



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS
ESTEROIDES DA SÉRIE LAPDESF GL-FT**

ARARAQUARA - SP

2017

MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS
ESTEROIDES DA SÉRIE LAPDESF GL-FT**

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

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M149s Machado, Marcella Gabrielle Mendes
Síntese e avaliação anti-inflamatória de derivados esteroides da Série Lapdesf GL-FT /
Marcella Gabrielle Mendes Machado. -- Araraquara, 2016.
117 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Chung Man Chin.

1. Anti-inflamatórios. 2. Ftalimida. 3. Glicocorticoides. 4. Hibridação molecular. 5. Phthalimide.
6. Lapdesf GL-FT. I. Chung, Man Chin, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS ESTEROIDES DA
SÉRIE LAPDESF GL-FT

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 01 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

CHUNG MAN CHIN

RENATO FARINA MENEGON

CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE

EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ

JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Dedico este trabalho ao meu amor, esposo e amigo. Você me mostrou que realmente o amor é paciente, o amor é bondoso (1 Co 13:14). Obrigada por acreditar em mim até nos momentos em que eu mesmo duvidei.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço ao Senhor por mais uma trajetória concluída! Tú és bom, em todo o tempo!

Aos meus pais pelo apoio em toda a minha formação. Esta vitória é fruto do cuidado de vocês.

Ao meu esposo Everton, pelo amor e companheirismo que fizeram toda a diferença nos bons e maus momentos durante esses anos de pós-graduação.

À minha irmã Priscilla, cunhado Evandro e todos os meus familiares e amigos que torceram e oraram pela concretização deste trabalho.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Chung Man Chin, pela confiança depositada, pelos incentivos e instruções durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Cleverton pela atenção, ensinamentos e encorajamento durante as análises histopatológicas e reuniões para discussão dos resultados.

Aos colegas e técnicos do Lapdesf pela ajuda e pela amizade. Cauê, agradeço de coração toda a contribuição nos ensaios biológicos.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, a técnica do laboratório Marisa Placeres e a colega Karina Barbieri pela colaboração no ensaio de viabilidade celular.

Aos professores membros da banca de qualificação e/ou defesa, Dr. Wagner Vilegas, Dr. Cleverton Roberto de Andrade, Dr. Jean Leandro dos Santos, Dr. Renato Farina Menegon, Dr. Eduardo René Perez, pela contribuição com sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

À toda equipe da seção de Pós-Graduação pela ajuda e valiosas orientações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2014/08728-6, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“ As grandes ideias surgem da observação dos
pequenos detalhes. ”*
(Augusto Cury)

RESUMO

Os glicocorticoides (GCs) são fármacos utilizados amplamente na terapêutica devido suas atividades anti-inflamatória, imunossupressora e antiangiogênica. Possuem a capacidade de reduzir a transcrição de uma série de enzimas/proteínas inflamatórias como a ciclooxigenase-2 (COX-2), lipoxigenases, fosfolipase A2, óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), super expresso em diversas doenças inflamatórias. Porém o seu uso é limitado devido as diversas reações adversas. Derivados ftalimídicos também têm sido relatados na literatura com importante atividade anti-inflamatória. Dessa forma, no presente trabalho, planejou-se através da estratégia de hibridação molecular, novos derivados anti-inflamatórios esteroides moduladores da citocina TNF-alfa, úteis no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Nesse contexto, foram sintetizados e caracterizados seis compostos derivados da prednisolona e budesonida da série Lapdesf GL-FT 1-6. Os compostos finais foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória em modelo de colite ulcerativa distal, atividade imunossupressora e determinação da viabilidade celular necessária para o ensaio de doseamento da citocina TNF-alfa. Além disso, os compostos GLFT 2 e 3 foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata. No ensaio de colite ulcerativa os compostos Lapdesf GL-FT 5 e 6 foram iguais estatisticamente ao controle negativo e apresentaram atividade anti-inflamatória com regressão do quadro de ulceração causada pela indução com ácido acético. O composto 5 ainda apresentou melhora nos sinais clínicos com ganho de peso e aumento da sobrevivência dos animais e regressão total da ulceração em 83,3% dos animais tratados. Os compostos GLFT 1 e 3 foram diferentes estatisticamente dos grupos controle positivo e negativo. Apresentaram atividade anti-inflamatória com regressão total do quadro de ulceração em 33,3% dos animais em cada grupo, sendo superior ao fármaco padrão, prednisolona, que obteve 16,7% de regressão total da ulceração. A viabilidade celular para os seis compostos da série Lapdesf GL-FT nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,65 μM foi superior a 70% indicando baixa citotoxicidade. Porém, os compostos GL-FT 2 e 3 apresentaram viabilidade celular inesperada, chegando a valores de 300 e 400%, respectivamente, nas concentrações avaliadas. Os derivados da série Lapdesf GL-FT 1-6 não apresentaram atividade imunossupressora no ensaio *in vitro*. Os compostos Lapdesf GL-FT 2 e 3 apresentaram atividade anti-inflamatória no ensaio de edema de pata, não havendo diferença estatística com o fármaco padrão, prednisolona.

Palavras-chave: Anti-inflamatório. Ftalimida. Glicocorticoides. Hibridação molecular.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GCs) are drugs widely used in therapy due their anti-inflammatory, immunosuppressive and antiangiogenic activities. They have the ability to reduce the transcription of a series of inflammatory enzymes / proteins such as cyclooxygenase-2 (COX-2), lipoxygenases, phospholipase A2, induced nitric oxide synthase (iNOS) and proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), over expressed in several inflammatory diseases. However, its use is limited due to the various adverse reactions. Phthalimide derivatives have also been reported in the literature with important anti-inflammatory activity. Thus, in the present work, new steroid anti-inflammatory derivatives as TNF-alpha cytokine modulators, useful in the treatment of chronic inflammatory diseases, have been designed through the molecular hybridization strategy. In this context, six compounds prednisolone and budesonide derivatives, Lapdesf GL-FT series, were synthesized and characterized. The final compounds were evaluated for anti-inflammatory activity in a model of distal ulcerative colitis, immunosuppressive activity and cell viability assay required for the TNF-alpha assay. In addition, GLFT 2 and 3 compounds were evaluated for anti-inflammatory activity in paw edema model. In the ulcerative colitis test, Lapdesf GL-FT 5 and 6 compounds were statistically equal to the negative control and showed anti-inflammatory activity with regression of the ulceration caused by the induction with acetic acid. Compound 5 also showed improvement in clinical signs such as weight gain and increased survival of animals and total regression of ulceration in 83.3% of treated animals. GLFT 1 and 3 compounds were statistically different from the positive and negative control groups. They presented anti-inflammatory activity with total regression of ulceration in 33.3% of the animals in each group, being superior to the standard drug, prednisolone, which obtained 16.7% of total ulceration regression. Cell viability for all Lapdesf GL-FT compounds at the concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.65 μ M was higher than 70% indicating low cytotoxicity. However, GL-FT 2 and 3 compounds showed unexpected cell viability, reaching values of 300 and 400%, respectively, at the concentrations evaluated. Lapdesf GL-FT 1-6 did not present immunosuppressive activity in the *in vitro* assay. Lapdesf GL-FT 2 and 3 compounds showed anti-inflammatory activity in the paw edema test, and there was no statistical difference with the standard drug, prednisolone.

Keywords: Anti-inflammatory. Phthalimide. Glucocorticoids. Molecular hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Doenças associadas à inflamação crônica	16
Figura 2 - Processo de ativação do fator de transcrição NF- κ B	18
Figura 3 - Citocinas envolvidas nas doenças inflamatórias intestinais.	18
Figura 4 - Estrutura molecular da talidomida.....	22
Figura 5 - Estratégia de hibridação molecular.....	24
Figura 6 - Representação do conceito de pró-fármaco.....	24
Figura 7 - Nitro ésteres de prednisolona (1-2) e budesonida (3-4).....	25
Figura 8 - Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Comparação entre a carragenina, prednisolona e o composto I	46
Figura 9 - Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Budesonida, compostos IV, V e VI.....	47
Figura 10 - Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata). Prednisolona, compostos II e III.....	48
Figura 11 - Evolução da média do peso corporal dos ratos tratados a partir do 5º dia com prednisolona, GLFT 1, GLFT 2 e GLFT 3 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.....	50
Figura 12 - Análise macroscópica dos cólons tratados com GLFT 1 e 3.....	51
Figura 13 - Comparação macroscópica de dois animais tratados com o composto GLFT 1. .	52
Figura 14 - Imagens da análise histopatológica do cólon do animal com megacólon tratado com o composto GLFT 1, aumento de 5 e 10 vezes.....	52
Figura 15 - Análise histopatológica do cólon dos animais com colite ulcerativa e submetidos ao tratamento com prednisolona, GLFT 1, 2 e 3.	54
Figura 16 - Imagens da análise histopatológica do cólon dos grupos controle positivo, prednisolona, GLFT 1, GLFT 2, GLFT 3 e controle negativo.....	55
Figura 17 - Evolução da média do peso corporal dos ratos tratados a partir do 5º dia com budesonida, GLFT 4, GLFT 5 e GLFT 6 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.....	57
Figura 18 -Análise histopatológica do cólon dos animais com colite ulcerativa e submetidos ao tratamento com budesonida, GLFT 4, 5 e 6.	59
Figura 19 - Imagens da análise histopatológica do cólon dos grupos controle positivo, budesonida, GLFT 4, GLFT 5, GLFT 6 e controle negativo.	60

Figura 20 - Imagens da análise histopatológica do cólon dos grupos controle positivo, budesonida, GLFT 4, GLFT 5, GLFT 6 e controle negativo.	61
Figura 21 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de prednisolona, Lapdesf GLFT1, Lapdesf GLFT2 e Lapdesf GLFT3.....	63
Figura 22 - Estrutura molecular do cicloastragenol	64
Figura 23 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de budesonida, Lapdesf GLFT4, Lapdesf GLFT5 e Lapdesf GLFT6.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças entre a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn	20
Tabela 2 - Dose em mg/Kg dos compostos administrados no ensaio de colite ulcerativa distal	34
Tabela 3 - Codificação dos achados histopatológicos para realização da análise estatística ..	37
Tabela 4 - Bandas de absorção no IV referente aos intermediários ftalimídicos 1, 2 e 3 (pastilha de KBr).	42
Tabela 5 - Deslocamentos químicos obtidos no RMN ¹ H dos intermediários ftalimídicos	42
Tabela 6 - Rendimentos dos compostos sintetizados	43
Tabela 7 - Principais deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C dos compostos Lapdesf GL-FT 4, 5 e 6.....	45
Tabela 8 - Análise macro e microscópica do cólon e estado geral dos ratos tratados com prednisolona, GLFT 1, GLFT 2 e GLFT 3 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.....	53
Tabela 9 - Análise macro e microscópica do cólon e estado geral dos ratos tratados com budesonida, GLFT 4, GLFT 5 e GLFT 6 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.....	58
Tabela 10 - Inibição de MLR (%) e IC ₅₀ (μM) dos compostos da série Lapdesf GL-FT 1-6.	66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Planejamento estrutural dos derivados da série Lapdesf GL-FT.....	26
Esquema 2 - Síntese dos intermediários ftalimídicos (1-3).....	30
Esquema 3 - Síntese dos derivados série Lapdesf GL-FT (I-VI).....	31

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 1 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6).....	44
Espectro 2 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto GL-FT 6 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6).....	45

ABREVIATURAS

AIEs	Anti-inflamatórios esteroides
BRB	Barreira hemato-retiniana
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GC	Glicocorticoide
HAc	Ácido acético
HCl	Ácido Clorídrico
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
IFN- γ	Interferon- γ
IKK	Complexo kinase kappa B
IL	Interleucina
IV	Espectrofotometria na região do infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
MCP-1	Proteína quimioatratora de monócitos
MeOH	Metanol
MLR	Reação Linfocitária Mista
NO	Óxido Nítrico
P.f	Faixa de fusão
PLGF	Fator de crescimento placentário
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O processo inflamatório.....	16
1.2 Doenças inflamatórias intestinais (DII).....	19
1.3 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais	20
1.4 Modificações moleculares de glicocorticoides.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Reagentes e Solventes	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Metodologia sintética	30
3.2.2 Métodos analíticos.....	31
3.2.2.1 Determinação da faixa de fusão	31
3.2.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.).....	31
3.2.2.3 Espectrofotometria de absorção no infravermelho (I.V.).....	31
3.2.2.4 Espectrometria de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	32
3.2.2.5 Espectrometria de Massas	32
3.2.3 Ensaio Biológicos.....	32
3.2.3.1 Animais	32
3.2.3.2 Atividade anti-inflamatória (modelo de edema de pata).....	33
3.2.3.3 Atividade anti-inflamatória (modelo colite ulcerativa distal) (adaptado de: FABIA et al., 1992; VASSALO et al., 2007).	33
3.2.3.3.1 Análise histopatológica.....	35
3.2.3.3.2 Teste imunoquímico para detecção da citocina TNF- α	37

3.2.3.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais	37
3.2.3.4.2 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos (MOSMAN, 1983)	38
3.2.3.4.3 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	38
3.2.3.4.4 Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	39
3.2.3.5 Atividade imunossupressora (Ensaio de reação linfocitária mista) (JANG et al., 2011).	40
3.2.3.6 Análise Estatística.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1 Síntese e caracterização dos compostos da série Lapdesf GL-FT.....	41
4.3 Atividade anti-inflamatória (modelo de edema de pata)	46
4.4 Atividade anti-inflamatória (modelo colite ulcerativa distal).....	48
4.4.1 Derivados de prednisolona	49
4.4.2 Derivados de budesonida.....	56
4.5 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos	62
4.6 Atividade imunossupressora (ensaio de MLR)	65
5 CONCLUSÕES	67
6 PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE – Procedimentos sintéticos e espectros.....	76
ANEXO A - Parecer do comitê de ética (Protocolo CEUA/FCF/Car nº 04/2016)	114
ANEXO B - Parecer do comitê de ética (Protocolo CEUA/FCF/Car nº 11/2016)	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 O processo inflamatório

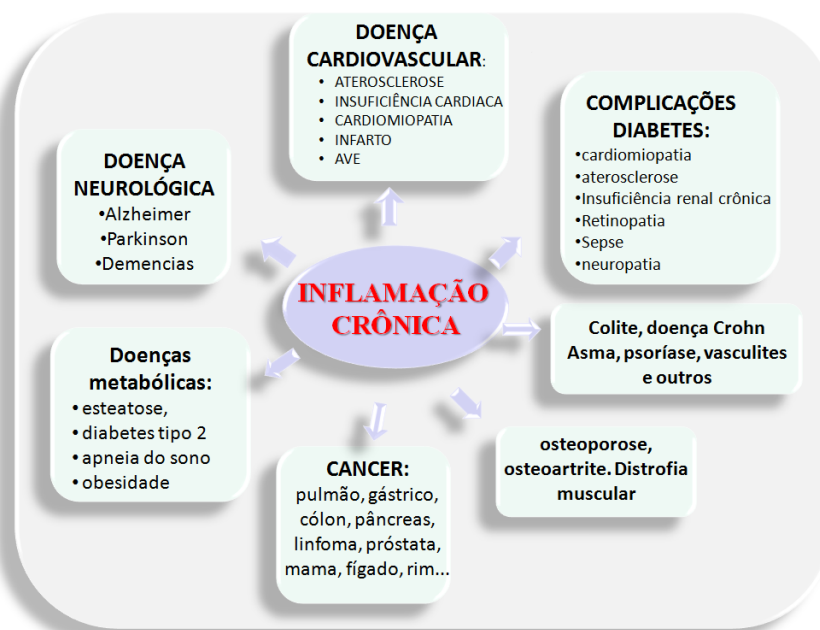
A inflamação divide-se em padrões agudos e crônicos, sendo caracterizada por ser uma resposta de proteção do organismo desencadeada por estímulos físicos, químicos e biológicos, e esses podem resultar em dor, edema e levar à disfunção do órgão ou tecido (BRASILEIRO-FILHO, 2009).

A inflamação aguda apresenta curta duração, horas ou dias, sendo observado fenômenos exsudativos e vasculares com a presença de uma reação sistêmica (BILATE, 2007). Caso a inflamação persista, ela pode vir a adquirir um quadro crônico, caracterizada por ocorrências proliferativas em que há formação de fibrose (MONTENEGRO, 1999).

A inflamação crônica pode apresentar duração de semanas, meses ou anos e ocorre em condições de infecção constante, exposição prolongada a substâncias que causam irritação e em respostas autoimunes (OKUYAMA; AIHARA, 1986).

A inflamação crônica está relacionada à patogênese de diversas doenças crônicas, tais como psoríase, artrite reumatoide, osteoartrite, síndrome metabólica, doença de Crohn e doenças neurológicas, como observado na Figura 1 (ALKIM et al., 2015).

Figura 1 - Doenças associadas à inflamação crônica



Fonte: CHUNG, 2012

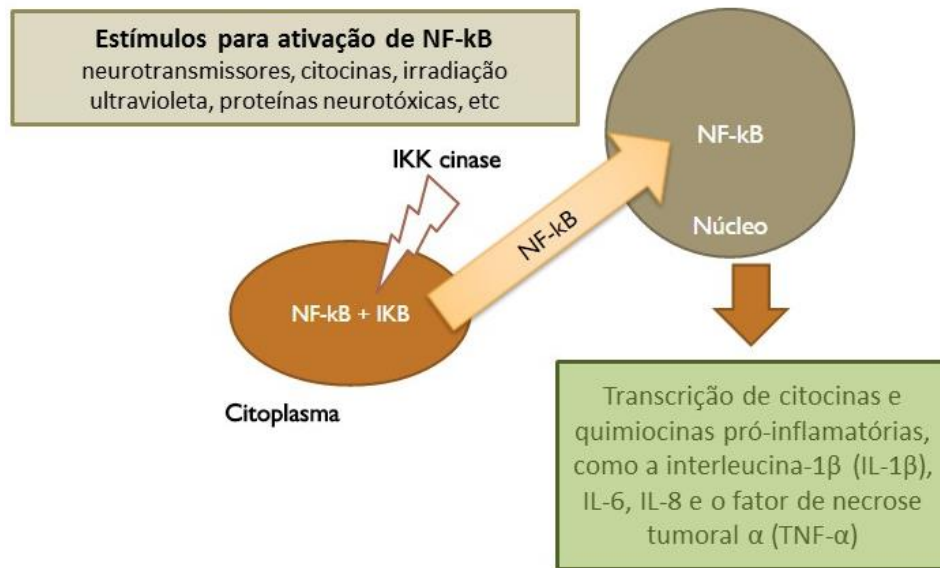
Os macrófagos são as principais células presentes no sítio da inflamação crônica, responsáveis pela secreção de diversos mediadores fisiológicos destacando-se as citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que atuam na manutenção e propagação do quadro inflamatório durante o processo crônico (ALKIM et al., 2015; OLIVER; CIULLA, 2006; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; SUZUKI et al., 2008).

A citocina pró-inflamatória TNF- α é expressa em diferentes tecidos e atua especialmente estimulando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção com a finalidade de se restabelecer a função inicial (mecanismo de reparo e cicatrização). O TNF- α estimula e induz a cascata de ativação de outras citocinas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), além de ativar os genes responsáveis pelo estresse oxidativo que são responsáveis por amplificar e prolongar a inflamação (CHAPARRO et al., 2012; ZHOU et al., 2006; KRAYCHETE et al., 2006; MONTENEGRO, 1999).

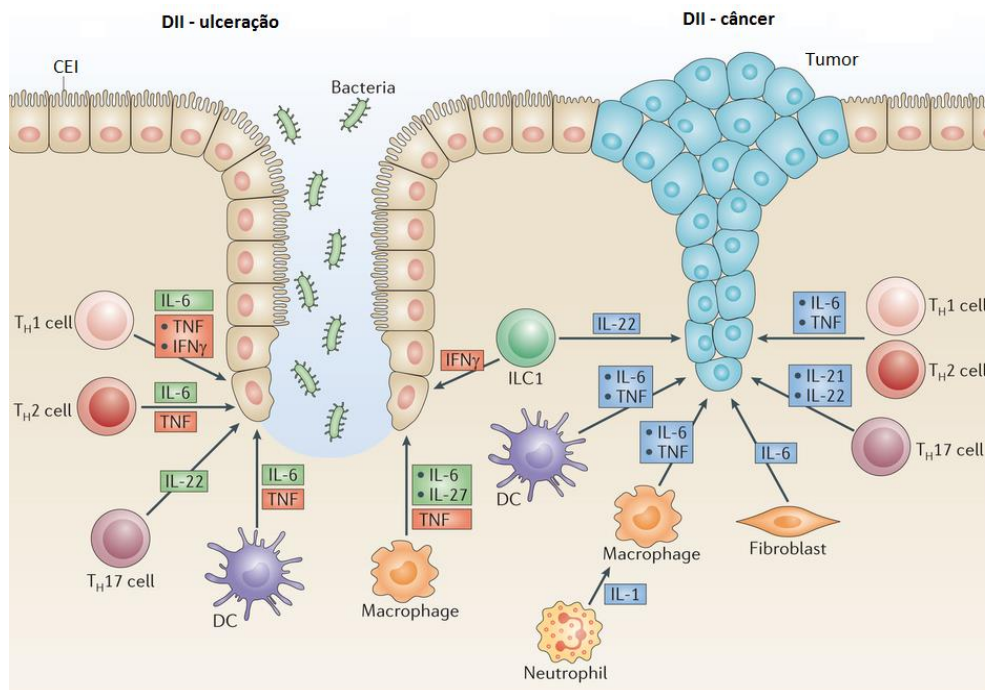
O TNF- α atua induzindo a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). O NF-kB é expresso em praticamente todos os tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel. Em células em homeostase o NF-kB está presente no citoplasma em sua forma inativa, associado a proteína inibitória kappa B (I κ B), porém vários estímulos são capazes de ativá-lo, a exemplo de neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento, glicocorticoides, estresse oxidativo, irradiação ultravioleta e proteínas neurotóxicas (ZHOU et al., 2006).

Para a ativação do NF-kB é necessária a fosforilação do I κ B, a qual é mediada pelo complexo kinase kappa B (IKK). O complexo IKK é composto de três subunidades: IKK- α e IKK- β (catalíticas) e IKK- γ (reguladora). Após a fosforilação e subsequente degradação do I κ B pelo proteassoma o NF-kB é translocado ao núcleo, onde ocorre a regulação de diversos genes com papéis importantes na resposta imune inflamatória, conforme observado na Figura 2 (ISRAEL, 2010; TAK et al., 2001). Elevados níveis de TNF- α podem levar a um feedback positivo desencadeando a reativação do NF-kB (ZHOU et al., 2006).

O aumento da expressão de NF-kB está diretamente relacionado à patogênese de diversas doenças, a exemplo das doenças inflamatórias intestinais (DII). Na Figura 3 estão indicadas as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que atuam sobre as células epiteliais intestinais (CEI) durante as doenças inflamatórias intestinais (DII), como a retocolite ulcerativa (NEURATH, 2014).

Figura 2 - Processo de ativação do fator de transcrição NF-kB

Fonte: Autor

Figura 3 - Citocinas envolvidas nas doenças inflamatórias intestinais.

Destacados em verde estão as citocinas que contribuem para a cicatrização da mucosa e em vermelho as que possuem efeito ulcerogênico. No câncer associado a DII, estão destacadas em azul as citocinas com efeitos pró-tumorais. DC = células dendríticas; IL = interleucina; macrophage = macrófago; cell = célula; neutrophil = neutrófilo; fibroblast = fibroblasto; CEI = células epiteliais intestinais.

Fonte: NEURATH, 2014

1.2 Doenças inflamatórias intestinais (DII)

A retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) são as mais comuns doenças inflamatórias crônicas intestinais que acometem o intestino (TEIXEIRA et al., 2015). As DII são caracterizadas por sangramento retal, dor abdominal, perda de peso e diarreia, resultando na ruptura da barreira epitelial e formação de ulceração no epitélio (KOUTROUBAKIS; KOUROUMALIS, 2008; LIU e WANG, 2011). Pacientes com essas inflamações, de forma prolongada e crônica no trato gastrointestinal, podem evoluir para um câncer colorctal, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade entre esses indivíduos (LIU e WANG, 2011; ROGLER, 2014). Estima-se que o risco de desenvolver câncer colorctal em pacientes com colite ulcerativa é de 2-5 vezes maior do que a população em geral (FUMERY et al, 2017).

A inflamação na RCU é limitada à camada mucosa. Ela normalmente começa no reto onde geralmente se encontra um maior processo inflamatório. Por outro lado, na DC a inflamação é transmural afetando todas as camadas da parede intestinal (ROGLER, 2014). Na Tabela 1 estão descritas as principais diferenças entre essas duas doenças.

A maior incidência das DII ocorre no Canadá e Europa. Há uma prevalência de 90 a 505 casos de colite ulcerativa por 100.000 pessoas no Norte da Europa e América do Norte. Ambas as doenças afetam indivíduos em qualquer idade, porém observa-se um maior pico de incidência na faixa etária entre os 15 e 30 anos (CONRAD et al., 2014).

A patogênese das DII é multifatorial, envolvendo predisposição genética, alterações na barreira epitelial, desregulação imune subjacente e fatores ambientais (KOZUCH e HANAUER, 2008).

Sabe-se que o desequilíbrio na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na mucosa do cólon, desempenham um papel importante no desenvolvimento dessas doenças. A produção excessiva de EROs, induzida pela citocina TNF- α , nas células da mucosa induz respostas inflamatórias que podem, direta ou indiretamente causar dano as células epiteliais intestinais, influenciando assim, na integridade da mucosa ou iniciando uma cascata de sinalização inflamatória que pode levar a insuficiência grave em situações de colite (ZHOU et al., 2006).

Estudos também demonstraram que a típica produção de óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante no controle da lesão tecidual. No entanto, elevados níveis de NO produzidos após o aumento da regulação do óxido nítrico sintase indutível (iNOS) nas células epiteliais tem sido associado às doenças inflamatórias intestinais (COOKE e DAVIDGE, 2002; LIU e WANG, 2011).

Tabela 1 - Diferenças entre a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn

Retocolite ulcerativa	Doença de Crohn
A doença está confinada ao cólon	O intestino delgado está envolvido em 80% dos casos
O retossigmoide encontra-se invariavelmente envolvido; o envolvimento colônico é geralmente do lado esquerdo	O retossigmoide é frequentemente poupado; o envolvimento colônico é geralmente do lado direito
O sangramento retal macroscópico encontra-se sempre presente	O sangramento retal macroscópico encontra-se ausente em 15-25% dos casos
Não ocorrem fístulas	Fístula, massas e desenvolvimento de abscessos são comuns
Não ocorrem lesões perianais importantes	As lesões perianais são importantes em 25-35%
A parede intestinal é afetada simétrica e ininterruptamente, a partir do reto proximalmente	Ao raio X, a parede intestinal é afetada assimetricamente e em segmentos, com “áreas de salto” entre segmentos doentes
A inflamação é uniforme e difusa	A aparência endoscópica é macular, com ulcerações isoladas separadas por segmentos de mucosa de aparência normal
A inflamação é confinada à mucosa, exceto nos casos graves	A inflamação e a formação de fissuras microscópicas se estendem transmuralmente; as lesões têm frequentemente uma distribuição focal
Não ocorrem granulomas epiteliais típicos	Granulomas epitelioides (semelhantes a sarcoides) são detectados na parede intestinal ou nos linfonodos em 25-50% dos casos

Fonte: Adaptado de

http://www.msdlatinamerica.com/profissionais_da_saude/manual_merck/secao_03/secao_03_031.html

A microvasculatura da mucosa nas DII sofre um intenso processo de neoangiogênese, apresentando maior densidade de microvasos comparado a mucosa normal (ALKIM et al., 2015). Níveis elevados de moléculas pró-angiogênicas como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foram observados na mucosa inflamada de pacientes com RCU e DC, comparado ao controle (DANESE, 2008).

1.3 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais

O tratamento convencional das doenças inflamatórias intestinais utiliza medicamentos anti-inflamatórios, sendo o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA ou mesalamina) o fármaco de primeira escolha para indução e manutenção da remissão da doença. Caso o paciente não responda ao tratamento, glicocorticoides, imunossupressores (azatioprina, mercaptopurina e ciclosporina) ou agentes biológicos (como anticorpos anti-TNF- α) podem ser utilizados. Os

aminosalicilatos (sulfassalazina, mesalazina, olsalazina e balsalazina) são frequentemente combinados com corticosteroides a fim de induzir a remissão das DII (LIU e WANG, 2011).

O uso dos imunossupressores é justificado quando há falha no tratamento com os aminossalicilatos, se reservando a casos graves, devido ao alto risco de toxicidade relacionado ao uso desses medicamentos (LIU e WANG, 2011).

Para aqueles pacientes que não respondem ao tratamento convencional, a terapia anti fator de necrose tumoral α (anti-TNF- α) tornou-se uma abordagem interessante no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como retocolite ulcerativa e artrite reumatoide, e na prevenção da rejeição de transplantes (BAYRY, 2011; BRENNAN; FELDRNANT, 1996; CANTANHEDA et al., 2007; WŁODARCZYK et al., 2016).

Entre os compostos aprovados na terapêutica anti-TNF-alfa, encontram-se os biofármacos infliximab, etanercept e adalimumab (AALTONEN et al., 2012; BAYRY, 2011; CANTANHEDA et al., 2007; KORNBLUTH, 1998), proteínas altamente imunogênicas e relacionadas ao risco de reativação de infecção latente, como tuberculose. Além disso, os custos de terapia a longo prazo são elevados limitando o acesso a esse tratamento para um grande número de pacientes (RADIN et al., 2016).

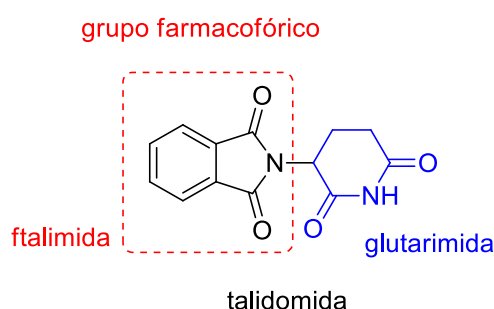
Rutella et al. (2011) detectaram a inibição da angiogênese em pacientes com DC fazendo uso da terapia com infliximab. No estudo realizado por Algaba et al. (2014) em 37 pacientes com DII foi observado a diminuição dos níveis circulantes de VEGF após a terapia com infliximab e adalimumab.

A talidomida é um fármaco modulador da citocina TNF- α e possui atividades anti-inflamatória, imunomoduladora e antiangiogênica. Este fármaco foi muito utilizado na década de 1950 e 1960 para o alívio dos enjoos matinais em gestantes, porém foi retirado do mercado devido os seus efeitos teratogênicos (KUMAR et al., 2012; LIMA et al., 2001). Na década de 1990 esse fármaco ganhou interesse na prática clínica devido seus importantes benefícios no tratamento da hanseníase (eritema nodoso leproso (ENL), mieloma múltiplo e síndrome mielodisplástica (BORGES; FROEHLICH, 2003; CASAL et al., 2016; YAMASAKI et al., 2014).

A ftalimida é o grupamento farmacofórico da talidomida (Figura 4), destituído do efeito teratogênico, e atua como inibidor da citocina TNF- α (LIMA et al., 2001). Diversos derivados ftalimidicos têm sido relatados na literatura com variadas aplicabilidades terapêuticas, como anti-inflamatório (CASAL et al., 2016; BHAT et al., 2015; ASSIS et al., 2012; BARBOSA et al., 2012), antiangiogênico (BEEDIE et al., 2016; SHIMAZAWA et al., 1999), anticâncer (PANDIT et al., 2013), dentre outros.

A eficácia do uso de talidomida como tratamento de curto prazo das DII foi relatada em pacientes adultos e pediátricos em um estudo realizado por Diamanti et al. (2015), porém os problemas de segurança em uma terapia prolongada limitam o uso desse fármaco.

Figura 4 - Estrutura molecular da talidomida



Fonte: Autor

Os glicocorticoides (GCs) são anti-inflamatórios esteroides (AIEs) utilizados na terapia de diversas doenças pelos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (SEGURO et al., 2013; BÍLKOVÁ et al., 2011; GESSI et al., 2010).

Os AIEs agem promovendo a liberação de um mediador com ação anti-inflamatória, liporcotina-1, levando a inibição da fosfolipase A2. Essa inibição diminui a concentração do ácido araquidônico, resultando em uma ação inibitória nas vias das prostaglandinas e lipoxigenases. Além disso, os GCs possuem um forte efeito sobre o sistema imunitário, atuando na rede de citocinas e enzimas inflamatórias, nas moléculas de adesão, fatores de permeabilidade e na função celular (BIJLSMA et al.; 2003).

Os GCs também apresentam atividade antiangiogênica, a qual tem proporcionado importantes benefícios no tratamento de doenças oculares como a retinopatia diabética e doenças inflamatórias intestinais (CIULLA et al., 2014; ZHANG et al., 2014; MESSENGER et al., 2013).

Os corticosteroides agem em múltiplos níveis da angiogênese, regulando a atividade dos macrófagos responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento angiogênicos (VEGF e demais citocinas pró-inflamatórias), proteases e inibindo a migração de células endoteliais (OLIVER; CIULLA, 2006). Dexametasona, triancinolona e fluocinolona são hoje utilizados para o tratamento da EMD em alternativa aos anti-VEGF disponíveis no mercado (CIULLA et al., 2014).

Os GCs são usados como potentes fármacos anti-inflamatórios no tratamento de moderada a severa colite ulcerativa ou em pacientes que não respondem ao tratamento convencional (POUSA et al., 2011)

Entretanto, a utilização dos glicocorticoides na terapia das doenças inflamatórias crônicas é limitada, devido às suas várias reações indesejáveis, especialmente em doses elevadas ou na administração prolongada que pode levar a supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA). A interrupção abrupta da administração pode causar coma e morte (SCHMIDT et al., 2008; DAMIANI, et al., 2001). Entre as principais complicações que podem ocorrer após o tratamento com GCs estão: osteoporose, glaucoma, hipertensão, psicose e síndrome de Cushing (BÍLKOVÁ et al., 2011).

A inibição do VEGF é uma estratégia terapêutica promissora para atenuar a inflamação no tratamento das DII, porém mais estudos que investiguem o papel desse fator angiogênico e seus receptores nessas doenças são necessários (ALKIM et al., 2015; SCALDAFERRI et al., 2009).

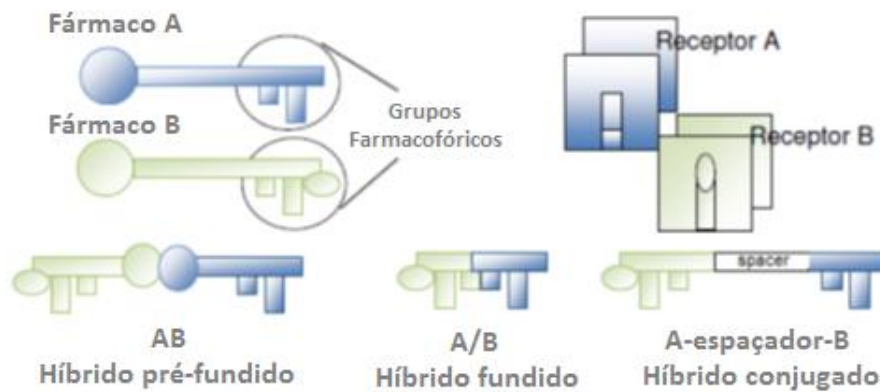
1.4 Modificações moleculares de glicocorticoides

Análogos sintéticos de GCs têm sido planejados ao longo dos anos utilizando estratégias de modificações moleculares, como latenciação e hibridação molecular, a fim de obter um melhor perfil terapêutico com otimização da relação risco-benefício, resolução de problemas de solubilidade, redução dos efeitos adversos relacionados à terapia além de potencialização da atividade anti-inflamatória (BARALDI et al., 2004; FANG et al., 2007).

A hibridação molecular é uma abordagem de obtenção de novos compostos com duas ou mais moléculas bioativas fundidas, obtendo uma única molécula capaz de ser reconhecida por diferentes receptores biológicos. No planejamento de novos híbridos é possível considerar apenas o grupo farmacofórico das molecular originais, com eliminação do grupamento tóxico, resultando em um aumento da segurança (CHUNG, 2012; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

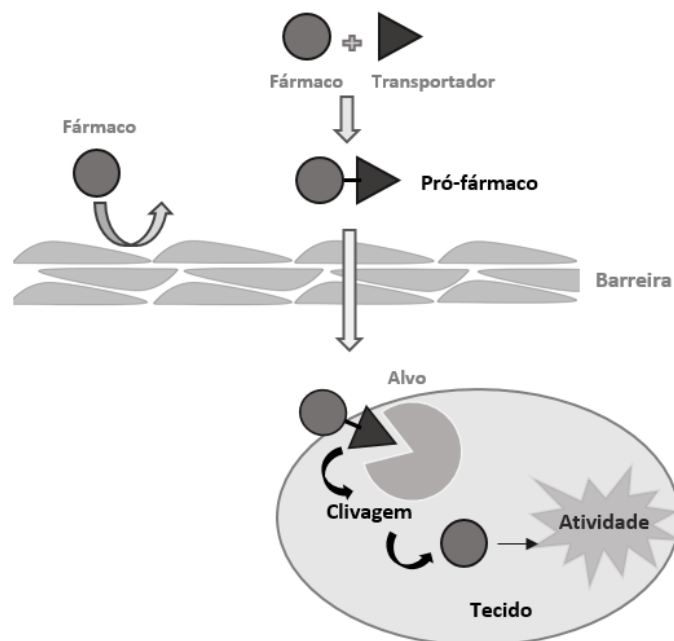
Os híbridos podem ser conjugados (subunidades separadas por um espaçador) ou ligados diretamente (pré-fundido e fundido), conforme observado na Figura 5 (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

O processo de hibridação está intimamente relacionado com a estratégia de obtenção de um pró-fármaco recíproco. A principal diferença está no fato dos compostos híbridos poderem agir "*per se*" sem necessidade de biotransformação prévia (BOSQUESI et al., 2011).

Figura 5 - Estratégia de hibridação molecular

Fonte: Adaptado de BOSQUESI et al., 2011

A latenciação, outra importante estratégia de modificação molecular, conceitualmente é a obtenção do fármaco em sua forma inativa (pró-fármaco), o qual libera a porção ativa original no local de ação ou próximo a ele, após uma reação química ou enzimática *in vivo* (Figura 6) (CHUNG et al., 2005).

Figura 6 - Representação do conceito de pró-fármaco

Fonte: Adaptado de MACHADO et al., 2016

Existem duas principais categorias de pró-fármacos: pró-fármacos clássicos e bioprecusores. Na primeira, o fármaco ativo é ligado a um transportador através de uma ligação biorreversível. Quando o transportador possui atividade terapêutica, este é chamado de pró-fármaco recíproco, possibilitando um sinergismo de ação ou agregando ao pró-fármaco uma atividade diferente e benéfica para o tratamento. Bioprecusores também precisam da ativação *in vivo* para haver atividade, porém não estão ligados a um transportador. São exemplos de pró-fármacos bioprecusores a lovastatina, o enalapril e o metronidazol (CHUNG et al., 2005).

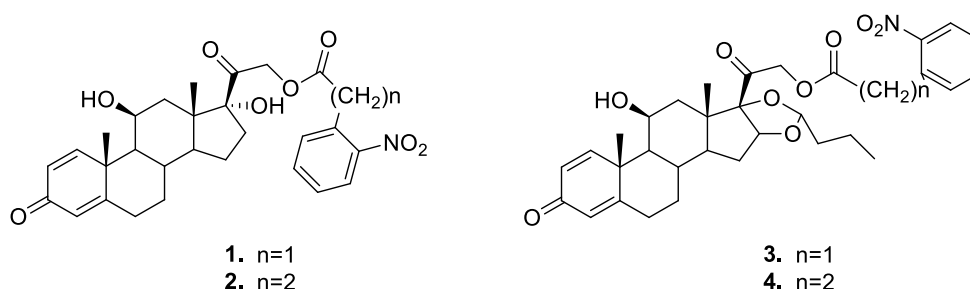
Pró-fármacos com glicocorticoides associados a doadores de óxido nítrico (NO), também são relatados na literatura (BARALDI et al., 2004; FANG et al., 2007). GCs e NO apresentam efeitos sinérgicos, promissores no tratamento de doenças inflamatórias (STREHL; BUTTGEREIT, 2013).

O uso de ftalimidas associados com anti-inflamatórios por hibridação molecular tem sido uma estratégia utilizada na Química Medicinal, demonstrando atividade sinérgica, sendo propostos como alternativos aos biofármacos (MACHADO, 2013; SANTOS et al., 2009).

A fim de diminuir os efeitos adversos relacionados aos glicocorticoides no tratamento das DII devido a absorção no trato intestinal, Marques Ruiz e colaboradores (2013) sintetizaram nitro ésteres de prednisolona (**1-2**) e budesonida (**3-4**) utilizando os carreadores 2-nitrofenil ácido acético (n=1) e 2-nitrofenil de ácido propiônico (n=2) (Figura 7). O pró-fármaco é clivado após a ação das nitro-redutases da microflora colônica.

Os compostos derivados de prednisolona (**1-2**) apresentaram atividade anti-inflamatória em modelo de colite ulcerativa, com menor atrofia no timo, indicando reduzida exposição sistêmica destes análogos esteroides.

Figura 7 - Nitro ésteres de prednisolona (**1-2**) e budesonida (**3-4**)



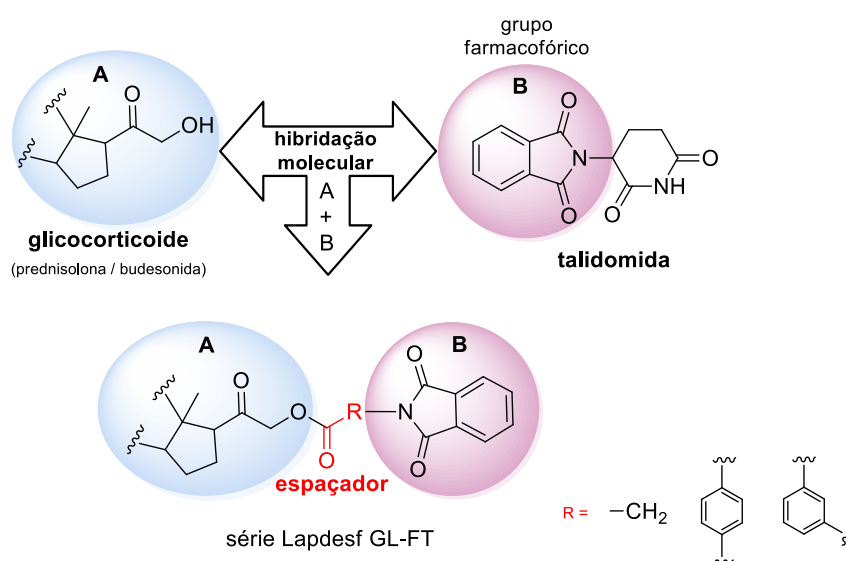
Fonte: Autor

Tendo em vista que o uso prolongado de GCs está associado a diversos efeitos adversos, como osteoporose, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, catarata, entre outros, limitando o uso desses fármacos em terapias prolongadas (SEGURO et al., 2013) e que os anti-TNF-alfa disponíveis no mercado são altamente onerosos e imunogênicos onde destacam-se o infliximab e adalimumab, novos fármacos anti-inflamatórios aliados à atividade inibidora de TNF-alfa, mais potentes e com menores efeitos adversos são desejáveis.

O desenvolvimento de compostos derivados de glicocorticoides e ftalimida, com ação anti-inflamatória conhecida, associado à propriedade de modulação da citocina TNF-alfa, poderia alcançar um melhor perfil de atividade em situações de doenças inflamatórias crônicas onde há super expressão da citocina TNF-alfa.

Os compostos deste trabalho foram planejados conforme ilustrado no Esquema 1, utilizando a estratégia de hibridação molecular entre os glicocorticoides (prednisolona e budesonida) e o grupo farmacofórico da talidomida (ftalimida).

Esquema 1 - Planejamento estrutural dos derivados da série Lapdesf GL-FT



Os compostos da série Lapdesf GL-FT foram considerados como híbridos, tendo em vista que para classifica-los como pró-fármacos recíprocos é necessário a realização de ensaios que comprovem a atividade biológica somente após uma reação química ou enzimática *in vivo* (CHUNG et al., 2005).

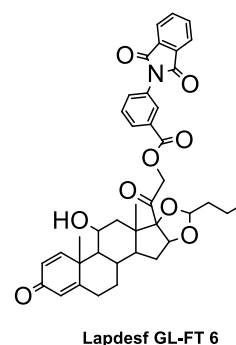
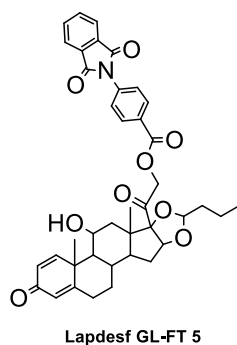
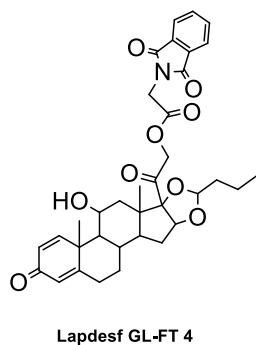
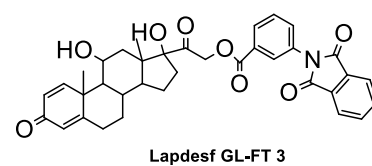
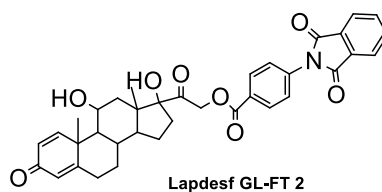
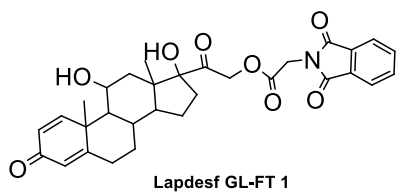
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa a síntese e avaliação anti-inflamatória de compostos esteroides da série Lapdesf GL-FT.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar seis compostos esteroides da série Lapdesf GL-FT:
 - 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)acetato (**Lapdesf GL-FT 1**)
 - 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 2**)
 - 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisoindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 3**)
 - 2-(7-hidroxi -6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a, 12b - dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxo isoindolin-2-il)acetato (**Lapdesf GL-FT 4**)
 - 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil -2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a, 12b - dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxo isoindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 5**)
 - 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil -2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a, 12b - dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxo isoindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 6**)



- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos GL-FT 2 e GL-FT 3 em modelo de edema de pata;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos em modelo de colite ulcerativa distal;
- Avaliar a produção da citocina TNF- α em ensaio enzimático (ELISA);
- Avaliar a atividade imunossupressora dos compostos no ensaio de reação linfocitária mista (MLR).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes e Solventes

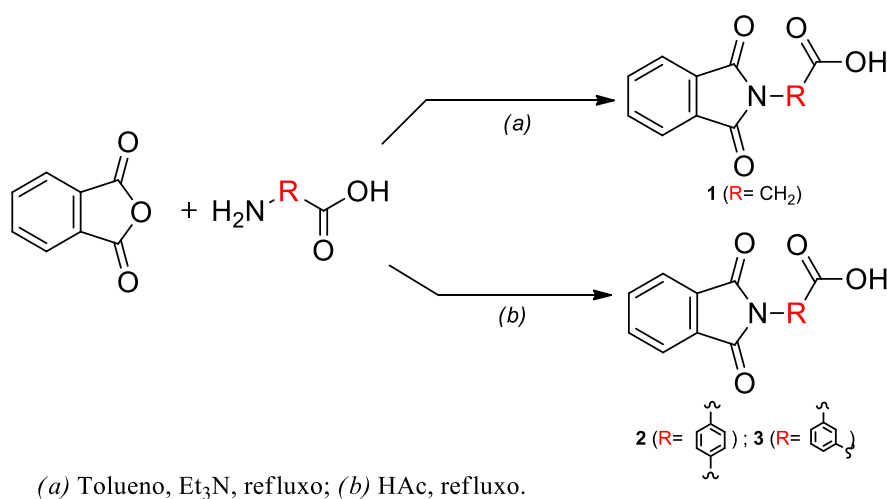
- 1-hidroxibenzotriazol (Acros Organics);
- Acetato de etila P.A. (Synth);
- Ácido acético glacial P.A. (J.T. Baker);
- Ácido clorídrico (Synth);
- Ácido *m*-aminobenzóico (Fluka);
- Ácido *p*-aminobenzóico (Fluka);
- Água destilada;
- Anidrido ftálico (J.T. Baker);
- Budesonida (Deg);
- Clorofórmio (Synth);
- Diisopropilcarbodiimida (Sigma);
- Diclorometano P.A. (Synth);
- Dimetilaminopiridina (Sigma);
- Dimetilsulfóxido P.A. (Vetec);
- Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma Aldrich)
- Glicina (Analítica);
- Goma arábica (Sigma);
- Hexano (Synth);
- Metanol P.A. (Merck);
- Parafina (Merck);
- Prednisolona (EMS);
- Sílica para coluna 0,06-0,2 mm (Across);
- Sulfato de sódio anidro (Synth);
- Tolueno (Synth);
- Trietilamina (Merck);
- Xilol (Synth).

3.2 Métodos

3.2.1 Metodologia sintética

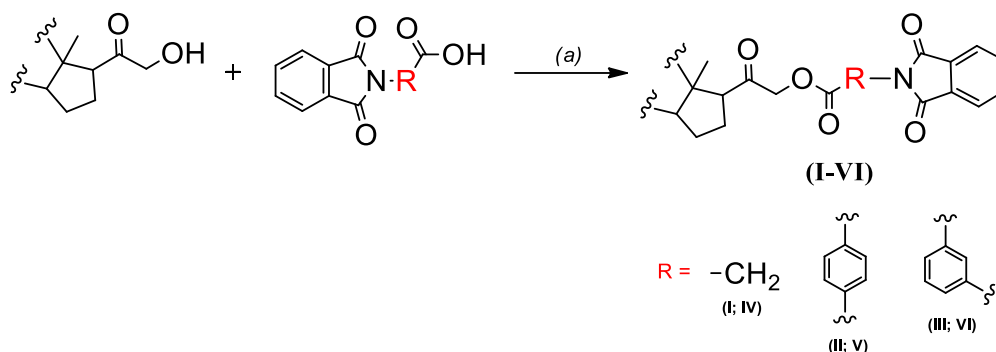
A obtenção dos compostos da série Lapdesf GL-FT envolveu duas etapas sintéticas. A primeira etapa consistiu na síntese dos intermediários ftalimídicos (**1-3**) conforme o Esquema 2, através da condensação de aminas previamente selecionadas ao anidrido ftálico, tendo como solvente o tolueno (**1**) ou ácido acético (**2 e 3**).

Esquema 2 - Síntese dos intermediários ftalimídicos (**1-3**)



Estes intermediários foram em seguida acoplados com os respectivos glicocorticoides, prednisolona e budesonida, através de uma substituição nucleofílica utilizando o agente acoplante EDC em diclorometano anidro (Esquema 3), obtendo assim os produtos finais esterificados (**I-VI**). A metodologia sintética detalhada para cada etapa é descrita no Apêndice A.

Esquema 3 - Síntese dos derivados série Lapdesf GL-FT (I-VI)



(a) CH_2Cl_2 , EDC, DMAP, Et_3N , t.a., 24h.

3.2.2 Métodos analíticos

3.2.2.1 Determinação da faixa de fusão

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

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

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

3.2.2.3 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.

3.2.2.4 Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos no espectrômetro Varian Inova[®] (300 MHz), utilizando como solvente DMSO- d_6 , no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araraquara.

3.2.2.5 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos no equipamento de alta resolução, ESI-TOF, nos modos de análise positivo e negativo, utilizando como solvente metanol, no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP.

3.2.3 Ensaios Biológicos

Os trabalhos foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, sob parecer favorável para execução dos ensaios biológicos, protocolos CEUA/FCF/CAr nº 04/2016 e 11/2016 (ANEXOS A e B).

3.2.3.1 Animais

Para o ensaio de atividade anti-inflamatória (modelo colite ulcerativa distal) foram utilizados 72 (setenta e dois) ratos Wistar (250-280g), sendo 6 (seis) animais por grupo experimental, provenientes do Biotério da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto (PUSP-RP). Os animais foram mantidos em condições ambientais do biotério, com temperatura controlada em 24°C (± 1) e ciclo circadiano de 12 horas, em caixas plásticas (50 x 60 x 22 cm) com no máximo 6 animais por caixa.

Para o ensaio de viabilidade celular (*in vitro*), foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss de seis semanas (20-25g), fornecidos pelo Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório, CEMIB - Unicamp, mantidos sob as mesmas condições ambientais.

3.2.3.2 Atividade anti-inflamatória (modelo de edema de pata) (adaptado de: WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

A avaliação da atividade anti-inflamatória aguda para os compostos GL-FT 2 e 3 foi realizada seguindo o modelo de edema de pata, no qual ocorre a formação de exsudato inflamatório induzido pela carragenina (1%, 0,1mL/ pata).

Os animais foram mantidos em jejum por 12h, com livre acesso à água antes da realização do experimento. Os grupos controle positivo e tratados receberam por via subplantar na pata posterior direita o agente químico irritante, carragenina, e salina na pata posterior esquerda. Os compostos testados (100 μ M/Kg; 0,1mL/100g rato) tiveram como veículo goma arábica 5% e foram administrados por via oral (gavage), 60 minutos antes da carragenina. O grupo controle positivo não recebeu tratamento.

As espessuras (mm) das patas posteriores foram medidas, com uso de espessímetros, antes e após os tratamentos, de hora em hora, durante 6 horas após a administração da carragenina. Os resultados foram obtidos pela diferença entre a leitura das patas antes e após os tratamentos e expressos como média $\pm$ erro padrão. Após 7 horas do início do experimento, os animais sofreram eutanásia em câmara de CO₂.

3.2.3.3 Atividade anti-inflamatória (modelo colite ulcerativa distal) (adaptado de: FABIA et al., 1992; VASSALO et al., 2007).

A avaliação da atividade anti-inflamatória para os compostos da série Lapdesf GL-FT 1-6 foi realizado seguindo o modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético. Foram realizados dois experimentos em momentos distintos, conforme os grupos detalhados a seguir:

1º ensaio:

- Grupo I (n=6): Controle positivo
- Grupo II (n=7): Prednisolona
- Grupo III (n=6): Lapdesf GL-FT 1
- Grupo IV (n=6): Lapdesf GL-FT 2
- Grupo V (n=6): Lapdesf GL-FT 3
- Grupo VI (n=6): Controle negativo

2º ensaio:

- Grupo I (n=5): Controle positivo
- Grupo II (n=5): Budesonida
- Grupo III (n=6): Lapdesf GL-FT 4
- Grupo IV (n=6): Lapdesf GL-FT 5
- Grupo V (n=6): Lapdesf GL-FT 6
- Grupo VI (n=6): Controle negativo

Os animais foram mantidos em jejum nas 24 horas que antecederam o procedimento. Os animais foram anestesiados com cetamina 90 mg/Kg, por via intraperitoneal, e em seguida, os grupos I-V receberam 2 mL *per rectum* do agente químico irritante, ácido acético, na concentração de 4% sob auxílio de um cateter/sonda gástrica de Levine nº 4, o qual 8 cm do mesmo foi introduzido e mantido por um período de exposição de 1 minuto.

O controle negativo (grupo VI) foi submetido ao mesmo procedimento descrito anteriormente, porém o agente irritante foi substituído por NaCl 0,9%.

Os grupos tratados (grupos II-V) receberam tratamento a partir do quinto dia após a indução de colite. O tratamento foi realizado diariamente, durante 5 dias, com doses de 100 μ M/Kg/dia (0,1mL/100g rato), via oral. As doses dos compostos em mg/Kg estão indicadas na Tabela 2. Após o 5º dia do início do tratamento (10º dia de indução de colite), os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e os órgãos (cólon, fígado e rins) extraídos para análise histopatológica. A massa corpórea para cada grupo foi registrada no dia da indução, no início e no fim do tratamento, a fim de avaliar possíveis variações decorrentes da indução da colite.

Tabela 2 - Dose em mg/Kg dos compostos administrados no ensaio de colite ulcerativa distal

Compostos	Peso molecular (g/mol)	Dose equivalente a 100 μ M/Kg em mg/Kg
Prednisolona	360,4	36,0
Budesonida	430,5	43,0
GL-FT 1	547,2	54,7
GL-FT 2	609,6	60,9
GL-FT 3	609,6	60,9
GL-FT 4	617,6	61,7
GL-FT 5	679,7	67,9
GL-FT 6	679,7	67,9

3.2.3.3.1 *Análise histopatológica*

Os cólons dos animais foram analisados no Laboratório de Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia (Foar) da UNESP de Araraquara, SP, com a colaboração do Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade.

Os tecidos foram removidos e pesados após a eutanásia dos animais e imediatamente fixados em solução de formol 10% por um período de 24 horas. Após este período, os órgãos foram transferidos para álcool 70% até o processamento histológico.

- Macroscopia

Foi realizado a análise macroscópica dos cólons, com registro do comprimento, largura, altura, cor e possíveis alterações. Os cólons retirados foram lavados com soro fisiológico para retirar as fezes contidas no interior do órgão. Neste caso, gentilmente, utilizando seringa de 5,0 mL desprovida de agulha, aplicamos um jato de soro fisiológico de modo a lixiviar (lavar) as fezes do interior do órgão. Posteriormente, foram seccionados no sentido transversal a cada 3,0 mm de modo a permitir a análise de todo o intestino (cólon). Os tecidos seccionados foram incluídos em papel filtro de modo a não girar durante o processamento, o que provocaria a análise de mesma região em dois cortes subsequentes. As secções foram então incluídas em cassetes plásticos devidamente codificados de modo a impossibilitar que o patologista identificasse grupos ou animais de cada grupo. Os cassetes foram mantidos em água corrente por 12 horas para remoção do excesso de formol.

- Processamento histológico

O processamento histológico envolve a desidratação dos órgãos com concentrações crescentes de álcool, substituição do álcool por xilol e posterior inclusão em parafina. Em seguida foram confeccionados os blocos de parafina utilizando moldes metálicos e respeitando a posição das secções mantidas pela adição do papel filtro.

- Cortes histológicos e coloração

Os tecidos, devidamente emblocados em parafina, foram cortados em micrótomo rotativo na espessura de 4 μm . As lâminas obtidas foram colocadas na estufa a 60 °C por 12 horas para derreter o excesso de parafina e permitir o processo de coloração. Após a desparafinação, as laminas foram coradas em hematoxilina e eosina e recobertas por lamínulas de vidro utilizando Permont^(R).

- Microscopia

A análise das lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina foi realizada por patologista experiente (análise cega) em microscópio da Marca Zeiss (Primo Star), utilizando as objetivas de 5, 10, 20 e 40x. Os seguintes parâmetros foram analisados: Mucosa (atrófica, normal, hipertrófia e papilomatosa), Perda de continuidade epitelial (ausente, epitélio, epitélio+conjuntivo subjacente e epitélio+conjuntivo subjacente+camada muscular), Porcentagem relativa da Perda de continuidade epitelial (Ausente, focal, 1/3, 2/3 ou mais), Presença de colônia bacteriana (ausente ou presente), Tipo de infiltrado inflamatório (agudo, crônico e misto), intensidade do infiltrado inflamatório (leve, moderado e forte), Tecido Linfóide Associado ao aparelho Gástrico (Ausente, Organizado/desorganizado, Desorganizado hiperplásico), vasos sanguíneos (estase e normais), camada muscular lisa (atrofia, normal, hipertrófica/hiperplásica) e presença de hemorragia (ausente e presente). Posteriormente, os resultados foram codificados de modo a permitir a análise estatística dos mesmos (Tabela 3).

Tabela 3 - Codificação dos achados histopatológicos para realização da análise estatística.

Parâmetros histopatológicos analisados	Codificação			
Infiltrado inflamatório (intensidade)	Ausente = 0	Leve = 1	Moderado = 2	Grave = 3
Infiltrado inflamatório (tipo)	Agudo = 1	Misto = 2	Crônico = 3	
Tecido Linfoide Associado ao aparelho gástrico (GALT)	Ausente = 0	Organizado = 1	Desorganizado= 2	Desorganizado hiperplásico = 3
Mucosa	Atrófica = 0	Normal = 1	hipertrófica = 2	papilomatosa = 3
Perda de continuidade	Ausente = 0	Epitélio = 1	Epit+conj subjacente = 2	Epit+conj+camada muscular = 3
Perda de continuidade (área afetada)	Ausente = 0	Focal = 1	1/3 = 2	2/3 ou mais = 3
Colônia Bacteriana	Ausente = 0	Presente = 1		
Camada Muscular	Atrófica = 1	Normal = 2	Hipertrófica = 3	
Estase	Ausente = 0	Presente = 1		
Hemorragia	Ausente = 0	Presente = 1		

3.2.3.4 Teste imunoquímico para detecção da citocina TNF- α

Os testes de viabilidade celular e de detecção de TNF- α foram realizados no laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

3.2.3.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais foram previamente estimulados por inoculação intraperitoneal utilizando 3 mL de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 horas de estímulo, os animais foram eutanasiados e o peritônio exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal. Em seguida, foi inoculado intraperitonealmente 5,0 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril (pH 7,2, 4°C). Após massagem peritoneal, as células do exsudato foram coletadas em seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular.

As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS (pH 7,2) e centrifugadas (400xg/5 minutos), a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em meio de cultura RPMI-1640 completo contendo 5% de FBS, 2-mercaptoetanol (2×10^{-5} M), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 UI/mL) e L-glutamina (2 mM). Determinou-se o número de células em câmara hemocitométrica de Neubauer com azul de tripan. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio de RPMI-1640-C.

Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa com tensão constante de CO₂ para a aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram retiradas com lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

3.2.3.4.2 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos (MOSMAN, 1983)

Utilizou-se a técnica de MTT, em microplaca de 96 cavidades, incubando-se suspensões celulares do exsudato peritoneal de camundongos (100µL/cavidade), na concentração de 5×10^6 células/mL, por 60 minutos, para a aderência celular. Adicionou-se as substâncias testadas seguida de incubação por 24 horas a 37° C. Os ensaios foram realizados com as substâncias nas concentrações de 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM e 1,56 µM.

Após o período total de incubação, o conteúdo da placa foi descartado e 100 µL da solução de MTT (1g/mL) foram adicionados em cada orifício. A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de álcool isopropílico ou solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados a cada orifício. Utilizou-se como controle positivo células e como controle negativo o meio de cultura. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro.

Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, onde o controle negativo correspondia a 100% de viabilidade.

3.2.3.4.3 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da produção da citocina TNF-α.

As células peritoneais foram ajustadas à 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 uma das cavidades foi adicionado 1 mL de suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60

minutos em estufa de CO₂. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com meio de cultura RPMI-1164-C.

Foi adicionado às células aderentes 1 mL de RPMI-1640-C, 1 mL das substâncias testadas e 1 mL de LPS a 1 µg/mL aos macrófagos aderidos à placa. Utilizou-se como controle positivo 1mL de LPS (1 µg/mL) e o meio de cultura RPMI-1640-C (1mL) foi utilizado como controle negativo.

Incubaram-se estas placas a 37°C em estufa 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, aliquotados em *eppendorfs* e armazenados em freezer a -80°C até a determinação da citocina TNF-α através do teste imunoenzimático, ELISA.

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

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

As microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-TNF-α de camundongo, na concentração de 4 µg/mL (100 µL/cavidade) diluído em tampão PBS e incubado “overnight” à 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 100 µL 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 100 µL/cavidade de anticorpo monoclonal anti-TNF-α marcado com biotina e diluído na concentração de 400 ng/mL em PBS-FBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas cinco vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 µL do conjugado peroxidase-estreptovidina 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 100 µL do

substrato foram adicionados em cada cavidade. Após nova incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas e as concentrações da citocina 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.

3.2.3.5 Atividade imunossupressora (*Ensaio de reação linfocitária mista*) (JANG et al., 2011).

O ensaio de reação linfocitária mista (MLR) foi realizado na Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica, com a colaboração do Prof. Thierry Louat.

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas de sangue heparinizado de doadores saudáveis por centrifugação em gradiente de densidade. PBMCs foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 completo contendo 10% de FCS e antibióticos e ajustadas à concentração de $1,2 \times 10^6$ células/mL. Estas células RPMI 1788 foram tratadas com 30 µg/mL de mitomicina C por 20 min a 37°C. Em seguida, foram lavadas quatro vezes com o meio de cultura e suspensas em RPMI-1640 completo para a densidade de $0,45 \times 10^6$ células/mL. Cerca de 100 µL de cada suspensão de células foi misturado com 20 µL dos compostos diluídos. Em seguida, estas foram incubadas a 37°C por 6 dias em 5% CO₂. As células foram colhidas em papel de filtro de vidro e as contagens por minuto (cpm) foram determinadas num contador de cintilação líquida.

3.2.3.6 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 e Anova. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram utilizadas análises de espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas para caracterização estrutural dos compostos sintetizados. Para auxílio na interpretação dos espectros, os quais estão apresentados na seção APÊNDICE, foram utilizadas as seguintes referências: SILVERSTEIN et al., 2006; SANTOS, 2009; MACHADO, 2013.

4.1 Síntese e caracterização dos compostos da série Lapdesf GL-FT

Os compostos da série Lapdesf GL-FT (I-VI) foram obtidos segundo os métodos estabelecidos por Santos e Chung (2011) e Machado (2013) e envolveu reações conhecidas do tipo substituição nucleofílica regioseletiva, adição nucleofílica à carbonila e condensação para a formação de imida.

A primeira etapa consistiu na síntese dos intermediários ftalimídicos (1-3), os quais foram obtidos com bons rendimentos globais, 59-83%. A espectrofotometria na região do infravermelho realizado para identificação dos derivados ftalimídicos 1-3 destacou os estiramentos demonstrados na Tabela 4.

Esses intermediários apresentam no espectro de infravermelho um estiramento característico da formação do sistema imídico, ligação C-N-C, com valores próximos a 1380 cm^{-1} . Outros estiramentos importantes são: estiramento da hidroxila (O-H) na região de 3400 cm^{-1} e os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico os quais se apresentam como duas bandas na região de 1700 cm^{-1} .

No espectro de RMN ^1H os hidrogênios do sistema imídico, H1 e H2, se apresentam como um multipeto na região aromática entre $\delta\ 8,00 - 7,83\text{ ppm}$. Para o derivado 1, o hidrogênio H5 o qual indica a formação da ligação entre as duas unidas é observado como um singlete em $\delta\ 4,29\text{ ppm}$. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios para os intermediários 2 e 3 estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4 - Bandas de absorção no IV referente aos intermediários ftalimídicos **1**, **2** e **3** (pastilha de KBr).

	Intermediário (1)	Intermediário (2)	Intermediário (3)
Grupo funcional	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
O-H	3481,51	3412,0	3468,0
C-H aromático	3099,61	nv*	3086,1
C-H alquílico (simétrico e assimétrico)	2985,81 e 2933,73	nv*	nv*
C=O imida (simétrico e assimétrico)	1772,58 e 1724,36	1747,5 e 1724,3	1774,5 e 1724,3
C=O ácido carboxílico	nv*	1701,2	1701,2
C=C aromático	1614,42 e 1467,83	1608,6 e 1429,2	1589,3 e 1458,1
C-N-C	1388,75	1381,0	1379,1

*nv: não visível no espectro

Tabela 5 - Deslocamentos químicos obtidos no RMN ¹H dos intermediários ftalimídicos **1**, **2** e **3**

	Intermediário (1)	Intermediário (2)	Intermediário (3)
Posição	RMN ¹ H (DMSO _d ₆)		RMN ¹ H (DMSO _d ₆)
1	7,89 (m, 4H)	7,95 (m, 4H)	7,94 (m, 4H)
2	7,89 (m, 4H)	7,95 (m, 4H)	7,94 (m, 4H)
5	4,29 (s, 2H)	-	-
6	-	7,60 (dd; Jorto = 8,1 Hz; Jmeta = 1,5 Hz; 2H)	7,70 (Jorto = 7,75 Hz; Jmeta = 1,5 Hz; 1H)
7	-	8,08 (dd; Jorto = 8,4Hz; Jmeta = 1,5 Hz; 2H)	7,67 (Jorto = 8,1Hz; 1H)
8	-	-	8,05 (Jmeta = 1,5Hz; 1H)
9	-	-	-
10	-	-	8,01 (Jmeta = 1,5Hz; 1H)

Após a obtenção dos intermediários ftalimídicos adequadamente funcionalizados, foram realizadas reações de acoplamento aos glicocorticoides selecionados: prednisolona e budesonida.

Nas reações para obtenção dos produtos finais derivados de prednisolona (GL-FT 1-3) foram substituídos os agentes acoplantes 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e diisopropilcarbodiimida (DIC) pelo etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e utilizou-se como agente catalisador a dimetilaminopiridina (DMAP), buscando uma melhoria na purificação e no rendimento da reação. Porém, houve otimização apenas para o derivado Lapdesf GL-FT 1, obtendo um rendimento de 50%, superior ao descrito na literatura (40%). Na Tabela 6, estão indicados os rendimentos de todos os produtos obtidos até o momento, variando entre 40-83%.

Tabela 6 - Rendimentos dos compostos sintetizados

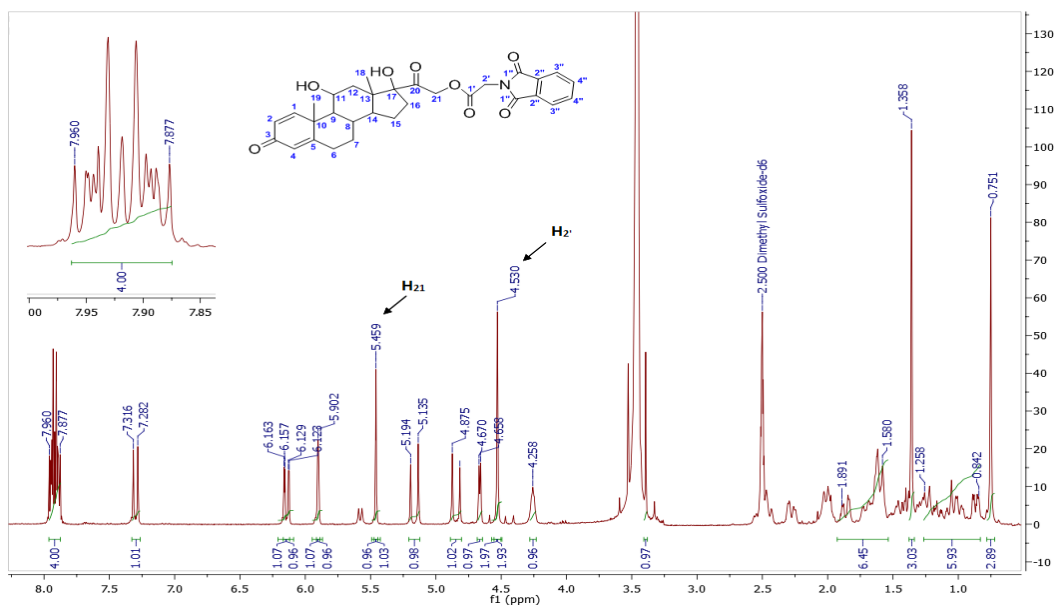
Composto	Rendimento (%)
Intermediários ftalimídicos	
Intermediário 1	59,0
Intermediário 2	71,1
Intermediário 3	83,0
Série Lapdesf GL-FT	
Lapdesf GL-FT 1	50,0
Lapdesf GL-FT 2	40,0
Lapdesf GL-FT 3	48,0
Lapdesf GL-FT 4	80,0
Lapdesf GL-FT 5	70,0
Lapdesf GL-FT 6	80,0

Quanto à caracterização estrutural dos compostos no espectro de infravermelho, observa-se os estiramentos referentes ao sistema imídico, que ocorre por volta de 1775-1780 cm^{-1} , os estiramentos das carbonilas do sistema imídico, o estiramento da hidroxila acima de 3400 cm^{-1} e a carbonila referente ao éster na região acima de 1700 cm^{-1} .

A caracterização estrutural utilizando RMN ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massas indicou a formação dos 6 compostos finais propostos nesse trabalho. Nos espectros de RMN ^1H dos 6 produtos pode-se observar a presença do multipeto na região aromática referente aos 4 hidrogênios da subunidade ftalimídica da molécula, além dos outros deslocamentos referentes a porção glicocorticoide, como observado no Espectro 1 do composto Lapdesf GL-FT 1. Ainda

no Espectro 1, destacam-se os singletos em δ 5,45 e 4,53 ppm referentes aos H_{21} e $H_{2'}$, respectivamente, os quais são indicativos da formação do produto final.

Espectro 1 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 1 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)



Nos espectros de RMN ^1H dos derivados de budesonida, observam-se dois tripletos (ausentes nos derivados de prednisolona) em δ 4,87 e 4,73 ppm referentes aos H_{22} e H_{16} , respectivamente, os quais possuem maiores deslocamentos pela proximidade aos átomos de oxigênio, como exemplificado no Espectro 2.

A Tabela 7 apresenta os principais deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para os compostos GL-FT 4-6.

