

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

Roberta Marques Dias de Ávila

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de
derivados indano-hidrazônicos, candidatos a protótipos
de fármacos anti-inflamatórios

Alfenas/MG

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

Roberta Marques Dias de Ávila

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de
derivados indano-hidrazônicos, candidatos a protótipos
de fármacos anti-inflamatórios

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Dra. Marcia Paranho Veloso

Có-orientador: Prof.Dr. Cláudio Viegas Júnior

Alfenas/MG

2010

Ávila, Roberta Marques Dias de.

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados indano-hidrazônicos, candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios / Roberta Marques Dias de Ávila. - Alfenas, 2010. 110 f. -

Dissertação (Mestrado em Matemática) - Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. Inflamação. 2. Antagonistas de prostaglandinas. 3. Antiinflamatórios-síntese química. I. Título.

CDD: 540

ROBERTA MARQUES DIAS DE ÁVILA

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados indano-hidrazônicos, candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovada em: 28 de junho de 2010

Prof. Dra. Fernanda Carla Ferreira de Brito

Instituição: Universidade Federal Fluminense - UFF

Assinatura:  _____

Prof. Dra. Marisi Gomes Soares

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG

Assinatura:  _____

Esta dissertação é dedicada aos meus amados pais, Carlos e Sônia, exemplos de paciência, força e determinação a despeito de todas as dificuldades enfrentadas.

AGRADECIMENTOS

- Aos membros da Banca examinadora pelo aceite ao convite.
- À Professora Dra. Marcia Paranho Veloso por ter me dado a chance de fazer parte da pesquisa científica, proporcionando desde a graduação a possibilidade de provar um pouco do fascínio da Química Medicinal, sem sua orientação nada disso seria possível.
- Ao Professor Dr. Cláudio Viegas Júnior, que por tantas vezes se fez presente, seja na bancada de laboratório, ou em sua sala, tornando possível extrair um pouco de sua rica experiência.
- Ao Professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos que nos inspira com suas grandiosas e incontáveis idéias, além do seu conhecimento, incentivando e mostrando que é possível
- À Professora Marisi pelo incentivo e suporte, possibilitando as análises da espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), bem como aos alunos de doutorado do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), especialmente Jame´s Almada da Silva e André Lúcio Franceschini Sarria responsáveis por grande parte das análises.
- Aos espectros fornecidos pela Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal do Rio- UFRJ
- À Professora Dra. Fernanda Carla de Brito pesquisadora do Laboratório de Farmacologia Experimental – LAFE do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – MFL, Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense – UFF e sua aluna de mestrado Nádia Alice Vieira da Motta e aluno de iniciação científica Rafael Cangemi Reis que realizaram os ensaios farmacológicos.
- Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG, pela amizade e força sempre constantes, em especial ao Rodrigo César da Silva e Camila de Pádua Gomes, Lucas Andrade, Miguel Divino da Rocha, Vanessa Silva Gontijo, Jaqueline Januário Pereira, Renan Amaro, Flávia Santa Cecília, Flávia Pereira, Cláudia Quintino da Rocha. Obrigada pela surpresa. Além de Carla Miguel, Marcelo José, Sônia Figueiredo, Isael Aparecido, Éderson D´Martin, Heleneide Campos, Lidiane Orlandi, Lílian Franco, Dayane do Carmo, Felipe Nascimento Andrade e todos os amigos que me apoiaram. Obrigada Gabriel de Oliveira Isac Morais.

- À aluna de Bic Júnior, amiga Marislaine Castro de Ávila, que em muitos momentos foi o meu braço.
- Aos meus amigos pelo apoio, torcida e orações especialmente meus vizinhos Juarez e Sônia, 'Tia Lúcia', Myrna e Sérgio. Obrigada dona Penha e família. Obrigada tia Marília por todos os momentos de orações e palavras de conforto durante meu período em Alfenas.
- Aos meus amados pais Carlos Magno Pires de Ávila e Sônia Marques Dias de Ávila aos quais devo o que tenho, pelo apoio incondicional e mesmo que distantes sempre presentes. Aos meus amores Dangelo Magno Dias de Ávila e Elaine de Souza Ávila pelo carinho e auxílio constante e por terem me presenteado dois sobrinhos lindos Uendell e Daniel, os meus tesouros.
- À Unifal-MG, CAPES, CNPq, IM-INOVAR
- Ao meu Deus Jesus Cristo por ter me dado forças e a chance de vivenciar tudo isso.

“Assim que compreendi que não há nada melhor do que ter prazer no trabalho; essa é a nossa recompensa. Pois como é que podemos saber o que vai acontecer depois da nossa morte?”
(Eclesiastes 3:22)

RESUMO

Os AINEs constituem uma importante classe de fármacos com aplicações terapêuticas que já têm sido utilizadas por mais de um século. A evolução do tratamento de doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatóide e a osteoartrite tem seu marco a partir da indometacina, um dos representantes dos AINEs tradicionais, para posterior ascensão e mais recentemente o desuso de inibidores com grande seletividade para PGHS-2. O esforço para a descoberta de um fármaco mais seguro e eficaz continua a ser um desafio e a busca por novos agentes anti-inflamatórios e analgésicos tem levado ao planejamento e a obtenção de inúmeras acil e arilidrazonas ativas de diversos padrões estruturais. Existem vários ligantes ativos capazes de atuar sobre a cascata do ácido araquidônico cujos resultados identificaram as subunidades acil e arilidrazônicas como grupo farmacofórico importante para inibição do processo inflamatório. Apesar da racionalização dos resultados obtidos e de estudos da relação estrutura-atividade no perfil biológico das subunidades acil e arilidrazonas, não foi possível até o momento identificar de fato o mecanismo de ação de tais grupamentos. O safrol, que é um alilbenzeno de distribuição ampla no reino vegetal, possui propriedades físico-químicas interessantes para ser utilizado como um produto de partida para a síntese das novas moléculas planejadas, sendo amplamente empregado em projetos de pesquisas no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) na Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Este trabalho descreve o planejamento e síntese de novos derivados indano-hidrazônicos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios. A rota sintética foi planejada em três etapas, utilizando reagentes de baixo custo e metodologias relativamente simples. Os compostos planejados e obtidos foram avaliados com o intuito de se observar o efeito anti-inflamatório a partir de ensaios preliminares (número de contorções abdominais induzidas por ácido acético) realizadas no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense – UFF. Foi possível identificar que todos os congêneres apresentaram inibição sendo que os mais ativos da série das moléculas sintetizadas foram os derivados (1c) e (1e) com 51,0% e 48,6% de inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético, respectivamente.

Palavras-chave: anti-inflamatórios, safrol, derivados indano-hidrazônicos, avaliação farmacológica.

ABSTRACT

NSAIDs are an important class of drugs with therapeutic applications that have already been used by more than a century. The evolution of treatment of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis has its mark from indomethacin, one of the representatives of traditional NSAIDs for later rise and more recently the disuse of inhibitors with high selectivity for PGHS-2. The effort to discover safer and more effective drug remains a challenge and the search for new anti-inflammatory agents and analgesics have led to the planning and the discovery of numerous active acyl and aryl-hydrazones. And there are several active ligands able to act on the arachidonic acid cascade results identified subunits acyl and aryl-hydrazones as important pharmacophore for inhibition of the inflammatory process. Despite the rationalization of the results and studies of structure-activity relationship in the biological profile of the subunits acyl and aryl-hydrazones, we could not yet identify because of the mechanism of action of such groups. Safrole, which is a allylbenzene wide distribution in the plant kingdom, has interesting physical and chemical properties for use as a starting product for the synthesis of new molecules designed and is widely used in research projects at the Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry . This paper describes the design and synthesis of new indane-hydrazone candidates prototype anti-inflammatory drugs. The synthetic route was planned in three stages, using reagents of low cost and relatively simple methods. The compounds obtained were planned and evaluated in order to observe the anti-inflammatory effect from preliminary tests (number of writhing induced by acetic acid) held in the Biomedical Institute of Universidade Federal Fluminense - UFF. It was possible to identify all congeners showed that inhibition was the most active of the series of synthesized molecules was derived (1c) and (1e) with 51.0% and 48.6% inhibition of writhing induced by acetic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Os mediadores químicos desencadeiam o processo inflamatório.....	18
Figura 2: Representação da biossíntese de prostaglandinas	20
Figura 3: Diagrama em fita do homodímero da PGHS-1 ligada ao fluorbiprofeno	22
Figura 4: Receptores nociceptivos e a inflamação.	26
Figura 5: Ação das prostaglandinas nos nocipetores.....	28
Figura 6: AAS e outros salicilatos	30
Figura 7: Estrutura da guafenina (10) e floctafenina (11).	30
Figura 8: Exemplos de AINES tradicionais	32
Figura 9: Estrutura do etodolaco (20), meloxicam (21), além dos <i>sulidos</i> (22, 23, 24).....	33
Figura 10: Estrutura química da fenilbutazona (25) e Dup-697 (26)	34
Figura 11: Estrutura química de fármacos diaril-heterocíclicos seletivos à PGHS-2	35
Figura 12: Exemplo de NO-AINE (30) e inibidor dual de COX e 5-LOX (31).....	37
Figura 13: Sítio ativo da PGHS-1e da PGHS-2.....	38
Figura 14: Estrutura do fármaco misoprostol e o uso do safrol como matéria-prima.....	41
Figura 15: A funcionalização de vários carbonos do safrol.	42
Figura 16: A subunidade arilidrazona como grupo farmacóforo	44
Figura 17: Hibridação molecular no desenho de derivados acil e arilidrazônicos	45
Figura 18: Planejamento dos novos derivados indano-hidrazônicos (1a-f)	46
Figura 19: Estrutura dos novos derivados a partir do safrol.....	47
Figura 20: Análise retrossintética dos compostos-alvo (1a-f).....	60
Figura 21: Espectro na região do infravermelho (KBr) do safrol (38) comercial.	61
Figura 22: Espectro na região do IV (KBr) para o safrol da espécie Sassafrás.....	61
Figura 23: Espectro no UV-visível. (a) Safrol comercial. (b) safrol obtido do extrato.....	62
Figura 24: Espectro na região do UV-visível. (a) Safrol (38), (b) isosafrol (39).	63
Figura 25: Espectro na região do infravermelho (KBr) do isosafrol (39).	64

Figura 26: Expansão do espectro de CG-MS do isosafrol (39).....	65
Figura 27: Espectro de RMN ¹ H do isosafrol (39).	66
Figura 28: Expansão do espectro de RMN ¹ H do isosafrol (39).....	67
Figura 29: Espectro de RMN ¹³ C do isosafrol (39).....	67
Figura 30: Mecanismo da formação do Reagente de Vilsmeier-Haack (RH).....	68
Figura 31: Espectro de IV para 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40).....	70
Figura 32: Espectro de RMN ¹ H para 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40).....	70
Figura 33: Espectro de RMN ¹³ C para 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40).....	71
Figura 34: Espectro no IV (KBr) do derivado (1a).	74
Figura 35: Espectro no IV (KBr) do derivado (1b).	75
Figura 36: Espectro no IV (KBr) do derivado (1c).	75
Figura 37: Espectro no IV (KBr) do derivado (1d).	76
Figura 38: Espectro no IV (KBr) do derivado (1e).	76
Figura 39: Espectro no IV o (KBr) do derivado (1f).....	77
Figura 40: Representação geral dos estereoisomeria dos compostos(1a-1f).....	78
Figura 41: Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado (1a).	79
Figura 42: Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado (1a).....	80
Figura 43: Espectro de RMN ¹³ C do derivado (1a).	81
Figura 44: Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado (1b).....	82
Figura 45: Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado (1b).....	82
Figura 46: Espectro de RMN ¹³ C do derivado (1b).....	83
Figura 47: Espectro de RMN ¹ H para o derivado (1c).....	87
Figura 48: Espectro de RMN ¹³ C do derivado para o derivado (1c).	88
Figura 49: Espectro de RMN ¹ H para o derivado (1d).	89
Figura 50: Espectro de RMN ¹³ C do derivado (1d).....	90
Figura 51: Espectro de RMN ¹ H para o derivado (1e).	91

Figura 52: Espectro de RMN ^{13}C para o derivado (1e).	92
Figura 53: Espectro RMN ^1H do derivado (1f).....	93
Figura 54: Espectro RMN ^{13}C do derivado (1f).....	94
Gráfico 1- Efeito anti-nociceptivo dos compostos indano-hidrazônicos.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre as isoformas PGHS-1 e PGHS-2.....	23
Tabela 2: Atribuições de RMN ¹ H (200 MHz) e RMN ¹³ C (50 MHz) para 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40) em CDCl ₃	72
Tabela 3: Síntese dos derivados indano-hidrazônicos planejados.....	73
Tabela 4: Atribuições das bandas de absorção observadas nos espectros de I.V. para os derivados indano-hidrazônicos de 1a-1f.....	74
Tabela 5: Dados de RMN ¹ H (200 MHz, TMS, CDCl ₃ ou acetona-d ₆) em ppm dos derivados indano-hidrazônicos (1 a-f) (CONTINUA).....	84
Tabela 6: Dados de RMN ¹³ C (50 MHz, TMS, CDCl ₃ ou DMSO-d ₆) em ppm dos derivados indano-hidrazônicos (1 a-1f)	86
Tabela 7: Resultados da avaliação anti-nociceptiva dos compostos indano-hidrazínicos através do teste da contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N em camundongos suíços. .	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais

AINES-NO – AINES doadores de óxido nítrico

AAS – Ácido acetilsalicílico

ATP – Trifosfato de adenosina

ASIC – canal iônico sensível a ácido

CCF – Cromatografia em camada fina

CD₃Cl – Clorofórmio deuterado

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

cLog P – Log P calculado

cm⁻¹ – Centímetro recíproco

COX-1 – Cicloxigenase 1

COX-2 – Cicloxigenase-2

COX-3 – Cicloxigenase 3

DMF - Dimetilformamida

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

H⁺ – íons hidrogênio

i.p. – Intraperitoneal

I.V. – Infravermelho

IBAMA – Instituto brasileiro de meio-ambiente

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IL-1β – Interleucina-1β

J – Constantes de acoplamento

K_i – Constante de inibição

LASSBio – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

5-LOX - 5-lipoxigenase

m-PGES-1 – Prostaglandina E Sintase-1 Microsomal

NO – óxido nítrico

P.F – Ponto de fusão

PGD₂ – Prostaglandina D₂

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF₂α – Prostaglandina F₂α

PGH₂ – Prostaglandina H₂

PGI₂ – Prostaglandina I₂

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PLC – Fosfolipase C

ppm – Parte por milhão

Rf – Fator referencial

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA m – Ácido Ribonucléico Mensageiro

REA – Relação estrutura-atividade

Ser - Serina

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF-α – Fator de necrose tumoral α

TxA₂ – tromboxana A₂

UV/Visível – Ultravioleta/ Visível

v.o. – Via oral

NOE – Efeito nuclear Overhauser

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	INFLAMAÇÃO	18
1.2.	BIOSSÍNTESE DAS PROSTAGLANDINAS	19
1.3.	PROSTAGLANDINA ENDOPERÓXIDO-H SINTASE (PGHS).....	21
1.4.	A DOR INFLAMATÓRIA	24
1.5.	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIAS (AINES).....	29
1.6.	A BASE MOLECULAR DA INIBIÇÃO DA PGHS	38
1.7.	O USO DO SAFROL COMO MATÉRIA-PRIMA PARA DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	40
2.	PLANEJAMENTO	44
3.	OBJETIVOS	47
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	48
4.1.	MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS.....	48
4.2.	METODOLOGIA DE SÍNTESE	49
4.2.1.	OBTENÇÃO DO MATERIAL DE PARTIDA	49
4.2.2.	SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 5-ALIL-1,3-BENZODIOXOLA (39) (ADAPTADO DE BARREIRO & LIMA, 1992).....	49
4.2.3.	SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 2-METIL-5,6-(METILENODIOXI)-1- INDANONA (40) (ADAPTADO DE BARREIRO & LIMA, 1992)	51
4.2.4.	PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS INDANO- HIDRAZÔNICOS (1a-f) (DIAS, 1994).....	52
4.3.	TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 0,1N (WHITTLE,1964).....	59
5.	RESULTADOS	60
5.1.	CONFIRMAÇÃO DO MATERIAL DE PARTIDA: SAFROL (38)	60
5.2.	OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 5-ALIL-1,3-BENZODIOXOLA (39)	62
5.3.	OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 2-METIL-5,6-(METILENODIOXI)-1- INDANONA (40).....	68
5.4.	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS INDANO-HIDRAZÔNICOS (1a-f).....	72
5.5.	ENSAIO DE INIBIÇÃO DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	95
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	98
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) representam um grupo repleto de agentes farmacológicos que compartilham as mesmas atividades terapêuticas e por vezes o mesmo mecanismo de ação, talvez refletindo a insatisfação terapêutica na área da dor e das doenças músculo-esqueléticas, bem como a variabilidade individual na resposta a estes agentes (PATRONO & ROCCA, 2009).

Há mais de um século Felix Hoffman sintetizou o ácido acetilsalicílico (AAS), que se tornou um dos primeiros fármacos da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), mas somente na década de setenta foi possível compreender que a aspirina (ou AAS) possui ação terapêutica por inibir a síntese de prostaglandinas inflamatórias. Hoje os AINEs estão entre os fármacos mais utilizados, sendo que na Europa representam em torno de 7,7% de todas as prescrições, um valor numérico provavelmente subestimado já que não leva em conta o uso destes fármacos sem receituário médico (SOSTRES *et al*, 2010). Há relatos de que mais de 80 milhões de comprimidos de aspirina são consumidos anualmente nos EUA, sendo que mais de 37% dos indivíduos a utilizam para prevenir coágulos sanguíneos. Outro AINE amplamente prescrito é o diclofenaco ou o seu sal sódico (Voltaren®) empregado para o tratamento da osteoartrose, artrite reumatóide e espondilite anquilosante (GORDEN, 2005).

O uso de AINES é mais frequente entre as mulheres e aumenta com a idade sendo relacionado à maior incidência das doenças reumáticas. Na verdade mais do que 90% das prescrições são feitas para pacientes acima de 65 anos (SHAHEEN, 2006). O maior problema relacionado com o uso crônico desses AINES é a possibilidade de induzir graves efeitos gastrointestinais tóxicos, como sangramento, ulceração e perfuração, além de complicações cardíacas e renais que limitam consideravelmente a sua utilidade terapêutica (SOSTRES *et al*, 2010). De acordo com o relatório de investigação sobre “Toxic and Deadly NSAIDs”, as estimativas apontam que complicações no trato gastrointestinal são responsáveis por mais de 107.000 hospitalizações e 16.500 mortes por ano entre pacientes com artrite nos EUA (BYSTRIANYK, 2002).

A necessidade de anti-inflamatórios que sejam eficientes, além de mais seguros, principalmente em relação aos eventos gastro-intestinais e cardiovasculares, torna essa área a ser explorada na pesquisa básica com objetivo de planejar e sintetizar novas entidades químicas promissoras a fármacos anti-inflamatórios.

1.1. INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser definida como uma resposta dos tecidos à agressão, seja ela química, física ou biológica, que apesar da complexidade dos processos que a desencadeiam, se manifesta de maneira estereotipada. O processo inflamatório tem como objetivo principal remover o agente etiológico ou nocivo e reparar o tecido lesado (RAMALHO *et al*, 2009; TRIBUTINO *et al*, 2009; COTRAN *et al*, 1999,). Em nível macroscópico, a resposta inflamatória é habitualmente acompanhada dos sinais clínicos como eritema, edema, hipersensibilidade e dor (RANQUIN, 2004).

A inflamação divide-se em padrões agudo e crônico, dependendo da persistência da lesão, dos sintomas clínicos e da natureza da resposta existente. As características mais importantes da inflamação aguda incluem o acúmulo de líquidos e componentes do plasma no tecido afetado, estimulação intravascular de plaquetas e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN – principalmente neutrófilos) do espaço intraluminal até o tecido extravascular (Figura 1). Por outro lado, os componentes celulares característicos da inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A resposta inflamatória crônica é prolongada, com persistência de células inflamatórias e dano tissular, frequentemente resultando em reparo não adequado (RUBIN *et al*, 2006).

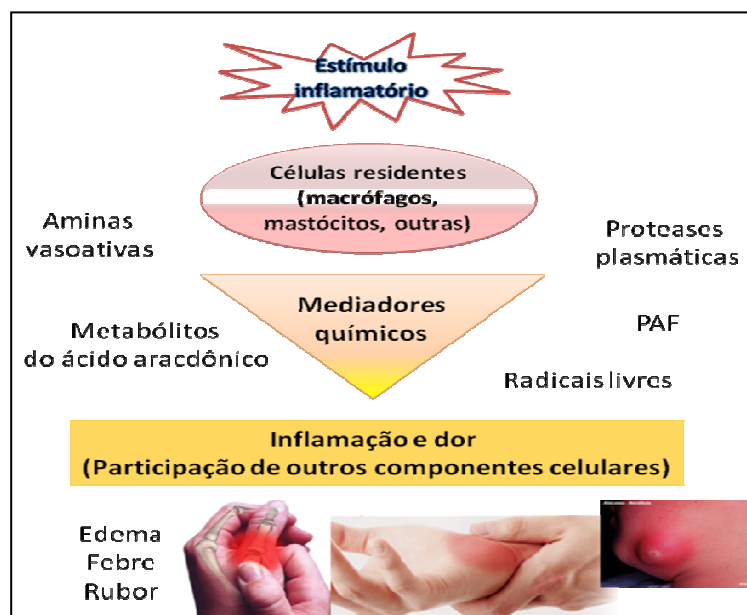


Figura 1: Os mediadores químicos desencadeiam o processo inflamatório agudo (abscesso de mandíbula, tendinite) ou crônico (tendinite, osteoartrite).

Há vários mecanismos diferentes envolvidos no processo inflamatório. A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência em vista dos patógenos e das lesões ambientais, embora, em algumas situações e patologias, a resposta inflamatória possa ser exagerada e duradoura, sem qualquer razão benéfica aparente (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Além da participação direta de células inflamatórias, vários mediadores químicos são gerados durante o processo inflamatório (Figura 1, página 18) tais como as aminas vasoativas (histamina e serotonina) (BURIGO *et al*, 1996), proteínas plasmáticas (sistema da coagulação e sistema complemento) (FARSKY, *et al*, 2000) juntamente com as cininas (bradicinina e citocinas), além dos metabólitos lipídicos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) (CABRAL, 2005).

A melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo inflamatório permitiu a descoberta de muitos alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, ainda é um desafio para o químico farmacêutico o planejamento de agentes com maior eficácia e menor toxicidade afim de tratar os sinais e sintomas da inflamação aguda bem como as conseqüências, em longo prazo, das doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, asma e outras patologias (DINARELLO, 2010).

1.2. BIOSÍNTESE DAS PROSTAGLANDINAS

Os prostanóides são produtos finais do metabolismo do ácido graxo e são produzidos por meio da ação enzimática da prostaglandina endoperóxido-H sintase (PGHS) ou cicloxigenase (COX). Estes metabólitos são reconhecidos como importantes mediadores fisiológicos, bem como patológicos, e estão envolvidos nos processos da inflamação, dor, febre, câncer, glaucoma, disfunção sexual masculina, osteoporose, doenças cardiovasculares e asma (BOUAZIZ-TERRACHET *et al*, 2010; ABRANOVITZ & METTERS, 1998).

O ácido araquidônico (AA) é um dos três ácidos graxos essenciais e está incorporado como éster de fosfolípídeo nas membranas celulares inclusive dos mastócitos e de outras células inflamatórias (eosinófilos, macrófagos) (SMITH *et al* 2000; SHINOHARA, 1999). Em resposta a uma variedade de estímulos, o AA é liberado por fosfolipases secretoras (sPLA₂) ou citoplasmáticas (cPLA₂) e posteriormente é convertido a prostaglandinas, através das duas isoformas da PGHS, por meio de etapas de reações sequenciais. A síntese das prostaglandinas inicia-se, portanto, com a atividade da PGHS catalisando a adição do

oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário prostaglandina G₂ (PGG₂). A mesma enzima, por sua atividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a PGH₂. As PGG₂ e PGH₂ apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxanos ativos, incluindo PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TX) (Figura 2). As prostaglandinas formadas a partir da ação das cicloxigenases ligam-se a receptores prostanóides que se encontram localizados na membrana celular, acoplados à proteína G e a outros receptores. A ativação da proteína G resulta na estimulação de sistemas efetores responsáveis pela liberação de segundos mensageiros em diversos tecidos desencadeando processos fisiológicos ou patológicos (KLEIN *et al*, 2007, CARO & CEDERBAUM, 2006).

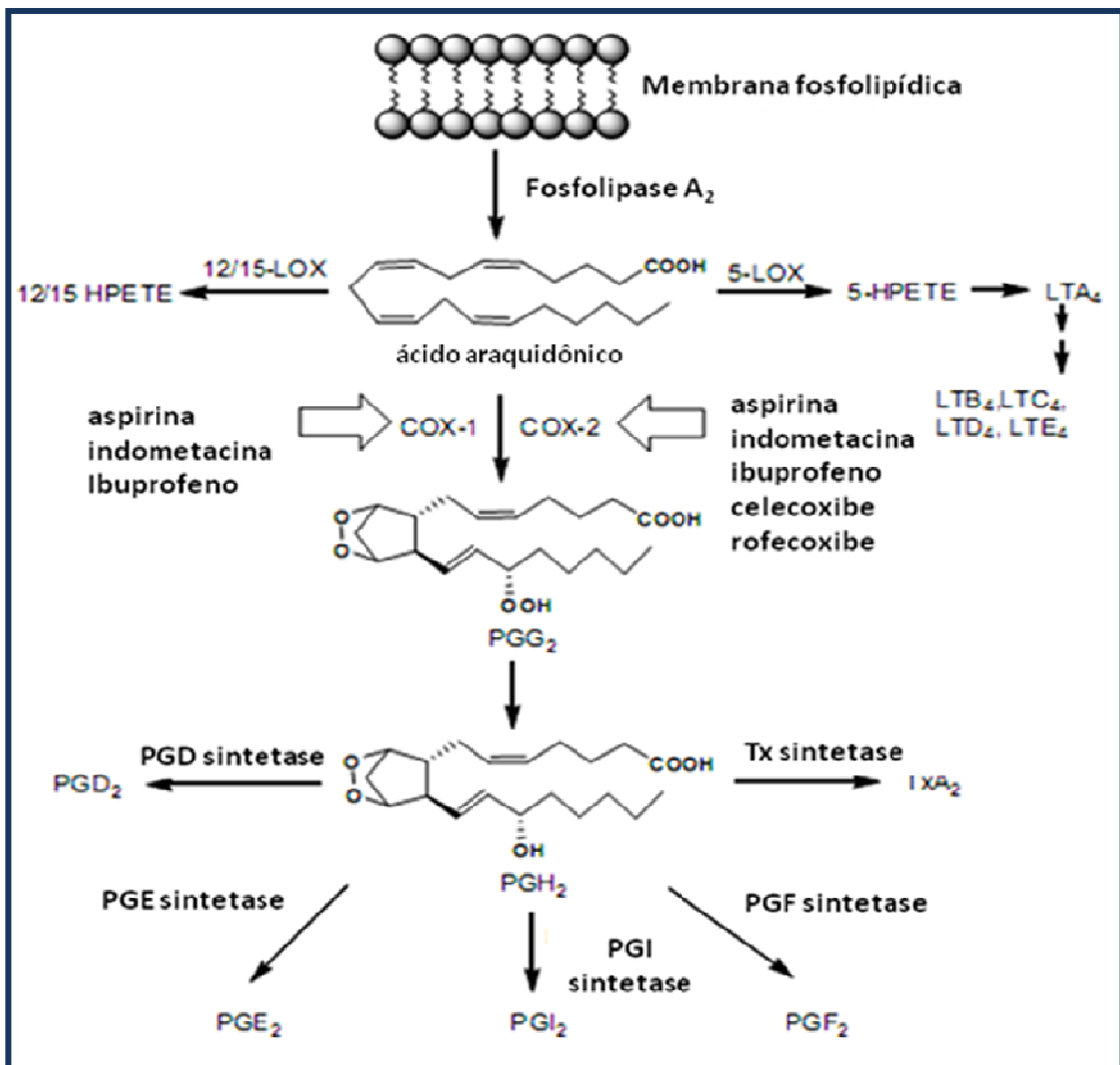


Figura 2: Representação da biossíntese de prostaglandinas (PG) a partir do ácido araquidônico via PGHS-1/PGHS-2 (COX-1/COX-2). Os AINES aspirina, indometacina e ibuprofeno são inibidores não seletivos das isoformas da COX enquanto celecoxibe e rofecoxibe exibem seletividade para a COX-2. Fonte: RAO & KNAUS, 2008.

1.3. PROSTAGLANDINA ENDOPERÓXIDO-H SINTASE (PGHS)

A primeira obtenção da enzima prostaglandina endoperóxido-H sintase (PGHS), na sua forma pura, isolada a partir de vesículas seminais, foi relatada em 1976, sendo que mais de uma década depois, em 1988, a enzima pôde ser clonada (MIYAMOTO *et al*, 1976, HEYMANN *et al*, 1976, MERLIE *et al*, 1988, YOKOYAMA *et al* 1988, RAO & KNAUS, 2008). A existência de uma isoforma induzível, que passou a ser chamada de PGHS-2, foi descoberta em meados da década de 90 (BOTTING, 2006). Sabe-se que a PGHS é a principal enzima responsável pela oxidação do ácido araquidônico (AA) para prostaglandina G₂ (PGG₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂). Ambas isoformas, PGHS-1 e PGHS-2, catalisam a reação de cicloxigenase (bis-oxigenase), pela qual o substrato endógeno, o ácido araquidônico (AA), juntamente com duas moléculas de oxigênio molecular é convertido para PGG₂. E outra reação de peroxidase em que PGG₂ é reduzido para PGH₂. Estas etapas reacionais ocorrem em sítios distintos, mas estrutural e funcionalmente interligados (SMITH *et al* 2000).

As isoformas da PGHS são hemoproteínas que apresentam diferentes perfis de expressão e de funções em distintos processos fisiológicos. A estrutura primária da PGHS-1 é composta de 602 aminoácidos, enquanto que a PGHS-2 tem 604 aminoácidos (RAO & KNAUS, 2008). Por convenção, os resíduos são numerados de acordo com a sequência da PGHS de ovinos ou murinos para se padronizar comparações estruturais e funcionais entre as espécies. As isoformas PGHS-1 e PGHS-2 compartilham em torno de 60-65% da mesma sequência de aminoácidos intra-espécies e cerca de 85-90% na homologia da sequência dos resíduos de aminoácidos para as diferentes isoformas interespécie (YOKOYAMA *et al*, 1988; OTTO & SMITH, 1996, RAO & KNAUS, 2008). A primeira estrutura cristalina da PGHS-1 de ovinos complexada com o AINE flurbiprofeno foi relatado em 1994 (PICOT, LOLL & GAVARITO, 1994, RAO & KNAUS, 2008). Destes estudos foi possível definir que as isoformas da PGHS são homodímeros, com cada monômero composto de três domínios estruturais, o domínio do fator de crescimento epidérmico (EGF), localizado na região N-terminal, o domínio de ligação à membrana (MBD) e o domínio catalítico C terminal. Este último, o maior deles, contém os sítios peroxidase e cicloxigenase (Figura 3, página 22) (LAGES *et al* 1998, PICOT, LOLL & GAVARITO, 1994).

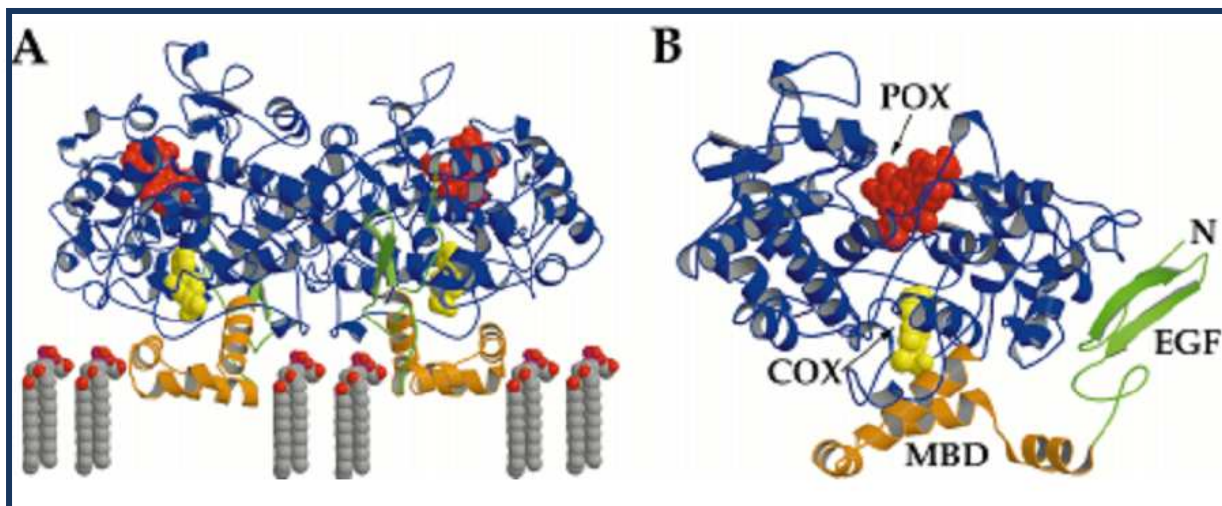


Figura 3: A) Diagrama em fita do homodímero da PGHS-1 de ovino com o fluorbiprofeno ligado no sítio ativo. B) Diagrama em fita da PGHS-1 com o fluorbiprofeno como ligante indicando os locais dos sítios ciclooxigenase (COX) e peroxidase (POX) além dos domínios EGF e MBD. O fluorbiprofeno está representado como modelo de bolas cheias em amarelo. Fonte: (SMITH, DEWITT & GAVARITO, 2000)

As unidades monoméricas da PGHS-1 e PGHS-2 contêm um canal hidrofóbico longo e estreito que se origina no domínio MDB e se estende até o núcleo do domínio catalítico. A região do sítio ativo responsável pela reação de ciclooxigenase, tanto para PGHS-1 como na PGHS-2, está localizado no canal hidrofóbico se estendendo em direção ao centro do domínio catalítico, enquanto o sítio peroxidase está localizado na região contendo o grupo heme e próximo da superfície da proteína. O MDB é composto de quatro hélices alfa sendo que uma delas, a hélice D, emerge para o domínio catalítico. Essas hélices cercam uma abertura que possivelmente, através dela, o substrato endógeno e os AINEs alcançam o sítio ativo. Ambas isoformas estão ligadas ao retículo endoplasmático (ER) e ao envelope nuclear e uma N-glicosilação é necessária para haver o desdobramento da atividade enzimática (SMITH, DEWITT, & GARAVITO, 2000). As isoformas da PGHS têm estruturas muito semelhantes no sítio de ligação, nos mecanismos catalíticos e possuem os mesmos produtos de biossíntese. Algumas das diferenças entre PGHS-1 e PGHS-2 de humanos podem ser visualizadas na Tabela 1 (página 23).

A isoforma PGHS-1 é constitutivamente expressa em altos níveis em células e tecidos, tais como o endotélio, monócitos, plaquetas, túbulos renais coletores e vesículas seminais (SMITH & DEWITT, 1996). A PGHS-2 é induzida por mediadores da inflamação, tais como lipopolissacarídeos (LPS), interleucina-1 (IL1), fator de necrose tumoral (TNF- α), em uma ampla variedade de células e tecidos, como endotélio vascular, osteoclastos, monócitos e

macrófagos. Vários estudos já indicaram que a PGHS-2 constitutivamente expressa exerce funções específicas na reprodução, fisiologia renal, reabsorção óssea e neurotransmissão (SMITH, W.L & DEWITT, 1996, LIM *et al*, 1997, CHENG *et al*, 1999, BREDER, DEWITT & KRAIG, 1995).

Tabela 1: Comparação entre as isoformas PGHS-1 e PGHS-2

Propriedades	PGHS-1	PGHS-2
Tamanho do gene	22 kb	8,3 kb
Cromossomo	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
RNA m	2,8 kb	4,1 kb
Regulação do RNA m	Constitutiva	Induzida
Localização	Retículo endoplasmático	Membrana nuclear e retículo endoplasmático
Peso molecular	70 kDa	70-72 kDa
Co-fator	1 mol de heme	1 mol de heme
Glicosilação	-N, 3 sítios	-N, 3 ou 4 sítios
Atividade	23 mmol de AA/mg/mL	12 mmol de AA/mg/mL

Nota: (kb)- kilobases KD , kDa (kilodaltons).

Fonte: Adaptado de RAO & KNAUS, 2008.

Os AINEs tradicionais possuem ação anti-inflamatória e analgésica por inibição não seletiva da atividade da PGHS. E ao inibir a isoforma da PGHS-1 responsável pela síntese das PGs gastroprotetoras apresentam efeitos colaterais no trato gastrointestinal (PRITCHARD & PIRMOHAMED, 2009, HARRAK *et al*, 2007, VANE *et al*, 1998). Durante a inflamação, o RNAm da PGHS-1 e a atividade da enzima não se altera, enquanto que, um aumento drástico nos níveis de PGHS-2 intracelular ocorre, levando a produção elevada de PGs associadas ao processo inflamatório (SOSTES *et al*, 2010). A expressão da PGHS-2 tem sido estudada extensivamente em modelos animais de inflamação, que fornecem fortes evidências de que a indução da enzima PGHS-2 está associada com a inflamação diferentemente do que ocorre com a PGHS-1. Além disso, as prostaglandinas produzidas através da PGHS-2 como a PGE₂ e PGI₂ amplificam os eventos do processo inflamatório iniciado por outros mediadores da inflamação, tais como histamina e bradicinina levando a um aumento da permeabilidade

vascular e ao edema (RAZ *et al* , 1989, FU *et al* 1990; MASFERRER *et al*, 1990). Outro fato que corrobora com a existência da relação da PGHS-2 com os processos inflamatórios é que inibidores seletivos para esta isoforma apresentam boa atividade anti-inflamatória e analgésica em vários modelos animais (BOTTING, 2006).

Por longo tempo questionou-se a suspeita de que o acetoaminofeno (paracetamol), um analgésico e antitérmico amplamente utilizado, apresentava sua ação terapêutica por inibir uma isoforma da PGHS que era especificamente encontrada no cérebro (BOTTING, 2000). Seria a existência de uma terceira isoforma catalítica da PGHS que poderia explicar as ações farmacológicas do paracetamol e outros antipiréticos analgésicos que são fracos inibidores de PGHS-1 e PGHS-2, mas penetram facilmente no sistema nervoso central (COURADE *et al*, 2001, BOTTTING & AYOUB, 2004). Em 2002, a partir dos estudos do grupo de pesquisa de Daniel Simmons, foi possível se ter a caracterização e o clone de uma enzima PGHS no cérebro de cães que, ao contrário da PGHS-1 e PGHS-2 (MITCHELL, 1993) foi sensível à inibição com acetaminofeno (CHANDRASEKHARAN, 2002). No entanto, o entusiasmo inicial em torno da descoberta da PGHS-3 como um alvo potencial do fármaco foi contestado quando se descobriu que não se pode generalizar a relação inter-espécie da presença de PGHS-3 em cães *versus* o homem. Estudos mais recentes têm revelado que as sequências de aminoácidos que codificam a PGHS-3 são completamente diferentes das PGHS-1 ou PGHS-2 em roedores e humanos e o que poderia contradizer o seu papel na causa da dor e febre. Apesar da relevância clínica da PGHS-3 como um alvo para fármacos ser questionável ainda são necessários estudos mais elaborados (KIS, SNIPES & BUSIJA, 2005, HINZ, CHEREMINA & BRUNE, 2008).

1.4. A DOR INFLAMATÓRIA

Evidências clínicas sustentam a idéia de que o sistema nervoso central desempenha um papel importante na fisiopatologia das doenças articulares inflamatórias como na artrite reumatóide. Embora os mecanismos espinal e cerebral participem na geração e perpetuação da dor, o conhecimento sobre os mecanismos periféricos aumentou consideravelmente nos últimos anos, sugerindo novas possibilidades de tratamento. Entre as medicações amplamente utilizadas por reumatologistas no tratamento de pacientes com inflamação ou doenças imunológicas, eles atribuem especial importância à ativação e sensibilização das fibras nervosas que estão envolvidas na dor (COUTAUX *et al*, 2005).

Os sinais nociceptivos são gerados por órgãos sensoriais periféricos chamados nociceptores (fibras da “dor”) que são as terminações de fibras nervosas de pequeno diâmetro responsáveis pelo ambiente tissular. As terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C (nociceptores) são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. A variedade de mediadores químicos capazes de ativar ou sensibilizar os nociceptores podem atuar em conjunto ou em um dado momento no processo inflamatório provocado pelo estímulo nocivo, produzindo mudanças sutis que resultam em hiperalgesia, alodinia ou “dor” espontânea (COUTAUX *et al*, 2005; LINLEY *et al*, 2010). A dor inflamatória é proveniente de uma lesão ou injúria tecidual, sendo que tanto as regiões periféricas e o sistema nervoso central contribuem significativamente para a hiperalgesia. Durante a inflamação os nociceptores periféricos estão sensibilizados (sensibilização periférica), e sobre a ação lesiva desenvolvem descargas ectópicas provenientes do local da lesão. Como consequência uma resposta complexa neuronal é mediada na medula espinhal, onde os neurônios se hipersensibilizam (sensibilização central) o que amplifica a atividade periférica (SCHAIBLE, 2007).

O primeiro grupo dentre as substâncias endógenas liberadas por células que sofreram alguma espécie de lesão, os íons de potássio (K⁺), íons de hidrogênio (H⁺), e trifosfato de adenosina (ATP), são aquelas que possuem ação excitatória, as demais atuam principalmente através de sensibilização dos nociceptores. A presença de H⁺ altera as condições do ambiente tissular no local da lesão, ativando os canais de sódio sensíveis ao pH ácido (ASIC); a ligação do ATP aos seus receptores resulta na abertura dos canais de cátions que despolariza as terminações das fibras nervosas (Figura 4, página 26). Na sensibilização o limiar de despolarização dos nociceptores é reduzido, o que os torna mais sensíveis aos estímulos de baixa intensidade sendo que, um estímulo que era normalmente inócuo, passa a ser doloroso (alodinia) (BARTFAI, 2001). Além disso, as terminações de fibras sensoriais são protegidas pelo perineuro, que isolados do tecido endoneural, impede a passagem de moléculas de massa molar elevada que sejam hidrofóbicos como os peptídeos (EK *et al*, 2001). Nos sítios da inflamação, esta barreira é quebrada, de modo que os peptídeos tenham acesso aos seus alvos potenciais (COUTAUX *et al*, 2005).

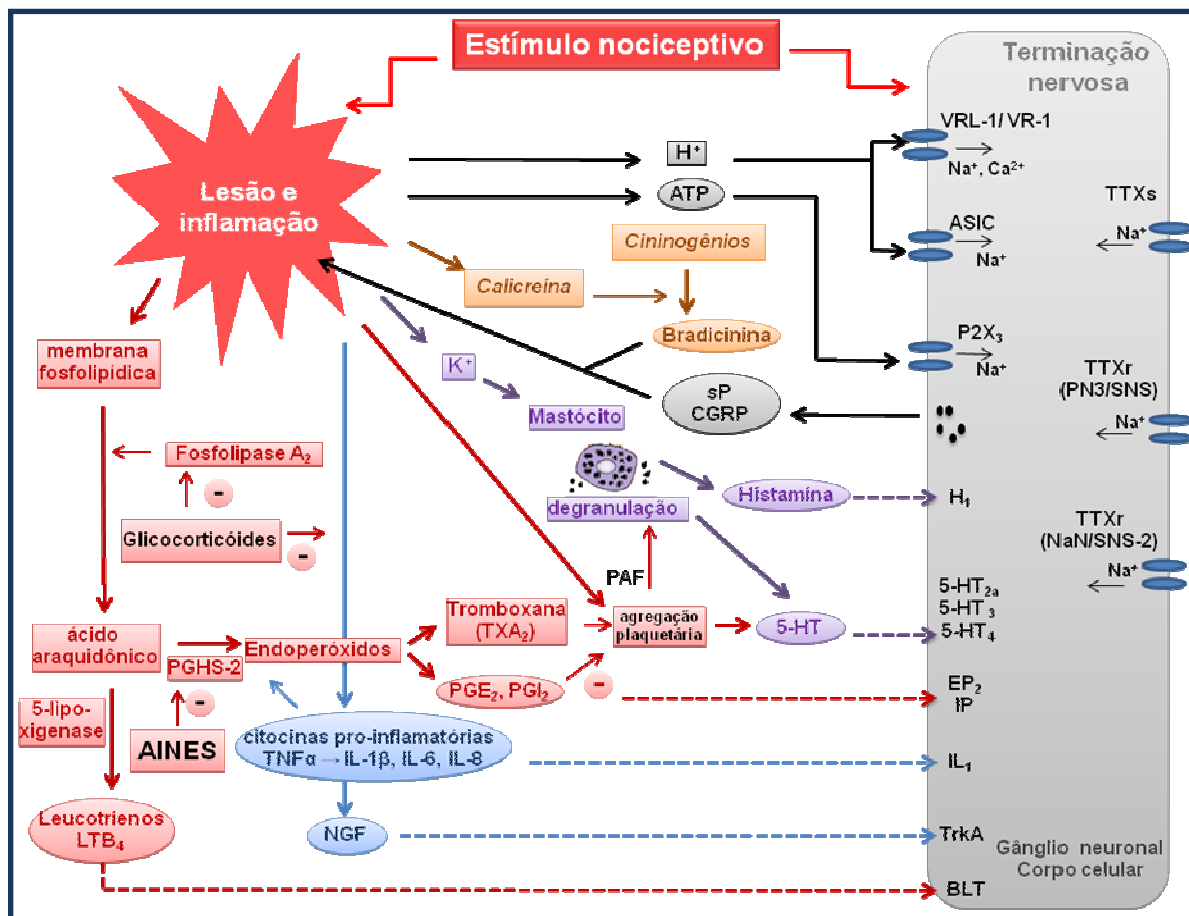


Figura 4: Receptores nociceptivos e a inflamação. Os fatores que podem ativar os nociceptores no sítio da inflamação são representados por seta contínua e aqueles que sensibilizam, por seta pontilhada. Na figura, íons hidrogênio (H^+) trifosfato de adenosina (ATP), canal iônico sensível ao pH ácido (ASIC), receptor vanilóide 1 (VR-1), receptor de ATP ionotrópico, prostaglandina E_2 e I_2 (PGE_1 , PGE_2), prostaglandina endoperóxido sintase 2 (PGHS-2) fator de crescimento neuronal (NGF), serotonina (5-HT) e receptores de serotonina, canais de sódio resistente e sensível a tetrodotoxina (TTX_r , TTX_s), receptor de NGF, tirosina quinase A (TrkA), substância P (sP), peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP). Glicocorticóides bloqueiam a enzima fosfolipase A_2 e, portanto, o metabolismo dos leucotrienos e prostaglandinas. Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) bloqueiam apenas a prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS-2) Fonte: (COUTAUX *et al*, 2005).

Já o segundo grupo de espécies moleculares relacionadas ao processo inflamatório, as cininas representadas pela bradicinina, que promove o aumento da permeabilidade capilar, está dentre as mais potentes substâncias algogênicas já identificadas (CALIXTO, CABRINI & CAMPOS, 2000; COUTURE *et al*, 2001). As prostaglandinas (PGE_2 , PGI_2), os leucotrienos (LTB_4), as citocinas pró-inflamatórias ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$), e o fator de crescimento neuronal (NGF) exercem efeitos específicos sensibilizando os receptores para a ação de outros mediadores, promovendo a hiperalgesia primária (CARTMELL *et al*, 2000; SARAGOVI & GEHRING, 2000). Também pode ser citada a serotonina (5-HT), liberada

durante a agregação plaquetária e degranulação de mastócitos além da histamina, igualmente liberada pelos mastócitos. A histamina induz prurido, seguido por dor com o aumento das suas concentrações e juntamente com 5-HT, se liga a receptores específicos, induzindo fosforilação das proteínas quinases A e C (PKA e PKC) interiorizadas na fibra neuronal. Isso reforça a eficácia dos canais de sódio tetrodotoxina-resistentes (TTXr) e diminui o limiar de receptores transdutores tais o como vanilóide (VR-1) (KUMAR, 2005) contribuindo para a sensibilização periférica. O complexo entre o fator de crescimento neuronal (NGF) e o seu receptor TrkA (tirosina quinase A) é interiorizado e transportado para o corpo celular dos neurônios no gânglio espinhal, que induz mudanças na síntese protéica, incluindo um aumento na produção dos canais TTXr favorecendo a hiperalgesia primária (Figura 4, página 26) (PEZET, MALCANGIO & MCMAHON, 2005).

As substâncias liberadas pelos nociceptores compreendem o terceiro grupo de mediadores envolvidos na hiperalgesia e alodinia, sendo que a substância P (sP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CRGP) podem ser citados. Essas substâncias são capazes de ativar os nociceptores direta ou indiretamente gerando um círculo vicioso que amplifica a sensibilização periférica (MANTY, 2002; NISSALO *et al*, 2002) (Figura 4, página 26). Todos os eventos bioquímicos que envolvem a sensibilização periférica dos nociceptores conduzem então à hiperalgesia primária. À medida que o aumento da resposta a estímulos dolorosos se estende para áreas adjacentes, ocorre a hiperalgesia secundária, que se deve a sensibilização espinhal. A hiperalgesia secundária é de natureza progressiva e em longo prazo é responsável por alterações plásticas do sistema nervoso que levam à cronificação da dor. O envolvimento do sistema nervoso central (sensibilização central) implica em alterações dos impulsos periféricos com adaptações positivas ou negativas. Ocorre redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal da medula espinhal (ALAN, 1999, ROCHA *et al*, 2005, BENANI *et al*, 2003).

1.4.1 PROSTAGLANDINAS E SUAS AÇÕES NOCICEPTIVAS

As prostaglandinas produzidas após a indução da PGHS-2 em células imunes no tecido inflamado contribuem para o processo inflamatório, pois promovem vasodilatação e potencializam o efeito edematoso de outros mediadores envolvido na inflamação, levando ao desenvolvimento de rubor, calor e edema no tecido lesado, e contribuindo para a hipersensibilidade à dor, agindo em terminais periféricos dos nociceptores (VARDEH *et al*,

2009). A ligação das prostaglandinas (PGE_2 , PGI_2) com receptores específicos (EP_1 , EP_2 e IP) acoplados à proteína G, induz a fosforilação dos canais iônicos que se tornam hipersensíveis à ação de outros mediadores. A fosforilação é induzida por uma proteína quinase A que é ativada pela adenilato ciclase, ou através da proteína quinase C (PKC), ativada por uma fosfolipase (PLC) que promove a abertura dos canais dos receptores vanilóides VR-1, dos canais de cálcio (incluindo N e P / Q), e dos canais de sódio voltagem-dependentes (TTXr) além de fechar os canais de potássio (Figura 5). A ação destes eventos leva a despolarização da membrana, a redução do limiar do potencial de ação e ao atraso na repolarização, resultando na sensibilização periférica (SMYTH *et al*, 2009; COUTAUX *et al*, 2005).

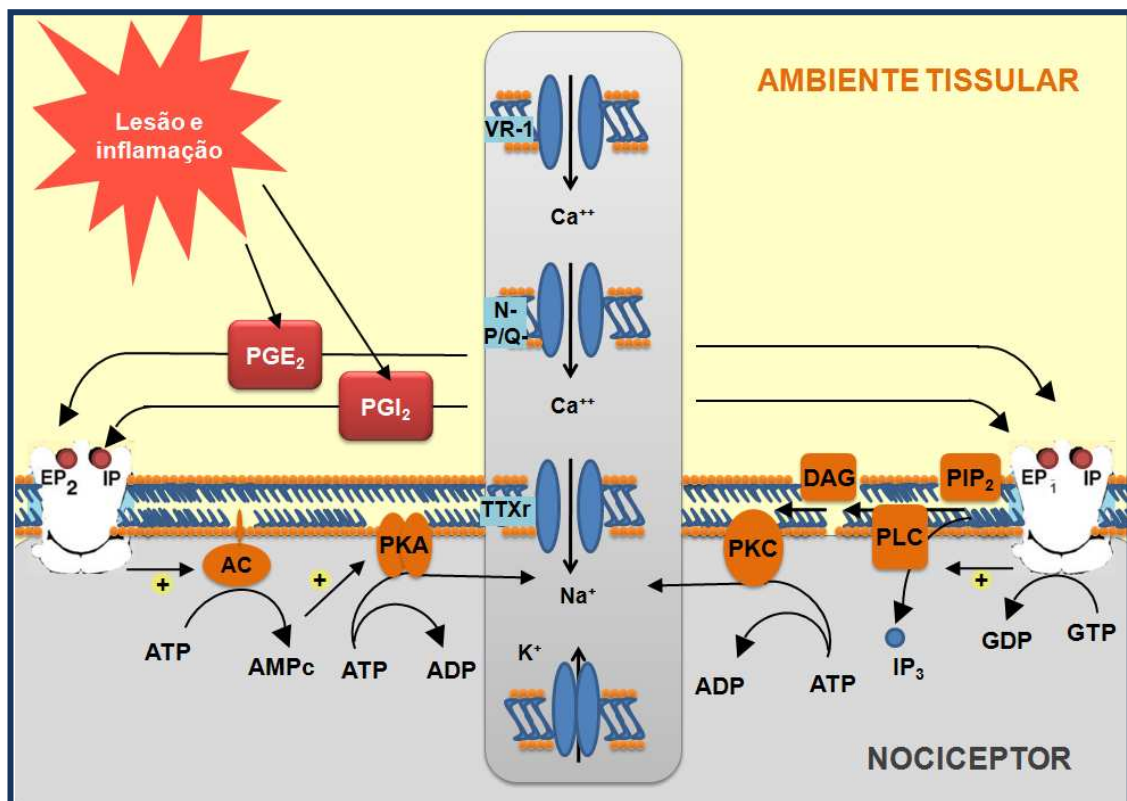


Figura 5: Ação das prostaglandinas nos nociceptores. Na figura, prostaglandinas E_2 e I_2 (PGE_2 e PGI_2), receptores de prostaglandinas E_1 , E_2 , e I (E_1P , E_2P , IP), proteína quinase A (PKA), adenilato ciclase (AC), proteína quinase C (PKC), fosfolipase C (PLC), trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), trifosfato de guanósina (GTP), difosfato de guanósina (GDP), receptor vanilóide (VR-1), canal de cálcio N e canal de cálcio P/Q (N, P/Q), canais de sódio voltagem dependente - tetróxido resistente (TTXr), diacilglicerol (DAG), fosfatidil inositol difosfato (PIP_2), inositol trifosfato (IP_3) Fonte: (COUTAUX *et al*, 2005).

A PGHS-2 após a inflamação periférica também é induzida nos neurônios do SNC, onde ajuda a desenvolver um componente central de hipersensibilidade à dor inflamatória, aumentando a excitabilidade neuronal. A maior concentração de PGE_2 no SNC depois da

inflamação periférica medeia um aumento generalizado à sensibilidade à dor mecânica devido à sensibilização das sinapses dos gânglios medulares resultante da maior liberação de mediadores pró-inflamatórios, da ativação dos canais de cálcio e do bloqueio dos receptores centrais de glicina. A presença de PGE₂ central também produz o estado febril e o uso de inibidores de PGHS-2 pode assim diminuir a hipersensibilidade à dor inflamatória (VANEGAS & SCHAIBLE, 2001; SAMAD, SAPIRSTEIN & WOOLF, 2002, VARDEH *et al*, 2009).

1.5 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES)

Historicamente os fármacos anti-inflamatórios tem suas origens na descoberta de plantas e seus extratos. A busca para o alívio da dor, febre e inflamação remonta a cerca de 400 AC, quando Hipócrates, um médico grego, utilizava o extrato da casca e das folhas do salgueiro. No início do século dezoito a salicilina (2) (Figura 6, página 30), foi isolada como princípio ativo da casca do salgueiro e a produção em massa do ácido salicílico sintético ocorreu por volta de 1860 por uma empresa alemã chamada Kolbe (RAO & KNAUS, 2008). Desde 1893, quando o químico alemão Felix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico (AAS, 3), patenteado como Aspirina, os agentes anti-inflamatórios não esteroideais (AINES) passaram a estar dentre os fármacos mais prescritos e usados em todo o mundo. (CARVALHO *et al*, 2004; SHUG *et al*, 2003). O glicosídeo salicilina (2) foi então o protótipo natural para descoberta do AAS (3), um fármaco centenário que apesar de sua estrutura simples de apenas nove átomos de carbono é empregado até hoje e apresenta importantes propriedades farmacoterapêuticas (BARREIRO & FRAGA, 2008).

Embora os primeiros anti-inflamatórios, como os salicilatos, sejam bastante eficazes como analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios, o uso destes compostos por períodos prolongados é limitado, na grande maioria dos pacientes, por desenvolverem efeitos gastrintestinais desagradáveis, como dispepsia, dor abdominal, sangramento, além de úlcera e perfuração gástrica ou duodenal (LAINE, TAKEUCHI & TAMAWSKI, 2008, CARVALHO *et al*, 2004; RANG & DALE, 1995) (Figura 6, página 30). Os efeitos colaterais dos derivados do ácido salicílico e outros AINES sob o trato gastrointestinal é, em parte devido à sua natureza ácida,

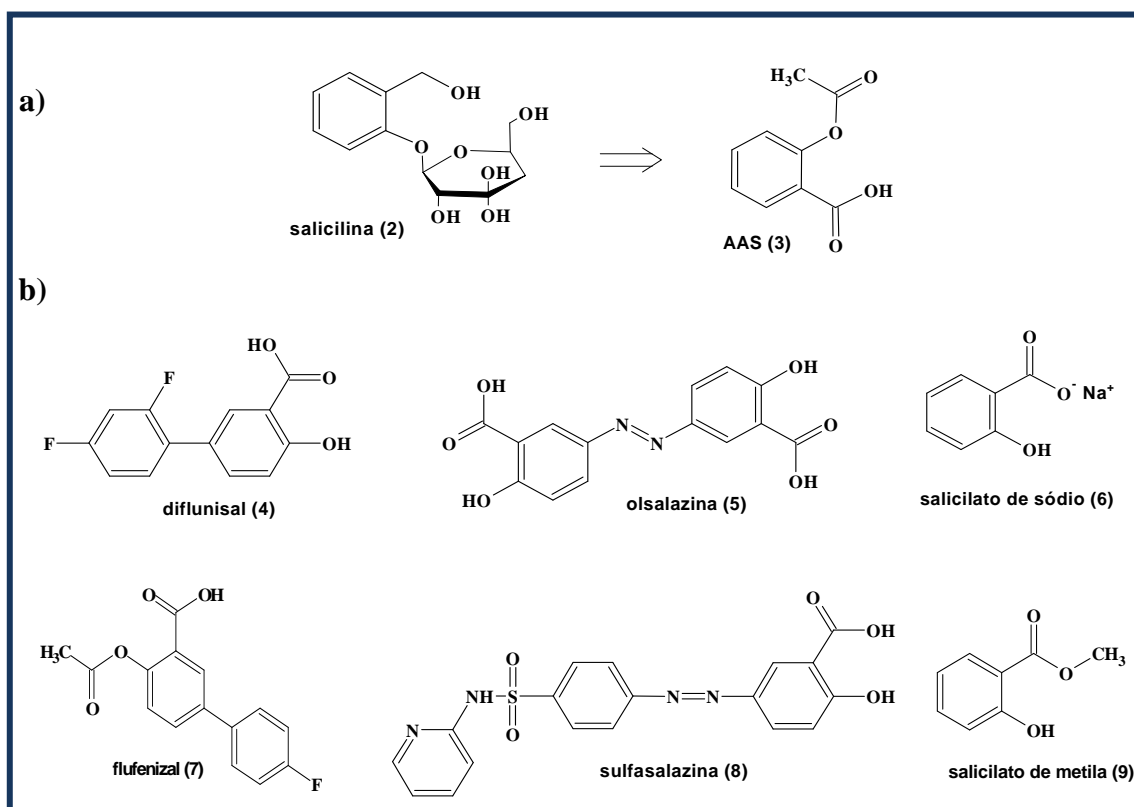


Figura 6: (a) Descoberta do ácido acetilsalicílico(AAS) a partir do glicosídeo salicilina (b) e exemplos de AINES derivados do ácido salicílico (salicilatos).

como é o caso da Aspirina (3), indometacina (13), ibuprofeno (18), diclofenaco (15), dentre outros (SOSTRES *et al*, 2010, MUSUMBA, PRITCHARD & PIRMOHAMED, 2009). Mas ainda que se esperasse que AINES com caráter estrutural básico, como os derivados quinolínicos guafenina (10) e floctafenina (11), (Figura 7) pudessem ser destituídos dos efeitos colaterais, a sua ação nociva sobre o estômago e o rim é preponderante por inibirem a biossíntese de prostaglandinas tanto quanto a indometacina (13), um dos representantes dos AINES tradicionais (ABADI *et al*, 2005, MOHAMED *et al*, 2000).

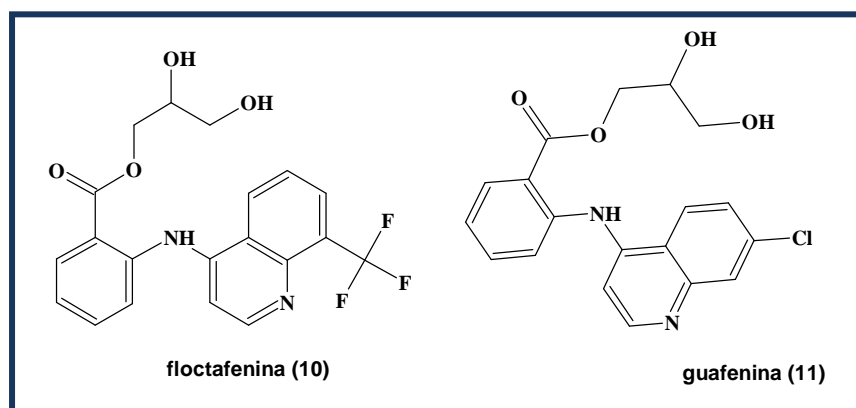


Figura 7: Estrutura da guafenina (10) e floctafenina (11).

É possível citar dois períodos na descoberta dos AINEs, aquele que vai até a década de 1970, que foi a era “pré-prostaglandina” e, posteriormente, até a última parte do século vinte, no qual os efeitos envolvidos na produção de prostaglandinas passaram a fazer parte do processo de desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (RAINSFORD, 2007). Foi então, a partir de 1970, que se tornou conhecido que a ação terapêutica dos AINEs é devida à inibição da enzima PGHS, também chamada de COX, e que catalisa a conversão do ácido araquidônico (Figura 2, página 20) a vários eicosanóides, incluindo prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXA₂) (VANE, 1971, RAO & KNAUS, 2008).

A Figura 8 na página 32 ilustra alguns AINEs tradicionais e além do AAS (3) (figura 6, página 18) que é um inibidor irreversível da PGHS, o mefenamato (16), diclofenaco (15) e ibuprofeno (18) são exemplos de inibidores competitivos reversíveis de ambas as isoformas, concorrendo com a ligação do ácido araquidônico (Figura 2, página 20) no sítio ativo da PGHS. O flurbiprofeno (18) e a indometacina (12) representam a classe dos AINEs tradicionais com inibição reversível lenta e tempo-dependente da PGHS-1 e PGHS-2, resultado da formação de uma ponte salina entre o carboxilato do fármaco e a arginina no sítio ativo, seguida por alterações de conformação do complexo ligante-enzima (HINZ & BRUNE, 2002).

A descoberta da isoforma PGHS-2 como uma enzima induzida pelo estímulo anti-inflamatório fez dela um alvo terapêutico atraente para o desenho de nova geração de AINEs, inibidores seletivos desta enzima, chamados de coxibes, que atuam sem os efeitos gastroirritantes, mecanismo de ação dependente, típico dos AINEs clássicos ou tradicionais (BEZERRA NETTO, 2004). Os coxibes representam a primeira classe de AINEs desenvolvidos baseando-se no raciocínio mecanístico biologicamente plausível para melhorar a segurança do uso de anti-inflamatórios, poupando as funções fisiológicas da PGHS-1 principalmente na mucosa gastrointestinal e plaquetas (PATRONO & ROCCA, 2009).

A primeira geração propriamente dita dos inibidores específicos da PGHS-2 é representada pelo derivado ácido indolacético, o etodolaco (20), bem como pelo meloxicam (21), que pertence à classe do ácido enólico, além das sulfonilidas, como o nimesulido (22) (RABASSEDA, 1996) e o flosulido (23) (KLEIN, 1994) (Figura 9, página 33). O composto NS-398 (24) planejado a partir de modificações do nimesulido também apresentou propriedades anti-inflamatórias com melhor seletividade para a PGHS-2 (HUFF *et al*, 1995; WARNER & MITCHELL, 2004). A descoberta da especificidade destes produtos foi constatada após a comercialização, sendo decorrente de observações clínicas e experimentais

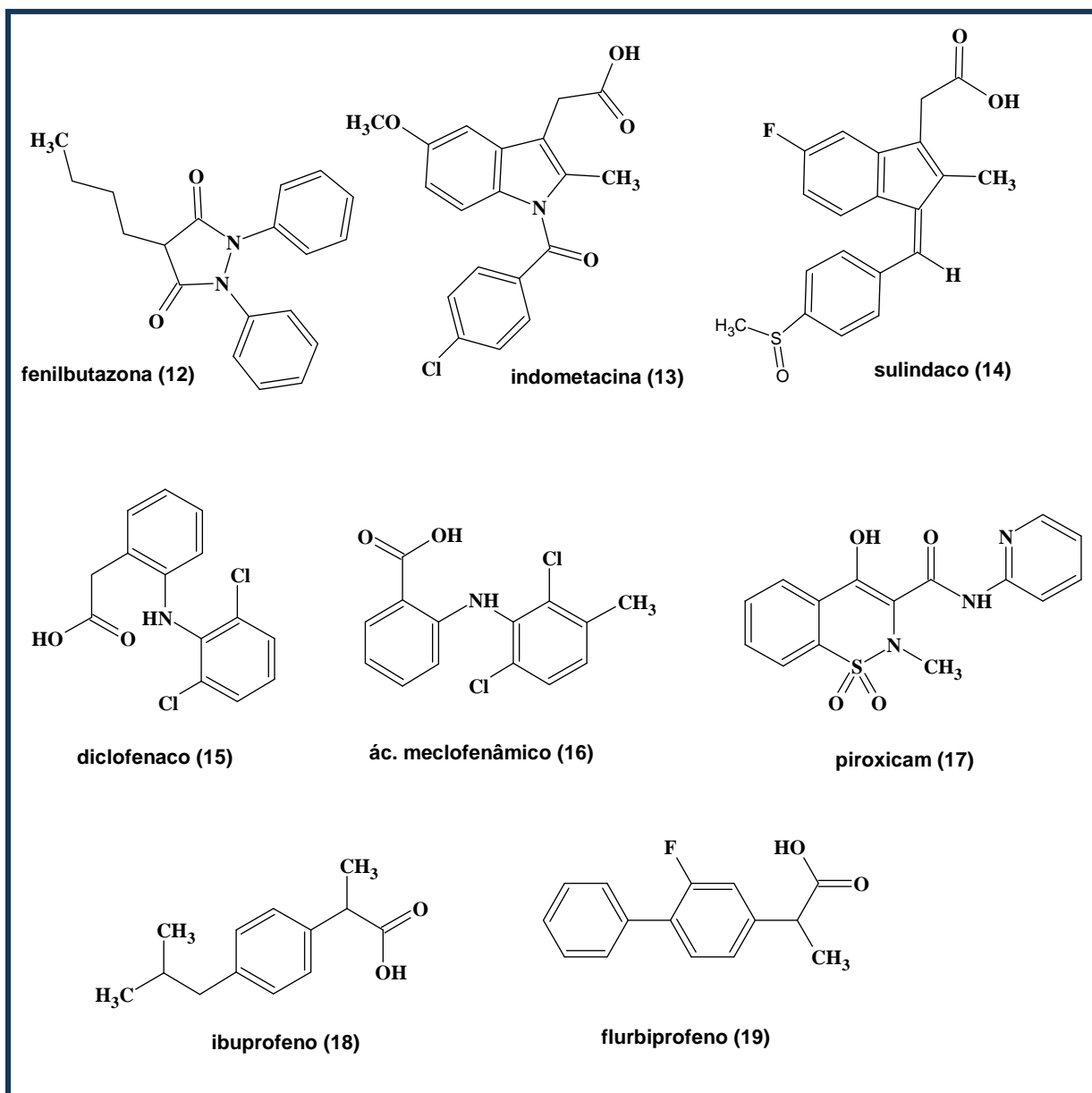


Figura 8: Exemplos de AINES tradicionais, fenilbutazona (12) um derivado pirazolônico, indometacina (13) e sulindaco (14), derivados dos ácidos indolacético e indenoacético, diclofenaco (15) derivado do ácido fenilacético, ácido meclofenâmico (16) um fenamato, o piroxicam (17) da classe do ácido enólico, ibuprofeno (18) e flurbiprofeno (19) que são derivados do ácido arilpropiónico.

da reduzida incidência de efeitos colaterais no trato gastrointestinal, que foi posteriormente averiguada por estudos *in vitro*. O nimesulido (22), além de exibir seletividade de ação sobre a PGHS-2, apresenta adicionalmente outros efeitos que intensificam sua atividade anti-inflamatória, como a inibição da ativação de neutrófilos e propriedades antioxidantes. A modificação molecular, notadamente do nimesulido, visando o aumento de sua seletividade sobre a PGHS-2, originou estruturas sem um grupamento carboxílico e com a presença de grupos sulfonamida ou sulfona, característicos dos inibidores específicos de segunda geração, os coxibes (KULKARNI, JAIN & SINGH, 2000).

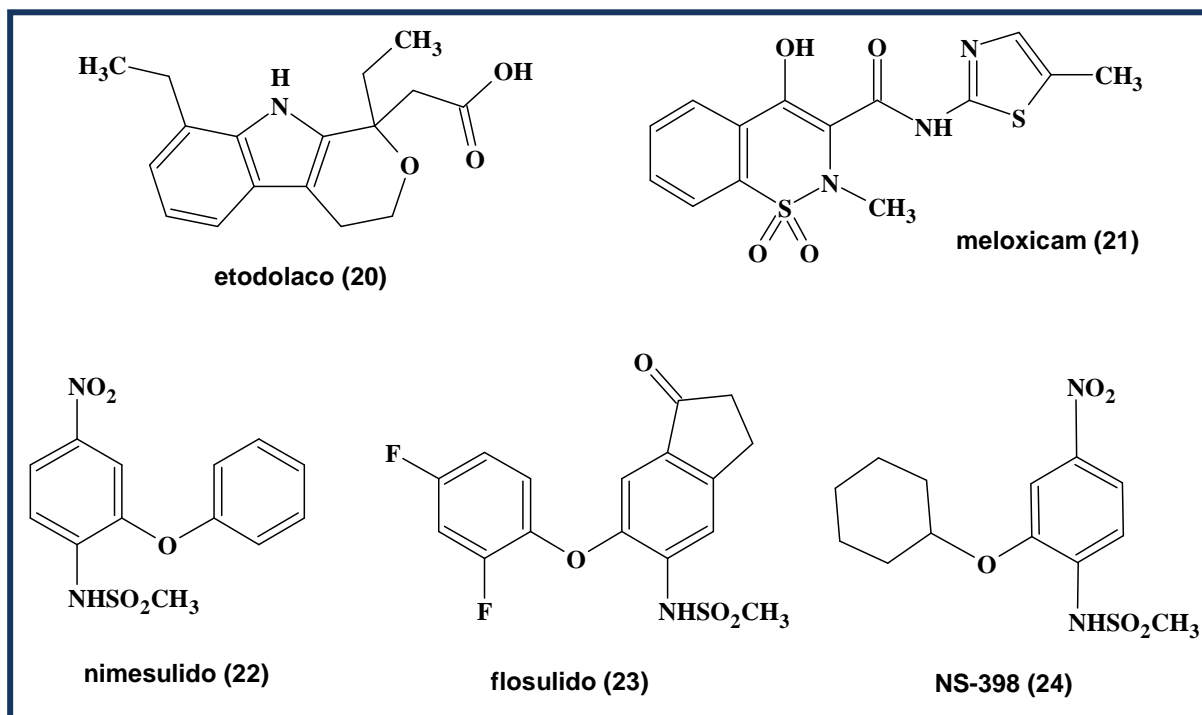


Figura 9: Estrutura do etodolaco (20), meloxicam (21), além dos *sulidos* (22, 23, 24).

Uma variada série de inibidores seletivos da PGHS-2 descritos na literatura são diaril-heterocíclicos (FRIESEN,1998). O grupamento farmacofórico diaril-heterocíclico tem sua origem histórica a partir do derivado da 5-pirazolona, a fenilbutazona (25), uma β -dicetona potencialmente enólica que garante sua propriedade ácida, e que estimulou os químicos medicinais a explorar compostos com o farmacóforo 1,2-bis-arila (Figura 10, página 34). Neste contexto, pesquisadores da DuPont iniciaram um extenso programa para avaliar novos derivados diaril-heterocíclicos como agentes anti-inflamatórios levando à descoberta de um potente e inibidor seletivo de PGHS-2, o DuP-697 (26) possuindo um anel central de cinco membros (RAO & KNAUS, 2008, TALLEY, 1999) (Figura 10, página 34). Uma característica comum dessas moléculas tricíclicas é a presença de uma substituição 1,2 diaril no anel central de cinco membros. Os estudos da relação estrutura-atividade indicam que a presença de um substituinte 4-metilsulfonila ou sulfonamida no derivado cis-estilbeno em um dos anéis fenila é necessário para a especificidade à PGHS-2 e a atividade *in vivo* geralmente aumenta com o átomo de flúor na posição *para* em um dos anéis. O estado de oxidação do átomo de enxofre presente no grupo metilsulfona é necessário para a inibição seletiva da COX-2 porque sulfóxidos ou sulfetos são inativos ou não apresentam seletividade (PRASIT & RIENDEAU, 1997(ver ref 15), MARNETT & KALGUTKAR, 1999).

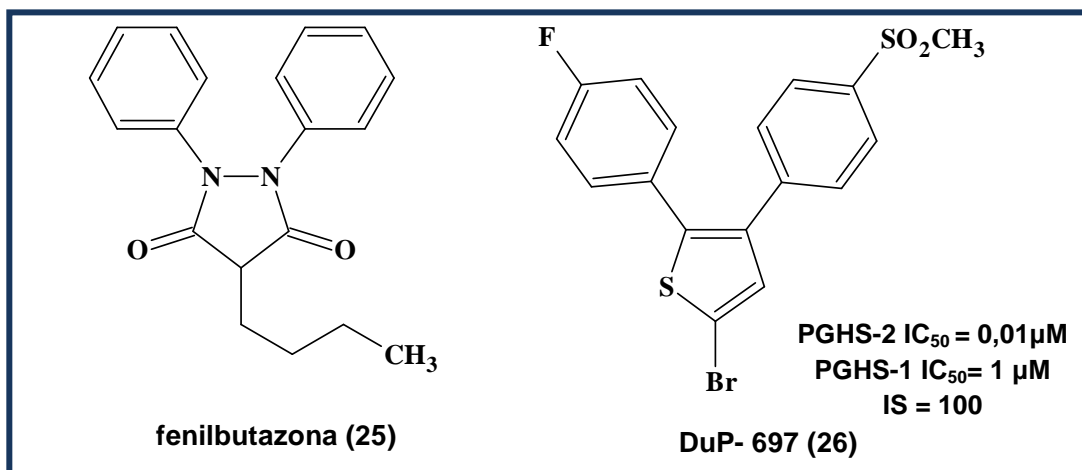


Figura 10: Estrutura química da fenilbutazona (25) e Dup-697 (26). O valor de IC₅₀ refere-se à concentração do fármaco necessária para inibir 50% da população enzimática, teste *in vitro*. Da relação matemática entre o valor de IC₅₀ para PGHS-1 e do IC₅₀ para PGHS-2 se obtém o índice de seletividade (IS) (RAO & KNAUS, 2008).

No desenho dos mais diversos inibidores seletivos para a PGHS-2 o sistema de anéis fundidos ao cis-estilbeno pode incluir além de heterocíclicos com cinco ou seis membros, heterocíclicos fundidos, tanto quanto carbocíclicos como ciclobuteno ou ciclopentenona. A estrutura do Dup-697 (26) serviu como modelo para a síntese da família de diaril-heterocíclicos inibidores seletivos da PGHS-2, dentre eles o primeiro fármaco aprovado para a clínica, foi o celecoxib (27) (Celebrex[®]), um derivado benzenosulfonamida possuindo o pirazol como anel central na sua estrutura tricíclica, além do rofecoxib (28) (Vioxx[®]) um derivado 3,4-diarilfuranona (MARNETT & KALGUTKAR, 1999, RAO & KNAUS, 2008) Tanto o celecoxibe (27) quanto o rofecoxibe (28) foram licenciados pela FDA para a dor crônica associada à osteoartrite, artrite reumatóide e a dor aguda na dismenorréia primária. (RAMALHO *et al*, 2009) (Figura 11, página 35).

Dentre os estudos da classe de compostos diarilisoaxazol o valdecoxibe (29) (Bextra[®]) foi lançado no mercado representando a segunda geração de inibidor seletivo da PGHS-2, possuindo um rápido início de ação e propriedades analgésicas significantes. Em estudos da ação analgésica para tratamento pós-operatório em pacientes que passaram por cirurgia oral, valdecoxibe (29) demonstrou ser mais eficaz que rofecoxibe (FRICKE *et al*, 2002). O parecoxibe (Dynastat[®]) (30) um pró-fármaco de valdecoxibe (29), com a propriedade de ser solúvel em água, foi lançado no mercado na forma injetável possuindo ações anti-inflamatórias e analgésicas (JOUBERT, LORTHIOIS & MOREAU, 2003) (Figura 11, página 35).

A partir de estudos da atividade de derivados 2,3-diarilpiridina e 3,4-diarilpiridina, as Merck *et al* puderam lograr com sucesso um inibidor mais seletivo à PGHS-2 que os demais coxibes (rofecoxibe, valdecoxibe ou celecoxibe), o etoricoxibe (Arcoxia®) (31) que embora não tenha sido aprovado como fármaco nos EUA e Canadá devido à sua toxicidade cardíaca, foi comercializado em outros 63 países. Possui uma eficácia similar ao diclofenaco em pacientes com osteoartrite, além de uma eficácia comparável à indometacina em pacientes com gota aguda, e ao naproxeno em mulheres com dismenorréia primária (CAPONE *et al*, 2007, CANNON *et al*, 2006).

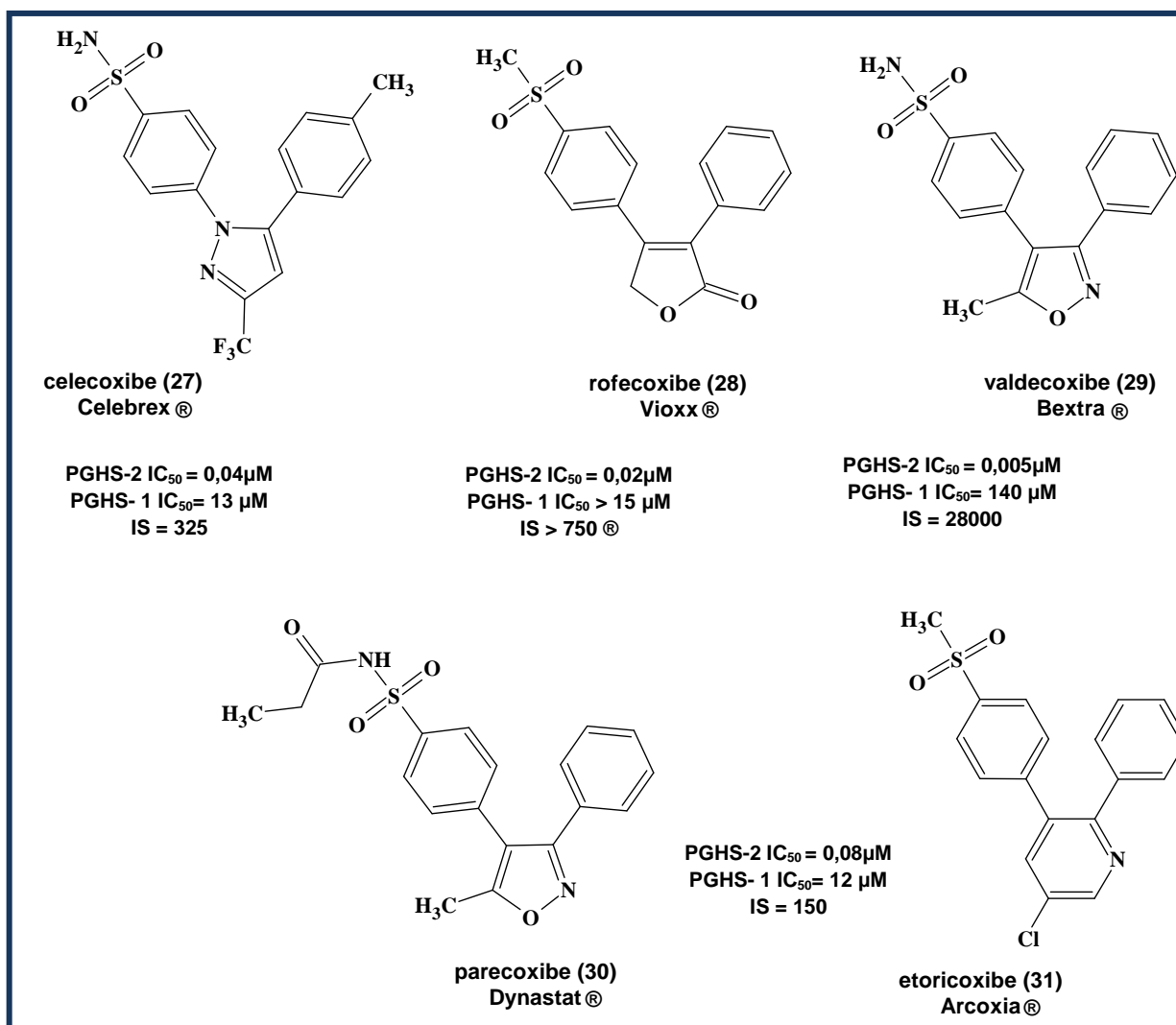


Figura 11: Estrutura química de fármacos diaril-heterocíclicos seletivos à PGHS-2. Fonte: (RAO & KNAUS, 2008).

Em curto período de tempo após ser comercializado tanto celecoxibe (27) quanto rofecoxibe (28) tornaram-se fármacos *blockbuster*, sendo que suas vendas excederam bilhões de dólares em 15 meses após o lançamento (PENNING *et al*, 1997, PRASIT *et al*, 1999)

(Figura 11, página 35). Apesar do sucesso nas vendas, estudos posteriores puderam confirmar as suspeitas dos efeitos cardiovasculares dos inibidores seletivos da PGHS-2, já que podem desfavorecer o equilíbrio entre tromboxana pró-trombótica (TXA₂) e prostaciclina antitrombótica (PGI₂), aumentando potencialmente a possibilidade de um evento cardiovascular (SOLOMON *et al*, 2004). Em setembro de 2004, a Merck Sharp e Dohme retirou do mercado o anti-inflamatório Vioxx® (rofecoxib) (28) e da mesma forma, a Pfizer® sob orientação da FDA (Food and Drug Administration), suspendeu, no dia 11 de abril de 2005, a venda do medicamento Bextra® (valdecoxibe) (29) devido ao aumento do risco cardiovascular para os pacientes com história de doença cardíaca e também por provocar reações cutâneas raras, porém graves. A FDA recomendou a colocação de tarja preta no medicamento Celebra® (celecoxib) (27), também da Pfizer, por apresentar risco cardiovascular (Figura 11, página 35) (DOGNÉ, SUPURAN & PRATICO, 2005).

Os eventos cardiovasculares associados aos inibidores seletivos da PGHS-2, com consequente retirada do mercado de alguns destes fármacos, deixa em destaque a necessidade que ainda se tem no desenvolvimento de anti-inflamatórios e analgésicos que apresentem menor injúria gastrointestinal, e que também sejam desprovidos dos efeitos adversos cardiovasculares. Existem trabalhos recentes que sugerem a PGE Sintase-1 Microsomal (mPGES-1) como alvo atraente e que os inibidores desta enzima podem apresentar atividade anti-inflamatória eficaz sem as reações colaterais dos PGHS-2 seletivos (CHENG *et al*, 2006). Outra abordagem já explorada desde a década de 90 é o planejamento de AINES doadores de óxido nítrico (NO), já que é uma molécula que desempenha papel importante em uma ampla variedade de condições fisiológicas e patológicas. A liberação de NO *in vivo* a partir de um pró-fármaco AINE-NO fornece um método oportuno para combater os riscos cardiovasculares associados com inibidores seletivos da PGHS-2. O NO apresenta efeitos cardiovasculares benéficos, tais como vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, além da defesa e cicatrização da mucosa gastrointestinal (BANDARAGE *et al*, 2000, NEMANI *et al*, 2009). O composto 31 (Figura 12, página 37) é um exemplo de uma nova classe de análogos de inibidores pirazolínicos seletivos à PGHS-2, contendo nitrato como um híbrido NO-doador, desenvolvido pela NitroMed. Este composto exhibe considerável inibição e seletividade da PGHS-2 (10 e 100% de inibição das isoformas da PGHS-1 e PGHS-2, respectivamente) e boa tolerância gastrointestinal (RANATUNGE *et al*, 2004).

As lipoxigenases catalisam a incorporação da molécula de oxigênio ao ácido araquidônico (AA) para formar hidroperóxidos como produtos, como por exemplo a 5-LOX

que metaboliza o AA para formar leucotrienos (LTs) pró-inflamatórios que podem desempenhar um papel importante nas doenças cardiovasculares uma vez que são potentes vasoconstritores. Ainda se forma por essa mesma via as cisteinil-LTs que podem estar envolvidas no dano à mucosa gástrica (CHARLIER & MIRCHAUX, 2003; LAUFER *et al*, 1994). E é por isso que cresce o interesse em se planejar moléculas que possam ser inibidoras tanto da COX quanto da LOX fornecendo candidatos a protótipos de anti-inflamatórios com reduzido efeito cardiovascular e gastrointestinal. Um exemplo de inibidor dual da COX e 5-LOX é o licofelone (32) (Figura 12) e estudos preliminares em humanos têm mostrado que o composto poderia se tornar um AINE alternativo no tratamento da osteoartrite (FIORUCCI *et al*, 2001).

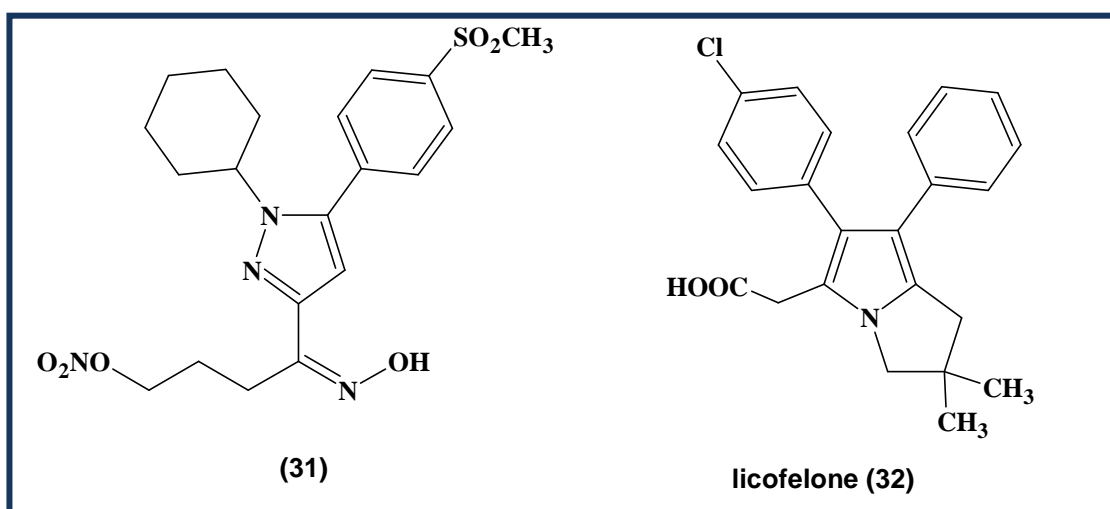


Figura 12: Exemplo de NO-AINE (30) e inibidor dual de COX e 5-LOX (31).

Outra abordagem para o tratamento de doenças inflamatórias é o desenvolvimento de inibidores de metaloproteinases de matriz (MMP) e o uso de proteínas injetáveis que visam o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A terapia anti-TNF- α tem sido utilizada com sucesso no tratamento de condições inflamatórias, tais como a artrite reumatóide. Exemplos de fármacos que podem ser citados é o etanercept (Enbrel[®]), infliximab (Remicade[®]) e adalimumab (Humira[®]) que têm um papel importante na terapia anti-inflamatória. O uso de anticorpos monoclonais anti-TNF α exercem sua ação benéfica por capturar a citocina pró-inflamatória TNF- α primária, conhecida por ser capaz de ativar outras citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina-1 (IL-1) e quimiocinas (PALADINO *et al*, 2003; TANSEY & SZYMKOWSKI, 2009).

1.6 A BASE MOLECULAR DA INIBIÇÃO DA PGHS

Embora já se conhecesse que a atividade anti-inflamatória e analgésica dos AINES era devido a inibição da PGHS, a partir de 1994 é que foi possível estabelecer uma visão estrutural mais clara dos modos de ligação (PICOT, LOLL & GAVARITO, 1994, RAO & KNAUS, 2008). O estudo de Garavito e colaboradores (1994), que descreve a estrutura cristalina da PGHS-1 complexada com o AINE flurbiprofeno (33), mostrou que o sítio ativo da enzima consiste de um longo e estreito canal hidrofóbico que se estende do domínio de ligação à membrana (MBD) para o centro do monômero da PGHS (PICOT, LOLL & GARAVITO, 1994, DANNHARDT & KIEFER, 2001). No ápice do canal do sítio ativo há o resíduo de aminoácido Tyr385 que se posiciona próximo ao grupo heme, e logo abaixo está o resíduo Ser530, que na presença do AAS (3) atuando como inibidor, se encontra acetilado (ALAGHA *et al*, 2009). A abertura do canal da PGHS-1 é composta de resíduos polares como Arg120 e Glu524. O grupo carboxilato do flurbiprofeno está orientado em direção à abertura do sítio ativo da PGHS em uma posição favorável para interagir com os resíduos polares (Arg120 e Glu524) (DANNHARDT & KIEFER, 2001, RAO & KNAUS, 2008).

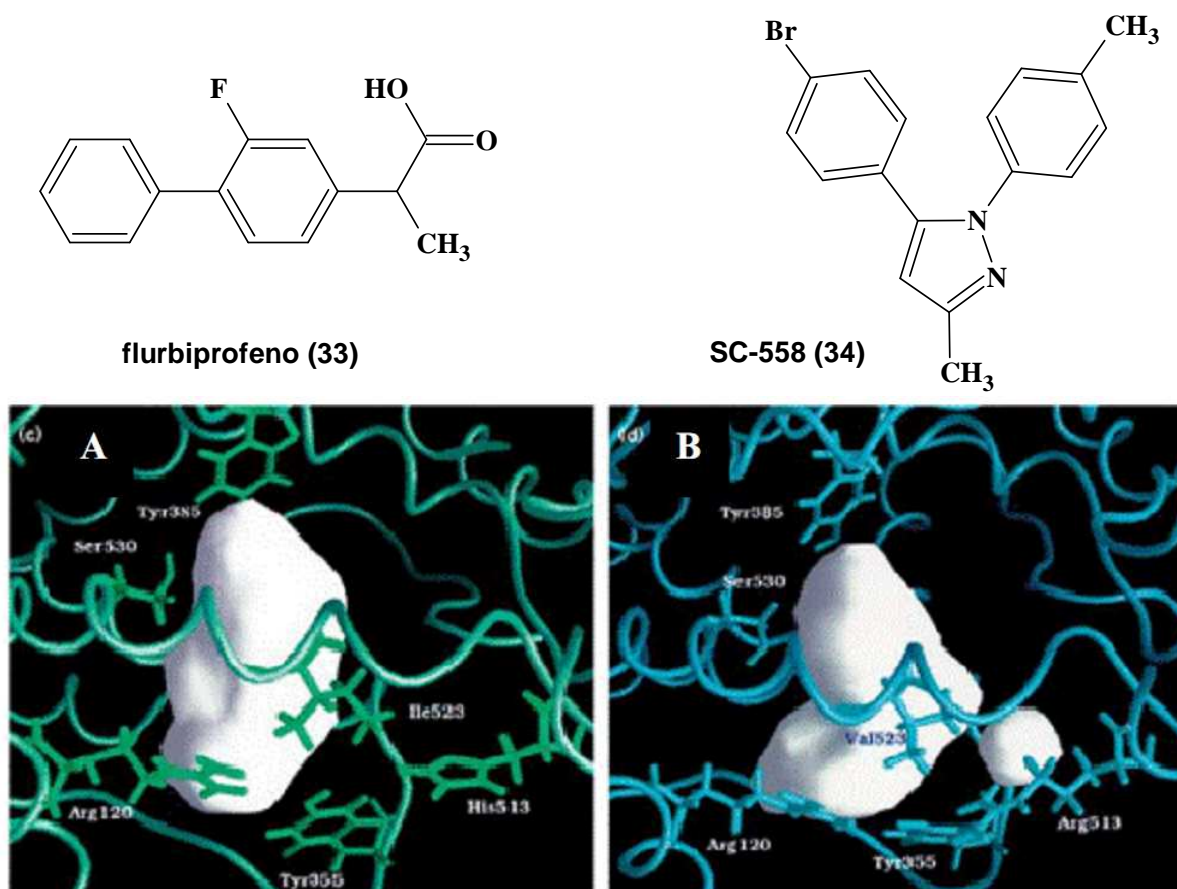


Figura 13: A) Sítio ativo da PGHS-1. B) Sítio ativo da PGHS-2

As interações de AINES no sítio ativo da PGHS têm sido estudadas exaustivamente, e a maioria dos fármacos de primeira geração são inibidores de ambas isoformas, sendo que, aqueles que são seletivos para a PGHS-2, apresentam forte ligação no sítio ativo desta última isoforma. Os AINES tradicionais exibem um dos três diferentes modos de ligação: a) ligação reversível (por exemplo: ibuprofeno), b) ligação rápida, reversível de baixa afinidade seguida por tempo-dependente, alta afinidade, ligação reversível lenta, c) ou uma rápida ligação reversível seguido por uma modificação covalente da enzima (ex: aspirina) (DANNHARDT & KIEFER, 2001). Os inibidores seletivos para PGHS-2 apresentam uma inibição tempo-dependente para esta isoforma, mas não para a PGHS-1 (RAO & KNAUS, 2008). A presença dos resíduos de aminoácidos Arg120, Glu524, Tyr355 e His90 formam uma rede de ligações de hidrogênio que atuam como um portão de entrada para o sítio ativo da PGHS (BHATTACHARYA, D, K. *et al.*, 1996). Os AINES geralmente se ligam no ápice da subunidade do canal próximo à Tyr385 e Arg120. O grupamento carboxílico de AINES, como fluorbiprofeno (33) interage com Arg120 em ambas isoformas da PGHS, por meio de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas (MANCINI, J. A. *et al.*, 1995). As demais interações do ligante com a proteína são de caráter hidrofóbico.

As diferenças estruturais nos sítios de ligação das isoformas da PGHS já têm sido vastamente exploradas inclusive para a concepção de inibidores seletivos da PGHS-2. No sítio ativo da PGHS-2, devido à presença de um resíduo de aminoácido menor, uma valina na posição 523 (isoleucina na PGHS-1) e outra (isoleucina na COX-1) na posição 434, criam um bolso extra no sítio catalítico que pode ser acessível. Esta diferença aumenta o volume global do sítio ativo da PGHS-2 (394 Å) quase 20% a mais quando comparado à PGHS-1 (316 Å, Figura 13, página 34) (WARNER & MITCHELL, 2004). Outra diferença está no resíduo de aminoácido 513, no qual na PGHS-1 a histidina (His) se faz presente e na PGHS-2 está a arginina (Arg). E é por estas diferenças estruturais que o substrato encontra maior flexibilidade no sítio ativo da PGHS-2. O estudo da estrutura cristalina do inibidor SC-558 (6) (KURUMBAIL, R. *et al.* 1996), um diarileterocíclico, complexado com a PGHS-2 estabeleceu a base estrutural para a inibição seletiva da isoforma da enzima exibido por esta classe de compostos (Figura 13, página 38).

O grupo farmacofórico sulfonamida substituído na posição *para* do 1,5-diarilpirazol (SC-558, 34) desempenha um papel crucial na seletividade para PGHS-2 através do encaixe no bolso lateral onde faz interações favoráveis com resíduos de aminoácidos no fundo deste bolso, tais como His90, Arg513, Phe518 e Gln192 (Figura 13, página 32). O carbono cinco do

anel *para*-bromofenil de SC-558 (34) é orientado em direção ao ápice do sítio ativo da PGHS-2, onde sofre interações hidrofóbicas com Phe381, Tyr385, Phe513, Trp387 e Leu384. O grupo CF₃ na posição C-3 do anel pirazólico liga-se a uma bolsa hidrofóbica consistindo de Met113, Val116, Val349, Tyr355, Leu359 e Leu531. A análise da estrutura do cristal mostrou a importância de farmacóforos como o SO₂NH₂, ou SO₂Me, como substituintes na posição *para* de um dos anéis fenila no desenho de inibidores diarileterocíclicos ou diarilcarbocíclicos que sejam seletivos para PGHS-2 (KURUMBAIL, *et al.* 1996).

1.7 O USO DO SAFROL COMO MATÉRIA-PRIMA PARA DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O uso de produtos naturais como fonte de novas moléculas candidatas a protótipos com potencial atividade biológica possui um importante escopo na área da Química Medicinal. Entretanto o isolamento de moléculas sem atividade farmacológica, mas que após transformação química ou enzimática passam a ser constituintes ativos farmacologicamente, também é uma ferramenta aliada para o planejamento e síntese de novos protótipos candidatos a fármacos (SIMÕES *et al.*, 2008).

Como exemplo, pode-se citar o uso do safrol (38) na síntese parcial de prostaglandinas modificadas Figura 14 (página 41). É importante mencionar que foi a partir dos estudos sintéticos para a síntese de prostaglandinas modificadas que ocorreu a introdução na terapêutica do fármaco misoprostol (Cytotec ® - Pfizer) (35), derivado prostanóide que atua como agonista de receptores gastro-intestinais de PGE₂, sendo utilizado no tratamento e prevenção de úlceras gástricas e duodenais. Uma vez que o misoprostol (35) foi classificado pela FDA como fármaco teratogênico, medicamentos que o contêm estão restritos aos estabelecimentos hospitalares devidamente cadastrados junto ao órgão de vigilância sanitária competente, principalmente quando sua finalidade terapêutica está relacionada à ginecologia e obstetrícia (WEEKS & FAÚNDES, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; COÊLHO, 1998; BARREIRO &FRAGA,1999).

Neste contexto, o safrol (38) foi empregado como matéria-prima para a síntese de novos análogos modificados de prostaglandinas (e.g. 36 e 37), explorando a unidade metilendioxila do produto natural de partida como subestrutura análoga ao anel ciclopentânico dioxigenado das prostaglandinas (BARREIRO &FRAGA,1999).

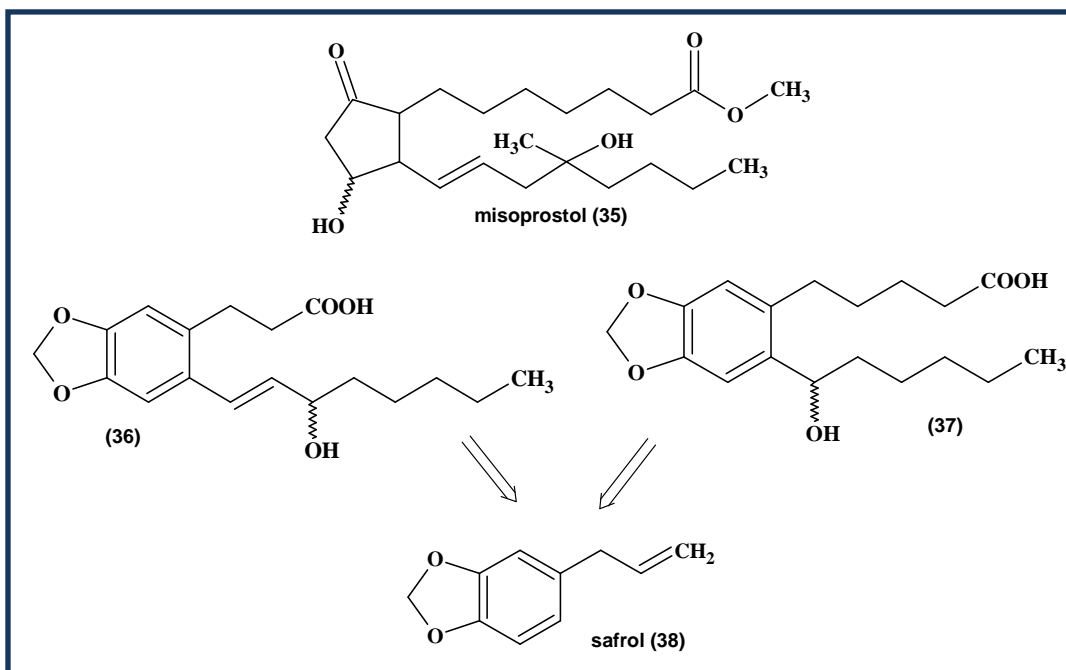


Figura 14: Estrutura do fármaco misoprostol (Cytotec ®- Pfizer, 35) e o uso do safrol (38) como matéria-prima para síntese de prostaglandinas modificadas.

O safrol (38) também se revelou como uma matéria-prima importante para a semi-síntese de substitutos da indometacina: sulindaco, clindanaco, etodolaco, pemedolaco, e outros anti-inflamórios não esteróides, que já foram considerados como fármacos tendo menores efeitos colaterais. Além de outros padrões estruturais que estão descritos na literatura, tendo o anel benzodioxila derivado do safrol, e que apresentam uma diversidade de efeitos biológicos comprovados, seja como anti-inflamatórios, analgésicos ou antiagregantes plaquetários dentre outros (SIMÕES *et al*, 2008). Este derivado fenilpropanóide é originalmente obtido no Brasil, em quantidades apreciáveis, do óleo de Sassafrás (*Ocotea sp*) de diversas espécies de canela encontrada no sul do Brasil (BARREIRO & FRAGA, 1999). Porém, devido a sua extração predatória, o IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente), proibiu, em 1992, sua extração, fazendo o Brasil cair do patamar de um dos maiores exportadores de safrol do mundo para um dos maiores importadores desse material (EMBRAPA, 2000). Todavia, pesquisas da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) identificaram no norte do país, espécies de pimentas (especialmente *Piper hispidinervum*, Pimenta Longa) que possuem na constituição de seu óleo essencial cerca de 80% de safrol, tornando viável sua exploração sustentável. Atualmente os maiores exportadores de safrol do mundo são a China e o Vietnã, podendo o Brasil recuperar sua antiga posição combatendo atitudes predatórias como àquelas relatadas anteriormente (EMBRAPA, 2000).

A química deste alilbenzeno natural por longa data já tem sido explorada, sendo tema de diversas dissertações e teses realizadas em diferentes programas de pós-graduação do país. Estes estudos resultaram no conhecimento da reatividade deste sistema, de tal maneira que todos os átomos de carbono desta substância natural podem ser eficiente e regioseletivamente funcionalizados (BARREIRO & FRAGA, 1999) (Figura 15). Dentre as várias possibilidades pode-se citar como atrativos presentes na estrutura deste produto natural:

- ⇒ O padrão de substituição do núcleo aromático (um catecol mascarado na forma de um acetal), passível de sofrer reações de abertura regioseletiva, gerando diferentes produtos (AMORIN *et al.*, 2001);
- ⇒ As diversas possibilidades de manipulação sintética que o grupamento alil oferece, como por exemplo, as reações de clivagem oxidativa da olefina terminal (AMORIN *et al.*, 2001), adições eletrofílicas (COSTA *et al.*, 1984), reações de cicloadição (WITIAK *et al.*, 1974), além de reações de ciclização envolvendo a participação da nuvem eletrônica do núcleo aromático (COSTA *et al.*, 1982).
- ⇒ A elevada reatividade e regioseletividade das reações de substituição eletrofílica sobre o núcleo aromático do safrol (BAYDAR *et al.*, 1988).

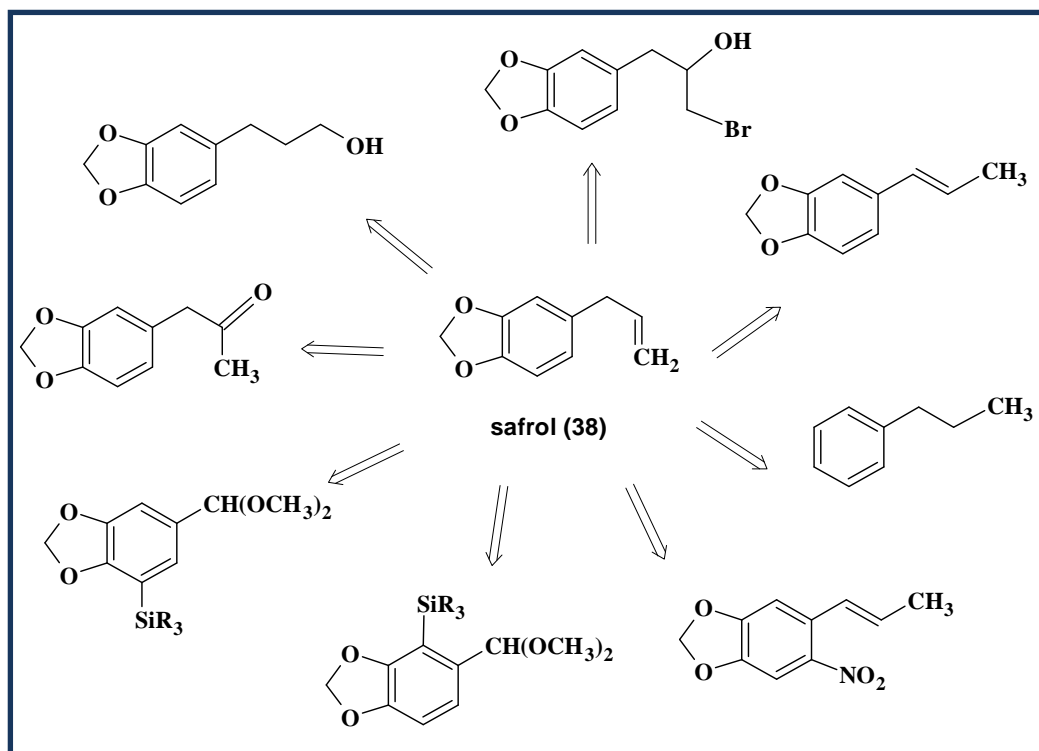


Figura 15: Esquema mostrando a possibilidade de funcionalização de vários carbonos do safrol.

Todos estes fatores tornam este produto natural um “building block” de extrema versatilidade, sendo aplicável nas áreas de síntese de produtos naturais e química medicinal (BARREIRO, 2001). A presença da unidade metilenodioxila introduz caráter estrutural particular à molécula de safrol como lipofilicidade, facilitando seu trânsito na biofase, e ao mesmo tempo caráter aceptor de ligações de hidrogênio, útil na interação com eventuais bioreceptores (BARREIRO & FRAGA, 1999)

2. PLANEJAMENTO

Desde a década de oitenta a literatura descreve que compostos com o modelo estrutural de BW-755c (39) e CBS-1108 (40) apresentam atividade de inibição tanto da PGHS como da 5-LOX possuindo propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (RANDALL, 1994). A análise das estruturas destas substâncias mostra um padrão de similaridade comum, representado pela função arilidrazona, que poderia estar associada às atividades descritas. De fato, no derivado (39) a função N-fenilidrazona encontra-se internalizada no anel pirazolínico, enquanto que no CBS-1108 (40) identifica-se sua presença numa subunidade espaçadora N-(2-tiofenila)-hidrazona. Além do mais, evidências sugerem que derivados fenilidrazônicos como o composto (41) possuem um caráter farmacofórico para a inibição da PGHS (LIMA *et al*, 2000) (Figura 16).

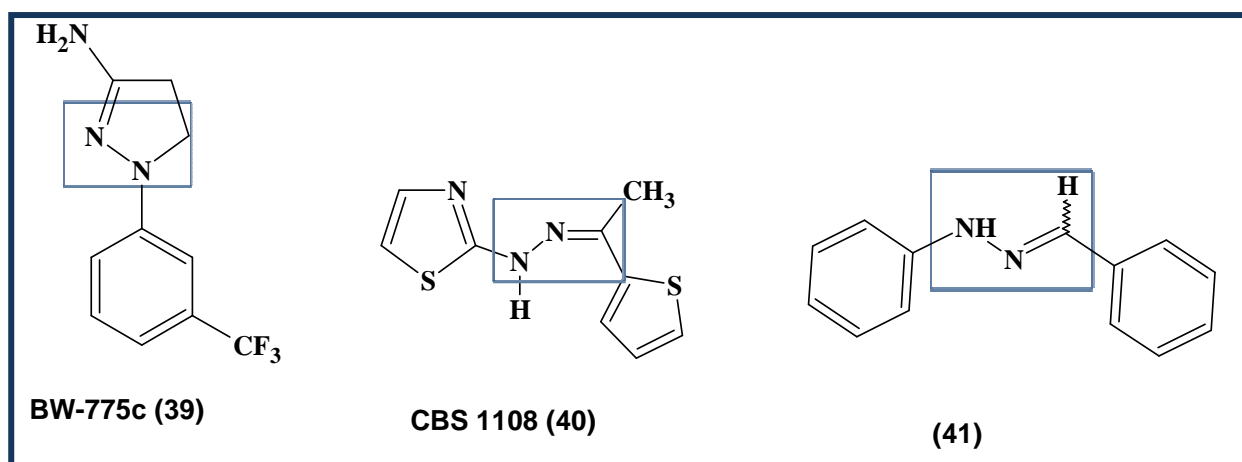


Figura 16: A subunidade arilidrazona como grupo farmacóforo com propriedades anti-inflamatória e analgésica.

No trabalho de Silveira *et al* (1993) e de Gaston *et al* (1996), o uso da hibridação molecular levou ao desenho de modelos estruturais que são derivados N-fenilpirazol arilidrazonas (42) e 4-(1-fenil)-pirazolo[3,4-b]piridil arilidrazonas (43), que apresentaram atividade analgésica, anti-inflamatória e perfil de antiagregante plaquetário, podendo atuar ao nível da cascata do ácido araquidônico (TODESCHINI *et al*, 1998). Na Figura 17 (página 45) a substituição bioisostérica do grupo nitro de (42) levou a obtenção dos derivados N-acilidrazônicos (44) com padrão estrutural similar às arilidrazonas (42) e (43) e que também apresentaram propriedades anti-inflamatórias (BARREIRO *et al*, 2002). Atualmente há diversos padrões moleculares contendo a subunidade N-acilidrazona descrita como um grupamento farmacofórico que além da ação anti-inflamatória, analgésica e antiagregante

plaquetária, também são cardioativos e tripanossomidas, dentre outras propriedades biológicas (MAIA *et al*,2009).

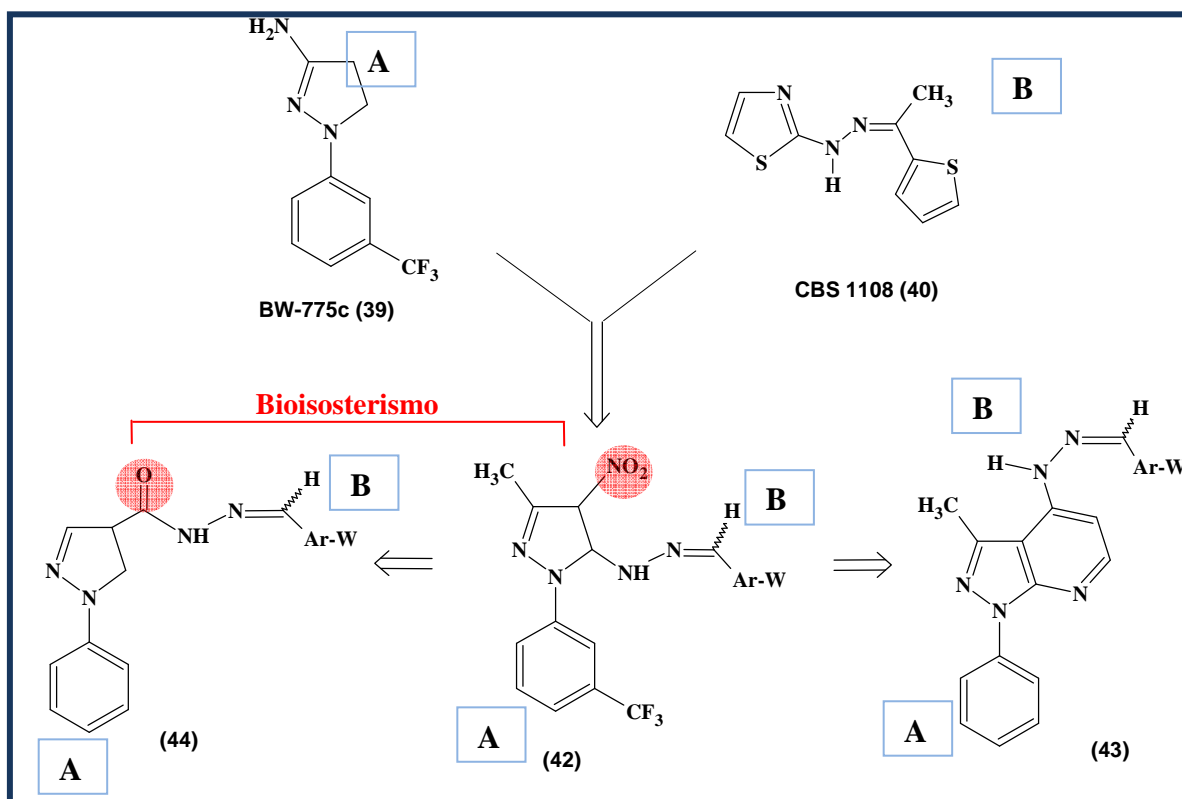


Figura 17: Hibridação molecular no desenho de derivados acil e arilidrazônicos com propriedades anti-inflamaórias, analgésicas e anti-trombóticas. Fonte: Adaptado de (TODESCHINI *et al*, 1998; BEZERRA, 2004). * A letra W representa grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica do anel, substituídos na posição *para*.

Apesar dos efeitos colaterais cardiovasculares, associado ao uso em longo prazo de inibidores seletivos da PGHS-2 que levou à remoção do mercado do fármaco rofecoxib (28, Figura 11, página 35) além do valdecoxib (29, Figura 11, página 35) cujas vendas foram proibidas principalmente por causar graves reações cutâneas, ainda há muita pesquisa a ser realizada com intuito de se alcançar novos fármacos anti-inflamatórios mais seguros, que sejam seletivos à PGHS-2 (DOGNE *et al*, 2005, ROMEIRO *et al* 2009). Além do mais, a importância da ação dos AINES em outras patologias, tem sido objeto de vários estudos. Como exemplo, há relatos recentes na literatura mostrando evidências cada vez maiores de que a expressão da PGHS-2 é um passo fundamental na patogénia do câncer de mama por intermédio de mecanismos dependentes ou não das prostaglandinas (ARUN & GOSS, 2004; HOWE *et al*, 2007). Estudos epidemiológicos têm sugerido que os AINES podem conferir um moderado grau de benefício contra o câncer de mama e a habilidade de prevenir o câncer de colo retal (HARRIS *et al*, 2006; LIZAKA *et al*,2002).

Diante do que foi exposto, a série de derivados indano-hidrazônicos (1a-1f) desenhados como candidatos a inibidores da PGHS foi planejada utilizando o padrão bis-aromático dos inibidores seletivos da PGHS-2 com a introdução da hidrazona (B) como espaçador (Figura 18). Além da presença do anel benzodioxola (A) cuja literatura relata diversos padrões moleculares que são protótipos anti-inflamatórios, como por exemplo, o safrolaco (45), que possui a função 1,3-benzodioxólica, oriunda do produto natural de partida (38), como sub-unidade isostérica à unidade 5-fluorfenila do sistema indênico do sulindaco (46) (SILVA & BARREIRO, 1993, BARREIRO & FRAGA, 1999). As variações na subunidade (C) foram propostas a fim de se estudar as mudanças eletrônicas e estéricas causadas pelos substituintes.

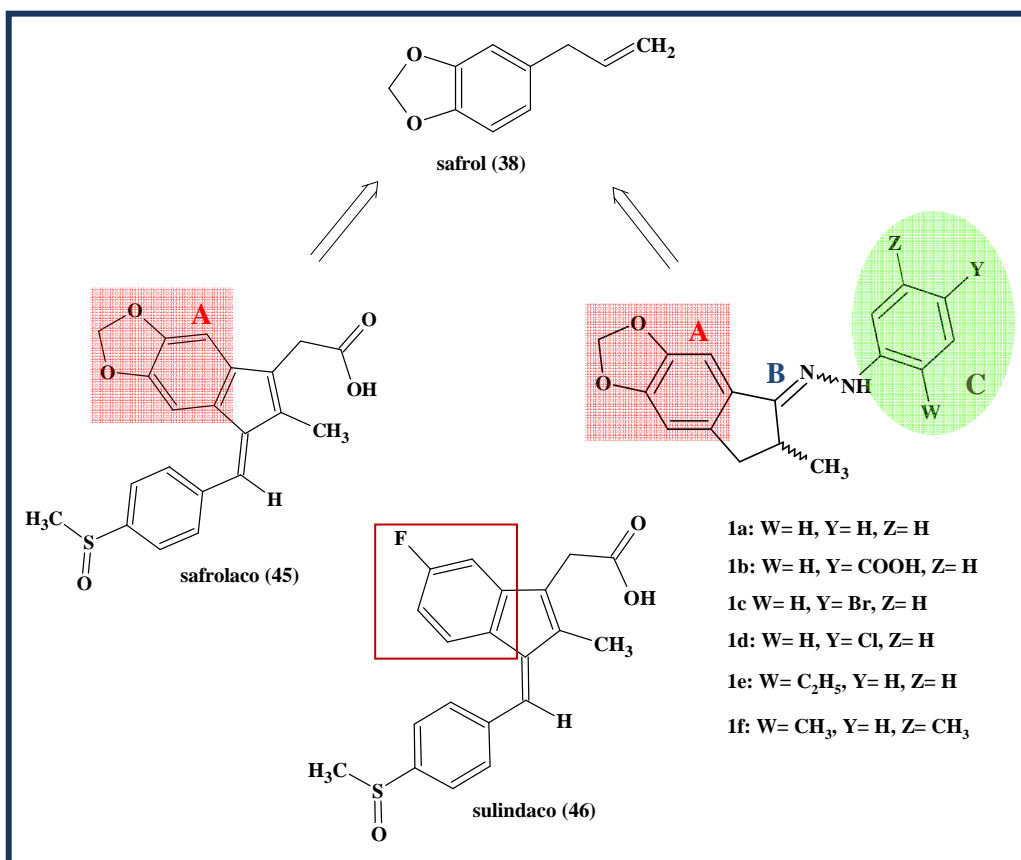


Figura 18: Planejamento dos novos derivados indano-hidrazônicos (1a-f)

3. OBJETIVOS

O presente projeto visa a obtenção e avaliação farmacológica de uma nova série de derivados indano-hidrazônicos (1a-f), apresentados na Figura 19, que tem como produto de partida o safrol (38). Uma série de compostos foi planejada apresentando o grupamento farmacofórico hidrazona com o objetivo de analisar a substituição bioisostérica não clássica de grupo funcional interconversível hidrazona/hidrazina. Foi mantido o arcabouço estrutural dos compostos protótipos anti-inflamatórios de segunda geração, que apresentam o padrão bis-aromático, intercalado por um elemento espaçador, neste caso, o próprio grupamento farmacofórico hidrazona.

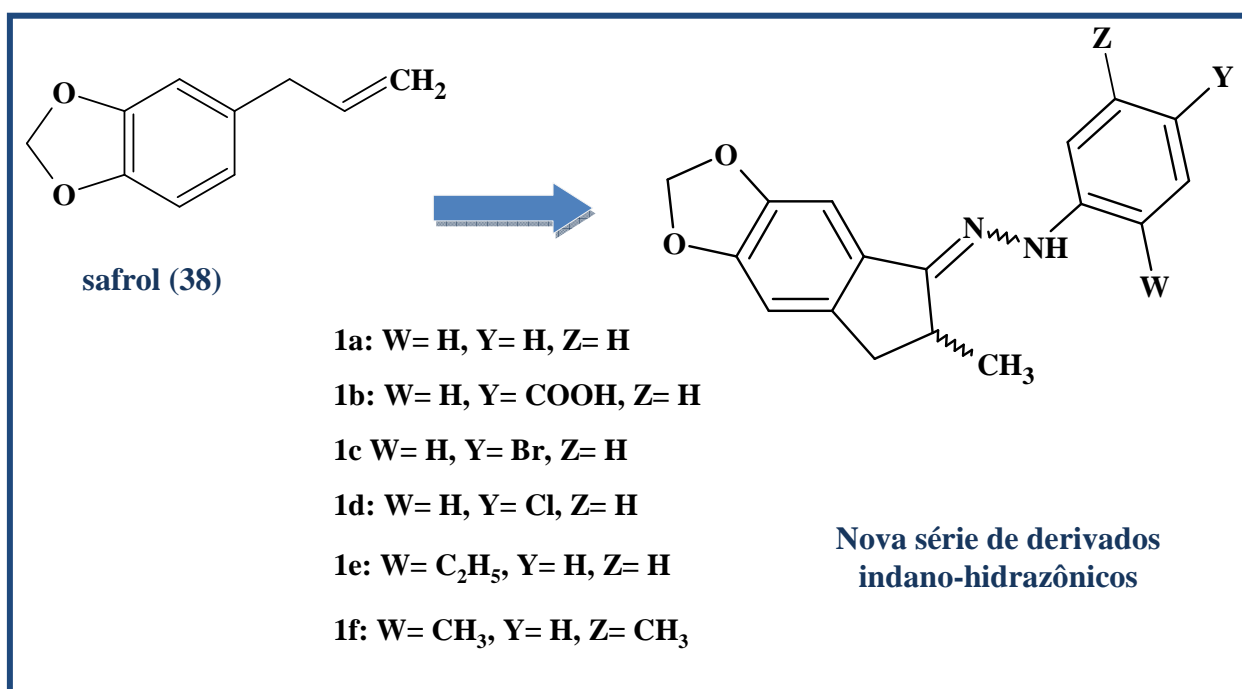


Figura 19: Estrutura dos novos derivados a partir do safrol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Planejamento, síntese e caracterização estrutural da série de compostos delineados utilizando o safrol (38) como material de partida.
- Avaliação do perfil anti-inflamatório por testes preliminares de contorções abdominais induzida por ácido acético .
- O estudo da relação estrutura atividade (REA) dos compostos planejados.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS

- Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel, w/UV254, na espessura de 0,2 μ e em suporte de alumínio, nas dimensões necessárias para cada caso.
- A medida da faixa de fusão foi obtida em graus Celsius e determinada em equipamento Marte (PFM II). A amostra foi triturada e empacotada em tubo capilar para registrar a faixa de temperatura da primeira evidência visível até a completa fusão ou decomposição do sólido. A determinação foi feita em triplicata.
- Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro FTIR, IR Prestig-21- Shimadzu acoplado a microcomputador munido de programa IR solution do Laboratório Interdisciplinar de Química (LabiQ) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). As análises foram feitas em pastilha de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em número de ondas (cm^{-1}).
- Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear foram realizados em espectrômetro Bruker AVANCE ARX200 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). E no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) foi utilizado o aparelho Bruker DPX- 200.
- Nos experimentos de RMN foi utilizado como referencial externo, o sinal relativo ao tetrametilsilano (TMS) para o qual o deslocamento químico do hidrogênio (δ_{H}) é igual ao do carbono ($\delta_{\text{C}} = 0,00$). Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).
- O espectro de massas foi obtido em um espectrômetro de massas HP-5989A, acoplado a um cromatógrafo gasoso CGAR modelo HP-5890 série II, quadrupolo, pelo método de impacto de elétrons (70 eV), coluna capilar SE-30m x 0,25 mm x 0,25 μm ; Temp in = 250 $^{\circ}\text{C}$, Tdet = 200 $^{\circ}\text{C}$, utilizando hélio como gás de arraste. Os fragmentos foram expressos pela razão entre unidades de massa e carga (m/z) e a abundância relativa dos picos em porcentagem (%). Na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

→ Os solventes utilizados nos experimentos cromatográficos foram de grau P.A, e nas etapas sintéticas foram previamente tratados e destilados segundo literatura específica (PERRIN & ARMAREGO, 1988).

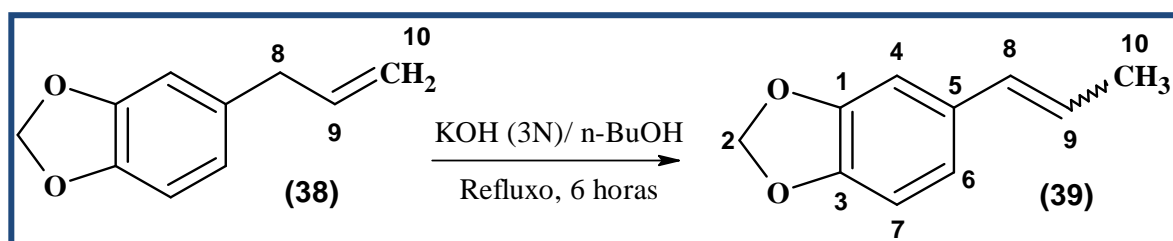
4.2 METODOLOGIA DE SÍNTESE

4.2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL DE PARTIDA

O Sassafrás foi fornecido pelo horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras UFLA –MG e colhido nos meses de setembro e novembro de 1991. O caule e as folhas foram moídos e secos em estufa ventilada a 25-30°C. O material vegetal não utilizado foi acondicionado em freezer sob temperatura inferior a 0°C. O extrato hexânico do caule e folhas obtido foi purificado em coluna de sílica gel de diâmetro variado segundo a quantidade do extrato de partida. Utilizando-se 25 gramas de sílica gel comum para cada grama de extrato e como eluente hexano:acetato a 15%, o safrol (38) foi obtido como um óleo de coloração amarela cujo fator de retenção (Rf) na placa de CCD era o mesmo para o safrol (38) padrão comercial. A espectroscopia na região do infravermelho entre o padrão comercial e o safrol (38) obtido do extrato foi comparada bem como as varreduras na espectroscopia da região do UV-Visível (Figuras 21, 22 e 23, respectivamente, páginas 60 e 61).

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$: 3.078, 3.007 (v C-H arom.); 2.978 (vas CH); 2.895 (vs C-H); 1639 (v C=C vinila); 1.502, 1.489, 1.444 (v C=C arom.); 808, 775 (δ C-H arom.); 990 (δ C=C). (Figura 22, página 60).

4.2.2 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 5-ALIL-1,3-BENZODIOXOLA (39) (ADAPTADO DE BARREIRO & LIMA, 1992).



Em balão bitubulado munido de condensador de refluxo foi adicionado a 1,16 g (7,15mmol) de safrol (38) previamente purificado, 5,8 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 3N em álcool butílico normal. A reação prosseguiu por seis horas. Após este

período, uma quantidade de 15 mL de água foi adicionada ao meio reacional e o pH foi neutralizado utilizando-se ácido clorídrico concentrado. Extrações com diclorometano foram realizadas, as frações orgânicas foram reunidas, lavada com solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o produto obtido na forma de um óleo marrom teve rendimento 87% a. Análises espectroscópicas na região do UV-Visível (Espectro 4) e infravermelho foram realizadas, bem como os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos.

p.e.: 232-234°C - lit: 232-234 °C (Aldrich Chemical Company, Inc.).

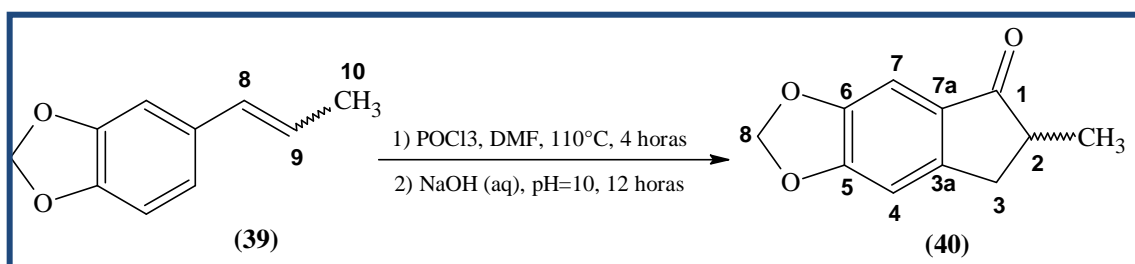
I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$: 3.018 (ν C-H arom.); 2.968 (ν CH); 2.893 (ν C-H); 1600, 1502, 1.489, 1.444 (ν C=C arom.); 1249 e 1041 (ν C-O-C); 767 (ν C=C); 761 (δ C-H); 990 (δ C=C). (Figura 26, página 64).

EM: m/z: 162(M+. 100%); 147(2%); 131(44%); 119(4%); 103(53%); 91(11%); 77(31%); 63(22%); 51(27%); (Esquema 1, página 64).

RMN ^1H (200 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 6,86 (s, H4), 6,76 (s, H7), 6,72 (s, H6), 6,30 (dd, J=1,58 e 15,81 Hz, H8), 6,04 (dd, J=6,48 e 15,65, H5), 5,91 (s, H2), 1,83 (dd, J=1,58 e 6,32, H10) (Figura 27 e 28, páginas 65 e 66).

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 147, 86 (C3); 146, 44 (C1); 132,43 (C5); 130,49 (C8); 123,88 (C9); 120, 03 (C6); 108, 14 (C7); 105,26 (C4); 100,86 (C2); 18,29 (C10) (Figura 29, página 66).

4.2.3 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 2-METIL-5,6-(METILENODIOXI)-1-INDANONA (40) (ADAPTADO DE BARREIRO & LIMA, 1992)



Em balão bitubulado munido de condensador de refluxo 2,1 mL de oxicloreto de fósforo (POCl₃) e 8,7 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) seca foram agitados em sistema fechado e anidro, sob atmosfera de Nitrogênio (N₂), com a temperatura de 0°C por 30 minutos, seguindo-se da adição de 3,0 g de 5-alil-1,3-benzodioxol (3) quando a reação prosseguiu à temperatura de 110°C durante 6 horas. O meio reacional foi vertido em água e gelo e o pH foi elevado ao valor de 10, mantendo-se sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente o pH do meio foi neutralizado e extrações com diclorometano foram realizadas, as frações orgânicas foram reunidas, lavada com solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida. Após o isolamento da reação, o produto reacional foi purificado em coluna cromatográfica (eluente: hexano:acetato de etila, 20%), obtendo-se um sólido laranja, com **43%** de rendimento. Análise espectroscópica na região do infravermelho foi realizada, bem como o espectro de ¹H RMN obtido.

I.V.máx. (KBr) γ -cm⁻¹: 2.966 (vas CH); 2.893 (vs C-H); 1693 (v C=O); 1.610, 1.473, (v C=C arom.); 1321, 1035, 1294, 1261, 937, (δ C-H arom.); 937 (δ C=C), 769 (δ C-H); (Figura 31, página 69).

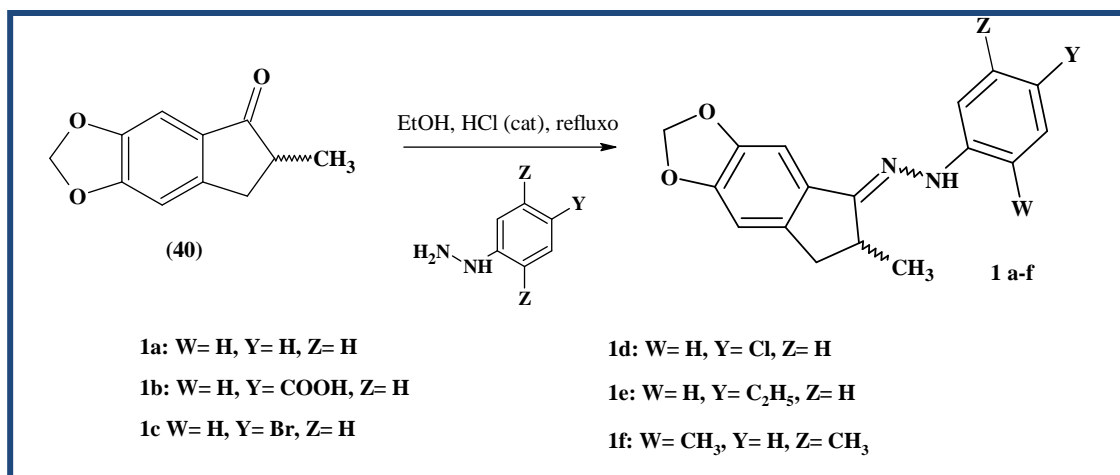
RMN ¹H (200 MHz) CDCl₃/ TMS (δ -ppm): 7,03 (s, H7); 6,74 (s, H4); 5,98 (s,H8); 3,20 (dd, H3, ²J= 12 Hz, ³J= 16 Hz, 2,48-2,66 (m, H2), 2,60 (H3*) 1,26 (d, H 9, J= 16 Hz) (Figura 32, página 69).

* A sobreposição dos sinais não permitiu visualizar as multiplicidades e o desdobramento do duplo duplete em torno de δ 2,60 do hidrogênio mais blindado do grupo metilênico na posição (3).

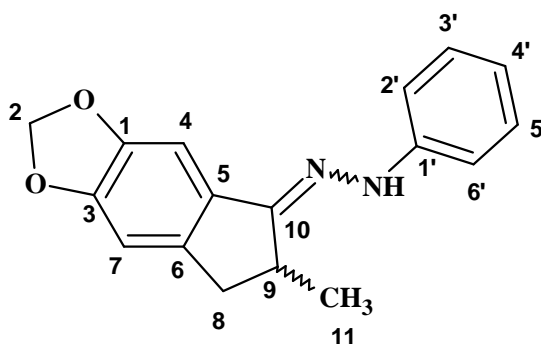
RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3/TMS (δ -ppm): 207,28 (C1), 154,12 (C7a), 150,78 (C6), 148,05 (C5), 130,58 (C3a), 112,02 (C8), 105,42 (C7), 102,23 (C4), 42,25 (C2), 34,76 (C3), 16,41 (C9). (Figura 33, página 70).

4.2.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS INDANO-HIDRAZÔNICOS (1a-f) (DIAS, 1994).

Em balão bitubulado munido de condensador de refluxo a massa de 50 mg do intermediário 2-metil-indanônico foi solubilizada em etanol e ácido clorídrico em quantidades catalíticas foi utilizado, a temperatura de refluxo foi estabelecida, momento em que a hidrazina foi adicionada. A reação prosseguiu por 20 dias até que a placa de CCD indicasse o fim da reação. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e extrações com diclometano foram realizadas, as frações orgânicas foram reunidas, lavada com solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio. Após isolamento da reação, o produto reacional foi isolado em cromatografia líquida clássica. Análise espectroscópica na região do infravermelho foi realizada, bem como os espectros de ^1H RMN e ^{12}C RMN foram obtidos.



a) Derivado (5*E/S*)-6-metil-6,7-diidro-5*H*-indeno[5,6-*d*][1,3]dioxol-5-ona fenilidrazona (1a) – *E/Z*



Rendimento da reação: 65%

Faixa de fusão: 79-82°C.

Característica física: Sólido marrom

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$ - (Figura 34, página 74)

RMN ^1H (200 MHz) acetona- d_6 / TMS (δ -ppm) (Figura 41 e 42, páginas 79 e 80):

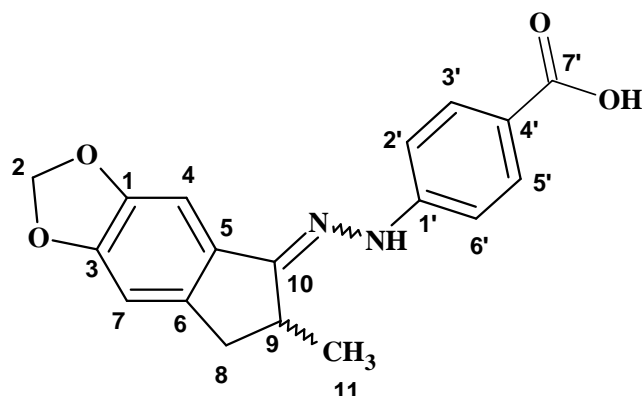
H 2	H 4	H 7	H 8	H 9	H 11	H 2'	H 3'	H 4'	H 5'	H 6'
6,09 (s)	7,31 (s)	6,92 (s)	2,85 (d) J= 14,8	3,06 (d) J=14,0	1,45 (s)	7,65 (d) J = 7,64	7,37 –7,40 (m)	7,20 – 7,24 (m)	7,37 –7,40 (m)	7,39(d) J = 7,29

J = Hz

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm) (Figura 43, página 81):

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
149,9	102,0	151,4	107,4	127,7	128,0	103,6	38,6	30,9	143,7	27,9
C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	-	-	-	-	-
148,2	122,9	128,0	124,8	128,3	120,9	-	-	-	-	-

b) Derivado ácido 4-[(2*E/S*)-2-(6-methyl-6,7-diidro-5*H*-indeno[5,6-*d*][1,3]dioxol-5-ilideno) hidrazino] benzóico (1b) – *E/Z*



Rendimento da reação: 66%

Faixa de fusão: 81-84°C.

Característica física: Sólido laranja

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$ - Figura 35, página 75.

RMN ^1H (200 MHz) DMSO- d_6 / TMS (δ -ppm) (Figura 44 e Figura 45, página 82):

H 2	H 4	H 7	H 8	H 9	H 11	H 2'	H 3'	H 4'	H 5'	H 6'
6,02 (s)	7,06 (s)	6,85 (s)	A = 2,47 (d) J=14,62 B #	#	1.12(d) J = 6,74	7,21 (d) J = 8,65	H 7,75 (d) J = 8,47	9,59 (s)	7,75(d) J = 8,47	H 7,21 (d) J = 8,65

J = Hz

A = Sinal de menor deslocamento

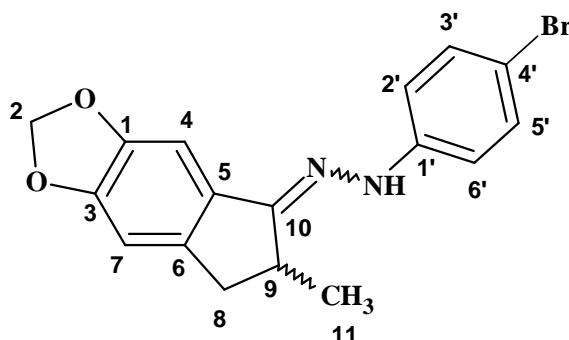
B = Sinal de maior deslocamento

Sinal não observado no espectro, devido à sobreposição de sinais

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm) (Figura 46, página 83):

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
149,8	100,2	156,2	105,7	131,4	140,0	101,4	37,6	33,4	147,0	17,7
C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	-	-	-	-
149,3	111,5	130,9	119,6	130,9	111,5	167,4	-	-	-	-

c) Derivado (5*E/S*)-6-metil-6,7-diidro-5*H*-indeno[5,6-*d*][1,3]dioxol-5-ona (4-bromofenil) hidrazona (1c) – *E/Z*



Rendimento da reação: 69%

Faixa de fusão: 83-86°C.

Característica física: Sólido marrom

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$ - Figura 36, página 75

RMN ^1H (200 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm) (Figura 47, página 87):

H 2	H 4	H 7	H 8	H 9	H 11	H 2'	H 3'	H 5'	H 6'
6,00 (s)	7,12 (s)	6,92 (s)	A = 2,88 (dd**) B = 3,18 (d) J = 17,0	4,04 (d) J = 18,0	1,26 (d) J = 10,5	7,36 (d) J = 8,74	7,48 (d) J = 8,0	7,48 (d) J = 8,0	7,36 (d) J = 8,74

J = Hz

A = Sinal de menor deslocamento

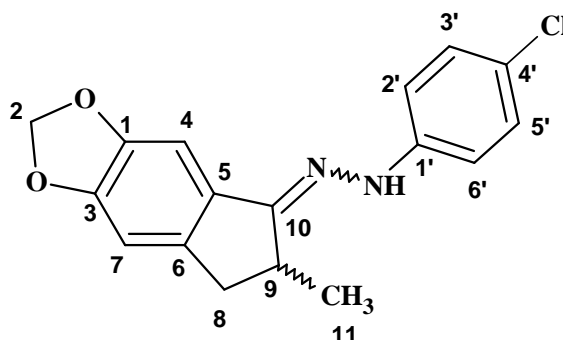
B = Sinal de maior deslocamento

** Não é possível calcular a constante de acoplamento (J)

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm) (Figura 48, página 88):

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
147,8	101,4	148,9	102,6	128,3	133,7	105,6	41,8	34,9	146,8	14,9
C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	-	-	-	-	-
138,0	114,5	130,7	111,8	130,7	114,5	-	-	-	-	-

d) Derivado (5*E/S*)-6-metil-6,7-diidro-5*H*-indeno[5,6-*d*][1,3]dioxol-5-ona (4-clorofenil) hidrazona (1d) – *E/Z*



Rendimento da reação: 67%

Faixa de fusão: 86-89°C.

Característica física: Sólido laranja

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$ - Figura 37, página 76.

RMN ^1H (200 MHz) CDCl_3/TMS ($\delta\text{-ppm}$) (Figura 49, página 89):

H 2	H 4	H 7	H 8	H 9	H 11	H 2'	H 3'	H 5'	H 6'
6,00 (s)	6,89 (s)	6,78 (s)	A = 2,21(t) B = 3,08 (d) J = 14,0	3,94 (d) J = 16,8	#	7,28 (d) J = 2,3	7,35 (d) J = 2,3	7,35 (d) J = 2,3	7,28 (d) J = 2,3

J = Hz

A = Sinal de menor deslocamento

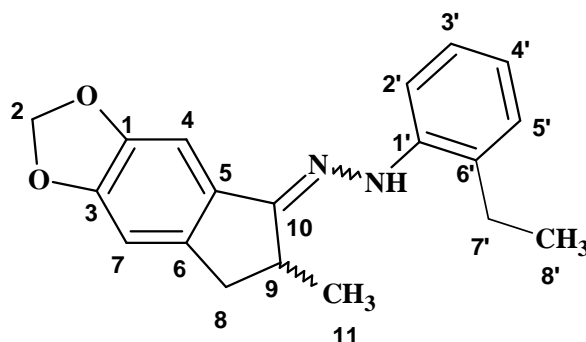
B = Sinal de maior deslocamento

Sinal não observado no espectro, devido à sobreposição de sinais.

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3/TMS ($\delta\text{-ppm}$) (Figura 50, página 90):

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
149,6	102,0	151,4	103,8	125,9	130,5	107,4	38,4	27,8	148,3	14,2
C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	-	-	-	-	-
145,3	121,6	127,8	128,3	127,8	121,6	-	-	-	-	-

e) Derivado (5*E/S*)-6-metil-6,7-diidro-5*H*-indeno[5,6-*d*][1,3]dioxol-5-ona (2-etilfenil) hidrazona (1e) – *E/Z*



Rendimento da reação: 43%

Faixa de fusão: 87-91°C.

Característica física: Sólido laranja

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$ - Figura 38, página 76.

RMN ^1H (200 MHz) CDCl_3/TMS ($\delta\text{-ppm}$) (Figura 51, página 91):

H 2	H 4	H 7	H 8	H 9	H 11	H 2'	H 3'	H 5'	H 7'	H 8'
6,10 (s)	7,16 (s)	6,85 (s)	A = 2,65 (dd) J=3,05/ J=3,50 B = 3,32 (dd) J=7,7/J=7,5	3,37 (d) J= 6,7	1,30 (s)	7,31 (s)	6,89 (d) J = 8,49	6,89 (d) J = 8,49	2,73 – 2,79 (m)	1,35 (d) J=7,43

J = Hz

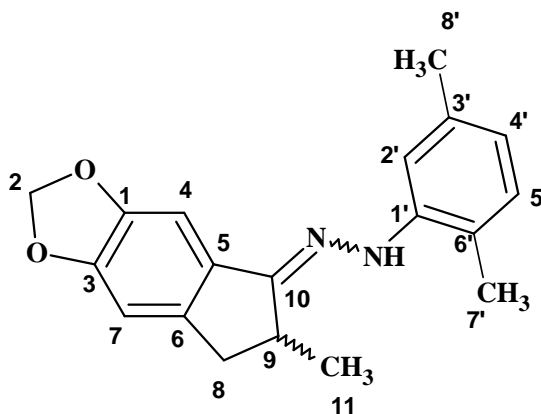
A = Sinal de menor deslocamento

B = Sinal de maior deslocamento

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3/TMS ($\delta\text{-ppm}$) (Figura 52, página 92):

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
143,3	102,1	149,1	104,3	127,5	131,4	105,1	38,5	33,2	146,3	17,5
C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	C8'	-	-	-
137,2	113,1	129,1	125,6	128,7	121,2	13,1	12,3	-	-	-

f) Derivado (5/*Z*)-6-metil-6,7-diidro-5*H*-indeno[5,6-*d*][1,3]dioxol-5-ona (2,5-dimetilfenil) hidrazona (1f) – *E/Z*



Rendimento da reação: 60%

Faixa de fusão: 81-84°C.

Característica física: Sólido amarelo

I.V.máx. (KBr) $\gamma\text{-cm}^{-1}$ - Figura 39, página 77.

RMN ^1H (200 MHz) CDCl_3/TMS ($\delta\text{-ppm}$) (Figura 53, página 93):

H 2	H 4	H 7	H 8	H 9	H 11	H 2'	H 4'	H 5'	H 7'	H 8'
6,19 (s)	7,92 (s)	7,00 (s)	A # B = 3,23 (t)	3,51 (d) J = 25,0	1,61 (s)	#	7,05 (d) J = 7,87	7,17 (d) J = 7,97	2,64 (s)	2,44 (s)

J = Hz

A = Sinal de menor deslocamento

B = Sinal de maior deslocamento

Sinal não observado no espectro devido à sobreposição de sinais.

RMN ^{13}C (50 MHz) CDCl_3/TMS ($\delta\text{-ppm}$) Figura 54, página 94):

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
145,4	102,7	148,8	105,8	127,6	130,6	106,3	38,7	34,4	141,8	17,7
C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	C8'	-	-	-
139,4	122,7	130,9	127,7	128,9	123,8	17,31	12,8	-	-	-

4.3 TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 0,1N (WHITTLE,1964)

Utilizam-se camundongos suíços de ambos os sexos (18-25g), em jejum (aproximadamente 12h), com **n** variante entre 7-10 animais. A relação entre o volume de ácido acético empregado e o peso do animal é 0,1ml/10g. A substância teste é administrada por via oral na dose de 100 µmol/kg suspensa em veículo , tween/ etanol/ água, na proporção de 1: 1: 100. A relação entre o volume da suspensão e peso do animal é de 0,1ml/20g. Após 1hora da administração da substância-teste, o ácido acético é administrado por via intraperitoneal. Aguarda-se 10 minutos para o registro da resposta biológica, a qual consiste em contorções da região abdominal associada com o estiramento ou contorção de qualquer das patas posteriores. As contorções são registradas em um intervalo de 20 minutos. Os resultados são expressos em número de contorções e em % de inibição, calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de inibição} = (\text{Controle} - \text{composto} / \text{controle}) \times 100$$

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Graphpad Prism versão 5.0, empregando-se o teste “t” de Student.

5. RESULTADOS

A metodologia empregada para a síntese dos novos derivados (1a-1f) fundamentou-se na análise retrossintética mostrada na Figura 20, representada abaixo. A desconexão da ligação dupla C=N permitiu identificar o intermediário indanônico (40) como composto chave para o caminho sintético que possibilitou a obtenção dos derivados indano-hidrazônicos (1a-1f). Estes foram alcançados por meio da condensação ácido-catalizada entre uma série de arilidrazinas substituídas (41a-41f) e a carbonila cetônica do núcleo indanônico do intermediário-chave (40). Por sua vez, a clivagem das ligações C-C do intermediário (40) mostrou que o seu núcleo indanônico pôde ser alcançado pela reação clássica de Vilsmeier-Haack, seguida da ciclização do isosafrol (39). A isomerização da olefina (38) ao isosafrol (39) termodinamicamente estável pôde ser realizada empregando-se como catalisador o hidróxido de potássio (KOH) em solução alcoólica sob temperatura ambiente.

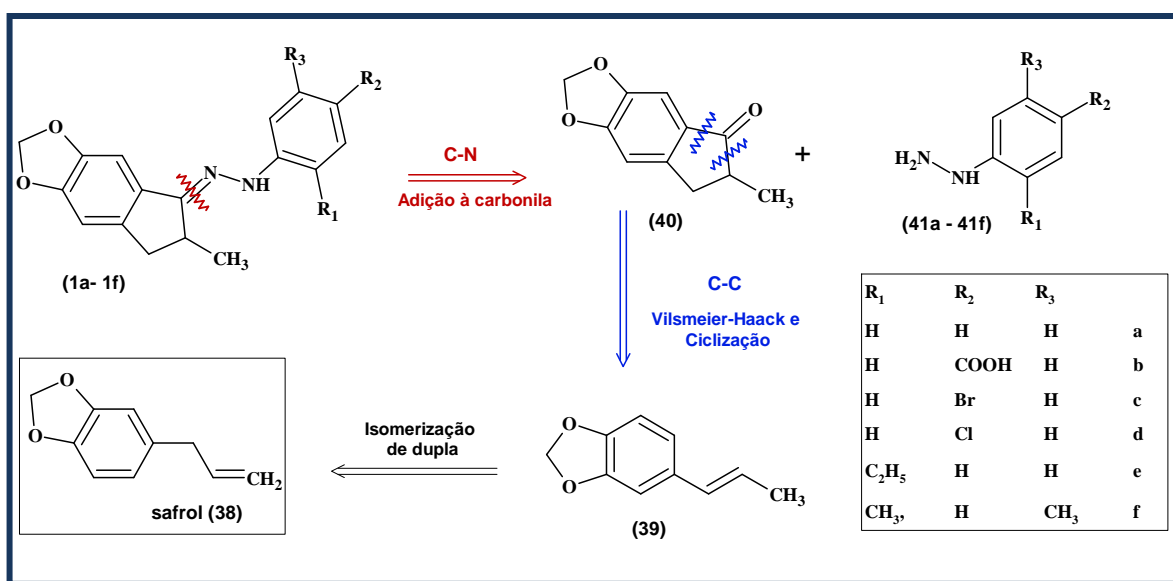


Figura 20: Análise retrossintética dos compostos-alvo (1a-f).

5.1. CONFIRMAÇÃO DO MATERIAL DE PARTIDA: SAFROL (38)

O óleo de safrol (38), obtido da purificação do extrato hexânico, do caule e folhas da espécie Sassafrás, teve sua composição determinada através da análise comparativa com o padrão comercial reservado no LFQM. A espectroscopia na região do infravermelho bem como as varreduras na região do UV-Visível apresentou as mesmas bandas características para ambos, como pode ser visualizado nas Figuras de Figura 21 a Figura 23 (páginas 61 e 62).

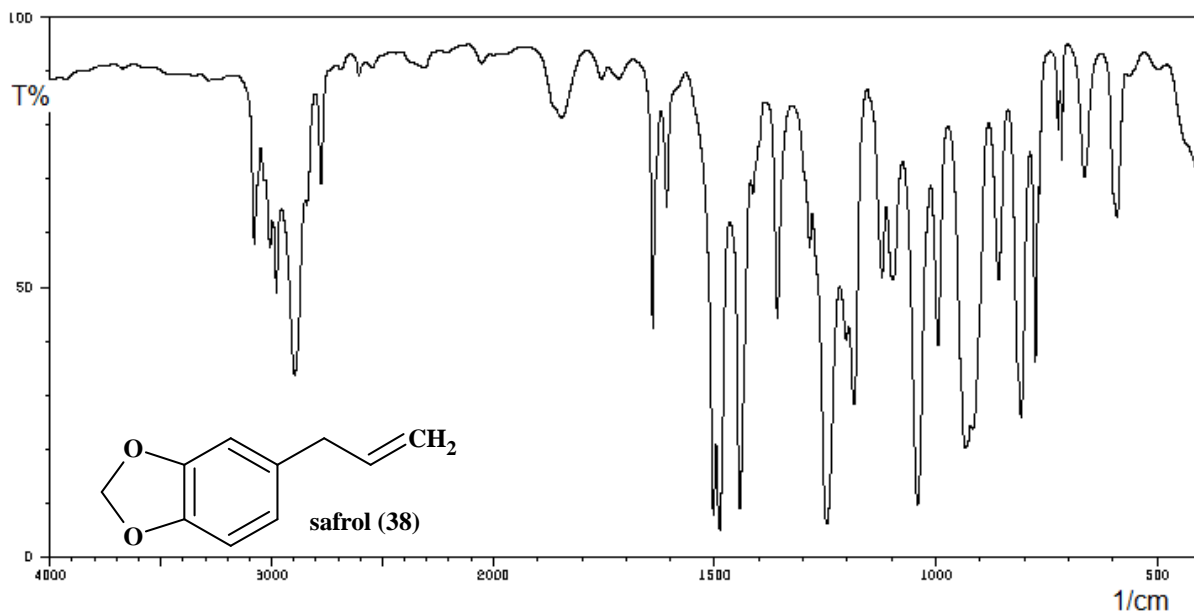


Figura 21: Espectro na região do infravermelho (KBr) do safrol (38) comercial.

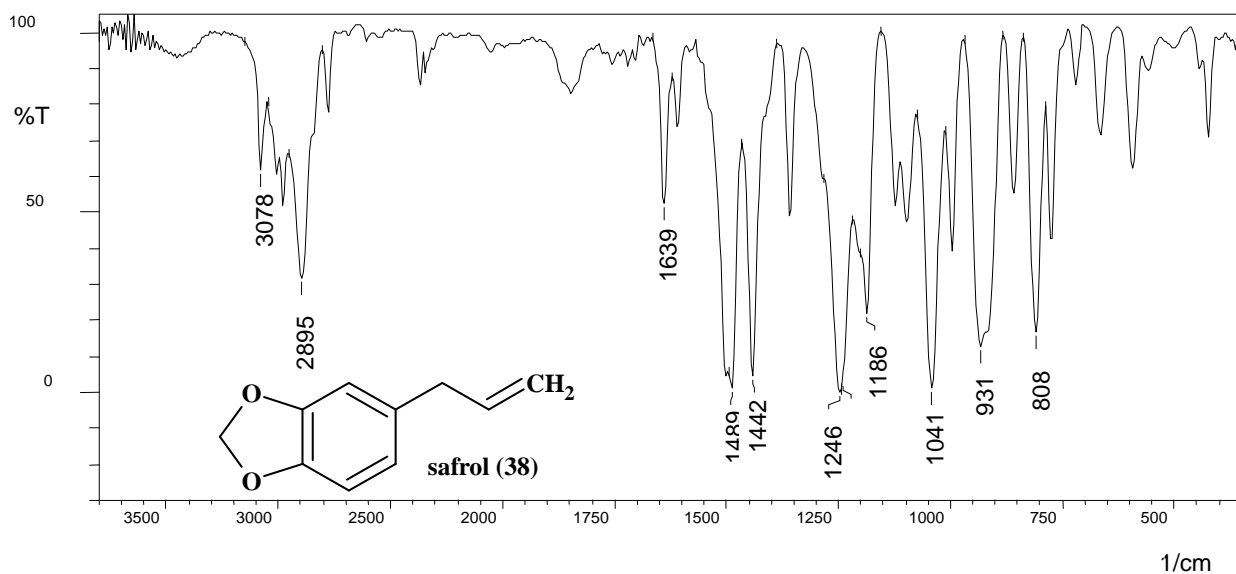


Figura 22: Espectro na região do infravermelho (KBr) para o safrol (38) isolado do extrato hexânico da espécie Sassafrás.

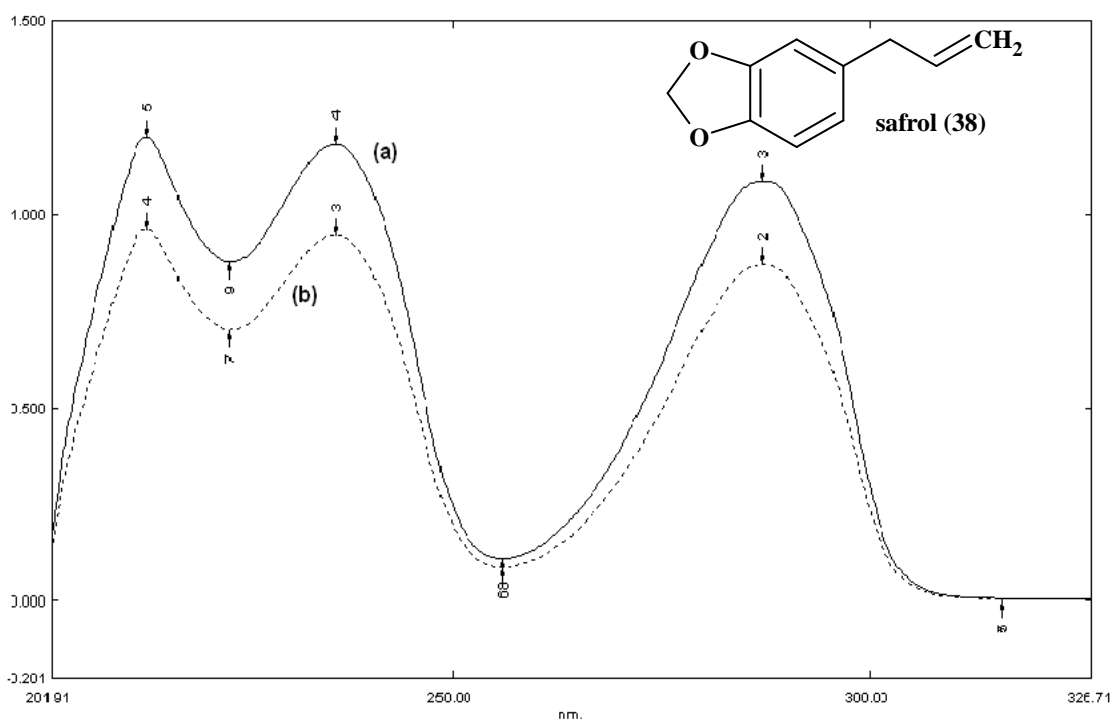
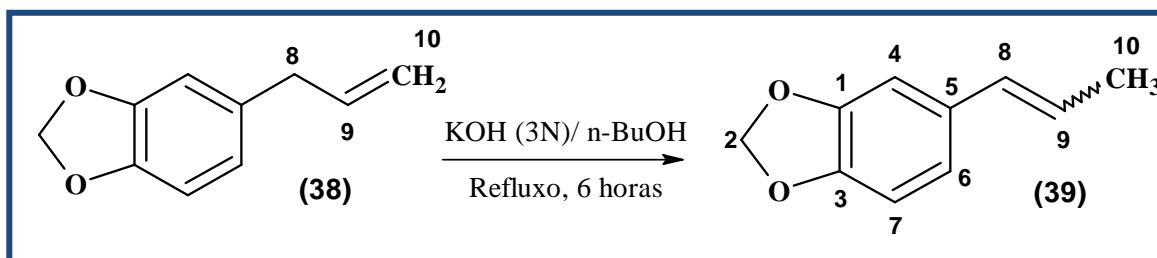


Figura 23: Espectro na região do UV-visível. (a) Safrol comercial. (b) safrol obtido do extrato.

5.2. OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 5-ALIL-1,3-BENZODIOXOLA (39)



A isomerização da olefina (38) ao 5-alil-1,3-benzodioxola ou isosafrol (39) termodinamicamente estável, empregando-se como catalisador hidróxido de potássio (KOH) em etanol, teve um rendimento de 87%. A análise por espectroscopia na região do UV-visível mostrou a presença de deslocamento batocrômico das bandas de absorção para o produto reacional em relação ao safrol (38) de partida e que pode ser visualizado na Figura 24 (página 63). Este deslocamento batocrômico pôde ser explicado pela presença da extensão de conjugação de ligações duplas que não ocorre na estrutura do material de partida. Além disso, não foi possível observar a banda característica de C=C de alquenos monosubstituídos, em torno de 1640 cm^{-1} , que ocorre no espectro na região do infravermelho para a estrutura alílica

do safrol (38) (Figura 22, página 61), e ausente no produto dissustituído resultante da reação de isomerização (Figura 25, página 64) (SILVERSTEIN *et al*, 2007).

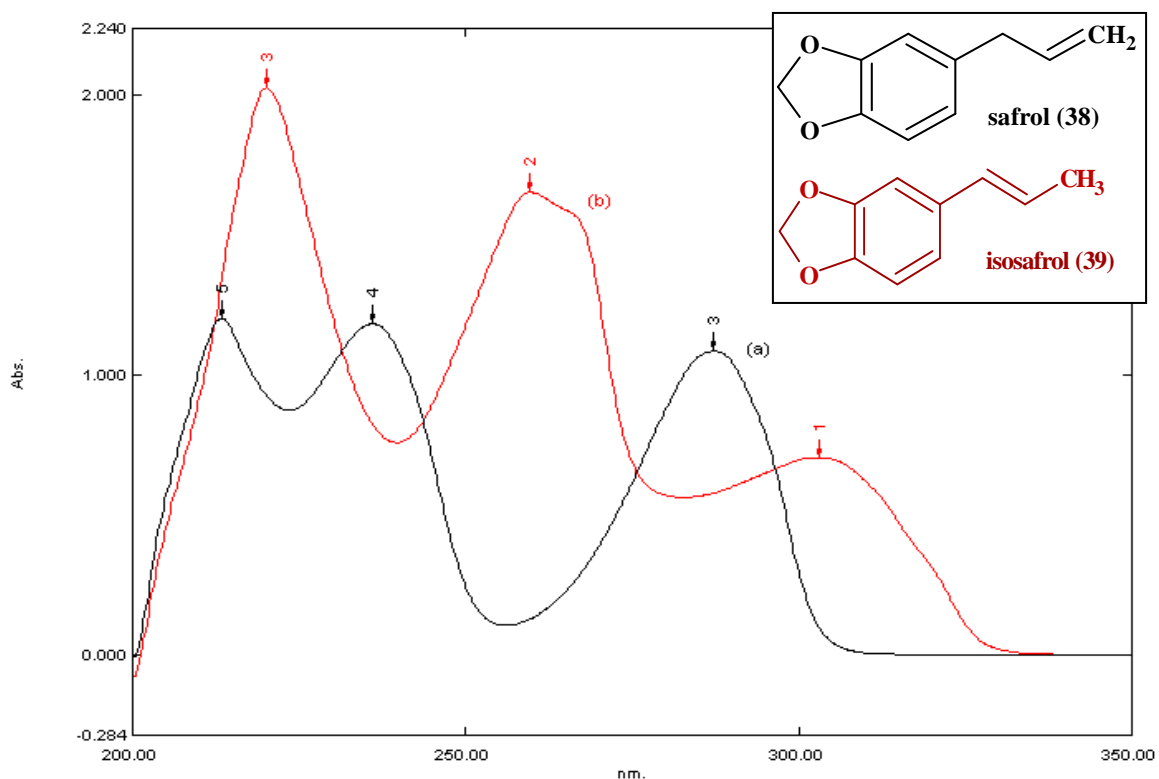


Figura 24: Espectro na região do UV-visível. (a) Safrol (38), (b) isosafrol (39).

Apesar do espectro na região do infravermelho do isosafrol (39) na área da deformação axial de C=C ter revelado um padrão estrutural de alceno trans-dissustituído, que tem absorção fraca ou até mesmo não observada, como é o caso, não se pôde afirmar a ausência do isômero *cis* (Figura 25, página 64). Isso porque a banda com intensidade forte em 767 cm^{-1} referente às vibrações de deformação de C-H fora do plano é característica de um padrão de alceno dissustituído em posição geométrica *cis* (SILVERSTEIN *et al*, 2007; SOLOMONS & FRYHLE, 2005). Diante da análise do espectro na reação do infravermelho da mistura racêmica do produto isomerizado pôde-se verificar as principais bandas de absorção:

- ν C-H (C, sp^2): 3018 cm^{-1} , para anel aromático;
- ν C-H (C, sp^3): 2893 cm^{-1} , para a metila;
- ν C=C: $1880 - 1640\text{ cm}^{-1}$, para anel aromático, as harmônicas ou frequências de combinação;
- - ν C=C (C, sp^2): $1600 - 1444\text{ cm}^{-1}$, vibração do esqueleto aromático;

- ν C-O-C: 1249 e 1041 cm^{-1} , para o grupamento metilenodioxila.

- ν C=C (C, sp^2): 767 cm^{-1} para dupla ligação *cis*;

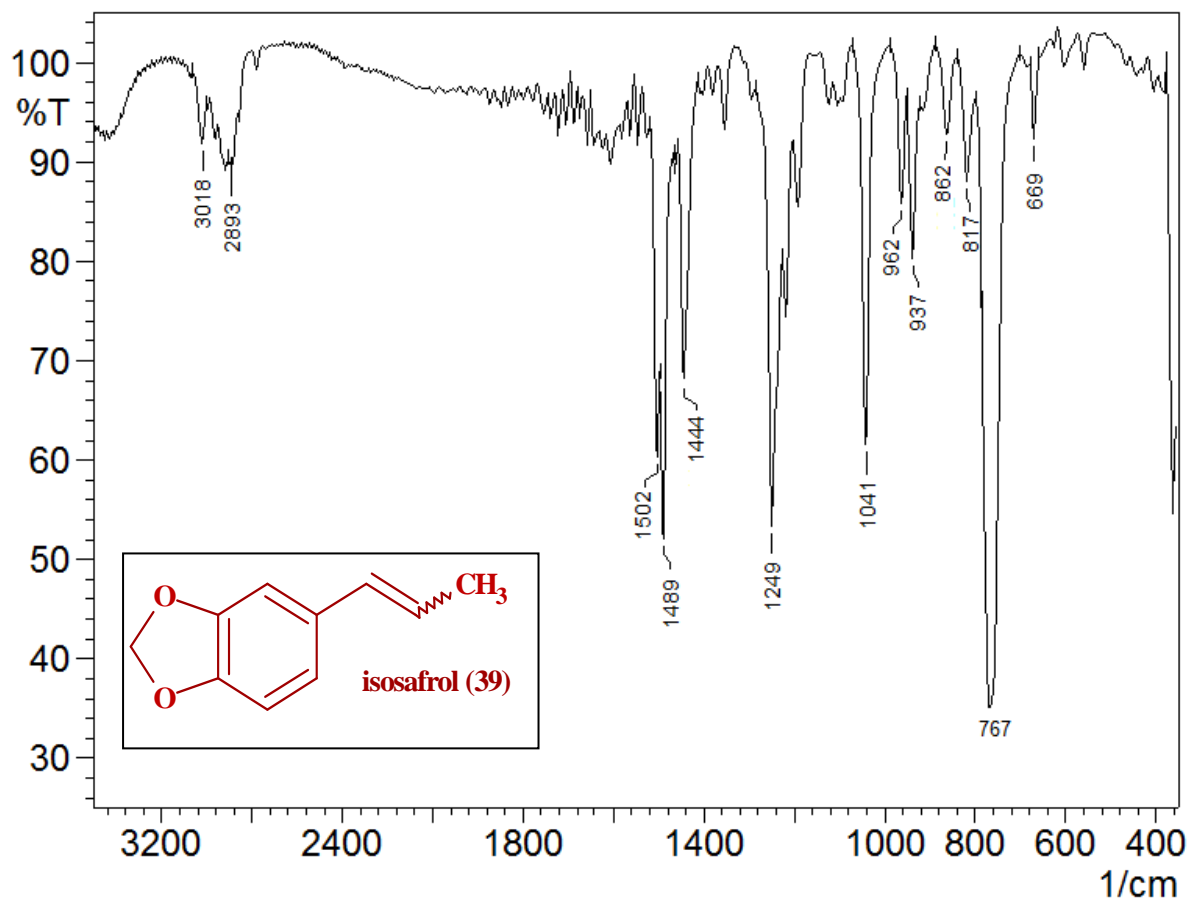


Figura 25: Espectro na região do infravermelho (KBr) do isosafrol (39).

O espectro de massas para o isosafrol (39) (Figura 26, página 65) registrou o pico do íon molecular m/z 162 como pico base. Não se observou a fragmentação diferenciada que distinguísse o isômero *cis* do isômero *trans*. Evidenciou-se ainda, outros fragmentos como m/z 147 como resultado da perda de um radical metila, m/z 131 com a perda do radical metoxila e m/z 103 com a perda de CO_2 , como os principais picos interpretados na elucidação do composto sintetizado (Esquema 1, página 65).

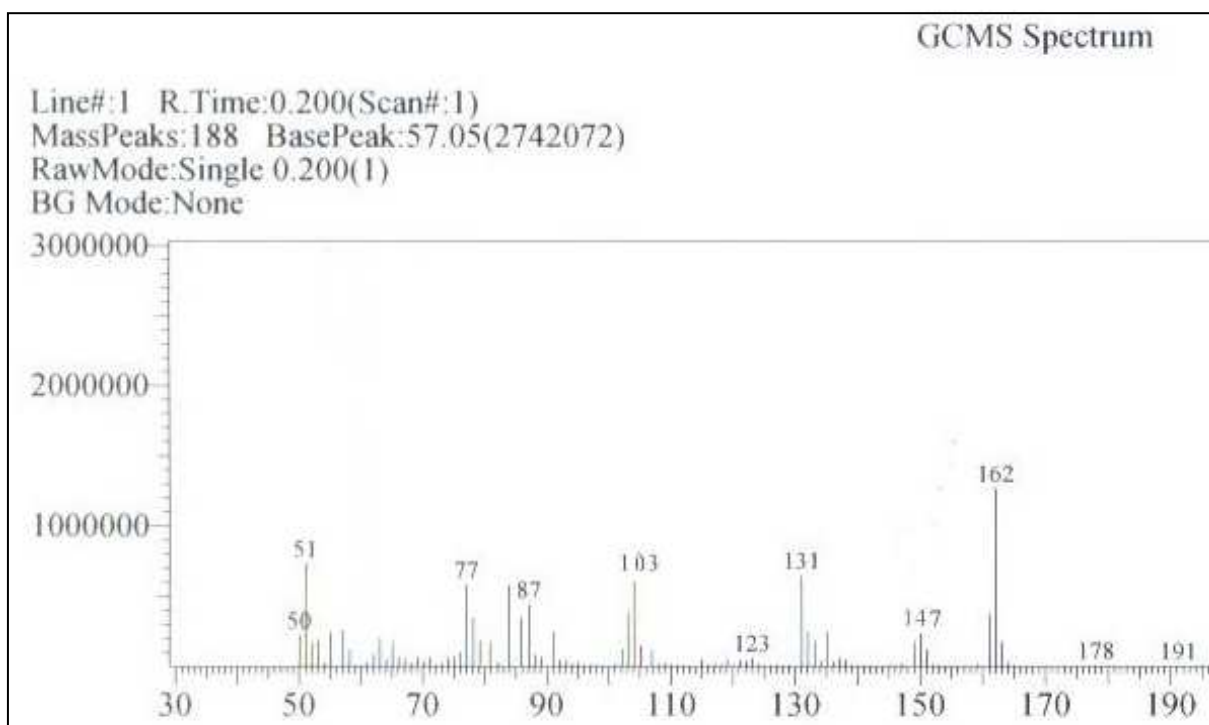
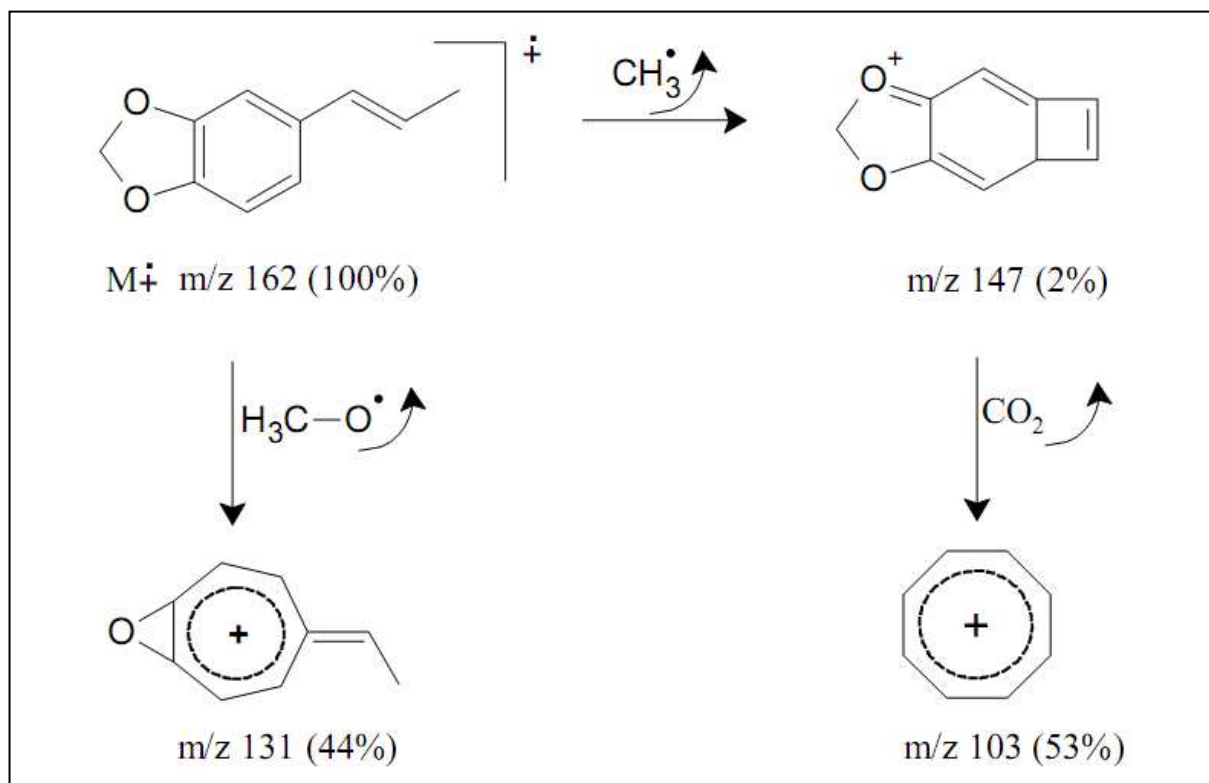


Figura 26: Expansão do espectro de CG-MS do isosafrol (39).



Esquema 1: Proposta de fragmentação para o isosafrol (39).

A isomerização da dupla deste fenilpropanóide pôde ser confirmada pela presença de um duplo duplete centrado em δ 1,83 ($J = 1,58$ Hz, $J = 6,32$ Hz) atribuído ao hidrogênio da metila do isosafrol na posição (10) (Figura 27). Foi observado o singlete em δ 5,91 relacionado à unidade metilenodioxila, e os singletos em δ 6,72, δ 6,76 e δ 6,86 referente ao deslocamento químico dos três hidrogênios do anel aromático. Em δ 6,04 (dd, 1H, $J = 6,48$ e $15,65$ Hz) e δ 6,30 (dd, 1H, $J = 1,58$ e $15,81$ Hz) ocorreram sinais atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação (Figura 28, página 67). A análise do espectro de RMN ^{13}C da **Figura 29** (página 67) mostrou a existência de 10 sinais, sendo que na região característica aos grupos alquila, observou-se o deslocamento químico em δ 18,2 atribuído ao carbono da metila na posição (10) que o safrol (38) não possui, indicando sua isomerização. Além do deslocamento químico em δ 123,8 e 130,4 referente aos carbonos com hibridização sp^2 (C8 e C9) da dupla do isosafrol (39). O sinal característico da metilenodioxila ocorreu em δ 100,8 e as demais atribuições dos outros seis sinais de carbono do anel aromático podem ser visualizadas no espectro da Figura 29 (página 67), sendo que foi possível perceber a presença de três sinais com menor intensidade atribuídos aos átomos de carbono quaternário do anel aromático (C1, C3 e C5), confirmando o produto reacional cuja estrutura já encontra-se descrita na literatura (BARREIRO & FRAGA, 1992; KAISER, DOMBA & SKIBBE, 1962).

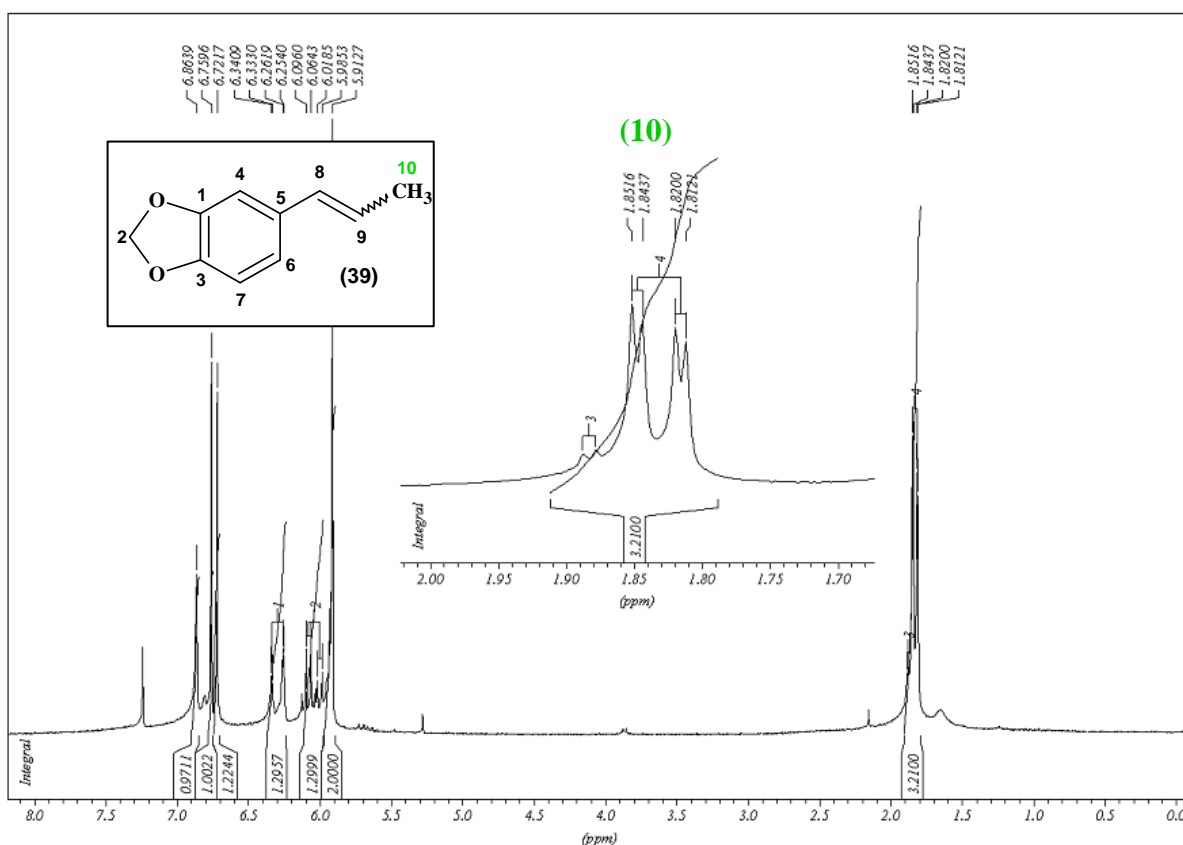


Figura 27: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, CDCl_3) do isosafrol (39).

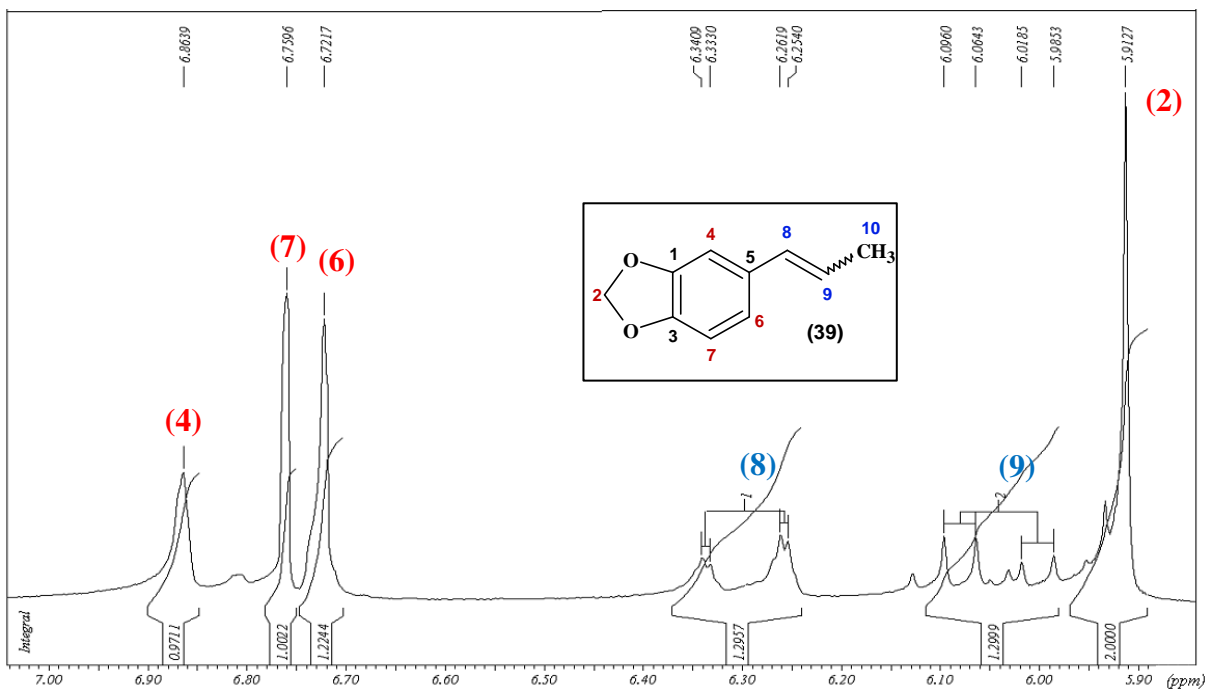


Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, CDCl_3) do isosafrol (39).

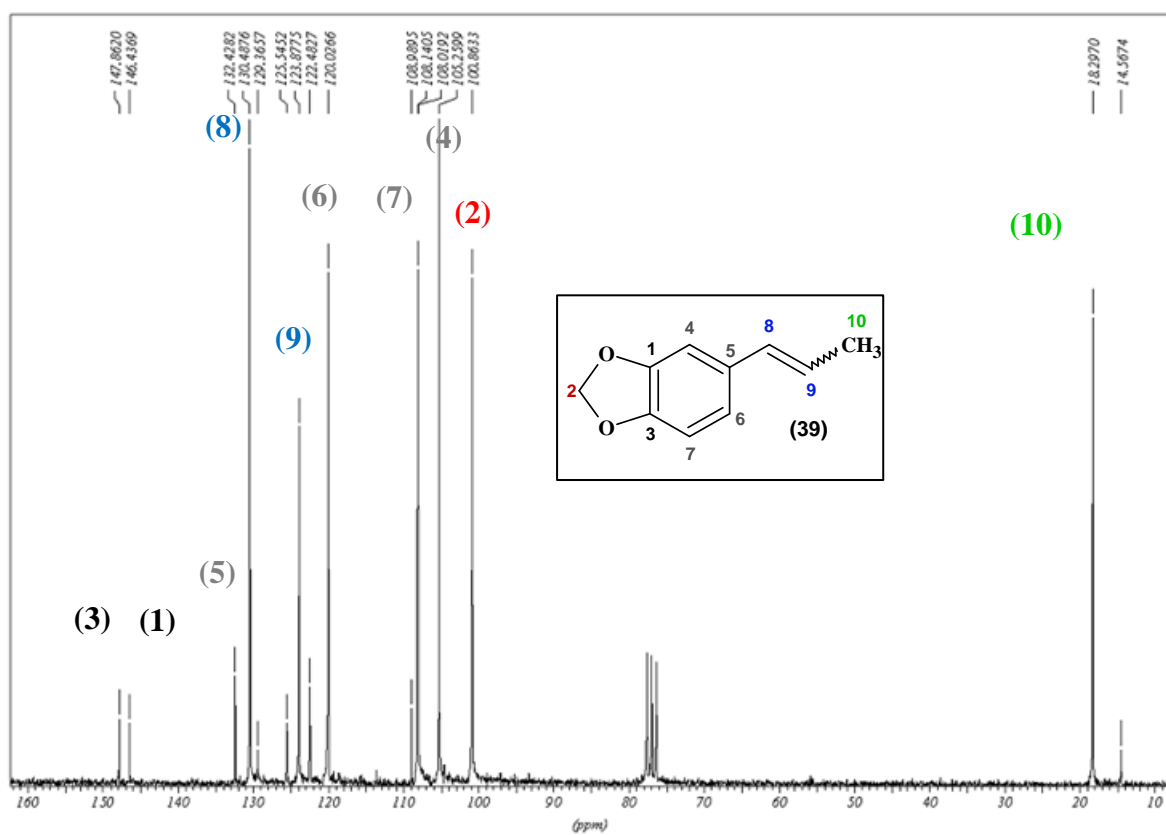
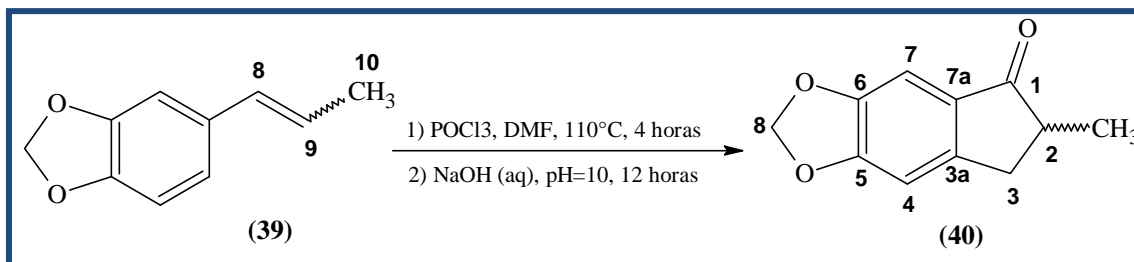


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3) do isosafrol (39).

5.3. OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 2-METIL-5,6-(METILENODIOXI)-1-INDANONA (40)



O rendimento para reação de Vilsmeier-haack seguida de ciclização, a fim de se alcançar o intermediário 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40) foi de 60%. O mecanismo envolve o ataque nucleofílico dos pares de elétrons da dupla ligação do estireno substituído (39) ao reagente de Vilsmeier- Haack (V.H.) que é formado da reação entre DMF e POCl_3 como mostra a Figura 30. Após ataque do isosafrol (39) ao reativo de V.H. há formação de intermediários catiônicos (39b e 39c, Esquema 2, página 67) que sob temperaturas elevadas, próximo a 100°C , forma o composto (40) em geometria Z, pelo favorecimento do controle termodinâmico. Após a etapa de hidrólise, é possível se obter a indanona (40) (Esquema 2, página 69) (WITIÁK *et al.*, 1974).

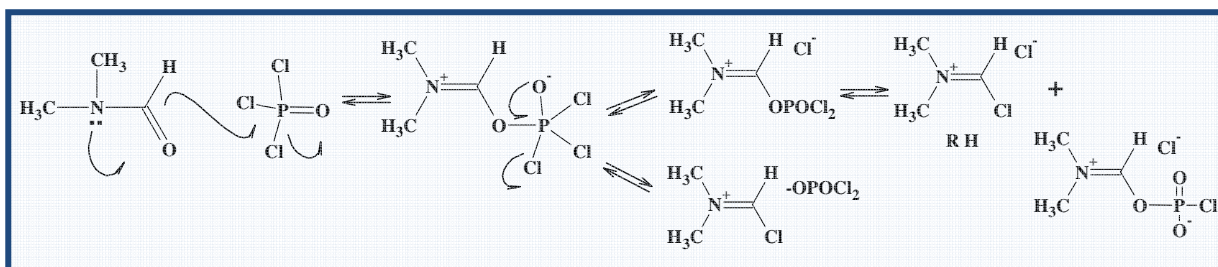
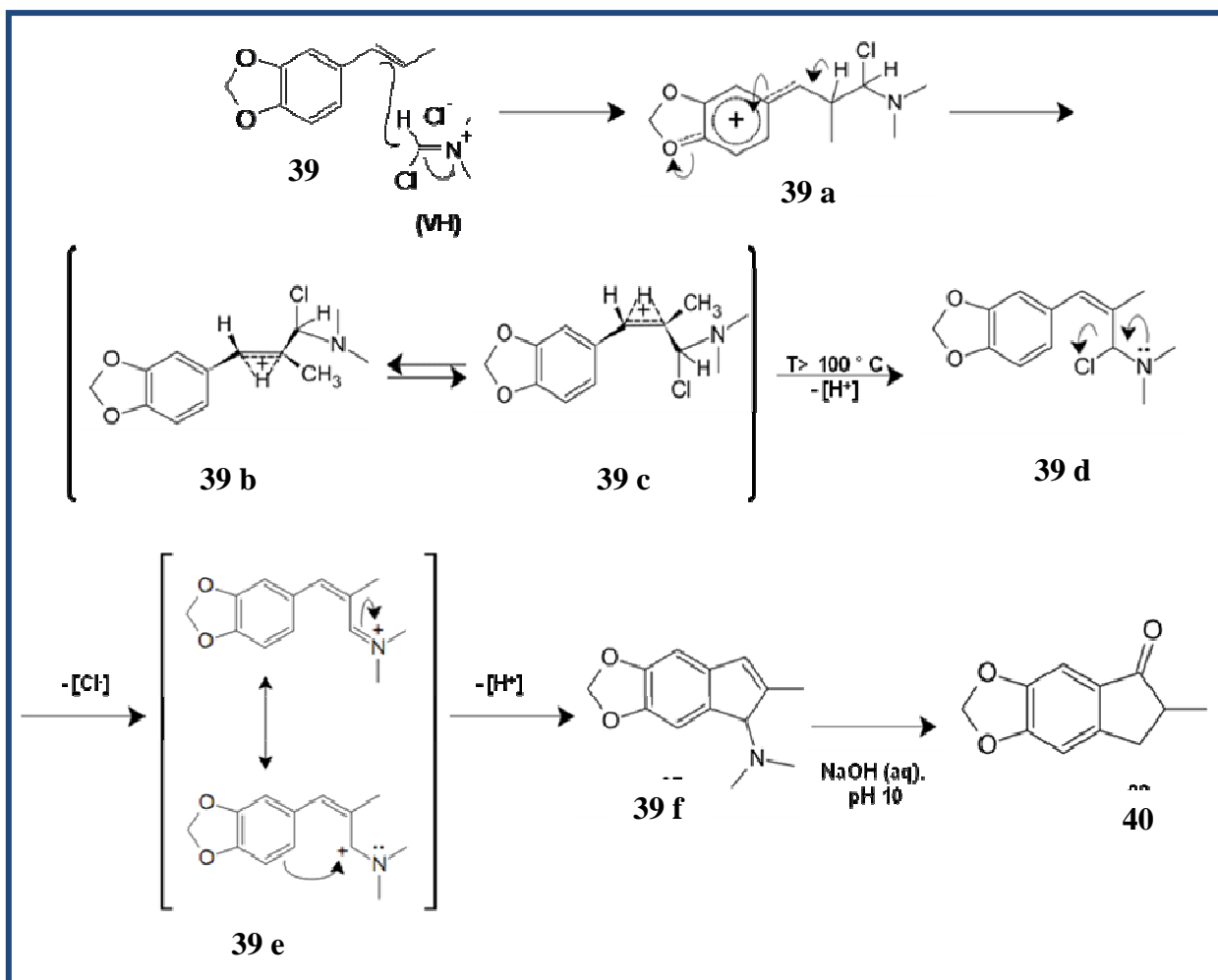


Figura 30: Mecanismo da formação do Reagente de Vilsmeier-Haack (RH). Fonte: (KÜRTI & CZARÓ, 2005).



Esquema 2: Proposta de mecanismo da reação do intermediário 2-metil-5,6-(metilendioxi)-1-indanona (40). Fonte: (WITIÁK *et al.*, 1974).

O produto reacional pôde ser confirmado por meio da espectroscopia na região do infravermelho, que revelou a presença de uma banda característica de carbonila de cetona em 1693 cm^{-1} cujo material de partida não possui (Figura 31, página 70). Além disso, a análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 32, página 70) mostrou a presença de um duplete centrado em $\delta 1,21$ ($J = 16 \text{ Hz}$) atribuído à metila do produto da reação. Um duplo duplete em $\delta 3,20$ referindo-se a um dos hidrogênios diastereotópicos do grupo metileno na posição (3), que apresentou acoplamento geminal ($J = 12 \text{ Hz}$) e vicinal ($J = 16 \text{ Hz}$) com o hidrogênio na posição (2) do novo centro assimétrico (Figura 32, página 70).

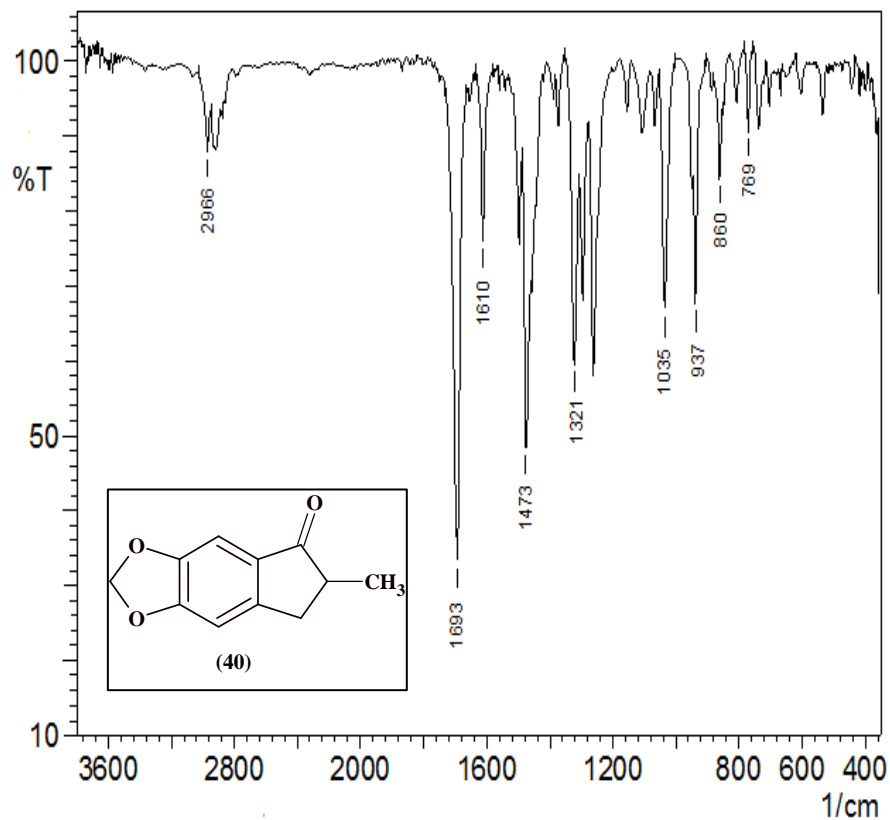


Figura 31: Espectro de infravermelho do produto reacional 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40).

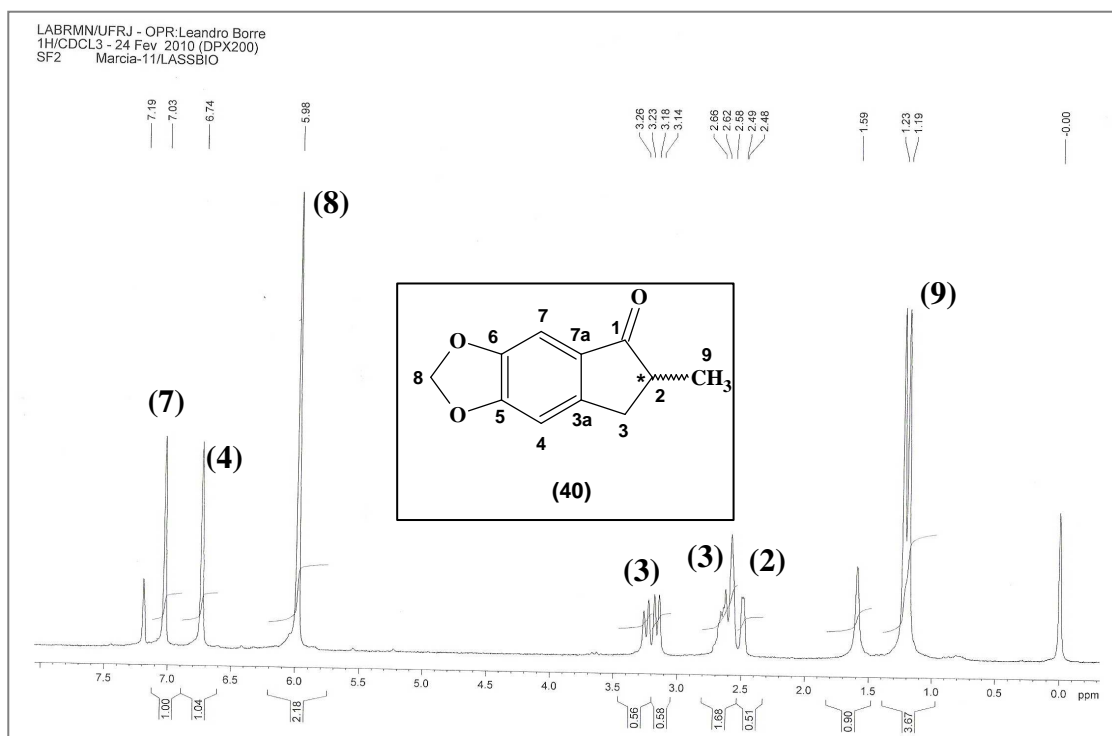


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, CDCl_3) do produto reacional 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40).

Devido à sobreposição dos sinais, a multiplicidade e desdobramento do segundo duplo duplete, referente ao hidrogênio mais blindado do grupo metileno da posição (3), não puderam ser evidenciados em torno de δ 2,60. O sinal do hidrogênio do centro assimétrico na posição (2) apresentou como um multiplete entre δ 2,48 a 2,66. Observou-se a simplificação dos sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos para dois singletos em δ 7,03 (H7) e δ 6,74 (H4), além do singlete em δ 5,98 referente à metilenodioxila na posição (8) (Figura 32, página 70). Os sinais atribuídos ao deslocamento químico dos hidrogênios do produto reacional bem como os valores das constantes de acoplamento foram organizados na Tabela 2 da página 72. No espectro de RMN ^{13}C pôde-se observar 11 sinais, sendo que um destes em δ 16,4 confirmou a presença da metila e à esquerda os deslocamentos em δ 42,2 e δ 34,7, os grupos metileno (C2) e metino (C3), respectivamente; além da carbonila em δ 207,2. Os conjuntos destes sinais que podem ser visualizados abaixo na Figura 33 e na Tabela 2 (página 72) confirmaram o núcleo indanônico do intermediário (40) cujos valores dos deslocamentos químicos estão descritos na literatura (BARREIRO & FRAGA, 1992; WITIAK *et al.*, 1974).

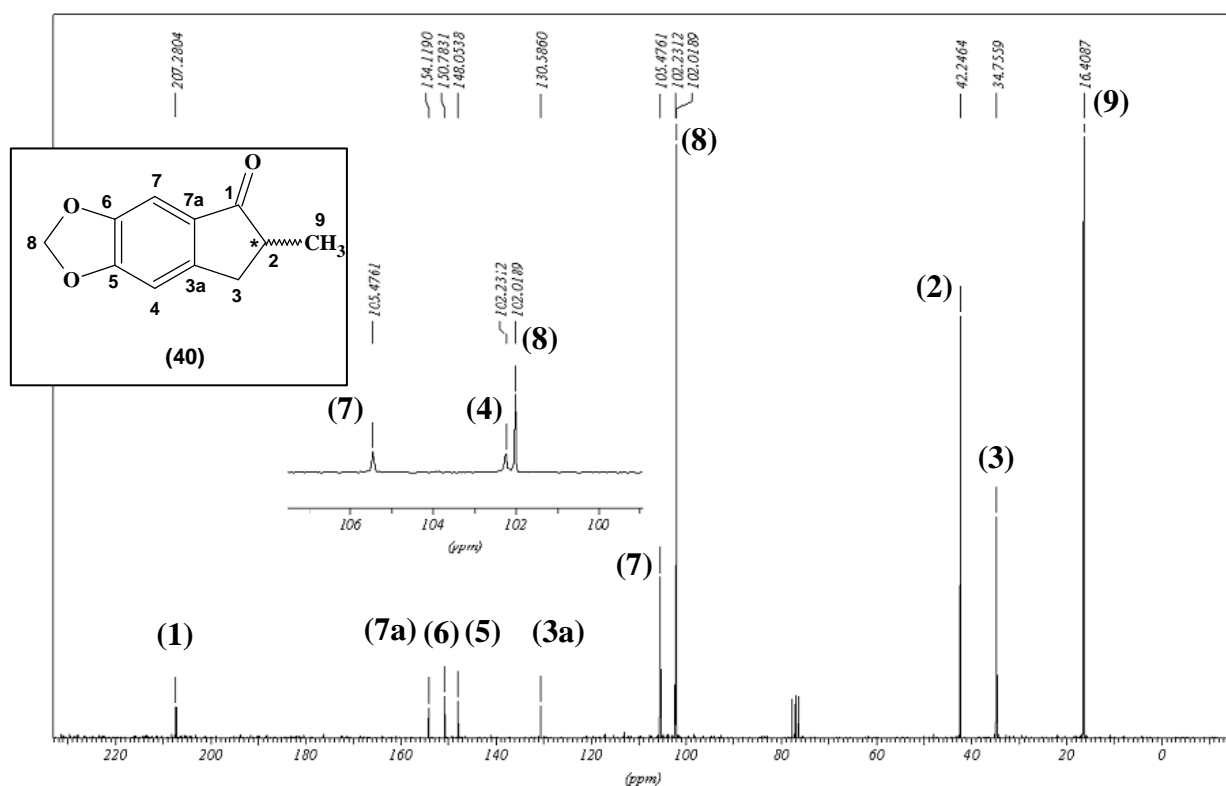
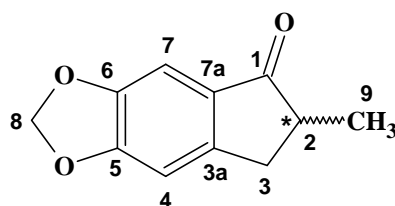


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3) do intermediário 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40).

Tabela 2: Atribuições de RMN ¹H (200 MHz) e RMN ¹³C (50 MHz) para 2-metil-5,6-(metilenodioxi)-1-indanona (40) em CDCl₃



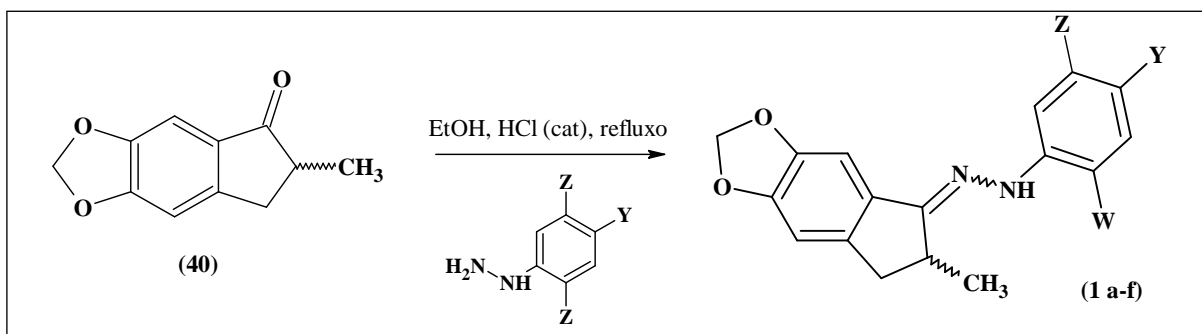
C	RMN ¹ H, δ (ppm), J (Hertz)	RMN ¹³ C, δ (ppm)
1	-	207,2
2	2,48 - 2,66 (m, 1H)	42,2
3	2,60 (1H)* 3,20 (dd, 1H, J = 12 e 16)	34,7
3a	-	130,5
4	6,74 (s, 1H)	102,2
5	-	148,0
6	-	150,7
7	7,03 (s, 1H)	105,4
7a	-	154,1
8	5,98 (s, 2H)	102,0
9	1,21 (d, 3H, J= 16)	16,4

* Devido à sobreposição dos sinais não foi possível visualizar a multiplicidade. A configuração absoluta do composto 2-metil-5,6-(metilenodioxi)-1-indanona (40) só poderia ser determinada por técnicas de espectrometria bidimensionais.

5.4. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS INDANO-HIDRAZÔNICOS (1a-f)

A partir do intermediário-chave 2-metil-5,6-(metilenodioxi)-1-indanona (40) os derivados indano-hidrazônicos (1a-f) foram obtidos explorando a condensação catalisada por ácido com as respectivas arilidrazinas substituídas, sob refluxo e etanol (Tabela 3, página 73) (DIAS, 1994).

Tabela 3: Síntese dos derivados indano-hidrazônicos planejados.



Derivado	W	Y	Z	Rendimento	P.F. °C	Aspecto físico
1a	H	H	H	65%	79-82	Sólido marrom
1b	H	COOH	H	66%	81-84	Sólido laranja
1c	H	Br	H	69%	83-86	Sólido marrom
1d	H	Cl	H	67%	86-89	Sólido laranja
1e	C ₂ H ₅	H	H	43%	87-91	Sólido marrom
1f	CH ₃	H	CH ₃	60%	81-84	Sólido amarelo

Da análise geral dos espectros de infravermelho dos derivados indano-hidrazônicos (1a-1f), não foi possível observar a banda característica da carbonila cetônica, em torno de 1693 cm^{-1} , referente ao material de partida 2-metil-5,6-(metilenodioxo)-1-indanona (40), indicando a obtenção das hidrazonas desejadas. O valor das bandas de absorção provenientes da vibração dos grupamentos característicos dos compostos, bem como suas atribuições, foram dispostas na Tabela 4 (página 74) e os respectivos espectros apresentados nas Figuras Figura 34 a Figura 39. Além destas bandas comuns a todos os derivados indano-hidrazônicos, no composto (1b) ainda foi possível observar a deformação axial característica de hidroxila e carbonila de grupamento ácido que ocorreram em torno de 3425 cm^{-1} e 1701 cm^{-1} , respectivamente, indicando a formação da hidrazona citada (Figura 35) (página 75).

Tabela 4: Atribuições das bandas de absorção observadas nos espectros de I.V. para os derivados indano-hidrazônicos de 1a-1f.

Tipos de vibrações	Bandas de absorção	Atribuições
ν C-H (C, sp^3)	2960 cm^{-1} a 2852 cm^{-1}	Presença de metila e/ou metileno
ν C=N	1606 cm^{-1} a 1610 cm^{-1}	Banda de baixa intensidade da hidrazona.
ν C=C (C, sp^2)	1469 cm^{-1} a 1475 cm^{-1}	Vibração do esqueleto aromático.
δ ass C-H (C, sp^3)	1350 cm^{-1} a 1370 cm^{-1}	Para metila
C-O-C	1269 cm^{-1} a 1274 cm^{-1}	Para metilenodioxila

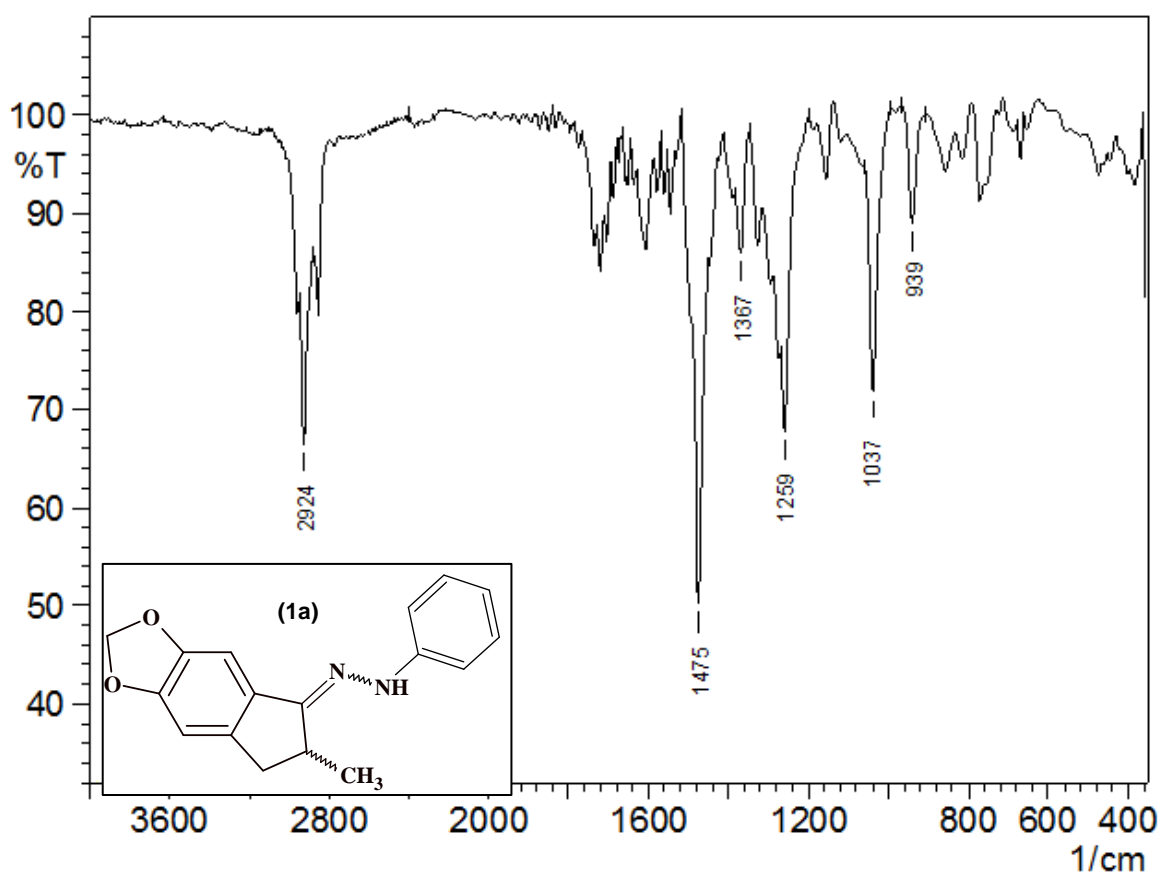


Figura 34: Espectro na região do infravermelho (KBr) do derivado (1a).

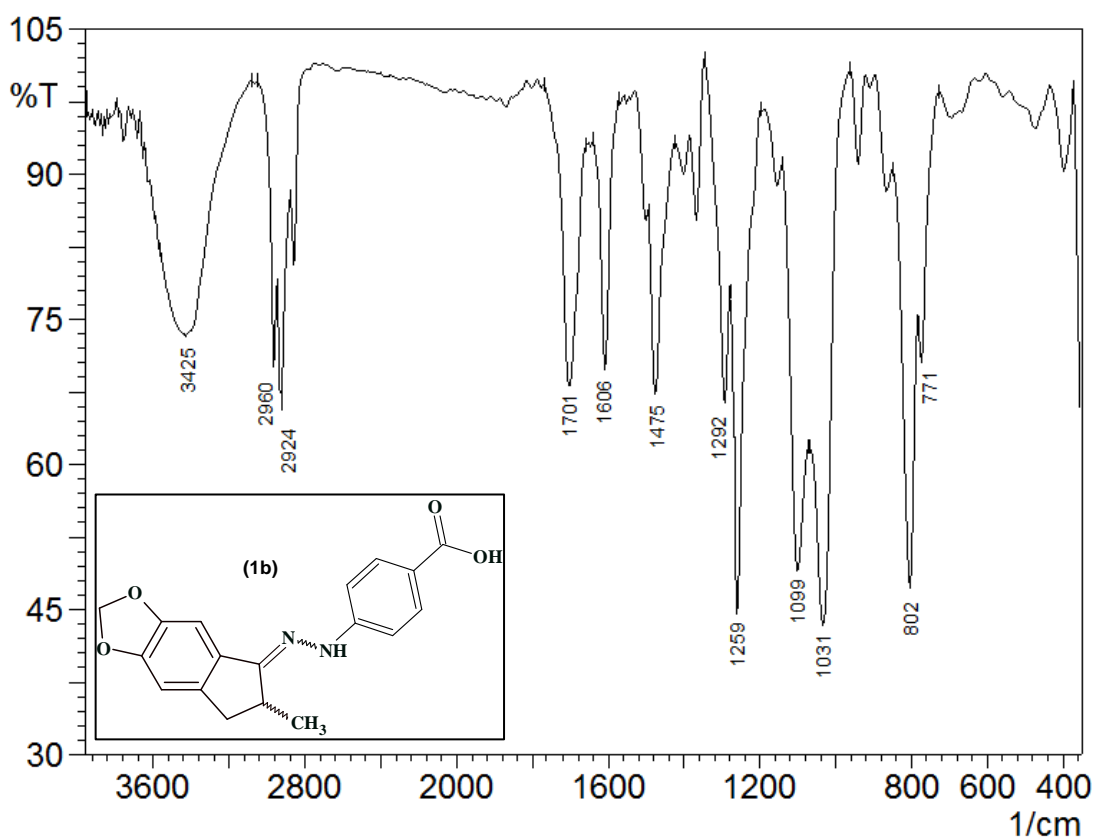


Figura 35: Espectro na região do infravermelho (KBr) do derivado (1b).

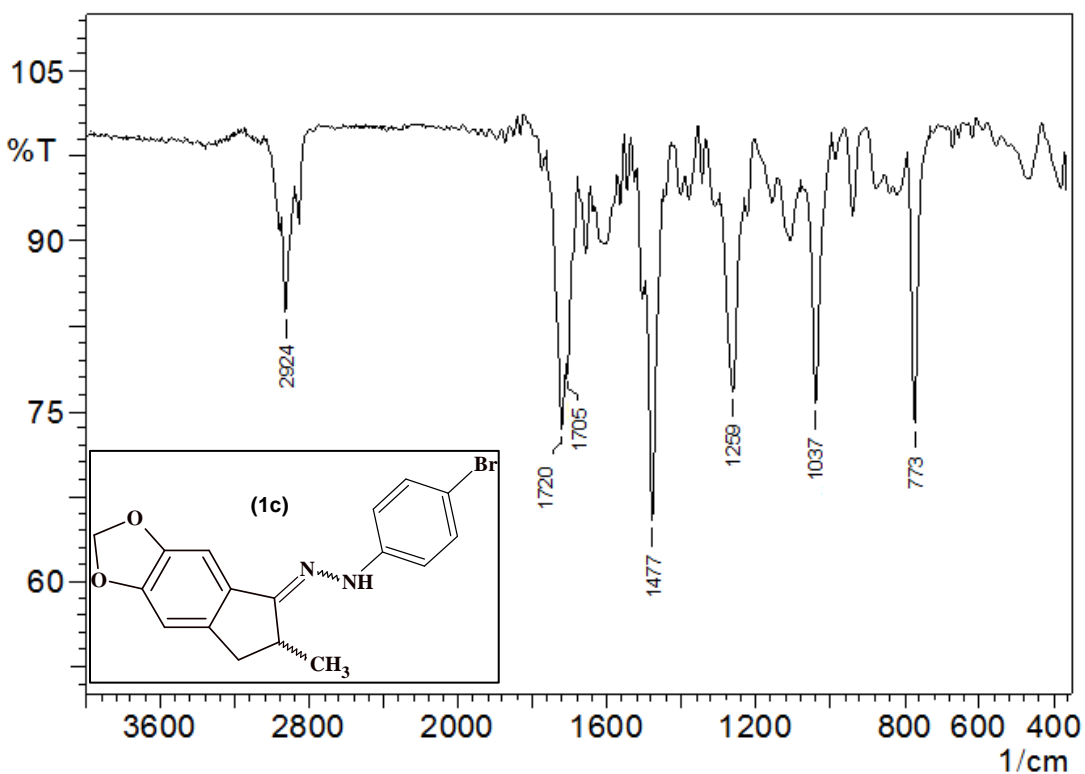


Figura 36: Espectro na região do infravermelho (KBr) do derivado (1c).

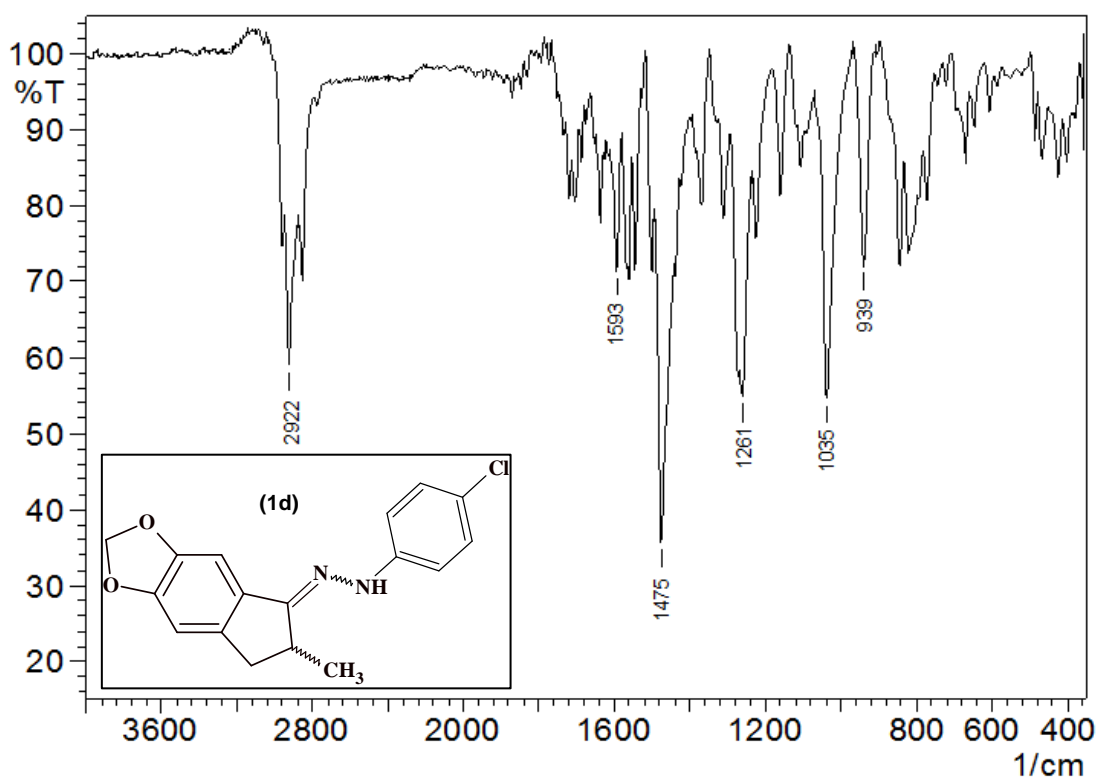


Figura 37: Espectro na região do infravermelho (KBr) do derivado (1d).

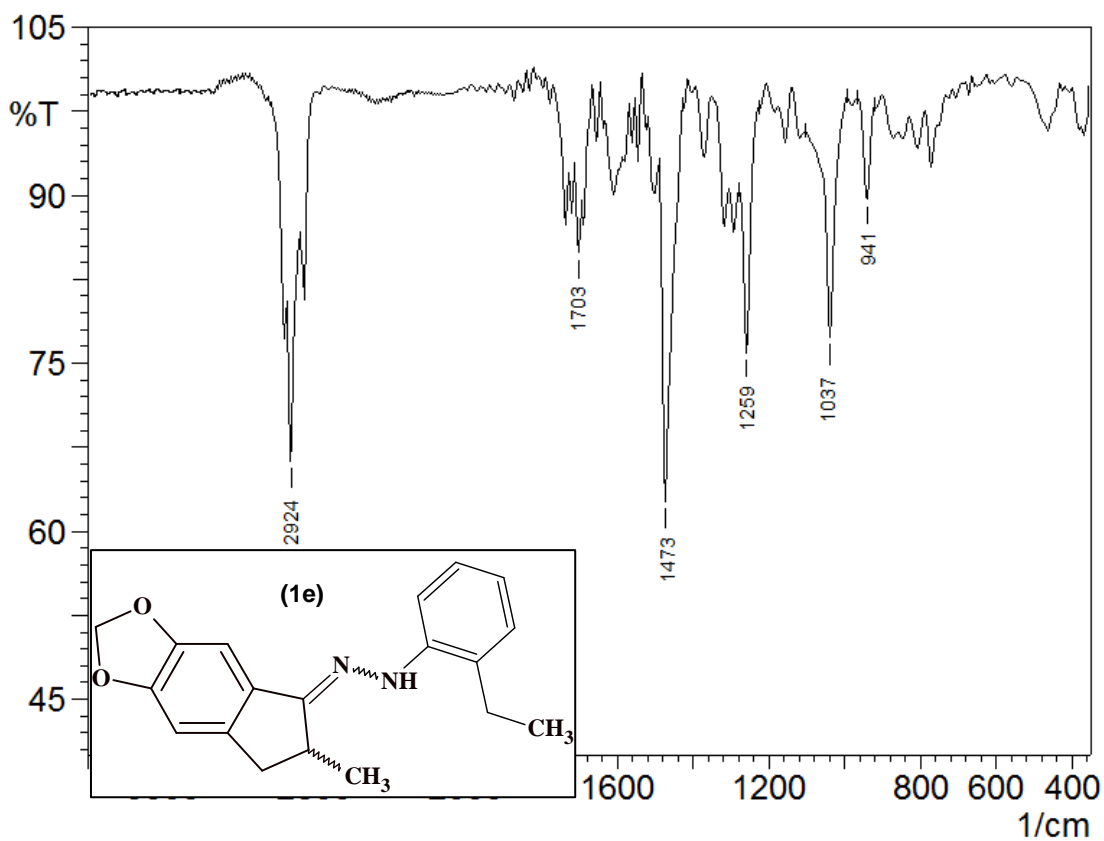


Figura 38: Espectro na região do infravermelho (KBr) do derivado (1e).

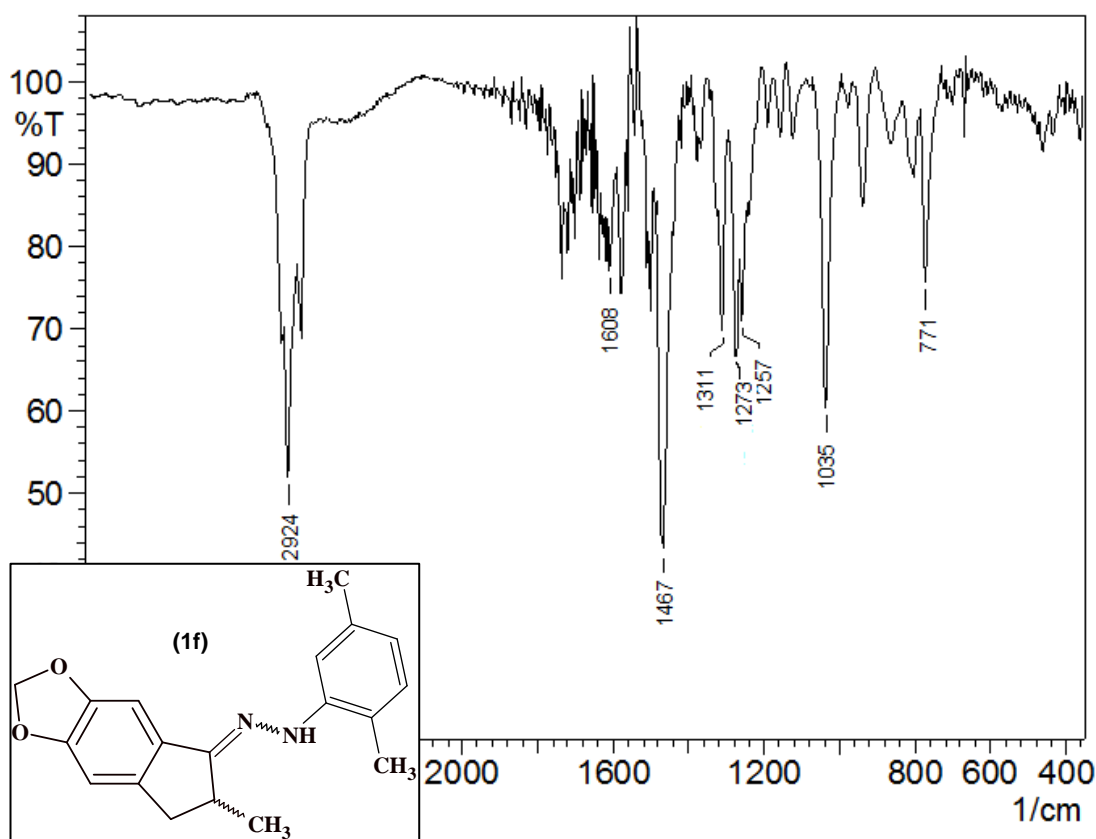


Figura 39: Espectro na região do infravermelho (KBr) do derivado (1f).

A observação das estruturas da nova família dos derivados indano-hidrazônicos (1a-1f) mostrou a possibilidade de isômeros que variam na configuração do centro assimétrico no carbono (9) bem como da geometria E/Z dos compostos sintetizados, representadas na Figura 40 (página 78). Pela análise destas representações pôde-se justificar o fato do sinal referente ao hidrogênio do centro estereogênico em (9) ter aparecido com o deslocamento químico maior nos espectros de RMN ^1H dos compostos finais em comparação ao material de partida (40) como mostra a Tabela 2, página 72. O efeito indutivo do átomo de nitrogênio sobre H9 reduz a densidade eletrônica ao redor deste hidrogênio deixando-o mais desblindado. O efeito indutivo, também exerceu um papel importante em relação à multiplicidade do sinal referente a H9, que se apresentou como um duplete por acoplar exclusivamente com um dos átomos de hidrogênio do carbono metileno na posição (8), ao contrário de um multiplete como ocorreu no material de partida 2-metil-5,6-(metilenodioxi)-1-indanona (40).

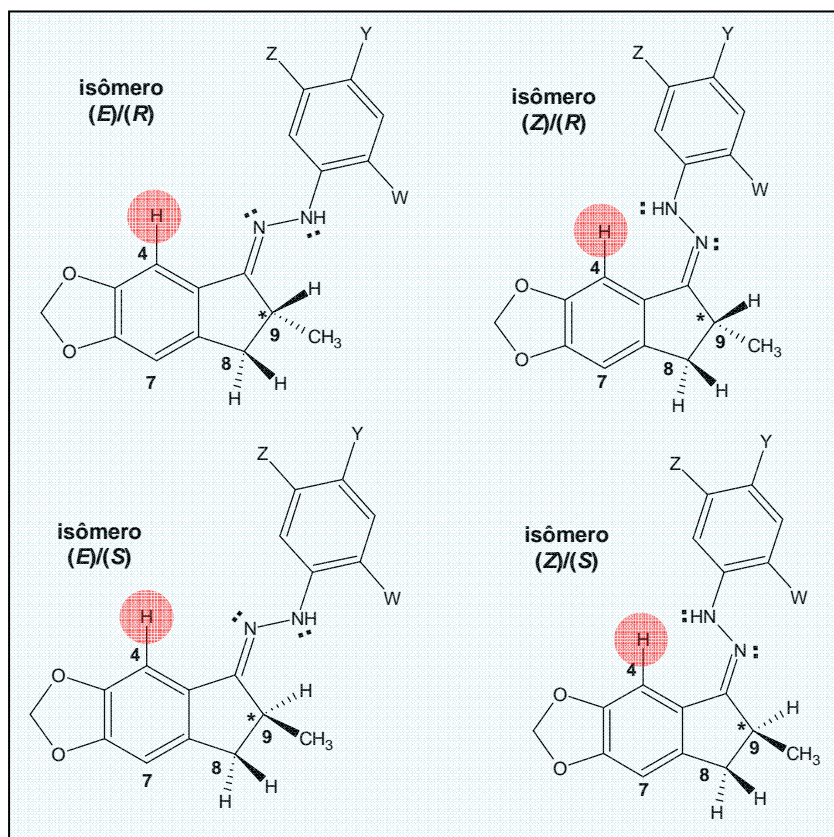


Figura 40: Representação geral da estrutura dos derivados indano-hidrazônicos enfatizando a estereoisomeria dos compostos.

Esta discussão pôde ser aplicada ao primeiro composto (1a) da série de indano-hidrazonas sintetizadas, como mostra a Figura 41 (página 79), em que o sinal referente ao hidrogênio do carbono (9) apareceu com o valor do deslocamento químico mais desblindado e como um duplete centrado em δ 3,06, enquanto o mesmo hidrogênio do centro estereogênico do núcleo indanônico de partida (40) se revelou como um multiplete com deslocamento entre δ 2,48 a 2,66 (Tabela 2, página 72). E conforme ao efeito indutivo do átomo de nitrogênio ou à anisotropia diamagnética da unidade hidrazônica do produto final, há a justificativa do sinal referente ao hidrogênio na posição (8) ter se apresentado apenas como um único duplete centrado em 2,85 ppm já que ocorre uma mudança no ambiente químico para este hidrogênio em relação ao material de partida justificando-se a simplificação do sinal. Outro deslocamento químico característico que foi possível visualizar no espectro de hidrogênio é o singlete referente à metila na posição (11) com o valor de 1,46 ppm. (Figura 41, página 79).

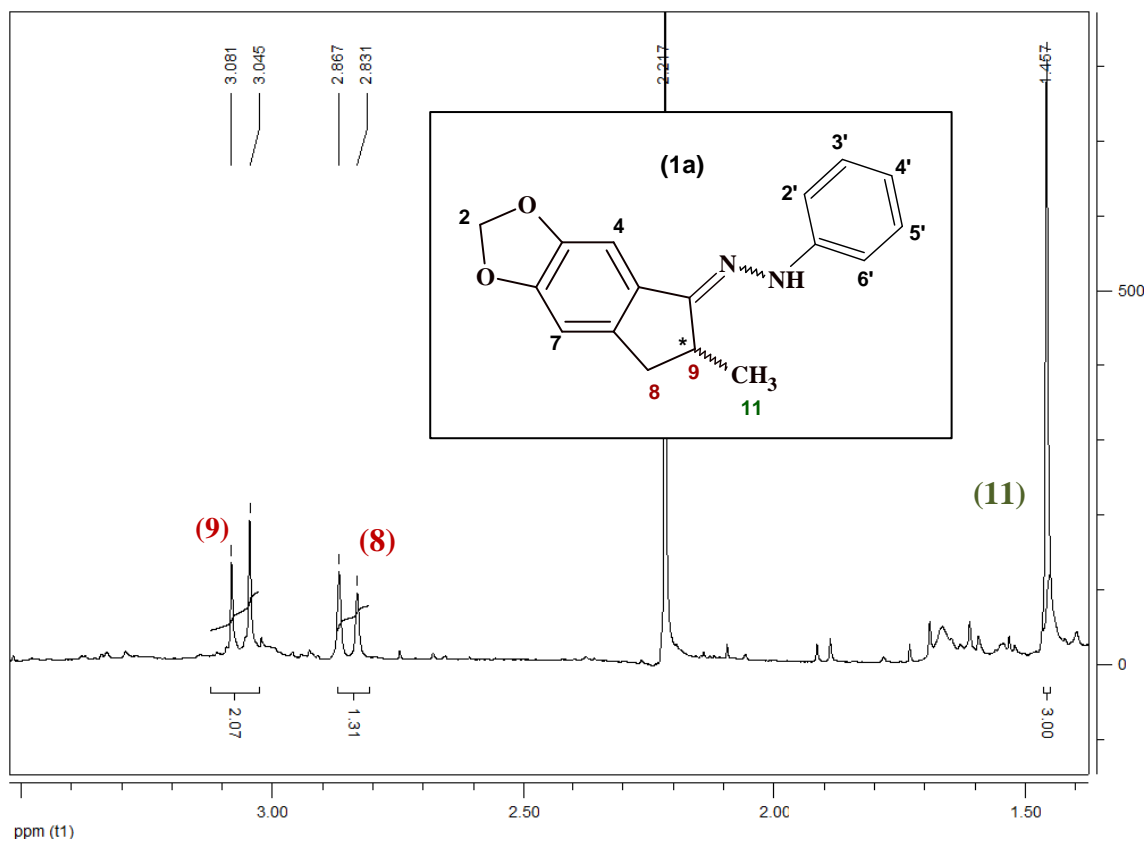


Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, acetona- d_6) do derivado (1a).

Os demais sinais atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos sistemas de anéis do derivado (1a) podem ser visualizados na Figura 42 (página 80), entre os quais, verificou-se a presença de dois singletos em δ 6,92 e 7,31 referente ao sinal do hidrogênio nas posições 7 e 4, respectivamente. Este último hidrogênio dependendo do estereoisômero que prevaleça como produto reacional, como representado na Figura 40 (página 78), favorece o efeito indutivo do nitrogênio da hidrazona sobre H4 fazendo com que o valor do sinal para H4 seja mais desblindado do que para H7. Os demais sinais ocorreram como dois dubletos centrados em δ 7,65 e δ 7,39 podendo ser relacionados a H2' e H6'(Hw) e o multipletto de H4'(Hy) entre δ 7,20 a δ 7,24 e H5'e H3'de δ 7,37 a 7,40, respectivamente. O valor do deslocamento químico referente aos sinais dos hidrogênios do grupo metilenodioxila (H2) ocorreu como um singlete característico em δ 6,09 ppm (Figura 42, página 80).

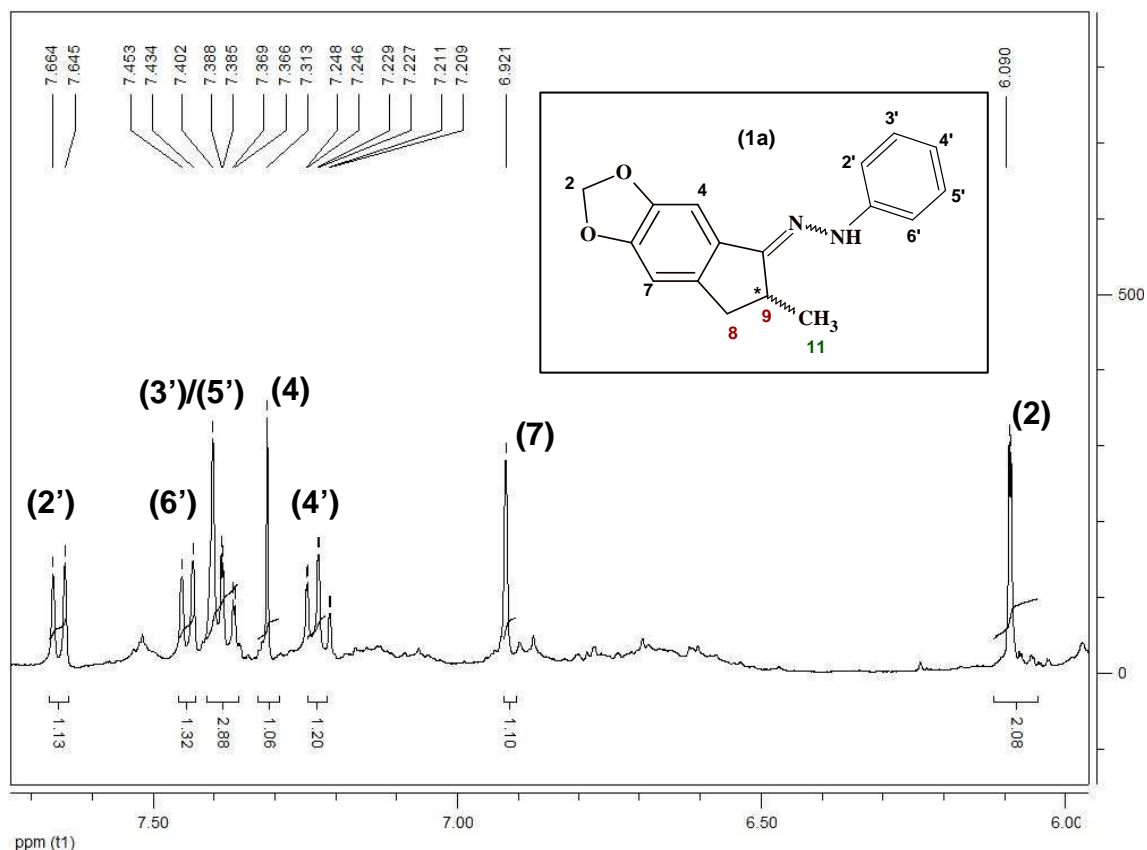


Figura 42: Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, acetona- d_6) do derivado (1a).

O espectro de RMN ^{13}C do composto (1a), representado na Figura 43 (página 81), mostrou a presença de 16 sinais, sendo que na região dos grupos alquila foi possível encontrar aquele referente à metila do C11, em δ 27,9, com o valor de 10 ppm deslocado à esquerda em relação à mesma metila da indanona de partida (40) (C9, Figura 33, página 71) devido ao efeito da anisotropia diamagnética da unidade hidrazônica sobre C11. Já o efeito indutivo dos átomos de nitrogênio da hidrazona interferiu no valor do deslocamento do carbono do grupo metino em C9, com o sinal em δ 30,9 deslocado a 11 ppm para a esquerda em relação ao grupo metino relacionado ao núcleo indanônico (40) (C2, Figura 33, página 71). Com o valor de sinal mais desblindado apareceu o carbono metilênico de C8 em δ 38,6. Também foi possível confirmar a presença do grupamento metilenodioxila do C2 em δ 102,0, e os demais sinais referentes aos sistemas de anéis, bem como suas atribuições, foram dispostos na Figura 43 (página 81). Ainda foi observar a existência de seis sinais de baixa intensidade referindo-se aos átomos de carbono que não estão ligados a hidrogênio, sendo que C10 e C1', apareceram como sinais fortemente desblindados que poderiam ter o valor de δ 143,7 e δ 148,2

respectivamente (Figura 43). Uma vez que as estruturas sintetizadas são inéditas e não são descritas na literatura, torna-se necessário a realização de determinações espectroscópicas bidimensionais para confirmar as atribuições que foram dadas a cada sinal de carbono.

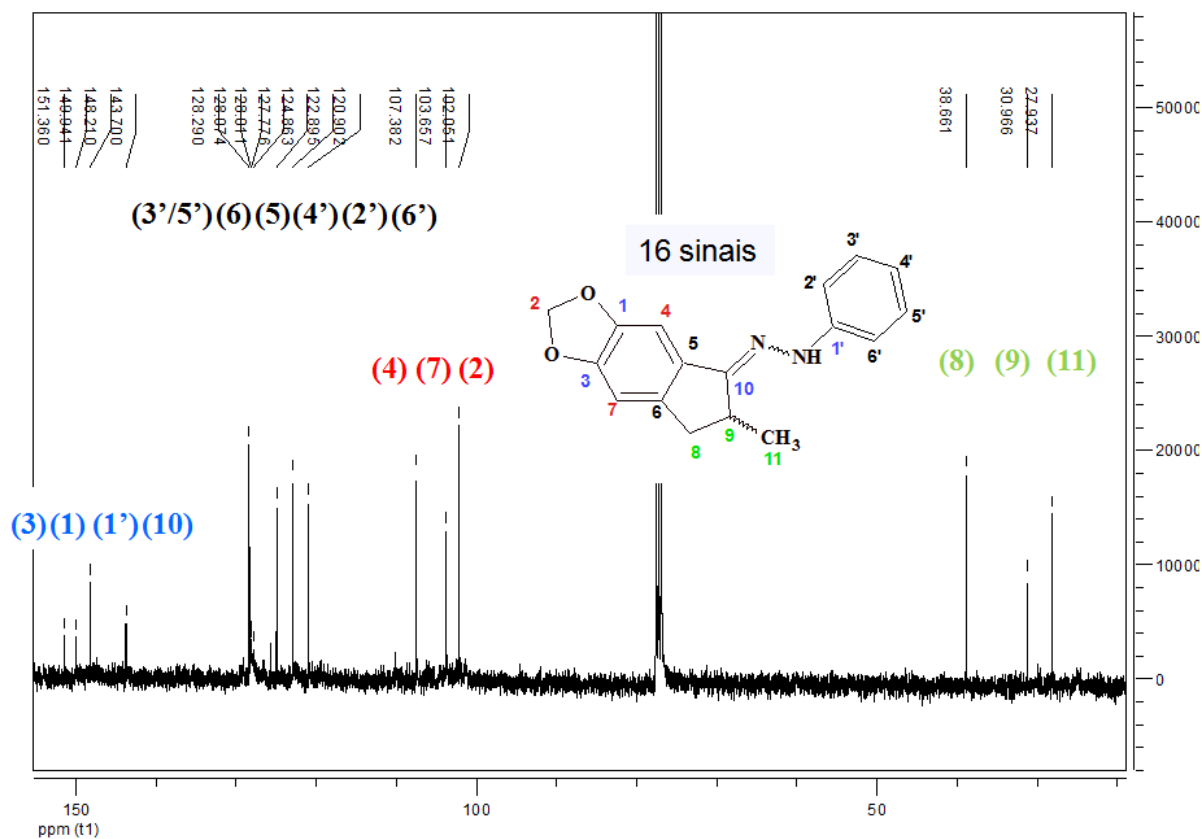


Figura 43: Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, TMS, CDCl₃) do derivado (1a).

Para o derivado (1b), o espectro de RMN ¹H na região dos grupos alquila mostrou um duplete centrado em δ 1,12 atribuído aos átomos de hidrogênio da metila na posição (11) da molécula (Figura 44, página 81). Além do sinal referente a um dos hidrogênios diastereotópicos do grupo metilênico na posição (8) centrado em δ 2,47. Já para o segundo hidrogênio do grupo metilênico em (8) e para o H9 do núcleo assimétrico não foram atribuídos os sinais, pois o valor do deslocamento se sobrepôs ao sinal do solvente em δ 3,36 como se pode ver na Figura 44 (página 82). Dentre os sinais da região dos hidrogênios aromáticos, como era de se esperar, o efeito indutivo da unidade hidrazônica deixou o sinal do H4 (δ 7,06) mais desblindado do que o sinal do hidrogênio em H7 (δ 6,85) como ocorreu para o composto (1a). E os sinais H2' e H6' (Hy) apareceram como um dublete centrado em δ 7,21, e H3' e H5' outro dublete centrado em δ 7,75, além da hidroxila do grupamento ácido que apareceu em δ 9,59 (Figura 45, página 82).



Figura 44: Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, DMSO-d_6) do derivado (1b).

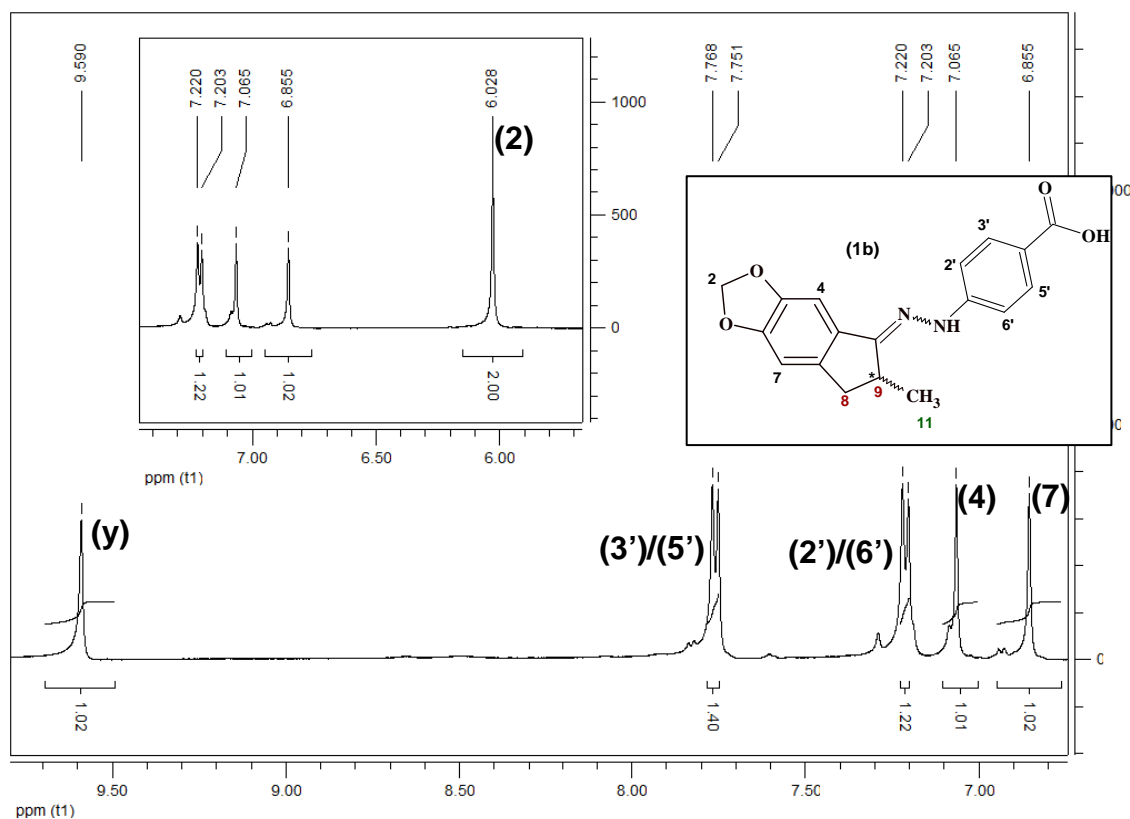


Figura 45: Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, DMSO-d_6) do derivado (1b).

O espectro de RMN ^{13}C para o composto (1b) na Figura 46 mostrou a presença de 16 sinais, sendo que na região dos grupos alquila foi possível encontrar aquele referente à metila do C11, em δ 17,7, seguido pelo C9 em δ 33,4 no qual o efeito indutivo da unidade hidrazônica foi pronunciada deixando o sinal mais desblindado do que o centro assimétrico da indonona de partida (40) que apareceu em δ 42,2 (C2, Figura 33, página 71). Já o grupo metilênico do C8 apareceu em δ 37,6. Também foi possível confirmar a presença do grupamento metilenodioxila do C2 em δ 100,2 e os demais sinais referentes aos sistemas de anéis podem ser vistos na Figura 46 e suas atribuições foram dispostas na Tabela 6 (página 86). Ainda foi possível evidenciar seis sinais de baixa intensidade referindo-se aos átomos de carbono que não estão ligados a hidrogênio sendo que o C10 e C1' apareceram como picos fortemente desblindados que poderiam ter o valor de δ 147,0 e δ 149,3 respectivamente (Figura 46) sendo necessária a realização de análises espectroscópicas bidimensionais para confirmar as atribuições de cada sinal de carbono.

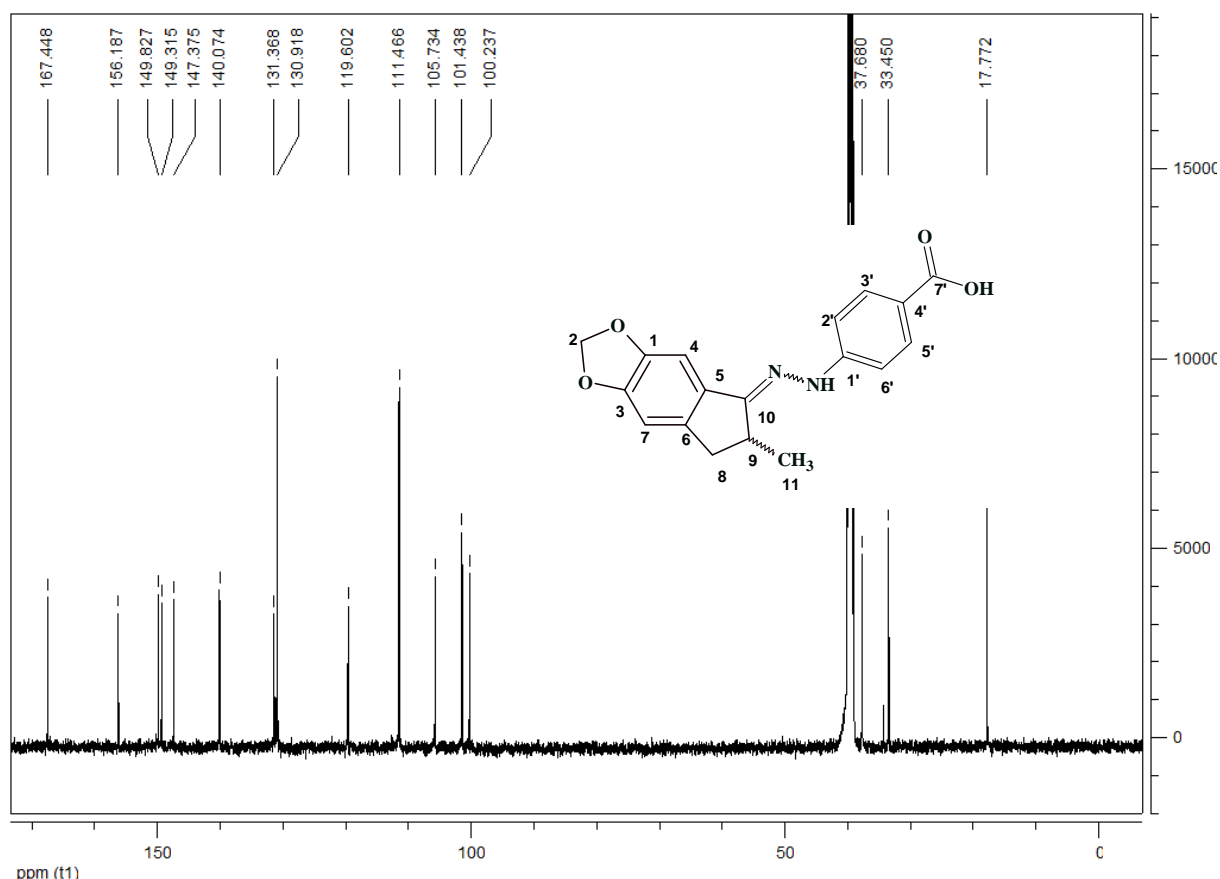
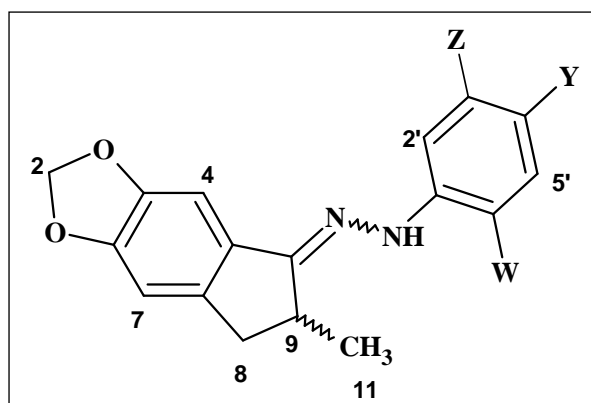


Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3) do derivado (1b).

As atribuições dos sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C das demais moléculas dos compostos finais (1c-1d) podem ser vistos nas Tabela 5 e Tabela 6 (páginas 84 e 86) e seus

respectivos espectros foram dispostos nas Figura 47 aFigura 54 (páginas 87 a 94). Da análise dos espectros de RMN ^1H e demais técnicas empregadas para a caracterização dos compostos não foi possível diferenciar sinais relacionados a cada isômero do produto final da via de síntese empregada, nem tão pouco estabelecer a proporcionalidade da relação diastereoisomérica dos derivados indano-hidrazônicos (1a-1f) por meio da integração dos sinais do espectro de RMN ^1H . Isso mostrou a necessidade de se aplicar outras técnicas de separação além da coluna de vidro, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), estudando-se o sistema de solvente a ser empregado e até a mesmo a possibilidade do uso de fase estacionária quiral. A utilização de outras técnicas de RMN, empregando-se o efeito nuclear Overhauser (NOE), possibilitaria verificar a presença de mais de um estereoisômero e a proporção entre eles.

Tabela 5: Dados de RMN ^1H (200 MHz, TMS, CDCl_3 ou acetona- d_6) em ppm dos derivados indano-hidrazônicos (1 a-f) (CONTINUA)



Derivado	H2	H4	H7	H8	H9	H11	H2'	H5'	W	Y	Z
1a	6,09 (s)	7,31 (s)	6,92 (s)	2,85 (d) J= 14,8	3,06 (d) J=14,0	1,45 (s)	7,65 (d) J = 7,64	7,37 –7,40 (m)	<u>H</u> 7,39 (d) J = 7,29	<u>H</u> 7,20 – 7,24 (m)	<u>H</u> 7,37 – 7,40 (m)
1b	6,02 (s)	7,06 (s)	6,85 (s)	A = 2,47 (d) J=14,62 B #	#	1,12 (d) J =6,74	7,21 (d) J = 8,65	7,75(d) J = 8,47	<u>H</u> 7,21 (d) J = 8,65	COOH 9,59 (s)	<u>H</u> 7,75 (d) J = 8,47
1c	6,07 (s)	7,12 (s)	6,92 (s)	A = 2,88 (dd**) B = 3,18 (d) J = 17,0	4,04 (d) J = 18,0	1,26 (d) J= 10,5	7,36 (d) J = 8,74	<u>H</u> 7,48 (d) J = 8,0	<u>H</u> 7,36 (d) J = 8,74	- Br	<u>H</u> 7,48 (d) J = 8,0

J = Hz

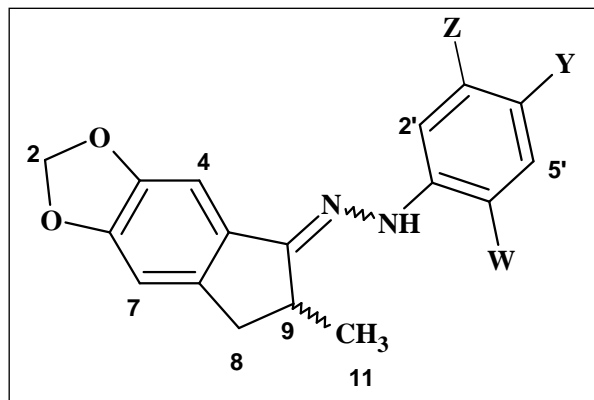
A = Sinal de menor deslocamento

B = Sinal de maior deslocamento

Sinal não observado no espectro, devido à sobreposição de sinais.

** Não é possível calcular a constante de acoplamento (J).

Erro! Fonte de referência não encontrada.



1d	6,00 (s)	6,89 (s)	6,78 (s)	A = 2,21 (t) B = 3,08 (d) J = 14,0	3,94 (d) J = 16,8	#	7,28 (d) J = 2,3	<u>H</u> 7,35 (d) J = 2,3	7,28 (d) J = 2,3	- Cl	<u>H</u> 7,35 (d) J = 2,3
1e	6,10 (s)	7,16 (s)	6,85 (s)	A = 2,65 (dd) J=3,05/ J=3,50 B = 3,32 (dd) J=7,7/J=7,5	3,37 (d) J = 6,7	1,30 (s)	7,31 (s)	6,89 (d) J = 8,49	<u>H7'</u> 2,73 – 2,79 (m) <u>H8'</u> 1,35 (d) J=7,43	<u>H</u> 6,72 – 6,73 (m)	<u>H</u> 6,89 (d) J = 8,49
1f	6,19 (s)	7,92 (s)	7,00 (s)	A # B = 3,23 (t)	3,51 (d) J = 25,0	1,61 (s)	#	7,17 (d) ³ J = 7,97	<u>CH</u> ₃ 2,64 (s)	<u>H</u> 7,05 J = 7,87	<u>CH</u> ₃ 2,44 (s)

$J = \text{Hz}$

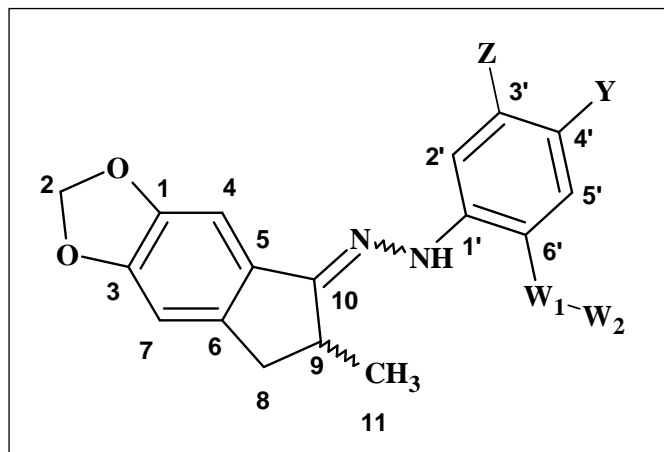
A = Sinal de menor deslocamento

B = Sinal de maior deslocamento

Sinal não observado no espectro, devido à sobreposição de sinais.

** Não é possível calcular a constante de acoplamento (J).

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3 ou DMSO-d_6) em ppm dos derivados indano-hidrazônicos (1 a-1f)



Derivado	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
1a	149,9	102,0	151,4	107,4	127,7	128,0	103,6	38,6	30,9	143,7	27,9
1b	149,8	100,2	156,2	105,7	131,4	140,0	101,4	37,6	33,4	147,0	17,7
1c	147,8	101,4	148,9	102,6	128,3	133,7	105,6	41,8	34,9	146,8	14,9
1d	149,6	102,0	151,4	103,8	125,9	130,5	107,4	38,4	27,8	148,3	14,2
1e	143,3	102,1	149,1	104,3	127,5	131,4	105,1	38,5	33,2	146,3	17,5
1f	145,4	102,7	148,8	105,8	127,6	130,6	106,3	38,7	34,4	141,8	17,7

Derivado	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	CW1	CW2	CY	CZ'
1a	148,2	122,9	128,0	124,8	128,3	120,9	-	-	-	-
1b	149,3	111,5	130,9	119,6	130,9	111,5	-	-	167,4	-
1c	138,0	114,5	130,7	111,8	130,7	114,5	-	-	-	-
1d	145,3	121,6	127,8	128,3	127,8	121,6	-	-	-	-
1e	137,2	113,1	129,1	125,6	128,7	121,2	13,1	12,3	-	12,8
1f	139,4	122,7	130,9	127,7	128,9	123,8	17,31	-	27,0	-

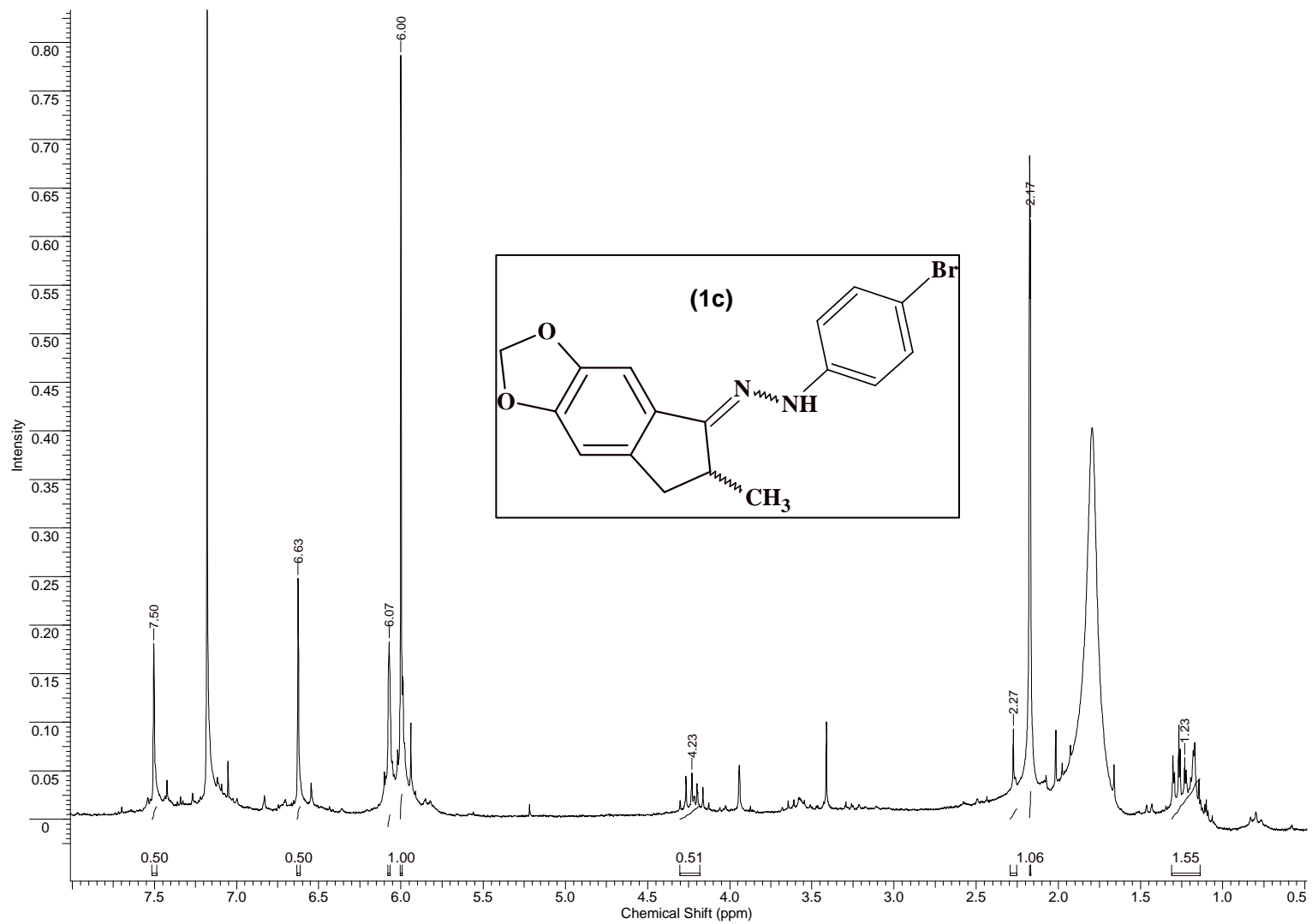


Figura 47: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, TMS, CDCl_3) para o derivado (1c).

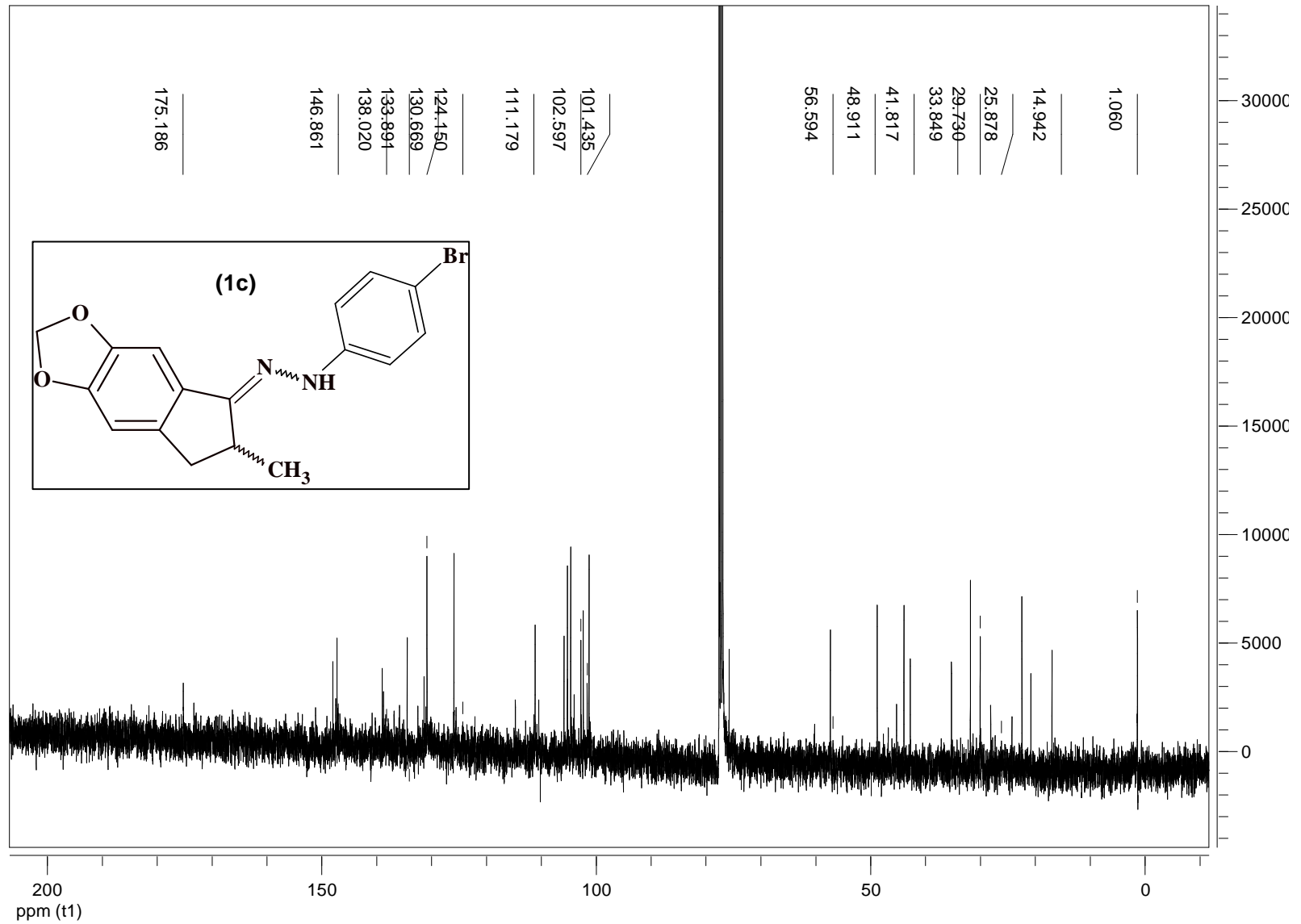


Figura 48: Espectro de RMN¹³C (50 MHz, TMS, CDCl₃) do derivado para o derivado (1c).

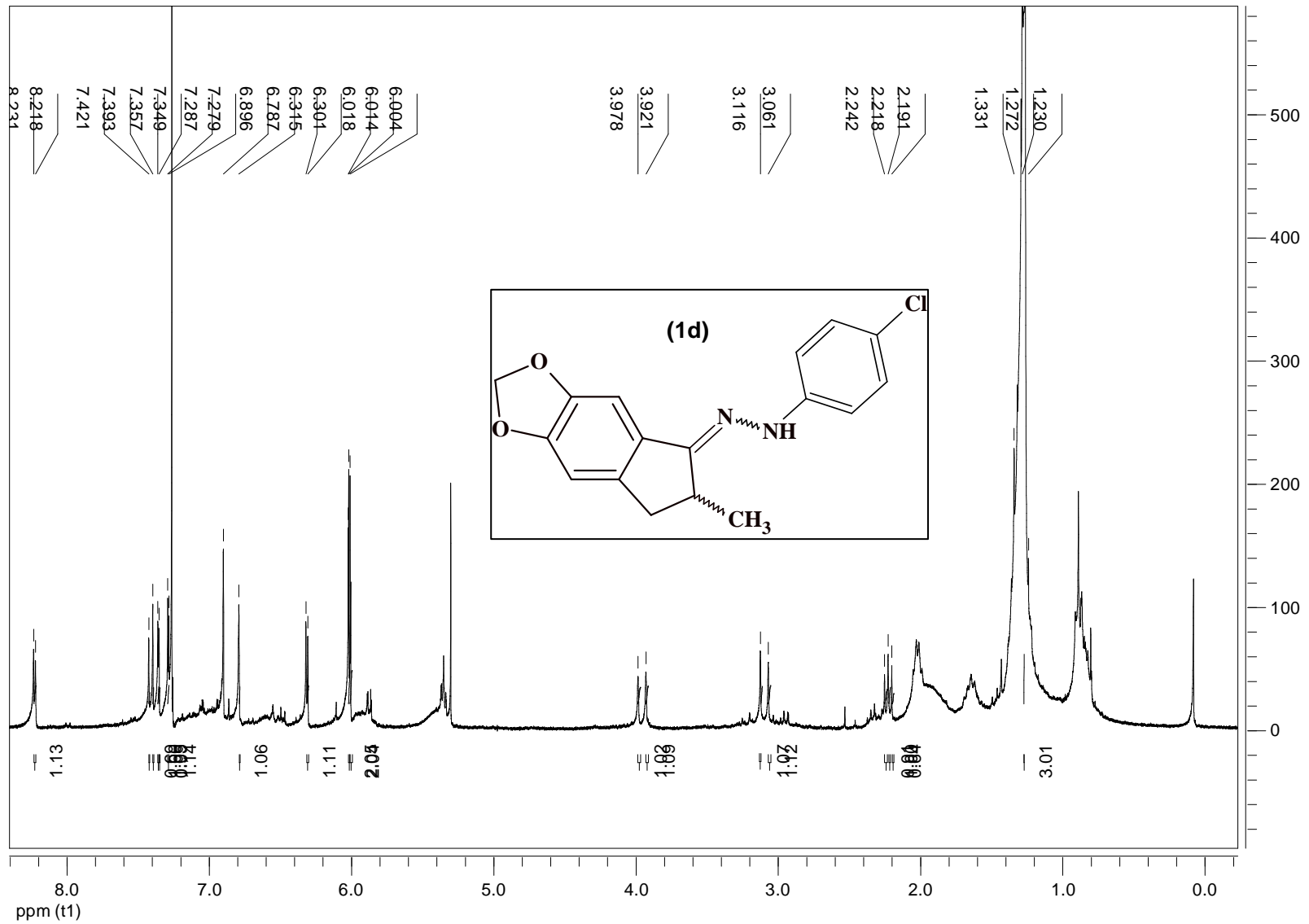


Figura 49: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, TMS, CDCl₃) para o derivado (1d).

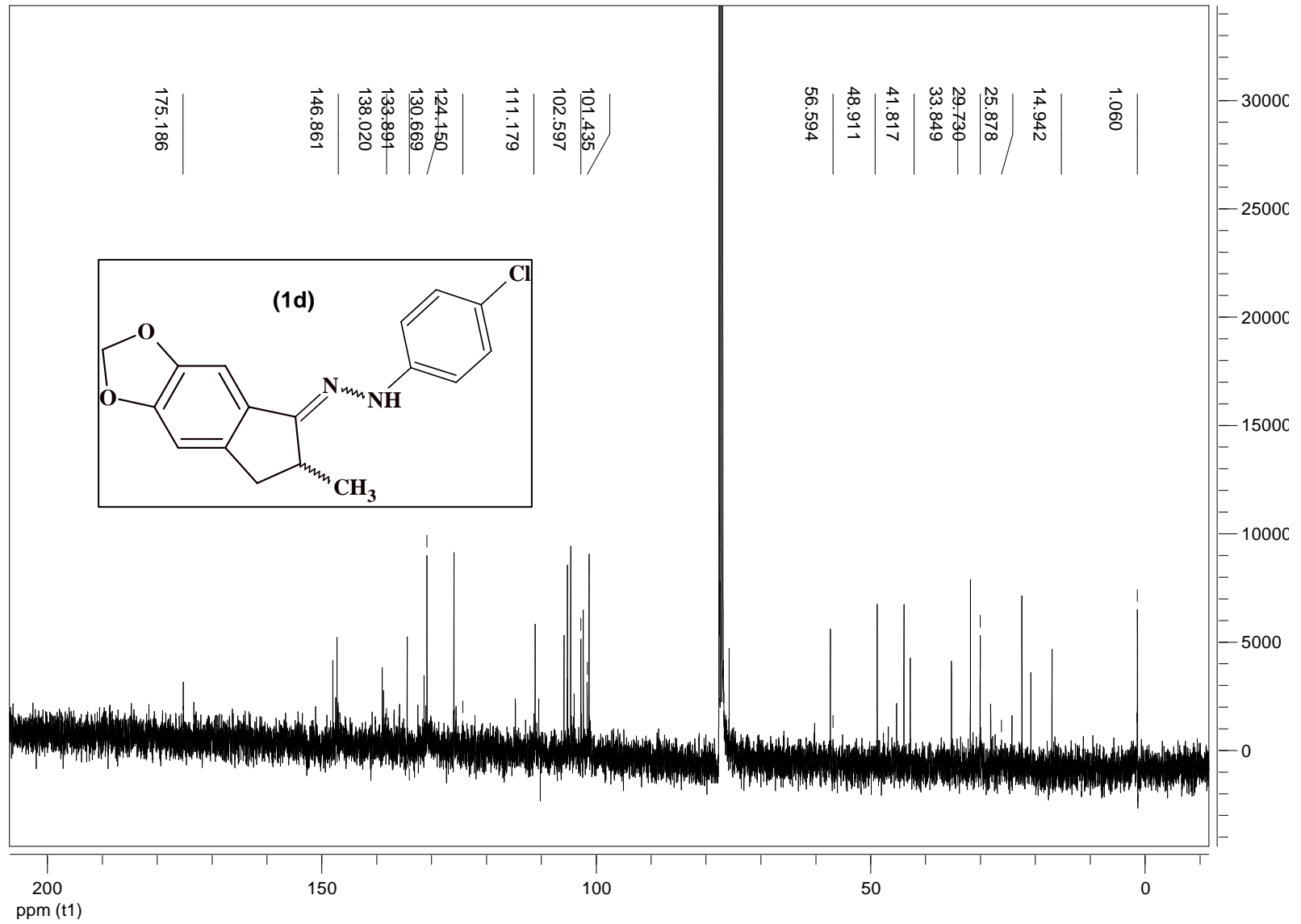


Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3) do derivado (1d).

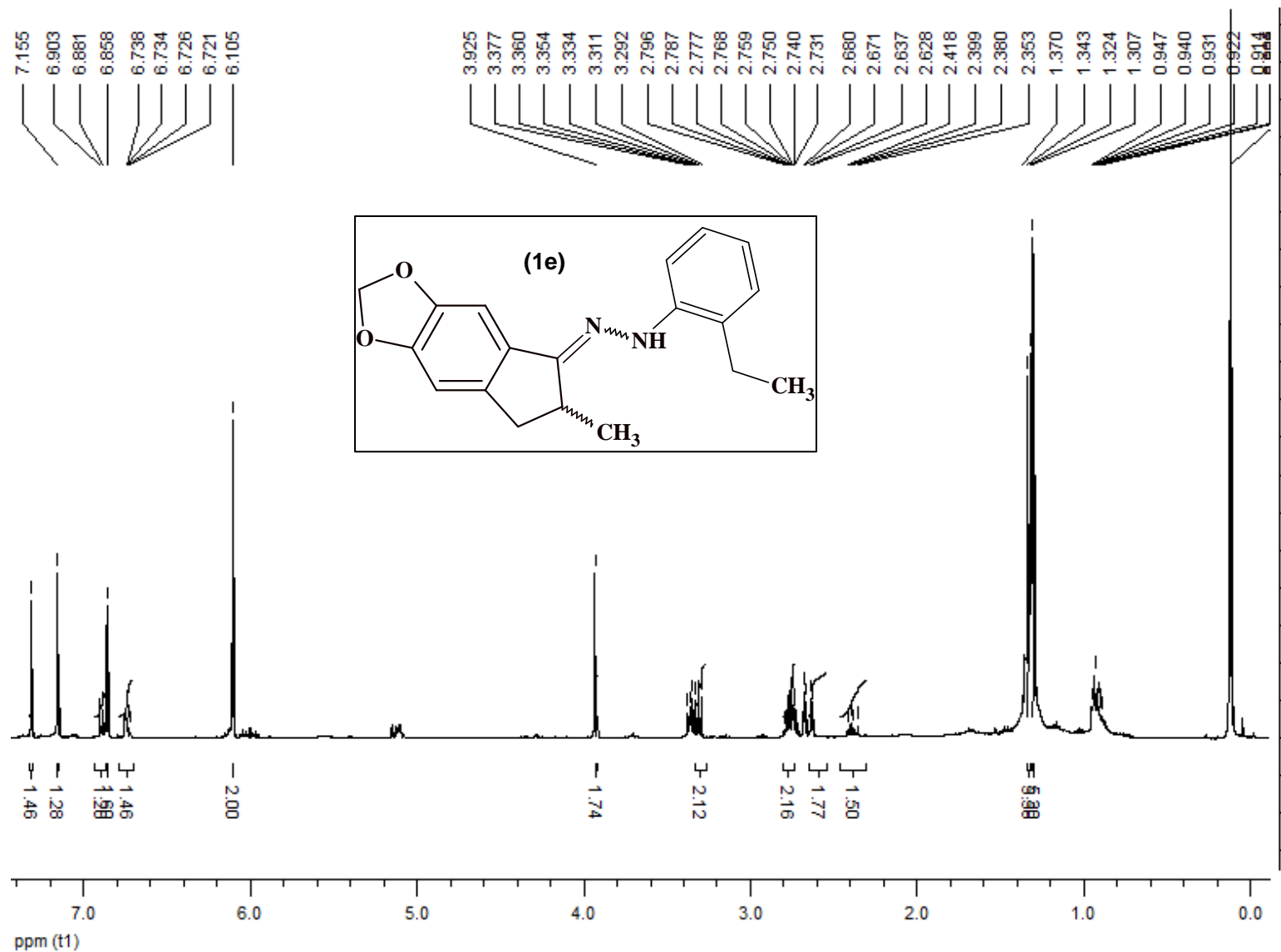


Figura 51: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, TMS, CDCl₃) para o derivado (1e).

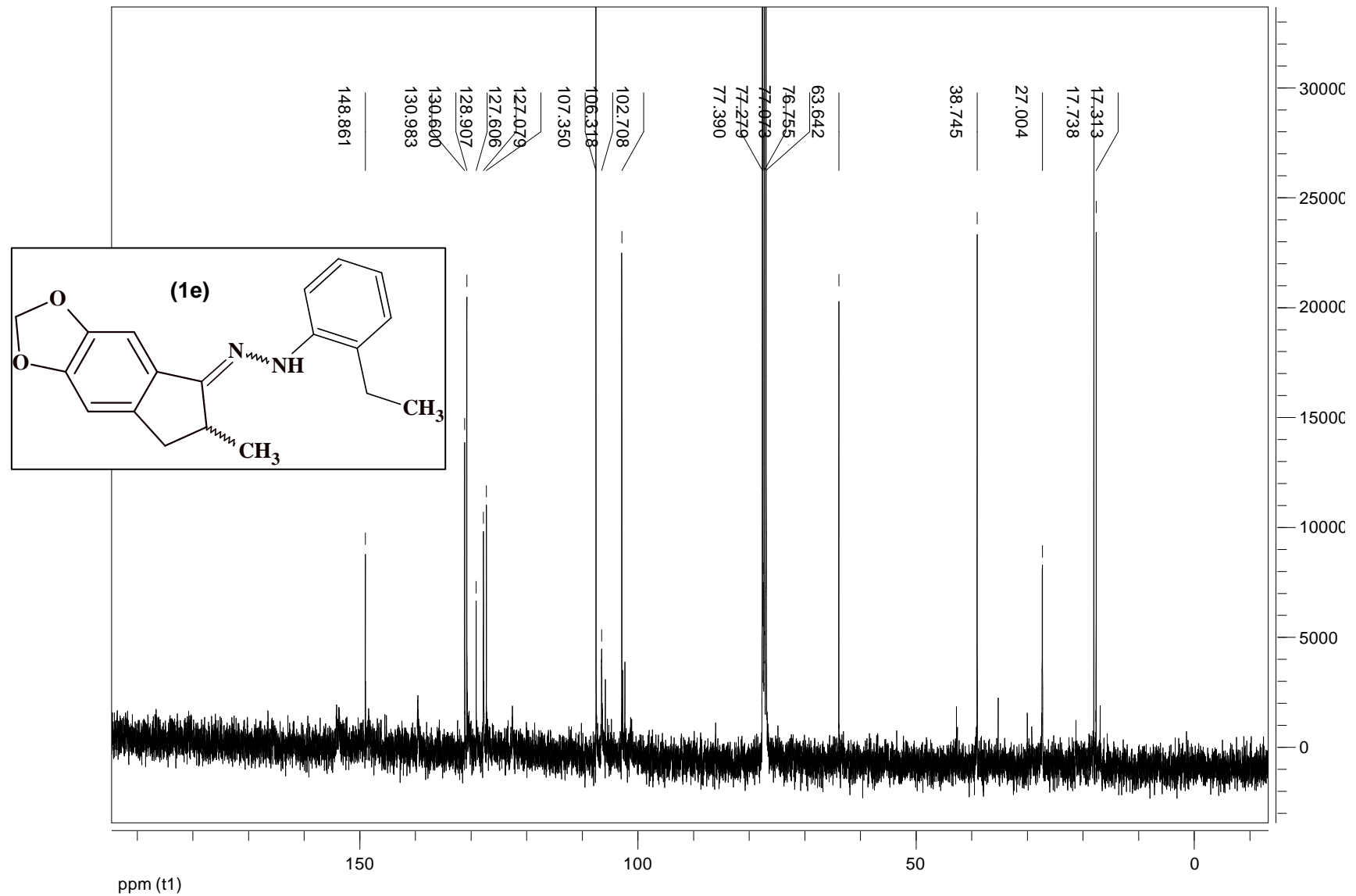


Figura 52: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3) para o derivado (1e).

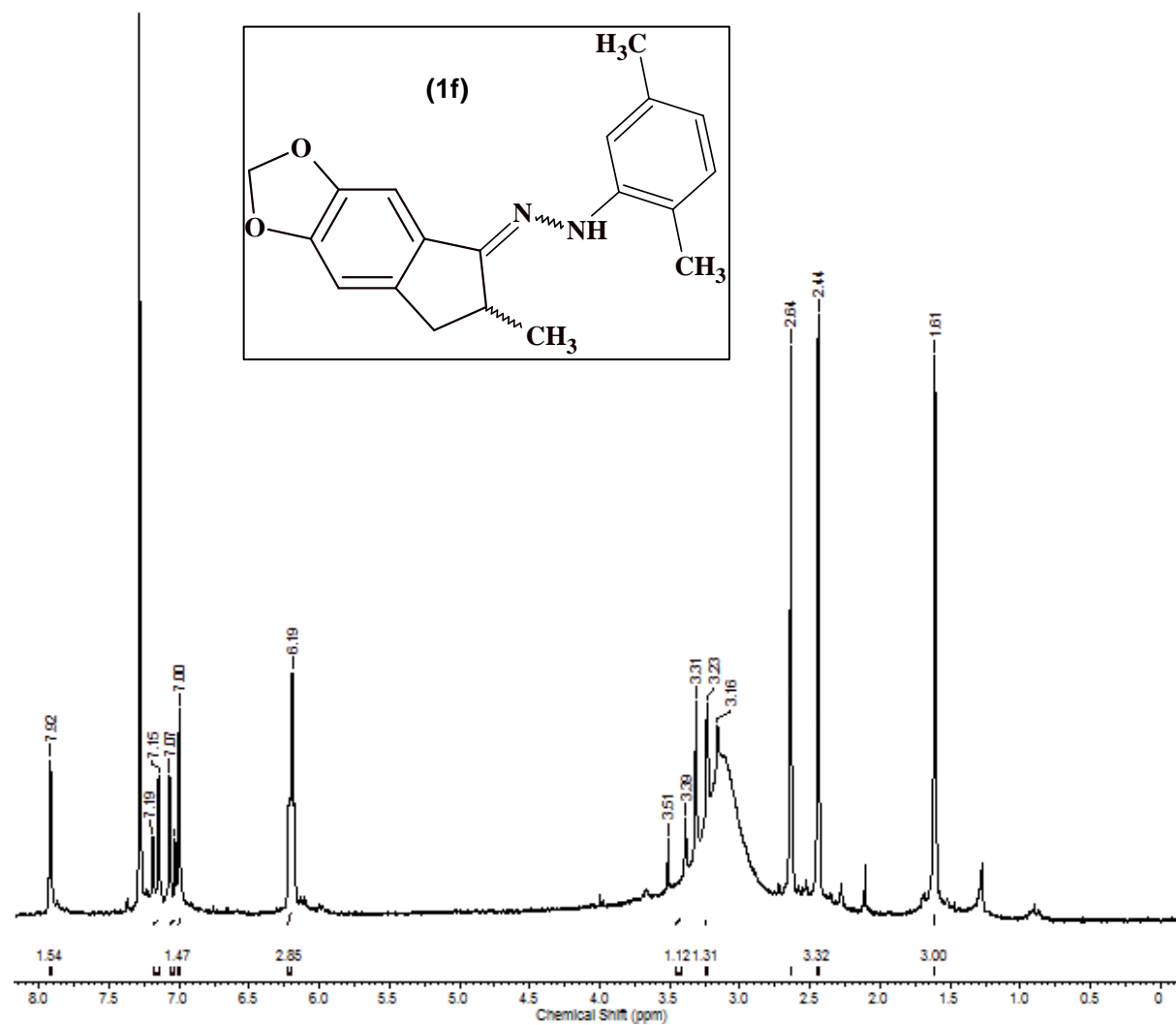


Figura 53: Espectro RMN ^1H (200 MHz, TMS, CDCl_3) do derivado (1f).

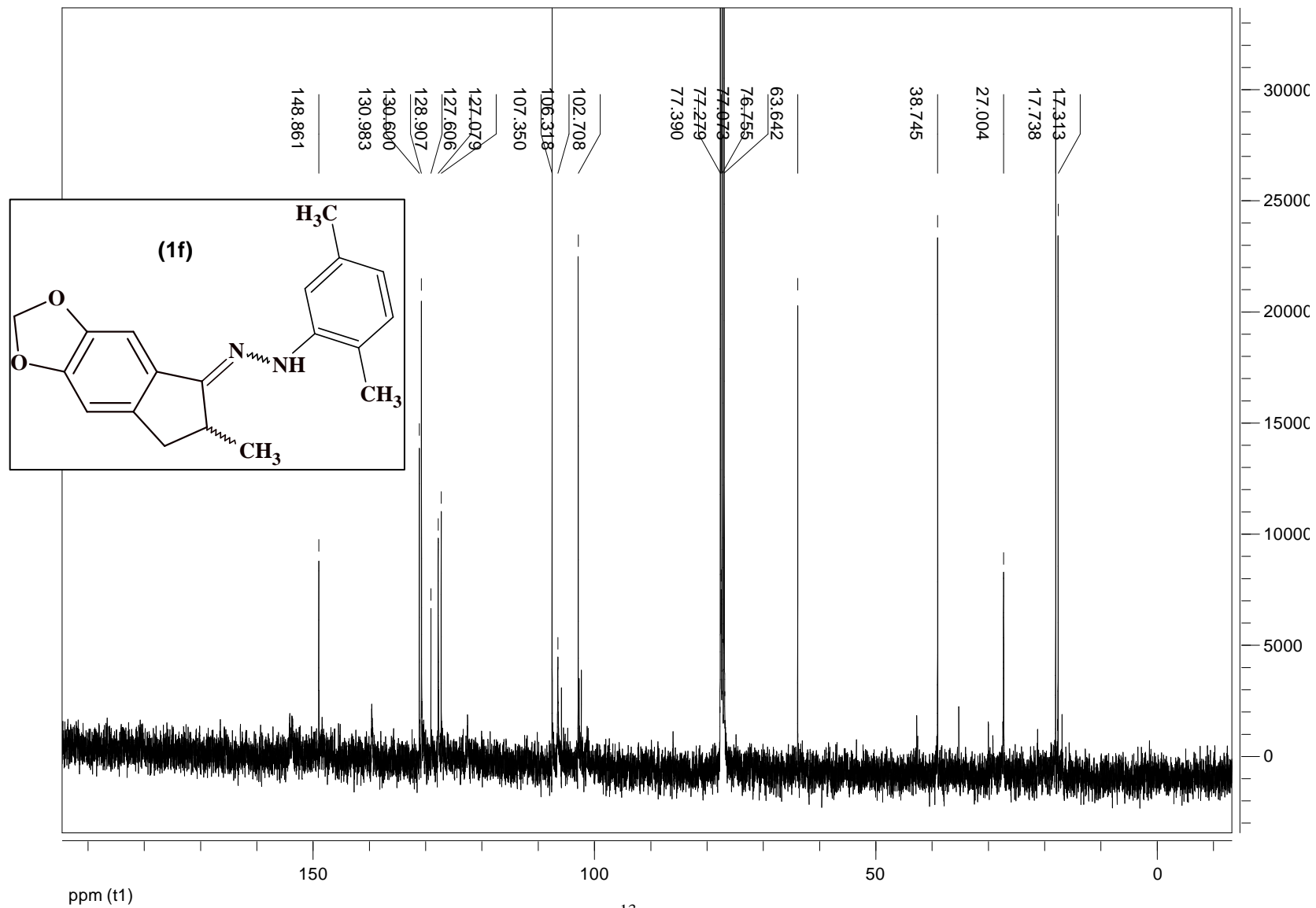


Figura 54: Espectro RMN ^{13}C (50 MHz, TMS, CDCl_3) do derivado (1f)

5.5. ENSAIO DE INIBIÇÃO DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

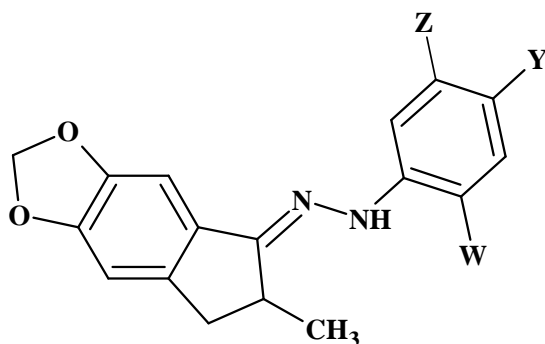
A atividade anti-nociceptiva relacionada com a ação anti-inflamatória dos novos derivados indano-hidrazônicos foi avaliada utilizando-se o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Este tipo de teste é um dos ensaios mais empregados como método de triagem (*screening*) para agentes analgésicos não-narcóticos, vastamente utilizados na avaliação de novos AINEs (BEZERRA NETO, 2004). A quantificação de prostaglandinas por radio-imuno-ensaio no exsudado peritoneal de ratos, obtidos após injeção intraperitoneal de ácido acético, revelou altos níveis de PGE₂ e PGF_{2α} durante os 30 primeiros minutos, como descreve Deraedt e colaboradores (1980). A maior liberação de prostaglandinas também é acompanhada por maiores níveis de mediadores do sistema nervoso simpático como a norepinefrina e acetilcolina e assim, tanto substâncias com atividade anti-inflamatória como colinérgicos ou anti-adrenérgicos podem estar envolvidos na atividade analgésica periférica (FERREIRA *et al*, 2003. BORSATO *et al*, 2000).

Todos os compostos avaliados foram administrados por via oral numa dose de triagem de 100 µmol/Kg e veiculados em tween/ etanol/ água, na proporção de 1: 1: 100 (0,1 mL/20 g de peso do animal), uma hora antes da injeção do ácido acético. O veículo (tween/etanol/água) que é o grupo controle teve seu efeito avaliado nas mesmas condições e não interferiu no número de contorções. Já o número de contorções obtido para cada derivado testado, foi comparado com o controle (veículo) e a atividade expressa em porcentagem de inibição. Os resultados foram expostos na Tabela 7 e Gráfico 1 e pela análise pôde-se verificar que todos os derivados apresentaram atividade anti-nociceptiva na dose testada sendo que (1c), com o bromo na posição *para* do anel aromático, e (1e) com o grupo etila na posição *orto* foram os que mostraram maior propriedade anti-nociceptiva com 51,0% e 48,6% de inibição das contorções abdominais, respectivamente.

O derivado (1e), com a etila na posição *orto*, e o derivado (1f), com metilas nas posições *orto* e *meta*, possuem substituintes com efeito indutivo doador de elétrons e confere maior volume à molécula destes compostos refletindo na porcentagem de inibição das contorções. O derivado (1a) apresentou 32,9% de inibição das contorções e o (1b) 27,3 %. Este último composto (1b) apresentou atividade de inibição significativa, apesar de se esperar que talvez fosse o mais ativo da série, já que apresenta o grupo ácido carboxílico como substituinte o que mimetizaria o modo de interação de outros AINES ácidos já empregados na

terapêutica, por exemplo, o fluorbiprofeno (33) que interage com resíduo da Arg120 do sítio ativo das isoformas da PGHS, por meio de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas.

Tabela 7: Resultados da avaliação anti-nociceptiva dos compostos indano-hidrazônicos através do teste da contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N em camundongos suíços.



1a: W= H, Y= H, Z= H

1b: W= H, Y= COOH, Z= H

1c: W= H, Y= Br, Z= H

1d: W= H, Y= Cl, Z= H

1e: W= C₂H₅, Y= H, Z= H

1f: W= CH₃, Y= H, Z= CH₃

Compostos (100 μmols/kg)	N	Nº de contorções	% Inibição
Controle	10	71,9 ± 5,8	-
1 a	10	48,3 ± 2,6	32,9**
1 b	10	52,3 ± 2,5	27,3**
1 c	10	35,2 ± 3,2	51,0***
1 d	10	62,4 ± 2,8	13,2 n.s.
1 e	10	37,0 ± 4,3	48,6***
1 f	10	44,3 ± 5,7	38,4**

Os resultados são expressos em média ± erro padrão; n= n° de animais; **Análise Estatística:** ** e *** representam valores $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente quando comparados com o grupo controle; **n.s.:** não significativo

O análogo halogenado com o átomo de cloro na posição *para* (1d) não teve uma ação nociceptiva significativa (13,2%) apesar do composto bromado apresentar a maior porcentagem de inibição (51,0%), o que pode ser justificado pela diferença na absorção gastrointestinal. Os valores alcançados com o teste biológico são resultados preliminares e a existência de dados inesperados pode ser justificada pela ação em alvos biológicos distintos do que na PGHS. Os compostos sintetizados podem atuar em níveis diferentes da cascata do ácido araquidônico, ou até mesmo em bioreceptores que não estejam envolvidos no metabolismo deste substrato, mas que contenha alguma relação com os eventos

desencadeados por um estímulo doloroso inflamatório responsável pela hipersensibilidade e alodinia. Além disso, uma absorção não efetiva das substâncias testadas pelo trato gastrointestinal, ou ainda pela metabolização por vias alternativas do metabolismo pode estar presente levando aos resultados alcançados.

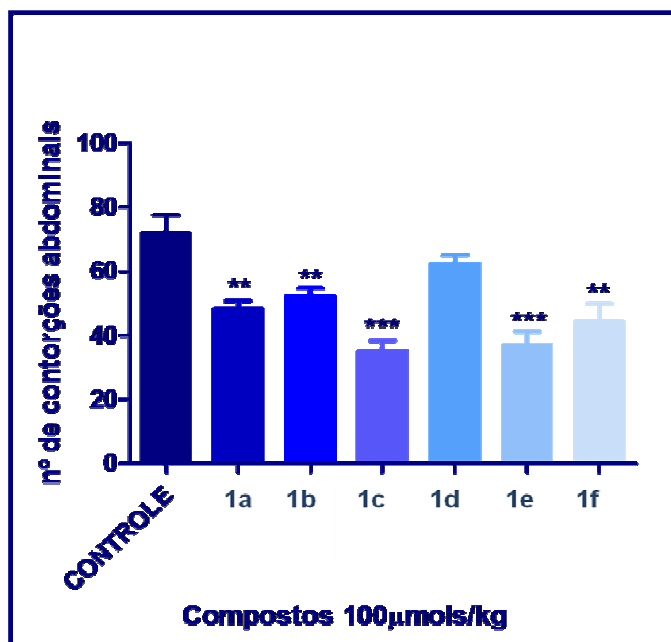


Gráfico 1: Efeito anti-nociceptivo dos compostos indano-hidrazônicos no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N em camundongos suíços. ** e *** representam valores $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A estratégia de síntese dos derivados indano-hidrazônicos (1a-1f), utilizando o safrol como material de partida e a aplicação de metodologias sintéticas clássicas, mostrou-se relativamente satisfatória, permitindo a obtenção das moléculas-alvo em rendimentos globais que variaram entre 26% a 31% mas com a necessidade de se otimizar o tempo reacional da última etapa sintética de condensação das arilidrazinas com a cetona indanônica. A utilização de outros métodos de identificação, empregando-se o efeito nuclear Overhauser (NOE) aliado a melhores técnicas de separação além da coluna de vidro, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), estudando-se o sistema de solvente a ser empregado e a possibilidade do uso de fase estacionária quiral, torna-se necessário para determinar com clareza a proporção da mistura dos estereoisômeros dos compostos finais.

O resultado da avaliação anti-nociceptiva, no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, mostrou que todos os compostos indano-hidrazônicos sintetizados apresentaram atividade de analgesia periférica, sendo que os padrões estruturais apresentados por (1c) e (1e) foram aqueles que revelaram ação anti-nociceptiva mais pronunciada com 51% e 48,6%, respectivamente. A presença de um grupamento doador de elétrons na posição *orto* como ocorreu para o derivado (1e), que possui a etila como substituinte, e de um grupamento na posição *para* com efeito indutivo retirador de elétrons como no composto (1c), que contém o bromo, conferiu maior porcentagem de inibição das contorções abdominais. Como foi planejado, o derivado com o grupo carboxílico na posição *para* (1b), apresentou efeito anti-nociceptivo, com 27,3% de inibição, uma vez que mimetiza o caráter estrutural ácido de outros AINES empregados na terapêutica capazes de inibir as isoformas da PGHS e promover o alívio da dor. A diferença da porcentagem de inibição das contorções do composto (1c) (51%) e de seu análogo halogenado como o cloro como substituinte (1d) (13,2%, ns) pode ser justificado pela diferença na absorção pelo trato gastrointestinal justificando o resultado apresentado.

O modelo de ensaio farmacológico empregado para avaliar os compostos indano-hidrazônicos (1a-1f) mostrou a ação de analgesia periférica sendo necessária a realização de mais testes com outra dosagem para a determinação da potência dos novos congêneres. Além da síntese de maior quantidade destes compostos para que ensaios relacionados com a atividade anti-inflamatória sejam realizados e desta forma avaliar quais mecanismos envolvidos no perfil analgésico apresentado por tais substâncias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARUN, B.; GOSS, P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. **Semin. Oncol.**, v.31, p.22-29, 2004.

ABADI, A. H.; HEGAZY, G. H.; EL-ZAHER, A. A. Synthesis of novel 4-substituted-7-trifluoromethylquinoline derivatives with nitric oxide releasing properties and their evaluation as analgesic and anti-inflammatory agents. **Bioorg. Med. Chem.**, n.13, p.5759–5765, 2005

ABRAMOVITZ, M.; METTERS, K.M. Prostanoid receptors. **Ann. Rep. Med. Chem.**, v.33, p.223-231, 1998

ALAGHA, A. *et al.* Design, synthesis and evaluation of aspirin analogues having an additional carboxylate substituent for antithrombotic activity. **Bioorg. Med. Chem. Let.** n.19, p. 4213 – 4216, 2009.

ALAN, N.S. *et al.* Controle da dor no período perioperatório. **Clin. Cirurg. Am. Norte**, v.79, p. 197-211, 1999.

AMORIN, M.B.; SILVA, A.J.M.; COSTA, P.R.R. The Reaction of Safrole Derivatives With Aluminum Chloride: Improved Procedures for the Preparation of Catechols or their mono-O-Methyl derivatives and a Mechanistic Interpretation. **J.Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 3, p. 346-353, 2001

BANDARAGE, U.K. *et al.* Nitrosothiol esters of diclofenac: synthesis and pharmacological characterization as gastrointestinal-sparing prodrugs. **J. Med. Chem.**, v.43, p. 4005-4016, 2000.

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: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Quím. Nova**, v.22, n.5, 1999.

_____. FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases farmacológicas da ação dos fármacos**. 2 ed Porto Alegre: Artmed, 2008. p 161.

_____. LIMA, M.E.F. The synthesis and antiinflammatory properties of a new sulindac analog synthesized from natural safrole. **J. Pharm. Sciences**, v.81, p. 1219-1222, 1992.

_____. MIRANDA, A.L.P. *et al.* A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quím. Nova**, 25, p. 129-148, 2002.

BARTFAI, T. *et al.* Telling the brain about pain. **Nature**, v. 410, p. 425-427, 2001.

BAYDAR, A. E. *et al.* The Piretrins and Related Compounds. Part XXXIV. Optimisation of Insecticidal Activity in Non-Esters. **Pestic. Sci.**, v. 23, p. 247-257, 1988.

BEZERRA NETO, H. J. C. **Novos derivados 6-nitro-benzodioxola-N-acilidrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, sintetizados a partir do safrol.** 2004. 340 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRJ – Rio de Janeiro, 2004.

BENANI, A. *et al.* Up-regulation of fatty acid metabolizing enzymes mRNA in rat spinal cord during persistent peripheral local inflammation. **Europ. J. of Neurology**, v.18, p.1904-1914, 2003.

BHATTACHARYA, D. K. *et al.* Involvement of arginine 120, glutamate 524 and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. **J Biol. Chem**, v. 271, p. 2179-2184, 1996.

BORSATO, M.L.C. *et al.* Analgesic activity of the ligandans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 809-813, 2000.

BOTTING, Regina M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **J. Therm. Biology**, v.31, p.208–219, 2006.

_____. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clin. Infect. Dis.**, v.31, p.202–210, 2000.

BOUAZIZ-TERRACHET, S. *et al.* Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study. **J. Molec. Modeling**, p. 1-11, 2010.

BREDER, C. D., DEWITT, D. L., KRAIG, R. P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. **J. Comp. Neurol**, v. 355, p. 296-315, 1995.

BURIGO, A.C., CALIXTO J.B., MEDEIROS Y.S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 48, c. 1, p. 106-111, 1996.

BYSTRIANYK, R. An Investigative Report on 'Toxic and Deadly NSAIDs', 2002, disponível em <http://www.healthsentinel.com> acessado em janeiro de 2009.

CABRAL, G. A. *et al.* Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences**, v.77, c.14, p. 1699- 1710, 2005.

CANNON, C.P. *et al.* Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the multinational etoricoxib and diclofenac arthritis longterm(MEDAL) programme: a randomised comparison. **Lancet**, v. 368, p.1771-81, 2006.

CALIXTO, J.B. *et al.* Kinins in pain and inflammation. **Pain**; v.87, p.1–5, 2000.

CARTMELL, T. *et al.* Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **J. Physiol.**, v.526, p.653–661, 2000.

COUTURE, R. *et al.* Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.429, p.161–176, 2001.

CAPONE, M.L., *et al.* Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. Prostaglandins **Other Lipid. Mediat.**, c.82, p.85-94, 2007.

CARO, A. A.; CEDERBAUM, A.I. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. **Free Rad. Biolog. Medicine** v. 40, c. 3, p. 364-375, 2006.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS- SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revi. Bras. de Anestesiologia** v. 54, n. 3, 2004

COURADE, J.P. *et al.* Acetaminophen distribution in the rat central nervous system, **Life Sci.** v.69, p. 1455–1464, 2001.

CHARLIER, C.; MICHAUX, C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Europ. Journ. of Med. Chem.**, v. 38, p. 645-659, 2003

CHANDRASEKHARAN, N.V. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 99, p.13926-13931, 2002.

CHENG, H. F. *et al.* Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. **J. Clin. Invest.**, v.103, p. 953-961, 1999.

CHENG, Y. *et al.* Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. **J. Clin. Invest.**, v.116, p.1391-1399, 2006.

COÊLHO, Helena Lutécia L. Misoprostol: a solução não é tão simples. **Rev. Saúde Pública**, v.32, n.4, p. 394-495, 1998.

COTRAN, R. S. *et al.* **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Saunders, 6 ed, 1999.

COSTA, P.P.C. *et al.* An Improved Synthesis from Natural Safrole of Índole Derivatives Related to Indomethacin. **J. Chem. Research**, v. 4, p. 102-103,1982

COSTA, P.R.R.; RABI, J.A.; QUEIROZ, W.M. The Nature of Solvents Effects in the Reaction of Safrole With Bromine. **J. Chem. Research**, v. 1, p. 20-21, 1984.

COUTAX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p. 359-371, 2005.

DANNHARDT, G., KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. **Europ. J. Med. Chem.**, v.36, p. 109–126, 2001.

DEARET, J.D.G. *et al.* Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **Eur. J. Pharmacol.** v.61, p. 17-24, 1980.

DIAS, L.R.S. *et al.* Synthesis and analgesic properties of 5-acyl-arylhydrazone 1-H pyrazolo [3,4-b] pyridine derivatives. **Pharmacology Acta Helvetiae**, 69, 1994, p. 163-169.

DINARELLO, Charles. A. Anti-inflammatory Agents:Present and Future. **Cell**, v.140, p. 935–950, 2010

DOGNÉ, J.; SUPURAN, C.T.; PRATICO, D. Adverse cardiovascular effects of the coxibs. **J. Med. Chem.**, v.48, p.2251-2257, 2005.

EK, M. *et al.* Inflammatory response – Pathway across the blood-brain barrier. **Nature**, v. 410, p. 430-431, 2001.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Projeto Pimenta Longa. Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre - Embrapa Acre. Disponível em <<http://www22.sede.embrapa.br/pimentalonga/projeto.htm>>. Acesso em: 06 maio 2010

FARSKY, S.H. *et al* Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. **Inflamm. Res.** v.53, p. 442-452, 2004.

FERREIRA D.S. *et al.* Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Ver. Bras. Farm.** v. 84, p. 47-49, 2003.

FIORUCCI, S. *et al.* Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?. **Biochem. Pharmacol.**, v.62, p.1433-1438, 2001.

FRIESEN, R.W. *et al*, 2-pyridinyl-4-(4-methylsulfonyl)phenylpyridines: selective and orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, c.8 p. 2777-2782, 1998.

FRICKE, J. *et al.* Valdecoxib is more efficacious than rofecoxib in relieving pain associated with oral surgery. **J. Ther.** v.9, p.89-97, 2002

FU, J.Y. *et al.* The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.** 265, 16737–16740, 1990

FUTAKI, N. *et al.* Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carragenan-air-ouch inflammation. **J. Pharm. Pharm.**, v.45, p. 753-755, 1993.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1130, 2005.

HARRAK, Y. . *et al.* Synthesis and biological activity of new anti-inflammatory compounds containing the 1,4-benzodioxine and/or pyrrole system. **Bioorg. Med Chem.** V.15, p.4876–4890, 2007.

HEYMANN, M.A.; RUDOLPH, A.M.; SILVERMAN, N.H. Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of prostaglandin synthesis. **N. Engl. J. Med.** 295, 530–533, 1976

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BRUNE, K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. **Faseb J.**, v. 22, p.383-390, 2008.

_____. BRUNE K. Cyclooxygenase-2 10 years later. **J. Pharmacol.Exp Ther**, v 300, p.367-375, 2006.

HOWE, L. R. *et al.* Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. **Breast Cancer Research.** , v. 9, p.210, 2007.

HARRIS, R.E. *et al.* Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade [review]. **Oncol. Rep.** v.13, c.4, p.559-583, 2004

JOUBERT, C.B.; LORTHIOIS, E.; MOREAU, F. To market, to market. **Ann.Rep. Med. Chem.**, v.38, p.347-374, 2003.

KAISER, E.; DOMBA, E.; SKIBBE, M. Base-catalyzed Rearrangements of Allylphenols and Haloallylphenols. **J.Org. Chem.**, v. 27, p. 2931-2933, 1962.

KIS, B.; SNIPES, A.; BUSIJA, D. W. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 315, p.1-7, 2005.

KLEIN, T. *et al.* Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - **Molecular Cell Research** v. 773, n. 11, p. 1605-1618, 2007.

KLEIN, T. *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase-2. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 1605-1610, 1994.

KURUMBAIL, R. *et al.* Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, n.384, p.644-648, 1996.

KULKARNI, S.K.; JAIN, N.K.; SING, H. A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v.22, p. 291-298, 2000.

KUMAR, V. *et al.* **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7^a ed. São Paulo: Elsevier, 230 p., 2005.

KÜRTI, L.; CZARÓ, B. **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Background and Detailed Mechanisms**. Elsevier Academic Press, 228 p., 2005.

NEMANI, K.V.S. *et al.*, NO-NSAIDs: Gastric-sparing nitric oxide-releasable prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v.19, p.5297–5301, 2009.

LAINE, L, TAKEUCHI K, TARNAWSKI A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v.135, p. 41–60, 2008.

LIMA, N.R. *et al.*, Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole **Eur. J. Med. Chem.** v. 35, p. 187–203, 2000.

LINLEY, J.E. *et al.* Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Eur. J. Physiol** v.459, p. 657–669, 2010.

LAUFER, S.A. *et al.* (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. **J. Med. Chem.**, v.37, p.1894–1897, 1994.

LIM, H. *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. **Cell**, v.91, p.197-208, 1997.

LIZAKA M. *et al.* Expression Profile Analysis of Colon Cancer Cells in Response to Sulindac or Aspirin **Biochem. Biophysical Research Communications**, v. 292, c.2, p. 498-512, 2002

LUONG, C.*et al.* Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. **Nat. Struct. Biol.**, n.3 p.927-933, 1996.

MAIA, R.C. *et al.* Synthesis and analgesic profile of conformationally constrained N-acylhydrazone analogues: Discovery of novel N-arylideneamino quinazolin-4(3H)-one compounds derived from natural safrole. **Bioorg. Med. Chem.** v.17, p. 6517–6525, 2009.

MANCINI, J. A. *et al* Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 29372-29377, 1995.

NISSALO, S. *et al*. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. **Ann. NY Acad. Sci.** , v. 966, p.384–399, 2002.

MANTYH, P.W. *et al*. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **J Clin Psychiatr** ; v.63, c. 11, p.6–10, 2002.

MARNETT, L. J.; KALGUTKAR, A. S. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. **Trends Pharm. Sciences**, v.20, p. 465-469, 1999.

MASFERRER, J.L. *et al*. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **J. Clin. Invest.** 86, 1375–1379, 1990

MERLIE, J.P. *et al*. Isolation and characterisation of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). **J. Biol. Chem.**, p.3550–3553. 1988

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Prevenção e tratamento dos agravos resultantes da violência sexual contra mulheres e adolescentes. Norma Técnica do Ministério da Saúde – 2002

MIYAMOTO, T. *et al*. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **J. Biol. Chem.**,v. 259, p.2629-2636, 1976.

MITCHELL, J.A. *et al*, Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v.90 , p. 11693–11697, 1993.

MUSUMBA, C., PRITCHARD, D.M., PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharm. Therapeutics**, v. 30, p. 517–531, 2009.

OTTO, J. C.; SMITH, W.L. Photolabeling of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 with 3-Trifluoro-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)diazirine as a Probe of Membrane Association and the Cyclooxygenase Active Site. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n. 17, p. 9906–9910, 1996

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacological Research**, v.5, p. 285 – 289, 2009.

PEZET, S.; MALCANGIO, M.; MCMAHON, S.B. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? **Brain Res Rev** ; v.40, p.240–249, 2005.

PALLADINO, M.A. *et al.* Anti-TNF- α therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Disc.**, v.2, p.736-746, 2003.

PICOT, D.; LOLL, P.J.; GARAVITO, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. **Nature** (Lond.), p. 243–249, 1994.

PORTARIA CVS - 2, D.O.E nº 51 de 17 de Março de 2005 Portaria CVS - 2, de 14-3-2005: Dispõe sobre a comercialização e o controle da substância misoprostol e de medicamentos que a contêm e dá providências correlatas.

PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**, 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 349 p.1988.

PENNING, T.D. *et al.* Synthesis and biological evaluation of the 1, 5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). **J. Med. Chem.**, v.40, p.1347-1365, 1997.

PRASIT, P. *et al* The discovery of rofecoxib, [MK 966, VIOXX, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. **Bioorg.Med. Chem. Letters**, v.9, p.1773-1778, 1999.

RABASSEDA, X. *et al.* Nimesulide: a selective cyclooxygenase 2 inhibitor anti-inflammatory drug. **Drugs Today**, v.32, p. 1-10, 1996.

RAINSFORD, K.D., Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Sub-cellular Biochemistry**. v.4, p. 3-27, 2007 (Abstract)

RAMALHO, T.C. *et al.* The search for new COX-2 inhibitors: a review of 2002–2008 patents. **Expert. Opin. Ther.Patents**, v.19, c 8, p. 1-36, 2009.

ROMEIRO, N.C. *et al* Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of new sulindac analogues. **Europ. J. Med.Chem.**, v. 44,p.1959–1971, 2009.

RANATUNGE, R.R. *et al.* Synthesis and selective cyclooxygenase-2 inhibitory activity of a series of novel, nitric oxide donor-containing pyrazoles. **J. Med. Chem.**, v.47, p. 2180-2193, 2004.

RANDALL, R.W. *et al.* Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipooxygenase activities of leucocytes by indomethacin and compound BW 775c. **Agents and Actions**, v.43, p. 176-178, 1994.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Pharmacology**, 3 ed. Churchill Livingstone, p. 246–255, 1995

RANQUIN J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clin Issues.**, v. 15, c.1, p. 3-17, 2004.

RAO, P.N.P., KNAUS, E.E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v.11, c.2, p. 81-110, 2008

RAZ, A., WYCHE, A., NEEDLEMAN, P. Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 1657–1661, 1989.

ROCHA *et al.* Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 57, c. 1, p. 94-105, 2007.

RUBIN, E. *et al.* **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAMAD, T.A.; SAPIRSTEIN, A.; WOOLF, C.J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol. Med.**, v.8, p. 390–396, 2002.

SARAGOVI, H.U.; GEHRING K. Development of pharmacological agents for targeting neurotrophins and their receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 21, p. 93–98, 2000.

SCHAIBLE, H.G. *et al* Pathophysiology of pain. **Orthopade**. v.36, p.10-12, 2000.

SCHUG, S.A.; GARRET, W.R.; GILLESPIE, G. Opioid and non-opioid analgesics. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, 1, 2003, p. 99-110.

SHAHEEN, N.J. *et al.* The burden of gastrointestinal and liver diseases. **Am. J. Gastroenterol**, v.101, p. 2128–38, 2006.

SHINOHARA, H. *et al.* Regulation of Delayed Prostaglandin Production in Activated P388D₁ Macrophages by Group IV Cytosolic and Group V Secretory Phospholipase A₂s* **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 18, p. 12263–12268, 1999

SILVA, E. F; BARREIRO, E. J. The Synthesis and Anti-inflammatory Activity of 1-Alkyl-Isochroman-1-yl Acetic Acids Derivatives, **J.Braz.Chem.Soc.**,v. 4, p.40 -44, 1993.

SMYTH, E.M. *et al.* Prostanoids in health and disease. **J. Lipid. Res.**, v. 50, c.423–428, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; DAVID, J.K. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, tradução de Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 234 p., 2007

SIMÔES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 6 ed. 1102p, 2008.

SMITH, W.L ; DeWitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Adv. Immunol.**, v.62, p.167-215 ,1996.

_____. DEWITT, D.L., GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Ann. Rev. Biochem.**,v. 69, p.145-182, 2000.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. Vol. 1 Rio de Janeiro: LTC, p. 80, 2005

SOLOMON, D.H. *et al* Relationship between selective cyclooxygenase2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. **Circulation**, v.109, p.2068-2073, 2004.

SOSTRES, C. *et al* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.24, p.121–132, 2010.

TALLEY, J. J. *et al.* Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). **Prog. Med. Chem. Res.**, v.36, p. 201-234, 1999.

TANSEY, M.; SZYMKOWSKI, D.E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 23,24, 2009

TRIBUTINO, J. L. M. *et al*, Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorg. Med. Chem.** v. 17, p.1125–1131, 2009.

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

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, **Nature New Biology**, v. 231, p. 232-235, 1971

_____. R., BAKHLE, Y.S., BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. Annual Review of Pharmacology and Toxicology V. 38: 97-120. 1998

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. **Prog. Neurobiol.** v. 64, p.327–363, 2001.

VARDEH, D. *et al*. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. **J. Clin. Invest.** v.119, c.2, p.287-294, 2009.

WALASH M. I. *et al*. Spectrophotometric determination of two N-(4-quinolyl) anthranilic acid derivative (glafenine and floctafenine) **J. Pharm. Biomedical Analysis**, v. 23, p.483–491, 2000.

WARNER, T. D., MITCHELL, J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The FASEB Journal**, v.18, p. 790-804, 2004.

WEEKS A. ; FAÚNDES A.; Misoprostol in obstetrics and gynecology . **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v. 99, p. 156–159, 2007

WITIAK, D.T.; WILLIAMS, D.R.; KAKODKAR, S.V. Vielmeir-Haack Cyclizations. Synthesis of 2-Substituted 3-Dimethylamino-5,6-methylenedioxyindenes and Corresponding Indanones. **Journal Organic Chemistry**, v..39, n. 9, p.1242-1247. 1974

YOKOYAMA, C., TAKAI, T., TANABE, T. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. **FEBS Lett.**, v.231, 247–251, 1998.

