v.17, n°4, p.231-242, 1998.

STRAUSS, E.; VIITANEN, M.; de RONCHI, D.; WINBLAD, B.; FRATIGLIONI, L.; Aging and the occurrence of dementia: findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians. **Arch Neurol.**, v.56, p.587-592, 1999.

SUGIMOTO, H.; Donepezil hydrochloride: a treatment drug for Alzheimer's disease. **The Chem. Record**, p.63-77, 2000.

TANAKA, K.; KITAMURA, Y.; Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: Tangle formation, amyloid- β , and microglia in Alzheimer's disease. **J. Pharmacol. Sci.**, v.118, p.429-443, 2012.

TELPOUKHOVSKAIA, M.A.; ORVIG, C.; Werner coordination chemistry and neurodegeneration. **Chem. Soc. Rev.**, v.42, p.1836-1846, 2013.

TESTA, B.; CRIVORI, P.; REIST, M.; CARRUPT, P.; The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. **Pers. in Drug Disc. and Design**, v.19, p.179-211, 2000.

TETKO, I.V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V.A.; RADCHENKO, E.V.; ZEFIROV, N.S.; MAKARENKO, A.S.; TANCHUK, V.Y.; PROKOPENKO, V.V.; Virtual computational chemistry laboratory – design and description. **J. Comput. Aid. Mol.**, v.19, p.453-463, 2005.

THATCHER, G.R.; BENNETT, B.M.; REYNOLDS, J.N.; NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. **Current Alz. Research**, v.3, p.237-245, 2006.

TÖRÖK, B.; SOOD, A.; BAG, S.; TULSAN, R.; GHOSH, S.; BORKIN, D.; KENNEDY, A.R.; MELANSON, M.; MADDEN, R.; ZHOU, W.; LEVINE, H.; TÖRÖK, M.; Diaryl hidrazones as multifunctional inhibitors of amylois self-assembly. **Biochemistry**, v.52, p.1137-1148, 2013.

TUPPO, E.E.; ARIAS, H.R.; The role of inflammation in alzheimer's disease. **The Inter. J. of Bio. & Cell Bio.**, v.37, p.289-305, 2005.

TWEEDIE, D.; FRANKOLA, A.; LUO, W.; LI, Y.; GREIG, N.H.; Thalidomide analogues suppress lipopolysaccharide-induced synthesis of TNF- α and nitrite, an intermediate of nitric oxide, in a cellular model of inflammation. **The Open Bio. J.**, v.5, p.37-44, 2011.

TWEEDIE, D.; FERGUSON, R.A.; FISHERMAN, K.; FRANKOLA, K.A.; PRAAG, H.; HOLLOWAY, H.W.; LUO, W.; LI, Y.; CARACCILO, L.; RUSSO, I.; BARLATI, S.; RAY, B.; LAHIRIS, D.K.; BOSOTTI, F.; GREIG, N.H.; ROSI, S.; Tumor necrosis factor- α synthesis inhibitor 3,6-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **J. of Neuroinflam.**, v.9, p.1-16, 2012.

UEYAMA, J.; NADAL, M.; ZHAO, Y.L.; KANAZAWA, H.; TAKAGI, K.; KONDO, T.; TAKAGI, K.; WAKUSAWA, S.; ABE, F.; SAITO, H.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, T.; Effect of thalidomide on endotoxin-induced decreases in activity and expression of hepatic cytochrome P450 3A2. **Biol. Pharm. Bull.**, v.31, p.1596-1600, 2008.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T.; Oxidative estresse and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Currenr. Neuropharma.**, v.7, p.65-74, 2009.

VAMUM, M.M.; IKEZU, T.; The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in alzheimer's diseade brain. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v.60, p.251-266, 2012.

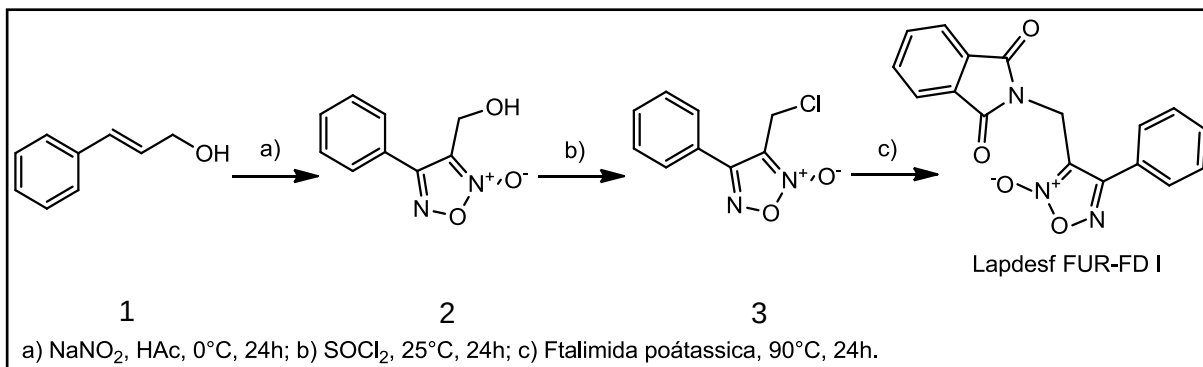
VANE, J.R.; Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v.231, p.224-235, 1971.

- VERHEY, F.J.; Alois Alzheimer (1864-1915). **J. Neurol.**, v.256, p.502-503, 2009.
- VERSCHUEREN, W.G.; DIERYNCK, I.; AMSSOMS, K.I.; HU, L.; BOONANTS, P.M.; PILLE, G.; DAEYAERT, F.D.; HERTOOGS, K.; SURLERAUX, D.L.; WIGERINCK, P.B.; Design and optimization of tricyclic phthalimide analogues as novel inhibitors of HIV-1 integrase. **J. Med. Chem.**, v.48, p.1930-1940, 2005.
- VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.; Molecular hybridization: a useful tool in design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chem.**, v.14, p.1829-1852, 2007.
- VILELA, L.P.; CAREMELLI, P.; A doença de Alzheimer na visão de familiares de pacientes. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.52, nº3, p.148-152, 2006.
- WEBER, A.; CASINI, A.; HEINE, A.; KUHN, D.; SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; KLEBE, G. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: New pharmacological opportunities due to related binding site recognition. **J. Med. Chem.**, v.46, p.550-557, 2004.
- WERMUTH, C. G. Multitargeted drugs: the end of the "one-target-one-disease" philosophy? **Drug Discov. Today**, v.9, nº19, p.826-827, 2004.
- WERMUTH, C.G. Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery. **J. Med. Chem.**, v.47, nº6, p.1303-1312, 2004
- WHO. **Dementia. A public health priority.** Disponível em: http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/. Acesso em: 05 de Março de 2013.
- 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.
- WOLFE, M.S.; Introduction to special issue on Alzheimer's disease. **J. Med. Chem.**, v.55, p.8977-8978, 2012.
- ZUO, X.; PENG, S.; HUA, C.; TAN, L.; DENG, H.; LI, Y.; Furoxan nitric oxide donor coupled chrysin derivatives: synthesis and vasculoprotection. **Bio. & Med. Chem. Letters**, v.21, p.1222-1226, 2011.

ANEXOS I

1. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

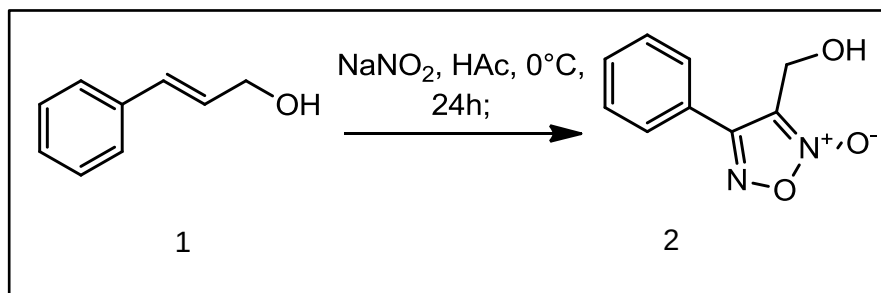
1.1 Síntese do composto Lapdesf FUR-FD I



Esquema 1 - Obtenção do composto Lapdesf FUR-FD I obtido a partir do álcool cinâmico

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

Reação



Procedimento

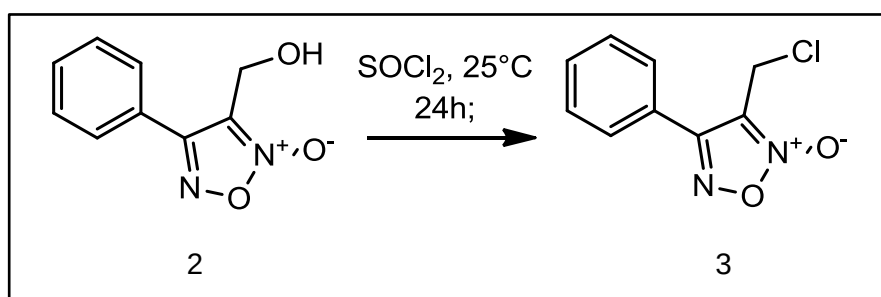
Em um balão de 250mL em banho de gelo adicionou-se 10,8g (0,08mol) de álcool *trans*-cinâmico (1) e 8ml de ácido acético glacial. Após solubilizar o álcool *trans*-cinâmico (1) o balão reacional foi adicionado a um banho de gelo. Utilizando um funil de adição adicionou-se lentamente gota-a-gota solução saturada de nitrito de sódio (NaNO_2) (15,52g em 35mL de água destilada). Após completa adição de NaNO_2 a reação foi retirada do banho de gelo e mantida em agitação constante por 24 horas em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como fase estacionária (FE) sílica gel e fase móvel (FM) 5:5 hexano:acetato de etila (v/v). O produto foi isolado realizando extrações com acetato de etila (7 x 30mL), posteriormente a fase

Anexos

orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 20mL) . Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro para remover resquícios de água, a qual posteriormente foi filtrada. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como FE sílica gel e FM 5:5 hexano:acetato de etila (v/v), após purificação, obteve-se 13g (rendimento de 82,9%) de produto com aspecto oleoso e coloração castanha-alaranjado (PM: 192,18; C₉H₈N₂O₃).

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

Reação

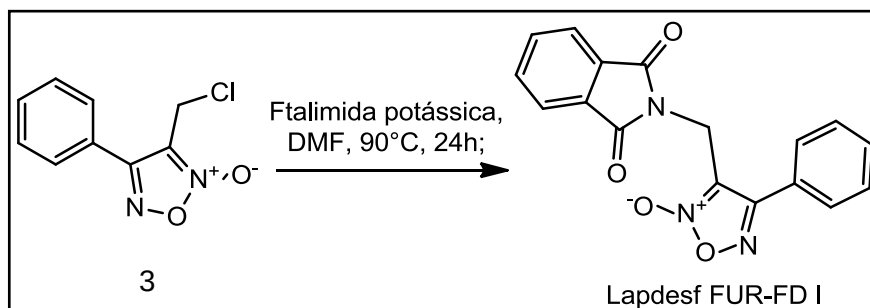


Procedimento

Adicionou-se a um balão de 50mL, 2,0g (0,01mol) do derivado (2) e 1,8mL (0,025mol) de cloreto de tionila (SOCl₂). A reação permaneceu sob atmosfera de nitrogênio, temperatura ambiente e agitação constante por 24 horas. Ao final da reação adicionou-se de maneira lenta 70mL de solução saturada de bicarbonato de sódio a 0°C. Realizou-se extrações da fase aquosa utilizando-se acetato de etila (4 x 30mL), foi então adicionado a fase orgânica sulfato de sódio anidro e filtrou-se a fase orgânica. O solvente foi removido sob pressão reduzida fornecendo 1,47g. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como FE sílica gel e FM 8:2 éter de petróleo:acetato de etila (v/v), após purificação, obteve-se 1,3g (rendimento de 60%) de produto com aspecto oleoso e coloração alaranjada (PM: 210,6; C₉H₇ClN₂O₂).

1.1.3 Síntese do 3-[(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)metil]-4-fenil-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (Lapdesf FUR-FD I)

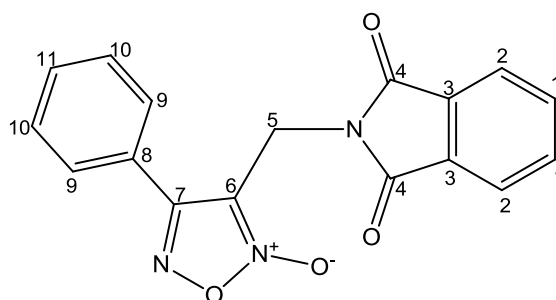
Reação



Procedimento

Adicionou-se a um balão de 50mL, 1,0g (4,8mmol) cloreto de metilfuroxano (3), 0,97g (5,2mmol) de ftalimida potássica e 12mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF), o meio reacional foi mantido em refluxo a 90°C, sob agitação constante por 28 horas. Ao fim da reação, adicionou-se ao meio reacional 15mL de solução saturada de cloreto de sódio, houve a formação de precipitado que foi filtrado a vácuo, por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como fase estacionária (FE) sílica gel e fase móvel (FM) 5:5 hexano:acetato de etila (v/v) o produto estava puro e forneceu 1,67g (rendimento de 91,2%). O produto apresentou faixa de fusão (FF) de 155°C-159C, (PM: 326,36; C₁₇H₁₁N₃O₄).

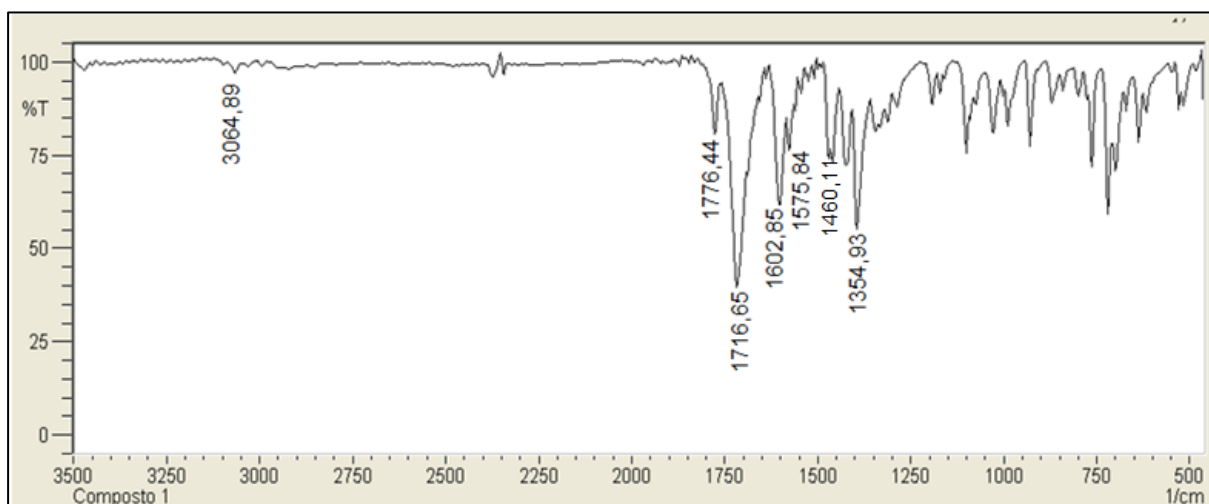
Caracterização estrutural:



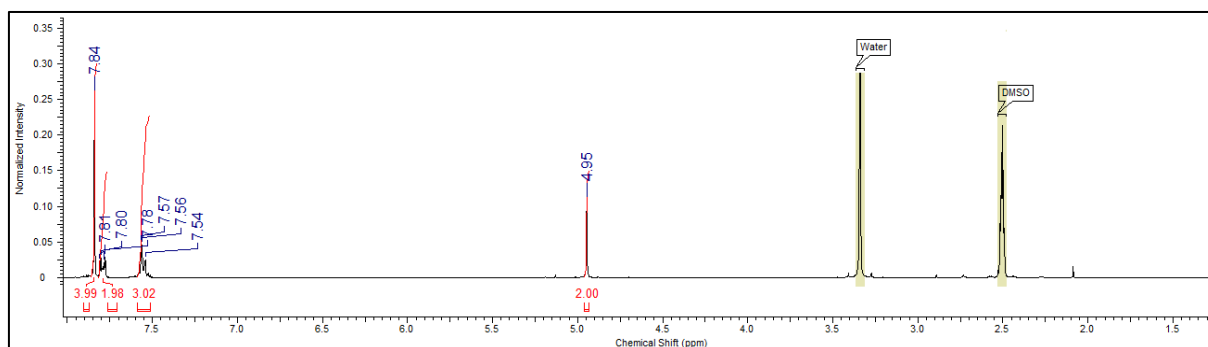
Anexos

Infravermelho (pastilha de KBr): C-H aromático: $3064,89\text{cm}^{-1}$; C=O imida (simétrico e assimétrico): $1776,44\text{cm}^{-1}$ e $1716,65\text{cm}^{-1}$; C=N furoxano: $1602,85\text{cm}^{-1}$; C=C aromático: $1575,84\text{cm}^{-1}$ e $1460,11\text{cm}^{-1}$; C-N-C: $1354,93\text{cm}^{-1}$.