Espectro 2 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto GL-FT 6 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

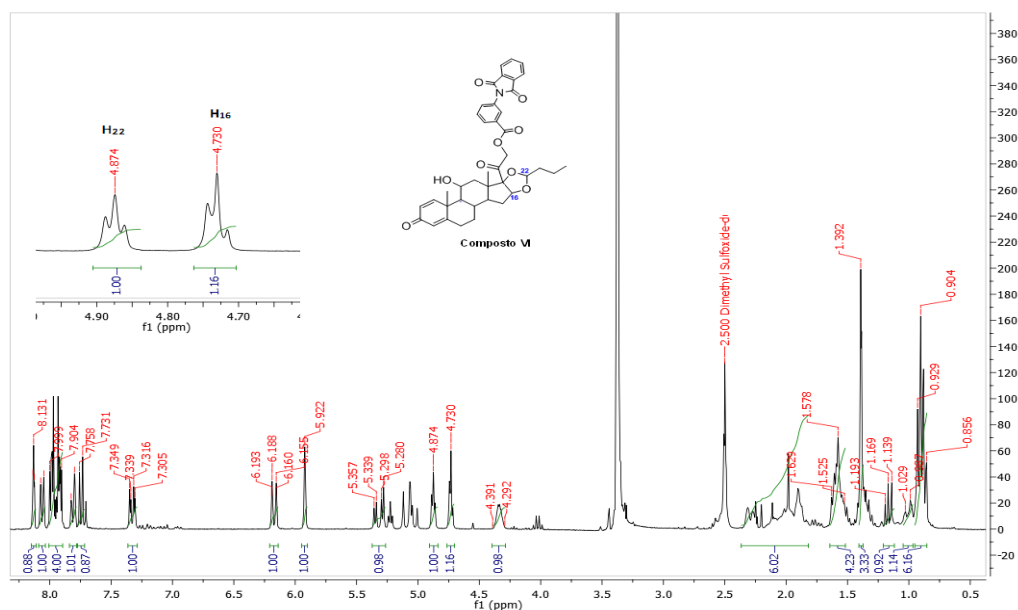
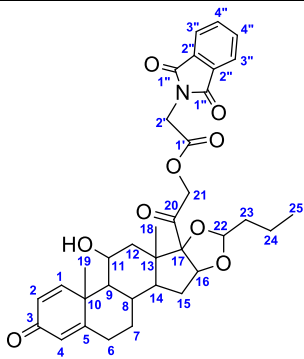
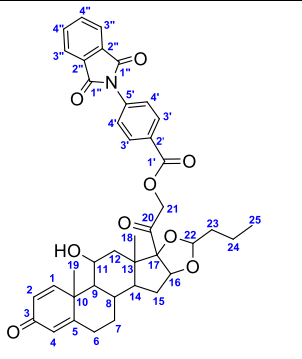
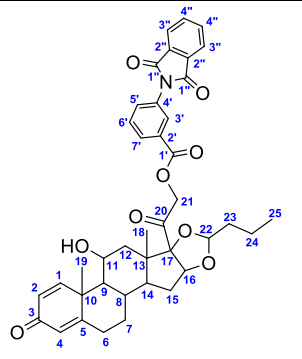


Tabela 7 - Principais deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos Lapdesf GL-FT 4, 5 e 6

	 Lapdesf GL-FT 4		 Lapdesf GL-FT 5		 Lapdesf GL-FT 6	
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
3	-	185,23	-	185,19	-	185,19
16	4,616	81,30	4,747	81,33	4,739	81,33
17	-	97,25	-	97,38	-	97,37
20	-	202,63	-	201,65	-	201,62
22	4,781	82,50	4,889	82,57	4,874	82,55
1'	-	170,28	-	170,24	-	170,22
2'	4,551	68,10	-	136,60	-	132,50
1''	-	167,21	-	166,61	-	166,86
2''	-	131,33	-	131,49	-	132,41
3''	7,879 – 7,962	135,01	7,915-8,014	134,93	7,904–7,999	134,80
4''	7,879 – 7,962	123,57	7,915-8,014	123,62	7,904–7,999	123,52

4.3 Atividade anti-inflamatória (modelo de edema de pata)

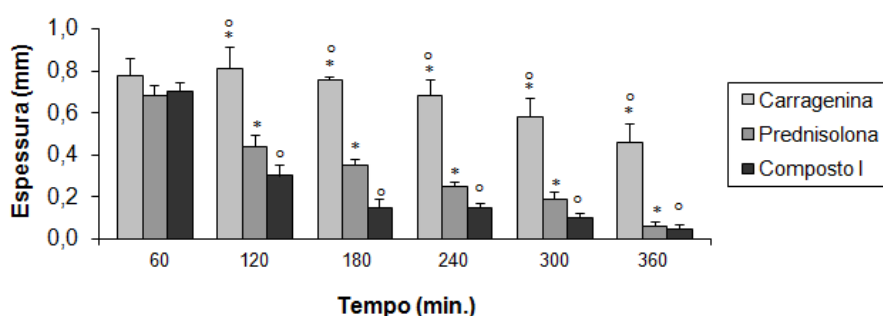
O ensaio de edema de pata induzido por carragenina em ratos foi realizado para avaliar a atividade anti-inflamatória aguda dos compostos II e III, a fim de obter resultados para todos os compostos da série Lapdesf GLFT.

Em estudos prévios realizados por Santos e Chung (2011) o composto I dos derivados de prednisolona (Lapdesf GL-FT 1) foi avaliado frente a esse ensaio. O composto I apresentou atividade anti-inflamatória aguda a partir da segunda hora com diferença significativa em relação ao controle positivo até a sexta hora (Figura 8).

Machado (2013) também avaliou a atividade anti-inflamatória no ensaio de edema de pata para os derivados de budesonida (Figura 9). O composto IV (Lapdesf GL-FT 4) apresentou atividade anti-inflamatória a partir da segunda até a quinta hora, não havendo diferença significativa com o controle positivo nas demais horas. O composto V (Lapdesf GL-FT 5) apresentou atividade anti-inflamatória entre a segunda a quarta hora. Já o composto VI (Lapdesf GL-FT 6) não apresentou atividade anti-inflamatória, sendo estatisticamente semelhante ao controle positivo.

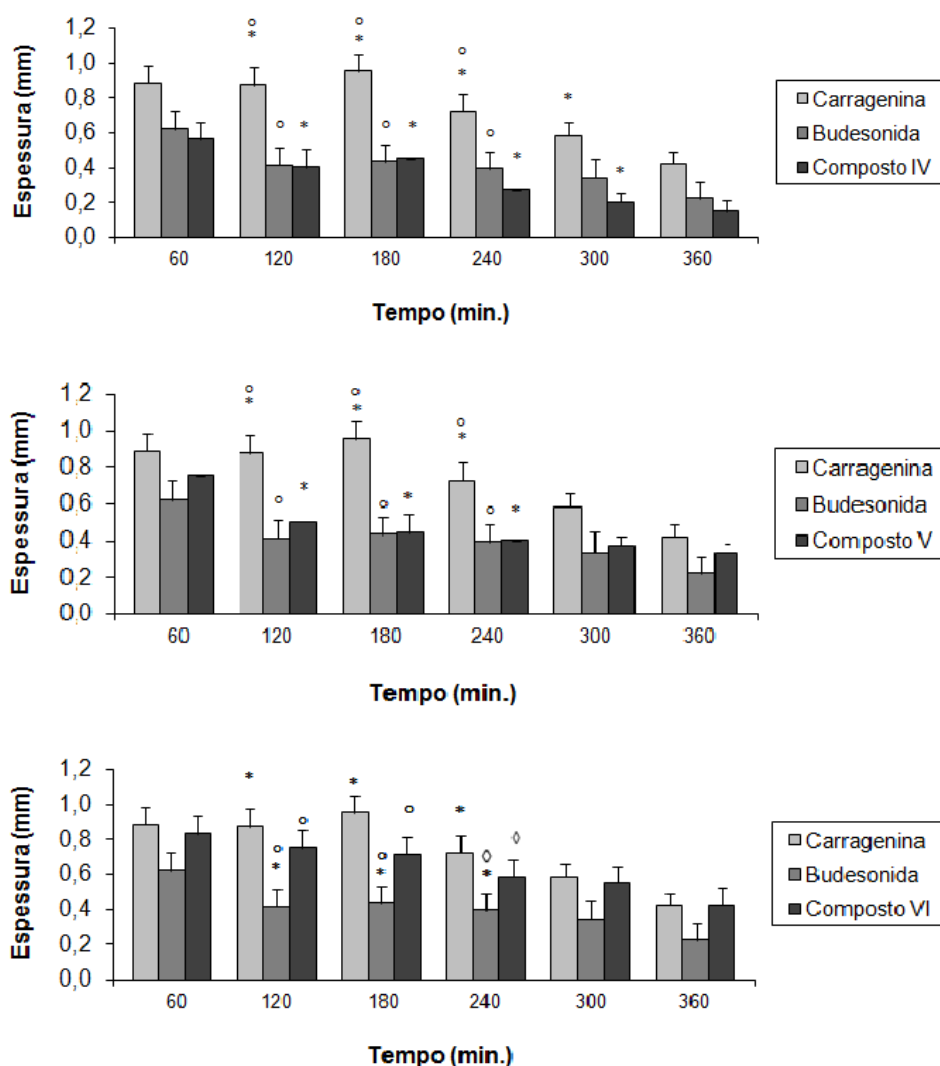
Figura 8 - Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata).

Comparação entre a carragenina, prednisolona e o composto I



Fonte: Santos e Chung, 2011

Figura 9 - Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata).
Budesonida, compostos IV, V e VI



Fonte: Machado, 2013

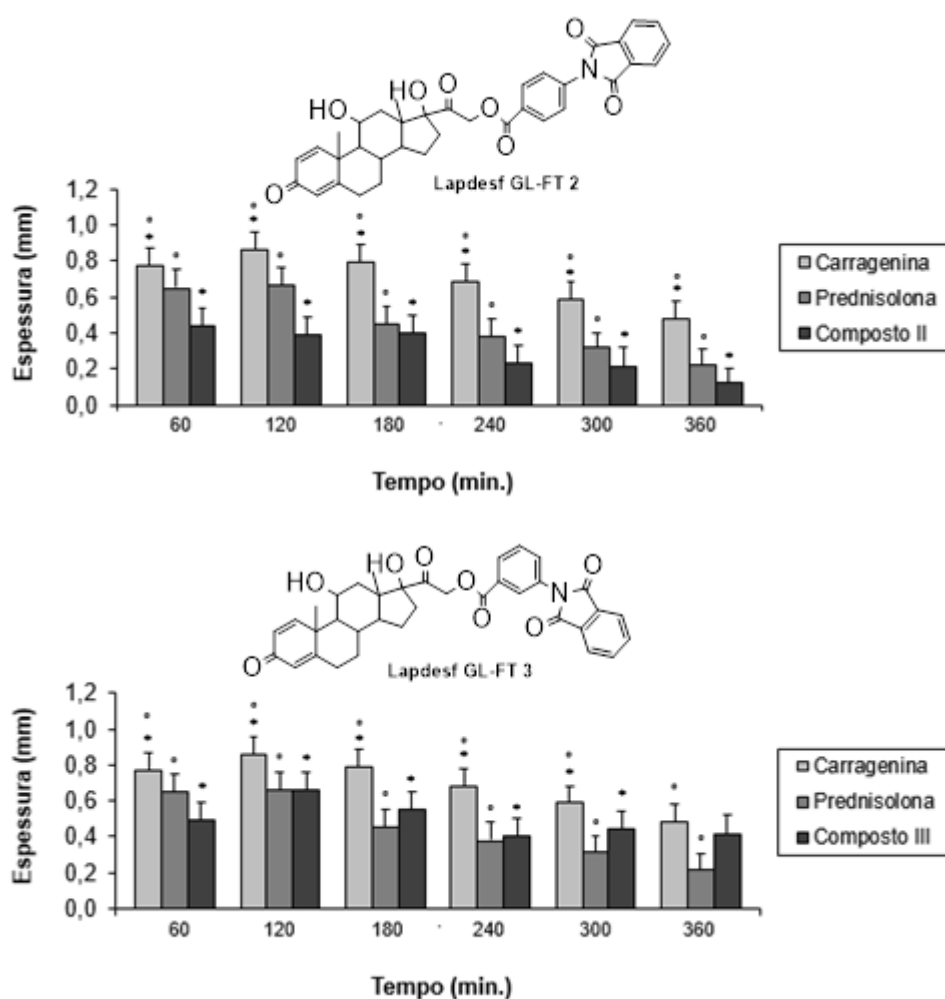
A Figura 10 ilustra a atividade anti-inflamatória dos derivados de prednisolona (100 μ M/kg) no modelo utilizado, comparando-o com a carragenina, indicadora do controle da inflamação, e a prednisolona (100 μ M/kg) que foi o fármaco utilizado como controle.

Os compostos II (Lapdesf GL-FT 2) e III (Lapdesf GL-FT 3) apresentaram atividade anti-inflamatória quando comparados ao controle positivo. O composto II apresentou atividade anti-inflamatória significativa durante todo o ensaio e o composto III apresentou atividade anti-inflamatória significativa nas 5 primeiras horas. Não houve diferença estatística entre os compostos testados e a prednisolona.

Esses dados apresentados indicam o incremento da atividade anti-inflamatória em glicocorticoides quando ocorre a introdução da subunidade ftalimídica, isso é possível devido ao sinergismo de ação característico desses novos híbridos.

Figura 10 - Ensaio de atividade anti-inflamatória aguda (modelo de edema de pata).

Prednisolona, compostos II e III.



Fonte: Autor

4.4 Atividade anti-inflamatória (modelo colite ulcerativa distal)

A retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) são as mais comuns doenças inflamatórias crônicas intestinais que acometem o intestino. Os principais sintomas da colite ulcerativa incluem diarreia com sangue e/ou muco, dor abdominal, incontinência fecal,

emagrecimento. Em casos mais graves pode levar a febre, vômitos e anorexia (TEIXEIRA et al., 2015). A nível microscópico ocorre ruptura da barreira epitelial e formação de ulceração no epitélio (LIU e WANG, 2011).

Dados da literatura mostram que a budesonida é tão efetiva quanto a prednisolona na indução da remissão da RCU, porém com menos efeitos adversos e menor supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (O'DONNELL; O'MORAIN, 2010).

Os compostos da série Lapdesf GL-FT 1-6 foram avaliados frente ao ensaio de colite ulcerativa distal para avaliação da atividade anti-inflamatória.

Para todos os grupos o peso relativo dos cólons não foi considerado, tendo em vista a variação entre os animais devido à presença de fezes no ato da extração do tecido.

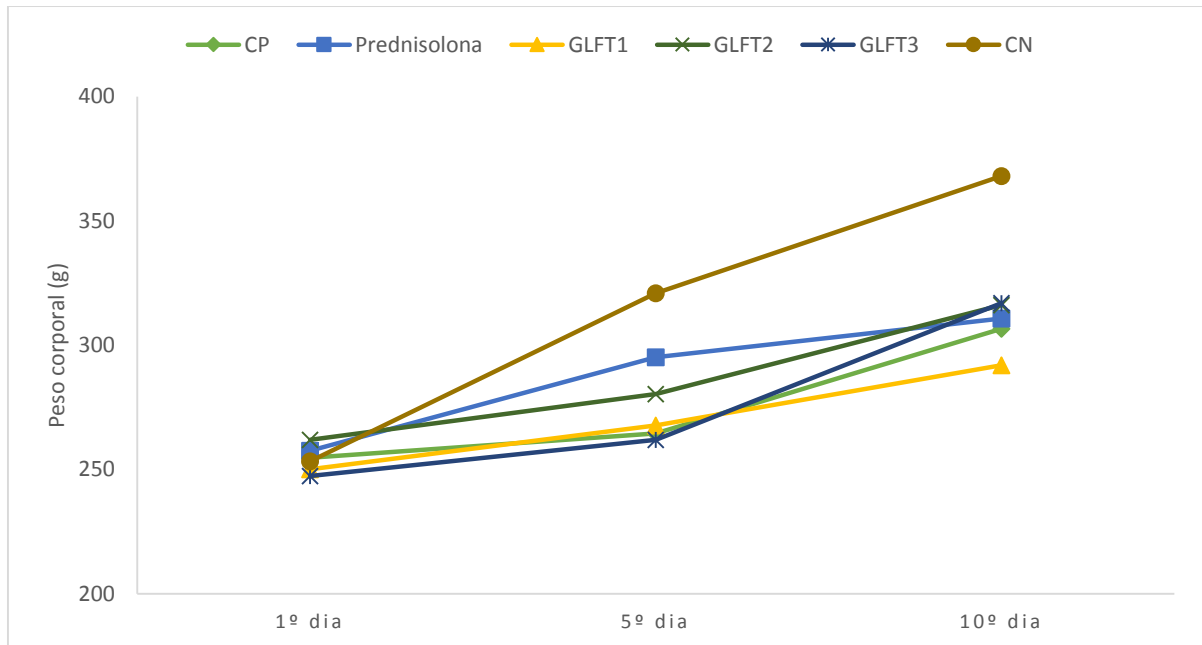
4.4.1 Derivados de prednisolona

No ensaio com os derivados de prednisolona, foi observado em todos os grupos (exceto o controle negativo) a presença de melema, fezes amolecidas e/ou diarreia após a indução de colite com ácido acético.

Observou-se fezes mais consistentes e ausência de melema durante o tratamento nos grupos tratados com prednisolona e GLFT 1. Nos grupos GLFT 2 e GLFT 3 foi observado diarreia apenas em alguns animais destes grupos, ao contrário dos animais do grupo controle positivo que mantiveram a presença de melema nas fezes com presença de diarreia e/ou fezes amolecidas em todos os animais.

Quanto à variação do peso, é possível observar na Figura 11 que todos os grupos ganharam peso após o início do tratamento (5º dia do ensaio). Os animais sadios (controle negativo) e doentes (controle positivo) ganharam peso, cerca de +14,7% e +15,9%, respectivamente, em relação ao 5º e 10º dia do ensaio. Os animais tratados com a prednisolona ganharam peso durante o tratamento cerca de +5,3%. Os animais tratados com os compostos GLFT 1, 2 e 3 ganharam peso durante o tratamento (+9,1%, +12,8% e +21,0%, respectivamente).

Figura 11 - Evolução da média do peso corporal dos ratos tratados a partir do 5º dia com prednisolona, GLFT 1, GLFT 2 e GLFT 3 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.



Fonte: Autor

No grupo prednisolona houve a morte de 1 animal no 4º dia do tratamento (8º dia do ensaio). No grupo tratado com o composto Lapdesf GLFT 2 observou-se a morte de 2 animais durante o tratamento (7º e 8º dia do ensaio). Já nos grupos controle positivo, GLFT 1, GLFT 3 e controle negativo todos os animais sobreviveram até o final do experimento. Os animais que vieram a óbito foram os animais mais debilitados pós-indução, os quais apresentaram perda de peso no início do tratamento.

Quanto à análise macroscópica dos cólons, em alguns animais foram observadas alterações como hiperplasia destacada na Figura 12.

Figura 12 - Análise macroscópica dos cólons tratados com GLFT 1 e 3.



À esquerda cólon com aparência normal, tratado com o composto GLFT 1 e à direita cólon com hiperplasia tratado com o composto GLFT 3.

Fonte: Autor

Ao realizar a análise microscópica do cólon pertencente à um animal tratado com o composto GLFT 3 foi observada perda de continuidade nível 3, atingindo camada muscular e a área afetada foi de mais de 2/3.

Essa hiperplasia também foi observada em 1 animal de cada grupo tratado com a prednisolona, GLFT 1 e GLFT 2, indicando ser uma característica intrínseca ao tratamento com prednisolona. Em relação à largura dessa hiperplasia para cada um dos casos, os valores encontrados foram (em centímetros): 2,2 cm (prednisolona), 1,5 cm (GLFT 1), 1,9 cm (GLFT 2), 2,8 cm (GLFT 3). Dessa forma não podemos fazer uma relação entre um aumento da hiperplasia pela presença da ftalimida nos compostos híbridos.

Outra alteração foi observada em um animal tratado com o composto GLFT 1. Este animal apresentou um intestino com tamanho superior ao normal como observado na Figura 13. Muita diarreia também foi observada no dia do sacrifício.

A complicação mais grave da retocolite ulcerativa é o megacolon tóxico, uma complicação intestinal aguda na qual ocorre a dilatação do cólon com diminuição abrupta da motilidade colônica com acúmulo de fezes e gases no cólon. Na clínica é definido por distensão cólica de, pelo menos, 6 cm, segmentar ou total, em presença de colite aguda e sinais de toxicidade sistêmica como temperatura superior a 38,5°C, frequência cardíaca acima de 120 batimentos por minuto, dentre outros, e envolve risco de vida (WOODHOUSE, 2016).

O megacolon tóxico é caracterizado por uma inflamação severa estendendo-se para a camada muscular lisa. Com a progressão da inflamação os neutrófilos invadem a camada muscular e causam mais danos pela liberação de enzimas proteolíticas, citocinas e leucotrieno

B₄ resultando em dismotilidade levando à dilatação (LOPES et al., 2009; WOODHOUSE, 2016). Isso foi observado na análise histopatológica desse animal. Foram encontradas muitas áreas de ulceração, atingindo profundamente a camada muscular e também necrose como observado na Figura 14.

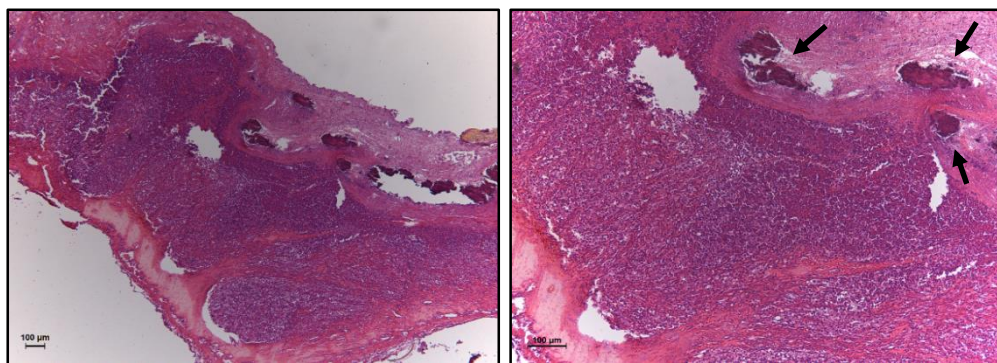
Figura 13 - Comparação macroscópica de dois animais tratados com o composto GLFT 1.



À esquerda um animal com dilatação do cólon e à direita um exemplo de cólon com aparência normal.

Fonte: Autor

Figura 14 - Imagens da análise histopatológica do cólon do animal com megacólon tratado com o composto GLFT 1, aumento de 5 e 10 vezes.



Ulceração da mucosa atingindo camada muscular e necrose (seta)

Fonte: Autor

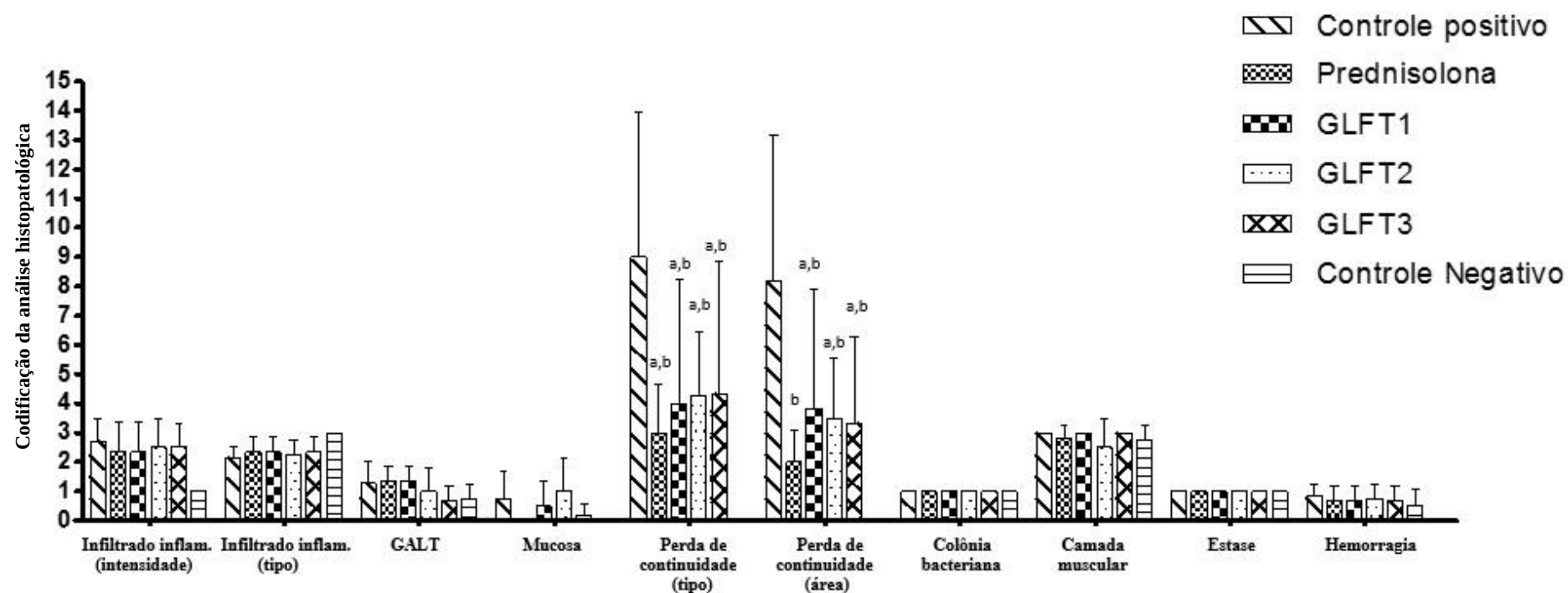
Os resultados das análises microscópicas dos derivados de prednisolona foram inseridos na Figura 15. É possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre a perda de continuidade e a área afetada dos compostos GLFT 1, 2, 3 e prednisolona em relação ao controle positivo e ao controle negativo. Não houve diferença significativa entre prednisolona e GLFT 1, 2 e 3. A regressão total do quadro de ulceração foi observada em 1 animal do grupo tratado com prednisolona e em 2 animais por grupo tratado com os compostos GLFT 1 e GLFT 3. A Tabela 8 apresenta um resumo das análises macro e microscópica obtidos no ensaio.

Tabela 8 - Análise macro e microscópica do cólon e estado geral dos ratos tratados com prednisolona, GLFT 1, GLFT 2 e GLFT 3 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.

	Controle Positivo (n=6)	Prednisolona (n=7)	GLFT 1 (n=6)	GLFT 2 (n=6)	GLFT 3 (n=6)	Controle Negativo (n=6)
Peso (%)	+15,9	+5,3	+9,1	+12,8	+21,0	+14,7
Mortalidade (n/dia da morte)	-	1/8 ^o	-	1/7 ^o e 1/8 ^o	-	-
Melema	+	-	-	-	-	-
Perda de continuidade n (%)						
0	-	1 (16,7)	2 (33,3)	-	2 (33,3)	6 (100)
1	-	-	-	-	-	-
2	1 (16,7)	-	1 (16,7)	1 (25)	-	-
3	5 (83,3)	5 (83,3)	3 (50)	3 (75)	4 (66,7)	-
Área afetada n (%)						
0	-	1 (16,7)	2 (33,3)	-	2 (33,3)	6 (100)
1	1 (16,7)	-	-	1 (25)	-	-
2	-	3 (50)	-	-	-	-
3	5 (83,3)	2 (33,3)	4 (66,7)	3 (75)	4 (66,7)	-

* grau 0: ausente; grau 1: epitélio; grau 2: epitélio + conjuntivo subjacente; grau 3: epitélio + conjuntivo subjacente + camada muscular. ** grau 0: Ausente; grau 1: focal; grau 2: 1/3; grau 3: 2/3 ou mais.
+ = presença; - = ausência

Figura 15 - Análise histopatológica do colón dos animais com colite ulcerativa e submetidos ao tratamento com prednisolona, GLFT 1, 2 e 3.



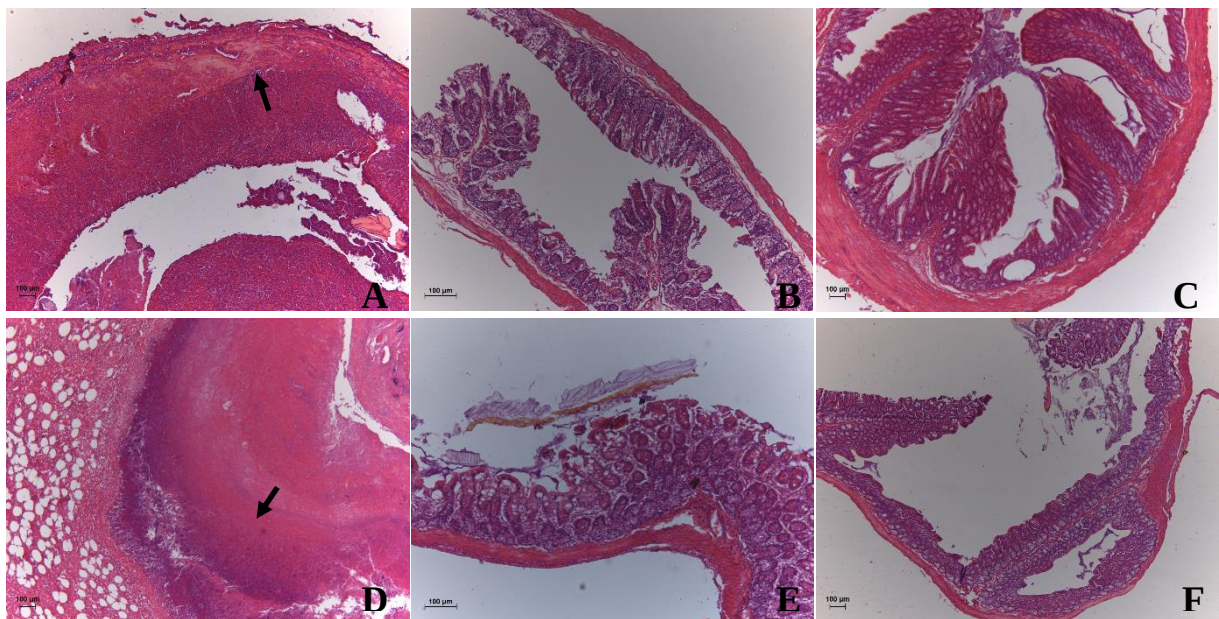
(a) = estatisticamente diferente do controle negativo; (b) = estatisticamente diferente do controle positivo. GALT = Tecido Linfoide Associado ao Aparelho Gástrico.

Fonte: Autor

Os altos valores de codificação histopatológica para a perda de continuidade, se devem às diversas áreas de ulceração observadas principalmente no controle positivo. Quando observada mais de uma área de ulceração os valores em relação à profundidade e a área afetada foram somados a fim de obter um valor que expressasse melhor os resultados encontrados.

A Figura 16 mostra as imagens comparativas dos cólons dos animais tratados com os três derivados de prednisolona (Lapdesf GLFT 1-3) e os grupos controles. É possível observar no controle positivo e GLFT 2 a presença de perda de continuidade com destruição total da mucosa e submucosa, atingindo a camada muscular e a recuperação dos tecidos quando do tratamento com a prednisolona e os derivados GLFT 1 e 3.

Figura 16 - Imagens da análise histopatológica do cólon dos grupos controle positivo, prednisolona, GLFT 1, GLFT 2, GLFT 3 e controle negativo.



(A) = grupo controle positivo, ulceração da mucosa atingindo camada muscular (seta) (5X); (B) = grupo prednisolona, ausência de ulceração (10X); (C) = grupo GLFT 1, ausência de ulceração (5X); (D) = grupo GLFT 2, ulceração da mucosa atingindo camada muscular (seta) (5X); (E) = grupo GLFT 3, ausência de ulceração (10X); (F) = grupo controle negativo, ausência de ulceração (5X).

Fonte: Autor

Não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação à intensidade e o tipo de infiltrado inflamatório, presença de hiperplasia linfóide folicular (GALT), aparência da mucosa e camada muscular, presença de colônia bacteriana, estase e hemorragia.

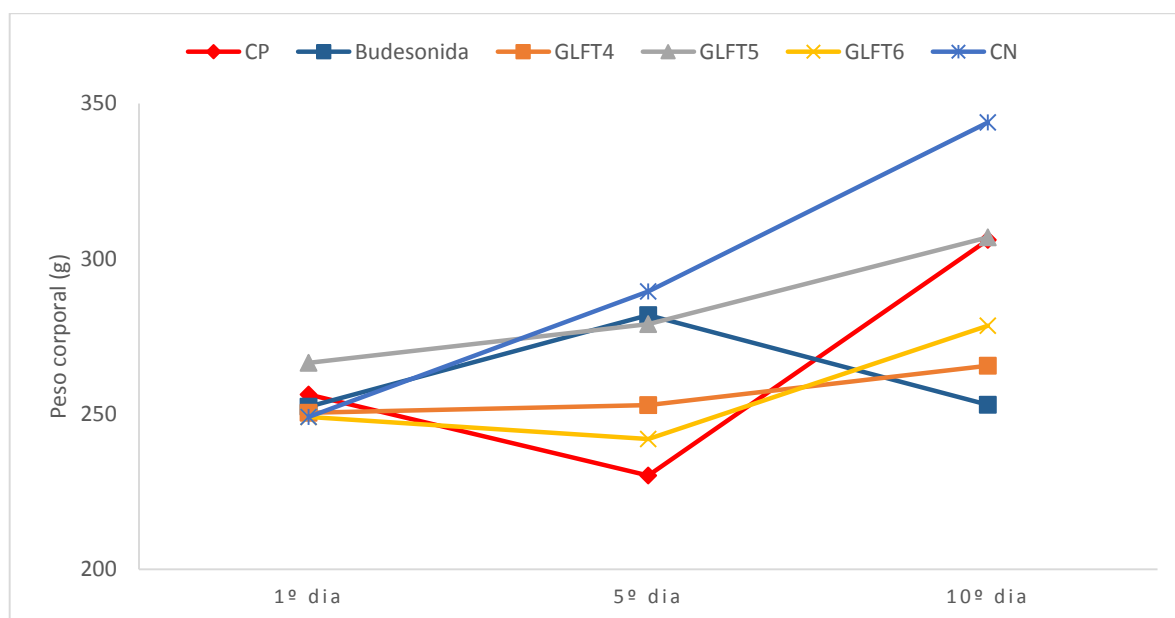
Os resultados encontrados indicaram que os compostos GLFT 1 e 3 apresentaram atividade anti-inflamatória com regressão do caso de ulceração, alcançando inclusive uma regressão total em 33,3% dos animais, superior ao fármaco padrão, prednisolona. Porém, não houve diferença estatística significativa entre estes grupos, não sendo possível afirmar o incremento da atividade anti-inflamatória pela ação da subunidade ftalimídica utilizada no planejamento desses compostos. São necessários mais estudos em relação à toxicidade e efeitos adversos dos compostos obtidos.

4.4.2 Derivados de budesonida

Para os derivados de budesonida, foram observadas fezes amolecidas, diarreia e melema (presença de sangue nas fezes) em todos os grupos após a indução, exceto o controle negativo, resultantes da indução da colite por ácido acético. Observou-se fezes mais consistentes em todos os grupos tratados após o tratamento. O grupo controle positivo manteve a presença de melema nas fezes dos animais.

Quanto à variação do peso, é possível observar na Figura 17 que todos os grupos, exceto budesonida, ganharam peso após o início do tratamento (5º dia do ensaio). Os animais saudáveis (controle negativo) ganharam peso, cerca de +18,8% em relação ao 5º e 10º dia do ensaio. Os animais tratados com a budesonida perderam peso durante o tratamento cerca de -10,2%. Os animais tratados com os compostos GLFT 4, 5 e 6 ganharam peso durante o tratamento (+5,0%, +10,0% e +15,0%, respectivamente). Por outro lado, o grupo controle positivo perdeu peso após a indução, mas apresentou um ganho de + 33% entre o 5º e 10º dia do ensaio. Esse ganho de peso pode ser em decorrência desses animais apresentarem edema e não devido ao restabelecimento da condição normal, comprovado pelas análises histopatológicas.

Figura 17 - Evolução da média do peso corporal dos ratos tratados a partir do 5º dia com budesonida, GLFT 4, GLFT 5 e GLFT 6 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.



Fonte: Autor

No controle positivo houve a morte de 1 animal no 9º dia do ensaio. No grupo tratado com o composto Lapdesf GLFT 4 observou-se a morte de 1 animal no 10º dia do ensaio (dia do sacrifício), enquanto no grupo Lapdesf GLFT 6 houveram duas mortes durante o tratamento (8º e 9º dia do ensaio). Já nos grupos budesonida, GLFT 5 e controle negativo não foram observadas mortes de animais. Observou-se que os animais que vieram a óbito foram os animais mais debilitados pós-indução, que perderam mais peso.

Não foram observadas alterações macroscópicas nos cólons dos animais de todos os grupos analisados.

Todos os resultados das análises microscópicas dos derivados de budesonida foram inseridos na Figura 18. Os compostos GLFT 4, 5 e 6 promoveram diminuição das ulcerações no cólon provocadas pela colite induzida pelo ácido acético (no gráfico descrito como perda de continuidade epitelial, termo histopatológico para ulceração). É possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre a perda de continuidade e área afetada dos compostos GLFT 5 e 6 e budesonida em relação ao controle positivo. O composto GLFT 5 mostrou-se como o mais promissor por não apresentar mortalidade e ser capaz de regredir

totalmente o quadro de ulceração em 5 dos 6 animais testados se apresentando semelhante estatisticamente ao grupo negativo (sadio) e a budesonida, ao qual apresentou regressão total do quadro de ulceração em 100% dos animais utilizados no teste (5/5).

O grupo tratado com o composto GLFT 6 também foi semelhante estatisticamente ao controle negativo, promovendo a regressão total da ulceração em 3 animais (3/4). Já no grupo tratado com o derivado GLFT 4, em apenas 1 animal foi observado a regressão total da ulceração, sendo diferente estatisticamente do grupo controle negativo.

A Tabela 9 apresenta um resumo das análises macro e microscópica obtidos no ensaio.

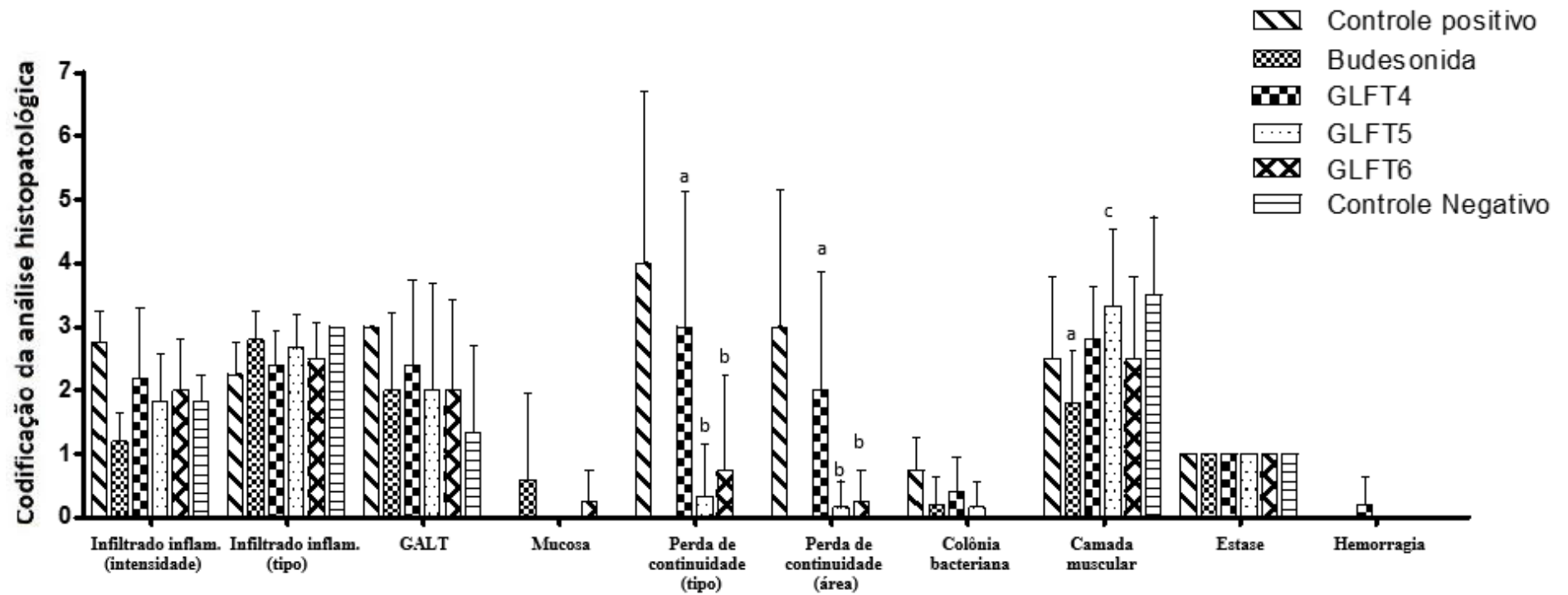
Tabela 9 - Análise macro e microscópica do cólon e estado geral dos ratos tratados com budesonida, GLFT 4, GLFT 5 e GLFT 6 em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético.

	Controle Positivo (n=5)	Budesonida (n=5)	GLFT 4 (n=6)	GLFT 5 (n=6)	GLFT 6 (n=6)	Controle Negativo (n=6)
Peso (%)	+ 33,0	-10,2	+5,0	+10,0	+15,0	+18,8
Mortalidade (n/dia da morte)	1/9 ^o	-	1/10 ^o	-	1/8 ^o e 1/9 ^o	-
Melema	+	-	-	-	-	-
Perda de continuidade*						
n (%)						
0	1 (25)	5 (100)	1 (20)	5 (83,3)	3 (75)	6 (100)
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	1 (20)	1 (16,7)	-	-
3	3 (75)	-	3 (60)	-	1 (25)	-
Área afetada**						
n (%)						
0	1 (25)	5 (100)	1 (20)	5 (83,3)	3 (75)	6 (100)
1	-	-	2 (40)	1 (16,7)	1 (25)	-
2	-	-	-	-	-	-
3	3 (75)	-	2 (40)	-	-	-

* grau 0: ausente; grau 1: epitélio; grau 2: epitélio + conjuntivo subjacente; grau 3: epitélio + conjuntivo subjacente + camada muscular. ** grau 0: Ausente; grau 1: focal; grau 2: 1/3; grau 3: 2/3 ou mais.

+ = presença; - = ausência

Figura 18 -Análise histopatológica do colón dos animais com colite ulcerativa e submetidos ao tratamento com budesonida, GLFT 4, 5 e 6.

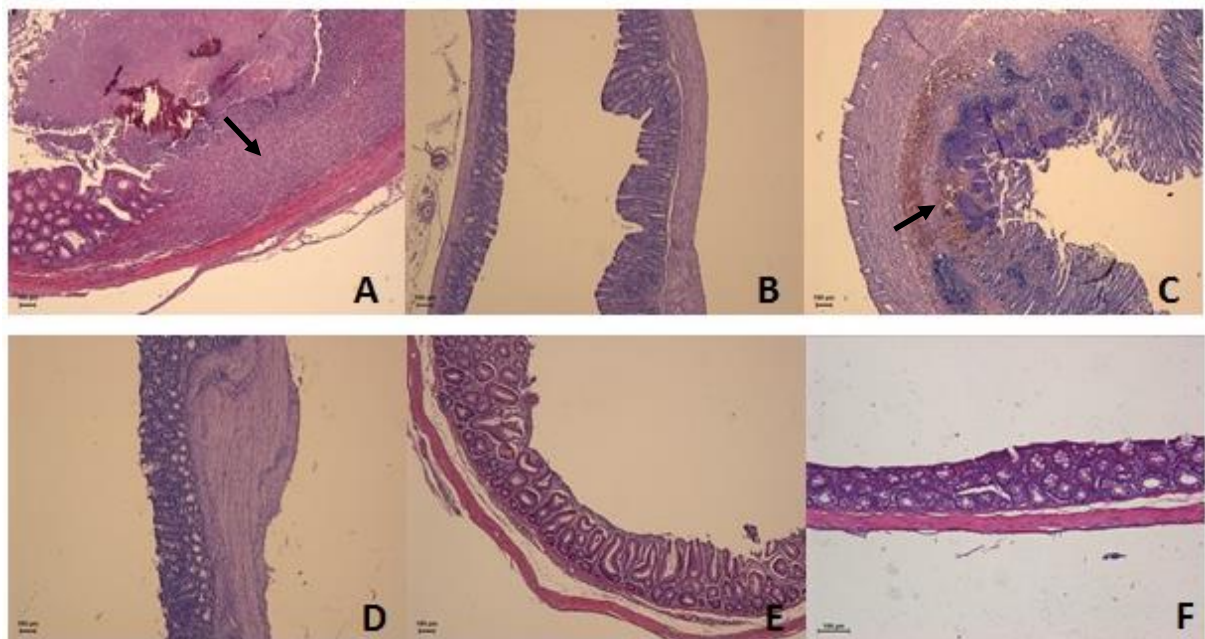


(a) = estatisticamente diferente do controle negativo; (b) = estatisticamente diferente do controle positivo; (c) = estatisticamente diferente da budesonida. GALT = Tecido Linfoide Associado ao Aparelho Gástrico.

Fonte: Autor

A Figura 19 mostra as fotografias comparativas dos cólons dos animais tratados com os três derivados da série Lapdesf GLFT 4-6 e os grupos controles. É possível observar no controle positivo a presença de perda de continuidade provocada pela indução da colite pelo ácido acético, com destruição total da mucosa e submucosa, atingindo a camada muscular. Observa-se também a recuperação dos tecidos quando do tratamento com os derivados GLFT 5 e 6. Esses resultados indicam a potencialidade desses compostos na indução da remissão da doença, pois de acordo com Naganuma et al. (2016) a cicatrização da mucosa é o principal objetivo terapêutico durante o tratamento da RCU.

Figura 19 - Imagens da análise histopatológica do cólon dos grupos controle positivo, budesonida, GLFT 4, GLFT 5, GLFT 6 e controle negativo.

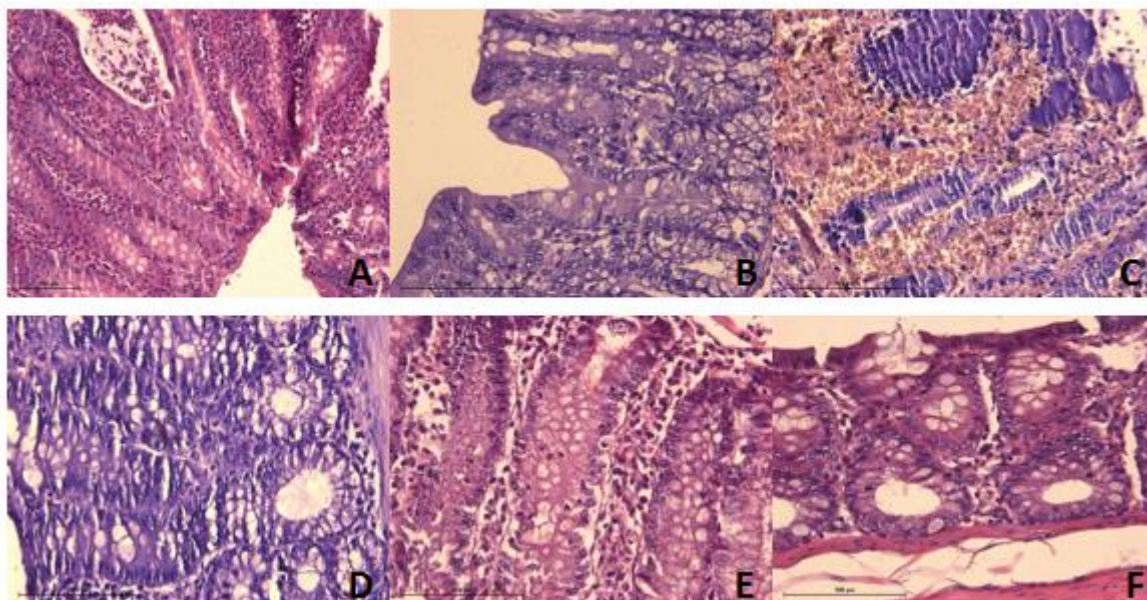


(A) = grupo controle positivo, ulceração da mucosa atingindo camada muscular (seta) (5X); (B) = grupo budesonida, ausência de ulceração (5X); (C) = grupo GLFT 4, ulceração da mucosa focal (seta) (5X); (D) = grupo GLFT 5, ausência de ulceração (5X); (E) = grupo GLFT 6, ausência de ulceração (5X); (F) = grupo controle negativo, ausência de ulceração (10X).

Fonte: Autor

Não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação à intensidade e o tipo de infiltrado inflamatório (ilustrado na Figura 20) e presença de hiperplasia linfóide folicular (GALT). Ressalta-se que a introdução do cateter/sonda gástrica de Levine nº 4, gera um estímulo mecânico imunológico, resultando em uma resposta hiperplásica.

Figura 20 - Imagens da análise histopatológica do cólon dos grupos controle positivo, budesonida, GLFT 4, GLFT 5, GLFT 6 e controle negativo.



(A) = grupo controle positivo, infiltrado inflamatório (20X) (B) = grupo budesonida, infiltrado inflamatório (40X); (C) = grupo GLFT 4, infiltrado inflamatório (40X); (D) = grupo GLFT 5, infiltrado inflamatório (40X); (E) = grupo GLFT 6, infiltrado inflamatório (40X); (F) = grupo controle negativo, infiltrado inflamatório (40X).

Fonte: Autor

Houve diferença significativa em relação a camada muscular do composto GLFT 5 em relação ao fármaco de origem, budesonida. O grupo GLFT 5 apresentou em sua maioria regiões de atrofia e hipertrofia semelhante estatisticamente ao grupo controle negativo. Entretanto, no grupo budesonida, foram observadas regiões atróficas e normais.

Todos os grupos apresentaram estase, sendo que em apenas um animal do grupo GLFT 4, observou-se presença de hemorragia, não havendo diferença estatística entre os grupos.

O epitélio da mucosa se apresentou atrófico para todos os animais dos grupos controle positivo, GLFT 4, GLFT 5 e controle negativo. Nos grupos budesonida e GLFT 6 houveram animais com mucosa papilomatosa e normal, respectivamente, porém sem diferença estatística entre os seis grupos.

O desequilíbrio na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na mucosa do cólon, desempenha um papel importante no desenvolvimento dessa doença. A produção excessiva de EROs, induzida pela citocina $\text{TNF-}\alpha$, nas células da mucosa induz respostas inflamatórias que podem, direta ou indiretamente causar dano as células epiteliais

intestinais, influenciando assim, na integridade da mucosa ou iniciando uma cascata de sinalização inflamatória que pode levar a insuficiência grave em situações de colite (ZHOU et al., 2006).

Dessa forma, diversos estudos relatam os benefícios na remissão clínica e no processo de cicatrização da mucosa pelo uso dos agentes biológicos anti-TNF- α , infliximab e adalimumab no tratamento da colite ulcerativa (RUTGEERTS et al., 2005). Entretanto a terapia com anticorpos monoclonais é cara e está relacionada ao risco de reativação de infecção latente, como tuberculose (CHRISTOPHI et al., 2016).

A partir dos resultados encontrados com diminuição significativa da ulceração pelos compostos GLFT 5 e 6, sendo estes similares a budesonida, não é possível afirmar que houve incremento da atividade anti-inflamatória pela ação da subunidade ftalimídica utilizada no planejamento desses compostos. Mais estudos serão necessários, com avaliação da toxicidade dos mesmos, porém os compostos planejados podem ser uma alternativa ao uso da mesalazina na indução e manutenção da remissão da doença, por conter na mesma molécula os benefícios conhecidos da budesonida e a modulação da citocina TNF- α , com possível diminuição dos efeitos adversos os quais limitam o uso de corticosteroides para manutenção da remissão da doença.

4.5 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos

A avaliação da viabilidade de macrófagos foi realizada utilizando-se o teste de MTT desenvolvido por Mosmann (1983). Nessa técnica, verifica-se nas células viáveis a formação de cristais de formazana, de coloração púrpura, decorrente da clivagem do anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio). Quanto menor a citotoxicidade das substâncias, maior será a intensidade metabólica e consequentemente maior será a absorvância da solução. Para a realização dos demais testes de quantificação de citocinas são necessárias viabilidades celulares superiores a 70%.

Os seis compostos da série Lapdesf GL-FT e seus padrões prednisolona e budesonida foram avaliados no ensaio de viabilidade nas concentrações de 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M e 1,65 μ M.

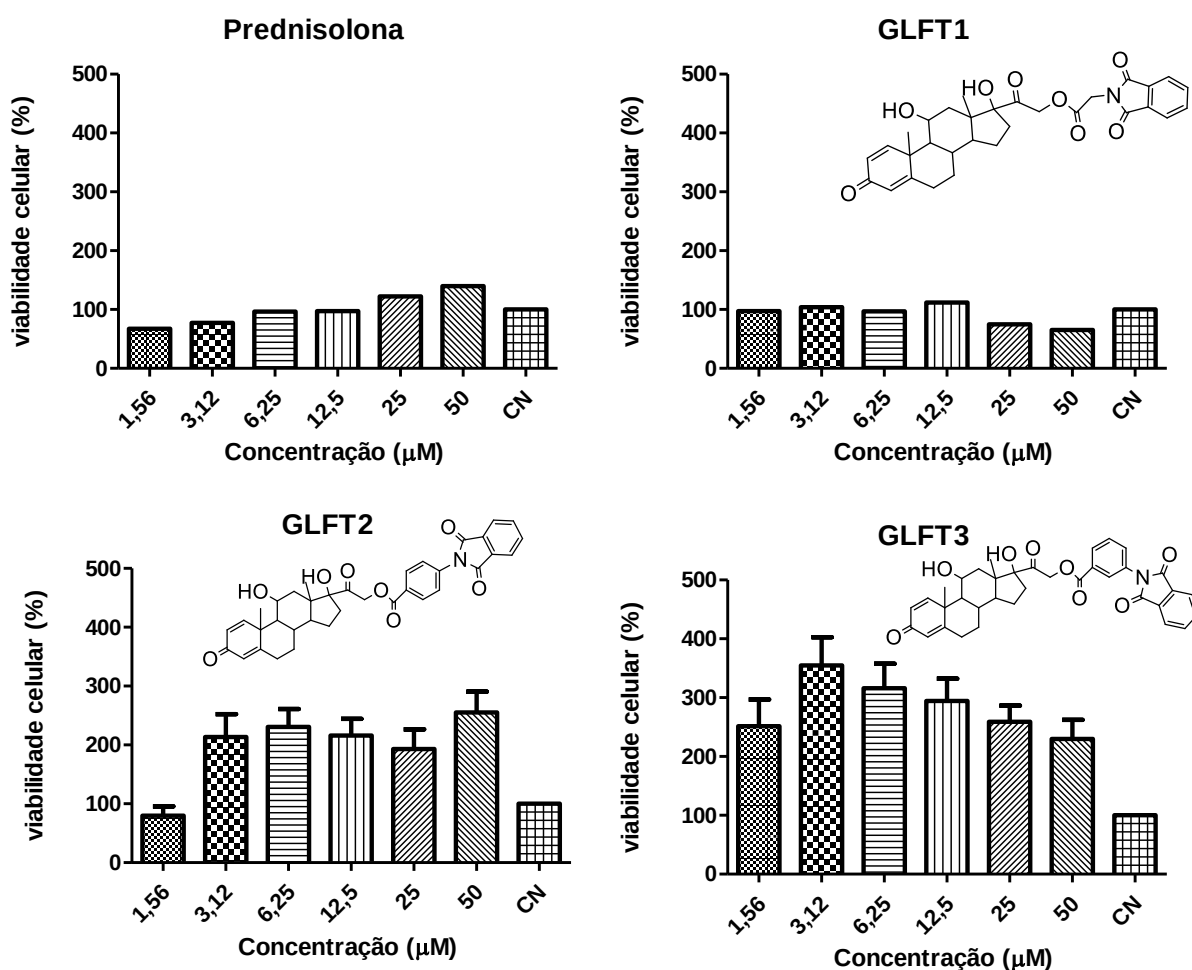
Na Figura 21 encontra-se os resultados para os derivados de prednisolona. Observa-se altos valores de viabilidade celular para todos os compostos em todas as concentrações testadas, chegando a valores superiores a 100%, destacando-se o derivado GLFT 3 com valores próximos

a 400%. Essas grandes porcentagens indicam uma proliferação celular pelos compostos testados, impedindo o andamento dos testes de detecção de citocinas.

Os atuais resultados para os compostos GLFT 2 e 3 despertaram a indagação sobre uma possível atividade de estimulação da telomerase, devido a semelhança estrutural dos corticoides com o cicloastragenol (Figura 22) (IP et al., 2014). Ensaios que avaliem proliferação celular estão sendo considerados para estes compostos.

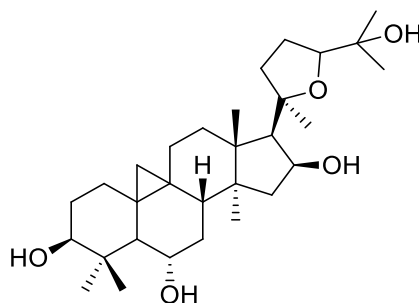
Para os derivados da budesonida também foram observados altos valores de viabilidade celular nas concentrações utilizadas (Figura 23). Para o composto GLFT 5 valores próximos a 200% de viabilidade foram encontrados.

Figura 21 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de prednisolona, Lapdesf GLFT1, Lapdesf GLFT2 e Lapdesf GLFT3.

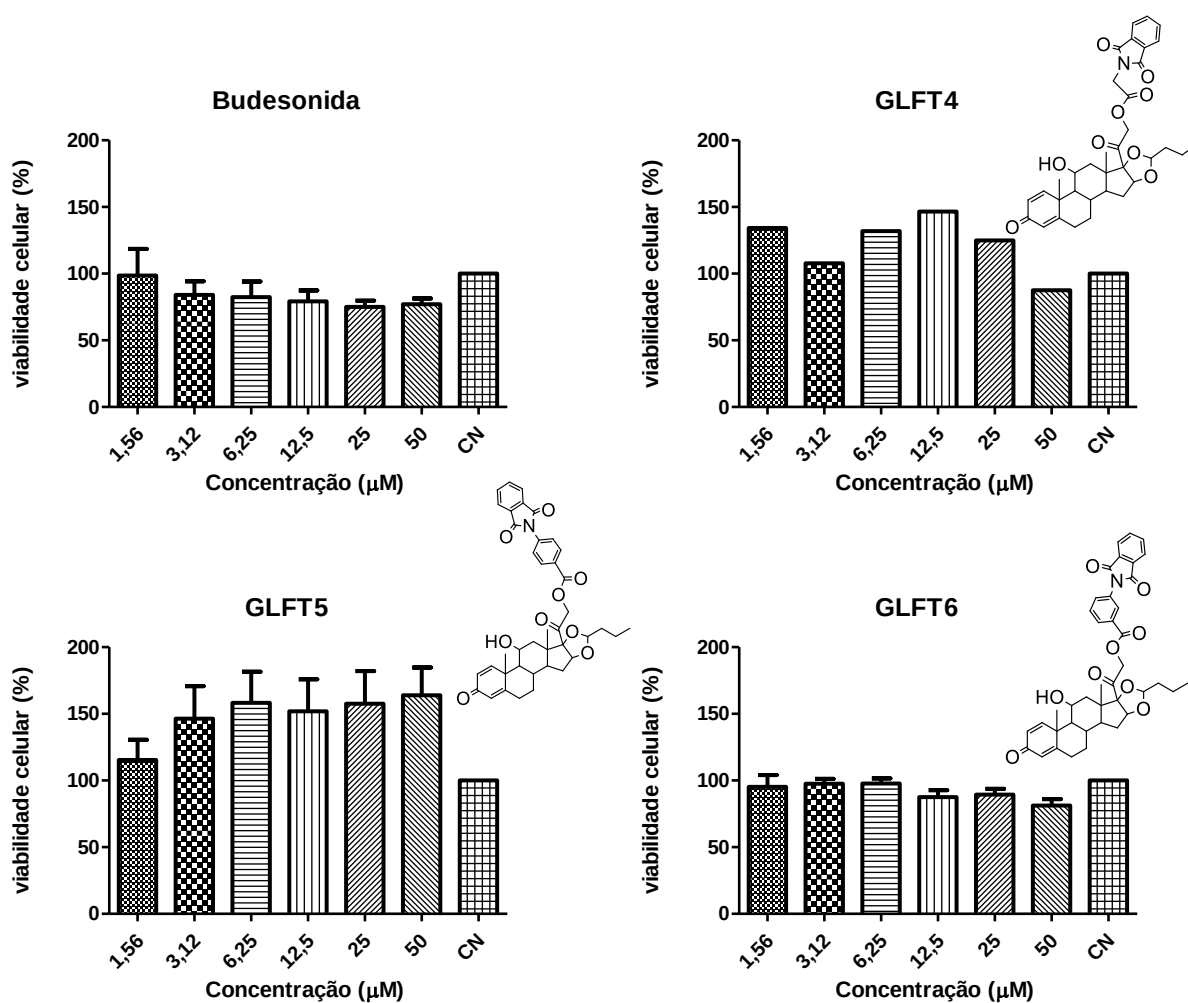


As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (CN), equivalendo a 100% de viabilidade.

Fonte: Autor

Figura 22 - Estrutura molecular do cicloastragenol

Fonte: Autor

Figura 23 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de budesonida, Lapdesf GLFT4, Lapdesf GLFT5 e Lapdesf GLFT6.

As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (CN), equivalendo a 100% de viabilidade.

Fonte: Autor

O ensaio de doseamento da citocina TNF-alfa foi realizado para os compostos derivados da budesonida GL-FT 4-6 em três diferentes concentrações não citotóxicas para as células: 1 μM , 0,1 μM e 0,01 μM . Porém, o controle positivo (LPS) apresentou valores não condizentes com o ensaio indicando a necessidade da repetição deste, com a utilização de animais provenientes de um biotério com melhores padrões sanitários.

4.6 Atividade imunossupressora (ensaio de MLR)

Os compostos Lapdesf GL-FT 1-6 foram avaliados quanto a atividade imunossupressora no ensaio de reação linfocitária mista (MLR). Este é um modelo *in vitro* utilizado para avaliar a rejeição após o transplante de órgãos. Foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas que foram incubadas na presença de células estimulatórias (RPMI-1788) em doses crescentes dos compostos por 6 dias (0,0001 μM - 10 μM).

Na Tabela 10 estão expressas as porcentagens de inibição da proliferação de linfócitos na concentração de 10 μM (maior concentração testada). Como controle foram utilizados a talidomida (devido os compostos serem derivados de ftalimida) e o ácido micofenólico, um fármaco imunossupressor utilizado para prevenir rejeição em transplante de órgãos.

Observou-se que os compostos da série Lapdesf GL-FT 1-6 não apresentaram atividade imunossupressora, atingindo a porcentagem máxima de 13,6 % para o composto Lapdesf GL-FT 6, quando comparado ao ácido micofenólico com 98,7 % de inibição. Além disso apresentaram altos valores de IC_{50} , semelhante a talidomida.

Esses resultados são importantes por indicar que os compostos sintetizados como potenciais inibidores da citocina TNF-alfa não apresentam o risco relacionado a terapia com anticorpos monoclonais em relação a reativação de infecção latente, como tuberculose.

Tabela 10 - Inibição de MLR (%) e IC₅₀ (μM) dos compostos da série Lapdesf GL-FT 1-6

Composto	MLR	
	Inibição (%) a 10 μM	IC ₅₀ (μM)
Lapdesf GL-FT 1	- 8,7	> 10
Lapdesf GL-FT 2	6,3	> 10
Lapdesf GL-FT 3	- 13,7	> 10
Lapdesf GL-FT 4	5,3	> 10
Lapdesf GL-FT 5	8,3	> 10
Lapdesf GL-FT 6	13,6	> 10
Talidomida	- 1,1	> 10
Ácido micofenólico	98,7	0,051

5 CONCLUSÕES

Foram obtidos três diferentes intermediários sintéticos (1-3) e seis produtos finais (Série Lapdesf GL-FT 1-6), com rendimentos variando entre 40 e 83%.

Os derivados da budesonida Lapdesf GL-FT 5 e 6 apresentaram atividade anti-inflamatória com regressão do quadro de ulceração causada pela indução com ácido acético, sendo iguais estatisticamente ao controle negativo. O composto 5 ainda apresentou regressão total da ulceração em 83,3% dos animais tratados e melhora nos sinais clínicos como perda de peso e sobrevida dos animais.

Os compostos GLFT 1, 2 e 3 foram diferentes estatisticamente dos grupos controle positivo e negativo. GLFT 1 e 3 apresentaram atividade anti-inflamatória com regressão total do quadro de ulceração em 33,3% dos animais em cada grupo, sendo superior ao fármaco padrão, prednisolona, que obteve 16,7% de regressão total da ulceração.

Todos os compostos finais da série Lapdesf GL-FT apresentaram viabilidade celular superior a 70% nas concentrações testadas, indicando uma baixa citotoxicidade das substâncias. Porém, os compostos GL-FT 2 e 3 apresentaram viabilidade celular inesperada, chegando a valores de 300 e 400%, respectivamente, nas concentrações avaliadas.

Os derivados da série Lapdesf GL-FT 1-6 não apresentaram atividade imunossupressora no ensaio *in vitro*.

Os compostos GL-FT 2 e 3 apresentaram atividade anti-inflamatória significativa quando comparado a carragenina e foram similares aos padrões prednisolona e budesonida no ensaio de edema de pata.

6 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular para os derivados esteroides sintetizados, será realizado um novo ensaio alternativo ao MTT, o qual trará informações adicionais a respeito da possível atividade de proliferação celular pelos compostos GL-FT 2 e 3. Caso os resultados confirmem a atividade proliferativa, a estimulação de telomerase será investigada.

A fim de obter maiores informações a respeito da atividade anti-inflamatória desses compostos novos testes de doseamento da citocina TNF- α serão realizados, assim como a ação desses compostos sobre o complexo de proteína quinase (IKK).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, K.J.; VIRKKI, L.M.; MALMIVAARA, A.; KONTTINEN, Y.T.; NORDSTRÖM, D.C.; BLOM, M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e30275, 2012.

AGGARWAL, B.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; HARIKUMAR, K.B.; GUPTA, S.R. THARAKAN, S.T.; KOCA, C.; DEY, S.; SUNG, B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1171, p. 59-76, 2009.

ALGABA, A.; LINARES, P. M.; FERNÁNDEZ-CONTRERAS, M. E.; FIGUEROLA, A.; CALVET, X.; GUERRA, I.; DE POUSA, I.; CHAPARRO, M.; GISBERT, J. P.; BERMEJO, F. The effects of infliximab or adalimumab on vascular endothelial growth factor and angiopoietin 1 angiogenic factor levels in inflammatory bowel disease: serial observations in 37 patients. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 20, n. 4, p. 695-702, 2014.

ALKIM, C.; ALKIM, H.; KOKSAL, A. R.; BOGA, S.; SEN, I. Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. **Int. J. Inflamm.**, v. 2015, 2015.

ASSIS, S.P.; SILVA, M.T.; OLIVEIRA, R.N.; LIMA, V.L. Synthesis and anti-inflammatory activity of new alkyl-substituted phthalimide 1H-1,2,3-triazole derivatives. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

BARALDI, P.G.; ROMAGNOLI, R.; DEL CARMEN NUÑEZ, M.; PERRETTI, M.; PAUL-CLARK, M.J.; FERRARIO, M.; GOVONI, M.; BENEDINI, F.; ONGINI, E. Synthesis of nitro esters of prednisolone, new compounds combining pharmacological properties of both glucocorticoids and nitric oxide. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 711-719, 2004.

BARBOSA, M.L.; RAMOS, T.J.; ARANTES, A.C.; MARTINS, M.A., SILVA, P.M.; BARREIRO, E.J.; LIMA, L.M. Synthesis and pharmacological evaluation of novel phenyl sulfonamide derivatives designed as modulators of pulmonary inflammatory response. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14651-14672, 2012.

BAYRY, J. New horizons in natural TNF- α antagonist research. **Trends Mol. Med.**, v. 17, n. 10, p. 538-540, 2011.

BEEDIE, S.L.; RORE, H.M.; BARNETT, S.; CHAU, C.H.; LUO, W.; GREIG, N.H.; FIGG, W.D; VARGESSON, N. In vivo screening and discovery of novel candidate thalidomide analogs in the zebrafish embryo and chicken embryo model systems. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 33237-33245, 2016.

BHAT, M.A.; AL-OMAR, M.A.; ANSARI, M.A.; ZOHEIR, K.M.; IMAM, F.; ATTIA, S.M.; BAKHEET, S.A.; NADEEM, A.; KORASHY, H.M.; VORONKOV, A.; BERISHVILI, V.; AHMAD, S.F. Design and synthesis of n-arylphthalimides as inhibitors of glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein, proinflammatory mediators, and cytokines in carrageenan-induced lung inflammation. **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 22, p. 8850-8867, 2015.

- BIJLSMA, J.W.J; BOERS, M.; SAAG, K.G.; FURST, D.E. Glucocorticoids in the treatment of early and late RA. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, p. 1033-1037, 2003.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **T. Reumat. Clín.**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.
- BÍLKOVÁ, E.; IMRAMOVSKÝ, A.; SEDLÁK, M. Recent advances in the design and synthesis of prednisolone and methylprednisolone conjugates. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, p. 3577-3595, 2011.
- BORGES, L.G.; FROEHLICH, P.E. Talidomida: novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n. 1, p. 96-102, 2003.
- BOSQUESI, P.L.; MELO, T.R.F.; VIZIOLI, E.O.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Anti-inflammatory drug design using a molecular hybridization approach. **Pharmaceuticals**, v. 4, p. 1450-1474, 2011.
- BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 364 p.
- BRENNAN, F.M.; FELDRNANNT, M. 1996. Cytokines in autoimmunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 872-877, 1996.
- CANTANHEDA, C.; ASSIS, E.; AZEVEDO, V.; ROMÃO, V.A.; SIMAS, H. Infliximab e Artrite Reumatóide. UNIMED-RIO. **Recom. Med.**, p. 1-24, 2007.
- CASAL J.J.; BOLLINI, M.; LOMBARDO, M.E.; BRUNO, A.M. Thalidomide analogues: Tumor necrosis factor-alpha inhibitors and their evaluation as anti-inflammatory agents. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 114-119, 2016.
- CHAPARRO, M.; GUERRA, I.; MUÑOZ-LINARES, P.; GISBERT, J.P. Systematic review: antibodies and anti-TNF-a levels in inflammatory bowel disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 35, p. 971-986, 2012.
- CHERNOGUZ, A.; CRAWFORD, K.; VANDERSALL, A.; RAO, M.; WILLSON, T.; DENSON, L. A.; FRISCHER, J. S. Pretreatment with anti-VEGF therapy may exacerbate inflammation in experimental acute colitis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 47, n. 2, p. 347-354, 2012.
- CHRISTOPHI, G.P.; RENGARAJAN, A.; CIORBA, M.A. Rectal budesonide and mesalamine formulations in active ulcerative proctosigmoiditis: efficacy, tolerance, and treatment approach. **Clin. Exp. Gastroenterol.**, v. 9, p. 125-130, 2016.
- CHUNG, M.C. **Interações medicamentosas no planejamento de novos fármacos**. 446p. Tese (Livro Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2012.
- CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latência e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, p. 155-179, 2005.

CIULLA, T.A.; HARRIS, A.; MCINTYRE, N.; JONESCU-CUYPERS, C. Treatment of diabetic macular edema with sustained-release glucocorticoids: intravitreal triamcinolone acetonide, dexamethasone implant, and fluocinolone acetonide implant. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 15, n. 7, p. 953-959, 2014.

CONRAD, Karsten; ROGGENBUCK, Dirk; LAASS, Martin W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmun. Ver.**, v. 13, n. 4, p. 463-466, 2014.

COOKE, C.L.M.; DAVIDGE, S.T. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappa B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 282, n. 2, p. 395-402, 2002.

COSTA-PINTO, F.A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune Interactions in Stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196-199, 2010.

DAMIANI, D.; KUPERMAN, H.; DICHTCHEKENIAN, V.; DELLA MANNA, T.; SETIAN, N. Repercussions of corticotherapy: the cost-benefit ratio. **Pediatrics**, v. 1, p. 71-82, 2001.

DANESE, S. VEGF in inflammatory bowel disease: a master regulator of mucosal immune-driven angiogenesis. **Dig. Liver Dis.**, v. 40, n. 8, p. 680-683, 2008.

DIAMANTI, A.; CAPRIATI, T.; PAPADATOU, B.; KNAFELZ, D.; BRACCI, F.; CORSETTI, T.; ELIA, D.; TORRE, G. The clinical implications of thalidomide in inflammatory bowel diseases. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 699-708, 2015.

FABIA, R.; WILLÉN, R.; AR'RAJAB, A.; ANDERSSON, R.; AHREN, B.; BENGMARK, S. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. **Eur. Surg. Res.** v. 24, n. 4, p. 211- 225, 1992.

FANG, L.; ZHANG, Y.; LEHMANN, J.; WANG, Y.; JI, H.; DING, D. Design and synthesis of furoxan-based nitric oxide-releasing glucocorticoid derivatives with potent anti-inflammatory activity and improved safety. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 17, p. 1062-1066, 2007.

FIRESTEIN, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-361, 2003.

FUMERY, M.; DULAI, P.S.; GUPTA, S.; PROKOP, L.J.; RAMAMOORTHY, S.; SANDBORN, W.J.; SINGH, S. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Colorectal Cancer in Patients with Ulcerative Colitis with Low-Grade Dysplasia: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, 2017.

GESSI, S.; MERIGHI, S.; BOREA, P.A. Glucocorticoids' pharmacology: past, present and future. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, p. 3540-3553, 2010.

IP, F.C.; NG, Y.P.; AN, H.J.; DAI, Y.; PANG, H.H.; HU, Y.Q.; CHIN, A.C.; HARLEY, C.B.; WONG, Y.H.; IP, N.Y. Cycloastragenol is a potent telomerase activator in neuronal cells: implications for depression management. **Neurosignals**, v. 22, n. 1, p. 52-63, 2014.

ISRAEL, A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, a000158, p. 1-14, 2010.

KHOUBEHI, B.; CHIROLI, V.; RONCHETTI, D.; MIGLIETTA, D.; THOMPSON, H.; ONGINI, E.; IMPAGNATIELLO, F. Enhanced oxygen saturation in optic nerve head of non-human primate eyes following the intravitreal injection of NCX 434, an innovative nitric oxide-donating glucocorticoid. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.**, v. 27, p. 115-121, 2011.

KNOD, J. L.; CRAWFORD, K.; DUSING, M.; COLLINS, M. H.; CHERNOGUZ, A.; FRISCHER, J. S. Angiogenesis and Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression Associated with Inflammation in Pediatric Crohn's Disease. **J. Gastrointest. Surg.**, v. 20, n. 3, p. 624-630, 2016.

KO, D.; HEIMAN, A.S.; CHEN, M.; LEE, H.J. New steroidal anti-inflammatory antedugs: methyl 21-desoxy-21-chloro-11beta,17alpha-dihydroxy-3,20-dioxo-1, 4-pregnadiene-16alpha-carboxylate, methyl 21-desoxy-21-chloro-11beta-hydroxy-3,20-dioxo-1, 4-pregnadiene-16alpha-carboxylate, and their 9alpha-fluoro derivatives. **Steroids**, v. 65, n. 4, p. 210-218, 2000.

KORNBLUTH, A. Infliximab approved for use in Crohn's disease: a report on the FDA GI Advisory Committee conference. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 4, n. 4, p. 328-329, 1998.

KOZUCH, P.L.; HANAUER, S.B. Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 3, p. 354-377, 2008.

KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A.; VALENTE, C.M.L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KUMAR, N.; SHARMA, U.; SINGH, C.; SINGH, B. Thalidomide: chemistry, therapeutic potential and oxidative stress induced teratogenicity. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 12, n. 13, p. 1436-1455, 2012.

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.

LIU, X.; WANG, J. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of Folium syringae leaves on TNBS-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 133, n. 2, p. 780-787, 2011.

LOPES, S.; AMARO, P.; PORTELA, F.; CANCELA, E.; FERREIRA, M.; ROMÃOZINHO, J.M.; LEITÃO, M. Megacólon tóxico - experiência de um serviço de gastroenterologia. **Rev. Port. Coloproct.**, v. 6, n. 1, p. 10-16, 2009.

MACHADO, M.G.M. Síntese e avaliação biológica de novos derivados anti-inflamatórios esteroides. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2013.

MACHADO, M.G.M.; YAMASAKI, P. R.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Targeted prodrug design for the treatment of malignant melanoma. **J. Dermatol. Res. Ther.**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2016.

MANUAL MERCK. **Distúrbios gastrointestinais**. Disponível em: <http://www.msdlatinamerica.com/profissionais_da_saude/manual_merck/secao_03/secao_03_031.html>. Acesso em: 14 Jan. 2017.

MARQUEZ RUIZ, J.F.; KEDZIORA, K.; PIGOTT, M.; KEOGH, B.; WINDLE, H.; GAVIN, J.; KELLEHER, D.P.; GILMER, J.F. A nitrophenyl-based prodrug type for colorectal targeting of prednisolone, budesonide and celecoxib. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, p. 1693-1698, 2013.

MESSINGER, W.B.; BEARDSLEY, R.M.; FLAXEL, C.J. Fluocinolone acetonide intravitreal implant for the treatment of diabetic macular edema. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 7, p. 425-434, 2013.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 320 p.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAGANUMA, M.; AOYAMA, N.; SUZUKI, Y.; NISHINO, H.; KOBAYASHI, K.; HIRAI, F.; WATANABE, K.; HIBI, T. Twice-daily budesonide 2-mg foam induces complete mucosal healing in patients with distal ulcerative colitis. **J. Crohns Colitis**, v. 10, n. 7, p. 828-836, 2016.

NEURATH, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014.

O'DONNELL, S.; O'MORAIN, C. A. Therapeutic benefits of budesonide in gastroenterology. **Ther. Adv. Chronic Dis.**, v. 1, n. 4, p. 177-186, 2010.

OKUYAMA, S.; AIHARA, H. Hyperalgesic action in mice of intracerebroventricularly administered arachidonic acid, PG E2, PG F2 alpha and PG D2: effects of analgesic drugs on hyperalgesia. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 9, n. 11, p. 902-908, 1986.

OLIVER, A.; CIULLA, T. A. Corticosteroids as antiangiogenic agents. **Ophthalmol. Clin. N. Am.**, v. 19, n. 3, p. 345-351, 2006.

PANDIT, B.; HU, Z.; CHETTIAR, S.N.; ZINK, J.; XIAO, Z.; ETTER, J.P.; BHASIN, D.; LI, P.K. Structure-activity relationship studies of thalidomide analogs with a taxol-like mode of action. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, n. 24, p. 6902-6904, 2013.

POUSA, I. D.; ALGABA, A.; LINARES, P. M.; SANZ-CAMENO, P.; MATÉ, J.; MORENO-OTERO, R.; BERMEJO, F.; GISBERT, J. P. Corticosteroids modulate angiogenic soluble factors in ulcerative colitis patients. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n. 3, p. 871-879, 2011.

RADIN, M.; SCIASCIA, S.; ROCCATELLO, D.; CUADRADO, M. J. Infliximab Biosimilars in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. **BioDrugs**, p. 1-13, 2016.

ROGLER, Gerhard. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. **Cancer Lett.**, v. 345, n. 2, p. 235-241, 2014.

RUTELLA, S.; FIORINO, G.; VETRANO, S.; CORREALE, C.; SPINELLI, A.; PAGANO, N.; ARENA, V.; MAGGIANO, N.; REPICI, A.; MALESCI, A.; DANESE, S. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 106, n. 4, p. 762-770, 2011.

RUTGEERTS, P.; SANDBORN, W.J.; FEAGAN, B.G.; REINISCH, W.; OLSON, A.; JOHANNIS, J.; TRAVERS, S.; RACHMILEWITZ, D.; HANAUER, S.B.; LICHTENSTEIN, G.R.; VILLIERS, W.J.; PRESENT, D.; SANDS, B.E.; COLOMBEL, J.F. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, n. 23, p. 2462-2476, 2005.

SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. **Processo de Obtenção de Compostos Derivados de Anti-Inflamatórios Esteróides (AIEs), Composições Farmacêuticas Contendo tais Compostos e seus Usos no Tratamento de Doenças de Caráter Inflamatório.** BR n. PI110005943, 18 fev. 2011.

SANTOS, J.L.; OLIVEIRA, E.V.; CHUNG, M.C.; MENEGON, R.F.; BLAU, L. **Derivados ftalimídicos de compostos antiinflamatórios não-esteróide e/ou moduladores de TNF-(alfa), processo de sua obtenção, composições farmacêuticas contendo os mesmos e seus usos no tratamento de doenças inflamatórias.**, BR n. PI 0901298-2A2, 6 abr. 2009.

SCALDAFERRI, F.; VETRANO, S.; SANS, M.; ARENA, V.; STRAFACE, G.; STIGLIANO, E.; REPICI, A.; STURM, A.; MALESCI, A.; PANES, J.; YLA-HERTTUALA, S.; FIOCCHI, C.; DANESE, S. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 585-595, 2009.

SCHMIDT, K.L.; PRADHAN, D.S.; SHAH, A.H.; CHARLIER, T.D.; CHIN, E.H.; SOMA, K.K. Neurosteroids, immunosteroids, and the Balkanization of endocrinology. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 157, n. 3, p. 266-274, 2008.

SEGURO, L.P.C.; ROSARIO, C.; SHOENFELD, Y. Long-term complications of past glucocorticoid use. **Autoimmun. Rev.**, v. 12, n. 5, p. 629-632, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006, 490p.

STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Optimized glucocorticoid therapy: Teaching old drugs new tricks. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 380, n. 1, p. 32-40, 2013.

SUZUKI, T.; CHUNG-WAI, C.; DOWNEY, G.P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, n. 6, p. 1348-1361, 2008.

SHIMAZAWA, R.; MIYACHI, H.; TAKAYAMA, H.; KURODA, K.; KATO, F.; KATO, M.; HASHIMOTO, Y. Antiangiogenic activity of tumor necrosis factor-alpha production regulators derived from thalidomide. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, n. 2, p. 224-226, 1999.

TAK, P.P.; GERLAG, D.M.; AUPPERLE, K.R.; VAN DE GEEST, D.A.; OVERBEEK, M.; BENNETT, B.L.; BOYLE, D.L.; MANNING, A.M.; FIRESTEIN, G.S. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 8, p. 1897-1907, 2001.

TEIXEIRA, F.V.; HOSNEC, R.S.; SOBRADO, C.W. Management of ulcerative colitis: a clinical update. **J. Coloproctol.**, v. 35, n. 4, p. 230-237, 2015.

VASSALO, E.C.; POVEDANO, A.; PUPO-NETO, J.A.; PAULO, F.L. Influência da administração da *Plantago ovata* (fibra dietética) na proteção da parede colônica em colite inflamatória induzida por ácido acético: estudo estereológico experimental em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 44, n. 6, p. 385-391, 2007.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007.

WANG, H.; ZHANG, W.; ZHU, C.; BUCHER, C.; BLAZAR, B.R.; ZHANG, C.; CHEN, J.F.; LINDEN, J.; WU, C.; HUO, Y. Inactivation of the adenosine A2A receptor protects apolipoprotein E-deficient mice from atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, n. 7, p. 1046-1052, 2009.

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.

WŁODARCZYK, M.; FICHNA, J.; SOBOLEWSKA-WŁODARCZYK, A. Pharmacology and metabolism of infliximab biosimilars – a new treatment option in inflammatory bowel diseases. **Pharmacol. Rep.**, v. 68, n. 4, p. 797-801, 2016.

WOODHOUSE, E. Toxic Megacolon: A Review for Emergency Department Clinicians. **J. Emerg. Nurs.**, 2016.

YAMASAKI, P.R.; NASCIMENTO, D.C.; CHELUCCI, R.C.; BELONE A.F.F.; ROSA, P.S.; DIÓRIO, S.M.; MELO, T.R., BARBIERI, K.P.; PLACERES, M.C.; CARLOS, I.Z.; CHUNG, M.C.; SANTOS, J.L. Synthesis and evaluation of novel dapsone-thalidomide hybrids for the treatment of type 2 leprosy reactions. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 14, p. 3084-3087, 2014.

ZENG, K.; XU, H.; MI, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; CHEN, F.; ZHU, J.; YU, X. Dietary taurine supplementation prevents glial alterations in retina of diabetic rats. **Neurochem. Res.**, v. 34, n. 2, p. 244-254, 2009.

ZHANG, X.; WANG, N.; SCHACHAT, A.P.; BAO, S.; GILLIES, M.C. Glucocorticoids: structure, signaling and molecular mechanisms in the treatment of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. **Curr. Mol. Med.**, v. 14, n. 3, p. 376-384, 2014.

ZHOU, Y.H.; YU, J.P.; LIU, Y.F.; TENG, X.J.; MING, M.; LV, P.; AN, P.; LIU, S.Q.; YU, H.G. Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 2006, n. 5, p. 1-9, 2006.

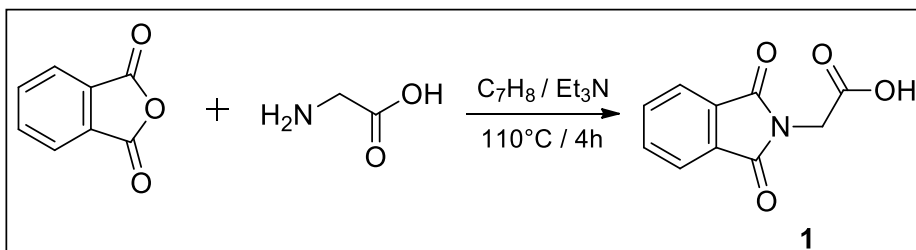
APÊNDICE – Procedimentos sintéticos e espectros

Serão apresentados nessa seção os procedimentos sintéticos dos intermediários e produtos finais obtidos, bem como as respectivas caracterizações estruturais.

1 Síntese dos compostos da série Lapdesf GL-FT

1.1 Síntese do intermediário ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (**1**)

Esquema sintético:

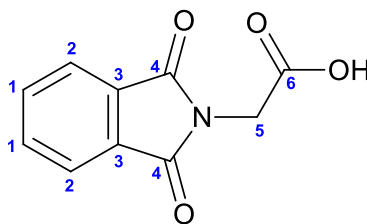


Procedimento:

Em um balão de 125 mL, conectado a um *dean stark* sob refluxo a uma temperatura de 110°C , adicionou-se 7,4g de anidrido ftálico (0,05 mol), 3,75g de glicina (0,05 mol), 30 mL de tolueno e 0,5 mL de trietilamina. A mistura reacional foi mantida sob agitação vigorosa e aquecimento durante 4 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 80% acetato de etila: 20% hexano. Após resfriamento da mistura reacional, o solvente orgânico foi evaporado à pressão reduzida obtendo um sólido branco.

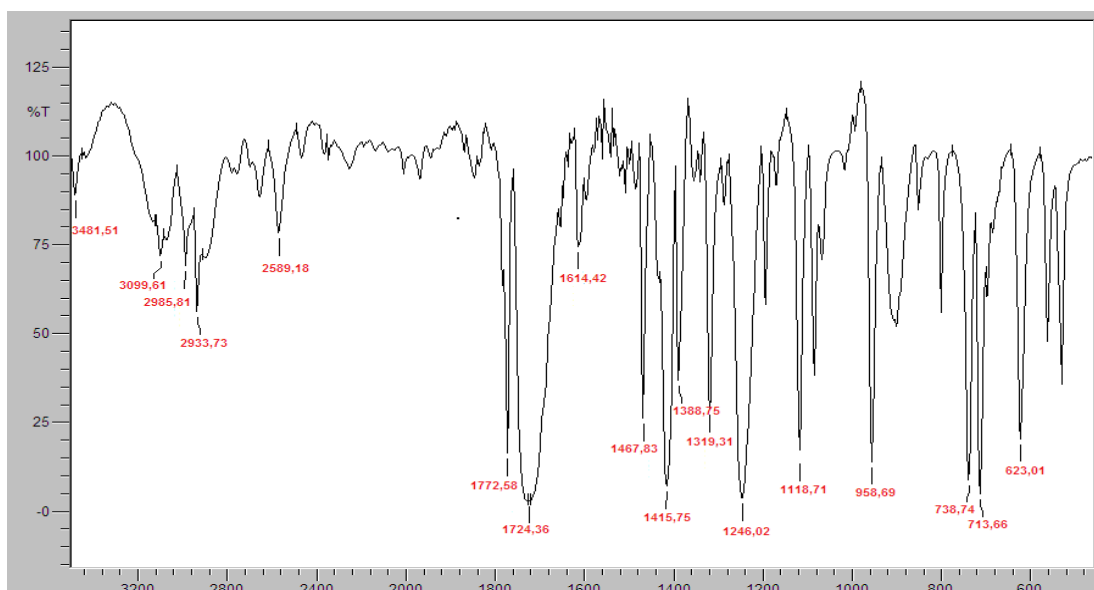
O isolamento reacional procedeu-se pela adição de 75 mL de acetato de etila a este sólido branco e com a ajuda de um funil de separação, a fase orgânica foi lavada com uma solução de HCl a 1M (4 vezes com 40 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, a qual foi filtrada e evaporada à pressão reduzida fornecendo 6,06g (rendimento: 59,0%) de um pó branco (**1**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$, $\text{PM}=205,17$ e $\text{PF}= 187-193^\circ\text{C}$.

Caracterização estrutural:



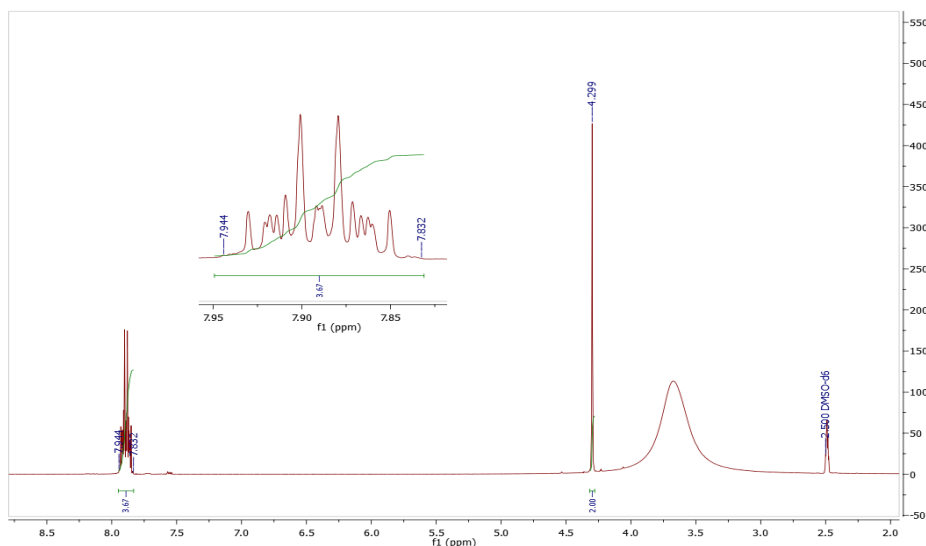
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3481,51\text{ cm}^{-1}$; ν C-H aromático = $3099,61\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2985,81$ e $2933,73\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1772,58\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1614,42\text{ cm}^{-1}$ e $1467,83\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1388,75\text{ cm}^{-1}$.

Espectro 5 - Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (**1**)



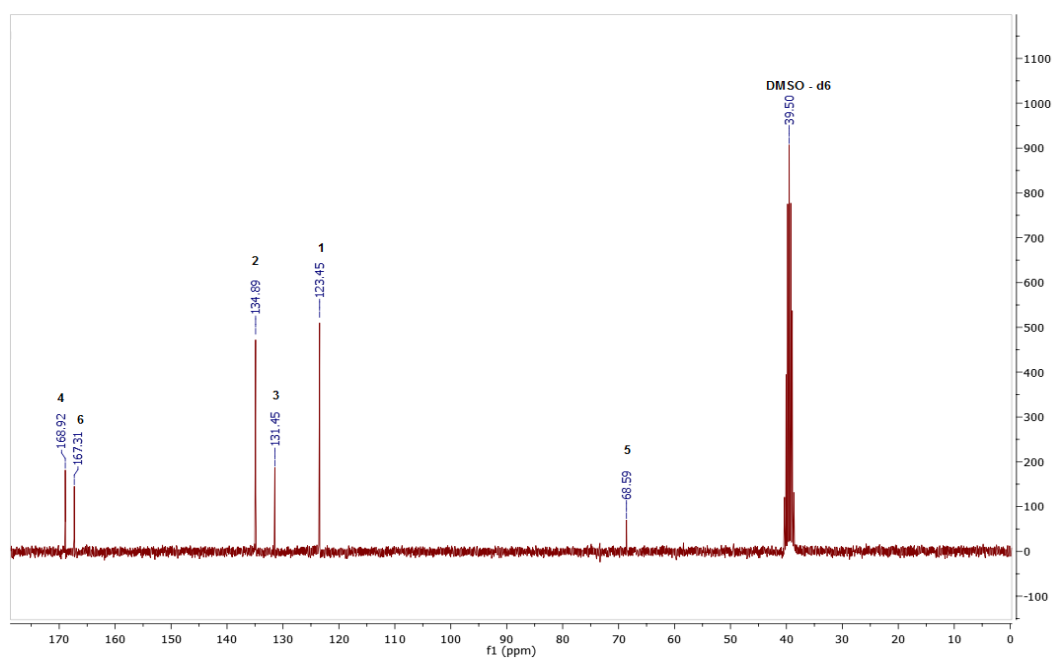
RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6): δ 7,832 – 7,944 (m; H₁ e H₂; 4H); 4,299 (s; H₅; 2H) ppm.

Espectro 6. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**1**) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6).



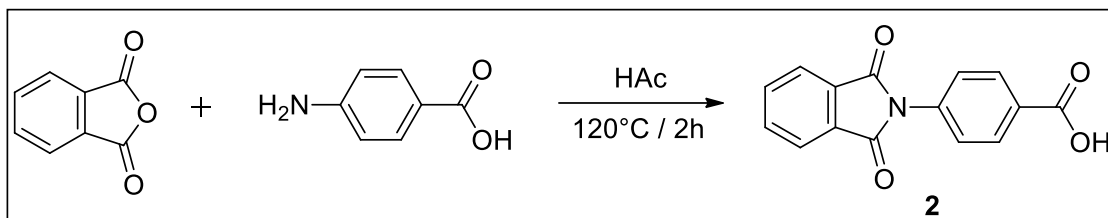
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 168,92 (C₄); 167,31 (C₆); 134,89 (C₂); 131,45 (C₃); 123,45 (C₁); 68,59 (C₅) ppm.

Espectro 7. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**1**) (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6).



1.2 Síntese do intermediário ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (2)

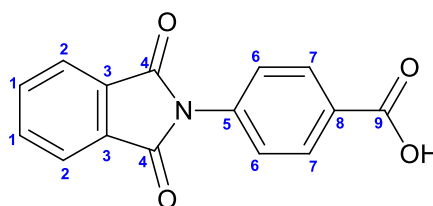
Esquema sintético:



Procedimento:

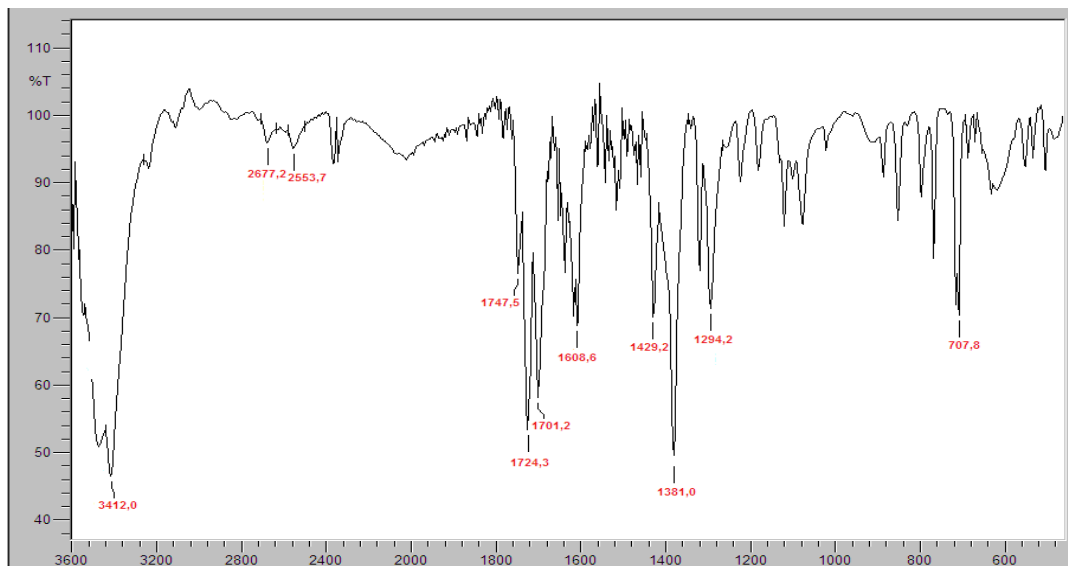
Em um balão de 50 mL adicionou-se 1 g (7,29 mmol) de ácido *p*-aminobenzóico, 1 g (6,75 mmol) de anidrido ftálico e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C, sob refluxo, por 2 horas e agitada vigorosamente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 85% CHCl₃: 10% MeOH : 5%HAc. Após resfriamento, a mistura reacional foi filtrada e o sólido branco formado foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida, o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95% fornecendo 1,29 g (rendimento: 71,1%) de cristais de cor branca (2) cuja fórmula molecular é C₁₄H₉NO₄, PM = 267 e PF = 284°C-289 °C.

Caracterização estrutural:



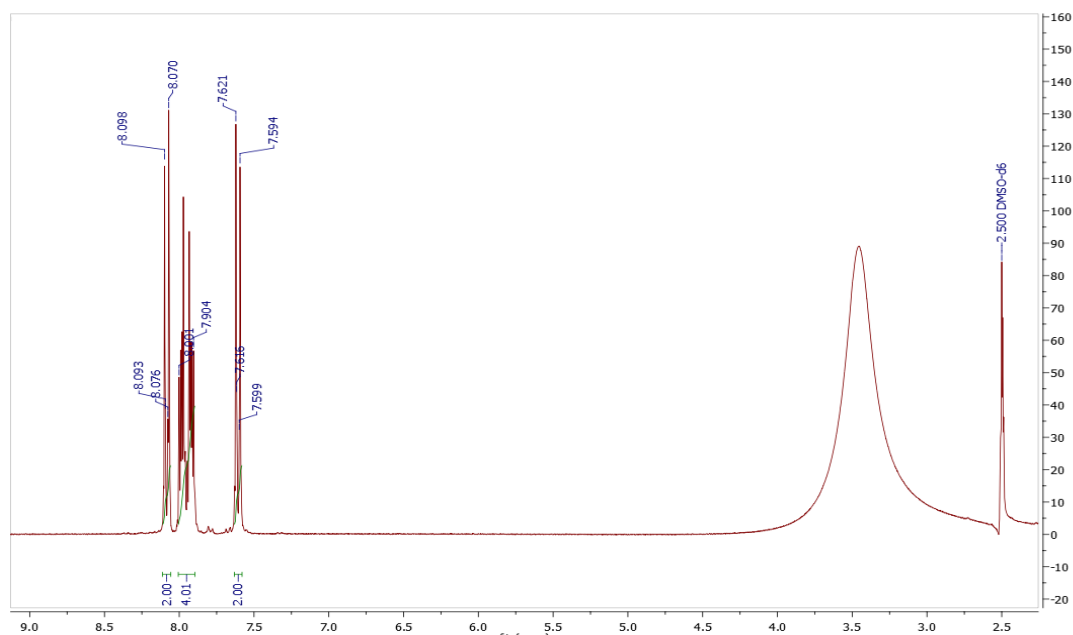
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = 3412,0 cm⁻¹; ν C=O_{imida} (simétrico e assimétrico) = 1747,5 cm⁻¹ e 1724,3 cm⁻¹; ν C=O ácido = 1701,2 cm⁻¹; ν C=C aromático = 1608,6 cm⁻¹ e 1429,2 cm⁻¹; ν C-N-C = 1381,0 cm⁻¹.

Espectro 8. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (2)

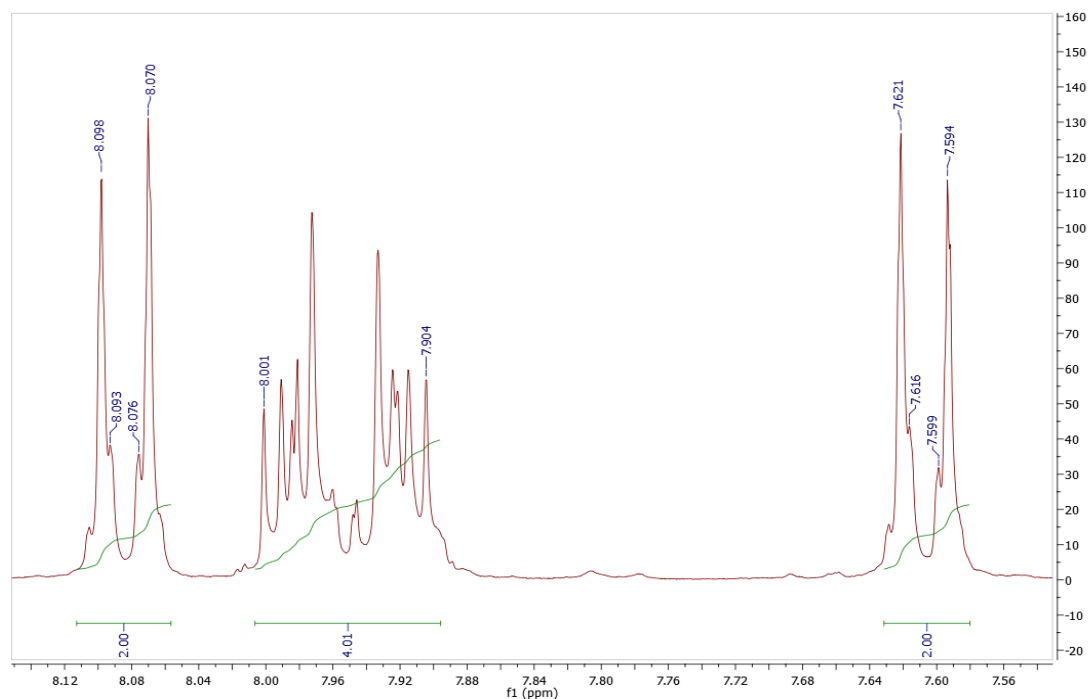


RMN ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ 8,08 (dd; H_7 ; $J_{\text{orto}} = 8,4$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 8,00-7,90 (m; H_1 e H_2 ; 4H); 7,60 (dd; H_6 ; $J_{\text{orto}} = 8,1$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H) ppm.

Espectro 9. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ^1H ; 300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

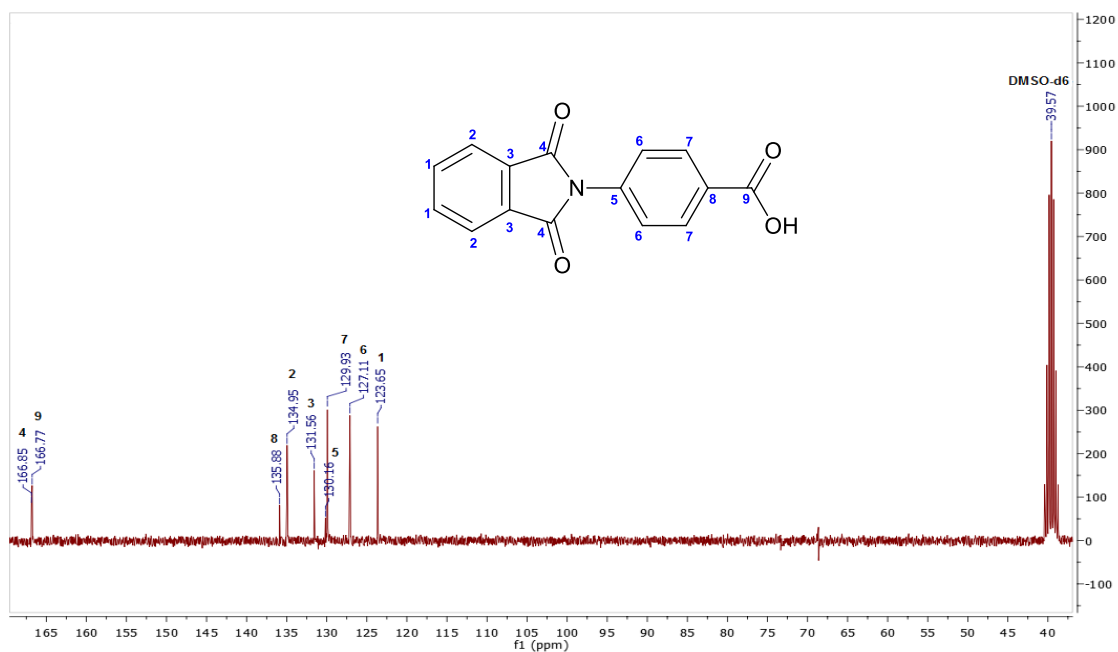


Espectro 10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6) – ampliação região aromática



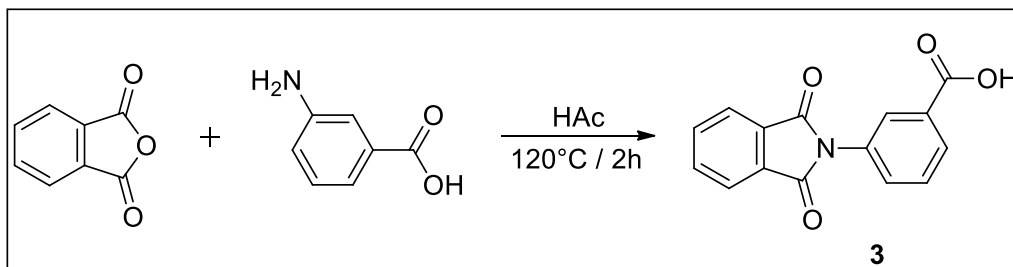
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 166,85 (C_4); 166,77 (C_9); 135,88 (C_8); 134,95 (C_2); 131,56 (C_3); 130,16 (C_5); 129,93 (C_7); 127,11 (C_6); 123,65 (C_1) ppm.

Espectro 11. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (2) (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)



1.3 Síntese do intermediário ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**3**)

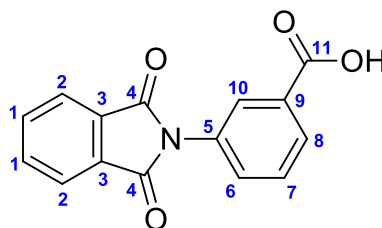
Esquema sintético:



Procedimento:

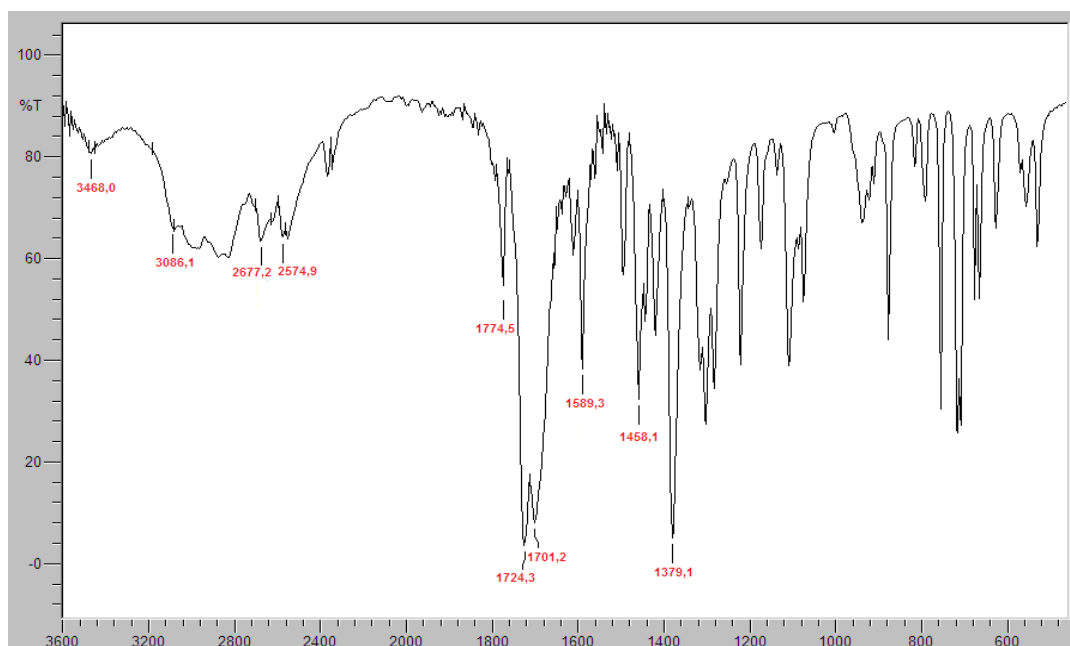
Em um balão de 50 mL adicionou-se 1 g (7,29 mmol) de ácido *m*-aminobenzóico, 1 g (6,75 mmol) de anidrido ftálico e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 120°C, sob refluxo, por 2 horas e agitada vigorosamente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando como fase móvel: 85% CHCl₃: 10% MeOH : 5%HAc. Após resfriamento, a mistura reacional foi filtrada e o sólido branco formado foi lavado com cerca de 60 mL de água gelada. Em seguida, o sólido obtido foi recristalizado em etanol 95% fornecendo 1,49g (rendimento: 83,0%) de cristais de cor branca (**3**) cuja fórmula molecular é C₁₄H₉NO₄, PM = 267 e PF = 276°C-282°C.

Caracterização estrutural:



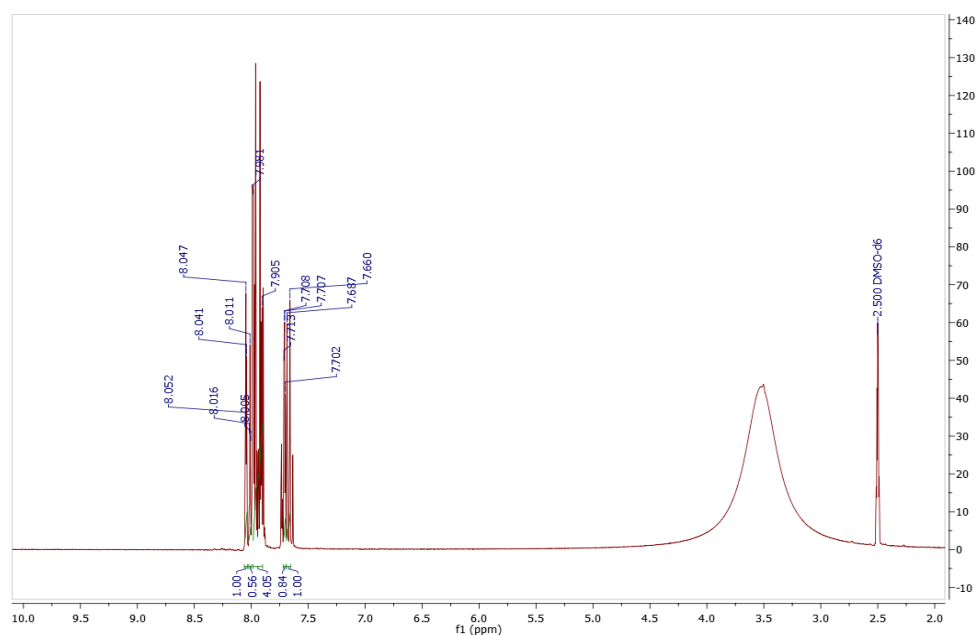
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = 3468,0 cm⁻¹; ν C-H aromático = 3086,1 cm⁻¹; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1774,5 cm⁻¹ e 1724,3 cm⁻¹; ν C=O ácido carboxílico = 1701,2 cm⁻¹; ν C=C aromático = 1589,3 cm⁻¹ e 1458,1 cm⁻¹; ν C-N-C 1379,1 cm⁻¹.

Espectro 12. Espectro no infravermelho do intermediário ftalimídico (3)

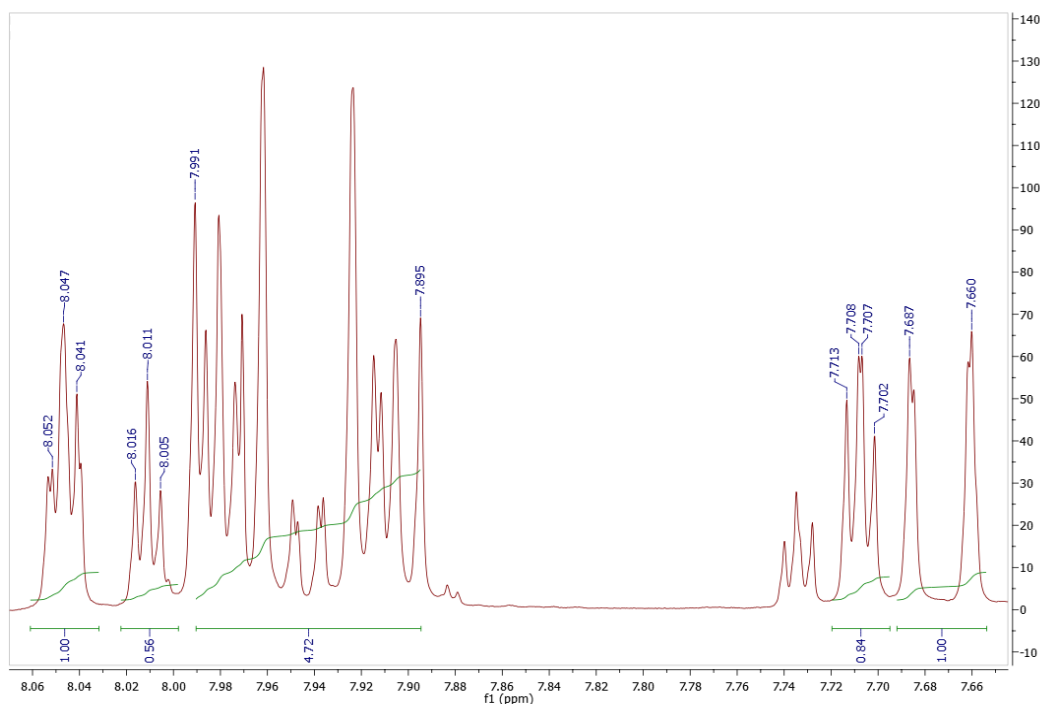


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,05 (H_8 ; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); 8,01 (H_{10} ; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); 7,905 – 7,981 (m; H_1 e H_2 ; 4H); 7,70 (H_6 ; $J_{\text{orto}} = 7,75$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); 7,67 (H_7 ; $J_{\text{orto}} = 8,1$ Hz; 1H) ppm.

Espectro 13. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (3) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

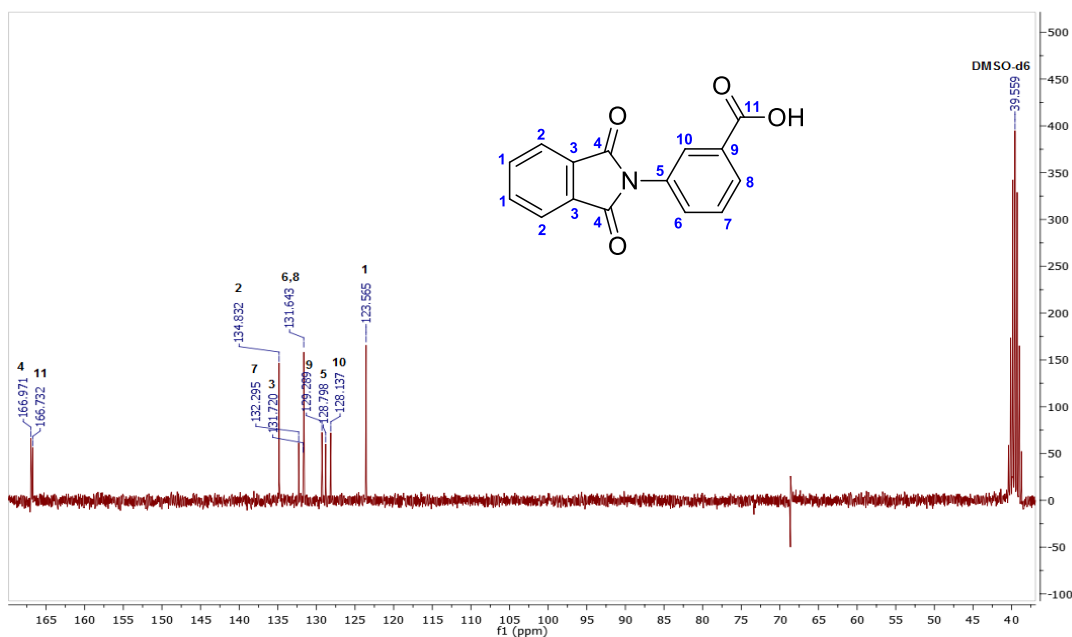


Espectro 14. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**3**) (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6) – ampliação região aromática



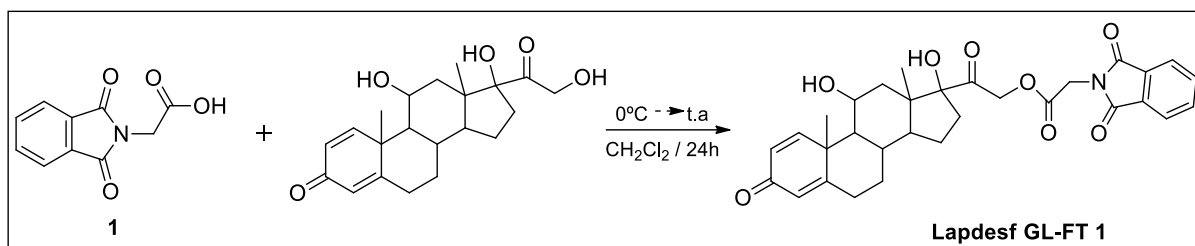
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 166,97 (C_4); 166,73 (C_{11}); 134,83 (C_2); 132,29 (C_7); 131,72 (C_3); 131,64 (C_6 e C_8); 129,28 (C_9); 128,79 (C_5); 128,13 (C_{10}) e 123,56 (C_1) ppm.

Espectro 15. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário ftalimídico (**3**) (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)



1.4 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisindolin-2-il)acetato (**Lapdesf GL-FT 1**)

Esquema sintético:

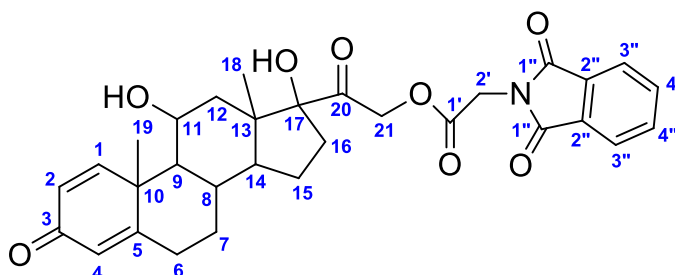


Procedimento:

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 205,17 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (**1**) foram dissolvidos em 15 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C . Em seguida, 230 mg (1,2 mmol) de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 20,5 mg (0,2 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 360,4 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

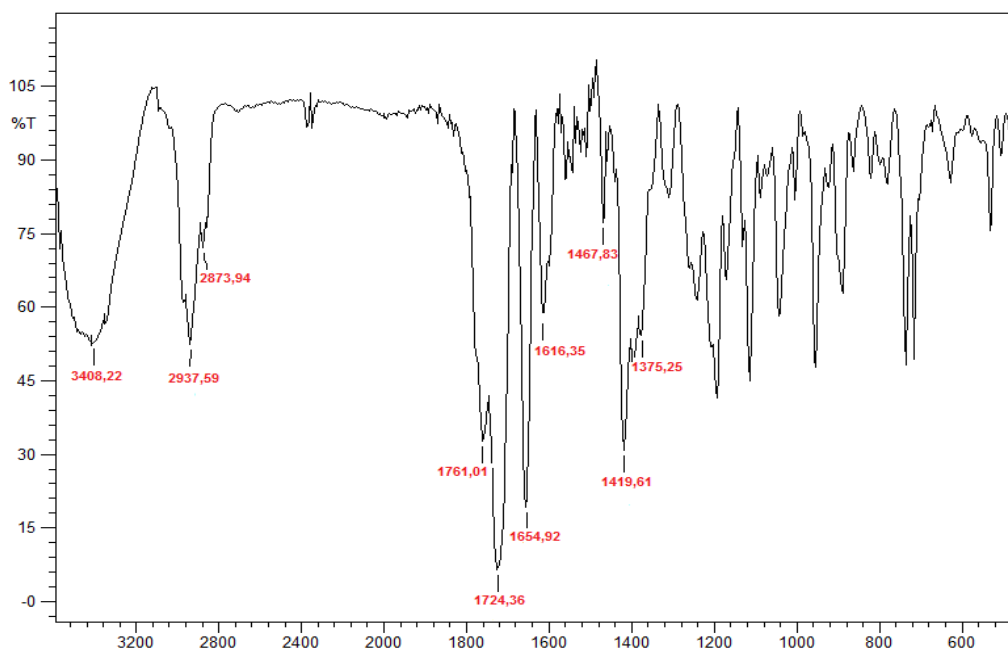
A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi diluído com cerca de 50 mL de diclorometano. Em um funil de separação, a fase orgânica foi lavada, 3 vezes, com cerca de 15 mL de solução saturada de bicarbonato. Após essa etapa, sulfato de sódio anidro foi adicionado a fase orgânica. O produto foi filtrado e evaporado a pressão reduzida e purificado por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 80% Acetato de etila: 20% Hexano) fornecendo 270 mg (rendimento: 50,0%) de um sólido branco (**Lapdesf GL-FT 1**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{NO}_8$; $\text{PM}=547,22$; $\text{PF}: 201^\circ\text{-}204^\circ\text{C}$.

Caracterização estrutural:



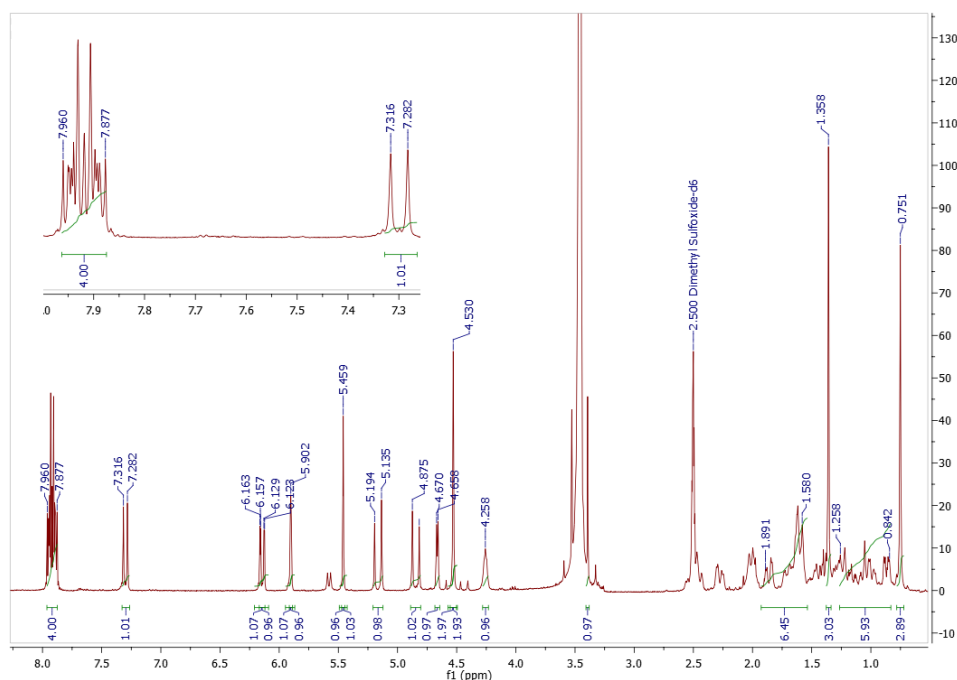
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3408,22\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2937,59$ e $2873,94\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1761,01\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1654,92\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1616,35\text{ cm}^{-1}$ e $1467,83\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1375,25\text{ cm}^{-1}$.

Espectro 16. Espectro no infravermelho do composto Lapdesf GL-FT 1

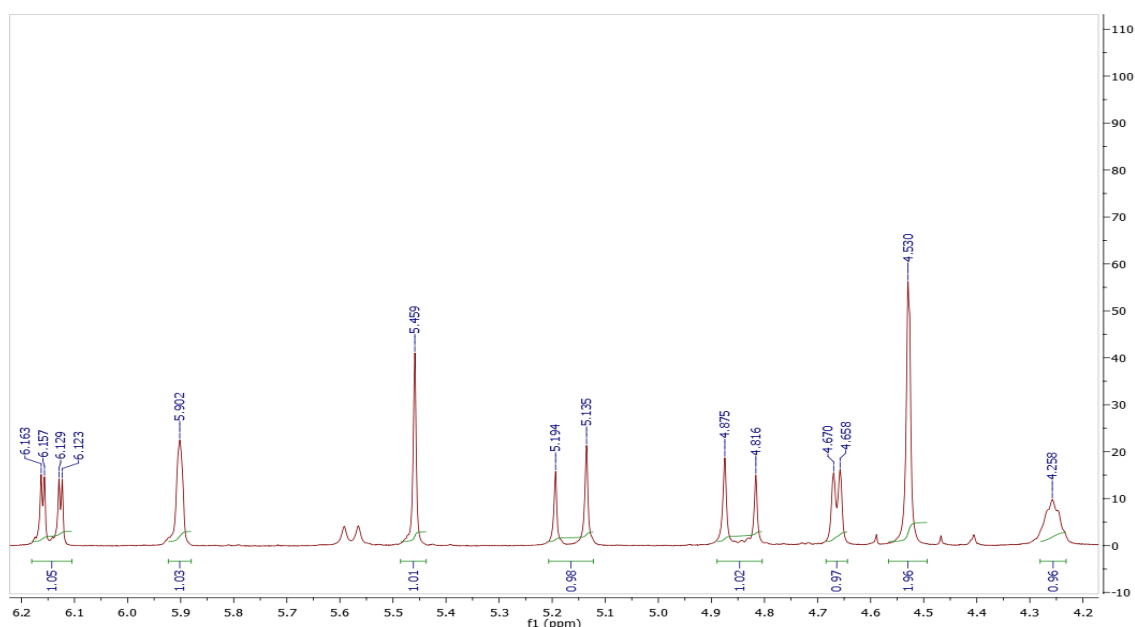


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 7,877-7,960 (m; $\text{H}_{4''}$ e $\text{H}_{3''}$; 4H); 7,299 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,20\text{ Hz}$; 1H); 6,143 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 10,20\text{ Hz}$; $J_{\text{meta}} = 1,8\text{ Hz}$; 1H); 5,902 (s; H_4 ; 1H); 5,459 (s; H_{21} ; 2H); 5,164 (d; OH; 1H); 4,845 (d; OH; 1H); 4,530 (s; H_2 ; 2H); 4,277-4,235 (m; H_{11} ; 1H); 1,580-1,890 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); 0,843-1,258 (m; H_{16} , H_{12} , H_6 ; 6H); 1,358 (s; H_{19} ; 3H); 0,751 (s; H_{18} ; 3H) ppm.

Espectro 17. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 1 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

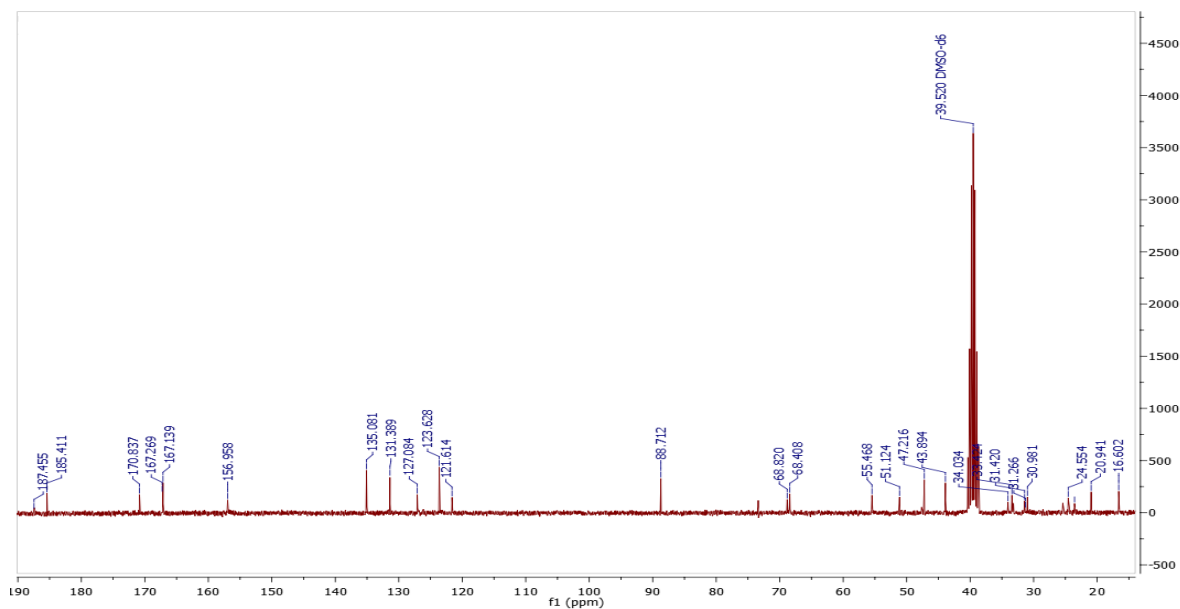


Espectro 18. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 1 – ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6).

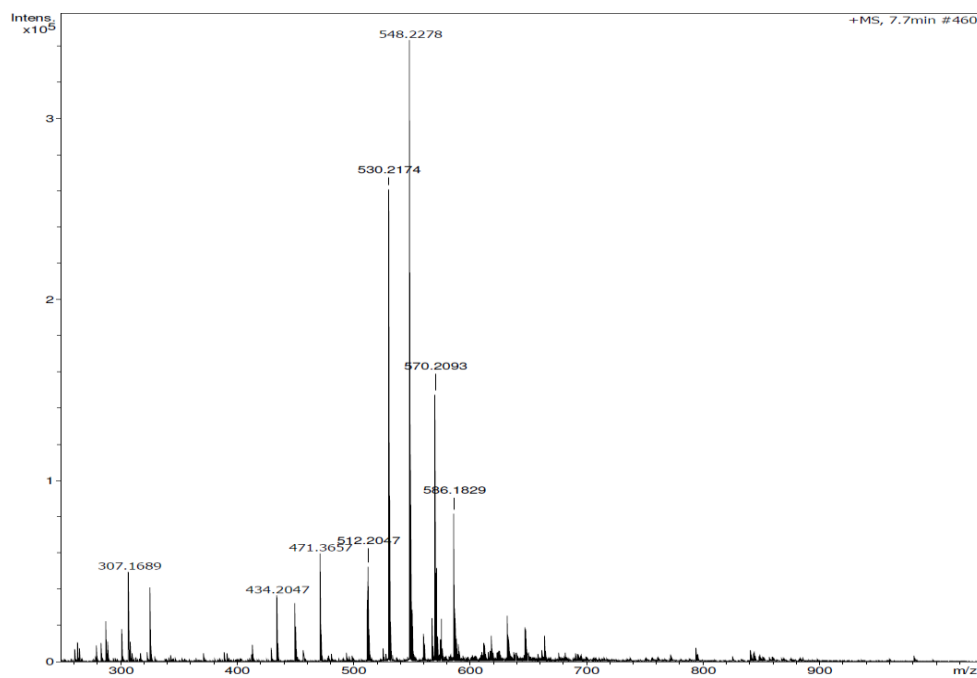


RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 187,455 (C_{20}); 185,411 (C_3); 170,837 ($\text{C}_{1'}$); 167,269 ($\text{C}_{1'}$); 167,139 (C_5); 156,958 (C_1); 135,081 ($\text{C}_{3''}$); 131,389 ($\text{C}_{2''}$); 127,084 (C_2); 123,628 ($\text{C}_{4''}$); 121,614 (C_4); 88,712 (C_{17}); 68,820 (C_{21}), 68,408 ($\text{C}_{2'}$); 55,486 (C_9); 51,124 (C_{14}); 47,216 (C_{13}); 43,894 (C_{10}); 34,034 (C_{11}); 33,424 (C_{12}); 31,420 (C_{16}); 31,266 (C_6); 30,981 (C_7); 24,554 (C_8); 23,557 (C_{15}); 20,941 (C_{19}); 16,602 (C_{18}) ppm.

Espectro 19. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 1 (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

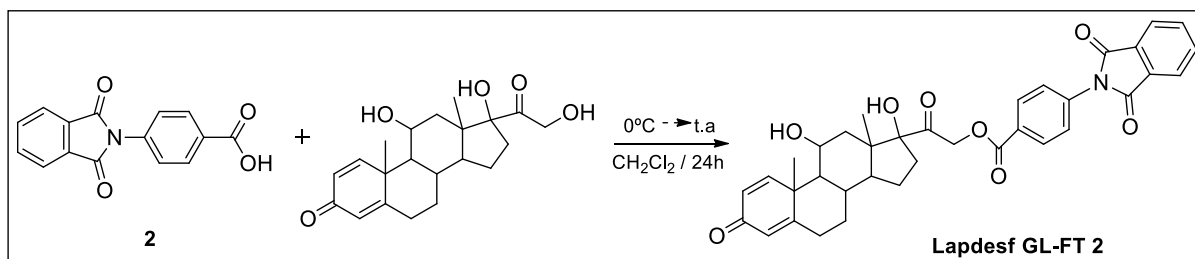


Espectro 20. Espectro de massas, modo positivo, do composto Lapdesf GL-FT 1. $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 548,2278; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z$ 570,2093.



1.5 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 2**)

Esquema sintético:

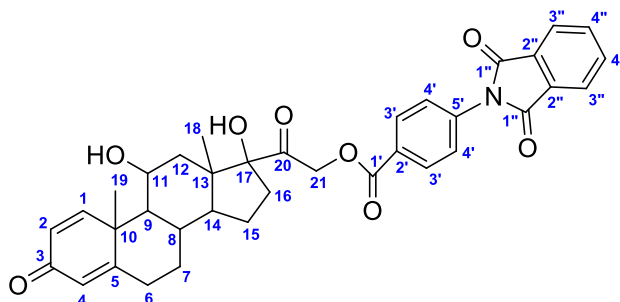


Procedimento:

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il) benzoico (**2**) foram dissolvidos em 15 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C . 230 mg (1,2 mmol) de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 26,7 mg (0,2 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 360,4 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

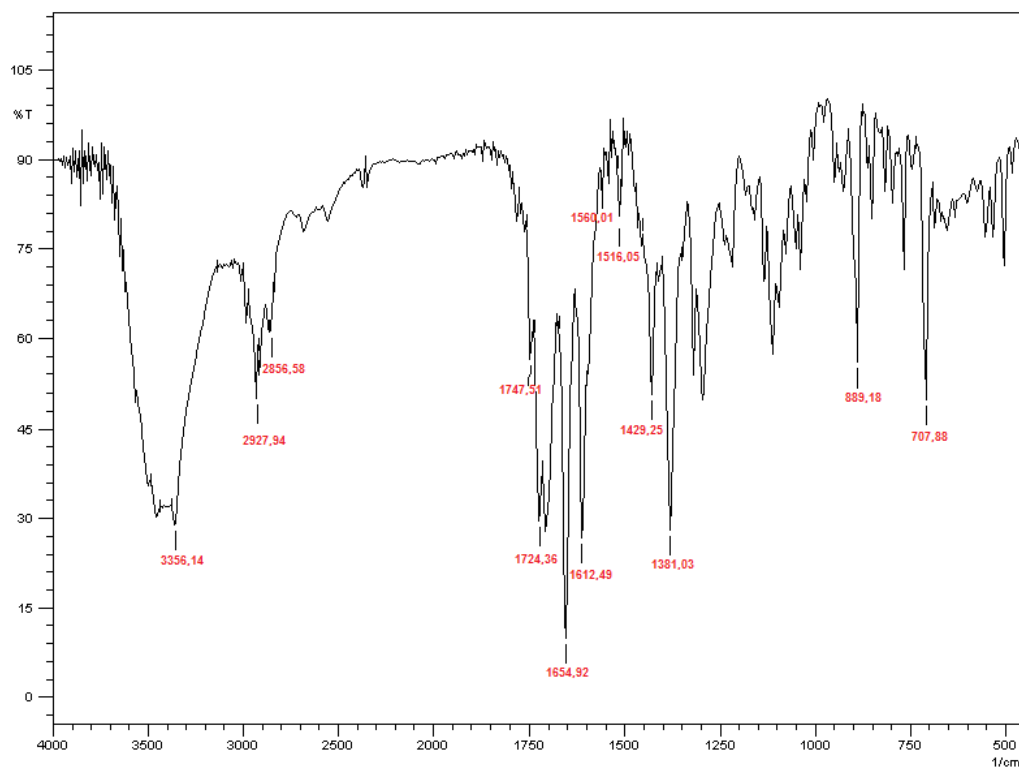
A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi diluído com cerca de 50 mL de diclorometano. Em um funil de separação, a fase orgânica foi lavada, 3 vezes, com cerca de 15 mL de solução saturada de bicarbonato. Após essa etapa, sulfato de sódio anidro foi adicionado a fase orgânica. O produto foi filtrado e evaporado a pressão reduzida e purificado por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 265 mg (rendimento: 40,0%) de um sólido branco (**Lapdesf GL-FT 2**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{NO}_8$; $\text{PM}=609,66$; $\text{PF}: 188^{\circ}\text{-}191^{\circ}\text{C}$.

Caracterização estrutural:



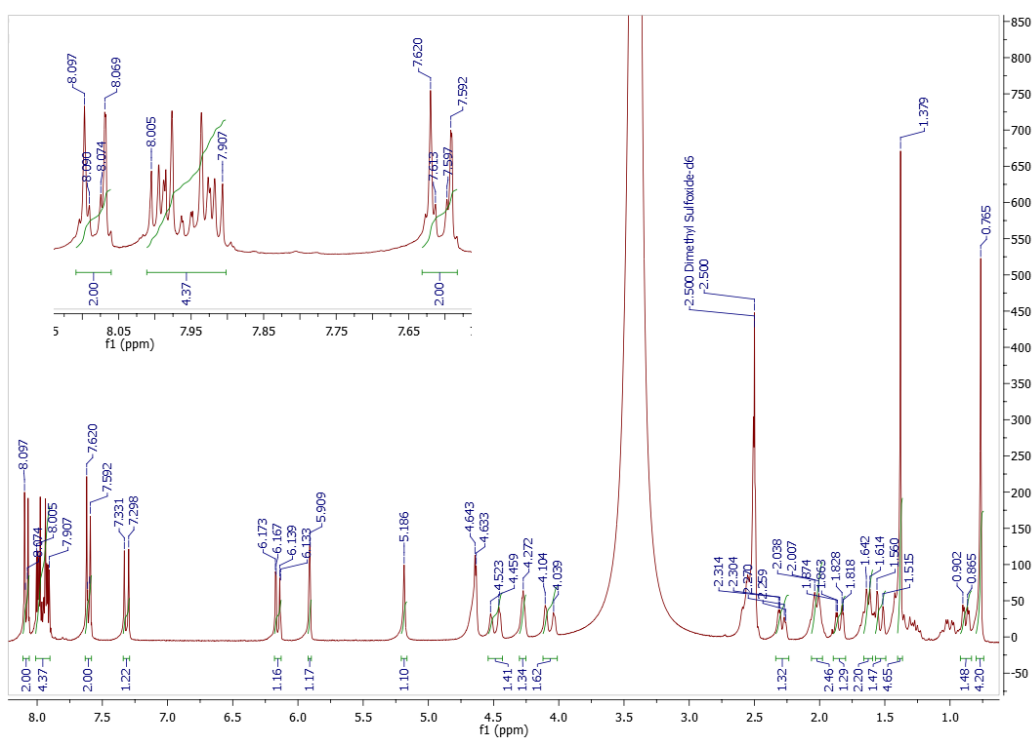
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = 3356,14 cm^{-1} ; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = 2927,94 e 2856,58 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1747,51 cm^{-1} e 1724,36 cm^{-1} ; ν C=O éster = 1654,92 cm^{-1} ; ν C=C aromático = 1560,01 cm^{-1} e 1516,05 cm^{-1} ; ν C-N-C = 1381,03 cm^{-1} .

Espectro 21. Espectro no infravermelho do composto Lapdesf GL-FT 2



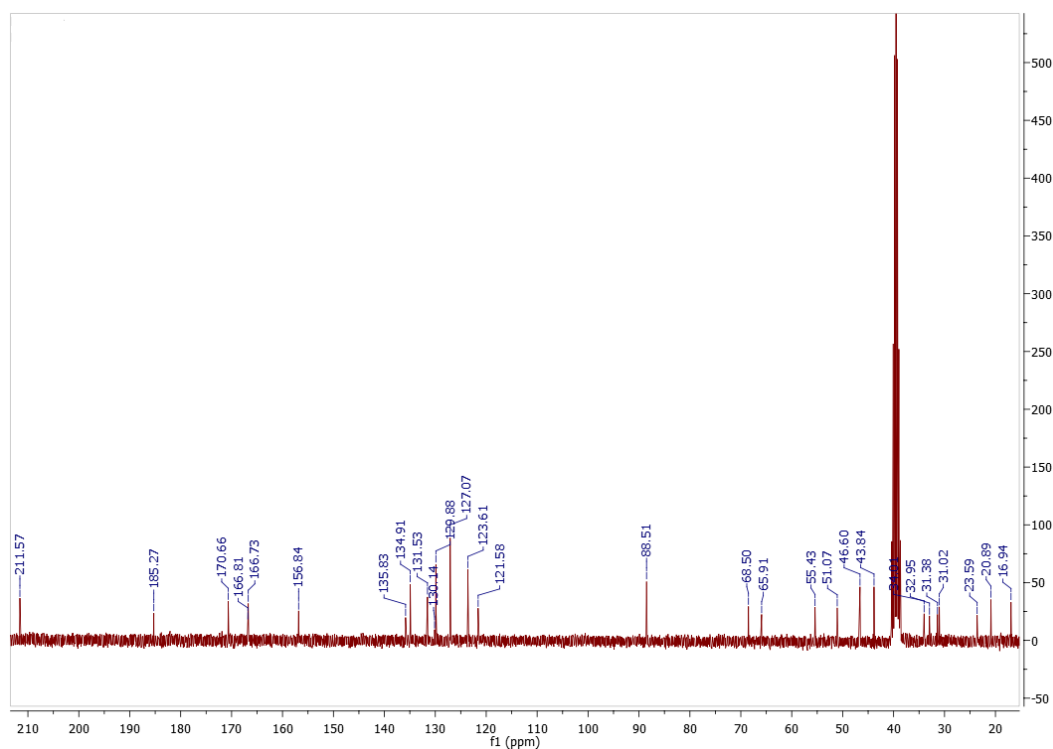
RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6): δ 8,08 (dd; H_3 ; $J_{\text{orto}} = 8,4$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); δ 7,907-8,005 (m; H_4'' e H_3'' ; 4H); 7,60 (dd; H_4 ; $J_{\text{orto}} = 8,4$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 7,314 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; 1H); 6,153 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); 5,909 (s; H_4 ; 1H); 4,530 (s; H_5 ; 2H); 4,272 (m; H_{21} ; 2H); 1,580-1,890 (m; H_{17} , H_{18} , H_{12} , H_{11} ; 7H); 0,843-1,258 (m; H_{21} , H_{14} , H_9 ; 6H); 1,379 (s; H_6 ; 3H); 0,765 (s; H_{15} ; 3H) ppm.

Espectro 22. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 2 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

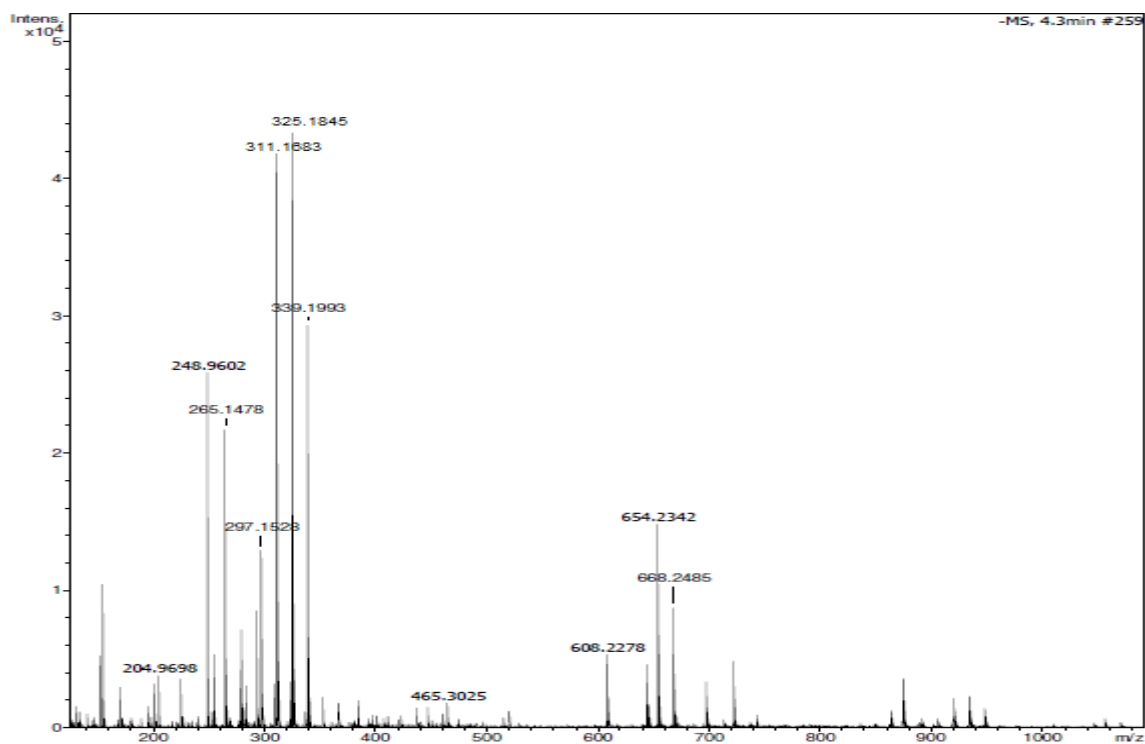


RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 211,57 (C_{20}); 185,27 (C_3); 170,66 (C_1'); 166,81 (C_1''); 166,73 (C_5); 156,84 (C_1); 134,91 (C_3''); 131,53 (C_2''); 130,14 (C_5'); 129,88 (C_3'); 127,07 (C_4'); 123,61 (C_4''); 121,58 (C_4); 88,51 (C_{15}); 68,50 (C_8); 65,91 (C_{17}); 55,43 (C_9); 51,07 (C_{18}); 46,60 (C_{12}); 34,01 (C_{14}); 32,95 (C_{10}); 31,02 (C_6); 23,59 (C_{13}); 20,89 (C_{11}); 16,94 (C_{19}) ppm.

Espectro 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 2 (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

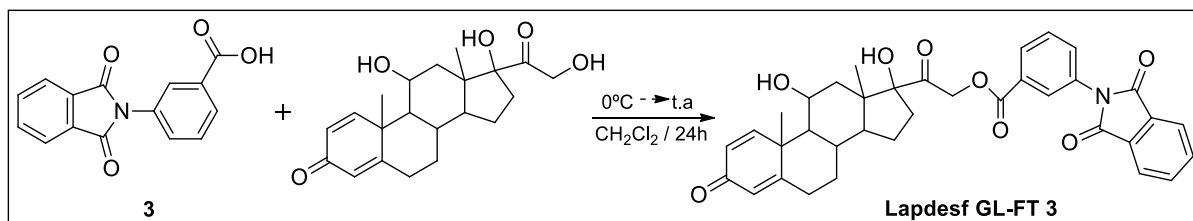


Espectro 24. Espectro de massas, modo negativo, do composto Lapdesf GL-FT 2. $[\text{M-H}]^+ = m/z$ 608,2278.



1.6 Síntese do 2-(11,17-dihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il)-2-oxoetil 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 3**)

Esquema sintético:

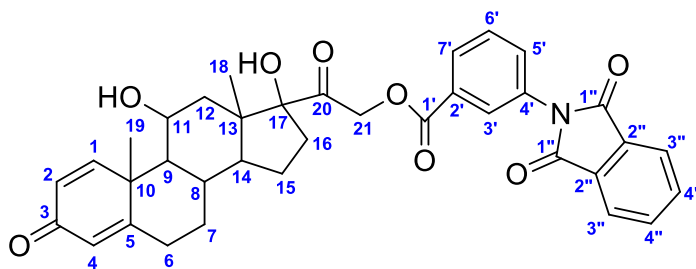


Procedimento:

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**3**) foram dissolvidos em 15 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C . 230 mg (1,2 mmol) de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 26,7 mg (0,2 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 360,4 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

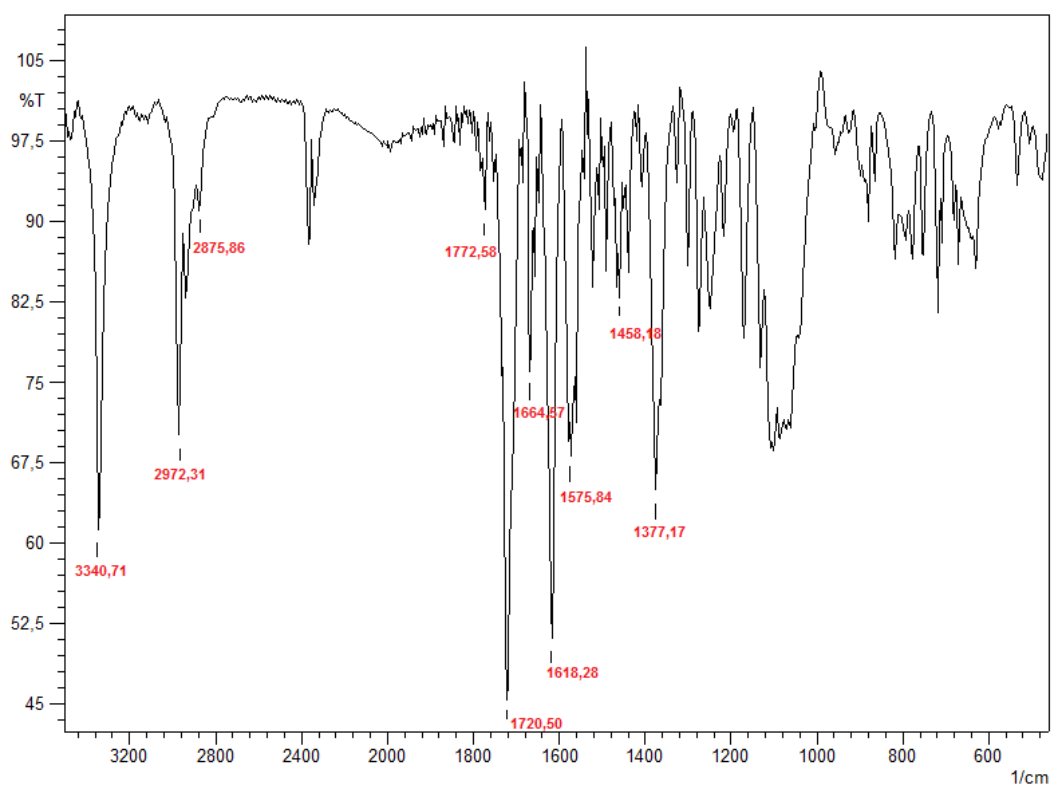
A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi diluído com cerca de 50 mL de diclorometano. Em um funil de separação, a fase orgânica foi lavada, 3 vezes, com cerca de 15 mL de solução saturada de bicarbonato. Após essa etapa, sulfato de sódio anidro foi adicionado a fase orgânica. O produto foi filtrado e evaporado a pressão reduzida e purificado por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 243 mg (rendimento: 48%) de um sólido branco (**Lapdesf GL-FT 3**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{NO}_8$, $\text{PM}=609,66$; $\text{PF}: 235^{\circ}\text{-}238^{\circ}\text{C}$.

Caracterização estrutural:



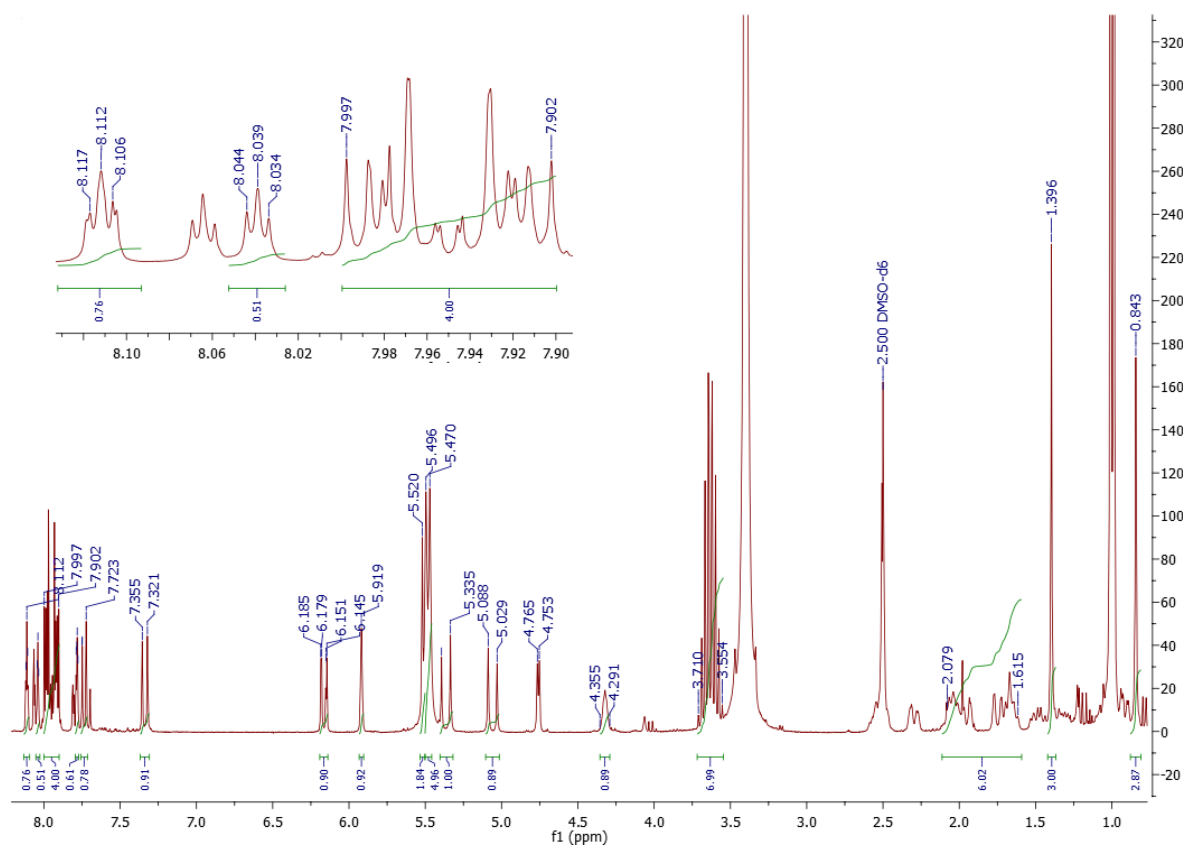
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3340,71\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2972,31$ e $2875,86\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1772,58\text{ cm}^{-1}$ e $1720,50\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1664,57\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1575,84\text{ cm}^{-1}$ e $1458,18\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1377,17\text{ cm}^{-1}$.

Espectro 25. Espectro no infravermelho do composto Lapdesf GL-FT 3

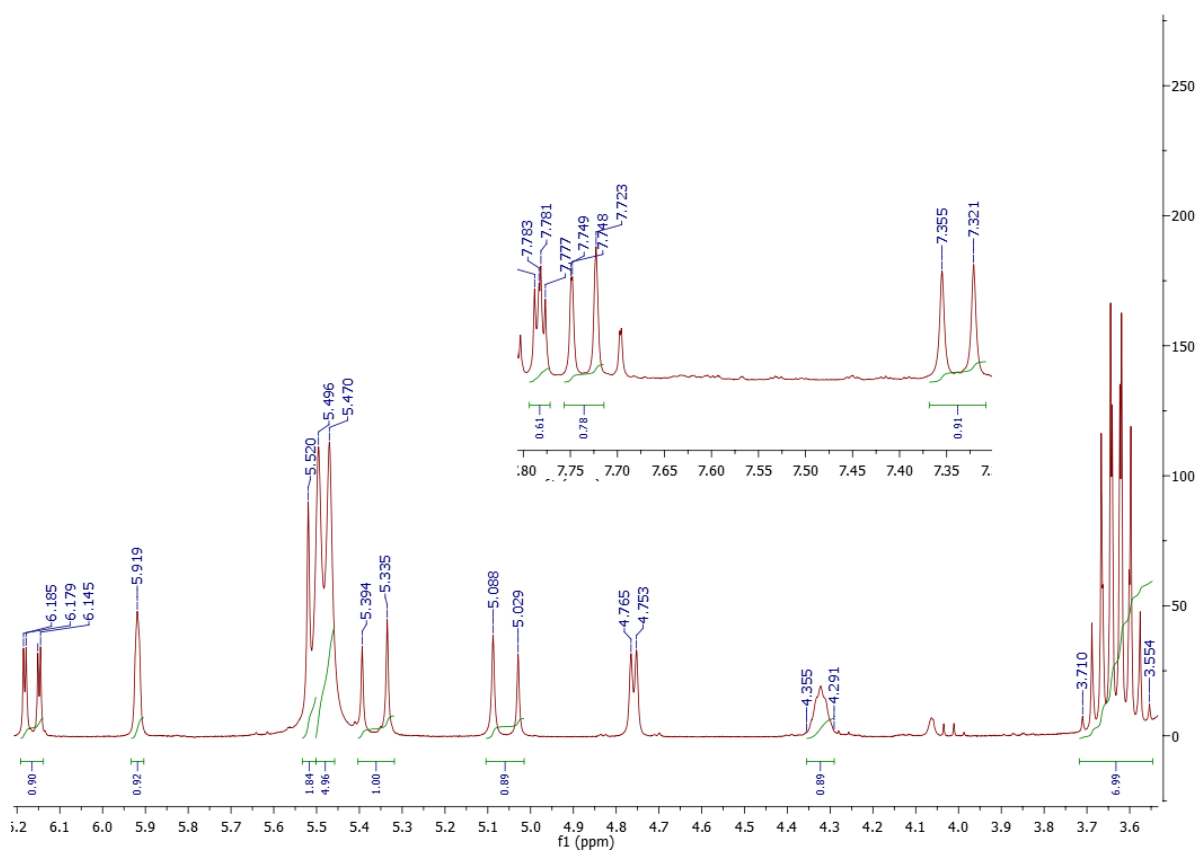


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,111 (H_3 ; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); δ 8,039 (H_7 ; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); δ 7,902 – 7,997 (m; H_4'' e H_3'' ; 4H); δ 7,782 (H_5 ; $J_{\text{orto}} = 7,75$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); δ 7,736 (H_6 ; $J_{\text{orto}} = 7,8$ Hz; 1H); δ 7,338 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; 1H) ; δ 6,165 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 10,20$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); δ 5,919 (s; H_4 ; 1H); δ 5,520 (s; H_{21} ; 2H); δ 5,364 (d; OH; 1H); δ 5,058 (d; OH; 1H); δ 4,355-4,291 (m; H_{11} ; 1H); δ 3,710-3,555 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); δ 1,615-2,079 (m; H_{16} , H_{12} , H_6 ; 6H); δ 1,396 (s; H_{19} ; 3H); δ 0,843 (s; H_{18} ; 3H) ppm.

Espectro 26. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 3 – com ampliação da região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

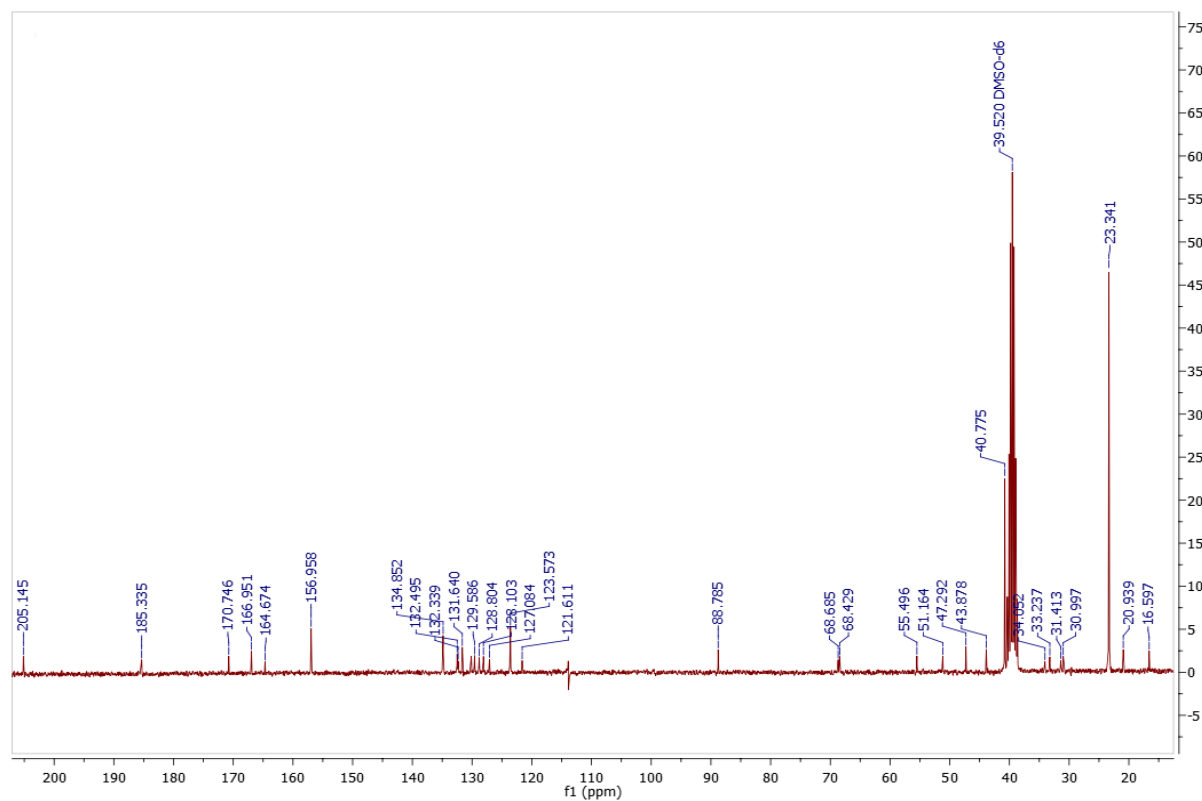


Espectro 27. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 3 - ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

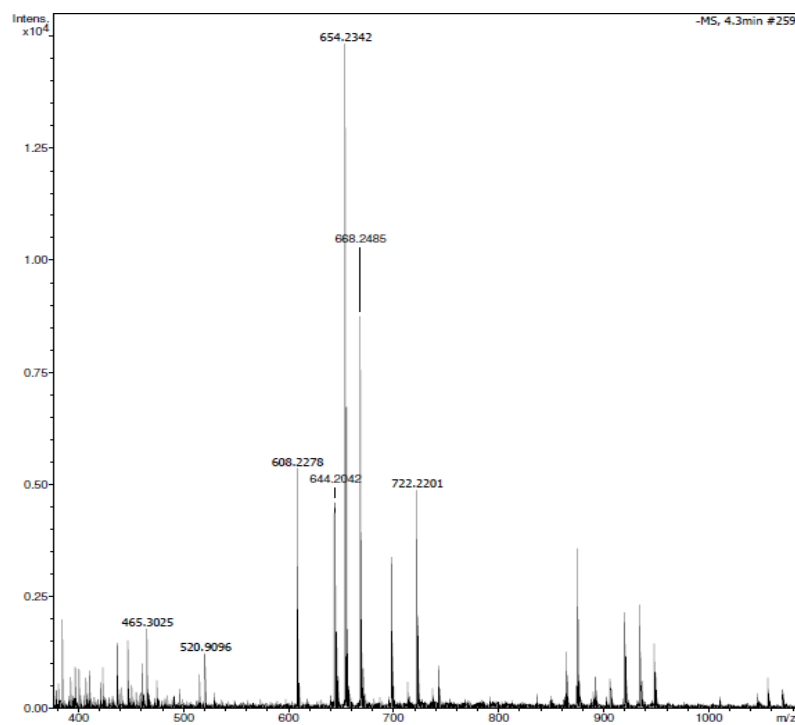


RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 205,145 (C_{20}); 185,335 (C_3); 170,746 (C_5); 166,951 ($\text{C}_{1''}$); 164,674 ($\text{C}_{1'}$); 156,958 (C_2); 134,852 ($\text{C}_{3''}$); 132,495 (C_2'); 132,339 ($\text{C}_{2''}$); 131,640 ($\text{C}_{3'}$ e C_7'); 129,586 (C_6'); 128,804 (C_4'); 128,103 (C_5); 127,084 (C_1); 123,573 (C_4''); 121,611 (C_4); 88,785 (C_{17}); 68,685 (C_{11}); 68,429 (C_{21}); 55,496 (C_9); 51,164 (C_{14}); 47,292 (C_{13}); 43,878 (C_{10}); 40,775 (C_{12}); 34,052 (C_{16}); 33,237 (C_6); 31,413 (C_7); 30,997 (C_8); 23,341 (C_{15}); 20,939 (C_{19}); 16,597 (C_{18}) ppm.

Espectro 28. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 3 (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

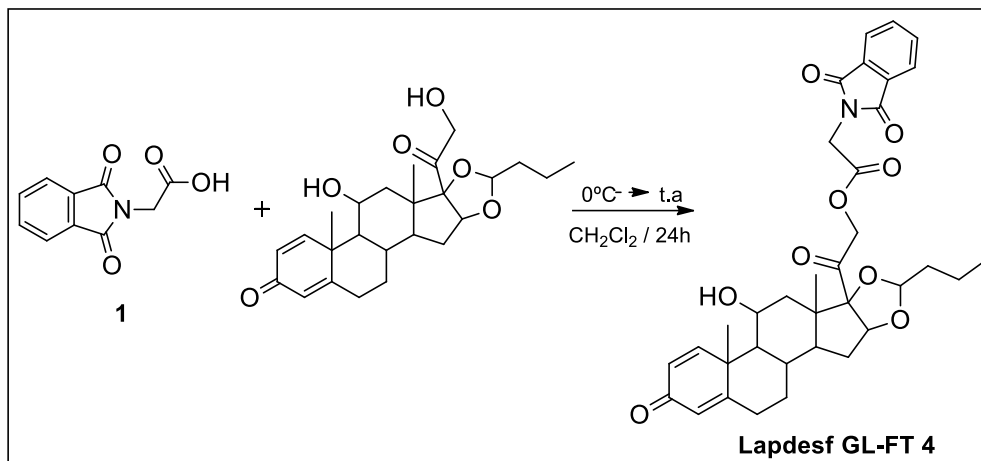


Espectro 29. Espectro de massas, modo negativo, do composto Lapdesf GL-FT 3. $[\text{M}-\text{H}]^+ = m/z$ 608,2278.



1.7 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil 2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a, 12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 2-(1-3-dioxoisindolin-2-il)acetato (**Lapdesf GL-FT 4**)

Esquema sintético:

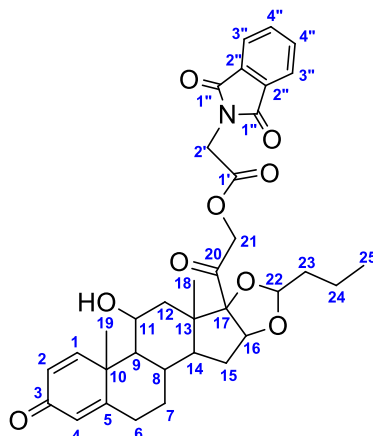


Procedimento:

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 205,17 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)acético (**1**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C . 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 430,5 mg (1 mmol) de budesonida à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e a foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

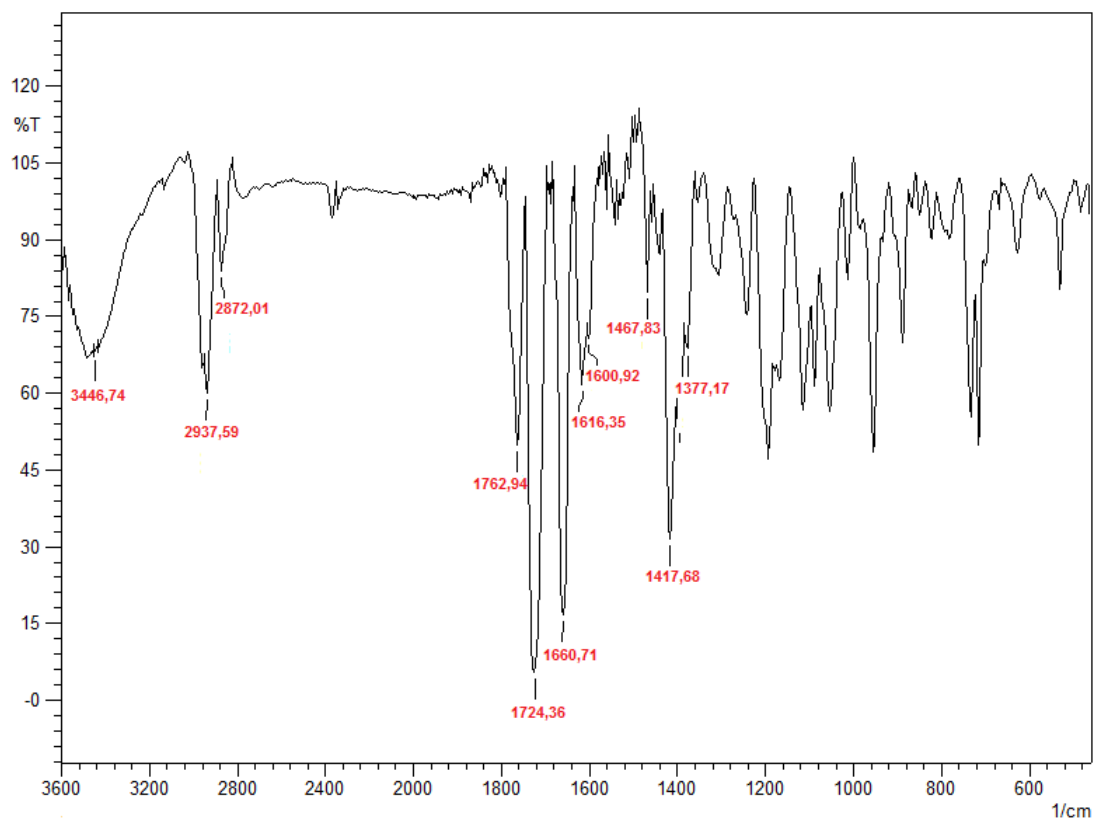
A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 505 mg (rendimento: 80,0%) de um sólido branco (**Lapdesf GL-FT 4**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{NO}_9$; PM= 617,69; PF: $201^{\circ}\text{--}204^{\circ}\text{C}$.

Caracterização estrutural:



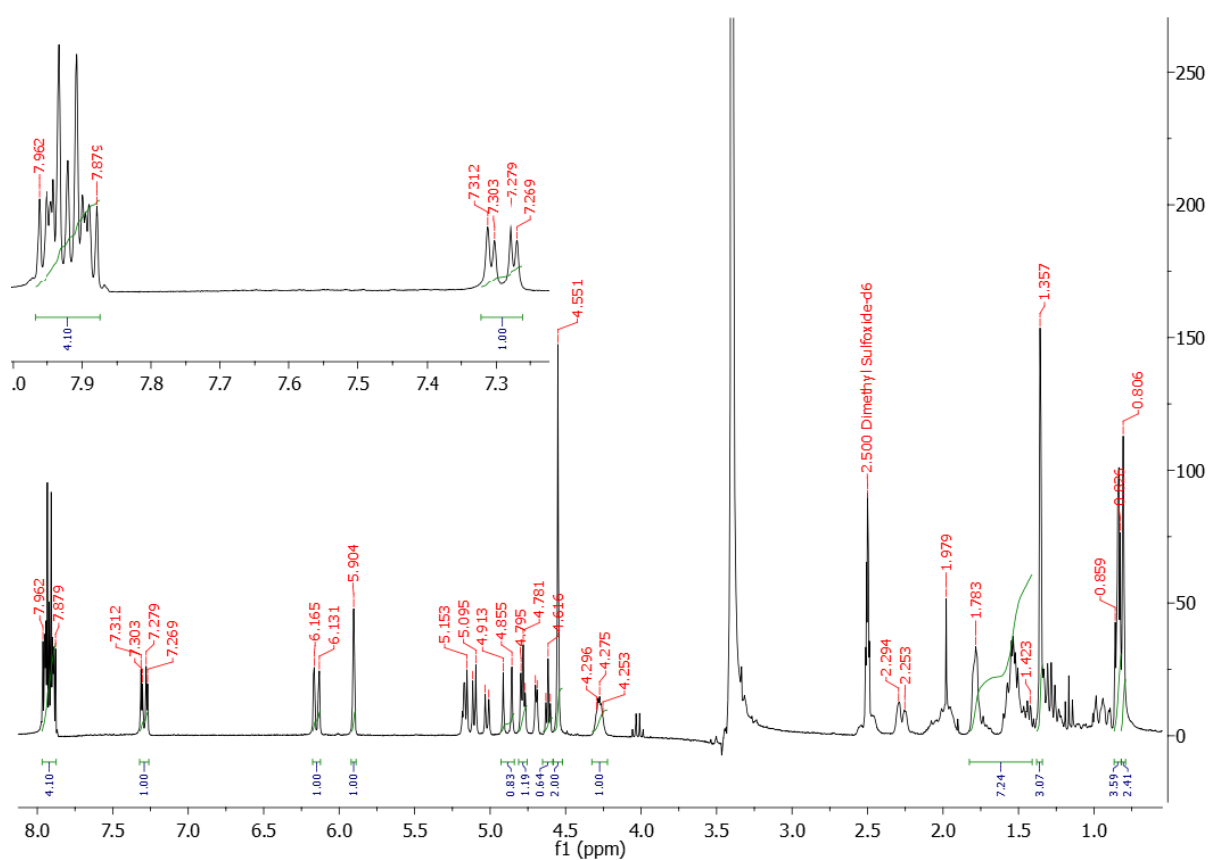
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3446,74\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2937,59$ e $2872,01\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1762,94\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1660,71\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1600,92\text{ cm}^{-1}$ e $1467,83\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1377,17\text{ cm}^{-1}$.

Espectro 30. Espectro no infravermelho do composto Lapdesf GL-FT 4

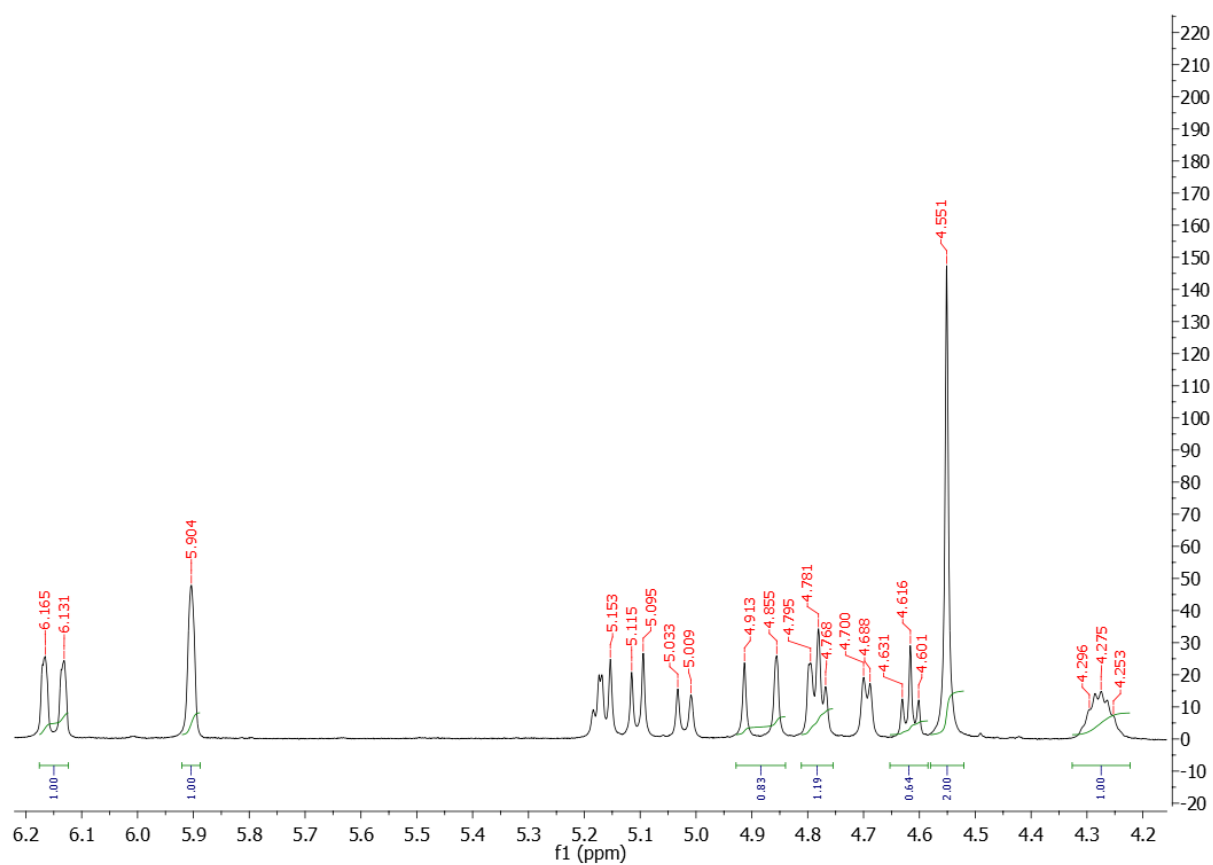


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 7,879 – 7,962 (m; $\text{H}_{4''}$ e $\text{H}_{3''}$; 4H); δ 7,290 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 9,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 2,7$ Hz; 1H); δ 6,148 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,2$ Hz; 1H); δ 5,904 (s; H_4 ; 1H); δ 4,884 (d; OH; 1H); δ 4,781 (t; H_{22} ; 1H); δ 4,616 (t; H_{16} ; 1H); δ 4,551 (s; H_2 ; 2H); δ 4,275 (s; H_{21} ; 2H); δ 1,783-1,423 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); δ 1,357 (s; H_{19} ; 3H); δ 0,859-0,826 (m; H_{23} , H_{12} ; 4H); δ 0,806 (s; H_{18} ; 3H) ppm.

Espectro 31. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 4 – ampliação região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

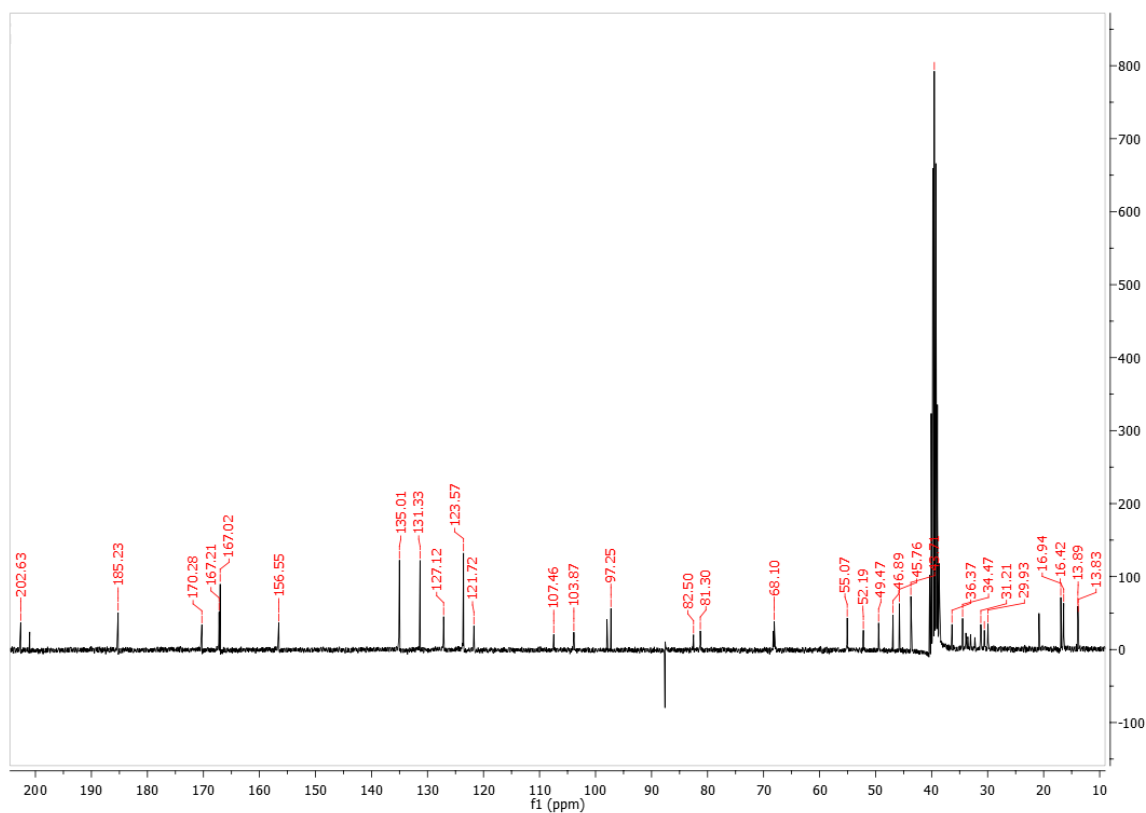


Espectro 32. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 4 - ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

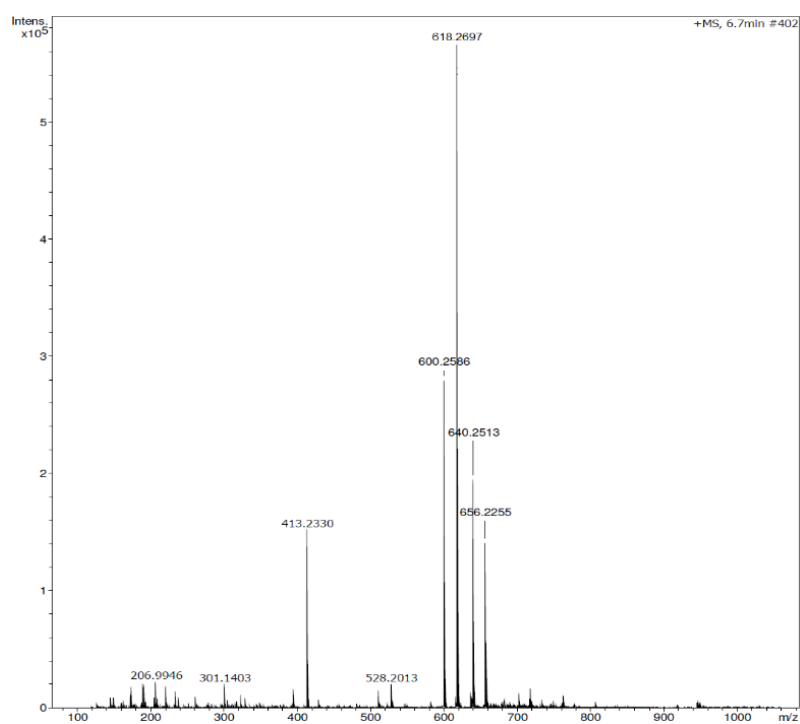


RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 202,63 (C_{20}); 185,23 (C_3); 170,28 (C_1); 167,21 ($\text{C}_{1''}$); 167,02 (C_5); 156,55 (C_2); 135,01 ($\text{C}_{3''}$); 131,33 ($\text{C}_{2''}$); 127,12 (C_1); 123,57 ($\text{C}_{4''}$); 121,72 (C_4); 103,87 (C_{21}); 97,25 (C_{17}); 82,50 (C_{22}); 81,30 (C_{16}); 68,10 (C_2); 55,07 (C_9); 52,19 (C_{13}); 49,47 (C_{10}); 46,89 (C_{14}); 43,71 (C_{12}); 36,37 (C_{23}); 34,47 (C_8); 31,21 (C_6); 30,60 (C_{15}); 29,93 (C_7); 16,94 (C_{19}); 16,42 (C_{18}); 13,89 (C_{25}); 13,83 (C_{24}) ppm.

Espectro 33. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 4 (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

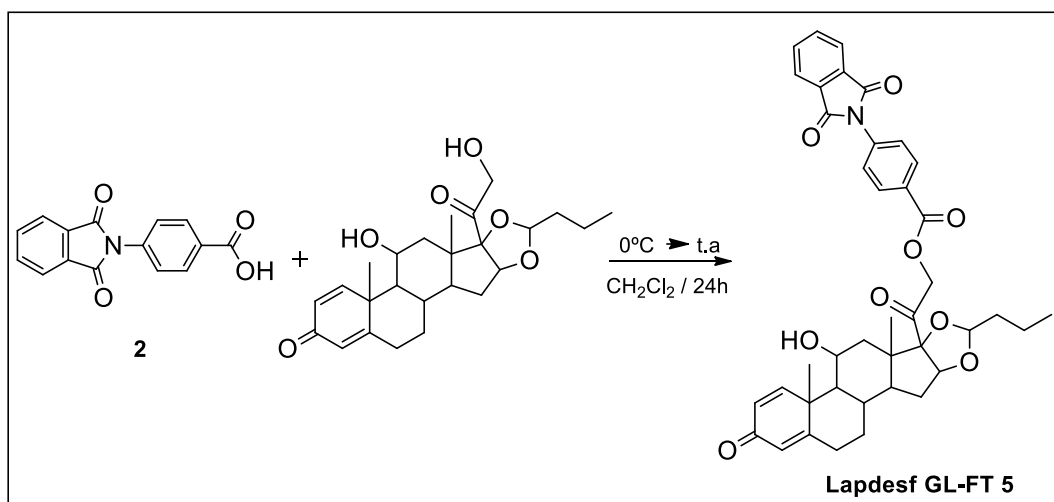


Espectro 34. Espectro de massas, modo positivo, do composto Lapdesf GL-FT 4. $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 618,2697; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z$ 640,2513.



1.8 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 5**)

Esquema sintético:

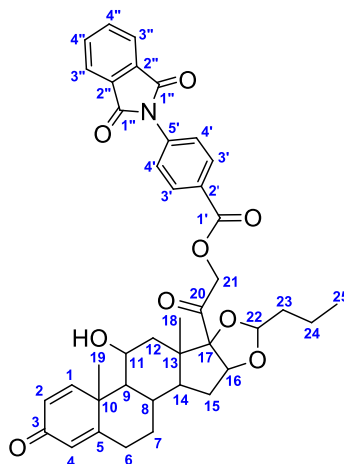


Procedimento:

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il) benzoico (**2**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C . 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 430,5 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

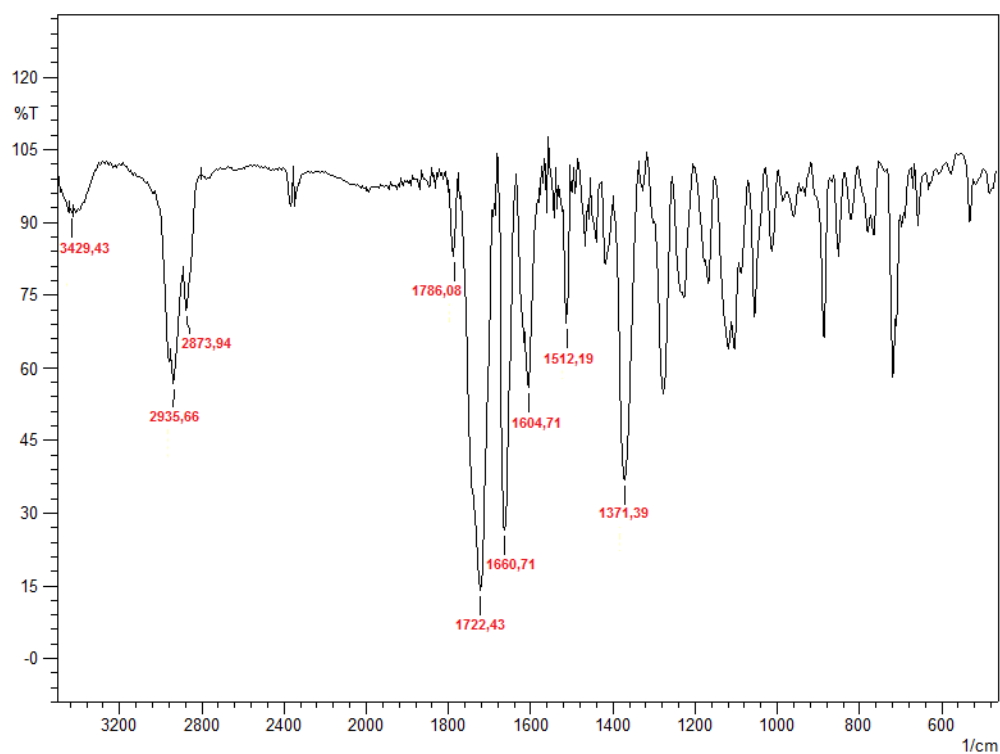
A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 500 mg (rendimento: 70,0%) de um sólido branco (**Lapdesf GL-FT 5**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{NO}_9$; PM=679,75; PF: $188^\circ\text{-}191^\circ\text{C}$.

Caracterização estrutural:



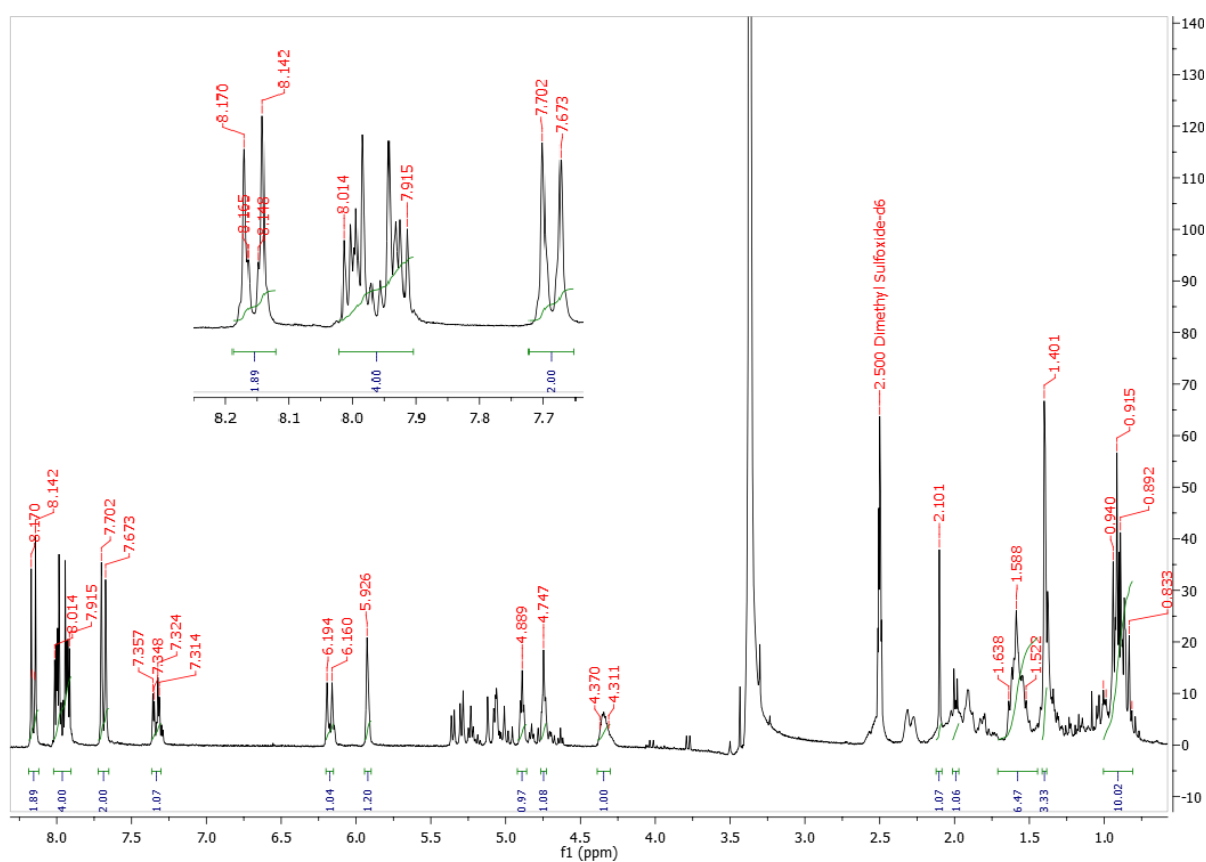
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3429,43\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2935,66$ e $2873,94\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1786,08\text{ cm}^{-1}$ e $1722,43\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1660,71\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1604,71\text{ cm}^{-1}$ e $1512,19\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1371,39\text{ cm}^{-1}$.

Espectro 35. Espectro no infravermelho do composto Lapdesf GL-FT 5

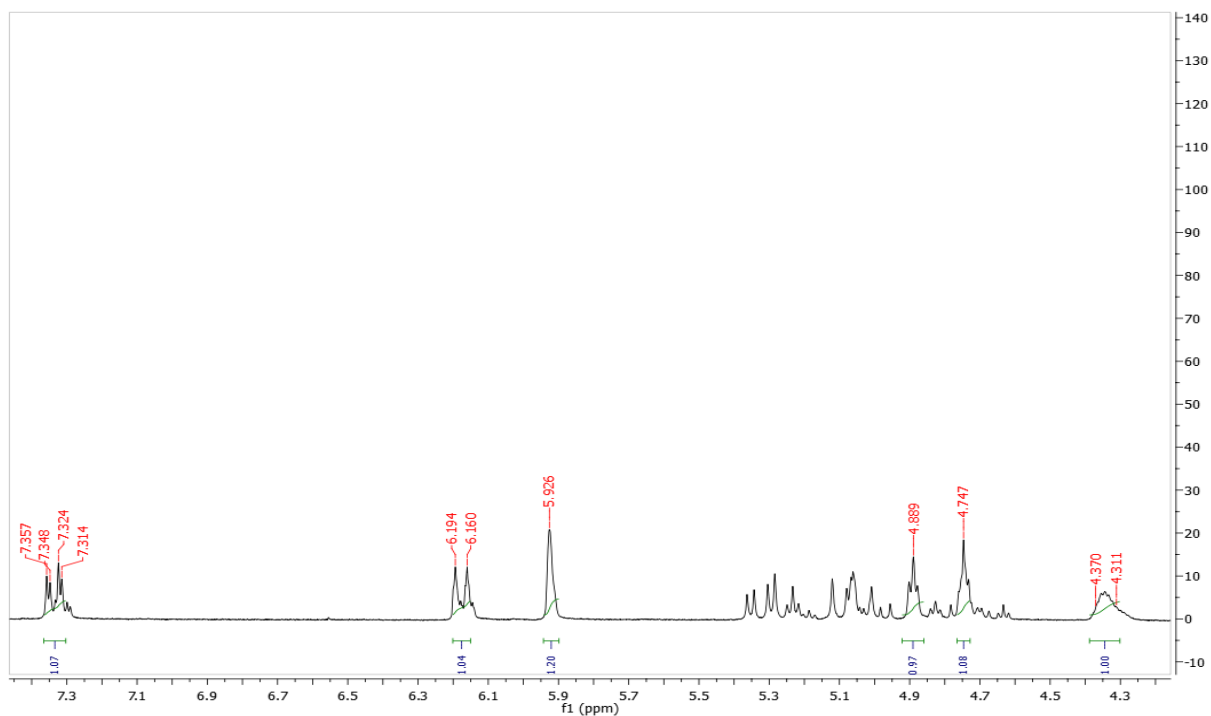


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,156 (dd; H_3 ; $J_{\text{orto}} = 6,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 8,014-7,915 (m; H_4'' e H_3''' ; 4H); 7,687 (dd; H_4 ; $J_{\text{orto}} = 8,7$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 2H); 7,335 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 9,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 2,7$ Hz; 1H); 6,177 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 10,2$ Hz; 1H); 5,926 (s; H_4 ; 1H); 4,889 (t; H_{22} ; 1H); δ 4,747 (t; H_{16} ; 1H); 4,370-4,311 (m; H_{11} ; 1H); δ 1,638-1,522 (m; H_{15} , H_{14} , H_9 , H_8 , H_7 ; 7H); 1,401 (s; H_{19} ; 3H); 1,005-0,814 (m; H_{23} , H_{24} ; H_{25} ; H_{18} ; 10H) ppm.

Espectro 36. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 5 – ampliação região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

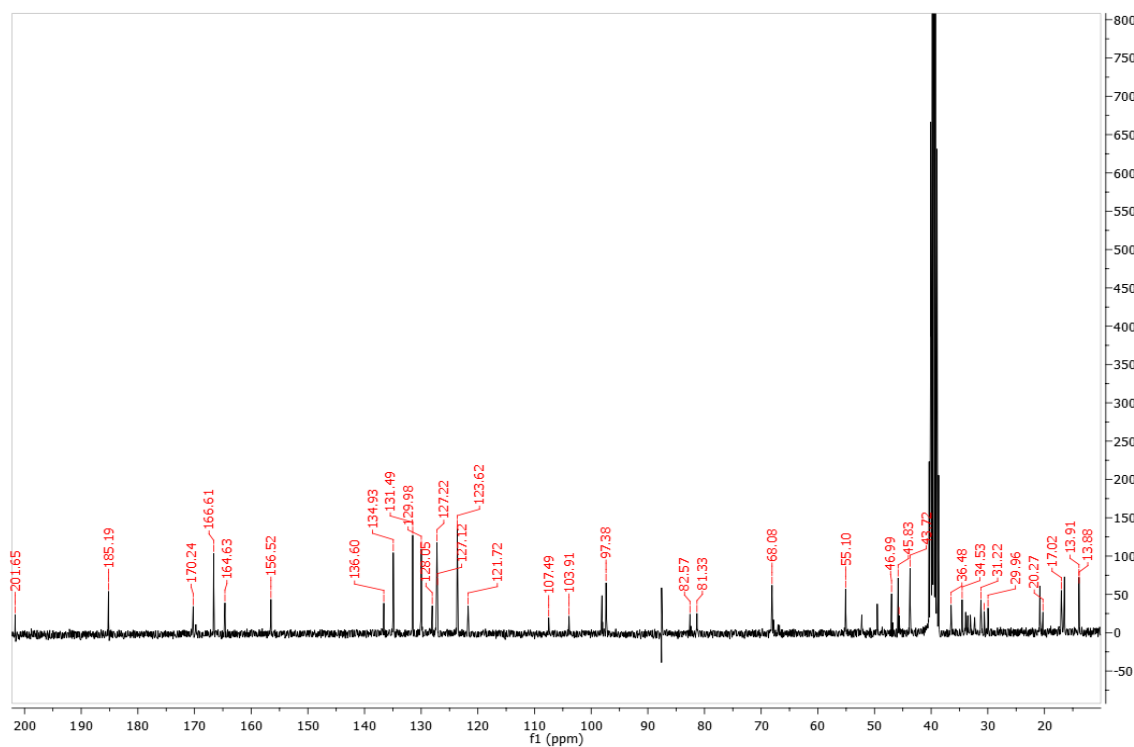


Espectro 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 5 – ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

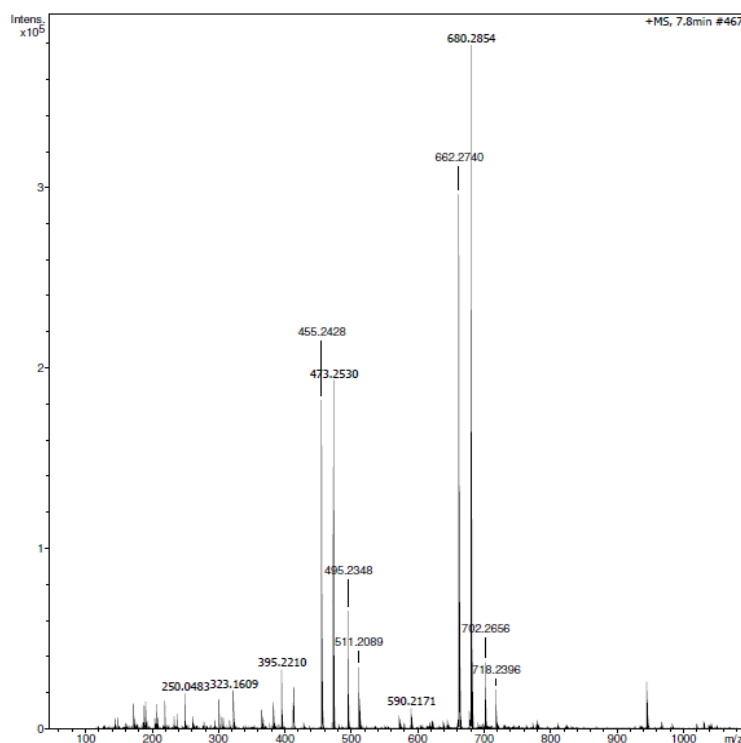


RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 201,65 (C_{20}); 185,19 (C_3); 170,24 (C_1'); 166,61 (C_1''); 164,63 (C_5); 156,52 (C_2); 136,60 (C_2'); 134,93 (C_3''); 131,49 (C_2''); 129,98 (C_3'); 128,05 (C_5'); 127,72 (C_4'); 127,12 (C_1); 123,62 (C_4''); 121,72 (C_4); 103,91 (C_{21}); 97,38 (C_{17}); 82,57 (C_{22}); 81,33 (C_{16}); 55,10 (C_9); 46,99 (C_{13}); 45,83 (C_{10}); 45,67 (C_{14}); 43,72 (C_{12}); 36,48 (C_{23}); 34,53 (C_8); 31,22 (C_6); 30,62 (C_{15}); 29,96 (C_7); 20,27 (C_{19}); 17,02 (C_{18}); 13,91 (C_{25}); 13,88 (C_{24}) ppm.

Espectro 38. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 5 (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)

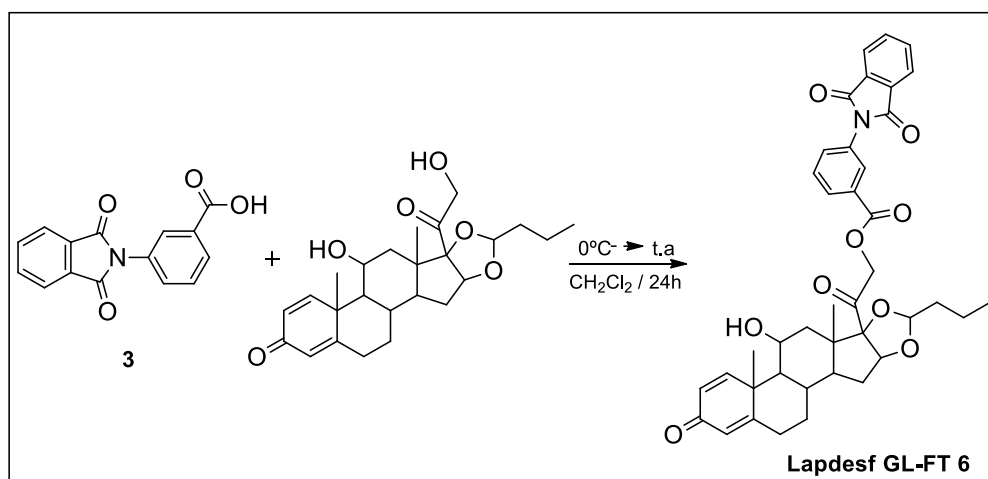


Espectro 39. Espectro de massas, modo positivo, do composto Lapdesf GL-FT 5. $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 680,2854; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z$ 702,2656.



1.9 Síntese do 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-naftol [2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 3-(1-3-dioxoisindolin-2-il)benzoato (**Lapdesf GL-FT 6**)

Esquema sintético:

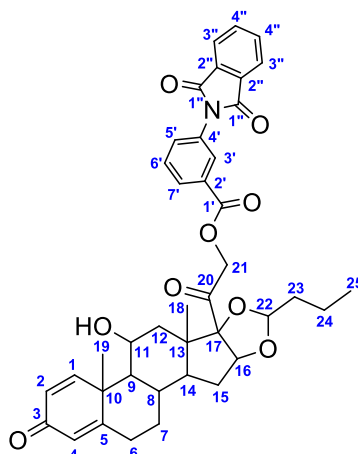


Procedimento:

Em um balão de 50 mL, conectado a um tubo com agente secante, 267 mg (1 mmol) do derivado ftalimídico ácido 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzóico (**3**) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano anidro, formando uma solução que foi mantida sob agitação e em banho de gelo a 0°C . 162 mg (1,2 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 0,155 mL (1 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) foram adicionados à referida solução. Em seguida, foram adicionados 5 gotas de trietilamina e 430,5 mg (1 mmol) de prednisolona à solução. Após 1 hora, retirou-se a reação do banho de gelo e foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até indicar o término da reação.

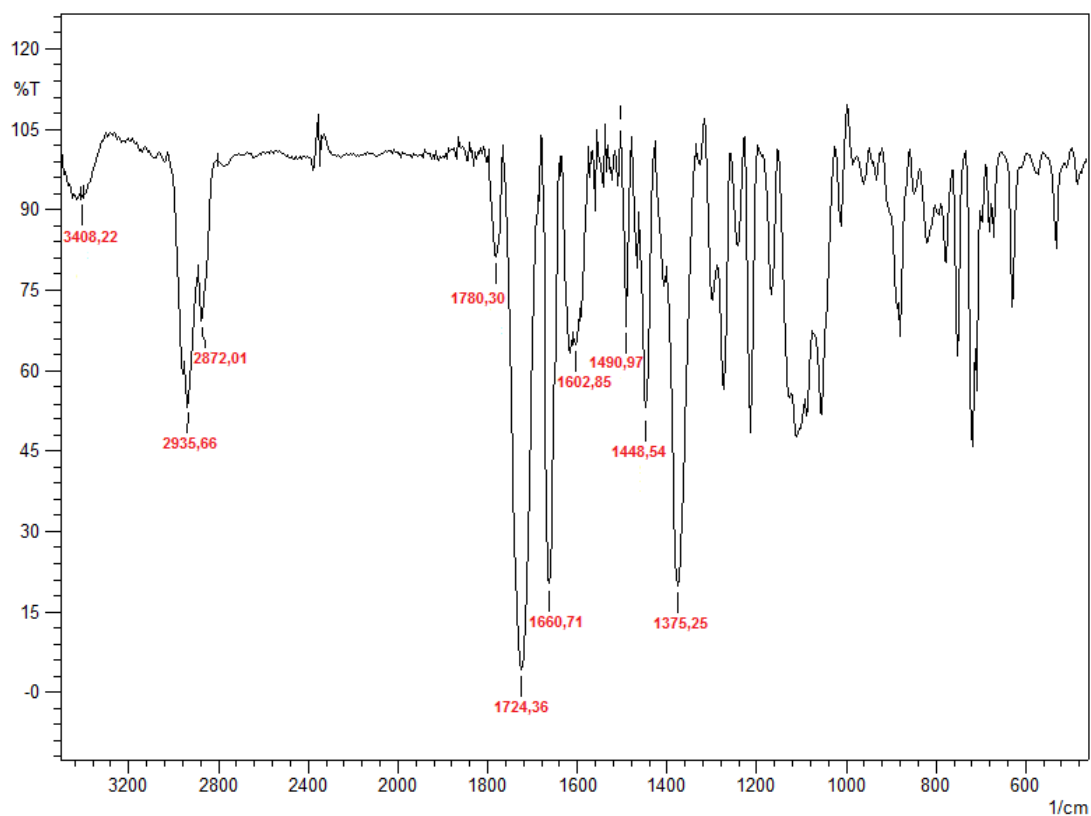
A mistura reacional foi filtrada, evaporada a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica, fase móvel: 60% Acetato de etila: 40% Hexano) fornecendo 552 mg (rendimento: 80,0%) de um sólido branco (**Lapdesf GL-FT 6**) cuja fórmula molecular é $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{NO}_9$, $\text{PM}=679,75$; $\text{PF}: 235^{\circ}\text{-}238^{\circ}\text{C}$.

Caracterização estrutural:



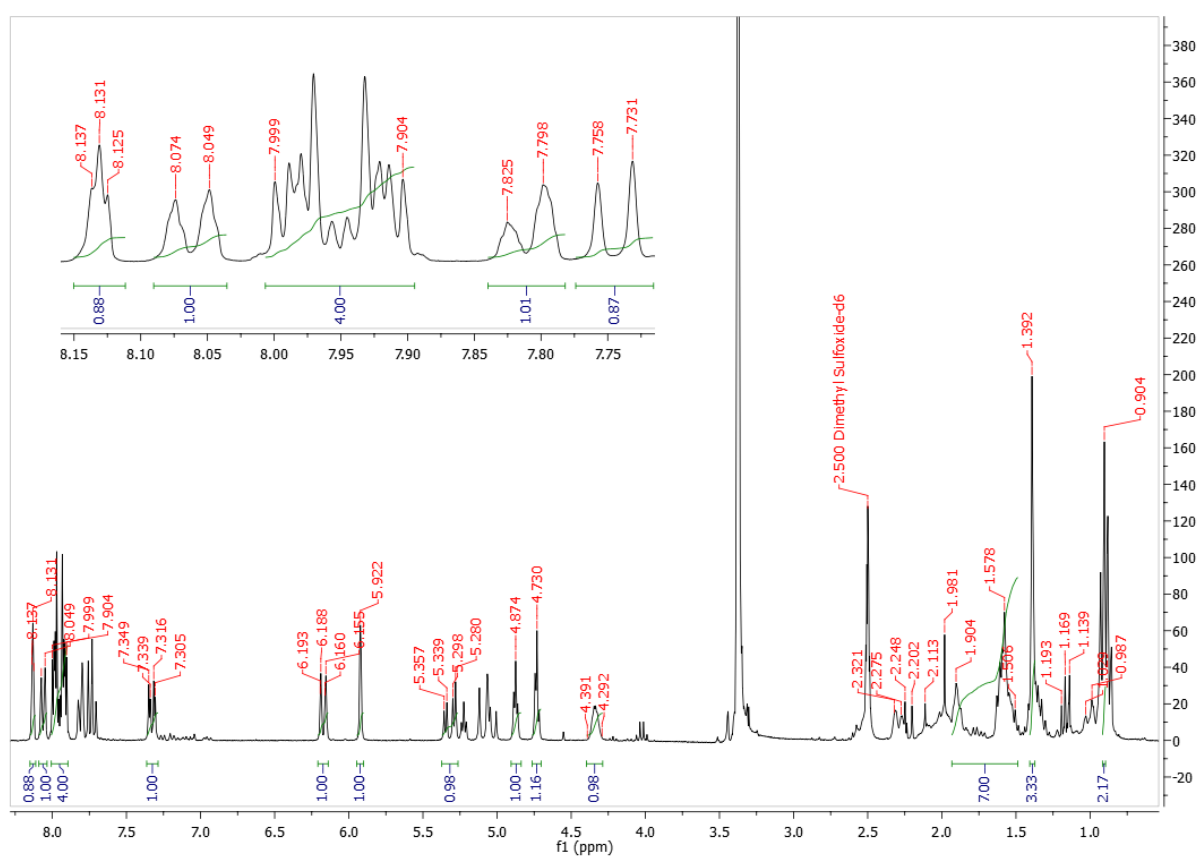
Infravermelho (pastilha de KBr): ν O-H = $3408,22\text{ cm}^{-1}$; ν C-H alquílico (simétrico e assimétrico) = $2935,66$ e $2872,01\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = $1780,30\text{ cm}^{-1}$ e $1724,36\text{ cm}^{-1}$; ν C=O éster = $1660,71\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático = $1602,85\text{ cm}^{-1}$, $1490,97$ e $1448,54\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C = $1375,25\text{ cm}^{-1}$.

Espectro 40. Espectro no infravermelho do composto Lapdesf GL-FT 6

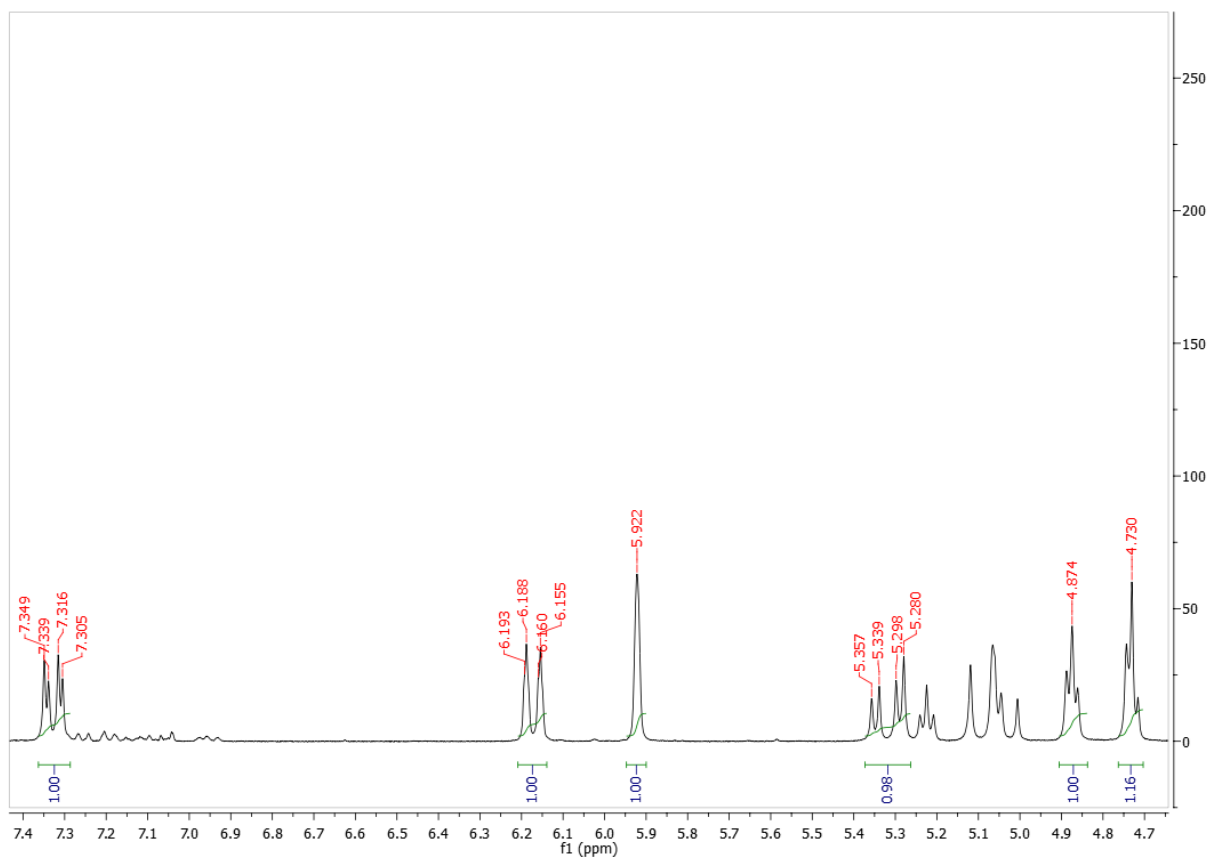


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,131 (H_3' ; $J_{\text{meta}} = 1,8$ Hz; 1H); 8,061 (H_7' ; $J_{\text{orto}} = 7,5$ Hz; 1H); 7,999 – 7,904 (m; H_4'' e H_3'' ; 4H); 7,811 (H_6' ; $J_{\text{orto}} = 8,1$ Hz; 1H); 7,744 (d; H_1 ; $J_{\text{orto}} = 8,1$ Hz; 1H); 7,327 (dd; H_5 ; $J_{\text{orto}} = 9,9$ Hz; $J_{\text{meta}} = 3,0$ Hz; 1H); 6,174 (dd; H_2 ; $J_{\text{orto}} = 9,90$ Hz; $J_{\text{meta}} = 1,5$ Hz; 1H); 5,922 (s; H_4 ; 1H); 4,874 (t; H_{22} ; 1H); 4,739 (t; H_{16} ; 1H); 4,391-4,292 (m; H_{11} ; 1H); δ 1,392 (s; H_{19} ; 3H); 1,629-1,525 (m; H_{23} ; H_{24} ; 4H); 0,929-0,856 (m; H_{25} ; H_{18} ; 6H) ppm.

Espectro 41. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 6 – ampliação região aromática (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6)

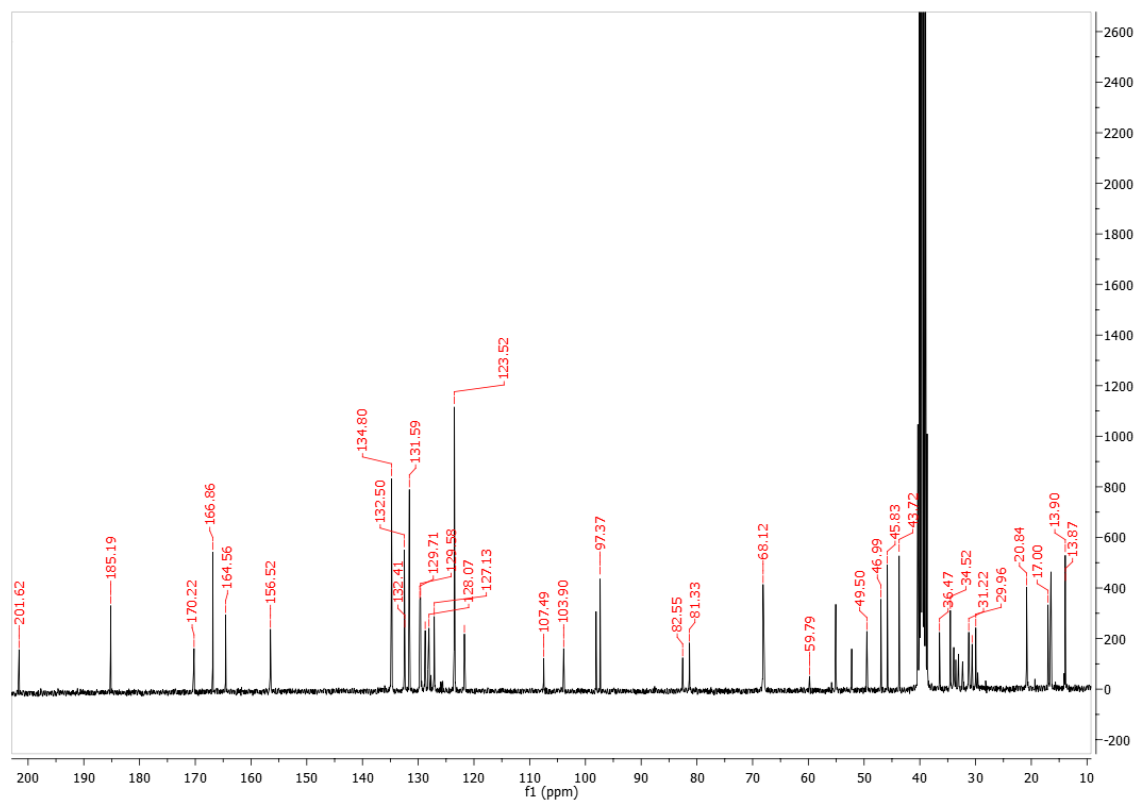


Espectro 42. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 6 – ampliação (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6)

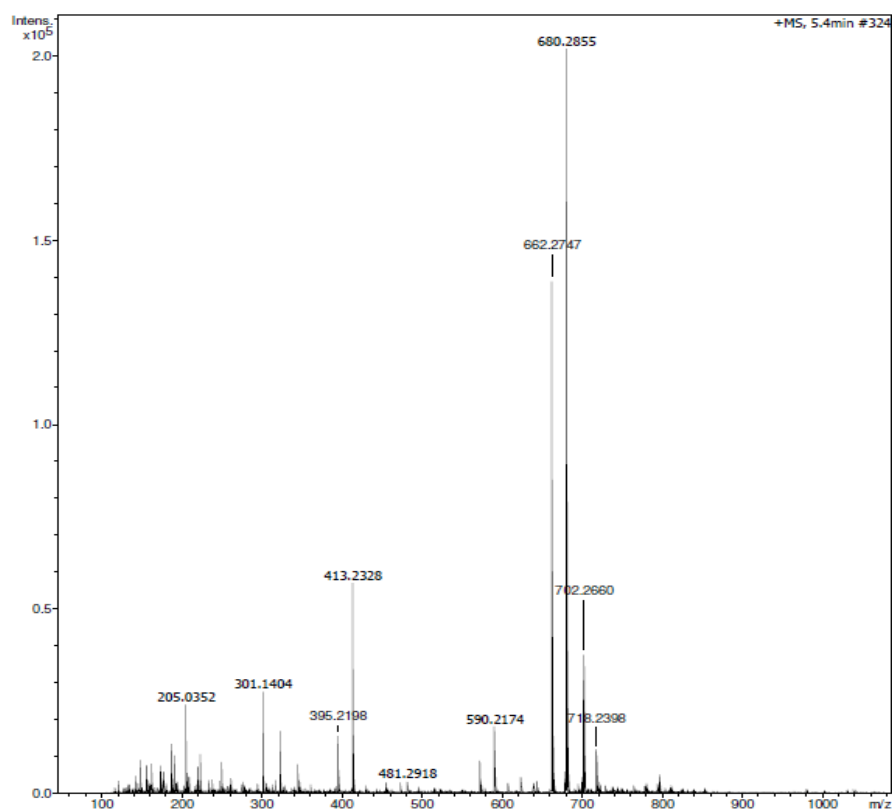


RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ 201,62 (C_{20}); 185,19 (C_3); 170,22 (C_1); 166,86 ($\text{C}_{1'}$); 164,56 (C_5); 156,52 (C_2); 134,80 ($\text{C}_{3''}$); 132,50 (C_2); 132,41 ($\text{C}_{2''}$); 131,59 (C_3 ; C_7); 129,58 (C_6); 128,75 (C_4); 128,07 (C_5); 127,13 (C_1); 123,52 ($\text{C}_{4''}$); 121,71 (C_4); 103,90 (C_{21}); 97,37 (C_{17}); 82,55 (C_{22}); 81,33 (C_{16}); 68,12 (C_{11}); 59,79 (C_9); 49,50 (C_{13}); 46,99 (C_{10}); 45,83 (C_{14}); 43,72 (C_{12}); 36,47 (C_{23}); 34,52 (C_8); 31,22 (C_6); 30,62 (C_{15}); 29,96 (C_7); 20,84 (C_{19}); 17,00 (C_{18}); 13,90 (C_{25}); 13,87 (C_{24}) ppm.

Espectro 43. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do composto Lapdesf GL-FT 6 (RMN ^{13}C ; 75 MHz; DMSO- d_6)



Espectro 44. Espectro de massas, modo positivo, do composto Lapdesf GL-FT 6. $[M+H]^+ = m/z$ 680,2855; $[M+Na]^+ = m/z$ 702,2660.



ANEXO A - Parecer do comitê de ética (Protocolo CEUA/FCF/Car nº 04/2016)

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 04/2016

Interessada: MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

Projeto: Síntese de anti-inflamatórios esteroides das séries Lapdesf GL-FT e GL-TAU: ensaios biológicos e estudo in silico

Parecer nº 13/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 03 de março de 2016, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Síntese de anti-inflamatórios esteroides das séries Lapdesf GL-FT e GL-TAU: ensaios biológicos e estudo in silico", apresentado pela Pós-graduanda MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO, sob orientação da Professora Doutora Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em FEVEREIRO de 2017 em formulário para este fim.

Araraquara, 09 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO B - Parecer do comitê de ética (Protocolo CEUA/FCF/Car nº 11/2016)**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada "Síntese de anti-inflamatórios esteroides das séries Lapdesf GL-FT e GL-TAU: ensaios biológicos e estudo in silico", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 11/2016, sob a responsabilidade de Marcelle Gabrielle Mendes Machado e Profa. Dra. Chung Man Chin - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 15 de abril de 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro de 2017
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	78
Peso/Idade	250-280 g 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto

Araraquara, 19 de abril de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA