

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIINFLAMATÓRIA DE 5-BENZILIDENO-
3-(4-CLOROBENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONAS**

Flávia De Toni Uchôa

Recife – 2004

Flávia De Toni Uchôa

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE
5-BENZILIDENO-3-(4-CLOROBENZIL)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONAS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS
BIOATIVOS, PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.

Área de Concentração: Química de
Compostos Bioativos

Orientadora: Prof^a. Dra. Suely Lins Galdino

Recife, 2004

Uchôa, Flávia De Toni

Síntese e avaliação da atividade antiinflamatória de 5-Benzilideno-3-(4-Clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas / Flávia De Toni Uchôa. – Recife : O Autor, 2004.

159 folhas : il., fig., tab., foto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biotecnologia de produtos bioativos – Planejamento e síntese de fármacos. 2. Tiazolidinas – Avaliação da atividade antiinflamatória. I. Título.

**547.78:615
615.31**

**CDU (2.ed.)
CDD (21.ed.)**

**UFPE
BC2004-116**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *FLÁVIA DE TONI UCHÔA* AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 12 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:

Dra. GLÓRIA ISOLINA BOENTE PINTO DUARTE
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Dra. SUELY LINS GALDINO
Departamento de Antibióticos - UFPE

Dra. ANA CRISTINA LEITE
Departamento de Farmácia - UFPE

Esta obra é dedicada ao meu eterno
“paitrocinador”, Ermes De Toni Júnior, porque
sua ausência me deu força, e a certeza de sua
constante presença me dá coragem para seguir
perseguindo meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Professora Suely Lins Galdino, do Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela orientação, acolhida, incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Maria do Carmo Alves de Lima, do Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela acolhida, colaboração e incentivo, e pelos valiosos ensinamentos: científicos e de vida.

Ao Professor Ivan da Rocha Pitta, do Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela acolhida, colaboração e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Ivone Antônia dos Santos, do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela atenção dispensada e grandiosa colaboração na execução dos ensaios biológicos.

À Professora Mônica Camelo Pessoa Azevedo de Albuquerque pelo apoio e realização do estágio de docência na disciplina de Parasitologia.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Antibióticos e do Biotério do Departamento de Antibióticos pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, bem como aos funcionários da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental pela atenção e cordialidade dispensadas e pela fundamental ajuda na realização dos espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

A secretária do curso de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Maria Suely Rodrigues Cavalcanti, pela atenção e cordialidade dispensadas e principalmente pelo apoio e incentivo ao longo desta jornada.

Aos colegas do Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos: Ana Maria Souza, Angela Coelho Andrade, Andréa Apolinário, Andréa Lopes, Clécio Henrique, Daniel Tarcísio Pereira, Diana Malta, Érika Souza Vieira, Everaldo Santos, Gérson Paiva, Janaína Rodrigues, Joyce Nunes, Leila Cabral, Maíra Pitta, Manuela Carvalho, Micheline Miranda, Rosa Mourão, Ricardo Moura, Simone Walfrido, e Terezinha Gonçalves, pela acolhida, ajuda e pelas horas agradáveis de convívio.

Ao aluno do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental Aldo César Passilongo da Silva pelo auxílio na execução dos ensaios biológicos, e à aluna de iniciação científica do LPSF, Ana Roberta Aguiar Cañas, pelo prestimoso auxílio tanto durante as sínteses, purificações e ensaios biológicos.

Aos colegas deste Mestrado e aqueles de outros Departamentos que foram companheiros de disciplinas, pelas horas de estudo, pelo auxílio e pelo crescimento que suas convivências proporcionaram.

Aos honestos e sofridos pagadores de impostos, financiadores indiretos do ensino e da pesquisa nesse país, e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A Deus, porque seus escritos certos por linhas tortas, felizmente me trouxeram até aqui.

E finalmente, àquelas pessoas, que não estão diretamente relacionadas a este trabalho, mas, são a base e o fundamento para que tudo isso fosse possível.

Ao meu grande amor, Adriano Dutra Uchôa e ao fruto desse amor, Gustavo De Toni Uchôa, pelo apoio incondicional, carinho e pela compreensão nos momentos de estresse e ausência.

À minha mãe, Stelita Zanella De Toni, incentivadora, conselheira e amiga e minha irmã e cunhado, Luciana e Gilberto Menoncin, pelas suas presenças nesse momento tão importante.

A toda da minha família recifense, leia-se, José Gláucio, Maria Helena e Fabiana Uchôa, Eduardo, Cristiane e Gabriela Coimbra Esteves, Rodolfo Cursino e Alzira e Leda Dutra, pelo carinho e apoio permanentemente dispensados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE ESQUEMAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	19
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS	32
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
3 REVISÃO DA LITERATURA	
3.1 Atividade antiinflamatória	34
3.1.1 Inflamação	34
3.1.1.1 Fisiopatologia da resposta inflamatória	35
3.1.1.2 Enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico	39
3.1.1.3 Isoformas da cicloxigenase	41
3.1.1.3.1 Funções fisiopatológicas das enzimas COX-1 e COX-2	46
3.1.2 Fármacos antiinflamatórios	49
3.1.2.1 Antiinflamatórios esteroidais	50
3.1.2.2 Antiinflamatórios não-esteroidais clássicos	52
3.1.2.3 Antiinflamatórios inibidores seletivos da COX-2	57

3.1.2.3.1	Metanossulfanilidas	61
3.1.2.3.2	Ciclos diarilsubstituídos	61
3.1.2.3.3	Di- <i>terc</i> -butil-fenóis	64
3.1.2.3.4	Agentes diversos	65
3.1.2.4	Inibidores da LOX e inibidores duais COX/LOX	66
3.1.2.5	Antiinflamatórios não-esteroidais doadores de óxido nítrico	67
3.2	Planejamento de fármacos	68
3.2.1	Descoberta de novos fármacos	68
3.2.2	Planejamento racional de fármacos	70
3.2.3	Modificações moleculares	72
3.2.3.1	Homologação, quebras em cadeias e transformações cadeia-anel	72
3.2.3.2	Isosterismo e bioisosterismo	73
3.2.4	Planejamento de fármacos antiinflamatórios seletivos à COX-2	76
3.3	Tiazolidinas	79
3.3.1	Tiazolidinas biologicamente ativas	79
3.3.2	Tiazolidinas de ocorrência natural	80
3.3.3	Síntese de tiazolidinas	82
3.3.3.1	Síntese do núcleo tiazolidinônico	83
3.3.3.2	Modificações no anel da tiazolidina -2,4-diona	84
4	PLANEJAMENTO RACIONAL DE TIAZOLIDINAS: POTENCIAIS INIBIDORAS DA COX-2	91

5	SÍNTESE DA SÉRIE 5-BENZILIDENO-3-(4-CLOROBENZIL)	
	THIAZOLIDINA-2,4-DIONAS	98
	5.1 Objetos de síntese	98
	5.2 Material	99
	5.3 Metodologia	100
	5.3.1 Obtenção da thiazolidina-2,4-diona	101
	5.3.2 Obtenção da 3-(4-clorobenzil)-thiazolidina-2,4-diona	101
	5.3.3 Obtenção da 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-thiazolidin-2-ona	102
	5.3.4 Obtenção dos ésteres 2-ciano-acrilatos de etila	103
	5.3.5 Obtenção dos 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-thiazolidina-2,4-diona	105
	5.4 Resultados e discussão	108
	5.4.1 Análise espectroscópica	108
	5.4.1.1 Caracterização da 3-(4-clorobenzil)-thiazolidina-2,4-diona	110
	5.4.1.2 Caracterização da 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-thiazolidin-2-ona	111
	5.4.1.3 Ésteres 2-ciano-acrilatos	112
	5.4.1.4 Caracterização dos compostos 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-thiazolidina-2,4-diona	115
6	ATIVIDADE BIOLÓGICA	119
	6.1 Avaliação de efeitos gerais	119
	6.1.1 Material	120
	6.1.2 Metodologia	120

6.1.3 Resultados e discussão	122
6.2 Avaliação da atividade antiinflamatória	124
6.2.1 Material	125
6.2.2 Metodologia	127
6.2.2.1 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter	127
6.2.2.2 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter modificado	129
6.2.3 Resultados e discussão	132
6.2.3.1 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter	133
6.2.3.2 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter modificado	137
6.2.4 Relação qualitativa estrutura-atividade	139
7 CONCLUSÕES	144
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
9 ANEXOS	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE	Ácido 5-hidroperoxi eicosatetraenóico
5-HT	Serotonina; 5-hidroxitriptamina
5-LOX	5-Lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
ADP	Difosfato de adenosina
Arg	Arginina
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
COX-3	Cicloxigenase-3
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ED ₄₀	Dose eficaz (40%)
EPC	Edema de pata por carragenina
His	Histidina
IC ₅₀	Concentração inibitória (50%)
IL-1	Interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LPSF	Laboratório de Palnejamento e Síntese de Fármacos
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
LTs	Leucotrienos
m	Múltiplo
NO-NSAIDs	Antiinflamatórios não-esteroidais doadores de óxido nítrico
NSAIDs	Antiinflamatórios não-esteroidais
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

PAF	Fator de ativação plaquetária
P.F.	Ponto de fusão
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGHS	Prostaglandina endoperóxido sintetase
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGs	Prostaglandinas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
P.M.	Peso molecular
R.f.	Razão de frente
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
s	Singleto
Ser	Serina
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Triplete
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXs	Tromboxanos
Tyr	Tirosina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Val	Valina

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.1:	Biossíntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico (PARENTE e PERETTI, 2003)	40
Esquema 3.2:	Rota de metabolismo do ácido araquidônico com os alvos biológicos dos fármacos antiinflamatórios (FIORUCCI <i>et al.</i> , 2001)	49
Esquema 3.3:	Cinética de inibição da COX-2 proposta por Coopland e colaboradores (1994)	60
Esquema 5.1:	Diagrama de síntese para obtenção dos compostos da série LYS	100
Esquema 6.1:	Representação do experimento para medição do edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter	129
Esquema 6.2:	Representação do experimento para medição do edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter modificado	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1:	Conversão do ácido araquidônico em PGG ₂ e PGH ₂ (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996)	44
Figura 3.2:	Modelo dos sítios ativos cicloxigenase e peroxidase da COX-1 ovina	45
Figura 3.3:	Dipirona e paracetamol: inibidores da COX-3	46
Figura 3.4:	Hidrocortisona: principal glicocorticóide natural	51
Figura 3.5:	Betametasona e prednisolona: corticosteróides derivados da hidrocortisona	52
Figura 3.6:	Fármacos antiinflamatórios não esteroidais	53
Figura 3.7:	Estrutura cristalina do sítio ativo da COX-1 ovina acetilada pela aspirina (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996)	54
Figura 3.8:	Fármacos utilizados na prevenção de úlceras gástricas de pacientes tratados com NSAIDs	56
Figura 3.9:	Naproxeno	56
Figura 3.10:	Nimesulida e derivado etiltiazol (N-{6-[(5-etil-1,3-tiazol-2- il)-tio]-1-oxo-2,3-di-hidro-1 <i>H</i> -inden-5-il}-metano sulfonamida)	61
Figura 3.11:	Indoxol e fenilbutazona	62

Figura 3.12:	Moléculas com atividade antiinflamatória contendo diferentes anéis centrais: 4,4-dimetil-3-[4-(metilsulfonil)-fenil]-2-fenilciclobut-2-en-1-ona; 4-[2-(4-flúorfenil)-ciclopent-1-en-1-il]-benzenossulfonamida; 2-(4-flúorfenil)-3-[4-(metilsulfonil)-fenil]-tiofeno; 1-(4-flúorfenil)-2-metil-5-[4-(metilsulfonil)-fenil]-1 <i>H</i> -pirrol; 3-[4-(metilsulfonil)-fenil]-4-fenilfurano; 1-(4-flúorfenil)-5-[4-(metilsulfonil)-fenil]-1 <i>H</i> -pirazol-3-carbonitrila	63
Figura 3.13:	Inibidor seletivo da COX-2, contendo como heterocíclo central o tiazol: (5-(4-flúorfenil)-2-metil-4-[4-(metilsulfonil)-fenil]-1,3-tiazol)	63
Figura 3.14:	Tiazolona di- <i>terc</i> -butil fenol	64
Figura 3.15:	Composto RS 5706700	65
Figura 3.16:	Análogo tiazol da indometacina: 1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metil-3-[[4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol-2-il]-metil]-1 <i>H</i> -indol	66
Figura 3.17:	Inibidores da 5-LOX: zileuton e tepoxalin	67
Figura 3.18:	Nitro-aspirina (2-[2-(nitróxi)-etóxi]-etil 2-(acetilóxi)-benzoato	67
Figura 3.19:	Etapas hierárquicas do processo de descobrimento racional de fármacos baseado na abordagem fisiológica: da esquerda para direita, iniciando com a etapa crítica de eleição do alvo terapêutico (BARREIRO, 2002)	71
Figura 3.20:	Nimesulida, flosulida e L 745.337	76
Figura 3.21:	Utilização do bioisosterismo para o planejamento de derivados 1,2-benzodioxolos (RODRIGUES <i>et al.</i> , 2002)	77

Figura 3.22:	Tiazolidinas com atividade antiartrítica e antiinflamatória estudadas por Missbach e colaboradores (1996); Albuquerque e colaboradores (1995) e Vigoritta, e colaboradores (2002)	79
Figura 3.23:	Tiazolidinas com atividade antiinflamatória estudadas por Lesyk e colaboradores (1996) e Horishny e colaboradores (1996)	80
Figura 3.24:	Ferormônio produzido por <i>Nauphoeta cinera</i>	80
Figura 3.25:	Exemplos de produtos naturais contendo anéis tiazolidina, tiazolina ou tiazol	81
Figura 3.26:	Mecanismo geral proposto por Du e colaboradores (2000) para biossíntese das tiazolinas, tiazolidinas e tiazóis	81
Figura 3.27:	Estrutura da penicilina G, demonstrando o núcleo tiazolidínico presente nas penicilinas	82
Figura 3.28:	Núcleo tiazolidínico	82
Figura 3.29:	Preparação da tiazolidina-2,4-diona	83
Figura 3.30:	Mecanismo de N-alquilação da tiazolidina-2,4-diona	84
Figura 3.31:	Condensação de Knoevenagel A) Método para utilizando acetato de sódio; B) Método utilizando β -alanina	86
Figura 3.32:	Reação de formação dos ciano-acrilatos	87
Figura 3.33:	Deslocamento químico que promove a ativação do hidrogênio metilênico	88
Figura 3.34:	Mecanismo da condensação de Knoevenagel, que leva a formação de ciano-acrilatos	89

Figura 3.35:	Reação de adição tipo Michael que para formação de tiazolidinas 5-substituídas	89
Figura 4.1:	Estrutura geral LYS, indometacina e sobreposição das duas moléculas	92
Figura 4.2:	Indometacina, tiazolidinas-2,4-dionas com atividade antiinflamatória, RS57067000 e estrutura geral LYS	93
Figura 4.3:	Estrutura da LYS-2, éstres da indometacina seletivos à COX-2 e LYS-4	94
Figura 4.4:	Estrutura do composto LYS-5, comparado com RS57067000	95
Figura 4.5:	Estrutura do composto SM-8849, da tiazolidinadiona sintetizada no LPSF e a estrutura de LYS-3	95
Figura 4.6:	Isosterismo clássico no anel pentagonal tiazolidínico	96
Figura 5.1:	Compostos da série LYS: LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5	98
Figura 6.1:	Representação esquemática e fotografia do pletismômetro manual, montado no LPSF – UFPE e utilizado nos ensaios de determinação da atividade antiinflamatória. A= tanque de medida; B= cilindro de leitura	126
Figura 6.2:	Evolução do edema apresentado pelos grupos teste, controle e padrão	133
Figura 6.3:	Representação gráfica dos percentuais de inibição do edema de pata apresentado pelas substâncias testadas e pela indometacina	135
Figura 6.4:	Evolução do edema de pata nos grupos controle,	

	substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4, LYS-5 e indometacina	138
Figura 6.5:	Comparação entre as estruturas químicas e os percentuais de atividade antiinflamatória exibidos pelos compostos A, B e C (PEREIRA, 2003) e LYS-2, LYS-3 e LYS-5	140
Figura 6.6:	Compostos LYS-2 e LYS-4, assinalando o grupo metóxi em diferentes posições do anel	141
Figura 6.7:	Composto LYS-5, assinalando a presença da amina secundária	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1:	Mediadores do processo inflamatório	36
Tabela 3.2:	Estrutura química e ação de algumas prostaglandinas e leucotrienos	38
Tabela 3.3:	Principais propriedades das isoformas da cicloxigenase humana	42
Tabela 3.4:	Atividade de fármacos anti-inflamatórios [a) VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998 b) LEVAL <i>et al.</i> , 2001]	58
Tabela 3.5:	Biosósteros clássicos e bioisósteros não-clássicos (SILVERMAN, 1992; THOMAS, 2003)	75
Tabela 3.6:	Valores de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 para diferentes ésteres e amidas da indometacina e amidas do ácido meclofenâmico (KALGUTKAR <i>et al.</i> , 2000)	78
Tabela 5.1:	Material e equipamentos utilizados na síntese e comprovação estrutural dos derivados da série LYS, suas especificações e procedência	99
Tabela 5.2:	Propriedades da tiazolidina-2,4-diona	101
Tabela 5.3:	Propriedades do composto 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-oná	102
Tabela 5.4:	Propriedades do composto 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-oná	103
Tabela 5.5:	Benaldeídos, condições reacionais utilizadas e ésteres 2-ciano-acrilatos obtidos	104
Tabela 5.6:	Propriedades dos ésteres 2-ciano-acrilatos obtidos	105
Tabela 5.7:	Condições reacionais e LYS obtido a partir dos ésteres	

	2-ciano-acrilato	106
Tabela 5.8:	Propriedades dos compostos da série LYS obtidos	106
Tabela 5.9:	Frequências e intensidade de absorção no infravermelho, em cm^{-1} , para o composto 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona	110
Tabela 5.10:	Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm do composto 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2, 4-diona, em CDCl_3	111
Tabela 5.11:	Frequências de absorção no infravermelho em cm^{-1} para 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona	111
Tabela 5.12:	Deslocamentos químicos de RMN ^1H , e detalhamento do espectro de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, solvente DMSO-d_6	112
Tabela 5.13:	Frequências de absorção no IV, em cm^{-1} (intensidade) para IP-47, IP-48, IP-23 e IP-19	112
Tabela 5.14:	Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto IP-47, solvente DMSO-d_6	113
Tabela 5.15:	Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto IP-48, solvente DMSO-d_6	113
Tabela 5.16:	Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto IP-23, solvente DMSO-d_6	114
Tabela 5.17:	Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz,	

	e detalhamentos do espectro do composto IP-19, solvente DMSOd ₆	114
Tabela 5.18:	Freqüências de absorção no infravermelho, em cm ⁻¹ (intensidade) para LYS-2,LYS-3, LYS-4 e LYS-5	115
Tabela 5.19:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H, em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto LYS-2, solvente DMSOd ₆	116
Tabela 5.20:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H, em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto LYS-3, solvente DMSOd ₆	116
Tabela 5.21:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H, em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto LYS-4, solvente DMSOd ₆	117
Tabela 5.22:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H, em ppm, J em Hz, e detalhamentos do espectro do composto LYS-5, solvente DMSOd ₆	117
Tabela 6.1:	Materiais e equipamentos utilizados na avaliação dos efeitos gerais dos derivados da série LYS, suas especificações e procedência	120
Tabela 6.2:	Efeitos gerais observados em camundongos utilizando- se as substâncias LYS-2, 3, 4 e 5, na dose de 1000 mg/Kg de peso corpóreo	122
Tabela 6.3:	Material e equipamentos utilizados na avaliação da atividade antiinflamatória de derivados da série LYS, suas especificações e procedência	126

Tabela 6.4:	Percentual de inibição do edema de pata apresentado pelas substâncias testadas, no período de uma até seis horas	134
Tabela 6.5:	Percentual de inibição do edema das substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4 LYS-5 e indometacina, apresentados como média aritmética das leituras realizadas durante 6 horas de experimento	135
Tabela 6.6:	Percentual de inibição do edema de pata induzido por carragenina alcançado pelas substâncias LYS-2, 3, 4 e 5 (100mg/Kg) nos tempo 1 e 6 horas	137

RESUMO

Os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais são os mais utilizados no tratamento das doenças inflamatórias e estão entre os mais utilizados no mundo. A maior limitação na utilização dos antiinflamatórios não-esteroidais consiste nos seus efeitos colaterais, incluindo toxicidade gastrointestinal e renal. O mecanismo de ação desses fármacos envolve a inibição da ciclooxigenase e, conseqüentemente, a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. Atribui-se a COX-1 (isoforma constitutiva) os efeitos indesejáveis dos antiinflamatórios não-esteroidais, enquanto os efeitos antiinflamatórios são atribuídos a COX-2 (isoforma induzida). Assim, o desenvolvimento de substâncias que inibam seletivamente a COX-2 poderia alcançar uma grande potência antiinflamatória, sem os negativos efeitos colaterais observados nos antiinflamatórios não-esteroidais tradicionais. As tiazolidinas constam em registros científicos como substâncias de importante atividade biológica, inclusive antiinflamatória. Tiazolidinas potencialmente antiinflamatórias com substituintes bezilidenos na posição 5 e um grupamento *p*-clorobenzil na posição 3 foram planejadas e sintetizadas através da rota sintética que partiu da tiazolidina-2,4-diona e do cloreto de 4-cloro-benzila, que foram reagidos em meio básico obtendo-se o composto 3- (4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, o qual sofreu uma reação de tionação com P₂S₅ formando 3- (4-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona. Paralelamente, sintetizaram-se os ésteres 2-ciano-acrilato de etila, através da reação entre aldeídos substituídos e cianoacetato de etila. Posteriormente, através de uma reação de adição de Michel, os ésteres 2- ciano acrilatos de etila foram reagidos com 3- (4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona ou 3- (4-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, obtendo-se os compostos finais 5-(3-bromo-4-metóxi-benzilideno)-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona [**LYS-2**], 5-(1-1'-bifenil-4-il-metileno)- 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona [**LYS-3**], 5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)- 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona [**LYS-4**] e 3-(4-cloro-benzil)-5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [**LYS-5**] que tiveram suas estruturas comprovadas através de espectroscopia de infravermelho e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A atividade antiinflamatória de [**LYS-2**; **LYS-3**; **LYS-4** e **LYS-5** (50 mg/Kg i.p.)] foi avaliada através do edema de pata induzido por carragenina, demonstrando atividades de 38,75; 40,64; 61,23 e 58,96%, respectivamente.

ABSTRACT

Nonsteroidal antiinflammatory drugs are the most used in the treatment of inflammatory disease and are among the most widely used drugs. The mayor limitation of using nonsteroidal antiinflammatory drugs consists of their side-effects, including gastrointestinal and renal toxicity. The mechanism of action of this drugs involves the inhibition of cyclooxygenase, and consequently, the conversion of arachidonic acid into prostaglandins. The undesirable side-effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs are attributed to the inhibition of COX-1 (constitutive isoform), whereas the anti-inflammatory effects are attributed to COX-2 (inducible isoform). Thus, the development of drugs that selectively inhibits the COX-2 could have great anti-inflammatory potency without the negative side-effects observed with traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs. Thiazolidines appears in scientific papers as substances in great biological activity, including anti-inflammatory. Potentially anti-inflammatory thiazolidines 5-benzylidene substituted and a *p*-chlorobenzyl group in the 3-position were planned and synthesized through the synthetic route which used the thiazolidine-2,4-dione and the 4-chlorobenzyl chloride that had been reacted in a basic mean, resulting in 3-(4-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione compound, which suffered a tiation with P₂S₅, forming 3-(4-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one. In Parallel, it was synthesized the esthers ethyl 2-cyane-acrilate though the reaction between substituted aldehydes and ethyl cyaneacetate. After this, through the Michel's addition reaction, the esthers ethyl 2-cyane acrilates were reacted with 3-(4-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione or 3-(4-chloro-benzyl)-4-thioxo-thiazolidin-2-one, forming the final compounds 5-(3-bromo-4-methoxy-benzylidene)-3-(4-chlorobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione **[LYS-2]**, 5-(1-1'-biphenyl-4-il-methylene)-3-(4-chlorobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione **[LYS-3]**, 5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(4-chlorobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione **[LYS-4]** and 3-(4-chlorobenzyl)-5-(1*H*-indol-3-il-methylene)-4-thioxo-thiazolidin-2-one **[LYS-5]** which had their structures confirmed through the infrared spectroscopy and hydrogen nuclear magnetic resonance. The antiinflammatory activity of **[LYS-2; LYS-3; LYS-4 e LYS-5]** (50 mg/Kg i.p.) was evaluated through the carrageenin induced paw edema, showing activities of 38.75, 40.64, 61.63 and 58.96%, respectively.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A inflamação refere-se, por definição à reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local. É geralmente causada por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecido necrótico ou reações imunológicas. O papel da inflamação consiste em conter e isolar a lesão, destruir os microrganismos invasores, inativar toxinas e iniciar processos de cura e reparo. Todavia, estes processos podem ser potencialmente nocivos, causando reações de hipersensibilidade que ameaçam a vida do indivíduo, bem como lesão progressiva e fibrose de órgãos (ROBBINS, 2001).

De uma maneira geral, os sintomas da inflamação são dor, calor local e inchaço. Células do sistema imune são atraídas para o local da lesão e ali ativadas, tornando-se capazes de agir frente à lesão. Muitas vezes, a inflamação é um processo agudo, como traumas, infecções e situações pós-operatórias. Infelizmente, não raro, após iniciado, o processo inflamatório não é encerrado como seria esperado e o organismo continua em um estado ativado, liberando os mediadores químicos, responsáveis pela dor e pela destruição de tecidos adjacentes, desencadeando um processo inflamatório crônico (MYCEY, HARVEY e CHAMPE, 2000).

As doenças inflamatórias crônicas têm um significativo impacto na saúde pública que é refletido na variedade de formas como elas podem ser apresentadas. A artrite e a osteoartrite, por exemplo, constituem um importante problema, uma vez que estão freqüentemente associadas à complicações que comprometem a produtividade e qualidade de vida do indivíduo, além de envolver altos custos no seu tratamento.

No conjunto das doenças inflamatórias, agrupadas sob a designação de reumatismos, a osteoartrite é a mais freqüente, representando 30 a 40 % das consultas em ambulatórios de reumatologia. No Brasil, são 15 milhões os portadores de osteoartrite. Segundo dados do Ministério da Saúde, esta doença atinge cerca de 80 % das pessoas acima dos 70 anos de idade (BRASIL, 2003). A sua importância pode ser demonstrada através dos dados da previdência social, pois é responsável por 7,5 % de todos os afastamentos do trabalho. Adicionalmente, é a segunda doença entre as que justificam o auxílio inicial de afastamento e também ocupa a mesma posição (10,5 %) em relação ao auxílio-doença (em prorrogação); e também é a quarta enfermidade a determinar aposentadoria (6,2 %) (SEDA e SEDA, 2003).

Um estudo realizado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) em sete grandes cidades da América Latina e Caribe, revelou que uma em cada três pessoas acima dos 60 anos são portadoras de artrite. Nos Estados Unidos e Canadá, representantes de países desenvolvidos, os portadores de artrite representam, respectivamente, 58 e 47 % das pessoas acima de 70 anos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2002). Projeções populacionais estimam que a artrite irá afetar 18 % da população americana (aproximadamente 60 milhões de pessoas) no ano de 2020 e limitará as principais atividades de 4 % (11,6 milhões). Direta ou indiretamente, estima-se que os custos vão aumentar proporcionalmente (U.S. DEP. HEALTH & HUMAN SERVICES, 2003).

O grande número de portadores de doenças inflamatórias crônicas faz com que a utilização de antiinflamatórios também seja elevada. São os medicamentos mais utilizados no mundo, representando 100 milhões de

prescrições anuais, estimando-se um número sete vezes maior de vendas sem prescrições. Representam 40 bilhões de comprimidos ao ano (MERCK SHARP & DOHME, 2003). Em 2001, o total mundial de vendas de dois medicamentos antiinflamatórios (Celebra[®] e Vioxx[®]) superou os 5,7 bilhões de dólares, colocando estes fármacos na lista dos dez mais vendidos no mundo naquele ano (BARREIRO, 2003).

No início dos anos de 1970 descobriu-se o mecanismo de ação dos medicamentos antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs), verificando-se que preveniam a produção de prostaglandinas através da inibição da enzima cicloxigenase (COX). Portanto, fica estabelecida a participação de um processo bioquímico de ação para esses fármacos (HAMBERG e SAMUELSSON, 1967; VANE, 1971). Durante muitos anos pensou-se que a COX era uma única enzima presente constitutivamente na maioria dos tecidos e que sua inibição levava ao decréscimo na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, bem como das prostaglandinas benéficas produzidas no estômago, rins e outros órgãos e tecidos humanos (DANNAHRDT e KIEFER, 2001).

Mais recentemente, descobriu-se que a atividade da COX encontrava-se aumentada em determinados estados inflamatórios e poderia ser induzida nas células por citocinas inflamatórias. Tais dados sugeriram a existência de duas formas de COX, uma constitutiva, presente nos tecidos, como estômago e rins, e uma enzima indutiva, associada a inflamação. Esta hipótese foi suportada pelo isolamento de uma nova forma de COX, codificada por um segundo gene para cicloxigenase, sendo chamada cicloxigenase-2 (COX-2) (SMITH, GARAVITO E DeWITT, 1996).

A descoberta da enzima COX-2 levou a hipótese de que a toxicidade associada a terapia com NSAIDs nos tecidos gástricos e renais seria devido a inibição da isoforma cicloxigenase-1 (COX-1), enquanto os efeitos benéficos seriam devidos a inibição da isoforma induzida COX-2 no sítio da inflamação.

Os NSAIDs clássicos inibem a produção das prostaglandinas através da inibição da COX-1 e da COX-2, levando a efeitos indesejáveis, uma vez que a primeira exerce funções fisiológicas. Devido ao seu uso disseminado, os NSAIDs causam mais hospitalizações e mortes do que qualquer outra classe de medicamentos disponível no mercado uma vez que, ao inibirem a enzima COX-1, que produz prostaglandinas responsáveis pela proteção da mucosa gástrica, causam efeitos gastrintestinais graves, tais como perfurações do estômago, úlceras e sangramentos (PARENTE e PERETTI, 2003).

É eminente que a comunidade científica busque fármacos antiinflamatórios mais potentes, mais seletivos ao alvo enzimático COX-2 e com efeitos indesejados reduzidos. Neste contexto, surge a Química Medicinal, com seus conhecimentos interdisciplinares e as estratégias racionais que abrirão os caminhos para descoberta desses novos fármacos.

O planejamento racional de fármacos através da abordagem fisiológica exige conhecimento da patologia e seus mecanismos fisiológico e bioquímico, assim como o reconhecimento das enzimas implicadas no processo (RATTI e TRIST, 2001; BARREIRO, 2002). De posse dessas informações, conhecimentos físico-químicos e estruturais e o reconhecimento das propriedades que devem ser mantidas ou que podem ser modificadas numa estrutura química, conduzirão as estratégias de modificação molecular, permitindo que moléculas potenciais sejam planejadas.

Uma vez planejadas, faz-se necessária a execução da síntese, a purificação, a comprovação estrutural das substâncias sintetizadas e, finalmente, o início dos testes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Engajando-se na busca por novos antiinflamatórios não-esteroidais, o presente trabalho foi desenvolvido envolvendo duas grandes áreas de conhecimento: a química orgânica e a biologia. A parte de química orgânica envolvendo um estudo detalhado das possibilidades de substâncias a serem sintetizadas que seriam potencialmente antiinflamatórias, compreendeu a síntese, purificação, elucidação estrutural e determinação de algumas propriedades físico-químicas de novos compostos 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas. A parte biológica visou uma revisão da literatura sobre o mecanismo e enzimas envolvidas no processo inflamatório e os ensaios de determinação da atividade antiinflamatória propriamente ditos, realizados através da avaliação do edema de pata induzido por carragenina.

Neste trabalho, inicialmente faremos uma revisão da literatura, onde serão abordados os aspectos fisiopatológicos inerentes a inflamação, enzimas envolvidas no processo inflamatório e possibilidades de inibição das enzimas. Serão abordadas também as estratégias de planejamento de fármacos bem como as propriedades químicas relevantes das tiazolidinas.

A seguir, será apresentado o planejamento, a síntese e a elucidação estrutural das substâncias 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas, bem como a avaliação da atividade antiinflamatória. Finalmente serão apresentadas as considerações finais, que arrematam essa pequena contribuição ao estudo de compostos antiinflamatórios, assim como o referencial bibliográfico de consulta.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir no desenvolvimento de novos agentes farmacodinâmicos mais eficazes e menos tóxicos com atividade antiinflamatória, com o propósito de auxiliar e melhorar as possibilidades de tratamento atualmente existentes para as enfermidades inflamatórias e, ainda, gerar meios para facilitar o acesso das pessoas a esses agentes terapêuticos, tanto pela possibilidade de produção com baixo custo, quanto pelo aumento da competitividade mercadológica proveniente da comercialização de novos agentes.

2.2 Específicos

Preparar, por síntese orgânica, novos derivados 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas;

Elucidar as estruturas químicas dos compostos sintetizados pelos métodos espectroscópicos de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio;

Avaliar a atividade antiinflamatória dos novos derivados 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas na inflamação aguda.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Atividade antiinflamatória

A utilização de substâncias com atividade antiinflamatória é relatada desde os primórdios da humanidade para o tratamento e alívio das doenças inflamatórias. Inicialmente, através da utilização de uma variedade de extratos de plantas, passando pela aspirina, primeiro fármaco antiinflamatório introduzido na terapêutica em 1897, chegando no início do século XXI onde as mais recentes substâncias antiinflamatórias são criteriosamente planejadas e obtidas visando potência aliada a efeitos adversos mínimos (KALGUTKAR *et al.*, 1998).

3.1.1 Inflamação

A inflamação é a maneira como o organismo responde às lesões locais, sendo usualmente caracterizada por sintomas familiares como dor, calor, edema, rubor e perda de função na área afetada, sintomas que já eram relatados séculos atrás pelos romanos. Tais sintomas ocorrem por um período limitado de tempo, em uma área determinada e comumente acontecem em benefício do organismo. Durante este processo, células do sistema imune são atraídas para a área afetada e transformadas de um estado inativo ou latente para um estado ativado, tornando-se aptos para combater a causa da lesão (KATZUNG, 2000).

Substâncias químicas, como citocinas e prostaglandinas, liberadas em uma cascata ordenada e auto-regulável, são os mediadores endógenos que controlam o processo inflamatório. Por envolver uma série de reações bioquímicas, o entendimento da fisiopatologia da resposta inflamatória é de suma importância no processo de desenvolvimento de fármacos antiinflamatórios.

3.1.1.1 Fisiopatologia da resposta inflamatória

A inflamação cobre uma gama de eventos fisiopatológicos e está presente em diferentes situações: aguda, sub-aguda ou crônica, órgão-específica, reversível ou irreversível. A resposta inflamatória, vista em muitas doenças crônicas, ou seguida de um trauma agudo, é iniciada quando vasos sanguíneos (primeiramente arteríolas) irritadas ou danificadas expõem superfícies endoteliais e cartilagens às plaquetas circulantes. As plaquetas aderem a estas superfícies, agregam-se as aberturas dos vasos sanguíneos danificados e liberam o conteúdo dos seus grânulos no espaço extracelular. Outras células, incluindo células do endotélio vascular, leucócitos, mastócitos e macrófagos são recrutadas por processos quimiotáticos para dar início ao desenvolvimento do processo inflamatório.

Um denominador comum nestas respostas inflamatórias são os mediadores envolvidos. Essas moléculas, como exemplificadas na Tabela 3.1, agem como hormônios endógenos e substâncias regulatórias no sítio da inflamação (ARMAN *et al.*, 1965; SMITH *et al.*, 1998). É importante notar que nem todos os mediadores participam em todos os tipos de inflamação. Por

exemplo, baseado na eficácia de agentes farmacológicos anti-histamínicos, sabe-se que a histamina está envolvida em certas respostas inflamatórias alérgicas brônquicas e cutâneas, enquanto praticamente não aparece na artrite reumatóide ou na asma (McGILL e BUSSE, 1996).

Tabela 3.1: Mediadores do processo inflamatório

Classe Química	Mediadores da Inflamação
Nitrocompostos	Óxido nítrico
Aminas	Histamina Serotonina (5-HT) Catecolaminas
Peptídeos / Proteínas	Bradicinina Interleucina-1 (IL-1) Fator de necrose tumoral (TNF) Fator de ativação plaquetária (PAF)
Lipídeos	Prostaglandinas (PGs) Tromboxanos (TXs) Leucotrienos (LTs)

Entre as substâncias liberadas pelos grânulos plaquetários estão a serotonina (5-HT), o difosfato de adenosina (ADP), e o fator de ativação plaquetária (PAF). A serotonina, um mediador vasoconstritor, ajuda a fechar os vasos danificados, enquanto que o ADP e o PAF promovem a agregação plaquetária e a liberação dos grânulos plaquetários (MANNANIONI, DiBELLO e MASINI, 1997).

A agregação plaquetária quimicamente induzida é acompanhada pela ativação de fosfolipases, ao mesmo tempo que as plaquetas liberam ácido araquidônico (Tabela 3.2) de suas membranas fosfolipídicas. Nessas células o ácido araquidônico é rapidamente convertido em tromboxano A_2 (TXA₂), um forte promotor da agregação plaquetária. Outra substância crítica derivada do ácido araquidônico é a prostaglandina E_2 (PGE₂), o mediador predominantemente detectado em praticamente todas as condições inflamatórias, desde o edema agudo experimental até queimadura solar e

artrite reumatóide crônica. Uma evidência muito importante que comprovou que os metabólitos do ácido araquidônico têm um papel fundamental na inflamação foi a descoberta de que a aspirina age inibindo a enzima COX, também denominada prostaglandina endoperóxido sintetase (PGHS), vital na síntese de prostaglandinas (KALGUTKAR *et al.*, 1998).

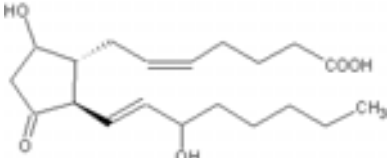
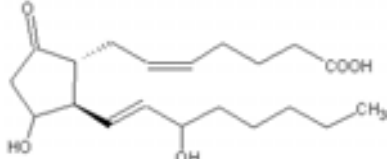
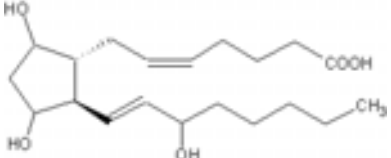
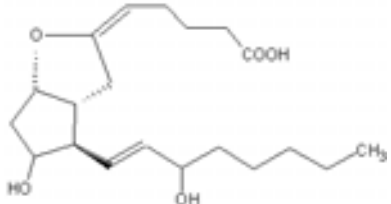
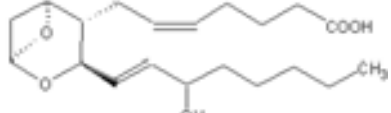
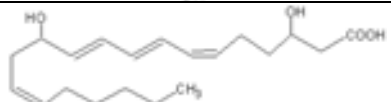
Os metabólitos do ácido araquidônico, também chamados de eicosanóides, são lipídios bioativos produzidos pela oxidação de ácidos graxos de 20 átomos de carbono; incluem prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Na Tabela 3.2 estão listadas algumas das ações específicas desses eicosanóides (PARENTE e PERETTI, 2003). Alguns destes compostos exibem efeitos opostos, resultando num equilíbrio homeostático.

Na resposta inflamatória clássica, a vasoconstrição que ocorre imediatamente após a lesão é seguida por um período prolongado de vasodilatação, mediado primeiramente por PGE_2 e prostaglandina I_2 (PGI_2) e mais fracamente pelo leucotrieno B_4 (LTB_4) e PAF. A resultante é um acréscimo no fluxo sanguíneo e a conseqüente congestão capilar, havendo eritema no sítio da inflamação. Este é o primeiro sintoma da resposta inflamatória.

A dilatação das arteríolas por esses mediadores pró-inflamatórios conduz a elevadas pressões hidrostáticas que resulta em permeabilidade vascular. A exsudação do plasma a partir dos vasos sanguíneos permeabilizados para o tecido conectivo produz o edema, segundo sintoma da inflamação. O LTB_4 e o PAF são produzidos nos leucócitos e agem com a histamina e a bradicinina para induzir a permeabilidade nas vênulas dilatadas.

Outra função importante do LTB₄ , PAF, histamina e bradicinina é atrair células fagocitárias (BEN-BARUCH, MICHIEL e OPPENHEIN, 1995).

Tabela 3.2: Estrutura química e ação de algumas prostaglandinas e leucotrienos

Eicosanóide	Estrutura Química	Ação
Ácido araquidônico		Precursor biossintético
PGD ₂		Promoção do sono
PGE ₂		Contração da musculatura lisa, dor e modulação da febre
PGF ₂		Contração da musculatura lisa uterina
PGI ₂		Inibição da agregação plaquetária, vasodilatação, implantação embrionária
TXA ₂		Estimulação da agregação plaquetária, vasoconstrição
LTB ₄		Quimiotaxia de leucócitos

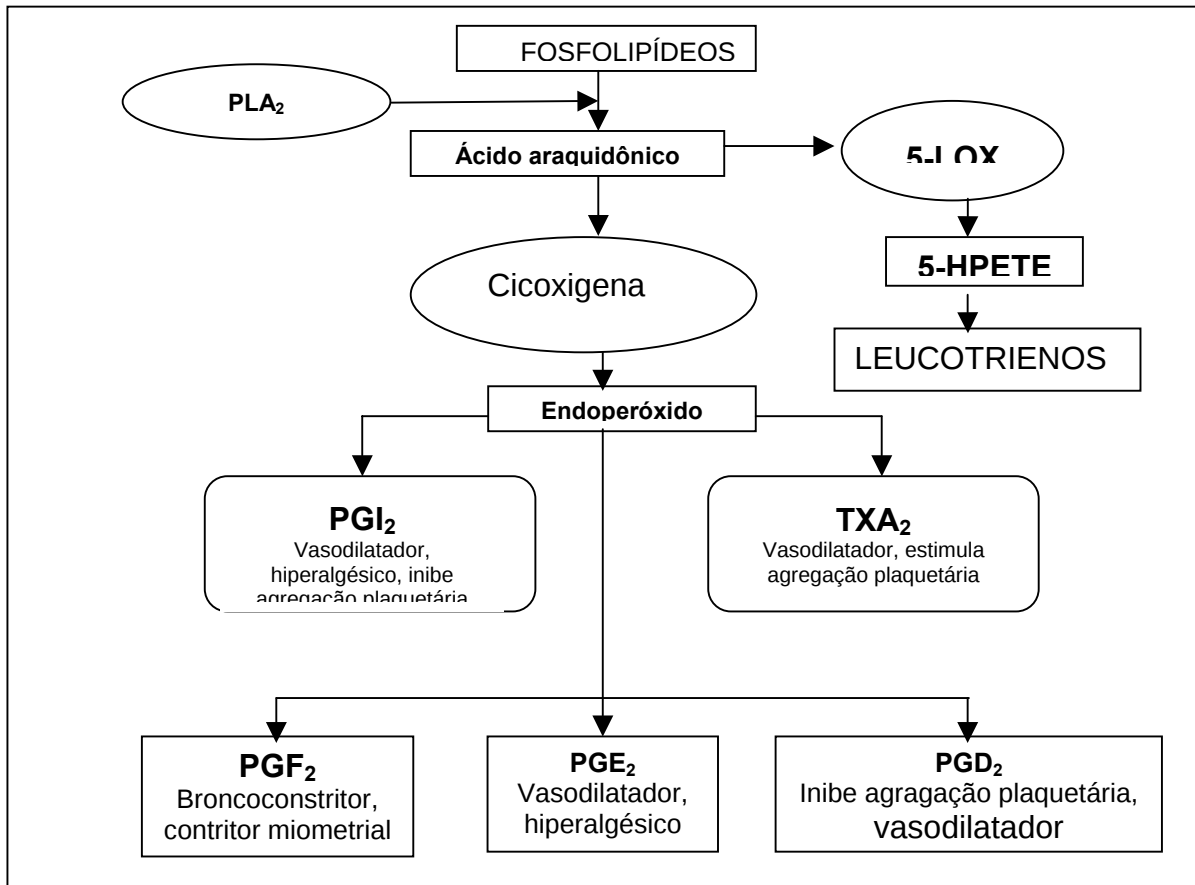
O terceiro sintoma da inflamação é a hiperalgesia ou dor. Em resposta às citocinas pró-inflamatórias, a atividade da enzima COX-2 aumenta e produz elevados níveis de PGE₂ no endotélio cutâneo e células sinoviais. Esse eicosanóide, agindo isolado ou conjuntamente a bradicinina ou outro estímulo, pode então sensibilizar os nociceptores polimodais e outros neurônios aferentes de dor. A síntese de PGE₂ no sistema nervoso central e o alto nível de receptores para PGE₂ na região circunventricular do cérebro são

consistentes com o papel desse eicosanóide como um pirogênio endógeno ativador de vias neuronais associadas com a sensibilidade a dor. Tardamente, a PGE₂ é também um potente agente pirético envolvido no desenvolvimento do calor, ou febre – o quarto sintoma da inflamação (CATANIA *et al.*, 1991). A produção de febre em infecções virais e bacterianas é estimulada por certas citocinas, como interleucina-1 (IL-1) (DUBE *et al.*, 2001).

Muitas doenças crônicas, como asma brônquica e artrite reumatóide, podem ser descritas como processos inflamatórios, as quais compartilham das mesmas características da inflamação aguda, apresentadas anteriormente.

3.1.1.2 Enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico

A biossíntese de eicosanóides começa com a interação de certos hormônios, fatores de crescimento ou citocinas com receptores celulares de superfície que ativam a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). O ácido araquidônico, precursor mais comum dos eicosanóides, vem das membranas celulares fosfolipídicas, onde encontra-se esterificado. A PLA₂ ativada catalisa a hidrólise desse éster liberando o ácido livre (DENNIS, 1994). A cascata da transformação do ácido araquidônico, liberação dos mediadores e enzimas envolvidas está demonstrada no Esquema 3.1.



Esquema 3.1: Biossíntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico (PARENTE e PERETTI, 2003)

Após a liberação do ácido araquidônico pela ação da PLA₂ esse ácido poderá ser metabolizado pela ação de dois grandes complexos enzimáticos.

- Cicloxigenase (COX): essa enzima, com dupla função catalítica, apresenta a atividade “cicloxigenase”, que catalisa a formação de prostaglandina G₂ (PGG₂), e a atividade “peroxidase” que catalisa uma redução de dois elétrons de PGG₂ para prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂, molécula instável, é então transformada em prostanóides: PGI₂, TXA₂, PGE₂ e prostaglandina F₂ (PGF₂) por sintases específicas em diferentes células (DANHARDT e KIEFER, 2001).
- 5-Lipoxigenase (LOX): através de um intermediário 5-hidroperóxi essa enzima produz os leucotrienos, assim chamados pela ocorrência em

leucócitos, e um trieno conjugado característico presente em sua estrutura. O primeiro composto formado é o leucotrieno A₄ (LTA₄), um metabólito instável contendo um grupamento epóxi. Derivado do LTA₄ por hidrólise enzimática tem-se o (LTB₄) e o leucotrieno C₄ (LTC₄), pela adição de um tripeptídeo catalisado pela glutathione-S-transferase. A partir do LTC₄, são produzidos leucotrieno D₄ (LTD₄) e leucotrieno E₄ (LTE₄), os três compostos do grupo conhecido como cisteinil-leucotrienos (SAMUELSSON, 1980; PARENTE e PERETTI, 2003).

3.1.1.3 Isoformas da cicloxigenase

Baseado no mecanismo de biossíntese de prostaglandinas proposto em 1967 por Hamberg e Samuelson (1967), confirmado em estudos posteriores pelos mesmos autores (HAMBERG e SAMUELSSON, 1973; *apud*: MARNETT *et al*, 1999), o termo cicloxigenase foi cunhado para descrever a enzima que catalisa a complexa formação de peróxidos bicíclicos como produtos iniciais da oxigenação de ácidos graxos polinsaturados.

Até 1991, apenas uma COX havia sido descrita, a isoenzima hoje chamada COX-1 ou enzima constitutiva. Nessa época pesquisas realizadas por Xie e colaboradores (1991), utilizando a indução da expressão de um ácido ribonucléico mensageiro (RNAm), revelaram que esse codificava proteínas tendo uma cadeia de aminoácidos com 60 % de identidade com a COX-1. Em trabalho subsequente, foi demonstrado que esta nova proteína, chamada COX-2 ou isoforma induzível, é muito similar estruturalmente a COX-1 quanto a estrutura, mas difere substancialmente no que diz respeito a sua expressão e

biologia. A razão para existência de duas isoformas é ainda desconhecida. Entretanto sabe-se que a COX-1 e a COX-2 são freqüentemente co-expressadas na mesma célula e podem atuar como partes separadas de sistemas biossintéticos que funcionam, de alguma forma, independentemente (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996).

Ambas isoformas são proteínas glicosiladas, homodiméricas, com grupamento heme e com dois sítios catalíticos. Suas principais propriedades estão resumidas na Tabela 3.3 (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

Tabela 3.3: Principais propriedades das isoformas de cicloxigenases humana

Características	COX-1	COX-2
Localização do Gene e tamanho	Cromossomo 9 22 Kb	Cromossomo 1 8,3 Kb
Massa molecular	71 KDa (~600 aa)	71 KDa (~600 aa)
Tecidos de expressão	Constitutivamente na maioria dos tecidos, particularmente estômago, rins, monócitos, macrófagos, plaquetas	Induzidamente nas células endoteliais, sinoviócitos, condrócitos, fibroblastos, musculatura lisa, aparelho reprodutivo Constitutivamente no sistema nervoso central, rins e células pancreáticas
Indutores endógenos	Não aplicável	Citocinas pro-inflamatórias, fatores de crescimento, agregação de receptores IgE, expressão de oncogenes
Inibidores endógenos	Desconhecidos	Glicocorticóides, cotocinas antiinflamatórias.
Localização intracelular	Retículo endoplasmático e membranas perinucleares	Retículo endoplasmático e membranas perinucleares

Do ponto de vista genético há muitas diferenças entre as isoformas, a começar pelo fato dos genes que as expressam estarem alocados em cromossomos diferentes. A COX-1 encontra-se no cromossomo 9 e a COX-2 no cromossomo 1. A COX-1 contém 11 exons em 22 Kb, enquanto a COX-2 tem 10 exons em 8,3 Kb. O tamanho relativamente pequeno do genoma da COX-2 encaixa-se como uma característica dos genes de expressão imediata, ou de urgência (LEVAL *et al.*, 2000).

As COX-1 e COX-2 são 63 % idênticas e 77 % similares a nível de aminoácidos. As maiores diferenças na estrutura primária estão nas regiões N-terminal e C-terminal. As estruturas terciárias e quaternárias são visualmente idênticas. O domínio catalítico é altamente conservado, com os resíduos envolvidos na catálise ou ligação com grupo heme; Arginina (Arg) -120, Histidina (His) -206, Tirosina (Tyr) -385, His-386 e His-388 preservados. Uma diferença estrutural é encontrada na posição 523 do sítio ativo destas enzimas, onde tem-se uma isoleucina (Ile) na COX-1 e uma valina (Val) na COX-2 (PICOT, LOLL e GARAVITO, 1994). O menor tamanho da valina condiciona um substancial crescimento na acessibilidade do sítio catalítico permitindo acesso a um bolso lateral no sítio catalítico, conhecido como “side-pocket”. O acesso ao “side-pocket” não é permitido estericamente pela cadeia lateral da isoleucina na COX-1 (GIERSE *et al.*, 1996).

O mecanismo através do qual as duas isoformas promovem a catálise do ácido araquidônico é praticamente o mesmo, promovem a reação de cicloxigenação (bis-oxigenação) que converte o ácido araquidônico em PGG₂, e a peroxidação que reduz a PGG₂ em PGH₂ (Figura 3.1). O sítio ativo é um canal ladeado por resíduos hidrofóbicos e inserido no maior domínio globular da enzima (SMITH, GARVITO e DeWITT, 1996).

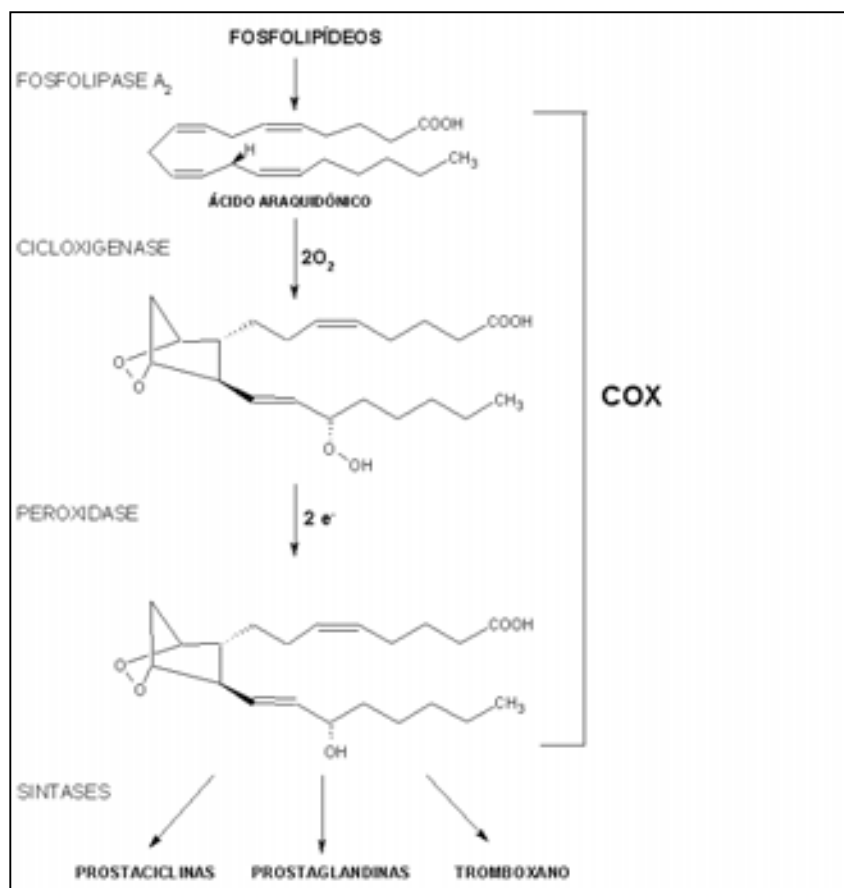


Figura 3.1: Conversão do ácido araquidônico em PGG₂ e PGH₂ (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996)

A reação de cicloxigenação requer um hidroperóxido, o qual é obtido através da oxidação do grupo heme por um mecanismo envolvendo óxido nítrico. O grupo heme então oxidado, oxida o resíduo Tyr-385 adjacente e o radical tirosinil resultante abstrai o átomo de hidrogênio na posição 13 do ácido araquidônico. O aminoácido Arg-120, também tem um papel muito importante nesta catálise, pois serve como âncora do araquidonato no sítio ativo, uma vez que se liga ao grupo carboxilato deste através de ligações de hidrogênio (Figura 3.2) (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996).

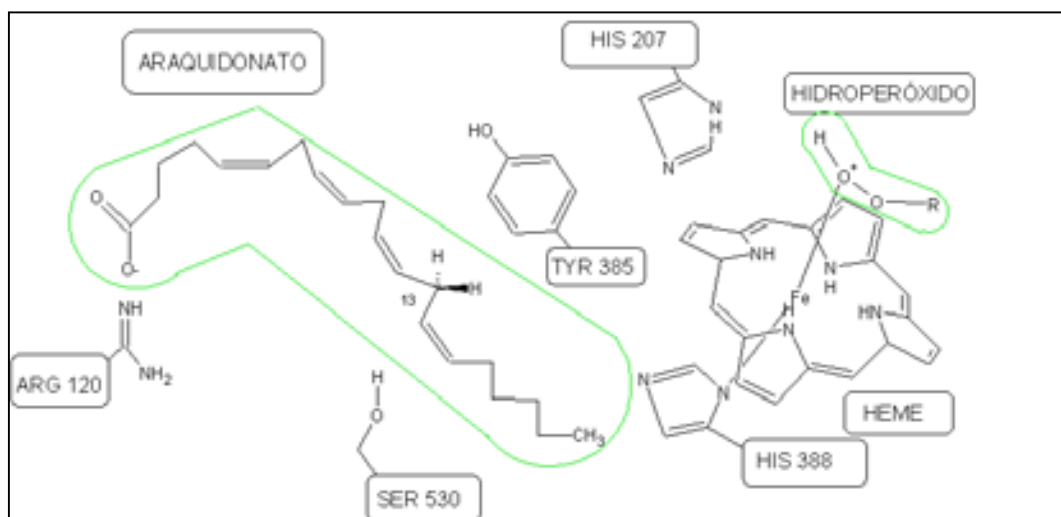


Figura 3.2: Modelo dos sítios ativos cicloxigenase e peroxidase da COX-1 ovina. Um alquil hidróperóxido é mostrado ligado ao grupo heme do sítio ativo peroxidase, e o araquidonato é demonstrado ligado ao sítio ativo cicloxigenase. Os resíduos His-388 e His-207 são os ligantes proximal e distal do heme, respectivamente. A Tyr-385 situada vizinha ao grupo heme e ligada ao araquidonato, é o resíduo que é convertido em radical tirosinil e que abstrai o átomo de hidrogênio na posição 13 do araquidonato, assim iniciando a catálise. Arg-120 localiza-se na abertura do canal hidrofóbico e é o ponto de fixação do grupo carboxilato do araquidonato (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996)

Como as prostaglandinas resultantes desta catálise medeiam inúmeras funções fisiopatológicas, as funções fisiológicas e patológicas das COX-1 e COX-2 são diferentes. A COX-1 pode ser detectada na maioria dos tecidos e é tipicamente expressa em níveis constantes através do ciclo celular. A COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos dos mamíferos, mas sua expressão pode ser rapidamente induzida em células envolvidas na inflamação, como fibroblastos, monócitos e endotélio vascular, como resposta a fatores de crescimento, promotores de tumor, hormônios, endotoxinas bacterianas e citocinas. Por esta razão, ficaram conhecidas como constitutiva e induzida, respectivamente. Recentemente, evidências demonstraram que ambas, COX-1 e COX-2, estão envolvidas em alguns processos fisiológicos e patológicos (SEIBERT *et al.*, 1994).

Como reflexo destas diferentes formas de expressão, atribui-se a COX-1 a produção das prostaglandinas que fazem a manutenção fisiológica do

organismo, que envolve, homeostase plaquetária, integridade da mucosa gástrica e regulação do fluxo renal. Por outro lado, atribui-se à COX-2 a produção das prostaglandinas envolvidas nas reações inflamatórias e responsáveis pelos sintomas da inflamação, como febre, dor, edema e vasodilatação.

Chandrasekharan e colaboradores (2002) descreveram uma terceira e distinta isoenzima, chamada cicloxigenase-3 (COX-3). Em humanos, o RNAm da COX-3 é expresso com um transcrito de aproximadamente 5,5 Kb e encontra-se abundantemente no córtex cerebral e coração. Essa isoforma pode ser inibida por fármacos analgésicos/antipiréticos, como o paracetamol e dipirona (Figura 3.3), e é potencialmente inibida por alguns NSAIDs. Assim, sugere-se que a COX-3 poderia representar um mecanismo de ação central, através do qual estas drogas diminuiriam a dor e, possivelmente a febre (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

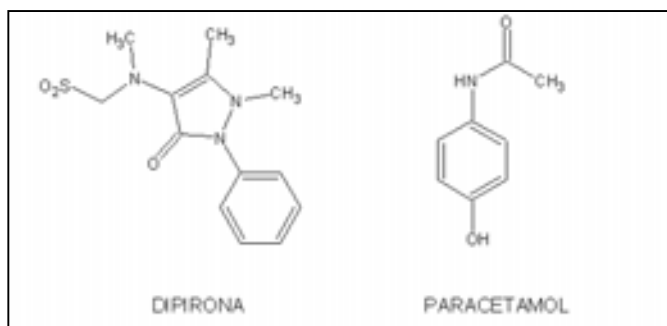


Figura 3.3: Dipirona e paracetamol: inibidores da COX-3

3.1.1.3.1 Funções fisiopatológicas das enzimas COX-1 e COX-2

Na maioria das espécies, incluindo a humana, prostaglandinas citoprotetoras da mucosa gastrintestinal são produzidas pela ação da COX-1, embora pequenas quantidades de COX-2 também sejam expressas

constitutivamente (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998). A ação citoprotetora é complexa e envolve ambas PGI_2 e PGE_2 , capazes de reduzir a secreção gástrica das células parietais, aumentar o fluxo sanguíneo nas mucosas e estimular a liberação de muco. Assim, a inibição da COX-1 danifica a mucosa gástrica, causando hemorragias e ulcerações, de forma que é aceito pela comunidade científica que a toxicidade gastrointestinal dos antiinflamatórios não-esteroidais clássicos (NSAIDs) é devida a sua ação inibitória sobre a COX-1 (PARENTE e PERETTI, 2003).

Experimentos têm demonstrado que a COX-2 é rapidamente induzida durante processos ulcerativos gastrointestinais, onde geram grandes quantidades de prostaglandinas que contribuem no processo de cura, indicando que esta enzima pode estar envolvidas numa situação especial chamada “citoproteção adaptativa” (PARENTE e PERETTI, 2003).

As prostaglandinas (PGs) contribuem, mas não necessariamente, para o funcionamento normal dos rins, regulando o tônus vascular e o fluxo sanguíneo. A produção de PGs, principalmente PGE_2 mostra-se essencial na manutenção das funções renais de portadores de insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática ou insuficiência renal (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998). Em humanos, a COX-1 é expressa constitutivamente nos vasos, nos dutos coletores e na alça de Henle. A COX-2 é expressa na mácula densa e está envolvida no desenvolvimento normal dos rins, uma vez que picos da proteína COX-2 aparecem nas 2ª e 3ª semana pós-natal, e então declina até atingir os níveis encontrados nos adultos na 12ª semana. O envolvimento de ambas isoformas na fisiologia renal é confirmado pelos dados que sugerem que NSAIDs induzem retenção de sódio em adultos saudáveis mediada pela

inibição da COX-2, enquanto a depressão da taxa de filtração glomerular é associada a inibição da COX-1 (PARENTE e PERETTI, 2003).

Nas plaquetas, a única isoforma detectável é a COX-1, que leva a formação do pró-agregatório TXA₂. Este fato explica a utilização clássica de “meio ácido acetilsalicílico por dia” como profilaxia de doenças tromboembólicas (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998), uma vez que doses baixas do ácido acetilsalicílico podem acetilar a COX-1 nas plaquetas, bloqueando irreversivelmente a síntese de TXA₂ durante seu tempo de vida na circulação sanguínea (PARENTE e PERETTI, 2003).

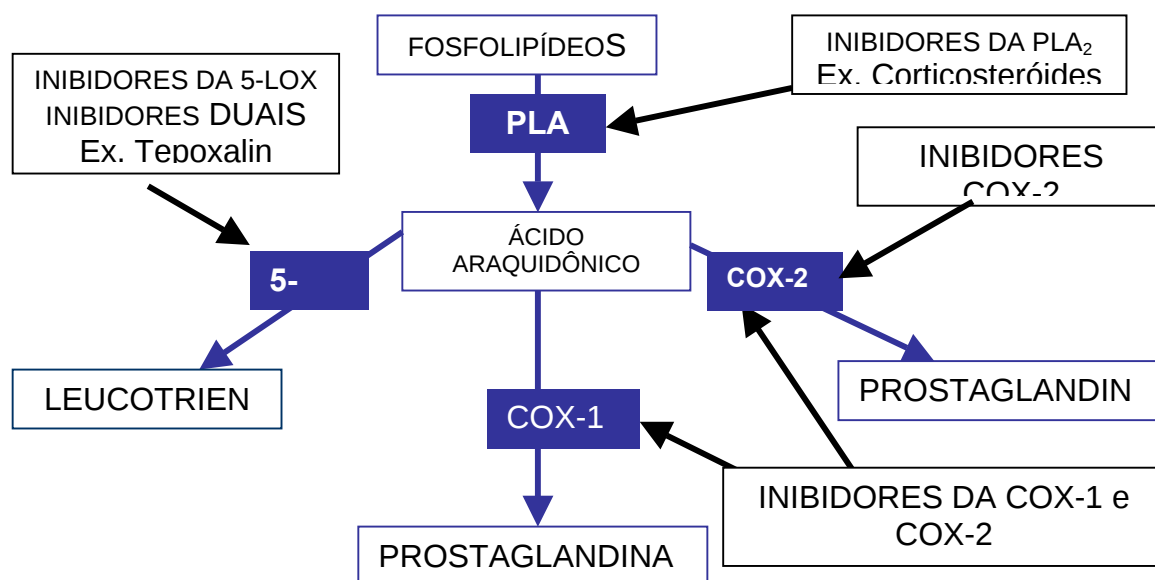
As PGs são importantes na gestação e nas contrações uterinas durante o trabalho de parto. Ambas COX-1 e COX-2 são expressas no epitélio uterino em diferentes etapas da gestação, sendo importante para a implantação do embrião e na angiogênese necessária para o estabelecimento da placenta. Prostaglandinas derivadas da COX-2 têm um papel muito importante no parto, pois os níveis dessa enzima encontram-se substancialmente aumentados no líquido amniótico imediatamente antes e ao iniciar o trabalho de parto (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

Hoje, diante das informações a respeito das funções das enzimas COX-1 e COX-2, a comunidade científica confirma que a COX-2 está claramente associada à inflamação e que fármacos inibidores seletivos desta enzima oferecem a possibilidade de inibição das PGs inflamatórias praticamente sem afetar as PGs geradas pela COX-1 no estômago, rins ou plaquetas (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

3.1.2 Fármacos antiinflamatórios

Estabelecida a relação entre os compostos eicosanóides e a inflamação, as propriedades e os mecanismos de ação dos agentes antiinflamatórios puderam ser esclarecidos. Os fármacos capazes de inibir ou interromper alguma etapa da resposta inflamatória são heterogêneos quanto a sua estrutura química e diferentes quanto ao mecanismo de ação. É possível agrupá-los através dos diferentes mecanismos de ação em: a) Antiinflamatórios esteroidais; b) Antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs); c) Antiinflamatórios inibidores seletivos da COX-2 (Coxibs); d) Inibidores da 5-LOX e inibidores duais COX/LOX; e e) Antiinflamatórios não-esteroidais doadores de óxido nítrico (NO-NSAIDs).

O Esquema 3.2 demonstra os alvos biológicos das diferentes classes de fármacos antiinflamatórios (FIORUCCI *et al.*, 2001).



Esquema 3.2: Rota de metabolismo do ácido araquidônico com os alvos biológicos dos fármacos antiinflamatórios (FIORUCCI *et al.*, 2001)

3.1.2.1 Antiinflamatórios esteroidais

Os antiinflamatórios esteroidais, também conhecidos por corticosteróides, podem ser de ocorrência natural ou sintética. Os naturais são aqueles chamados hormônios córtico supra-renais, ou seja, moléculas esteroidais sintetizadas e liberadas pelo córtex supra-renal. Podem ser classificados em vários grupos: os que possuem efeitos sobre o metabolismo intermediário (glicocorticóides), os que exercem principalmente uma função de retenção de sais (mineralocorticóides) e aqueles que apresentam atividade androgênica ou estrogênica (KATZUNG, 2000).

O principal glicocorticóide natural é o cortisol ou hidrocortisona (Figura 3.4), o qual, igualmente aos demais glicocorticóides, tem a capacidade de reduzir acentuadamente as manifestações inflamatórias, em função de seus efeitos sobre a concentração, distribuição e função dos leucócitos periféricos, bem como da inibição da PLA₂. A administração de um glicocorticóide aumenta a concentração dos neutrófilos devido a um maior influxo da medula óssea e da migração diminuída dos vasos sanguíneos; também reduz o número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos na circulação como resultado do seu movimento do tecido vascular para o linfóide (GILMAN, HARDMAN e LIMBIRD, 2002).

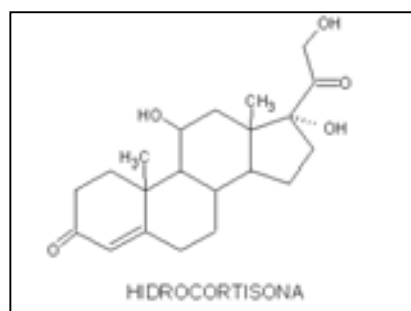


Figura 3.4: Hidrocortisona: principal glicocorticóide natural

Os glicocorticóides ainda inibem as funções dos leucócitos e macrófagos teciduais, reduzindo a capacidade destas células de responderem a antígenos e mitógenos. O efeito sobre os macrófagos é acentuado, uma vez que limita sua capacidade de fagocitar e destruir microrganismos e de produzir IL-1 (interleucina-1), pirógeno, collagenase, elastase, fator de necrose tumoral (TNF, tumoral necrose factor) e ativador de plasminogênio (GILMAN, HARDMAN e LIMBIRD, 2002).

Além dos efeitos nas funções leucocitárias, os glicocorticóides influem na resposta inflamatória através da redução da síntese de prostaglandinas e leucotrienos decorrente da ação na PLA₂. Esses hormônios aumentam a concentração de certos fosfolipídeos de membrana que parecem inibir a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, além de aumentar a concentração de lipocortinas, que aparentemente se ligam aos substratos fosfolipídicos da PLA₂. Os glicocorticóides também reduzem a expressão da COX-2, o que causa uma diminuição na quantidade de enzima disponível para a formação de prostaglandinas (ZHANG *et al.*, 1997).

Os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores desta classe de fármacos são extremamente úteis na terapêutica, entretanto são responsáveis por efeitos adversos bastante graves, como, síndrome iatrogênica de Cushing (rosto arredondado, aumento de peso, hiperglicemia, podendo chegar a diabetes

e osteoporose), retardamento da cicatrização de feridas, úlcera péptica, catarata subcapsular posterior, glaucoma, hipertensão intracraniana, psicose e aumento de infecções bacterianas e micóticas oportunistas (KATZUNG, 2000).

Do ponto de vista químico, os corticosteróides são substâncias derivadas do colesterol e são análogos a hidrocortisona, como por exemplo, a betametasona e prednisolona (Figura 3.5).

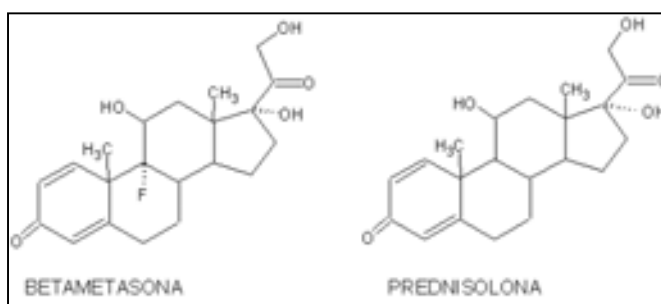


Figura 3.5: Betametasona e prednisolona: corticosteróides derivados da hidrocortisona

3.1.2.2 Antiinflamatórios não-esteroidais clássicos

As substâncias químicas que são classificadas como antiinflamatórios não-esteroidais clássicos (NSAIDs) são aquelas que inibem o processo inflamatório através da inibição não seletiva das isoformas da enzima COX e tem mecanismo de ação e estruturas químicas diferentes daquelas apresentadas pelos fármacos antiinflamatórios esteroidais.

Fazem parte desta classe o ibuprofeno, a indometacina, o flubiprofeno, ácido meclofenâmico e a aspirina (Figura 3.6). A aspirina é o primeiro e mais popular dos antiinflamatórios, utilizados na terapêutica desde 1899 (MYCEY, HARVEY e CHAMPE, 2000).

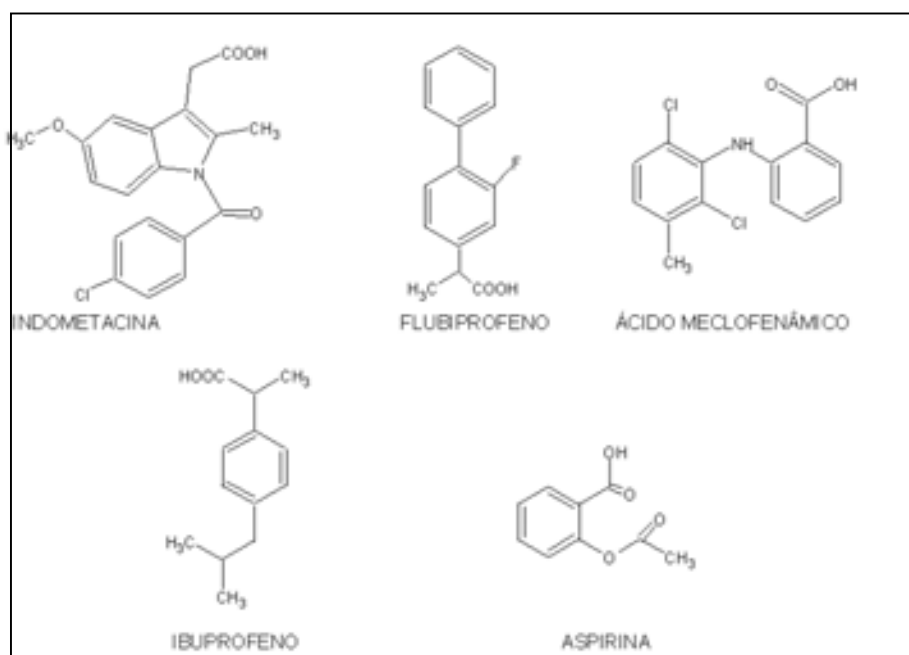


Figura 3.6: Fármacos antiinflamatórios não-esteroidais

Os NSAIDs são, do ponto de vista químico, de uma diversidade tão grande que resulta em uma gama de características estruturais e farmacocinéticas que torna impossível agrupá-los. A aspirina e os demais NSAIDs relacionam-se apenas pelo fato de serem ácidos orgânicos fracos e terem a importante propriedade de inibirem a biossíntese das prostaglandinas através da inibição da COX. Com isso, promovem uma menor liberação de mediadores por granulócitos, basófilos e mastócitos, reduzem a sensibilidade dos vasos à bradicinina e à histamina, afetam a produção de linfocinas pelos linfócitos T e reverterem a vasodilatação. Em graus variáveis, inibem a síntese de protrombina, são analgésicos, antipiréticos e inibem a agregação plaquetária. Em contrapartida, todos são irritantes gástricos, uma vez que não são seletivos para COX-2, e apresentam elevada nefrotoxicidade (KATZUNG, 2000).

Estudos de cristalografia de raio-X mostram que a porção ácida dos NSAIDs forma uma ligação através de ligações de hidrogênio com o resíduo

Arg-120 das enzimas COX-1 e COX-2, da mesma forma que seu substrato endógeno, o ácido araquidônico, impedindo a sua entrada no sítio catalítico da enzima (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996). A análise da cristalografia de raio-X da aspirina ligada a COX-1 ovina, mostrou que esta molécula é capaz de produzir uma acetilação no resíduo Serina (Ser) -530 (Figura 3.7). A modificação covalente da enzima pela aspirina causa sua inativação permanente (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996).

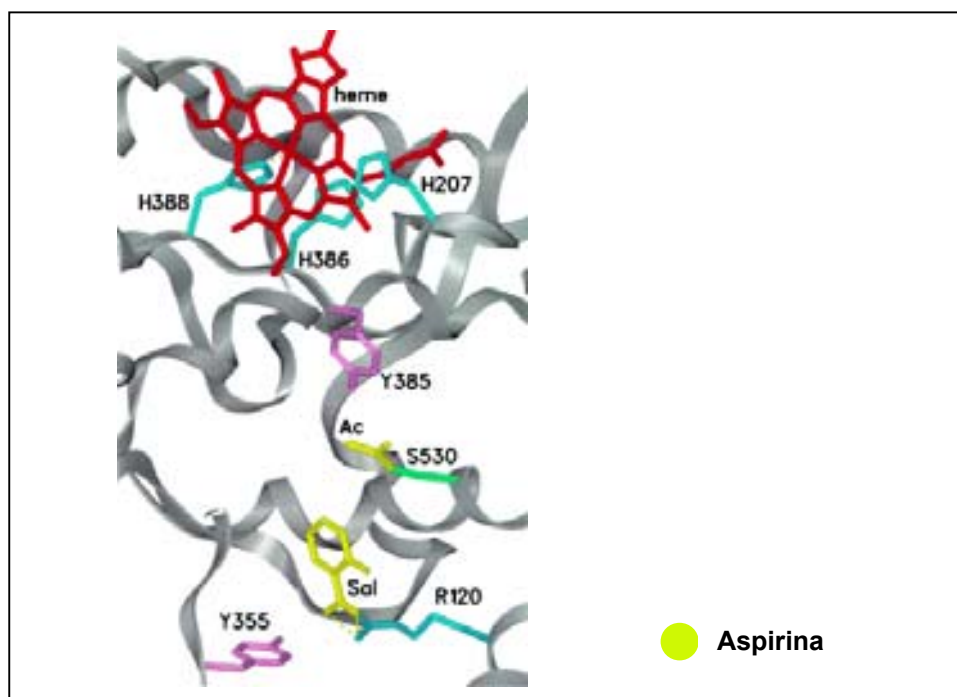


Figura 3.7: Estrutura cristalina do sítio ativo da COX-1 ovina acetilada pela aspirina (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996)

A aspirina representa um caso singular de atividade farmacológica uma vez que forma ligação covalente e inibição irreversível das COXs. Tal inibição justifica seu comportamento único frente o longo período de inibição da agregação plaquetária que promove, uma vez que as plaquetas circulantes, ao contrário das demais células, não são capazes de produzir novas COXs (KALGUTKAR *et al.*, 1998).

Em outro extremo estão os agentes NSAIDs, como o Ibuprofeno, que se comportam como um típico inibidor competitivo reversível das COXs. Existindo também um número de NSAIDs, incluindo indometacina, flubiprofeno e ácido meclofenâmico, que exibem um comportamento inibitório intermediário e são conhecidos como inibidores reversíveis tempo-dependente (SMITH, GARAVITO e DeWITT, 1996).

O grande inconveniente na utilização dos NSAIDs clássicos é, devido a sua não-seletividade na inibição da COX, ou seja, inibe as duas isoformas da enzima, acarretando uma série de efeitos adversos graves. Os NSAIDs têm sido responsáveis por muitos casos de insuficiência renal aguda e de síndrome nefrótica, que se desenvolve insidiosamente, não dependendo da dose ou do tempo de uso da fármaco. A importância das ulcerações gástricas nos pacientes que usam doses antiinflamatórias de NSAIDs faz com que fármacos como misoprostol, um análogo da PGE_1 seja utilizado concomitantemente ao tratamento a fim de proteger a mucosa, ou ainda a utilização de tratamentos simultâneos com anti-histamínicos H_2 , como a cimetidina ou inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol (Figura 3.8) (LEVAL *et al.*, 2001).

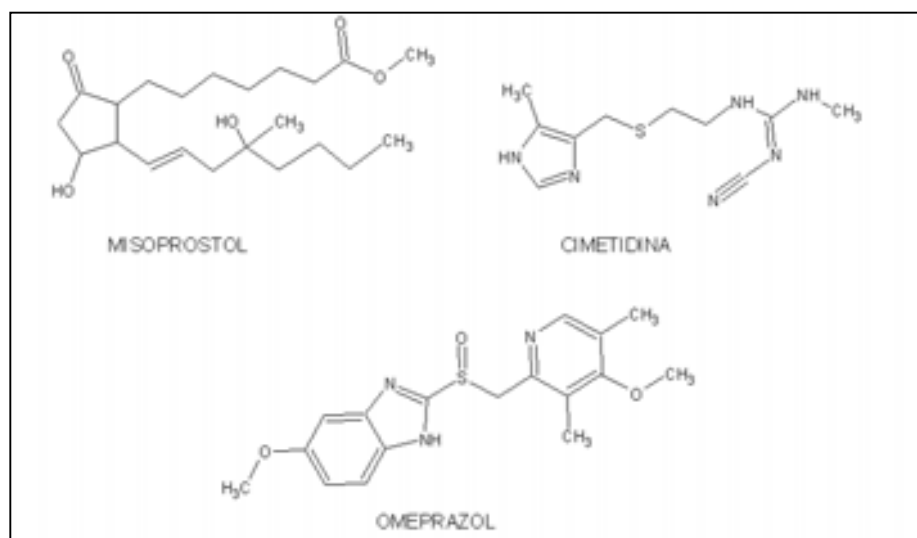


Figura 3.8: Fármacos utilizados na prevenção de úlceras gástricas de pacientes tratados com NSAIDs

Pacientes com doenças inflamatórias crônicas são os mais atingidos pelos efeitos adversos dos NSAIDs. Estudo multicêntrico, randomizado e duplo-cego realizado por Hawkey e colaboradores (2003) evidenciaram a incidência de úlceras em 25,5 % dos casos utilizando naproxeno (Figura 3.9), um NSAID clássico, contra 2,9 % do placebo, num período de 12 semanas. Tais eventos surtam um impacto econômico grande, pois geram consultas médicas por efeitos adversos, internações hospitalares por hemorragias gastrintestinais e necessidade de utilização de fármacos gastroprotetores (SOLOMON *et al.*, 2003).

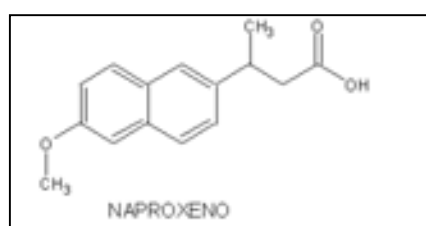


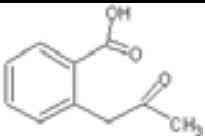
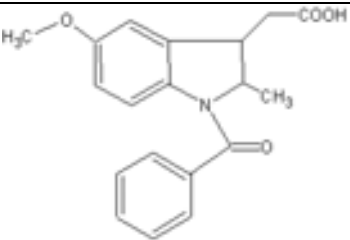
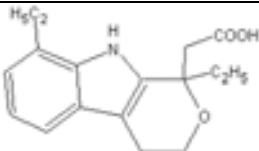
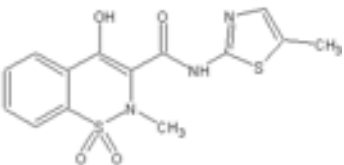
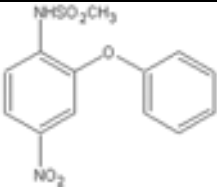
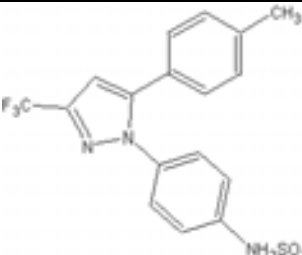
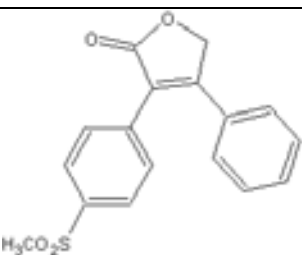
Figura 3.9: Naproxeno

3.1.2.3 Antiinflamatórios inibidores seletivos da COX-2

O reconhecimento de que a enzima COX existe em duas isoformas foi o acontecimento responsável pelo surgimento de uma nova classe de fármacos, desenvolvidos com base em um planejamento racional a fim de atingir unicamente a forma indutiva da enzima, a COX-2. A primeira geração de inibidores seletivos vieram de modelos animais cujos compostos apresentavam grande potência antiinflamatória com reduzidos efeitos colaterais no estômago. Nimesulida, etodolac e meloxicam (Tabela 3.4) foram descobertos desta maneira e encontram-se disponíveis no mercado (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

Por muitos anos pesquisadores questionaram-se a respeito da nimesulida, pois essa apresentava excelente performance nos ensaios *in vivo*, mas nos testes inibitórios frente a COX *in vitro* não demonstrava inibição. Na época, os ensaios *in vitro* para COX eram realizados com a enzima extraída de vesículas seminais, onde encontra-se predominantemente a COX-1. Mais tarde, após a descoberta da isoforma COX-2, nimesulida, etodolac e meloxicam, foram ensaiados para esta e confirmaram sua seletividade frente a COX-2 (Tabela 3.4) (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

**Tabela 3.4: Atividade de fármacos anti-inflamatórios [a) VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998
b) LEVAL et al., 2001]**

Fármaco	Estrutura Química	IC ₅₀ COX-1 (μM)	IC ₅₀ COX-2 (μM)	Razão IC ₅₀ COX-1/COX-2
Aspirina ^{1a}		1,67	278	166
Indometacina ^{1a}		0,028	1,68	60
Etodolac ^{2a}		34	3,4	0,1
Meloxicam ^{2a}		4,8	0,43	0,09
Nimesulida ^{2a}		9,2	0,52	0,06
Celecoxib ^{3a}		15	0,04	0,003
Rofecoxib ^{2b}		7,8	0,77	0,098

Ensaios realizados em 1) Células animais; 2) Sangue humano 3) Enzimas humanas

De uma segunda geração de agentes antiinflamatórios, então planejados racionalmente e mais seletivos frente a COX-2, os dois primeiros medicamentos da classe dos Coxibs introduzidos na clínica médica no final da década de 1990 foram o Celocoxib (Celebra, Celebrex[®]) e Refocloxib (Vioxx[®]) (Tabela 3.4) (HAWKEY, 1999).