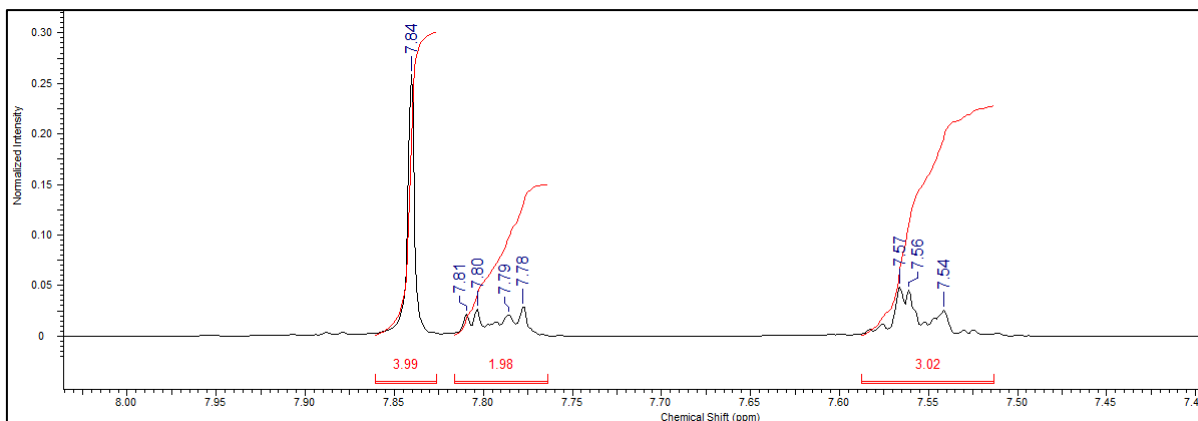
RMN ^1H (300MHz; DMSO_{d6}): δ 4,95 (H_5 ; 2H; s); δ 7,57-7,54 (H_{10} e H_{11} ; 3H; m); δ 7,84 (H_1 e H_2 ; 4H; m); δ 7,81-7,78 (H_9 ; 2H; dd – $J_{\text{orto}} = 2,2\text{Hz}$ / $J_{\text{meta}} = 7,5\text{Hz}$) ppm.



Espectro 1 - Espectro de infravermelho do produto Lapdesf FUR-FD I (pastilha de KBr)

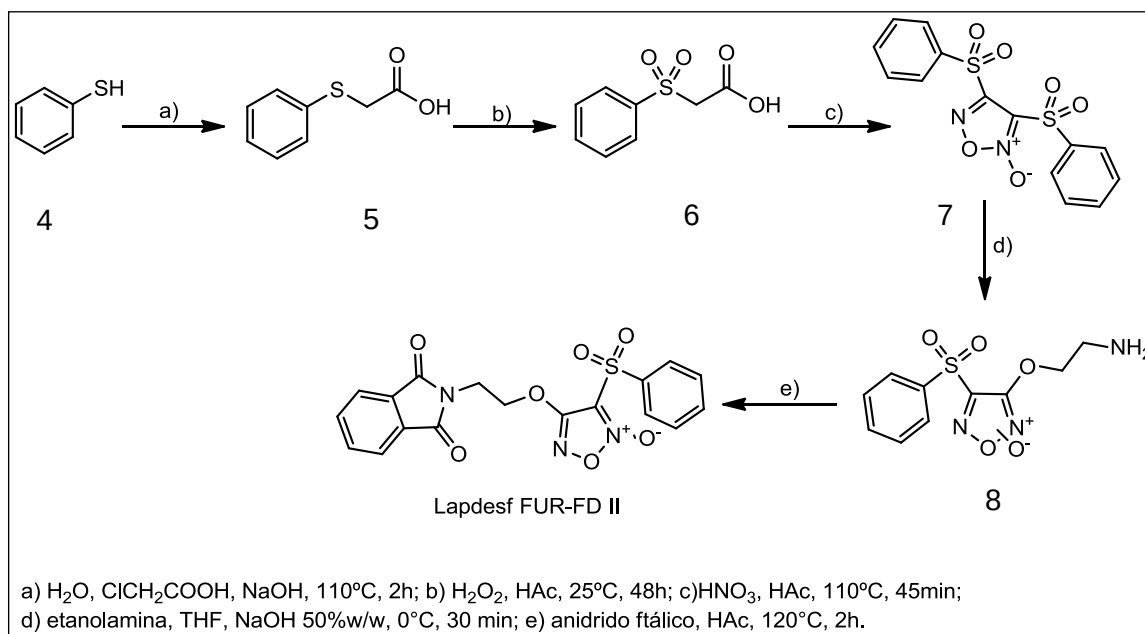


Espectro 2 - Espectro de ressonância magnética nuclear do Lapdesf FUR-FD I (RMN ^1H ; 300MHz; DMSO_{d6})



Espectro 3 - Espectro de ressonância magnética nuclear do Lapdesf FUR-FD I (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6) – ampliação região aromática.

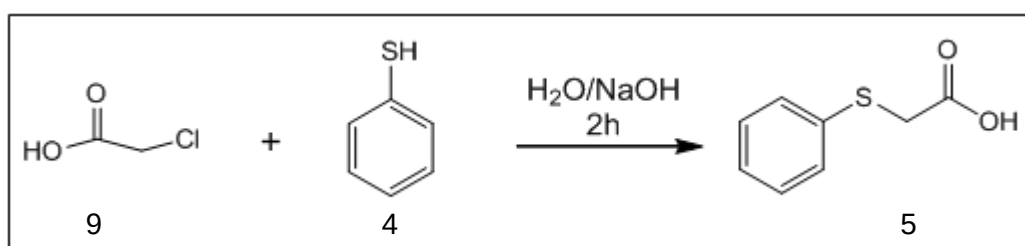
1.2 Síntese do composto Lapdesf FUR-FD II



Esquema 16 - Obtenção do composto Lapdesf FUR-FD II obtido a partir do tiofenol.

1.2.1 Síntese do ácido feniltioacético (5) (adaptado de KENNY *et al.*, 1961)

Reação

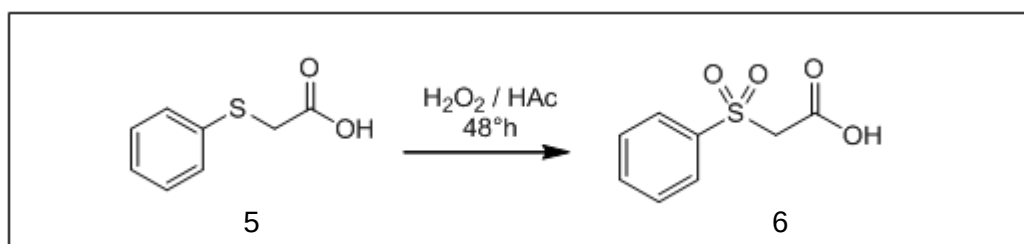


Procedimento

Em um balão de 250mL adicionou-se 9,3mL (90,7mmol) de tiofenol (4) em 40 mL de água destilada. Posteriormente adiciona-se 7,62g (190,6mmol) de hidróxido de sódio (NaOH) e a mistura foi mantida em agitação por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se lentamente 9,44g (99,84mmol) de ácido monocloroacético (9). A mistura reacional foi mantida em refluxo, aquecida a 110°C e mantida em agitação por 2 horas. Após decorrido o tempo de reação o meio reacional foi resfriado em banho de gelo e o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado em abundancia com água destilada gelada. Após seco produto foi obtido 13,2g (rendimento de 86,6%) de um sólido branco (FF: 59°C-61°C; PM: 168,21; C₈H₈O₂S).

1.2.2 Síntese ácido fenilsulfonilacético (6) (adaptado de KENNY *et al.*, 1961)

Reação

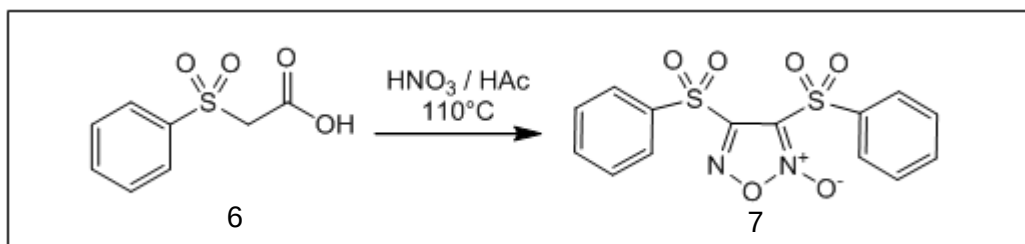


Procedimento

Em um balão de 250mL adicionou-se 5,0g (29,7mmol) de ácido feniltioacético (5) em 40,0mL de ácido acético glacial, após solubilizar o ácido feniltioacético (5) o meio reacional foi mantido em banho de gelo e adicionou-se 15,0mL de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação vigorosa e temperatura ambiente por 48 horas. Para isolar o produto foi adicionado 100mL de solução saturada de NaCl e feita uma extração utilizando acetato de etila (4 x 15mL). Foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro para retirar resíduos de água e então evaporou-se a fase orgânica sob pressão reduzida. O produto foi obtido na forma de cristais brancos, a massa total obtida foi de 5,61g (rendimento de 94,27%), (PM: 200,21; C₈H₈O₄S).

1.2.3 Síntese 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (7)

Reação

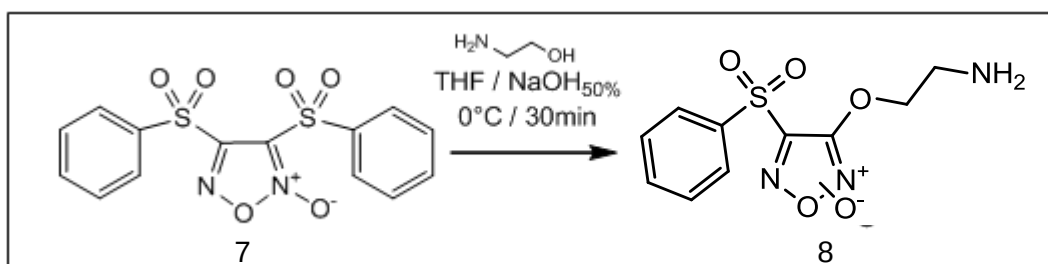


Procedimento

Adicionou-se em um balão de 125mL, 3,21g (16,03mmol) do ácido fenilsulfonilacético (6) em 10mL de ácido acético glacial mantendo a temperatura em 0°C. Lentamente adicionou-se 5mL de ácido nítrico fumegante 85,7%. A mistura foi mantida em agitação e banho de gelo por 5 minutos e depois mantida em refluxo a 110°C por 45 minutos. Ao fim da reação o meio reacional foi esfriado e adicionada água destilada gelada. Há a formação de precipitado que foi filtrado e lavado com água destilada gelada. O produto final foi recristalizado em uma mistura de acetato de etila/diclorometano/hexano (1:1:1), fornecendo uma massa total de 1,69g (rendimento de 37,25%) de um sólido branco-esverdeado com faixa de fusão: 140°C-142°C (PM: 366,38; C₁₄H₁₀N₂O₆S₂).

1.2.4 Síntese 4-(2-aminoetoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (8)

Reação



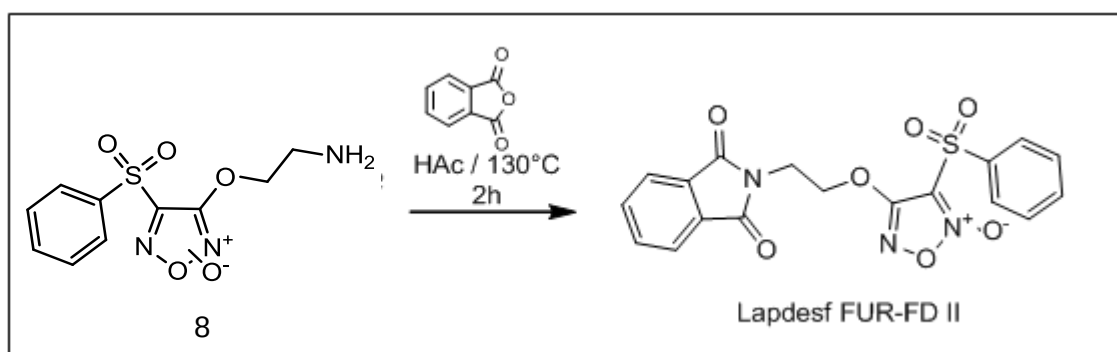
Procedimento

Em um balão de 50mL, adicionou-se 2,0g (5,53mmol) do derivado (7) em 20,0mL de tetrahidrofurano (THF). Em seguida adicionou-se 0,83mL (13,7mmol) de etanolamina e 0,66mg (16,6mmol) de NaOH 50%,. A reação foi mantida em agitação por 30 minutos e

temperatura ambiente. O isolamento do produto foi realizado adicionando-se 20,0mL de solução saturada de NaCl, o produto foi isolado realizando-se extração que foi feita utilizando-se acetato de etila (4 x 30mL). O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como FE sílica gel e FM 95:5 acetato de etila:metanol (v/v). Obteve-se 435mg (rendimento de 27,84%) do produto (8) de cor amarela e aspecto oleoso (PM: 285,04; $C_{10}H_{11}N_3O_5S$).

1.2.5 Síntese do composto 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)etoxi]-3-(fenilsulfonil)-2-N-1,2,5-oxadiazol (Lapdesf FUR-FD II)

Reação

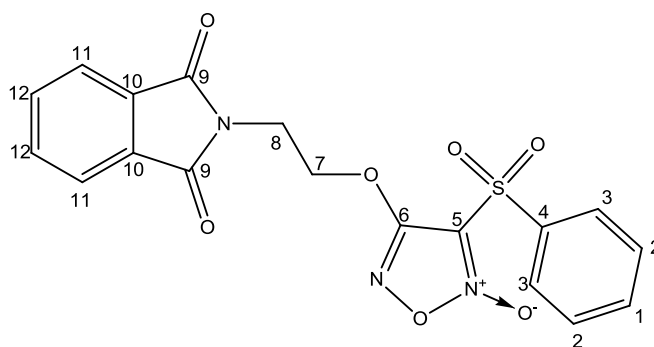


Procedimento

Em balão de 25,0mL, adicionou-se 230,0mg (0,598mmol) do derivado furoxânico (8) e 88,0mg (0,598mmol) de anidrido ftálico e 7,0mL de ácido acético. A reação foi mantida sob agitação e refluxo em atmosfera de nitrogênio por 2 horas. O isolamento foi realizado por resfriamento do balão reacional seguido da adição de cerca de 4,0mL de água gelada/gelo com adição de hidróxido de sódio 20% até pH=7. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 40mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e evaporada sob pressão reduzida para fornecer 110mg de um sólido de coloração marrom. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica utilizando-se como FE sílica gel e FM 6:4 hexano:acetato de etila (v/v) para obtenção de 72mg (rendimento de 24%) de um sólido branco (Lapdesf FUR-FD II) com faixa de fusão entre 132°C-137°C (PM = 415,05; $C_{18}H_{13}N_3O_7S$).

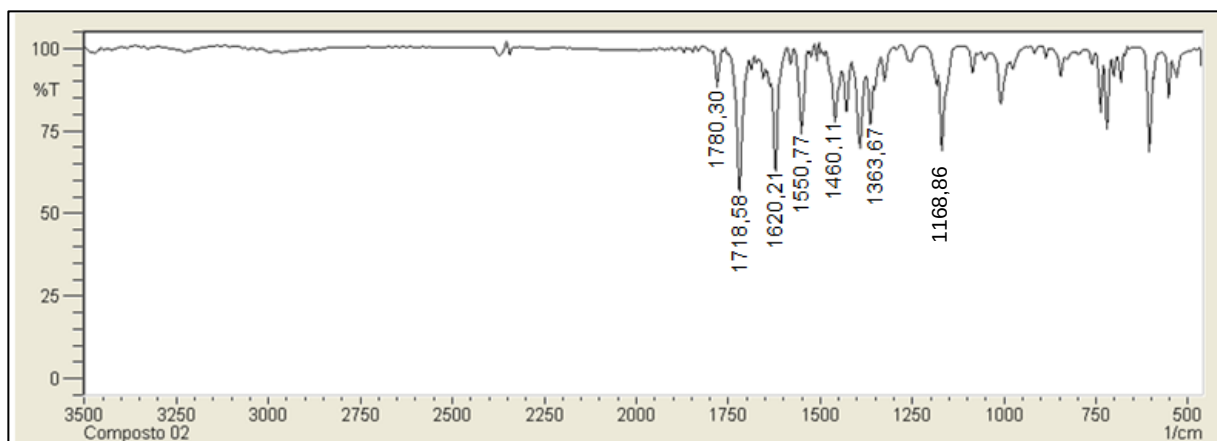
Anexos

Caracterização estrutural:

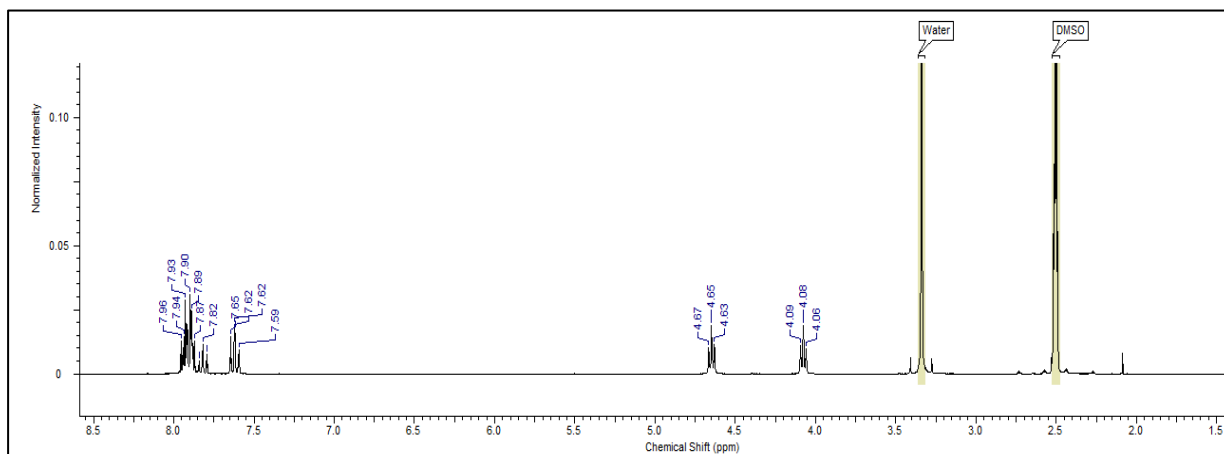


Infravermelho (pastilha de KBr): C=O imida (simétrico e assimétrico): $1780,30\text{cm}^{-1}$ e $1718,58\text{cm}^{-1}$; C=N furoxano: $1620,21\text{cm}^{-1}$ e $1550,77\text{cm}^{-1}$; C=C aromático: $1460,11\text{cm}^{-1}$; N-O: $1363,67\text{cm}^{-1}$; S=O: axial simétrica: $1168,86\text{cm}^{-1}$.

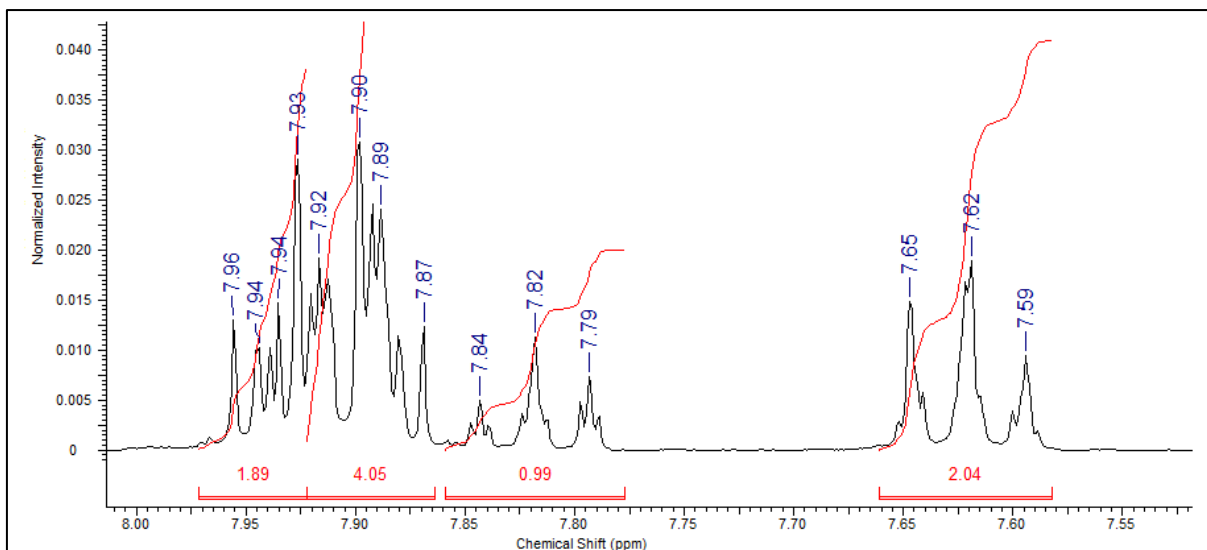
RMN ^1H (300MHz; DMSO_{d6}): δ 4,65 (H_7 ; 2H; t); δ 4,08 (H_8 ; 2H; t); δ 7,92-7,87ppm (H_{11} , H_{12} ; 4H; m); δ 7,96-7,93ppm (H_3 ; 2H; m); δ 7,65-7,59ppm (H_2 ; 2H; dd; $J_{\text{orto}} = 7,62\text{Hz}$ / $J_{\text{meta}} = 1,76\text{Hz}$); δ 7,84-7,79ppm (H_1 ; 1H; tt; $J_{\text{orto}} = 7,6\text{Hz}$ / $J_{\text{meta}} = 1,2\text{Hz}$)



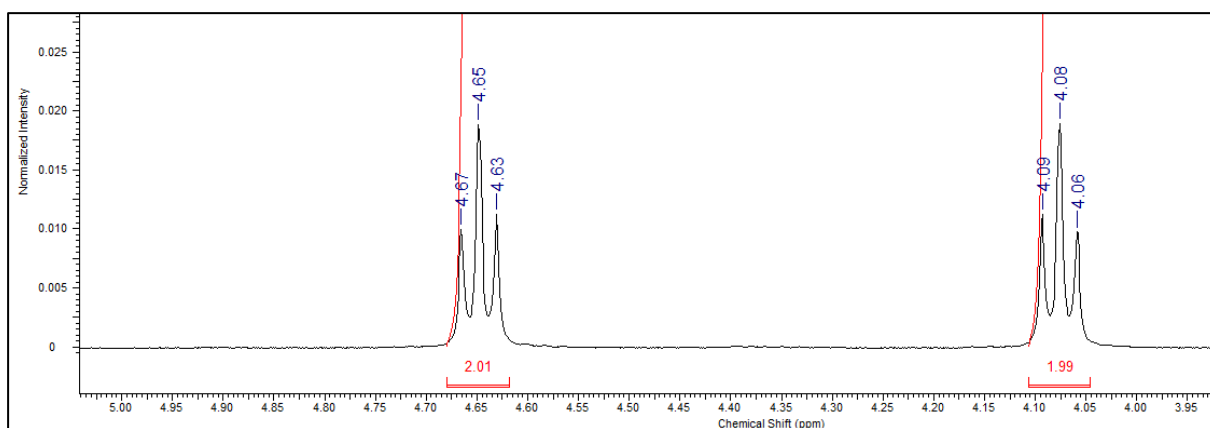
Espectro 4 - Espectro no infravermelho do Lapdesf FUR-FD II (pastilha de KBr).



Espectro 5 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD I (300 MHz; DMSO_{d6}).

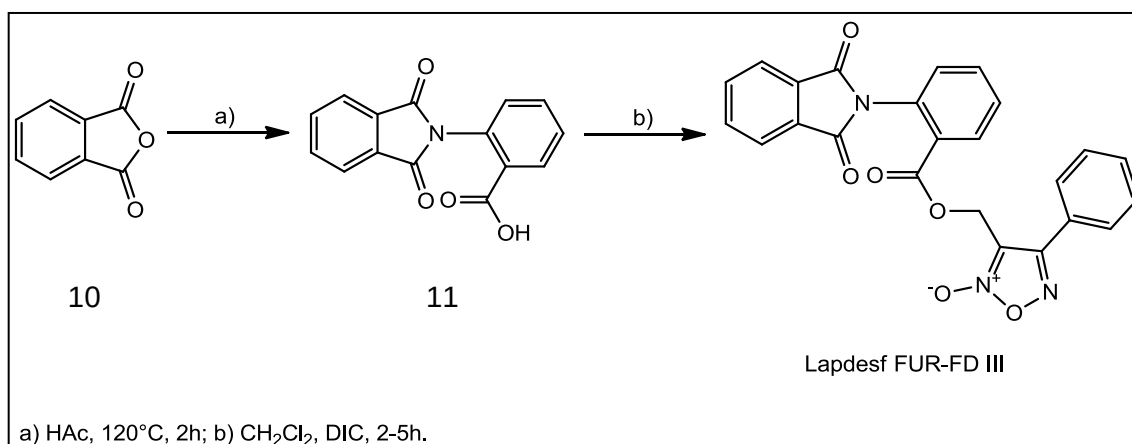


Espectro 6 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD II (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação região aromática.



Espectro 7 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD II (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação região alquílica.

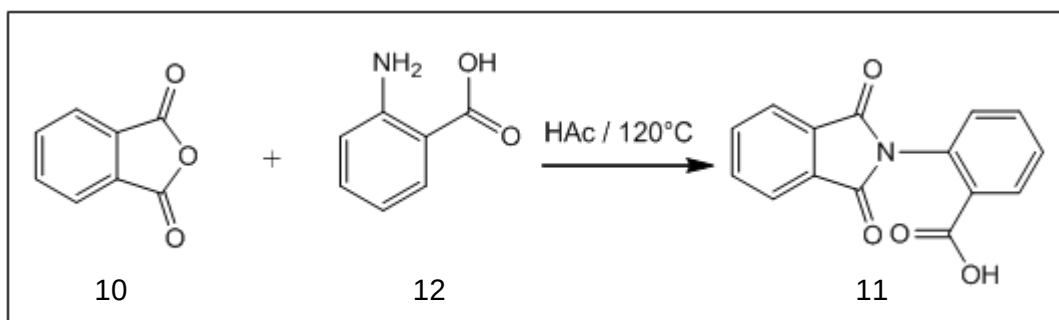
1.3 Síntese do composto Lapdesf FUR-FD III



Esquema 17 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD III.

1.3.1 Síntese do ácido 2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzoico (10)

Reação

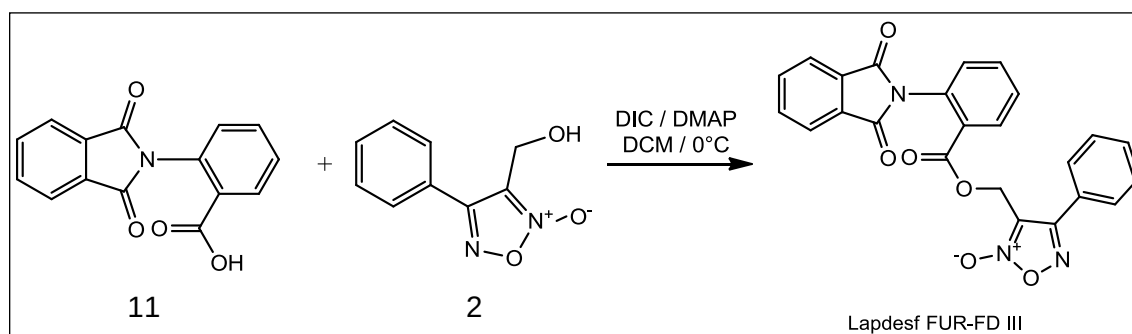


Procedimento

Em um balão de 50mL, adicionou-se 1,0g (7,29mmol) de ácido 4-aminobenzoico (11), 1,0g (6,75mmol) de anidrido ftálico (10) e 10mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi mantida em refluxo e agitação a temperatura de 120°C por 1 hora. Para isolar o produto foi feito o resfriamento da mistura reacional e posterior filtração a vácuo do precipitado, que foi lavado com água gelada. O produto obtido foi recristalizado utilizando-se etanol 95% e água. Obteve-se uma massa total de 1,19g (rendimento de 58,5%), do produto final (11) o qual apresentou a coloração rósea e faixa de fusão: 216°C-219°C (PM: 267,23; C₁₄H₉NO₄).

1.3.2 Síntese do 3-([2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzoil]oxi)metil)-2-hidroxi-4-fenil-1,2,5-oxadiazol (Lapdesf FUR-FD III)

Reação



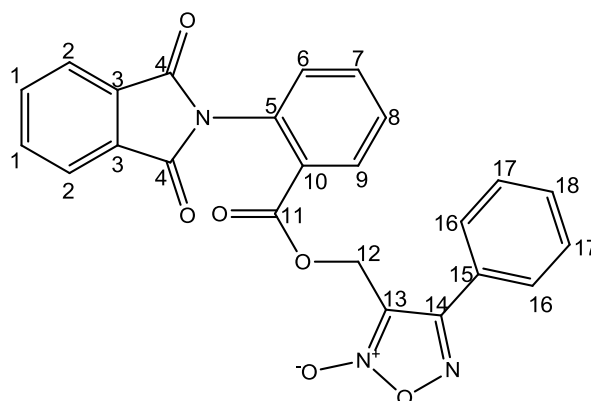
Procedimento

Adicionou-se um balão de 50mL, 0,4g (1,5mmol) do derivado ftalimidico (11), 0,25g (1,3mmol) do derivado furoxânico (2), 0,562g (2,72mmol) de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 0,018g (0,14mmol) de dimetilaminipiridina (DMAP). Por fim adicionou-se 15mL de

Anexos

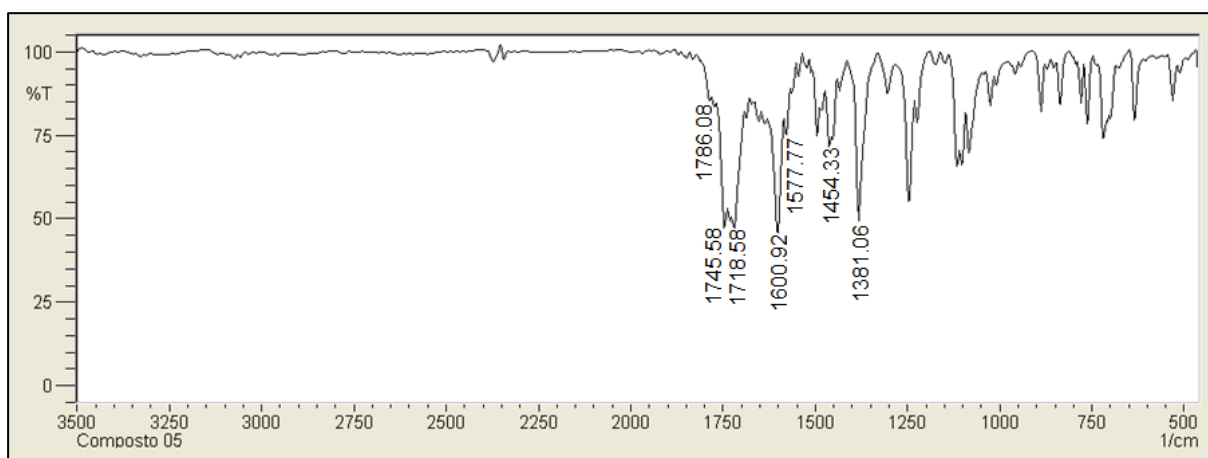
diclorometano destilado e manteve-se a reação a 0°C em agitação vigorosa por 5 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como fase estacionária (FE) sílica gel e fase móvel (FM) 5:5 hexano:acetato de etila (v/v). Ao final da reação o solvente foi retirado do meio reacional em pressão reduzida e o produto obtido purificado por coluna cromatográfica FE sílica gel e FM 6:4 hexano:acetato de etila (v/v), fornecendo 327mg (rendimento de 49,05%) de um sólido branco com faixa de fusão: 181°C-184°C, (PM: 441,39; C₂₄H₁₅N₃O₆).

Caracterização estrutural

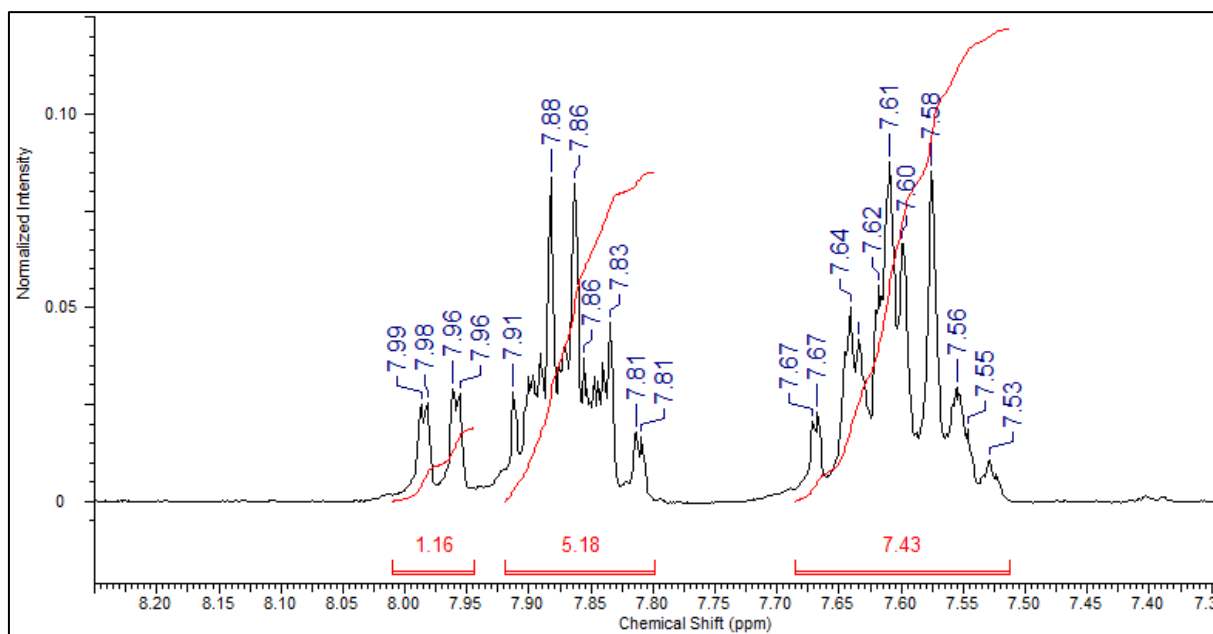
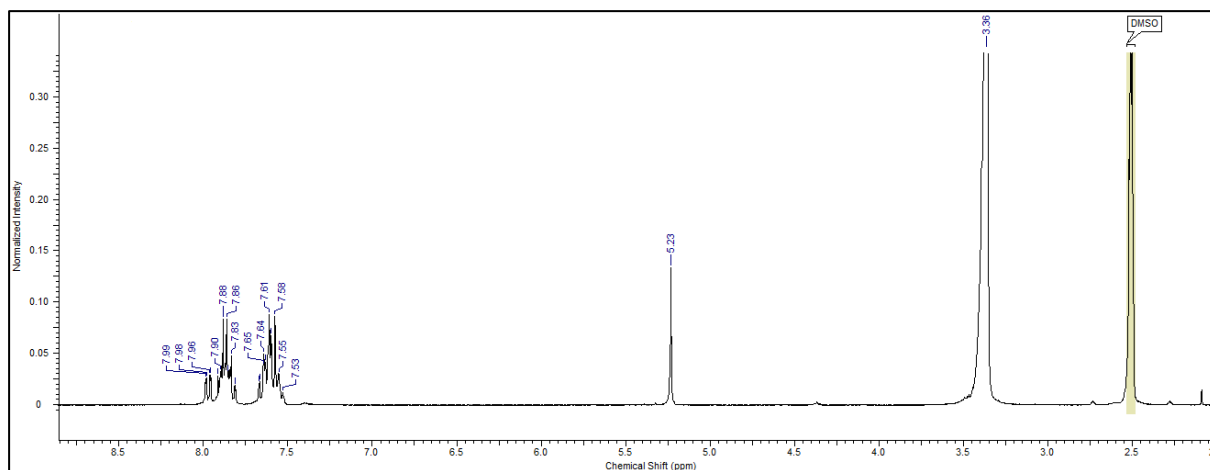


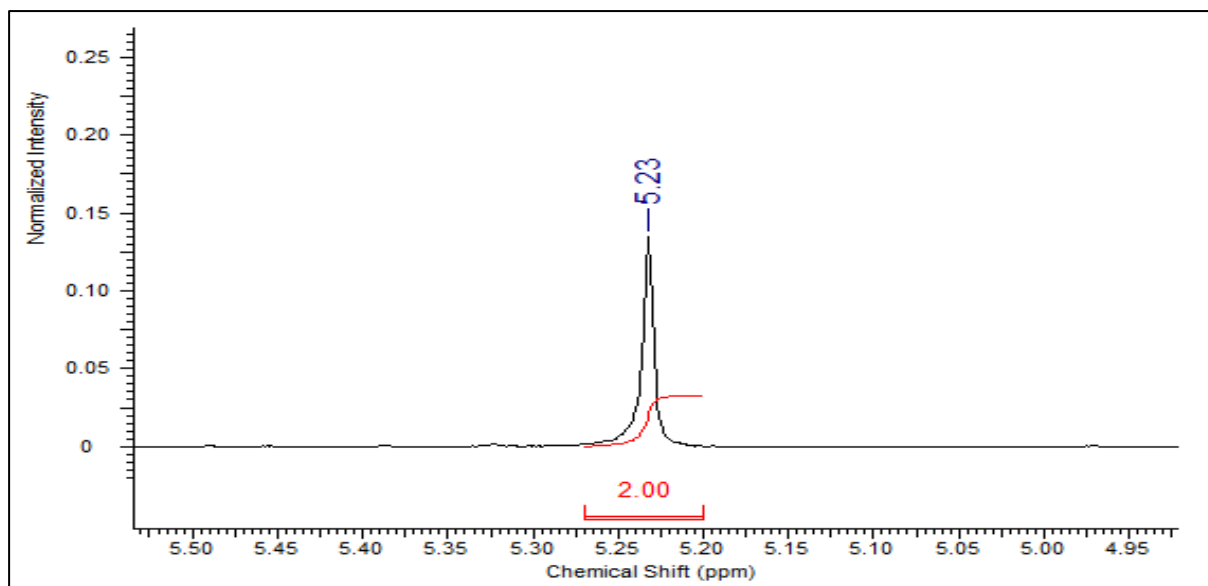
Infravermelho (pastilhas KBr): C=O imida (simétrico e assimétrico): 1786,08cm⁻¹ e 1718,58cm⁻¹; C=O éster: 1745,58cm⁻¹; C=N furoxano: 1600,92cm⁻¹; C=C aromático: 1577,77cm⁻¹ e 1454,33cm⁻¹; C-N-C: 1381,06cm⁻¹.

RMN ¹H (300MHz; DMSO_{d6}): δ 5,23 (H₁₂; 2H; s); δ 7,97 (H₉; 1H; dd; J_{orto}= 7,8Hz/ J_{meta}= 1,6Hz); δ 7,91-7,81 (H₁, H₂ e H₁₈; 5H; m); δ 7,67-7,53 (H₁₇, H₁₆, H₆, H₇ e H₈; 7H; m) ppm.



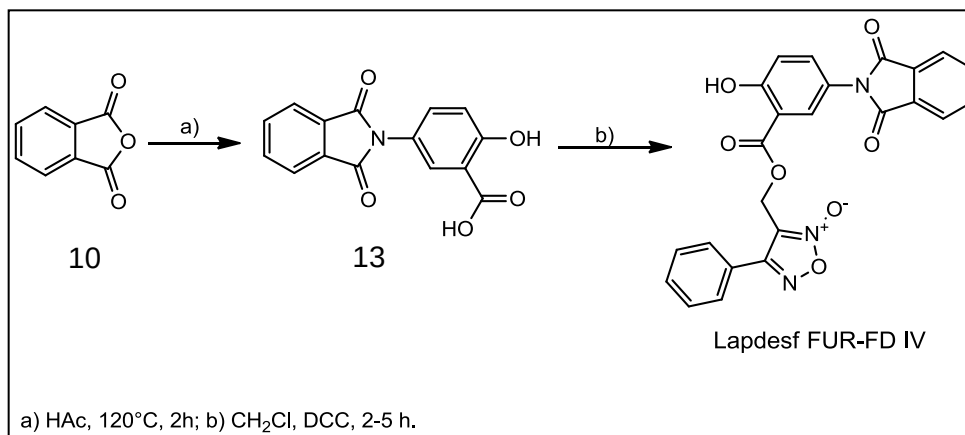
Espectro 8 - Espectro na região de infravermelho do composto Lapdesf FUR-FD III (pastilha de KBr)





Espectro 11 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD III (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação região alquílica.

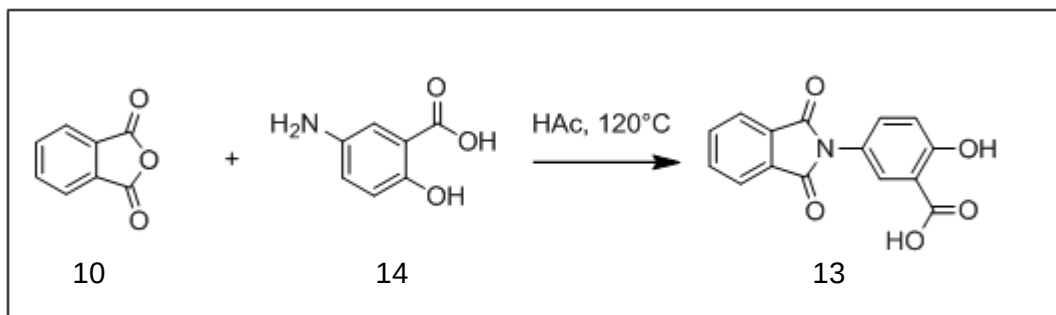
1.4 Síntese do composto Lapdesf FUR-FD IV



Esquema 18 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD IV.

1.4.1 Síntese do 5-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-hidróxibenzóico (12)

Reação

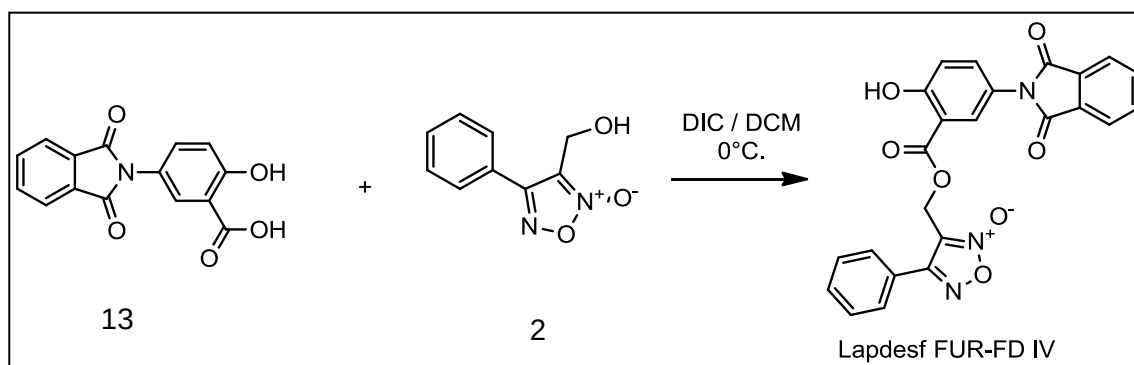


Procedimento

Em um balão de 50mL, adicionou-se 1,0g (6,52mmol) de mesalazina (14), 1,0g (6,74mmol) de anidrido ftálico (10) e 20mL de ácido acético glacial. A reação foi mantida em refluxo a 120°C sob agitação por 1 hora. Ao final da reação o meio reacional foi resfriado utilizando banho de gelo, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado abundantemente com água gelada. O sólido resultante da reação foi então recristalizado utilizando etanol 95% e água. O produto final (13) foi obtido com massa de 1,58g (rendimento de 87,4%) na forma amorfa de coloração cinza e FF: acima de 250°C, (PM: 282,25, C₁₅H₉NO₅).

1.4.2 Síntese do composto 3-([5-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-hidroxibenzoil]oxi}metil)-2-N-óxido-4-fenil-1,2,5-oxadiazol (Lapdesf FUR-FD IV)

Reação

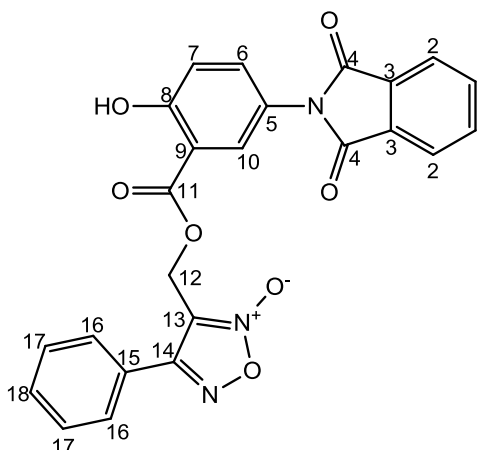


Procedimento

Adicionou-se a um balão de 50mL, 0,42g (1,50mmol) de derivado ftalimídico (13), 0,25g (1,30mmol) do intermediário (2), 0,56g (2,72mmol) de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 0,02g (0,14mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) e 15 mL de diclorometano destilado. O meio reacional foi então mantido em agitação constante a temperatura de 0°C durante 5 horas, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como fase estacionaria (FE) sílica gel e fase móvel (FM) 5:5 hexano:acetato de etila (v/v). Ao fim da reação o solvente foi retirado sob pressão reduzida e o produto resultante foi purificado por coluna cromatográfica FE sílica gel e FM 6:4 hexano:acetato de etila (v/v), fornecendo 216,13mg (rendimento de 36,30%) com FF: 156°C-166°C, (PM: 457,39; C₂₄H₁₅N₃O₇).

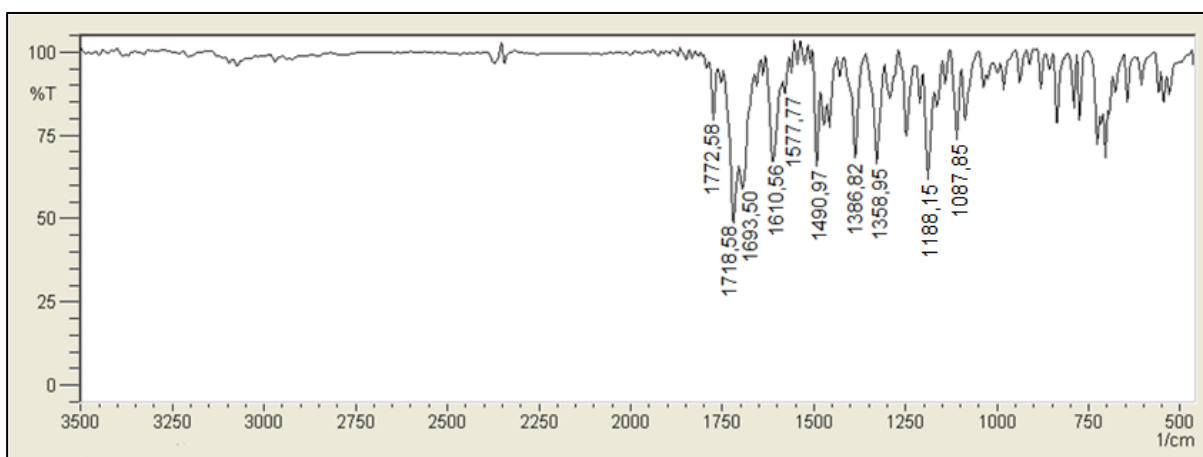
Anexos

Caracterização estrutural:

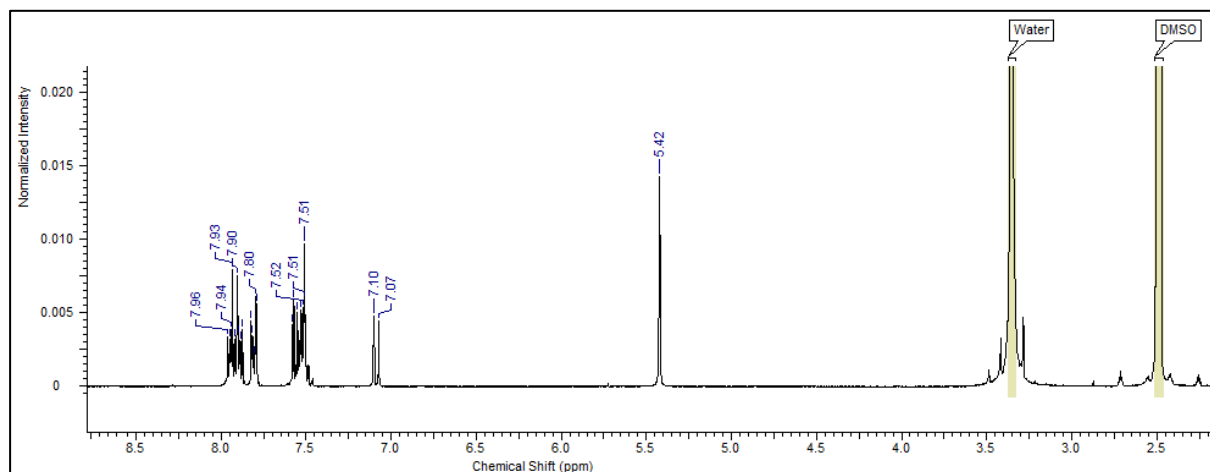


Infravermelho (pastilhas KBr): C=O imida (simétrico e assimétrico): $1772,58\text{cm}^{-1}$ e $1693,50\text{cm}^{-1}$; C=O éster $1718,58\text{cm}^{-1}$; C=N furoxano: $1610,56\text{cm}^{-1}$; C=C aromático: $1577,77\text{cm}^{-1}$ e $1490,97\text{cm}^{-1}$; C-N-C: $1386,82\text{cm}^{-1}$; C-O éster: $1188,15\text{cm}^{-1}$ e $1087,85\text{cm}^{-1}$.

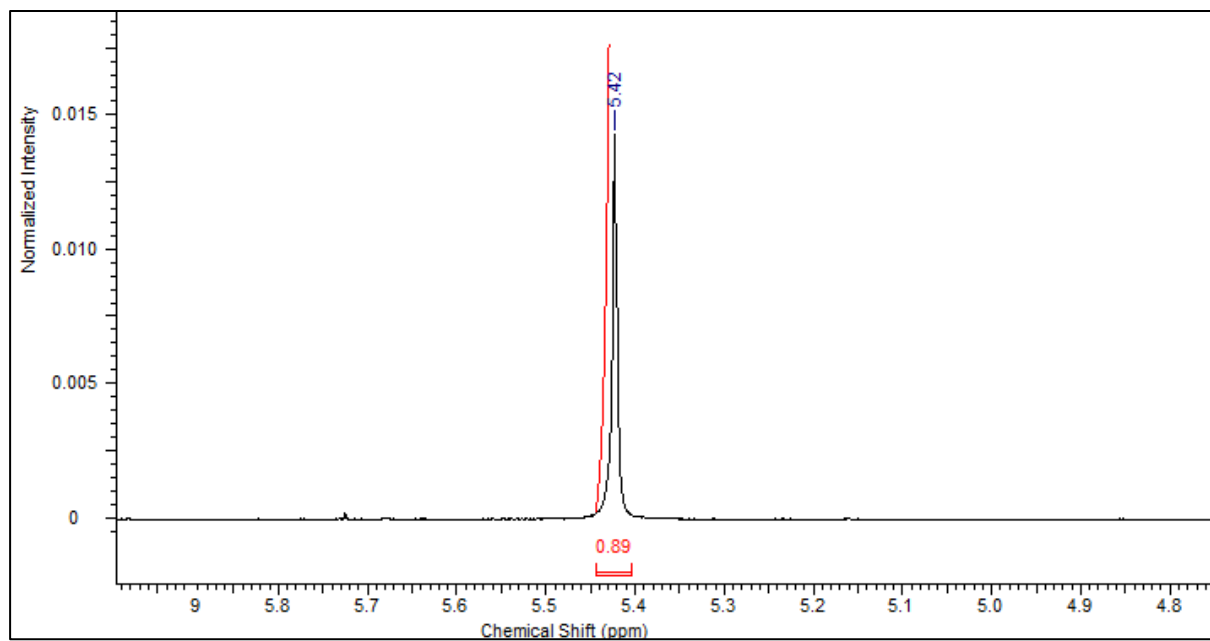
RMN ^1H (300MHz; DMSO_{d6}): δ 5,42 (H_{12} ; 2H; s); δ 7,09 (H_7 ; 1H; d; $J_{\text{orto}} = 8,79\text{Hz}$); δ 7,83-7,78 (H_{16} ; 2H); δ 7,58-7,50 (H_{18} , H_{17} , H_6 e H_{10} ; 5H; m); δ 7,95-7,88 (H_1 e H_2 , 4H, m) ppm.



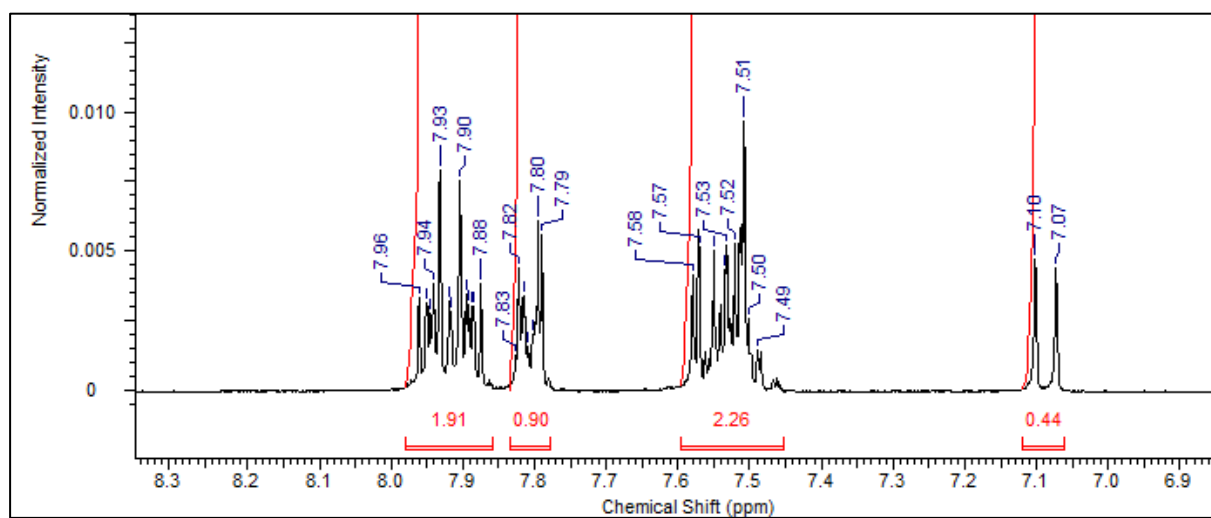
Espectro 12 - Espectro na região de infravermelho do composto Lapdesf FUR-FD IV (pastilha de KBr).



Espectro 13 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD IV (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}).

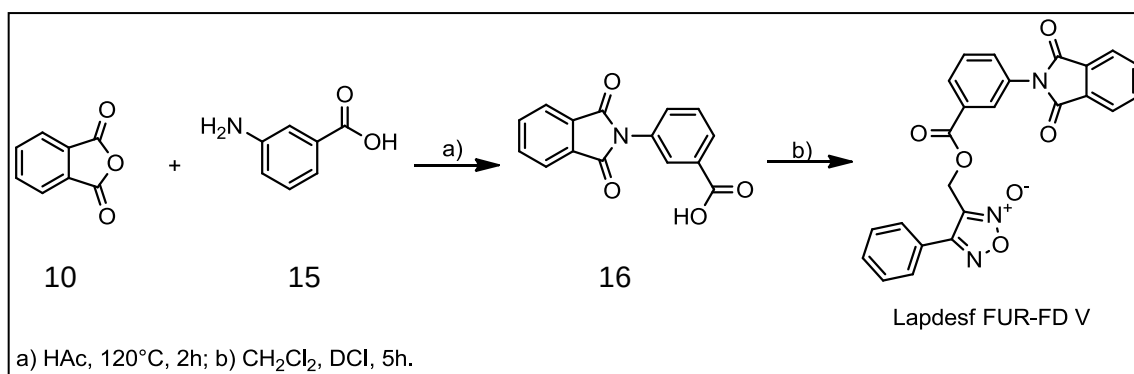


Espectro 14 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD IV (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação região alquílica.



Espectro 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD IV (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6) – ampliação região aromática.

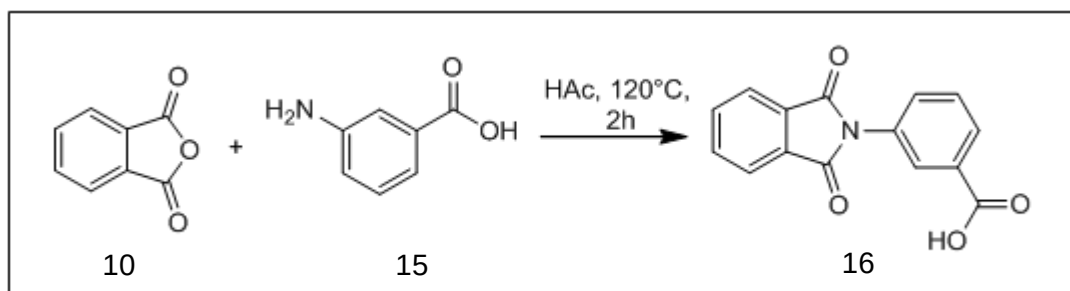
1.5 Síntese do composto Lapdesf FUR-FD V



Esquema 19 - Síntese do composto Lapdesf FUR-FD V.

1.5.1 Síntese do ácido 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzóico (16)

Reação

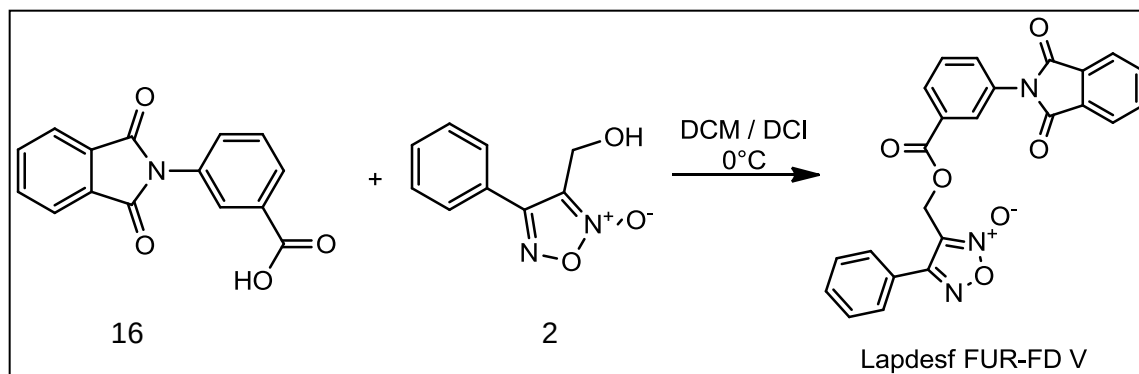


Procedimento

Em um balão de 50mL, adicionou-se 1,0g (7,29mmol) de ácido 3-aminobenzoico (15), 1,0g (6,75mmol) de anidrido ftálico (10) e 20mL de ácido acético glacial. A reação permaneceu em refluxo a 120°C por 1 hora em agitação constante. Ao final da reação o meio reacional foi resfriado utilizando banho de gelo, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado abundantemente com água gelada. O sólido resultante da reação foi então recristalizado utilizando etanol 95% e água. O produto final (16) foi obtido com massa de 1,40g (rendimento de 79,0%) na forma amorfa de coloração branca e FF: acima de 283°C-286°C, (C₁₅H₉NO₄; PM= 267,23).

1.5.1 Síntese do composto 3-({[3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2 il)benzoil]oxi} metil)-2-N-óxido-4-fenil-1,2,5-oxadiazol (Lapdesf FUR-FD V)

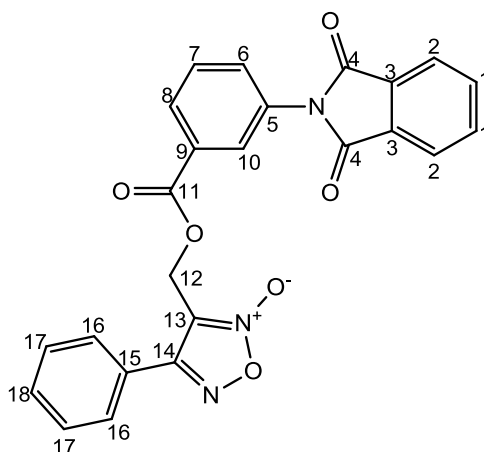
Reação



Procedimento

Adicionou-se a um balão de 50mL, 0,42g (1,50mmol) de derivado ftalimídico (16), 0,25g (1,30mmol) de furoxano fenilado (2), 0,56g (2,72mmol) de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 0,02g (0,14mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) e 15 mL de diclorometano destilado. O meio reacional foi então mantido em agitação constante a temperatura de 0°C durante 5 horas, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como fase estacionaria (FE) sílica gel e fase móvel (FM) 5:5 hexano:acetato de etila (v/v). Ao fim da reação o solvente foi retirado sob pressão reduzida e o produto resultante foi purificado por coluna cromatográfica FE sílica gel e FM 6:4 hexano:acetato de etila (v/v), fornecendo 261,44mg (rendimento de 39,21%) com FF: 156°C-158°C, (PM: 441,39; C₂₄H₁₅N₃O₆).

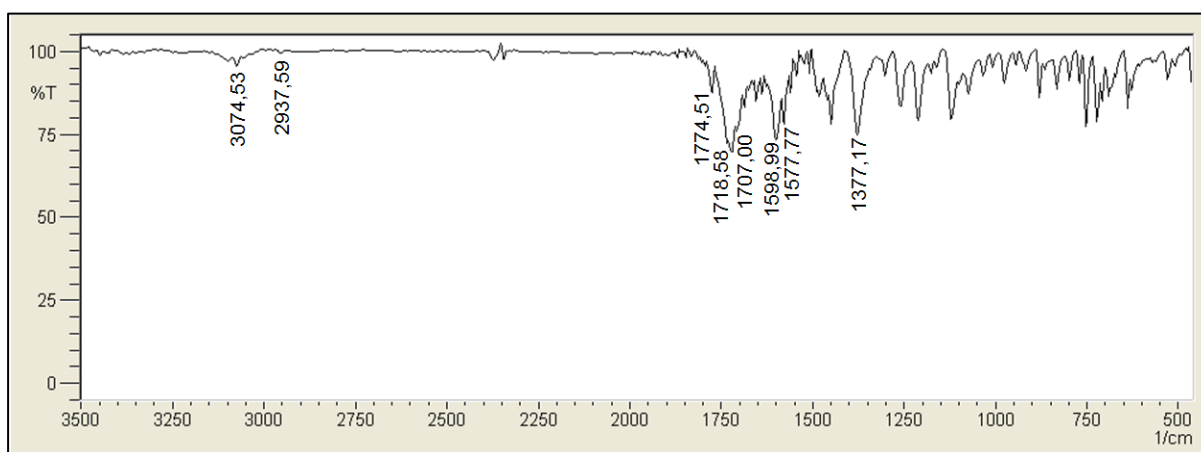
Caracterização estrutural



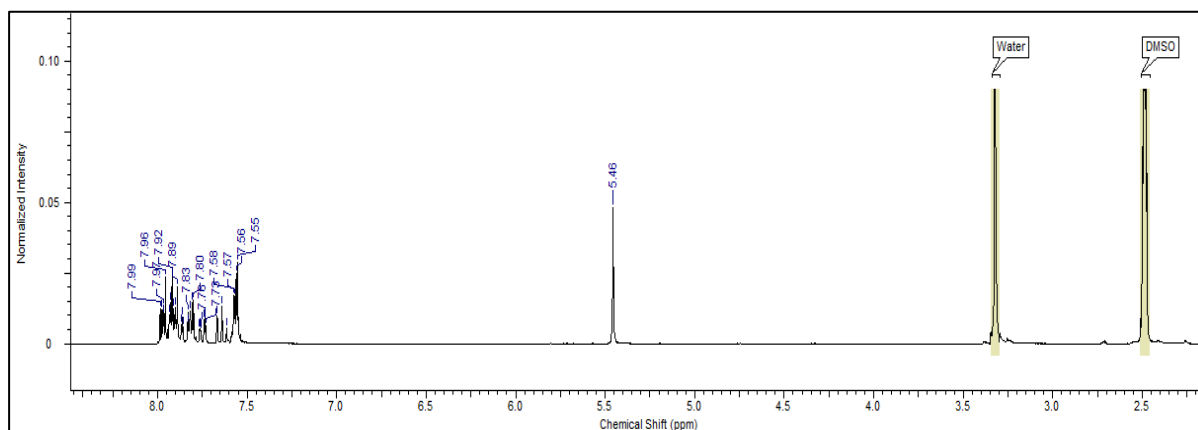
Anexos

Infravermelho (pastilha KBr): C-H aromático: $3074,53\text{cm}^{-1}$; C-H alquílico: $2937,59\text{cm}^{-1}$; C=O imida (simétrico e assimétrico): $1774,51\text{cm}^{-1}$ e $1707,00\text{cm}^{-1}$; C=O éster: $1718,58\text{cm}^{-1}$; C=N furoxano: $1577,77\text{cm}^{-1}$; C=C aromático: $1598,99\text{cm}^{-1}$; C-N-C: $1377,17\text{cm}^{-1}$.

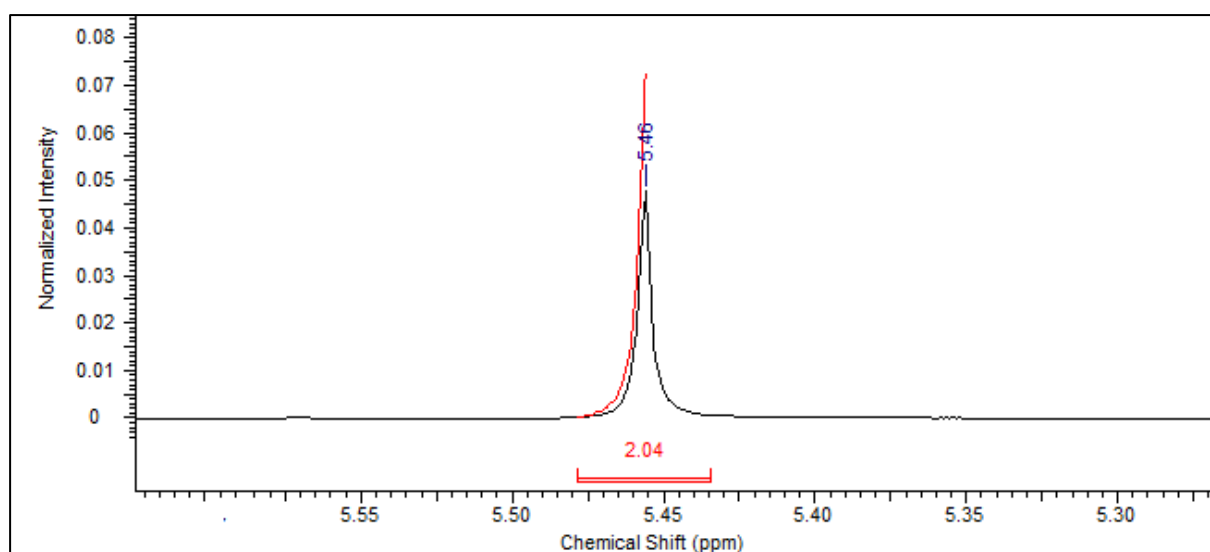
RMN ^1H (300MHz; DMSO_{d6}): δ 5,46 (H_{12} ; 2H; s); δ 7,93-7,86 (H_1 e H_2 ; 4H; m); δ 7,99-7,96 (H_8 e H_{10} ; 2H; m); δ 7,83-7,80 (H_{16} ; 2H; m); δ 7,75 (H_6 ; 1H; m); δ 7,67-7,62 (H_7 ; 1H; t; $J_{\text{orto}} = 8,2\text{Hz}/J_{\text{orto}} = 8,2\text{Hz}$); δ 7,58-7,55 (H_{17} e H_{18} ; 3H; m) ppm.



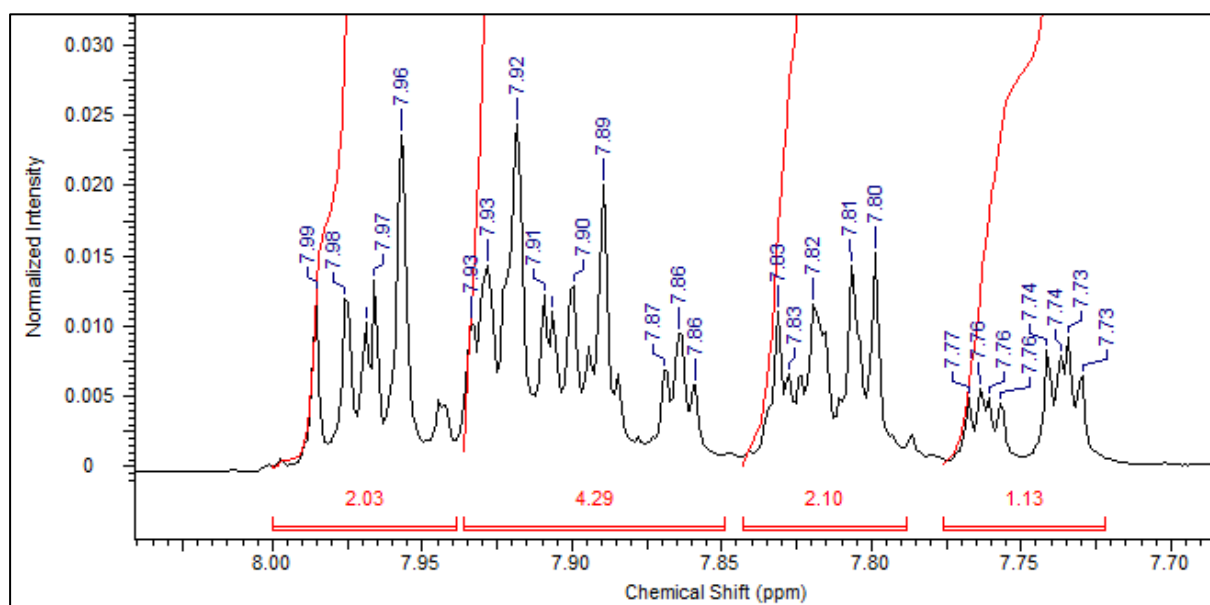
Espectro 16 - Espectro na região de infravermelho do composto Lapdesf FUR-FD V (pastilha de KBr).



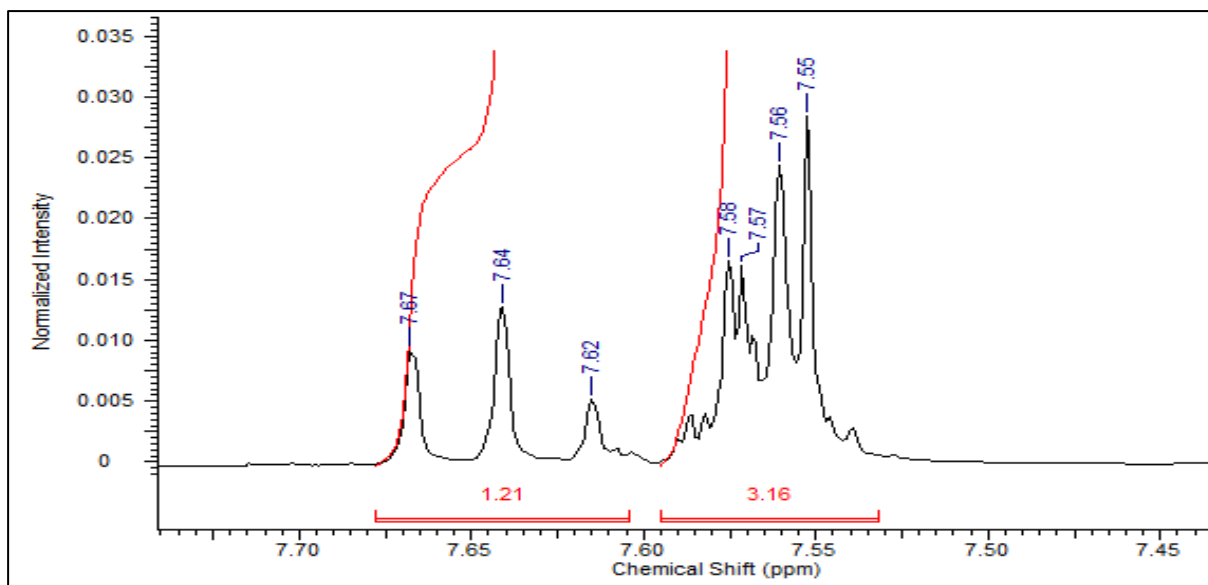
Espectro 17 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD V (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}).



Espectro 18 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD V (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6) – ampliação região alquílica.

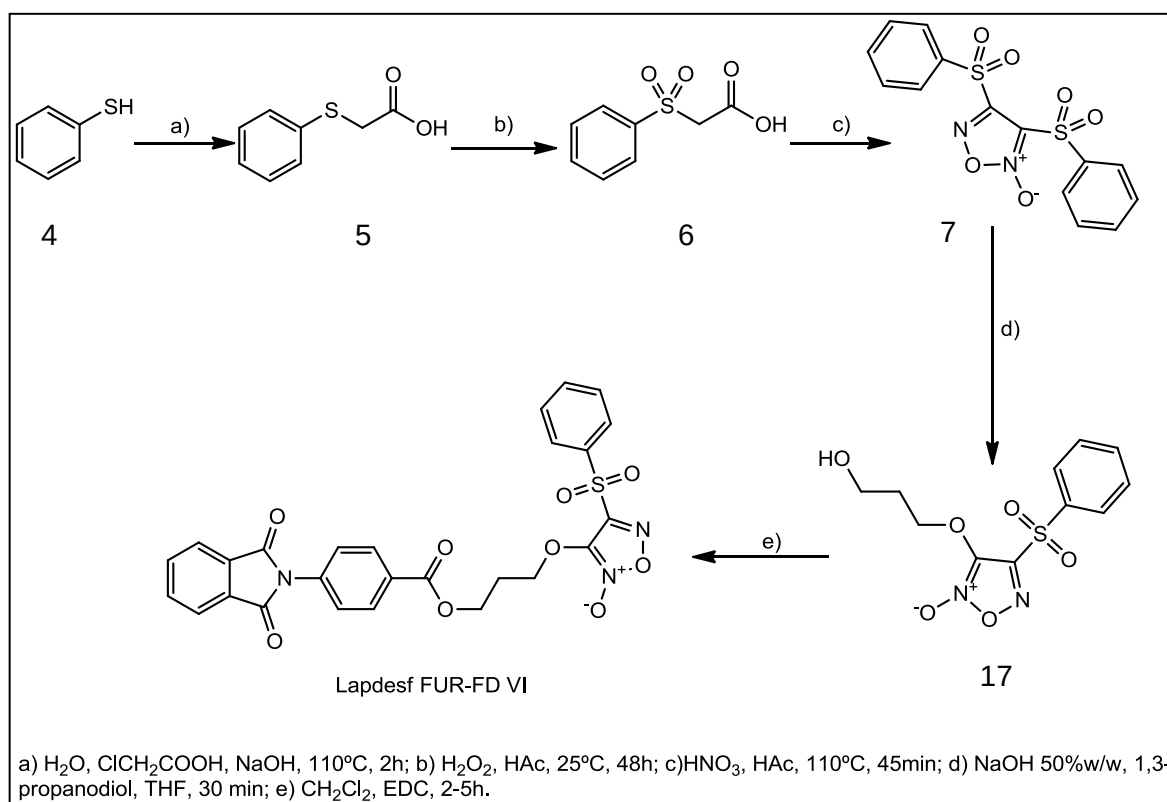


Espectro 19 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD V (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6) – ampliação região aromática.



Espectro 20 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD V (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6) – ampliação região aromática.

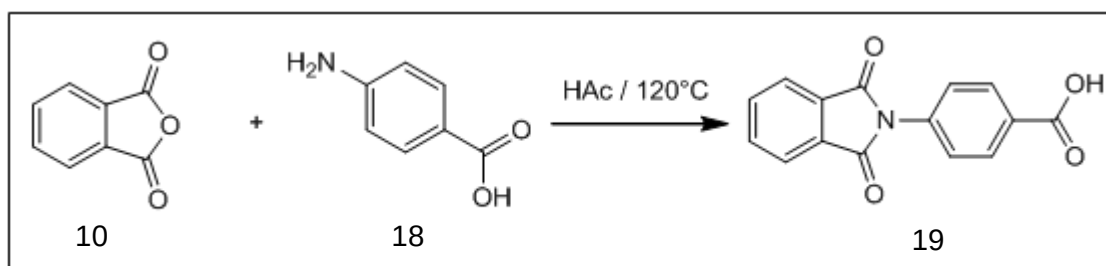
1.6 Síntese do composto Lapdesf FUR-FD VI



Esquema 20 - Obtenção do composto Lapdesf FUR-FD VI obtido a partir do tiofenol.

1.6.1 Síntese do ácido 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)benzoico (19)

Reação

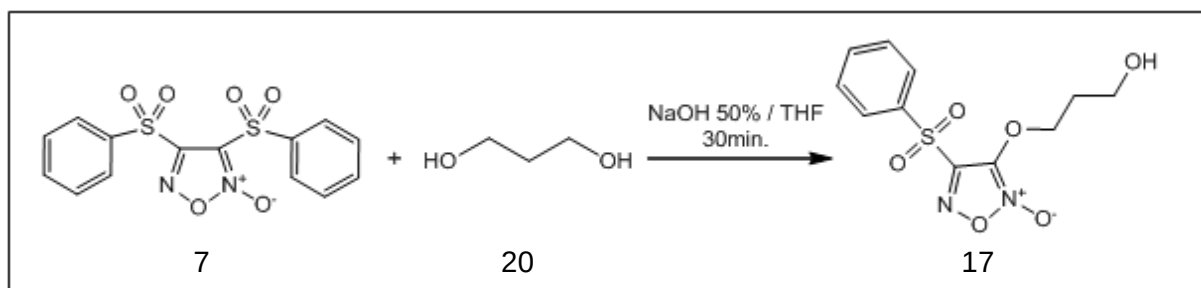


Procedimento

Em um balão de 50mL, adicionou-se 1,0g (7,29mmol) de ácido 4-aminobenzoico (18), 1,0g (6,75mmol) de anidrido ftálico (10) e 20mL de ácido acético glacial. A reação permaneceu em refluxo a 120°C por 1 hora em agitação constante. Ao final da reação o meio reacional foi resfriado utilizando banho de gelo, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado abundantemente com água gelada. O sólido resultante da reação foi então recristalizado utilizando etanol 95% e água. O produto final (19) foi obtido com massa de 1,55g (rendimento de 87,5%) na forma amorfa de coloração branca e FF: entre 287°C-290°C, (C₁₅H₉NO₄; PM= 267,23).

1.6.2 Síntese do ácido 3-(3-hidroxipropoxi)-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (18)

Reação



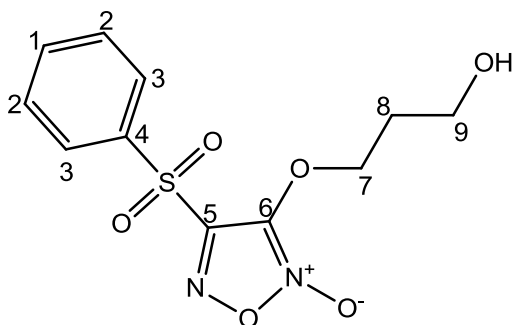
Procedimento

Em balão de 25mL contendo 1,09g (2,73mmol) do intermediário (7) e 2,05ml de 1,3-propanodiol (27,3mmol) em 8,0ml de tetrahidrofurano (THF), adicionou-se 0,219 g (2,73mmol) de solução de NaOH 50%. A mistura reacional foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente, e foi adicionado novamente 0,109g (1,37mmol) de solução de NaOH

Anexos

50%. Em seguida o meio reacional foi concentrado sob pressão reduzida. O isolamento foi feito por extração utilizando acetato de etila e lavando a mistura com água duas vezes, lava-se novamente a fase aquosa com acetato de etila e combinam-se as duas fases orgânicas obtidas. O produto resultante foi então purificado em coluna cromatográfica (éter de petróleo:acetato de etila 6:4), resultando em um sólido de cor branca. Obteve-se 1,09 g do produto final com rendimento de 72,9%, com faixa de fusão = 95°C-100°C, (PM: 300,29; $C_{11}H_{12}N_2O_6S$).

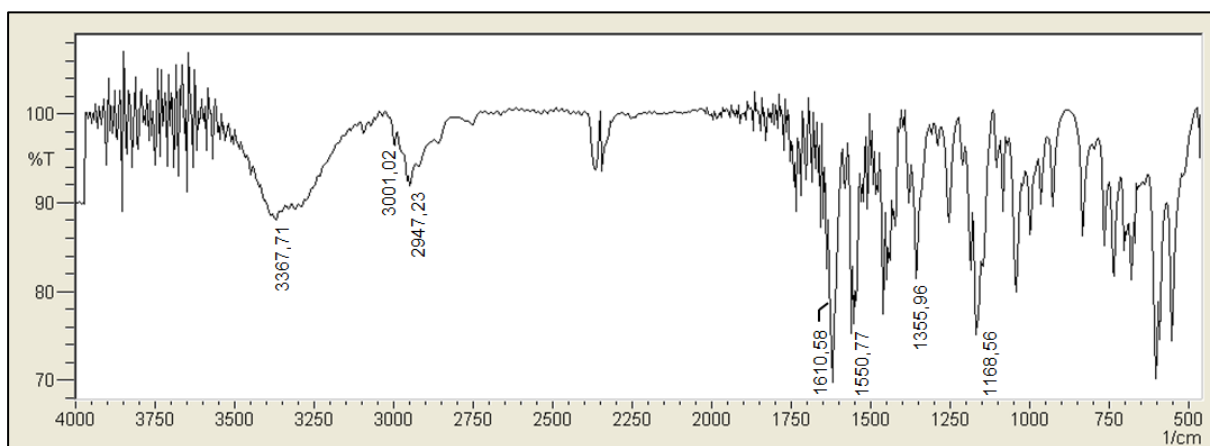
Caracterização estrutural



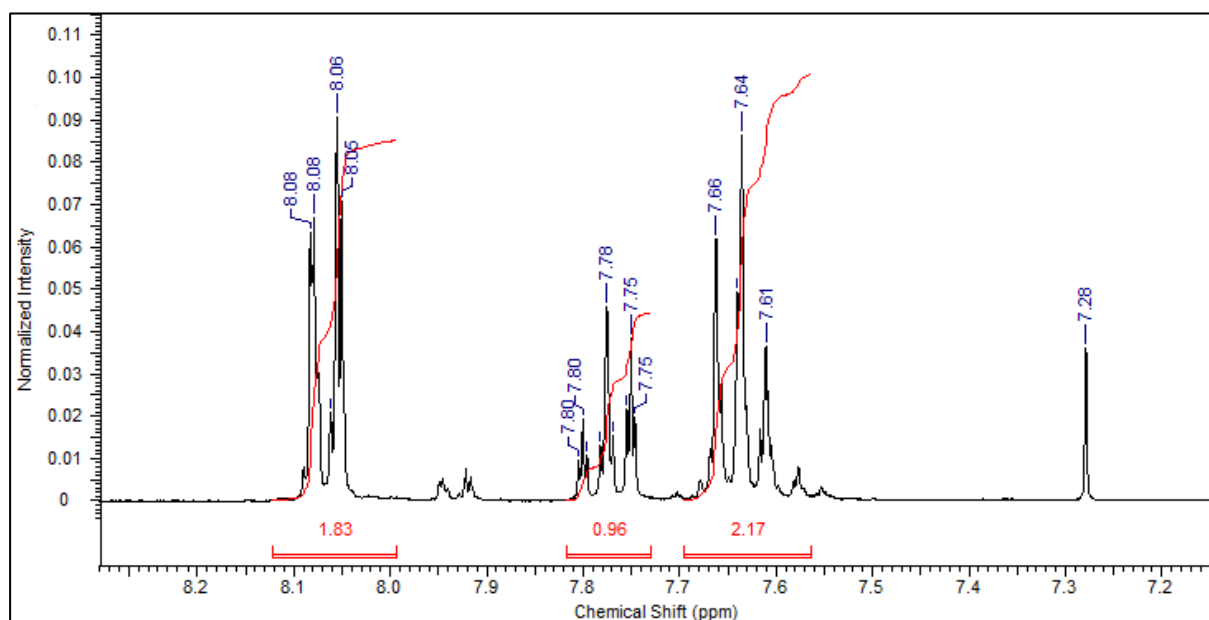
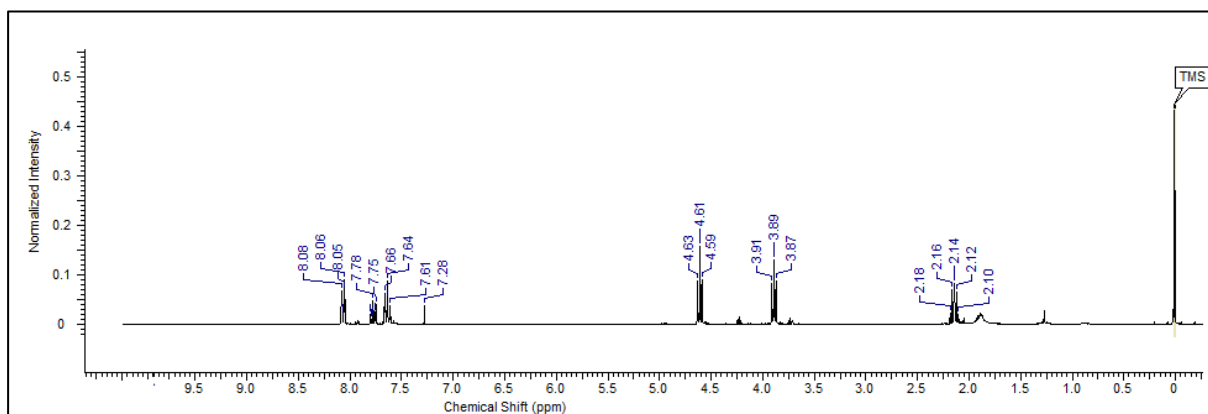
Infravermelho (pastilha de KBr): -OH: $3367,71\text{cm}^{-1}$; C-H: aromático: $3001,02\text{cm}^{-1}$; C-H alquílico: $2947,23\text{cm}^{-1}$; C=N furoxano: $1610,58\text{cm}^{-1}$ e $1550,77\text{cm}^{-1}$ S=O axial assimétrica e simétrico: $1355,96\text{cm}^{-1}$ e $1168,56\text{cm}^{-1}$;

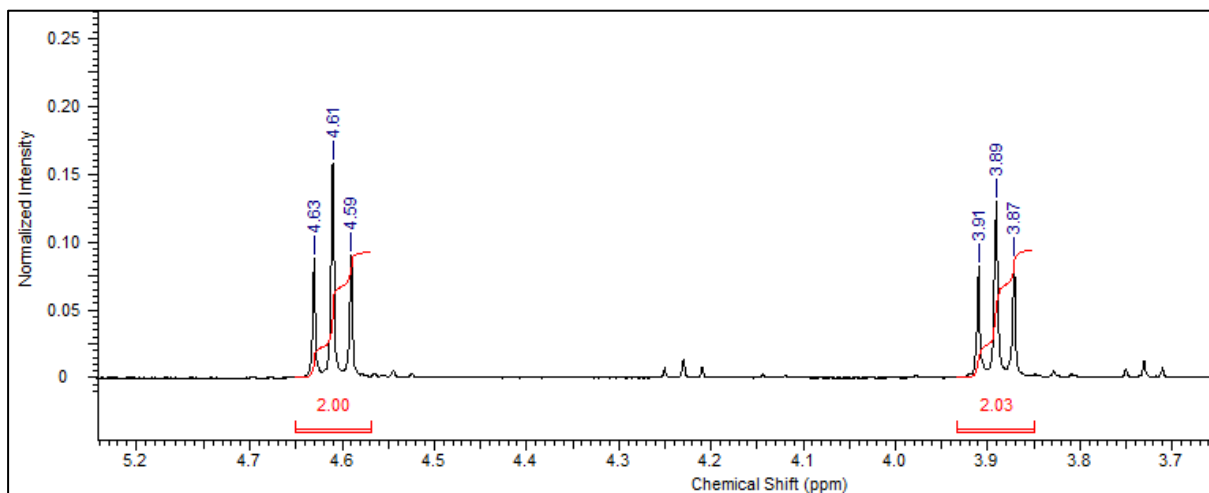
RMN ^1H (300MHz; CD_3Cl_3): δ 4,61 (H_7 ; 2H; t); δ 3,89 (H_9 ; 2H; t); δ 2,14 (H_8 ; 2H; q); δ 8,08-8,05 (H_3 ; 2H, m); δ 7,80-7,75 (H_1 ; 1H; m); δ 7,66-7,61 (H_2 ; 2H; m) ppm.

RMN ^{13}C (300MHz; CD_3Cl_3): δ 129,93 (C_1); 128,76 (C_2); 135,90 (C_3); 138,19 (C_4); 110,68 (C_5); 159,13 (C_6); 59,51 (C_7); 31,54 (C_8); 69,50 (C_9) ppm.

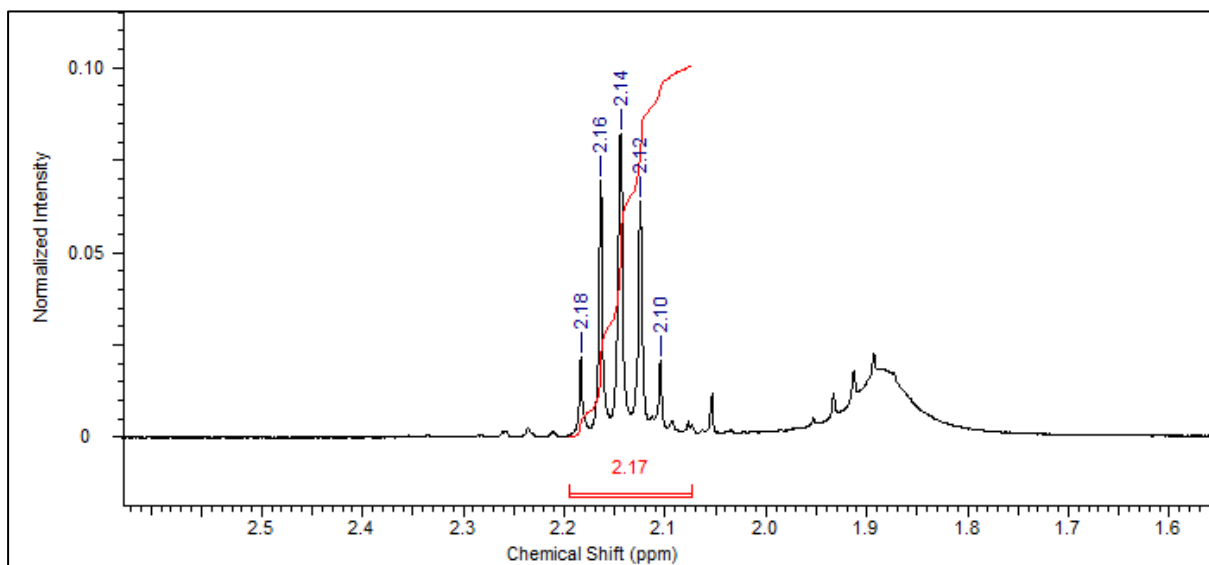


Espectro 21 - Espectro na região de infravermelho do derivado furoxânico (16) (pastilha de KBr).



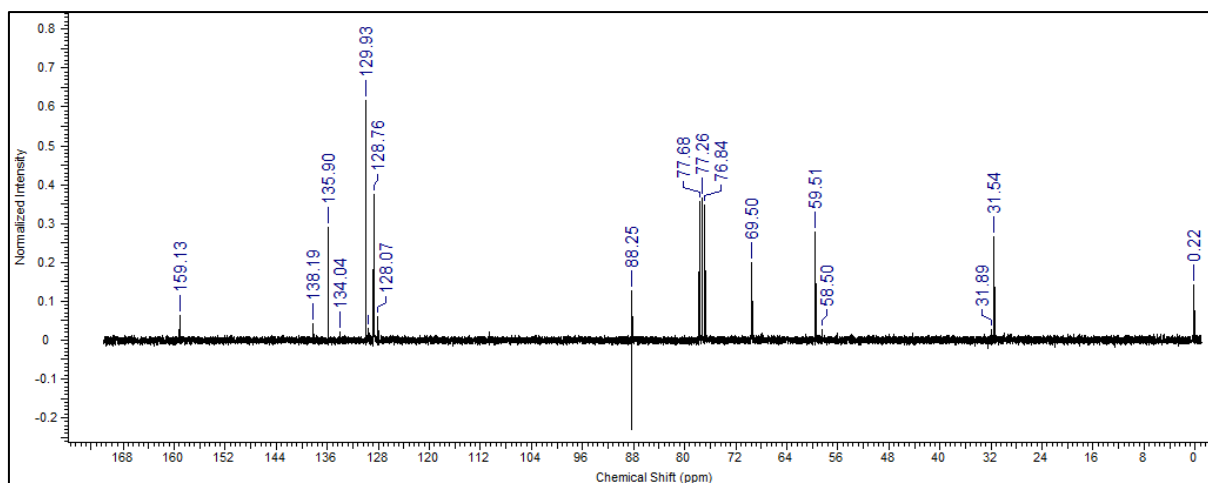


Espectro 24 - Espectro de ressonância magnética nuclear do derivado furoxânico (17) (RMN ^1H ; 300 MHz; CH_3Cl_3) – ampliação região alquílica.

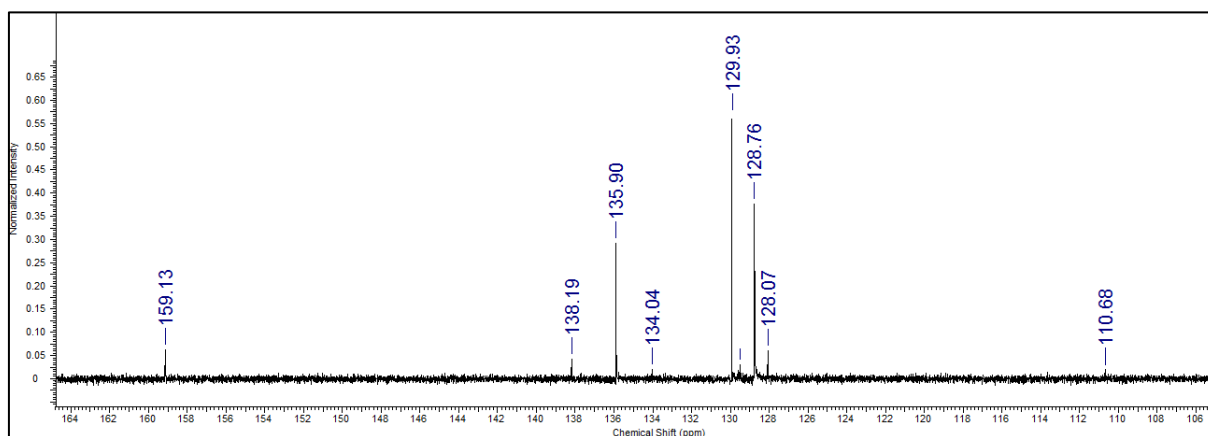


Espectro 25 - Espectro de ressonância magnética nuclear do derivado furoxânico (17) (RMN ^1H ; 300 MHz; CH_3Cl_3) – ampliação região alquílica.

Anexos



Espectro 26 - Espectro de ressonância magnética nuclear do derivado furoxânico (17) (RMN ^{13}C ; 300 MHz; CH_3Cl_3).

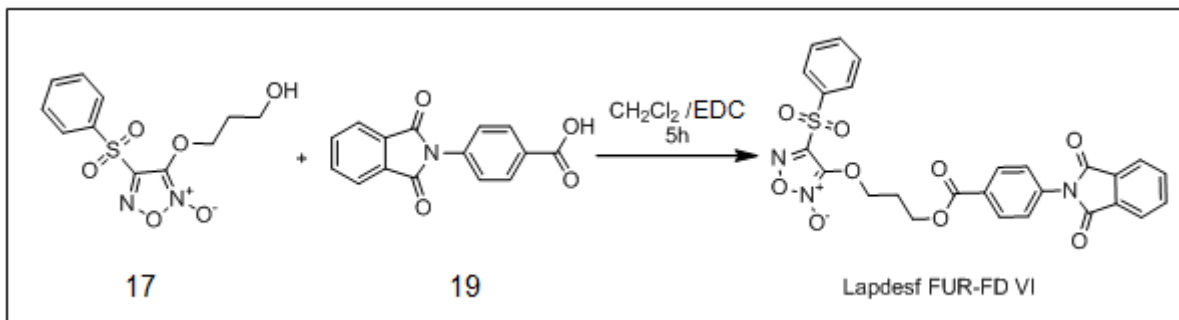


Espectro 27 - Espectro de ressonância magnética nuclear do derivado furoxânico (17) (RMN ^{13}C ; 300 MHz; CH_3Cl_3) – ampliação região aromática.

Anexos

1.6.2 Síntese do Lapdesf FUR-FD VI

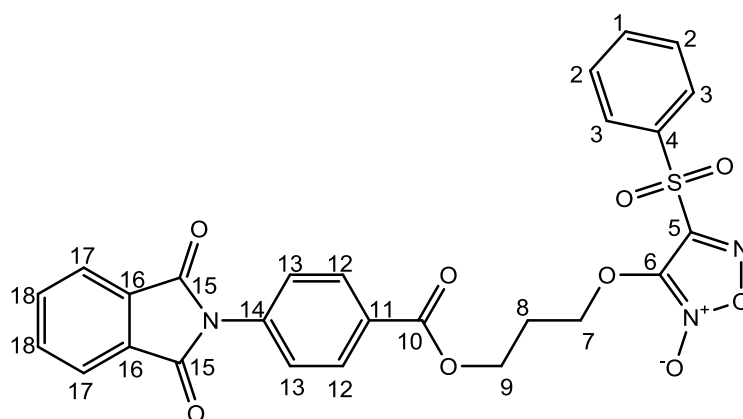
Reação



Procedimento

Adicionou-se a um balão de 50mL, 0,42g (1,50mmol) de derivado ftalimídico (19), 0,45g (1,50mmol) de derivado furoxânico (17), 0,56g (2,72mmol) de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), 0,02g (0,14mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) e 15 mL de diclorometano destilado. O meio reacional foi então mantido em agitação constante a temperatura de 0°C durante 5 horas, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como fase estacionaria (FE) sílica gel e fase móvel (FM) 5:5 hexano:acetato de etila (v/v). Ao fim da reação o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto resultante foi purificado por coluna cromatográfica FE sílica gel e FM 6:4 hexano:acetato de etila (v/v), fornecendo 324,88mg (rendimento de 41,5%) com FF: 176°C-180°C, (PM: 549,51; C₂₆H₁₉N₃O₉S).

Caracterização estrutural

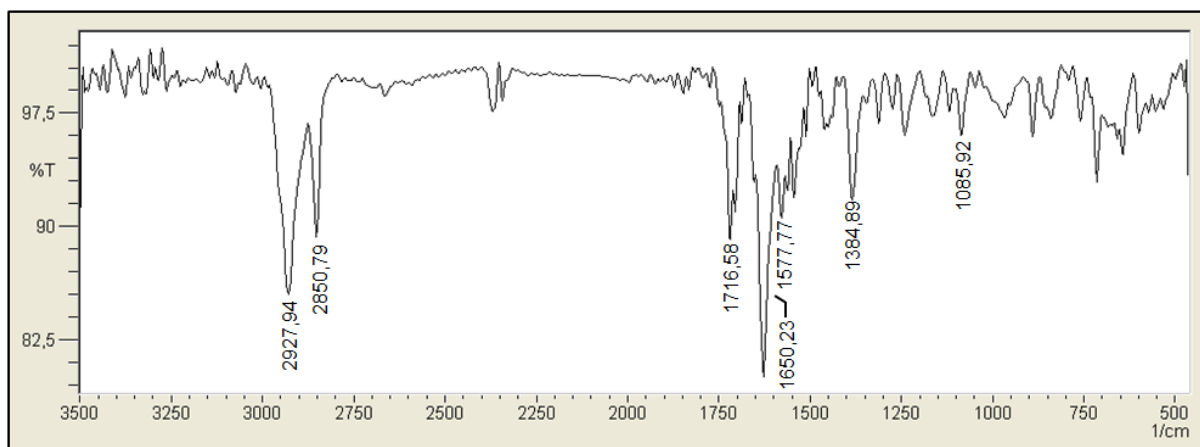


Anexos

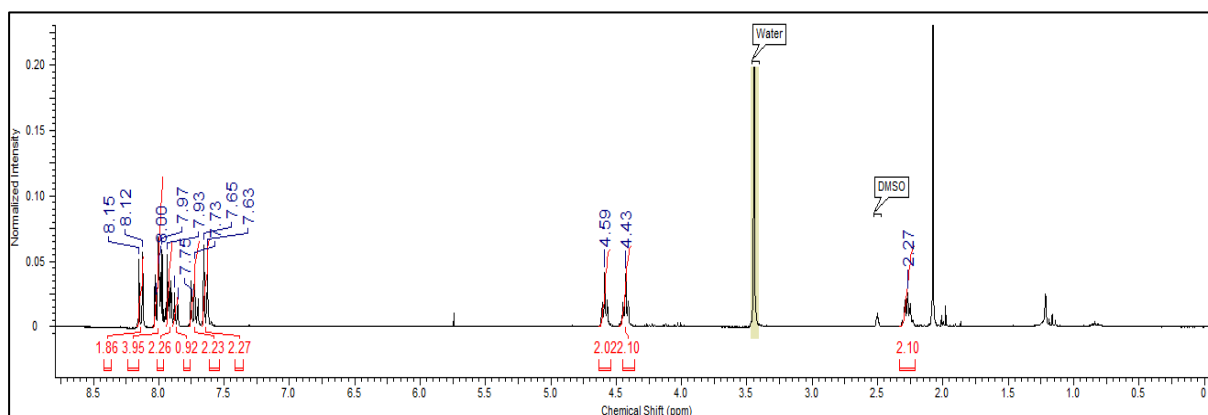
Infravermelho (pastilha de KBr): C-H alquílico: $2927,94\text{cm}^{-1}$ e $2850,79\text{cm}^{-1}$; C=O amida: $1650,23\text{cm}^{-1}$; C=O éster: $1716,58\text{cm}^{-1}$; C-O-C éter: $1085,92\text{cm}^{-1}$; S=O axial assimétrica: $1384,89\text{cm}^{-1}$; C=C aromático: $1577,77\text{cm}^{-1}$.

RMN ^1H (300MHz; CD_3Cl_3): δ 4,58 (H_7 ; 2H; t); δ 4,42 (H_9 ; 2H; t); δ 2,27 (H_8 ; 2H; q); δ 8,15-8,12 (H_3 ; 2H; dd); δ 7,87-7,85 (H_1 ; 1H; tt; $J_{\text{orto}} = 7,9\text{Hz}/J_{\text{meta}} = 3\text{Hz}$); δ 7,65-7,62 (H_2 ; 2H; dd; $J_{\text{orto}} = 9\text{Hz}/J_{\text{meta}} = 3\text{Hz}$); δ 8,03-8,00 (H_{12} ; 2H; m); δ 7,74-7,70 (H_{13} ; 2H; m); 7,99-7,89 (H_{17} e H_{18} ; 4H; m) ppm.

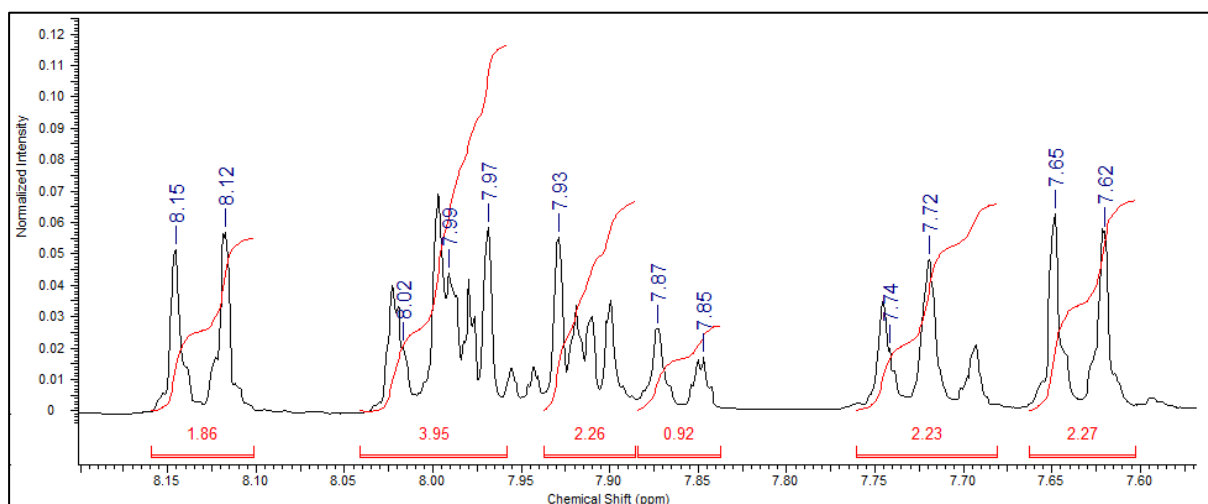
RMN ^{13}C (300 MHz; DMSO_{d6}): δ 166,75 (C_{15}); δ 165,27 (C_{10}); δ 158,94 (C_6); δ 137,23 (C_4); δ 136,26 (C_{11}); δ 135,00 (C_{17}); δ 131,56 (C_{14}); δ 130,12 (C_{16}); δ 129,94 (C_3 e C_{12}); δ 128,41 (C_1); δ 127,24 (C_2 e C_{13}); δ 123,69 (C_{18}); δ 110,64 (C_5); δ 68,42 (C_9); δ 61,33 (C_7); δ 30,78 (C_8) ppm.



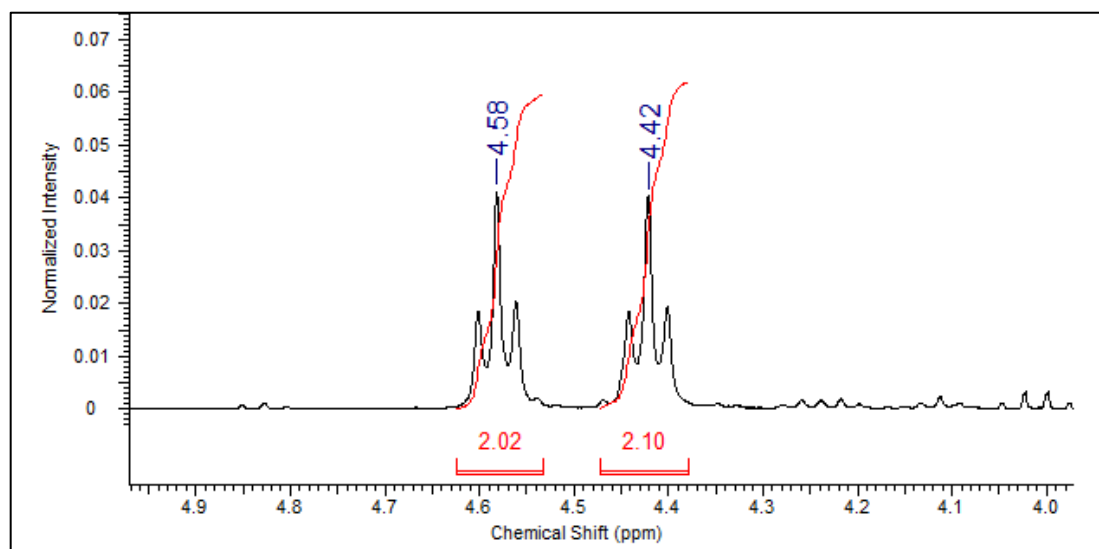
Espectro 28 - Espectro na região de infravermelho do composto Lapdesf FUR-FD VI (pastilha de KBr).



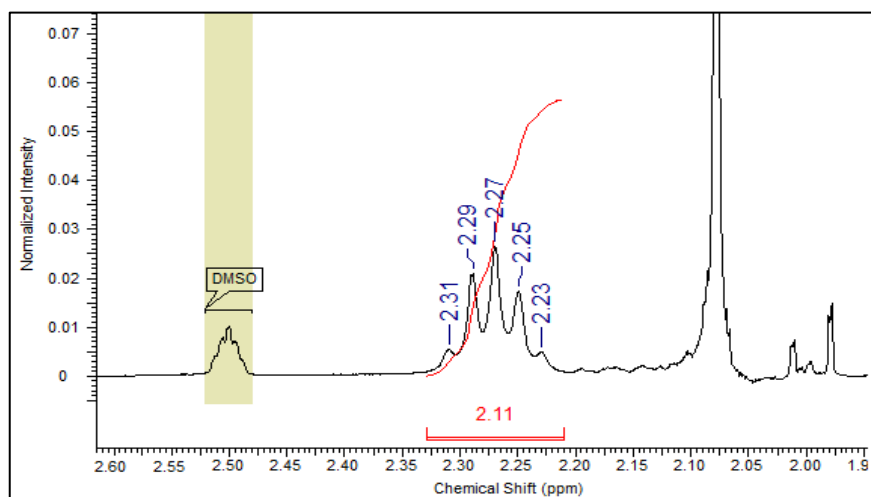
Espectro 29 - Espectro de ressonância magnética nuclear do Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}).



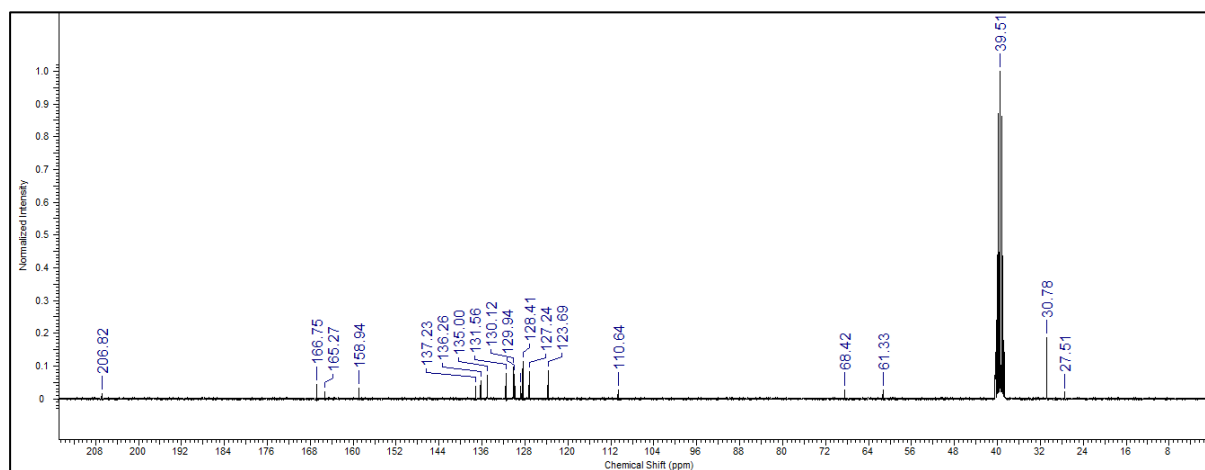
Espectro 30 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação da região aromática.



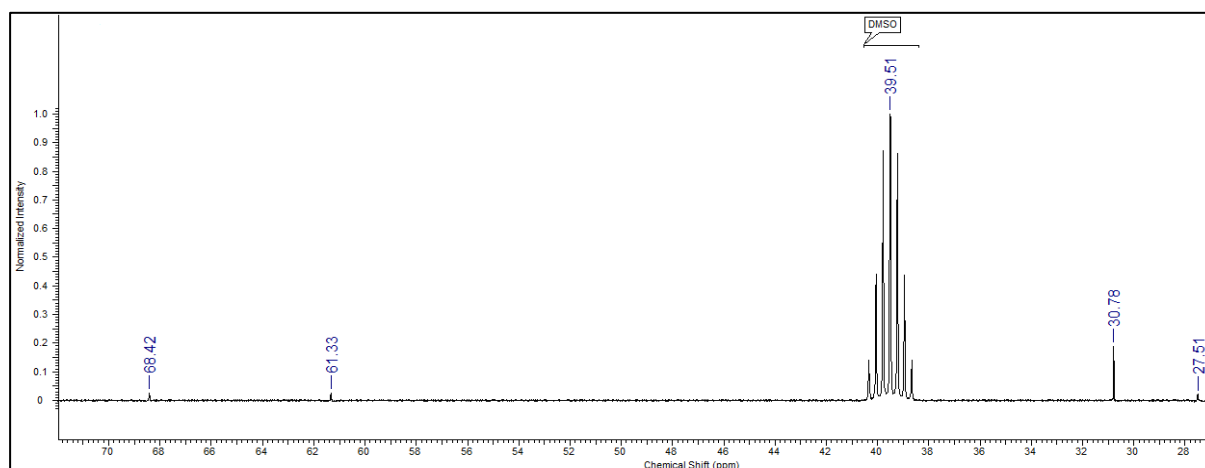
Espectro 31 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO_{d6}) – ampliação da região alquímica.



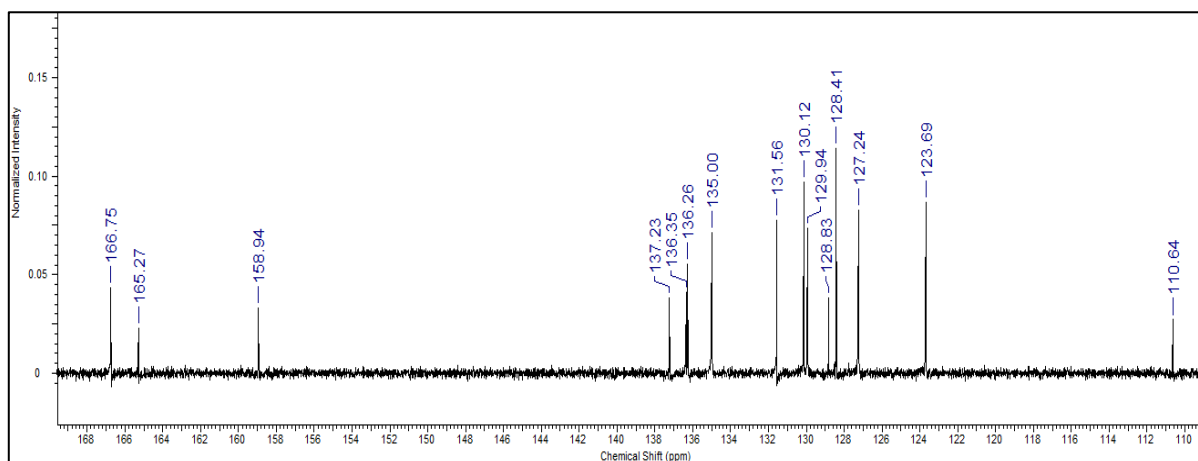
Espectro 32 – Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^1H ; 300MHz; DMSO_{d6}).



Espectro 33 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^{13}C ; 300 MHz; DMSO_{d6}).



Espectro 34 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^{13}C ; 300 MHz; DMSO_{d6}) - ampliação entre 70-30ppm.



Espectro 35 - Espectro de ressonância magnética nuclear do composto Lapdesf FUR-FD VI (RMN ^{13}C ; 300 MHz; DMSO-d_6) - ampliação entre 168-110ppm.

ANEXOS II

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 02/2013

Interessado: RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI

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

Projeto: Avaliação da mutagenicidade *in vivo* de compostos derivados
ftálimídicos

Parecer nº 22/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Avaliação da mutagenicidade *in vivo* de compostos derivados ftálimídicos”, apresentado pelo pós-graduando RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI, sob orientação da Professora Doutora Chun Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade.

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

Araraquara, 10 de junho de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXOS III

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 04/ 2012

Pesquisador: RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI

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

Projeto: Obtenção de híbridos lapdesf Fur-Fd e atividade antiinflamatória, com potencial atividade neuroprotetora.

Parecer nº 19/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 17 de Abril de 2013, analisou o relatório final do protocolo para uso de animais na pesquisa: “Obtenção de híbridos lapdesf Fur-Fd e atividade antiinflamatória, com potencial atividade neuroprotetora”, apresentado pelo pós-graduando Rafael Consolin Chelucci, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta Faculdade, e considerou o referido relatório estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua aprovação.

Araraquara, 22 de Abril de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXOS IV

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 03/2013

Interessado: RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI

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

Projeto: Obtenção de híbridos lapdesf Fur-Fd e atividade antiinflamatória,
com potencial atividade neuroprotetora

Parecer nº 09/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Obtenção de híbridos lapdesf Fur-Fd e atividade antiinflamatória, com potencial atividade neuroprotetora”, apresentado pelo pós-graduando RAFAEL CONSOLIN CHELUCCI, sob orientação da Professora Doutora Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta Faculdade.

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

Araraquara, 18 de março de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA