



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica

**NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS
PLANEJADOS COMO CANDIDATOS A
FÁRMACOS ANALGÉSICOS E
ANTIINFLAMATÓRIOS**

Carolina de Mattos Duarte

Rio de Janeiro
Maio, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS PLANEJADOS
COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANALGÉSICOS E
ANTIINFLAMATÓRIOS**

Carolina de Mattos Duarte

TESE DE DOUTORADO REALIZADA NO LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E
SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS (LASSBio) – FACULDADE DE
FARMÁCIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, SOB A
ORIENTAÇÃO DE:

PROF. DR. ELIEZER J. BARREIRO

PROF. DR. CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA

Rio de Janeiro

Maio, 2006

**NOVOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS PLANEJADOS
COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANALGÉSICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS**

Carolina de Mattos Duarte

Tese submetida ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Eliezer J. Barreiro (LASSBio – FF – UFRJ) – Presidente

Carlos Alberto Manssour Fraga (LASSBio – FF – UFRJ)

Jean-Jacques Bourguignon (CNRS/ULP – França)

Marco Aurélio Martins (IOC – FIOCRUZ)

Octávio Augusto Ceva Antunes (DQI – IQ – UFRJ)

Angelo da Cunha Pinto (DQO – IQ – UFRJ)

Paulo Roberto Ribeiro Costa (NPPN – UFRJ) (Suplente)

Hugo Cerecetto (Universidad de la Republica – Uruguai) (Suplente)

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, junto ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

DUARTE, Carolina de Mattos.

Novos Derivados *N*-Acilidrazônicos Planejados
como Candidatos a Fármacos Analgésicos e
Antiinflamatórios/

Carolina de Mattos Duarte. Rio de Janeiro: UFRJ/
Instituto de Química, 2006.

xxix, 119 p.; ANEXO, 61 p.

(Tese) - Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Química, 2006.

1. *N*-Acilidrazonas. 2. Canabinóide. 3.
Ciclooxigenase-2. 4. Estruturas privilegiadas.
5. Tese (Dout. – IQ-UFRJ).

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título.

Este trabalho é dedicado a Sylvio de Mattos (*in memoriam*)
pelas suas vitórias em todas as guerras de sua vida.

AGRADECIMENTOS

- Aos Professores Doutores Eliezer J. Barreiro e Carlos Alberto Manssour Fraga, pelas discussões científicas e pela oportunidade de realizar o trabalho no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, UFRJ.
- À Prof^ª. Dra. Ana Luísa Palhares de Miranda e seus orientados MSc. Jorge Luiz Mendonça Tributino e Daniel Ignacchitti Lacerda, do LASSBio, Faculdade de Farmácia, UFRJ, pelo trabalho em colaboração referente aos ensaios farmacológicos *in vivo*, pelas discussões, pela convivência diária no laboratório e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, e ao Dr. Fernando Dutra, da Universidade de Caxias do Sul, pelo trabalho em colaboração referente aos ensaios bioquímicos de atividade antioxidante.
- À Prof^ª. Dra. Marília Oliveira Ferreira Goulart, do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, pelo trabalho em colaboração referente aos ensaios de voltametria cíclica e pela calorosa acolhida em seu laboratório.
- Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina; ao Prof. Dr. Juliano Ferreira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria; à Prof^ª. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira, da Universidade Federal de Alagoas e à MSc Marina Vieira Martins, do LASSBio, Faculdade de

Farmácia, UFRJ, pelo trabalho em colaboração referente aos ensaios em receptores canabinóides.

- À Dra. Claire Lugnier, do Laboratoire de Pharmacologie et Physico-Chimie des Interactions Cellulaires / CNRS (UMR 7034), da Université Louis Pasteur – Strasbourg I, pela oportunidade de desenvolver os projetos de doutorado-sanduíche em seu laboratório e pelo trabalho em colaboração referente à inibição da fosfodiesterase-4.
- Aos Drs. Jean-Jacques Bourguignon e Martine Schmitt, do Laboratoire de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire / CNRS (UMR 7175 - LC1), da Université Louis Pasteur – Strasbourg I pela oportunidade de desenvolver os projetos de doutorado-sanduíche e pelo grande crescimento científico e humano que me proporcionaram.
- Ao Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, do Departamento de Medicina Social da Universidade Federal de Alagoas, pelo suporte científico, lingüístico e psicológico durante a minha estada em Strasbourg, além de todo aprendizado e grande amizade desde a iniciação científica.
- Ao Prof. Dr. Marcel Hibert e aos Drs. Jean Suffert, Gilbert Schlewer, Didier Rognan, André Mann, Robert Anton e Jacques Haiech, do Laboratoire de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire / CNRS (UMR 7175 - LC1), da Université Louis Pasteur – Strasbourg I, pela convivência científica.
- Ao Prof. W. Bruce Kover, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelos valiosíssimos ensinamentos sobre a Química Orgânica nas disciplinas de

Mecanismos de Reações Orgânicas, Tópicos Especiais em Química Orgânica e Tópicos Especiais em Mecanismos.

- Aos Profs. Drs. Claudia M. Rezende, Edson L. S. Lima, Simon J. Garden, Pierre M. Esteves, Cláudio J. A. Mota e Carlos R. Kaiser, pela convivência e pelo aprendizado nas disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Aos Profs. Drs. Aparecida Cayoco Ponzoni, Áurea Echevarria, Carlos Maurício R. de Santanna, Clarissa O. da Silva, João Batista N. da Costa, Marco Edilson F. Lima, Porfirio de Jesus das Neves, Rosane N. Castro e Silas Varella Fraiz Junior, do Dequim/UFRRJ, pela cordial convivência durante minha experiência como professora substituta nesta instituição.
- Aos colegas e amigos Alexandra Lopes, Aline Fraga, Ana Paula Rodrigues, André de Paula, Angélica Lima, Anna Benite, Arthur Kümmerle, Bruno Andrade, Carolina, Célia, Cínthia (A)Luna Torreão, Daniel Schulz, Danilo Sant'anna, Débora Faoro, Fernanda Brito, Fernanda Oliveira, Gilberto Silva, Heleno Bezerra-Netto, Hugo Verli, Ibelza Melo, Jean Santos, Josiane Neves, Leandro Silva, Lis Helena Teixeira, Luiz Romeiro, Mariana Duarte, Mariana Vilella, Márcia Veloso, Monique Brito, Nelilma Romeiro, Patrícia Lima, Ramon Leite, Renata Lacerda, Rodrigo Peres, Susana Cardoso, Vagner Pinho, Valter Gonçalves, do LASSBio, e os amigos Shanserley do Espírito Santo e Eduardo Costa, com os quais convivi durante a realização deste trabalho.
- Aos colegas e amigos Vanesca Frota Madeira, Fabrice Stock, Malik Hellal, Frédéric Bihel, Pascal Benderitter, Alexander Mongeot, Jacques Bricard,

Jean Peluso, Cyrill Anthenaume, Françoise Herth, Hadjila Chabane, Dominique Gérard, Stéphanie Riche, André Barreto, Lorena Zanlorenssi, Sébastien Guéry, Angèle Schoenfelder, Christophe Bour, Thomas Spangenberg, Catherine Vonthron, Valérie Collot, Jordi Rodrigo, Walid Mokni, Samia Doghmi e Rima Thaseldar-Roumie pela convivência em Strasbourg e amizade.

- Aos meus familiares Lais Vianna de Mattos, Agenor Cardozo Duarte, Renata de Mattos Duarte, Atilla de Mattos Duarte, José Renato Duarte Fajardo, João Guilherme Duarte Fajardo, Gisele Machado Duarte, José de Anchieta Fajardo, Yara Vianna de Mattos e Sylvio de Mattos (*in memoriam*), pelo total e incondicional apoio.
- A todos da querida família Schmitt, Marie-Therèse (Maman), Joseph, Anne-Marie, Simone, Jean-Louis, Marie-Émilie, Marianne e petit Antoine, que me proporcionaram um agradabilíssimo ambiente de família aos domingos, durante minha estadia em Strasbourg.
- Ao grande amigo Benoit Louis, por todos os ótimos momentos.
- Ao meu fotógrafo predileto Jonilson Pantoja, pelo grande incentivo e carinho, principalmente na etapa de redação da tese.
- À Central Analítica do IQ-UFRJ pelos espectros de ressonância magnética nuclear e de infravermelho.
- Aos órgãos CNPq, CAPES, FUJB, FAPERJ e ao programa PRONEX, pelo apoio financeiro.
- Antecipadamente, aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite.

RESUMO

O presente trabalho descreve o planejamento, a síntese e a avaliação das propriedades farmacológicas de novos derivados *N*-acilidrazônicos (**56-57**), planejados estruturalmente como análogos otimizados do protótipo LASSBio-294 (**53**), candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios.

Os compostos 6-nitro-1,3-benzodioxolil-*N*-acilidrazônicos (**56**) e 6-[(metilsulfonyl)amino]-1,3-benzodioxolil-*N*-acilidrazônicos (**57**) foram obtidos a partir do safrol (**60**), produto natural abundante da flora brasileira. Estes derivados foram submetidos, preliminarmente, a ensaios *in vivo* em protocolos clássicos de inflamação, identificando-se os derivados *N*′-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidróxifenilmetilideno)-6-nitro-1,3-benzodioxola-5-carboidrazina (LASSBio-881) (**56c**) e *N*′-fenilmetilideno-6-[(metilsulfonyl)amino]-1,3-benzodioxola-5-carboidrazina (LASSBio-930) (**57c**) como candidatos mais promissores, capazes de inibir o edema de pata de rato induzido por carragenina em 31,7 e 59,6% (300 µmol/kg, *p.o.*), respectivamente.

O derivado LASSBio-881 (**56c**) foi identificado como analgésico na fase neurogênica do modelo de hiperalgesia induzida por formalina em camundongos, apresentando 44,5% de efeito antinociceptivo na dose de 100 µmol/kg, enquanto o análogo LASSBio-930 (**57c**) promoveu analgesia na fase inflamatória (48,7%) do mesmo modelo, indicando mecanismos de ação distintos para ambos os compostos. Os ensaios *in vitro* sobre as isoformas de ciclooxigenase (COX) demonstram que LASSBio-881 (**56c**) não foi capaz de atuar nesta via, enquanto LASSBio-930 (**57c**) inibe a produção de TXB₂.

proveniente de COX-1 em sangue humano total com $IC_{50} = 2,9 \mu M$, ambos sem ação sobre a enzima fosfodiesterase-4.

O composto LASSBio-881 (**56c**) apresentou perfil de ação *in vivo* semelhante ao do endocanabinóide anandamida (**71**). Este derivado (**56c**) foi então submetido ao modelo de ligação específica em receptores canabinóides CB1 de cérebro de camundongos, sendo capaz de deslocar o radioligante em 71% na concentração de $100 \mu M$. Além disso, LASSBio-881 (**56c**) foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos T sem promover apoptose, provavelmente através de sua ação sobre os receptores CB2. Este derivado (**56c**) também apresentou destacado perfil redox verificado por voltametria cíclica, além de importante perfil antioxidante frente a radicais de nitrogênio, em 32% (DPPH), e oxigênio, em 86% (radicais hidroxila), que pode estar associado ao seu perfil anti-apoptótico.

Desta forma, pode-se caracterizar que a estratégia adotada para a otimização das propriedades antiinflamatórias e analgésicas do protótipo LASSBio-294 (**53**) logrou sucesso, resultando na obtenção de dois novos compostos-protótipos, *i.e.* LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**). Ademais, a metodologia sintética empregada na obtenção dos compostos das séries (**56**) e (**57**) descritos neste trabalho se mostrou adequada, permitindo sua síntese em bons rendimentos globais, *i.e.* 36 e 27%, respectivamente.

ABSTRACT

We describe herein the design, synthesis and pharmacological evaluation of new bioactive *N*-acylhydrazones (**56-57**), structurally designed as novel optimized analogs of lead LASSBio-294 (**53**), candidates to anti-inflammatory and analgesic lead-compounds.

The 6-nitro-1,3-benzodioxolyl-*N*-acylhydrazones (**56**) e 6-[(methylsulphonyl)amino]-1,3-benzodioxolyl-*N*-acylhydrazones (**57**) were synthesized from safrole (**60**), an abundant natural product from Brazilian flora. These derivatives were preliminarily submitted to *in vivo* classical inflammation assays, in which *N*'-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenylmethylidene)-6-nitro-1,3-benzodioxole-5-carbohydrazine (LASSBio-881) (**56c**) and 6-[(methylsulphonyl)amino]-*N*'-phenylmethylidene-1,3-benzodioxole-5-carbohydrazine (LASSBio-930) (**57c**) derivatives were elected as the most promising candidates, which are able to reduce the carragenaan-induced rat paw edema in 31.7 and 59.6% (300 μ mol/kg, p.o.), respectively.

LASSBio-881 (**56c**) was identified as analgesic in the neurogenic phase of formalin-induced hypernociception in mice, showing 44.5% of antinociceptive effect in a oral dose of 100 μ mol/kg, while the analog LASSBio-930 (**57c**) was analgesic in the inflammatory phase (48.7%) of the same protocol, indicating distinct mechanisms of action for both compounds. The *in vitro* assays over cyclooxygenase (COX) isoforms show that LASSBio-881 (**56c**) was not capable to inhibit this pathway, while LASSBio-930 (**57c**) inhibits the production of TXB₂ from COX-1 in human whole blood with IC₅₀ = 2.9 μ M, both with no action on phosphodiesterase-4 enzyme.

Compounds LASSBio-881 (**56c**) and anandamide (**71**) have similar *in vivo* profile when both are compared. This derivative (**56c**) was then submitted to specific cannabinoid CB1-binding in mice brain homogenates, displacing the radioligand in 71% at 100 μ M. Besides, LASSBio-881 (**56c**) was able to inhibit T-cell proliferation *in vitro*, without promoting apoptosis, in contrast to (**71**), probably through its action over CB2 receptors. This derivative (**56c**) also presented important redox profile, verified by cyclic voltammetry, as well as proeminent antioxidant profile over nitrogen radicals, in 32% (DPPH), and oxygen radicals, in 86% (hydroxyl), which can be associated to its anti-apoptotic profile.

Finally, the rational basis adopted for the optimization of anti-inflammatory and analgesic properties of the lead-compound LASSBio-294 (**53**) was successful, resulting in the identification of two novel lead-compounds, *i.e.* LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**). The synthesis of compounds (**56**) e (**57**) described in this work was accomplished in good overall yields, *i.e.* 36 and 27%, respectively.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ - deslocamento químico

ΔH_f - entalpia de formação

AA - ácido araquidônico

AChE - acetilcolinesterase

AEA - anandamida

BHT - *tert*-butilhidroxitolueno

BK - bradicinina

BZD - benzodiazepina

CB - canabinóide

CCF - cromatografia em camada fina

CCK - colecistocinina

CCR2B - receptores de quimiocina do tipo 2B

ClogP - log P calculado

COX -cicloxygenase

DA - dopamina

DE₅₀ - dose efetiva para alcançar 50% do efeito máximo

DMF - dimetilformamida

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazil

EIA - ensaio imunoenzimático

E_{pa_1} – potencial de pico anódico de primeira onda

E_{pc_1} – potencial de pico catódico de primeira onda

FDA - *Food and Drugs Administration*

GPCR - receptor acoplado à proteína G

GPIIbIIIa – glicoproteína IIbIIIa

HIV – vírus da síndrome da imunodeficiência humana

HTS - *screening* robotizado de alto débito

Hz - Hertz

IC₅₀ - concentração inibitória de 50% da atividade máxima

IV - infravermelho

J - constante de acoplamento

ligação-H - ligação de hidrogênio

LO - lipoxigenase

LPS - lipopolissacarídeo

MC4R - receptores de melanocortina do subtipo 4

NAH - *N*-acilidrazona

NCE - nova entidade química

NHR - receptor de hormônio nuclear

NK - neurocinina

p38 MAPK – proteína quinase p38 ativada por mitógeno

PAF - fator de ativação plaquetária

PDE - fosfodiesterase

ppm - partes por milhão

RMN - ressonância magnética nuclear

ROS - espécies reativas de oxigênio

SERT - recaptação de serotonina

SNC - sistema nervoso central

SOSA - otimização seletiva de atividades colaterais

TBAP - perclorato de tetrabutilamônio

TBARS - espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TPA - éster de forbol

Trp - triptofano

TXB₂ - tromboxana B₂

VC - voltametria cíclica

VR - receptor vanilóide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número absoluto de citações do termo “*privileged structures*” nas bases de dados bibliográficas.

Figura 2 – Conformações mais estáveis para os diastereoisômeros *E* e *Z* dos compostos LASSBio-882 (**56d**), LASSBio-930 (**57c**) e LASSBio-123 (**70b**).

Figura 3 – Conformações mais estáveis para hidrazidas (**67-69**).

Figura 4 – Conformações mais estáveis para os intermediários (**IIIa**) e (**IIIb**) relativos aos produtos LASSBio-123 (**70b**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-930 (**57c**).

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – *Estruturas privilegiadas* da classe dos bifenílicos.

Esquema 2 – Planejamento estrutural do Devazepide (9).

Esquema 3 – *Estruturas privilegiadas* da classe das benzodiazepinas.

Esquema 4 – *Estruturas privilegiadas* da classe das diidropiridinas.

Esquema 5 – *Estruturas privilegiadas* da classe das espiropiperidinas.

Esquema 6 – *Estruturas privilegiadas* da classe das aminopiridazinas.

Esquema 7 – *Estruturas privilegiadas* da classe dos diaril-heterocíclicos.

Esquema 8 – Planejamento racional das *N*-acilidrazonas da série (44).

Esquema 9 – Relação estrutura-atividade das *N*-acilidrazonas analgésicas e antiagregantes plaquetárias.

Esquema 10 – Estruturas privilegiadas da classe das *N*-acilidrazonas.

Esquema 11 – Ferramentas da Química Medicinal no planejamento racional de novos protótipos.

Esquema 12 – Planejamento racional das novas séries (56-57).

Esquema 13 – Rota sintética para a obtenção dos derivados (56-57) e (70).

Esquema 14 – Compostos submetidos à análise conformacional.

Esquema 15 – Mecanismo proposto para a formação das NAH (56-57) e (70).

Esquema 16 – Anandamida.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Novos medicamentos aprovados para comercialização pela agência norte-americana FDA em 2005.

Tabela 1 – Porcentagem de *estruturas privilegiadas* presentes em ligantes de GPCRs, canais iônicos, NHR, proteínas quinases e serino-proteases.

Tabela 2 – Novos derivados NAH (**56a-g**), (**57a-d**) e (**70**).

Tabela 3 – Entalpias de formação obtidas para os respectivos confôrmeros mais estáveis dos diastereoisômeros *E* e *Z* dos derivados NAH (**56d**), (**57c**) e (**70b**).

Tabela 4 - Edema de pata de rato induzido por carragenina dos derivados NAH (**56**), (**57**) e (**70**).

Tabela 5 – Perfil antiinflamatório dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**) no ensaio de edema de orelha induzido por TPA e AA.

Tabela 6 – Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina em camundongos para os compostos (**56c**), (**70a**) e (**57c**).

Tabela 7 – Concentrações inibitórias de 50% da atividade máxima (IC₅₀) para os compostos nimesulido (**58**), celecoxib (**34**), LASSBio-294 (**53**) e LASSBio-930 (**57c**) no ensaio de dosagem de TXB₂ em sangue total humano não estimulado (COX-1)

Tabela 8 – Efeito dos compostos nimesulido (**58**), celecoxib (**34**), LASSBio-294 (**53**), LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) na agregação plaquetária induzida por AA em plasma rico em plaquetas de coelho.

Tabela 9 – Perfil necrótico e apoptótico de linfócitos T modulados pela ação dos compostos AEA (**71**) e LASSBio-881 (**56c**).

Tabela 10 – Dados eletroquímicos dos derivados LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**).

Tabela 11 – Ensaio do DPPH para os derivados LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**).

Tabela 12 – Atividade antioxidante dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**) frente aos radicais hidroxila e superóxido.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação da atividade antiedematogênia dos compostos (56a-g) e (70a) no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina.

Gráfico 2 - Avaliação da atividade antiedematogênia dos compostos (57a-d) no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina.

Gráfico 3 – Avaliação da atividade antiedematogênia dos compostos LASSBio-881 (56c) e LASSBio-945 (70a) no modelo de edema de orelha induzido por éster de forbol (TPA) em camundongos.

Gráfico 4 – Avaliação da atividade antiedematogênia dos compostos LASSBio-881 (56c), LASSBio-930 (57c) e LASSBio-945 (70a) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) em camundongos.

Gráfico 5 – Avaliação da atividade analgésica dos compostos LASSBio-881 (56c) e LASSBio-945 (70a) no modelo de dor induzida por formalina em camundongos.

Gráfico 6 – Avaliação da atividade analgésica do composto LASSBio-930 (57c) no modelo de dor induzida por formalina em camundongos.

Gráfico 7 – Avaliação da atividade analgésica central dos compostos LASSBio-881 (56c) e LASSBio-945 (70a) no ensaio da placa quente em camundongos.

Gráfico 8 – Avaliação da atividade analgésica central do composto LASSBio-930 (57c) no ensaio da placa quente em camundongos.

Gráfico 9 – Avaliação do perfil inibitório da produção de TXB₂ em sangue humano total não-estimulado para nimesulido (58), celecoxib (34), LASSBio-294 (53), LASSBio-881 (56c) e LASSBio-930 (57c).

Gráfico 10 – Avaliação do perfil de ligação específica dos compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) no ensaio de ligação específica ao receptor CB1 em homogenato de cérebro de camundongos.

Gráfico 11 – Avaliação do perfil inibitório sobre a proliferação de linfócitos pelos compostos AEA (**71**) e LASSBio-881 (**56c**).

LISTA DE ESPECTROS

- Espectro 1** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (62)
- Espectro 2** – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (62)
- Espectro 3** – Experimento de DEPT-135 para o derivado (62)
- Espectro 4** – Infravermelho do derivado (62)
- Espectro 5** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (63)
- Espectro 6** – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (63)
- Espectro 7** – Experimento de DEPT-135 para o derivado (63)
- Espectro 8** – Infravermelho do derivado (63)
- Espectro 9** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (64)
- Espectro 10** – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (64)
- Espectro 11** – Experimento de DEPT-135 para o derivado (64)
- Espectro 12** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (65)
- Espectro 13** – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (65)
- Espectro 14** – Experimento de DEPT-135 para o derivado (65)
- Espectro 15** – Infravermelho do derivado (65)
- Espectro 16** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (67)
- Espectro 17** – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (67)
- Espectro 18** – Experimento de DEPT-135 para o derivado (67)
- Espectro 19** – Infravermelho do derivado (67)
- Espectro 20** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (68)
- Espectro 21** – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (68)
- Espectro 22** – Experimento de DEPT-135 para o derivado (68)
- Espectro 23** – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56a)

Espectro 24 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56a)

Espectro 25 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56a)

Espectro 26 – Infravermelho do derivado (56a)

Espectro 27 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56b)

Espectro 28 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56b)

Espectro 29 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56b)

Espectro 30 – Infravermelho do derivado (56b)

Espectro 31 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56c)

Espectro 32 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56c)

Espectro 33 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56c)

Espectro 34 – Infravermelho do derivado (56c)

Espectro 35 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56d)

Espectro 36 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56d)

Espectro 37 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56d)

Espectro 38 – Infravermelho do derivado (56d)

Espectro 39 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56e)

Espectro 40 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56e)

Espectro 41 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56e)

Espectro 42 – Infravermelho do derivado (56e)

Espectro 43 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56f)

Espectro 44 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56f)

Espectro 45 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56f)

Espectro 46 – Infravermelho do derivado (56f)

Espectro 47 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56g)

Espectro 48 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56g)

Espectro 49 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(56g)**

Espectro 50 – Infravermelho do derivado **(56g)**

Espectro 51 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(57a)**

Espectro 52 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado **(57a)**

Espectro 53 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(57b)**

Espectro 54 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado **(57b)**

Espectro 55 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(57b)**

Espectro 56 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(57c)**

Espectro 57 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado **(57c)**

Espectro 58 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(57c)**

Espectro 59 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(57d)**

Espectro 60 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado **(57d)**

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE ESQUEMAS	xviii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xix
LISTA DE GRAFICOS	xxi
LISTA DE ESPECTROS	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS	2
1.2. USO DO CONCEITO DE <i>ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS</i> NO DESENHO RACIONAL DE NOVAS QUIMIOTECAS	2
1.3. IDENTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS	10
1.3.1. BENZODIAZEPINAS	10
1.3.2. DIIDROPIRIDINAS	13
1.3.3. ESPIROPIPERIDINAS	14
1.3.4. AMINOPIRIDAZINAS	15
1.3.5. DIARIL-HETEROCÍCLICOS	16
1.4. IDENTIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE <i>N</i> -ACILIDRAZONA (NAH) COMO <i>ESTRUTURA PRIVILEGIADA</i>	18
2. OBJETIVOS	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES (56-57)	27

3.2. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES (56-57) E (70)	39
3.2.1. AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIINFLAMATÓRIO E ANALGÉSICO DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES (56-57) E (70)	39
3.2.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL INIBITÓRIO DOS COMPOSTOS LASSBio-881 (56c) e LASSBio-930 (57c) SOBRE A ISOFORMA COX-1	49
3.2.3. AVALIAÇÃO DO DERIVADO LASSBio-881 (56c) FRENTE AOS RECEPTORES CANABINÓIDES	54
3.2.4. AVALIAÇÃO DOS PERFIS ELETROQUÍMICO E ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO LASSBio-881 (56c)	59
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
5. PARTE EXPERIMENTAL	67
5.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES (56-57)	67
5.1.1. OBTENÇÃO DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBALDEÍDO (62)	68
5.1.2. OBTENÇÃO DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOXILATO DE METILA (63)	69
5.1.3. OBTENÇÃO DE 6-AMINO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOXILATO DE METILA (64)	70
5.1.4. OBTENÇÃO DE 6-[(METILSULFONIL)AMINO]-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOXILATO DE METILA (65)	71
5.1.5. OBTENÇÃO DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA (67)	72
5.1.6. OBTENÇÃO DE 6-[(METILSULFONIL)AMINO]-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA (68)	73

5.1.7. OBTENÇÃO DAS <i>N'</i> -ARILMETILIDENO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDAS 6-SUBSTITUÍDAS (56-57)	74
5.2. MODELAGEM MOLECULAR	82
5.3. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS (56-57)	82
5.3.1. ENSAIO DE EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO POR CARRAGENINA (FERREIRA,1979)	82
5.3.2. ENSAIO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA) E ÉSTER DE FORBOL (TPA) EM CAMUNDONGOS (SÁNCHEZ E MORENO, 1999)	83
5.3.3. ENSAIO DE HIPERALGESIA INDUZIDA POR FORMALINA EM CAMUNDONGOS (HUNSKAAR <i>ET AL.</i> , 1987)	84
5.3.4. ENSAIO DA PLACA QUENTE EM CAMUNDONGOS (KURAISHI <i>ET.AL.</i> , 1983)	85
5.3.5. ENSAIO DE ATIVIDADE COX-1 EM SANGUE HUMANO TOTAL (PATRIGNANI <i>et al.</i> , 1994; BRIDEAU <i>et al.</i> , 1996; DE LEVAL <i>et al.</i> , 2001)	85
5.3.6. ENSAIO DE AGRAGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (BORN & CROSS, 1968)	87
5.3.7. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE-4 (LUGNIER <i>et al.</i> , 1986)	88
5.3.8. ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA DE [³ H]SR141716 EM RECEPTORES CANABINÓIDES CB1 DE MEMBRANA DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO (ABOOD <i>et al.</i> , 1997)	89
5.3.9. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (JULIUS <i>et al.</i> , 1973; HIRATA <i>et al.</i> , 2003)	90

5.3.10. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR EM CÉLULAS ESPLÊNICAS TOTAIS (SCHMID <i>et al.</i> , 1994)	91
5.4. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES	92
5.4.1. ESTUDOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA (CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2004)	92
5.4.2. ENSAIO DE SEQÜESTRAMENTO DE RADICAIS FRENTE AO DPPH (TAIT <i>et al.</i> , 1996)	93
5.4.3. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE DESOXIRRIBOSE FRENTE A RADICAIS HIDROXILA GERADOS NA REAÇÃO DE FENTON (MEINICKE <i>et al.</i> , 1998)	93
5.4.4. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO GERADOS NO SISTEMA XANTINA/XANTINA OXIDASE (FLOHÉ e ÖTTING, 1984)	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	95

1. INTRODUÇÃO:

A Química Medicinal é a disciplina que trata dos aspectos relacionados ao planejamento, invenção, descoberta, identificação e obtenção de compostos de interesse terapêutico, *i.e.* fármacos, bem como as razões moleculares de seu modo de ação, incluindo a compreensão da relação entre a estrutura química e a atividade terapêutica, absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (WERMUTH *et al.*, 1998).

O reconhecimento molecular do fármaco na biofase é realizado através de suas interações intermoleculares, *i.e.* forças eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes, com o respectivo biorreceptor (BARREIRO e FRAGA, 2001). O arranjo espacial das suas subunidades estruturais, responsáveis pelas interações com as biomacromoléculas, incluindo os requisitos farmacofóricos, define, qualitativamente, o grau de afinidade e a especificidade da ligação do complexo micromolécula-biorreceptor (BARREIRO e FRAGA, 2001). Essas subunidades são conectadas entre si através de um arcabouço molecular capaz de assegurar uma orientação espacial que favorece a interação desses grupos com os sítios receptores.

Na literatura recente, constata-se um grande interesse na identificação de tais arcabouços moleculares, denominados “*estruturas privilegiadas*”.

1.1. ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS:

O termo “*estrutura privilegiada*” foi primeiramente utilizado por EVANS e colaboradores (1988), e recentemente revisado por PATCHETT e NARGUND (2000), sendo definido como estrutura ou subunidade mínima comum capaz de fornecer pontos ligantes para mais de um tipo de biorreceptor podendo-se modular a seletividade desta interação através de modificações em outras subunidades estruturais. Os autores ainda acrescentaram que tais estruturas possuem propriedades que facilitam a sua ligação às biomacromoléculas, possivelmente por interações distintas dos respectivos ligantes endógenos. A introdução deste conceito teve grande impacto no desenvolvimento da Química Medicinal moderna, como se observa pelo crescimento significativo do número de citações anuais da expressão “*privileged structures*” em diferentes bases de dados bibliográficos¹ (Figura 1).

1.2. USO DO CONCEITO DE *ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS* NO DESENHO RACIONAL DE NOVAS QUIMIOTECAS:

A partir da década de 90, com o advento das técnicas de química combinatória e *screening* robotizado de alto débito (*high throughput synthesis* e *high throughput screening* - HTS) o desenho de novas quimiotecas tornou-se um grande desafio para os Químicos Medicinais, promovendo expressiva

¹ As bases de dados bibliográficos consultadas foram: Web of Science® (<http://isiknowledge.com>), American Chemical Society (ACS; <http://pubs.acs.org>), Science Direct® (<http://www.sciencedirect.com>) e SciFinder Scholar® (CAS Chemical Abstracts Service), acessados a partir do sítio <http://www.periodicos.capes.gov.br> em 05/03/06.

mudança nos paradigmas da Química Medicinal moderna, sobretudo ao nível da pesquisa realizada nos laboratórios industriais.

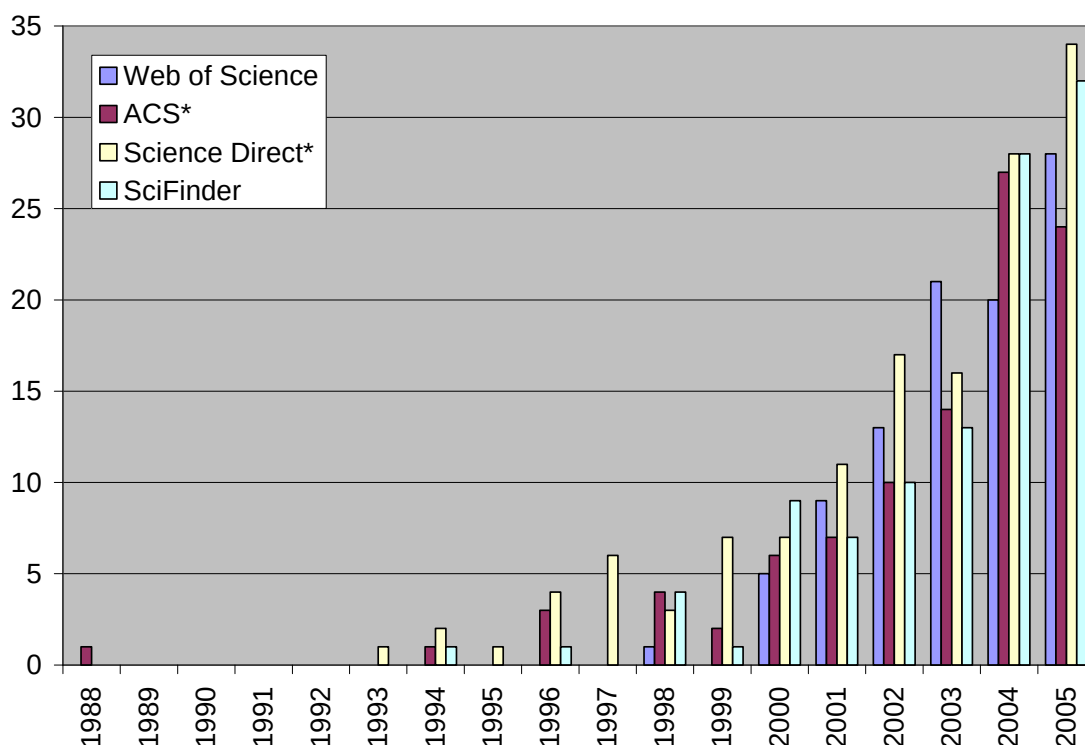


Figura 1 – Número absoluto de citações do termo “*privileged structures*” nas bases de dados bibliográficas. A busca foi realizada utilizando-se o termo indicado, a cada ano, no período de 1988 a 2005. As bases de dados indicadas com asterisco (*) oferecem a opção de busca em texto completo (*full text*), ativada em função de sua disponibilidade.

Vale destacar que, apesar do elevado investimento do setor industrial farmacêutico nessas novas tecnologias de pesquisa, desenvolvimento e inovação, a descoberta de novas entidades químicas (NCEs) que representem efetivamente, uma oportunidade de atingirem o mercado como autênticas inovações terapêuticas, não têm correspondido às expectativas do setor (SERVICE, 2004). De fato, no ano de 2005, dentre os 14 novos medicamentos que ingressaram no mercado, aprovados pela agência reguladora norte-americana FDA (*Food and Drugs Administration*) (Quadro 1), excetuando-se

produtos com fins de diagnóstico, apenas ca. 50% deles possuíram o status de autênticas NCEs².

Neste contexto, o setor industrial farmacêutico envolvido na pesquisa de novos medicamentos redirecionou o desenho estrutural de coleções de moléculas sintéticas a serem bioensaiadas por HTS, com o objetivo de aumentar a probabilidade de obtenção de novos *hits* candidatos a protótipos de fármacos, que apresentassem tanto requisitos farmacofóricos quanto de solubilidade adequados. O desenvolvimento de estratégias com esta finalidade tem sido amplamente relatado na literatura, e tem gerado trabalhos de grande impacto científico e tecnológico. Como exemplo, os resultados de LIPINSKI e colaboradores (1997) com a “regra dos cinco”, baseada nas propriedades de fármacos e protótipos da literatura. Os autores postularam que um composto-protótipo promissor como candidato a fármaco deve possuir, no máximo, 5 pontos doadores e 10 aceptores de ligação de hidrogênio (ligação-H) com peso molecular inferior a 500 u.m.a. e log P calculado (ClogP) inferior a 5. Estas regras criam um critério estrutural empírico para a identificação de compostos candidatos a novos fármacos bem como para a construção de quimiotecas (LIPINSKI *et al.*, 1997).

O conceito de *estruturas privilegiadas* também é considerado importante estratégia para o planejamento racional de quimiotecas (THOMPSON e ELLMAN, 1996; ELLMAN, 1996; LEBL, 1999). O seu emprego associado ao uso de métodos computacionais e modelos farmacofóricos de quatro pontos (LABAUDINIÈRE, 1998; MASON *et al.*, 1999) ou de fragmentação de moléculas bioativas ou fármacos, tem sido realizado com

² <http://www.centerwatch.com/patient/drugs/drugls05.html>, acessado em 20/03/2006

Quadro 1 – Novos medicamentos aprovados para comercialização pela agência norte-americana FDA em 2005^a

Fármaco	Nome fantasia	Mês/Ano aprovação	Indicação	Classe	Indústria	Referência
Pramlintide	Symlin [®]	Março 2005	Diabetes tipo 1 e 2	Mimético do hormônio amilina	Amylin Pharmaceuticals	RYAN, JOBE e MARTIN, 2005
Entecavir*	Baraclude [®]	Março 2005	Hepatite B	Análogo de nucleosídeo	Bristol-Myers Squibb	CHANG <i>et al.</i> , 2006
Ibandronate	Boniva [®] (nova formulação)	Março 2005	Osteoporose	Bisfosfonato inibidor de reabsorção óssea	Roche / GlaxoSmithKline	EMKEY e ETTINGER, 2006
Exenatide	Byetta [®]	Abril 2005	Diabetes tipo 2	Análogo funcional do GLP-1 (glucagon-like peptide 1)	Amylin/Eli Lilly	DAVIDSON, BATE e KIRKPATRICK, 2005
Galsulfase	Naglazyme [®]	Mai 2005	Mucopolissacaridose VI	Forma variante da enzima N-acetilgalactosamina 4-sulfatase	BioMarin Pharmaceuticals	HOPWOOD, BATE e KIRKPATRICK, 2006
Isosorbida dinitrato/hidralazina cloridrato	BiDil [®]	Junho 2005	Falência cardíaca	Associação de um doador de NO e um vasodilatador	NitroMed	BRANCA, 2005
Tipranavir*	Aptivus [®]	Junho 2005	HIV	Inibidor de protease não-peptídico	Boehringer Ingelheim	FLEXNER, BATE, KIRKPATRICK, 2005
Ramelteon*	Rozerem [®]	Julho 2005	Insônia	Agonista de receptor de melatonina	Takeda	BUYSSE, BATE e KIRKPATRICK, 2005
Mecasermin	Increlex [®]	Agosto 2005	Distúrbios de crescimento	IGF-1 humano recombinante	Tercica	NORMAN, 2006
Nelarabine*	Arranon [®]	Outubro 2005	Leucemia linfoblástica	Pró-fármaco de análogo de desoxiguanosina	GlaxoSmithKline	GANDHI <i>et al.</i> , 2006
Lenalidomide*	Revlimid [®]	Dezembro 2005	Síndromes mielodisplásicas	Análogo da talidomida	Celgene	HIDESHIMA, RICHARDSON e ANDERSON, 2006
Conivaptan*	Vaprisol [®]	Dezembro 2005	Hiponatremia	Antagonista não-peptídico de receptor de vasopressina	Astellas	TANG, BHAVNAN e FRANCIS, 2005
Sorafenib*	Nexavar [®]	Dezembro 2005	Carcinoma de células renais	Inibidor de quinases	Bayer/Onyx	MARX, 2005
Abatacept	Orencia [®]	Dezembro 2005	Artrite reumatóide	Proteína de fusão com ação inibitória de linfócitos T	Bristol-Myers Squibb	MORELAND, BATE e KIRKPATRICK, 2006
Ranolazine*	Ranexa [®]	Janeiro 2006	Angina crônica	Anti-angina	CV Therapeutics	GAFFNEY, 2006
Lubiprostone*	Amitiza [®]	Janeiro 2006	Constipação idiopática	Ativador de canal CIC-2	Sucampo/Takeda	WINPENNY, 2005
Sunitinib*	Sutent [®]	Janeiro 2006	Câncer renal e tumores gastrointestinais	Inibidor múltiplo de tirosina-quinases	Pfizer	MCINTYRE e CASTANER, 2005
Vacina de rotavírus oral pentavalente	Rotateq [®]	Fevereiro 2006	Prevenção de gastroenterite infantil	Vacina de vírus inativado	Merck	CUNLIFFE e NAKAGOMI, 2005

^aFonte: <http://www.centerwatch.com/patient/drugs/drugls05.html>, acessado em 20/03/2006;

*novas entidades químicas (NCEs)

objetivo de se identificarem padrões estruturais relevantes que devem constar de quimiotecas (BEMIS e MURCKO, 1996; BEMIS e MURCKO, 1999; LEWELL *et al.*, 1998; SHERIDAN e MILLER, 1998; AJAY, BEMIS e MURCKO, 1999; SCHNUR *et al.*, 2004).

Outros autores, *e.g.* SCHNUR, HERMSMEIER e TEBBEN (2006), inventores do programa *ClassPharmer* de identificação de subestruturas freqüentes (“*privilegiadas*”) em coleções de moléculas bioativas, questionaram, recentemente, a eficácia daquela abordagem para eleição de *estruturas privilegiadas*, quando se deseja seletividade frente a distintas famílias de alvos moleculares. Estes autores afirmam que a freqüência da ocorrência de determinadas estruturas não deve ser critério único para assegurar a condição de *privilegiadas*, e exploram naquele trabalho a questão da seletividade identificada em fragmentos moleculares gerados pelo programa em relação a uma série de famílias-alvo: receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores de hormônios nucleares (NHR), serino-proteases, proteínas quinases e canais iônicos, recuperando a definição original de EVANS (1988) e PATCHETT (2000). Ademais, foi constatado neste trabalho que existem elevadas porcentagens de ocorrência de estruturas consideradas *privilegiadas* para ligantes de canais iônicos entre os inibidores de serino-proteases (92%) (Tabela 1), assim como *estruturas privilegiadas* para inibidores de serino-proteases ocorrem em inibidores de proteínas quinases em alta porcentagem (91%). Por outro lado, observaram que o inverso não ocorria, ou seja, apenas 11% das *estruturas privilegiadas* identificadas em inibidores de serino-proteases estavam presentes em ligantes de canais iônicos e 20% das *estruturas privilegiadas* para inibidores de proteínas quinases estavam

presentes em inibidores de serino-proteases (Tabela 1). (SCHNUR, HERMSMEIER e TEBBEN, 2006).

Tabela 1 – Porcentagem de *estruturas privilegiadas* presentes em ligantes de GPCRs, canais iônicos, NHR, proteínas quinases e serino-proteases*

Subestruturas	Ligantes				
	GPCRs ^a	Canais iônicos	NHR ^b	Proteínas quinases	Serino-proteases
GPCRs	-	26	10	11	17
Canais iônicos	47	-	15	19	92
NHR	40	30	-	17	15
Proteínas quinases	48	34	16	-	20
Serino-proteases	25	11	7	91	-

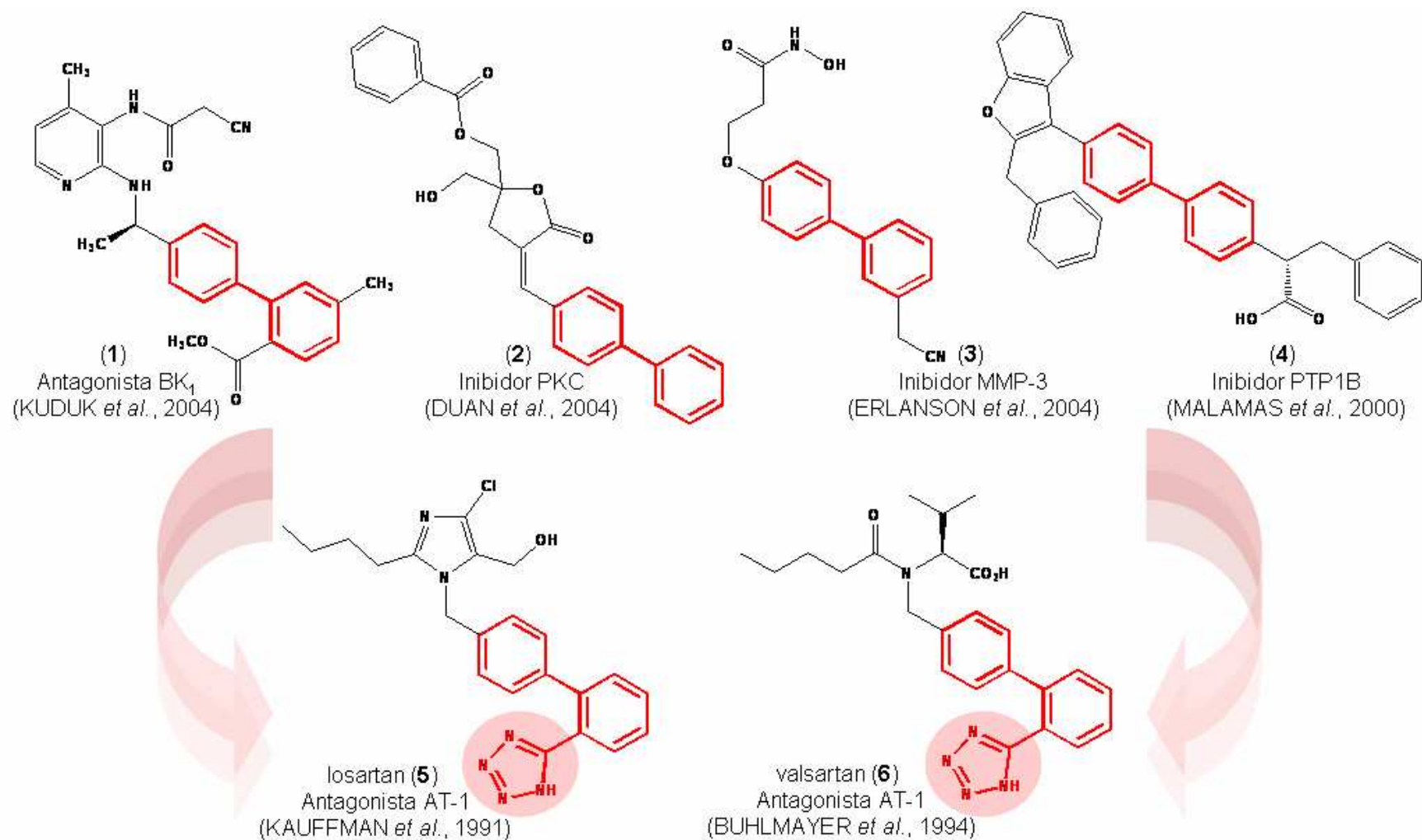
*adaptado de SCHNUR, HERMSMEIER e TEBBEN, 2006

^areceptores acoplados à proteína-G

^breceptores de hormônios nucleares

Além disso, verificou-se que os ligantes de GPCRs possuem a maior variedade de *estruturas privilegiadas* em relação às outras famílias de receptores, indicando que estes ligantes possam ser promíscuos, com reduzida seletividade (Tabela 1). Utilizando como exemplo a subestrutura bifenila, classificada como *estrutura privilegiada* para GPCRs (BEMIS e MURCKO, 1996; MASON *et al.*, 1999), SCHNUR, HERMSMEIER e TEBBEN (2006) constataram que a mesma aparece em 5658 compostos que atuam em 311 classes distintas de alvos farmacológicos, dentre os quais antagonistas de receptores de bradicinina BK₁ (**1**) (KUDUK *et al.*, 2004), inibidores da proteína quinase C (PKC) (**2**) (DUAN *et al.*, 2004), inibidores da metaloprotease de matriz tipo 3 (MMP-3) (**3**) (ERLANSON *et al.*, 2004), inibidores da tirosina fosfatase protéica 1B (PTP-1B) (**4**) (MALAMAS *et al.*, 2000) (Esquema 1). A subunidade *privilegiada* 2'-tetrazolobifenila foi identificada em 1046 compostos estritamente relacionados aos receptores de angiotensina II, como ilustrado pelo losartan (**5**) (KAUFFMAN *et al.*, 1991) e valsartan (**6**) (BUHLMAYER *et al.*,

1994) (Esquema 1). Pode-se observar que a subunidade bifenila ganha seletividade com a introdução do grupo tetrazola (SCHNUR, HERMSMEIER e TEBBEN, 2006), evidenciando a definição original de *estrutura privilegiada* de EVANS (1988) e PATCHETT (2000) e exemplificando que modificações estruturais adequadas conduzem a compostos altamente seletivos.

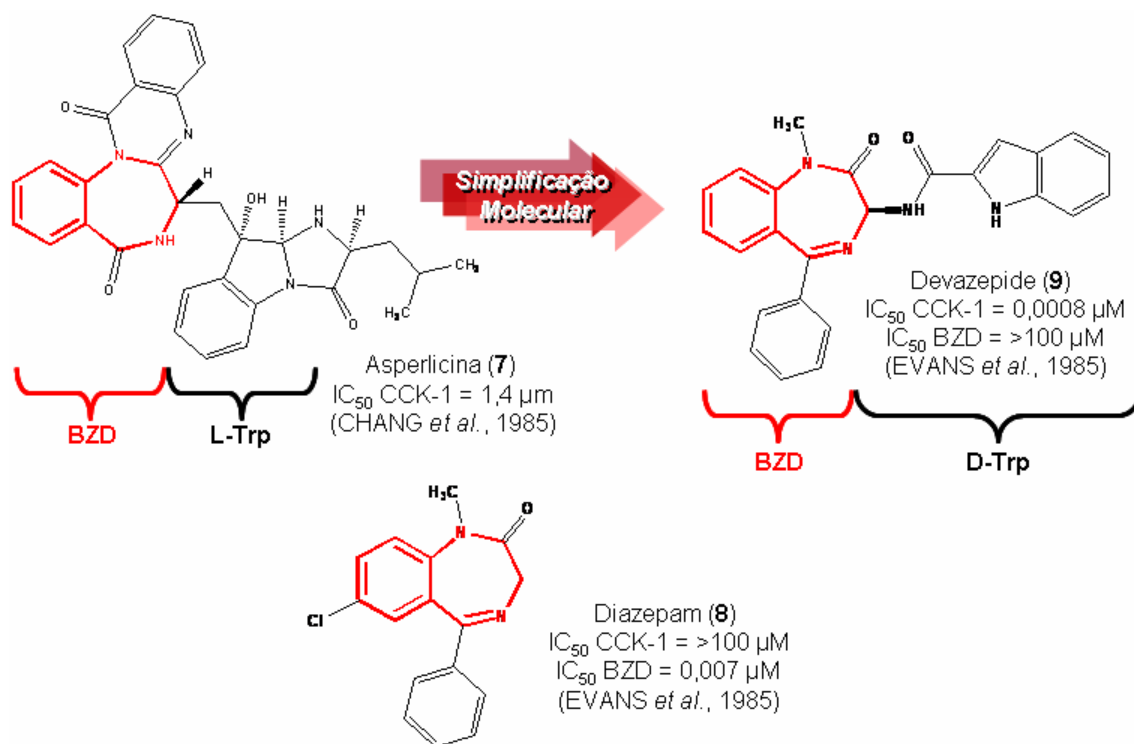


Esquema 1 – Estruturas privilegiadas da classe dos bifenílicos

1.3. IDENTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS:

1.3.1. BENZODIAZEPINAS:

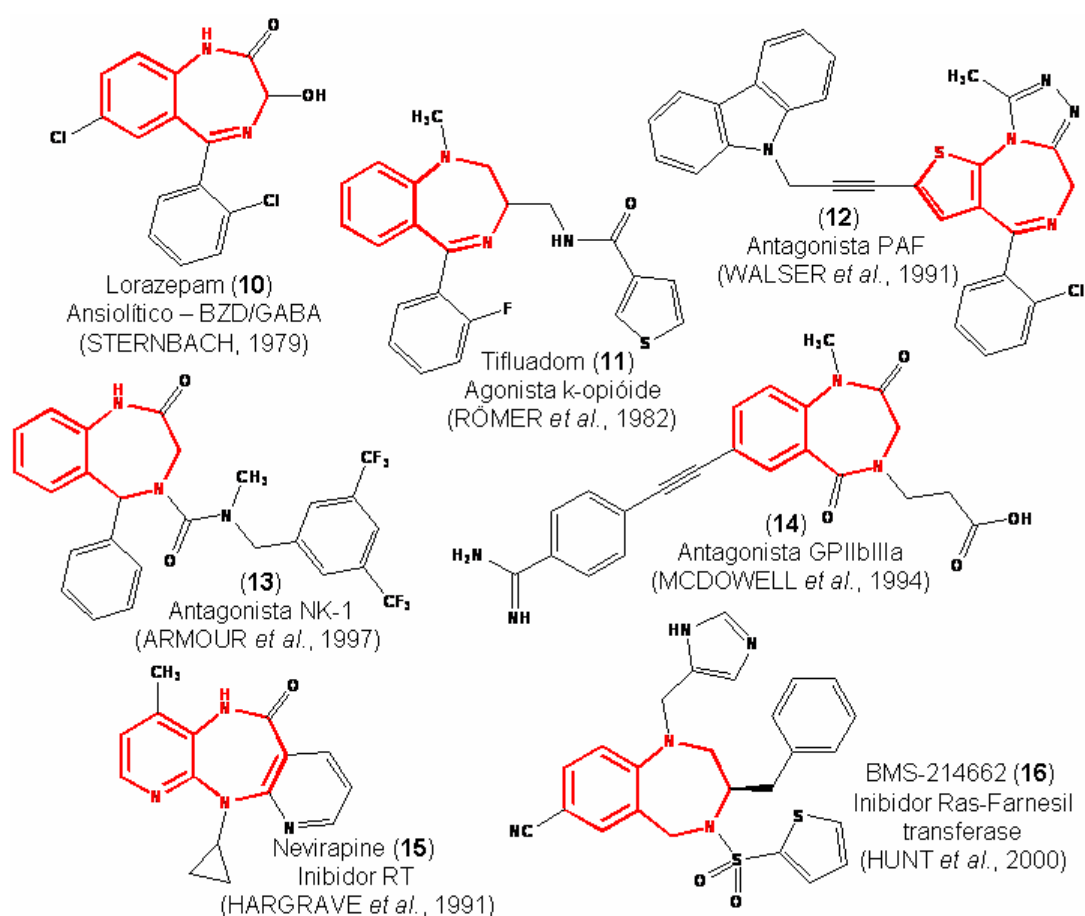
Os trabalhos pioneiros de EVANS e colaboradores sobre o desenvolvimento de novos antagonistas não-peptídicos de receptores de colecistocinina (CCK) objetivaram a obtenção de novos análogos do produto natural asperlicina (**7**) (CHANG *et al.*, 1985), antagonista de receptores CCK, a partir da modificação estrutural de fármacos benzodiazepínicos ansiolíticos, *e.g.* diazepam (**8**) (BOCK *et al.*, 1986; BOCK *et al.*, 1988; EVANS *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1988). Estes trabalhos culminaram no desenvolvimento do devazepide (L-364,718 ou MK-329) (**9**), primeiro antagonista não-peptídico altamente seletivo para receptores CCK-1, amplamente utilizado como marcador farmacológico para esse alvo terapêutico. O planejamento estrutural de (**9**) envolveu a simplificação molecular do protótipo natural (**7**), identificando-se as subunidades benzodiazepina (BZD) e triptofano (Trp) como essenciais para o reconhecimento molecular pelos receptores CCK (Esquema 2).



Esquema 2 – Planejamento estrutural do Devazepide (9)

Os benzodiazepínicos constituem uma ampla classe de compostos ativos no sistema nervoso central (SNC), atuando como ligantes de canais iônicos e GPCRs. Como exemplos de fármacos ansiolíticos desta classe, temos o diazepam (**8**) e lorazepam (**10**), ligantes de receptores gabaérgicos (STERNBACH, 1979) (Esquemas 2 e 3). Além dos extensivos trabalhos sobre a atividade de benzodiazepínicos nos receptores CCK realizados por diversos grupos (EVANS *et al.*, 1988; BOCK *et al.*, 1990; BOCK *et al.*, 1993; LOWE *et al.*, 1994; VAN NIEL *et al.*, 1995; CUROTTO *et al.*, 1995; HENKE *et al.*, 1996; HIRST *et al.*, 1996; HENKE *et al.*, 1997; SINHA *et al.*, 1999; AGRAWAL *et al.*, 2002; GIRAGOSSIAN *et al.*, 2003), existem relatos descrevendo o papel dessa classe de compostos como ligantes de outros GPCRs, tais como agonistas κ -opiídeos, o tifluadom (**11**) (RÖMER *et al.*, 1982); antagonistas do fator de ativação plaquetária (PAF), o derivado policíclico (**12**) (WALSER *et al.*, 1991);

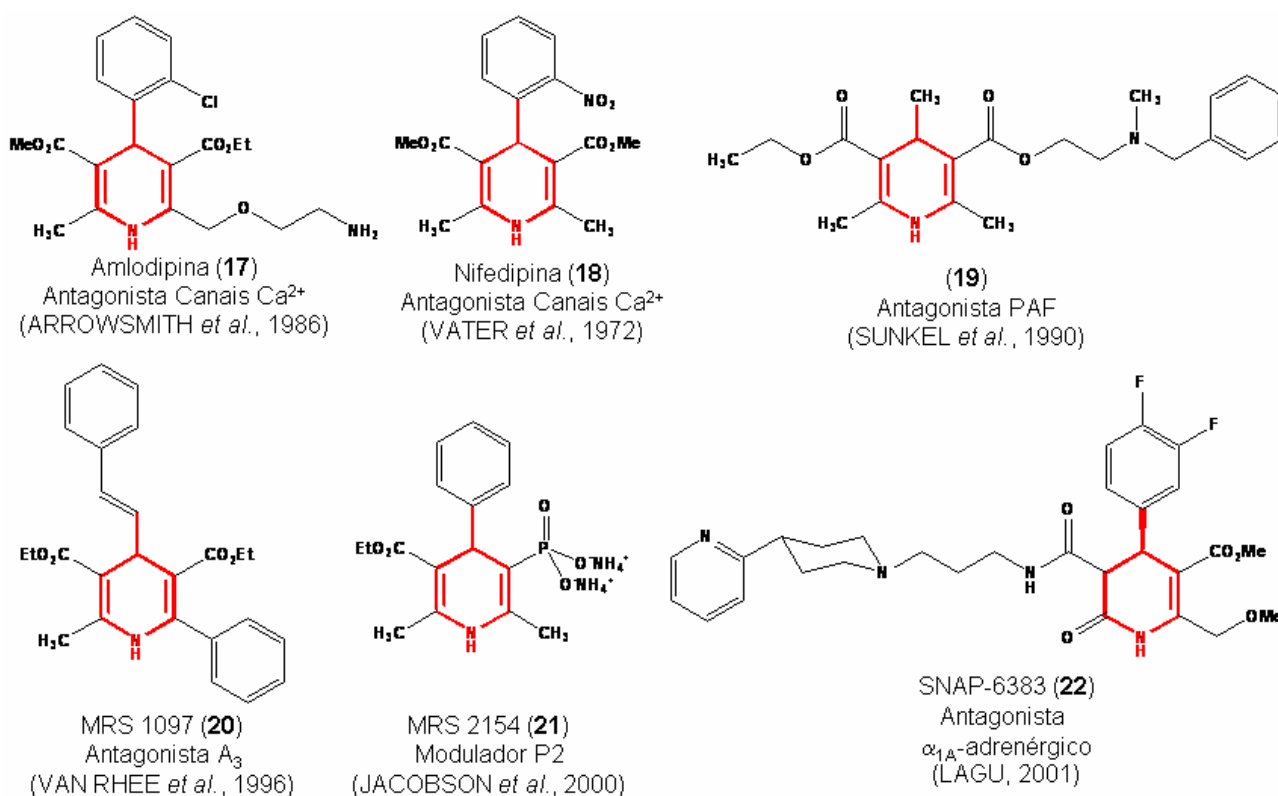
antagonistas de receptores de neurocinina NK-1, *e.g.* (13) (ARMOUR *et al.*, 1997) e antagonistas de receptores GPIIb/IIIa, *e.g.* (14) (MCDOWELL *et al.*, 1994) (Esquema 3). Como inibidores enzimáticos, temos os inibidores da transcriptase reversa do HIV, ilustrado pela nevirapina (15) HARGRAVE *et al.*, 1991) e inibidores de RAS-farnesiltransferase, exemplificado pelo derivado BMS-214662 (16) (HUNT *et al.*, 2000) (Esquema 3).



Esquema 3 – Estruturas privilegiadas da classe das benzodiazepinas

1.3.2. DIIDROPIRIDINAS:

Outro exemplo clássico de *estruturas privilegiadas* são as diidropiridinas, classicamente descritas como antagonistas de canais de cálcio, ilustrado pela amlodipina (**17**) (ARROWSMITH *et al.*, 1986) e nifedipina (**18**) (VATER *et al.*, 1972), fármacos amplamente empregados no tratamento da hipertensão arterial. Modificações estruturais adequadas nos substituintes do anel diidropiridínico forneceram antagonistas de receptores do PAF, tal como (**19**) (SUNKEL *et al.*, 1990); antagonistas de receptores de adenosina do tipo A₃, exemplificado pelo derivado MRS 1097 (**20**) (VAN RHEE *et al.*, 1996); moduladores do receptor purinérgico P2, tal como o MRS 2154 (**21**) (JACOBSON, KIM e KING, 2000) e antagonistas α_{1A} -adrenérgicos, ilustrado pelo derivado SNAP-6383 (**22**) (LAGU, 2001), entre outros (Esquema 4).



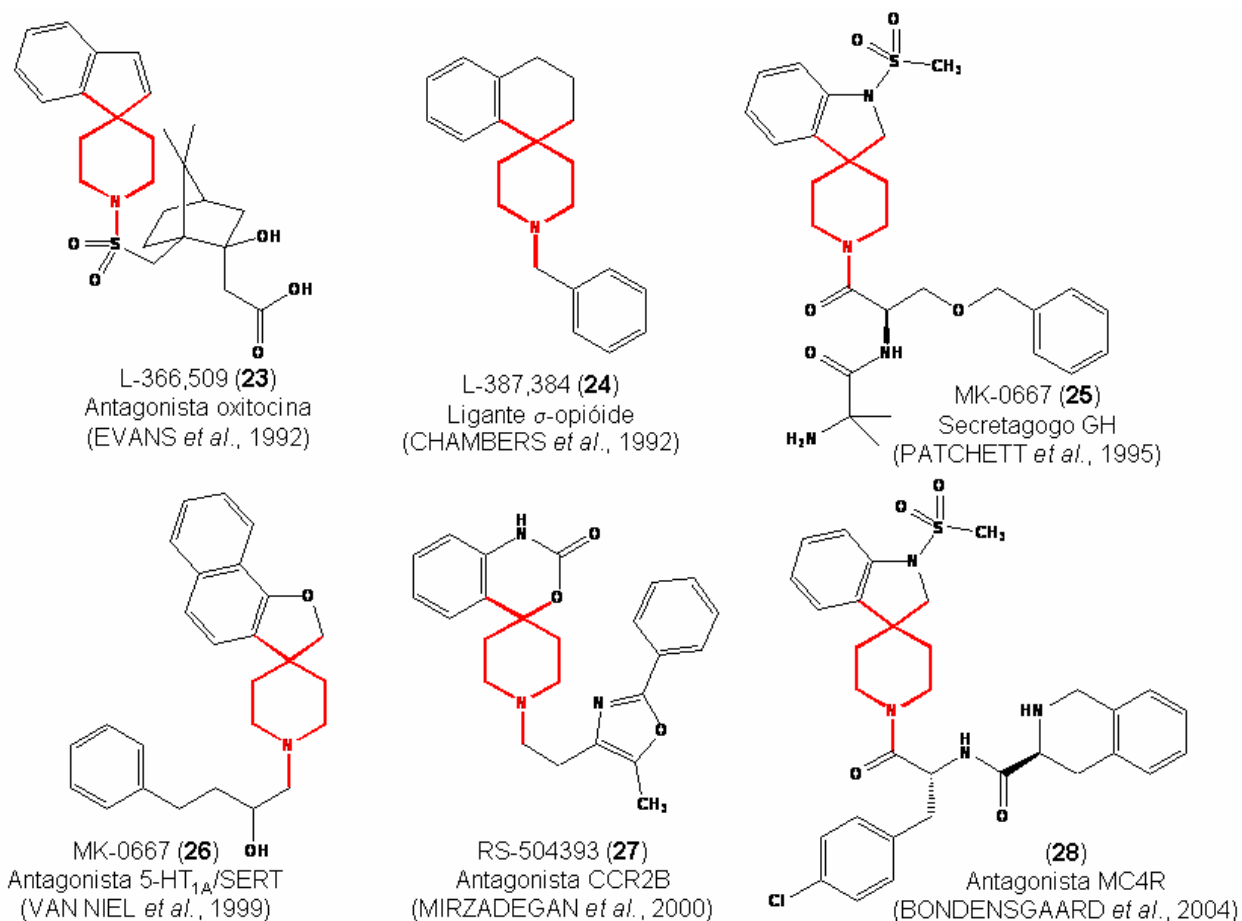
Esquema 4 – Estruturas privilegiadas da classe das diidropiridinas

1.3.3. ESPIROPIPERIDINAS:

Outra classe de *estruturas privilegiadas* importante constitui-se nas espiropiperidinas, que foram inicialmente descritas como antagonistas de receptores de oxitocina, tal como exemplificado pelo derivado L-366,509 (**23**) (EVANS *et al.*, 1992) e ligantes σ -opióides, tal como L-687,384 (**24**) (CHAMBERS *et al.*, 1992) (Esquema 5).

Os trabalhos de PATCHETT e colaboradores (1995) evidenciaram a descoberta do protótipo MK-0667 (**25**) como secretagogo de hormônio do crescimento (GH), ativo *in vivo* por via oral, a despeito de possuir em sua estrutura a subunidade peptídica (Esquema 5). De fato, foi a partir dos trabalhos de PATCHETT que as espiropiperidinas foram classificadas como *estruturas privilegiadas*, por estarem também presentes em ligantes de outros GPCRs, como receptores de oxitocina e σ -opióides gerando análogos seletivos ligantes de grande variedade de GPCRs, canais iônicos e enzimas (NARGUND *et al.*, 1998; PATCHETT e NARGUND, 2000).

A literatura recente relata outros exemplos importantes de derivados espiropiperidínicos como antagonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT_{1A}) com propriedades na recaptação de serotonina (SERT), como exemplifica o derivado (**26**) (VAN NIEL *et al.*, 1999); antagonistas de receptores de quimiocina do tipo 2B (CCR2B), representado por RS-504393 (**27**) (MIRZADEGAN *et al.*, 2000) e antagonistas de receptores de melanocortina do subtipo 4 (MC4R), ilustrado por (**28**) (BONDENSGAARD *et al.*, 2004) (Esquema 5).

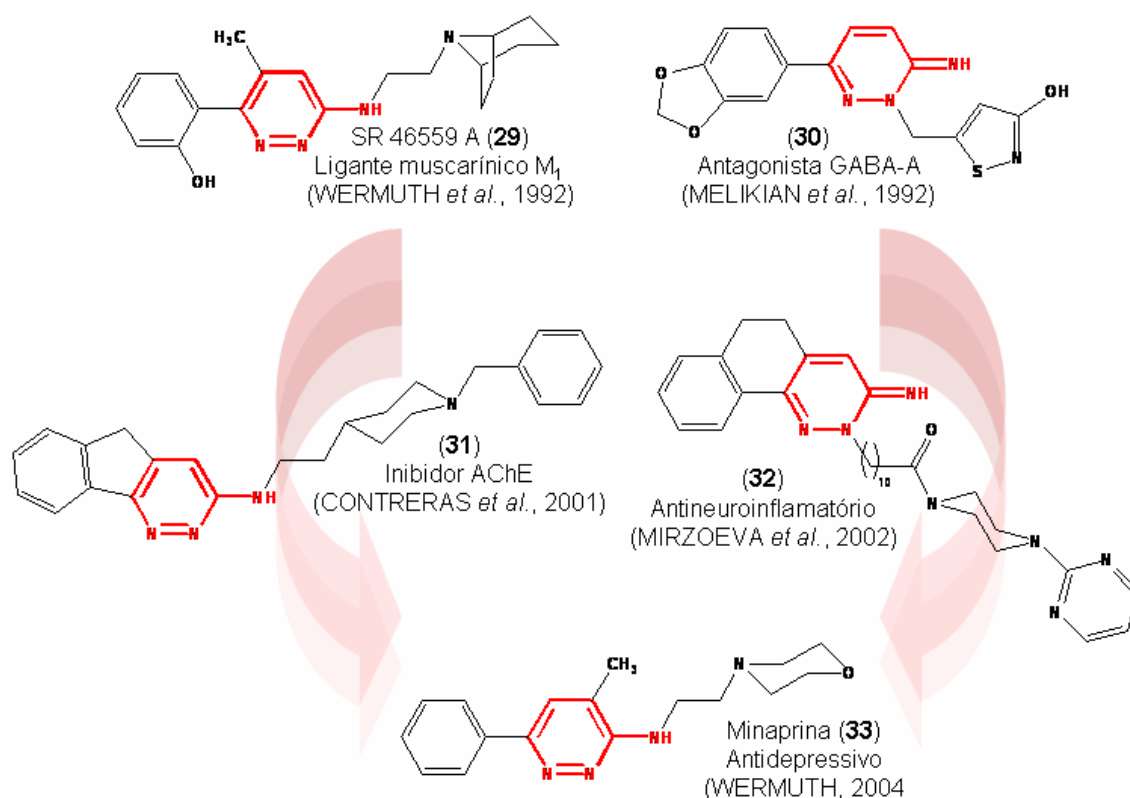


Esquema 5 – Estruturas privilegiadas da classe das espiropiperidinas

1.3.4. AMINOPIRIDAZINAS:

As aminopiridazinas constituem uma subunidade importante na construção de quimiotecas por possuírem pontos estratégicos de diversidade estrutural (BOURGUIGNON, OUMOUC e SCHMITT, 2006). Aplicando-se a estratégia de otimização seletiva de atividades colaterais (SOSA – *Selective Optimization of Side Activities*) e utilizando-se fármacos antigos como fonte de *estruturas privilegiadas*, WERMUTH e colaboradores (2004) descreveram a obtenção de ligantes muscarínicos M₁, ilustrado por SR 46559A (**29**) (WERMUTH *et al.*, 1992) e antagonistas gabaérgicos GABA-A, tal como o

derivado **(30)** (MELIKIAN *et al.*, 1992), inibidores da acetilcolinesterase (AChE), tal como **(31)** (CONTRERAS *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2001), e antineuroinflamatórios, como **(32)** (MIRZOEVA *et al.*, 2002; CRAFT *et al.*, 2004) obtidos a partir de modificações estruturais no protótipo minaprina **(33)** (Esquema 6), fármaco antidepressivo potencializador da transmissão serotoninérgica e dopaminérgica (WERMUTH, 2004).

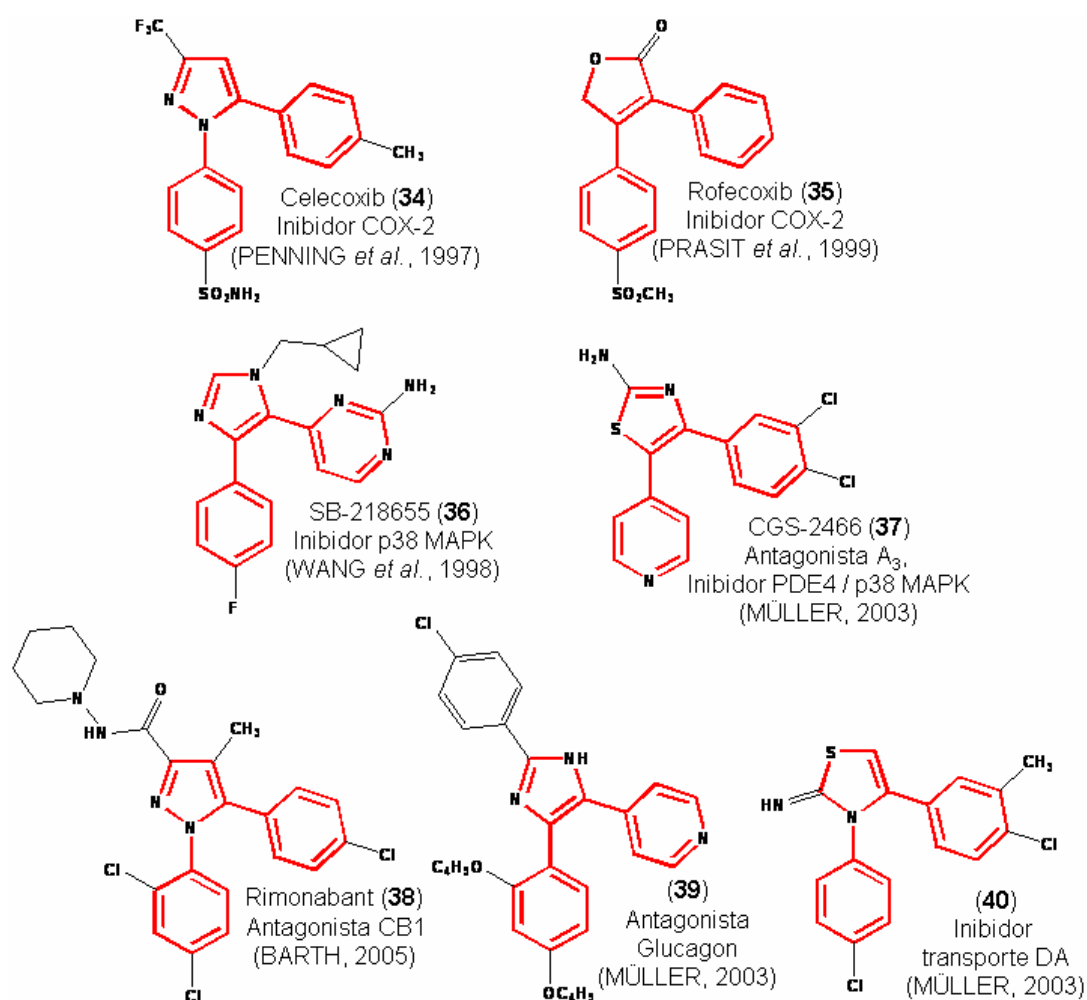


Esquema 6 – Estruturas privilegiadas da classe das aminopiridazinas

1.3.5. DIARIL-HETEROCÍCLICOS:

Dentre a classe dos antiinflamatórios não-esteroidais de segunda geração, o padrão diaril-heterocíclico pode ser identificado como *estrutura privilegiada*, destacando-se dentre os inibidores de ciclooxigenase-2 (COX-2),

e.g. celecoxib (**34**) (PENNING *et al.*, 1997) e rofecoxib (**35**) (PRASIT *et al.*, 1999); inibidores da quinase p38 ativada por mitógeno (p38 MAPK), e.g. SB-218655 (**36**) (WANG *et al.*, 1998); e protótipos de atividade múltipla, e.g. CGS-2466 (**37**), antagonista de receptores de adenosina A₃ e inibidor de fosfodiesterase-4 (PDE-4) e p38 MAPK (MÜLLER, 2003) (Esquema 7). Além das propriedades antiinflamatórias, os derivados diaril-heterocíclicos também podem atuar como agonista inverso de receptor canabinóide CB₁, e.g. rimonabant (**38**) (BARTH, 2005); antagonistas de receptores de glucagon, e.g. (**39**) (MÜLLER, 2003); e inibidores de transporte de dopamina (DA), e.g. (**40**) (MÜLLER, 2003) (Esquema 7), caracterizando-se, de fato, como uma *estrutura privilegiada*.



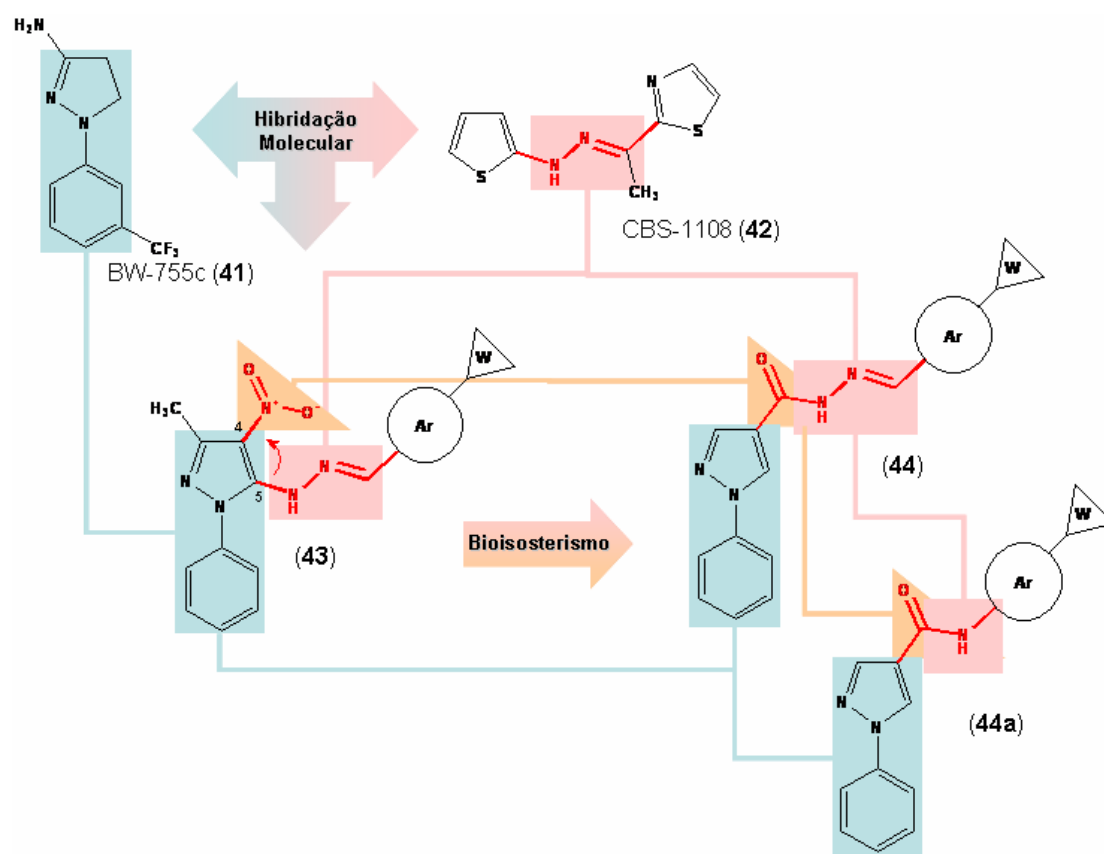
Esquema 7 – Estruturas privilegiadas da classe dos diaril-heterocíclicos

1.4. IDENTIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE *N*-ACILIDRAZONA (NAH) COMO ESTRUTURA PRIVILEGIADA:

Os trabalhos desenvolvidos no LASSBio com derivados *N*-acilidrazônicos (NAH), recentemente compilados na revisão de FRAGA e BARREIRO (2006), evidenciaram o caráter de *estrutura privilegiada* para esses compostos. A primeira série de NAH bioativas estudadas no LASSBio foi planejada racionalmente utilizando-se ferramentas da Química Medicinal de modificação molecular, como a hibridação molecular (BOURGUIGNON, 1996), o bioisosterismo (LIMA e BARREIRO, 2005), a simplificação molecular, a homologação e a restrição conformacional (WERMUTH, 1996; BOURGUIGNON, 1996). Tais estratégias permitem variações importantes no padrão de lipofilicidade, de sítios doadores/aceptores de ligação-H, bem como nas distâncias e orientações conformacionais dos respectivos farmacóforos, viabilizando uma diferenciação no reconhecimento molecular de compostos da mesma classe química frente às biomacromoléculas, que se reflete em diferentes perfis de seletividade (WERMUTH, 1996).

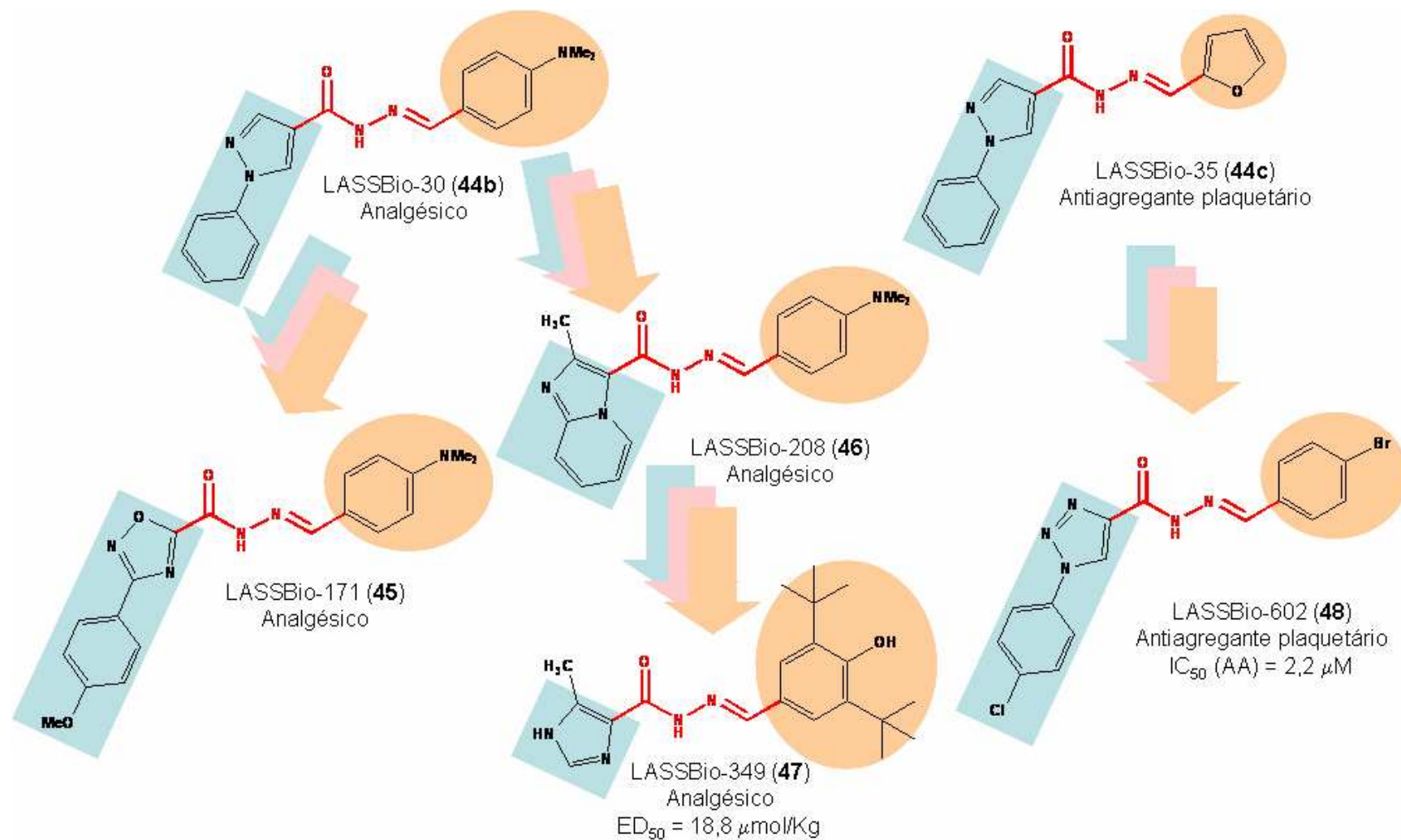
A partir da hibridação molecular de dois protótipos da literatura, *i.e.* BW-755c (**41**) (GHIGLIERI-BERTEZ *et al.*, 1987) e CBS-1108 (**42**) (SINCHOLLE *et al.*, 1985), descritos como inibidores duais de ciclooxigenase e 5-lipoxigenase, foi inicialmente obtida a série de 4-nitropirazolil-5-hidrazonas analgésicas e antitrombóticas (**43**) (FREITAS, 1992; SILVEIRA *et al.*, 1991). Estas últimas originaram, por sua vez, a série pioneira de NAH pirazólicas (**44**) através do bioisosterismo dos grupos nitro-arila, introduzido na série (**43**) por conveniências sintéticas (FREITAS, 1992), e carboxilato, além da transposição

do grupo hidrazona na forma *N*-acil para o carbono 4 do sistema pirazólico (FREITAS, 1992) (Esquema 8), que resultou na obtenção de protótipos com importantes propriedades analgésica (MATHEUS *et al.*, 1991) e antiagregante plaquetária (MIRANDA *et al.*, 1994). Os resultados obtidos validaram o planejamento estrutural para a nova série de NAH (**44**), demonstrando que a estratégia de modificação estrutural adotada para a otimização da série inicial (**43**) foi adequada.



Esquema 8 – Planejamento racional das *N*-acilidrazonas da série (**44**)

O caráter farmacofórico da função NAH foi investigado, obtendo-se os respectivos derivados amídicos (**44a**) a partir da supressão da subunidade imínica de (**44**) (Esquema 8), o que resultou em compostos inativos nos mesmos bioensaios realizados anteriormente. Adicionalmente, cabe ressaltar



Esquema 9 – Relação estrutura-atividade das *N*-acilidrazonas analgésicas e antiagregantes plaquetárias

que o padrão NAH caracteriza-se por possuir diferentes pontos de possível diversidade estrutural, importantes na construção de distintas famílias de compostos-protótipos, candidatos a fármacos. Baseando-se nas estratégias de bioisosterismo, outras séries de NAH foram sintetizadas e avaliadas farmacologicamente, de forma a permitir o estudo das relações entre a estrutura química e suas respectivas atividades analgésicas, antiinflamatórias e antitrombóticas (FRAGA e BARREIRO, 2006).

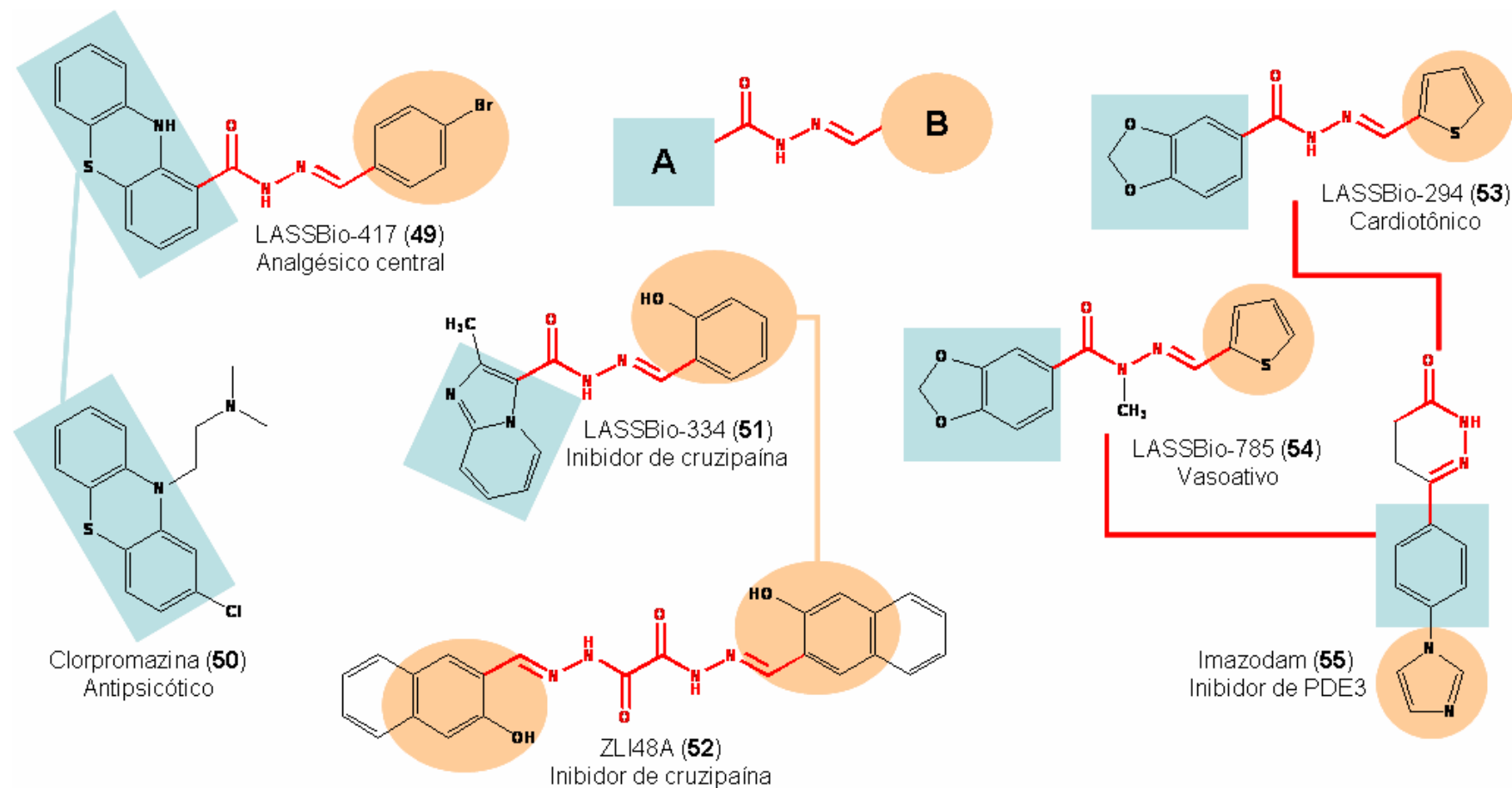
Inicialmente, foram identificadas relações bioisostéricas importantes entre os derivados NAH analgésicos LASSBio-30 (**44a**) (MATHEUS *et al.*, 1991), LASSBio-171 (**45**) (LEITE *et al.*, 1999), LASSBio-208 (**46**) (RIBEIRO *et al.*, 1998) e LASSBio-349 (**47**) (FIGUEIREDO *et al.*, 2000), bem como entre os compostos antiagregantes plaquetários LASSBio-35 (**44b**) (MIRANDA *et al.*, 1994) e LASSBio-602 (**48**) (CUNHA *et al.*, 2003) (Esquema 9). Esses resultados sugeriram que a modificação do padrão heterocíclico na subunidade ligada ao grupo acila da função NAH não modificou drasticamente a atividade farmacológica dos novos compostos obtidos, contudo, na região imínica, a natureza do substituinte mostrou-se crucial para o perfil de atividade observado.

Utilizando-se o conceito de *mensagem-endereço* introduzido por LIPKOWSKI, TAM e PORTOGHESE (1986), foi observado para a classe das NAH um padrão diferenciado de atividade farmacológica (*mensagem*) quando a região imínica (B, Esquema 10) foi modificada e diferentes padrões de ligação (*endereço*) foram obtidos quando alterou-se a natureza do substituinte ligado ao grupo acila (A). Variando-se racionalmente essas duas subunidades estruturais, foram obtidos compostos antiagregantes plaquetários, ilustrados

por LASSBio-35 (**44b**) (MIRANDA *et al.*, 1994) e LASSBio-602 (**48**) (CUNHA *et al.*, 2003); analgésicos periféricos, como LASSBio-30 (**44a**) (MATHEUS *et al.*, 1991), LASSBio-171 (**45**) (LEITE *et al.*, 1999), LASSBio-208 (**46**) (RIBEIRO *et al.*, 1998) e LASSBio-349 (**47**) (FIGUEIREDO *et al.*, 2000) (Esquema 9); analgésicos centrais, tal como LASSBio-417 (**49**), este baseado na estrutura do antipsicótico clorpromazina (**50**) (SILVA *et al.*, 2004); inibidores de cruzipaina, como LASSBio-334 (**51**), originado a partir da estrutura do derivado ZLI48A (**52**) (IFA *et al.*, 2000); agentes cardiotônicos, como LASSBio-294 (**53**) (ALBUQUERQUE, BARREIRO e SUDO, 1999) e vasoativos, como LASSBio-785 (**54**), baseados na estrutura do inibidor de PDE-3, imazodam (**55**) (SILVA *et al.*, 2005) (Esquema 10).

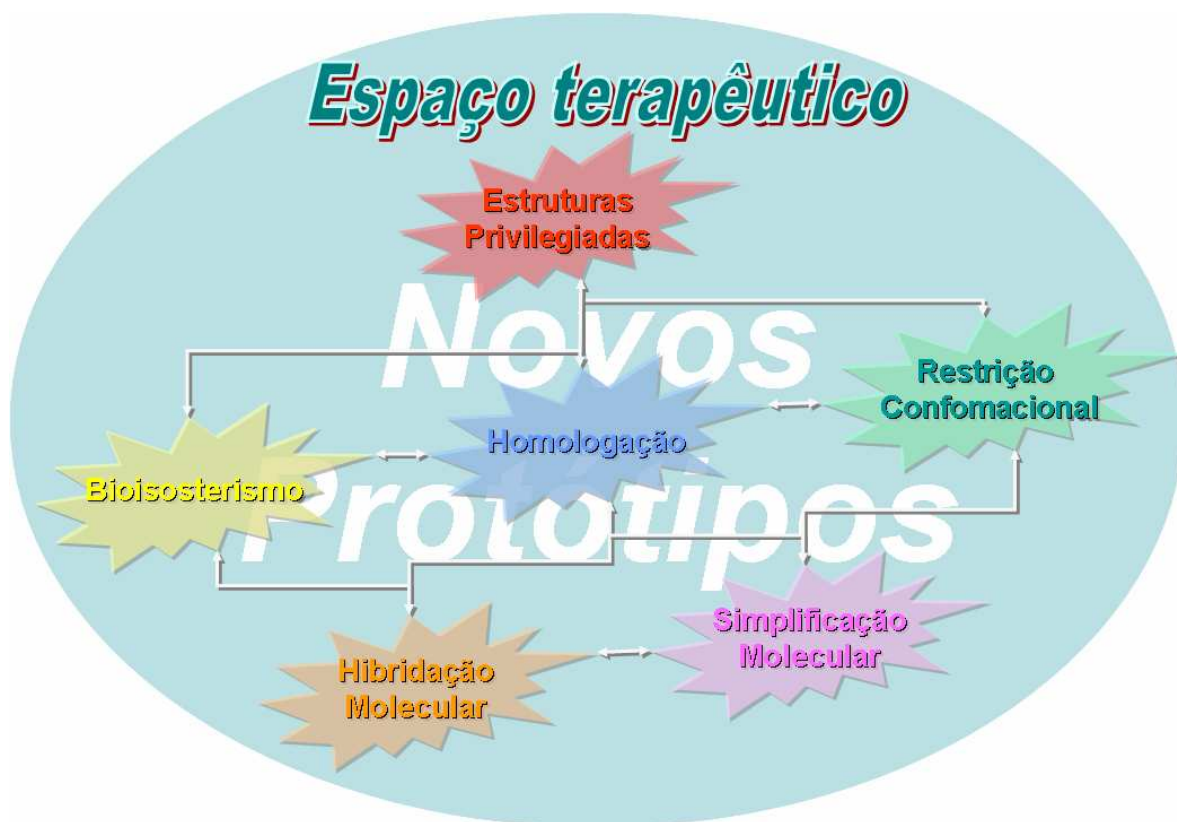
Considerando-se a acessibilidade sintética dos derivados NAH, constatou-se que a modificação racional de sua estrutura resultou em compostos mais seletivos para um dado alvo farmacológico. A partir deste perfil de propriedades farmacológicas podemos classificar os derivados NAH como *estruturas privilegiadas*, respeitando-se a definição original de EVANS (1988) e PATCHETT (2000), visto que correspondem a um arcabouço molecular capaz de contribuir para com uma gama de ações farmacológicas, sendo passíveis, por modificação estrutural apropriada de seus substituintes, de resultarem em compostos seletivos para uma determinada ação farmacológica.

O conceito de *estruturas privilegiadas*, na sua mais estrita definição, constitui, de fato, uma importante estratégia na identificação de subunidades moleculares de múltiplos propósitos para diferentes atividades farmacológicas (MÜLLER, 2003). Nos trabalhos anteriormente mencionados, destacaram-se as



Esquema 10 – Estruturas privilegiadas da classe das *N*-acilidrazonas

estruturas privilegiadas representadas pelas bifenilas, benzodiazepinas, diidropiridinas, espiropiperidinas, aminopiridazinas, diaril-heterocíclicos e NAH. Esta nova ferramenta de compreensão da diversidade molecular vem sendo empregada na “colonização” do *espaço terapêutico* existente para cada arcabouço molecular (AUTOR ANÔNIMO, 2004) e sua associação com outros conceitos clássicos da Química Medicinal (KUBINYI, 2006), representados pela hibridação molecular (BOURGUIGNON, 1996), bioisosterismo (LIMA e BARREIRO, 2005), simplificação molecular, homologação e restrição conformacional (WERMUTH, 1996; BOURGUIGNON, 1996), resultam em uma significativa ferramenta de planejamento racional de novos candidatos a protótipos de fármacos (Esquema 11).



Esquema 11 – Ferramentas da Química Medicinal no planejamento racional de novos protótipos

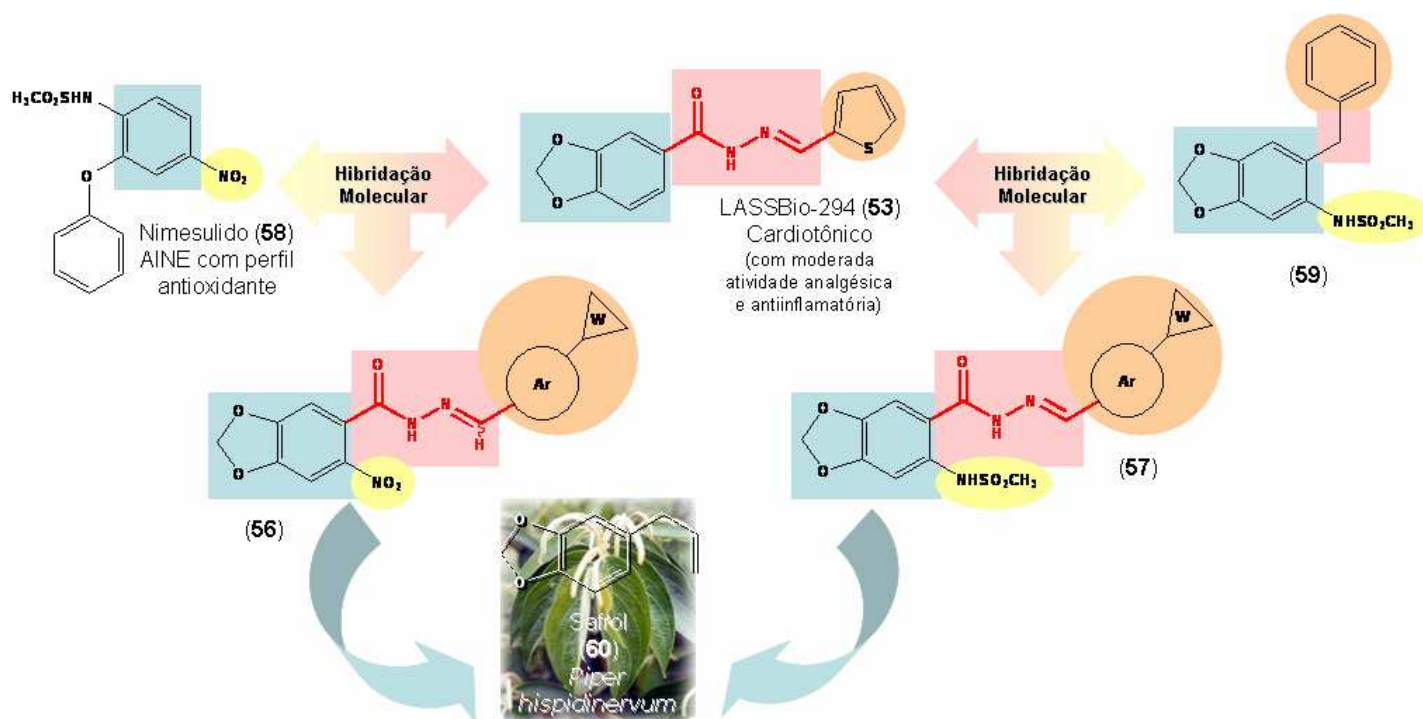
2. OBJETIVOS:

O presente trabalho situa-se no âmbito de uma linha de pesquisas que visa o planejamento, a síntese e a avaliação das propriedades farmacológicas de novos candidatos a protótipos de fármacos, e tem como objetivos a obtenção de novos derivados NAH (**56-57**), análogos otimizados do protótipo LASSBio-294 (**53**) (Esquema 12), autêntico protótipo de fármaco cardiotônico (ALBUQUERQUE, BARREIRO e SUDO, 1999) com atividades analgésica³ e antiagregante plaquetária⁴, porém com moderada atividade antiinflamatória (MIRANDA *et al.*, 2002). Utilizando os princípios de SOSA (WERMUTH, 2004), os novos compostos (**56-57**) descritos neste trabalho foram planejados a partir de modificações estruturais de (**53**), com o intuito de promover sua otimização. Aplicando-se a estratégia da hibridação molecular (BOURGUIGNON, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2001), identificou-se o desenho estrutural da série de derivados 6-nitro-1,3-benzodioxolil-*N*-acilidrazônicos (**56**) com a introdução do grupamento nitro-aromático presente no fármaco antiinflamatório não-esteroidal nimesulido (**58**) (Esquema 12), atributo estrutural importante para seu perfil antioxidante *in vitro* e *in vivo* (CANDELARIO-JALIL *et al.*, 2000; CANDELARIO-JALIL *et al.*, 2003; CANDELARIO-JALIL e LÉON, 2003). A mesma abordagem foi adotada para o desenho estrutural dos derivados 6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-benzodioxolil-*N*-acilidrazônicos (**57**), com a introdução do grupamento *N*-sulfonilanilínico presente no protótipo de fármaco antiinflamatório safrosulido (**59**), anteriormente descoberto no LASSBio (LAGES *et al.*, 1998) (Esquema 12). A

³ DI₅₀ = 8,1 µmol/kg, no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

⁴ CI₅₀ = 15,3 µM, no modelo de agregação induzida por ácido araquidônico em plaquetas de coelho, inibindo a produção de tromboxana B₂

análise retrossintética de ambas as séries (56-57) identificou o safrol (60) como matéria-prima, um produto natural de grande versatilidade sintética (BARREIRO e FRAGA, 1999; COSTA, 2000), obtido em altos rendimentos (ca. 90%) destilando-se o óleo essencial das folhas e talos de *Piper hispidinervum*, uma piperácea arbustiva que se constitui em uma fonte renovável e sustentável deste fenilpropanóide⁵ (Esquema 12).



Esquema 12 – Planejamento racional das novas séries (56-57)

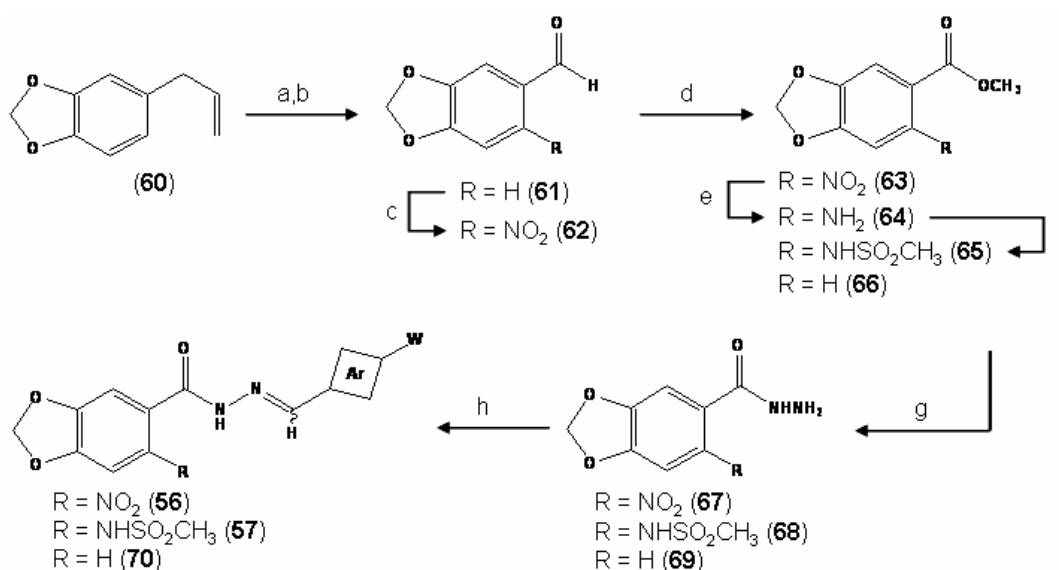
Ademais, a subunidade 1,3-benzodioxola, advinda da estrutura do safrol (60), está presente em várias moléculas, naturais ou sintéticas, que possuem atividades farmacológicas, sendo considerada, portanto, uma subunidade *biofórica* (BARREIRO e FRAGA, 1999).

⁵ Dados extraídos do sítio: <http://www22.sede.embrapa.br/pimentalonga/principal.html>, acessado em 06/04/2006

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES (56-57):

Os novos compostos 6-nitro- (56) e 6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-benzodioxolil-*N*-acilidrazônicos substituídos (57) foram sintetizados explorando o safrol (60) como matéria-prima. Após isomerização e clivagem oxidativa do produto natural (60) (BARREIRO e LIMA, 1992; BARREIRO *et al.*, 1985), obteve-se o piperonal (61) em 75% de rendimento, o qual foi subsequentemente submetido à funcionalização regioseletiva da posição 6 do sistema 1,3-benzodioxólico através da reação de nitração (EKELEY e KLEMME, 1928) empregando ácido nítrico concentrado a 20-25°C. Subseqüente oxidação (LIMA *et al.*, 2000) pelo tratamento do nitroaldeído (62) com soluções metanólicas de hidróxido de potássio e iodo a 0°C, resultou na obtenção do éster 6-nitropiperonílico (63) em 84% de rendimento a partir de (61) (Esquema 13). O espectro de infravermelho (IV) de (63) revelou a presença do grupamento nitro, pela presença das bandas de absorção em 1509 e 1038 cm⁻¹, e da carbonila do éster em 1717 cm⁻¹; adicionalmente, a presença de apenas dois singletes em 7,03 e 7,38 ppm na região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN ¹H deste composto confirmou a presença do padrão 1,2,4,5-tetrassubstituído do anel aromático. Esses dados estão de acordo com os resultados previamente descritos por EKELEY e KLEMME (1928), demonstrando inequivocamente que a nitração ocorreu regioseletivamente na posição 6 do anel 1,3-benzodioxola.



a) KOH_{aq} 3N, *n*-BuOH, t.a., 3h; b) *i* - O_3/O_2 , AcOH, 0°C , 1h; *ii* - Zn° , AcOH (75%, 3 etapas); c) HNO_3 , 20- 25°C , 0,5h, 95%; d) I_2 , KOH, MeOH, 0°C , 1,5h, 88%; e) Fe° , NH_4Cl , EtOH: H_2O , refluxo, 2h, 75%; f) $\text{H}_3\text{CSO}_2\text{Cl}$, Py, CH_2Cl_2 , t.a., 1h, 89%; g) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 80%, EtOH, t.a., 1h; h) ArCHO , EtOH, HCl_{cat} , t.a., 0,5h

Esquema 13 – Rota sintética para a obtenção dos derivados (56-57) e (70)

O éster 6-nitropiperonílico (63) foi submetido à redução quimiosseletiva do grupamento nitro, empregando ferro metálico em meio ácido (LAGES *et al.*, 1998), a qual forneceu a anilina correspondente (64) em 75% de rendimento. Em seguida, a mesilação de (64) (LAGES *et al.*, 1998) forneceu o derivado *N*-metanossulfonilado (65), em 89% de rendimento (Esquema 13). As bandas de absorção em 3140 e 3108 cm^{-1} no espectro de IV do éster (65) referem-se à deformação axial do grupo N-H, enquanto as bandas em 1675 , 1362 e 1148 cm^{-1} caracterizam a deformação da carbonila e as deformações assimétrica e simétrica do grupo $-\text{SO}_2$, respectivamente.

Os intermediários-chave empregados na construção das séries de compostos planejadas (56-57), *i.e.* hidrazidas (67) e (68), foram obtidos em 70-78% de rendimento, através do tratamento de soluções etanólicas dos ésteres correspondentes (63) e (65) com hidrato de hidrazina à temperatura ambiente

(LIMA *et al.*, 2000). Finalmente, os novos compostos-alvo (**56-57**) foram obtidos a partir da condensação de (**67-68**) com os respectivos aldeídos aromáticos, em etanol, contendo quantidades subestequiométricas de HCl concentrado, em 70-95% de rendimento (LIMA *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que o novo derivado (**70a**) (Ar-W = 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil) não-funcionalizado no carbono 6 do sistema 1,3-benzodioxola, também foi obtido aplicando-se a mesma estratégia sintética para as séries (**56-57**), a partir da hidrazida (**69**), conforme descrito anteriormente por LIMA e colaboradores (2000) (Esquema 13).

A análise dos respectivos espectros de RMN ^1H dos derivados nitrados (**56**) revelaram que estes se caracterizam como misturas diastereoisoméricas, por apresentarem dois singletes na proporção média de 65:35, correspondentes aos hidrogênios imínicos $\text{CH}=\text{N}$ dos isômeros *E* e *Z*, respectivamente (Tabela 2). O assinalamento de cada diastereoisômero foi feito de acordo com os trabalhos de KARABATSOS e colaboradores (1962; 1963) sobre as configurações relativas de hidrazonas e análogos, descrevendo que o hidrogênio imínico do diastereoisômero *E* encontra-se 0,2-0,3 ppm mais desblindado que o isômero *Z* correspondente. Exemplificando-se o derivado (**56d**) (Anexo, Espectro 35), verificou-se que o singlete referente ao hidrogênio imínico ($\text{CH}=\text{N}$) do diastereoisômero *Z* apresentou deslocamento químico (δ) de 8,03 ppm, enquanto aquele respectivo ao isômero *E* aparece em 8,24 ppm. Portanto, a variação de 0,21 ppm entre os valores observados caracteriza que os resultados obtidos estão em concordância com os dados previamente descritos por KARABATSOS (1962; 1963). Nos espectros de RMN ^{13}C desses derivados também se observa o desdobramento de alguns sinais, indicando a mistura diastereoisomérica. Por outro lado, para os compostos da série (**57**)

nota-se a presença de um único diastereoisômero, em coerência com resultados anteriores de LASSBio-294 e análogos (**53**) (LIMA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005).

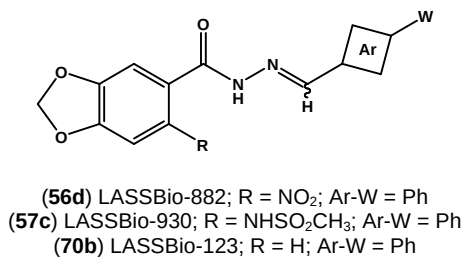
Tabela 2 – Novos derivados NAH (**56a-g**), (**57a-d**) e (**70**)

Derivado	Ar-W	Fórmula molecular	Peso molecular	Rendimento última etapa (%)	Ponto de Fusão (°C)	Razão E:Z ^a
56a LASSBio-879		C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₆	303,2	88	226-228	60:40
56b LASSBio-880		C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₅ S	319,3	90	240-242	60:40
56c LASSBio-881		C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₆	441,5	82	280-282	67:33
56d LASSBio-882		C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₅	313,3	95	216-218	70:30
56e LASSBio-934		C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₅	314,3	84	184-185	70:30
56f LASSBio-935		C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₅	314,3	89	202-203	70:30
56g LASSBio-936		C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₅	302,2	83	212-213	57:43
57a LASSBio-928		C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₆ S	351,3	86	260-262	100:0
57b LASSBio-929		C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅ S ₂	367,4	82	276-278	100:0
57c LASSBio-930		C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₅ S	361,4	84	244-246	100:0
57d LASSBio-931		C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₆ S	489,6	70	254-255	100:0
70a LASSBio-945		C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₄	396,5	91	231-232	100:0

^aCalculada a partir da integração dos sinais do hidrogênio imínico no espectro de ¹H RMN, e atribuídos de acordo com KARABATSOS *et al.* (1962, 1963).

Com o intuito de racionalizar os diferentes perfis de diastereosseletividade apresentados pelos derivados NAH das séries (**56**) e (**57**), foi realizado o estudo conformacional de ambos os possíveis diastereoisômeros para derivados representativos de cada série, ilustrados no Esquema 14, empregando o método semiempírico AM1 (DEWAR *et al.*, 1985). A Figura 2 resume os confôrmeros mais estáveis para cada diastereoisômero

estudado e seus respectivos dados de distância e ângulos diedrais (θ) mais relevantes.



Esquema 14 – Compostos submetidos à análise conformacional

O derivado não-substituído LASSBio-123 (**70b**) foi obtido previamente por LIMA e colaboradores (2000) como um único diastereoisômero, apresentando configuração relativa *E*. O mesmo resultado foi obtido para o derivado LASSBio-945 (**70a**) e para os compostos da série (**57**), a despeito de estes últimos apresentarem substituintes volumosos em *orto* ao grupo NAH, como nos derivados da série (**56**), que por sua vez apresentam-se como misturas diastereoisoméricas.

O conformero mais estável para o diastereoisômero *E* do derivado LASSBio-123 (**70b**) apresenta o arranjo *S-cis* entre as duplas ligações C5=C6 do sistema 1,3-benzodioxola e a função C=O do grupo NAH (ângulo diedro de ca. 40°), assim como a orientação *sin* dos grupos ligados a ambos os átomos de nitrogênio do grupo NAH, resultando na aproximação espacial dos grupos carbonila (C=O) e imina (HC=N), com uma distância entre C=O...HC=N de 2,23 Å (Figura 2A), favorecendo a participação de ligação-H intramolecular. Para o correspondente diastereoisômero *Z*, tem-se como conformação mais estável a *S-cis-anti*, onde se observa um afastamento dos grupos C=O e HC=N (4,69 Å) (Figura 2A).

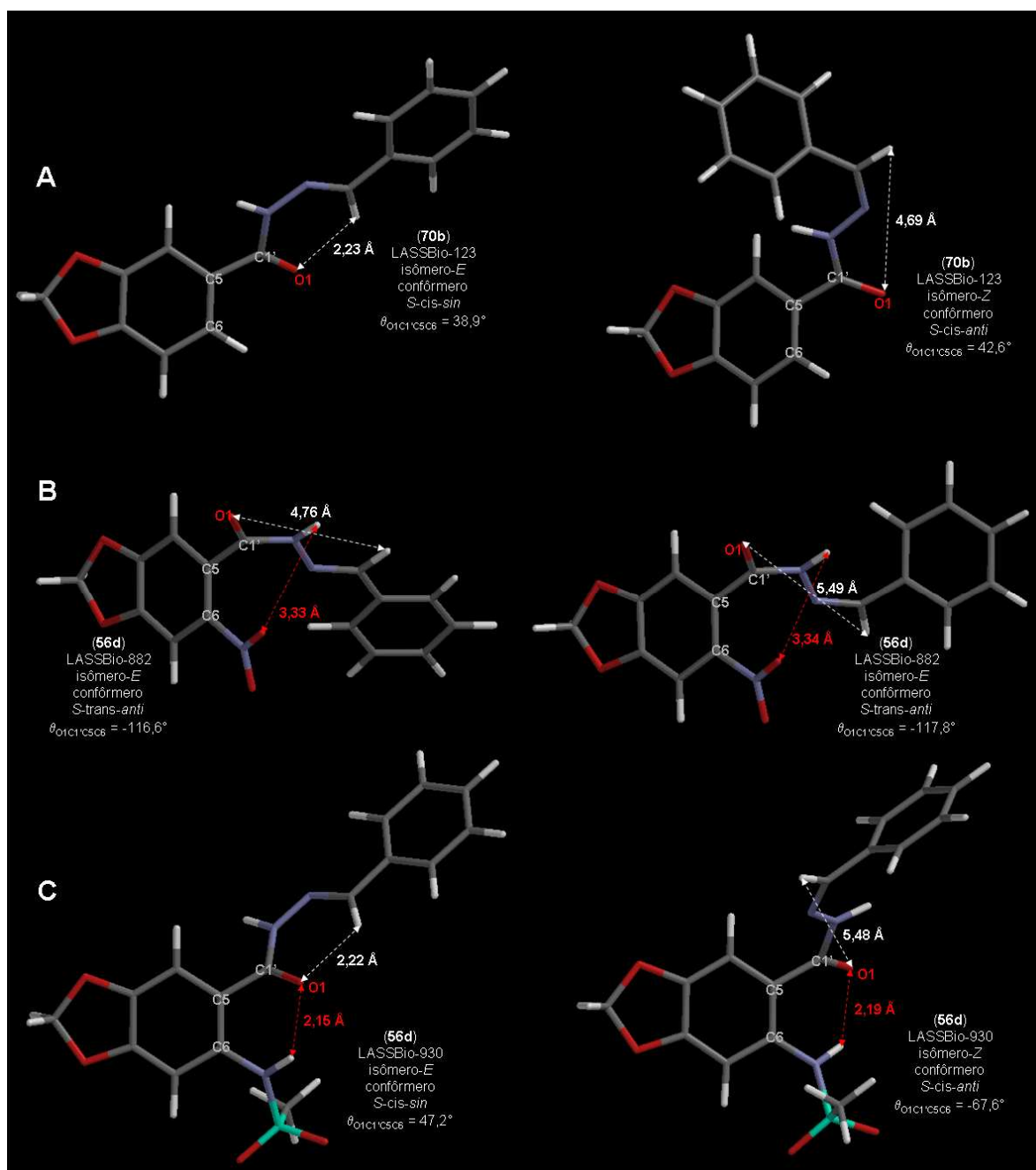


Figura 2 – Conformações mais estáveis para os diastereoisômeros *E* e *Z* dos compostos LASSBio-882 (56d), LASSBio-930 (57c) e LASSBio-123 (70b). A – O isômero *E* do composto não-substituído LASSBio-123 (70b) apresenta como a conformação mais estável a *S-cis-sin*, com destaque para a distância de 2,23 Å entre C=O...HC=N, enquanto o respectivo isômero *Z* tem como conformação mais estável a *S-cis-anti*. B – O efeito *orto* do grupo nitro favorece o conformero *S-trans-anti* para ambos os diastereoisômeros de LASSBio-882 (56d), que apresentam distâncias semelhantes entre C=O...HC=N e CONH...O-N=O. C – A ligação-H entre SO₂NH...O=C restringe a conformação *S-cis* para ambos os isômeros, permitindo que LASSBio-930 (57c) apresente um perfil conformacional semelhante ao do composto LASSBio-123 (70b).

Para o derivado LASSBio-882 (**56d**), o efeito *orto* do grupo nitro ligado ao carbono 6 do sistema 1,3-benzodioxola parece favorecer, para ambos os diastereoisômeros, o confômero *S-trans-anti*, que apresenta distâncias semelhantes entre $C=O \cdots HC=N$, *i.e.* ca. 5 Å, e para o átomo de hidrogênio amídico e um dos átomos de oxigênio do grupo nitro ($CONH \cdots O^-N=O$), *i.e.* 3,3 Å (Figura 2B).

A Figura 2C mostra que, para ambos os diastereoisômeros do composto LASSBio-930 (**57c**), o grupo *N*-metanossulfonilamina em *orto* favorece uma restrição conformacional, *i.e.* *S-cis*, através da formação de uma ligação-H entre o átomo de hidrogênio deste grupo (SO_2NH) e o átomo de oxigênio da carbonila da NAH ($C=O$) nos respectivos confômeros mais estáveis. Essa interação resulta em um arranjo espacial que mimetiza um anel de seis membros, com uma distância entre $SO_2NH \cdots O=C$ de ca. 2,2 Å. Para o isômero *E* observa-se a orientação *S-cis-sin*, enquanto que a conformação *S-cis-anti* é adotada pelo isômero *Z* de LASSBio-930 (**57c**), com distâncias iguais a 2,22 e 5,48 Å, respectivamente, entre $C=O \cdots HC=N$ (Figura 2C). Portanto, nota-se que LASSBio-930 (**57c**) apresenta similaridades conformacionais em relação ao composto LASSBio-123 (**70b**). Ademais, observa-se uma semelhança no perfil conformacional das hidrazidas (**67-69**) em relação aos seus respectivos derivados NAH estudados (**56d**), (**57c**) e (**70b**) (Figura 3). Contudo, os valores de entalpia de formação (ΔH_f) obtidos para os confômeros mais estáveis dos diastereoisômeros de LASSBio-882 (**56d**), LASSBio-930 (**57c**) e LASSBio-123 (**70b**) (Tabela 3) não se correlacionam com a razão diastereoisomérica determinada experimentalmente para os derivados em questão.

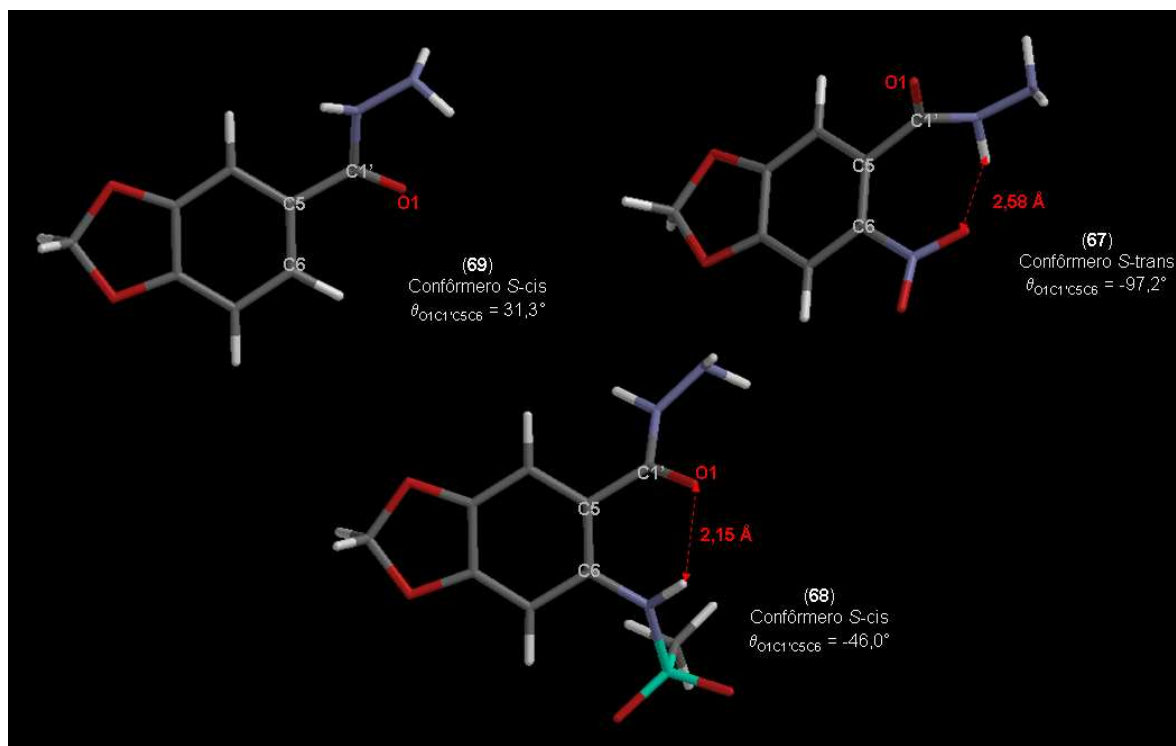
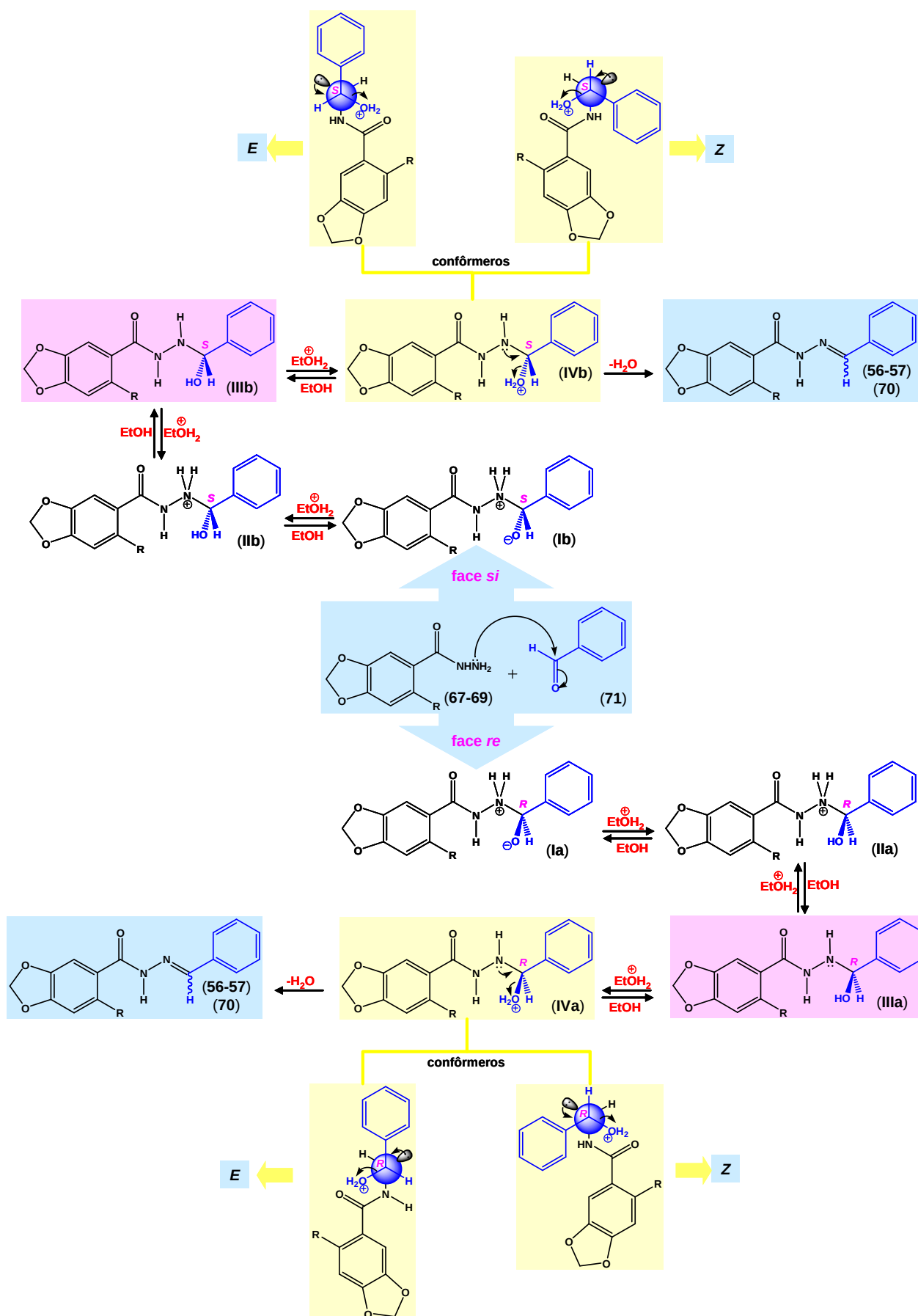


Figura 3 – Conformações mais estáveis para hidrazidas (67-69). Nota-se que os ângulos diedros são semelhantes aos dos respectivos derivados NAH da Figura 2.

Tabela 3 – Entalpias de formação obtidas para os respectivos conformêros mais estáveis dos diastereoisômeros *E* e *Z* dos derivados NAH (**56d**), (**57c**) e (**70b**)

Conformero	ΔH_f (kcal/mol)	$\Delta\Delta H_f$ E/Z (kcal/mol)	Razão E:Z
LASSBio-882 (56d) isômero <i>E</i> S-cis- <i>sin</i>	8,83	4,09	70:30
LASSBio-882 (56d) isômero <i>Z</i> S-cis- <i>anti</i>	4,74		
LASSBio-930 (57c) isômero <i>E</i> S-trans- <i>anti</i>	-67,41	0,02	100:0
LASSBio-930 (57c) isômero <i>Z</i> S-trans- <i>anti</i>	-67,61		
LASSBio-123 (70b) isômero <i>E</i> S-cis- <i>anti</i>	-3,35	1,99	100:0
LASSBio-123 (70b) isômero <i>Z</i> S-cis- <i>anti</i>	-1,36		

O perfil energético dos derivados estudados anteriormente parece indicar que a diastereosseletividade não pode estar relacionada à estabilidade dos produtos formados, pois a diferença de energia ($\Delta\Delta H_f$ *E/Z*) não condiz com as proporções obtidas experimentalmente (Tabela 3). O Esquema 15 mostra a proposta de um mecanismo para a reação de condensação das hidrazidas (**67-69**) com o benzaldeído, seguindo relatos anteriores que indicam que a eliminação de água é a etapa lenta da reação (CUSTER *et al.*, 2004). Pela análise desta proposição, podemos constatar que a estereoquímica da dupla ligação imínica é dependente da conformação adotada pelos intermediários protonados (**IVa**) e (**IVb**), que sofrem a eliminação de H₂O assistida pelo par de elétrons não ligante do nitrogênio alfa ao carbono carbinólico. A análise conformacional dos intermediários neutros (**IIIa**) e (**IIIb**) foi realizada, utilizando a mesma metodologia adotada anteriormente, e os confôrmeros de menor energia estão ilustrados na Figura 4.



Esquema 15 – Mecanismo proposto para a formação das NAH (56-57) e (70)

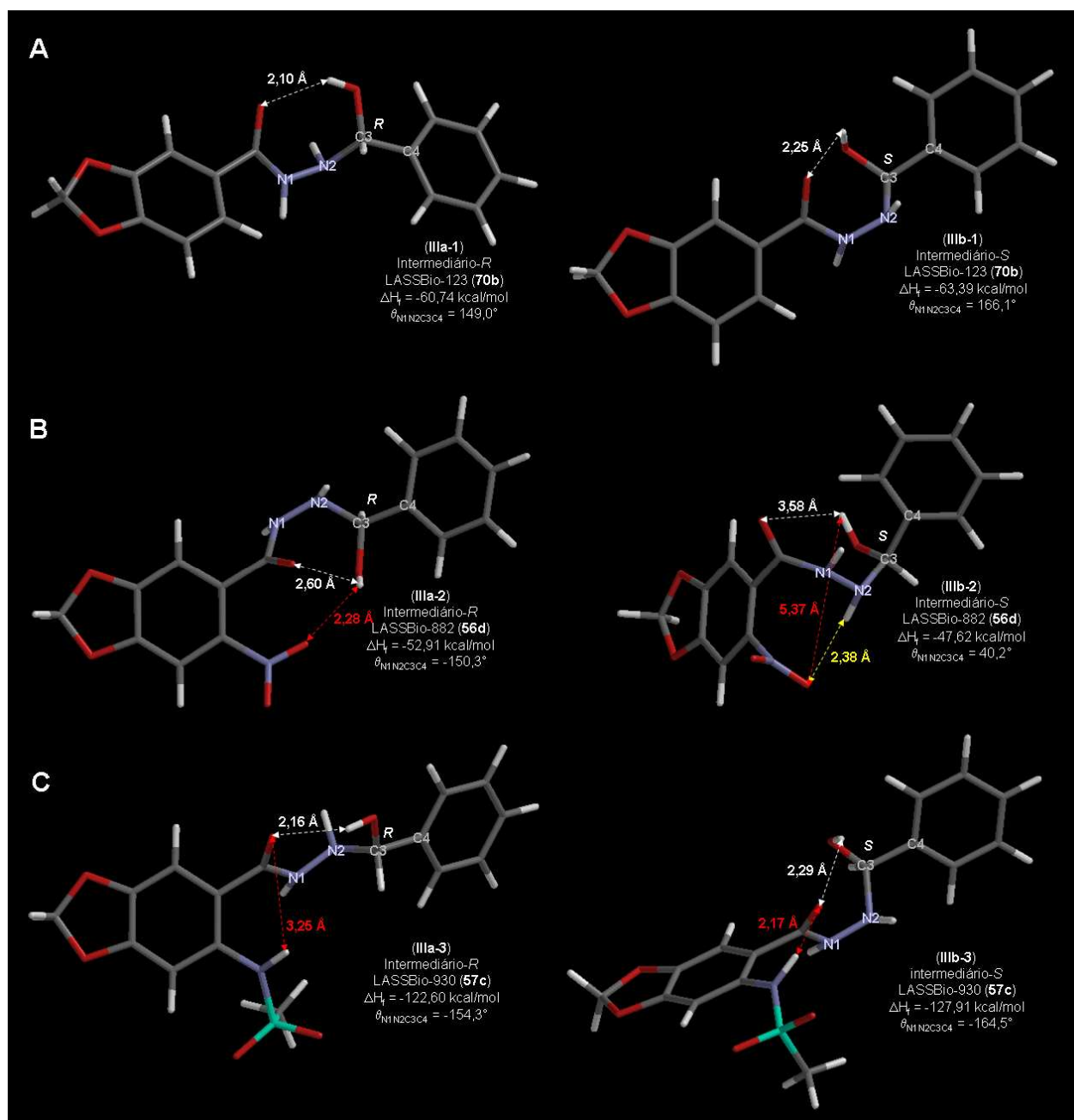


Figura 4 – Conformações mais estáveis para os intermediários (IIIa) e (IIIb) relativos aos produtos LASSBio-123 (70b), LASSBio-882 (56d) e LASSBio-930 (57c). A – Ambos os intermediários favorecem a formação do diastereoisômero *E* de LASSBio-123 (70b), destacando-se as distâncias de 2,10 e 2,25 Å entre C=O...HOC-N. B – O intermediário (IIIa-2) favorece a formação do isômero *E*, enquanto (IIIb-2) favorece o isômero *Z* devido ao efeito da presença do grupo nitro, destacando-se os respectivos ângulos diedrais entre N1-N2-C3-C4. C – Assim como em A, a formação do diastereoisômero *E* é favorecida para ambos os intermediários.

Para ambos os conformêros mais estáveis dos intermediários (**IIIa-1**) e (**IIIb-1**), destacam-se os respectivos ângulos diedros (θ) de $149,0^\circ$ e $166,1^\circ$ entre os átomos N1-N2-C3-C4, com conformação antiperiplanar. A aproximação entre os grupos carbonila (C=O) e hidroxila (HOC-N), com distâncias C=O...HOC-N de 2,10 e 2,25 Å, respectivamente, resulta na orientação antiperiplanar observada, favorecendo-se a formação do diastereoisômero *E* de LASSBio-123 (**70b**) em ambos os intermediários formados (Figura 4A). Contudo, os conformêros mais estáveis de (**IIIa-2**) e (**IIIb-2**) possuem diferenças importantes nos ângulos diedros entre N1-N2-C3-C4. O primeiro apresenta a conformação antiperiplanar ($\theta = -150,3^\circ$), que favorece a formação do isômero *E*, com a aproximação entre os grupos HOC-N, C=O e $\text{O}=\text{N}^+-\text{O}^-$, *i.e.* 2,60 Å (C=O...HOC-N) e 2,28 Å ($\text{O}=\text{N}^+-\text{O}^-$...HOC-N). O segundo, por sua vez, apresenta a conformação sinclinal ($\theta = 40,2^\circ$), favorecendo assim a formação do diastereoisômero *Z*, por consequência da aproximação dos grupos $\text{O}=\text{N}^+-\text{O}^-$ e H-N2 (2,38 Å), que substitui o grupo HOC-N nesta interação (Figura 4B).

Na Figura 4C, observa-se que apenas a formação do isômero *E* é favorecida, em consequência da conformação antiperiplanar adotada por ambos os intermediários (**IIIa-3**) e (**IIIb-3**), *i.e.* $\theta = -154,3^\circ$ e $-164,5^\circ$. De maneira semelhante aos intermediários (**IIIa-1**) e (**IIIb-1**), observa-se a aproximação entre os grupos C=O e HOC-N, *i.e.* 2,16 Å (**IIIa-3**) e 2,29 Å (**IIIb-3**), assim como uma interação adicional entre os grupos C=O e HNSO_2 , com distâncias de 3,25 Å (**IIIa-3**) e 2,17 Å (**IIIb-3**).

Diante dos resultados obtidos, constata-se que a diastereosseletividade para a obtenção das NAH das séries (**56-57**) e (**70**)

parece ser dependente de fatores conformacionais (entrópicos) dos respectivos intermediários envolvidos, destacando-se **(IIIa-b)** e **(IVa-b)**.

3.2. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES **(56-57)** E **(70)**:

Os compostos obtidos, *i.e.* **(56-57)** e **(70)**, foram ensaiados, primeiramente quanto às suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas, em modelos *in vivo*, com o objetivo de selecionar os protótipos mais promissores.

3.2.1. AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIINFLAMATÓRIO E ANALGÉSICO DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES **(56-57)** E **(70)**⁶:

Primeiramente, o perfil antiinflamatório *in vivo* dos compostos 3,4-metilenedioxifenil-*N*-acilidrazônicos 6-substituídos **(56-57)** e **(70)** foi investigado no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina (FERREIRA, 1979), com o intuito de triar os derivados com melhor perfil de bioatividade. As novas NAHs **(56)**, **(57)** e **(70)**, além de nimesulido **(58)** e LASSBio-294 **(53)**, utilizados como referência, foram administrados por via oral na dose de 300 µmol/kg. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4 e nos Gráficos

⁶ Estudo realizado pelos alunos de doutoramento Jorge Luiz Mendonça Tributino e de mestrado Daniel Ignachitti Lacerda, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

1 e 2. Resultados previamente descritos na literatura indicam que os inibidores seletivos de COX-2 atuam neste modelo reduzindo a formação de edema, sem provocar irritação gástrica (SIEBERT *et al.*, 1994; CHAN *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1997).

Tabela 4 - Edema de pata de rato induzido por carragenina dos derivados NAH (**56**), (**57**) e (**70**)

Composto	Dose ($\mu\text{mol/Kg}$)	n	Varição de volume (μL)	% de inibição
Goma 5%	---	10	$521,8 \pm 25,4$	---
53 LASSBio-294	300	5	---	29,7*
58 Nimesulido	300	5	$221,4 \pm 42,6$	57,5*
56a LASSBio-879	300	5	$500,1 \pm 42,7$	4,1 n.s.
56b LASSBio-880	300	5	$503,5 \pm 44,3$	3,4 n.s.
56c LASSBio-881	300	8	$356,3 \pm 16,0$	31,7*
56d LASSBio-882	300	5	$503,1 \pm 39,5$	3,5 n.s.
56e LASSBio-934	300	8	$402,8 \pm 40,0$	22,8 n.s.
56f LASSBio-935	300	8	$452,4 \pm 14,4$	13,3 n.s.
56g LASSBio-936	300	8	$412,6 \pm 22,4$	20,9 n.s.
57a LASSBio-928	300	8	$324,1 \pm 29,3$	37,9*
57b LASSBio-929	300	7	$333,8 \pm 44,2$	36,0*
57c LASSBio-930	300	10	$210,9 \pm 34,2$	59,6*
57d LASSBio-931	300	8	$459,9 \pm 48,8$	11,8 n.s.
70 LASSBio-945	300	8	$331,8 \pm 27,6$	36,4*

* $p < 0,001$ ANOVA One Way seguido do teste de Bonferroni;
Varição de volume expressa em média $\pm$ Erro Padrão da Média

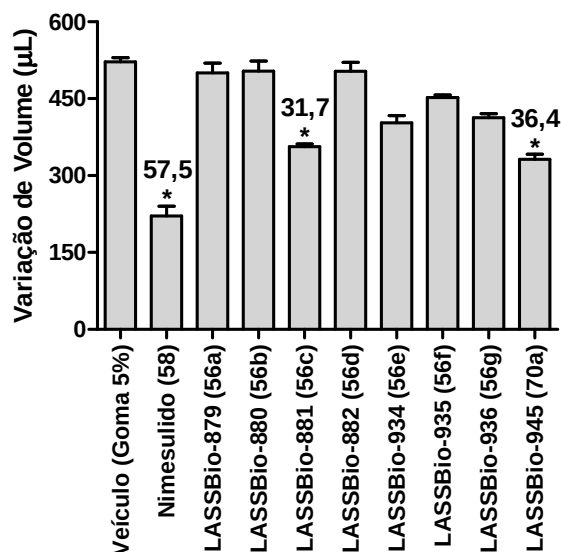
Dentre os compostos testados neste modelo, destacam-se os derivados LASSBio-881 (**56c**) ($R = \text{NO}_2$; Ar-W = 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil), LASSBio-928 (**57a**) ($R = \text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$; Ar-W = 2-furil), LASSBio-929 (**57b**) ($R = \text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$; Ar-W = 2-tiofenil), LASSBio-930 (**57c**) ($R = \text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$; Ar-W = fenil) e LASSBio-945 (**70a**) ($R = \text{H}$; Ar-W = 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil), os quais foram capazes de inibir significativamente o edema de pata na dose de

300 $\mu\text{mol/Kg}$, sem provocar qualquer irritação gástrica. LASSBio-930 (**57c**) foi o único composto capaz de exercer uma ação equiparável àquela do nimesulido (**58**) na dose testada. A determinação da dose efetiva para alcançar 50% do efeito máximo (DE_{50}) de LASSBio-930 (**57c**) foi de 166,2 $\mu\text{mol/Kg}$, enquanto o nimesulido tem DE_{50} de 22,7 $\mu\text{mol/Kg}$, indicando que seus perfis de potência são bem distintos.

Em uma análise preliminar dos resultados obtidos para os derivados da série (**56**), verificou-se que não há correlação direta entre a presença do grupo nitro e a atividade farmacológica observada, visto que os derivados LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) inibiram a formação do edema na mesma ordem de grandeza, *i.e.* 31,7 e 36,4% respectivamente. Todavia, para os compostos da série (**57**), a presença do grupo metanossulfonilamino em C-6 do sistema 1,3-benzodioxola, parece favorecer o incremento da atividade antiinflamatória, já que o composto LASSBio-929 (**57b**) (36,0% de inibição) foi mais ativo que LASSBio-294 (**53**) (29,7% de inibição), à exceção do composto LASSBio-931 (**57d**).

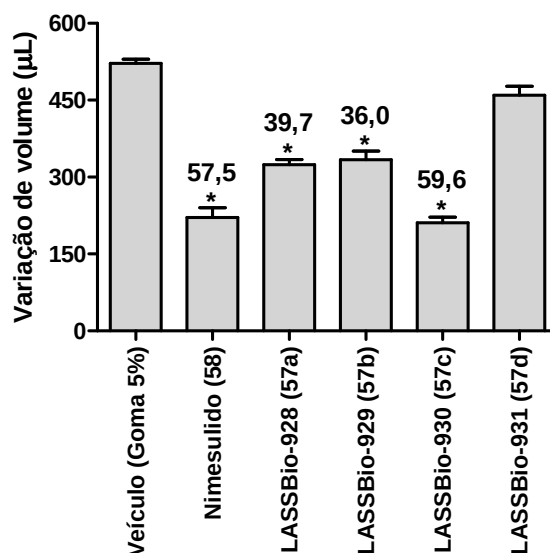
A resposta inflamatória constitui um conjunto complexo de interações entre mediadores biossintetizados no sítio de lesão tecidual, que tem como objetivo primário a sua recuperação. Entretanto, a persistência do estímulo danoso conduz a um estado inflamatório crônico, onde não há reparação tissular (NATHAN, 2002). A biossíntese destes mediadores do processo inflamatório envolve duas enzimas-chaves, *i.e.* cicloxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LO), envolvidas no catabolismo do ácido araquidônico (AA) (VANE e BOTTING, 1995).

Neste contexto, selecionamos os compostos LASSBio-881 (**56c**),



300 µmol/kg v.o.; n=5-10 animais; *p<0,001 em relação ao controle (veículo)

Gráfico 1 – Avaliação da atividade antiedematogêncica dos compostos (56a-g) e (70a) no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina. A variação do volume da pata está expressa em média ± erro padrão da média e corresponde à leitura na 3ª hora após o estímulo inflamatório induzido pela injeção intraplantar de carragenina. O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Bonferroni.



300 µmol/kg v.o.; n=5-10 animais; *p<0,001 em relação ao controle (veículo)

Gráfico 2 – Avaliação da atividade antiedematogêncica dos compostos (57a-d) no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina. A variação do volume da pata está expressa em média ± erro padrão da média e corresponde à leitura na 3ª hora após o estímulo inflamatório induzido pela injeção intraplantar de carragenina. O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Bonferroni.

LASSBio 930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**), para dar continuidade aos estudos de atividade antiinflamatória, visando subsidiar a elucidação de seu provável mecanismo de ação. Assim, estes compostos foram submetidos ao ensaio de edema de orelha induzido por AA e éster de forbol (TPA) em camundongos, na dose de 300 $\mu\text{mol/Kg}$ (SÁNCHEZ e MORENO, 1999).

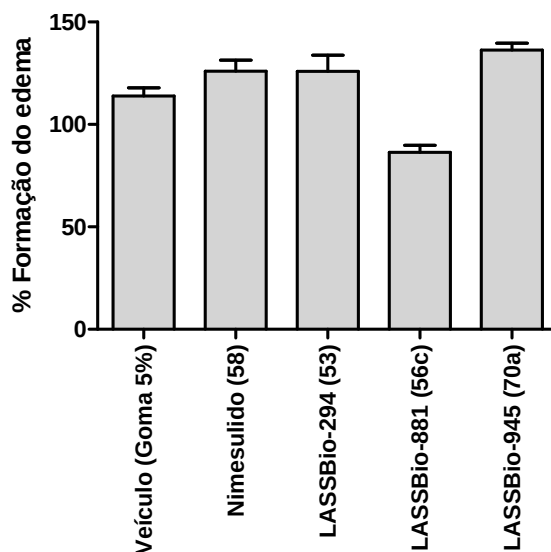
O edema de orelha induzido por TPA caracteriza-se pelo fato de apresentar uma importante participação de produtos da via da 5-LO, sendo inibido por antiinflamatórios esteroidais, *e.g.* dexametasona, e por inibidores seletivos de 5-LO, *e.g.* zileuton. Os inibidores seletivos de COX-2 não apresentam atividade significativa no edema de orelha induzido por TPA, porém no edema de orelha induzido por AA são capazes de inibi-lo quase totalmente (SÁNCHEZ e MORENO, 1999).

Os resultados obtidos com os derivados LASSBio-881 (**56c**), LASSBio 930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**) estão descritos na Tabela 5 e nos Gráficos 3 e 4, a seguir.

Tabela 5 – Perfil antiinflamatório dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**) no ensaio de edema de orelha induzido por TPA e AA

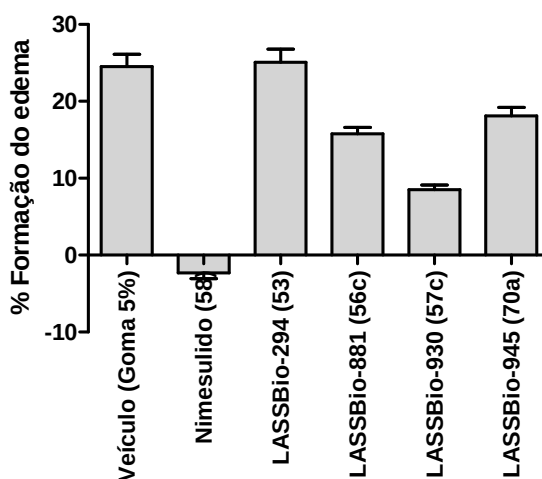
Composto	Dose ($\mu\text{mol/Kg}$)	Edema de orelha induzido por TPA			Edema de orelha induzido por AA		
		n ^a	Formação do Edema ^b (%)	Inibição (%)	n	Formação do Edema ^b (%)	Inibição (%)
Veículo	---	12	113.9 $\pm$ 14.0	---	13	24,5 $\pm$ 5.8	---
58 Nimesulido	300	6	126.0 $\pm$ 13.4	-10.6 <i>n.s.</i> ^c	9	-2.3 $\pm$ 2.3	100*
53 LASSBio-294	300	6	125.9 $\pm$ 19.4	-10.5 <i>n.s.</i>	10	25.1 $\pm$ 5.3	-1.6 <i>n.s.</i>
56c LASSBio-881	300	6	86.4 $\pm$ 8.5	24.1 <i>n.s.</i>	14	15.8 $\pm$ 3.0	36.0 <i>n.s.</i>
57c LASSBio-930	300	---	---	---	14	8,5 $\pm$ 2,3	65,3*
70a LASSBio-945	300	6	136.3 $\pm$ 8.4	-19.6 <i>n.s.</i>	9	18.1 $\pm$ 3.3	26.7 <i>n.s.</i>

^anúmero de animais; ^bresultados expressos em média $\pm$ SEM; ^cnão significativo; * $p < 0,05$ (ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).



300 μ mol/kg v.o.; n=6-14 animais; *p<0,05 em relação ao controle (veículo)

Gráfico 3 – Avaliação da atividade antiedematogêncica dos compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) no modelo de edema de orelha induzido por éster de forbol (TPA) em camundongos. Os resultados estão expressos em porcentagem de formação do edema (média $\pm$ erro padrão da média) e correspondem à leitura na 6^a hora após a indução do estímulo inflamatório por administração tópica de TPA. O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Dunnet.



300 μ mol/kg v.o.; n=6-14 animais; *p<0,05 em relação ao controle (veículo)

Gráfico 4 – Avaliação da atividade antiedematogêncica dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) em camundongos. Os resultados estão expressos em porcentagem de formação do edema (média $\pm$ erro padrão da média) e correspondem à leitura na 1^a hora após a indução do estímulo inflamatório por administração tópica de AA. O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Dunnet.

Os resultados obtidos mostraram que os compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) não foram capazes de inibir significativamente ambos os edemas de orelha induzidos por TPA ou AA. Contudo, LASSBio-930 (**57c**) foi capaz de inibir em 56,5% o edema de orelha induzido por AA. Estes resultados sugerem que LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**57c**) não exercem suas atividades antiinflamatórias interferindo com a cascata do AA, enquanto LASSBio-930 (**57c**) parece estar atuando diretamente nesta via bioquímica. Esta constatação levou-nos a inferir que os compostos selecionados parecem apresentar distintos mecanismos de ação antiinflamatória.

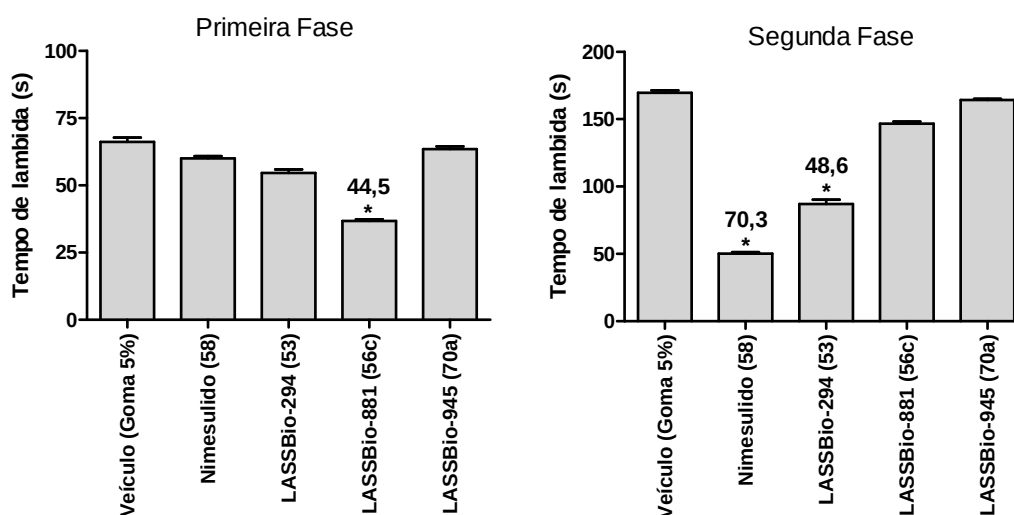
Alguns dos mediadores químicos do processo inflamatório, *e.g.* eicosanóides, são capazes de ativar e sensibilizar os nociceptores, conduzindo a uma resposta hiperalgésica (WILLIAMS, KOWALUK e ARNERIC, 1999). Neste contexto, além do perfil antiinflamatório dos derivados selecionados LASSBio-881 (**56c**), LASSBio 930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**), decidimos avaliar também sua atividade analgésica, primeiramente, no ensaio de dor induzida por formalina em camundongos (HUNSKAAR *et al.*, 1987). Este modelo é inespecífico e permite a distinção da dor neurogênica e da dor inflamatória, através da inferência do efeito analgésico em duas fases temporais (HUNSKAAR *et al.*, 1987).

Na Tabela 6 e nos Gráficos 5 e 6 seguintes, apresentam-se os resultados obtidos para os compostos LASSBio-881 (**56c**), 945 (**70a**) e LASSBio-930 (**57c**) neste modelo.

Tabela 6 – Ensaio de dor induzida por formalina em camundongos para os compostos **(56c)**, **(70a)** e **(57c)**

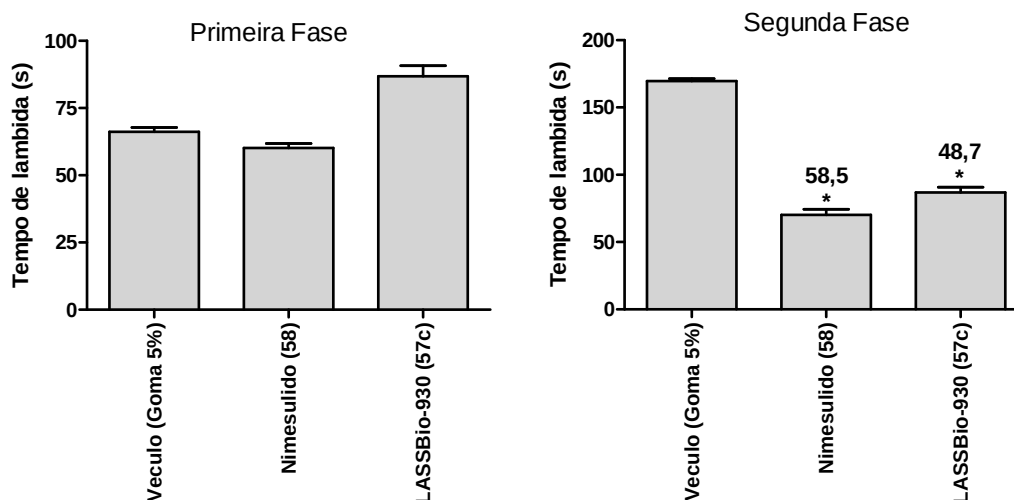
Composto	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	n	1ª fase (neurogênica) Tempo (s)	% Inibição 1ª fase	2ª fase (inflamatória) Tempo (s)	% Inibição 2ª fase
Goma 5%	---	10	66,2 $\pm$ 5,0	---	169,5 $\pm$ 6,0	---
58 Nimesulido	100	7	60,0 $\pm$ 2,3	9,3 n.s.	50,3 $\pm$ 2,6	70,3*
53 LASSBio-294	100	10	54,6 $\pm$ 4,3	17,9 n.s.	87,1 $\pm$ 9,8	48,6*
56c LASSBio-881	100	8	36,8 $\pm$ 1,7	44,5*	146,8 $\pm$ 4,0	13,4 n.s.
70a LASSBio-945	100	8	63,5 $\pm$ 3,0	4,1 n.s.	164,2 $\pm$ 2,6	3,1 n.s.
58 Nimesulido	300	7	60,2 $\pm$ 4,4	9,0 n.s.	70,3 $\pm$ 11,1	58,5*
57c LASSBio-930	300	8	86,9 $\pm$ 11,1	16,3 n.s.	86,9 $\pm$ 11,1	48,7*

n = nº de animais; resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média; *p<0,001 Anova One Way seguido do teste de Dunnet. n.s. = não significativo.



100 $\mu\text{mol/Kg}$, v.o.; n = 7-10 animais; *p<0,001 em relação ao controle (veículo)

Gráfico 5 – Avaliação da atividade analgésica dos compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) no modelo de dor induzida por formalina em camundongos. Os resultados estão expressos em tempo de lambida da pata (média $\pm$ erro padrão da média) e correspondem às leituras nos intervalos de 0-5 minutos (primeira fase) e 15-30 minutos (segunda fase) após a indução do estímulo doloroso por injeção intraplantar de formalina. O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Dunnet.



300 μ mol/Kg, v.o.; n = 7-10 animais; *p<0,001 em relação ao controle (veículo)

Gráfico 6 – Avaliação da atividade analgésica do composto LASSBio-930 (**57c**) no modelo de dor induzida por formalina em camundongos. Os resultados estão expressos em tempo de lambida da pata (média $\pm$ erro padrão da média) e correspondem às leituras nos intervalos de 0-5 minutos (primeira fase) e 15-30 minutos (segunda fase) após a indução do estímulo doloroso por injeção intraplantar de formalina. O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Dunnet.

Diante dos resultados obtidos, constatou-se que os compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) foram capazes de promover ação analgésica, embora com perfis distintos, *i.e.* LASSBio-881 (**56c**) apresentou atividade analgésica na fase neurogênica do modelo, enquanto LASSBio-930 (**57c**) apresentou seu perfil analgésico durante a fase inflamatória, de forma semelhante ao protótipo nimesulido (**58**). Os resultados acima sugerem, portanto, que os mecanismos de ação analgésica de LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) são distintos. Ademais, o composto LASSBio-945 (**70a**) não demonstrou caráter analgésico, indicando preliminarmente que a presença do grupo nitro em C-6 pode ser relevante para a atividade analgésica nesta classe de derivados.

Com o intuito de se verificar, mais especificamente, a ação analgésica central dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-930 (**57c**) e LASSBio-945 (**70a**), estes foram submetidos ao ensaio da placa quente em

camundongos (KURAISHI *et al.*, 1983), modelo onde as substâncias com atividade analgésica central, e.g. morfina, são capazes de aumentar o tempo de latência do animal na placa quente. Os resultados obtidos estão apresentados nos Gráficos 7 e 8.

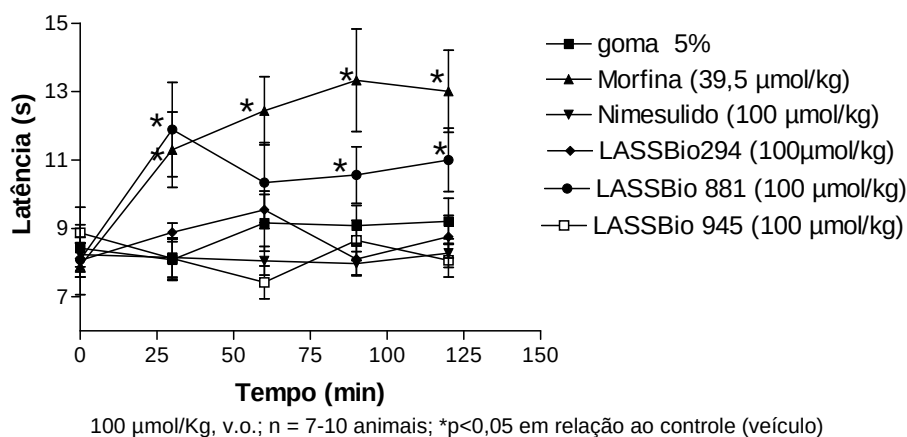


Gráfico 7 – Avaliação da atividade analgésica central dos compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) no ensaio da placa quente em camundongos. Os resultados estão expressos em tempo de latência do animal sobre a placa (média ± erro padrão da média) e correspondem às leituras nos tempos 0 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração dos compostos por via oral. O método estatístico utilizado para a análise dos resultados foi o teste *t* de Student.

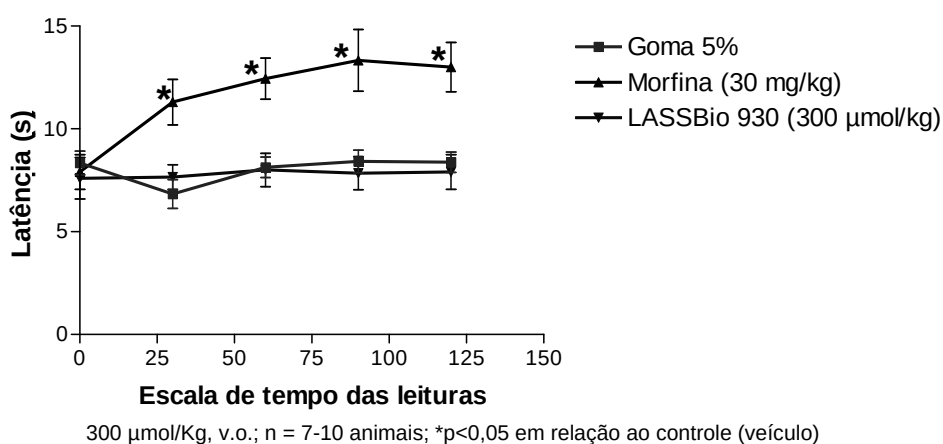


Gráfico 8 – Avaliação da atividade analgésica central do composto LASSBio-930 (**57c**) no ensaio da placa quente em camundongos. Os resultados estão expressos em tempo de latência do animal sobre a placa (média ± erro padrão da média) e correspondem às leituras nos tempos 0 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração dos compostos por via oral. O método estatístico utilizado para a análise dos resultados foi o teste *t* de Student.

Os resultados demonstraram que apenas o composto LASSBio-881 (**56c**) foi capaz de induzir analgesia central neste modelo, na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$. O fato de LASSBio-930 (**57c**) não ter apresentado atividade significativa no ensaio da placa quente, mesmo na dose de 300 $\mu\text{mol/Kg}$ (Gráfico 8), também está coerente com os resultados anteriores obtidos no ensaio de dor induzida por formalina. A atividade antinociceptiva central de LASSBio-881 (**56c**), confirmada pelo ensaio da placa quente, indica a ação deste composto ao nível do sistema nervoso central, sugerindo mais uma vez a distinção dos mecanismos de ação para os derivados LASSBio-881 (**56c**) e seu análogo não-nitrado LASSBio-945 (**70a**).

3.2.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL INIBITÓRIO DOS COMPOSTOS LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) SOBRE A ISOFORMA COX-1⁷:

Visando a elucidação do mecanismo de ação antiinflamatória e analgésica dos compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**), os mesmos foram submetidos ao ensaio de inibição da COX-1 descrito por PATRIGNANI e colaboradores (1994). Este ensaio baseia-se na medição dos níveis de tromboxana B₂ (TXB₂) em sangue humano total como função indireta da atividade da COX-1 de plaquetas. Substâncias capazes de inibir a COX-1 também inibem a produção de TXB₂ neste modelo. Este experimento emprega sangue coagulado espontaneamente e após incubação, dosam-se os níveis de

⁷ Estudo realizado pelo aluno de doutoramento Jorge Luiz Mendonça Tributino, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

TXB₂ proveniente quase exclusivamente de COX-1 das plaquetas. Já para se verificar o efeito inibitório sobre a COX-2, adiciona-se lipopolissacarídeo (LPS) ao sangue o que estimula a expressão de COX-2 proveniente de monócitos, dosando-se em seguida os níveis de PGE₂ ou TXB₂ (BRIDEAU *et al.*, 1996). O Gráfico 9 apresenta os resultados de obtidos para a dosagem de TXB₂ oriundo de COX-1 de plaquetas humanas.

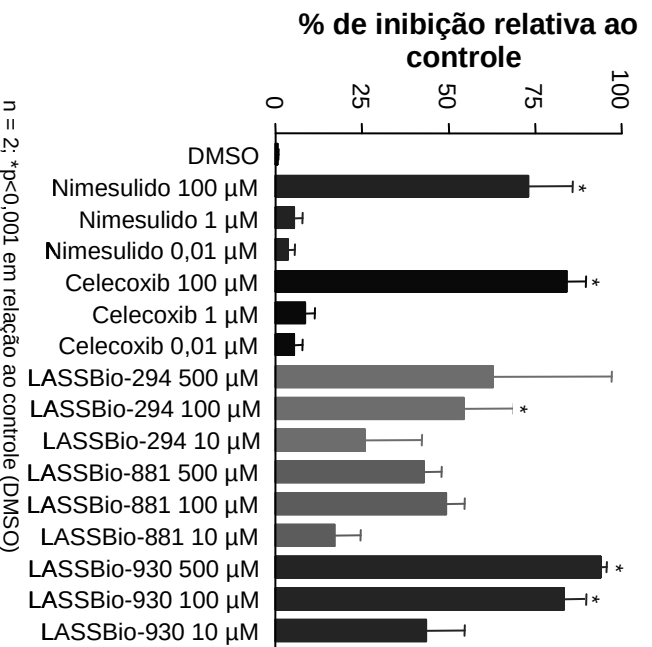


Gráfico 9 – Avaliação do perfil inibitório da produção de TXB₂ em sangue humano total não-estimulado para nimesulido (**58**), celecoxib (**34**), LASSBio-294 (**53**), LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**). Os resultados estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (DMSO) (média ± erro padrão da média). O método estatístico ANOVA One Way foi utilizado para a análise dos resultados, seguido do teste de Dunnett.

Os resultados do Gráfico 9 mostraram que os compostos LASSBio-294 (**53**) e LASSBio-930 (**57c**) foram capazes de inibir a produção de TXB₂ proveniente de plaquetas apenas na concentração de 100 µM, com perfil semelhante aos inibidores seletivos de COX-2, nimesulido (**58**) e celecoxib

(**34**), utilizados como padrões. O composto LASSBio-881 (**56c**), mesmo na maior concentração testada, *i.e.* 500 μM , não foi capaz de inibir significativamente a COX-1. Estes resultados estão em coerência com aqueles verificados anteriormente em modelos *in vivo*, que sugerem diferentes mecanismos de ação analgésica e antiinflamatória para LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**).

Foram também obtidos valores de IC_{50} (Tabela 7) para os compostos nimesulido (**58**), celecoxib (**34**), LASSBio-294 (**53**) e LASSBio-930 (**57c**). Todos os compostos testados inibiram de maneira concentração-dependente a produção de TXB_2 em sangue humano total coagulado espontaneamente. O composto LASSBio-930 (**57c**) apresentou IC_{50} de 2,9 μM , sendo o mais potente na inibição da COX-1 de plaquetas dentre os compostos testados. Este resultado obtido para o composto LASSBio-930 (**57c**) foi ratificado pelo ensaio de agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico em plasma rico em plaquetas de coelhos (Tabela 8).

Tabela 7 – Concentrações inibitórias de 50% da atividade máxima (IC_{50}) para os compostos nimesulido (**58**), celecoxib (**34**), LASSBio-294 (**53**) e LASSBio-930 (**57c**) no ensaio de dosagem de TXB_2 em sangue total humano não estimulado (COX-1)

Composto	IC_{50} COX-1(μM)
58 Nimesulido	72,2
34 Celecoxib	48,3
53 LASSBio-294	63,0
57c LASSBio-930	2,9

Tabela 8 – Efeito dos compostos nimesulido (**58**), celecoxib (**34**), LASSBio-294 (**53**), LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) na agregação plaquetária induzida por AA em plasma rico em plaquetas de coelho

Composto	Concentração (μM)	% de agregação	% de inibição
Controle	---	71,1 ± 3,0	---
DMSO	---	70,2 ± 3,2	1,3 n.s.
58 Nimesulido	1	72,3 ± 7,2	-1,6 n.s.
58 Nimesulido	10	69,3 ± 7,0	2,5 n.s.
58 Nimesulido	25	75,6 ± 4,7	-6,3 n.s.
58 Nimesulido	50	0,0 ± 0,0	100*
58 Nimesulido	100	0,0 ± 0,0	100*
34 Celecoxib	1	76,6 ± 8,0	-7,7 n.s.
34 Celecoxib	10	75,0 ± 4,9	-5,5 n.s.
34 Celecoxib	25	76,0 ± 4,5	-6,8 n.s.
34 Celecoxib	50	0,0 ± 0,0	100*
34 Celecoxib	100	0,0 ± 0,0	100*
56c LASSBio-881	1	72,0 ± 2,1	-1,2 n.s.
56c LASSBio-881	10	79,6 ± 3,8	-11,9 .s.
56c LASSBio-881	25	56,5 ± 28,2	20,5 n.s.
56c LASSBio-881	50	0,0 ± 0,0	100*
56c LASSBio-881	100	0,0 ± 0,0	100*
57c LASSBio-930	1	82,8 ± 4,5	-16,4 n.s.
57c LASSBio-930	2,5	57,0 ± 29,5	19,8 n.s.
57c LASSBio-930	5	0,0 ± 0,0	100*
57c LASSBio-930	10	0,0 ± 0,0	100*
57c LASSBio-930	50	0,0 ± 0,0	100*
57c LASSBio-930	100	0,0 ± 0,0	100*

Resultados expressos em média ± erro padrão da média de 3 experimentos;
*p<0,001 Anova One Way seguido do teste de Dunnet; n.s. - não significativo

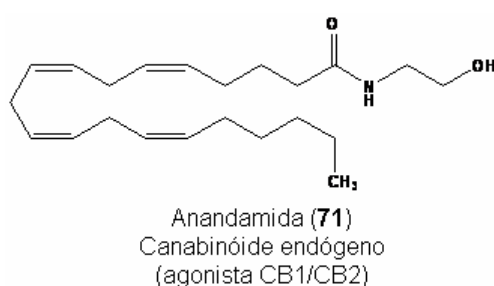
As plaquetas são células derivadas da fragmentação do citoplasma de megacariócitos que não apresentam núcleos. Os seus conteúdos enzimáticos encontram-se pré-formados não sendo este tipo celular capaz de realizar síntese protéica e expressam constitutivamente a isoforma 1 da COX (GEIGER, 2001). O composto LASSBio-930 (**57c**) foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por AA em concentrações próximas àsquelas obtidas no ensaio de seletividade para a COX-1. O valor de IC_{50} para o composto LASSBio-930 (**57c**), neste ensaio, pôde ser estimado entre 2,5 e 5 μM , muito próximo da IC_{50} obtida no ensaio para COX-1 em sangue humano total, *i.e.* 2,9 μM .

Além dos efeitos sobre a COX-1, esses compostos também foram estudados frente à isoforma 4 da enzima fosfodiesterase (PDE-4)⁸, envolvida nos processos inflamatórios (HOUSLAY, SCHAFER e ZHANG, 2005; LUGNIER, 2006). Todavia, LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) não foram capazes de inibir a ação desta enzima na concentração de 10 μM , apresentando porcentagens de inibição inferiores a 2%. Esses resultados corroboram o fato de LASSBio-930 (**57c**) poder atuar seletivamente sobre a cascata do AA, mais especificamente na enzima COX. Por outro lado, para o derivado LASSBio-881 (**56c**), verificou-se que sua ação analgésica e antiinflamatória observada *in vivo* não pode ser relacionada à inibição de enzimas da cascata do AA ou da PDE-4.

De acordo com os resultados farmacológicos disponíveis, foi possível constatar que LASSBio-881 (**56c**) foi capaz de promover efeitos antiinflamatórios periféricos no modelo de edema de pata de rato e analgésico

⁸ Estudo realizado em colaboração com a Dra. Claire Lugnier (CNRS/Faculté de Pharmacie – ULP Strasbourg I, França).

central, nos modelos de hiperalgesia induzida por formalina e da placa quente. Apesar do perfil de bioatividade de LASSBio-881 (**56c**) não poder ser correlacionado à inibição de enzimas da cascata do AA, este composto apresentou perfis de atividade *in vivo* semelhantes àqueles do endocanabinóide anandamida (AEA) (**71**) (Esquema 16), nos modelos de edema de pata de rato induzido por carragenina e hiperalgesia induzida por formalina em camundongos, conforme descrito por CALIGNANO *et al.* (1998) e RICHARDSON *et al.* (1998), o que motivou a realização de bioensaios para a avaliação do perfil de ligação do derivado LASSBio-881 (**56c**) frente aos receptores canabinóides, nos modelos descritos a seguir.



Esquema 16 – Anandamida

3.2.3. AVALIAÇÃO DO DERIVADO LASSBio-881 (**56c**) FRENTE AOS RECEPTORES CANABINÓIDES⁹:

O papel do sistema endocanabinóide no controle da dor (CALIGNANO *et al.*, 1998) e da inflamação (RICHARDSON *et al.*, 1998) vem

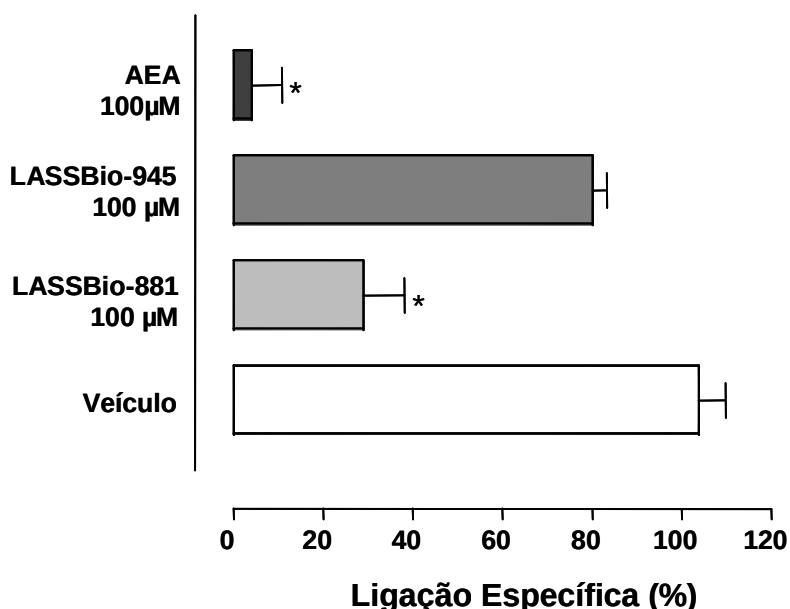
⁹ Estudo realizado pela MSc Marina Vieira Martins, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ, e pelos Profs. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira (LaFI – UFAL), Dr. Juliano Ferreira (UFSM) e Dr. João B. Calixto (UFSC).

sendo amplamente descrito na literatura e são decorrentes do agonismo parcial da anandamida (AEA) (**71**) (Esquema 16) e outros endocanabinóides sobre os receptores canabinóides CB1 e CB2, expressos principalmente no cérebro e em células do sistema imune, respectivamente, bem como em receptores vanilóides (VR1) (HOWLET *et al.*, 2002). Apesar da ativação dos receptores CB1 levar aos efeitos indesejados relacionados ao consumo da “maconha” (*Cannabis sativa*), a aplicação terapêutica de agonistas CB1 é promissora para o tratamento de acidentes vasculares cerebrais, dor e glaucoma. Por outro lado, a ausência de tais efeitos psicotrópicos no agonismo seletivo de receptores CB2 tem chamado a atenção dos Químicos Medicinais para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos analgésicos e antiinflamatórios (LAMBERT e FOWLER, 2005). A ampla diversidade estrutural de agonistas canabinóides naturais e sintéticos não permitiu até o momento a eleição de um farmacóforo comum, pois as relações entre as estruturas químicas e a atividade agonista sobre os receptores canabinóides não foi ainda adequadamente estabelecida (LAMBERT e FOWLER, 2005).

Outras enzimas envolvidas na resposta inflamatória hiperalgésica, *i.e.* COX e LOs, também são capazes de converter AEA (**71**) em produtos oxidados, *i.e.* prostamidas, que também podem se ligar a receptores canabinóides (HAMPSON *et al.*, 1995; KOZAK *et al.*, 2000; CRAIB *et al.*, 2001; VAN DER STELT *et al.*, 2002; VELDHUIS *et al.*, 2003), demonstrando a conexão entre estas janelas bioquímicas no controle do processo inflamatório.

O perfil de ligação específica *in vitro* de LASSBio-881 (**56c**) em receptores CB1 foi avaliado em homogenato de cérebro de camundongos frente ao ligante [³H]SR141716A (ABOOD *et al.*, 1997) e os resultados estão

ilustrados no Gráfico 10. LASSBio-881 (**56c**) foi capaz de deslocar em 71% o radioligante, na concentração de 100 μ M, enquanto o mesmo não ocorreu para o derivado não-nitrado LASSBio-945 (**70a**), o qual só foi capaz de deslocar o radioligante em ca. 20%, na mesma concentração, em coerência com seus respectivos perfis analgésicos *in vivo*. Com esses resultados, podemos postular que LASSBio-881 (**56c**) apresentou uma ação analgésica devido, provavelmente, à sua ligação em receptores CB1, mostrando o mesmo perfil de atividade da AEA (**71**).

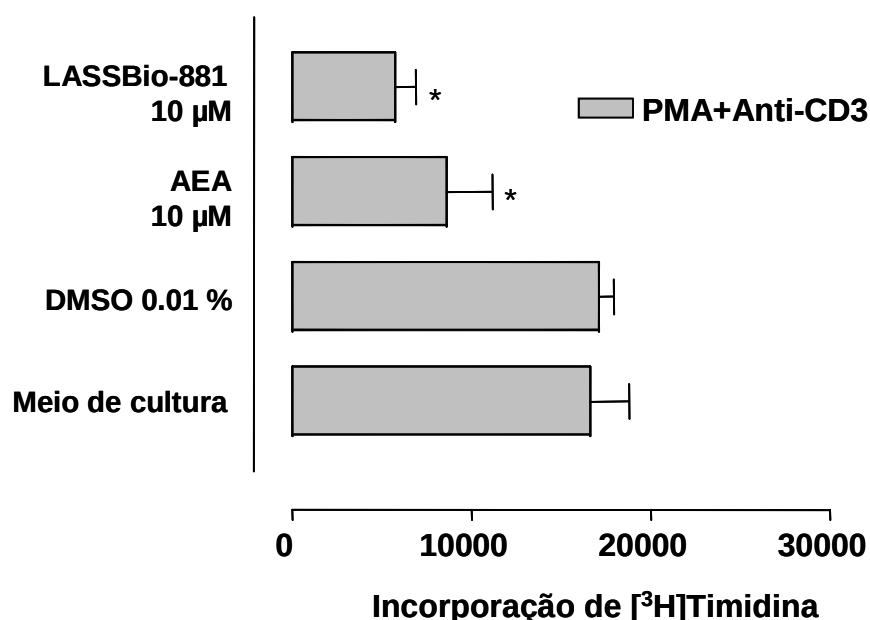


100 μ M; n = 5 animais por grupo; *p<0,01 em relação ao grupo controle (veículo).

Gráfico 10 – Avaliação do perfil de ligação específica dos compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) no ensaio de ligação específica ao receptor CB1 em homogenato de cérebro de camundongos. Os resultados estão expressos em porcentagem de ligação específica, frente ao ligante [3 H]SR141716A (média $\pm$ erro padrão da média). O método estatístico utilizado para a análise dos resultados foi o teste de *t* de Student.

Com o intuito de verificar o perfil de ligação de LASSBio-881 (**56c**) com os receptores CB2, investigou-se o perfil imunomodulador deste derivado frente à proliferação de linfócitos T esplênicos ativados (JULIUS *et al.*, 1973;

HIRATA *et al.*, 2003). O efeito do endocanabinóide AEA (**71**) neste modelo resulta na redução significativa da taxa de crescimento celular, através de sua ação sobre os receptores CB2 presentes nos linfócitos (MACCARRONE e FINAZZI-AGRÓ, 2003). O Gráfico 11 demonstra a inibição da proliferação de linfócitos por LASSBio-881 (**56c**), sugerindo que possa ser mediada por ação sobre receptores CB2, uma vez que AEA (**71**), utilizado como padrão neste ensaio, apresentou o mesmo perfil de modulação. Por outro lado, LASSBio-881 (**56c**) não foi capaz de induzir apoptose, em contraste com os resultados obtidos para AEA (**71**) (MACCARRONE e FINAZZI-AGRÓ, 2003) (Tabela 9), demonstrando sua capacidade de prevenir a proliferação linfocitária sem provocar morte celular, provavelmente através de sua ação sobre os receptores CB2.



10 µM; n = 3 experimentos (triplicata); *p<0,01 em relação ao grupo controle (veículo).

Gráfico 11 – Avaliação do perfil inibitório sobre a proliferação de linfócitos pelos compostos AEA (**71**) e LASSBio-881 (**56c**). Os resultados foram medidos a partir da incorporação de [³H]Timidina (média ± erro padrão da média). O método estatístico utilizado para a análise dos resultados foi o teste de *t* de Student.

Tabela 9 – Perfil necrótico e apoptótico de linfócitos T modulados pela ação dos compostos AEA (**71**) e LASSBio-881 (**56c**)

Tratamento	% Necrose (7-AAD ^a)	%Apoptose (Anexina V ^b)
Controle	0,3%	42%
Anti-CD3	0,1%	39%
Anti-CD3 + AEA (71) 10 µM	0,1%	50,8%*
Anti-CD3 + LASSBio-881 (56c) 10 µM	0,0%	43,8%

Cada ponto representa determinações em triplicate e os resultados foram baseados em, no mínimo, três experimentos independentes (média ± SEM). *p<0,01 (teste *t* de Student) comparado ao grupo controle (anti-CD3). ^a7-AAD = 7-amino-actinomicina D, marcador de necrose celular; ^bmarcador de apoptose celular.

A AEA (**71**) foi capaz de promover a indução de apoptose por ativação de receptores vanilóides (MACCARRONE *et al.*, 2000) e canabinóides, sendo que por ativação destes últimos, a apoptose ocorre pelo aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular, por intermédio da via mitocondrial que promove o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MACCARRONE e FINAZZI-AGRÓ, 2003). Os resultados ilustrados na Tabela 9 parecem demonstrar que LASSBio-881 (**56c**) atua de maneira seletiva sobre os receptores canabinóides, sem ação sobre os receptores vanilóides; ou ainda, seu possível efeito antioxidante (vide *infra*) estaria inibindo a via pró-apoptótica mitocondrial, por reduzir os níveis mitocondriais de ROS.

3.2.4. AVALIAÇÃO DOS PERFIS ELETROQUÍMICO E ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO LASSBio-881 (**56c**)¹⁰:

Em consequência da resposta inflamatória, há a produção maciça de espécies reativas de oxigênio (ROS), que vêm sendo reconhecidas recentemente como verdadeiros sinalizadores intracelulares (DI VIRGILIO, 2004) e desempenhando importante papel em desordens do sistema nervoso central, e.g. injúria pós-isquêmica, doença de Alzheimer, demência pré-senil (CHONG, LI e MAIESE, 2005). O nimesulido (**58**) foi recentemente descrito como neuroprotetor em modelos *in vivo* e *in vitro* e sua atividade se deve tanto a sua ação antiinflamatória quanto a suas propriedades antioxidantes (CANDELARIO-JALIL *et al.*, 2002; CANDELARIO-JALIL *et al.*, 2003; CANDELARIO-JALIL e LÉON, 2003).

Os derivados *N*-acilidrazônicos descobertos no LASSBio como protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e antitrombóticos (FRAGA *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004), também são capazes de mimetizar a subunidade bis-álílica de ácidos graxos insaturados e seus derivados, como o ácido araquidônico (AA), precursor da biossíntese de eicosanóides, e AEA (**71**), envolvido no sistema endocanabinóide (BARREIRO *et al.*, 2002; MAHY, GASPARD e MANSUY, 1993), devido a sua capacidade estabilizadora de radicais.

Pelo exposto, a fim de investigarmos as contribuições relativas dos grupos nitro em C-6, 3,5-di-*terc*-butil-4-hidróxifenila e NAH em relação ao

¹⁰ Estudo realizado em colaboração com Prof. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart (UFAL), Prof. Dra. Ana Luísa Palhares de Miranda (LASSBio-UFRJ), Dr. Fernando Dutra e Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara (USP).

eventual caráter redox dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**), estudamo-los eletroquimicamente, utilizando-se a técnica da voltametria cíclica (VC), em meio aprótico (DMF, TBAP 0,1 mol L⁻¹), com eletrodos de carbono vítreo (eletrodo de trabalho) e Ag|AgCl, Cl⁻ 0,1 mol L⁻¹ (eletrodo de referência) (CAVALCANTI *et al.*, 2004). Os valores dos potenciais de pico catódico e anódico obtidos para a primeira etapa de redução (E_{pc1}) e oxidação (E_{pa1}), respectivamente, com velocidade de varredura de 0,1 V/s, estão ilustrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados eletroquímicos dos derivados LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**)^a

Composto	Potenciais de pico	
	E_{pc1} (V)	E_{pa1} (V)
56c LASSBio-881	-1,20	+1,04
56d LASSBio-882	-1,02	<i>n.d.*</i>
70a LASSBio-945	-2,07	+0,84

^a Dados obtidos por voltametria cíclica (VC), com velocidade de varredura de 0,1 V/s, em potenciostato / galvanostato BAS 100B, interfaceado a microcomputador. *não determinado

Em termos eletroquímicos, o derivado LASSBio-881 (**56c**) representa um composto de eletroatividade mista, devido à presença do grupamento nitroaromático, passível de ser reduzido e da subunidade fenólica estericamente impedida, que pode sofrer oxidação, ambos interconectados pela função NAH. O estudo de seus análogos, *i.e.* LASSBio-882 (**56d**), desprovido do grupo fenol e LASSBio-945 (**70a**), derivado não-nitrado, foi útil

na elucidação das propriedades eletroquímicas de cada grupamento *per-se*. Os dados da Tabela 9 mostraram que LASSBio-881 (**56c**) apresentou um perfil redox complexo, conforme evidenciado pela presença de picos em ambas as regiões catódica e anódica. Conforme observado para o derivado LASSBio-945 (**70a**) ($E_{pc1} = -2,07$ V), a subunidade NAH também constitui-se em grupo passível de sofrer redução (LUND, 2001). Em contrapartida, a contribuição deste grupo para o potencial de redução de ambos os compostos LASSBio-881 (**56c**) ($E_{pc1} = -1,02$ V) e LASSBio-882 (**56d**) ($E_{pc1} = -1,20$) foi suplantada pela presença do grupamento nitro em C-6 mais facilmente reduzido (LUND, 2001). Ao se comparar os valores de E_{pc1} de LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-882 (**56d**), referentes à redução do grupo nitroaromático, evidenciou-se a influência do efeito doador de elétrons da subunidade fenólica na nitroredução, dificultando-a ($\Delta E_{pc1} = 0,18$ V), o que implica na assistência da função NAH. Efeitos semelhantes foram observados na região anódica, onde foi possível a identificação dos picos anódicos (E_{pa1}) para os derivados LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**), com valores iguais a +1,04 V e +0,84 V, respectivamente, e com $\Delta E_{pa1} = 0,20$ V, uma vez que LASSBio-881 (**56c**) apresentou maior resistência à oxidação, provavelmente devido ao efeito retirador de elétrons do grupo nitro (MORROW, 2001). Tal fenômeno não é surpreendente, já que os processos eletroquímicos envolvendo adição ou remoção de elétrons de um composto orgânico, correlacionam-se diretamente com a habilidade de seus respectivos substituintes em apresentar perfil doador ou retirador de elétrons (LUND, 2001; MORROW, 2001).

Para a avaliação do perfil antioxidante do composto LASSBio-881 (**56c**), foi realizado primeiramente o ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila)

(BRAND-WILLIAMS, CURVELIER e BERSET, 1995), que mede a capacidade doadora de radical hidrogênio de substâncias antioxidantes, convertendo o radical estável de nitrogênio DPPH em seu derivado 1,1-difenil-2-picrilidrazina. A reação é acompanhada por mudança em sua coloração, passando de violeta a amarelo, e é monitorada espectrofotometricamente. O BHT (*terc*-butilidroxitolueno) foi utilizado como antioxidante de referência e os resultados estão ilustrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Ensaio do DPPH para os derivados LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**)

Composto	Concentração (mM)	Absorbância	Seqüestramento (%)
Veículo	---	1,082	---
BHT	0,1	0,163	84,9*
56c LASSBio-881	0,1	0,736	32,0*
56d LASSBio-882	0,1	1,001	7,49 <i>n.s.</i> [#]
70a LASSBio-945	0,1	0,628	45,7*

* $p < 0,01$ ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet; [#]não significativo.

LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-945 (**70a**) foram capazes de seqüestrar radicais na experiência realizada com DPPH em 32,0% e 45,7%, respectivamente, em concentração de 0,1 mM, devido à presença da subunidade 3,5-di-*terc*-butil-4-hidróxifenila em suas estruturas, enquanto que LASSBio-882 (**56d**), possuindo um substituinte fenila na unidade distal imínica, não foi ativo (7,5% *n.s.*). Estes resultados sugerem que a capacidade doadora de radical hidrogênio da hidroxila do grupo 3,5-di-*terc*-butil-4-hidróxifenila é

imperativamente mais efetiva, em termos de perfil antioxidante, do que o hidrogênio amídico da subunidade NAH, em concordância com os resultados anteriores obtidos na voltametria cíclica.

Com o intuito de verificar o eventual efeito de LASSBio-881 (**56c**) sobre radicais livres formados na biofase, foram realizados ensaios de degradação de desoxirribose mediada por radicais hidroxila (MEINICKE, BECHARA e VERCESI, 1998) e de produção de superóxido pelo sistema xantina/xantina oxidase (FLOHÉ e ÖTTING, 1984) (Tabela 12), empregando o BHT como antioxidante de referência.

Tabela 12 – Atividade antioxidante dos compostos LASSBio-881 (**56c**), LASSBio-882 (**56d**) e LASSBio-945 (**70a**) frente aos radicais hidroxila e superóxido

Composto	Degradação de radicais hidroxila			Degradação de ânions superóxido		
	Concentração (mM)	[TBARS ^a] (μM) ^b	Degradação (%)	Concentração (mM)	Velocidade (ΔA/min)	Degradação (%)
Veículo	---	6,459 ± 0,087	---	---	0,0301	---
BHT	0,5	0,896 ± 0,043	86,1*	<i>n.d.</i> ^c	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
56c LASSBio-881	0,5	0,997 ± 0,085	84,6*	0,25	0,0310	-2,9 <i>n.s.</i> ^d
56d LASSBio-882	0,5	1,083 ± 0,013	83,2*	0,25	0,0242	19,6 <i>n.s.</i>
70a LASSBio-945	0,5	0,954 ± 0,062	85,2*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

^aEspécies reativas do ácido tiobarbitúrico; ^bresultados expressos em média ± erro padrão da média; ^cnão determinado; ^dnão significativo estatisticamente; *p<0.01 ANOVA One Way followed by Dunnet test.

O derivado LASSBio-881 (**56c**) foi capaz de reduzir os níveis de radicais hidroxila em 84,6%, medidos sob a forma de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), assim como os outros compostos, na mesma magnitude do antioxidante de referência, *i.e.* BHT. Podemos constatar

notoriamente que a presença dos grupos 6-nitro e 3,5-di-*terc*-butil-4-hidróxifenila neste composto não influenciaram diretamente o efeito antioxidante observado, sugerindo que a subunidade NAH desempenhe importante papel na estabilização de radicais de oxigênio bioformados, conforme descrito anteriormente (BARREIRO *et al.*, 2002; MAHY, GASPARD e MANSUY, 1993). Por outro lado, os níveis de ânions superóxidos permaneceram inalterados frente aos compostos testados, sugerindo a especificidade de LASSBio-881 (**56c**) na estabilização de radicais livres, em detrimento de sua ação sobre ânions-radicaís.

Uma vez caracterizado o perfil antioxidante de LASSBio-881 (**56c**), é possível associá-lo à ausência de efeito indutor de apoptose no modelo de proliferação de linfócitos (MACCARRONE e FINAZZI-AGRÓ, 2003).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos concluir que a estratégia adotada para o planejamento estrutural dos compostos **(56)** e **(57)** logrou sucesso, visto que foi possível obterem-se novos protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, ativos em modelos *in vivo*, administrados por via oral. A metodologia empregada na obtenção dos compostos das séries de novos derivados NAH **(56)** e **(57)** se mostrou satisfatória, aplicando-se metodologias clássicas, sendo sintetizadas em rendimentos globais que variaram de 23 a 42%, a partir do safrol **(60)**, produto natural abundante da flora brasileira. Os derivados da série **(56)** foram obtidos como misturas diastereoisoméricas, apresentando predominância do isômero *E*, enquanto a obtenção dos compostos da série **(57)** foi diastereosseletiva, assim como descrito anteriormente para o protótipo LASSBio-294 **(53)**. O estudo conformacional dos derivados representativos de cada série **(56-57)** e de seus respectivos intermediários sintéticos foi realizado e contribuiu para a racionalização da diastereosseletividade observada.

A avaliação farmacológica realizada permitiu a eleição de dois protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, LASSBio-881 **(56c)** e LASSBio-930 **(57c)**, que tiveram seus mecanismos de ação investigados. Evidenciou-se que o derivado LASSBio-930 **(57c)** apresentou importante efeito analgésico e antiinflamatório *in vivo* ($ED_{50} = 166,2 \mu\text{mol/kg}$), com perfil de ação semelhante ao de inibidores seletivos de COX-2 e também se mostrou potente inibidor da produção de eicosanóides *in vitro*, através da inibição da COX [IC_{50}

(COX-1) = 9,2 μ M] e sem ação sobre a PDE-4. Estes resultados demonstraram a importância da introdução da subunidade farmacofórica *N*-metanossulfonilamina em LASSBio-930 (**57c**), presente em inibidores seletivos de COX-2 como o nimesulido (**58**), restando, contudo, determinar-se a seletividade deste derivado sobre as isoformas de COX.

Por sua vez, o derivado LASSBio-881 (**56c**) apresentou importantes efeitos analgésico central e antiinflamatório, mediados provavelmente por sua ação sobre receptores canabinóides, assim como pelo seu perfil antioxidante. Seu perfil de ação foi comparável àquele descrito para o endocanabinóide anandamida (**71**), à exceção do perfil pró-apoptótico, excluindo-se efeitos sobre as enzimas da cascata do AA, assim como sobre a PDE-4. O fato de LASSBio-881 (**56c**) não induzir apoptose pode estar relacionado ao seu diferenciado perfil antioxidante. Ademais, ambas as subunidades nitroaromática e 3,5-di-*tert*-butil-4-hidróxifenila mostraram-se relevantes para seus efeitos *in vivo* e *in vitro*.

Portanto, diante do exposto, constata-se que a otimização das propriedades antiinflamatórias e analgésicas do protótipo LASSBio-294 (**53**) resultou na obtenção de dois novos compostos-protótipos, *i.e.* LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**), demonstrando a importância da estratégia de SOSA para o planejamento racional de novos candidatos a fármacos a partir das NAH, que, por sua vez, podem ser de fato classificadas como *estruturas privilegiadas*.

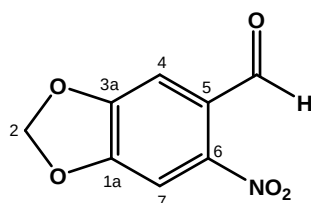
5. PARTE EXPERIMENTAL:

5.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DAS SÉRIES (56-57):

As reações foram rotineiramente monitoradas por cromatografia em camada fina (CCF) em sílica gel (placas F245 Merck) e os produtos visualizados com iodo ou luz ultravioleta (254 and 365 nm). Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram determinados em soluções de $\text{DMSO}-d_6$ com um espectrômetro Bruker AC-200. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em partes por milhão (ppm) a partir do tetrametilsilano como padrão interno, e os valores de constante de acoplamento (J) são dados em Hz. Os espectros da região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Nicolet Magna IR 760. As amostras foram examinadas sob a forma de pastilhas de brometo de potássio. Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Quimis e não foram corrigidos. As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel Merck 230–400 mesh. Todos os produtos descritos apresentaram espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de acordo com as estruturas assinaladas. As soluções orgânicas foram secas sobre sulfato de sódio anidro e os solventes orgânicos foram removidos sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

5.1.1. OBTENÇÃO DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBALDEÍDO (**62**) (EKELEY e KLEMME, 1928):

Em um balão contendo 1g (6,7 mmol) de piperonal triturado, mantido em banho-maria à temperatura ambiente, contendo “septo” acoplado a uma bola de borracha vazia (sistema fechado de alívio da pressão) foram adicionados 3,3 mL de HNO₃ concentrado (d = 1,42 g/mL), observando-se imediata mudança de cor (incolor para amarelo). Após ca. 5 minutos de agitação magnética, observou-se o desprendimento de um gás laranja (NO₂) e o escurecimento da mistura reacional (cor castanha), além de brusco aquecimento, que pôde ser controlado pela adição de gelo ao banho-maria. Observou-se a completa dissolução do material de partida. Após ca. 10 minutos, a mistura foi resfriada em banho de gelo, observando-se a intensa precipitação de um sólido amarelo-claro, que foi filtrado a vácuo e lavado com ca. 200 mL de água destilada gelada. O produto (**62**) foi obtido em 95% de rendimento, após recristalização com etanol/água.

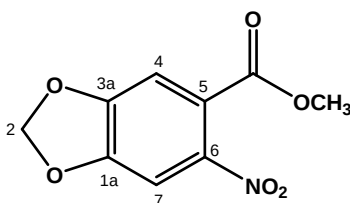


6-nitro-1,3-benzodioxola-5-carbaldeído (62). Sólido amarelo-claro; p.f. 91-92°C (lit. 93-94°C). RMN ¹H (200MHz, DMSO-*d*₆, TMS) δ (ppm): 6,34 (s, 2H, H-2); 7,32 (s, 1H, H-4); 7,74 (s, 1H, H-7); 10,09 (s, 1H, -CHO). RMN ¹³C (50MHz, DMSO-*d*₆, TMS) δ (ppm): 104,9 (C-2); 105,4 (C-7); 107,5 (C-4); 128,0 (C-5);

146,1 (C-6); 151,8 (C-3a); 152,3 (C-1a); 188,6 (C=O). IV ($\nu_{\max}$, KBr) ν (cm^{-1}): 1682, 1518, 1368, 1336, 1126, 1119, 1032, 1021.

5.1.2. OBTENÇÃO DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOXILATO DE METILA (**63**):

Em um balão de 250 mL de capacidade contendo 1,5g (7,7 mmol) de (**62**) suspensos em 10 mL de metanol, foram adicionados 1,3g (23,1 mmol) de hidróxido de potássio solubilizados em 20 mL de metanol. Adicionou-se 2,54 g (10 mmol) de iodo, lavando-se o bécher com mais 30 mL de metanol o que totalizou 60 mL de metanol. A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por 1,5h, quando foi observado o consumo total do aldeído (**62**) de partida. Em seguida, adicionou-se 10 mL de solução saturada de bissulfito de sódio, observando-se o desaparecimento da cor castanha da mistura reacional. A mistura foi filtrada a vácuo e o sólido retido foi lavado com 30 mL de metanol. O filtrado final foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo o produto (**63**) desejado em 88% de rendimento, após recristalização em etanol/água.

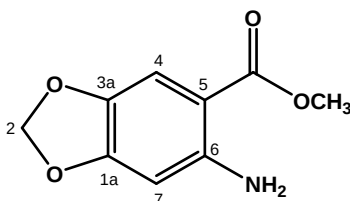


6-nitro-1,3-benzodioxola-5-carboxilato de metila (63). Sólido amarelo-claro; p.f. 102-103°C. RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm): 3,89 (s, 3H, OCH_3); 6,18 (s, 2H, H-2); 7,04 (s, 1H, H-4); 7,38 (s, 1H, H-7). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3 ,

TMS) δ (ppm): 53,5 (OCH_3); 103,8 (C-2); 105,1 (C-7); 108,6 (C-4); 123,9 (C-5); 143,2 (C-6); 149,8 (C-3a); 151,5 (C-1a); 165,9 (C=O). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 1717, 1509, 1488, 1362, 1272, 1108, 1038.

5.1.3. OBTENÇÃO DE 6-AMINO-1,3-BENZODIOXOLA-5- CARBOXILATO DE METILA (**64**):

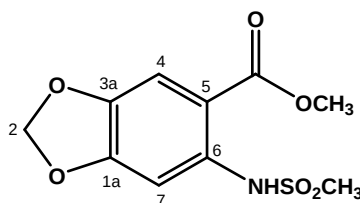
Uma mistura de 1,0g (4,4 mmol) de (**63**), 1,39g (24,9 mmol) de ferro metálico e 0,14g (2,7 mmol) de cloreto de amônio suspensos em 75 ml de etanol:água (2:1) em balão de 250 mL, foi refluxada por 1h. Ao final deste tempo foi detectado o consumo total do material de partida (**63**) por CCF. A mistura reacional foi filtrada sobre Celite[®] ainda quente, e o filtrado foi então evaporado a vácuo, observando-se a precipitação de um sólido amarelo escuro, que após filtração e recristalização em etanol/água forneceu o produto (**64**) desejado em 75% de rendimento.



6-amino-1,3-benzodioxola-5-carboxilato de metila (64). Sólido amarelo escuro; p.f. 175-176°C. RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm): 3,83 (s, 3H, OCH_3); 5,60 (s, 2H, NH_2); 5,89 (s, 2H, H-2); 6,17 (s, 1H, H-4); 7,26 (s, 1H, H-7). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm): 51,3 (OCH_3); 96,8 (C-2); 101,2 (C-7); 102,5 (C-4); 108,5 (C-5); 139,1 (C-6); 148,8 (C-3a); 152,9 (C-1a); 168,2 (C=O).

5.1.4. OBTENÇÃO DE 6-[(METILSULFONIL)AMINO]-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOXILATO DE METILA (**65**):

Em um balão contendo 0,5g (2,6 mmol) de (**64**), foram adicionados 30 mL de CH₂Cl₂, 3,0 mL de piridina e 0,9 mL (11,6 mmol) de cloreto de mesila. Após agitação magnética por 1h à temperatura ambiente, detectou-se por CCF o consumo total do material de partida (**64**). A mistura reacional foi lavada com HCl 10% (3 x 30 mL); solução saturada de CuSO₄ (2 x 30 mL) e H₂O (2 x 30 mL). A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida, fornecendo (**65**) como um sólido branco em 89% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna, utilizando gradiente de acetato de etila:n-hexano como eluente.

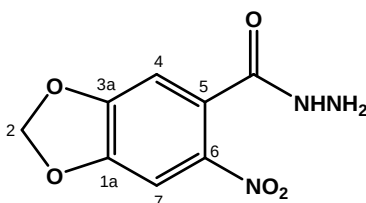


6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-benzodioxola-5-carboxilato de metila (65**).**

Sólido branco; p.f. 178-180°C. RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 3,02 (s, 3H, SO₂CH₃); 3,91 (s, 3H, OCH₃); 6,05 (s, 2H, H-2); 7,31 (s, 1H, H-4); 7,44 (s, 1H, H-7); 10,00 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 40,0 (SO₂CH₃); 52,6 (OCH₃); 100,6 (C-2); 102,5 (C-7); 108,9 (C-4); 109,6 (C-5); 138,2 (C-6); 143,8 (C-3a); 153,2 (C-1a); 168,2 (C=O). IV (ν_{max}, KBr) ν (cm⁻¹): 3140, 3108, 3017, 2952, 2932, 2852n, 1675, 1627, 1507, 1486, 1443, 1362, 1332, 1244, 1148, 1030, 978, 903, 880, 784, 647, 500.

5.1.5. OBTENÇÃO DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA (67):

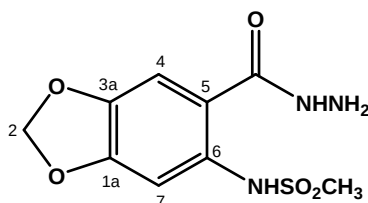
Em um balão de 50 ml contendo 0,5g (2,2 mmol) de **(63)** suspensos em 2mL de etanol, foram adicionados 6,7 mL (0,11 mol) de hidrato de hidrazina a 80%. A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2h, observando-se seu escurecimento e consumo total do éster de partida **(63)** por CCF. O pH básico da mistura reacional foi neutralizado com HCl concentrado (ca. 10 mL) em banho de gelo e concentrado sob pressão reduzida, observando-se a precipitação de um sólido amarelo, que foi intensificada com banho de gelo. O sólido foi filtrado, obtendo-se o produto desejado **(67)** em 70% de rendimento após recristalização em etanol/água.



6-nitro-1,3-benzodioxola-5-carbohidrazida (67). Sólido amarelo; p.f. 184-185°C. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 4,41 (s, 2H, NH_2); 6,26 (s, 2H, H-2); 7,03 (s, 1H, H-4); 7,64 (s, 1H, H-7); 9,59 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 104,2 (C-2); 105,3 (C-7); 108,5 (C-4); 128,3 (C-5); 141,9 (C-6); 148,8 (C-3a); 151,7 (C-1a); 165,2 (C=O). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 3336, 3199, 3120, 1670, 1519, 1502, 1475, 1328, 1257, 1030, 880.

5.1.6. OBTENÇÃO DE 6-[(METILSULFONIL)AMINO]-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA (**68**):

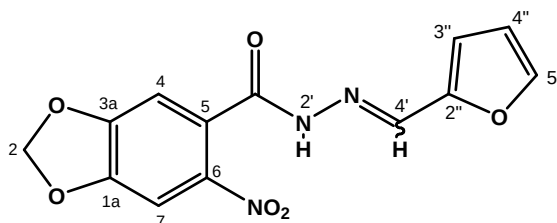
Em um balão contendo 0,5g (1,8 mmol) de (**65**), foram adicionados 10 mL de etanol e 5,8 mL (92,8 mmol) de hidrato de hidrazina a 80%. A mistura reacional foi agitada magneticamente à temperatura ambiente por 1h, observando-se a dissolução do sólido inicialmente presente no meio e o consumo total do éster de partida (**65**) por CCF. O meio reacional foi concentrado a vácuo e em seguida neutralizado até pH 7, em banho de gelo, observando-se a precipitação de um sólido amarelo claro, que foi filtrado e após recristalização em etanol/água forneceu o produto desejado (**68**) em 78% de rendimento.



6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida (68**).** Sólido amarelo claro; p.f. 198-200°C. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 3,03 (s, 3H, SO_2CH_3); 4,60 (s, 2H, NH_2); 6,10 (s, 2H, H-2); 7,06 (s, 1H, H-4); 7,32 (s, 1H, H-7); 9,96 (s, 1H, SO_2NH); 11,29 (s, 1H, CONHNH_2). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 40,0 (SO_2CH_3); 101,8 (C-2); 102,7 (C-7); 107,2 (C-4); 113,0 (C-5); 135,4 (C-6); 143,9 (C-3a); 150,8 (C-1a); 167,4 (C=O).

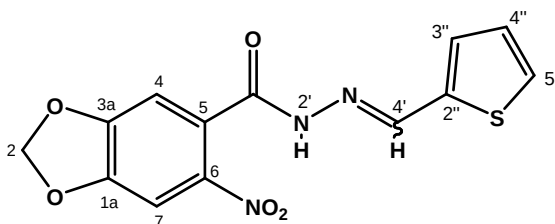
5.1.7. OBTENÇÃO DAS *N'*-ARILMETILIDENO-1,3-BENZODIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDAS 6-SUBSTITUÍDAS (56-57):

Em um balão contendo ca. 1 mmol da hidrazida correspondente (**67-68**) em 10 ml de etanol absoluto, foram adicionados 1,1 mmol do aldeído aromático desejado. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 1h, quando detectou-se o consumo total do material de partida por CCF. Após concentração do meio reacional sob pressão reduzida, adicionou-se 15 ml de água destilada gelada e submeteu-se a mistura reacional a um banho de gelo. Observou-se a precipitação intensa do sólido, que após recristalização em etanol/água, forneceu os respectivos produtos desejados em rendimentos de 70-95%.



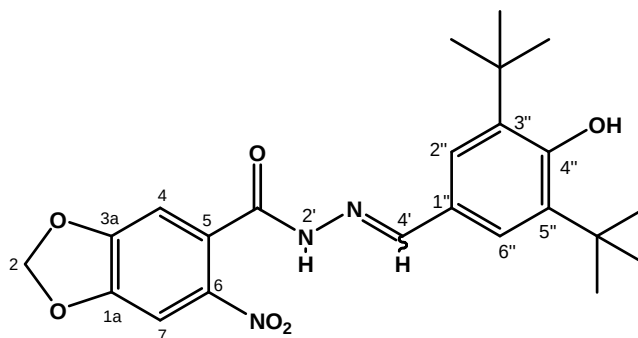
***N'*-(2-furilmetilideno)-6-nitro-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida (56a).** Sólido amarelo; p.f. 226-228; 88%. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 6,30 (s, 10H, H-2*E/Z*); 6,54 (dd, 2H, $J = 1,8$ Hz, H-4''*Z*); 6,64 (dd, 3H, $J = 1,8$ Hz, H-4''*E*); 6,72 (d, 2H, $J = 3,4$ Hz, H-3''*Z*); 6,95 (d, 3H, $J = 3,4$ Hz, H-3''*E*); 7,15 (s, 2H, H-4'*Z*); 7,30 (s, 3H, H-4'*E*); 7,74 (d, 7H, $J = 4,6$ Hz, H-5''*Z*, H-4*E/Z*); 7,87 (d, 5H, H-5''*E*, H-7*Z*); 8,10 (s, 3H, H-7*E*); 11,87 (s, 2H, H-2'*Z*); 11,90 (s, 3H, H-2'*E*). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 104,4 (C-2); 104,7 (C-7); 105,4 (C-4); 108,5 (C-3''); 108,9 (C-3''); 112,5 (C-4''); 112,7 (C-4''); 128,6 (C-5); 134,9 (C-4'); 138,1 (C-4'); 141,2 (C-6); 145,5 (C-5''); 145,9 (C-5''); 148,8 (C-2''); 149,6

(C-2''); 152,2 (C-1a); 152,6 (C-3a); 161,9 (C-1'); 167,9 (C-1'). IV ($\nu_{\max}$, KBr) ν (cm^{-1}): 3197, 3123, 3061, 2918, 2855, 1644, 1623, 1533, 1504, 1486, 1381, 1293, 1281, 1261, 1164, 1126, 1033, 1017, 939, 877, 763.



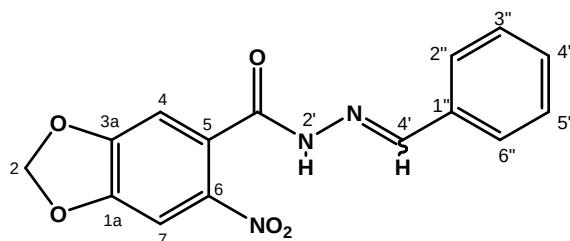
6-nitro-*N'*-(2-tienilmetilideno)-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida (56b).

Sólido amarelo; p.f. 240-242; 90%. RMN ^1H (200MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) δ (ppm): 6,30 (s, 10H, H-2*E/Z*); 7,03 (dd, 2H, $J = 3,6$ Hz, H-4''*Z*); 7,13 (m, 5H, H-4''*E*, H-3''*Z*); 7,31 (m, 5H, H-3''*E*, H-4''*Z*); 7,50 (m, 5H, H-4''*E*, H-5''*Z*); 7,71 (m, 8H, H-4*E/Z*, H-5''*E*); 8,14 (s, 2H, H-7*Z*); 8,42 (s, 3H, H-7*E*); 11,88 (s, 2H, H-2'*Z*); 11,92 (s, 3H, H-2'*E*). RMN ^{13}C (50MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) δ (ppm): 104,4 (C-7); 104,5 (C-2); 105,4 (C-4); 108,6 (C-5''); 108,9 (C-5''); 128,1 (C-5); 128,2 (C-4''); 128,3 (C-4''); 129,1 (C-3''); 129,7 (C-3''); 130,9 (C-4'); 131,8 (C-4'); 141,5 (C-6); 143,4 (C-5''); 148,7 (C-1a); 149,1 (C-3a); 152,2 (C-2''); 152,6 (C-2''); 161,7 (C-1'); 167,8 (C-1'). IV ($\nu_{\max}$, KBr) ν (cm^{-1}): 3191, 3073, 3060, 3032, 2992, 2915, 2844, 1639, 1608, 1591, 1560, 1531, 1503, 1485, 1380, 1290, 1264, 1222, 1162, 1125, 1033, 1015, 928, 878, 713.



***N'*-(3,5-ditertbutil-4-hidróxifenilmetilideno)-6-nitro-1,3-benzodioxola-5-**

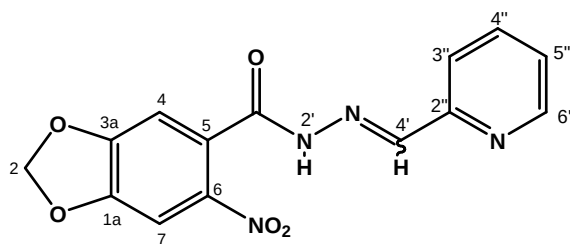
carboidrazida (56c). Sólido amarelo; p.f. 280-282; 82%. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 1,32 (s, 18H, $-\text{CH}_3\text{Z}$); 1,40 (s, 36H, $-\text{CH}_3\text{E}$); 6,29 (m, 6H, H-2E/Z); 7,15 (m, 6H, H-2'',6''E/Z); 7,27 (s, 1H, H-4Z); 7,47 (s, 2H, H-4E); 7,67 (m, 1H, H-4'Z); 7,73 (s, 2H, H-4'E); 7,83 (s, 3H, H-7E/Z); 11,69 (s, 1H, H-2'Z); 11,76 (s, 2H, H-2'E). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 30,5 ($-\text{CH}_3$); 34,9 ($\text{C}-\text{Me}_3$); 104,0 (C-7); 104,2 (C-2); 108,7 (C-4); 124,0 (C-5); 124,4 (C-2'',6''); 128,6 (C-1''); 139,5 (C-3'',5''); 142,0 (C-6); 145,0 (C-4'); 148,6 (C-4''); 152,5 (C-1a); 156,3 (C-3a); 167,7 (C-1'). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 3593, 3172, 3065, 2962, 2872, 1662, 1612, 1527, 1509, 1487, 1433, 1401, 1372, 1342, 1259, 1236, 1212, 1139, 1117, 1032, 927, 875, 766.



***N'*-fenilmetilideno-6-nitro-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida (56d).** Sólido

amarelo; p.f. 216-218; 95%. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 6,31 (s, 66H, H-2E/Z); 7,34 (m, 165H, H-2'',3'',4'',5'',6''E/Z); 7,45 (s, 10H, H-4Z); 7,72

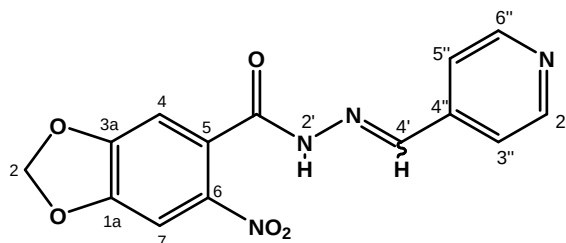
(s, 23H, H-4E); 7,76 (s, 33H, H-7E/Z); 7,99 (s, 10H, H-4'Z); 8,22 (s, 23H, H-4'E); 11,94 (s, 10H, H-2'Z); 11,97 (s, 23H, H-2'E). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 104,4 (C-2); 104,6 (C-7); 108,6 (C-4); 108,9 (C-4); 127,1 (C-3'',5''); 127,7 (C-3'',5''); 128,4 (C-5); 129,2 (C-2'',6''); 129,3 (C-2'',6''); 130,4 (C-4''); 130,7 (C-4''); 141,6 (C-6); 144,8 (C-4'); 148,8 (C-4'); 152,3 (C-1a); 152,7 (C-3a); 162,0 (C-1'); 168,0 (C-1'). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 3222, 3114, 3059, 2916, 2851, 1646, 1607, 1533, 1503, 1485, 1381, 1279, 1161, 1123, 1033, 928, 878, 768, 693.



6-nitro-*N'*-(2-piridinilmetilideno)-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida (56e).

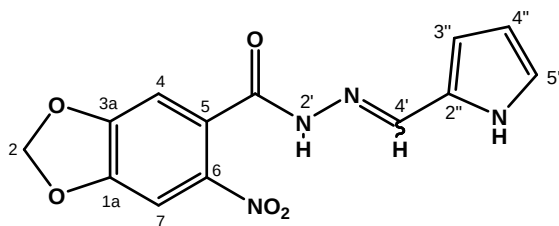
Sólido amarelo; p.f. 184-185; 84%. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 6,32 (s, 20H, H-2E/Z); 7,37 (m, 10H, H-5'',6''E/Z); 7,58 (s, 10H, H-4E/Z); 7,74 (m, 10H, H-7E/Z); 7,91 (m, 10H, H-4''E/Z); 8,03 (s, 3H, H-4'Z); 8,24 (s, 7H, H-4'E); 8,54 (d, 3H, $J = 3,6$ Hz, H-3''Z); 8,62 (d, 7H, $J = 4,2$ Hz, H-3''E); 12,15 (s, 3H, H-2'Z); 12,19 (s, 7H, H-2'E). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 104,5 (C-2); 104,6 (C-7); 105,5 (C-4); 108,7 (C-3''); 108,9 (C-3''); 119,5 (C-5''); 120,5 (C-5''); 124,8 (C-4''); 125,1 (C-4''); 127,2 (C-5); 137,3 (C-4'); 137,4 (C-4'); 144,8 (C-6); 150,0 (C-6''); 150,1 (C-6''); 153,2 (C-1a); 155,5 (C-3a); 155,9 (C-2''); 156,2 (C-2''); 165,4 (C-1'); 171,3 (C-1'). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}):

3427, 3198, 3122, 3063, 2983, 2925, 2854, 1663, 1609, 1523, 1505, 1485, 1432, 1368, 1336, 1288, 1262, 1163, 1126, 1032, 921, 874, 777, 762, 640, 583.



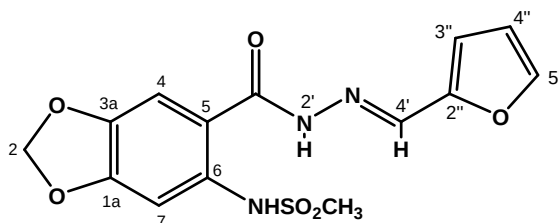
6-nitro-*N'*-(4-piridinilmetilideno)-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida (56f).

Sólido amarelo; p.f. 202-203; 89%. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 6,31 (s, 20H, H-2*E/Z*); 7,32 (d, 6H, $J = 4,9$ Hz, H-2'',6''*Z*); 7,52 (s, 3H, H-4*Z*); 7,71 (d, 14H, $J = 5,8$ Hz, H-2'',6''*E*); 7,77 (s, 7H, H-4*E*); 7,99 (s, 3H, H-4'*Z*); 8,23 (s, 7H, H-4'*E*); 8,56 (d, 6H, $J = 4,9$ Hz, H-3'',5''*Z*); 8,68 (d, 14H, $J = 5,8$ Hz, H-3'',5''*E*); 12,27 (s, 3H, H-2'*Z*); 12,30 (s, 7H, H-2'*E*). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 104,7 (C-2,7); 108,6 (C-4); 121,2 (C-3'',5''); 121,7 (C-3'',5''); 124,9 (C-5); 141,7 (C-6); 142,2 (C-4'); 144,7 (C-4''); 145,0 (C-4''); 145,8 (C-4'); 150,2 (C-2'',6''); 150,3 (C-2'',6''); 152,5 (C-1a); 153,4 (C-3a); 167,0 (C-1'); 171,5 (C-1'). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 3450, 3198, 3119, 3050, 2996, 2920, 2857, 1670, 1581, 1530, 1508, 1489, 1421, 1370, 1337, 1298, 1268, 1162, 1125, 1030, 923, 881, 818, 744, 693, 537.



6-nitro-*N'*-(1*H*-pirrol-2-ilmetilideno)-1,3-benzodioxola-5-carboidrazida

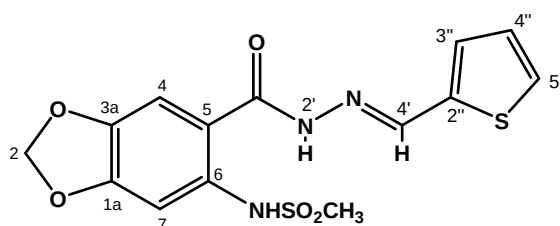
(**56g**). Sólido amarelo; p.f. 202-203; 89%. RMN ^1H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 6,06 (d, 3H, $J = 2,8$ Hz, H-4''Z); 6,14 (d, 4H, $J = 2,6$ Hz, H-4''E); 6,29 (s, 17H, H-2E/Z, 3''Z); 6,47 (s, 4H, H-3''E); 6,82 (s, 3H, H-5''Z); 6,93 (s, 4H, H-5''E); 7,11 (s, 3H, H-4'Z); 7,27 (s, 4H, H-4'E); 7,70 (s, 3H, H-4Z); 7,72 (s, 4H, H-4E); 7,86 (s, 3H, H-7Z); 8,07 (s, 4H, H-7E); 10,83 (s, 3H, H-1''Z); 11,54 (s, 4H, H-1''E); 11,60 (s, 3H, H-2'Z); 11,62 (s, 4H, H-2'E). RMN ^{13}C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 104,4 (C-4''); 104,8 (C-4''); 105,4 (C-2); 108,5 (C-7); 108,9 (C-4); 109,8 (C-3''); 109,9 (C-3''); 112,1 (C-5''); 112,9 (C-5''); 117,3 (C-5); 122,5 (C-5''); 123,3 (C-5''); 131,7 (C-2''); 132,2 (C-2''); 137,8 (C-4'); 141,0 (C-4'); 144,9 (C-6); 151,6 (C-1a); 155,3 (C-3a); 164,6 (C-1'); 170,6 (C-1'). IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 3478, 3412, 3190, 3113, 3054, 2914, 2855, 1638, 1604, 1536, 1502, 1484, 1427, 1384, 1333, 1298, 1263, 1164, 1127, 1035, 928, 874, 744, 551.



***N'*-(2-furilmetilideno)-6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-benzodioxola-5-**

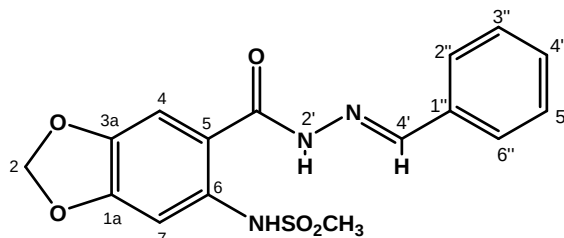
carboidrazida (57a). Sólido amarelo claro; p.f. 260-262°C, 86%. RMN ^1H

(200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 3,08 (s, 3H, SO₂CH₃); 6,15 (s, 2H, H-2); 6,65 (s, 1H, H-4''); 6,95 (s, 1H, H-3''); 7,05 (s, 1H, H-4'); 7,41 (s, 1H, H-4); 7,85 (s, 1H, H-5''); 8,28 (s, 1H, H-7); 10,60 (s, 1H, SO₂NH); 11,77 (s, 1H, H-2'). RMN ¹³C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 40,31 (SO₂CH₃); 102,94 (C-2); 108,72 (C-3''); 112,79 (C-4''); 114,55 (C-7); 114,90 (C-5''); 135,27 (C-5); 138,80 (C-4'); 144,13 (C-6); 145,96 (C-4); 149,75 (C-1a); 151,09 (C-3a); 164,46 (C-1').



6-[(metilsulfonil)amino]-*N'*-(2-tienilmetilideno)-1,3-benzodioxola-5-

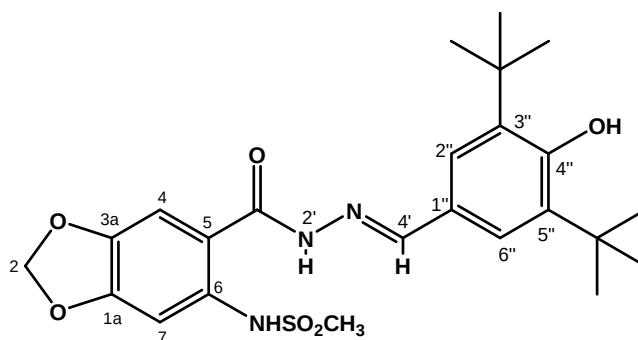
carboidrazida (57b). Sólido amarelo claro; p.f. 276-278°C, 82%. RMN ¹H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 3,08 (s, 3H, SO₂CH₃); 6,14 (s, 2H, H-2); 7,12 (d, 1H, J = 4 Hz, H-4''); 7,16 (d, 1H, J = 4 Hz, H-3''); 7,33 (s, 1H, H-4'); 7,42 (s, 1H, H-4); 7,69 (d, 1H, J = 4 Hz, H-5''); 8,59 (s, 1H, H-7); 10,59 (s, 1H, SO₂NH); 11,81 (s, 1H, H-2'). RMN ¹³C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 40,28 (SO₂CH₃); 102,89 (C-2); 102,93 (C-3''); 108,11 (C-4''); 114,97 (C-5); 128,47 (C-7); 129,86 (C-5''); 131,90 (C-4'); 135,26 (C-6); 139,35 (C-1a); 144,10 (C-4); 151,05 (C-3a); 164,31 (C-1').



***N'*-fenilmetilideno-6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-benzodioxola-5-**

carboidrazida (57c). Sólido amarelo; p.f. 244-246; 84%. RMN ¹H (200MHz,

DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 3,09 (s, 3H, -SO₂CH₃); 6,15 (s, 2H, H-2); 7,12 (s, 1H, H-4); 7,46 (m, 4H, H-2'',3'',5'',6''); 7,73 (m, 2H, H-7,4''); 8,41 (s, 1H, H-4'); 10,66 (s, 1H, -SO₂NH); 11,87 (s, 1H, H-2'). RMN ¹³C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 40,30 (-SO₂CH₃); 102,81 (C-7); 102,93 (C-2); 108,17 (C-4); 114,83 (C-5); 127,71 (C-2'',6''); 129,41 (C-3'',5''); 130,82 (C-4''); 134,60 (C-1''); 135,42 (C-6); 144,08 (C-3a); 149,15 (C-4'); 151,11 (C-1a); 164,57 (C-1').



***N'*-(3,5-ditercbutil-4-hidróxifenilmetilideno)-6-[(metilsulfonil)amino]-1,3-**

benzodioxola-5-carboidrazida (57d). Sólido amarelo; p.f. 254-255; 70%. RMN ¹H (200MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 1,41 (s, 18H, -C(CH₃)₃); 3,08 (s, 3H, -SO₂CH₃); 6,14 (s, 2H, H-2); 7,11 (s, 1H, -OH); 7,46 (m, 4H, H-4,7,2'',6''); 8,32 (s, 1H, H-4'); 10,73 (s, 1H, -SO₂NH); 11,67 (s, 1H, H-2'). RMN ¹³C (50MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ (ppm): 33,79 (-C(CH₃)₃); 38,15 (-SO₂CH₃); 43,35 (-C(CH₃)₃); 105,82 (C-7); 106,01 (C-2); 111,20 (C-4); 117,99 (C-5); 127,70 (C-2'',6''); 128,97 (C-3'',5''); 138,48 (C-1''); 142,87 (C-6); 147,15 (C-1a); 153,78 (C-4'); 154,09 (C-3a); 160,00 (C-4''); 167,35 (C-1').

5.2. MODELAGEM MOLECULAR:

A análise conformacional dos compostos NAH (**56d**), (**57c**) e (**70b**), e dos intermediários (**IIIa-b**) foi realizada utilizando-se o método semi-empírico Hamiltoniano AM1 (DEWAR *et al.*, 1985), disponível no programa SPARTAN 1.0.5 (WAVEFUNCTION INC., Irvine, CA, 2000) em PC Pentium IV 1,5 GHz.

5.3. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS (**56-57**):

5.3.1. ENSAIO DE EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO POR CARRAGENINA (FERREIRA,1979)¹¹:

Os compostos testados foram administrados por via oral, na dose de 300 µmol/Kg, utilizando-se como veículo uma solução de goma arábica 5%. Uma hora após a administração, foi realizada a indução do edema pela administração subplantar de carragenina 1% (1000 µg/pata). Na pata contralateral foi feita a administração de solução de NaCl 0,9% (0,1 mL/pata). A leitura foi realizada 3 horas após a administração subplantar de carragenina, utilizando-se um pletismógrafo acoplado a uma bomba peristáltica de fluxo contínuo. O edema foi expresso pela variação de volume das patas, obtida pela diferença entre as patas com carragenina e salina. Após o ensaio, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da curvatura maior e examinados macroscopicamente para avaliar o índice de ulcerogeneicidade dos compostos

¹¹ Ensaio realizado pelo aluno de doutoramento MSc Jorge Luiz Mendonça Tributino e de mestrado Daniel Ignachitti Lacerda, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

testados. AINES clássicos como a indometacina e a aspirina induzem ulcerações difusas na mucosa dos animais, o que não é observado para os inibidores seletivos de COX-2 (CHAN *et al.*, 1995).

5.3.2. ENSAIO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA) E ÉSTER DE FORBOL (TPA) EM CAMUNDONGOS (SÁNCHEZ E MORENO, 1999)¹²:

Foram utilizados camundongos albinos de ambos os sexos, pesando entre 18-25g. Os compostos foram administrados por via oral, uma hora antes da administração tópica do ácido araquidônico, utilizando-se como veículo a goma arábica 5%. A indução do processo inflamatório consiste na administração de 10 µL de uma solução de ácido araquidônico (25 mg/mL) dissolvido em acetona em cada uma das faces da orelha do animal (500µg de AA por orelha). Na orelha contralateral é somente realizada a aplicação de acetona. Uma hora após a administração do ácido araquidônico os animais são sacrificados e ambas as orelhas são retiradas e pesadas. Com os pesos obtidos calcula-se a porcentagem de formação do edema pela fórmula:

$$\% \text{ de formação do edema} = \frac{\text{PO tratada} - \text{PO controle}}{\text{PO controle}} \times 100$$

Onde: PO controle = Peso da orelha somente com acetona

PO tratada = Peso da orelha que recebeu AA.

¹² Ensaio realizado pelo aluno de doutoramento MSc Jorge Luiz Mendonça Tributino, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

O protocolo do ensaio para o edema induzido por TPA é idêntico ao do edema de orelha induzido por AA, com a diferença de que o sacrifício dos animais e a retirada das orelhas é realizada somente 6 horas após a indução do edema com a aplicação tópica de 10 µL de uma solução de TPA em acetona (2 µg/orelha).

5.3.3. ENSAIO DE DOR INDUZIDA POR FORMALINA EM CAMUNDONGOS (HUNSKAAR *et al.*, 1987)¹³:

O ensaio de formalina consiste em uma administração subplantar de formaldeído 2,5% em camundongos albinos de ambos os sexos, pesando entre 18-25g. O estímulo doloroso é então caracterizado pelo tempo em que o animal permanece lambendo a pata que recebeu o estímulo irritante. O ensaio de formalina é caracterizado por apresentar duas fases distintas. A primeira fase (0-5 minutos após a injeção da formalina) se caracteriza por uma fase dita neurogênica, ou seja, apresentando um componente central bastante relevante, sendo capaz de ser inibida por analgésicos de ação central como a morfina. A segunda fase (15-30 minutos após a injeção de formalina) é a chamada fase inflamatória, onde ocorre uma maciça produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, sendo inibida por AINES clássicos como o ácido acetilsalicílico e inibidores seletivos de COX-2 como o nimesulido.

¹³ Ensaio realizado pelo aluno de doutoramento MSc Jorge Luiz Mendonça Tributino e de mestrado Daniel Ignachitti Lacerda, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

5.3.4. ENSAIO DA PLACA QUENTE EM CAMUNDONGOS (KURAISHI *et.al.*, 1983)¹⁴:

A atividade analgésica central dos compostos foi avaliada através do teste da placa quente ($55 \pm 0,1$)°C, utilizando-se camundongos suíços de ambos os sexos com pesos entre 18-25g e mantidos em jejum por um período de 8 h.

Os animais foram colocados sobre a placa aquecida e suas respostas ao estímulo térmico (retirada e lambida da pata) foram cronometrados. Foi realizada uma primeira leitura para a adaptação dos animais e subsequente foi realizada a leitura controle. Os animais que permaneceram por mais de 10 segundos na placa sem responder ao estímulo térmico foram descartados. Os derivados foram então administrados por via oral nas doses de 100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$. Foram feitas quatro leituras em intervalos de trinta minutos após a administração oral dos compostos.

5.3.5. ENSAIO DE ATIVIDADE COX-1 EM SANGUE HUMANO TOTAL (PATRIGNANI *et al.*, 1994; BRIDEAU *et al.*, 1996; DE LEVAL *et al.*, 2001)¹⁵:

O ensaio para determinação da atividade dos compostos frente à isoforma cicloxigenase-1 (COX-1) em sangue total foi realizado pela primeira vez por PATRIGNANI e colaboradores (1994). Este experimento se baseia na medição dos níveis de TXB_2 em amostras de sangue total após coagulação

¹⁴ Ensaio realizado pelo aluno de doutoramento MSc Jorge Luiz Mendonça Tributino e de mestrado Daniel Ignachitti Lacerda, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

espontânea como parâmetro de atividade da enzima COX-1. A TXB₂ produzida é proveniente da COX-1 de plaquetas estimuladas durante o processo de coagulação. A literatura descreve uma pequena variante desta metodologia, onde a atividade da COX-1 é medida após a estimulação do sangue total com o ionóforo de cálcio A 23187. A atividade da COX-2 nesses trabalhos é medida após a indução do sangue total com LPS, entretanto é feita a medida de TXB₂ e não PGE₂ como descreveu PATRIGNANI e colaboradores (1994).

Ensaio de COX-1 *in vitro*: Realizou-se a punção em indivíduos que não fizeram uso de nenhum tipo de antiinflamatório por pelo menos por duas semanas. O sangue foi coletado em tubos não contendo nenhum tipo de anticoagulante. Alíquotas de 1 mL foram imediatamente transferidas para tubos de vidro já contendo as soluções das substâncias a serem testadas ou o veículo (DMSO). As soluções estoque das substâncias teste foram feitas em DMSO de modo que a concentração final desejada fosse atingida ao adicionarmos 4 µL destas soluções aos 1 mL do sangue total. Os tubos foram vortexados para a homogeneização. Além das amostras, foram feitos os respectivos controles. As amostras foram incubadas a 37° C por 1 hora sob agitação constante para indução da coagulação. Após a incubação centrifugou-se as amostras de sangue a 12.000 X G por 5 min para a retirada do soro. O soro retirado foi armazenado a -30° C em tubos *eppendorf* para dosagem de TXB₂ por ensaio imunoenzimático (EIA).

Dosagem de TXB₂ (kit Amersham): Foram adicionados 100 µL do tampão do ensaio para os poços de ligação não-específica (N) e 50 µL do tampão do ensaio nos poços padrão zero O. Começando-se com o mais diluído, adicionou-se 50 µL de cada padrão e das amostras nos poços apropriados e 50

μL do anti-soro em todos os poços exceto o branco e os de ligação não-específica. Em seguida, adicionou-se 50 μL do conjugado de TXA₂ peroxidase em todos os poços exceto o branco. A placa foi posteriormente coberta e incubada à temperatura ambiente por 1 hora. Os poços foram aspirados e lavados 4 vezes com 400 μl de tampão de lavagem. Adicionou-se 150 μL do substato da enzima nos poços, cubrindo-se a placa e misturando no *shaker* por 15 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 100 μL de ácido sulfúrico 1M em cada poço, misturando, para determinação da densidade ótica em uma placa a 450 nm dentro de 30 minutos.

5.3.6. ENSAIO DE AGRAGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (BORN & CROSS, 1968)¹⁵:

Para a obtenção do sangue utilizaram-se coelhos albinos de ambos os sexos pesando entre 2,5 e 3,5, kg. Realizou-se a retirada do sangue através de punção da artéria central da orelha. O sangue foi coletado em tubos de polipropileno contendo solução de citrato trissódico 3,8% na proporção de 1 parte de citrato para cada 9 partes de sangue. Realizou-se uma centrifugação a 500 x *g* por 10 minutos, em temperatura ambiente, para a obtenção do PRP. Para a obtenção do PPP realizou-se uma centrifugação do sedimento a 2000 x *g*, por 10 minutos, também em temperatura ambiente. O PRP foi utilizado dentro de no máximo 3 horas, tendo em vista que após esse período as plaquetas perdem gradativamente a sua capacidade de agregação

¹⁵ Ensaio realizado pelo aluno de doutoramento MSc Jorge Luiz Mendonça Tributino, do LASSBio / Departamento de Farmacologia Básica e Clínica – ICB – UFRJ.

(CAZENAVE et. al, 1979). Os compostos foram testados veiculados em DMSO e pré-incubados por 5 minutos com as plaquetas. Adicionou-se o ácido araquidônico (200 μ M) e acompanhou-se o registro de agregação por 5 minutos.

5.3.7. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE-4 (LUGNIER *et al.*, 1986)¹⁶:

A enzima fosfodiesterase-4 (PDE-4) foi isolada de aorta bovina por cromatografia de troca iônica, conforme descrito por LUGNIER e colaboradores (1986) e sua atividade foi medida frente à concentração de 10 μ M de AMPc por ensaio radioimunoenzimático (KERAVIS, WELLS e HARDMAN, 1980). Para prevenir a interferência de PDE-3 contaminante neste ensaio, adicionou-se 100 μ M de GMPc. Os compostos LASSBio-881 (**56c**) e LASSBio-930 (**57c**) foram solubilizados em DMSO, sendo testados em uma concentração de 10 μ M. O DMSO teve concentração final (1%) que não alterou significativamente a atividade da enzima PDE.

¹⁶ Ensaio realizado em colaboração com a Dra. Claire Lugnier (CNRS/ULP – Strasbourg I, França).

5.3.8. ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA DE [³H]SR141716 EM RECEPTORES CANABINÓIDES CB1 DE MEMBRANA DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO (ABOOD *et al.*, 1997)¹⁷:

Foram utilizados camundongos pesando entre 30-40 g. Os animais foram sacrificados por decapitação, retirando-se o cérebro por inteiro para a utilização no ensaio.

Homogeneizou-se o cérebro em tampão A (320 mM sacarose, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) em potter de vidro (10 movimentos). Para 4 cérebros utilizou-se 20 mL de tampão (5 mL para homogeneizar e 15 para lavar). O homogeneizado foi centrifugado a 1600 G ou 5400 rpm por 10 min a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi salvo e o pellet lavado uma vez com 10 ml de tampão A com subsequente centrifugação. O combinado de sobrenadantes foi centrifugado a 21000 rpm por 1 hora a temperatura de 4°C. O pellet foi ressuspensão em 1 ml de tampão B (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, pH 7,4) e foi medida a concentração de proteínas que deve estar por volta de 4-6 mg/mL.

A ligação foi iniciada pela adição de 160 µg de proteínas de membrana em tubos *ependorf* siliconizados, 50 µL (10 nM) de PMSF (inibidor da amidase FAAH), 50 µL (10 nM) de [³H]SR141716A, 50 µL de veículo (0,1 % DMSO + tampão C) ou 50 µL de AM281 (análogo do SR141716, antagonista de receptores canabinóides) (100 µM) ou o composto-teste e tampão C (50mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂ e 2,5 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos,

¹⁷ Ensaio realizado pela aluna de doutoramento MSc Marina Vieira Martins (LASSBio-FF-UFRJ), em colaboração com o Prof. Dr. Juliano Ferreira (UFSM) e Prof. Dr. João B. Calixto (UFSC).

pH 7,4), o suficiente para fazer um volume total de 500 μ L. A adição de 100 μ M de AM281 foi usada para binding não específico.

Incubou-se por 1 hora a 30° C. Em seguida, foram adicionados 1 mL de tampão D (50 mM Tris-HCl, 1mg/ml de BSA, pH 7,4) para completar o volume total de 1,5 mL. Logo após, filtrou-se a vácuo com subseqüentes lavagens (duas) com solução tampão D. O filtro deve ser pré-tratado com polietilenoamina 0,1% por pelo menos 2 horas.

A radioatividade foi quantificada por espectrometria em líquido de cintilação, onde os filtros são postos por 1 hora em 4 mL de líquido de cintilação.

5.3.9. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (JULIUS *et al.*, 1973; HIRATA *et al.*, 2003)¹⁸:

Populações enriquecidas de células T esplênicas foram obtidas por filtração em colunas de lã de nylon de células esplênicas de acordo com o método de JULIUS e colaboradores (1973). As células esplênicas foram aplicadas à coluna, numa relação de 108 células para cada 0,6 g de lã de nylon compactada em seringas de 10 mL. As células obtidas foram lavadas para remoção do soro fetal bovino e depois foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 1% de nutridoma. Os estímulos foram adicionados no início da cultura em triplicatas, na presença de 0,5 ng/ml de éster forbólico (PMA), com ou sem adição de anticorpo anti-CD3 (2C11) solúvel (2% v/v) e na

¹⁸ Ensaio realizado pela aluna de doutoramento MSc Marina Vieira Martins (LASSBio-FF-UFRJ) e pela Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira (UFAL).

presença ou ausência de diferentes concentrações das substâncias indicadas. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 3 dias e pulsadas com timidina tritiada 18 horas antes de serem recolhidas no coletor de células.

5.3.10. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR EM CÉLULAS ESPLÊNICAS TOTAIS (SCHMID *et al.*, 1994)¹⁹:

Baços de camundongos BALB/c foram removidos assepticamente e colocados em placa de Petri contendo uma malha de aço inox e meio DMEM sem soro. Após maceração a suspensão de células transferida para um tubo de 15 mL. As células foram depletadas de eritrócitos com tampão ACK (solução de cloreto de amônio tamponada). As células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 1% de nutridoma e a concentração de células viáveis, avaliada pela exclusão em azul de Trypan em câmara de Neubauer.

A análise da apoptose foi realizada em populações enriquecidas de células T cultivadas em placas de 24 poços, num volume final de 1 mL, na presença de PMA (0,5 ng/ml) com ou sem anti-CD3 e na presença ou ausência de LASSBio-881 (**56c**) e AEA (**71**). Após 48 horas de cultura a 37°C em atmosfera úmida contendo 7% de CO₂, as células foram marcadas com anexina V e 7-actinomicina D, para análise do perfil indutor de apoptose e necrose, respectivamente, através da análise em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD).

5.4. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES:

5.4.1. ESTUDOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA (CAVALCANTI *et al.*, 2004)¹⁹:

Os estudos de voltametria cíclica dos compostos *N*-acilidrazônicos selecionados foram realizados utilizando-se eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm), platina e Ag/AgCl, Cl⁻ (0,100 mol L⁻¹) em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade, como eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente. Em meio aprótico, utilizou-se DMF e perclorato de tetrabutylamônio (0,100 mol L⁻¹), e em meio prótico, tentou-se solubilizar com 50% etanol / tampão, pH aparente de 6,9 (0,100 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 0,100 mol L⁻¹ NaH₂PO₄), porém, houve precipitação, impossibilitando os estudos em meio aquoso. A análise dos dados foi realizada a partir de gráficos obtidos nos experimentos. O equipamento utilizado foi o Potenciostato/Galvanostato BAS 100B, interfaceado a microcomputador.



As varreduras foram realizadas em diferentes velocidades (de 20 mV/s a 2 V/s), tanto em potenciais negativos (-3000 a 0 mV) quanto positivos (0 a 1400mV).

¹⁹ Ensaio realizado em colaboração com a Profa. Dra. Marília Oliveira Ferreira Goulart (UFAL).

5.4.2. ENSAIO DE SEQÜESTRAMENTO DE RADICAIS FRENTE AO DPPH (TAIT *et al.*, 1996):

A 2 mL de uma solução etanólica dos compostos-teste foram adicionados a 2 mL de uma solução de DPPH (1×10^{-4} M) (Sigma) e a mistura reacional foi agitada vigorosamente e mantida à temperatura ambiente. A absorção do DPPH foi medida a 514 nm. Os valores médios foram obtidos de experimentos em triplicata.

5.4.3. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE DESOXIRRIBOSE FRENTE A RADICAIS HIDROXILA GERADOS NA REAÇÃO DE FENTON (MEINICKE *et al.*, 1998)²⁰:

Misturas reacionais (0,5 mL) contendo desoxirribose (10 mM), tampão Hepes (10 mM; pH 7,2), o composto-teste (10 µl) dissolvidas em DMSO (0,5 mM) e H₂O₂ (1 mM) foram incubadas a 37°C por 1 h. A reação foi iniciada pela adição de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O (10 µM). Os controles foram feitos na ausência de desoxirribose. Decorrido o tempo necessário, ácido tiobarbitúrico (1% em NaOH 50 mM; 0,5 mL) e ácido *orto*-fosfórico (4%; 0,5 mL) foram adicionados, as misturas reacionais foram aquecidas a 100°C por 15 min e resfriadas em banho de gelo. As absorbâncias destas misturas foram medidas e a concentração de TBARS calculada usando $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

²⁰ Ensaio realizado pelo Prof. Dr. Fernando Dutra (UNICSUL) em colaboração com o Prof. Dr. Etelvino Bechara (IQ-USP).

5.4.4. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO GERADOS NO SISTEMA XANTINA/XANTINA OXIDASE (FLOHÉ e ÖTTING, 1984)²¹:

As amostras dissovidas em DMSO foram adicionadas, nas concentrações indicadas, ao tampão fosfato 50 mM (pH 7,8; 37°C) contendo xantina (250 µM), EDTA (100 µM) e citocromo c (12 µM). A reação foi iniciada com a adição de quantidade suficiente de xantina oxidase (~ 0,2 U/mL, em solução EDTA 100 µM). Foram medidas as velocidades de redução de citocromo c por ânion superóxido, por espectrofotometria, expressas em $\Delta A/\text{min}$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

(AUTOR ANÔNIMO) Colonizing therapeutic space: the overlooked science of drug husbandry (Editorial). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 101, 2004.

ABOOD, M. E.; DITTO, K. E.; NOEL, M. A. *et al.* Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 207-214, 1997.

AGRAWAL, V. K.; SHARMA, R.; KHADIKAR, P. V. Quantitative structure-activity relationship studies on 5-Phenyl-3-ureido-1,5-benzodiazepine as cholecystokinin-A receptor antagonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3571-3581, 2002.

AJAY; BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. Designing libraries with CNS activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 4942-4951, 1999.

ALBUQUERQUE, E. X.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T. *et al.* **3,4-Methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone, its derivatives and salts, useful for treating heart conditions, e.g. congestive heart failure or systolic dysfunction, and conditions associated with muscle fatigue e.g. cancer.** Patente WO-200078754-A1, 2000.

ARMOUR, D. R.; ASTON, N. M.; MORRISS, K. M. L. *et al.* 1,4-Benzodiazepin-2-one derived neurokinin-1 receptor antagonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 15, p. 2037-2042, 1997.

ARROWSMITH, J. E.; CAMPBELL, S. F.; CROSS, P. E. *et al.* Long-acting dihydropyridine calcium antagonists. 1. 2-Alkoxymethyl derivatives incorporating

basic substituents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1696-1702, 1986.

BARREIRO, E. J.; COSTA, P. R. R.; COELHO, F. A. S. *et al.* Prostaglandin analogs .2. Synthesis of new derivatives from safrole isolated from sassafras oil. **Journal of Chemical Research (S)**, n. 7, p. 220-221, 1985.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 744-759, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *ibid*, 2001. Cap. 6: Estratégias de modificação molecular. p. 163-210.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos**. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2001. Cap. 1: Aspectos gerais da ação dos fármacos. p. 15-51.

BARREIRO, E. J.; LIMA, M. E. F. The synthesis and anti-inflammatory properties of a new sulindac analogue synthesized from natural safrole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 12, p. 1219-1222, 1992.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P. *et al.* Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: Novel lead-compounds of analgesic, antinflammatory and antithrombotic drugs. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.

BARTH, F. CB1 cannabinoid receptor antagonists. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 103-118, 2005.

BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. Properties of known drugs. 2. Side chains. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 5095-5099, 1999.

BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 15, p. 2887-2893, 1996.

BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; EVANS, B. E. *et al.* Cholecystokinin antagonists - synthesis and biological evaluation of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-amines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 264-268, 1988.

BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; EVANS, B. E. *et al.* Cholecystokinin antagonists - synthesis and biological evaluation of 4-substituted 4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 176-181, 1988.

BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; EVANS, B. E. *et al.* Cholecystokinin-A receptor ligands based on the κ -opioid agonist tifluadom. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p.450-455 , 1990.

BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; EVANS, B. E. *et al.* Development of 1,4-benzodiazepine cholecystokinin type B antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 26, p. 4276-4292, 1993.

BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; RITTLE, K. E. *et al.* Cholecystokinin antagonists - synthesis of asperlicin analogs with improved potency and water solubility. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1941-1945, 1986.

BONDENSGAARD, K.; ANKERSEN, M.; THÖGERSEN, H. *et al.* Recognition of privileged structures by G-protein coupled receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 888-899, 2004.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **Journal of Physiology**, v.168, n. 1, p. 178-183, 1963.

BOURGUIGNON, J. J. Identical and non-identical twin drugs. *In*: WERMUTH, C. G. (ed.) **The Practice of Medicinal Chemistry**. Nova Iorque: Academic Press, 1996. p. 261-294.

BOURGUIGNON, J. J.; OUMOUC, S.; SCHMITT, M. Use of polyfunctionalized pyridazines as reactive species for building chemical diversity. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 277-295, 2006.

BRANCA, M. A. BiDil raises questions about race as a marker. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 8, p. 615-616, 2005.

BRANDWILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology - Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRIDEAU, C.; KARGMAN, S.; LIU, S. *et al.* A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. **Inflammation Research** v. 45, n. 2, p. 68-74, 1996.

BUHLMAYER, P.; FURET, P.; CRISCIONE, L. *et al.* Valsartan, a potent, orally-active angiotensin-II antagonist developed from the structurally new amino-acid series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 29-34, 1994.

BUYSSE, D.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P. Ramelteon. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 4, n. 11, p. 881-882, 2005.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A. *et al.* Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, v. 394, n. 6690, p. 277-281, 1998.

CANDELARIO-JALIL, E.; AJAMIEH, H. H.; SAM, S. *et al.* Nimesulide limits kainate-induced oxidative damage in the rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 390, n. 3, p. 295-298, 2000.

CANDELARIO-JALIL, E.; ALVAREZ, D.; GONZÁLEZ-FALCÓN, A. *et al.* Neuroprotective efficacy of nimesulide against hippocampal neuronal damage following transient forebrain ischemia. **European Journal of Pharmacology**, v. 453, n. 2-3, p. 189-195, 2002.

CANDELARIO-JALIL, E.; GONZALEZ-FALCON, A.; GARCIA-CABRERA, M. *et al.* Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 3, p. 545-555, 2003.

CANDELARIO-JALIL, E.; GONZÁLEZ-FALCÓN, A.; GARCÍA-CABRERA, M. *et al.* Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 3, p. 545-555, 2003.

CANDELARIO-JALIL, E.; LEÓN, O. S. Effects of nimesulide on kainate-induced *in vitro* oxidative damage in rat brain homogenates. **BMC Pharmacology**, v. 3, p. 7, 2003.

CANDELARIO-JALIL, E.; LEÓN, O. S. Effects of nimesulide on kainate-induced *in vitro* oxidative damage in rat brain homogenates. **BMC Pharmacology**, v. 3, p. 7, 2003.

CAVALCANTI, J. C. M.; OLIVEIRA, N. V.; DE-MOURA, M. A. B. F. *et al.* Evidence of self-protonation on the electrodic reduction mechanism of an anti-*Helicobacter pylori* metronidazole isotere. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 541, n. 2, p. 177-182, 2004.

CAZENAVE, J. P.; HEMMENDINGER, S.; BERETZ, A. *et al.* L'aggrégation plaquettaire: Outil d'investigation clinique et d'étude pharmacologique. Méthodologie. **Annales de Biologie Clinique**, v. 41, n. 3, p. 167-169, 1983.

CHAMBERS, M. S.; BAKER, R.; BILLINGTON, D. C. *et al.* Spiropiperidines as high-affinity selective σ ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 2033-2039, 1992.

CHAN, C.C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C. *et al.* Pharmacology of selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal antiinflammatory agent with no ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 3, p. 1531-1537, 1995.

CHANG, R. S. L.; LOTTI, V. J.; MONAGHAN, R. L. *et al.* A potent nonpeptide cholecystokinin antagonist selective for peripheral tissues isolated from *Aspergillus alliaceus*. **Science**, v. 230, n. 4722, p. 177-179, 1985.

CHANG, T. T.; GISH, R. G.; DE MAN, R. *et al.* A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. **New England Journal of Medicine** v. 354, n. 10, p. 1001-1010, 2006.

CHONG, Z. Z.; LI, F. Q.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 3, p. 207-246, 2005.

CONTRERAS, J.-M.; PARROT, I.; SIPPL, W. *et al.* Design, synthesis and structure-activity relationships of a series of 3-[2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethylamino]pyridazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 17, p. 2707-2718, 2001.

CONTRERAS, J.-M.; RIVAL, Y. M.; CHAYER, S. *et al.* Aminopyridazines as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 730-741, 1999.

COSTA, P. R. R. Safrole and eugenol: study of the chemical reactivity and use in the synthesis of biologically active natural products and its derivatives. **Quimica Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.

CRAFT, J. M.; WATTERSON, D. M.; FRAUTSCHY, S. A.; VAN ELDIK, L. J. Aminopyridazines inhibit β -amyloid-induced glial activation and neuronal damage in vivo. **Neurobiology of Aging**, v. 25, n. 10, p. 1283-1292, 2004.

CRAIB, S. J.; ELLINGTON, H. C.; PERTWEE, R. G. *et al.* A possible role of lipoxygenase in the activation of vanilloid receptors by anandamide in the guinea-pig bronchus. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 30-37, 2001.

CUNHA, A. C.; FIGUEIREDO, J. M.; TRIBUTINO, J. L. M. *et al.* Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 2051-2059, 2003.

CUNHA, A. C.; FIGUEIREDO, J. M.; TRIBUTINO, J. L. M. *et al.* Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 2051-2059, 2003.

CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O. A critical time for rotavirus vaccines: a review. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 521-532, 2005.

CUROTTO, G.; DONATI, D.; PENTASSUGLIA, G.; URSINI, A. 1,5-Benzodiazepines as CCK-B antagonists. Effect of halogen substitution at the

benzo-fused ring on potency and selectivity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 24, p. 3011-3016, 1995.

CUSTER, T. G.; KATO, S.; BIERBAUM, V. M. *et al.* Gas-phase kinetics and mechanism of the reactions of protonated hydrazine with carbonyl compounds. gas-phase hydrazone formation: kinetics and mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 9, p. 2744-2754, 2004.

DAVIDSON, M. B.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P. Exenatide. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 713-714, 2005.

DE LEVAL, X.; DELARGE, J.; DEVEL, P. *et al.* Evaluation of classical NSAIDs and COX-2 selective inhibitors on purified ovine enzymes and human whole blood. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 64, p. 211-216, 2001.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F. *et al.* Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DI VIRGILIO, F. New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 14, p. 1647-1652, 2004.

DUAN, D.; LEWIN, N. E.; SIGANO, D. M. *et al.* Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. 21. A solid-phase method of synthesis of diacylglycerol lactones as a prelude to combinatorial approach for the synthesis of protein kinase C isozyme-specific ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 3248-3254, 2004.

EKELEY, J. B.; KLEMME, M. The nitration of piperonal. **Journal of the American Chemical Society**, v. 50, n. 10, p. 2711-2715, 1928.

ELLMAN, J. A. Design, synthesis, and evaluation of small-molecule libraries. **Accounts of Chemical Research**, v. 29, n. 3, p. 132-143, 1996.

EMKEY, R. D.; ETTINGER, M. Improving compliance and persistence with bisphosphonate therapy for osteoporosis. **American Journal of Medicine** v. 119, n. 4, suppl. 1, p. 18S-24S, 2006.

ERLANSON, D.A.; MCDOWELL, R. S.; O'BRIEN, T. Fragment-based drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 3463-3482, 2004.

EVANS, B. E.; BOCK, M. G.; RITTLE, K. E. *et al.* Design of potent, orally effective, nonpeptidal antagonists of the peptide hormone cholecystokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, n. 13, p. 4918-4922, 1986.

EVANS, B. E.; LEIGHTON, J. L.; RITTLE, K. E. *et al.* Orally active, non peptide oxytocin antagonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 21, p. 3919-3927, 1992.

EVANS, B. E.; RITTLE, K. E.; BOCK, M. G. *et al.* Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 2235-2246, 1988.

FERREIRA, S. H. A new method for measuring variations of rat paw volume. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, n. 9, p. 648, 1979.

FIGUEIREDO, J. M.; CÂMARA, C. A.; AMARANTE, E. G. *et al.* Design and synthesis of novel potent antinociceptive agents: Methyl-imidazolyl N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 2243-2248, 2000.

FIGUEIREDO, J. M.; CAMARA, C. D.; AMARANTE, E. G. *et al.* Design and synthesis of novel potent antinociceptive agents: Methyl-imidazolyl N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 2243-2248, 2000.

FLEXNER, C.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P. Fresh from the pipeline - Tipranavir. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 12, p. 955-956, 2005.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Superoxide-dismutase assays. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FRAGA, A. G. M.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, A. L. P. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterotricyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 285-290, 2000.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, anti-inflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 167-198, 2006.

FREITAS, A. C. C. (1992) Síntese e avaliação farmacológica de derivados pirazólicos funcionalizados, inibidores de enzimas da cascata do ácido araquidônico. **Tese de Doutorado**, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

GAFFNEY, S. M. Ranolazine, a novel agent for chronic stable angina. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 1, p. 135-142, 2006.

GANDHI, V.; KEATING, M. J.; BATE, G. *et al.* Nelarabine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 17-18, 2006.

GEIGER, J. Inhibitors of platelet signal transduction as anti-aggregatory drugs. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, n. 5, p. 865-890, 2001.

GHIGLIERI-BERTEZ, C.; COQUELET, C.; ALAZET, A.; BONNE, C. Inhibiteurs mixtes des voies de la cyclooxygénase et des lipoxygénases: synthèse et activité de dérivés hydrazoniques. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 147-152, 1987.

GIRAGOSSIAN, C.; SUGG, E. E.; SZEWCZYK, J. R.; MIERKE, D. F. Intermolecular interactions between peptidic and nonpeptidic agonists and the third extracellular loop of the cholecystokinin 1 receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 16, p. 3476-3482, 2003.

HAMPSON, A. J.; HILL, W. A.; ZAN, P. M. *et al.* Anandamide hydroxylation by brain lipoxygenase - metabolite structures and potencies at the cannabinoid receptor. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1259, n. 2, p. 173-179, 1995.

HARGRAVE, K. D.; PROUDFOOT, J. R.; GROZINGER, K. G. *et al.* Novel non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 1. Tricyclic pyridobenzo- and dipyridodiazepinones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 7, p. 2231-2241, 1991.

HENKE, B. R.; AQUINO, C. J.; BIRKEMO, L. S. *et al.* Optimization of 3-(1*H*-Indazol-3-ylmethyl)-1,5-benzodiazepines as potent, orally active CCK-A agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 17, p. 2706-2725, 1997.

HENKE, B. R.; WILLSON, T. M.; SUGG, E. E. *et al.* 3-(1*H*-Indazol-3-ylmethyl)-1,5-benzodiazepines: CCK-A agonists that demonstrate oral activity as satiety agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 14, p. 2655-2658, 1996.

HIDESHIMA, T.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C. Current therapeutic uses of lenalidomide in multiple myeloma. **Expert Opinion on Investigational Drugs** v. 15, n. 2, p. 171-179, 2006.

HIRATA, T.; SHIMAZAKI, C.; SUMIKUMA, T. *et al.* Humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody induced apoptosis of fresh and cloned human myeloma cells in vitro. **Leukemia Research**, v. 27, n. 4, p. 343-349, 2003.

HIRST, G. C.; AQUINO, C.; BIRKEMO, L. *et al.* Discovery of 1,5-benzodiazepines with peripheral cholecystokinin (CCK-A) receptor agonist activity (II): optimization of the C3 amino substituent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5236-5245, 1996.

HOPWOOD, J. J.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P. Galsulfase. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 5, n. 2, p. 101-102, 2006.

HOUSLAY, M. D.; SCHAFER, P.; ZHANG, K. Y. J. Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1503-1519, 2005.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HUNT, J. T.; DING, C. Z.; BATORSKY, R. *et al.* Discovery of (*R*)-7-cyano-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1*H*-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1*H*-1,4-benzodiazepine (BMS-214662), a farnesyltransferase inhibitor with potent preclinical antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3587-3595, 2000.

IFA, D. R.; RODRIGUES, C. R.; ALENCASTRO, R. B. *et al.* A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. **Journal of Molecular Structure - Theochem**, v. 505, p. 11-17, 2000.

JACOBSON, K. A.; KIM, Y.-C.; KING B. F. In search for selective P2 receptor ligands: interaction of dihydropyridine derivatives at recombinant rat P2X₂ receptors. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, n. 1-3, p. 152-157, 2000.

JULIUS, M. H.; SIMPSON, E.; HERZENBERG, L. A. Rapid method for isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 3, n. 10, p. 645-649, 1973.

KARABATSOS, G. J.; GRAHAM, J. D.; VANE, F. M. Syn-anti isomer determination of 2,4-dinitrophenylhydrazones and semicarbazones by NMR. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 5, p. 753-755, 1962.

KARABATSOS, G. J.; SHAPIRO, B. L.; VANE, F. M. *et al.* Structural studies by nuclear magnetic resonance. II. Aldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 18, p. 2784-2788, 1963.

KARABATSOS, G. J.; TALLER, R. A. Structural studies by nuclear magnetic resonance. V. Phenylhydrazones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3624-3629, 1963.

KAUFFMAN, R. F.; BEAN, J. S.; ZIMMERMAN, K. M. *et al.* Losartan, a nonpeptide angiotensin-II (Ang-II) receptor antagonist, inhibits neointima formation following balloon injury to rat carotid arteries. **Life Sciences**, v. 49, n. 25, p. PL223-PL228, 1991.

KERAVIS, T. M.; WELLS, J. N.; HARDMAN, J. G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from pig coronary arteries. Lack of interconvertibility of major forms. **Biochimica et Biophysica Acta, Enzymology**, v. 613, n. 1, p. 116-129, 1980.

KOZAK, K. R.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, L. J. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33744-33749, 2000.

KUBINYI, H. Privileged structures and analogue-based drug discovery. *In*: FISCHER, J.; GANELLIN, C. R. (eds.) **Analogue-based Drug-Discovery**. Weinheim: Wiley-VHC Verlag, 2006. p. 53-68.

KUDUK, S. D.; NG, C.; FENG, D.-M. *et al.* 2,3-Diaminopyridine bradykinin B1 receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 26, p. 6439-6442, 2004.

KURAISHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S. *et al.* (1983) Separate involvement of spinal noradrenergic and serotonergic systems morphine analgesia. The differences in mechanical and thermal algescics tests. **Brain Research**, v. 273, n. 2, p. 245-252, 1983.

LABAUDINIÈRE, R. F. RPR's approach to high-speed parallel synthesis for lead generation. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 11, p. 511-515, 1998.

LAGES, A. S.; SILVA, K. C. M.; MIRANDA, A. L. P. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of new flosulide analogues, synthesized from natural safrole. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 2, p. 183-188, 1998.

LAGU, B. Identification of α_{1A} -adrenoceptor selective antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Drugs of the Future**, v. 26, n. 8, p. 757-765, 2001.

LAMBERT, D. M.; FOWLER, C. J. The endocannabinoid system: Drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 16, p. 5059-5087, 2005.

LEBL, M. Parallel personal comments on "classical" papers in combinatorial chemistry. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 3-24, 1999.

LEITE, L. F. C. C.; NEVES, M. R.; DA-SILVA, J. B. P. *et al.* Synthesis and analgesic profile of novel N-containing heterocycle derivatives: arylidene 3-phenyl-1,2,4-oxadiazole-5-carbohydrazide. **Il Farmaco**, v. 54, n. 11-12, p. 747-757, 1999.

LEWELL, X. Q.; JUDD, D. B.; WATSON, S. P.; HANN, M. M. RECAP - Retrosynthetic Combinatorial Analysis Procedure: a powerful new technique for identifying privileged molecular fragments with useful applications in combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 3, p. 511-522, 1998.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIMA, P.C.; LIMA, L.M.; DA-SILVA, K.C.M. *et al.* Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 187-203, 2000.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIPKOWSKI, A. W.; TAM, S. W.; PORTOGHESE, P. S. Peptides as receptor selectivity modulators of opiate pharmacophores. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 1222-1225, 1986.

LOWE, III, J. A.; HAGEMAN, D. L.; DROZDA, S. E. *et al.* 5-Phenyl-3-ureidobenzazepin-2-ones as cholecystikinin-B receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3789-3811, 1994.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366-398, 2006.

LUGNIER, C.; KOMAS, N. Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilation. **European Heart Journal**, v. 14, suppl. I, p. 141-148, 1993.

LUGNIER, C.; SCHOEFFTER, P.; LE BEC, A. *et al.* Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 10, p. 1743-1751, 1986.

LUND, H. Cathodic Reduction of Nitro and Related Compounds. *In*: LUND, H.; HAMMERICH, O. (eds.) **Organic Electrochemistry 4th ed.** Nova Iorque: Marcell Dekker, 2001, p. 379-401.

LUND, H. Reduction of Azomethine Compounds. *In*: LUND, H.; HAMMERICH, O. (eds.) **Organic Electrochemistry 4th ed.** Nova Iorque: Marcell Dekker, 2001, p. 435-451.

MACCARRONE, M.; FINAZZI-AGRÓ, A. The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 9, p. 946-955, 2003.

MACCARRONE, M.; LORENZON, T.; BARI, M. *et al.* Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 31938-31945, 2000.

MAHY, J. P.; GASPARD, S.; MANSUY, D. Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxidase reactions of prostaglandin synthase - formation of iron(III)-sigma-phenyl complexes. **Biochemistry**, v. 32, n. 15, p. 4014-4021, 1993.

MALAMAS, M. S.; SREDY, J.; MOXHAM, C. *et al.* Novel benzofuran and benzothiophene biohenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1293-1310, 2000.

MARX, J. Cancer - Encouraging results for second-generation antiangiogenesis drugs. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1248-1249, 2005.

MASON, J. S.; MORIZE, I.; MENARD, P. R. *et al.* New 4-point pharmacophore method for molecular similarity and diversity applications: overview of the method and applications, including a novel approach to the design of combinatorial libraries containing privileged substructures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 17, p. 3251-3264, 1999.

MATHEUS, M. E.; OLIVEIRA, L. F.; FREITAS, A. C. C. *et al.* Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 12, p. 1219-1222, 1991.

MCDOWELL, R. S.; BLACKBURN, B. K.; GADEK, T. R. *et al.* From peptide to non-peptide. 2. The *de novo* design of potent, nonpeptidal inhibitors of platelet aggregation based on a benzodizepinedione scaffold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 12, p. 5077-5083, 1994.

MCINTYRE, J. A.; CASTANER, J. Sunitinib malate - Oncolytic drug multitargeted tyrosine kinase inhibitor. **Drugs of The Future**, v. 30, n. 8, p. 785-792, 2005.

MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. Ruthenium red-catalyzed degradation of peroxides can prevent mitochondrial oxidative damage induced by either *tert*-butyl hydroperoxide or inorganic phosphate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, n. 2, p. 275-280, 1998.

MELIKIAN, A.; SCHLEWER, G.; CHAMBON, J. P.; WERMUTH, C. G. Condensation of muscimol or thiomuscimol with aminopyridazines yields GABA-A antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 22, p. 4092-4097, 1992.

MIRANDA, A. L. P.; SOLER, O.; FREITAS, A. C. C.; BARREIRO, E. J. New pyrazolylhydrazone derivatives as inhibitors of platelet-aggregation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, suppl. 1, p. 210-215, 1994.

MIRANDA, A. L. P.; LIMA, P. C.; TRIBUTINO, J. L. M. *et al.* Antiinflammatory, analgesic and anti-platelet properties of LASSBio-294, a new thienylacylhydrazone derivative. **Abstracts du 6^{ème} Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie**, P296; Rennes, França, 2002.

MIRZADEGAN, T.; DIHEL, F.; EBI, B. *et al.* Identification of the binding site for a novel class of CCR2B chemokine receptor antagonists. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25562-25571, 2000.

MIRZOEVA, S.; SAWKAR, A.; ZASADZKI, M. *et al.* Discovery of a 3-amino-6-phenyl-pyridazine derivative as a new synthetic antineuroinflammatory compound. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 563-566, 2002.

MORELAND, L.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P. Abatacept. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 185-186, 2006.

MÜLLER, G. Medicinal Chemistry of target family-directed masterkeys. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 681-691, 2003.

NARGUND, R. P.; PATCHETT, A. A.; BACH, M. G. *et al.* Peptidomimetic growth hormone secretagogues. Design considerations and therapeutic potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 17, p. 3103-3127, 1998.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.

NORMAN, P. Mecasermin - Tercica. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 7, n. 4, p. 371-380, 2006.

PATCHETT, A. A.; NARGUND, R. P. Privileged structures – an update. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 289-298, 2000.

PATCHETT, A. A.; NARGUND, R. P.; TATA, J. R. *et al.* Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v. 92, n. 15, p. 7001-7005, 1995.

PATRIGNANI, P.; PANARA, M. R.; GRECO, A.; FUSCO, O.; NATOLI, C.; IACOBELLI, S.; CIPOLLONE, F.; GANCI, A.; CREMINON, C.; MACLOUF, J.; PATRONO, C. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, p. 1705-1712, 1994.

PENNING, T. D.; TALLEY, J. J.; BERTENSHAW, S. R. *et al.* Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2

inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1347-1365, 1997.

PRASIT, P.; WANG, Z.; BRIDEAU, C. *et al.* The discovery of rofecoxib, [MK 966, Vioxx[®], 4-(4'-methylsulfonylphenyl-3-phenyl-2(5*H*)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 13, p. 1773-1778, 1999.

RIBEIRO, I. G.; DA-SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C. *et al.* Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-*a*]pyridine 3-acylarylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 225-235, 1998.

RICHARDSON, J. D.; AANONSEN, L.; HARGREAVES, K. M. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, n. 2, p. 145-153, 1998.

RICHARDSON, J. D.; KILO, S.; HARGREAVES, K. M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. **Pain**, v. 75, n. 1, p. 111-119, 1998.

RÖMER, D.; BÜSCHER, H. H.; HILL, R. C. *et al.* An opioid benzodiazepine. **Nature**, v. 298, n. 5876, p. 759-760, 1982.

RYAN, G. J.; JOBE, L. J.; MARTIN, R. Pramlintide in the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 10, p. 1500-1512, 2005.

SÁNCHEZ, T., MORENO, J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 57, n. 2-3, p. 119-131, 1999.

SCHMID, I.; UITTENBOGAART, C. H.; KELD, B. *et al.* A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow-cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, v. 2, p. 145-157, 1994.

SCHNUR, D. M.; BENO, B. R.; GOOD, A. TEBBEN, A. J. Approaches to target class library design. *In*: BAJORATH, J. (Ed.) **Chemoinformatics: Concepts, Methods and Tools for Drug Discovery, Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 2004. p.355-377.

SCHNUR, D. M.; HERMSMEIER, M. A.; TEBBEN, A. J. Are target-family-privileged substructures truly privileged? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2000-2009, 2006.

SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K. *et al.* Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, n. 25, p. 12013-12017, 1994.

SERVICE, R. F. Surviving the blockbuster syndrome. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1796-1799, 2004.

SHERIDAN, R. P.; MILLER, M. D. A method for visualizing recurrent topological substructures in sets of active molecules. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 5, p. 915-924, 1998.

SILVA, A. G.; ZAPATA-SUDO, G.; KUMMERLE, A. E. *et al.* Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 3431-3437, 2005.

SILVA, G. A.; COSTA, L. M. M.; BRITO, F. C. F. *et al.* New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives.

Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 12, n. 12, p. 3149-3158, 2004.

SILVEIRA, I. A. F. B.; PAULO, L. G.; MIRANDA, A. L. P.; ROCHA, S. O.; FREITAS, A. C. C.; BARREIRO, E. J. (1991) Substituted pyrazolylhydrazones - a new class of platelet-aggregation inhibitors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 9, p. 947-951, 1991.

SINCHOLLE, D.; BERTEZ, C.; LEGRAND, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of a dual inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways, cbs-1108 (2-acetylthiophene-2-thiazolylhydrazone). **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 35-2, n. 8, p. 1260-1263, 1985.

SINHA, J.; KURUP, A.; PALETI, A.; GUPTA, S. P. Quantitative structure-activity relationship study on some nonpeptidal cholecystokinin antagonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1127-1130, 1999.

STERNBACH, L. E. The benzodiazepine story. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1979.

SUNKEL, C. E.; DE CASA-JUANA, M. F.; SANTOS, L. *et al.* 4-Alkyl-1,4-dihydropyridine derivatives as specific PAF acether antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 12, p.3205-3210, 1990.

TANG, W. H. W.; BHAVNANI, S.; FRANCIS, G. S. Vasopressin receptor antagonists in the management of acute heart failure. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14, n. 5, p. 593-600, 2005.

THOMPSON, L. A.; ELLMAN, J. A. Synthesis and applications of small molecule libraries. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 1, p. 555-600, 1996.

VAN DER STELT, M.; VAN KUIK, J. A.; BARI, M. *et al.* Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: Conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 17, p. 3709-3720, 2002.

VAN NIEL, M. B.; FREEDMAN, S. B.; MATASSA, V. G. *et al.* CCK-B selective receptor ligands: novel 1,3,5-trisubstituted benzazepin-2-ones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 13, p. 1421-1426, 1995.

VAN NIEL, M.; BEER, M.; CASTRO, J. *et al.* Parallel synthesis of 3-aryloxy-2-propanolamines and evaluation as dual affinity 5-HT_{1A} and 5-HT reuptake ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 22, p. 3243-3248, 1999.

VAN RHEE, A. M.; JIANG, J.-I.; MELMAN, N. *et al.* Interaction of 1,4-dihydropyridine and pyridine derivatives with adenosine receptors: selectivity for A₃ receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 15, p. 2980-2989, 1996.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 1995.

VATER, W.; SCHLOSSM, K.; STOEPEL, K. *et al.* Pharmacology of 4-(2'-nitrophenyl)-2,6-dimethyl-3,5-dicarbomethoxy-1,4-dihydropyridine (Nifedipine, BAY A 1040). **Arzneimittel-Forschung**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 1972.

VELDHUIS, W. B.; VAN DER STELT, M.; WADMAN, M. W. *et al.* Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: Role of vanilloid receptors and lipoxygenases. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 4127-4133, 2003.

WALSER, A.; FLYNN, T.; MASON, C. *et al.* Triazolobenzo- and triazolothienodiazepines as potent antagonists of platelet activating factor.

Journal of Medicinal Chemistry, v. 34, n. 3, p. 1209-1221, 1991.

WANG, Z. L.; CANAGARAJAH, B. J.; BOEHM, J. C. *et al.* Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. **Structure with Folding & Design**, v. 6, n. 9, p. 1117-1128, 1998.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Nova Iorque: Academic Press, 1996. Cap. 6: Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. p. 81-100.

WERMUTH, C. G. *ibid*, 1996. Cap. 13: Molecular variations based on isosteric replacements. p. 203-238.

WERMUTH, C. G. *ibid*, 1996. Cap. 16: Application strategies for primary structure-activity relationships exploration. p. 295-310.

WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: another way to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1303-1314, 2004.

WERMUTH, C. G.; BOURGUIGNON, J. J.; HOFFMANN, R. *et al.* SR 46559 A and related aminopyridazines are potent muscarinic agonists with no cholinergic syndrome. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 8, p. 833-838, 1992.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms in Medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

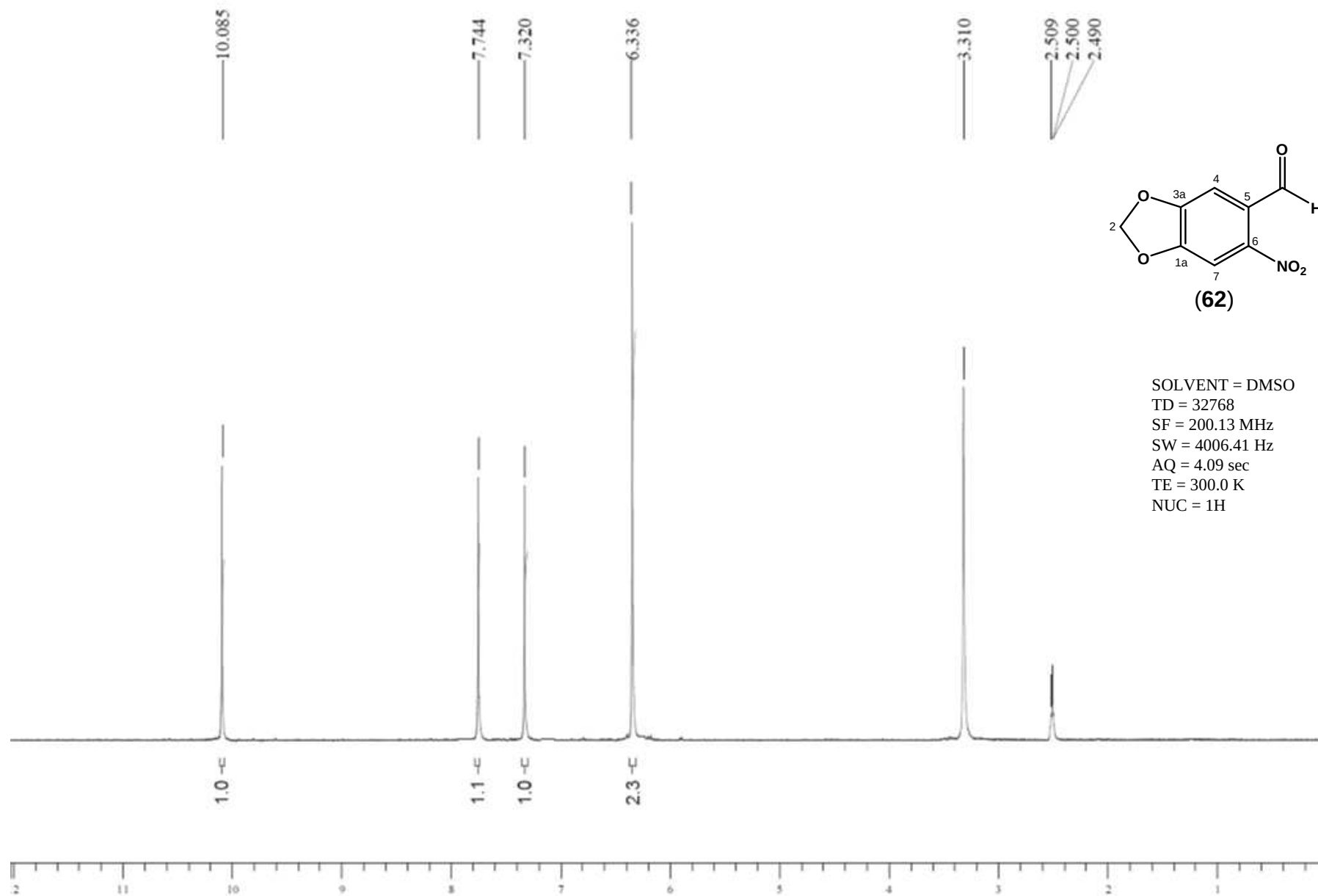
WILLIAMS, M.; KOWALUK, E. A.; ARNERIC, S. P. Emerging molecular approaches to pain therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1481-1500, 1999.

WINPENNY, J. P. Lubiprostone Sucampo Pharmaceuticals Takeda Pharmaceutical. **IDrugs**, v. 8, n. 5, p. 416-422, 2005.

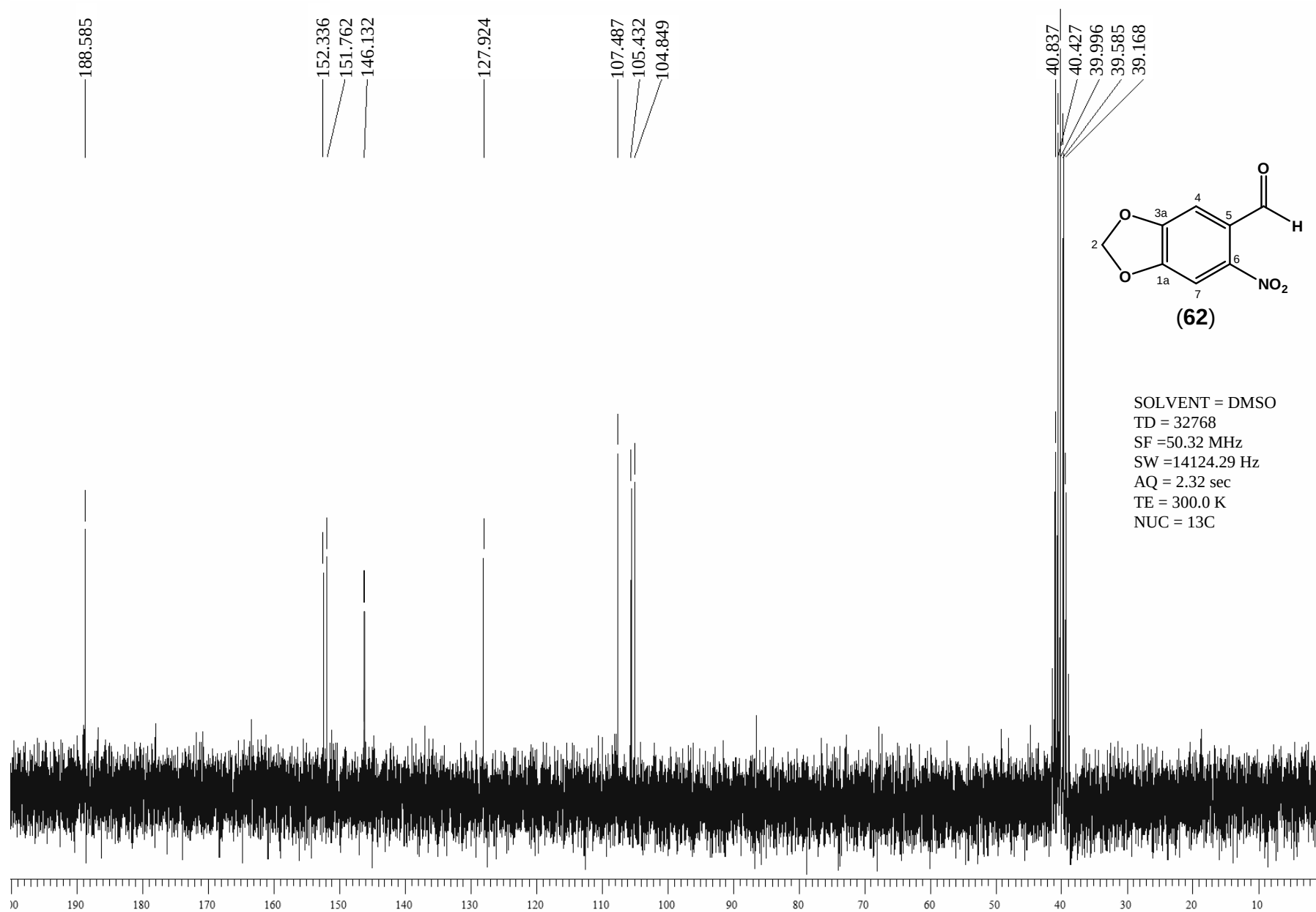
ZHANG, Y., SHAFFER, A., PORTANOVA J. *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1069-1075, 1997.

ANEXO

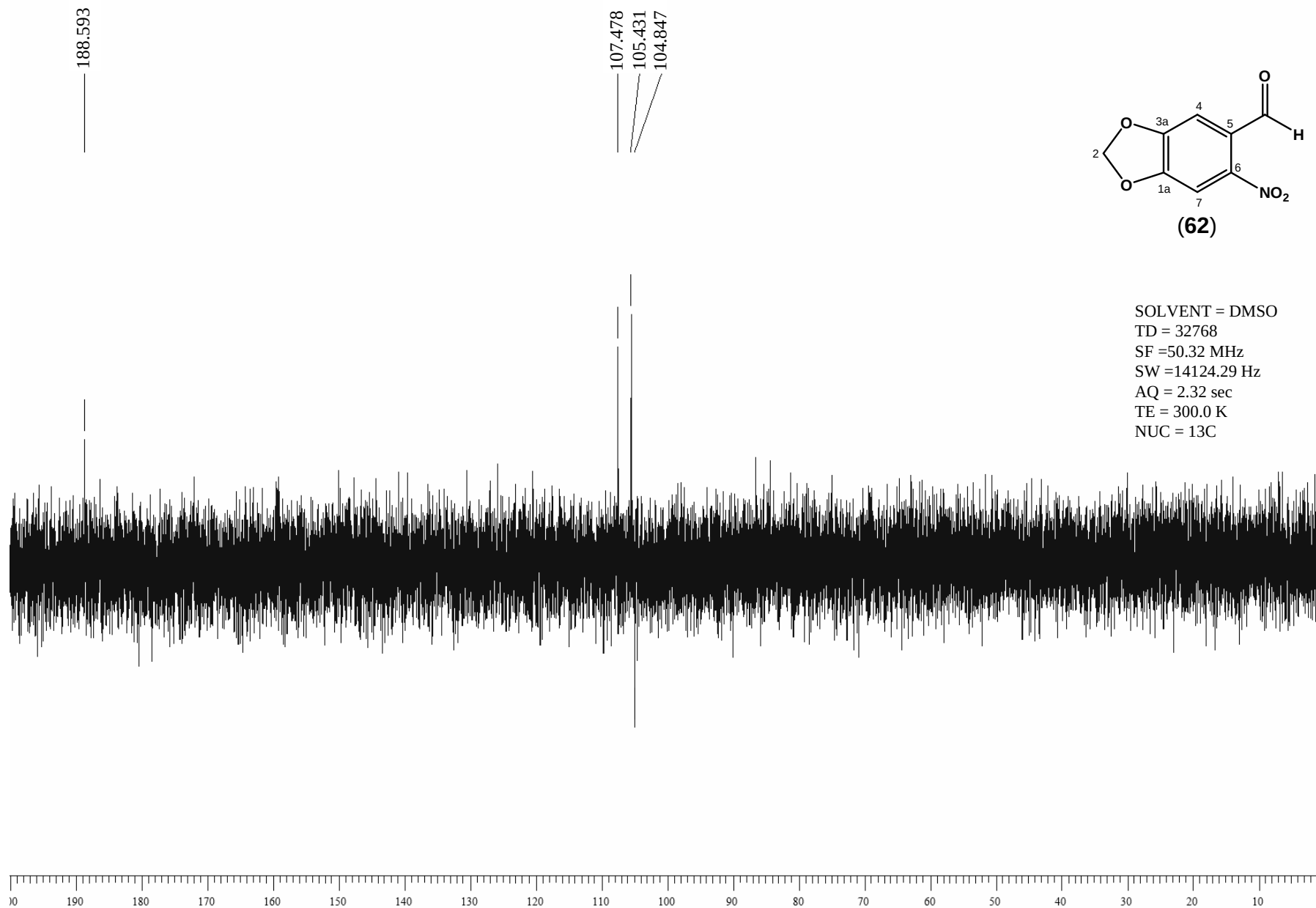
Espectros



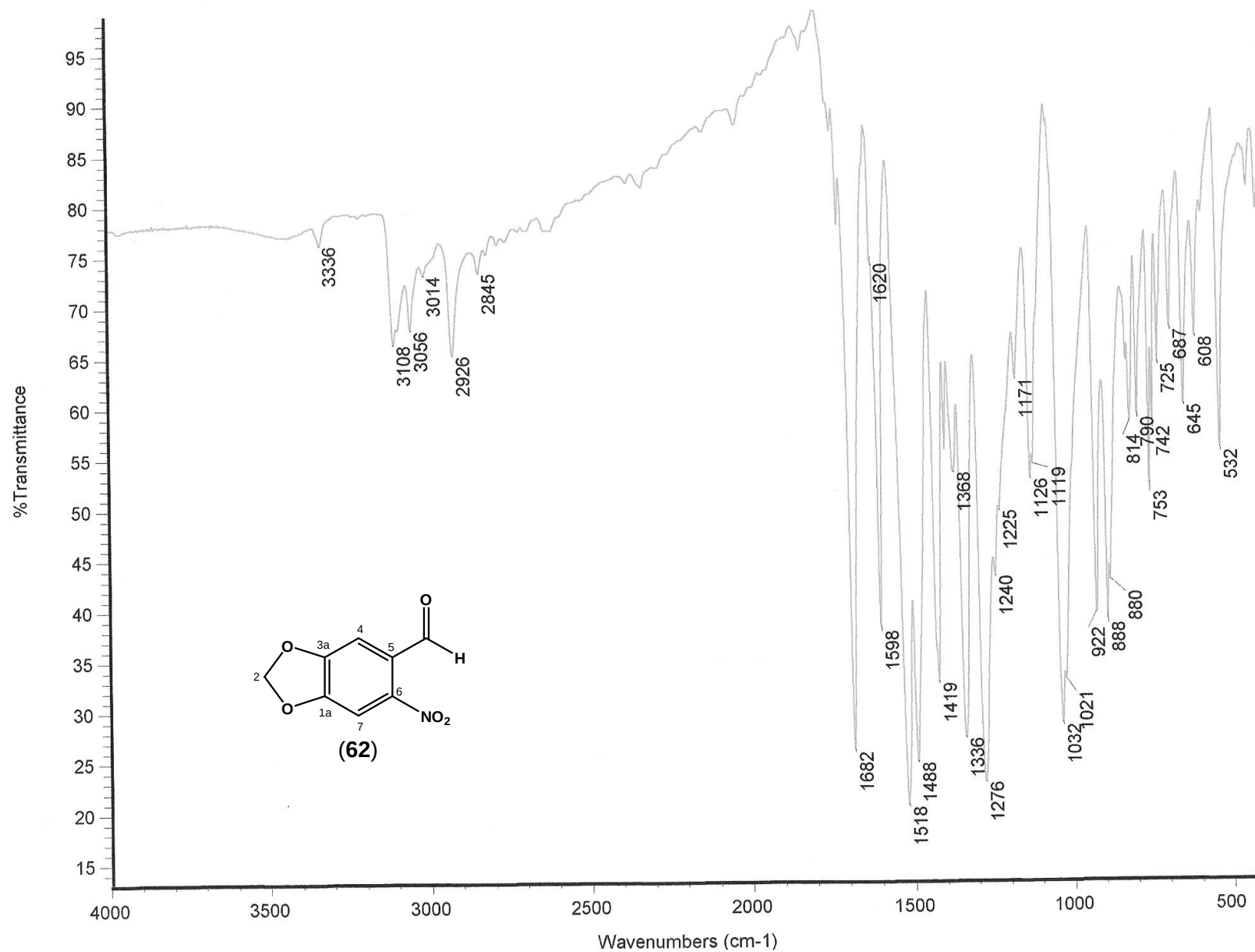
Espectro 1 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(62)**



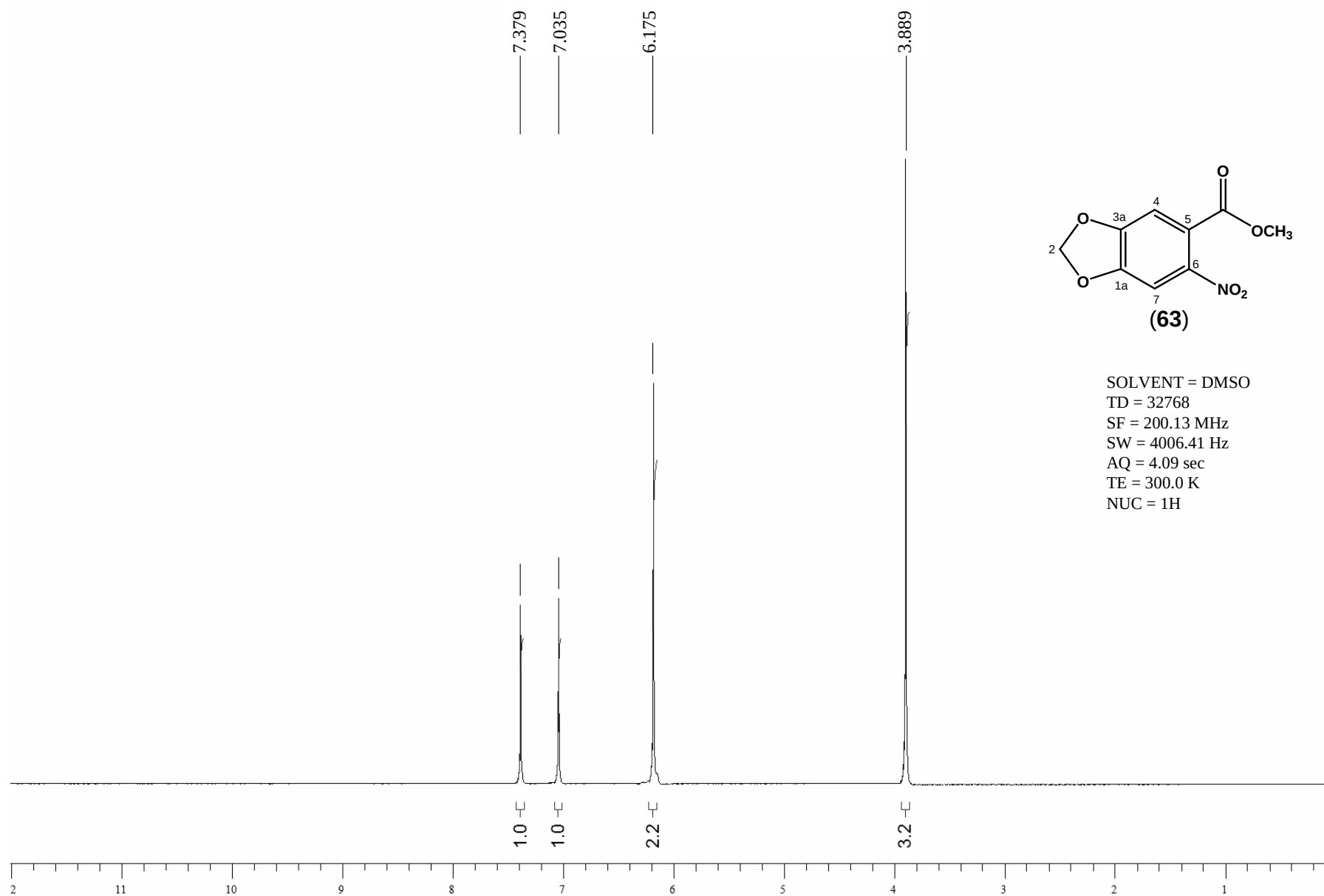
Espectro 2 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (62)



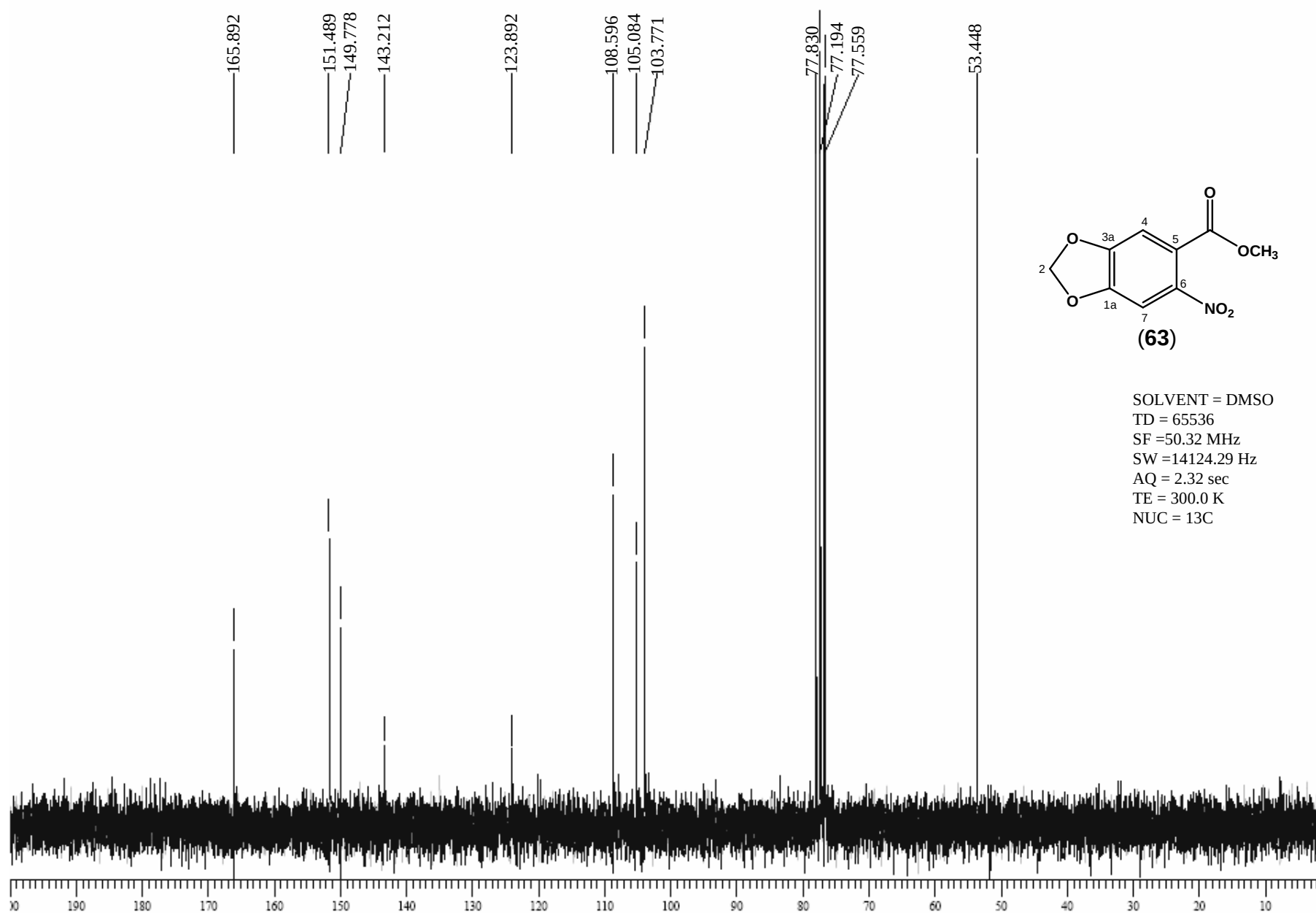
Espectro 3 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(62)**



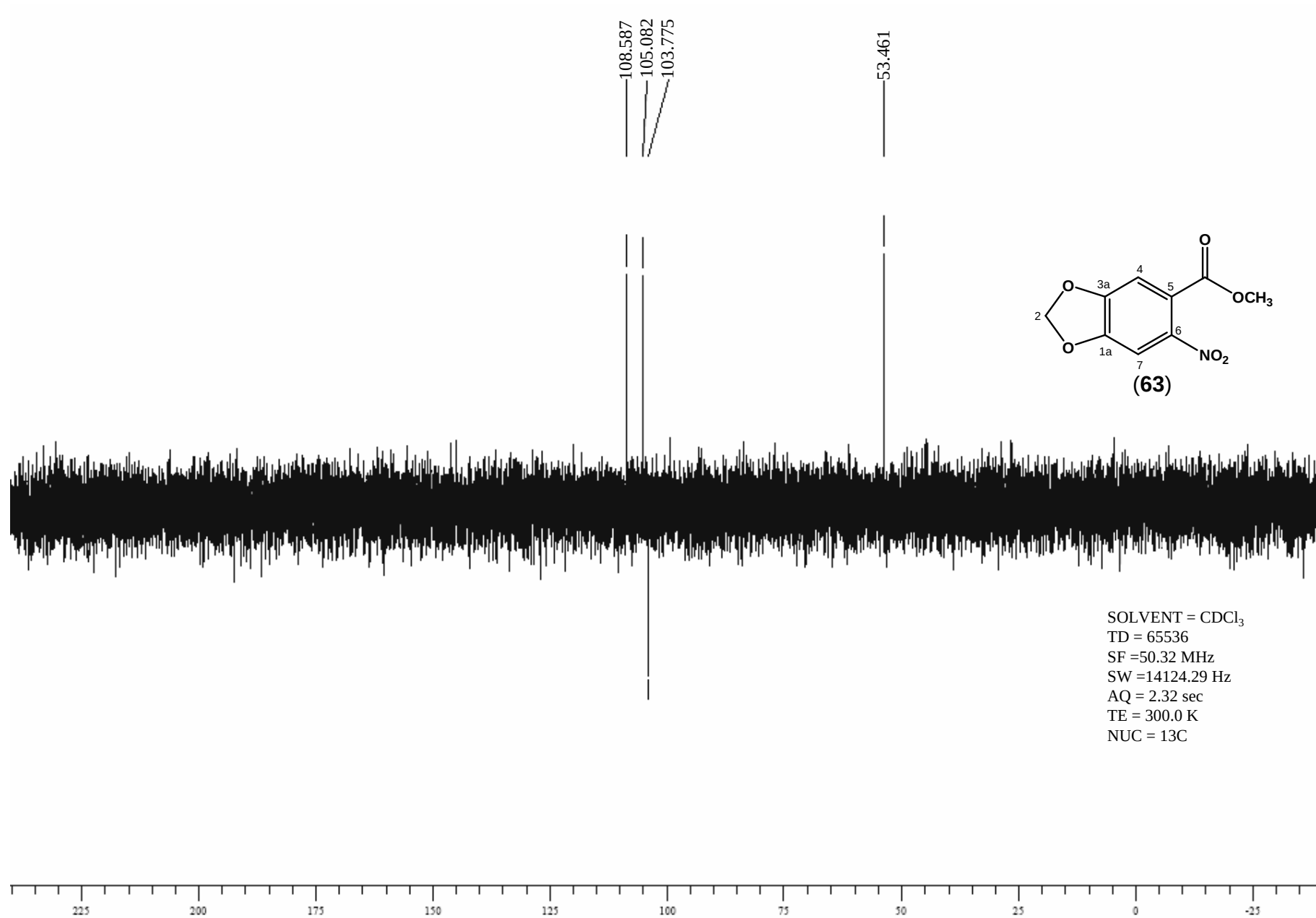
Espectro 4 – Infravermelho do derivado (62)



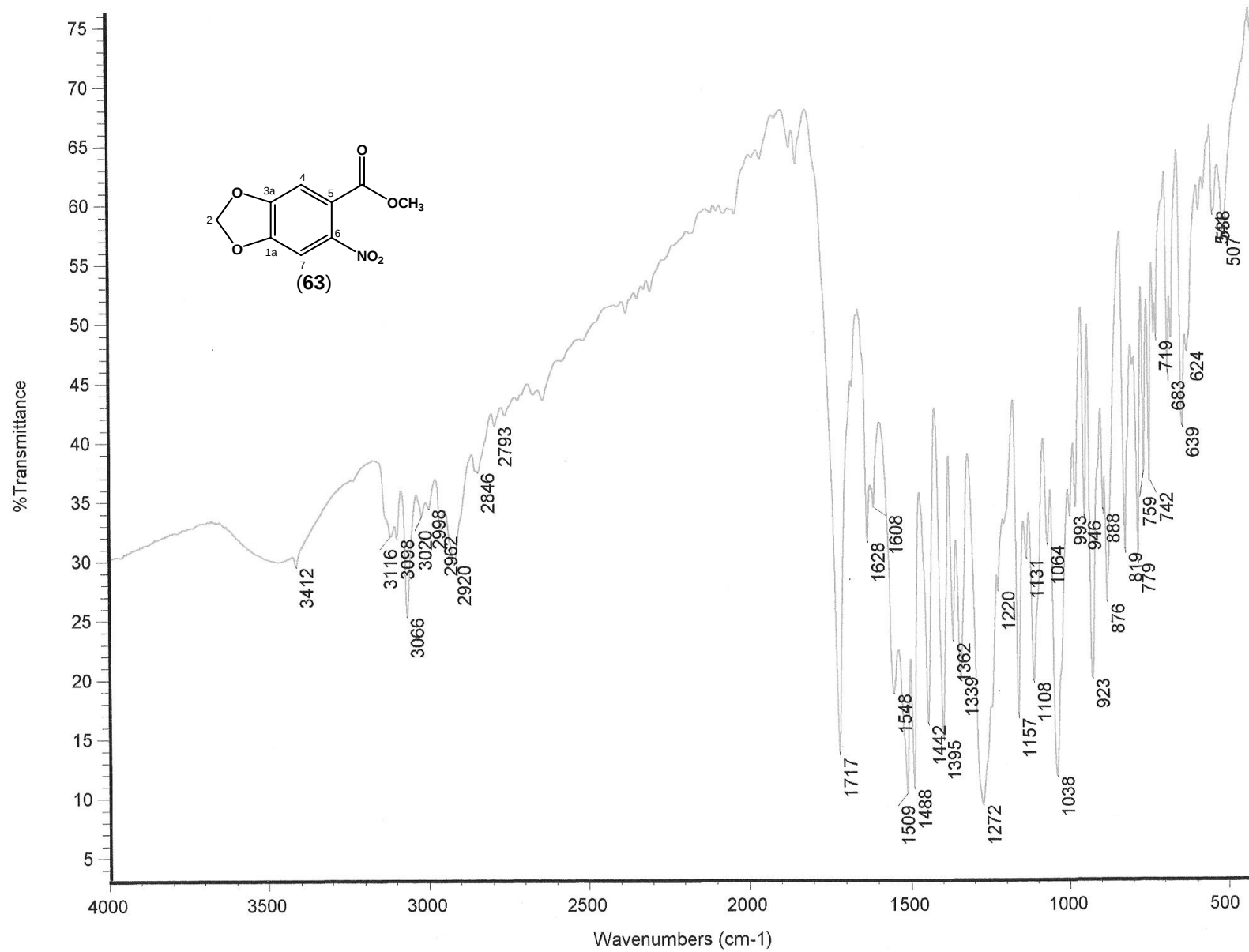
Espectro 5 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (63)



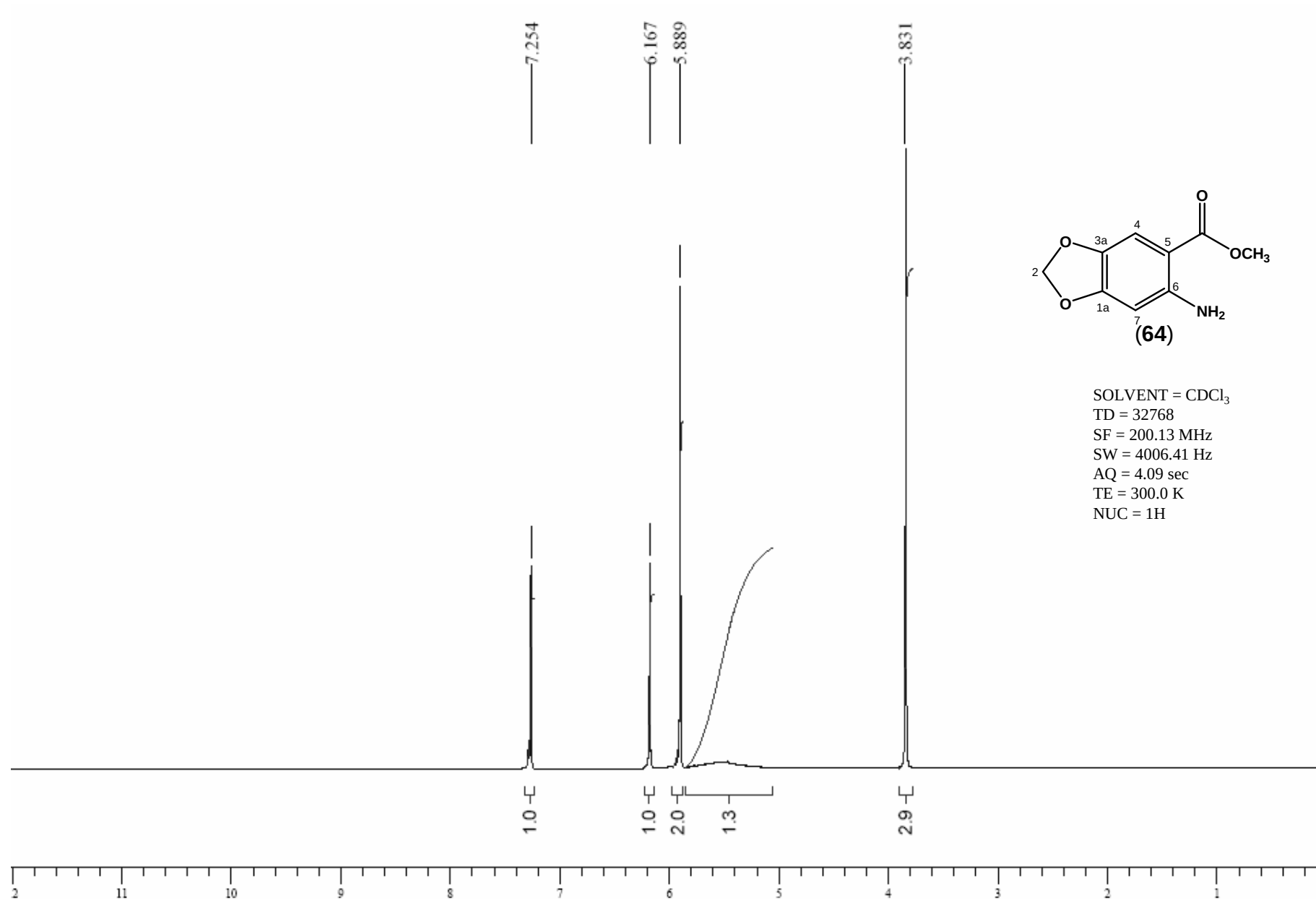
Espectro 6 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C do derivado (63)



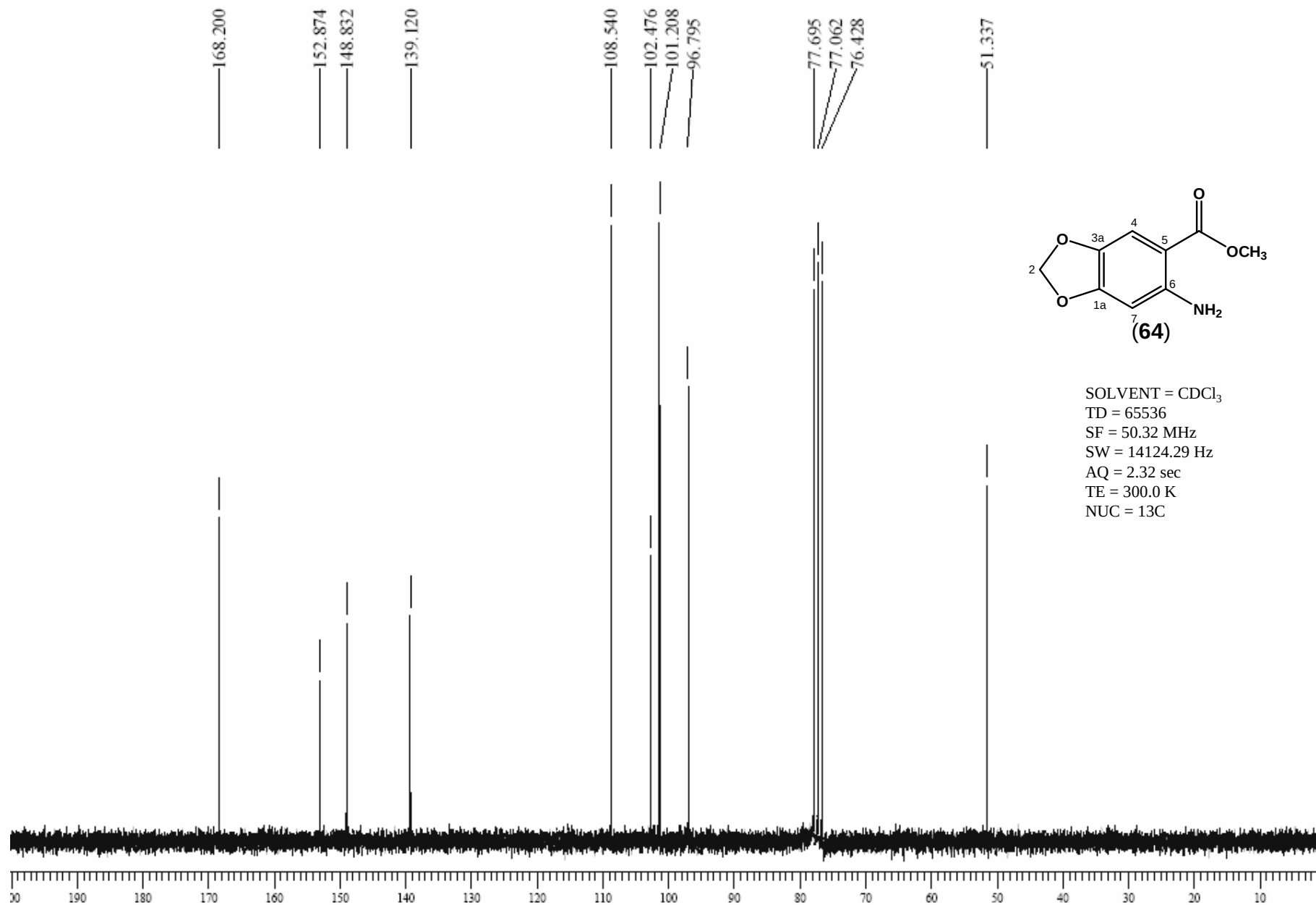
Espectro 7 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(63)**



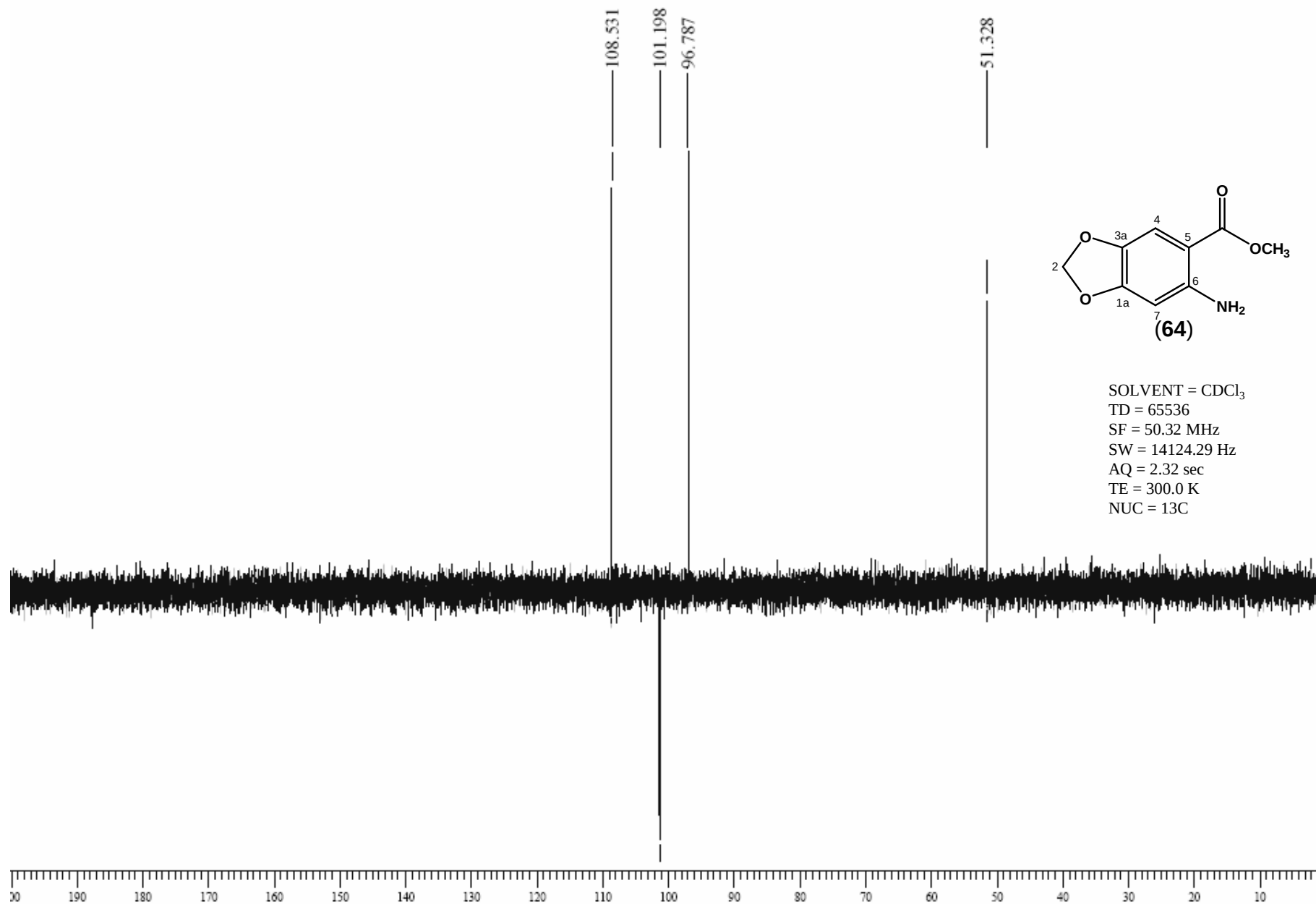
Espectro 8 – Infravermelho do derivado (63)



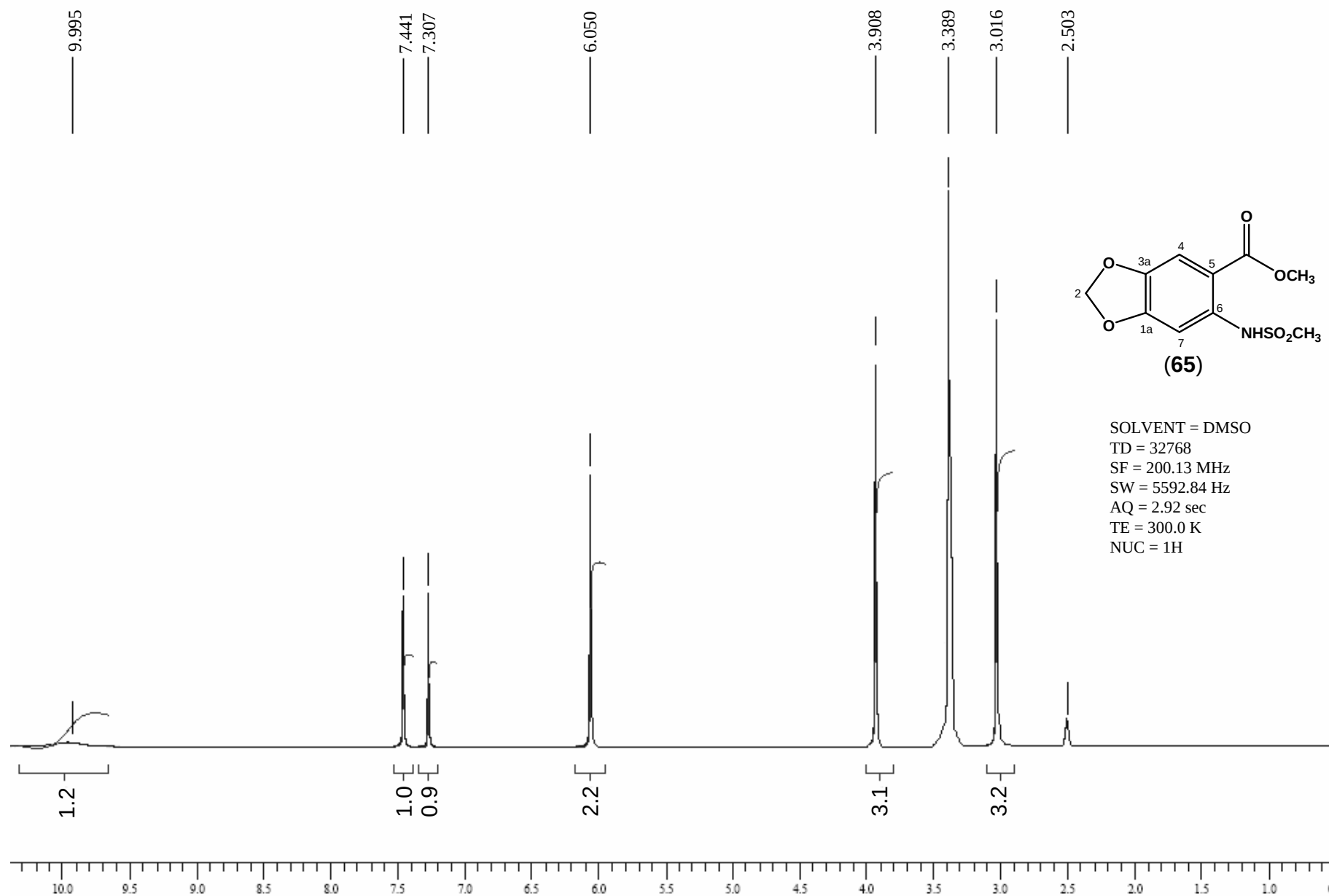
Espectro 9 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H do derivado (64)



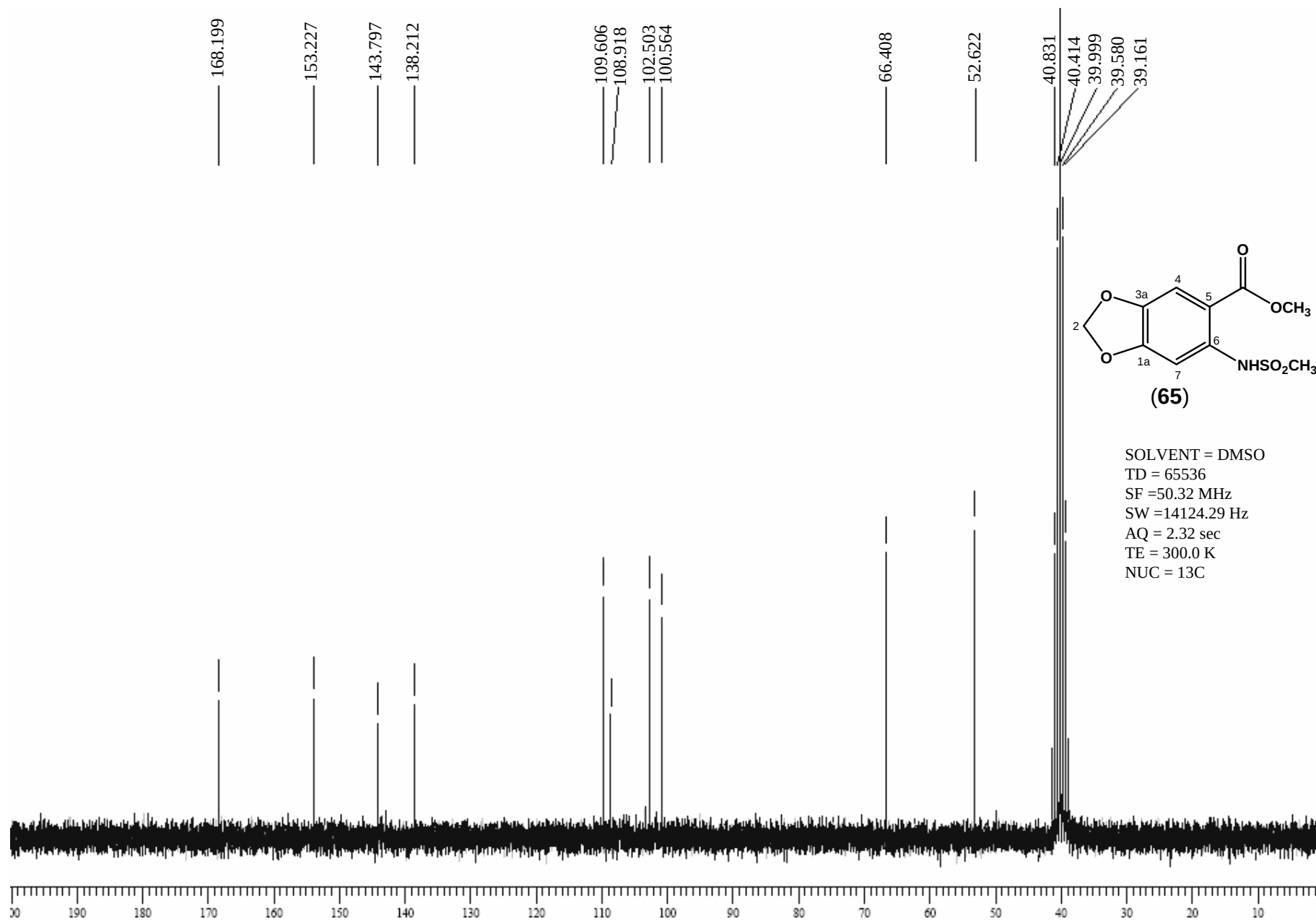
Espectro 10 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (64)



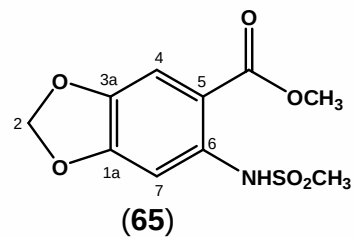
Espectro 11 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (64)



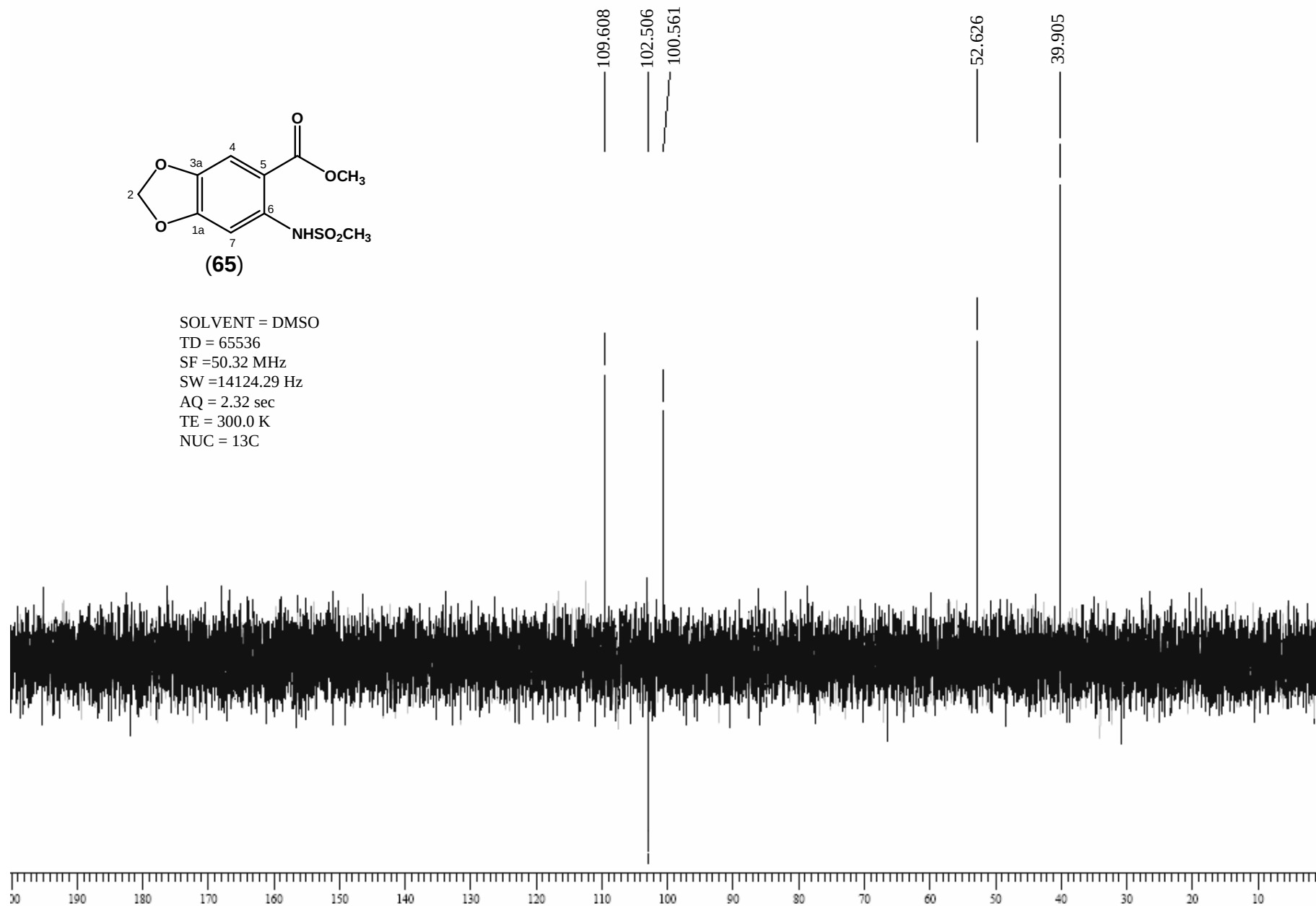
Espectro 12 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H do derivado (64)



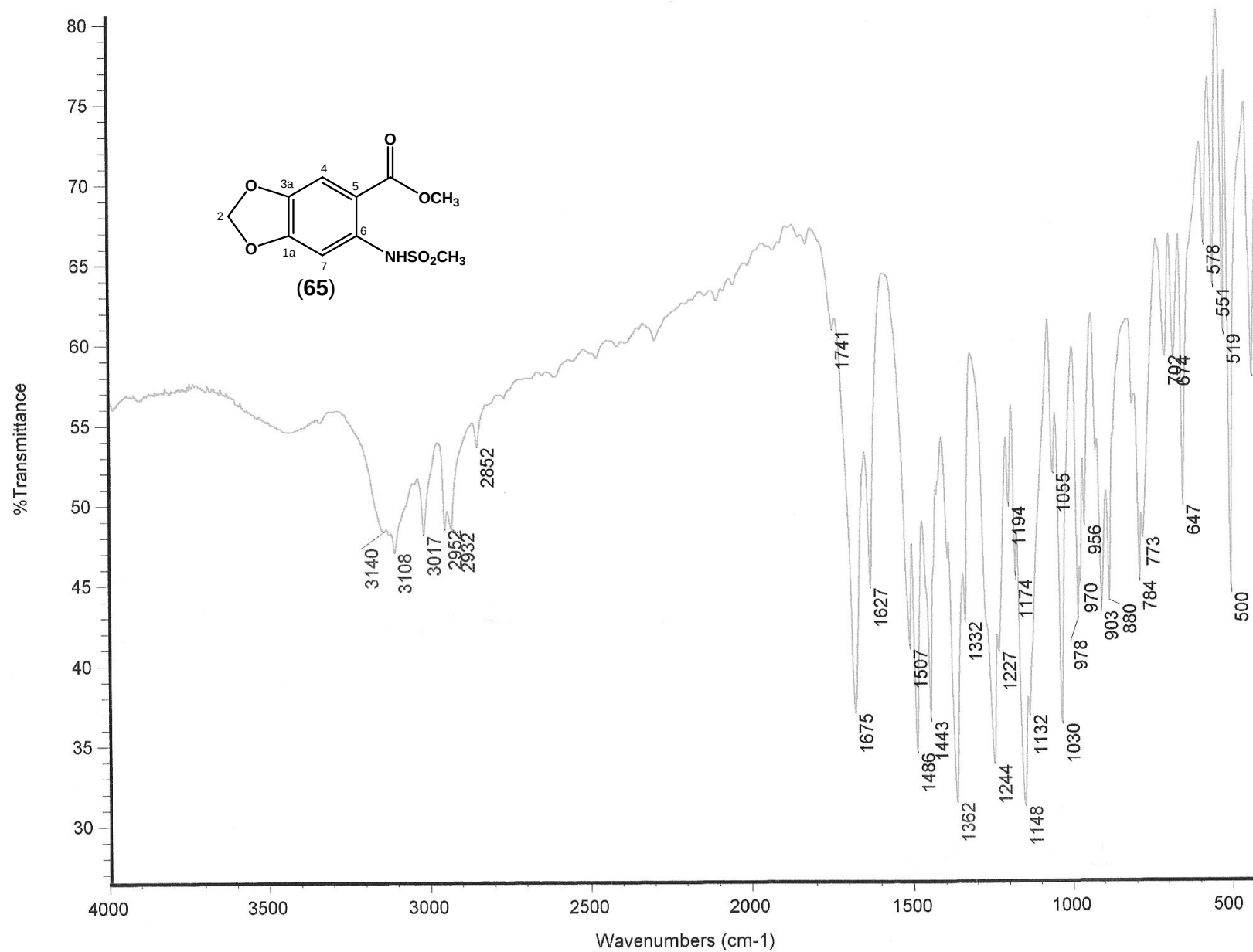
Espectro 13 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C do derivado (65)



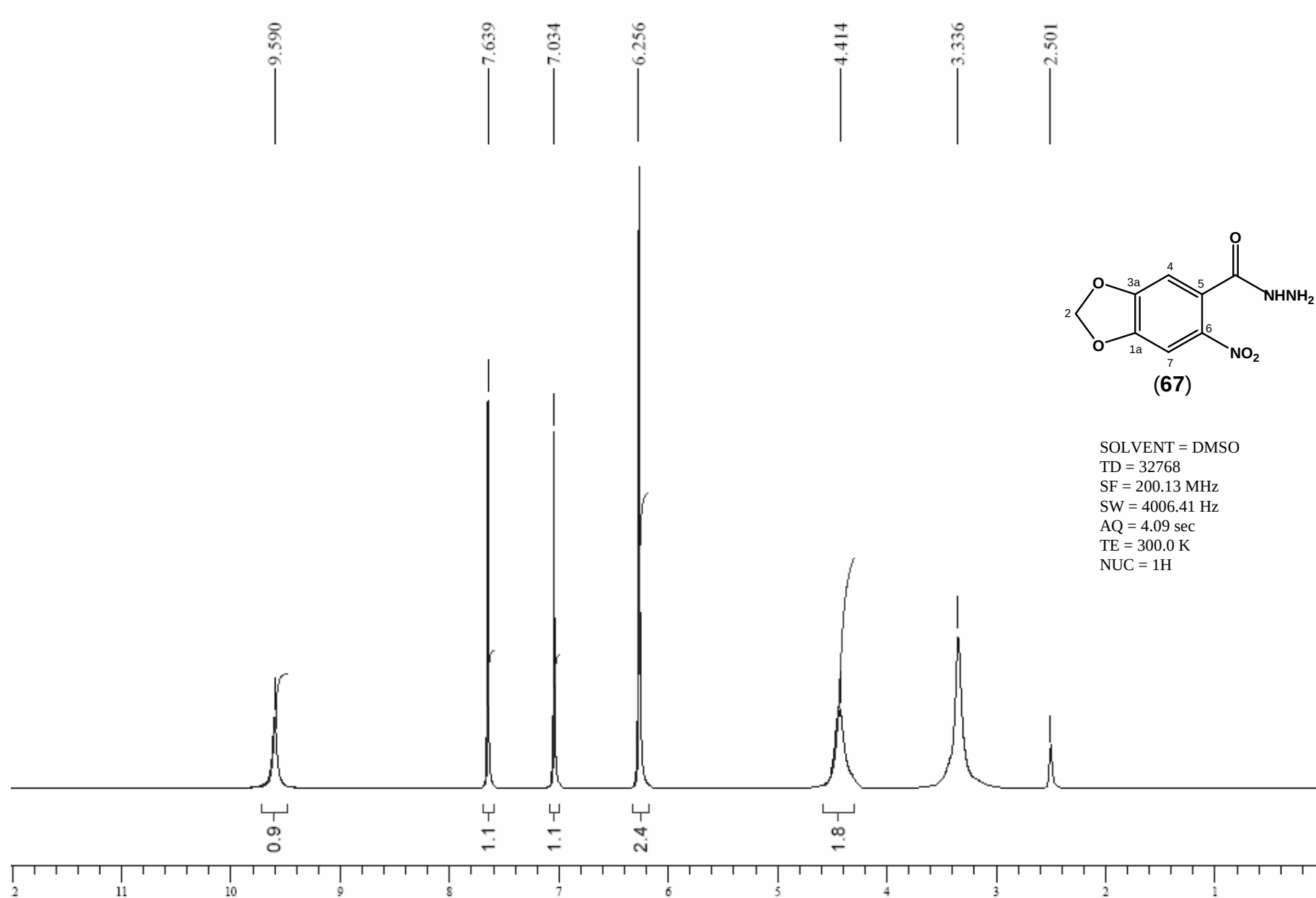
SOLVENT = DMSO
TD = 65536
SF = 50.32 MHz
SW = 14124.29 Hz
AQ = 2.32 sec
TE = 300.0 K
NUC = ¹³C



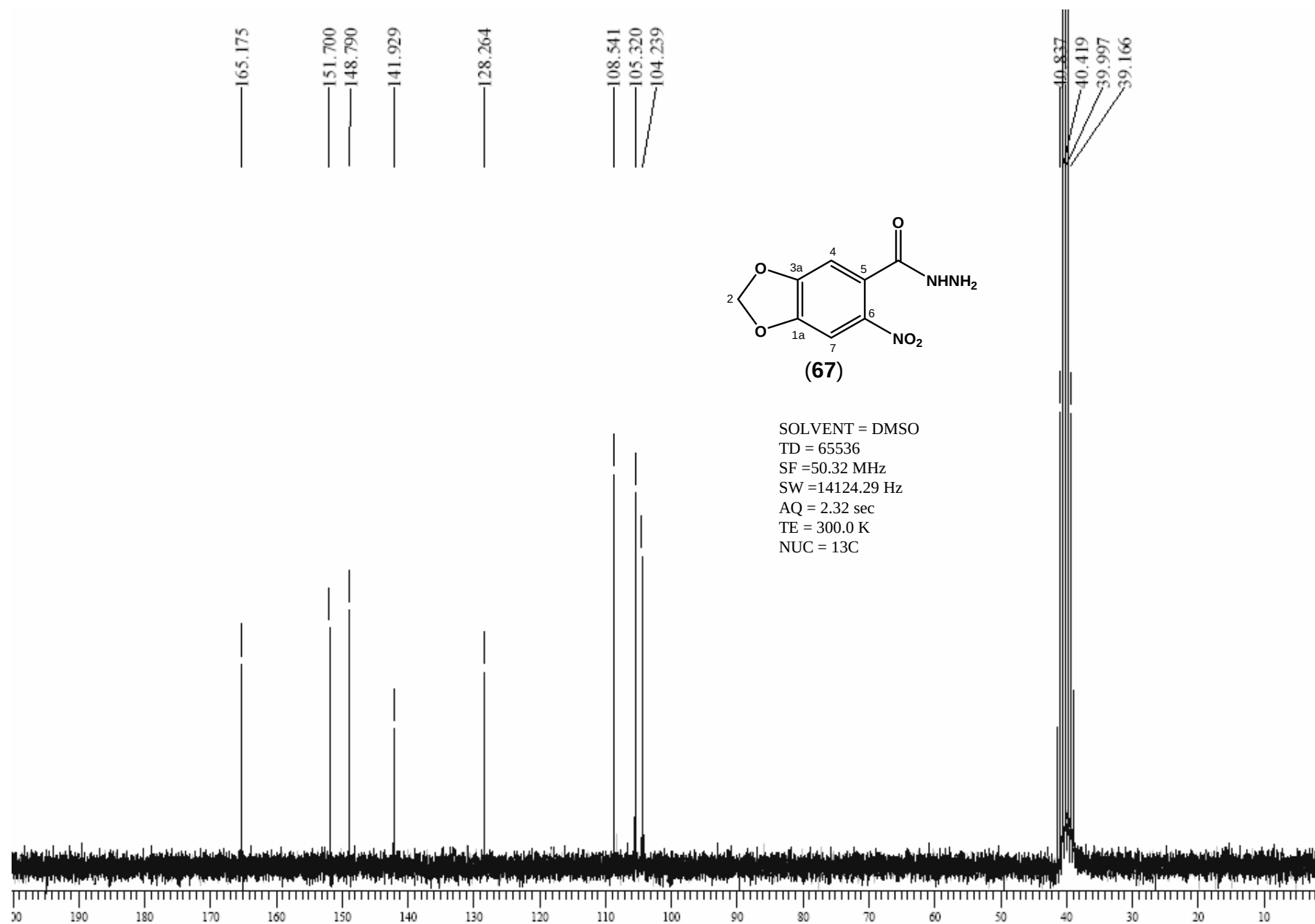
Espectro 14 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (65)



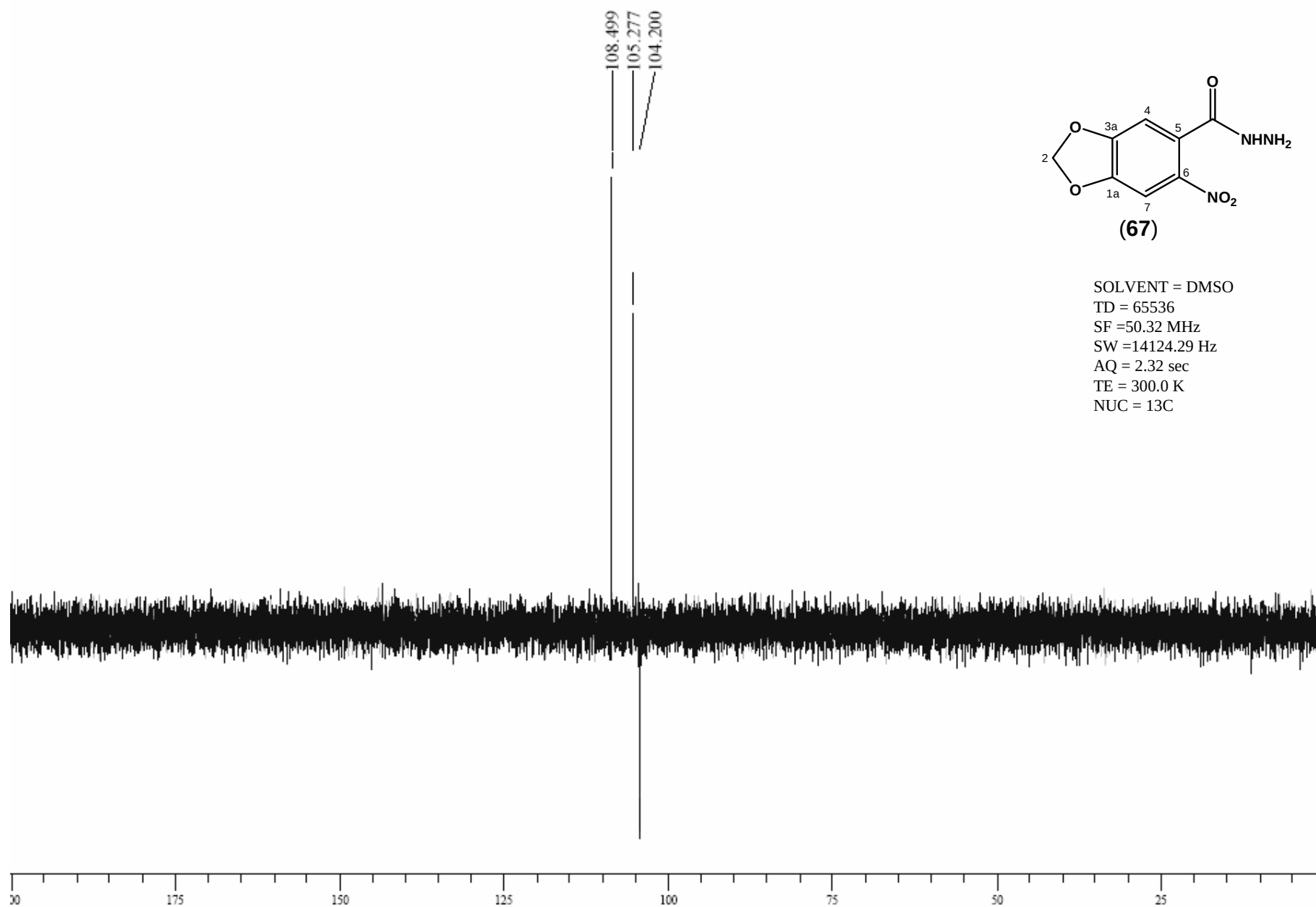
Espectro 15 – Infravermelho do derivado (65)



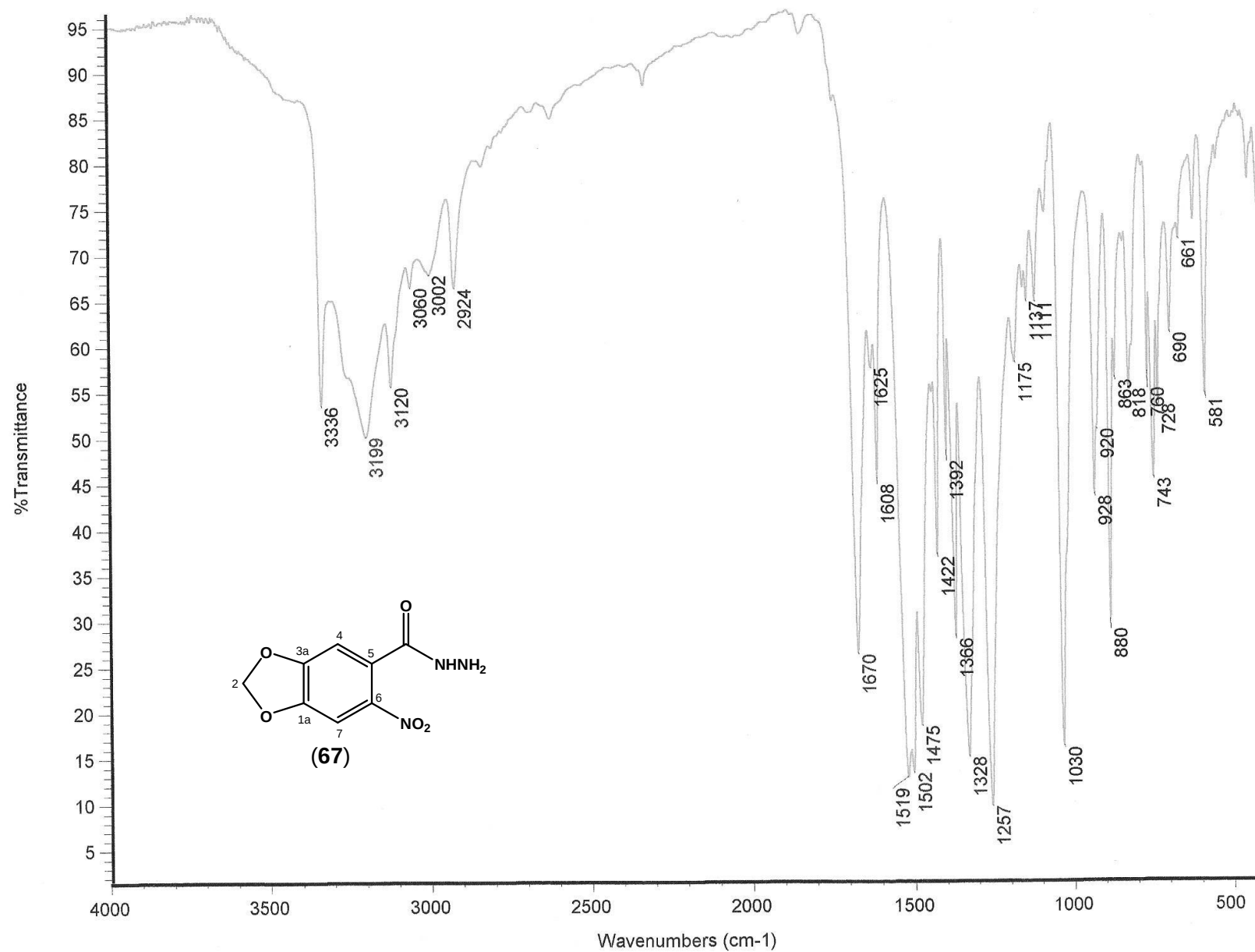
Espectro 16 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (67)



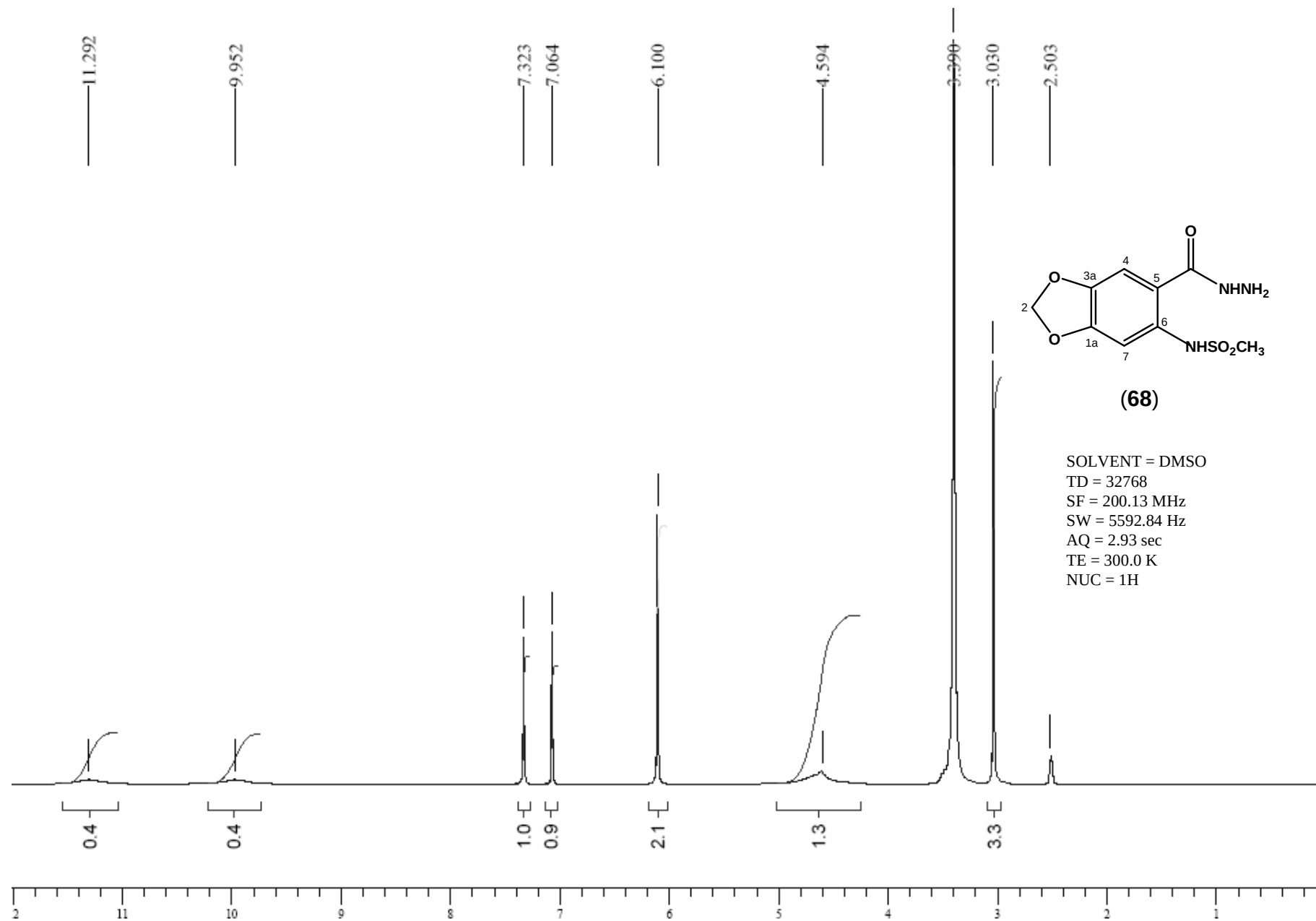
Espectro 17 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (67)



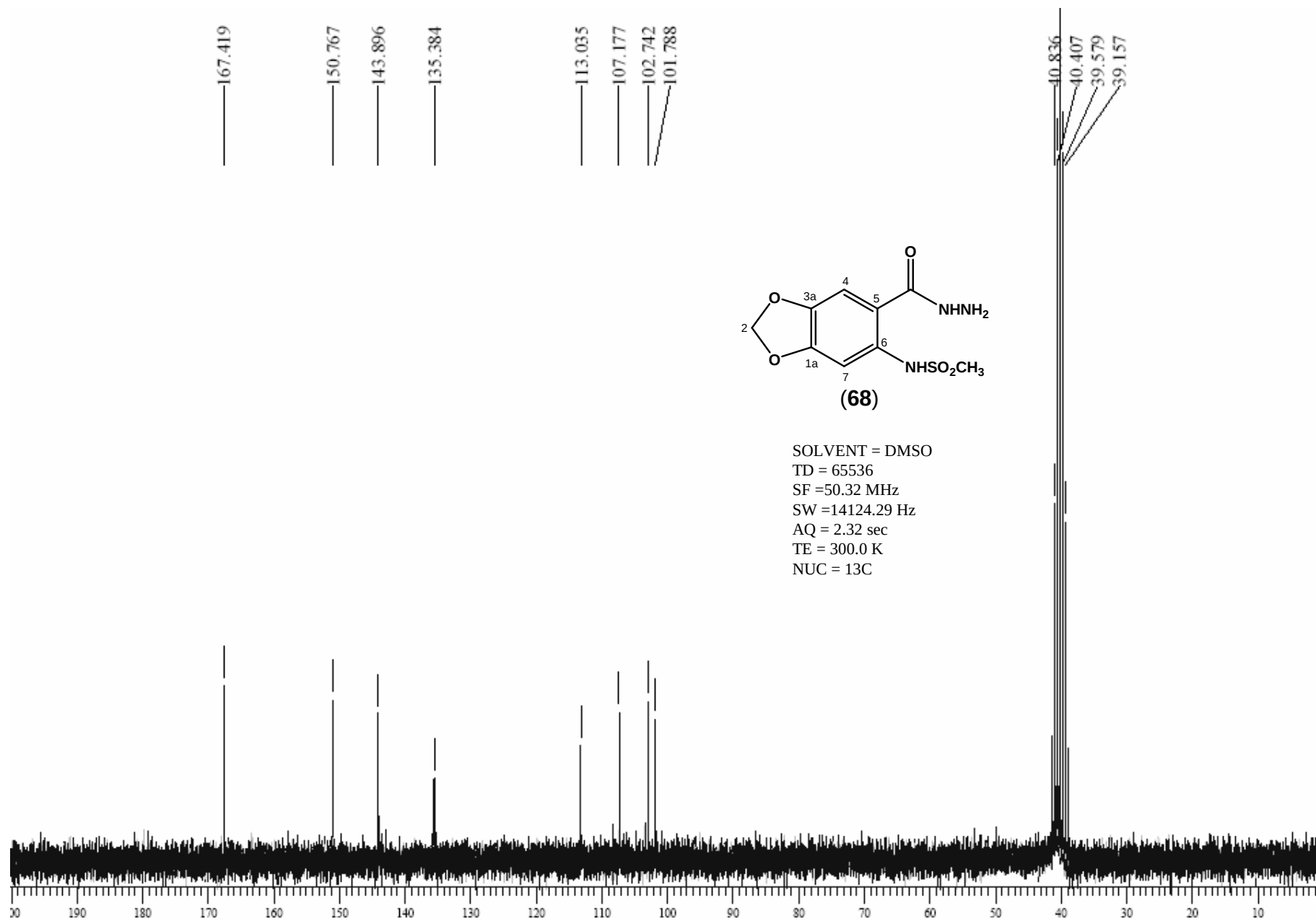
Espectro 18 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (67)



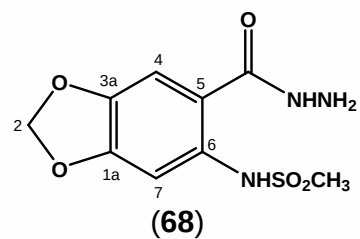
Espectro 19 – Infravermelho do derivado (67)



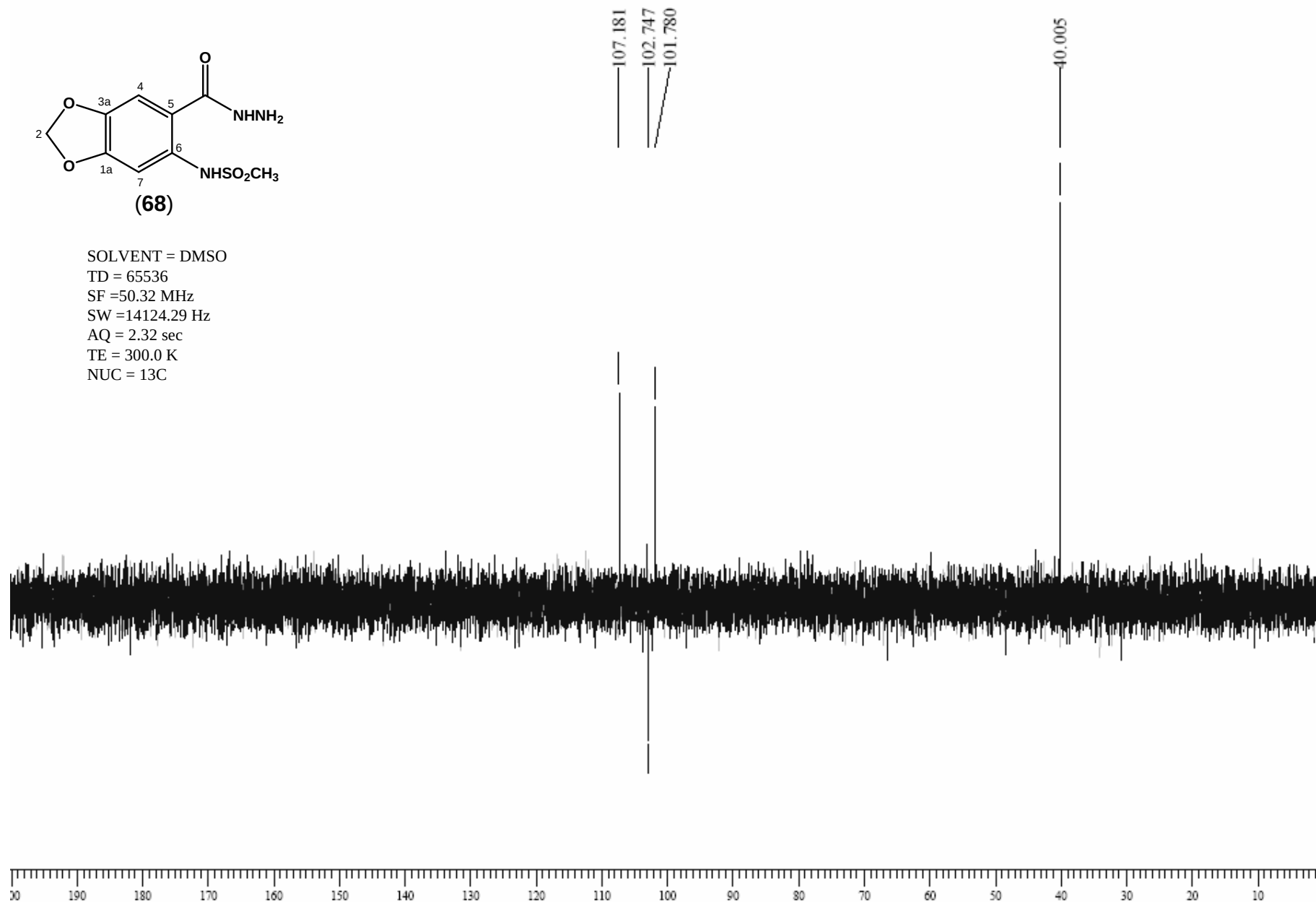
Espectro 20 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (68)



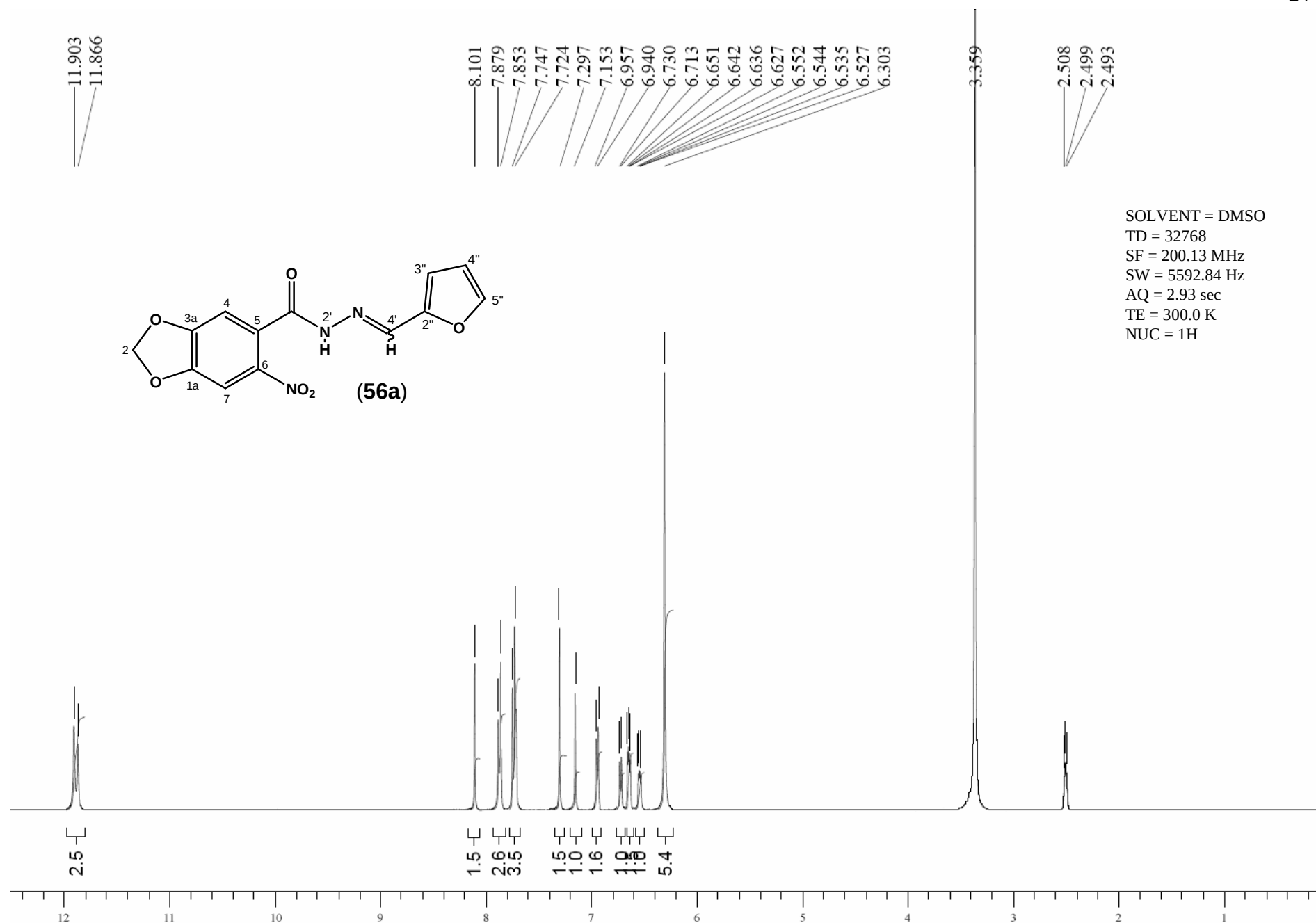
Espectro 21 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (68)



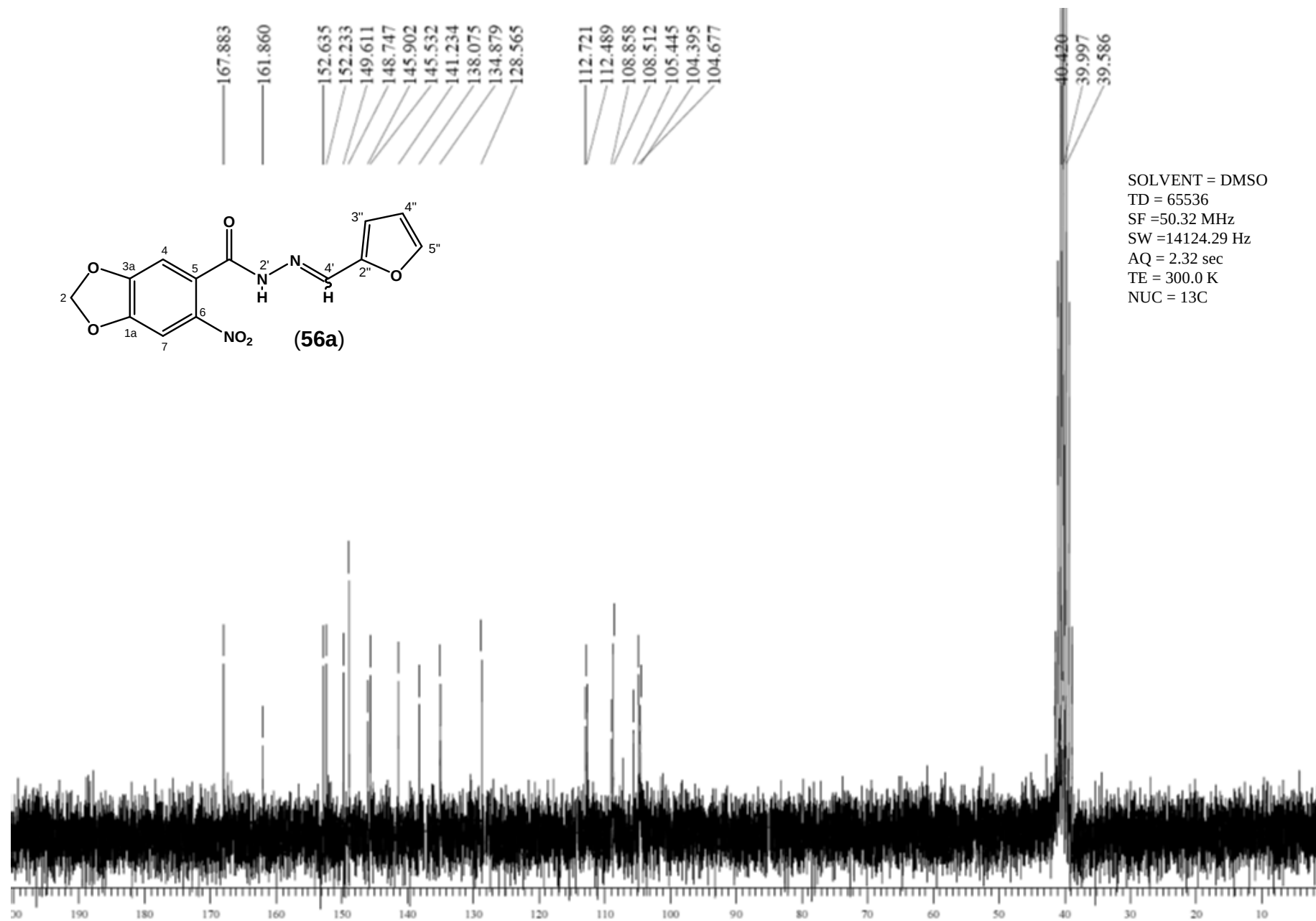
SOLVENT = DMSO
TD = 65536
SF = 50.32 MHz
SW = 14124.29 Hz
AQ = 2.32 sec
TE = 300.0 K
NUC = ¹³C



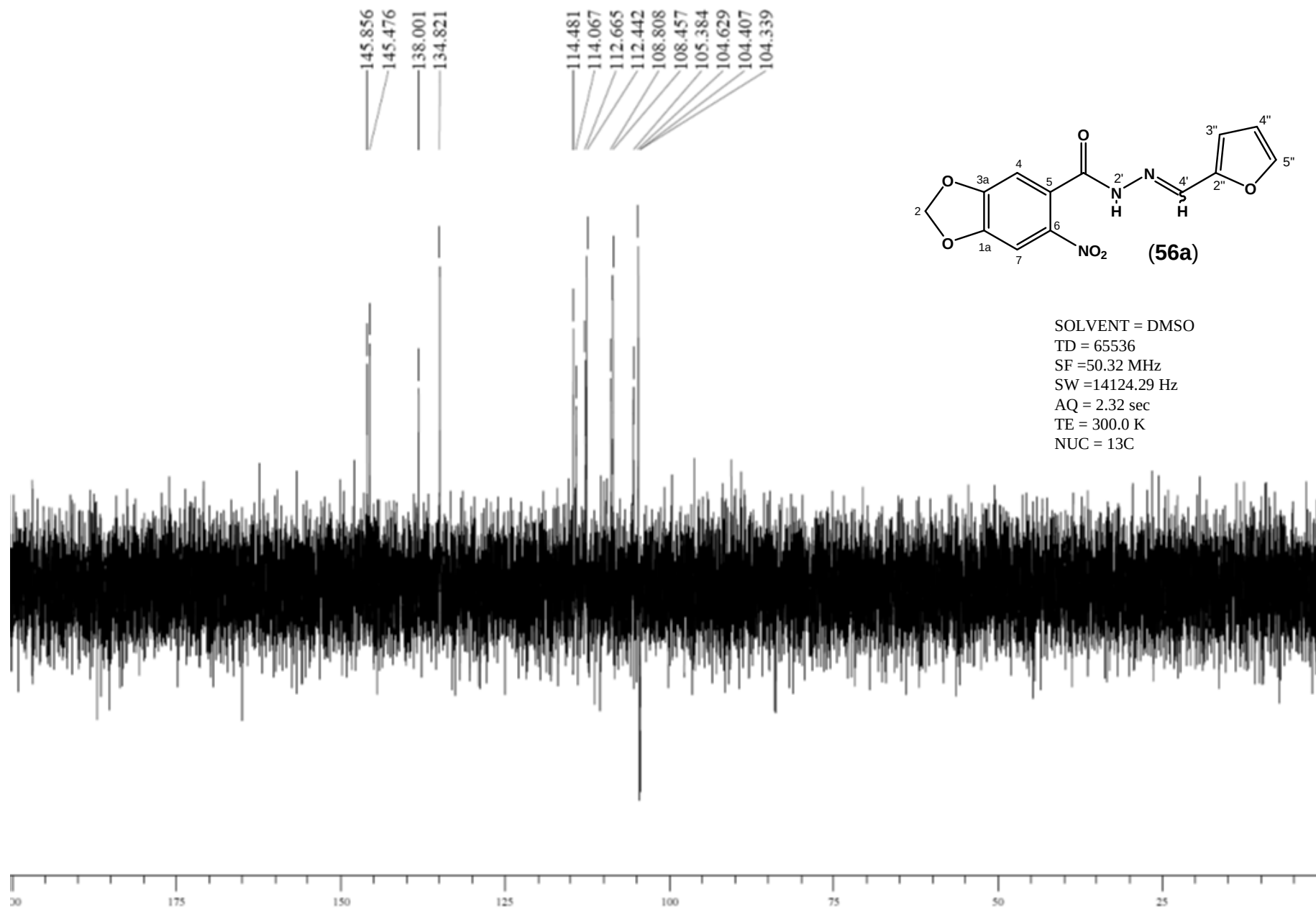
Espectro 22 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(68)**



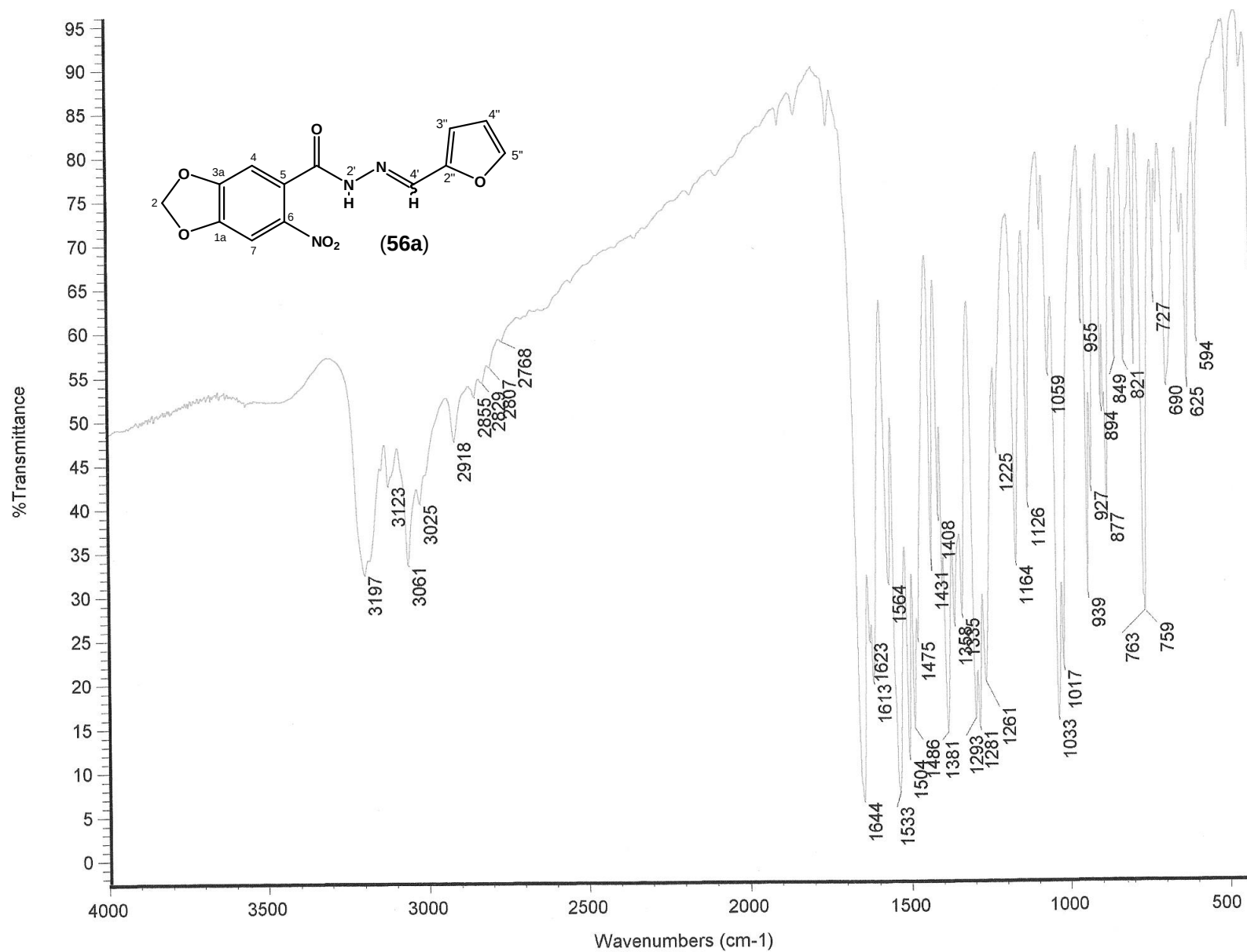
Espectro 23 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56a)



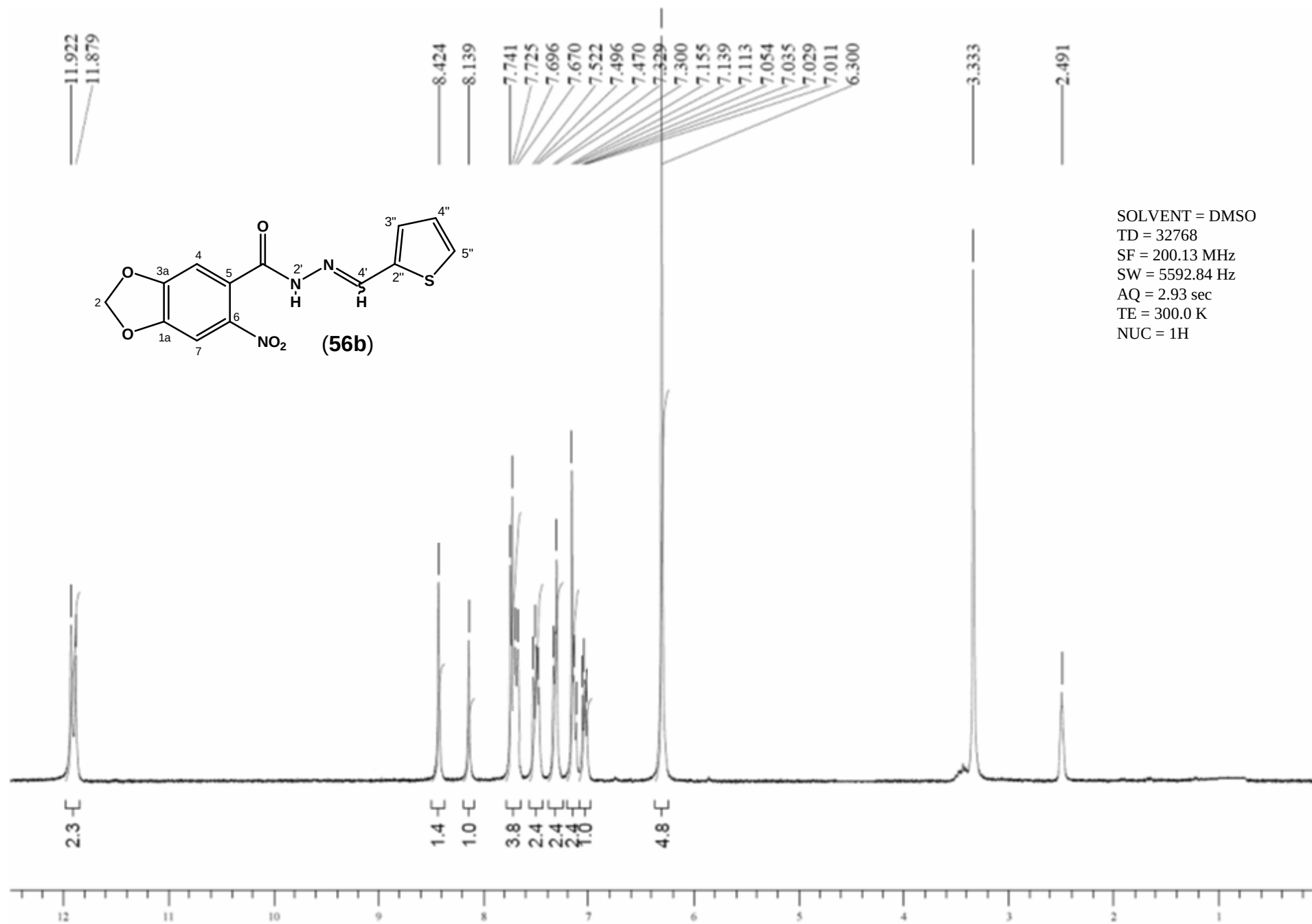
Espectro 24 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56a)



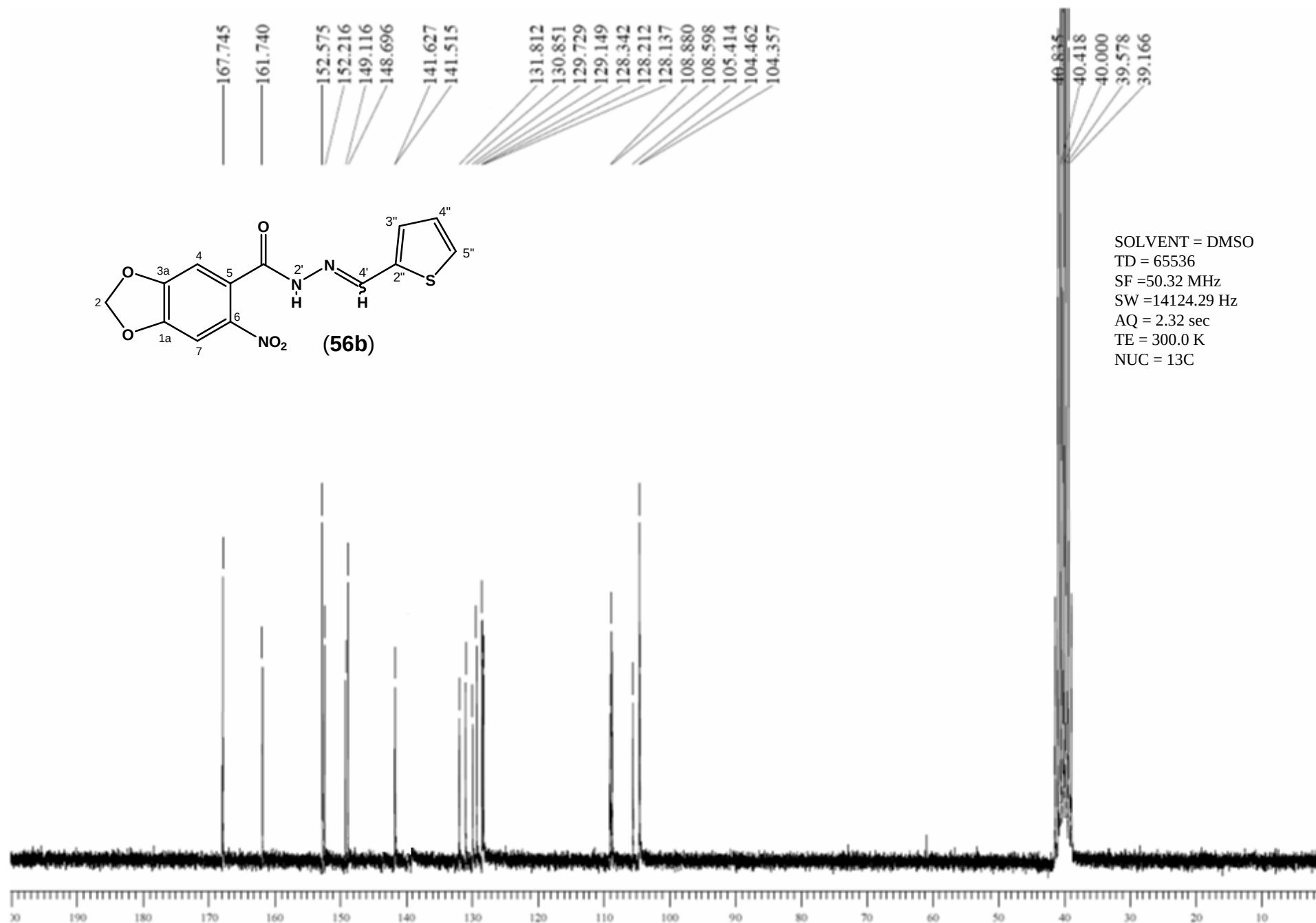
Espectro 25 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56a)



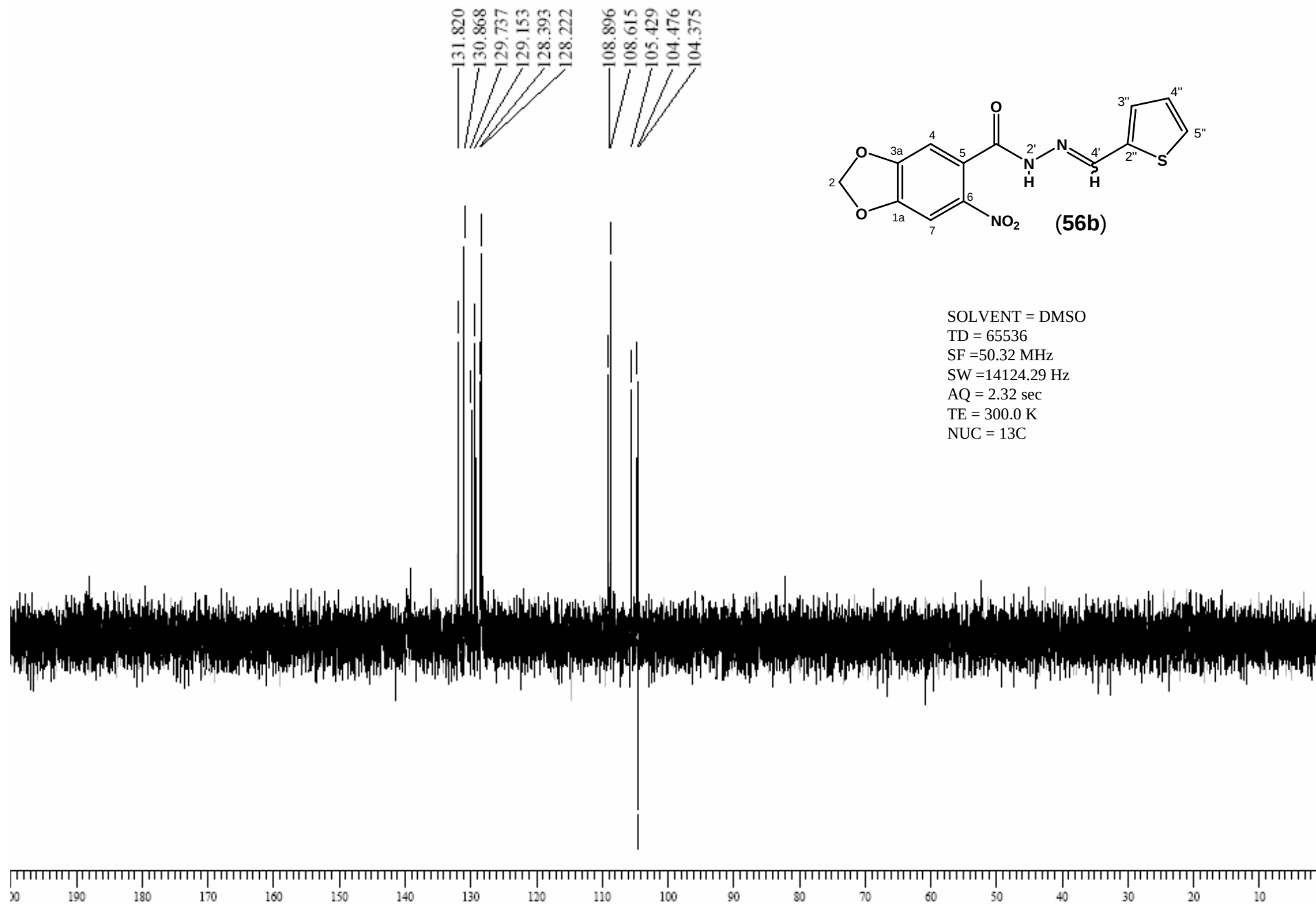
Espectro 26 – Infravermelho do derivado (56a)



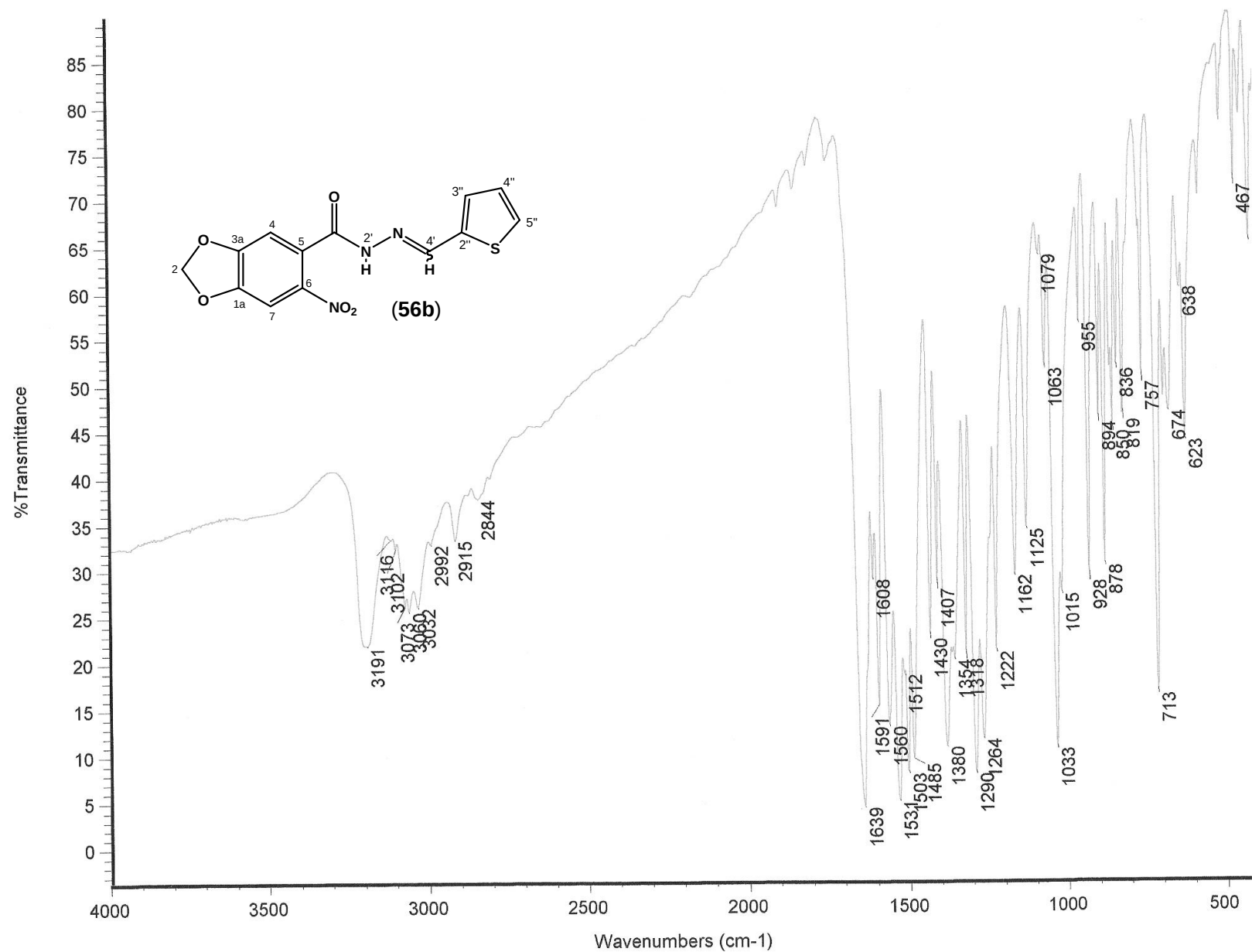
Espectro 27 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(56b)**



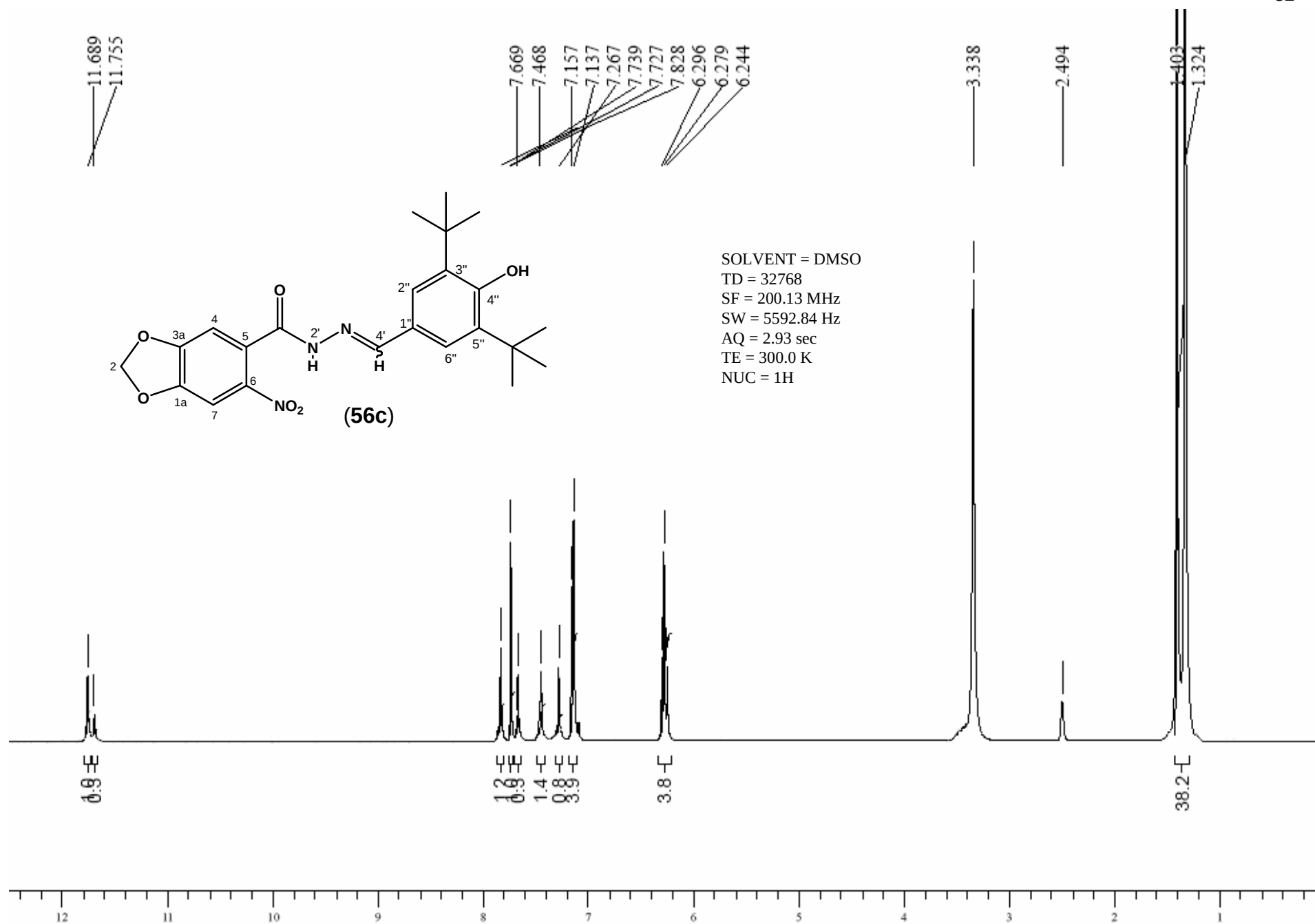
Espectro 28 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C do derivado (56b)



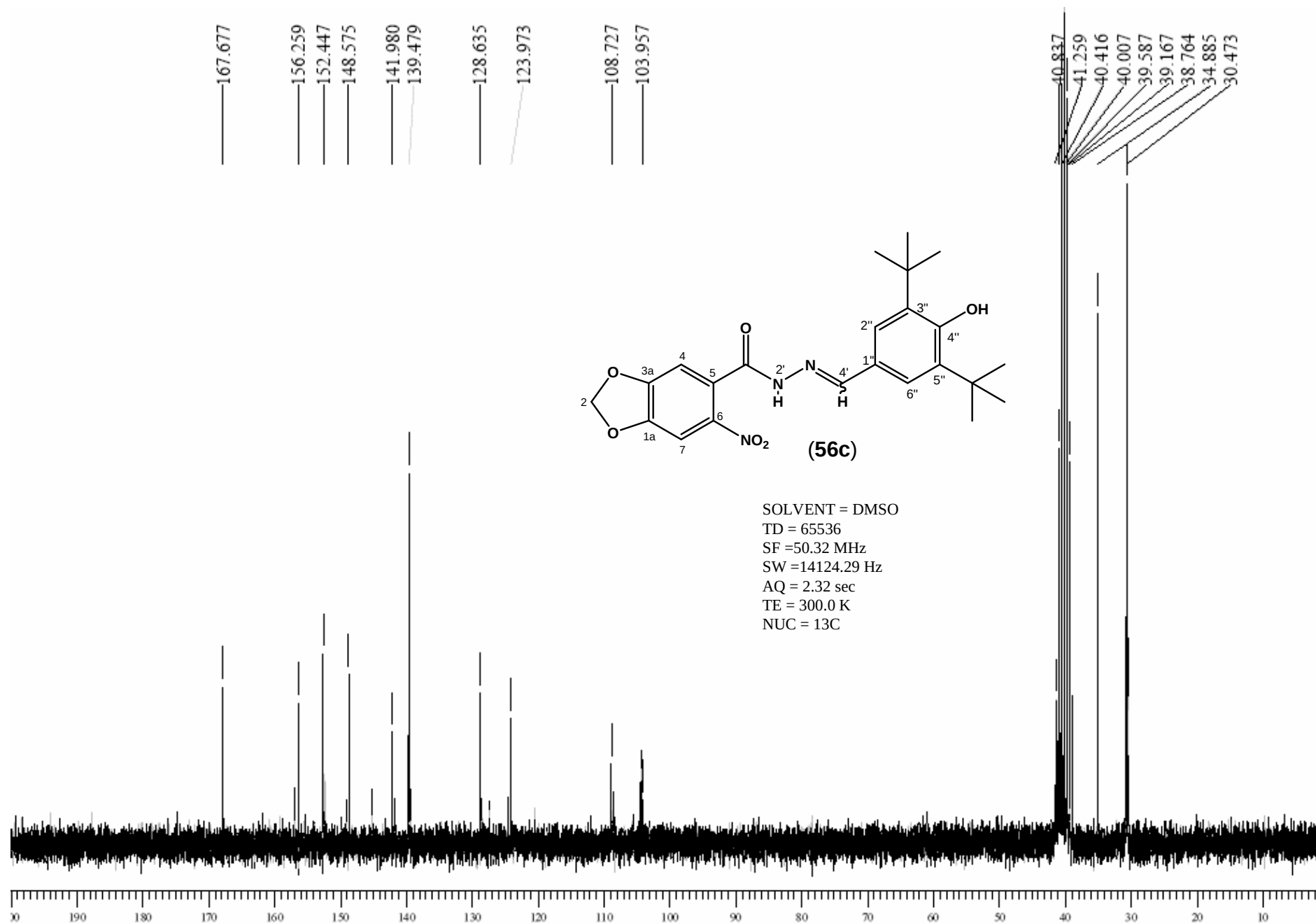
Espectro 29 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56b)



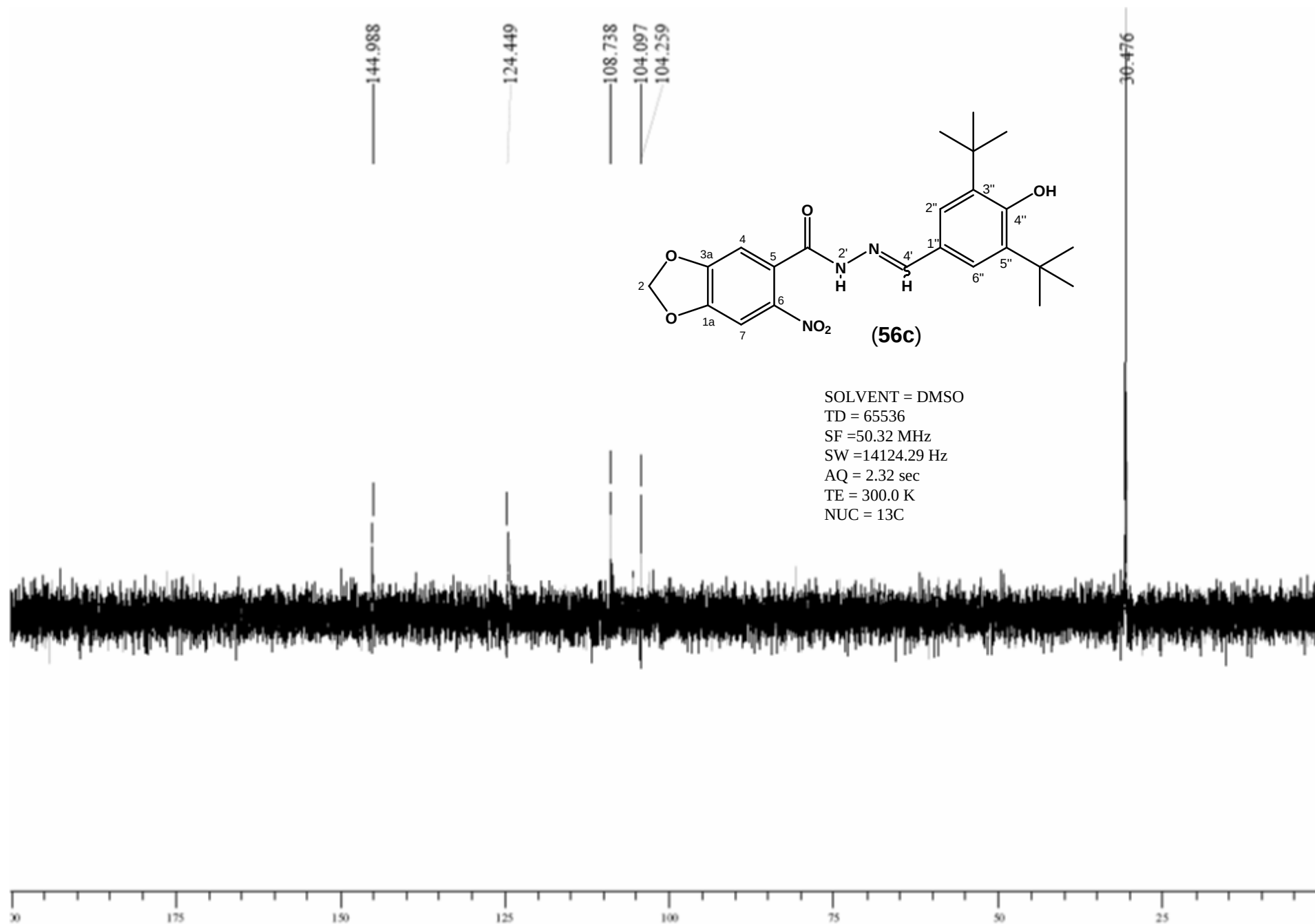
Espectro 30 – Infravermelho do derivado (56b)



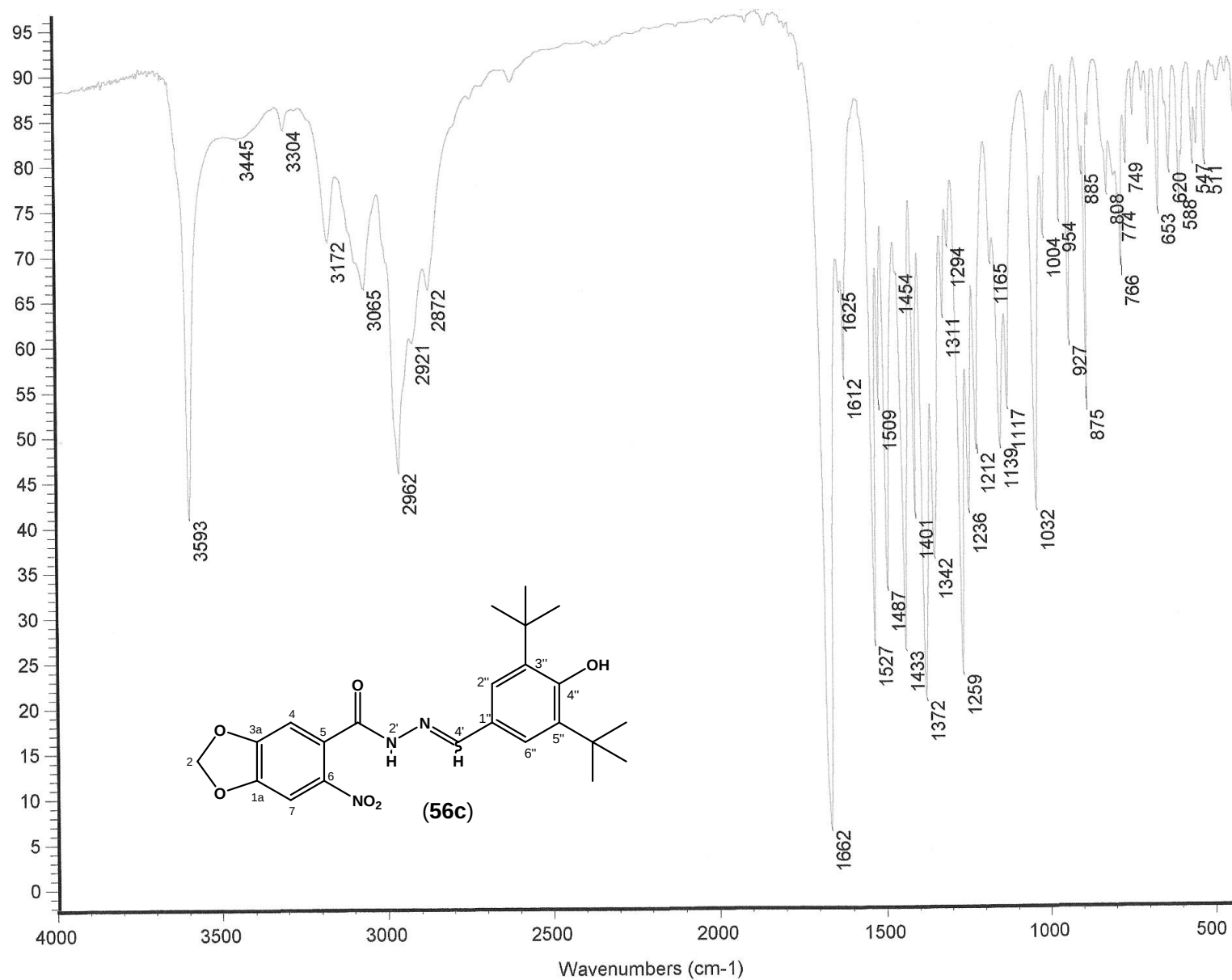
Espectro 31 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56c)



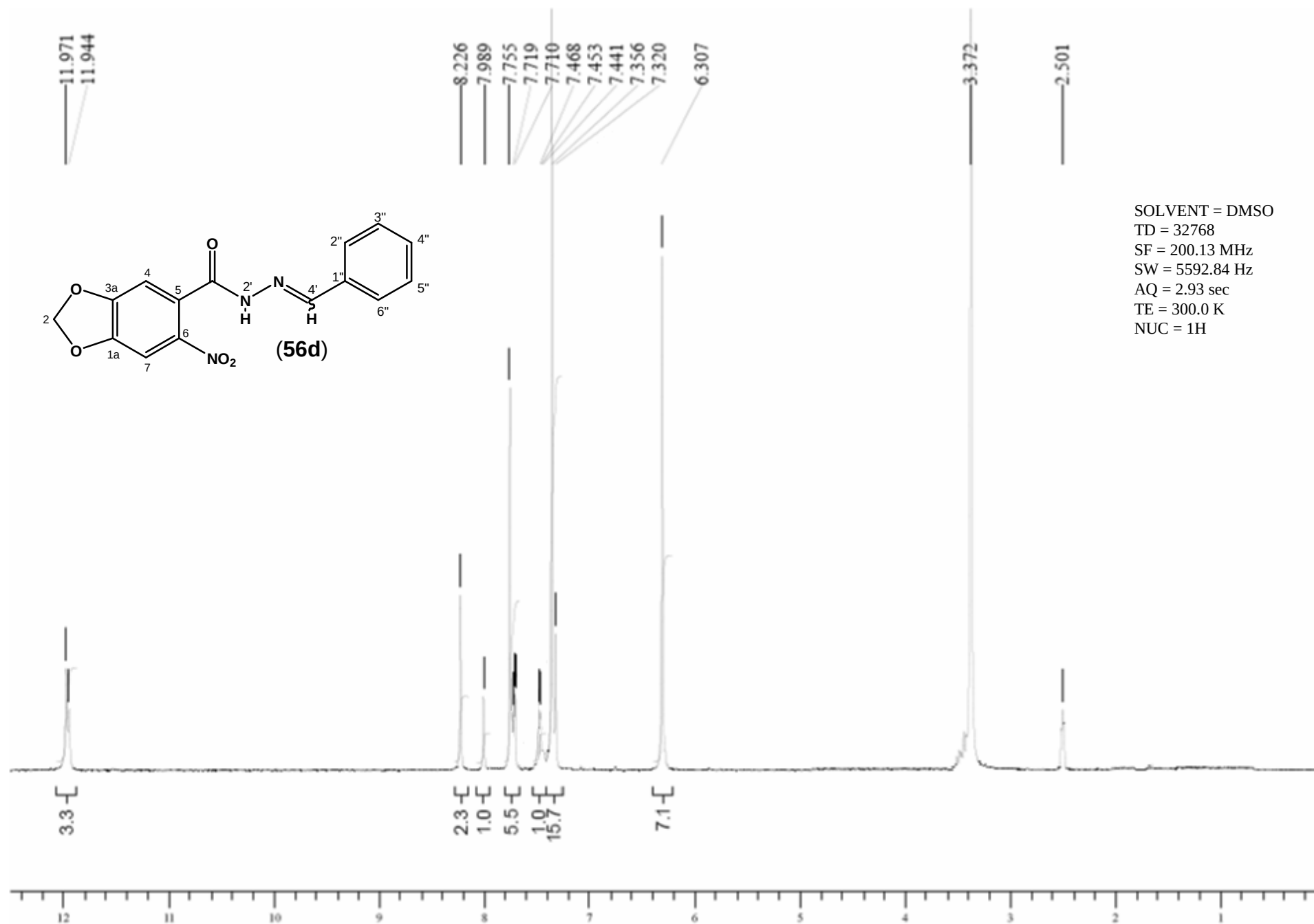
Espectro 32 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56c)



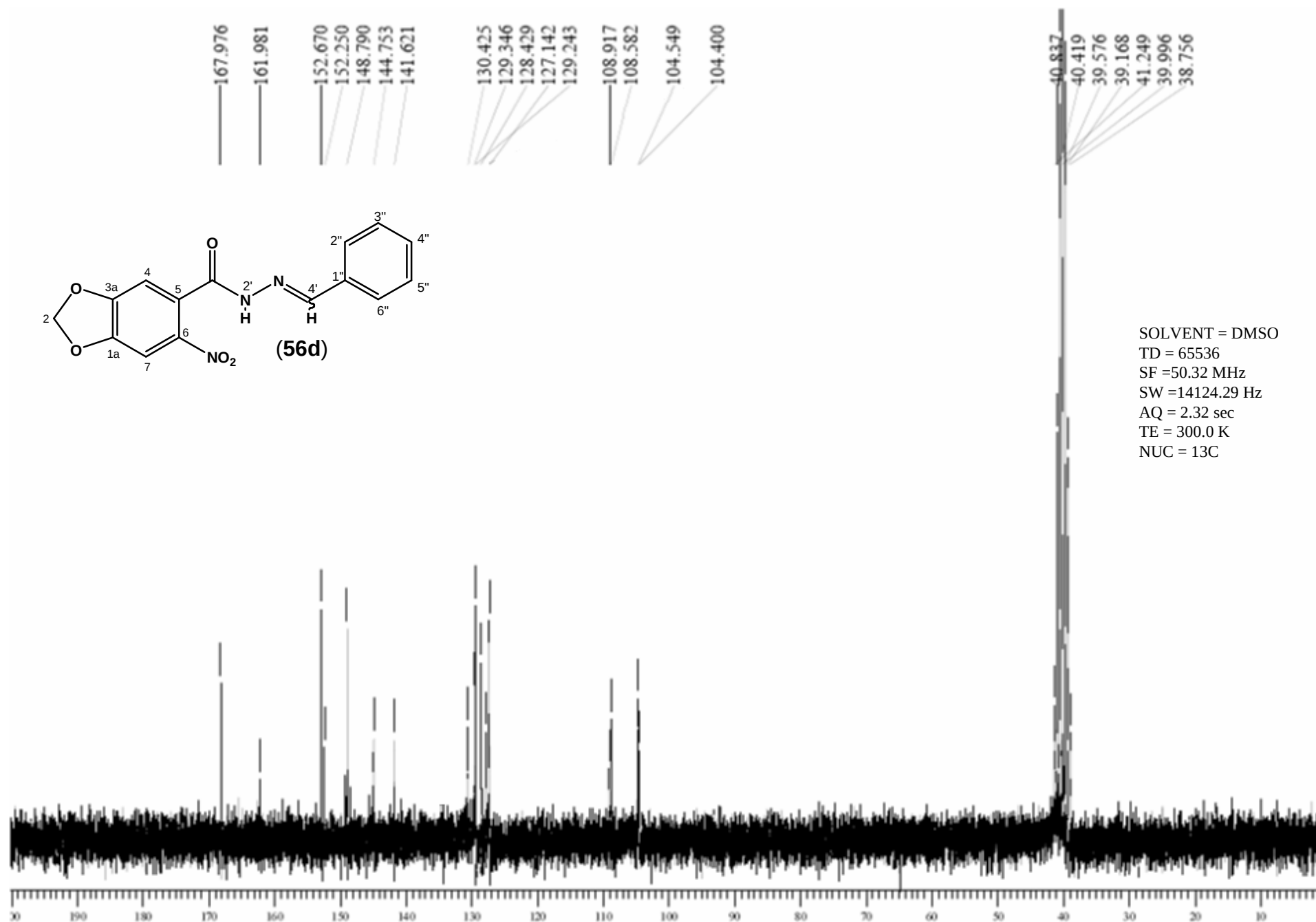
Espectro 33 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56c)



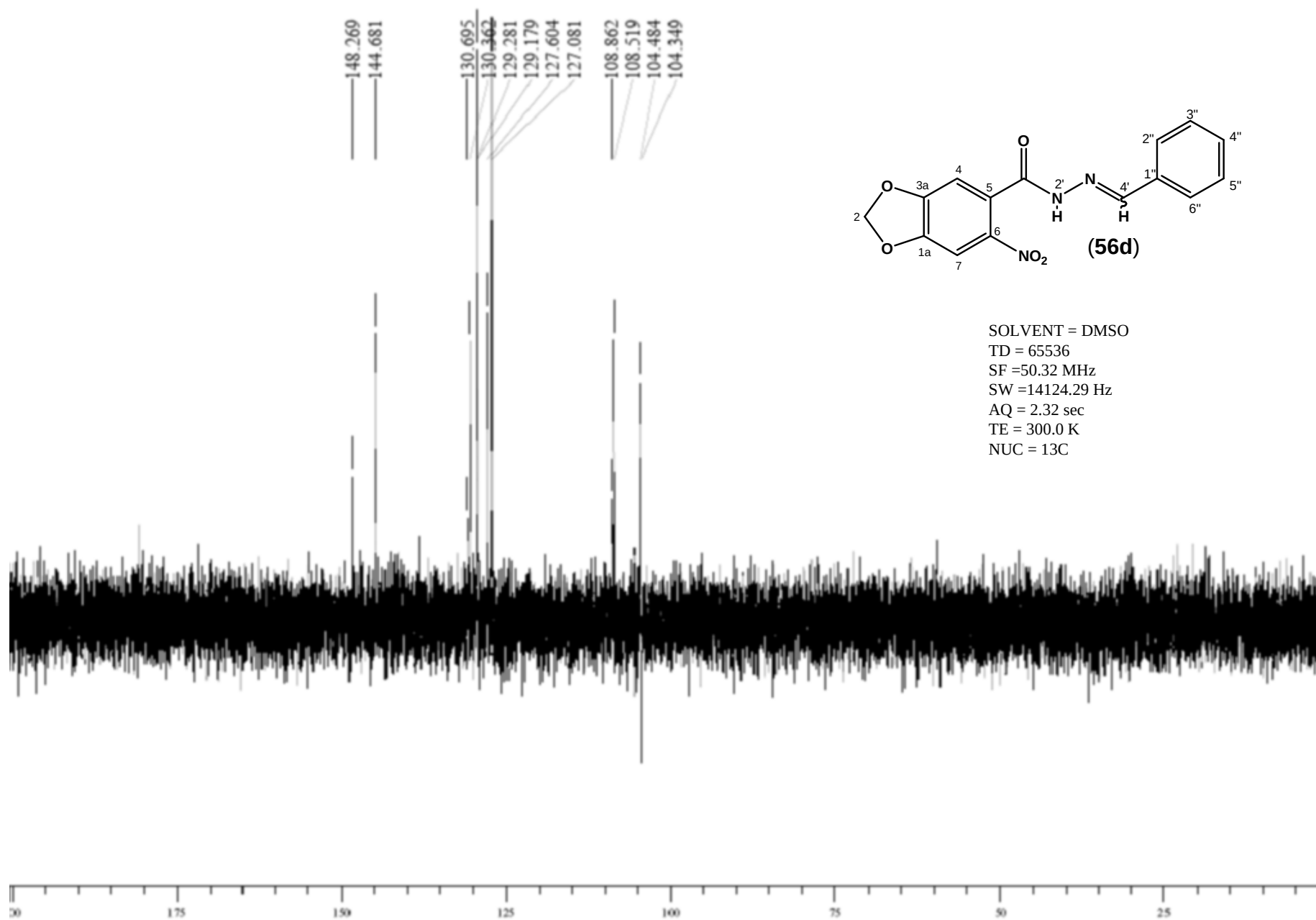
Espectro 34 – Infravermelho do derivado (56c)



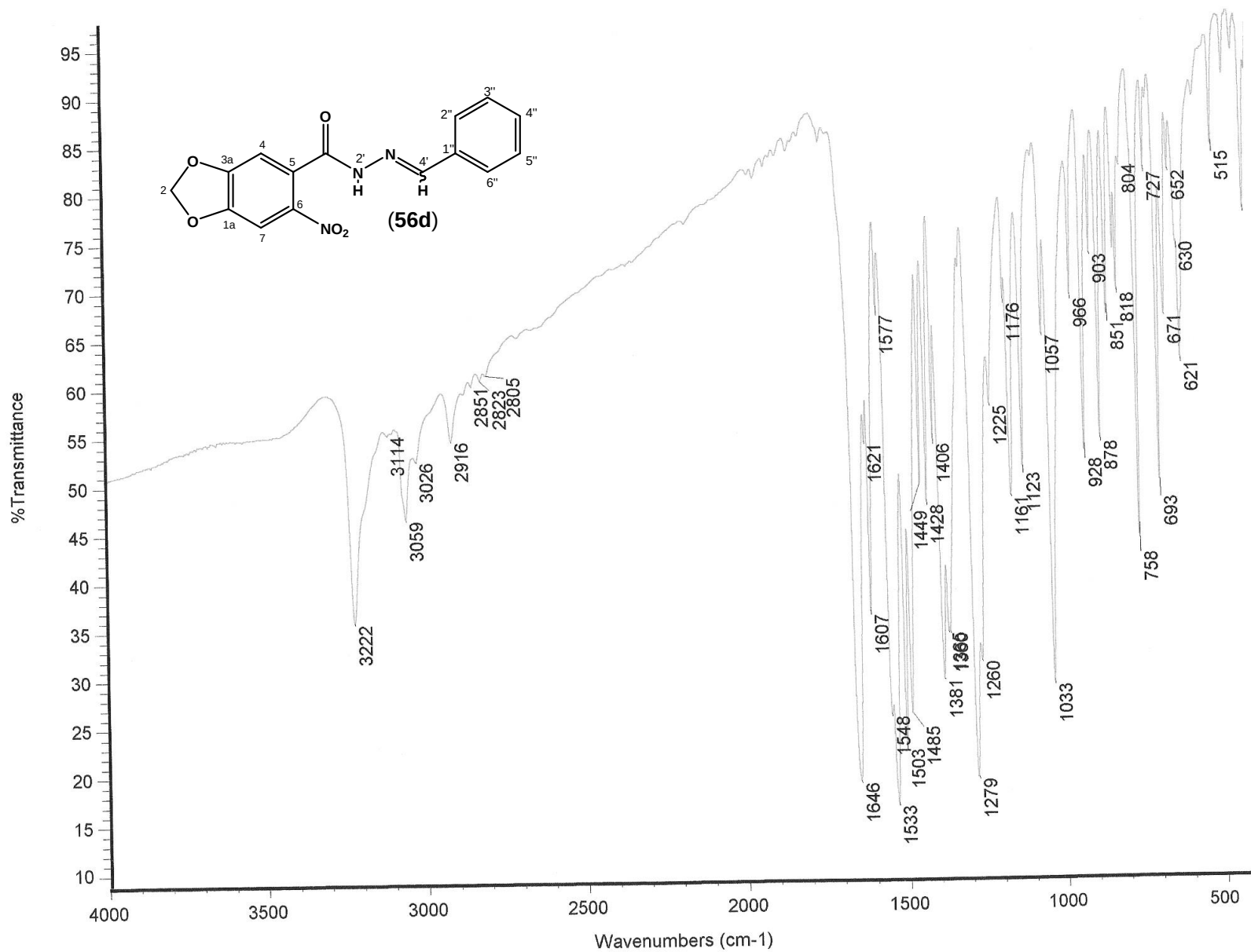
Espectro 35 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado **(56d)**



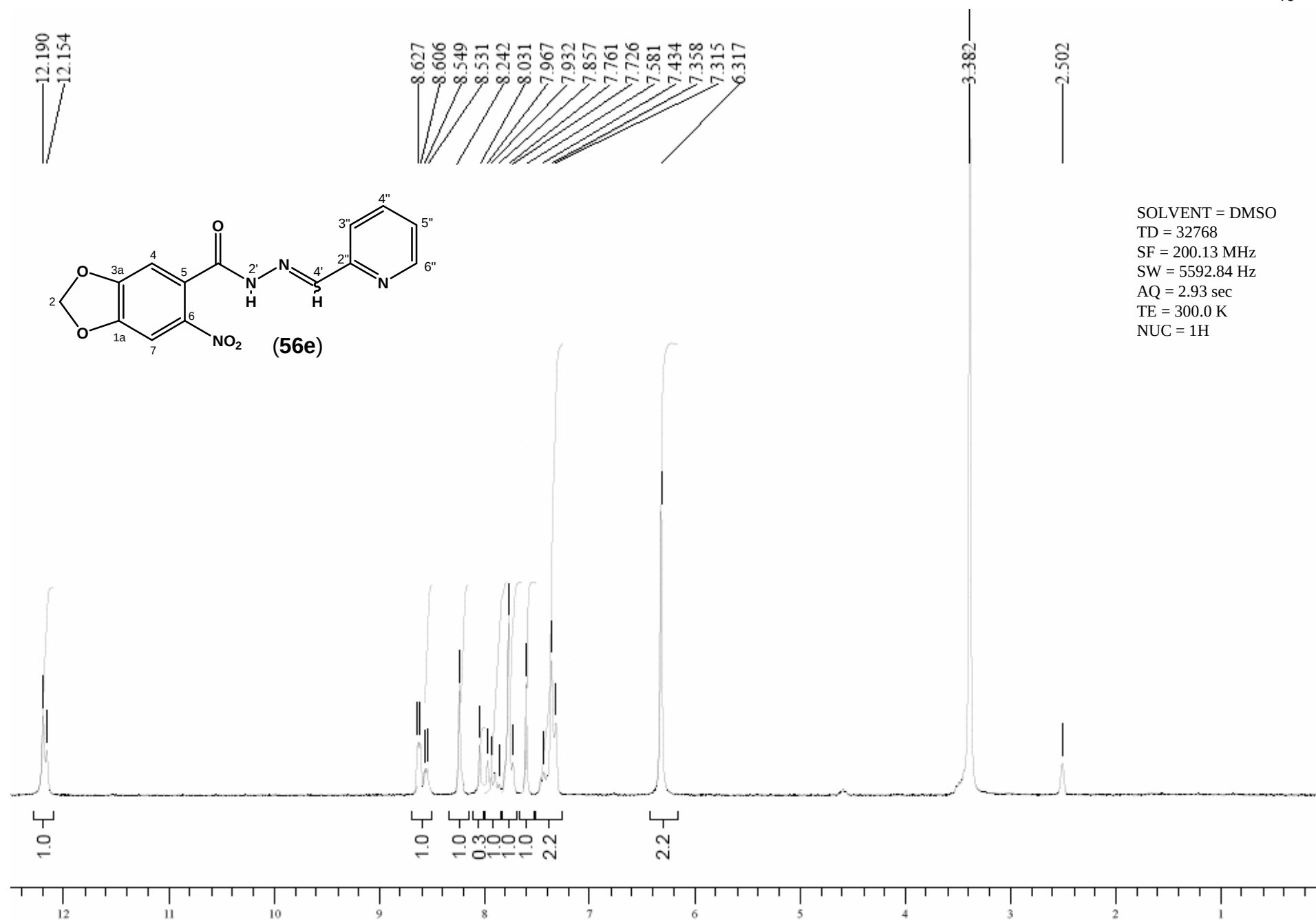
Espectro 36 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56d)



Espectro 37 – Experimento de DEPT-135 para o derivado **(56d)**

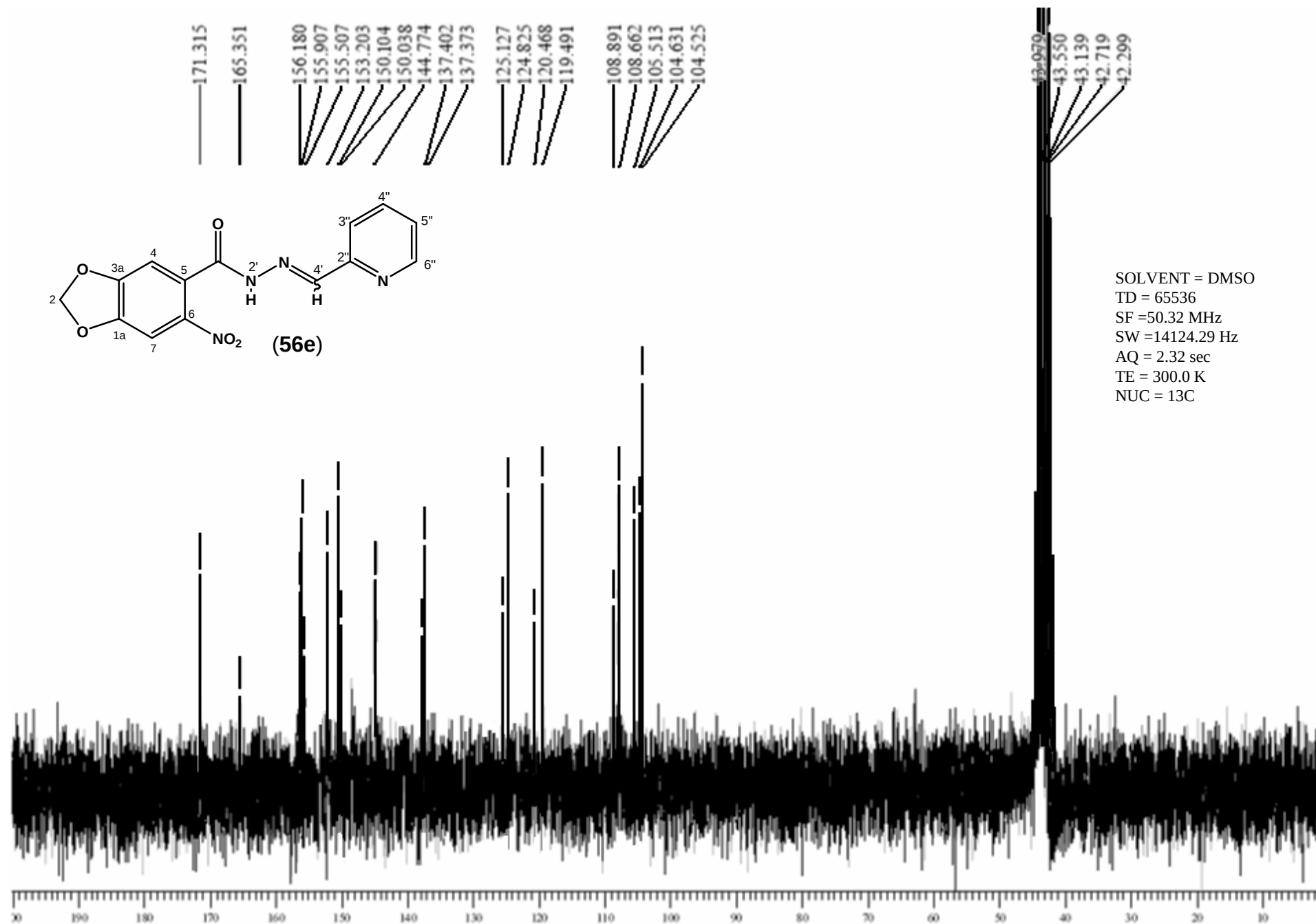


Espectro 38 – Infravermelho do derivado (56d)

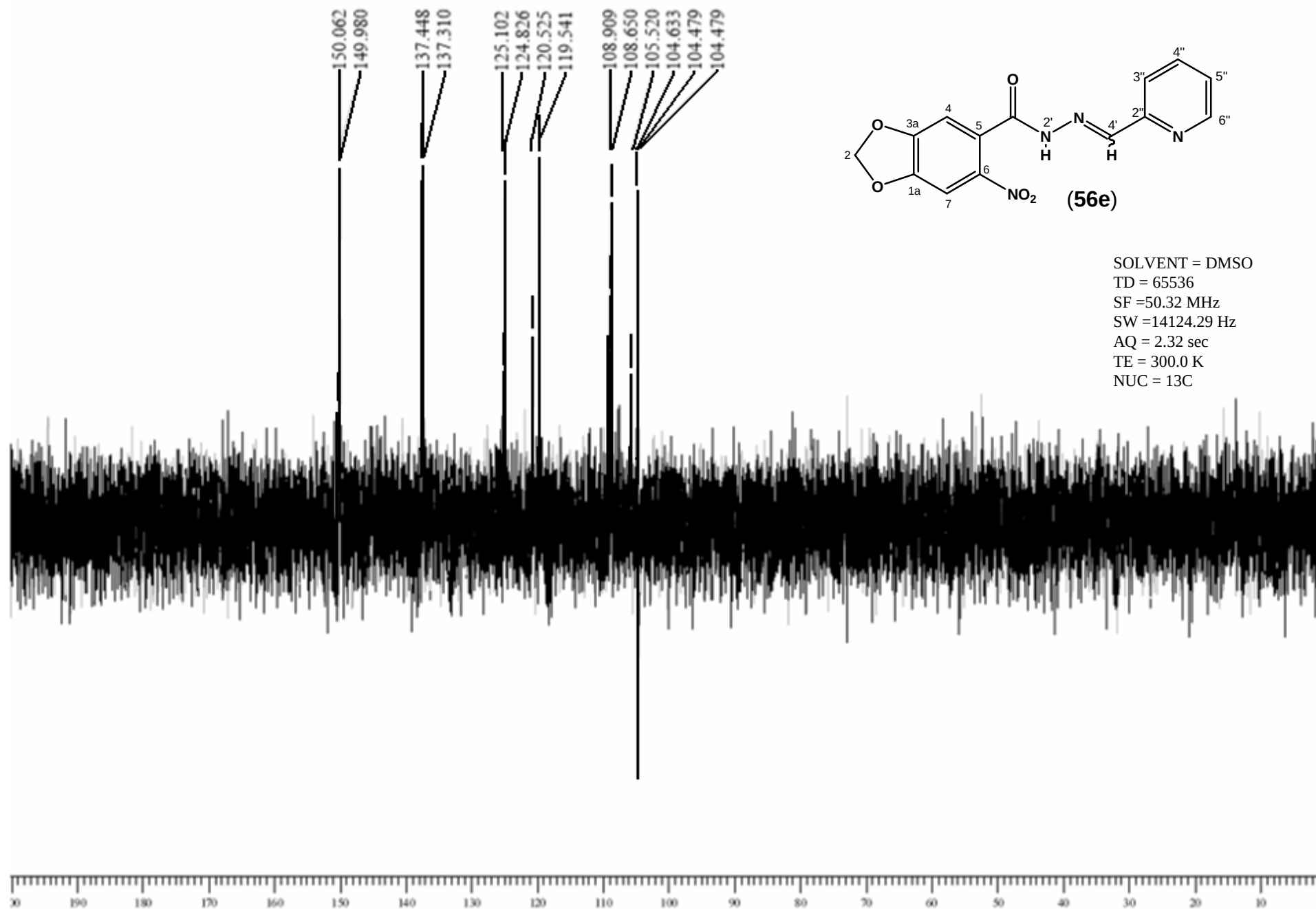


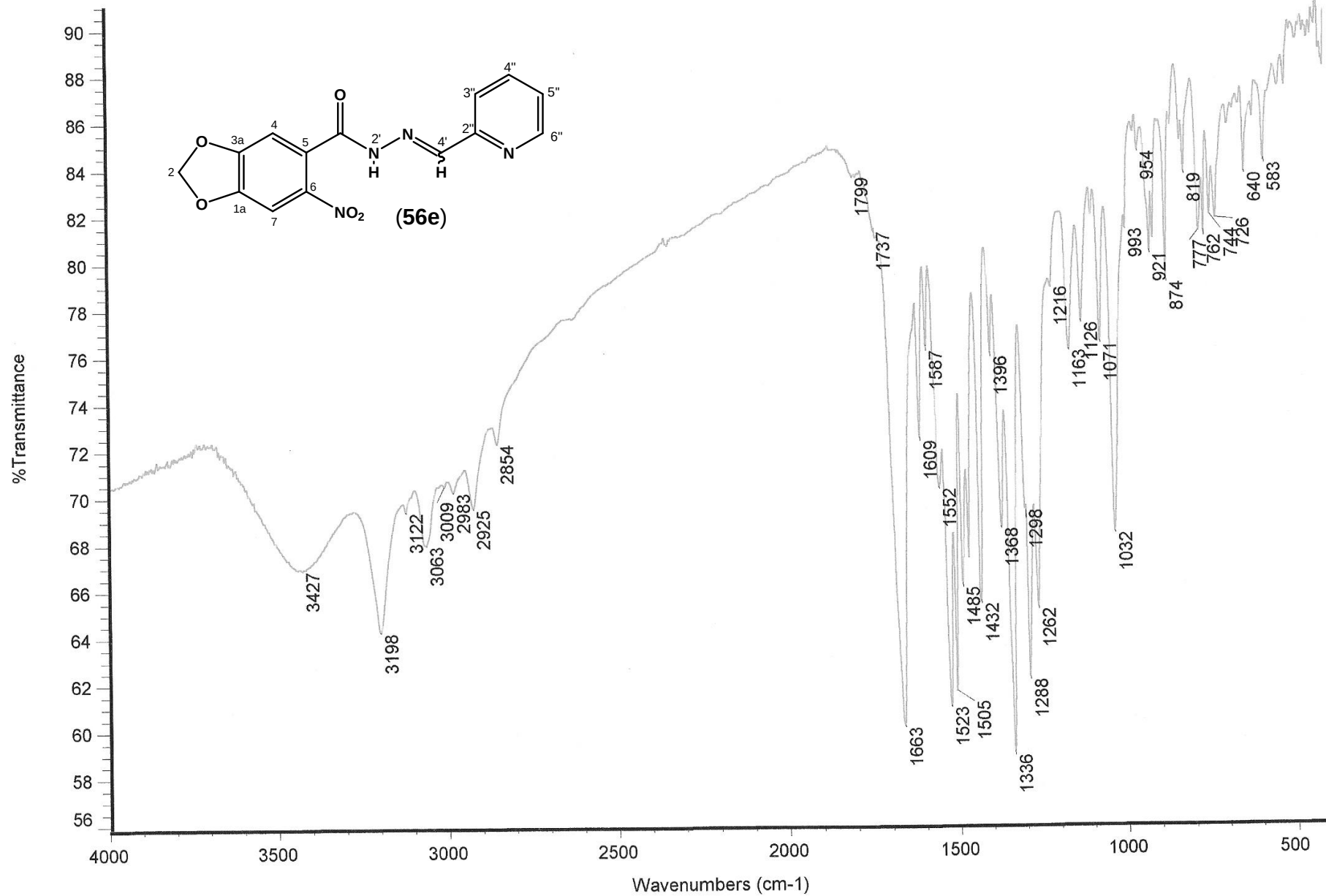
SOLVENT = DMSO
 TD = 32768
 SF = 200.13 MHz
 SW = 5592.84 Hz
 AQ = 2.93 sec
 TE = 300.0 K
 NUC = 1H

Espectro 39 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H do derivado (56e)

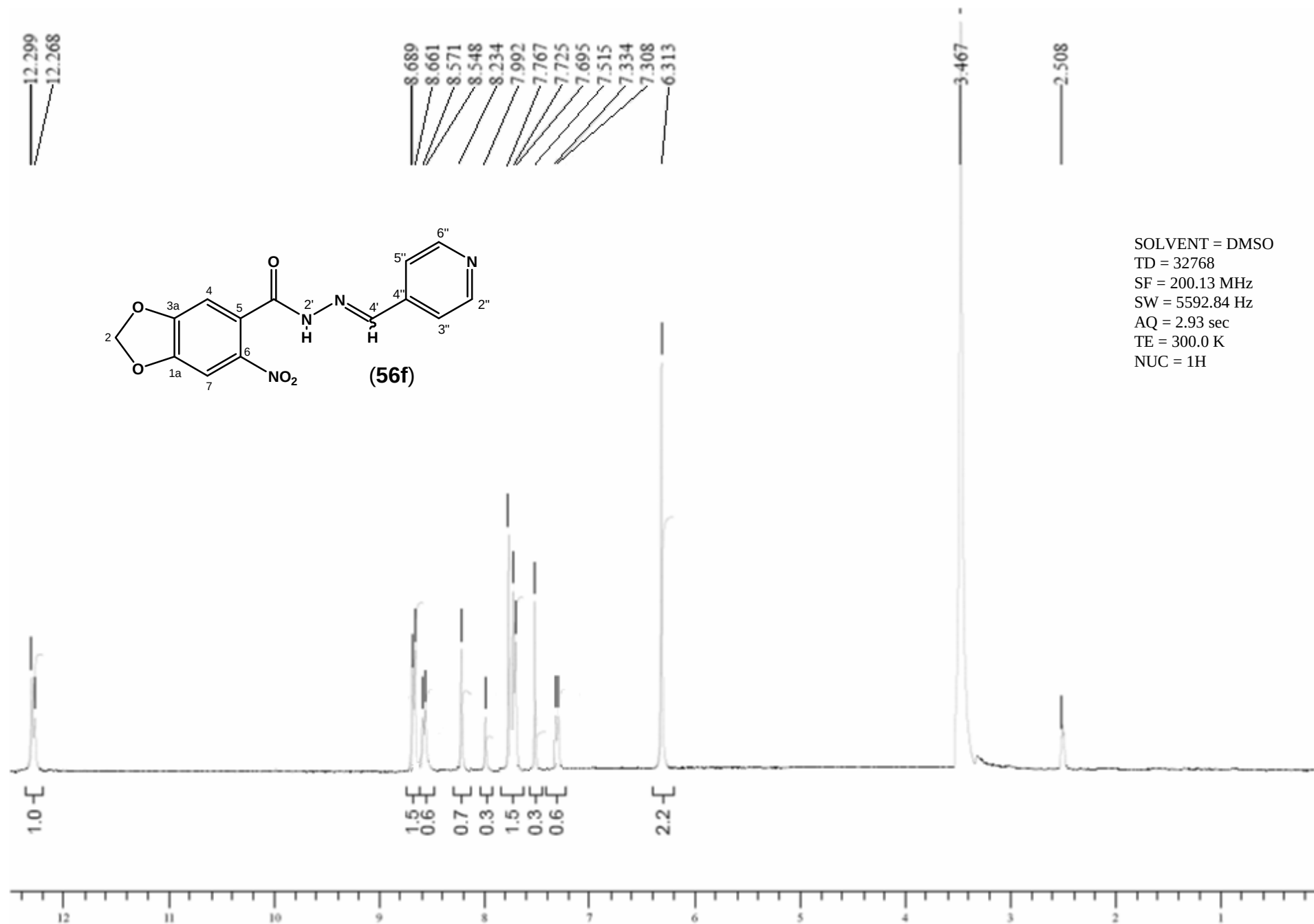


Espectro 40 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56e)

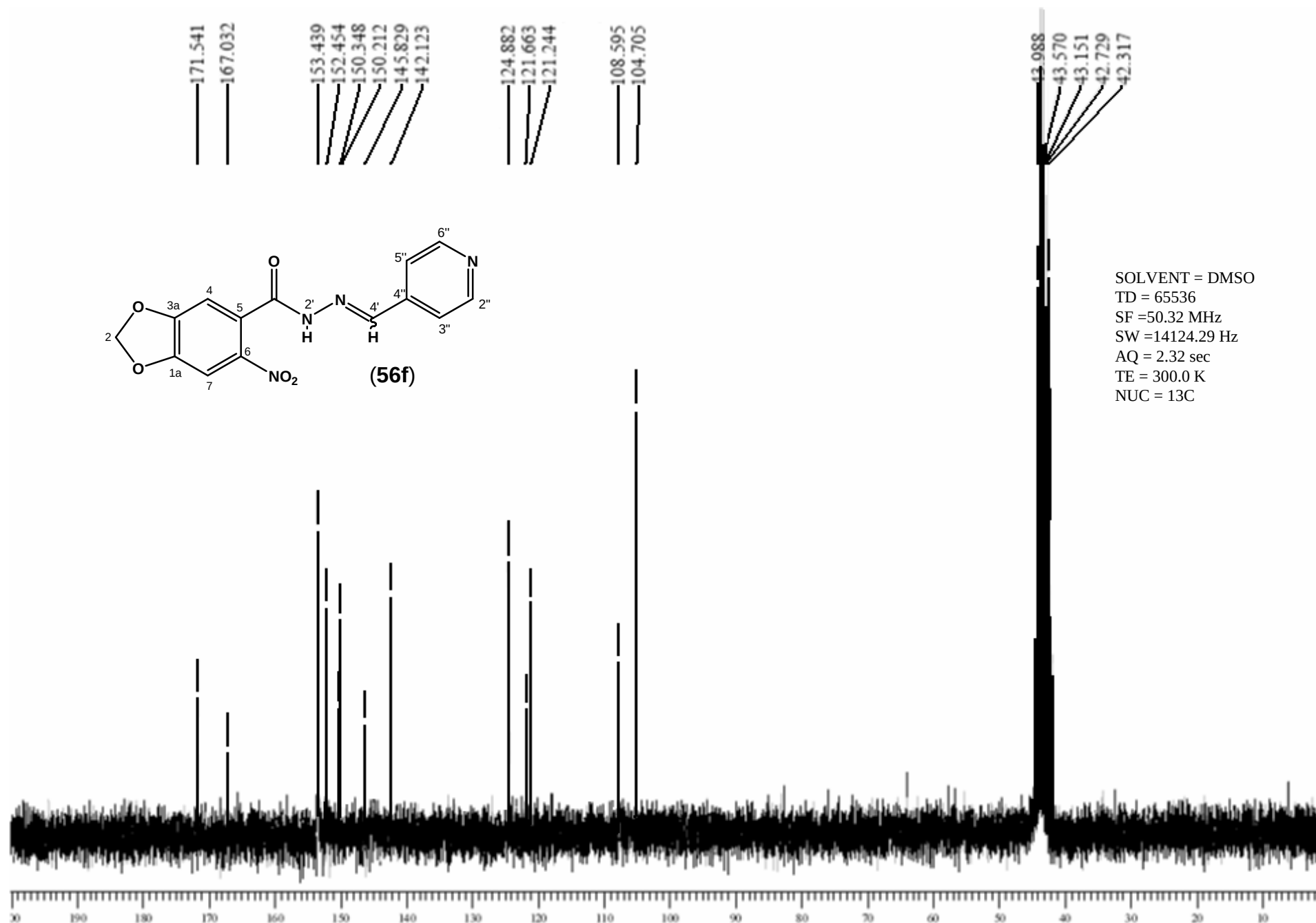




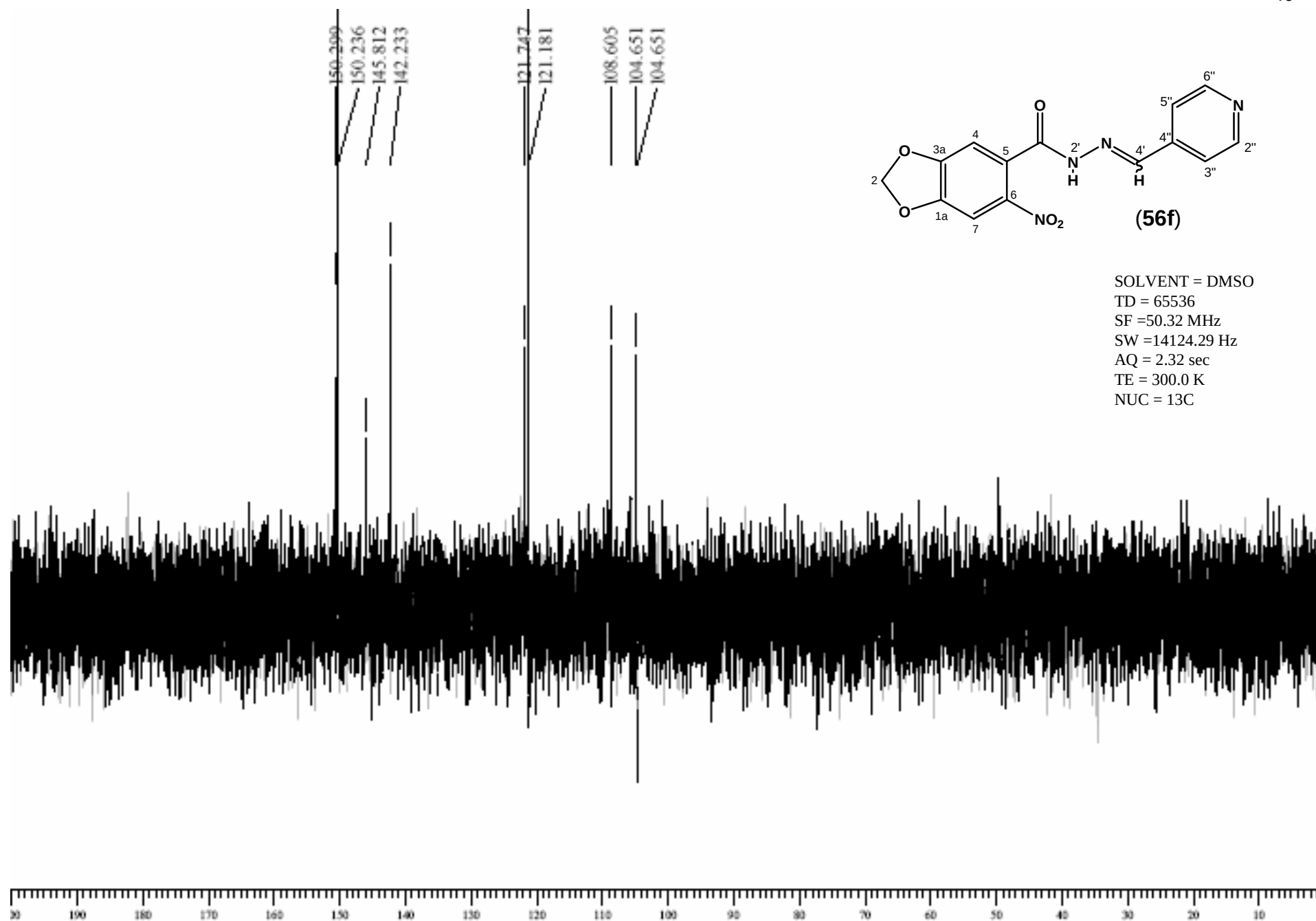
Espectro 42 – Infravermelho do derivado (56e)



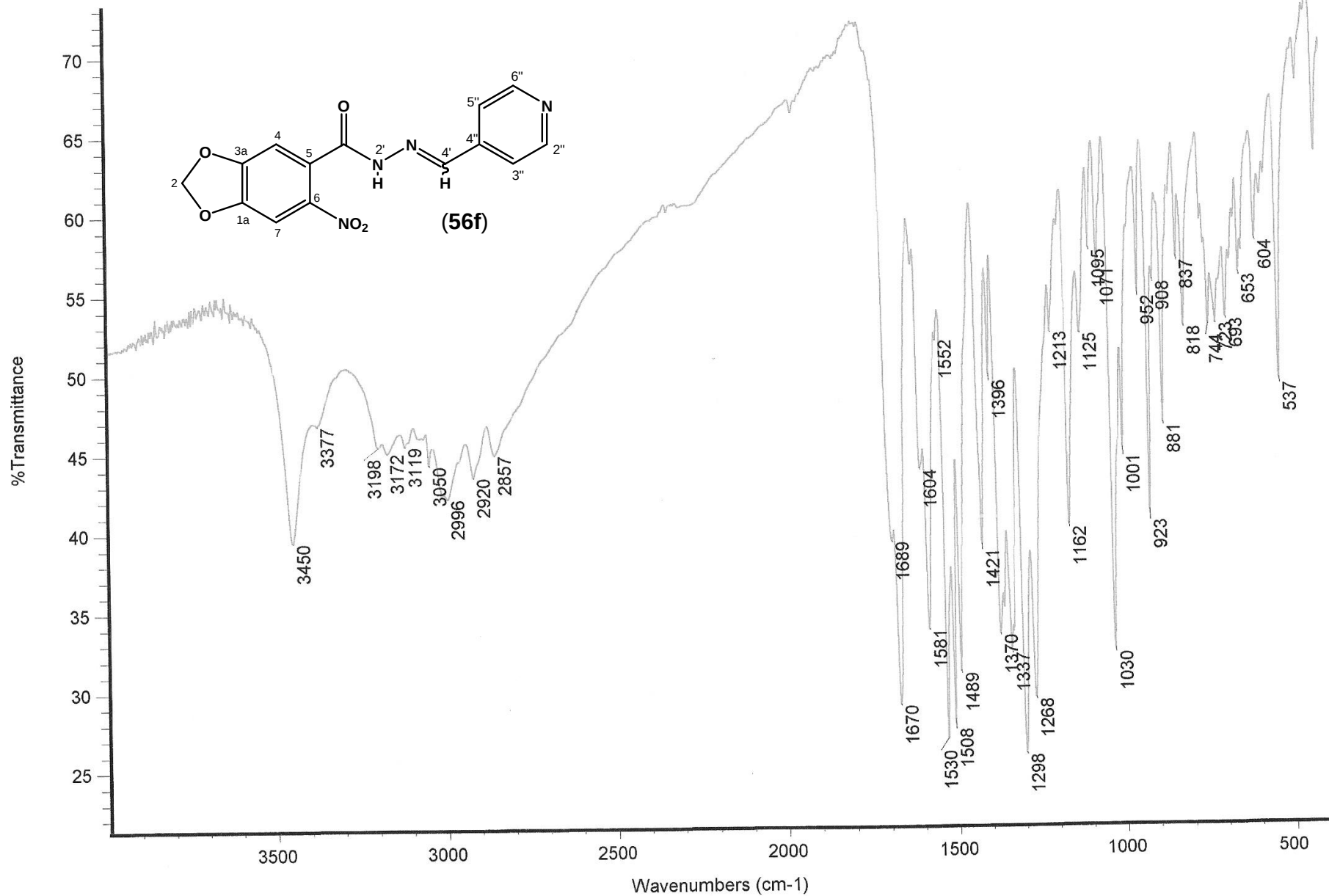
Espectro 43 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (**56f**)



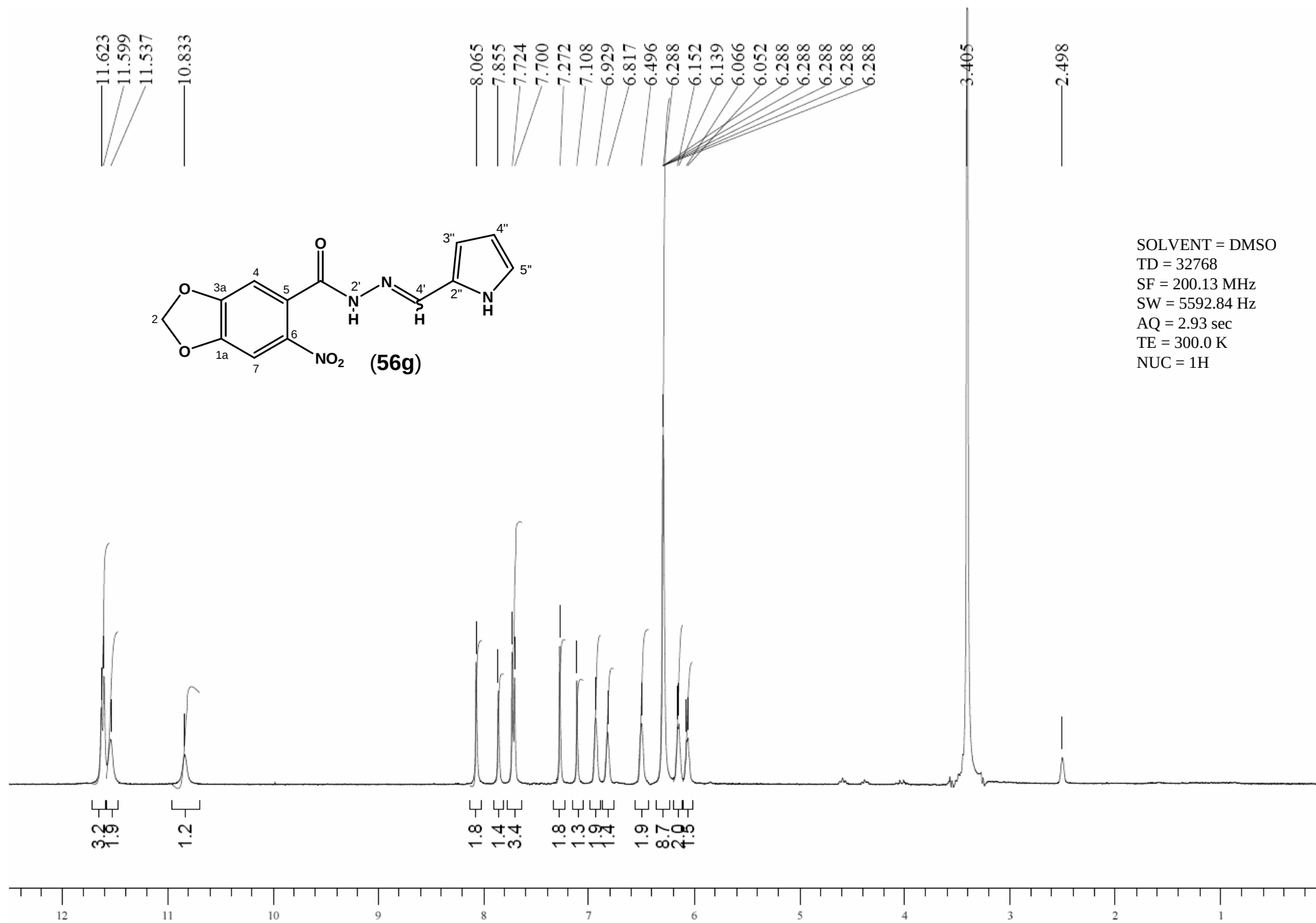
Espectro 44 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C do derivado (56f)



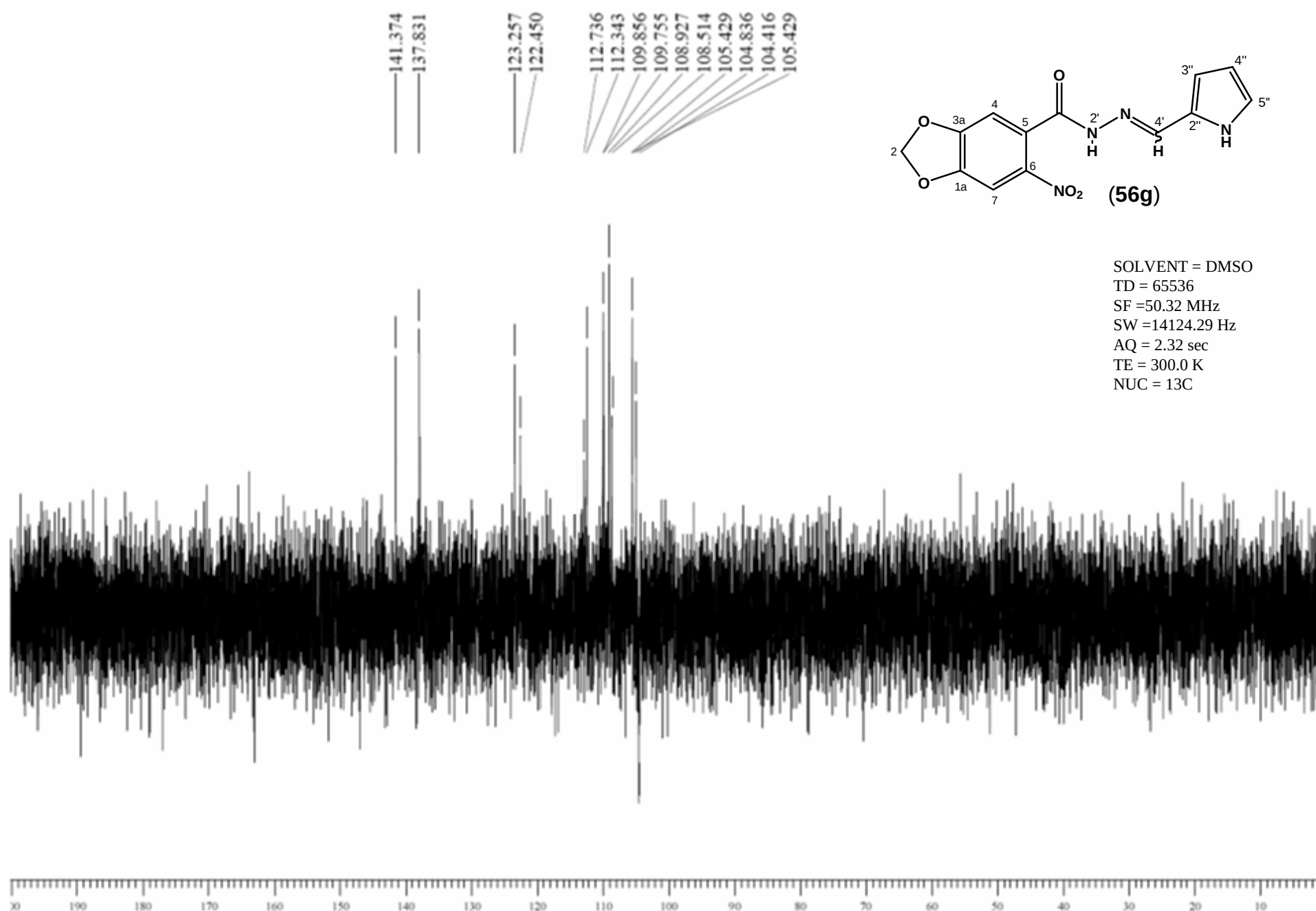
Espectro 45 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56f)



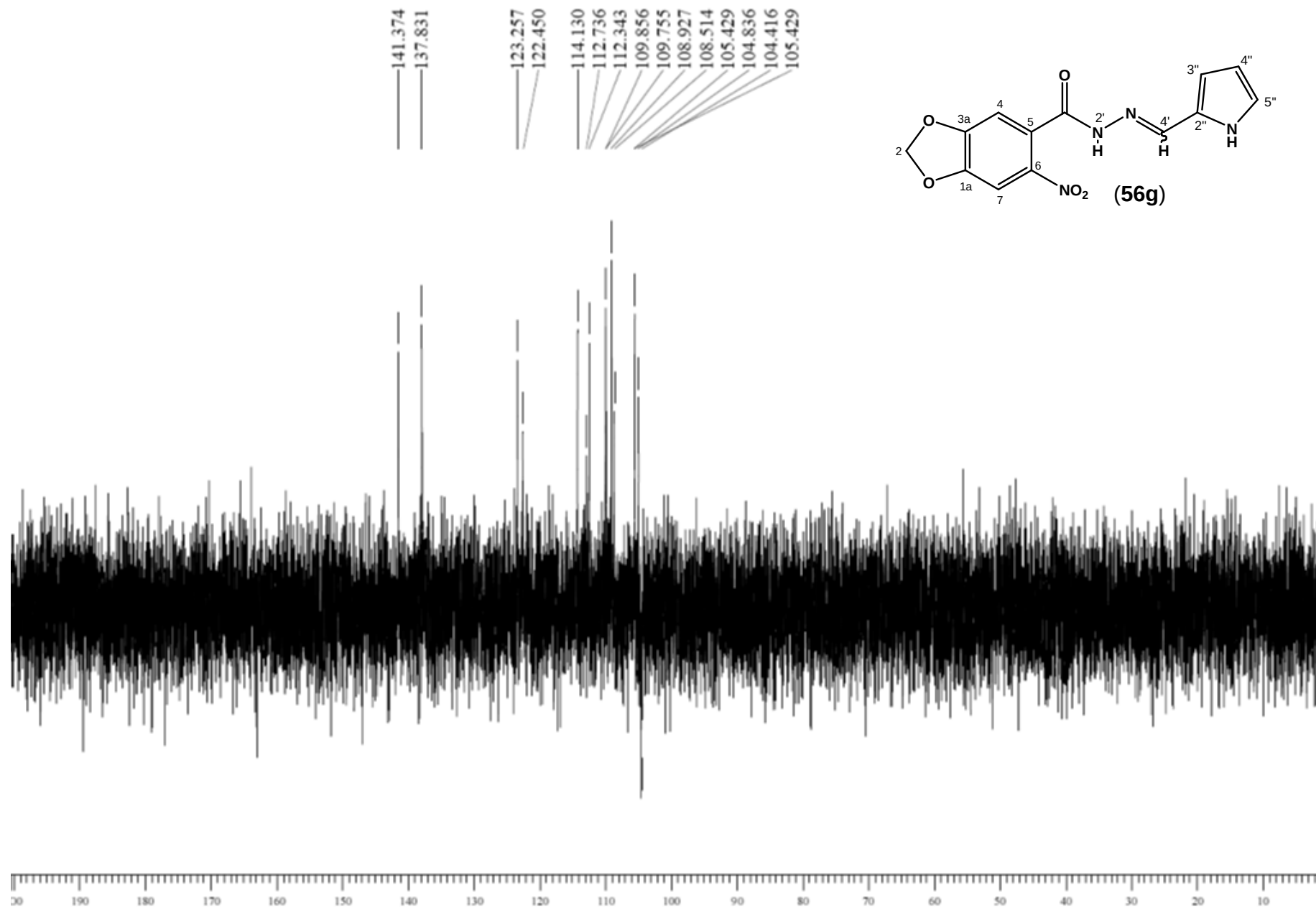
Espectro 46 – Infravermelho do derivado (56f)



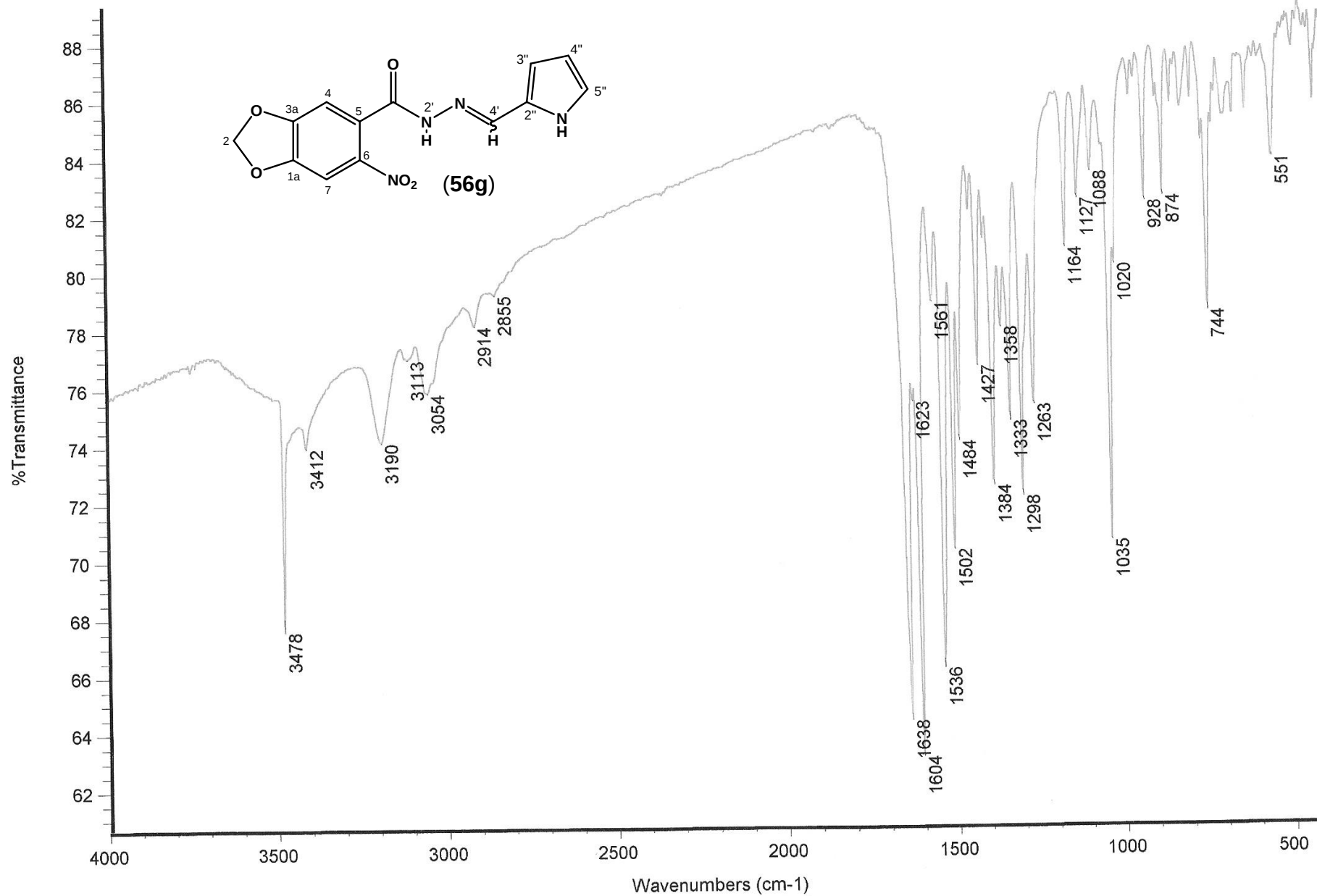
Espectro 47 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (56g)



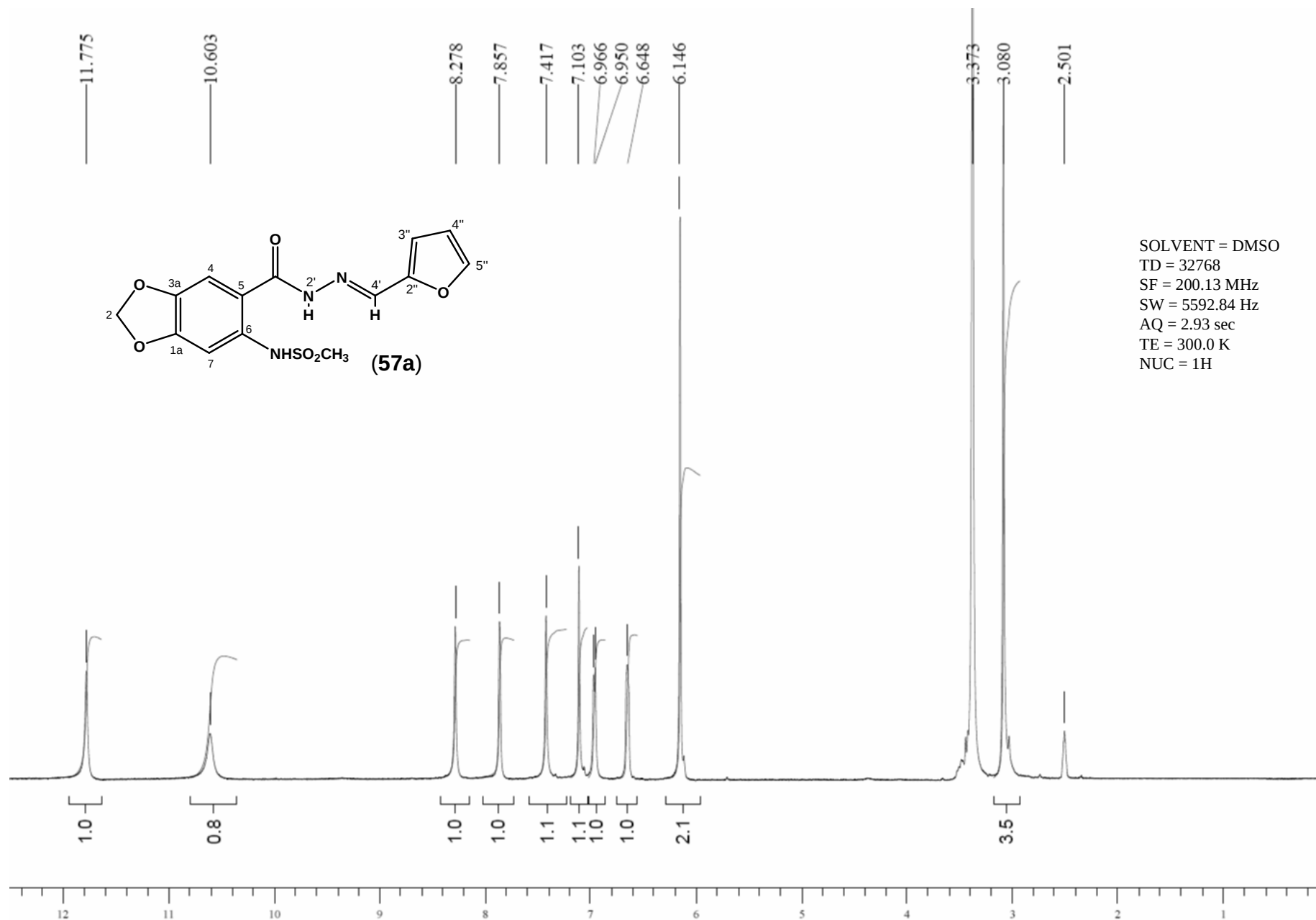
Espectro 48 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (56g)



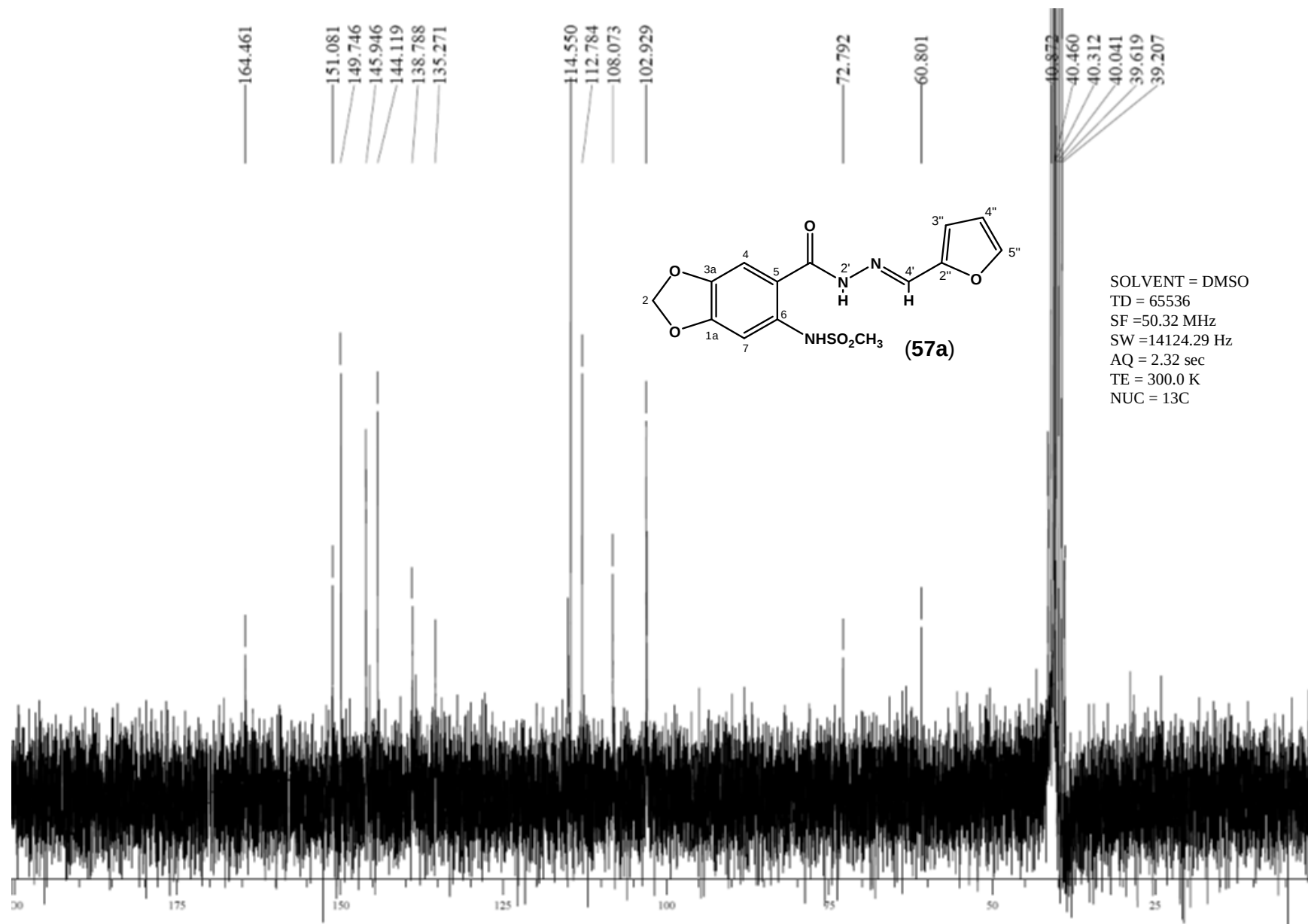
Espectro 49 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (56g)



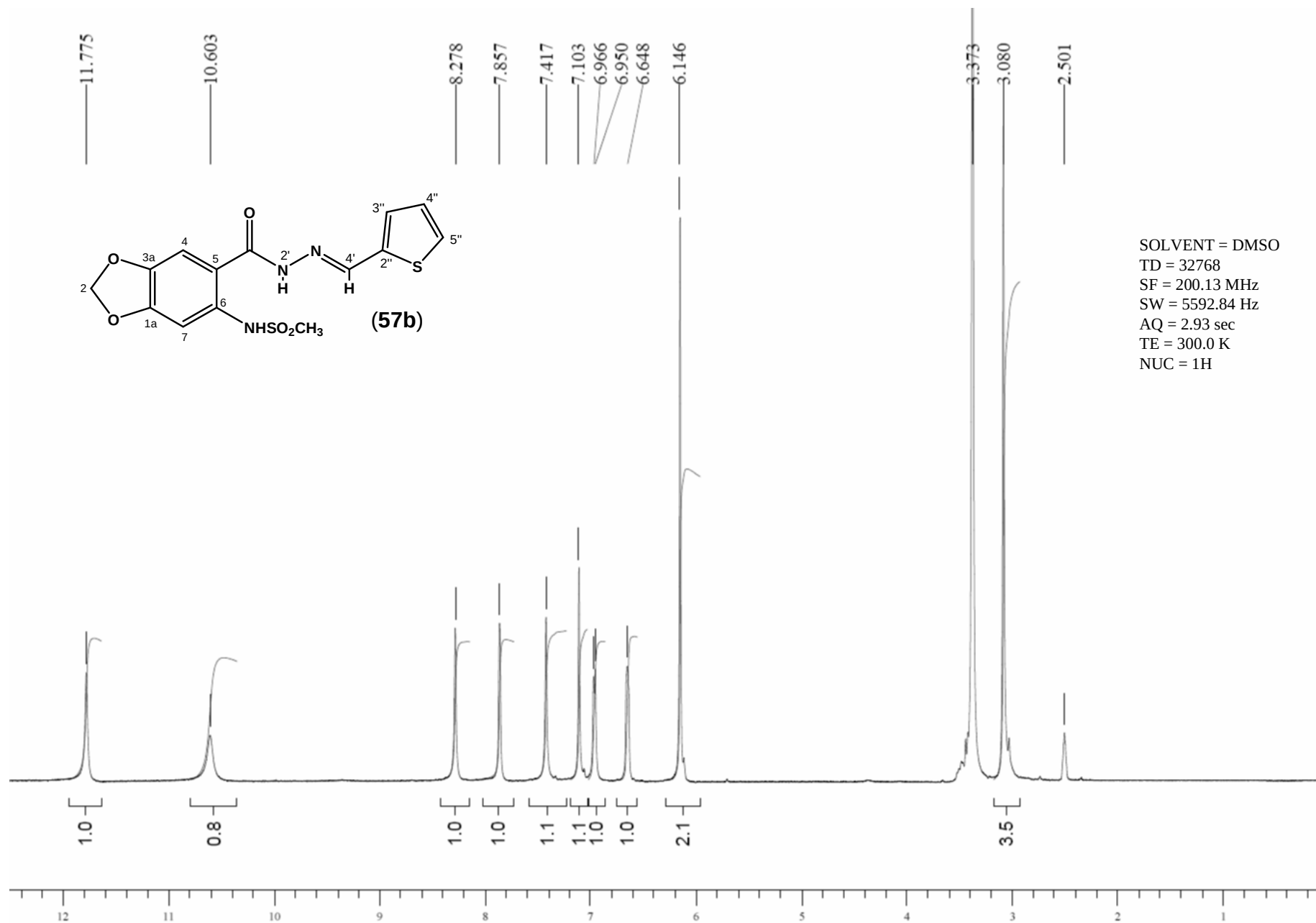
Espectro 50 – Infravermelho do derivado (56g)



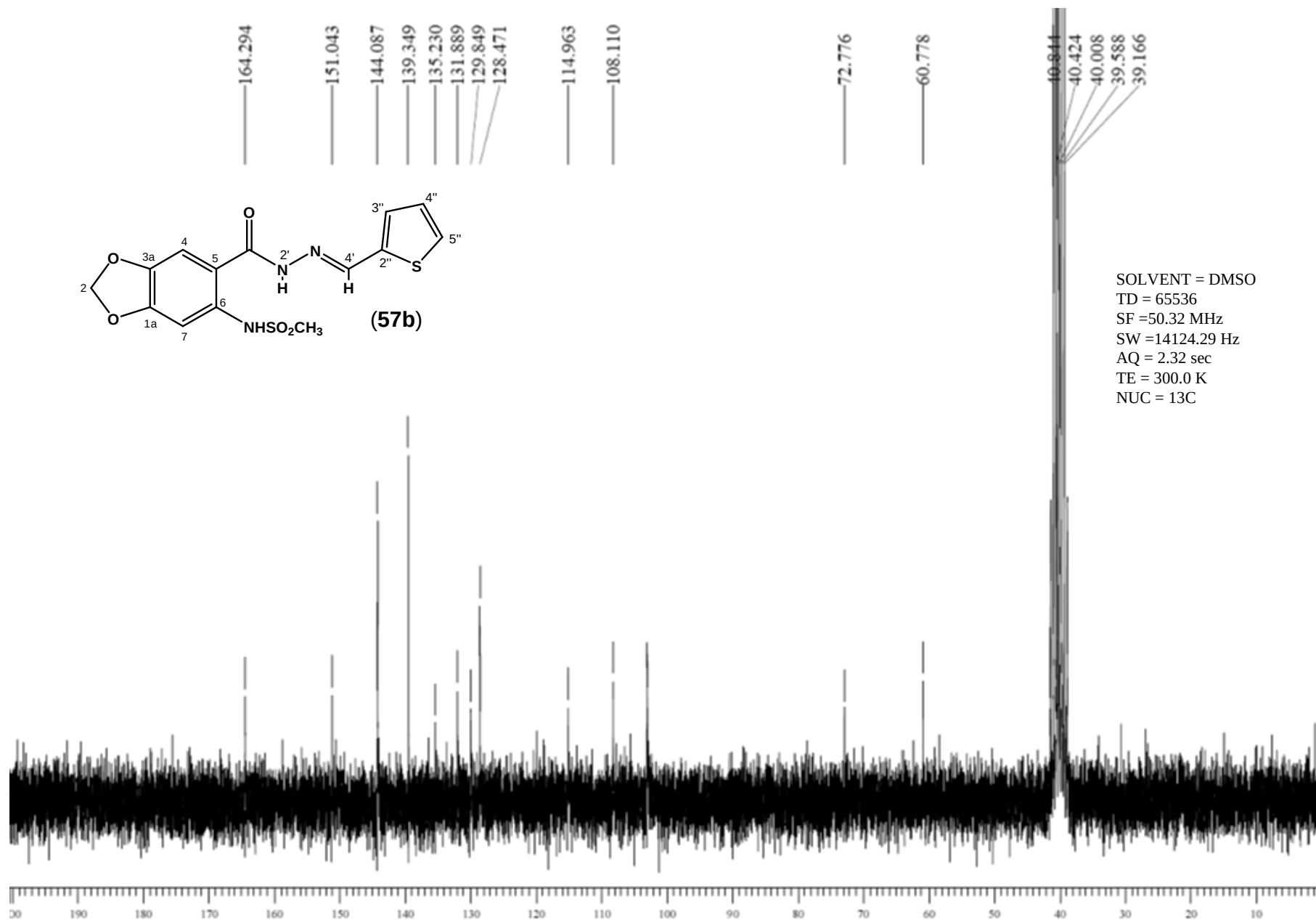
Espectro 51 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (**57a**)



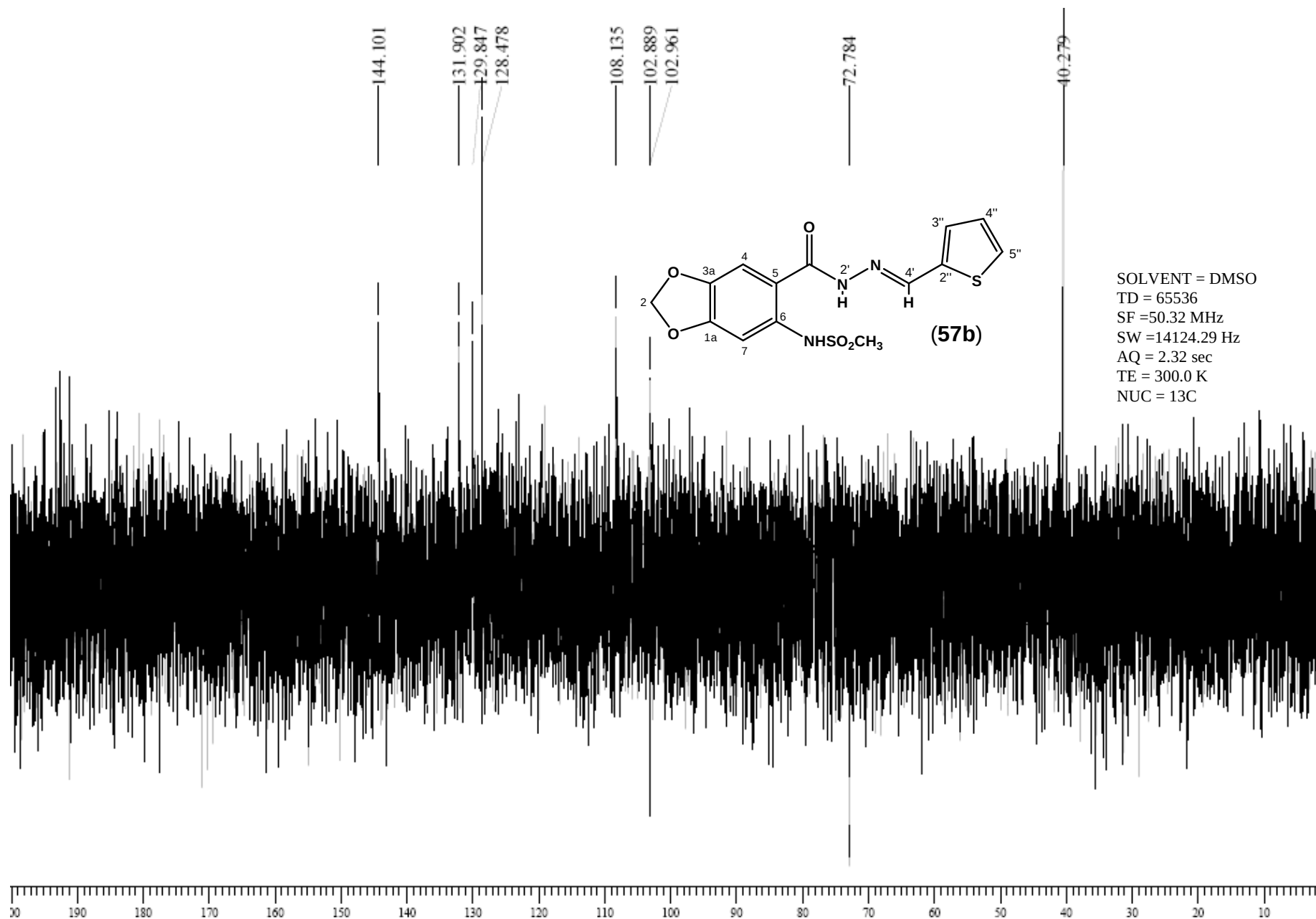
Espectro 52 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado **(57a)**



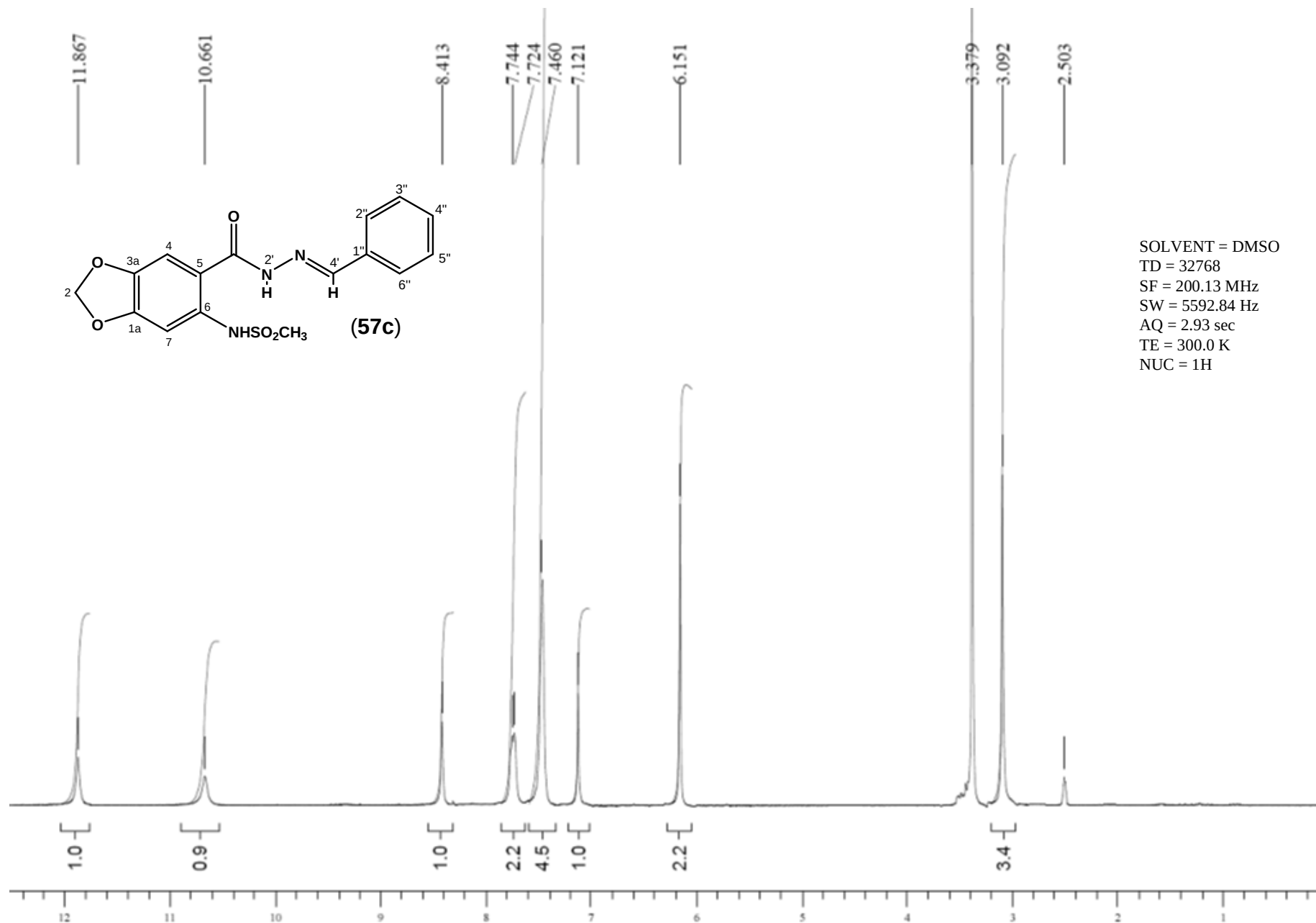
Espectro 53 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (**57b**)



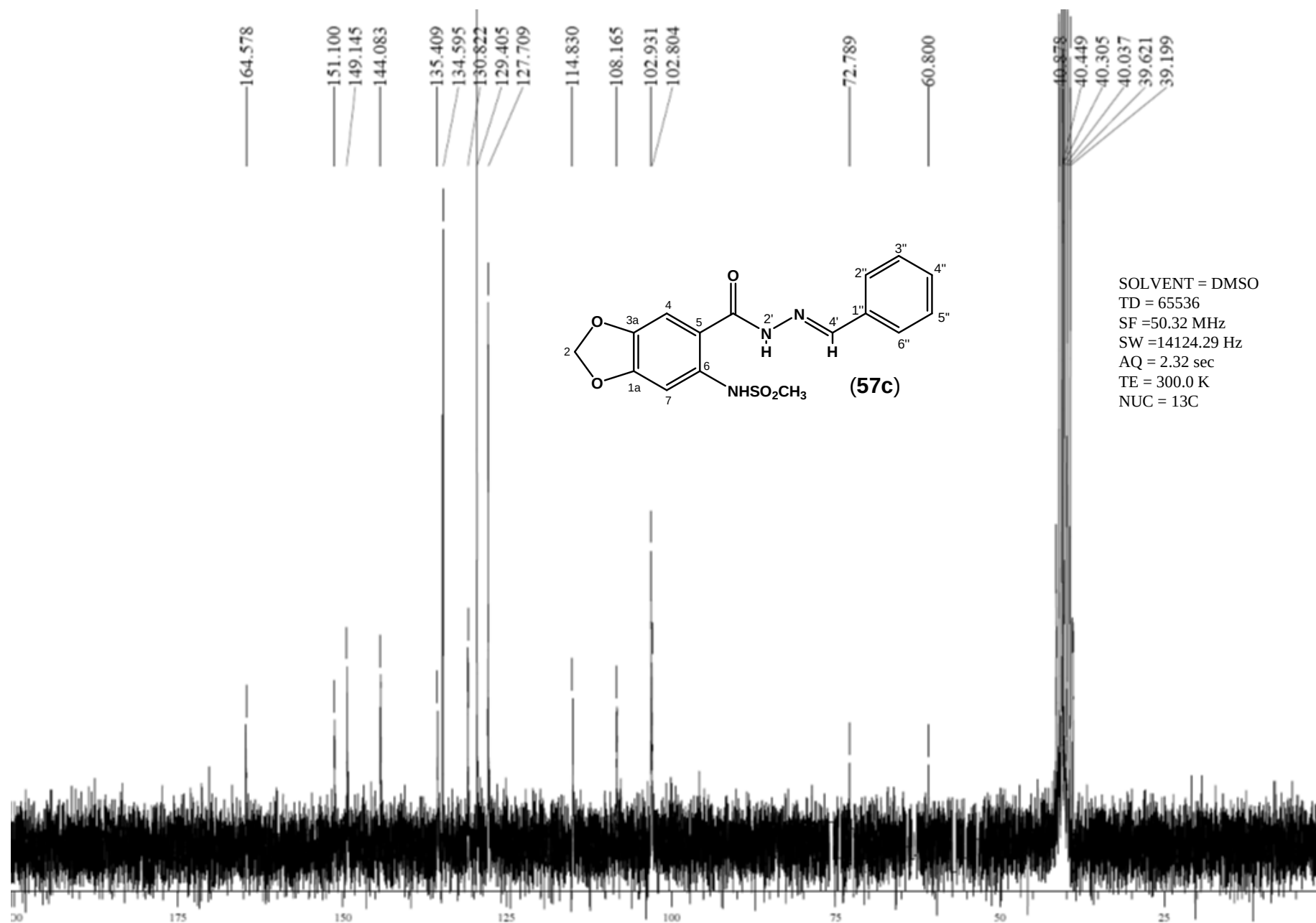
Espectro 54 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (57b)



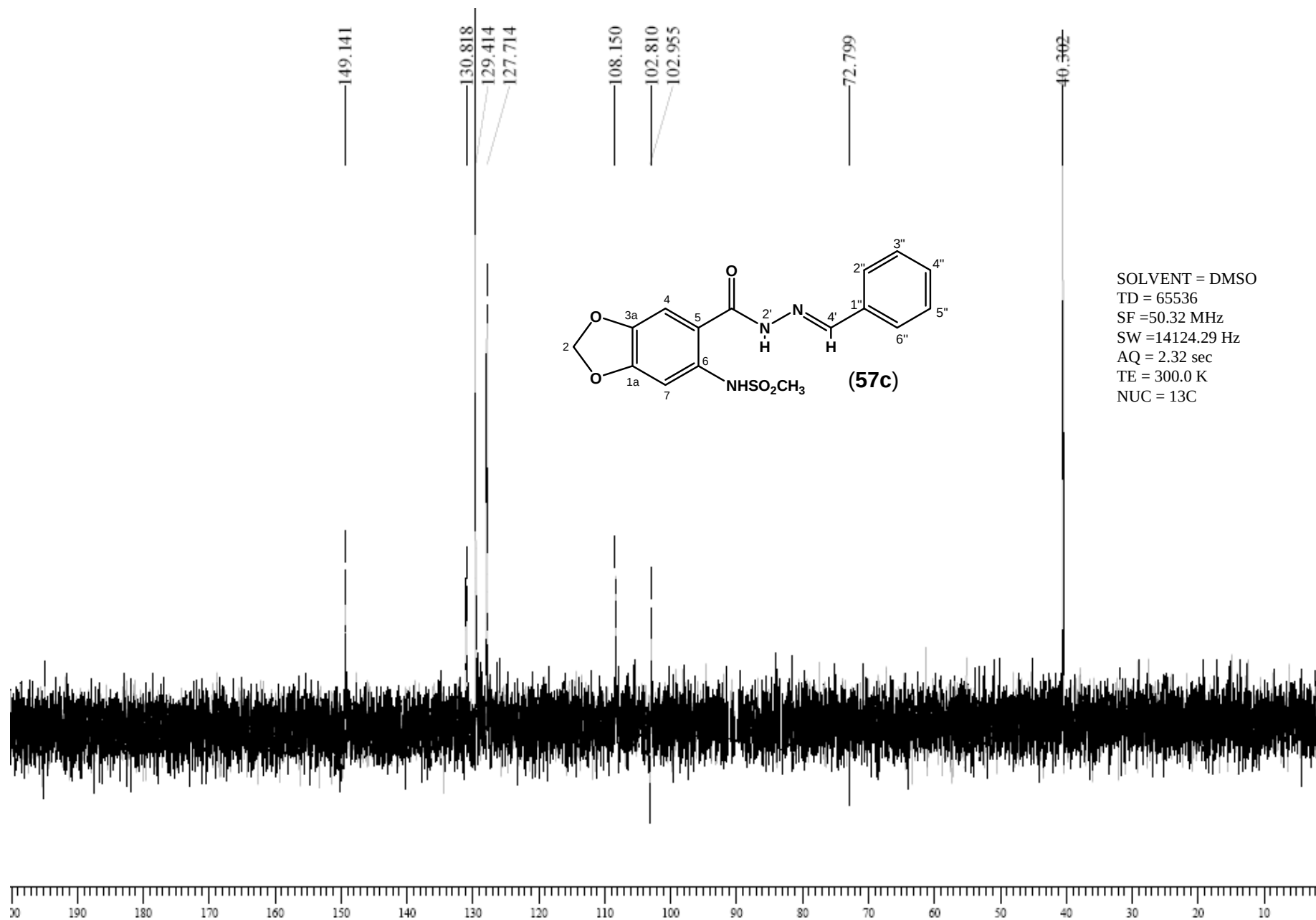
Espectro 55 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (57b)



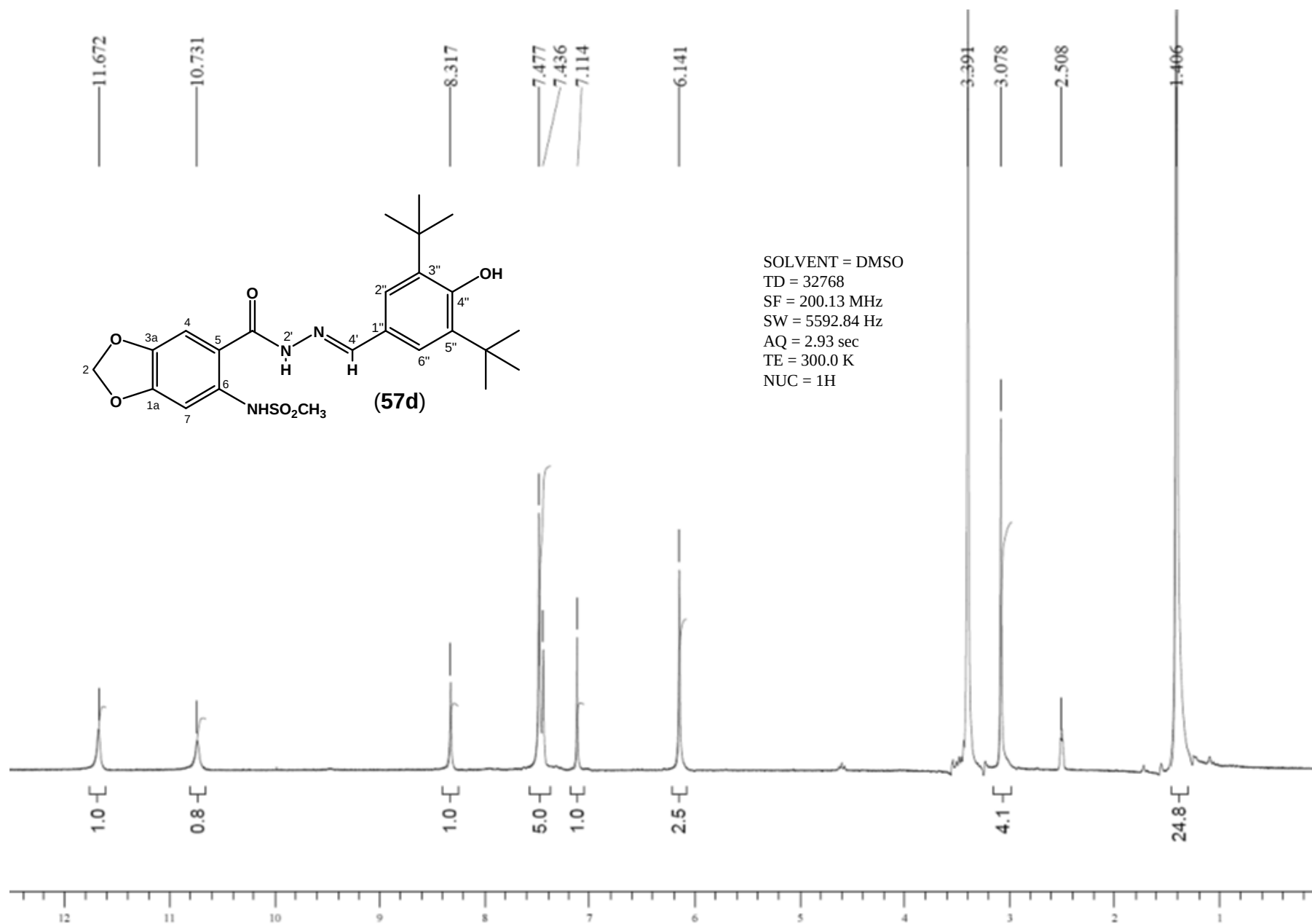
Espectro 56 – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H do derivado (57c)



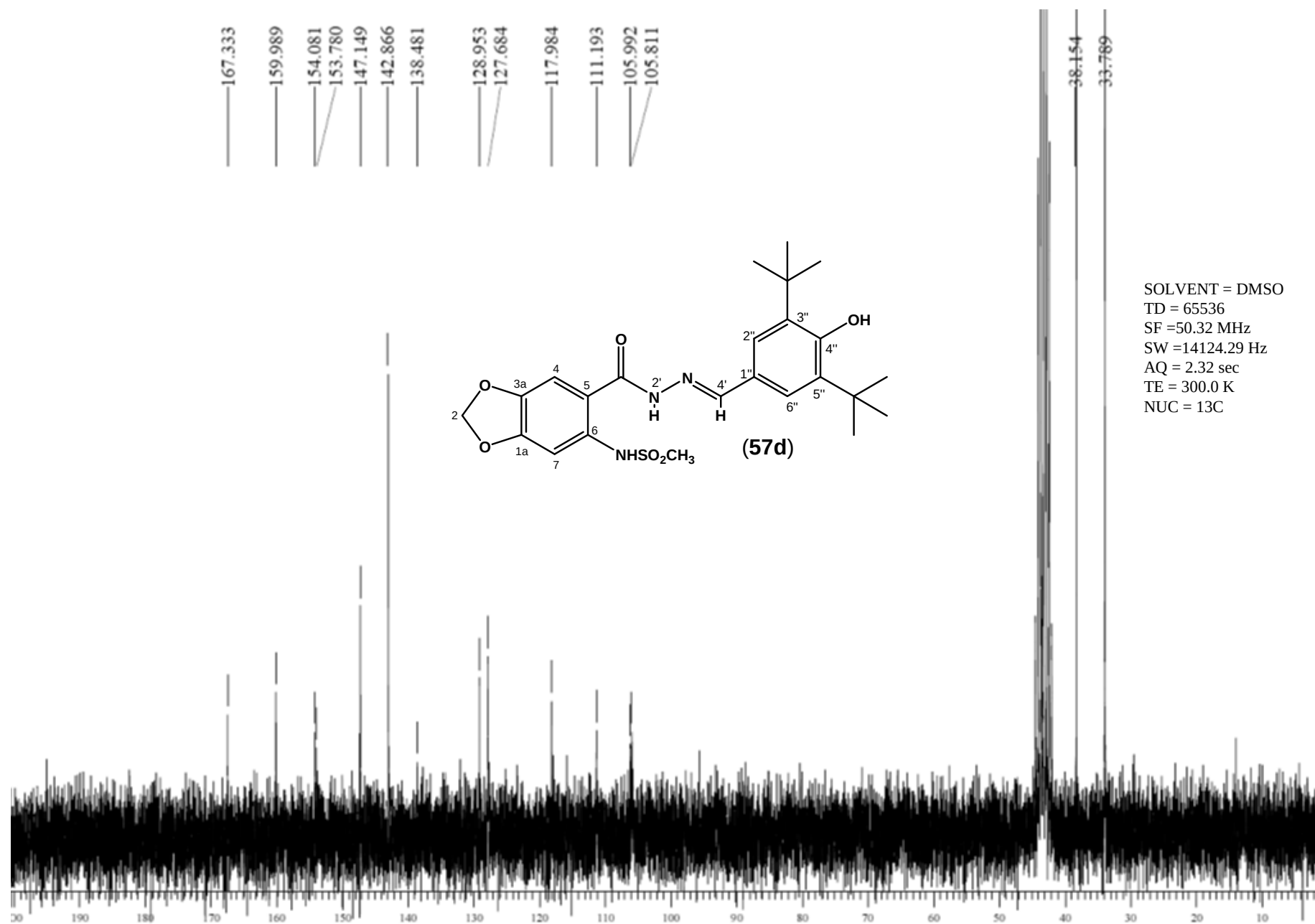
Espectro 57 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (**57c**)



Espectro 58 – Experimento de DEPT-135 para o derivado (57c)



Espectro 59 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do derivado (57d)



Espectro 60 – Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C do derivado (57d)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)