A diferença na inibição da COX-2 e da COX-1 deve-se a alguns fatores. Primeiramente, a interação através de ligações de hidrogênio com o resíduo Arg-120, comprovada para a maioria dos NSAIDs não está presente nos Coxibs. Embora na COX-2 exista o mesmo resíduo Arg-120, os Coxibs não possuem grupamento ácido, de forma que, para o planejamento de novos Coxibs, não é desejável a presença do grupamento ácido (HAWKEY, 1999).

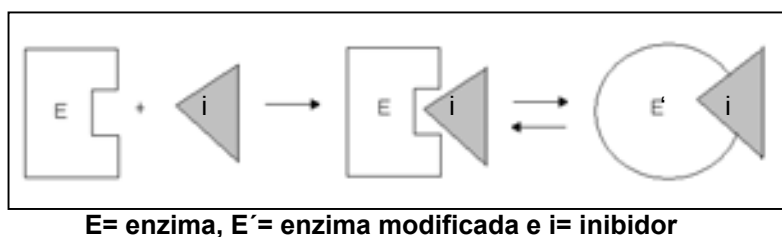
É sabido também que a modificação na posição 523, uma isoleucina na COX-1 e valina na COX-2, leva a uma abertura no canal hidrofóbico, dando acesso a um “side-pocket”, o qual é utilizado para ligação de muitas substâncias seletivas, freqüentemente via grupos sulfonil, sulfona ou sulfonamida ou extensões laterais rígidas (HAWKEY, 1999).

Recentes estudos indicam que resíduos Tyr-385 e Ser-530 também exercem função importante na inibição da COX-2, uma vez que evidências cristalográficas sugerem que tais aminoácidos poderiam quelar grupos polares ou negativamente carregados do ácido araquidônico, aspirina e diclofenaco (ROWLINSON *et al.*, 2003).

A cinética da inibição da COX-2 também é diferente da COX-1. Na COX-1 tem-se uma inibição instantânea e competitivamente reversível, como é esperado para um processo baseado em ligações de hidrogênio; excetuando a aspirina. A inibição da COX-2 é dependente de tempo, com o desenvolvimento

da seletividade após 15-30 minutos e após isto, essencialmente irreversível. A cinética completa com ligação covalente e/ou mudanças conformacionais secundárias no canal ainda não está clara (HAWKEY, 1999).

Coopland e colaboradores (1994) após estudarem a cinética de inibição de alguns inibidores seletivos da COX-2, constataram que não há modificação química no inibidor. Esses autores propuseram que o inibidor levaria a uma transição conformacional da enzima levando a uma significativa fixação (para todos os propostos práticos, irreversível) do inibidor com a enzima, sem qualquer modificação química da enzima ou do inibidor, conforme representado no Esquema 3.3.



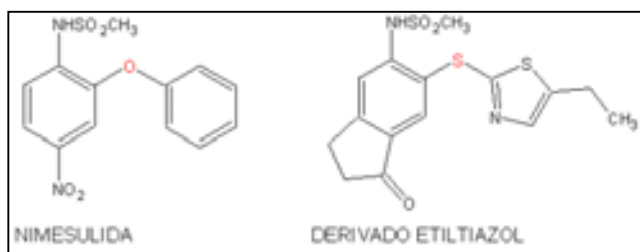
Esquema 3.3: Cinética de inibição da COX-2 proposta por Coopland e colaboradores (1994)

Do ponto de vista da Química Medicinal, os Coxibs podem ser divididos em a) inibidores metanossulfanilidas; b) inibidores cíclicos diarilsubstituídos; c) derivados *terc*-butil-fenóis; e d) agentes diversos.

3.1.2.3.1 Metanossulfanilidas

As metanossulfanilidas representam uma importante classe de Coxibs pode ser considerada como derivada da nimesulida, um fármaco conhecido desde os anos de 1960. Estruturalmente esses inibidores da COX-2 são caracterizados como éteres diarílicos com alquilsulfanilidas ligadas a um dos anéis aromáticos, a porção alquila do grupo sulfonil é tipicamente um grupamento metil ou triflúor-metil e, em posição *para* a esse grupamento invariavelmente está presente um grupo retirador de elétrons (DANNHARDT e KIEFER, 2001)

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os análogos tioéter são inibidores mais potentes e que um derivado etiltiazol (Figura 3.10) é considerado o antiinflamatório mais potente da classe metanossulfanilidas



(LEVAL *et al.*, 2000).

Figura 3.10: Nimesulida e derivado etiltiazol (N-{6-[(5-etil-1,3-tiazol-2-il)tio]-1-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-5-il}-metanosulfonamida)

3.1.2.3.2 Ciclos diarilsubstituídos

Em contraste às metanossulfanilidas, a derivação química da classe dos ciclos diarilsubstituídos não está bem estabelecida. Sugere-se que possa derivar do indoxol e da fenilbutazona, representados na Figura 3.11, que são

ciclos diarilsubstituídos sintetizados na década de 1960 e identificados como potentes antiinflamatórios (LEVAL *et al.*, 2000).

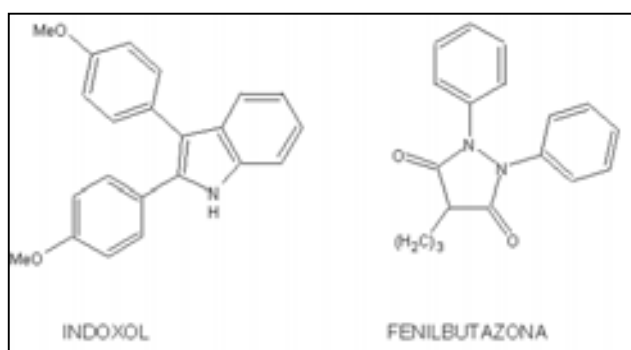


Figura 3.11: Indoxol e fenilbutazona

Durante os anos de 1970 e 1980, vários grupos de pesquisa em Química Medicinal interessaram-se nessa classe de fármacos e um grande número de compostos foram sintetizados e tiveram sua atividade antiinflamatória e inibidora da COX-2 avaliadas. A maior diferença entre os representantes dessa classe está na natureza do anel central. Tiazóis, oxazóis, furanos, pirróis, pirazóis, imidazóis, isoxazóis, tiofenos, ciclopentenos e muitos outros foram propostos.

Os heterociclos diarilsubstituídos contendo grupos 4-metóxi ou 4-halogênios normalmente apresentam maior potencial antiinflamatório que os análogos não substituídos. A grande maioria dos ciclos diarilsubstituídos também compartilham da presença de grupos alquilsulfanilidas (LEVAL *et al.*, 2000). Alguns exemplos de moléculas com atividade antiinflamatória que possuem anéis centrais do tipo ciclobuteno (FREISEN *et al.*, 1996), ciclopenteno (REITZ *et al.*, 1994), tiofeno (LEBLANC *et al.*, 1995), pirrol (KHANNA *et al.*, 1997), furano (DUCHARME *et al.*, 1995) e pirazol (MATSUO *et al.*, 1991) podem ser vistas na Figura 3.12.

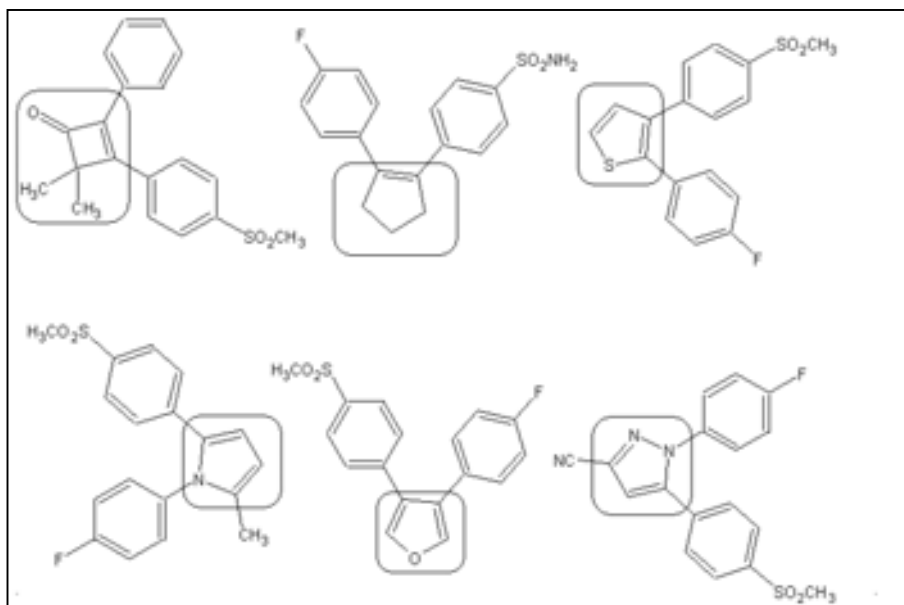


Figura 3.12: Moléculas com atividade antiinflamatória contendo diferentes anéis centrais: 4,4-dimetil-3-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-fenilciclobut-2-en-1-ona; 4-[2-(4-flúorfenil)ciclopent-1-en-1-il]-benzenosulfonamida; 2-(4-flúorfenil)-3-[4-(metilsulfonil)-fenil]-tiofeno; 1-(4-flúorfenil)-2-metil-5-[4-(metilsulfonil)-fenil]-1H-pirrol; 3-[4-(metilsulfonil)-fenil]-4-fenilfurano; 1-(4-flúorfenil)-5-[4-(metilsulfonil)-fenil]-1H-pirazol-3-carbonitrila

Da classe dos tiazóis, tem-se como exemplo a molécula mostrada na Figura 3.13, que é um potente e seletivo inibidor da COX-2 (TALLEY *et al.*, 1996 *apud* LEVAL *et al.*, 2000).

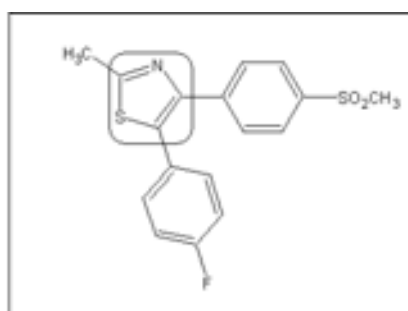


Figura 3.13: Inibidor seletivo da COX-2, contendo como heterociclo central o tiazol: (5-(4-flúorfenil)-2-metil-4-[4-(metilsulfonil)-fenil]-1,3-tiazol

Os fármacos celecoxib e rofecoxib também pertencem a essa classe.

3.1.2.3.3 Di-*terc*-butil-fenóis

Recentemente, di-*terc*-butil-fenóis foram descritos como uma nova classe de potentes e seletivos inibidores da COX-2. Nessa classe, uma série de tiazolonas, oxazolonas, 1,3,4-tiadiazóis e 1,3,4-oxadiazóis foram sintetizados e avaliados farmacologicamente. Por exemplo, a tiazolona di-*terc*-butil-fenol (Figura 3.14) mostrou-se especialmente potente e seletiva frente a COX-2. Quando administrada em ratos na forma de colinato, demonstrou grande potência no teste de edema de pata induzida por carregenina, além de revelar propriedades analgésicas nos teste da dor induzida por ácido acético ($ED_{40} = 0,1 \text{ mg/Kg}$) (LEVAL *et al.*, 2000).

Segundo Dannhardt e Kiefer (2001) os di-*terc*-butil-fenóis agem também através de um mecanismo de ação oxidativo.

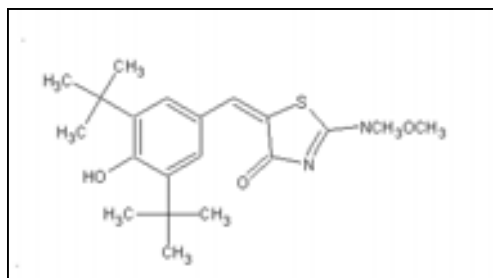
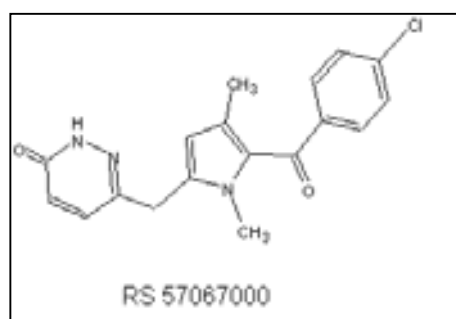


Figura 3.14: Tiazolona di-*terc*-butil-fenol

3.1.2.3.4 Agentes diversos

Compostos de estruturas químicas diversas, sem grupos alquilsufanilidas ou ciclos diarilsubstituídos, levou a comunidade científica a apresentar inúmeras novas substâncias antiinflamatórias potentes e seletivas para COX-2. O composto 6-[[5-(4-clorobenzoil)-1,4-dimetil-1*H*-pirrol-2-il]-metil]-piridazin-3-(2*H*)-ona (RS 57067000) (Figura 3.15), é citado por Vane, Bakhle e Botting (1998) como o provável primeiro composto de uma nova classe de



inibidores da COX-2.

Figura 3.15: Composto RS 57067000

Muitos autores têm proposto modificações estruturais em NSAIDs não-seletivos, como aspirina, flubiprofeno e indometacina, a fim de obter inibidores seletivos. Tais modificações não são aleatórias, são baseadas em extensivos estudos de relação estrutura-atividade dos compostos (KALGUTKAR *et al.*, 2000).

Estudos recentes realizados por Kalgutkar e colaboradores (2000) demonstraram que a derivação dos grupos carboxílicos na indometacina e no ácido meclofenâmico resultaram em compostos potentes e inibidores seletivos da COX-2. Com o mesmo objetivo, Woods e colaboradores (2001) substituíram

o grupo carboxílico pelo anel tiazol e obtiveram compostos potentes e seletivos para COX-2 (Figura 3.16).

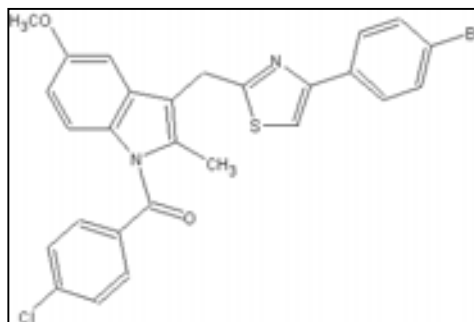


Figura 3.16: Análogo tiazol da indometacina: 1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metil-3-[[4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol-2-il]-metil]-1H-indol

3.1.2.4 Inibidores da LOX e inibidores duais COX/LOX

O leucotrienos (LTs) são produzidos pela 5-lipoxigenase (5-LOX), especialmente os cisteinil-leucotrienos, e estão envolvidos na fisiopatologia da asma. Um exemplo de inibidor da 5-LOX é o zileuton (Zyflo[®]) (Figura 3.17) com eficácia similar ao tratamento com corticosteróides, é utilizado para aliviar sintomas relacionados com a asma (McGILL e BUSSE, 1996).

Como os LTs induzem a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucina-8 (IL-8) e fator de ativação plaquetária (PAF), e o leucotrieno B₄ (LTB₄) é um marcante quimiotático de neutrófilos e eosinófilos os LTs também estão envolvidos na patogênese de uma variedade de doenças inflamatórias humanas; muitos trabalhos são desenvolvidos visando inibir além da COX, a enzima 5-LOX. Um exemplo de inibidor dual é o tepoxalin (Figura 3.17) (FIORUCCI *et al.*, 2001).

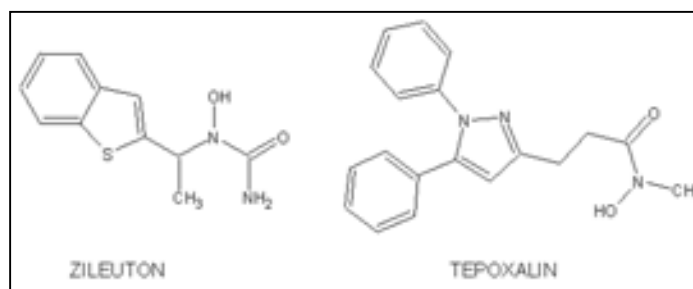


Figura 3.17: Inibidores da 5-LOX: zileuton e tepoxalin

3.1.2.5 Antiinflamatórios não-esteroidais doadores de óxido nítrico

Uma alternativa aos Coxibs no tratamento da inflamação são os chamados NO-NSAIDs, onde NO representa óxido nítrico. Baseado nas observações de que o óxido nítrico, assim como certas PGs, protegem a mucosa gástrica e que camundongos deficientes de COX-1 não desenvolvem úlceras gástricas, um precursor de óxido nítrico é ligado aos convencionais NSAIDs. Essas drogas tem o propósito de liberar óxido nítrico para a mucosa gástrica, a fim de compensar a redução de eicosanóides gerada pelo efeito inibitório do NSAID. Alguns compostos experimentais incluem nitro-aspirina (Figura 3.18), nitro-ibuprofeno e nitro-naproxeno (CHIROLI *et al.*, 2003).

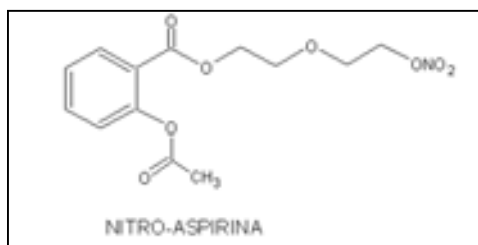


Figura 3.18: Nitro-aspirina (2-[2-(nitroxí)-etóxi]-etil-2-(acetilóxi)-benzoato)

3.2 Planejamento de fármacos

3.2.1 Descoberta de novos fármacos

O descobrimento de um novo fármaco é o processo através do qual novas substâncias químicas com atividade farmacológica são identificadas e desenvolvidas.

Durante muitos anos, a descoberta de fármacos foi realizada de maneira empírica ou acidental. Exemplos clássicos dessas descobertas são a penicilina e os nitrocompostos.

A penicilina teve sua descoberta acidental, quando Fleming, em 1928, verificou que colônias de estafilococos sofreram lise quando cultivadas em placas de Petri que haviam sido contaminadas por um fungo do gênero *Penicillium*. Seus esforços para extrair a substância bacteriolítica não tiveram êxito. Mais tarde, em 1939 Chain e Florey conseguiram fazer seu isolamento e purificação, dando início a uma classe de fármacos antimicrobianos chamada Penicilina (FLEMING, 1946).

Empiricamente, a observação de constantes dores de cabeça, causadas por vasodilatação, em trabalhadores que manuseavam explosivos do tipo nitroglicerina levou ao estudo dessa substância para o tratamento da angina, uma vez que poderia vir a dilatar também as válvulas cardíacas. Em janeiro de 1879, William Murrel publicou na revista *The Lancet* o artigo intitulado “Nitroglycerin as a remedy for angina pectoris”, confirmando a utilização eficaz de nitroglicerina para o tratamento da angina (SHELVIN, 1982).

Materiais de origem natural foram e ainda têm sido um importante caminho na descoberta de novos fármacos. Principalmente com o auxílio da etnobotânica, muitas drogas importantes foram introduzidas, tais como morfina (*Papaver somniferum*) (MYCEY, HARVEY e CHAMPE, 2000) e paclitaxel (*Taxus brevifolia*) (KOPPAKA *et al.*, 1996).

A partir de fármacos já conhecidos tem-se a possibilidade de realizar uma descoberta testando-os para outras atividades, como foi o caso da descoberta da atividade tricogênica do, até então, anti-hipertensivo minoxidil (CLISSOLD e HEEL, 1987). Fármacos conhecidos também podem gerar novos a partir do estudo de seu metabolismo, como no caso da descoberta da hicantona, que foi desenvolvida a partir do estudo do metabolismo da lucantona, potente anti-helmíntico da classe das tioxantronas (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995).

Com os avanços nos estudos de relação estrutura-atividade, a descoberta e a caracterização de receptores biológicos e os progressos na área de química computacional iniciou-se uma nova era na descoberta de novos fármacos: a descoberta feita através do planejamento racional (RATTI e TRIST, 2001).

Como exemplo, desenhada para atuar como antagonista seletiva dos receptores histaminérgicos do tipo 2, a cimetidina foi o primeiro fármaco reconhecido como racionalmente planejado (BLACK *et al.*, 1972).

3.2.2 Planejamento racional de fármacos

Por definição, planejamento racional de fármacos, ou “rational drug desing”, é o desenho de moléculas baseado no conhecimento de características farmacologicamente relevantes na estrutura da proteína alvo obtida por métodos de cristalografia de raios-X (KOPPAL, 2003) Constitui uma ferramenta poderosa na descoberta de fármacos que possam ser:

- Eficazes e seguros;
- Bem absorvidos oralmente e biodisponíveis;
- Metabolicamente estáveis para manter uma desejável meia-vida;
- Atóxicos e causar mínimos efeitos adversos;
- Distribuídos seletivamente no(s) tecido(s) alvo(s) (NEAMATI e BARCHI, 2002).

A principal estratégia utilizada para o planejamento racional de fármacos é aquela baseada no mecanismo de ação farmacológica pretendido, também denominada abordagem fisiológica. As etapas hierárquicas da abordagem fisiológica estão ilustradas esquematicamente na Figura 3.19 (BARREIRO, 2002). Nessa abordagem está sub-entendido o conhecimento da fisiopatologia em questão, condição essencial à correta eleição do alvo terapêutico mais adequado, que é a etapa inicial deste processo.

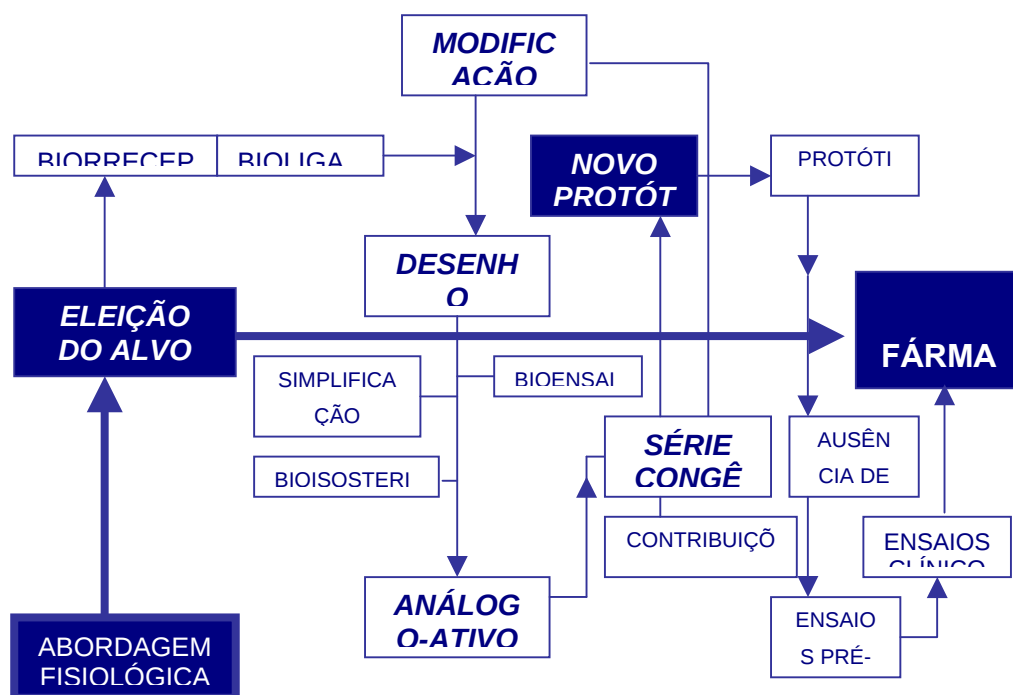


Figura 3.19: Etapas hierárquicas do processo de descobrimento reacional de fármacos baseado na abordagem fisiológica: da esquerda para direita, iniciando com a etapa crítica de eleição do alvo terapêutico (BARREIRO, 2002)

O alvo terapêutico é representado por uma enzima ou receptor e o planejamento do novo ligante pode ser realizado introduzindo-se modificações moleculares clássicas no substrato natural e/ou sintético, já conhecidos para este receptor, ou estudando-se índices de complementaridade entre ligante-receptor com emprego de técnicas computacionais (BARREIRO, 2002).

3.2.3 Modificações moleculares

As modificações moleculares são a chave para a manipulação de atividade farmacológica e potência. Após anos de estudos das relações entre estrutura e atividade biológica, várias metodologias de modificação molecular foram estabelecidas, como homologação, quebras de cadeia, transformações cadeia-anel, isosterismo e bioisosterismo (SILVERMAN, 1992).

3.2.3.1 Homologação, quebras em cadeias e transformações cadeia-anel

A homologação utiliza o aumento ou diminuição da cadeia de um composto protótipo utilizando uma unidade constante, normalmente um grupo $-\text{CH}_2-$. Para muitas séries de compostos, o aumento da cadeia lateral de um até cinco, e de cinco até nove, leva a uma aumento nos efeitos farmacológicos. A partir daí, qualquer aumento resulta em súbito decréscimo da atividade. Este fenômeno está provavelmente relacionado ao aumento da lipofilicidade da molécula, que permite a penetração através das membranas celulares até que a baixa solubilidade em água se torne um problema para ser transportada em meio aquoso (SILVERMAN, 1992).

Uma modificação molecular baseada em quebras das cadeias laterais pode afetar o efeito do composto de duas maneiras: alterando sua lipofilicidade, da mesma forma que nas séries homólogas, e interferindo na ligação com o receptor. Por exemplo, é comum que aminas primárias sejam mais ativas que secundárias, e estas mais que terciárias (SILVERMAN, 1992).

Modificações moleculares podem ser obtidas através da transformação de cadeias alquílicas em análogos cíclicos e vice-versa, interferindo na ligação com o receptor, podendo ser uma importante ferramenta para restringir uma determinada conformação e conferir rigidez estrutural (SILVERMAN, 1992).

3.2.3.2 Isosterismo e bioisosterismo

A alteração ou inserção de substituintes, cujas propriedades são similares, em uma molécula protótipo é chamada substituição isostérica ou bioisostérica. Por definição o isosterismo químico descreve as similaridades nas propriedades entre átomos, grupos funcionais, radicais e moléculas (KNITTEL e ZAVOD, 2002).

Inicialmente os isósteros seguiam os postulados de Grimm e Erlenmeyer. Grimm descreveu similaridades entre grupos que tem o mesmo número de valência de elétrons, podendo ter diferentes números de átomos. Erlenmeyer redefiniu o conceito, como sendo átomos, íons ou moléculas em que a camada periférica de elétrons possa ser considerada idêntica (SILVERMAN, 1992).

A dificuldade em relacionar propriedades biológicas com propriedades físico-químicas de átomos individuais, grupos funcionais ou moléculas, devido a infinidade de parâmetros físico-químicos envolvidos simultaneamente, tornou necessária a introdução de um novo conceito: o bioisosterismo (KNITTEL e ZAVOD, 2002).

Bioisósteros não tem o mesmo número de átomos e não se encaixam nas regras estéricas e eletrônicas dos isósteros clássicos, mas mantém alguma

similaridade química e, principalmente, produzem atividades biológicas similares. Desta forma, a aplicação do conceito de biosisoterismo representa uma forma de modificar a estrutura química de um composto protótipo que pode ser útil para atenuar a toxicidade, modificar a atividade farmacológica e pode provocar significantes alterações de metabolismo (THOMAS, 2003).

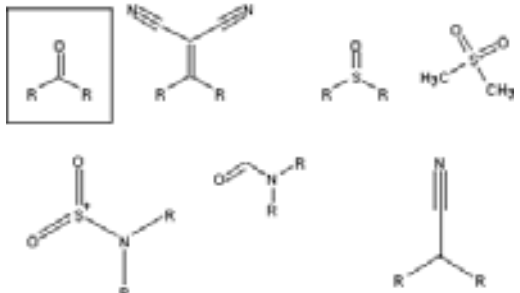
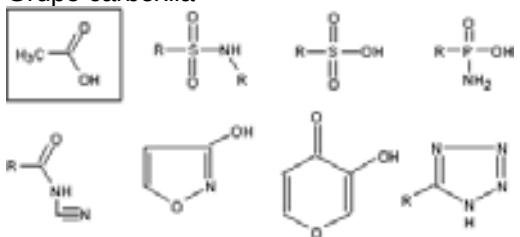
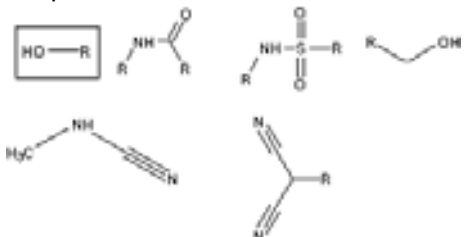
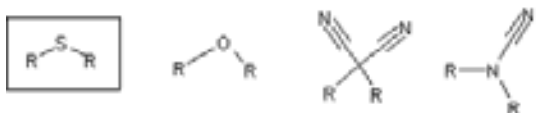
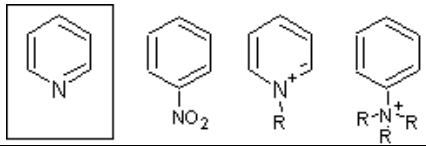
Os bioisósteros podem ser divididos em:

- Bioisósteros clássicos: que incluem átomos e grupos de átomos monovalentes, divalente, trivalentes ou tetravalentes, e, anéis equivalente;
- Bioisósteros não-clássicos: que incluem grupos intercambiáveis e anéis versus estrutura não-cíclica (KNITTEL e ZAVOD, 2002).

Exemplos de isósteros clássicos, também chamados bioisósteros clássicos e bioisósteros não-clássicos podem ser observados na Tabela 3.5.

Através de modificações bioisostéricas um ou mais dos seguintes parâmetros podem ser modificados: tamanho, forma, distribuição eletrônica, lipossolubilidade, hidrossolubilidade, pK_a , reatividade química e ligações de hidrogênio (SILVERMAN, 1992).

Tabela 3.5: Bioisósteros clássicos e bioisósteros não-clássicos (SILVERMAN, 1992; THOMAS, 2003)

Bisósteros clássicos	Bioisósteros não-clássicos
Átomos e grupos Univalentes a. CH_3 NH_2 OH F Cl b. Cl PH_2 SH c. Br <i>i</i>-Pr d. I <i>t</i>-But	Grupo Carbonila 
Átomos e grupos Bivalentes a. $-\text{CH}_2-$ $-\text{NH}-$ $-\text{O}-$ $-\text{S}-$ $-\text{Se}-$ b. $-\text{COCH}_2\text{R}$ $-\text{CONHR}$ $-\text{CO}_2\text{R}$ $-\text{COSR}$	Grupo carboxila 
Átomos e grupos Trivalentes a. $-\text{CH}=$ $-\text{N}=$ b. $-\text{P}=$ $-\text{As}=$	Grupo Hidroxila 
Átomos Tetravalentes a. $\begin{array}{c} \\ -\text{C}- \\ \end{array}$ $\begin{array}{c} \\ -\text{P}- \\ \end{array}$	Halogênios X CF_3 CN $\text{N}(\text{CN})_2$ $\text{C}(\text{CN})_3$
Anéis equivalentes a. $-\text{CH}=\text{CH}-$ $-\text{S}-$ b. $-\text{CH}=$ $-\text{N}=$ c. $-\text{O}-$ $-\text{S}-$ CH_2- $-\text{NH}-$	Tioéter 
	Piridina 
	Hidrogênio H F

3.2.4 Planejamento de fármacos antiinflamatórios seletivos à COX-2

Pode-se afirmar que grande parte dos Coxibs derivam quimicamente da nimesulida (Figura 3.20), estruturalmente caracterizada como uma alquilsulfonanilida. Uma grande variedade de compostos foram sintetizados com diferentes grupos retiradores de elétrons na posição 4, incluindo carbóxi, deoxicarbonil, aminocarbonil, ciano, aminosulfonil ou trifluórmetil. Seguindo esta estratégia, o grupo farmacêutico Schering obteve a flosulida, que teve seu esqueleto estrutural aproveitado pelo grupo Merck na elaboração do composto N-{6-[(2,4-difluórfenil)-tio]-1-oxo-2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il}-metano-sulfonamida (L-745.337), que é um análogo tioéter da flosulida (Figura 3.20) (LEVAL *et al.*, 2000).

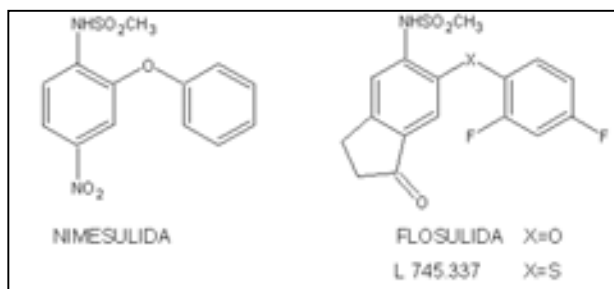


Figura 3.20: Nimesulida, flosulida e L 745.337

Rodrigues e colaboradores (2002) sintetizaram derivados 1,2-benzotiazóis (Figura 3.21) que são estruturalmente relacionados à flosulida. Esses derivados foram desenhados explorando o conceito de bioisosterismo, substituindo o átomo de oxigênio formador o diariléter e o anel ciclopentanona da flosulida por um grupo metileno e o anel 1,3-dioxolano (Figura 3.21).

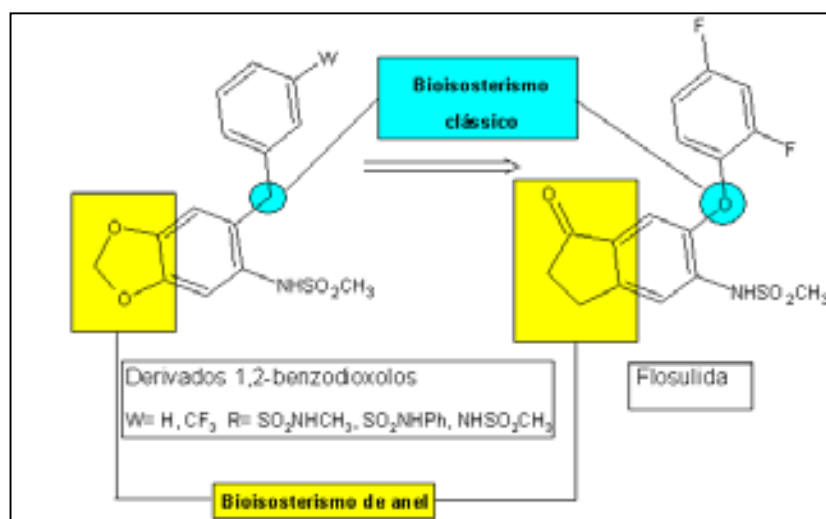
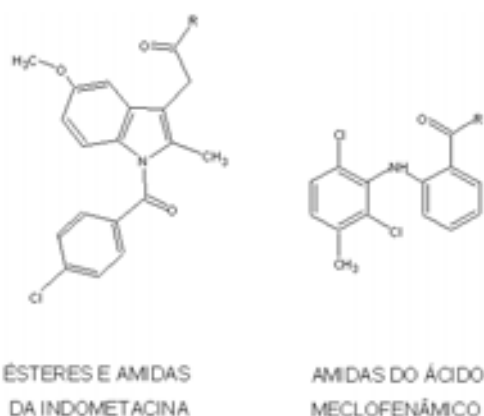


Figura 3.21: Utilização do bioisosterismo para o planejamento de derivados 1,2-benzodioxolos (RODRIGUES et al., 2002)

Tendo como alvo terapêutico a enzima COX-2, Kalgutkar e colaboradores (2000) obtiveram sucesso ao realizar modificações moleculares clássicas baseadas em estudos de relação estrutura-atividade em dois NSAIDs, a indometacina e o ácido meclofenâmico, a fim de identificar inibidores seletivos da COX-2 (Tabela 3.6).

Tabela 3.6: Inibição das enzimas COX-1 e COX-2 por diferentes ésteres e amidas da indometacina e amidas do ácido meclofenâmico (KALGUTKAR et al., 2000)



Composto	R	IC ₅₀ oCOX-1	IC ₅₀ HCOX-2	IC ₅₀ COX-1/ COX-2
10 Indometacina	OH	0,050	0,75	0,070
4	HNCH ₃	>66	0,70	>90
5	OCH ₃	33	0,25	130
6	HN(CH ₂) ₂ O ^o H	>66	0,25	>287
7	HNC ₆ H ₄ (4-NHCOCH ₃)	>66	0,12	>600
8	OC ₆ H ₄ (4-O-CH ₃)	>66	0,040	>1.700
9	O-C ₆ H ₄ (4-S-CH ₃)	2,6	0,30	8,7
10	OC ₆ H ₄ (2-S-CH ₃)	>66	0,060	>1.100
11	OC ₆ H ₄ (4-F)	3,0	0,075	40
12	O(3-C ₅ H ₄ N)	2,5	0,050	50
13	HNC ₆ H ₄ (4-S-CH ₃)	>66	0,12	>600
14	HNC ₆ H ₄ (4-F)	>66	0,060	>1.100
15	HN(3-C ₅ H ₄ N)	>66	0,050	>1.300
16	NC ₅ H ₁₀	>66	>16,5	-
17	N(CH ₃)(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	>66	>16,5	-
18	NH ₂	>66	0,70	>29
19	HN(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	>66	0,060	>1.100
20	O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	>66	0,050	>1.320
21	*	>66	>66	-
22	*	>66	>66	-
23	*	>66	2,5	>26
Ácido Meclofenâmico	OH	0,040	0,050	0,72
24	HNCH ₃	16,5	5,5	3,0
25	HN(CH ₂) ₃ Cl	2,4	0,060	40
26	HN(CH ₂) ₂ OHI	0,90	0,60	1,4
27	HN(CH ₂) ₂ OC ₆ H ₅	66	0,15	440
28	HNOCH ₂ C ₆ H ₅	66	1,0	66
29	HNOCH ₂ C ₆ H ₅ (4-NO ₂)	60	0,20	273
30	HN(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	4,0	4,5	0,90
31	HNCH ₂ CO ₂ CH ₃	1,2	0,070	17
32	HNCH ₂ CO ₂ H	0,30	0,40	0,75

Valores de IC₅₀ (μM) representam a inibição dependente do tempo da COX em duplicatas. * = Contém grupamento *p*-bromobenzil no nitrogênio indólico. O grupo R é fenetilamida (21), fenetil éster (22) e ácido livre (23)

3.3 Tiazolidinas

3.3.1 Tiazolidinas biologicamente ativas

Os derivados tiazolidinônicos constituem uma importante classe de compostos heterocíclicos para os quais diversas propriedades farmacológicas vêm sendo documentadas nas últimas décadas (OMAR, SALAMA e ESHBA, 1985). Observou-se que o núcleo tiazolidínico é capaz de apresentar atividades como: fungicida (PAPAKONSTANTONOU *et al.*, 2002), antiviral (BARRECA *et al.*, 2001; SUDO, MATSUMOTO e MATSISHIMA, 1997) e antimicrobiana (HABIB *et al.*, 1997), inclusive tuberculostática (GUNIZ *et al.*, 2002). Adicionalmente, revelam atividade antidiabética (NOMURA *et al.*, 1999), antiartrítica (MISSBACH *et al.*, 1996) e antiinflamatória (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; VIGORITTA *et al.*, 2003; HORISHNY *et al.*, 1996; LESYK *et al.*, 1996) , (Figuras 3.22 e 3.23).

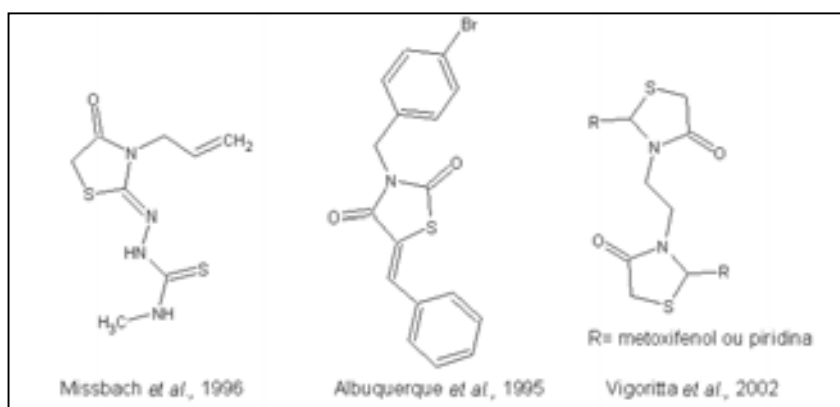


Figura 3.22: Tiazolidinas com atividade antiartrítica e antiinflamatória estudadas por Missbach e colaboradores (1996); Albuquerque e colaboradores (1995) e Vigoritta, e colaboradores (2002)

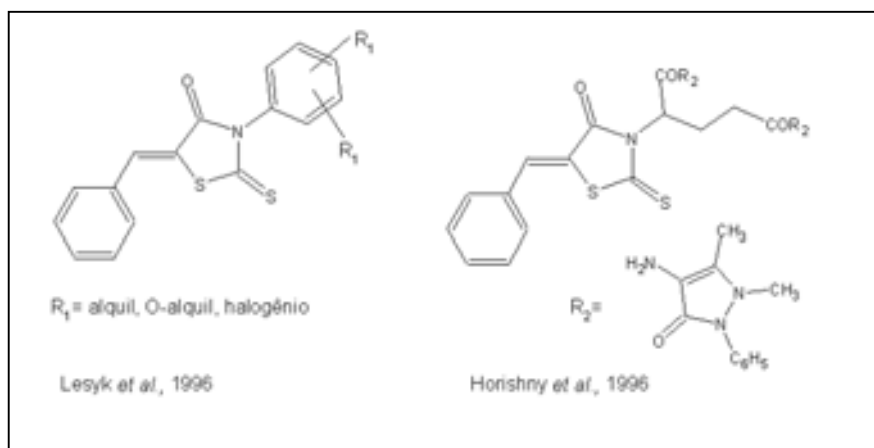


Figura 3.23: Tiazolidinas com atividade antiinflamatória estudadas por Lesyk e colaboradores (1996) e Horishny e colaboradores (1996)

3.3.2 Tiazolidinas de ocorrência natural

De ocorrência natural, a 2-metil-tiazolidina é um dos componentes do feromônio de uma espécie de barata, *Nauphoeta cinera*, que foi isolada das glândulas esternais dos machos adultos e foi identificada através de cromatografia, gasosa acoplada a espectrômetro de massas, por Sreng (1990).

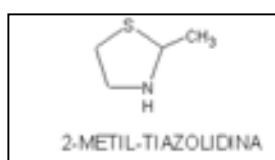


Figura 3.24 : Ferormônio produzido por *Nauphoeta cinera*

Os heterociclos de cinco membros como tiazolidinas e tiazóis também são estruturas comuns em muitos peptídeos que contém enxofre (Figura 3.25). A biossíntese desses heterociclos é resultado da heterociclização da cadeia lateral de uma cisteína com o grupo carbonila precedente do resíduo do peptídeo formando uma tiazolina, catalisada por uma peptídeo sintetase não-ribossomal. A subsequente conversão de tiazolina para tiazolidina ou tiazolina para tiazol, requer um passo adicional de redução ou oxidação (Figura 3.26),

respectivamente, cujo domínio catalítico ainda não está determinado (DU *et al.*, 2000).

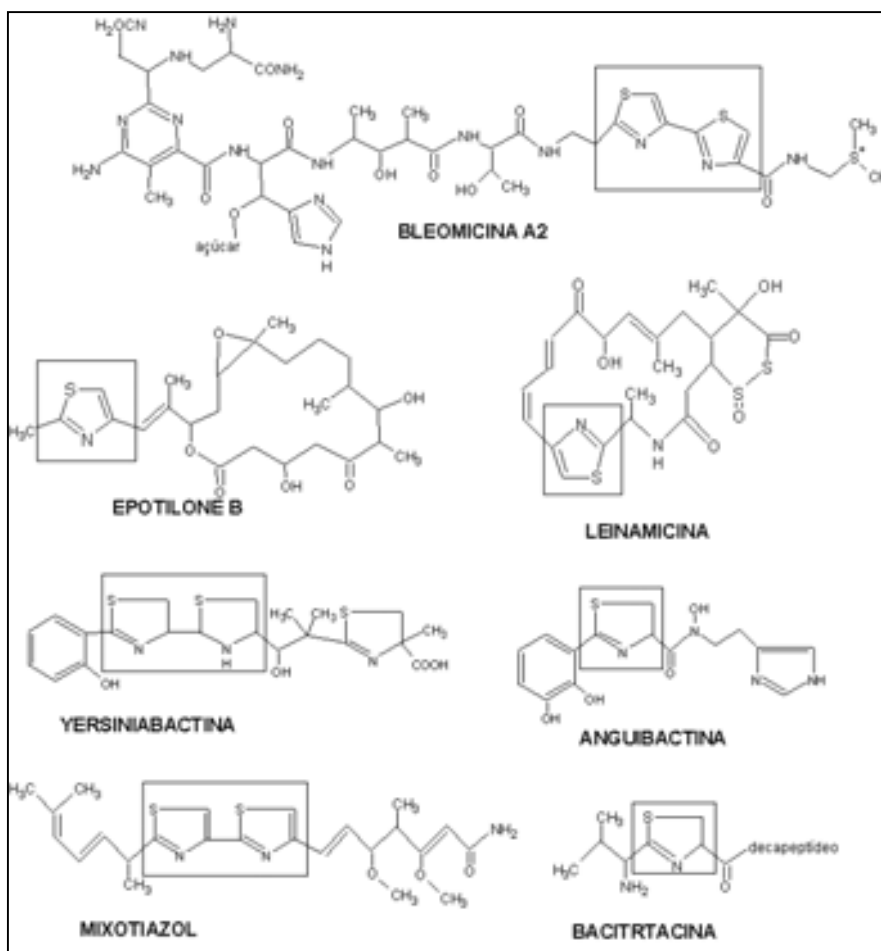


Figura 3.25: Exemplos de produtos naturais contendo anéis tiazolidina, tiazolina ou tiazol

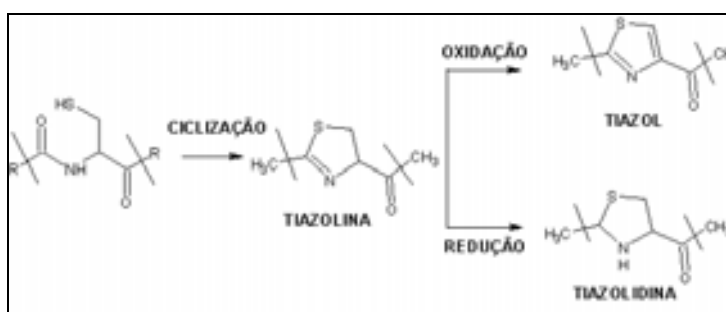


Figura 3.26: Mecanismo geral proposto por Du e colaboradores (2000) para biossíntese das tiazolinas, tiazolidinas e tiazóis

O núcleo aparece na natureza também como parte integrante do anel central das penicilinas, onde está fundido ao anel β -lactâmico de quatro membros (Figura 3.27) (FLEMING, 1946).

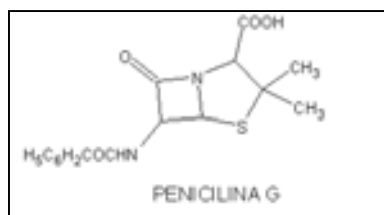


Figura 3.27: Estrutura da penicilina G, demonstrando o núcleo tiazolidínico presente nas penicilinas

3.3.3 Síntese de tiazolidinas

Objeto de síntese, diversos estudos vêm sendo realizados com os compostos que apresentam o núcleo tiazolidínico. As posições 2 e 4 deste núcleo (Figura 3.28) são ocupadas por átomos de oxigênio ou enxofre. Deste modo, temos a tiazolidina-2,4-diona quando $X = Y = O$, a 4-tioxo-tiazolidin-2-ona quando $X = S$ e $Y = O$ e a 2-tioxo-tiazolidin-4-ona quando $X = O$ e $Y = S$.

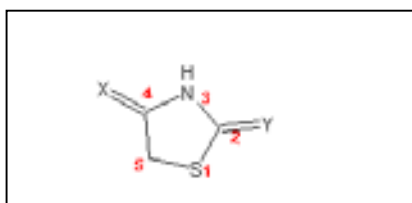


Figura 3.28: Núcleo tiazolidínico

3.3.3.1 Síntese do Núcleo Tiazolidinônico

A tiazolidina-2,4-diona teve sua estrutura primeiramente elucidada por Libermann em 1881. Sua síntese pode ser realizada através de vários métodos, os quais consistem basicamente na reação de um ácido alifático α -halogenado ou de seus ésteres com tiocarbamatos, tiocianatos alcalinos e tiouréia. O método de escolha é aquele que utiliza a condensação dos ácidos ou ésteres α -halogenados com a tiouréia, substituída ou não, levando à formação de compostos 2-imino cuja hidrólise conduz as tiazolidina-2,4-dionas (DE LIMA, 1998).

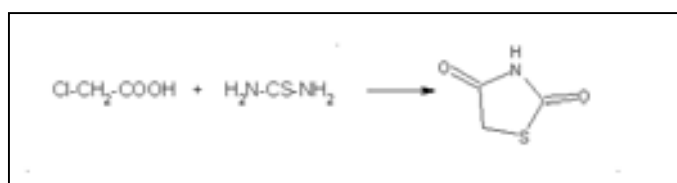


Figura 3.29: Preparação da tiazolidina-2,4-diona

Kochkanyan, Israelyan e Zaritovaskii (1978) descreveram a obtenção da tiazolidin-2,4-diona utilizando anilina como catalisador, obtendo 77 % de rendimento, onde proporções equimolares de tiouréia, ácido monocloraacético e anilina são aquecidas em um banho de óleo a 115-120 °C, por 20 minutos. Na etapa seguinte é adicionado uma solução de ácido clorídrico (1:1), e a mistura é levada a refluxo por mais 30-40 minutos.

3.3.3.2 Modificações no anel da tiazolidina-2,4-diona

Para inserção de substituintes na posição 3 da tiazolidina-2,4-diona, o processo utilizado baseia-se na N-alquilação com halogenetos de alquila. Omar, Salama e Eshba (1985) realizaram uma benzilação com cloreto de benzila em meio básico, para obter tiazolidina-2,4-dionas 3-substituídas. A reação de N-alquilação dá-se por um mecanismo reacional onde uma base retira o hidrogênio ligado ao nitrogênio (posição 3), gerando uma carga negativa nesse nitrogênio. Assim, a carga negativa irá atacar o carbono α -halogenado, que, por efeito indutivo tem uma carga parcial positiva, formando o composto N-alquilado (Figura 3.30).

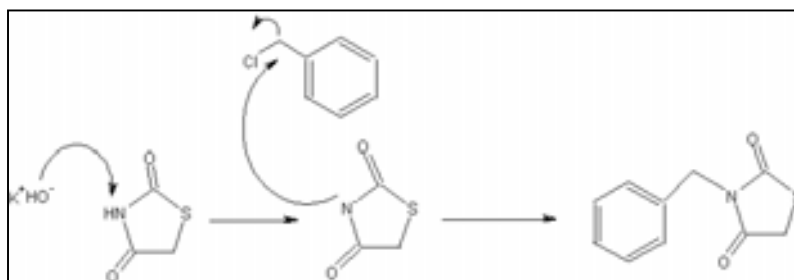


Figura 3.30: Mecanismo de N-alquilação da tiazolidina-2,4-diona

Modificações na posição 4 podem ser realizadas através de reações de tionação, ou seja, a conversão do grupo carbonila no correspondente grupo tiocarbonila. A tiocarbonila pode ser obtida através da reação do composto carbonilado com sulfetos de fósforo, como decassulfeto de tetrafósforo (P_4S_{10}) e pentassulfeto de fósforo (P_2S_5) ou através da utilização do reagente de Lawesson (2,4-bis-(4-metóxfenil)-1,3-ditio-2,4-fosfetano-2,4-dissulfeto) (CAVA e LEVINSON, 1985).

A utilização de P_2S_5 como reagente efetivo para efetuar esta transformação têm seus primeiros registros em 1869. O procedimento usual envolve tolueno, xileno ou piridina como solventes, normalmente requer um grande excesso do reagente e longo tempo de reação, e tem rendimentos muito variáveis (CAVA e LEVINSON, 1985).

O reagente de Lawesson tem sido o reagente mais empregado para tionação, cujo mecanismo é similar ao da reação de Wittig, envolvendo um intermediário cíclico de quatro membros (CAREY e SUNDBERG, 1990). Entretanto, dois fatores limitam a utilização do reagente de Lawesson: o alto custo e a grande quantidade de sub-produtos derivados do reagente que acompanham suas reações e que são removidos somente através de processos cromatográficos (CURPHEY, 2002).

A tionação com P_2S_5 tem sido utilizada com sucesso pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) nas modificações da posição 4 da tiazolidina-2,4-diona, através da reação de proporções equimolares desse reagente e a respectiva cetona, durante 18 horas sob refluxo de dioxano seco. A purificação do produto é feita através da filtração do sólido obtido e lavagem com água destilada a 80 °C.

A inserção de substituintes aromáticos na posição 5 da tiazolidina-2,4-diona é descrita por Unangst e colaboradores (1994) por dois métodos diferentes, ambos através de condensação de Knoevenagel (Figura 3.31).

No primeiro método (Figura 3.31 A), o aldeído é utilizado em ligeiro excesso (10 %) em relação a tiazolidina-2,4-diona, em meio de ácido acético. É utilizado como catalisador básico o acetato de sódio, em proporção molar 3,5

vezes maior. A reação é levada a refluxo por 48 horas e o produto final é retirado através de filtração, após sua precipitação em água destilada.

O segundo método (Figura 3.31 B), utiliza proporções equimolares dos aldeídos e da tiazolidina-2,4-diona em meio de ácido acético. É utilizado o aminácido β -alanina como catalisador básico em proporção molar 1,5 vezes menor que os demais reagentes. A reação é levada a refluxo por 24 horas e após resfriada é adicionada água destilada e agitada por mais 60 minutos. O produto final é obtido por filtração do meio reacional e recristalizado a partir de cianeto de metila.

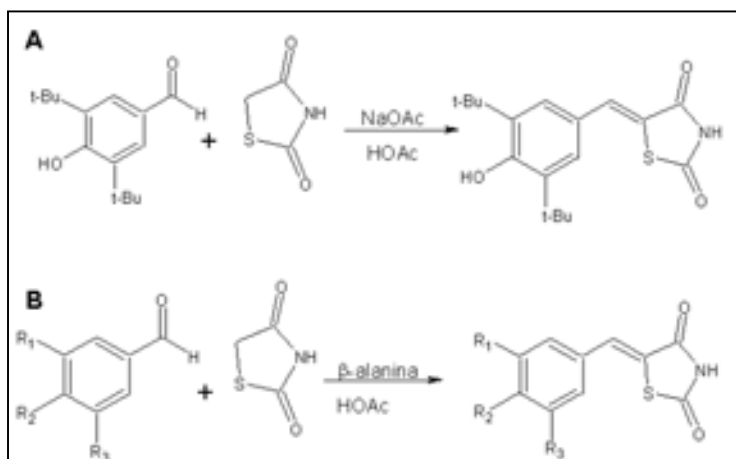


Figura 3.31: Condensação de Knoevenagel A) Método utilizando acetato de sódio; B) Método utilizando β -alanina realizado por Unangst e colaboradores (1994)

Esses métodos também são utilizados com ligeiras modificações em relação ao tempo de reação e métodos de purificação (MURATA, FUJITANI e MIZUT, 1999).

A inserção de um grupo benzilideno na posição 5 da tiazolidina-2,4-diona também pode ser feita através de uma reação de adição do tipo Micheal na qual utilizam-se ciano-acrilatos formados a partir de benzaldeídos substituídos para reagir com diferentes tiazolidinas (SILVA *et al.*, 2001).

Para tanto, uma etapa é realizada paralelamente a fim de se obter ciano-acrilatos de etila derivados dos aldeídos aromáticos substituídos.

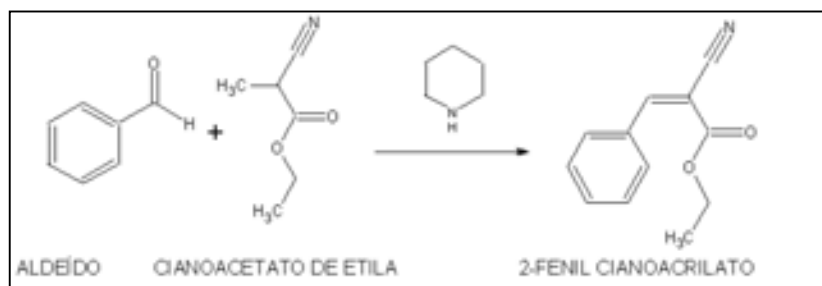


Figura 3.32: Reação de formação dos ciano-acrilatos, realizado por Silva e colaboradores (2001)

A reação é feita através de proporções equimolares de cianoacetato de etila e do benzaldeído dissolvidos em benzeno seco e tendo como catalisador básico a piperidina. O tempo de refluxo e a quantidade de catalisador variam conforme o benzaldeído utilizado. O sistema reacional é montado acoplado a um tubo de Dean-Stark a fim de que seja feita a retirada da água formada pela formação de azeótropo com benzeno. O produto final é retirado por filtração (SILVA *et al.*, 2001).

A formação dos ciano-acrilatos ocorre através de uma condensação, entre os aldeídos substituídos e cianoacetato de etila, formando água como sub-produto, mais especificamente através de uma condensação de Knoevenagel. (COPE *et al.*, 1941).

Entre as reações de condensação, a de Knoevenagel é atípica pelo fato de que um de seus materiais de partida é um composto metileno ativo, isto é, contém átomos de hidrogênio metilênicos ácidos que estão ativados por grupos carbonila e nitrila. Os grupos carbonila e nitrila ajudam a deslocalizar a carga negativa, conforme pode ser observado na Figura 3.33.

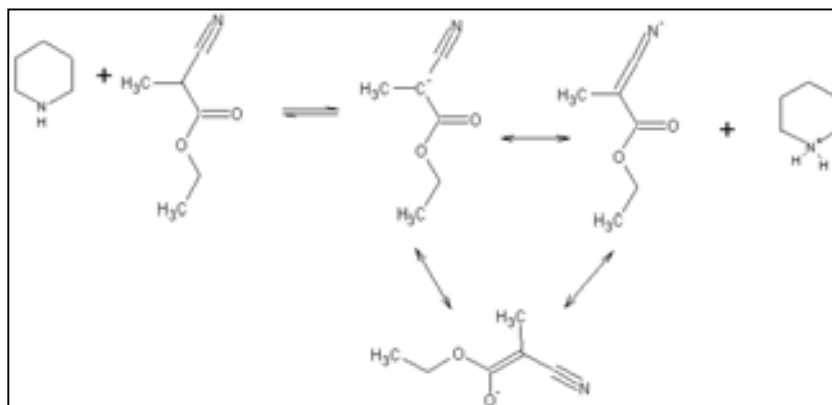


Figura 3.33: Deslocamento químico que promove a ativação do hidrogênio metilênico

O mecanismo reacional de formação dos ciano-acrilatos está apresentado na Figura 3.34, o qual inicia-se pela retirada do hidrogênio metilênico do cianoacetato de etila, através da piridina, uma base orgânica forte. A seguir, o carbânio formado, estabilizado através do equilíbrio demonstrado na Figura 3.33, ataca o carbono α -carbonila, que tem sobre si uma carga parcial positiva resultante do efeito indutivo provocado pelo átomo de oxigênio, formando o éster ciano-acrilato (CAREY e SUNDBERG, 1990).

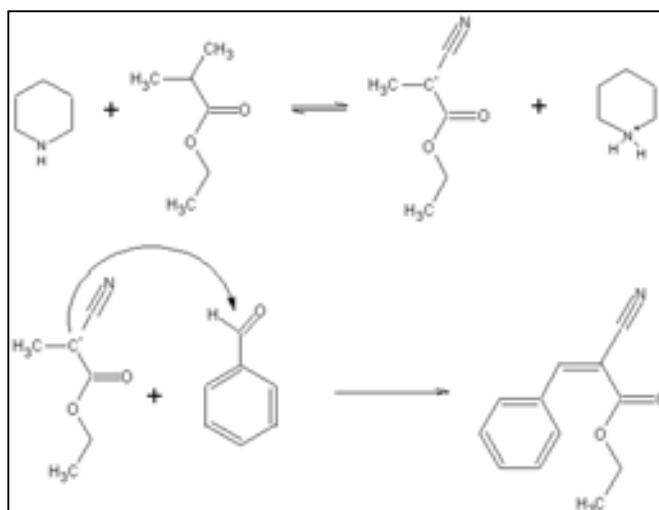


Figura 3.34: Mecanismo da condensação de Knoevenagel, para a formação de ciano-acrilatos

Uma vez formados, em proporções equimolares, os ciano-acrilatos podem ser inseridos na posição 5 do anel tiazolidínico. Esta reação utiliza

piperidina como catalisador e etanol absoluto como solvente, necessitando de leve aquecimento até 60-70 °C. O produto final é retirado por filtração (PEREIRA, 2003). A reação se procede através de uma adição tipo Michael (Figura 3.35).

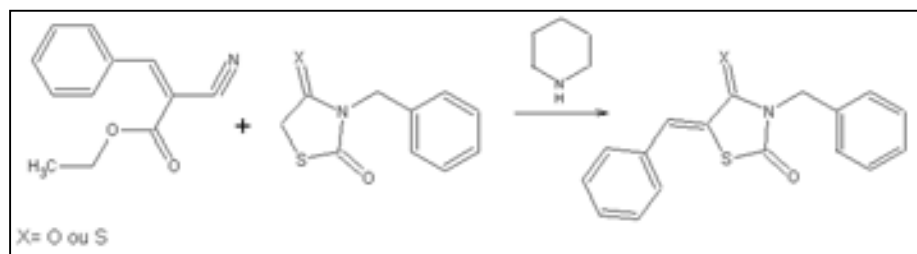


Figura 3.35: Reação de adição tipo Michael paraa formação de tiazolidinas 5-substituídas

**PLANEJAMENTO RACIONAL
DE TIAZOLIDINAS:
POTENCIAIS INIBIDORAS
DA COX-2**

4 PLANEJAMENTO RACIONAL DE TIAZOLIDINAS: POTENCIAIS INIBIDORAS DA COX-2

Considerando inicialmente as disponibilidades materiais oferecidas pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), o planejamento dos compostos sintetizados foi baseado no mecanismo de ação farmacológico pretendido, ou seja, através do processo de abordagem fisiológica (BARREIRO e FRAGA, 2001). Desta forma, visando obter compostos com atividade antiinflamatória, cujo alvo terapêutico é representado pela enzima COX, o planejamento dos novos ligantes, conforme detalhado a seguir, foi realizado através de modificações moleculares, inclusive pela aplicação do conceito de bioisosterismo, em um fármaco já conhecido para este receptor: a indometacina (Figura 4.1).

Embora seja um fármaco preferencialmente inibidor da COX-1, Kalgutkar e colaboradores (2000) realizaram modificações moleculares na indometacina que resultaram em ésteres e amidas com atividade inibitória seletivos à COX-2. Com o mesmo protótipo, Woods e colaboradores (2001) sintetizaram uma série de derivados tiazóis, alguns dos quais com expressiva seletividade para COX-2.

O composto 6-[[5-(4-clorobenzoil)-1,4-dimetil-1*H*-pirrol-2-il]-metil]-piridazin-3-(2*H*)-ona (RS 5706700), demonstrado na Figura 4.2, podendo ser considerado um análogo da indometacina, tem grande potência, aliado a alta seletividade (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

Uma série química de compostos contendo o núcleo tiazolidinônico e estruturalmente semelhantes à indometacina, foi sintetizada por Albuquerque e colaboradores (1995) e exibiu atividade antiinflamatória. Posteriormente, o

mesmo anel heterocíclico foi aplicado em uma série química no LPSF, apresentando atividade antiinflamatória satisfatória no teste da inibição do edema de pata induzido por carragenina em ratos (Figura 4.5) (PEREIRA, 2003).

Tomando-se por base todas estas informações, planejamos o desenvolvimento de uma nova série química com potencial atividade antiinflamatória e seletividade para COX-2, nomeada LYS (5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas), cuja semelhança estrutural com a indometacina é demonstrada na Figura 4.1.

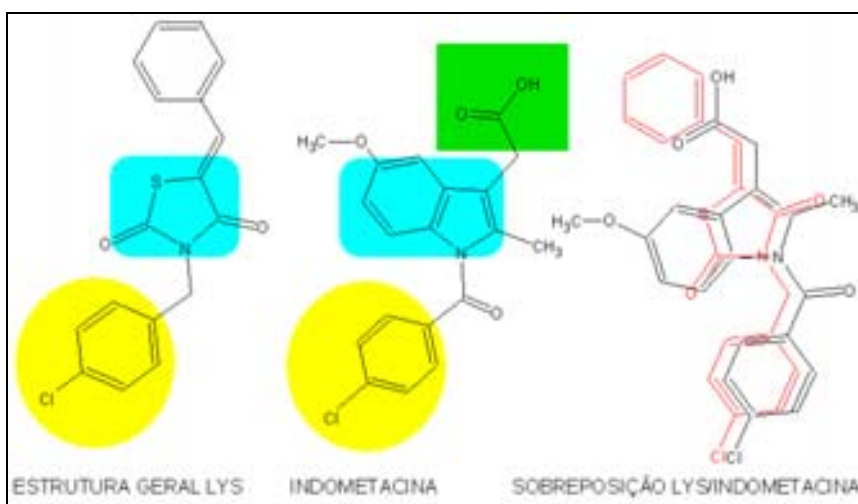


Figura 4.1: Estrutura geral LYS, indometacina e sobreposição das duas moléculas

Destaca-se em verde o grupo carboxílico da indometacina, indesejável na obtenção de compostos que tenham atividade antinflamatória seletiva à COX-2, uma vez que atribui-se a esse grupamento a interação química responsável pela ligação dos NSAIDs clássicos às ambas isoformas da COX (KALGUTKAR *et al.*, 2000). Em amarelo, um grupamento hidrofóbico, o qual é apontado em diversos estudos de relação entre estrutura química e atividade farmacológica como desejável para a atividade antiinflamatória, devido ao fato de que grande parte do sítio ativo é composto por um canal hidrofóbico

(KALGUTKAR *et al.*, 2000; WOODS *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2002). Em azul, a aplicação do conceito de bioisosterismo, onde é feita substituição de anéis (SILVERMAN, 1992).

Na Figura 4.2 observa-se as semelhanças estruturais entre as tiazolidinadionas com atividade antiinflamatória sintetizadas no LPSF (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995), ladeadas pela indometacina e pelo composto RS 57067000. Em verde destacam-se os grupamentos hidrofóbicos; em rosa, podemos observar exemplos de isosterismo de anel; e assinalado em bege, está presente o grupamento ácido da indometacina, ausente nos demais compostos.

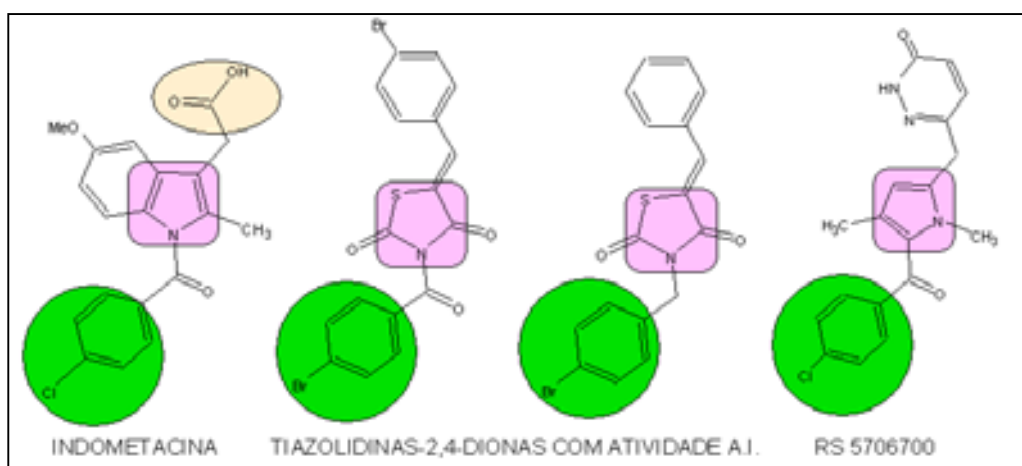


Figura 4.2: Indometacina, tiazolidinas-2,4-dionas com atividade antinflamatória, RS57067000 e estrutura geral LYS

No sentido de determinar quais os substituintes seriam introduzidos na estrutura geral LYS, também analisamos as tiazolidinadionas com atividade antiinflamatória previamente sintetizadas por Albuquerque e colaboradores (1995) e por Pereira (2003), onde a atividade antiinflamatória foi obtida em moléculas que continham substituintes como o átomo de bromo e o grupamento metóxi. Também foram considerados relevantes os dados em relação a seletividade para COX-2 obtidos com os ésteres e amidas da indometacina sintetizados por Kalgutkar e colaboradores (2000) (Figura 4.3).

De forma que optamos aplicar substituições com o átomo de bromo e com o grupamento metóxi nos compostos LYS-2 e LYS-4 (Figura 4.3).

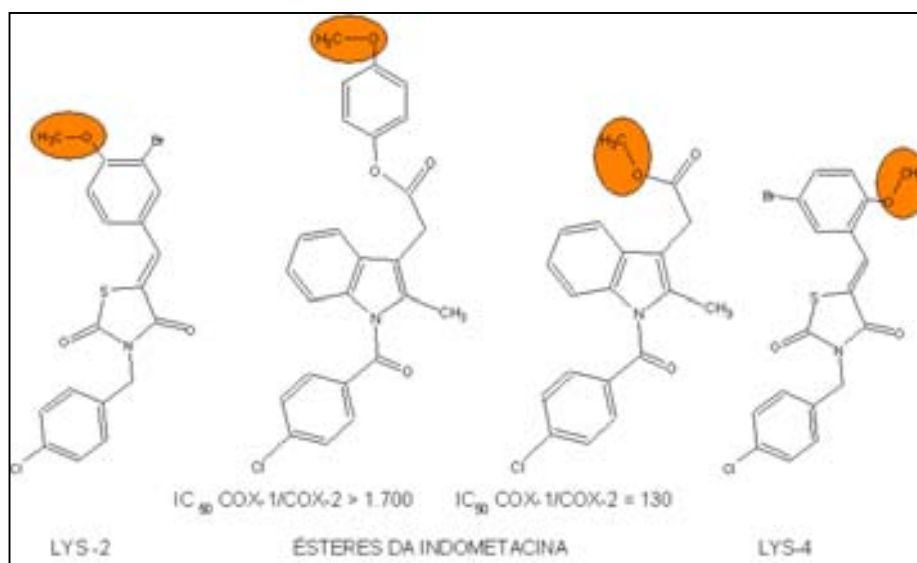


Figura 4.3: Estrutura da LYS-2, ésteres da indometacina seletivos à COX-2 e LYS-4

Uma análise detalhada da estrutura química do composto RS 57067000 conduziu ao desenho de outro composto, o LYS-5, através da introdução do grupamento 1H-indol, uma vez que ambos apresentam uma amina secundária (em amarelo) em posições correspondentes e assim, nessa porção da molécula poderiam realizar interações químicas similares com o sítio ativo do receptor (Figura 4.4).

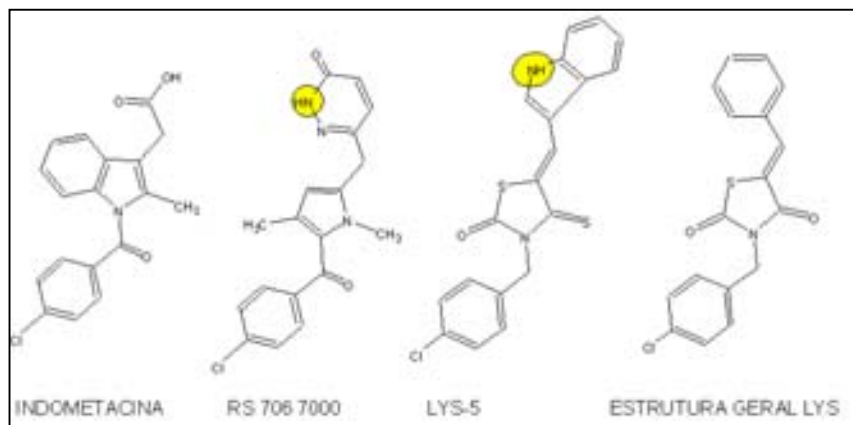


Figura 4.4: Estrutura do composto LYS-5, comparado com RS57067000

Uma análise detalhada do composto 4-(1,1'-bifenil-4-il-metil)-N-metil-1,3-tiazol-2-amina (SM-8849), um potente anti-arrético (NISHIKAKU, AONO e KOGA, 1994), e compostos previamente sintetizados no LPSF (PEREIRA, 2003), idealizamos também utilizar um grupo bifenil (Figura 4.5), pois nesses compostos, julga-se que seja relevante a orientação espacial dos seus anéis aromáticos para uma perfeita interação com o receptor, bem como sua lipofilia.

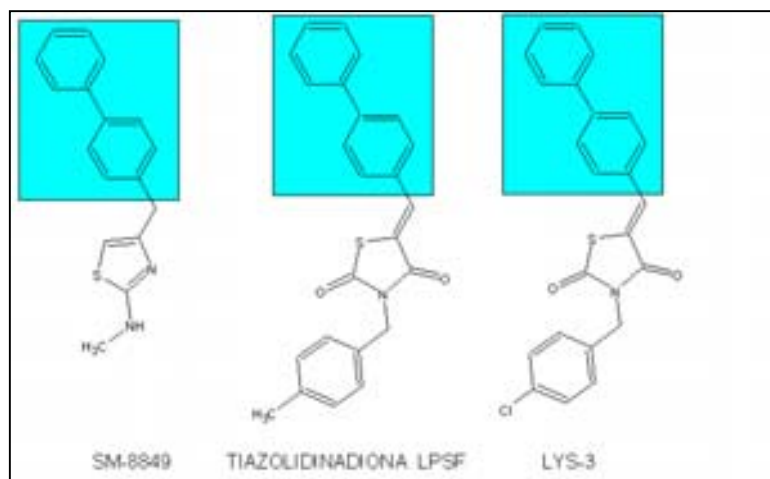


Figura 4.5: Estrutura do composto SM-8849, da tiazolidinadiona sintetizada no LPSF e a estrutura de LYS-3

Finalmente, também foi aplicado o conceito clássico de isosterismo onde o grupamento C=O foi substituído por C=S no anel pentagonal tiazolidínico para

o composto LYS-5, a fim de promover um aumento de atividade ou melhora das propriedades farmacocinéticas através de um acréscimo na lipofilia, provocado por essa mudança, conforme pode ser observado na Figura 4.6.



Figura 4.6: Isosterismo clássico no anel pentagonal tiazolidínico

**SÉRIE 5-BENZILIDENO-
3-(4-CLOROBENZIL)-
TIAZOLIDINA-2,4-DIONA**

5 SÍNTESE DA SÉRIE 5-BENZILIDENO-3-(4-CLOROBENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA (LYS)

5.1 Objetos de síntese

Na figura 5.1 encontram-se os compostos inéditos da série 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (série LYS) que foram planejados, sintetizados e tiveram sua comprovação estrutural.

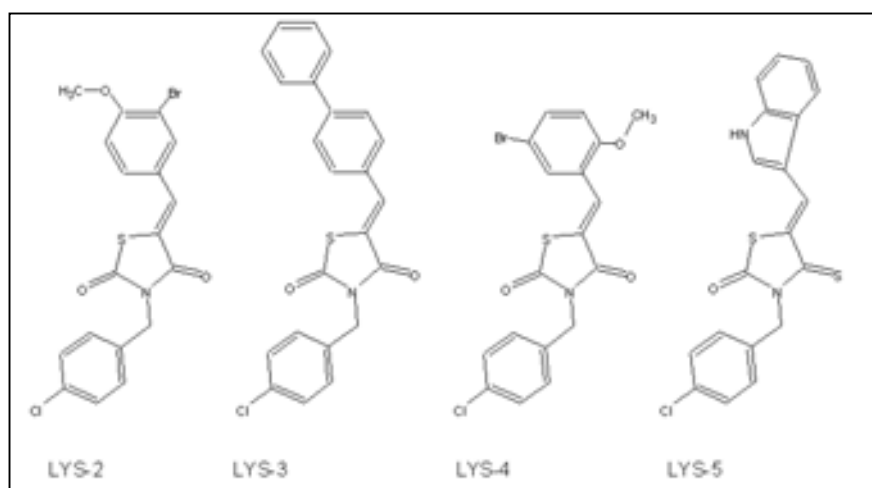


Figura 5.1: Compostos da série LYS: LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5

Os compostos, aqui denominados LYS-2, 3, 4 e 5, correspondem respectivamente a:

LYS-2:

5-(3-bromo-4-metóxi-benzilideno)-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona.

LYS-3:

5-(1-1'-bifenil-4-il-metileno)-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona.

LYS-4:

5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona.

LYS-5:

3-(4-clorobenzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona.

5.2 Material

Para a síntese e a comprovação estrutural dos novos derivados da série LYS, foram utilizados reagentes específicos, solventes, placas cromatográficas e equipamentos listados a seguir.

Tabela 5.1: material e equipamentos utilizados na síntese e comprovação estrutural dos derivados da série LYS, suas especificações e procedência

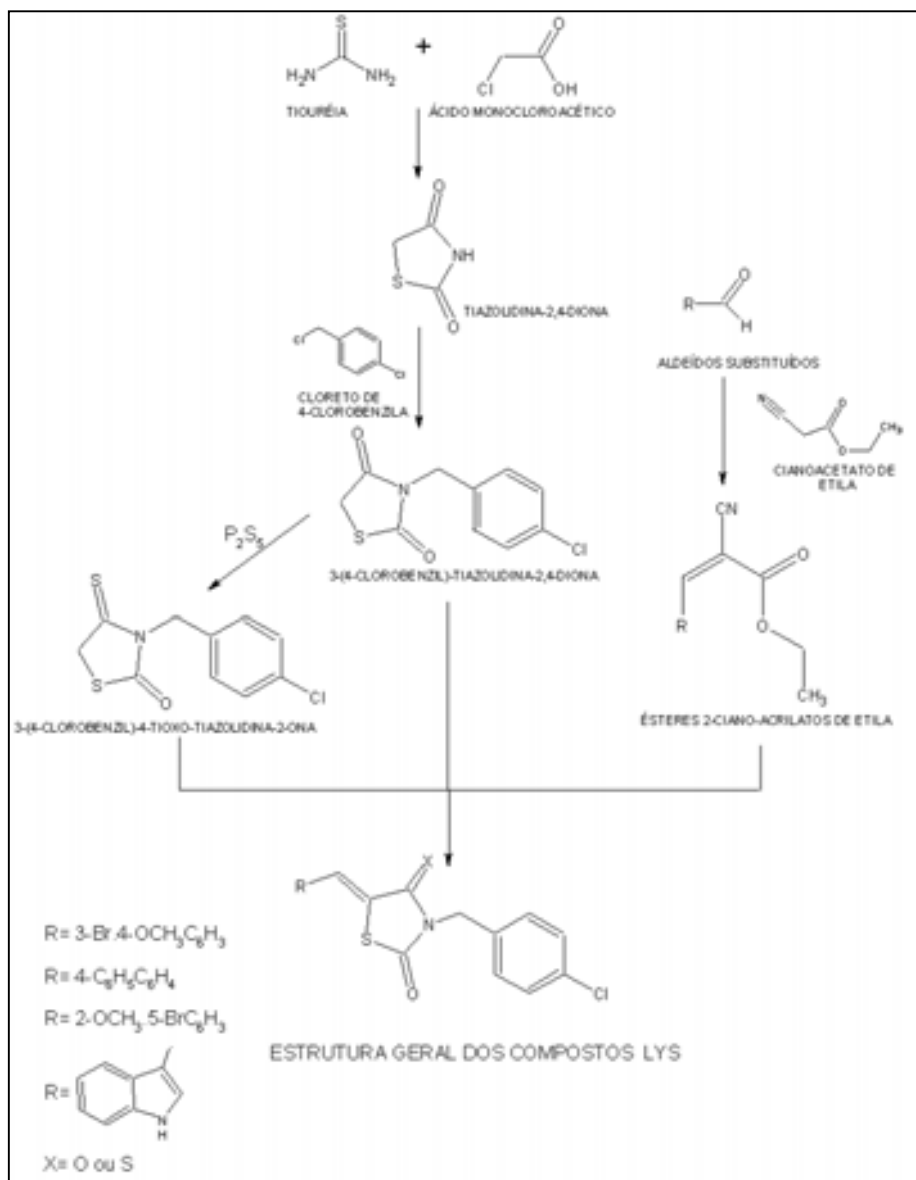
Produto	Especificação	Procedência
1- <i>H</i> -indol-3-carbaldeído		Sigma-Aldrich
2-Metóxi-5-bromo-benzaldeído		Sigma-Aldrich
4-Fenil-benzaldeído		Sigma-Aldrich
4-Metóxi-5-bromo-benzaldeído		Sigma-Aldrich
Acetato de etila	P.A.	Merck, Synth
Acetona	P.A.	Merck
Ácido monocloroacético		Merck
Benzeno		Merck, Synth
Cianoacetato de etila		Merck
Cloreto de 4-clorobenzila		Sigma-Aldrich
Dioxano	Seco	Merck
Etanol	Absoluto	Merck, Synth
Hidróxido de potássio	Pastilhas	Merck
<i>n</i> -Hexano	P.A.	Merck, Synth
Metanol		Merck
Pentassulfeto de fósforo		
Piperidina		Merck
Placa cromatográfica	Sílica-gel 60 F ₂₅₄ , 0,25 mm de espessura	Merck
Sílica-gel para cromatografia em coluna	230-400 mesh	Merck
Tiouréia		Merck
Tolueno		Merck, Synth

Equipamentos

Balança	Analítica	E. Meppler
Lâmpada U.V.	254 e 320 nm	Philips
Rotaevaporador		Buch
Bomba vácuo/pressão		
Espectrofotômetro de IV	Modelo IFS 66, realizado em pastilha de KBr	FTIR Bruker
Espectrofotômetro de RMN	Modelo plus, 300 MHz	Varian
Ponto de fusão	Modelo 340 27	Quimis
Vidraria especializada		

5.3 Metodologia

O esquema 5.1 representa o diagrama de síntese para a obtenção da série de compostos LYS.



Esquema 5.1: Diagrama de síntese para obtenção dos compostos da série LYS

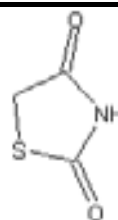
5.3.1 Obtenção da tiazolidin-2,4-diona

Em um balão, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados 0,4 mols de tiouréia e 0,4 mols de ácido monocloroacético, ambos previamente dissolvidos em 100 mL de água destilada. A mistura reacional foi aquecida até 80 °C e agitada durante 18 horas e, em seguida, mantida sob refrigeração por 24 horas. Os cristais formados foram separados por filtração e purificados através de lavagens sucessivas com água destilada.

O produto obtido apresentou as propriedades listadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Propriedades da tiazolidina-2,4-diona

Estrutura e nome químico



Tiazolidina-2,4-diona

Fórmula	C ₃ H ₃ NO ₂ S
Massa molecular	117,2
R _f (sistema)	0,51 (clorofórmio/metanol 96:4)
Ponto de fusão	121-122 °C
Ponto de fusão (literatura)	122 °C (KOCHKANYAN, ISRAELYAN e ZARITOUSKII, 1978)
Rendimento	84 %

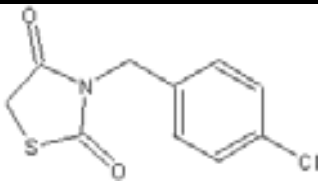
5.3.2 Obtenção da 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona

Em um balão, com agitação magnética, foram adicionados 0,25 mols de tiazolidina-2,4-diona e 10 mL de metanol. Após a dissolução da tiazolidina-2,4-diona, foram adicionados, gota a gota, 10 mL de uma solução de hidróxido de sódio em metanol (0,25 mM). Após 10 minutos a temperatura ambiente foram

adicionados, gota a gota, 0,25 mols de cloreto de 4-clorobenzil e foi acoplado um condensador ao balão. A mistura foi aquecida a 65 °C por 12 horas e então resfriada bruscamente. O precipitado formado foi filtrado e purificado através de recristalização em etanol.

O produto obtido apresentou as propriedades listadas na tabela 5.3.

Tabela 5.3: Propriedades da 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona

Estrutura e nome químico	
	
3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona	
Fórmula	C ₁₀ H ₈ NO ₂ SCl
Massa molecular	241,69
R_f (sistema)	0,6 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
Ponto de fusão	92-95 °C
Ponto de fusão (literatura)	96 °C (GOÉS <i>et al.</i> , 1991)
Rendimento	63 %

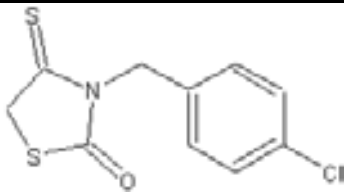
5.3.3 Obtenção da 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona

Em um balão, com agitação magnética, acoplado a um condensador e em sistema fechado, sob argônio, foram adicionados 8,28 mmols de 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona, 8,28 mmols de pentassulfeto de fósforo (P₂S₅) e 50 mL de dioxano seco como solvente. A mistura reacional foi aquecida até 110 °C durante 10 horas e a seguir resfriada. O volume reacional foi reduzido a metade por evaporação em rotavapor e o produto precipitado foi

filtrado e purificado através de lavagens sucessivas com água destilada aquecida a 60 °C.

O produto obtido apresentou as propriedades listadas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Propriedades do composto 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo- tiazolidin-2-ona

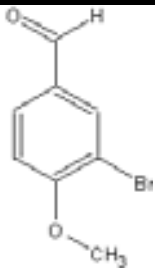
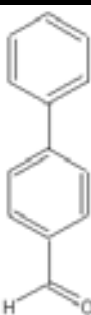
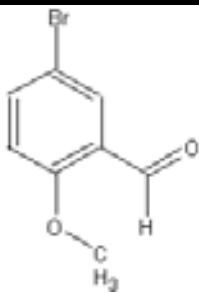
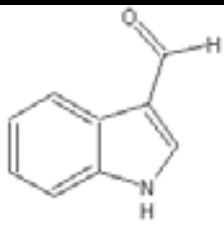
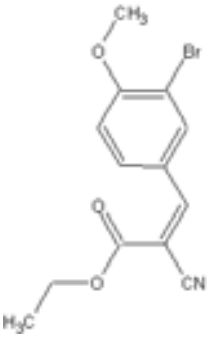
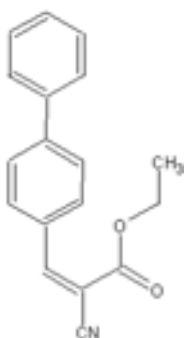
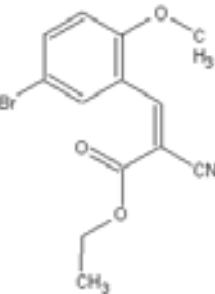
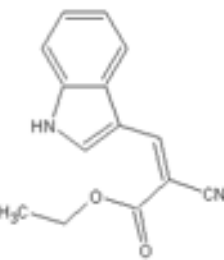
Estrutura e nome químico	
	
3-(4-clorobenzil)-4-tioxo- tiazolidin-2-ona	
Fórmula	C ₁₀ H ₈ NOS ₂ Cl
Massa molecular	257,76
R_f (sistema)	0,7 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
Ponto de fusão	85-89 °C
Ponto de fusão (literatura)	88-90 °C (CHANTEGREL <i>et al.</i> , 2002)
Rendimento	82 %

5.3.4 Obtenção dos ésteres 2-ciano-acrilatos de etila

Em um balão, com agitação magnética, foram adicionados 20 mmols do aldeído substituído, cianoacetato de etila em ligeiro excesso molar de 10%, 30 mL de benzeno seco como solvente e 250 µL de piperidina, utilizada como catalisador básico. O balão foi acoplado a um Dean-Stark e a um condensador e a mistura reacional foi aquecida até 110 °C durante 4 ou 4,5 horas, dependendo do aldeído substituído utilizado. Após esse período de tempo o balão foi retirado e acoplado a um rotavapor onde o volume reacional foi reduzido à metade. A mistura foi resfriada e o precipitado formado foi separado por filtração e purificado através de recristalização em etanol.

As condições reacionais específicas para cada aldeído estão listadas na Tabela 5.5.

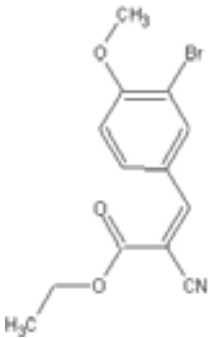
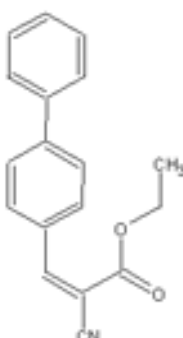
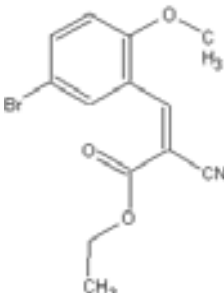
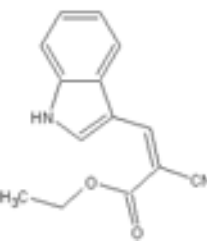
Tabela 5.5: Benzaldeídos, condições reacionais utilizadas e ésteres 2-ciano-acrilatos obtidos

Benzaldeído (estrutura química)				
Nome químico	3-bromo-4-metóxi benzaldeído	1-1'-bifenil-4-carbaldeído	5-bromo-2-metóxi carbaldeído	1H-indol-3-carbaldeído
Tempo reacional	4 horas	4 horas	4,5 horas	4 horas
Produto obtido (código e estrutura química)	IP-47 	IP-48 	IP-23 	IP-19 
Nome químico	Etil (2Z) – 3 - (3 -bromo -4 - metóxi - fenil) – 2 ciano -acrilato	Etil (2Z) – 3 – (1-1'-bifenil-4-il)-2-ciano-acrilato	Etil (2Z) – 3 - (5 -bromo -2-metóxi - fenil) – 2 ciano -acrilato	Etil (2Z) – 2-ciano-3- (1 H - indol - 3 - il) acrilato

Os produtos IP 47, IP-48, IP-23 e IP-19 encontram-se apresentados na configuração espacial Z, uma vez que essa foi a configuração definida pela interpretação de seus espectros de RMN ¹H, onde o deslocamento químico do hidrogênio etilênico apresentou-se na região de 8,33-8,57, valores normalmente encontrados para esta configuração.

Os produtos obtidos apresentam as propriedades listadas na Tabela 5.6

Tabela 5.6: Propriedades dos ésteres 2-ciano-acrilatos obtidos

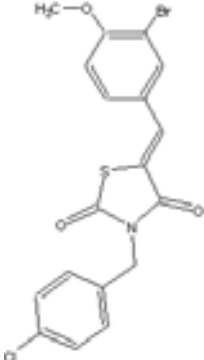
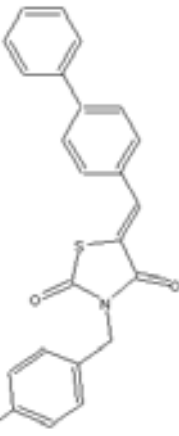
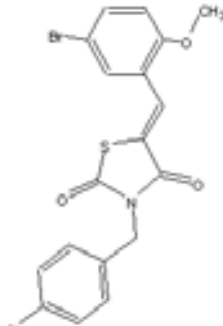
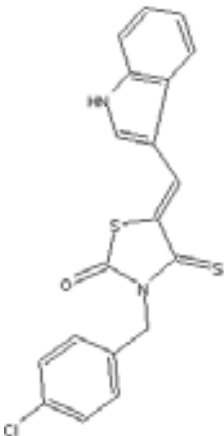
Produto obtido (código e estrutura química)	IP-47	IP-48	IP-23	IP-19
				
Fórmula	$C_{13}H_{12}BrNO_3$	$C_{18}H_{15}NO_2$	$C_{13}H_{12}BrNO_3$	$C_{13}H_{12}N_2O_2$
Peso molecular	310,14	277,32	310,14	240,26
Rf (sistema)	0,75 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 6:4)	0,61 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 8:2)	0,8 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)	0,71 (benzeno /AcOEt 6:4)
Ponto de fusão	160-161 °C	128-130 °C	111-112 °C	162-165 °C
Ponto de fusão (literatura)	160-161 °C (PEREIRA, 2003)	128-130 °C (PEREIRA, 2003)	111-112 °C (MAGALHÃES, 2003)	162-165 °C (PEREIRA, 2003)
Rendimento	72 %	63 %	58 %	84 %

5.3.5 Obtenção dos 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas

Em um balão de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo foram adicionadas proporções equimolares de 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona ou 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, e dos ésteres 2-ciano-acrilatos, 10mL de etanol absoluto como solvente e, como catalisador básico, 400 µL de piperidina. A mistura foi aquecida lentamente até atingir 50 °C e permaneceu de 2 a 3 horas, dependendo do estes 2-ciano-acrilato utilizado. O balão foi resfriado e o precipitado formado foi retirado por filtração e purificado por lavagem com etanol.

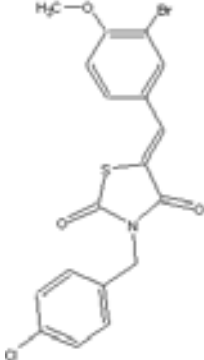
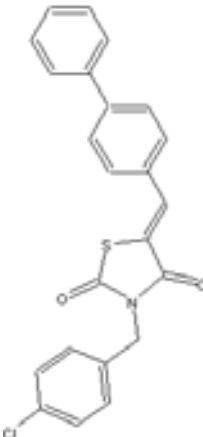
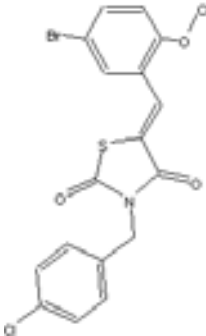
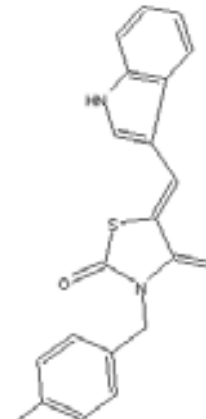
As condições reacionais específicas para cada éster 2-ciano-acrilato estão listadas na tabela 5.7.

Tabela 5.7: Condições reacionais e LYS obtido a partir do éster 2-ciano-acrilato correspondente

Éster 2-ciano-acrilato	IP-47	IP-48	IP-23	IP-19
Tempo reacional	3 horas	3 horas	2,5 horas	2 horas
Produto obtido (código)	LYS-2	LYS-3	LYS-4	LYS-5
Produto obtido (estrutura química)				

Os produtos finais obtidos apresentaram as propriedades apresentadas na tabela 5.8.

Tabela 5.8: Propriedade dos compostos da série LYS obtidos

Produto obtido (código e estrutura química)	LYS-2	LYS-3	LYS-4	LYS-5
				
Fórmula	C ₁₈ H ₁₃ BrNO ₃ SCI	C ₂₃ H ₁₆ NO ₂ SCI	C ₁₈ H ₁₃ BrNO ₃ SCI	C ₁₉ H ₁₃ N ₂ OS ₂ Cl
Peso molecular	438,7	405,9	438,7	384,90
Rf (<i>n</i> -Hex/AcOEt 7:3)	0,75	0,95	0,82	0,57
Ponto de fusão	190-191 °C	191-195 °C	164-165 °C	145-147 °C
Rendimento	83 %	81 %	77 %	70 %

Os produtos LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5 encontram-se apresentados na configuração espacial Z, uma vez que essa foi a configuração definida pela interpretação dos seus espectros de RMN ^1H , onde o deslocamento químico do hidrogênio benzilidênico apresentou-se na região de 7,93-8,22, valores compatíveis com os normalmente encontrados para esta configuração.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Análise espectroscópica

A identificação dos compostos obtidos foi resultado da soma de análises espectroscópicas utilizando diferentes técnicas, pois dificilmente uma única análise poderia ser considerada satisfatoriamente comprobatória da estrutura química de um composto inédito.

Assim sendo, para os compostos obtidos durante a execução desta dissertação, foram realizadas análises espectroscópicas denominadas infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e espectrometria de massas.

A identificação dos compostos através da espectroscopia no IV baseia-se na conversão da radiação no infravermelho, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de rotação e vibração molecular, que após quantizada, é representada através de um espectro de bandas. As bandas de vibração e rotação normalmente ocorrem na parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas, mais especificamente entre 4.000 e 400 cm^{-1} (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A frequência ou o comprimento de onda (inversamente proporcionais) de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos, formando um espectro característico para a molécula como um todo, embora, certos grupos de átomos dêem origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma

frequência, independentemente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A presença das bandas características de determinados grupos funcionais é justamente o que permite a identificação dos grupos funcionais nas moléculas sintetizadas.

As posições das bandas nos espectros é expressa em número de onda, na unidade cm^{-1} e a intensidade das bandas é expressa em transmitância (T), que é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. É representada em termos semiquantitativos, onde F= forte, md= médio e f= fraco.

A espectroscopia de RMN ^1H caracteriza compostos baseado na propriedade que as moléculas tem de, estando em um campo magnético apropriado, absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais de cada molécula. Assim, a absorção é função de determinados núcleos da molécula.

Um espectro de RMN é um registro das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades, ou seja, o espectro é uma série de picos, cujas áreas são proporcionais ao número de hidrogênios que elas representam. As posições dos picos são medidas em unidades de frequência a partir de um pico de referência. Os deslocamentos químicos variam de acordo com blindagem oferecida pela nuvem eletrônica que cerca cada hidrogênio, que varia com o ambiente químico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O deslocamento químico é dado em ppm (δ) e a constante de acoplamento J é dada em Hertz (Hz), os acoplamentos são abreviados singleto (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), quadripleto (q) e multipletto (m).

A espectrometria de massa é uma análise que permite a determinação estrutural de compostos orgânicos. Baseia-se no comportamento de uma molécula diante um impacto de um feixe de elétrons de alta energia.

O espectro de massas é o registro de um espectro de íons na base da razão massa/carga (m/z), onde são obtidos o íon molecular (molécula intacta com perda de um elétron, removido pelo feixe de energia) e os diversos fragmentos ionizados (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

5.4.1.1 Caracterização da 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona

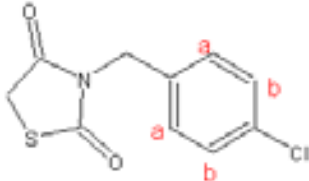
O espectro no infravermelho do composto 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (Anexo 1) mostrou as frequências de absorção referentes as duas carbonilas (Tabela 5.9).

Tabela 5.9: Frequências e intensidade de absorção no infravermelho, em cm^{-1} , para o composto 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona

Grupos funcionais	C=O	C=O
	Posição 2	Posição 4
Frequência em cm^{-1} (intensidade)	1.755 (md)	1.675 (F)

O espectro de RMN ^1H (Anexo 2), confirma a presença de hidrogênios aromáticos (d; 7,30 e 7,32 ppm), dos hidrogênios de posição 5 do anel (s; 4,71 ppm) e dos hidrogênios metilênicos do grupo benzila (s; 3,94 ppm), conforme pode ser observado na Tabela 5.10.

Tabela 5.10: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm do composto 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2-diona, em CDCl_3

			
Sinais observados (multiplicidade)	$-\text{CH}_2-$ (benzil) (s)	$-\text{CH}_2-$ (anel) (s)	Hidrogênios aromáticos
Deslocamento químico em ppm	4,71	3,94	a(d) 7,32 J= 13,2 b(d) 7,30 J= 13,2

5.4.1.2 Caracterização da 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona

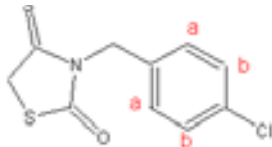
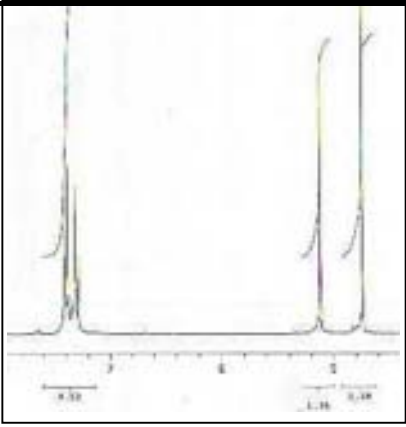
O espectro no infravermelho do composto 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (Anexo 3) apresentou as frequências de absorção referentes a carbonila e tiocarbonila (Tabela 5.11).

Tabela 5.11: Frequências de absorção no infravermelho em cm^{-1} para 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona

Grupos funcionais	C=O	C=S
Frequência em cm^{-1} (intensidade)	1.707,2 (F)	1.488,5 (md)

O espectro de RMN ^1H (Anexo 4), confirma a presença de hidrogênios aromáticos (dd; ppm), dos hidrogênios da posição 5 do heterociclo (s; 4,79 ppm) e dos hidrogênios metilênicos do grupo benzila (s; 5,11 ppm), conforme pode ser observado na Tabela 5.12.

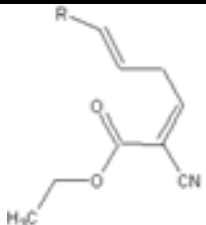
Tabela 5.12: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , e detalhamento do espectro de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona, em DMSO-d_6

3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona  			
Sinais observados (multiplicidade)	-CH ₂ - (benzil) (s)	-CH ₂ - (anel) (s)	Hidrogênios aromáticos
Deslocamento químico em ppm	5,11	4,73	a (dd) 7,40 J= 8,4 b (dd) 7,30 J= 8,4

5.4.1.3 Ésteres 2-ciano-acrilatos

Os espectros no infravermelho dos compostos IP-47, IP-48, IP-23 e IP-19 mostrados nos Anexos 5, 6, 7 e 8, apresentaram as frequências de absorção referentes aos grupamento nitrila, à carbonila e a ligação C-O do éster (vibrações da deformação axial C-O) e a deformação axial de C=C (Tabela 5.13).

Tabela 5.13: Frequências de absorção no IV em cm^{-1} (intensidade) para IP-47, IP-48, IP-23 e IP-19

					
Estrutura geral IPs*					
IPs	C≡N	C=O	C-O-	C=C	NH*
IP-47	2.221,6 (m)	1.717 (F)	1.299 (F)	1.589 (F)	n.a .
IP-48	2.219 (m)	1.720 (F)	1.267 (F)	1.598 (F)	n.a .
IP-23	2.200 (m)	1.708 (F)	1.290 (F)	1.588 (md)	n.a .
IP-19	2.211,5 (m)	1.694 (F)	1.262 (F)	1.567 (F)	3.325 (F)

* R= porção da molécula variável para cada IP; n.a.=não aplicável

Os espectros de RMN ^1H de cada composto IP (Anexos 9, 10, 11 e 12) confirmaram a presença de hidrogênios aromáticos e dos hidrogênios do radical etila com deslocamentos químicos específicos para cada composto, como pode ser visto nas Tabelas 5.14, 5.15, 5.16 e 5.17.

Tabela 5.14: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto IP-47, solvente DMSO-d_6

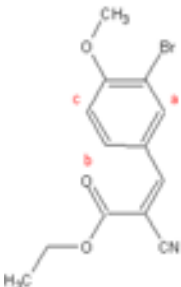
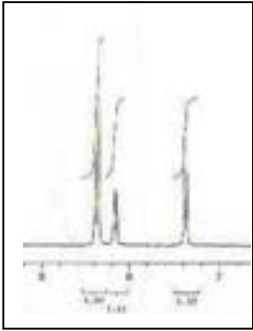
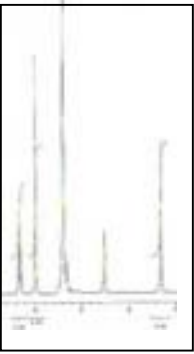
IP-47				Sinais observdos (multiplicidade)	Hidrogênios aromáticos	-CH= (s)	-CH₂- (q)	-OCH₃ (s)	-CH₃ (t)
Deslocamento químico em ppm	a (d) 8,37 J=2,4 b (dd) 8,15 J=2,4 J=8,7 c (d) 7,35 J=8,7	8,33	4,20 J= 7,2	3,96	1,29 J= 7,2				

Tabela 5.15: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto IP-48, solvente DMSO-d_6

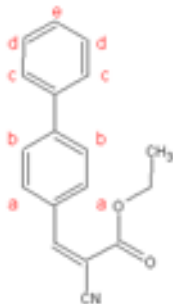
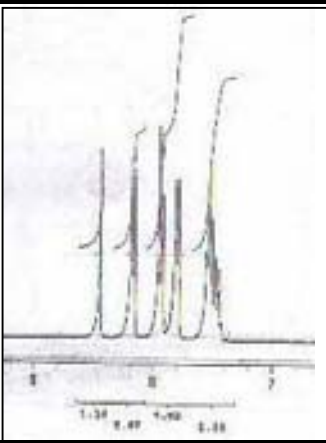
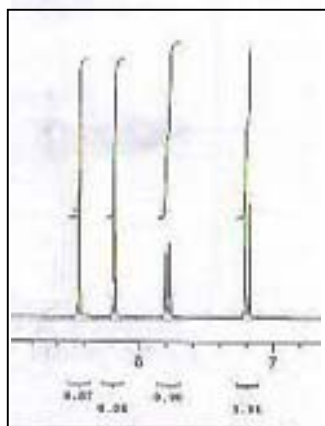
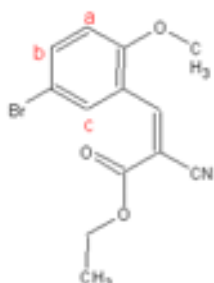
IP-48				
Sinais observdos (multiplicidade)	Hidrogênios aromáticos	-CH= (s)	-CH₂- (q)	-CH₃ (t)
Deslocamento químico em ppm	a (d) 7,93 J= 8,7 b (d) 8,17 J= 8,7 c, d, e (m) 7,81-7,44	8,45	4,33 J= 7,2	1,31 J= 7,2

Tabela 5.16: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto IP-23, solvente DMSO-d_6

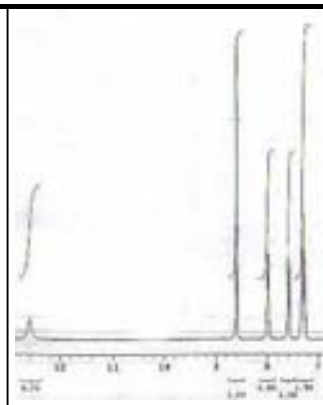
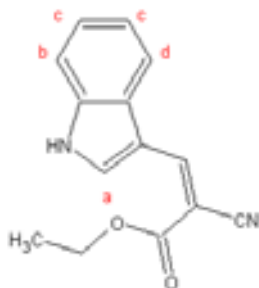
IP-23



Sinais observados (multiplicidade)	Hidrogênios aromáticos	-CH= (s)	-CH ₂ - (q)	-OCH ₃ (s)	-CH ₃ (t)
Deslocamento químico em ppm	a (d) 7,19 J=9,3 b (dd) 7,78 J=9,3 J=2,7 c (d) 8,18 J=2,7	8,43	4,32 J= 7,2	3,91	1,31 J=7,2

Tabela 5.17: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto IP-19, solvente DMSO-d_6

IP-19

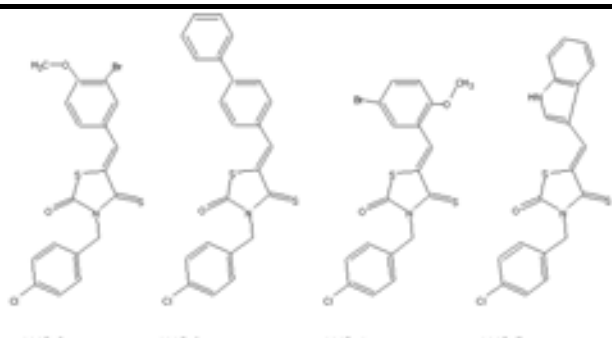


Sinais observados (multiplicidade)	Hidrogênios aromáticos	NH (s)	-CH= (s)	-CH ₂ - (q)	-CH ₃ (t)
Deslocamento químico em ppm	a (s) 8,57 b (d) 7,97 J= 6,3 c (m) 7,30 d (d) 7,58 J= 7,2	12,60	8,57	4,28 J= 7,2	1,31 J= 7,2

5.4.1.4 Caracterização dos compostos 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LYS)

Os espectros no infravermelho dos compostos 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona, LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5 (Anexos 13, 14, 15 e 16), apresentaram as frequências de absorção referentes aos grupamentos carbonila, a deformação axial C=C, além de tiocarbonila e NH (para LYS-5). As frequências de absorção para cada grupamento apresentam pequenas variações em cada substância, conforme pode ser visto na Tabela 5.18.

Tabela 5.18: Frequências de absorção no infravermelho, em cm^{-1} (intensidade) para LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5

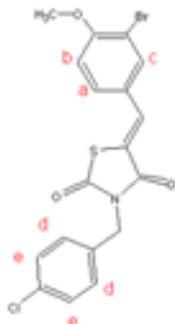
					
	C=O (4)	C=O (2)	C=C	N-H*	C=S
LYS-2	1.676 (F)	1.739 (F)	1.592 (md)	n.a .	n.a .
LYS-3	1.688 (F)	1.752 (F)	1.600 (md)	n.a .	n.a .
LYS-4	1.685 (F)	1.735 (F)	1.593 (md)	n.a .	n.a .
LYS-5	n.a.	1724 (F)	1.598 (md)	3.260 (md)	1.490 (md)

* n.a.=não aplicável

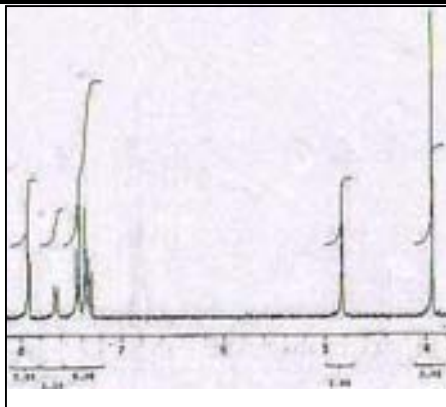
Os espectros de RMN de hidrogênio de cada um composto das séries LYS (Anexos 17,18,19 e 20) confirmam a presença dos hidrogênios aromáticos da posição 5, dos hidrogênios aromáticos da posição 3, do hidrogênio da liga dupla exocíclica e dos hidrogênios exocíclicos do grupo benzila; com deslocamentos químicos específicos para cada composto, como pode ser visto nas Tabelas 5.19, 5.0, 5.21 e 5.22.

Tabela 5.19: Deslocamentos químicos de RMN ^1H , em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto LYS-2, solvente DMSO-d_6

LYS-2



Chemical structure of LYS-2, a thiazolidine derivative. The structure shows a thiazolidine ring (a five-membered ring with one sulfur atom and two carbonyl groups) attached to a benzene ring. The benzene ring has a chlorine atom at position 4 and a methoxy group at position 1. The thiazolidine ring is attached to the benzene ring at position 2. The protons are labeled as follows: 'a' and 'b' are the aromatic protons on the benzene ring; 'c' is the methoxy group; 'd' and 'e' are the protons on the thiazolidine ring.



¹H NMR spectrum of LYS-2 in DMSO-d₆. The spectrum shows several peaks in the aromatic region (7.3-7.7 ppm) and a methoxy singlet at 3.93 ppm. Integration values are shown below the peaks: 0.95, 1.34, 0.95, 1.00, 0.95.

**Sinais observdos
(multiplicidade)**

**Hidrogênios
aromáticos
Posição 3**

**Hidrogênios
aromáticos
Posição 5**

**-CH=
(s)**

**-CH₂-
(s)**

**-OCH₃
(s)**

Deslocamento químico

d (d) 7,42
J=8,7

e (d) 7,34
J= 8,7

a (dd) 7,64 J=2,1
J=8,7

b (d) 7,30 J=8,7

c (d) 7,91 J=2,1

7,93

4,82

3,93

Tabela 5.20: Deslocamentos químicos de RMN ^1H em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto LYS-3, solvente DMSO-d_6

LYS-3

**Sinais observdos
(multiplicidade)**

**Hidrogênios
aromáticos**

Posição 3

**Hidrogênios
aromáticos**

Posição 5

**-CH=
(s)**

**-CH₂-
(s)**

Deslocamento químico

f (d) 7,43

J= 8,4

g (d) 7,36

J= 8,4

a (dd); **c** (d) sobrepostos

em 7,75

b (d) 7,88 J= 8,7

d e e (m) 7,47

8,02

4,85

Tabela 5.21 : Deslocamentos químicos de RMN ^1H em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto LYS-4, solvente DMSO $_d$

LYS-4

The chemical structure of LYS-4 is shown. It consists of a 4-chlorophenyl ring (labeled d and e) connected via a methylene group to a five-membered cyclic urea derivative. This is further connected via a methylene group to a 3,4-dimethoxyphenyl ring (labeled a, b, and c). The protons are labeled as follows: 'a' for the aromatic protons ortho to the methylene group on the 3,4-dimethoxyphenyl ring; 'b' and 'c' for the aromatic protons meta and para to the methylene group on the 3,4-dimethoxyphenyl ring; 'd' for the aromatic protons ortho to the methylene group on the 4-chlorophenyl ring; and 'e' for the aromatic protons meta to the methylene group on the 4-chlorophenyl ring.

The ¹H NMR spectrum of LYS-4 in DMSO-d₆ is shown. The x-axis represents the chemical shift in ppm, ranging from 0 to 10. The spectrum displays several peaks: a multiplet between 7.0 and 7.7 ppm corresponding to aromatic protons (labeled a, b, c, d, e); a singlet at approximately 7.97 ppm corresponding to the -CH= proton; a singlet at approximately 4.82 ppm corresponding to the -CH₂- protons; and a singlet at approximately 3.89 ppm corresponding to the -OCH₃ protons. Integration values are shown below the baseline for each major peak group.

Sinais observdos (multiplicidade)	Hidrogênios aromáticos Posição 3	Hidrogênios aromáticos Posição 5	-CH= (s)	-CH ₂ - (s)	-OCH ₃ (s)
Deslocamento químico	d (d) 7,42 J= 8,4 e (d) 7,34 J= 8,4	a (d) 7,55 J=2,4 b (dd) 7,67 J=8,7 J=2,4 c (d) 7,15 J=8,7	7,97	4,82	3,89

Tabela 5.22: Deslocamentos químicos de RMN ^1H em ppm, J em Hz, e detalhes do espectro do composto LYS-5, solvente DMSO $_d$

LYS-5

The chemical structure of LYS-5 is shown. It features a 4-chlorophenyl ring (labeled f) connected via a methylene group (labeled e) to a five-membered heterocycle. This heterocycle is further connected to a vinyl group (labeled b) which is attached to a benzofuran system. The benzofuran system has protons labeled a, b, c, and d.

The ¹H NMR spectrum of LYS-5 in DMSO-d₆ is displayed. The x-axis represents the chemical shift in ppm, ranging from 0 to 12. The spectrum shows several peaks: a broad peak at 12.23 ppm (NH), a multiplet at 8.22 ppm (-CH=), a multiplet at 7.92 ppm (b), a multiplet at 7.83 ppm (a), a multiplet at 7.51 ppm (d), a multiplet at 7.34 ppm (f), and a multiplet at 7.24 ppm (c). Integration values are provided below the peaks: 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, and 1.00.

**Sinais observdos
(multiplicidade)**

**Hidrogênios
aromáticos**

Posição 3

**Hidrogênios
aromáticos**

Posição 5

**-CH=
(s)**

**-CH₂-
(s)**

**NH
(s)**

Deslocamento químico

e (d) 7,43
J= 16,5 e 8,4
f (d) 7,34
J= 8,4

a (s) 7,83
b (d) 7,92 J= 7,5
c (m) 7,24
d (d) 7,51 J= 8,7

8,22

4,83

12,23

ATIVIDADE BIOLÓGICA

6 ATIVIDADE BIOLÓGICA

A verificação da atividade biológica de uma substância constitui o objetivo principal dos bioensaios, cujas abordagens metodológicas envolvem estudos clínicos, utilizando seres humanos, e pré-clínicos, utilizando normalmente modelos *in vivo* e *in vitro*.

Como a atividade biológica de uma substância depende das características dessa (estrutura e propriedades físico-químicas); da entidade biológica com quem vai interagir (espécie, sexo, idade, etc.) e do tratamento utilizado (dose, via de administração, entre outros). O bioensaio de uma série de compostos análogos provê ferramentas para estabelecer uma possível uma correlação entre a resposta biológica apresentada e as propriedades estruturais e físico-químicas dos compostos da série em estudo.

6.1 Avaliação de efeitos gerais

A avaliação dos efeitos gerais das substâncias da série LYS foi realizada visando observar algumas reações comportamentais e fisiológicas das substâncias em camundongos, através do registro dos efeitos ou respostas que podem ocorrer dentro de alguns minutos, horas ou dias após a administração das substâncias em estudo. Através da avaliação de efeitos gerais também foi possível estabelecer as doses a serem administradas nos ensaios *in vivo* da determinação da atividade antiinflamatória (KIMMEL e BUELKE, 1994).

6.1.1 Material

Os animais utilizados para avaliação de efeitos gerais foram camundongos albino Swiss (*Mus musculus*) provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, mantidos em gaiolas de polipropileno, em ambiente climatizado (aproximadamente 23 ± 2 °C), *ad libitum* e submetidos a período de claro-escuro de 12 horas.

Os materiais utilizados estão listados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Materiais e equipamentos utilizados na avaliação dos efeitos gerais dos derivados da série LYS, suas especificações e procedência

Material / Equipamento	Especificações	Procedência
Tween 80		Merck & Co
Substâncias LYS-2-5	Sintetizadas e purificadas	LPSF – UFPE
Etanol	70 %	Synth
Balança analítica		E. Meppler
Balança semi-analítica		Marte
Ração		Purina

6.1.2 Metodologia

Os experimentos foram realizados em acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética para Experimentos com Animais, da UFPE (Protocolo Nº. 23076.004500/2003-93), no período de maio a outubro de 2003, na Sala de Transplantes do Biotério do Departamento de Antibióticos, durante o dia, em ambiente climatizado (aproximadamente 23 ± 2 °C).

Para realização da avaliação de efeitos gerais utilizou-se o método descrito por De Luca e colaboradores (1996). Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos, com faixa etária de 60 dias e peso variando entre 25 e 35 g. Os animais foram mantidos em gaiolas formando grupos de seis animais, que foram devidamente marcados, pesados e tiveram sua alimentação retirada 12 horas antes do início do experimento. O acesso a

água foi restrito no início do experimento, e permitido após 60 minutos completos de experimentação.

Em cada grupo de seis animais foram administrados individualmente, com intervalos de 10 minutos, por via intraperitoneal (i.p.) uma suspensão contendo 1 g/Kg de peso corporal das substâncias a serem testadas (LYS-2, 3, 4 e 5), ou apenas soro fisiológico para o grupo controle. As suspensões foram preparadas individualmente utilizando-se Tween 80 a 2 % como agente suspensor (FALCÃO, 2003) e soro fisiológico como veículo.

Após a administração de cada substância teste ou do soro fisiológico no grupo controle, os animais foram removidos para uma segunda gaiola, onde ficaram sob observação constante nos primeiros 60 minutos. Após este período os animais foram observados em intervalos de 12 horas até que se completassem 48 horas. Os efeitos gerais provocados pelas substâncias foram devidamente registrados e agrupados em efeitos depressores ou estimulantes do sistema nervoso central (SNC).

Os animais utilizados foram sacrificados cinco dias após cada experimento, não sendo reutilizados para qualquer outra finalidade.

6.1.3 Resultados e discussão

A observação de efeitos gerais ou respostas fisiológicas e comportamentais na dose de 1000 mg/Kg registradas para as substâncias LYS-2, 3, 4 e 5 estão descritas na Tabela 6.2. Nenhum animal foi a óbito durante o período transcorrido nos ensaios

Tabela 6.2: Efeitos gerais observados em camundongos utilizando-se as substâncias LYS-2, 3, 4 e 5, na dose de 1000 mg/Kg de peso corpóreo

Substância (1000 mg/Kg)	Efeitos observados		
	Estimulantes do SNC	Depressores do SNC	Outros efeitos
LYS-2	Piloereção, ereção de cauda, movimentos estereotipados, aumento da frequência respiratória, agitação, convulsão tônica.	Alteração de marcha, arrastamento dos membros posteriores, prostração, bradicardia.	Presença de diurese e excreção fecal, contorções abdominais, espasmos.
LYS-3	Piloereção, ereção de cauda, movimentos estereotipados, tremores finos, levantamento de pata anterior, aumento da frequência respiratória, agitação, movimentos circulares, agressividade, (postura em garra).	Alteração de marcha, arrastamento dos membros posteriores, arrastamento de cauda, prostração, bradicardia, sonolência	Presença de diurese e excreção fecal, contorções abdominais, espasmos. Após 20 horas observou-se diurese.
LYS-4	Piloereção, ereção de cauda, tremores finos, movimentos estereotipados, aumento da frequência respiratória, agitação.	Alteração de marcha, arrastamento dos membros posteriores, prostração, bradicardia, sonolência, após duas horas todos os animais estavam dormindo.	Ausência de diurese e excreção fecal, regurgitação, contorções abdominais, espasmos.
LYS-5	Piloereção, ereção de cauda, tremores finos, movimentos estereotipados.	Alteração de marcha, arrastamento dos membros posteriores, prostração, bradicardia, sonolência.	Presença de diurese e ausência de excreção fecal, contorções abdominais, espasmos, fotofobia. Após 20 horas observou-se excreção fecal (diarréia).

SNC = Sistema Nervoso Central

Entre as substâncias testadas, a LYS-2 mostrou-se a mais reativa das drogas testadas, apresentando expressiva diurese e excreção fecal, espasmos

e contrações freqüentes ao longo do período de observação, chegando a apresentar convulsões tônicas nos primeiros 20 minutos.

A substância LYS-4 mostrou-se menos reativa que a LYS-2, embora do ponto de vista estrutural estas moléculas difiram apenas nas posições dos substituintes do anel aromático da posição 5 (bromo e metóxi). Ressalta-se que as reações depressoras do SNC foram mais pronunciadas do que reações estimulantes, além da ausência total de diurese.

As respostas provocadas por LYS-3 foram semelhantes a LYS-5, embora com efeitos depressores menos pronunciados. Ocasionalmente fortes efeitos estimulantes foram observados, mas ao longo do período de observação prevaleceram os efeitos depressores. Após 20 horas da administração da substância, observou-se diurese.

Os animais também responderam significativamente à LYS-5; atuando aparentemente como depressores do SNC. Os animais, após um curto período inicial de agitação, que pode ser atribuído ao estresse induzido pela aplicação da droga, apresentaram prostração e sonolência. Observou-se também diminuição na freqüência respiratória. Adicionalmente, ocorreu ausência de diurese (apenas 1 episódio imediatamente após aplicação da droga em um dos animais) e de excreção fecal. Após 20 horas observou-se a presença de excreção fecal, de consistência líquida.

Considerando-se que as substâncias não tiveram efeito letal na dose testada, optou-se por utilizar como dose terapêutica máxima na realização dos teste de atividade antiinflamatória o equivalente a 10 % desta dose, ou seja, 100 mg/Kg de peso (PEREIRA *et al.*, 1994; FALCÃO, 2003).

6.2 Avaliação da Atividade Antiinflamatória

O sucesso na descoberta de novos fármacos antiinflamatórios clinicamente eficazes depende, em grande parte, da metodologia de avaliação em modelos animais que é empregada. Tais métodos consistem basicamente em induzir química ou fisicamente uma reação inflamatória no animal e verificar a capacidade da substância em estudo, profilática ou terapeuticamente, de suprimir tal reação inflamatória, de maneira que a inflamação provocada seja o mais próxima possível da resposta inflamatória humana nas mais diversas patologias inflamatórias.

A verificação da atividade antiinflamatória pode ser detectada através da mensuração de parâmetros macroscópicos relacionados ao processo inflamatório, como edema, calor e dor; ou parâmetros bioquímicos, como contagem de células ou dosagens de mediadores químicos.

Inúmeros métodos *in vivo* podem ser utilizados para a avaliação da atividade antiinflamatória, tais como: indução de edema de pata (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962), indução de edema de orelha (GOTO *et al.*, 2002), exsudação pleural, indução de artrite, implante de pelet de algodão (GUPTA *et al.*, 1969), bolsão inflamatório (“air pouch”) (PALASKA *et al.*, 2003), entre outros. Todos esses métodos são amplamente utilizados e citados na literatura, cada qual com pequenas variações no que diz respeito as características do animal (peso, idade, dieta), agente indutor da inflamação e sua concentração, via de administração da droga testada e detalhes dos protocolos experimentais, tais como tamanho da seringa de aplicação, volume da solução, utilização ou não de anestesia, entre outros.

A indução do edema de pata de rato por carregenina (EPC) foi escolhida como ensaio *in vivo* para a avaliação da atividade antiinflamatória na fase aguda da inflamação das drogas sintetizadas como objeto desta dissertação, baseado num estudo comparativo entre métodos experimentais para avaliação de atividade antiinflamatória realizado por Gupta e colaboradores (1969), que o aponta como um método conveniente e capaz de detectar atividade em todas as categorias de fármacos antiinflamatórios clinicamente úteis, e na boa correlação existente entre a eficácia deste modelo e a atividade exibida em humanos (OTTERNESS e BLIVEN, 1985 *apud*: ZHANG *et al.*, 1997), além das facilidades oferecidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE.

6.2.1 Material

Os animais utilizados para avaliação da atividade antiinflamatória foram ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, mantidos em gaiolas de polipropileno, em ambiente climatizado (aproximadamente 23 ± 2 °C), *ad libitum* e submetidos a período de claro-escuro de 12 horas.

O material e equipamentos utilizados para realização da avaliação da atividade antiinflamatória das substâncias da série LYS estão listadas na Tabela 6.3.

Tabela 6.3: Material e equipamentos utilizados na avaliação da atividade antiinflamatória de derivados da série LYS, suas especificações e procedência

Material / Equipamento	Especificações	Procedência
Carragenina		Sigma-Aldrich.
Tween 80		Merck & Co
Substâncias LYS-2-5	Puras	LPSF – UFPE
Indometacina	Em pó	Farmácia Escola – UFPE
Etanol	70 %	Synth
Ração animal		Purina
Balança analítica		E. Meppler
Balança semi-analítica		Marte
Pletsmômetro manual ou Medidor de Volume Diferencial	Construído conforme Figura 6.1.	LPSF – UFPE

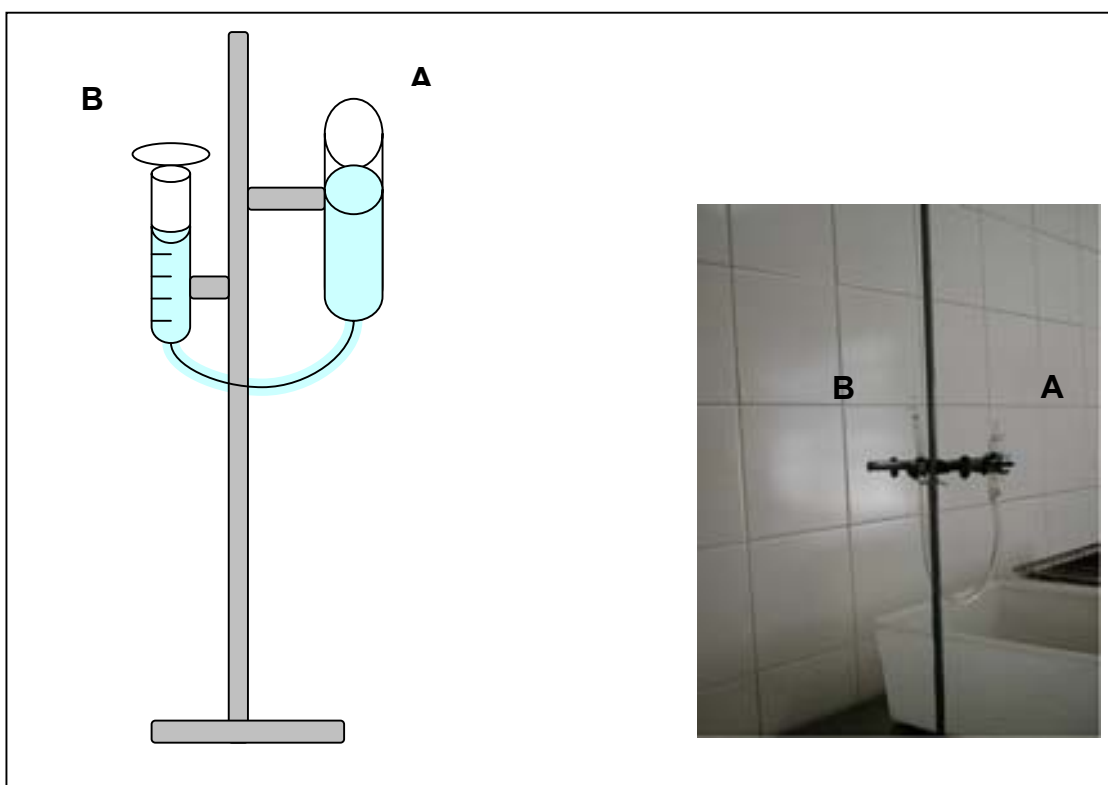


Figura 6.1: Representação esquemática e fotografia do pletsmômetro manual, montado no LPSF – UFPE e utilizado nos ensaios de determinação da atividade antiinflamatória. A= tanque de medida; B= cilindro de leitura

6.2.2 Metodologia

Os experimentos foram realizados em acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética para Experimentos com Animais, da UFPE (Protocolo Nº. 23076.004500/2003-93), no período de maio a outubro de 2003, na Sala de Transplantes do Biotério do Departamento de Antibióticos, durante o dia, em ambiente climatizado (aproximadamente 23 ± 2 °C).

6.2.2.1 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter

Para determinação da atividade antiinflamatória profilática utilizou-se o método de Winter, Risley e Nuss (1962), o qual foi executado conforme descrito a seguir.

Foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 205 e 305g e com idades entre 2 e 3 meses. Os animais foram mantidos em grupos de seis e tiveram sua alimentação retirada 12 horas antes do início do experimento. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água.

Primeiramente cada animal recebeu, via intraperitoneal, as substâncias LYS-2, 3, 4 e 5, a indometacina ou soro fisiológico, dependendo do grupo a que pertencia, de acordo com a seguinte denominação:

- Grupo Controle (n=6), os animais que receberam, por via intraperitoneal, 1 mL de soro fisiológico;
- Grupo Padrão (n=6), os animais que receberam, por via intraperitoneal, 1 mL de suspensão de indometacina 10 mg/Kg em soro fisiológico (SALA *et al*, 2003);

- Grupo Teste (n=6), os animais que receberam, por via intraperitoneal, 1 mL de suspensão da droga teste (LYS 2, 3, 4 ou 5) com concentração de 50 mg/Kg em soro fisiológico.

As suspensões de indometacina e das substâncias LYS, foram preparadas em soro fisiológico utilizando 2 % de Tween 80 (FALCÃO, 2003).

A seguir, cada animal foi segurado firmemente (sem estar anestesiado) e a pata traseira direita foi submersa até a altura do osso mielóide lateral no tanque de medida do pletismômetro (Figura 6.1). O volume de água deslocado foi verificado através do cilindro de leitura e corresponde ao volume da pata. Este valor é chamado de leitura no tempo zero ou zero negativo.

Uma hora após a administração intraperitoneal das substâncias LYS o agente inflamatório (0,1 mL de solução de carragenina a 1 % em soro fisiológico) foi injetado subcutaneamente na face plantar da pata traseira direita.

Uma hora após a injeção de carragenina foi realizada nova leitura da medida da pata, chamada leitura do tempo 1 hora. Leituras subseqüentes foram realizadas até completarem-se 6 horas de inflamação, conforme demonstrado no Esquema 6.1.

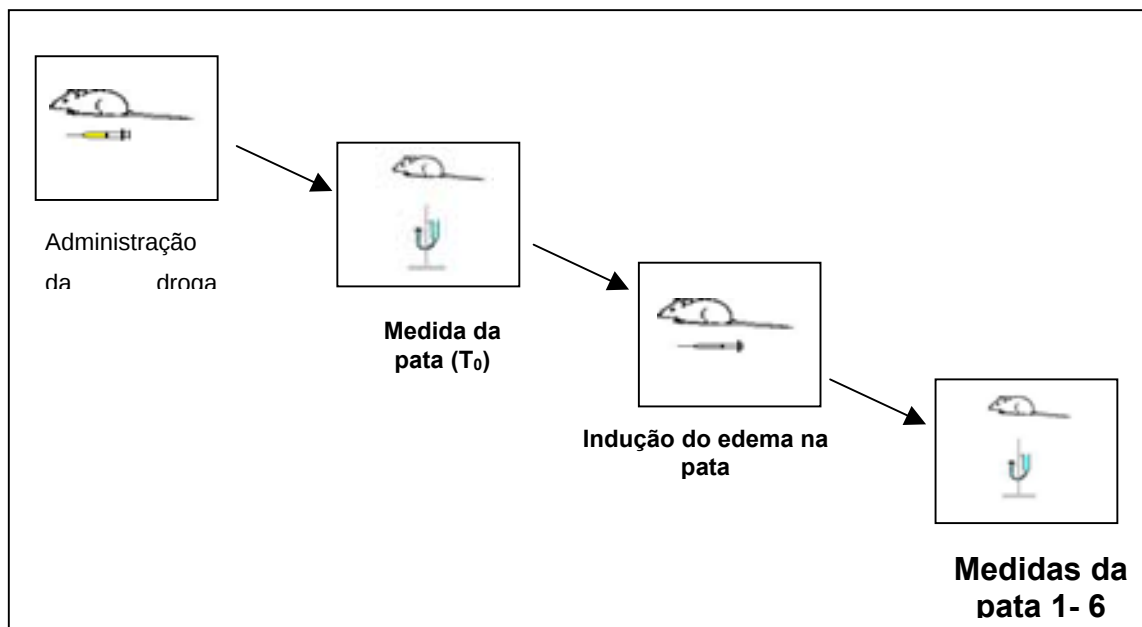
O efeito antiinflamatório das drogas foi estimado em termos de percentual de inibição, calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antiinflamatória (\%)} = [(n - n')/n] \times 100$$

onde n e n' indicam a média $\pm$ erro padrão do volume do edema nos grupos controle e teste em uma determinada hora (PALASKA *et al.*, 2003). Entende-se por volume do edema a diferença no volume da pata numa determinada hora e o volume da pata no tempo zero. Cada grupo experimental foi formado por seis

animais (n=6). Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância com intervalo de confiança de 95% utilizando-se o teste de Dunnet, quando comparados com o grupo controle.

Os dados obtidos em cada data de experimentação foram comparados unicamente aos grupos controle e padrão obtidos naquela mesma data. Os animais utilizados foram sacrificados 48 horas após cada experimento, não sendo reutilizados para qualquer outra finalidade.



Esquema 6.1: Representação do experimento para medição do edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter.

6.2.2.2 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter modificado

A determinação da atividade antiinflamatória através do método de Winter (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962) tem sido utilizada como método de escolha. Entretanto, nesse método as drogas são administradas antes da indução da inflamação por carragenina, não provendo informações conclusivas sobre o comportamento dessas na inflamação já estabelecida.

Visando a determinação da atividade antiinflamatória terapêutica, ou seja, num processo inflamatório já estabelecido, e uma verificação de possíveis diferenças nos resultados provenientes da variação do momento da administração das substâncias, utilizou-se o método de Winter, Risley e Nuss (1962) com modificações propostas por Zhang e colaboradores (1997), o qual foi executado conforme descrito a seguir.

Foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 205 e 469 g e com idades entre 2 e 4 meses. Os ratos foram mantidos em grupos de seis e tiveram sua alimentação retirada 12 horas antes do início do experimento. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água.

Primeiramente cada animal foi segurado firmemente (sem estar anestesiado) e a pata traseira direita foi submersa até a altura do osso mielóide lateral no tanque de medida do pletismômetro manual (Figura 6.1). O volume de água deslocado foi verificado através do cilindro de leitura e corresponde ao volume da pata. Este valor é chamado de leitura no tempo zero ou zero negativo.

Registrada a leitura no tempo zero para todos os animais do grupo total de experimentação, o agente inflamatório (0,1 mL de solução de carragenina a 1% em soro fisiológico), foi injetado subcutaneamente na face plantar da pata traseira direita. Trinta minutos após a injeção da carragenina foi feita uma nova leitura da medida da pata. Essa medida é chamada leitura no tempo 30 minutos ou zero positivo.

Uma hora após a injeção de carragenina, cada animal recebeu, por via intraperitoneal, as substâncias LYS, indometacina ou soro fisiológico, dependendo do grupo a que pertencia, denominados:

- Grupo Controle (n=6), os animais que receberam, por via intraperitoneal, 1 mL de soro fisiológico;
- Grupo Padrão (n=6), os animais que receberam, por via intraperitoneal, 1 mL de suspensão de indometacina 10 mg/Kg em soro fisiológico (SALA *et al*, 2003);
- Grupo Teste (n=6), os animais que receberam, por via intraperitoneal, 1 mL de suspensão da substância teste com concentrações variáveis (LYS 2= 12,5; 25;50 e 100 mg/Kg, LYS-3= 50 e 100 mg/Kg, LYS-4= 50 e 100 mg/Kg, LYS-5= 50 e 100 mg/Kg) em soro fisiológico.

As suspensões de indometacina e das drogas teste, foram preparadas em soro fisiológico utilizando 2 % de Tween 80 (FALCÃO, 2003).

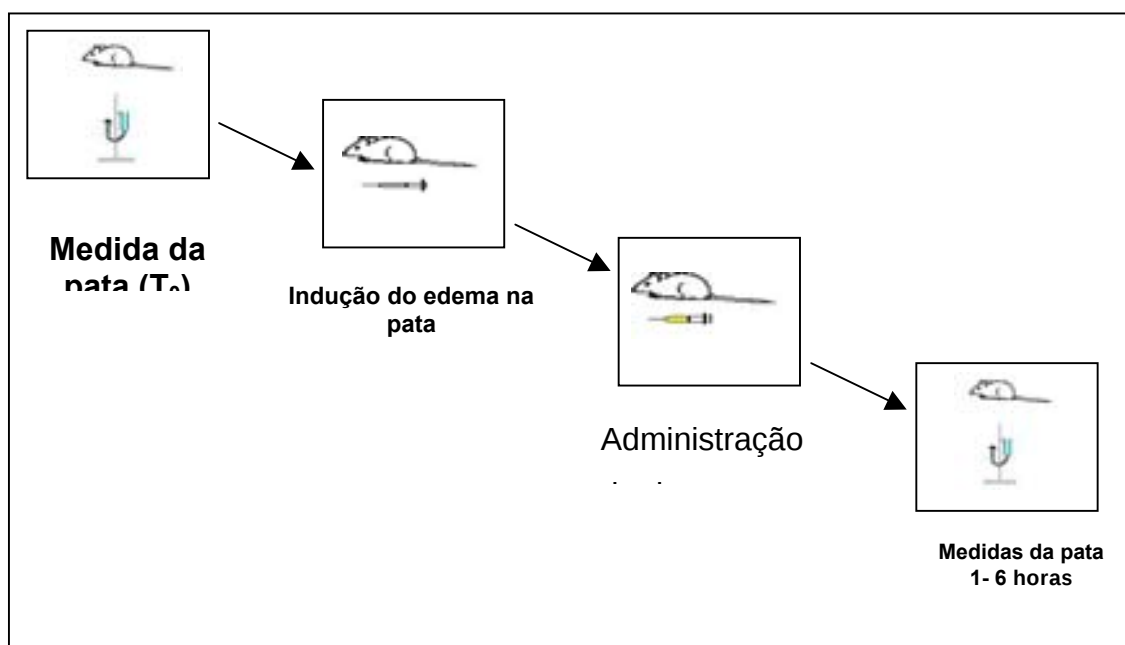
Após a administração das substâncias LYS, indometacina ou soro fisiológico, cada animal teve o volume da pata medido, pela segunda vez. Essa medida é chamada leitura no tempo 1 hora. Leituras subseqüentes foram realizadas durante 5 horas, conforme o Esquema 6.2.

O efeito antiinflamatório das drogas foi estimado em termos de percentual de inibição, calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antiinflamatória (\%)} = [(n - n')/n] \times 100$$

onde n e n' indicam a média $\pm$ erro padrão do volume do edema nos grupos controle e teste em uma determinada hora (PALASKA *et al.*, 2003). Entende-se por volume do edema a diferença no volume da pata numa determinada hora e o volume da pata no tempo zero. Cada grupo experimental foi formado por seis animais (n=6). Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância com intervalo de confiança de 95% utilizando-se o teste de Dunnet, quando comparados com o grupo controle.

Os dados obtidos em cada data de experimentação foram comparados unicamente aos grupos controle e padrão obtidos naquela mesma data. Os animais utilizados foram sacrificados 48 horas após cada experimento, não sendo reutilizados para qualquer outra finalidade.



Esquema 6.2: Representação do experimento para medição do edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter modificado

6.2.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos nos ensaios de edema de pata induzido por carragenina (EPC) estão descritos separadamente, de acordo com o método utilizado. Dados ilustrativos (fotografias) os ensaios encontram-se nos Anexos 21 e 22.

6.2.3.1 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter

As substâncias da série LYS tiveram sua atividade antiinflamatória profilática avaliada segundo método descrito no item 6.2.2.1, na dose de 50 mg/kg de peso corporal. Todas as substâncias apresentaram atividade antiinflamatória profilática significativa quando comparadas ao grupo controle. Na Figura 6.2 observa-se a evolução do edema de pata induzido por carragenina nos diferentes grupos testados, durante seis horas de ensaio.

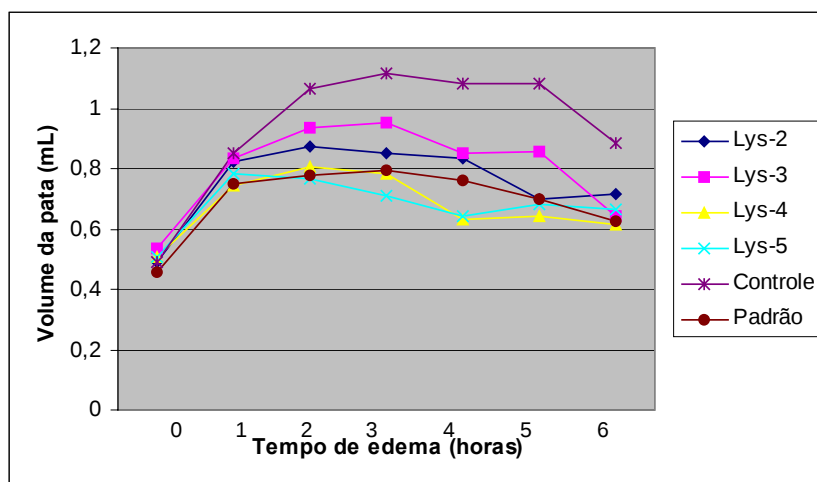


Figura 6.2: Evolução do edema apresentado pelos grupos teste, controle e padrão

A evolução do edema no grupo controle seguiu o padrão apresentado nos ensaios realizados por Winter, Risley e Nuss (1962), onde há uma fase inicial de desenvolvimento do edema, nos primeiros 30 a 60 minutos, seguido

de um crescimento acentuado durante cinco horas, indicando que o ensaio respondeu de acordo com o esperado. Os valores de inibição obtidos para indometacina estão em acordo com os obtidos anteriormente por Gupta e colaboradores (1969).

Os percentuais de inibição observados com as substâncias testadas foram mais elevados nos período compreendido entre três e cinco horas, tendo demonstrado maior potência as substâncias LYS-4 e a LYS-5 que alcançaram um pico de inibição às quatro horas após a indução do edema, onde foram capazes de inibir o desenvolvimento do edema em 78 e 77 %, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle, superando inclusive, o efeito apresentado pelo fármaco utilizado como padrão, a indometacina. Os percentuais de inibição de todas as substâncias podem ser observados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4: Percentual de inibição do edema de pata apresentado pelas substâncias testadas, no período de uma até seis horas.

Volume do edema (VE) de pata e percentuais de inibição do edema a cada												
Substância	hora(tempo após a indução do edema)											
	VE	1 h*	VE	2 hs	VE	3 hs	VE	4 hs	VE	5 hs	VE	6 hs
LYS-2	0,33	6,97	0,38	33,3	0,36	42,7	0,34	42,6	0,21	64,8	0,22	42,5
LYS-3	0,30	16,3	0,40	30,4	0,42	33,3	0,32	46,5	0,32	45,1	0,11	72,3
LYS-4	0,23	34,9	0,30	47,8	0,27	56,0	0,12	78,9	0,13	77,5	0,11	72,3
LYS-5	0,27	23,2	0,26	55,1	0,20	68,0	0,13	77,5	0,10	70,4	0,16	59,6
Indometacina	0,29	18,1	0,31	44,9	0,33	46,7	0,30	49,3	0,24	59,1	0,15	57,4
Controle	0,36	100	0,57	100	0,63	100	0,59	100	0,59	100	0,39	100

VE= média do volume do edema medido, em mL. Considera-se o grupo controle como 100% do edema. Resultados significativos quando comparados com o grupo controle (análise de variância, intervalo de confiança de 95%, teste de Dunnet) * valores de p >0,05

Graficamente a inibição do edema pode ser observada na Figura 6.3.

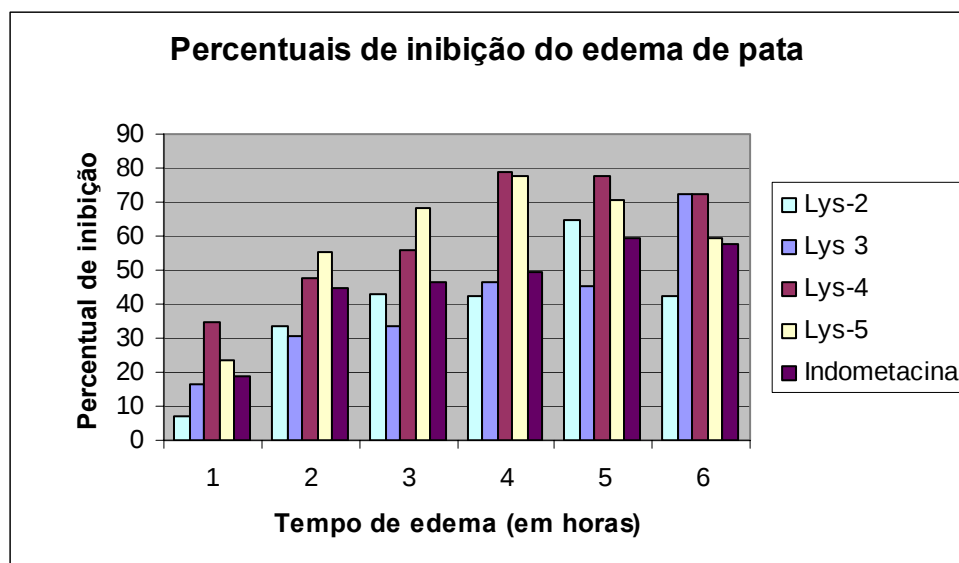


Figura 6.3: Representação gráfica dos percentuais de inibição do edema de pata apresentado pelas substâncias testadas e pela indometacina

A atividade apresentada pelas substâncias LYS-2 e LYS-3 apresentou-se ligeiramente inferior àquela apresentada pela indometacina. Nas substâncias LYS-4 e LYS-5, a diferença dos percentuais de atividade antiinflamatória exibida foi em média, 15,28 % e 13,04 %, respectivamente, superior a indometacina, conforme pode ser observado na Tabela 6.5, indicando que tais substâncias têm importante potencial antiinflamatório.

Tabela 6.5: Percentual de inibição do edema das substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4, LYS-5 e indometacina, apresentados como média aritmética das leituras realizadas durante 6 horas de experimento

Substância	Percentual de inibição do edema (média das 6 horas de experimento)
LYS-2	38,75%
LYS-3	40,64%
LYS-4	61,23%
LYS-5	58,96%
Indometacina	45,92%

Considera-se o grupo controle como 100% do edema. Resultados significativos quando comparado com o grupo controle (Análise de variância, intervalo de confiança 95%, teste de Dunnet)

As substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5 apresentam um perfil de inibição do edema similar ao apresentado pela indometacina, sem inibir a fase

inicial do desenvolvimento do edema – provavelmente resultante da produção local de bradicinina, insensível a ação dos NSAIDs, enquanto a segunda fase (uma a cinco horas) é bloqueada quantitativamente - sugerindo que o mecanismo de ação através do qual as substâncias da série LYS inibiram o desenvolvimento do edema seja similar ao mecanismo de ação da indometacina. As substâncias LYS-3, LYS-4 e LYS-5 exibiram uma queda no volume do edema, ligeiramente mais acentuada que a indometacina, no tempo 4 horas.

Dados de inibição enzimática, corroborados por dados bioquímicos, especificamente, por dosagens de prostaglandina E_2 (PGE_2) e tromboxano A_2 (TXA_2) comprovam que o mecanismo de ação antiinflamatória da indometacina está relacionado com a inibição das duas isoformas da COX, COX-1 e COX-2 (SMITH *et al.*, 1998). Assim, por raciocínio análogo, é possível sugerir que o provável mecanismo de ação das substâncias testadas seja também através da inibição da enzima COX.

Inferir sobre qual das duas isoformas estaria sendo atingida preferencialmente não é possível unicamente através do EPC, entretanto, segundo Smith e colaboradores (1998), fármacos seletivos para COX-1 não são capazes de inibir profilaticamente a formação do edema no EPC, enquanto fármacos inibidores da COX-1 e da COX-2, e seletivos à COX-2 o são. Assim, pode-se sugerir que as substâncias da série LYS possivelmente não sejam inibidoras seletivas da COX-1, uma vez que foram capazes de inibir profilaticamente o EPC.

6.2.3.2 Edema de pata induzido por carragenina pelo método de Winter modificado

As substâncias da série LYS tiveram sua atividade antiinflamatória terapêutica avaliada segundo método de Winter modificado, descrito no item 6.2.2.2.

As substâncias testadas nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg não apresentaram atividade antiinflamatória significativa. As substâncias testadas na dose 100mg/kg apresentaram atividade antiinflamatória (33,85-79,41 %) na primeira e na sexta hora após a indução do edema, quando comparadas ao grupo controle.

O percentual de inibição do edema de pata induzido por carragenina apresentado pelas substâncias LYS-2, 3, 4 e 5, uma e seis horas após a injeção de carragenina, na dose de 100 mg/Kg de peso do animal, está demonstrado na Tabela 6.6.

Tabela 6.6: Percentual de inibição do edema de pata induzido por carragenina alcançado pelas substâncias LYS-2, 3, 4 e 5 (100 mg/Kg) nos tempo 1 e 6 horas

Percentual (%) de inibição do edema de pata induzido por carragenina	LYS-2	LYS-3	LYS-4	LYS-5
1 hora	40,95	33,85	34,45	47,63
6 horas	47,05	48,81	79,41	76,7

Considera-se o grupo controle como 100% do edema. Resultados significativos quando comparado com o grupo controle (Análise de variância, intervalo de confiança 95%, teste de Dunnet)

Observou-se que de uma maneira geral as substâncias da série LYS não foram capazes de inibir ou reverter significativamente o edema já estabelecido, durante o tempo de experimentação. Imediatamente após a administração das substâncias houve uma redução do edema e após este período o edema apresentou-se nas mesmas proporções do grupo controle até

que no tempo seis horas houve novamente um decréscimo no volume do edema, conforme pode ser observado na Figura 6.4. O mesmo comportamento foi apresentado pelo fármaco utilizado como padrão, a indometacina.

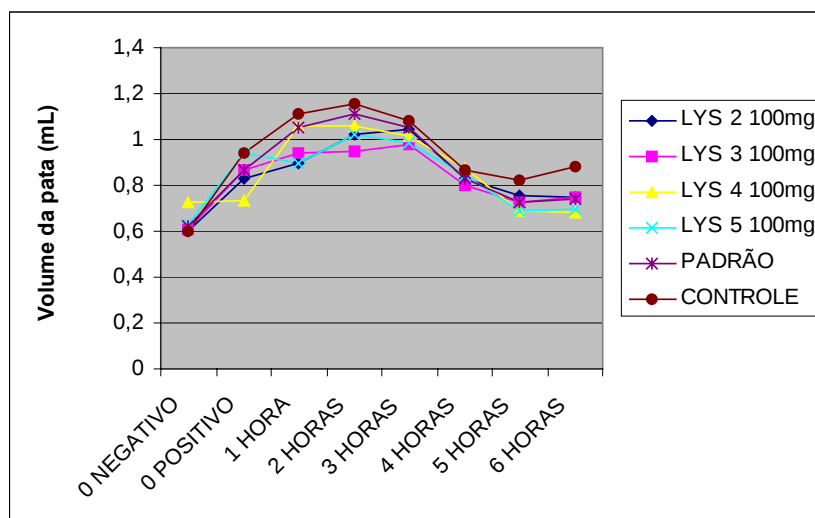


Figura 6.4: Evolução do edema de pata nos grupos controle, substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4, LYS-5 e indometacina

A evolução do edema apresentada pela administração terapêutica da indometacina, das substâncias da série LYS e do grupo controle, similares entre si, embora diferente do resultado obtido no EPC pelo método de Winter (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962), está de acordo com resultados obtidos previamente por Zhang e colaboradores (1997), onde a administração terapêutica de cetorolac, um inibidor inespecífico da COX (inibidor de ambas isoformas), reduziu o edema num primeiro momento e a partir daí teve um desenvolvimento similar ao do grupo controle.

Com resultados similares, Smith e colaboradores (1998) observaram que a utilização terapêutica no EPC das substâncias [5-(4-clorofenil)-1-(4-metóxfenil)-3-trifluór-metil-pirazol (SC-560) e celecoxib, inibidores seletivos da COX-1 e COX-2 respectivamente, não reverteram o edema estabelecido durante o tempo de duração do experimento, embora tenham promovido

redução nos níveis de PGE_2 , um indicativo de que está ocorrendo inibição da enzima COX. No ensaio profilático, o celecoxib apresentou-se capaz de reduzir o edema de pata (SMITH *et al.*, 1998).

No mesmo ensaio Smith e colaboradores (1998) também verificaram que, embora a utilização de celecoxib não tivesse levado à diminuição no volume do edema, o mesmo apresentou propriedades analgésicas, tais quais haviam sido observadas quando da administração profilática dessa substância, mais um indicador de que estaria ocorrendo inibição da enzima, no caso, da COX-2.

As diferenças apresentadas entre os métodos utilizados para determinação da atividade antiinflamatória através do volume do edema sugerem que a avaliação do edema de pata utilizando-se administração terapêutica das substâncias, durante o período de seis horas não seja um método apropriado para avaliação da atividade antiinflamatória, provavelmente porque o tempo de experimentação seja insuficiente para promover a reversão de um edema que já está estabelecido, e adicionalmente pode sugerir-se que reverter uma situação de edema já estabelecido envolva outros mecanismos ainda desconhecidos que não estejam relacionadas à COX, mas sim, relacionados mecanismos responsáveis pela drenagem do exsudato que compõe o edema.

6.2.3.3 Relação qualitativa estrutura-atividade

Os resultados de atividade antiinflamatória apresentados pelas substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5, quando comparados aos resultados obtidos nos

compostos 5-(3-bromo-4-metóxi)-benzilideno-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (A), 5-(1-1'-bifenil-4-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (B) e 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (C) estudados por Pereira (2003) demonstram que as modificações químicas representadas pela presença do grupamento 4-clorobenzil na posição 3 do anel tiazolidínico e pela substituição de um átomo de oxigênio por enxofre na posição 4 do composto LYS-5, simultânea ou isoladamente, promoveram importantes diferenças percentuais na resposta antiinflamatória das moléculas LYS-2, LYS-3 e LYS-5, conforme demonstrado na Figura 6.5.

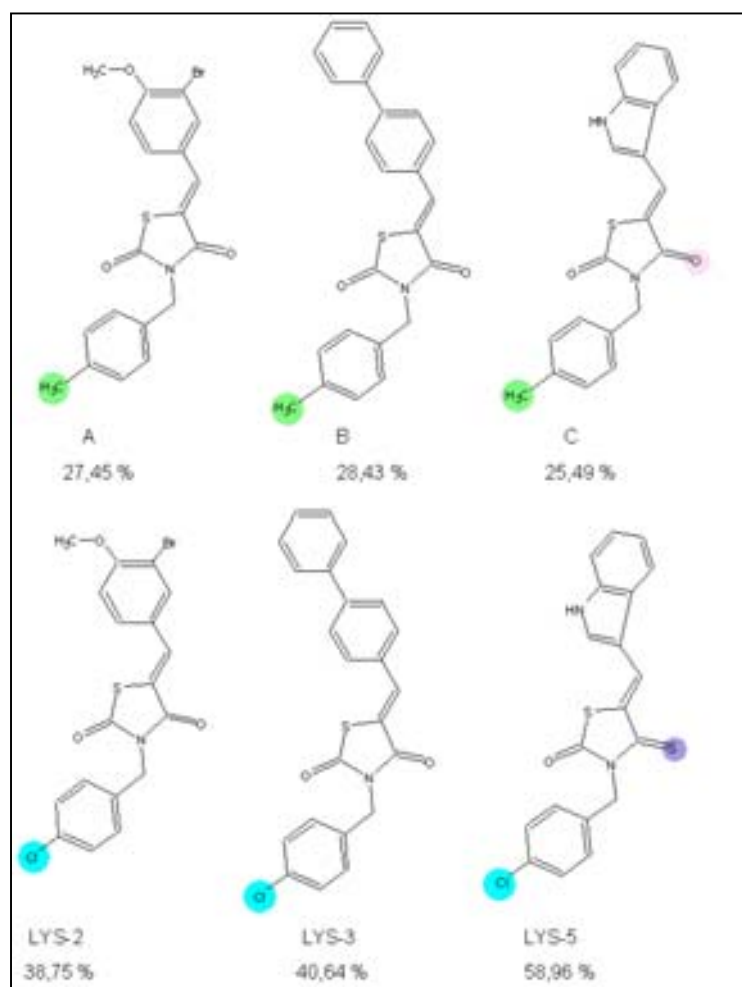


Figura 6.5: Comparação entre as estruturas químicas e os percentuais de atividade antiinflamatória exibidos pelos compostos A, B e C (PEREIRA, 2003) e LYS-2, LYS-3 e LYS-5

As diferenças percentuais apresentadas pelas substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5 na avaliação da atividade antiinflamatória através do método de Winter (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962), quando comparadas entre si, demonstraram que :

- Substituintes bifênil-4-il-metileno (LYS-3) e 3-bromo-4-metóxi-benzilideno (LYS-2), presentes na posição 5 do anel tiazolidínico, conferem ao protótipo resposta antiinflamatória mais baixa;
- Substituintes 5-bromo-2-metóxi-benzilideno (LYS-4) e 1*H*-indol-3-il-metileno (LYS-5), presentes na posição 5 do anel tiazolidínico, apresentam atividades similares entre si e consideravelmente superiores aos demais testados.

Considerando unicamente atividade antiinflamatória, tais observações sugerem que:

- O volume e disposição espaciais, assim como a distribuição eletrônica de LYS-3, não permitem interações específicas com seu receptor biológico;
- O grupamento métoxi, quando presente em posição *orto* do anel aromático da posição 5, promove interações mais favoráveis com o receptor do que quando presente em posição *para* (Figura 6.6).

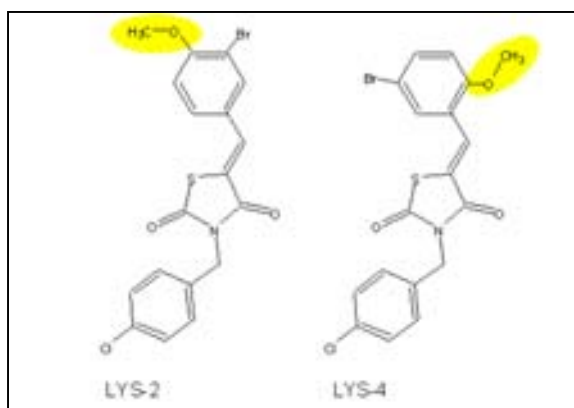


Figura 6.6: Compostos LYS-2 e LYS-4, assinalando o grupo metóxi em diferentes posições do anel

- O grupamento 1*H*-indol promove interações favoráveis com o receptor, provavelmente devido a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio através da amina secundária presente na estrutura (Figura 6.7).

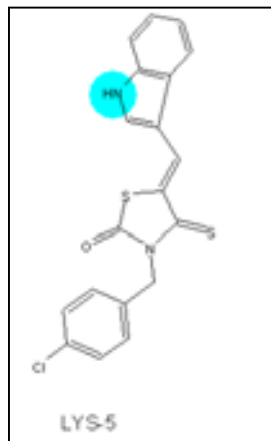


Figura 6.7: Composto LYS-5, assinalando a presença de amina secundária

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os derivados 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas que receberam a codificação LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5, foram sintetizados através da rota sintética proposta com rendimentos satisfatórios, foram purificados, e tiveram suas estruturas químicas comprovadas através de espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear.

A atividade antiinflamatória avaliada através do Método de Winter demonstrou que todas as substâncias sintetizadas apresentaram atividade antiinflamatória, sobressaindo-se as substâncias LYS-4 e LYS-5 cujos percentuais de inibição foram 15 e 13%, respectivamente, superiores à droga padrão testada, a indometacina.

A evolução do edema nos animais testados com as substâncias LYS-2, LYS-3, LYS-4 e LYS-5 sugere que a atividade antiinflamatória apresentada seja devida à inibição da enzima cicloxigenase, provavelmente de forma não-seletiva à COX-1.

A determinação da atividade antiinflamatória através do Método de Winter modificado levou a resultados diferentes daqueles observados na utilização do Método de Winter da forma clássica no tempo de experimentação realizado, provavelmente devido a diferenças entre os mecanismos de formação e reversão do edema, ainda não estabelecidos.

Adicionalmente podemos concluir que o planejamento realizado, utilizando a abordagem fisiológica e estratégias de modificação molecular e bioisosterismo foi satisfatório, tendo em vista que as substâncias planejadas e posteriormente

sintetizadas e testadas, alcançaram o alvo terapêutico demonstrando notada atividade antiinflamatória.

A fim de realizar a verificação da seletividade frente à COX-2 das substâncias da série LYS, sugere-se que, numa etapa a seguir, sejam realizados ensaios bioquímicos que determinem a razão entre as concentrações em que as enzimas COX-1 e COX-2 são inibidas por essas substâncias.

Tendo em vista a soma de informações citadas anteriormente, é possível verificar que a realização desse trabalho abriu um leque de possibilidades no que diz respeito a planejar e sintetizar tiazolidinas com potencial atividade antiinflamatória, revelando que esse é um caminho a ser seguido, onde tem-se moléculas potencialmente antiinflamatórias e que, devido a sua excelente reatividade química, podem ser efetivamente sintetizadas.

Como perspectivas deste trabalho pretende-se sintetizar uma nova série de compostos tiazolidínicos, utilizando-se diferentes substituintes contendo grupamentos *orto* metóxi e 1*H* indol na posição 5 do anel tiazolidínico, uma vez que essas substituições demonstraram excelente atividade antiinflamatória. Adicionalmente avaliar a atividade antiinflamatória e a seletividade frente à COX-2 e, em posse dos resultados, realizar estudos qualitativos e quantitativos de relação estrutura x atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J.F.C.; AZEVEDO, L.C.; GALDINO, S.L.; CHANTEGREL, J.; PITTA, I.R.; LUU-DUC, C. Synthèse et étude structurale des 5-arylidène thiazolidine-2,4-diones et 4-thio-imidazolidine-2-ones-3substituées. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 53, p. 209-214, 1995.

ARMAN, C.G.; BEGANY, A.J.; MILLER, L.M.; PLESS, H.H. Some details of inflammation caused by yeast and carrageenin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 150, n. 2, p. 328-334, 1965.

BARRECA, M.L.; CHIMIRRI, A.; DE LUCCA, L.; MONFORTE, A.M.; MONFORTE, P. Discovery of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 1793-1796, 2001.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artes Médicas. 2001. 243 p.

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova*, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2002.

BARREIRO, E.J. Pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. 1º Seminário Nacional sobre Complexo Industrial da Saúde. Rio de Janeiro, 2003.

BEN-BARUCH, A.; MICHIEL, D.F.; OPPENHEIM, J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 20, p. 11703-11706, 1995.

BLACK, J.W.; DUCAN, W.A.M.; DURANT, L.S.; EMMETT, J.C.; GANELLIN, C.R.; PARSONS, M.E. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature*, v. 236, p. 385, 1972.

BRASIL. Ministério da Saúde. Artrite reumatóide. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2003.

CAREY, F.A.; SUNDBERG, R.J. *Advanced Organic Chemistry – Part B*. 3ª ed. New York: Plenum Pub. Corp., 1990. 958 p.

CATANIA A.; ARNOLD, J.; MACALUSO, A.; HILTZ, M.E.; LIPTON, J.M. Inhibition of acute inflammation in the periphery by central action of salicylates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 88, p. 8544-8547, 1991.

CAVA, M.P.; LEVINSON, M.I. Thionation reactions of Lawesson's reagents. Tetrahedron, v. 22, p. 5061-5087, 1985.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, L.T.; EVANSON, N.K.; TORSNIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHANTEGREL, J.; ALBUQUERQUE, J.C.; GUARDA, V.L.; PERRISSIN, M.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; BRANDAO, S.S.; THOMASSON, P.; PITTA, I.R.; LUU-DUC, C. Synthèse et étude structurale de nouvelles 4-thioxothiazolidine-Zones substituées. Annales Pharmaceutiques Françaises, v. 60, p. 403-409, 2002.

CHIROLI, V.; BENEDINI, F.; ONGINI, E.; DEL SOLDATO, P. Nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drugs, the case of nitroderivates of aspirin. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 38, p. 441-446, 2003.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? Pharmacologic & Therapeutics, v. 68, n. 1, p. 35-85, 1995.

CLISSOLD, S.P.; HEEL, R.C. Topical minoxidil: a preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in alopecia areata and alopecia androgenetica. Drugs, v. 33, n. 2, p. 107-122, 1987.

COPE, A.C.; HOFMANN, C.M.; WYCKOFF, C.; HARDENBERGH, E. Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic esters. Journal of American Chemical Society, v. 63, p. 3452-3456, 1941.

COOPLAND, R.A.; WILLUAMS, J.M.; GIANNARAS, J.; NURNBERG, S.; COVINGTON, M.; PINTO, D.; PICK, S.; TRZASKOS, J.M. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, p. 11202-11206, 1994.

CURPHEY, T.J. Thionation with the Reagent Combination of Phosphorus Pentasulfide and Hexamethyldisiloxane. *Journal of Organic Chemistry*, v. 67, n. 18, p. 6461-6473, 2002.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, p. 109-126, 2001.

DE LIMA, J.G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. *Revista da Universidade Rural Série Ciências Exatas e da Terra*, v. 18/20, n. 1/2, p. 1-8, 1998.

DE LUCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. *Manual Para Técnicas em Bioterismo*, 2ª ed. São Paulo: Winnes Graph., 1996. 259 p.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DU, L.; CHEN, M.; SANCHEZ, C.; SHEN, B. An oxidation domain in the BImIII non-ribosomal peptide synthase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus*. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters*, v. 189, p. 171-175, 2000.

DUBE, P.H.; REVELL, A.P.; CHAPLIN, D.D.; LORENZ, R.G.; MILLER, V.L. A role for IL- α in inducing pathologic inflammation during bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 10880-10885, 2001.

DUCHARME, Y.; GAUTHIER, J.Y; PRASIT, P.; LEBLANC, Y.; ZHAONIN, W.; LEGER, S.; THERIEN, M. Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors. *United States Patent*, n. 5474995, 1995.

FALCÃO, E.P.S.; *Novas pirimidinas: Síntese e avaliação de suas atividades farmacológicas*. 2003. 248 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochemical Pharmacology*, v. 62, p. 1433-1438, 2001.

FLEMING, A. Penicillin its practical application. London: Butterworth & Co. 1946. p 1-45.

FREISEN, R.W.; DUBE, D.; FORTIN, R.; FRENETTE, R.; PRESCOTT, S.; CROMLISH, W.; GRIEG, G.M.; KARGMAN, S.; WONG, E.; CHI, C.C.; GORDON, R.; REIDENEAU, D. Novel 1,2-diarylcyclobutenes: selective and orally active COX-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 6, p. 2677, 1996.

GIERSE, J.K.; McDONALD, J.J.; HAUSER, S.D.; RANGWALA, S.H.; KOBOLDT, C.M.; SEIBERT, K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 25, p. 15810-15814, 1996.

GILMAN, G.A.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição, Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil., 2002. 1436 p.

GOES, A.J.S.; DE LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; LUU-DUC, C.; Synthèse et activité antiflogique de chlorobenzyl benzilidene thiazolidinedione et imadozilidinediones substituees. *Annals Pharmaceutiques Françaises*, v. 49, n. 2, p. 92-98, 1991.

GOTO, Y.; WATANABE, N.; KOGAWA, N.; TSUCHIYA, M.; TAKAHASHI, O.; UCHI, H.; FURUE, M.; HAYASHI, H. CX-659S: a novel diaminouracilderivate that has antioxidative and acute anti-inflammatory activities. *European Journal of Pharmacology*, v. 438, p. 189-196, 2002.

GUNIZ, K.S.; ORUÇ, E.E.; ROLLAS, S.; SAHIN, F.; OZBEK, A. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, p. 197-206, 2002.

GUPTA, M.B.; TANGRI, K.K.; GUPTA, G. P.; BHARGAVA, K.P. A comparasion of the experimental methods for screening of anti-inflammatory activity. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 1, n. 4, p. 24-31, 1969.

HABIB, N.S.; RIDA, S.M.; BADAWAY, E.A.M.; FAHAMY, H.T.Y.; GHOZLAN, H.A. Synthesis and antimicrobial activity of rhodanine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 32, p. 759-762, 1997.

HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. On the mechanism of biosynthesis of prostaglandins E_2 e F_1 *Journal of Biological Chemistry*, v. 242, n. 22, p. 5336-5343, 1967.

HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 70, p. 899-903, 1973. In: MARNETT, L.; ROWLINSON, S.W.; GOODWIN, D.C.; KALGUTKAR, A.S.;

HAWKEY, C.J. COX-2 Inhibitors. *The Lancet*, v. 353, p. 307-314, 1999.

HAWKEY, C.J.; LAINE, L.; SIMON, T.; QUAN, H.; SHINGO, S.; EVANS, J. Incidence of gastroduodenal ulcers in patients with rheumatoid arthritis after 12 weeks of rofecoxib, naproxen, or placebo: multicentre, randomised, double blind study. *Gut*, v. 52, p. 820-826, 2003.

HORISHNY, V.J.; VLADZMIRSKA, O.V.; ZIMENKOVSKY, B.S.; LESIK, R.B.; ROMAN, O.M.; NAKIEGAYEV, I.O. Search of new anti-inflammatory drugs among the derivatives of thiazolidine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 4, Supplement.1, S107, 1996.

KALGUTKAR, A.; CREWS, B.; ROWLINSON, S.; GERNER, C.; SEIBERT, K.; MARNETT, L. Aspirin-like Molecules that Covalently Inactivate Cyclooxygenase-2. *Science*, v. 280, p. 1268-1270, 1998.

KALGUTKAR, A.S.; CREWS, B.C.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, A .B.; KOZAK, K.R.; REMMEL, R. P.; MARNETT, L.J. Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of non-steroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 2, p. 925-930, 2000.

KATZUNG, B.G. *Basical and clinical pharmacology*. 8^a ed. New York: Mc Graw-Hill/Appleton & Lang, 2000. 1217 p.

KHANNA, I.K.; WEIER, R.M.; YU, Y.; COLLINS, P.W.; MIYASHIRO, J.M.; KOBOLDT, C.M.; VEENHUIZEN, A.W.; CURRIE, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON,

P.C. 1,2-Diarylpyrroles as potent and selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, n. 11, p. 1619-1633, 1997.

KIMMEL, C.A.; BUELKE, S.J. (editores) *Development Toxicology*. 2^a ed. New York: Raven, 1994. 479 p.

KNITTEL, J.; ZAVOD, R. Drug design and relationship of functional groups to pharmacologic activity. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. Cap.2, p.59-63.

KOCHKANYAN, R.O.; ISRAELYAN, Y.A.; ZARITOVASKII, A.N. New method for the synthesis of azolidines. *Chemistry of heterocyclic compounds*, v. 1, p. 70-72, 1978.

KOPPAKA, V.R.; BHAKUNI, R.S.; HANUMAN, J.B.; DAVIES, R.; JOHNSON, J. Taxanes from the bark of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry*, v. 41, n. 3, p. 863-866, 1996.

KOPPAL, T. (editor). *Drug Discovery and development: Glossary*. Disponível em <<http://www.dddmag.com>>. Acesso em: 23 set. 2003.

LEBLANC, Y.; GAUTHIER, J.Y.; ETHIER, D.; GUAY, J.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D.; TAGARI, P.; VICKERS, P.; WONG, E.; PRASIT, P. Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylthiophenes as selective COX-2 and COX-1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 5, p. 2123, 1995.

LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNÉ, J.M. Recent advances in inducible cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 1041-1062, 2000.

LEVAL, X.; DELARGE, J.; DEVEL, P.; NEVEN, P.; MICHAUX, C.; MASEREEL, B.; PIROTTE, B.; DAVID, J.L.; HEROTIN, Y.; DOGNÉ, J.M. Evaluation of classical NSAIDs and COX-2 selective inhibitors on purified ovine enzymes and human whole blood. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, v. 64, p. 211-216, 2001.

LESYK, R.B.; VLADZMIRSKA, O.V.; ZIMENKOVSKY, B.S.; HORISHNY, V.J.; DEMESCHUK, I.L. Synthesis of biologically active esters and amides of thiazolidine-3-carboxylic acids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 4, Supplement 1, S107, 1996.

MAGALHÃES, L.R. Síntese, elucidação estrutural e atividade biológica de imidazolidinas e tiazolidinas substituídas. 2003. 176 p. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

MANNANIONI, P.P.; DI BELLO, M.G.; MASINI, E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research*, v. 46, p. 4-18, 1997.

MARNETT, L.; ROWLINSON, S.W.; GOODWIN, D.C.; KALGUTKAR, A.S.; LANZO, C.A. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 e COX-2. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 33, p. 22903-22906, 1999.

MATSUO, M.; TSUJI, K.; KONISHI, N.; NAKAMURA, K. Pyrazole derivatives, processes for preparation thereof and pharmaceutical composition comprising the same. European Patent, n. 418845, 1991.

McGILL, K.A.; BUSSE, W.W. Zileuton. *The Lancet*, v. 348, p. 519-524, 1996.

MERCK SHARP & DHOME. Alívio da dor. Disponível em: <<http://www.msd-brazil.com>>. Acesso em: 20 abr. 2003.

MISSABACH, M.; JAGHER, B.; SIGG, I.; NAYERI, S.; CARLBERG, C.; WIESENBERG, I. Thiazolidines diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor with potent antiarthritic activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 23, p. 13515-13522, 1996.

MURATA, M.; FUJITANI, B.; MIZUT, H. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of a new series of 5-[[2-(-carboxyalkoxy)aryl]methylene]-4-oxo-2-thioxothiazolidine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 34, p. 1061-1070, 1999.

MYCEY, M.J.; HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. Lippincott's illustrated reviews: pharmacology special millennium update. 2ª ed. Lippincott Williams & Wilkins Publisher. 2000. p. 401-469.

NEAMATI, N.; BARCHI, J.J.J. New paradigms in drug design and discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 2, p. 3, 2002.

NISHIKAKU, F.; AONO, S.; KOGA, Y. Protective effects of D-penicillamine and a thiazole derivate, SM- 8849, on pristane-induced arthritis in mice. *Internacional Journal of Immunopharmacology*, v. 16, p. 91-100, 1994.

NOMURA, M.; KINOSHITA, S.; SATOH, H.; MAEDA, T.; MURAKAMI, K.; TSUNODA, M.; MIYACHI, H.; AWANO, K. (3-Substituted benzyl) thiazolidine-2,4-diones as structurally new antihyperglycemic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 9, p. 533-538, 1999.

OMAR, A.M.E.; SALAMA, H.M.; ESHBA, N.H. Novel thiazolidine-2,4-dione-4-thiosemicarbazone and 4-[(3,4-diaryl-3H-thiazol-2-yl)azo]thiazolidin-2-one derivatives: synthesis and evaluation for antimicrobial and anticancer proprieties. *Il fármaco*, v. 40, p. 49-57, 1985.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. 130^a Sessão do comitê executivo: Saúde e envelhecimento. Washington, USA, 2002.

OTTERNESS, I.G.; BLIVEN, M.L. Laboratory models for testing nonsteroidal anti-inflammatory drugs, pp11-252, New York: Wiley, 1985. In: ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E₂ production. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 283, n. 2, p. 1069-1075, 1997.

PALASKA, E.; SAHIN, G.; KELICEN, P; DURLE, N. T.; ALTINOK, G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *Il Farmaco*, v. 57, p. 101-107, 2003.

PAPAKONSTANTINOU, G.S.; POULI, N.; MARAKOS P.; CHYTIROGLOU-LADAS A. Synthesis antimicrobial and antifungal activity of some new 3-substituted derivatives of 4-(2,4-dichlorophenyl)-5-adamantyl-1H-1,2,4-triazole. *Il Farmaco*, v. 57, p. 973-977, 2002.

PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenase: two enzymes in the spotlight. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, p. 153-159, 2003.

PEREIRA, D.T.M. Síntese, caracterização estrutural a atividade antiinflamatória de derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos. 2003.130p Dissertação

(Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

PEREIRA, E.C.; NASCIMENTO, S.C.; LIMA, R.C.; SILVA, N.H.; OLIVEIRA, A.F.M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Analysis of Ursinea Fasciata crude extracts in the anti-neoplastic activity. Tokai Journal Experimental Clinical Medics, v. 19. n. 1,2, p. 47-52, 1994.

PICOT, D.; LOLL, P.J.; GARAVITO, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. Nature, v. 367, p. 243-249, 1994.

RATTI, E.; TRIST, D. Continuing evolution of the drug discovery process in the pharmaceutical industry. Pure and Applied Chemistry, v. 73, p. 67-75, 2001.

RIETZ, D.B.; LI, J.J.; NORTON, M.B.; REINHARD, E.J.; COLLINS, J.T.; ANDERSON, G.D.; GREGORY, S.A.; KOBOLDT, C.M.; PERKINS, W.E.; SEIBERT, K. Selective cyclooxygenase inhibitors: novel 1,2-diaryl cyclopentenones are potent and orally active COX-2 inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry, v. 37, n. 23, p. 3878-3881, 1994.

ROBBINS, L.S. Fundamentos de Robbins: Patologia estrutural e funcional. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1251p.

RODRIGUES, C.R.; VELOSO, M.P.; VERLI, H.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; BARREIRO, E.J. Selective PGHS-2 inhibitors: a rational approach for treatment of the inflammation. European Journal of Current Medicinal Chemistry, v. 9, p. 593-516, 2002.

ROWLINSON, S.W.; KIEFER, J.R.; PRUSAKIEWICZ, J.; PLAWLITZ, J.; KOZAK, K. R.; KALGUTKAR, A. S.; SATLLING, W. C.; KURUMBAIL, R. G.; MARNETT, L.J. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitors involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. The Journal of Biological Chemistry, in press, 2003.

SALA, A.; RECIO, C.; SCHINELLA, G.R.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; RÍOS, J-L. A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from helichrysum italicum. European Journal of Pharmacology, v. 460, p. 219-226, 2003.

SAMUELSSON, B. The leukotrienes: a new group of biologically active compounds including SRS-A. Trends in Pharmacological Sciences, v. 1, n. 2, p. 227-230, 1980.

SEDA H., SEDA A .C. O que é artrose? Sociedade Brasileira de Reumatologia Disponível em <<http://www.reumatologia.com.br>>. Acesso em: 30 out. 2003.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SHELVIN, H.H. Animal pharmacology of nitroglycerin. Life Science, v. 30, p. 1233-1246, 1982.

SILVA, T.G.; BARBOSA, F.S.V.; BRANDAO, S.S.F.; LIMA, MC.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; BARBE, J. Synthesis and structural elucidation of new benzylidene imidazolidines and acridinylidene thiazolidines. Heterocyclic Communications, v. 7, p. 523-528, 2001.

SILVERMAN, R.B. The organic chemistry of drug design and drug action. San Diego: Academic Press, 1992. 422 p.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. 460 p.

SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMAD, J.; SWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 95, n. 22, p. 13313-13318, 1998.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DeWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide synthases (cyclooxygenases) –1 and –2. The Journal of Biological Chemistry, v. 271, n. 52, p. 33157-33160, 1996.

SOLOMON, D.H.; GLYAN, R.J.; BOHN, R.; LEVIN, R.; AVRON, J. The hidden cost of nonselective non steroidal antiinflammatory drugs in older patients. The Journal of Rheumatology, v. 30, n. 4, p. 792-798, 2003.

SRENG, L. Seducin, male sex pherormone of the cockroach *Nauphoeta cinerea*: isolation, identification, and bioassay. *Journal of Chemical Ecology*, v. 16, p. 2899-2991, 1990.

SUDO, K.; MATSUMOTO, Y.; MATSUSHIMA, M. Novel hepatitis C virus protease inhibitors: thiazolidine derivates. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 238, p. 643-647, 1997.

TALLEY, J.J.; BROWN, D.L.; NAGARJAN, S.; CARTER, J.S.; WEIER, R.M.; STEALEY, M.A.; COLLINS, P;W.; SEIBERT, K. PCT Int. Appl. WO 96 03392, 1996. In: LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNÉ, J.M. Recent advances in inducible cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 1041-1062, 2000.

THOMAS, G. *Química Medicinal - Uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2003, 568 p.

UNANGST, P.C.; CONNOR, D.T.; WIACZESLAW, C.A.;RODERICK, S.J.; KOSTLAN, C.R.; SIRCAR, J.C.; CLIFFORD, W.D.; SCHERIER, D.J.; DYER, R.D. Synthesis and biological evaluation of 5-[[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]methylene]oxazoles, -thiazoles, and -imidazoles: novel dual 5-lypooxygenase and cyclooxygenase inhibitors with antiinflammatory activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, p. 322-328, 1994.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. National Institute of Arthites and muskulo eskeletal and skin diseases. Disponível em <<http://www.niams.nih.gov>>. Acesso em: 02 nov. 2003.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases1 and 2. *Annual Review in Pharmacologic Toxicology*, v. 38, p. 97-120, 1998.

VIGORITA, M. G.; OTTANÁ, R.; MONFORTE, F; MACCARI, R.; MONFORTE, M. T.; TROVATO, A.; TRAVIANO, M.F.; MICELI, N.; DE LUCA, G.; ALCARO, S.; ORTUSO, F. Chiral 3,3'-(1,2-EthanediyI)-bis[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-thiazolidinones] with anti-inflammatory activity. Part 11: Evaluation of COX-2 selectivity and modelling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 6, p. 999-1006, 2003.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as na assay for antiinflammatory drugs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 111,p. 544-547, 1962.

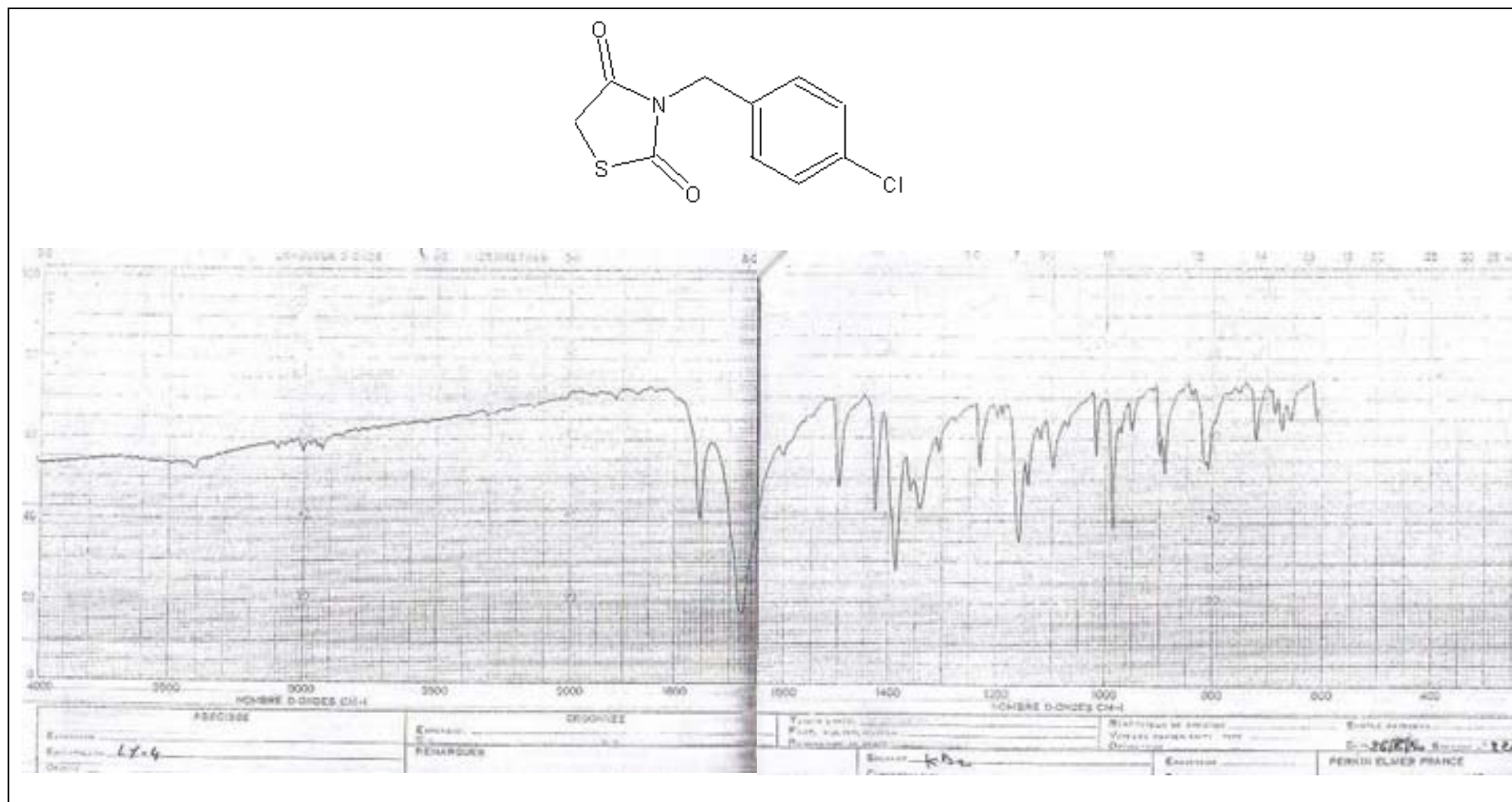
WOODS, K.W. ; McCROSKEY, R. W.; MICHAELIDES, M.R.; WADA, C.K.; HULKOWER, K.I.; BELL, R.L. Thiazole analogues of the NSAID indomethacin as selective COX-2 inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 11, p. 1325-1328, 2001.

XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 88, p. 2692-2696, 1991.

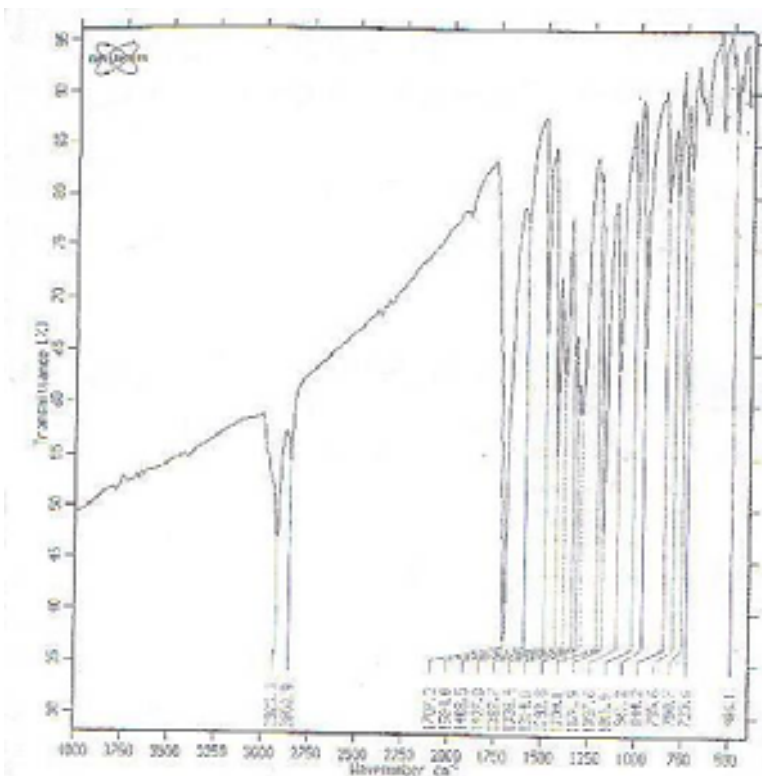
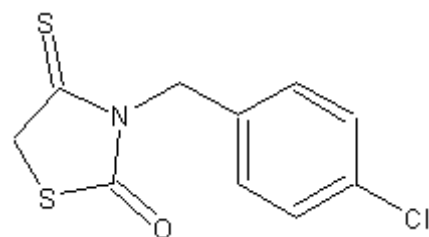
ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and protaglandina E₂ production. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 283, n. 2, p. 1069-1075, 1997.

A N E X O S

9 ANEXOS



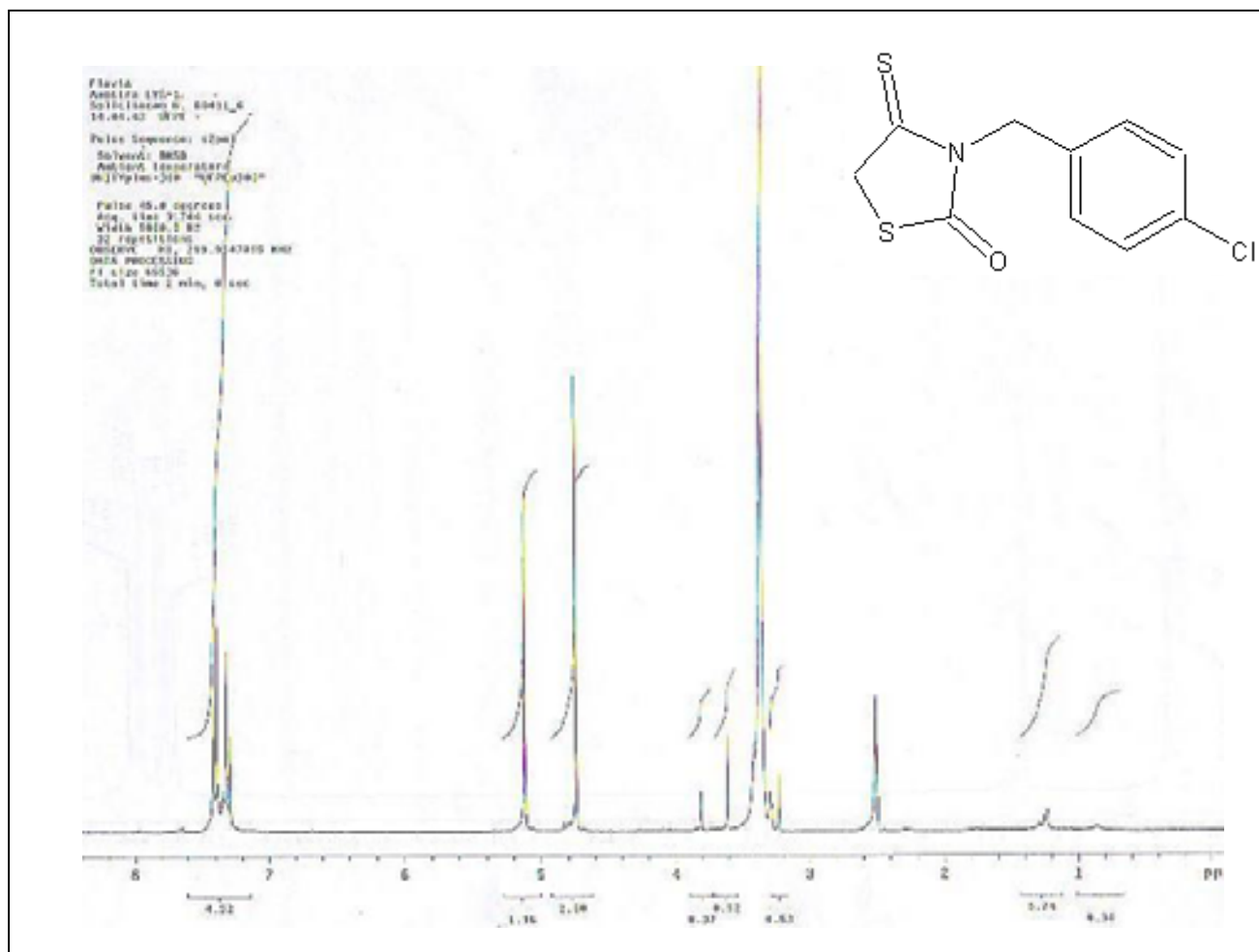
Anexo 1: Espectro no infravermelho da substância 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona, realizada em pastilha de KBr



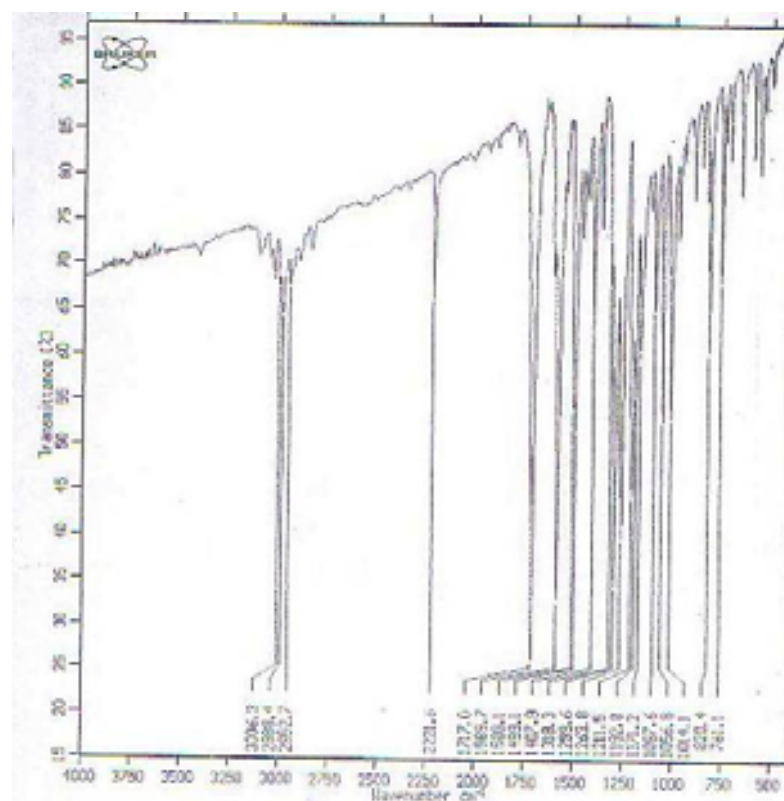
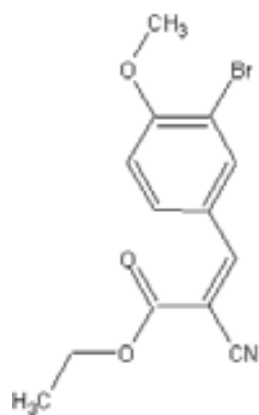
SPECTRUM: 6041.4
DATE: 11/4/2003
TIME: 11:26:21

SAMPLE: LIS-1 - Flaxia (Suely Galvão)
TECHNIQUE: Pastilha de KBr
USER: Elieir

Anexo 3: Espectro no infravermelho da substância 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, realizada em pastilha de KBr



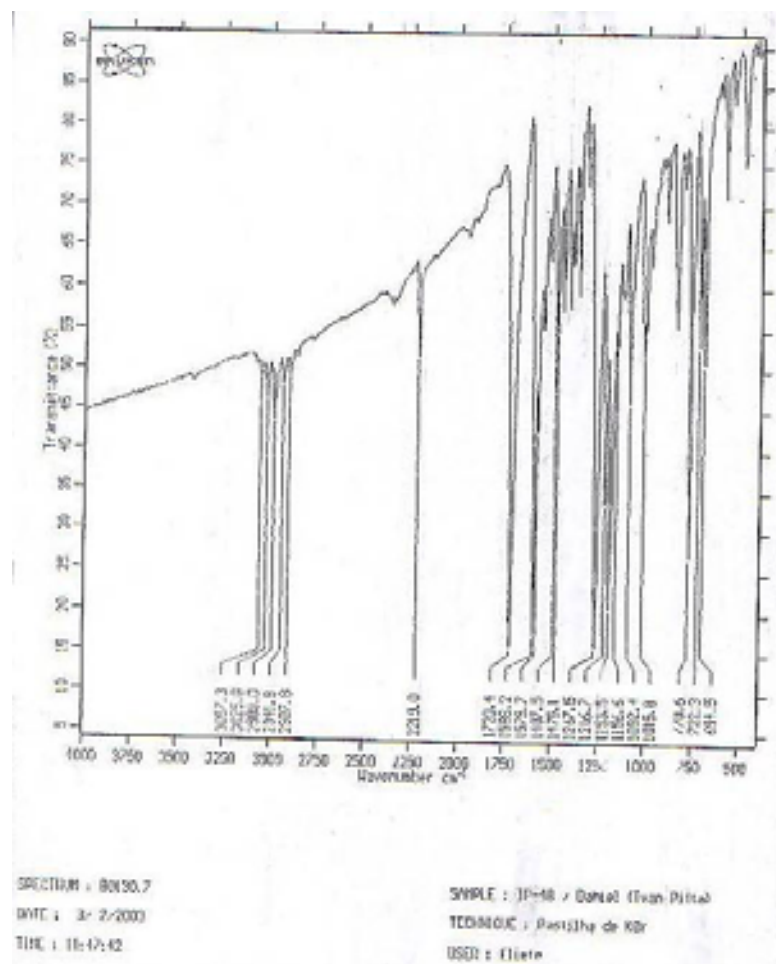
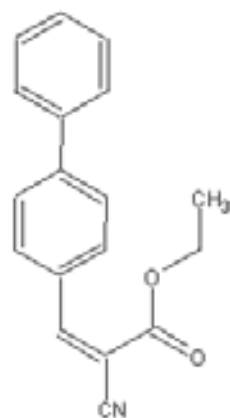
Anexo 4: Espectro de RMN ^1H da substância 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona



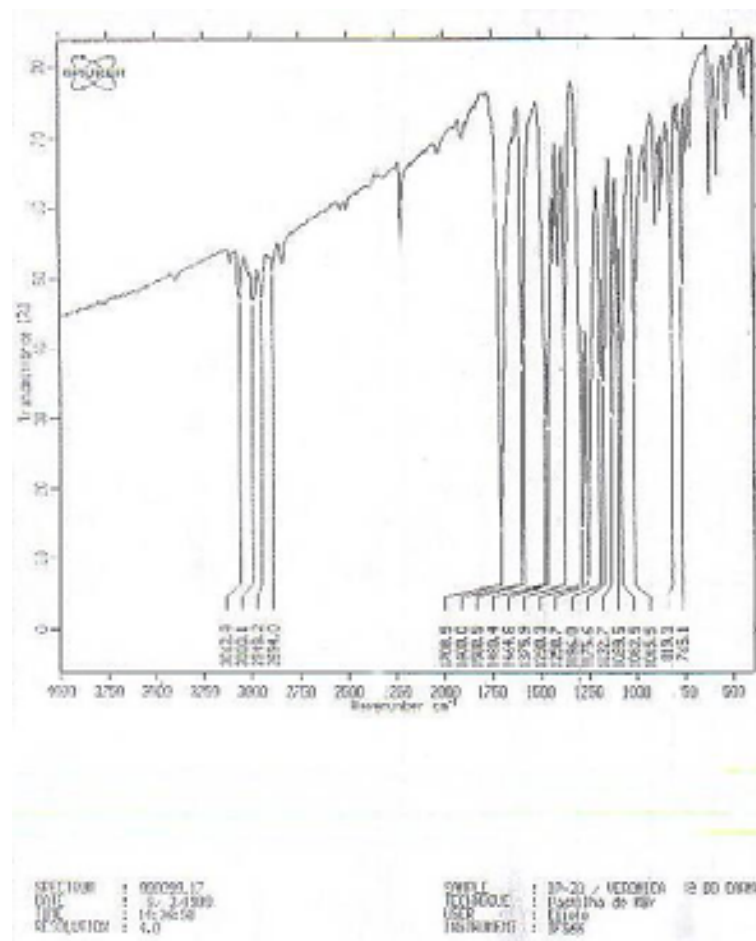
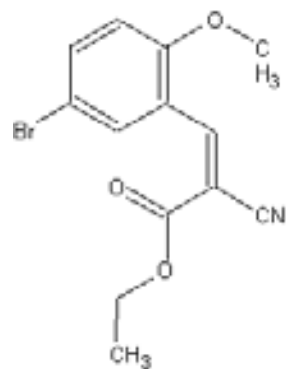
SPECTRUM : 80030.6
DATE : 3- 2-2009
TIME : 11:42:52

SAMPLE : IP-47 / Daniel (Van Pista)
TECHNIQUE : Pastilha de KBr
USER : Eliete

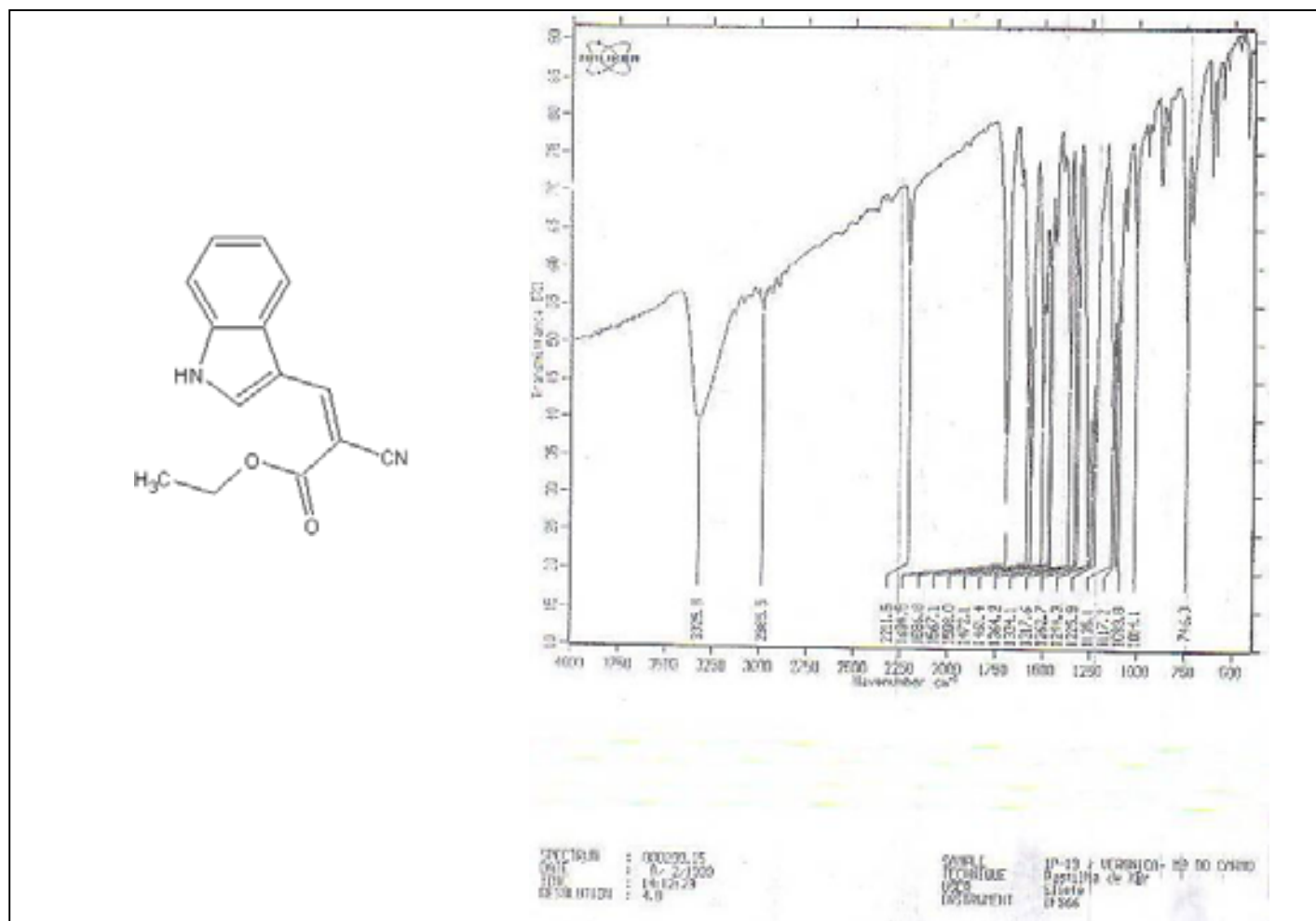
Anexo 5: Espectro no infravermelho da substância IP-47, realizado em pastilha de KBr



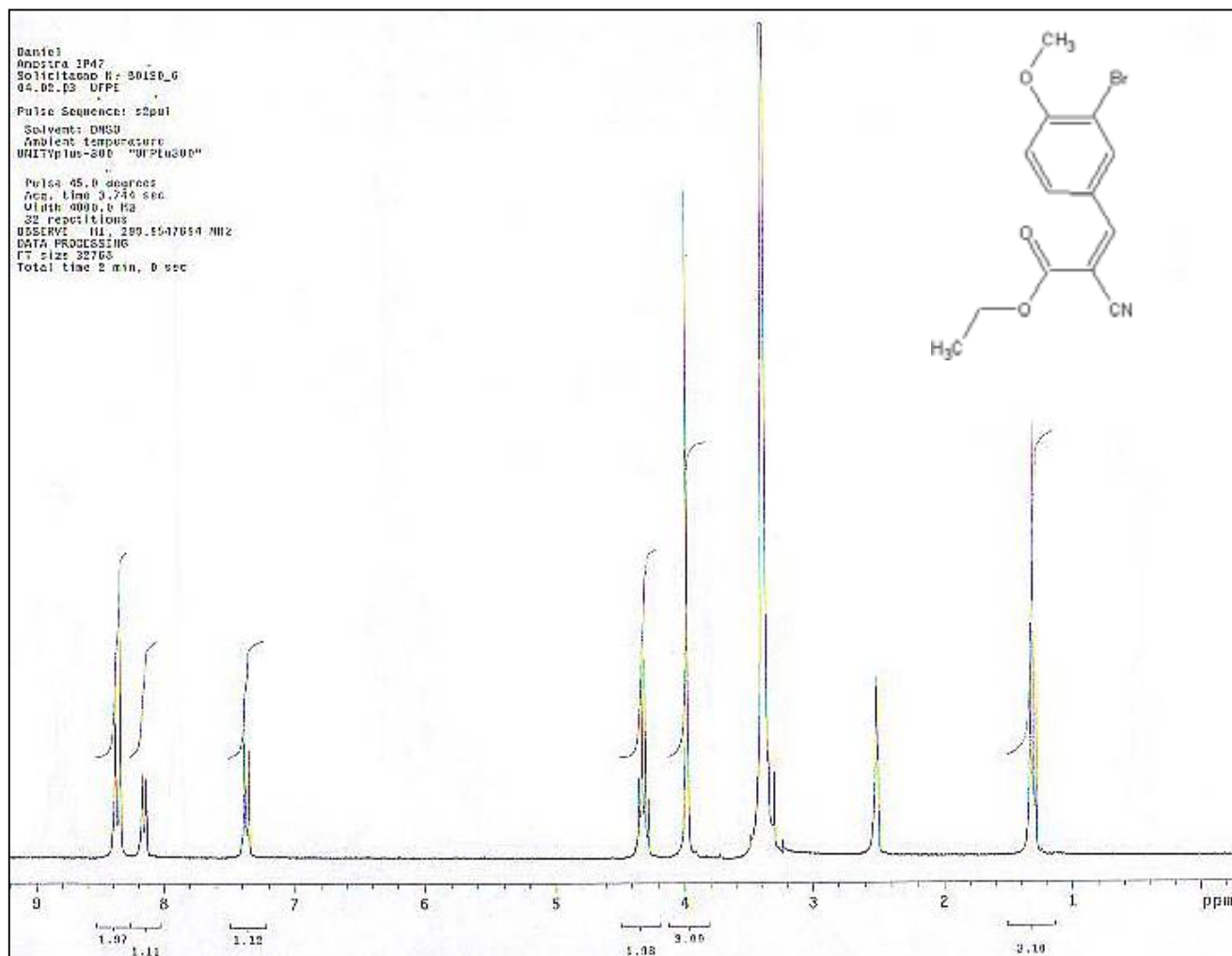
Anexo 6: Espectro no infravermelho da substância IP-48, realizado em pastilha de KBr



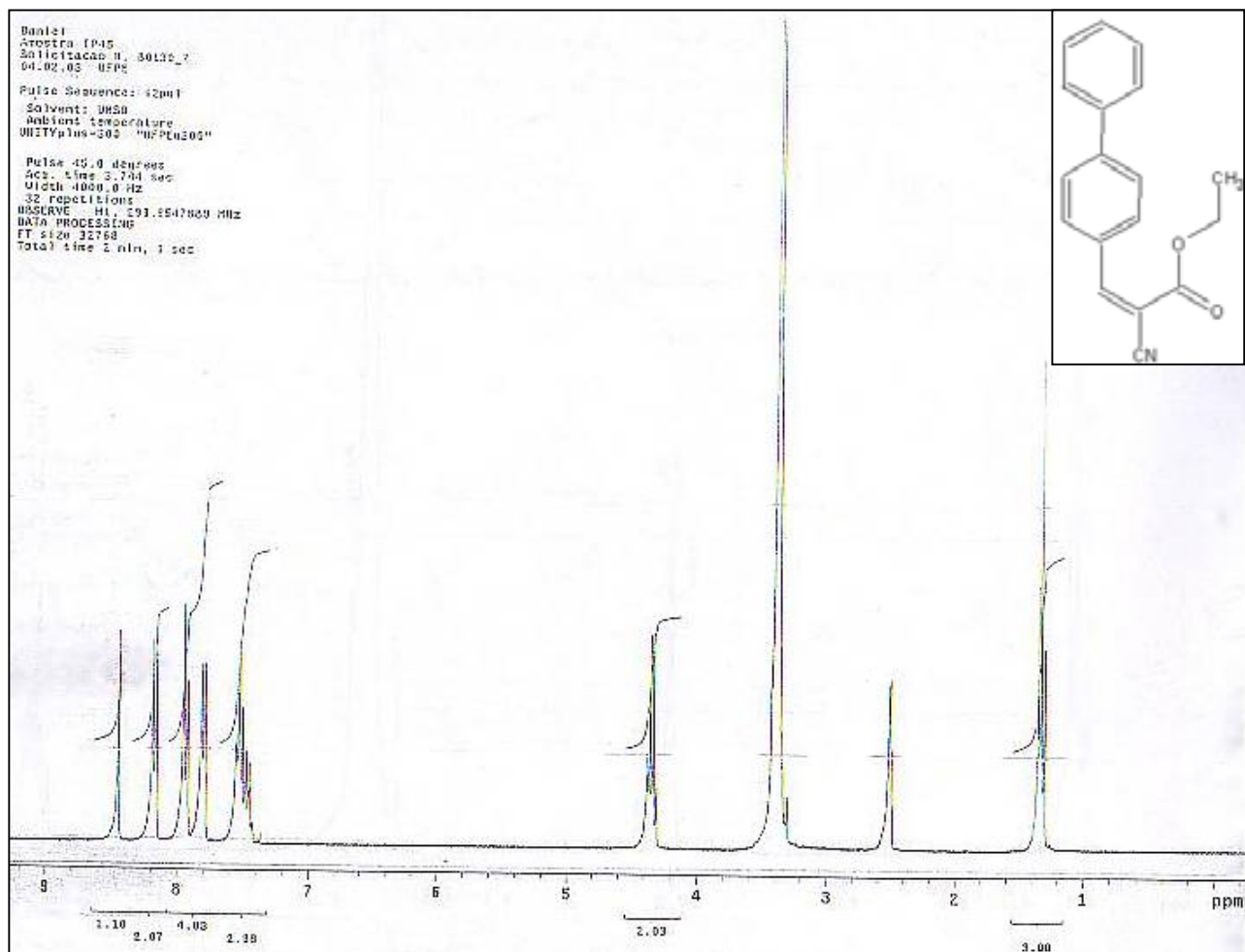
Anexo 7: Espectro no infravermelho da substância IP-23, realizada em pastilha de KBr



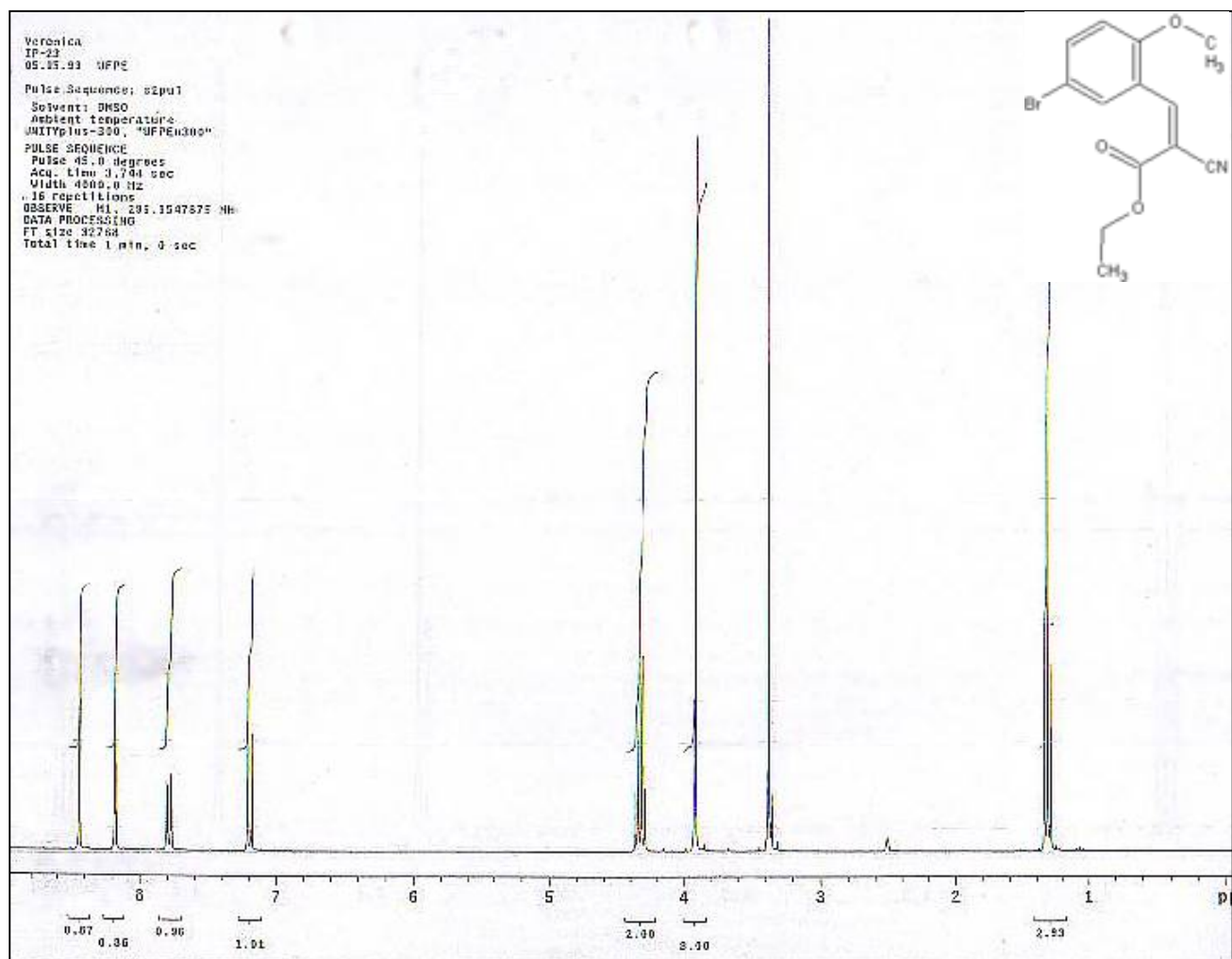
Anexo 8: Espectro no infravermelho da substância IP-19, realizado em pastilha de KBr



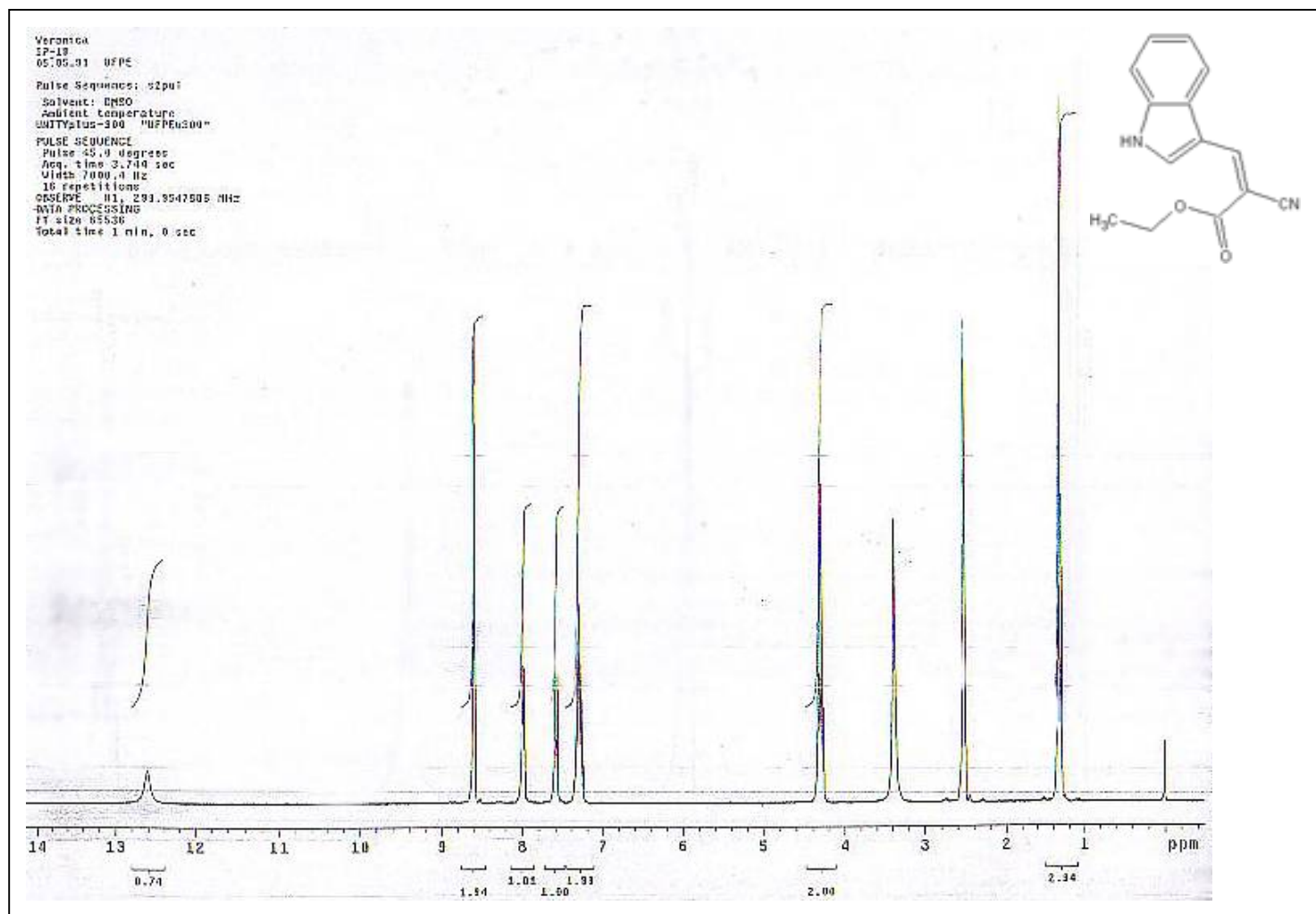
Anexo 9: Espectro de RMN ¹H da substância IP- 47



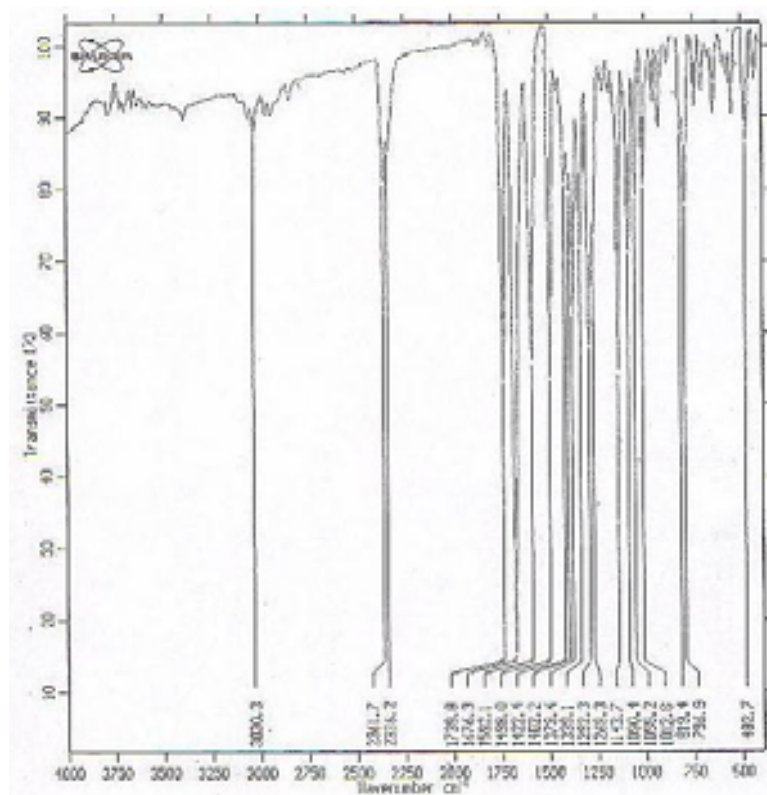
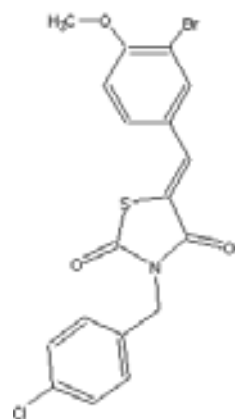
Anexo 10: Espectro de RMN ¹H da substância IP-48



Anexo 11: Espectro de RMN ^1H da substância IP-23



Anexo 12: Espectro de RMN ^1H da substância IP-19



SPECTRUM : 80011.31

DATE : 13/ 3/2003

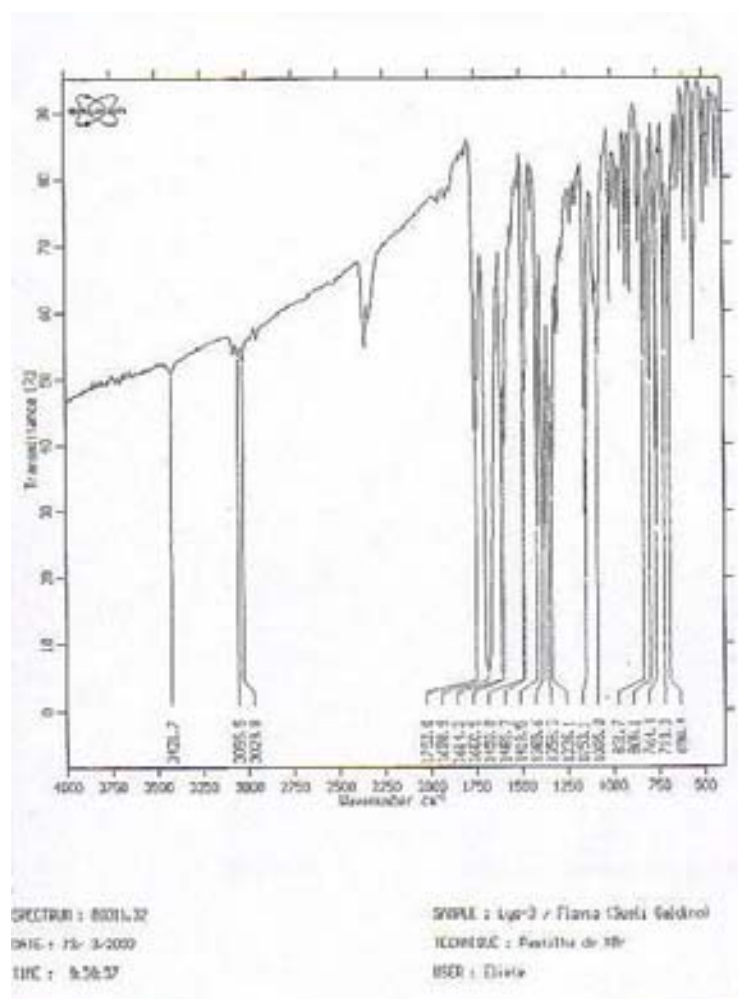
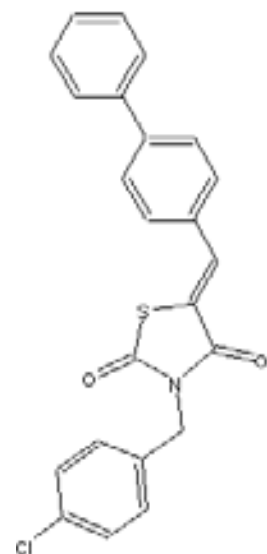
TIME : 9:28:18

SAMPLE : Lys-2 / Flavia (Suelli Galdino)

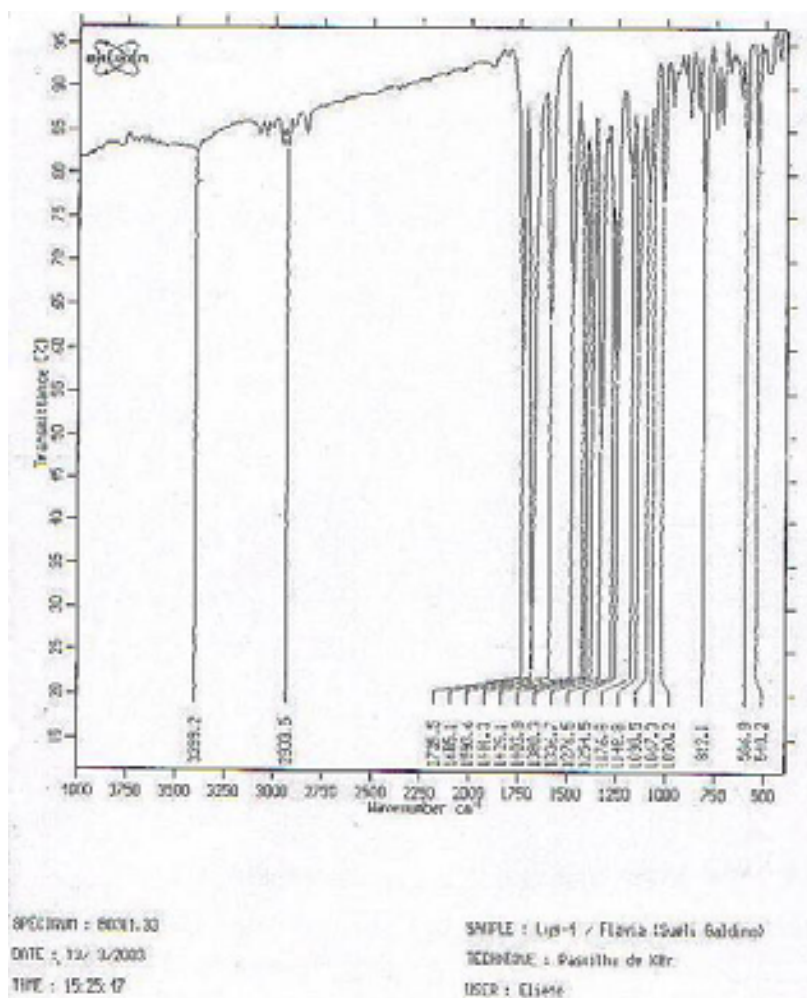
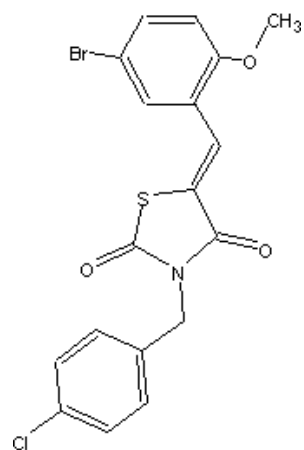
TECHNIQUE : Pastilha de KBr

USER : Eliene

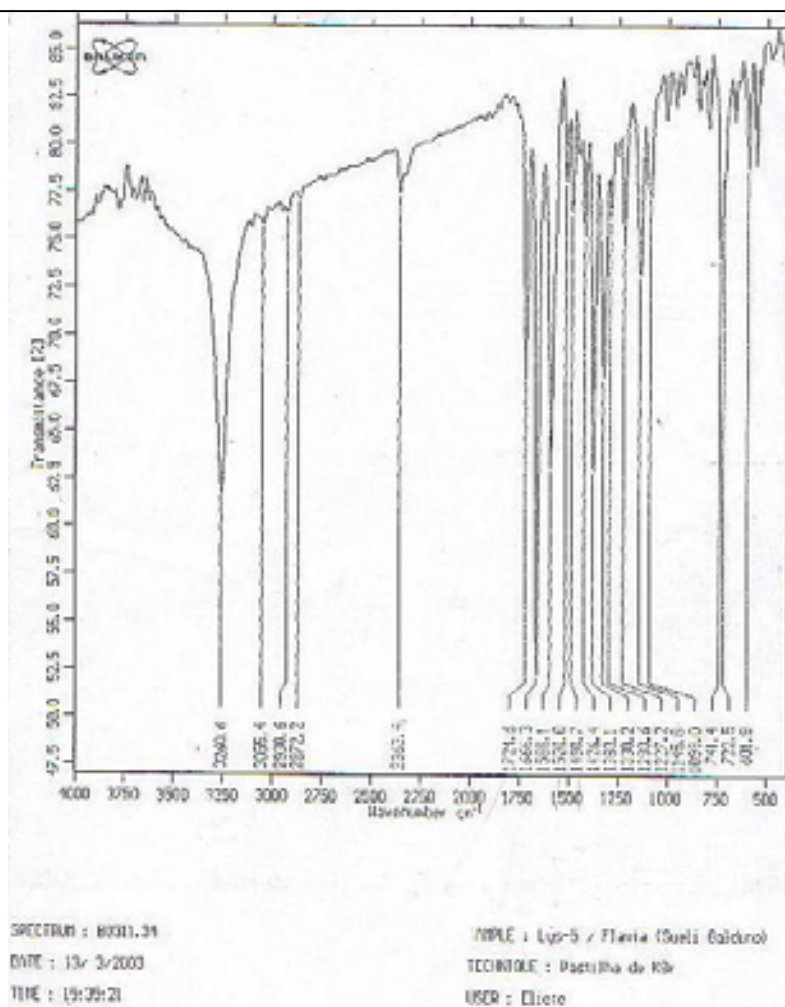
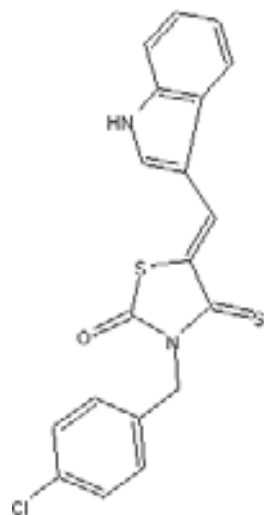
Anexo 13: Espectro no infravermelho da substância LYS-2, realizada em pastilha de KBr



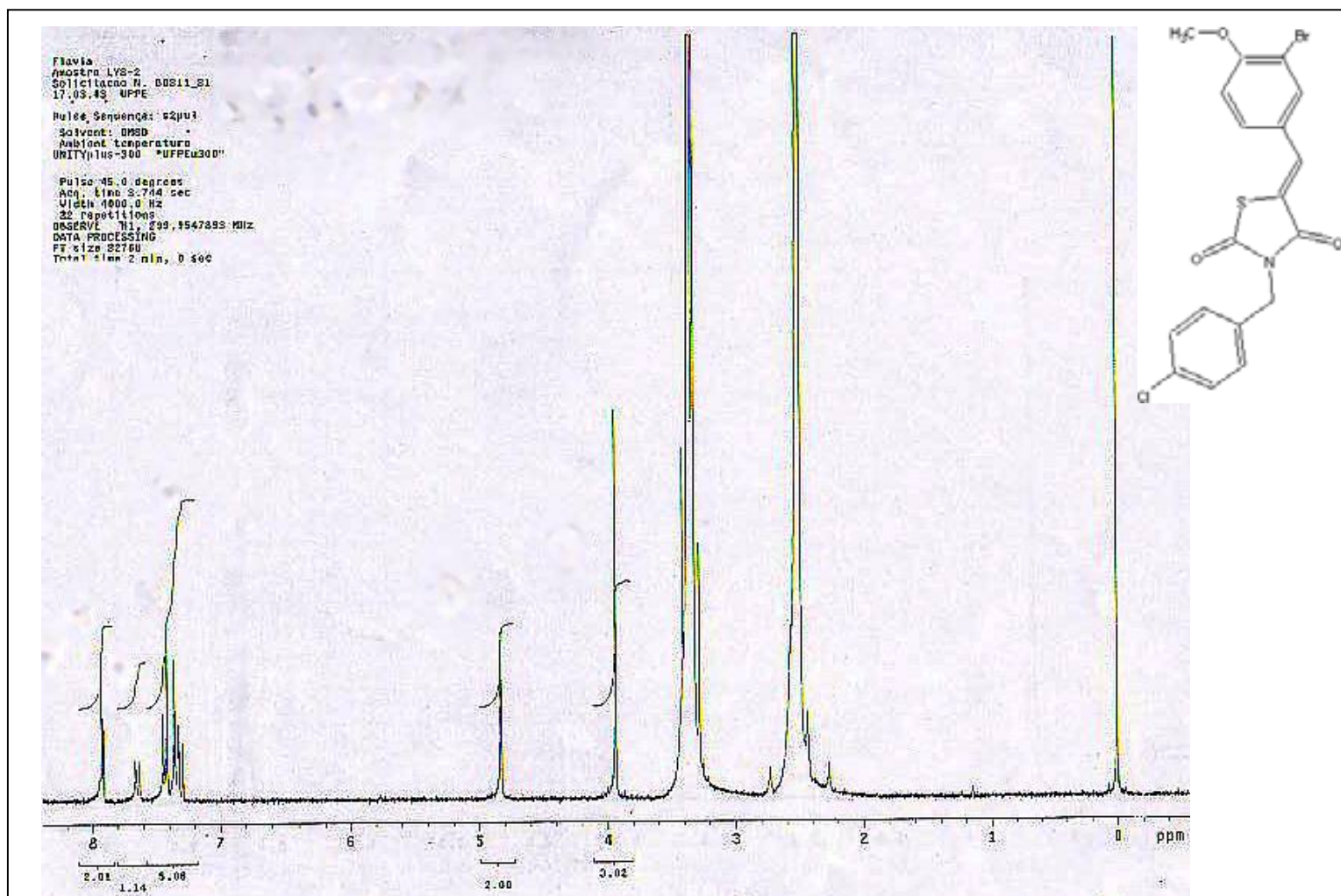
Anexo 14: Espectro no infravermelho da substância LYS-3, realizado em pastilha de KBr



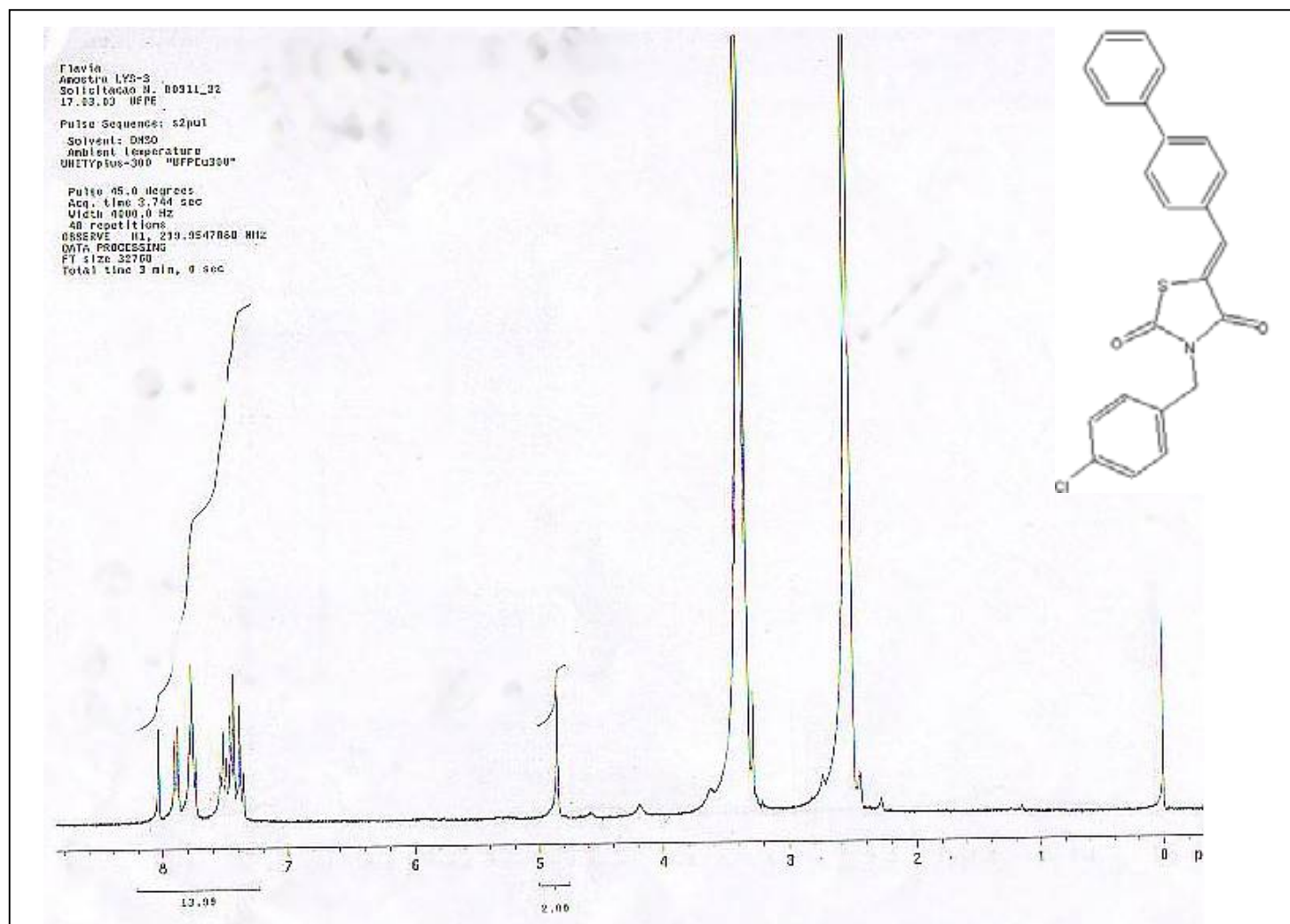
Anexo 15: Espectro no infravermelho da substância LYS-4, realizado em pastilha de KBr



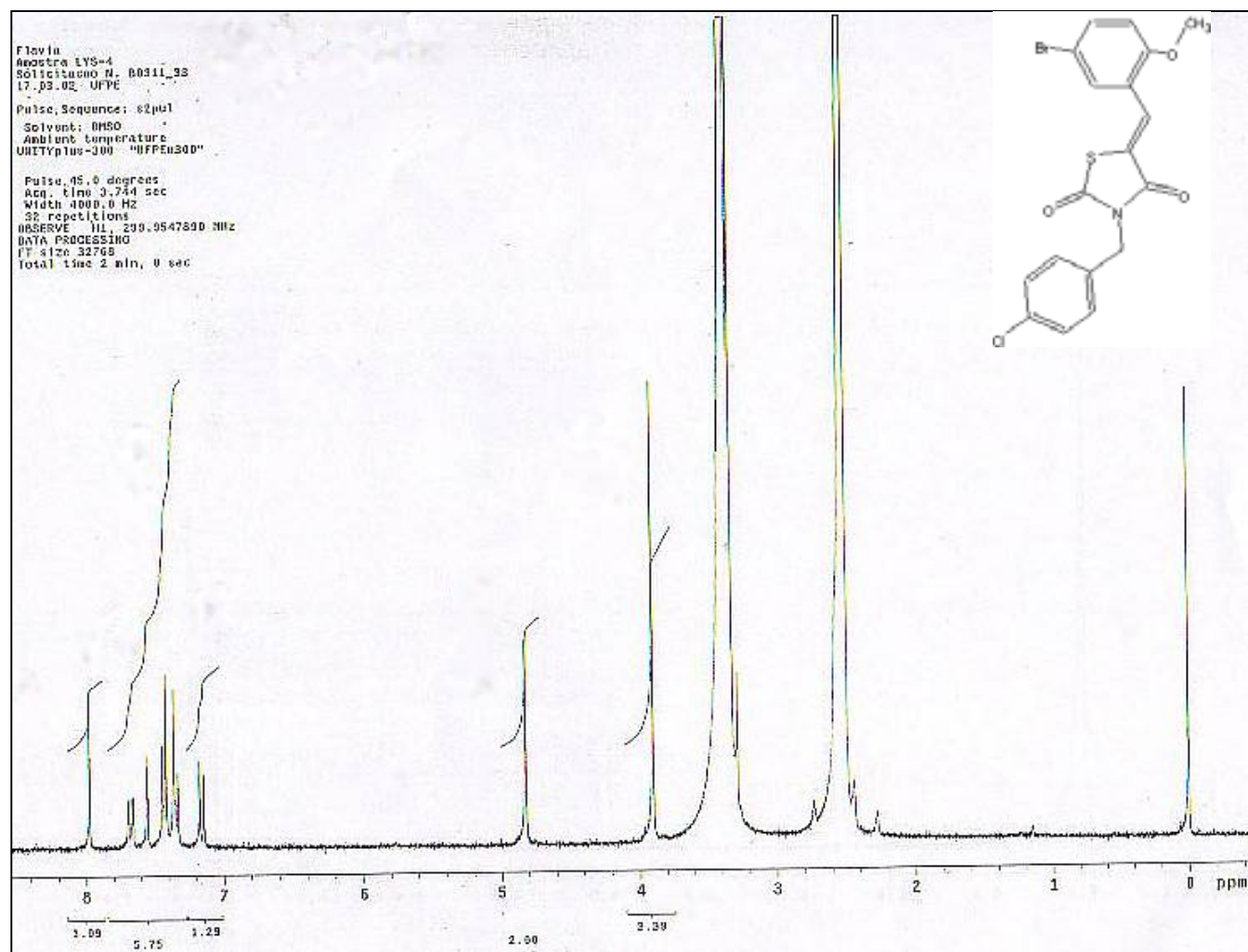
Anexo 16: Espectro no infravermelho da substância LYS-5, realizado em pastilha de KBr



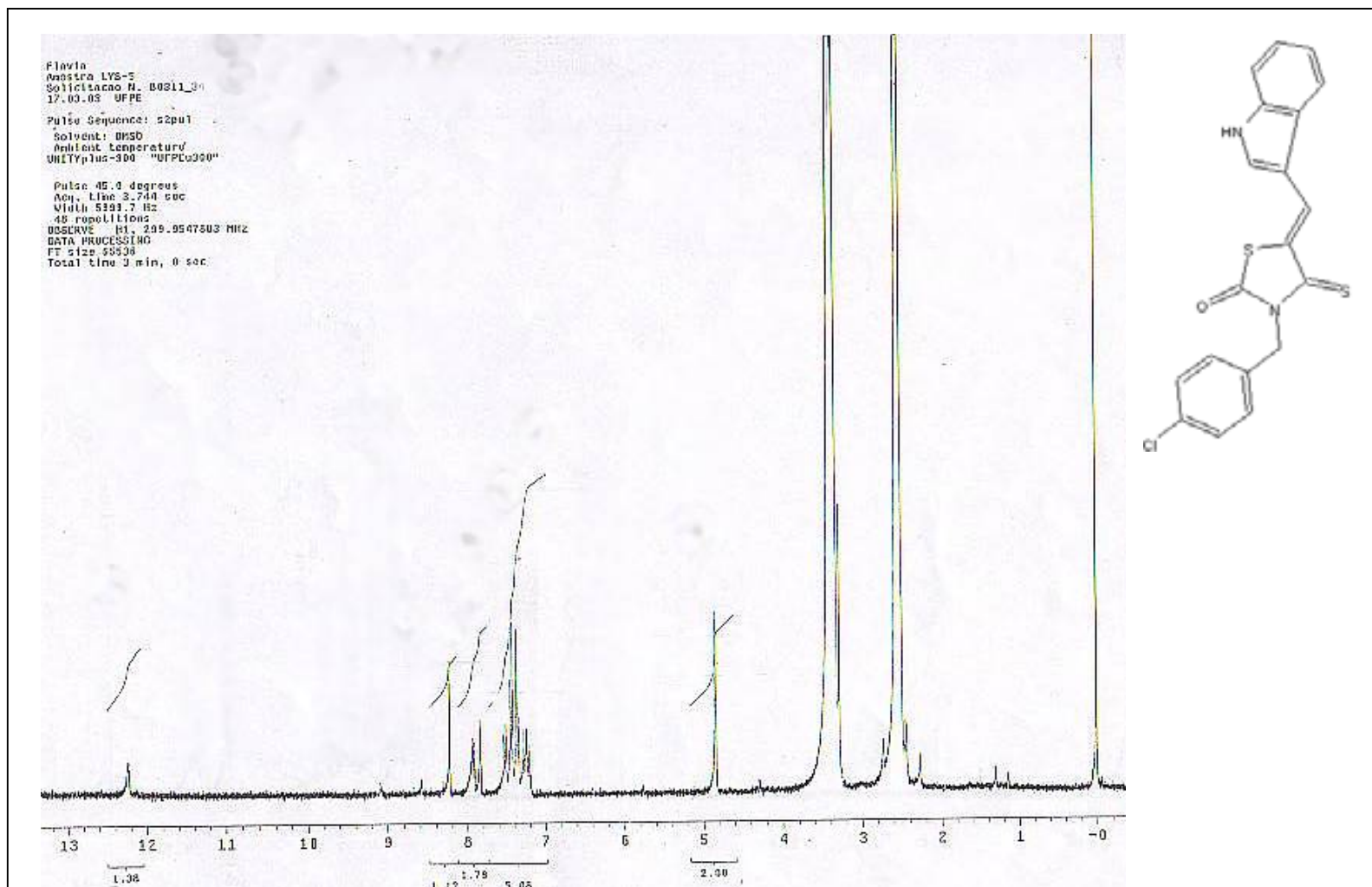
Anexo 17: Espectro de RMN ^1H da substância LYS-2



Anexo 18: Espectro de RMN ^1H da substância LYS-3



Anexo 19: Espectro de RMN ^1H da substância LYS-4



Anexo 20: Espectro de RMN ^1H da substância LYS-5

SÍNTESE E ANÁLISE ESTRUTURAL DO NOVO COMPOSTO 3-(4-CLORO-BENZIL)-5-(1H-INDOL-3-IL-METILENO)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONA

Flávia De Toni Uchôa ; Maria do Carmo Alves de Lima; Suely Lins Galdino; Ivan da Rocha Pitta (LPSF, Departamento de Antibióticos, UFPE).

INTRODUÇÃO

Os significativos avanços na elucidação do mecanismo da inflamação ocorridos na última década, representados pela caracterização da enzima ciclooxigenase e suas isoformas, COX-1 e COX-2, possibilitam que novos antiinflamatórios sejam sintetizados visando seletividade para COX-2. Um dos métodos de chegar a novas drogas é a modificação molecular, que utiliza como protótipo uma molécula matriz, cujas estrutura química e atividade biológica são bem definidas. Assim sendo, sintetizou-se o composto inédito 3-(4-cloro-benzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [1], utilizando como protótipo a indometacina, um potente antiinflamatório inibidor da síntese das prostaglandinas; juntamente com o heterociclo tiazol, núcleo que aparece em registros científicos como possuidor de grande atividade biológica e, quando diarilsubstituído, encaixa-se no perfil para possuir atividade antiinflamatória seletiva a COX-2.

METODOLOGIA

A rota sintética para obter o composto 3-(4-cloro-benzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [1] partiu da tiazolidina-2,4-diona [2] e do cloreto de 4-cloro-benzila [3], que foram reagidos em meio básico obtendo-se o composto 3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona [4]. Após separado por filtração e purificado o composto [4] sofreu uma reação de tionação com P₂S₅, utilizando dioxano seco como solvente sob uma atmosfera de argônio, formando o composto 3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [5]. O composto [5] foi separado por cromatografia em coluna de sílica-gel. Paralelamente, sintetizou-se o éster 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-acrilato de etila [6], através da reação em proporções equimolares de 1H-indol-3-carbaldeído e cianoacetato de etila, utilizando

piperidina como catalisador e benzeno seco como solvente. Posteriormente, através de uma reação de adição de Michel, proporções equimolares dos compostos [5] e [6] foram reagidos em metanol sob refluxo, obtendo-se o composto final 3-(4-cloro-benzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [1], que foi separado por filtração e purificado por cristalização em etanol absoluto. O produto [1] teve suas características físico-químicas determinadas, e foi devidamente caracterizado através dos espectros de absorção de infravermelho e RMN H¹.

RESULTADOS

O composto final 3-(4-cloro-benzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [1] foi obtido com rendimento de 56%, ponto de fusão de 216°C. O deslocamento químico dos hidrogênios expressos em δ ppm no espectro de absorção de RMN dos grupamentos encontram-se: N-H (s, 12,23); HC= (s, 8,22); -CH₂- (s, 4,83) além dos sinais dos grupamentos aromáticos indolídico CH (d, 7,92), CH (s, 7,84), CH (d, 7,52), 2CH (m, 7,29-7,21) e benzílico 2CH (d, 7,45), 2CH (d, 7,32). As frequências de absorção de Infravermelho em cm⁻¹ C=O (1666), C=C (1598), C=S (1491) e NH (3.260), permitiram comprovar a estrutura do composto sintetizado.

CONCLUSÕES

O composto proposto 3-(4-cloro-benzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona [1] foi obtido com sucesso através da rota sintética utilizada e teve sua estrutura química comprovada pelos dados dos espectros de IV e RMN¹H e suas propriedades físico-químicas de ponto-de-fusão, solubilidade, R_f em cromatografia de camada delgada foram igualmente determinadas.

Agência Financiadora: CNPq

Anexo 21: Resumo publicado nos anais da 55ª Reunião Anual da SBPC

SÍNTESE E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA 5-(5-BROMO-4-METOXI-BENZILIDENO)-3-(4-CLORO-BENZIL)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONA

Uchôa, F. D. T.¹, Cañas, A R P. A..¹, Souza, I. A.²; Lima, M. C. A. ¹, Suely L. Galdino¹ e Ivan R. Pitta¹(e-mail:flavia@nlink.com.br)

L.P.S.F¹ – L.C.E.² - Departamento de Antibióticos - UFPE. Av. Prof. Moraes do Rego S/N – Recife - PE. CEP 50.670-901.

Os significativos avanços na elucidação do mecanismo da inflamação ocorridos na última década, representados pela caracterização da enzima Ciclooxigenase (COX), possibilitam que novos antiinflamatórios sejam sintetizados, estes, vindo a existir a partir da soma de esforços nas áreas de modelagem molecular e síntese. O heterociclo tiazol, aparece em registros científicos como núcleo de grande atividade biológica e, quando diarilsubstituído, fecha os pré-requisitos para possuir atividade antiinflamatória. Seguindo este raciocínio, o nosso trabalho visa a síntese e elucidação estrutural do derivado 5-(5-bromo-4-metoxi-benzilideno)-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LYS-2). A rota sintética do composto LYS-2 parte da 2,4-tiazolidinadiona, que é preparada a partir de proporções equimolares de tiouréia e ácido monocloroacético, em meio aquoso, separada por filtração. A introdução de substituintes na posição 3 é feita através de uma reação de N-alkilação da tiazolidina-2,4-diona com o cloreto de 4-clorobenzila em meio básico. Nesta etapa o produto N-alkilado sofre a substituição do átomo de oxigênio da posição 4 pelo átomo de enxofre, através da utilização de pentassulfeto de enxofre em dioxano seco. Este produto é purificado através de cromatografia em coluna. Paralelamente é sintetizado o éster de Cope através da reação de condensação do 5-bromo-4-metoxi-benzaldeído com cianacetato de etila em presença de piperidina e refluxo com benzeno, esse éster então, sofre reação de adição em meio básico com o 3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LYS-1) obtendo o produto final LYS-2 com rendimento de 83%. Na análise de RMN1H foram observadas as seguintes absorções: CH= (d ppm = 7,93), CH₂ (d ppm = 4,83), hidrogênios aromáticos (d ppm = 7,91 – 7,29). No IV observamos as bandas características de C=O em 1739 cm⁻¹, CH= 1676 cm⁻¹, C=S 1498 cm⁻¹, CH₃O 1143 cm⁻¹. A análise dos espectros de RMN e IV permitiram confirmar a estrutura do composto sintetizado.

Apoio: CNPq/FACEPE/PIBIC

Anexo 22: Resumo publicado nos anais do XLIII Congresso Brasileiro de Química