



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LpQM – LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO EM QUÍMICA MEDICINAL

DAYANE ALBUQUERQUE OLIVEIRA E SILVA

PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE FTALIMIDAS PARA O TRATAMENTO DA
INFLAMAÇÃO

Recife, PE

2017

DAYANE ALBUQUERQUE OLIVEIRA E SILVA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE FTALIMIDAS PARA O TRATAMENTO DA
INFLAMAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr.º Diogo Rodrigo Magalhães Moreira

Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Cristina

Lima Leite

Recife, PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586p Silva, Dayane Albuquerque Oliveira e.
Planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de ftalimidas para o tratamento da inflamação / Dayane Albuquerque Oliveira e Silva. – 2017.
70 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Diogo Rodrigo Magalhães Moreira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Fator de necrose tumoral alfa. 2. Ftalimidas. 3. Inflamação. 4. Óxido nítrico. I. Moreira, Diogo Rodrigo Magalhães (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017 - 239)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LpQM – LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO EM QUÍMICA MEDICINAL

DAYANE ALBUQUERQUE OLIVEIRA E SILVA

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE FTALIMIDAS PARA O TRATAMENTO DA
INFLAMAÇÃO**

APROVADA EM: 31 de Julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr. Ana Cristina Lima Leite (Presidente)

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Membro Interno Titular)

Prof. Dr. Paulo André Teixeira de Moraes Gomes (Membro Externo Titular)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof.º Dr.º Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof.ª Dr.ª Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.º Dr.º Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof.º Dr.º Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.º Dr.º Luiz Alberto Lira Soares

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.º Dr.º José Lamartine Soares Sobrinho

Dedico este trabalho primeiramente a Deus
que é tudo em minha vida, aos mais pais
Valdete e Dinaildo (*in memoriam*), a meu
noivo e futuro esposo Weydson, e aos meus
irmãos Fagner, Fábio e Flávio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre me proteger e guiar meus caminhos.

A meu orientador prof. Dr^o Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira por toda orientação, paciência e oportunidade concedida. Pela sua equipe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz/Bahia), pelos testes biológicos realizados. Muito obrigada.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite, pela permissão dada em trabalhar em seu laboratório e por toda contribuição e parceria. Com certeza sua ajuda e empenho foi fundamental, assim como essencial, para a conclusão deste mestrado. Muito obrigada.

A minha mãe (Valdete) por sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos de minha vida, investindo em meus estudos, sempre me aconselhando e me fortalecendo nos momentos de tristeza e estresse, e por me ajudar a enxergar o lado bom de cada dificuldade que acontece em minha vida. A meu pai Dinaildo, por ser meu referencial e por sua eterna presença em minha vida (*in memoriam*).

Ao meu noivo e futuro esposo, Weydson, que nunca me deixa desistir, que sempre me dá forças, me faz perseverar, e me acolhe nos momentos difíceis. Só tenho que agradecer por todo companheirismo, amor e cumplicidade.

Sou grata pelo companheirismo e apoio de todos os meus irmãos Fagner, Fábio e Flávio, assim como de todos os meus parentes.

Aos Integrantes do Laboratório de planejamento em Química Medicinal (LpQM) pelos momentos de companheirismo e troca de conhecimentos, sou muito grata pela amizade construída, vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Desde o início da minha jornada neste laboratório, fui muito bem acolhida e sempre que precisei todos me ajudaram. Gevanio, Wanderlan, Miria, Lucianna e Arsênio, agradeço de forma especial a vocês.

Aos meus amigos que aguentam os meus estresses, me escutam, me acalmam, vocês são peças importantíssimas em minha vida. Em especial a minha amiga Camila Barros, que mesmo sendo de outro laboratório me ajudou bastante em todo processo do mestrado, nunca irei esquecer de tudo que você fez por mim.

Aos professores, pesquisadores e funcionários do DCFAR e do PPGCF, e a todos que contribuíram na realização desse trabalho.

Aos funcionários da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (UFPE), e ao CETENE pelas análises espectroscópicas realizadas.

A FACEPE, pela concessão da bolsa de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE).

Ao CNPq e a FACEPE, pelo suporte financeiro ao LpQM (DCFAR, UFPE).

" Finalmente, fortaleçam-se no Senhor e no seu forte poder".

Bíblia sagrada – Efésios 6:10.

RESUMO

O processo inflamatório acontece naturalmente como resposta da imunidade inata a eventos internos e externos, promovendo a ocorrência de sinais clássicos como edema, calor, rubor, dor e perda da função. Este processo envolve diversos mediadores químicos e biológicos, tais como o óxido nítrico (NO) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Quando a resposta inflamatória dura muito tempo, caracteriza-se como inflamação crônica e pode ter como consequência, ou pode acentuar doenças graves como cânceres, asma, etc. Muitos medicamentos são comercializados e administrados para o tratamento destes distúrbios inflamatórios, porém, os efeitos colaterais que estas drogas causam trazem a necessidade de novos fármacos mais seletivos e menos tóxicos para o tratamento destas enfermidades. Os derivados da Talidomida, as ftalimidas, já apresentam na literatura atividade frente aos mediadores inflamatórios, principalmente ao TNF- α . Derivados ftalimídicos *N*-(arilaminometil)-ftalimidas e *N*-(tiazolaminometil)-ftalimida, foram sintetizados a partir de três etapas reacionais, utilizando-se dos métodos de fusão e refluxo, para que, por fim, *N*-hidroximetilftalimida fosse condensada com anilinas substituídas e um 1,3-aminotiazol, obtendo-se assim os 15 compostos. As moléculas obtidas foram isoladas e as características físico-químicas foram realizadas, ponto de fusão, rendimento e índice de retenção, e posteriormente as moléculas foram avaliadas estruturalmente através de técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , IV, e EMAR. A atividade inibitória destes compostos foi estudada, *in vitro*, frente ao óxido nítrico e TNF- α em macrófagos J774 estimulados com LPS e INF- γ . Os compostos DA 1.7, DA-1.9 e DA- 1.15 exibiram atividade inibitória significativa na produção de NO e TNF- α . Em conclusão, a química e a farmacologia de derivados ftalimídicos *N*-(arilaminometil)-ftalimidas e *N*-(tiazolaminometil)-ftalimida permitiu esclarecer aspectos importantes da relação-estrutura-atividade, contribuindo para o desenvolvimento das pesquisas em anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Fator de necrose tumoral alfa. Ftalimidas. Inflamação. Óxido nítrico.

ABSTRACT

The inflammatory process occurs naturally as a response to innate immunity derived from endogenous and exogenous events, promoting the occurrence of classical signs such as edema, heat, redness, pain and loss of function. This process involves several chemical and biological mediators such as nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF- α). When the inflammatory response lasts a long time, it is characterized as chronic inflammation and can have as consequence or it can accentuate serious diseases like cancers, asthma, etc. Many drugs are marketed and administered to treat these inflammatory disorders, but side effects of these drugs highlights the importance for the discovery of new, more selective and less toxic drugs for the treatment of these diseases. Thalidomide derivatives, the phthalimides, are known in the literature to present inhibitory activity against inflammatory mediators, mainly to TNF- α . Phthalimidic derivatives *N*-(arylaminomethyl)phthalimides and *N*-(thiazolaminomethyl)phthalimide were synthesized from three reactional steps using the melting and reflux heating methods, where *N*-hydroxymethylphthalimide was condensed with phenylamines and an aminothiazole, thereby affording 15 compounds. With the obtained molecules, physicochemical characteristics were obtained, melting point, yield and retention index, and later the molecules were evaluated structurally by ^1H and ^{13}C NMR, IR and LCMS techniques. The inhibitory activity of these compounds was studied, *in vitro*, against nitric oxide and TNF- α in J774 macrophages stimulated with LPS and INF- γ . Compounds DA- 1.7, DA- 1.9, DA- 1.15 exhibited significant inhibitory activity for NO and TNF- α . In summary, we demonstrated the structure-activity relationships by studying the chemistry and pharmacology.

Keywords: Inflammation. Nitric oxide. Tumor necrosis factor alpha. Phthalimides,

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1: Obtenção da ftalimida..... | 32 |
| Esquema 2: Obtenção da N-hidroximetil-ftalimida..... | 32 |
| Esquema 3: Síntese das N-(arilaminometil)-ftalimidas..... | 33 |
| Esquema 4: Planejamento da série química DA1-15..... | 40 |
| Esquema 5: Provável mecanismo de síntese dos compostos DA-1-13;15..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Eventos vasculares da inflamação..... | 20 |
| Figura 2: Eventos na resolução da inflamação..... | 21 |
| Figura 3: Estrutura terciária do TNF- α | 23 |
| Figura 4: Esquema simplificado da biossíntese do NO..... | 25 |
| Figura 5: Talidomida..... | 26 |
| Figura 6: Grupamentos químicos da Talidomida..... | 28 |
| Figura 7: Análogos da talidomida em ensaios clínicos para terapia antitumoral..... | 29 |
| Figura 8: Exemplo de espectro de IV da molécula DA-1.9..... | 43 |
| Figura 9A: Exemplo de espectro de RMN de ^1H da molécula DA-1.9..... | 44 |
| Figura 9B: Ampliação 1 - Exemplo de espectro de RMN de ^1H da molécula DA-1.9..... | 44 |
| Figura 9C: Ampliação 2 - Exemplo de espectro de RMN de ^1H da molécula DA-1.9..... | 45 |
| Figura 10A: Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da molécula DA-1.9..... | 46 |
| Figura 10B: Ampliação 1 - Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da molécula DA-1.9..... | 46 |
| Figura 10C: Ampliação 2 - Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da molécula DA-1.9..... | 47 |
| Figura 11: Estrutura geral das N-(arilaminometil)-ftalimidias..... | 47 |
| Figura 12: Triagem dos compostos frente a produção de óxido nítrico por macrófagos J774 estimulados com LPS e INF- γ e tratados com os compostos na concentração de 20 μM | 58 |
| Figura 13: Curva concentração-resposta frente a produção de óxido nítrico por macrófagos J774 estimulados com LPS e INF- γ e tratados com o composto DA 1.9 nas concentrações de 20, 10 e 2.5 μM | 60 |
| Figura 14: Secreção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por macrófagos J774 estimulados com LPS e INF- γ e tratados com os composto DA1.9 nas concentrações de 20, 10 e 2.5 μM | 61 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Dados físico-químicos das N-(arilaminometil)-ftalimidas..... | 41 |
| Tabela 2: Citotoxicidade avaliada frente a macrófagos J774 e porcentagem de inibição do óxido nítrico (NO)..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------------|--|
| ^1H-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| ^{13}C-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| CCD | Cromatografia de Camada Delgada |
| d | Dubleto |
| Dexa | Dexametasona |
| EMAR | Espectro de massas de alta resolução |
| IFN-γ | Interferon γ |
| IV | Infravermelho |
| LpQM | Laboratório de planejamento em química medicinal |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| m | Multiplete |
| NHM | N-hidroximetilftalimida |
| NO | Óxido nítrico |
| PF | Ponto de fusão |
| REA | Relação Estrutura Atividade |
| Rf | Índice de retenção |
| s | Singleto |
| t | Triplete |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral alfa |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | Objetivo geral | 19 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 19 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 3.1 | Inflamação | 20 |
| 3.2 | Fator de necrose tumoral alfa – TNF-α | 22 |
| 3.3 | Óxido Nítrico | 24 |
| 3.4 | Talidomida | 26 |
| 3.5 | Derivados da Talidomida (Ftalimidas) | 27 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 | Equipamentos | 30 |
| 4.2 | Reagentes e Solventes | 30 |
| 4.3 | Monitoramento das reações | 31 |
| 4.4 | Síntese dos compostos | 31 |
| 4.4.1 | Síntese da ftalimida – 1ª etapa..... | 31 |
| 4.4.2 | Síntese da N-hidroximetilftalimida – 2ª etapa..... | 32 |
| 4.4.3 | Síntese das N-(arilaminometil)-ftalimidas – 3ª etapa..... | 32 |
| 4.5 | Dados físico-químicos | 37 |
| 4.6 | Análises espectroscópicas | 37 |
| 4.7 | Protocolo da avaliação farmacológica | 38 |
| 4.7.1 | Ensaio de citotoxicidade..... | 38 |
| 4.7.2 | Dosagem de nitrito (óxido nítrico)..... | 38 |
| 4.7.3 | Dosagem de citocinas..... | 39 |
| 4.7.4 | Análises estatísticas..... | 39 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 | Planejamento estrutural | 40 |
| 5.2 | Obtenção das N-(arilaminometil)-ftalimidas e N-(tiazolaminometil)ftalimida | 41 |
| 5.3 | Dados espectroscópicos | 47 |
| 5.3.1 | 2 - ((Fenilamino) metil) isoindolina-1,3 diona (DA 1.1)..... | 47 |
| 5.3.2 | 2 - (((4-Clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.2)..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 5.3.3 2 - (((4-Fluorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.3)..... | 49 |
| 5.3.4 2 - (((4-Bromofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.4)..... | 49 |
| 5.3.5 2 - (((4-Metoxifenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.5)..... | 50 |
| 5.3.6 2 - (((4-Isopropilfenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.6)..... | 50 |
| 5.3.7 2 - (((3-Metoxifenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.7)..... | 51 |
| 5.3.8 2 - (((3-Clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.8)..... | 52 |
| 5.3.9 2 - ((<i>m</i> -Tolilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.9)..... | 52 |
| 5.3.10 2 - (((3- (Trifluorometil) fenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.10)... | 53 |
| 5.3.11 2 - (((4-Etilfenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.11)..... | 54 |
| 5.3.12 2 - (((3,4-Diclorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.12)..... | 54 |
| 5.3.13 2 - ((<i>p</i> -Tolilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.13)..... | 55 |
| 5.3.14 2 - ((Tiazol-2-ilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.14)..... | 55 |
| 5.3.15 2 - (((2-Clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.15)..... | 56 |
| 5.4 Avaliação farmacológica | 57 |
| 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória, como parte da imunidade inata, atua no tecido vascular a partir de estímulos danosos endógenos e exógenos como, contaminação patogênica, células lesadas, a fim de que a homeostasia e integridade tecidual sejam restauradas. Embora seja essencial e muitas vezes benéfica, esta atividade pode ocasionar ou agravar doenças como obesidade, cânceres, doenças cardiovasculares (LU *et al.*, 2015; BANBURY *et al.*, 2015), devido a exacerbação e prolongamento desta por falhas nos mecanismos de controle fisiológico (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.*, 2005).

Diversas células imunes e mediadores químicos estão envolvidos na reação inflamatória. Os macrófagos se apresentam como células mais dominantes na resposta inflamatória, e são ativados por células danificadas e por moléculas que estão associadas a patógenos, como por exemplo, o LPS (Lipopolissacarídeo), e a partir disso, várias citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , e mediadores químicos como óxido nítrico (NO) são expressos (CHEN; NUÑEZ, 2010).

TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória que atua na ativação de neutrófilos, produção de intermediários reativos de oxigênio, aumento da citotoxicidade para certos microorganismos e aumento da atividade fagocítica, quimiotaxia dessas células e de monócitos, e também induz a produção de citocinas como a IL-1 e IL-6 (AKIRA *et al.*, 1990; VASSALI, 1992; GOLDBLUM *et al.*, 1993; EIGLER *et al.*, 1997; ALESSIO *et al.*, 1998). O NO está presente na inflamação e tem função muito importante contra bactérias, e como modulador da proliferação das mesmas, sendo assim um grande agente anti-infeccioso (CAROSSA *et al.*, 2001; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Em grande maioria, os medicamentos anti-inflamatórios empregados na clínica são os esteroidais (corticosteróides) e não-esteroidais (AINEs). Quando o uso é prolongado, apresentam efeitos colaterais graves, que afetam a adesão do paciente ao tratamento terapêutico, principalmente nas doenças crônicas e por consequência sua segurança torna-se questionada (BATLOUNI, 2010). Diante disso, a química medicinal sempre investe na busca por novos fármacos mais seletivos a fim de aumentar o sucesso das terapias e de evitar com que outras doenças sejam acarretadas devido ao insucesso destes tratamentos.

O núcleo farmacofórico ftalimida destaca-se por ser versátil e promissor, sendo descrito como uma estrutura privilegiada pois apresenta diversas atividades biológicas. É um importante protótipo apresentando atividade antiparasitária (ALIANÇA *et al.*, 2017), anti-inflamatória (LEITE *et al.*, 2014), antitumoral (PESSOA *et al.*, 2010), antiproliferativa (CARDOSO *et al.*,

2015), imunomoduladora (CARDOSO *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2014; COÊLHO *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2010).

A atividade imunomoduladora dos derivados ftalimídicos, estão interligadas com o fator de necrose tumoral (TNF- α) o qual é estudado e evidenciado sua importância, por ser considerado mediador dos processos inflamatórios e tumorais (OLIVEIRA, 2014). Assim como demonstrada a relevância das ftalimidias sobre o TNF- α nos processos inflamatórios, também destacamos a atividade dessas diante da produção do NO, onde derivados N-aminometilftalimidias aumentaram a sua indução por macrófagos peritoneais, obtidos de *Mus musculus*, quando comparados com IFN- γ e LPS (lipopolissacarídeos) (NETO, 2002).

Um exemplo clássico de fármaco que apresenta este grupamento químico é a Talidomida, fármaco com atividade hipnótica e sedativa, com baixa toxicidade. Entretanto, esta molécula promoveu um grande desastre pela sua alta teratogenicidade em crianças na qual suas mães utilizaram este medicamento para tratar enjoos matinais.

Este trabalho apresenta a síntese de 15 compostos N-(arilaminometil)-ftalimidias planejados por estratégias de biososterismo e hibridação molecular, candidatos a fármacos anti-inflamatórios, estudados frente a NO e TNF α .

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Visando a necessidade de identificar novos fármacos para o tratamento dos distúrbios inflamatórios, este trabalho tem como objetivo o planejamento estrutural e a síntese de derivados ftalimídicos, bem como a avaliação farmacológica das propriedades inibitórias frente a secreção do óxido nítrico e do fator de necrose tumoral α , e estudo das relações estrutura-atividade.

2.2 Objetivos específicos

- Planejar estruturalmente e sintetizar 14 N-(arilaminometil)-ftalimidas e 1 N-(tiazolaminometil)-ftalimida (**DA 1.1 – 1.15**);
- Caracterizar quimicamente e elucidar estruturalmente todos os compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons ($^1\text{H-RMN}$) e Carbono ($^{13}\text{CRMN}$), Infravermelho (IV) e EMAR;
- Avaliar atividade inibitória “*in vitro*” frente óxido nítrico e TNF- α ;
- Analisar a citotoxicidade celular frente a macrófagos J774.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação

A inflamação acontece através do mecanismo central de reparação dos tecidos após a ocorrência de um trauma, seja ele de natureza biológica (microorganismos), química (substâncias irritantes) e/ou física (calor, frio, lesão) (TLASKALOVAHOGENOVA, 2005; ABBAS *et al.*, 2008). Em consequência ao dano tecidual, mediadores químicos como as cininas, neuropeptídeos e histamina, componentes do complemento, citocinas e outros produtos dos leucócitos e das plaquetas, são recrutados e liberados no sentido de inativar ou destruir o agente agressor, assim como promover a reparação tecidual no local da lesão (RANG *et al.*, 2007). Estes componentes químicos atuam nos eventos vasculares, acarretando a vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e supervisão das diversas respostas de defesa local (**Figura 1**).

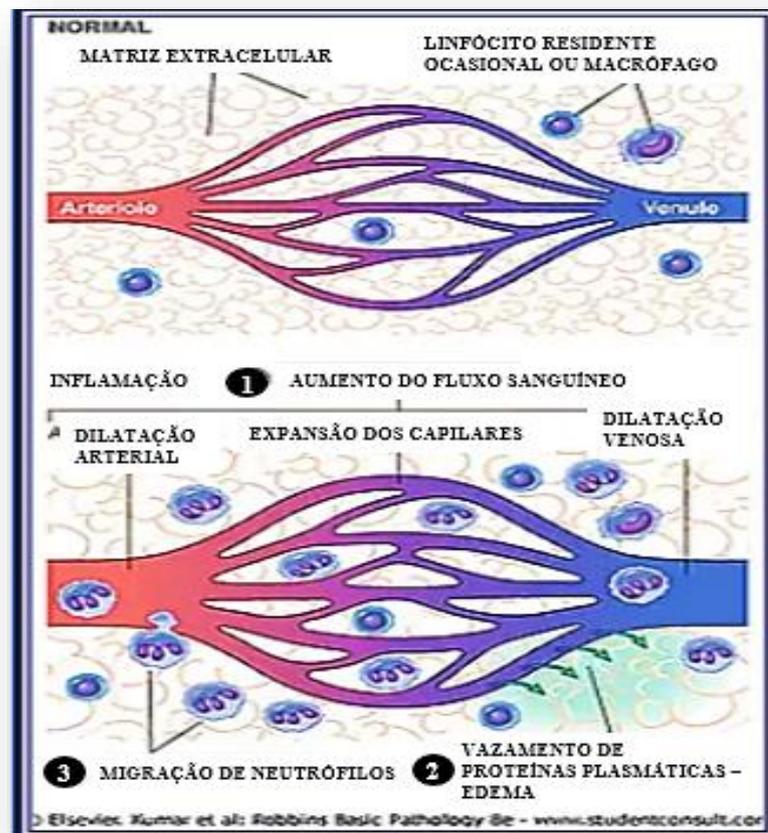


Figura 1: Eventos vasculares da inflamação. Fonte: Kumar *et al*, 2008.

De acordo com a durabilidade da lesão e sinais clínicos, a inflamação é definida como aguda ou crônica. De caráter não imunológico e de curta duração, o processo inflamatório agudo atrai células ativadas do sistema fagocítico e macrófagos teciduais para o local do trauma, secretando histamina, serotonina e citocinas. Diante das citocinas liberadas no momento da lesão, temos a interleucina 10 (IL-10) que apresenta-se modulando o processo inflamatório; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que atua induzindo a liberação de outras citocinas (VAZQUEZ-LOMBARDI, ROOME; CHRIST, 2013); e a interleucina 1-Beta (IL-1 β) que ocasiona a ativação da enzima cicloxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂s) e tromboxanos (TXs) (VERRI *et al.*, 2006).

Essas citocinas, a partir de um processo auto-regulatório, atraem leucócitos para o foco inflamatório (VOLTARELLI, 1994), os quais podemos destacar, neutrófilos e as células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) (SOEHNLEIN; LINDBOM 2010). Os neutrófilos caracterizam-se como importantes células da resposta imune inata, migrando primariamente para o local do trauma, infecção ou inflamação, e juntamente com os macrófagos, acarretam a fagocitose e erradicação do agente promotor da inflamação através da liberação de quimiocinas e citocinas (**Figura 2**) (MONTESEIRÍN 2009; KUMAR; SHARMA, 2010).

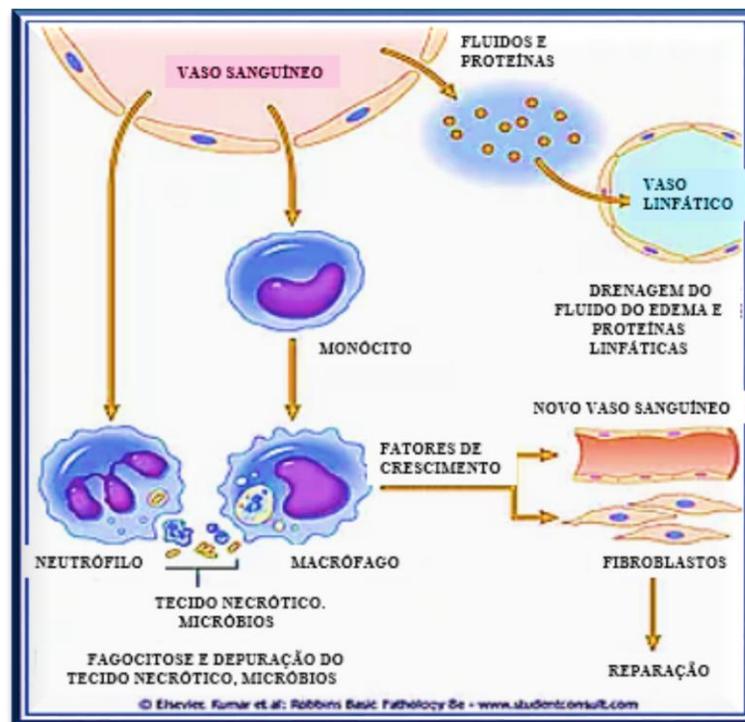


Figura 2: Eventos na resolução da inflamação. Fonte: Kumar *et al.*, 2008.

Quando o agente agressor permanece ativo por semanas, meses e até anos, ocorre a inflamação crônica, que está relacionada à patogênese de diversas doenças crônicas, tais como psoríase, artrite reumatoide, osteoartrite, síndrome metabólica, doença de Crohn e doenças neurológicas (ALKIM *et al.*, 2015). Isso ocorre devido ao desequilíbrio do processo inflamatório com outras funções celulares, causando estas diversas desordens biológicas. As principais células presentes no sítio da inflamação crônica, são os macrófagos, os quais são responsáveis pela secreção de diversos mediadores fisiológicos como as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 e o TNF- α , que atuam na manutenção e propagação do quadro inflamatório durante o processo crônico (ALKIM *et al.*, 2015; OLIVER; CIULLA, 2006; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; SUZUKI *et al.*, 2008). A histamina, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetária, a bradicinina, o óxido nítrico (NO), os neuropeptídios, são alguns dos mediadores químicos envolvidos neste processo (COUTINHO *et al.*, 2009).

3.2 Fator de necrose tumoral alfa – TNF- α

O TNF- α (**Figura 3**) é um importante mediador pró-inflamatório do grupo das citocinas e define-se como uma glicoproteína de membrana, sintetizada na forma de um precursor de 233 aminoácidos, peso molecular de 26 kDa e constituída por um domínio intracelular, um transmembrânico e um domínio extracelular (PENNICA *et al.*, 1984; VASSALI, 1992; BRADLEY, 2008).

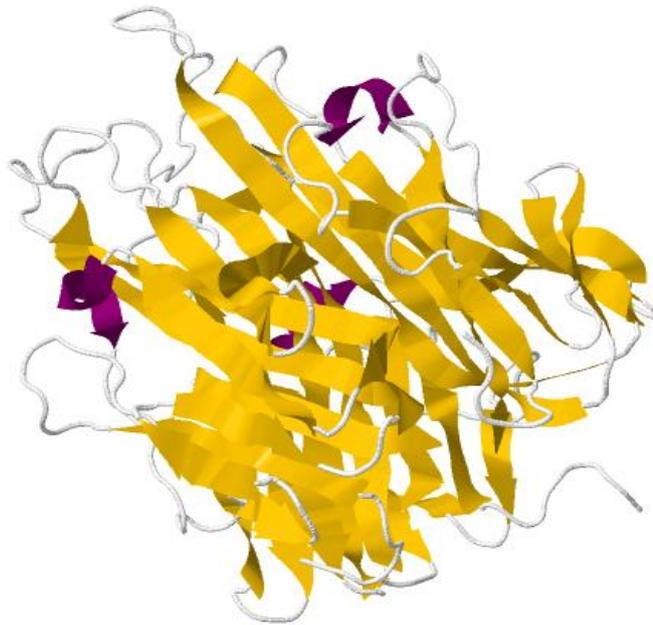


Figura 3: Estrutura terciária do TNF- α . Fonte: Protein Data Bank (PDB), em junho de 2017 – disponível em www.rcsb.org – a partir do PDB ID: 1TNF.

Estando acoplado a membrana, o TNF- α encontra-se na sua forma imatura, porém, ao ser clivado pela enzima TACE (TNF- α Converting Enzyme), resulta na liberação do TNF- α solúvel ou maduro (PENNICA *et al.*, 1984). Evidências demonstram que o TNF- α , em ambas as formas, é biologicamente ativo e necessita estar na forma trimérica para exercer sua atividade (KRIEGER *et al.*, 1988; PEREZ *et al.*, 1990; GOETZ *et al.*, 2004; BRADLEY, 2008). A literatura apresenta que células de camundongos deficientes em TACE fornecem 80 a 90% menos TNF- α maduro, do que animais normais (KILLAR *et al.*, 1999).

A expressão do TNF- α ocorre em diferentes tecidos, atuando principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção a fim de que se restabeleça a função inicial, que é o mecanismo de reparo e cicatrização. Esta citocina pró-inflamatória também estimula e induz a cascata de ativação de outras citocinas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como ativa os genes responsáveis pelo estresse oxidativo que são encarregados por aumentar e prorrogar o processo inflamatório (CHAPARRO *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2006; KRAYCHETE *et al.*, 2006; MONTENEGRO, 1999).

A principais fontes que geram e secretam TNF- α , após estímulo apropriado, são os monócitos e macrófagos (HOFSLI *et al.*, 1989; VASSALI, 1992). Os macrófagos atuam na produção do TNF- α a partir de uma série de estímulos como bactérias, vírus, complexos imunes, citocinas, lesões entre outros (BALKWILL, 2009; TRACEY *et al.*, 2008). Linfócitos T, neutrófilos, células endoteliais e mastócitos, também produzem esta citocina, e adicionalmente,

estas últimas estocam TNF- α em grânulos citoplasmáticos (AKIRA *et al.*, 1990; GORDON *et al.*, 1990). O próprio TNF- α , o lipopolissacarídeo de membrana de bactéria (LPS), a interleucina-1 (IL-1), o Interferon- γ (INF- γ) são aptos a estimular e liberar o mesmo (TRACEY *et al.*, 1987).

O TNF- α , liberado no espaço extracelular, liga-se a dois tipos de receptores para que exerça seus efeitos biológicos, o TNFR1 e o TNFR2 (TRACEY *et al.*, 2008; WALLIS, 2008). O TNFR1 está expresso em praticamente todas as células do organismo e o TNFR2, encontra-se mais comumente em células do sistema hematopoiético. Relatos da literatura detectam que a interação do TNF- α com o receptor TNFR1 promove uma sinalização intracelular que tem como consequência eventos pró-inflamatórios e apoptose, já a interação do TNF- α com o receptor TNFR2 não apresentam muitos dados e têm sido associados ao reparo de tecidos e à angiogênese (KONDO; SAUDER, 1997; BRADLEY, 2008).

O fator de transcrição nuclear Kappa B (NF κ B), denominação genérica de uma grande família de fatores de transcrição, medeia a resposta celular do TNF- α , assim como de citocinas, agentes infecciosos. NF κ B regula a expressão de inúmeros genes envolvidos nas respostas imune, inflamatória e na sobrevivência, proliferação e diferenciação de células. A regulação inadequada da cascata de sinalização do NF κ B está interligada com a inflamação crônica, doenças auto-imunes, algumas desordens hereditárias e muitos cânceres (ESCÁRCEGA *et al.*, 2007).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocina pró-inflamatória, é considerada uma das maiores promotoras da inflamação, por entre outras funções, acarretar a síntese de outras citocinas responsáveis pela cascata pró-inflamatória (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010).

3.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) em temperatura ambiente se comporta como radical livre gasoso, inorgânico e incolor (Moncada *et al.*, 1991). Embora, inicialmente, tenha sido considerado apenas como um poluente ambiental, com o passar do tempo e extensas pesquisas, demonstrou-se a importância desta molécula na maioria dos sistemas biológicos, na neurotransmissão, na defesa imune, regulação da morte celular e motilidade celular (Beckman; Koppenol, 1996; Morris *et al.*, 1992; Snyder; Dawson, 1995).

A síntese do NO se dá a partir do aminoácido L-arginina, que está presente em grandes concentrações no sangue, no fluído extracelular assim como em diferentes tipos de células, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Contudo, a obtenção do

óxido nítrico é consequência de diversos eventos oxidativos e redutores, e depende de um grande número de cofatores (**Figura 4**) (BRUCKDORFER, 2005).

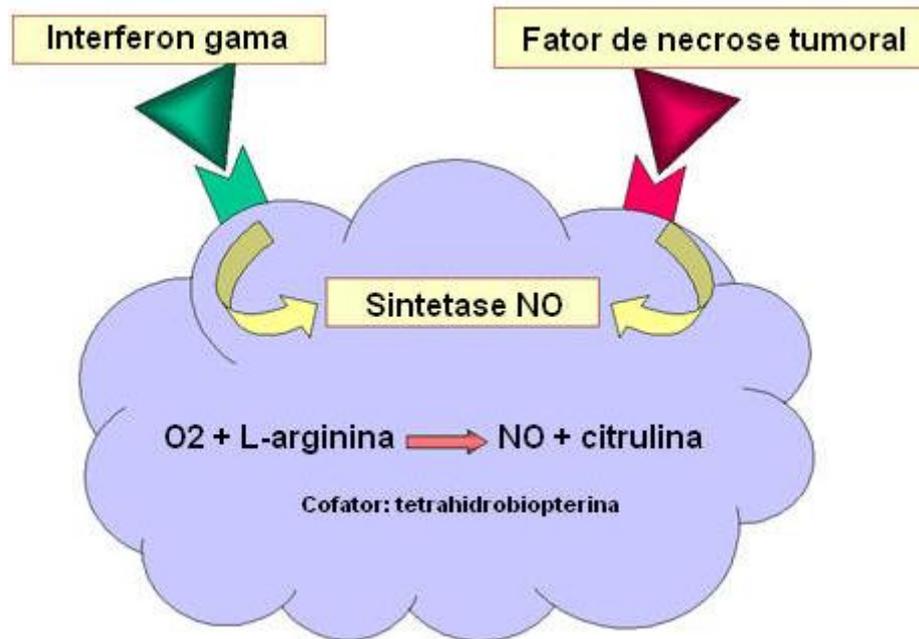


Figura 4: Esquema simplificado da biossíntese do NO. Fonte: Microbiologia e imunologia online, em junho 2017. Disponível em: www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter1.htm.

A enzima NOS detém três isoformas conhecidas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). A nNOS e eNOS são ditas enzimas constitutivas, produzem NO em baixas concentrações e é ativada através do cálcio (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003). Já a iNOS, libera em torno de 20 vezes mais NO do que a NOS constitutivas, sendo expressa nos macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais em resposta a estímulos externos como, por exemplo, organismos invasores (BRUCKDORFER, 2005).

O NO quando sintetizado em altas concentrações pela iNOS, tem atuado como um potente efector citotóxico na defesa imune (LIEW & COX, 1991; WEI *et al*, 1995; MACMICKING *et al*, 1997; KRÄNCKE *et al*, 1991). A produção do NO através da expressão da iNOS pode ser positiva quando resulta na inibição do crescimento de patógenos, na proteção de tecidos frente a traumas na resposta inflamatória aguda sistêmica, assim como no bloqueio da microtrombose por meio da prevenção de adesão plaquetária. Todavia, pode ser desfavorável quando a síntese de NO a partir de iNOS no espaço subendotelial e o potencial para sua inibição por lipoproteínas podem ter efeito sobre a patogênese dos vasos sanguíneos ateroscleróticos, devido a disfunção endotelial e consequente perda da atividade biológica de NO (MORRIS; BILLIAR, 1994).

3.4 Talidomida

A (2- (2,6-dioxo-3-piperidil) isoindolina-1,3-diona) ou (\pm) ftalimidoglutarimida, conhecida como Talidomida (**Figura 5**) é um derivado sintético do ácido glutâmico, e foi produzida e comercializada como um sedativo em 1957 por “Chemie Grunenthal”. Esta droga foi administrada com segurança e demonstrou ausência de efeitos adversos, tornando-se um sedativo-hipnótico benéfico entre 1957 e 1961 muito utilizado por grávidas no tratamento de enjoos matinais (MOOS *et al.*, 2003).

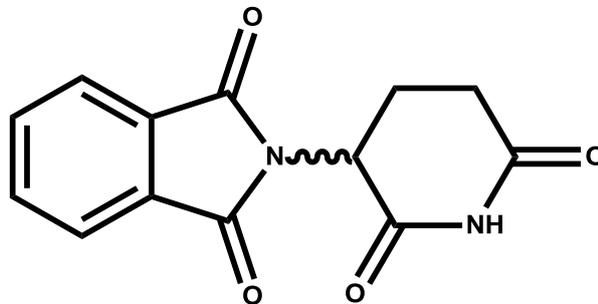


Figura 5: Talidomida. Fonte: (SINGHAL, 1999)

Devido à ausência de efeitos indesejados e venda sem necessidade de prescrição médica, a talidomida teve ampla comercialização na Alemanha e em mais de 46 países, como os da Europa e América do Sul, além do Canadá e outras regiões do mundo, com exceção dos Estados Unidos que não obtiveram licença do Food and Drug Administration (FDA), por não ter segurança sobre a droga (KELSEY, 1988). Em 1958, sua utilização começou a ser interligada a casos focomelia (ausência ou encurtamento das partes proximais dos membros), malformações intestinais, defeitos de ossos longos e outros distúrbios em filhos de mulheres grávidas que administravam este medicamento como antiemético (BORGES; FROEHLICH, 2003; MELCHERT; LIST, 2007).

Com isso, em novembro de 1961, o uso da talidomida foi suspenso, diminuindo drasticamente a ocorrência de bebês afetados. Mais de 10 mil crianças nasceram com graves danos em todo o mundo (VARGESSON, 2013). O fato trouxe à oficial médica americana Frances Kelsey, responsável pelas decisões à frente do FDA, a medalha e título de guardiã da Saúde Pública concedida pelo, então, presidente John Kennedy, por evitar uma epidemia de malformações em bebês nos EUA (RICE, 2007).

Após quatro anos do desastre da talidomida, o médico dermatologista Jacob Sheskin apresentou os efeitos clínicos da talidomida frente ao eritema nodoso leproso (ENL), diminuindo acentuadamente a dor e o processo inflamatório associado a Hanseníase (BOCHUD, *et al.*, 2008). Portanto, esta descoberta fez a talidomida ressurgir e ser estudada novamente como fármaco para algumas enfermidades, apresentando ações anti-inflamatórias, eficácia para o tratamento da hanseníase, propriedade antiangiogênica, e potencialmente útil para o tratamento do câncer (BARBOSA, 2009).

Em 1991, um estudo relatou que pacientes com lepra apresentavam níveis sanguíneos aumentados de um modulador do sistema imunológico, a citocina TNF- α . Assim como demonstraram que a Talidomida inibia seletivamente o fator de necrose tumoral alfa, em situações que esta citocina era expressa em quantidades maiores à necessidade de manutenção do sistema imunológico normal. Apresentando-se como potente imunoregulador (Gilla Kaplan *et al.*, 1991). Pacientes com tuberculose e AIDS, tratados com talidomida, também reduziram as concentrações de TNF- α , caracterizada pela melhora clínica do granuloma e redução da carga viral (KLAUSNER *et al.*, 1996). Diante dos estudos relatados na literatura, a hipótese mais relevante é que a ação deste medicamento se baseia primordialmente modulando a liberação de TNF- α , resultando num fármaco eficiente no tratamento de disfunções inflamatórias e tratamento do câncer (GERSHON, 1995; KAPLAN, 1994; BLACK; BIRDE; MOHLER, 1997).

Após diversos estudos, atualmente a talidomida é licenciada em todo o mundo, inclusive os EUA desde 1998, para o tratamento da hanseníase e mieloma múltiplo. A talidomida e seus análogos são utilizados na terapêutica de várias condições clínicas, incluindo as do sistema gastrointestinal como a doença de Crohn – doença crônica inflamatória que afeta o trato gastrointestinal, provavelmente acarretada por uma desregulação do sistema imunológico –, enfermidades reumatológicas como o lúpus - doença autoimune que afeta principalmente pele, articulações, rins, cérebro assim como também todos os demais órgãos –, e cânceres como o renal, de próstata e sarcoma de Kaposi. (VARGESSON, 2013).

3.5 Derivados da Talidomida (Ftalimidas)

A Talidomida apresenta em sua estrutura dois grupamentos químicos, a ftalimida e glutarimida (**Figura 6**). Estudos de relação estrutura-atividade (SAR), demonstram a importância do grupo ftalimida em relação ao grupo glutarimida, frente a diversas atividades biológicas. Isso pode ser exemplificado com alguns relatos, como em 1995 quando

HASHIMOTO *et al* observaram que o grupamento glutarimida não tinham relevância na atividade anti-TNF- α . Por sua vez, em 1999 MULLER *et al* enfatizaram os resultados demonstrados por MYIACHI *et al* (1997), o qual definiram a relevância do anel ftalimídico na atividade anti-TNF- α .

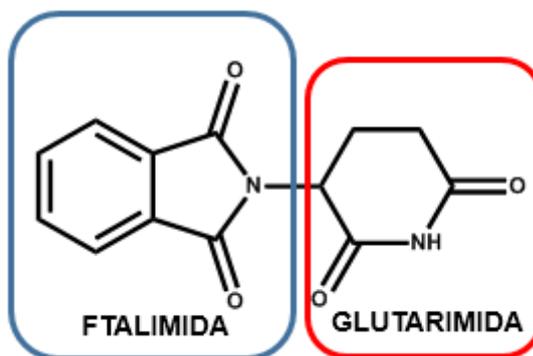


Figura 6: Grupamentos químicos da Talidomida. Fonte: autor.

Entre as diversas atividades farmacológicas das ftalimidas, descritas na literatura, temos a atividade antiparasitária (ALIANÇA *et al*, 2017), anti-inflamatória (Bach *et al*, 2017, LEITE *et al.*, 2013), antitumoral (CARDOSO *et al*, 2015), imunomoduladora (COÊLHO *et al*, 2014; LEITE *et al*, 2013; PESSOA *et al*, 2010), analgésica (ALANAZI *et al*, 2015), anticonvulsivante (KAMINSKI *et al*, 2011), antituberculose (AKGÜN *et al*, 2012; ABDEL-AZIZ *et al*, 2011), hipolipidêmica (ABDEL-AZIZ *et al*, 2011), ansiolítica (ALANAZI *et al*, 2015).

A partir destes dados, evidencia-se a importância do planejamento, síntese e obtenção de derivados ftalimídicos como grupamento promissor para o tratamento de doenças. Pomalidona (ACTIMID CC-4047) (7) e a lenalidomida (Revlimid, CC-5013) (**Figura 7**), derivados da talidomida, são dois principais fármacos imunomoduladores com atividade antitumoral, e são os primeiros a entrarem nos ensaios clínicos para o tratamento do mieloma múltiplo em 1999 (Chanan-Khan *et al*, 2006; Rhee *et al*, 2008).

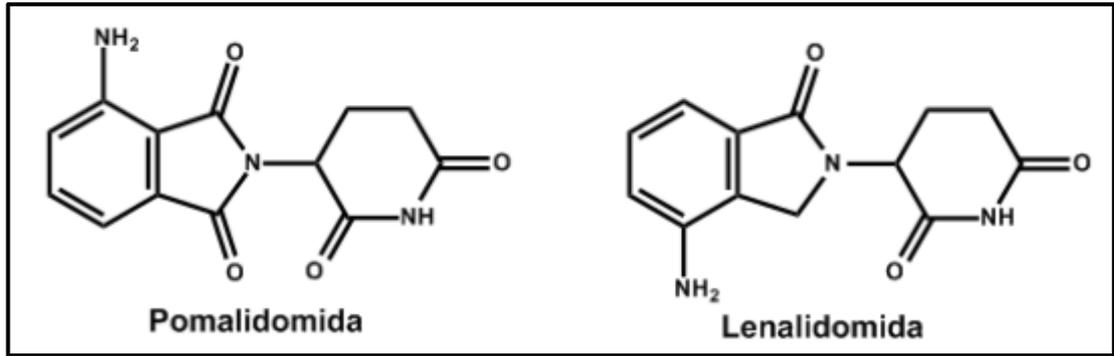


Figura 7: Análogos da talidomida em ensaios clínicos para terapia antitumoral. Fonte: Oliveira, 2014.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Os equipamentos e utensílios utilizados para síntese dos compostos da série DA 1.1-1.15 fazem parte da infraestrutura do LpQM. A seguir estão listados:

- ✓ Vidrarias em geral;
- ✓ Chapa de agitação e aquecimento (FISATOM 752A);
- ✓ Balança semi-analítica (BEL MARK 220);
- ✓ Capela com exaustão;
- ✓ Dessecador;
- ✓ Estufa (NOVA TÉCNICA NT 802);
- ✓ Bomba a vácuo (MICRONAL BA525S);
- ✓ Freezer de armazenamento;
- ✓ Espátulas e pinças metálicas.

4.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados na obtenção das moléculas foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO-*d*6) foram da marca CIL (Tédia Brazil). A seguir temos uma lista dos reagentes e solventes utilizados:

- ✓ Anidrido ftálico;
- ✓ Uréia;
- ✓ Formaldeído;
- ✓ Anilinas;
- ✓ Amino-Tiazol;
- ✓ Trietilamina;
- ✓ Água destilada;
- ✓ Metanol;
- ✓ DMSO-*d*6;
- ✓ DMF.

4.3 Monitoramento das reações

O acompanhamento das reações foi realizado utilizando placas de cromatografia em camada delgada (CCD) de Sílica Gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura. A leitura destas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

4.4 Síntese dos compostos

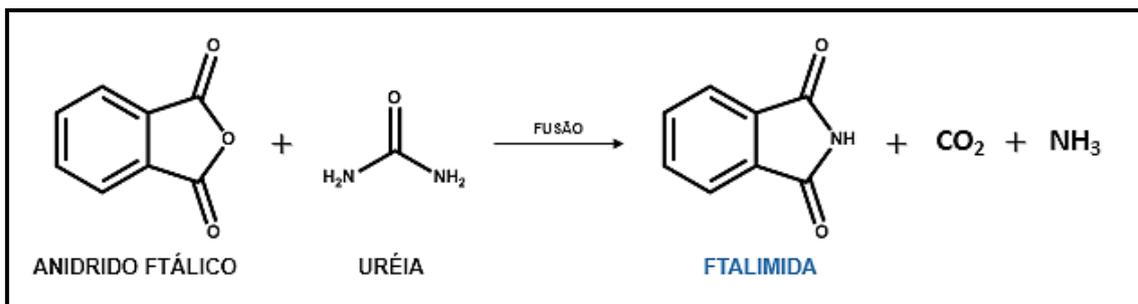
A obtenção das N-(arilaminometil)-ftalimidas se deu em três etapas reacionais, e suas estruturas foram elucidadas. Tais procedimentos serão descritos a seguir.

4.4.1 Síntese da ftalimida – 1ª etapa

A ftalimida é obtida através da reação entre **anidrido ftálico e uréia (Esquema 1)**, por fusão, através de uma acilação. Inicialmente, 2,5g de anidrido ftálico e 1,5g de uréia foram pesados e colocados num gral para que fossem macerados. Após maceração, os reagentes foram transferidos para um balão de fundo redondo, 100 ml, imerso em banho de óleo, o qual foi vedado frouxamente para que a pressão ficasse equalizada dentro e fora do recipiente.

O banho de óleo foi aquecido a uma temperatura de 140°C, verificado por termômetro, até que ocorresse a fusão dos reagentes, iniciando a reação. Com a fusão, elevou-se gradualmente a temperatura até 200°C, observando-se a formação de uma massa porosa, devido a formação de gases (CO₂ e NH₃). Após uma hora, retirou-se a tampa do balão para sublimação do anidrido ftálico, por cerca de meia hora. Retirou-se a reação do banho de óleo e com o resfriamento, desagregou-se a massa sólida com auxílio de espátula ou bastão de vidro. Adicionou-se cerca de 10 ml de água destilada e filtrou-se a ftalimida. A mesma foi colocada no dessecador. Com a ftalimida já obtida, fez-se uma cromatografia em camada delgada (sistema de eluição: 7/3 hexano/acetato de etila).

A ftalimida apresenta-se como sólido branco, com a fórmula molecular **C₈H₄O₃**, massa molecular **148,02g/mol** e ponto de fusão de **238°C**.

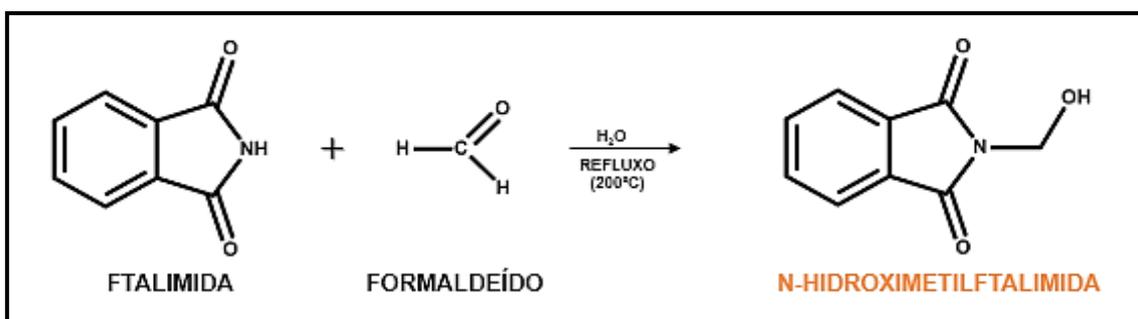


Esquema 1: Obtenção da ftalimida. Fonte: Autor.

4.4.2 Síntese da N-hidroximetilftalimida – 2ª etapa

A N-hidroximetilftalimida é sintetizada através de uma condensação da **ftalimida**, obtida previamente, com **formaldeído** (**Esquema 2**). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,0g de ftalimida, 1,4ml de formol e 10ml de água destilada. Colocou-se a reação sob refluxo, em temperatura acima de 100°C, até obter uma solução límpida. A solução foi filtrada a quente, por meio de papel de filtro e funil simples, e recolhida em erlenmeyer (que também estava aquecido). Com o resfriamento da reação, ocorreu a formação de cristais branco, posteriormente filtrados em funil sinterizado e lavados com água destilada gelada. O produto foi acondicionado no dessecador para secagem. Por sequência, realizou-se a CCD (sistema de eluição: 7/3 hexano/acetato de etila).

A N-hidroximetilftalimida apresenta fórmula molecular **C₈H₅NO₂**, massa molecular de 147,03g/mol e ponto de fusão de 147°C.

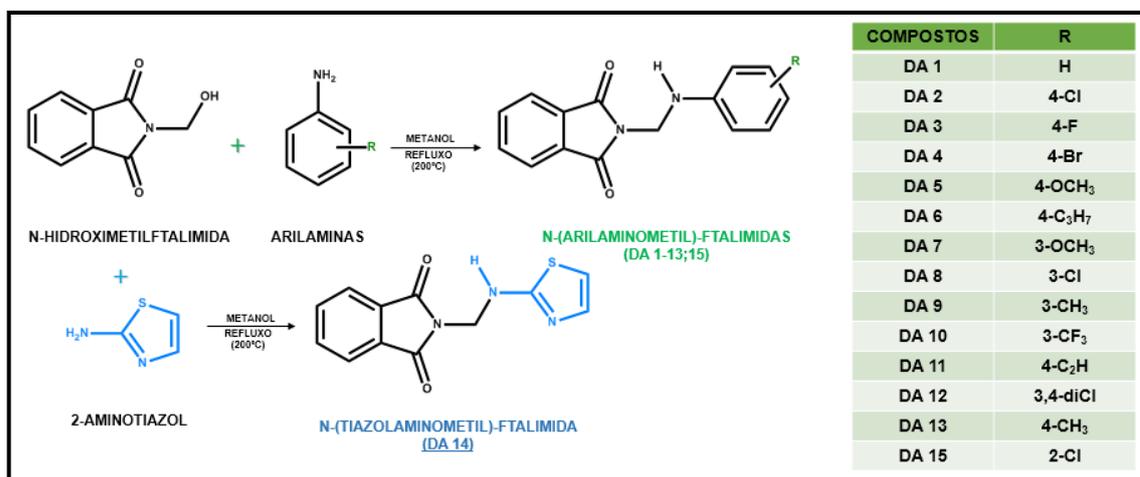


Esquema 2: Obtenção da N-hidroximetil-ftalimida. Fonte: Autor.

4.4.3 Síntese das N-(arilaminometil)-ftalimidas – 3ª etapa

Os compostos N-(arilaminometil)-ftalimidas foram preparados pelo procedimento convencional já descrito na literatura por Winstead e Heine, 1955. Esta metodologia utiliza N-

hidroximetilftalimida e arilaminas ou aminotiazol em metanol, sob agitação magnética em refluxo, durante 4-10h (**Esquema 3**). As reações foram acompanhadas por CCD que demonstraram o consumo dos reagentes de partida. Não foi necessária recristalização dos compostos.



Esquema 3: Síntese das N-(arilaminometil)-ftalimidas. Fonte: Autor.

- **DA 1 → 2 - ((fenilamino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

Sob refluxo: Em um balão de fundo redondo de 100 ml, foram adicionados 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroximetilftalimida (NHM) e 10 ml de metanol. Após solubilização da NHM, adicionou-se 0,33 g (3×10^{-3} mols) da anilina. Depois de 3 horas, retirou-se a reação do aquecimento e deixou-se sob agitação, até que, com o resfriamento, houve formação de precipitado amarelo, o qual foi filtrado em funil sinterizado. Foi realizada uma CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – onde percebeu-se que o produto estava puro.

- **DA 2 → 2 - (((4-clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 1 g (6×10^{-3} mols) da N-hidroximetilftalimida (NHM), 20 ml de metanol, 0,76 g (6×10^{-3} mols) da 4-cloroanilina. Ocorreu precipitação durante a reação. A reação durou 4 horas, filtrou-se o precipitado em funil sinterizado e com a CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – observou-se que o mesmo estava puro.

- **DA 3 → 2 - (((4-fluorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 1 g (6×10^{-3} mols) da N-hidroxi metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol e 0,67 g (6×10^{-3} mols) da 4-flúor-anilina. A reação durou 5 horas, filtrou-se o precipitado em funil sinterizado e com a CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – observou-se que o mesmo estava puro.

- **DA 4 → 2 - (((4-bromofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 1 g (6×10^{-3} mols) da N-hidroxi metilftalimida (NHM) 20 ml de metanol e 1,03 g (6×10^{-3} mols) da 4-bromo-anilina. A reação durou 4 horas e ocorreu precipitação. Filtrou-se o precipitado em funil sinterizado e com a CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – observou-se uma pequena mancha de impureza, com isso, lavou-se com metanol, assim, obteve-se o produto puro.

- **DA 5 → 2 - (((4-metóxi fenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 1 g (6×10^{-3} mols) da N-hidroxi metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol e 0,74 g (6×10^{-3} mols) da 4-metóxi-anilina. A reação durou 4 horas, ocorreu precipitação, filtrou-se com funil sinterizado. Foi realizada uma CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e percebeu-se que o produto estava puro.

- **DA 6 → 2 - (((4-isopropilfenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 1 g (6×10^{-3} mols) da N-hidroxi metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol e 0,81 g (6×10^{-3} mols) da 4-isopropil-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e percebeu-se que a mesma tinha finalizado após 6 horas, porém, não havia ocorrido precipitação. Colocou-se a reação na geladeira e após 24 horas observou-se a formação de precipitado, o qual foi filtrado em funil sinterizado.

- **DA 7 → 2 - (((3-metoxifenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroxi-metilftalimida (NHM), 15 ml de metanol e 0,37 g (3×10^{-3} mols) da 3-metóxi-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e percebeu-se que a mesma tinha finalizado após 10 horas. Só ocorreu precipitação depois que a reação ficou 24 horas na geladeira. O precipitado apresentou-se na cor bege.

- **DA 8 → 2 - (((3-clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,9 g ($5,4 \times 10^{-3}$ mols) da N-hidroxi-metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol e 0,69 g ($5,4 \times 10^{-3}$ mols) da 3-cloro-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e durou 6 horas, quando ocorreu precipitação. Filtrou-se com funil sinterizado.

- **DA 9 → 2 - ((m-tolilamino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 1 g (6×10^{-3} mols) da N-hidroxi-metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol e 0,64 g (6×10^{-3} mols) da 3-metil-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e durou 5 horas, quando ocorreu precipitação. Filtrou-se em funil sinterizado.

- **DA 10 → 2 - (((3- (trifluorometil) fenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroxi-metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol e 4 gotas de trietilamina (catalisador), e 0,48 g (3×10^{-3} mols) da 3-trifluórometil-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila. Após seis horas, retirou-se a reação do refluxo e deixou em temperatura ambiente sob agitação. Após 12 horas ocorreu precipitação. Filtrou-se e colocou o precipitado no dessecador.

- **DA 11 → 2 - (((4-etinilfenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroximetilftalimida (NHM), 20 ml de metanol, e 0,35 g (3×10^{-3} mols) da 4-etinil-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila. Após três horas de reação ocorreu formação de precipitado amarelo, a reação ficou por mais 30 minutos e foi retirada. Filtrou-se e colocou o precipitado no dessecador.

- **DA 12 → 2 - (((3,4-diclorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,33 g (2×10^{-3} mols) da N-hidroximetilftalimida (NHM), 20 ml de metanol, e 0,32 g (2×10^{-3} mols) da 3,4-dicloro-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila. Após quatro horas de reação desligou-se a chapa de aquecimento, e com o resfriamento ocorreu precipitação. Filtrou-se e colocou o precipitado no dessecador.

- **DA 13 → 2 - ((p-tolilamino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroximetilftalimida (NHM), 20 ml de metanol, e 0,32 g (3×10^{-3} mols) da 4-metil-anilina. A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e percebeu-se que a mesma tinha finalizado após cinco horas. Colocou-se a reação sob temperatura ambiente e após 30 minutos houve formação de precipitado. Filtrou-se e colocou no dessecador o produto puro.

- **DA 14 → 2 - ((tiazol-2-ilamino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroximetilftalimida (NHM), 20 ml de metanol, 0,3 g (3×10^{-3} mols) do 2-amino-tiazol e 4 gotas da trietilamina (catalisador). A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e após cinco horas foi retirada do refluxo e colocada sob temperatura ambiente e agitação durante a noite. No outro dia, observou-se a formação de precipitado. Filtrou-se e colocou no dessecador o produto puro.

- **DA 15 → 2 - (((2-clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona:**

O mesmo procedimento reacional utilizado para **DA 1**. 0,5 g (3×10^{-3} mols) da N-hidroxi metilftalimida (NHM), 20 ml de metanol, 0,38 g (3×10^{-3} mols) da 2-cloro-anilina e 4 gotas da trietilamina (catalisador). A reação foi acompanhada por CCD – meio 9:1 Diclorometano / Acetato de etila – e após seis horas foi retirada do refluxo e colocada sob temperatura ambiente e agitação durante a noite. No outro dia, observou-se a formação de precipitado na cor bege. Filtrou-se e colocou no dessecador o produto puro.

4.5 Dados físico-químicos

- **Pontos de fusão (PF):** Foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover (FISATOM 430 D) e os valores não foram posteriormente corrigidos. Os produtos se fundiram sem aparente decomposição da amostra.
- **Índice de Retenção (RF):** Utilizou-se placas de CCD de Sílica Gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura, e meio de eluição **7:3 Hexano / Acetato de Etila**. A leitura foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

4.6 Análises espectroscópicas

Para todos os compostos sintetizados, foram feitas análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos em instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interna. As constantes de acoplamento foram indicadas em Hertz (Hz), e as multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: s – singleto, d – dubleto, t – tripleto, m – multipeto. Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr. As micro-análises para C, N, H, e S foram realizadas em um analisador Carlos Erba (modelo EA 1110). Para os espectros de massas de alta-resolução (EMAR), usou-se a técnica de ionização por electrospray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo "time-of-flight" (TOF), medidos nos aparelhos LC-IT-TOF da Shimadzu.

4.7 Protocolo da avaliação farmacológica

4.7.1 Ensaio de citotoxicidade

Macrófagos murino da linhagem J774 foram incubados em placa de 96 poços (1×10^4 células/poço, em 100 μL) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Life) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Como controle positivo foi utilizado à violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Os compostos foram solubilizados em DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) e diluídos em meio DMEM e foram testados em sete concentrações (100-1.25 μM), em triplicatas. Após adição dos compostos, as placas foram incubadas em estufa com 5 % de CO_2 à 37 °C por 72 horas. Em seguida, foi adicionado 20 μL /poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubado por 4 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm. Os valores de CC_{50} foram calculados utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes.

4.7.2 Dosagem de nitrito (óxido nítrico)

Macrófagos murino da linhagem J774 foram incubados em placa de 96 poços (2×10^5 células/poço, em 100 μL) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Life) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 2 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . O meio foi removido e 100 μL de meio contendo 500 ng/mL de lipopolisacarídeos (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 5 ng/mL interferon-gama (IFN- γ , Sigma-Aldrich) foram adicionados. Após 1 h, 100 μL de meio contendo os compostos foram adicionados e placa incubada por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Como controle positivo foi utilizado à dexametasona (MP biomedical, Santa Ana, CA) na concentração de 20 μM . Os compostos foram solubilizados em DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) e diluídos em meio DMEM e foram testados na concentração de 20 μM), em quadruplicatas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a produção de nitrito no sobrenadante de macrófagos J774 foi determinada através do método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Dois experimentos independentes foram realizados.

A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectramax), com filtro de 570 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1. Os resultados foram expressos em μM

de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400 μM .

4.7.3 Dosagem de citocinas

As dosagens de TNF- α foram realizadas a partir do sobrenadante das culturas de células coletados 4 h pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando o protocolo, anticorpos e citocinas recombinante do kit Duoset ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Placas de ELISA (NUNC – IMMUNO PLATE MaxisorpSurface) foram sensibilizadas com 50 μl /poço do anticorpo de captura, na concentração de 2 $\mu\text{g/ml}$, diluído em PBS e incubadas por 16 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS a 0,05% de tween e bloqueadas com 100 μl /poço de PBS contendo, 1% de albumina bovina por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 50 μl /poço das amostras, do branco e da curva padrão dos recombinantes diluídos no tampão Tris-salina (20mM trizma base e 150 mM de NaCl) contendo 0.1% de albumina bovina e 0.05% de tween 20, durante 2 horas, à temperatura ambiente. O padrão foi diluído em concentrações seriadas (1:2), a partir da concentração inicial em pg/ml de cada kit, com sete diluições em duplicata. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada com 50 μl do anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 400 ng/ml por um período de 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada durante 20 minutos com avidina-peroxidase diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB dissolvido em 10 mL do tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5.0 e 2 μl de H_2O_2 e interrompida com ácido fosfórico a 0.05 M. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1.

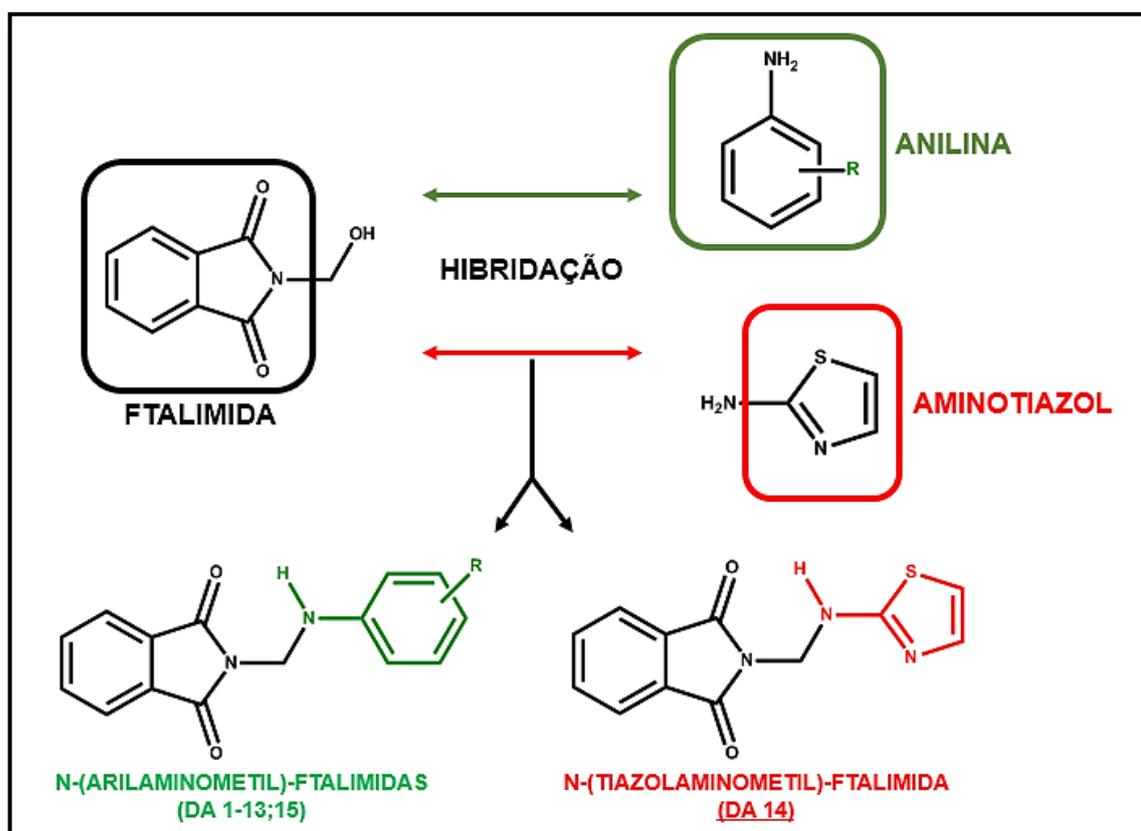
4.7.4 Análises estatísticas

Foi utilizada regressão não linear para calcular os valores de CC_{50} e IC_{50} . O one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Newman foram usadas para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $P < 0.05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism versão 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Planejamento estrutural

Diante de resultados promissores descritos na literatura, sob o ponto de vista farmacológico, análogos das ftalimidas, tiazóis e anilinas foram escolhidos como grupamentos farmacofóricos, para síntese da série dos 15 compostos candidatos a fármacos anti-inflamatórios. Seguindo o conceito da hibridação (**Esquema 4**), esses núcleos foram condensados a fim de obter moléculas com potencial atividade biológica e baixa citotoxicidade. Em 2015 Zhou e colaboradores relataram a atividade de N-(arilaminometil)-ftalimidas frente a uma enzima RSK2 na qual sua sobre-expressão e ativação está relacionada com alguns cânceres, como de mama e próstata (ZHOU *et al*, 2015).



Esquema 4: Planejamento da série química DA1-15. Fonte: Autor.

A partir de mais uma técnica química, o bioisosterismo, modificações nos radicais ligados a porção anilina foram realizados. Substituintes como halogênios (F, Cl, Br), metóxi, metil, etnil, inserção do grupamento aminotiazol, e variações na posição dos radicais (*orto*,

meta e para) foram utilizados para obtenção das 15 moléculas. Esta ferramenta permite que se estabeleça a análise da relação estrutura-atividade (REA) a fim de que seja possível definir a influência da modificação estrutural na atividade farmacológica das moléculas.

Feito o planejamento estrutural, procedeu-se a síntese e posteriormente avaliação farmacológica.

5.2 Obtenção das N-(arilaminometil)-ftalimidas e N-(tiazolaminometil)-ftalimida

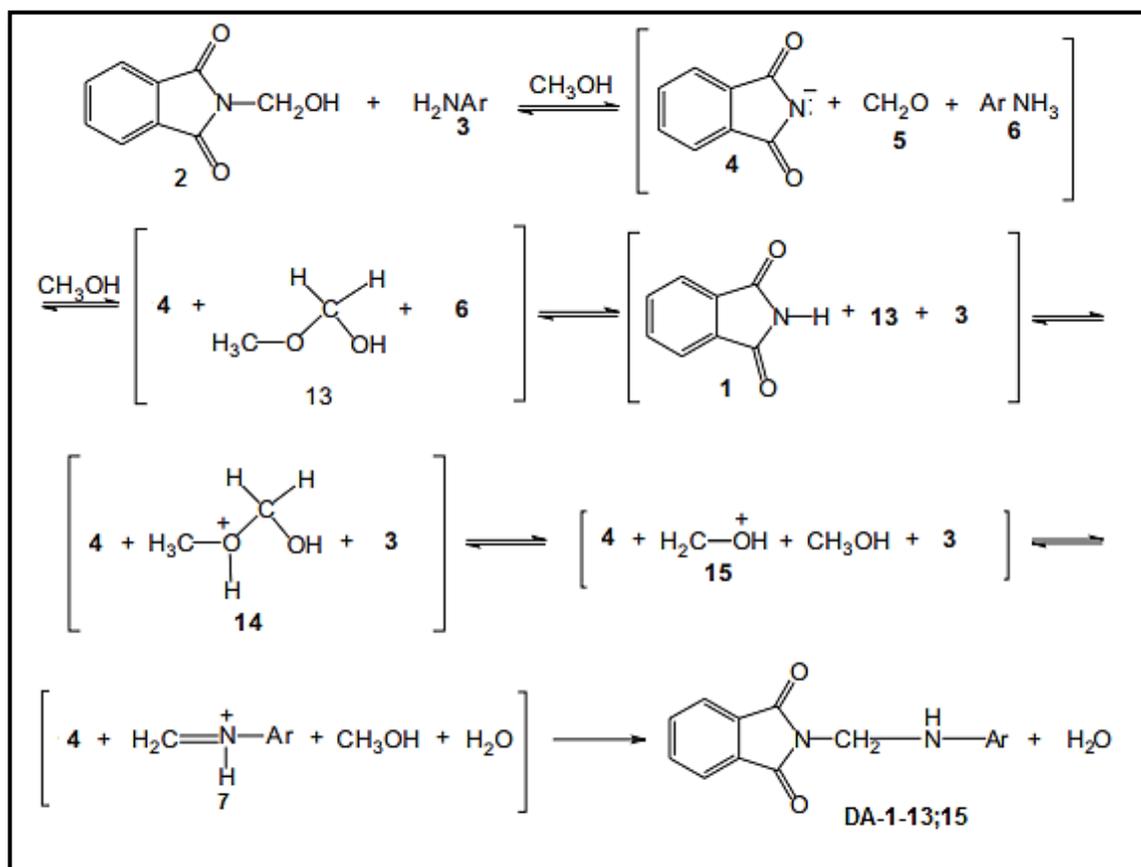
Com a obtenção dos compostos puros, dados físico-químicos como ponto de fusão (PF), rendimento e índice de retenção (Rf), foram determinados e estão demonstrados na **tabela 1**.

| MOLÉCULA | RENDIMENTO | PONTO DE FUSÃO (PF) | ÍNDICE DE RETENÇÃO (Rf) |
|----------|------------|---------------------|-------------------------|
| DA-1.1 | 57% | 207-210°C | 0,57 |
| DA-1.2 | 66,7% | 207-210°C | 0,52 |
| DA-1.3 | 50% | 170-172°C | 0,5 |
| DA-1.4 | 73,3% | 218-221°C | 0,52 |
| DA-1.5 | 76,6% | 146-149°C | 0,47 |
| DA-1.6 | 19,5% | 87-90°C | 0,71 |
| DA-1.7 | 29,5% | 166-168°C | 0,52 |
| DA-1.8 | 46,3% | 164-167°C | 0,59 |
| DA-1.9 | 55% | 130-133°C | 0,67 |
| DA-1.10 | 15,7% | 218-220°C | 0,59 |
| DA-1.11 | 57% | 206-209°C | 0,68 |
| DA-1.12 | 20,2% | 192-194°C | 0,71 |
| DA-1.13 | 47,6% | 173-175°C | 0,77 |
| DA-1.14 | 16,1% | 175-177°C | 0,48 |
| DA-1.15 | 34% | 160-163°C | 0,61 |

Tabela 1: Dados físico-químicos das N-(arilaminometil)-ftalimidas. Fonte: Autor.

O mecanismo de reação para formação destas moléculas foi proposto por SENA et al., em 2007. Primeiramente, a arilamina 3 capta o próton da N-hidroximetilftalimida 2 formando o ânion ftalimida 4, formaldeído 5 e amina protonada 6. As três moléculas estão solvatadas no metanol, o qual associa-se imediatamente com formaldeído formando um hemiacetal 13. O ânion 4 pode captar um próton de 6 produzindo ftalimida 1 e arilamina 3, ou alternativamente um próton pode ser transferido de 1 para 13 para que seja formado o hemiacetal 14 protonado e o ânion 4 de ftalimida. As moléculas estão em equilíbrio e são pares de íons próximos. Posteriormente, o hemiacetal protonado pode naturalmente perder metanol para permitir uma molécula de formaldeído protonado, o qual reage com arilamina para dar um íon imínico 7.

Com isso, o ânion ftalimida 4 ataca o átomo de carbono do íon imínico proporcionando o produto DA-1-13;15 (**Esquema 5**).



Esquema 5: Provável mecanismo de síntese dos compostos DA-1-13;15. Adaptado. Fonte: SENA et al., 2007.

As N-(arilaminometil)-ftalimidas foram elucidadas através de técnicas espectrofotométricas (RMN de ¹H e ¹³C, IV). A partir da análise espectroscópica na região do infravermelho (IV) foi possível constatar as principais bandas de absorção do composto DA-1.9 (**Figura 8**). A frequência de 3393 cm⁻¹ sugere a deformação axial N-H. Em 1702 e 1768 cm⁻¹ são caracterizados estiramentos de C=O de imida cíclica.

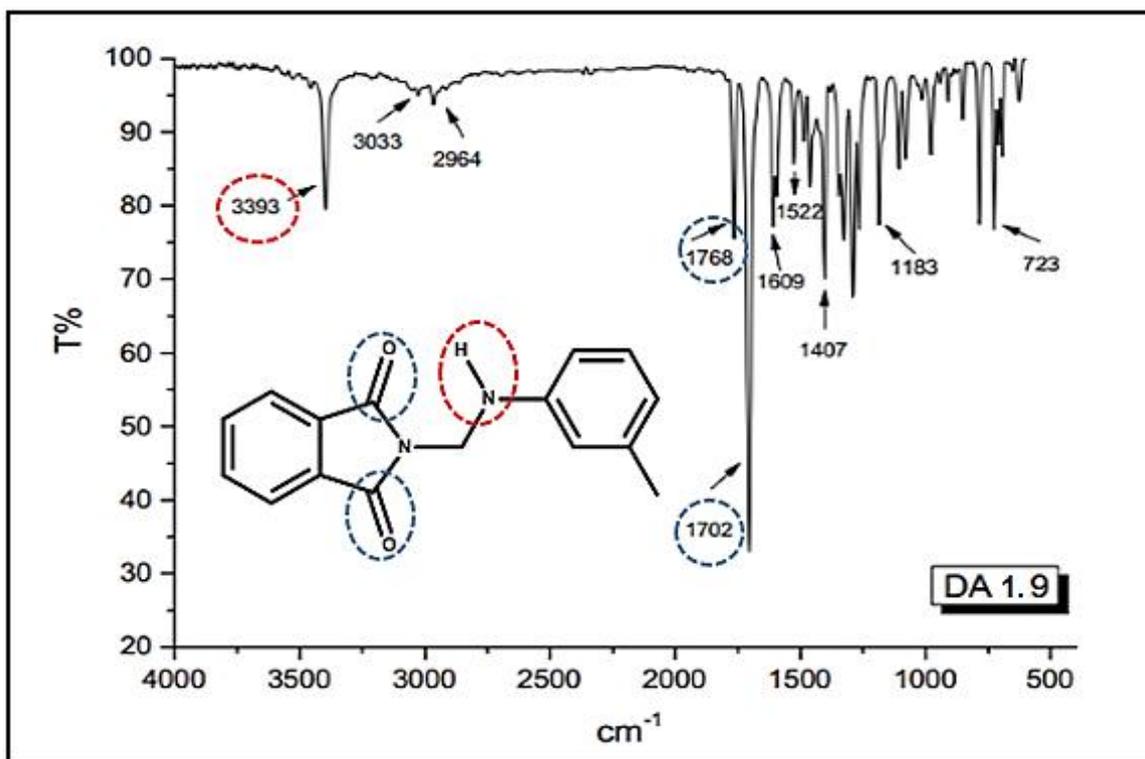


Figura 8: Espectro de IV da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

A **Figura 9A-C** mostra um exemplo de RMN ^1H do **composto DA-1.9**, onde foi detectado um singleto em 2.14 ppm, integrando para três hidrogênios, referente ao grupo metila da posição *meta* no anel benzênico, porção arilamina, da molécula. Em 4.97 ppm ($J=7.2$ Hz) observamos um dubleto, integrando para dois hidrogênios, referente ao grupo CH_2 da molécula. Em 6.39 ppm ($J=6.9$ Hz) identificamos um dubleto, integrando para um hidrogênio, referente ao hidrogênio ligado ao carbono 4 do anel benzênico ($\text{H-4}'$), porção arilamina. Em 6.46 ppm ($J=6.9$ Hz) verificamos a presença de um tripleto, integrando para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono 5 do anel benzênico ($\text{H-5}'$), porção arilamina. Em 6.59-6.63 ppm observamos um multipletto, integrando para dois hidrogênios, referentes aos hidrogênios 2 e 6 ligados ao anel benzênico ($\text{H-2}'$, $\text{H-6}'$), porção arilamina. Em 6.93 ppm ($J=7.5$ Hz) temos um tripleto, integrando para um hidrogênio, referente ao hidrogênio do grupo amina (NH) da molécula. Em 7.79-7.87 ppm identificamos um multipletto, integrando para quatro hidrogênios, referente aos hidrogênios que estão no anel aromático do grupamento ftalimida.

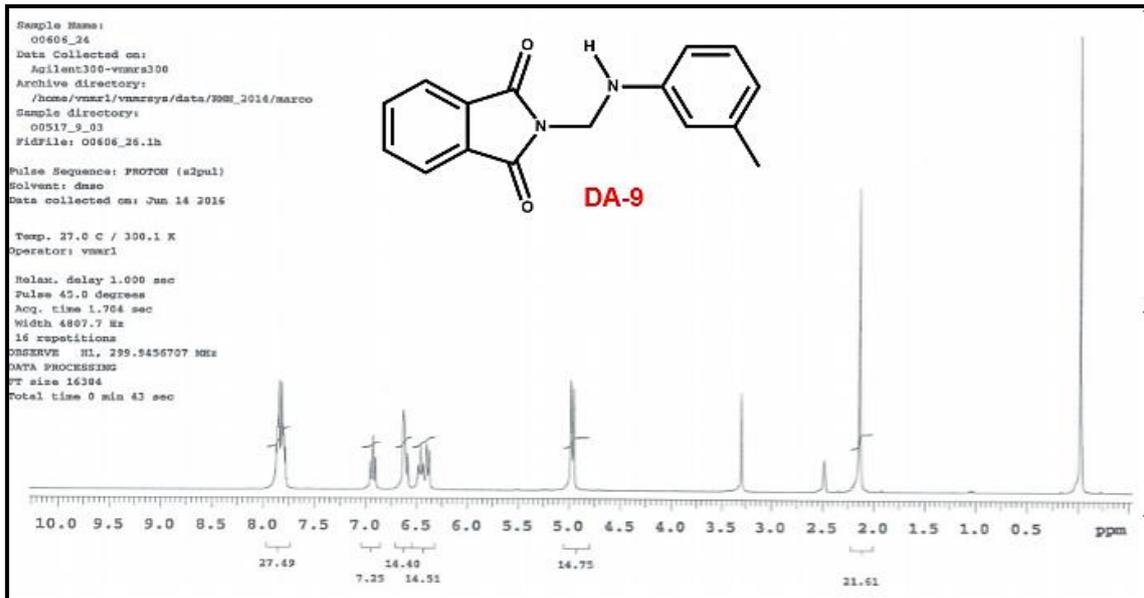


Figura 9A: Espectro de RMN de ^1H da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

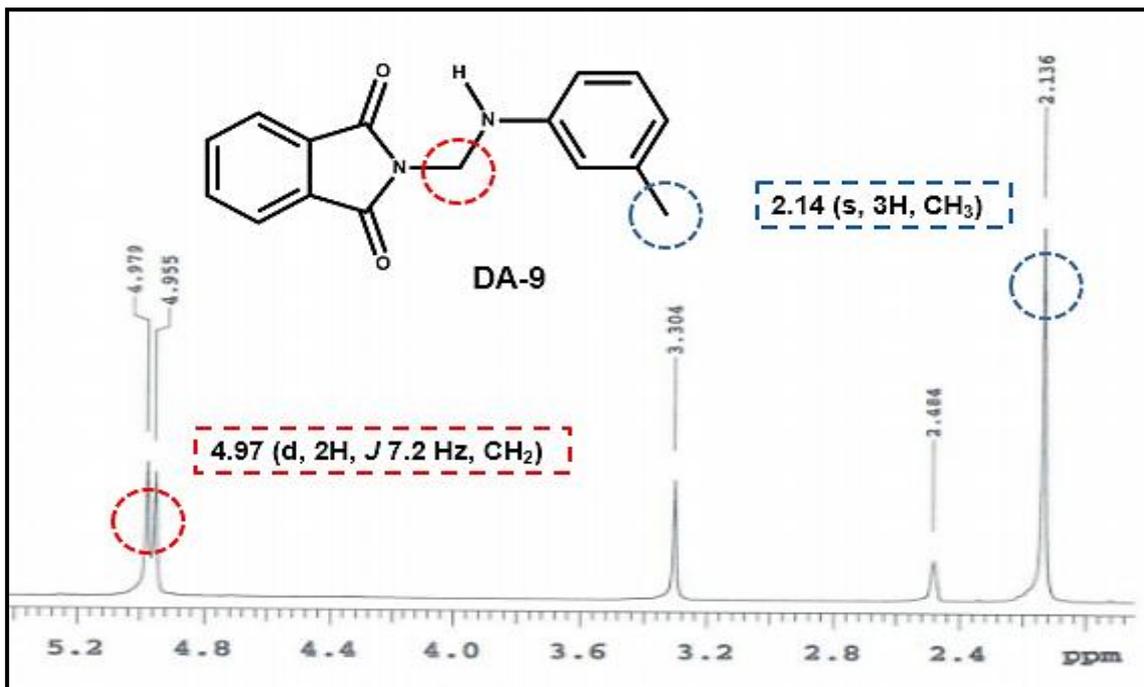


Figura 9B: Ampliação 1 - Espectro de RMN de ^1H da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

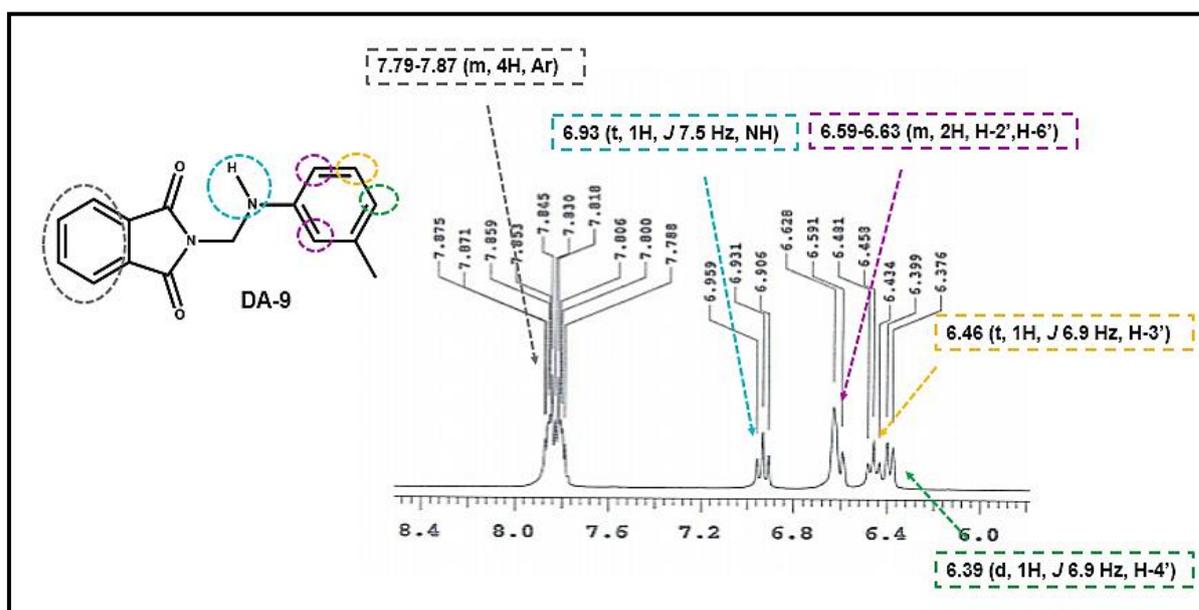


Figura 9C: Ampliação 2 - Exemplo de espectro de RMN de ^1H da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

Outra técnica de caracterização de compostos, é a ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C), representada na **Figura 10A-C** referente ao composto DA-1.9. O sinal em 21.25 ppm demonstra o sinal de carbono da metila CH_3 do composto. Em 47.05 ppm observamos o sinal de carbono do CH_2 da molécula. O sinal do $\text{C}6'$ do anel benzênico, porção arilamina, se apresenta em 109.6 ppm. Em 113.29 ppm identificamos o sinal referente ao carbono 2 ($\text{C}2'$) do anel benzênico, já em 118.06 ppm apresenta-se o sinal de carbono 4 ($\text{C}4'$) do anel benzênico, ambos da porção arilamina. O sinal em 123.15 ppm demonstra o sinal dos carbonos 5 e 8 do grupamento ftalimida da molécula. Em 128.74 ppm temos o sinal referente ao carbono 5 ($\text{C}5'$) do anel aromático da porção arilamina. Em 131.39 ppm observamos o sinal dos carbonos 4 e 9 da porção ftalimida, já em 134.59 ppm identificamos o sinal dos carbonos 6 e 7, também do grupamento ftalimida. O sinal do carbono 137.89 ppm representa o $\text{C}-\text{CH}_3$, que é o carbono 3 ($\text{C}3'$) do anel aromático da porção arilamina. Em 146.01 ppm temos o sinal do $\text{C}-\text{N}$, que é o carbono 1 ($\text{C}1'$) do anel aromático, grupamento arilamina. O sinal do carbono 167.95 ppm refere-se a carbonila $\text{C}=\text{O}$.

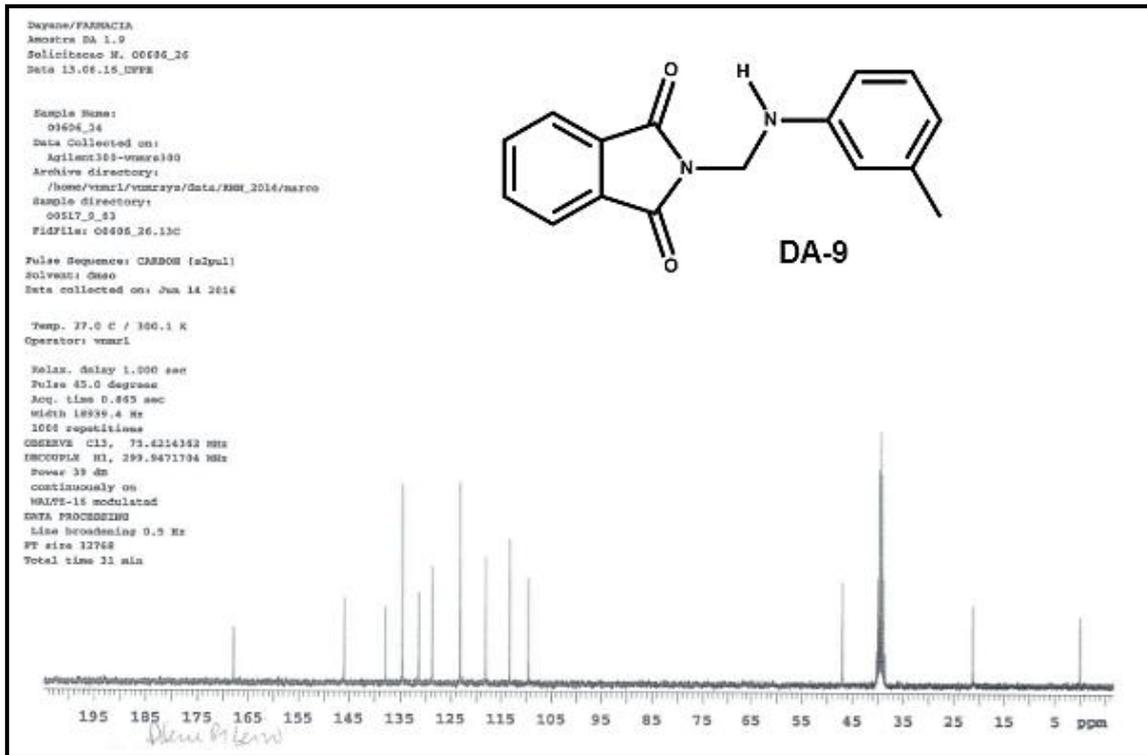


Figura 10A: Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

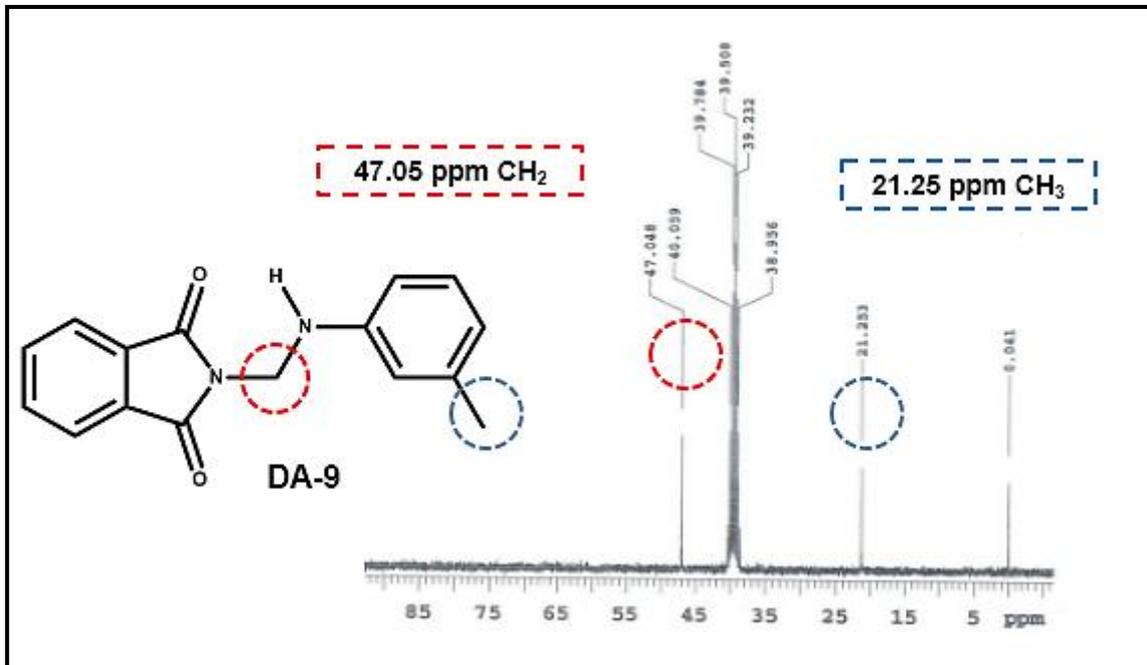


Figura 10B: Ampliação 1 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

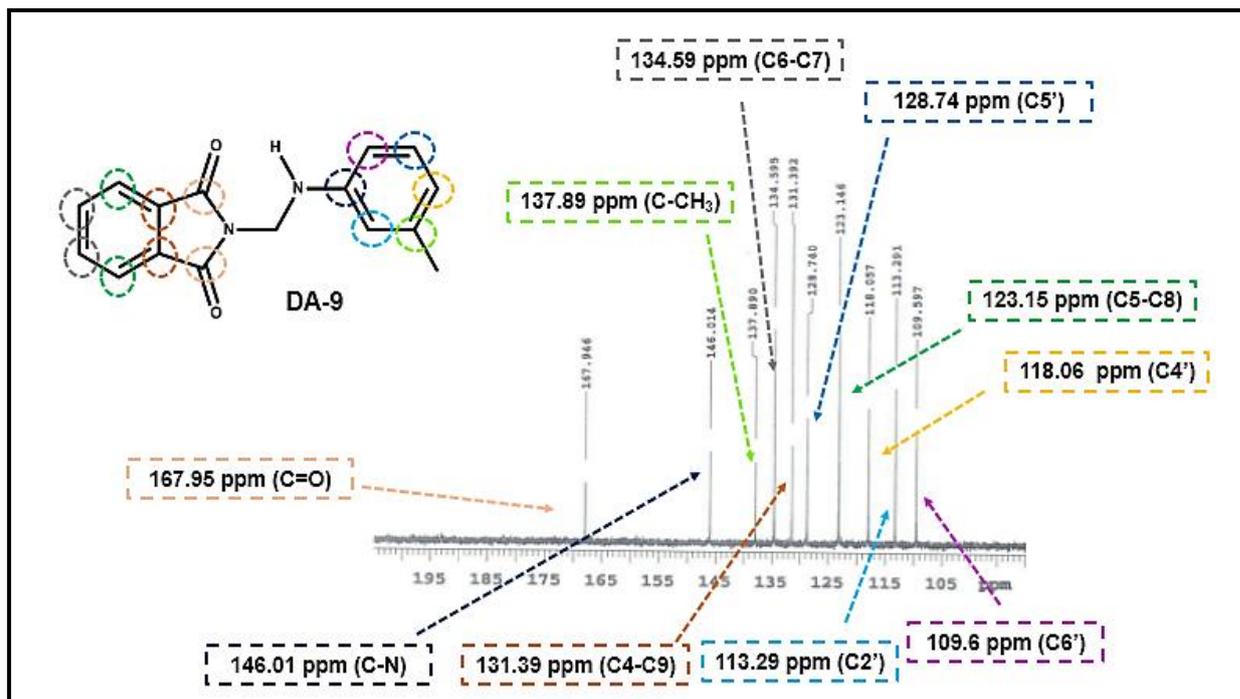


Figura 10C: Ampliação 2 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula DA-1.9. Fonte: Autor.

5.3 Dados espectroscópicos

Os dados espectroscópicos das *N*-(arilaminometil)-ftalimidas sintetizadas estão demonstrados a seguir, e a numeração das moléculas segue o padrão determinado na **figura 11**, para um melhor entendimento dos espectros.

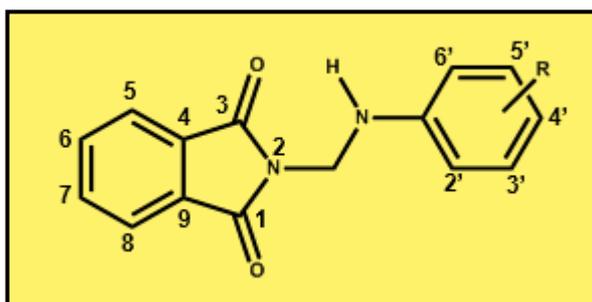
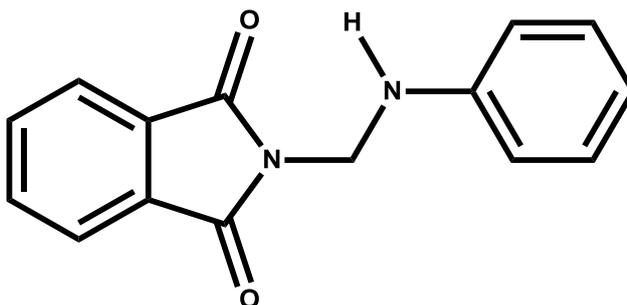


Figura 11: Estrutura geral das *N*-(arilaminometil)-ftalimidas. Fonte: Autor.

5.3.1 2-((Fenilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.1)



Sólido: pó amorfo, na cor amarela; Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}N_2O_2$; Massa molecular: 252,27 g/mol.

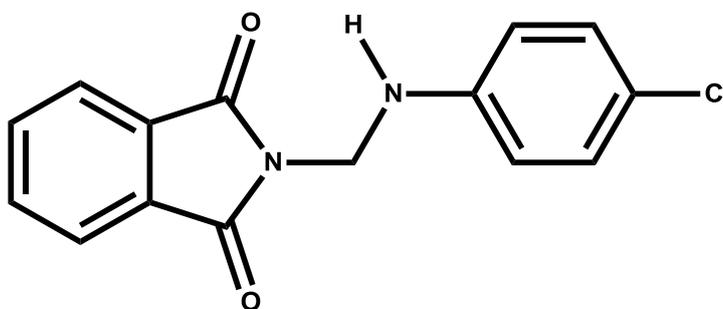
IV (KBr, cm^{-1}): 3377 (N-H); 1701 e 1769 (C=O).

RMN 1H : 4.99 (d, 2H, J 7.2 Hz, CH_2), 6.55-6.62 (m, 3H, $H_2'-H_4'-H_6'$), 6.83 (t, 1H, J 7.5 Hz, NH), 7.07 (t, 2H, $H_3'-H_5'$), 7.79-7.88 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 46.98 (CH_2), 112.43 ($C_2'-C_6'$), 117.15 (C_4'), 123.14 (C_5-C_8), 128.89 ($C_3'-C_5'$), 131.37 (C_4-C_9), 134.58 (C_6-C_7), 146.06 (C-N), 167.94 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{15}H_{12}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 253.09; valor encontrado: 248.99.

5.3.2 2 - (((4-Clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.2)



Sólido: pó amorfo, na cor amarela; Fórmula molecular: $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$; Massa molecular: 286,71 g/mol.

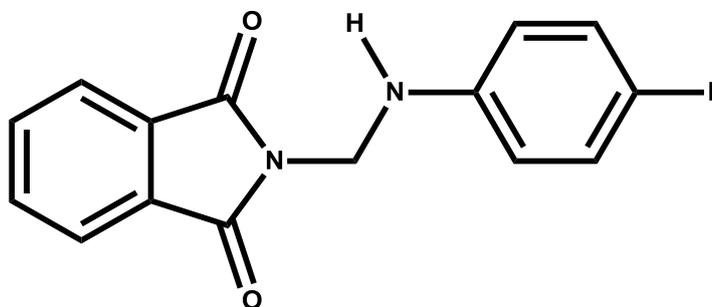
IV (KBr, cm^{-1}): 3380 (N-H); 1702 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 4.97 (d, 2H, J 7,2 Hz, CH_2), 6.38-6.48 (m, 2H, J 10,5 Hz, $H_2'-H_6'$), 6.61 (d, 2H, J 11,1 Hz, $H_3'-H_5'$), 6.93 (t, 1H, J 7,5 Hz, NH), 7.79-7.87 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 47.36 (CH_2), 114,43 ($C_2'-C_6'$), 121.1 (C_5-C_8), 123.7 (C-Cl), 129.1 ($C_3'-C_5'$), 131.86 (C_4-C_9), 135.15 (C_6-C_7), 145.63 (C-N), 168.42 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ $[M+H]^+$: 287.05; valor encontrado: 286,055.

5.3.3 2 - (((4-Fluorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.3)



Sólido: pó amorfo bege; Fórmula molecular: $C_{15}H_{11}FN_2O_2$; Massa molecular: 270,26 g/mol.

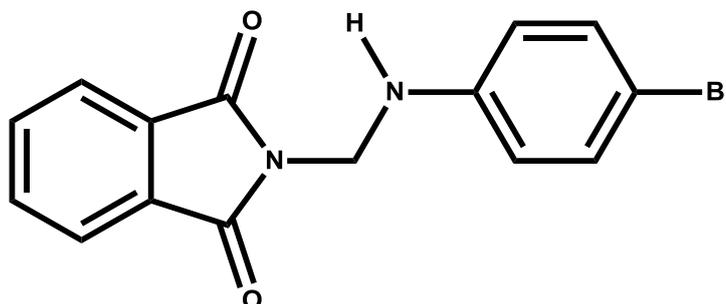
IV (KBr, cm^{-1}): 3399 (N-H); 1702 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 4.97 (d, 2H, J 7.8 Hz, CH_2), 6.55 (t, 1H, J 7.5 Hz, NH), 6.84-6.79 (m, 2H, $H_{3'}-H_{5'}$), 6.95-6.89 (m, 2H, $H_{2'}-H_{6'}$), 7.81-7.89 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : RMN C^{13} : 47.43 (CH_2), 113.44 ($C_{3'}-C_{5'}$), 115.27 ($C_{2'}-C_{6'}$), 123.19 (C_5-C_8), 131.37 (C_4-C_9), 134.62 (C_6-C_7), 142.68 (C-N), 155.03 (C-F), 167.99 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{15}H_{11}FN_2O_2$ $[M+H]^+$: 271.08; valor encontrado: 270.203.

5.3.4 2 - (((4-Bromofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.4)



Sólido: pó amorfo amarelo; Fórmula molecular: $C_{15}H_{11}BrN_2O_2$; Massa molecular: 331,16 g/mol.

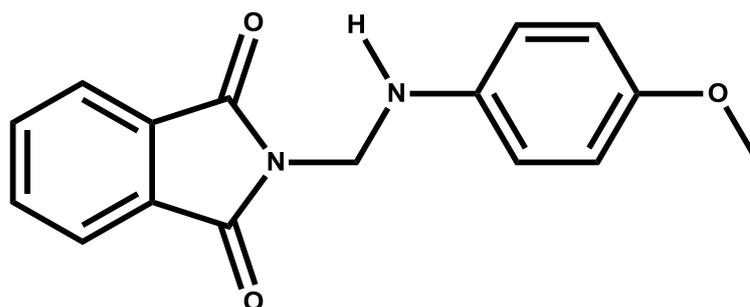
IV (KBr, cm^{-1}): 3386 (N-H); 1702 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 4.97 (d, 2H, J 6.9 Hz, CH_2), 6.79 (d, 2H, J 8.7 Hz, $H_{2'}-H_{6'}$), 6.84 (t, 1H, J 7.2 Hz, NH), 7.22 (d, 2H, J 8.7 Hz, $H_{3'}-H_{5'}$), 7.82-7.90 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ¹³C: 46.76 (CH₂), 108.065 (C2'-C6'), 114.5 (C-Br), 123.22 (C5-C8), 131.36 (C4-C9), 131.42 (C6-C7), 134.66 (C3'-C5'), 145.52 (C-N), 162.92 (C=O).

EMAR: Valor calculado para C₁₅H₁₁BrN₂O₂ [M+H]⁺: 331.00; valor encontrado: 331.943.

5.3.5 2 - (((4-Metoxifenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.5)



Sólido: pó amorfo amarelo; Fórmula molecular: C₁₆H₁₄N₂O₃; Massa molecular: 282,29 g/mol.

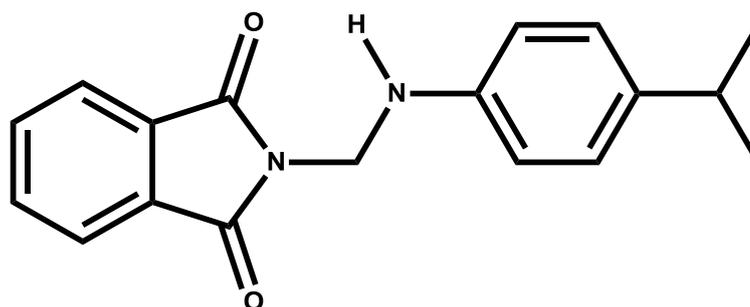
IV (KBr, cm⁻¹): 3360 (N-H); 1702 e 1768 (C=O).

RMN ¹H: 3.60 (s, 3H, CH₃), 4.96 (d, 2H, *J* 7.8 Hz, CH₂), 6.15 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, NH), 6.69 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, H₂'-H₆'), 6.77 (d, 2H, *J* 9.6 Hz, H₃'-H₅'), 7.8-7.88 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ¹³C: 47.89 (CH₃), 55.16 (CH₂), 113.78 (C3'-C5'), 114.49 (C2'-C6'), 123.13 (C5-C8), 131.38 (C4-C9), 134.58 (C6-C7), 139.84 (C-N), 151.64 (C-O-CH₃), 167.996 (C=O).

EMAR: Valor calculado para C₁₆H₁₄N₂O₃ [M+H]⁺: 283.10; valor encontrado: 282.118.

5.3.6 2 - (((4-Isopropilfenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.6)



Sólida: pó amorfo amarelo; Fórmula molecular: $C_{18}H_{18}N_2O_2$; Massa molecular: 294,35 g/mol.

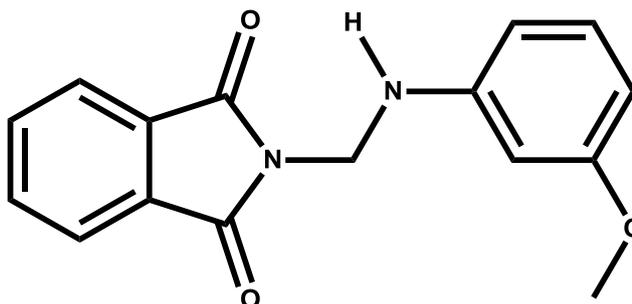
IV (KBr, cm^{-1}): 3373 (N-H); 1709 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 1.09 (d, 3H, J 6.9 Hz, CH_3), 2.69 (m, 1H, J 6,9 Hz, CH), 4.98 (d, 2H, J 7.2 Hz, CH_2), 6.39 (t, 1H, J 7.2 Hz, NH), 6.75 (d, 2H, J 9,0 Hz, $H_{2'}-H_{6'}$), 6.94 (d, 2H, J 8.1 Hz, $H_{3'}-H_{5'}$), 7.8-7.88 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 24.09 (CH_3), 32.41 (CH), 47.23 (CH_2), 112.42 ($C_{2'}-C_{6'}$), 123.15 (C_5-C_8), 126.61 ($C_{3'}-C_{5'}$), 131.39 (C_4-C_9), 134.58 (C_6-C_7), 137.06 ($C_{4'}$), 143.90 (C-N), 167.96 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{18}H_{18}N_2O_2 [M+H]^+$: 295.14; valor encontrado: 294.14.

5.3.7 2 - (((3-Metoxifenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.7)



Sólido: pó amorfo bege; Fórmula molecular: $C_{16}H_{14}N_2O_3$; Massa molecular: 282,29 g/mol.

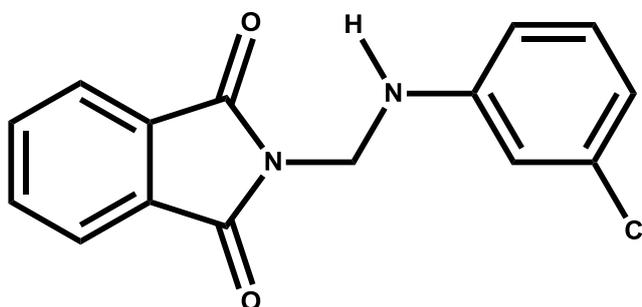
IV (KBr, cm^{-1}): 3386 (N-H); 1709 e 1762 (C=O).

RMN 1H : 3.66 (s, 3H, CH_3), 4.98 (d, 2H J 7.2 Hz, CH_2), 6.15-6.18 (m, 1H, $C_{2'}$), 6.38-6.41 (m, 1H, $C_{4'}$), 6.45-6.46 (m, 1H, $C_{6'}$), 6.63 (t, 1H, $C_{5'}$), 6.96 (t, 1H J 7.5 Hz, NH), 7.81-7.9 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 46.94 (CH_3), 54.6 (CH_2), 97.99 ($C_{2'}$), 102.81 ($C_{6'}$), 105.55 ($C_{4'}$), 123.18 ($C_{5'}$), 129.61 (C_5-C_8), 131.38 (C_4-C_9), 134.63 (C_6-C_7), 147.42 (C-N), 160.28 (C-O- CH_3), 167.95 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{16}H_{14}N_2O_3 [M+H]^+$: 283.10; valor encontrado: 282.100.

5.3.8 2 - (((3-Clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.8)



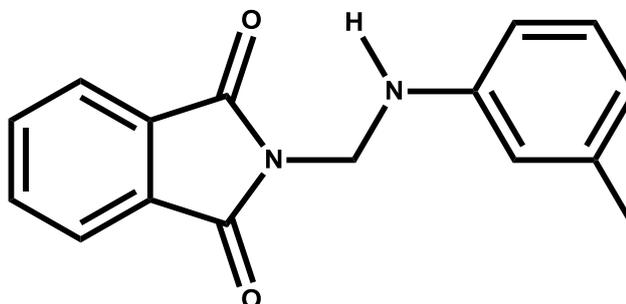
Sólido: pó amorfo branco brilhoso; Fórmula molecular: $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$; Massa molecular: 286,71 g/mol;

IV (KBr, cm^{-1}): 3386 (N-H); 1709 e 1762 (C=O).

RMN 1H : 4.98 (d, 2H, J 6.9 Hz, CH_2), 6.6 (d, 1H, J 8.1 Hz, H-6'), 6.77 (d, 1H, J 8.1 Hz, H-4'), 6.9 (s, 1H, H-2'), 6.97 (t, 1H, J 6.9 Hz, NH), 7.08 (t, 1H, J 8.4 Hz, H-5'), 7.82-7.91 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 46.57 (CH_2), 111.16 ($C6'$), 111.82 ($C2'$), 116.57 ($C5'$), 123.24 ($C4'$), 130.38 ($C5-C8$), 131.36 ($C4-C9$), 133.63 ($C6-C7$), 134.66 (C-Cl), 147.81 (C-N), 167.91 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ $[M+H]^+$: 287.05; valor encontrado: 286.083.

5.3.9 2 - ((*m*-Tolilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.9)

Sólido: pó amorfo branco; Fórmula molecular: $C_{16}H_{14}N_2O_2$; Massa molecular: 266,29 g/mol.

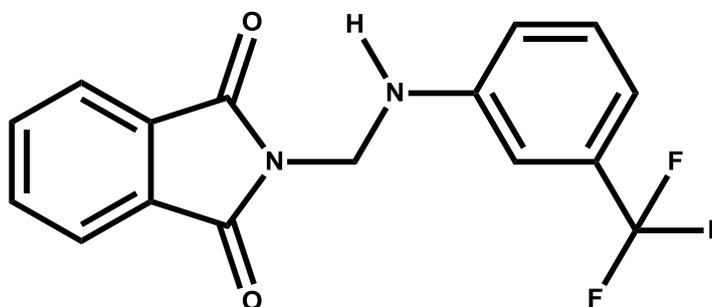
IV (KBr, cm^{-1}): 3393 (N-H); 1702 e 1768 (C=O).

RMN ¹H: 2.14 (s, 3H, CH₃), 4.97 (d, 2H, *J* 7.2 Hz, CH₂), 6.39 (d, 1H, *J* 6.9 Hz, H-4'), 6.46 (t, 1H, *J* 6.9 Hz, H-5') 6.59-6.63 (m, 2H, H-2', H-6'), 6.93 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, NH), 7.79-7.87 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ¹³C: 21.25 (CH₃), 47.05 (CH₂), 109.6 (C6'), 113.29 (C2'), 118.06 (C4'), 123.15 (C5-C8), 128.74 (C5'), 131.39 (C4-C9), 134.59 (C6-C7), 137.89 (C-CH₃), 146.01 (C-N), 167.95 (C=O).

EMAR: Valor calculado para C₁₆H₁₄N₂O₂ [M+H]⁺: 267.11; valor encontrado: 266.112.

5.3.10 2 - (((3- (Trifluorometil) fenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.10)



Sólido: pó amorfo branco; Fórmula molecular: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂; Massa molecular: 320,27 g/mol.

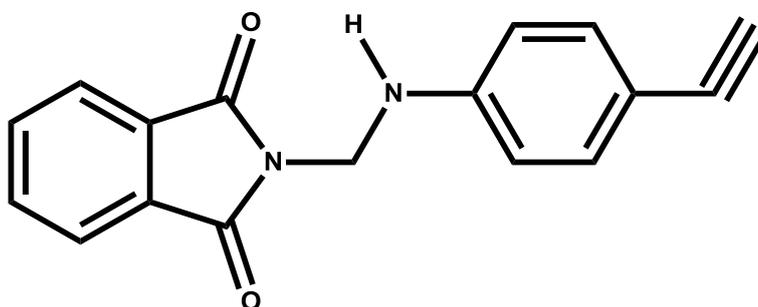
IV (KBr, cm⁻¹): 3406 (N-H); 1709 e 1768 (C=O).

RMN ¹H: 5.03 (d, 2H, *J* 7.2 Hz, CH₂), 6.88 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-6'), 7.09 (d, 1H, *J* 8.1, H-4'), 7.14 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, H-5') 7.18 (s, 1H, H-2') 7.29 (t, 1H, *J* 7,5 Hz, NH), 7.81-7.91 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ¹³C: 46.49 (CH₂), 108.4 (C2'), 113.08 (C4'), 116.06 (C6'), 123.26 (C5-C8), 129.82 (C-F₃), 131.37 (C5'), 134.68 (C4-C6-C7-C9), 146.85 (C-N), 167.94 (C=O).

EMAR: Valor calculado para C₁₆H₁₁F₃N₂O₂ [M+H]⁺: 321.08; valor encontrado: 320.054.

5.3.11 2 - (((4-Etínilfenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.11)



Sólido: pó amorfo amarelo; Fórmula molecular: $C_{17}H_{12}N_2O_2$; Massa molecular: 276,29 g/mol.

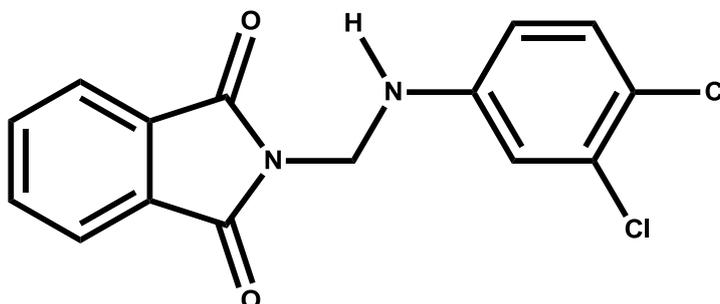
IV (KBr, cm^{-1}): 3386 (N-H); 1709 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 3.81 (s, 1H, CH), 4,99 (d, 2H, J 6.9 Hz, CH_2), 6,81 (d, 2H, J 9 Hz, H-2'; H-6') 7.04 (t, 1H, J 6.9 Hz, NH), 7.2 (d, 2H, J 8.7 Hz, H-3'; H-5'), 7.82-7.9 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 46.48 (CH_2), 77.85 ($C\equiv C$), 84.51 (C-Ar), 109.61 ($C4'$), 112.31 ($C2'-C6'$), 123.22 ($C5-C8$), 131.36 ($C3'-C5'$), 132.71 ($C4-C9$), 134.65 ($C6-C7$), 146.75 (C-N), 167.85 (C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{17}H_{12}N_2O_2 [M+H]^+$: 277.09; valor encontrado: 276.100.

5.3.12 2 - (((3,4-Diclorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.12)



Sólido: pó amorfo bege; Fórmula molecular: $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$; Massa molecular: 321,16 g/mol.

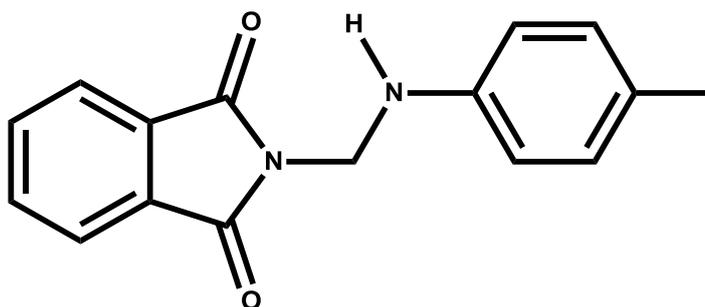
IV (KBr, cm^{-1}): 3413 (N-H); 1709 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 4.97 (d, 2H, J 7.2 Hz, CH_2), 6.8 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-2'), 7.08 (s, 1H, H-6'), 7.11 (t, 1H, J 7,2 Hz, NH), 7.28 (d, 1H, J 9 Hz, H-3') 7.81-7.91 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ¹³C: 46.48 (CH₂), 113.06 (C2'), 113.43 (C6'), 118.06 (C4'), 123.27 (C5-C8), 130.51 (C3'), 131.27 (C4-C9), 131.35 (C6-C7), 134.69 (C5'), 146.51 (C-N), 167.92 (C=O).

EMAR: Valor calculado para C₁₅H₁₀Cl₂N₂O₂ [M+H]⁺: 321.01; valor encontrado: 320.148.

5.3.13 2 - ((*p*-Tolilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.13)



Sólido: pó amorfo amarelo; Fórmula molecular: C₁₆H₁₄N₂O₂; Massa molecular: 266,29 g/mol.

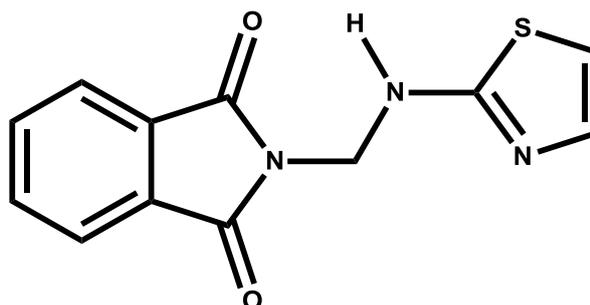
IV (KBr, cm⁻¹): 3373 (N-H); 1709 e 1768 (C=O).

RMN ¹H: 2.105 (s, 3H, CH₃), 4.98 (d, 2H, *J* 7.5 Hz, CH₂), 6.34 (t, 1H, *J* 7.2 Hz, NH), 6.72 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, H-2'; H-6'), 6.88 (d, 2H, *J* 8.1 Hz, H-3'; H-5'), 7.8-7.88 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ¹³C: 19.96 (CH₃), 47.32 (CH₂), 112.67 (C2'-C6'), 123.13 (C5-C8), 125.66 (C4'), 129.305 (C3'-C5'), 131.37 (C4-C9), 134.58 (C6-C7), 143.62 (C-N), 167.94 (C=O).

EMAR: Valor calculado para C₁₆H₁₄N₂O₂ [M+H]⁺: 267.11; valor encontrado: 266.068.

5.3.14 2 - ((Tiazol-2-ilamino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.14)



Sólido: pó amorfo marrom claro; Fórmula molecular: $C_{12}H_9N_3O_2S$; Massa molecular: 259,28 g/mol.

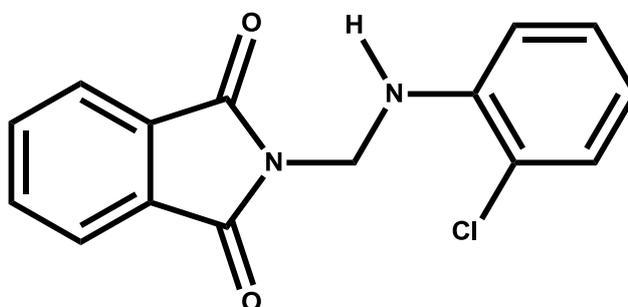
IV (KBr, cm^{-1}): 3213 (C-N); 1716 e 1775 (C=O).

RMN 1H : 5.11 (s, 2H, CH_2), 6.66 (s, 1H, C5' tiazol), 7.02 (s, 1H, C4' tiazol), 7.85 (s, 4H, Ar ftalimida), 8.27 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C : 47.1 (CH_2), 107.63 (C5'), 123.215 (C5-C8), 131.41 (C4-C9), 134.63 (C6-C7), 138.6 (C4'), 167.11 (C-N - C=O).

EMAR: Valor calculado para $C_{12}H_9N_3O_2S$ $[M+H]^+$: 260.04; valor encontrado: 260.054.

5.3.15 2 - (((2-Clorofenil) amino) metil) isoindolina-1,3-diona (DA 1.15)



Sólido: pó amorfo cinza claro; Fórmula molecular: $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$; Massa molecular: 286,71 g/mol.

IV (KBr, cm^{-1}): 3386 (N-H); 1709 e 1768 (C=O).

RMN 1H : 4.98 (d, 2H, J 6.8 Hz, CH_2), 6.59 (d, 1H, J 8 Hz, H6'), 6.77 (d, 1H, J 8 Hz, H3'), 6.96 (t, 1H, J 6,8 Hz, NH), 7.07 (t, 1H, J 8.4 Hz, H4'), 7.08 (t, 1H, J 8 Hz, H5'), 7.82-7.91 (m, 4H, Ar ftalimida).

RMN ^{13}C : 46.57 (CH_2), 111.16 (C6'), 111.81 (C2'), 116,58 (C4'), 123.25 (C5-C8), 130.39 (C5'), 131.36 (C3'), 133.63 (C4-C9), 134.67 (C6-C7), 147.79 (C-N), 167.93 (C=O).

5.4 Avaliação Farmacológica

O Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz/Bahia) realizou ensaios biológicos dos 15 compostos sintetizados frente ao TNF- α , dosagem de NO, e testes de citotoxicidade dos compostos.

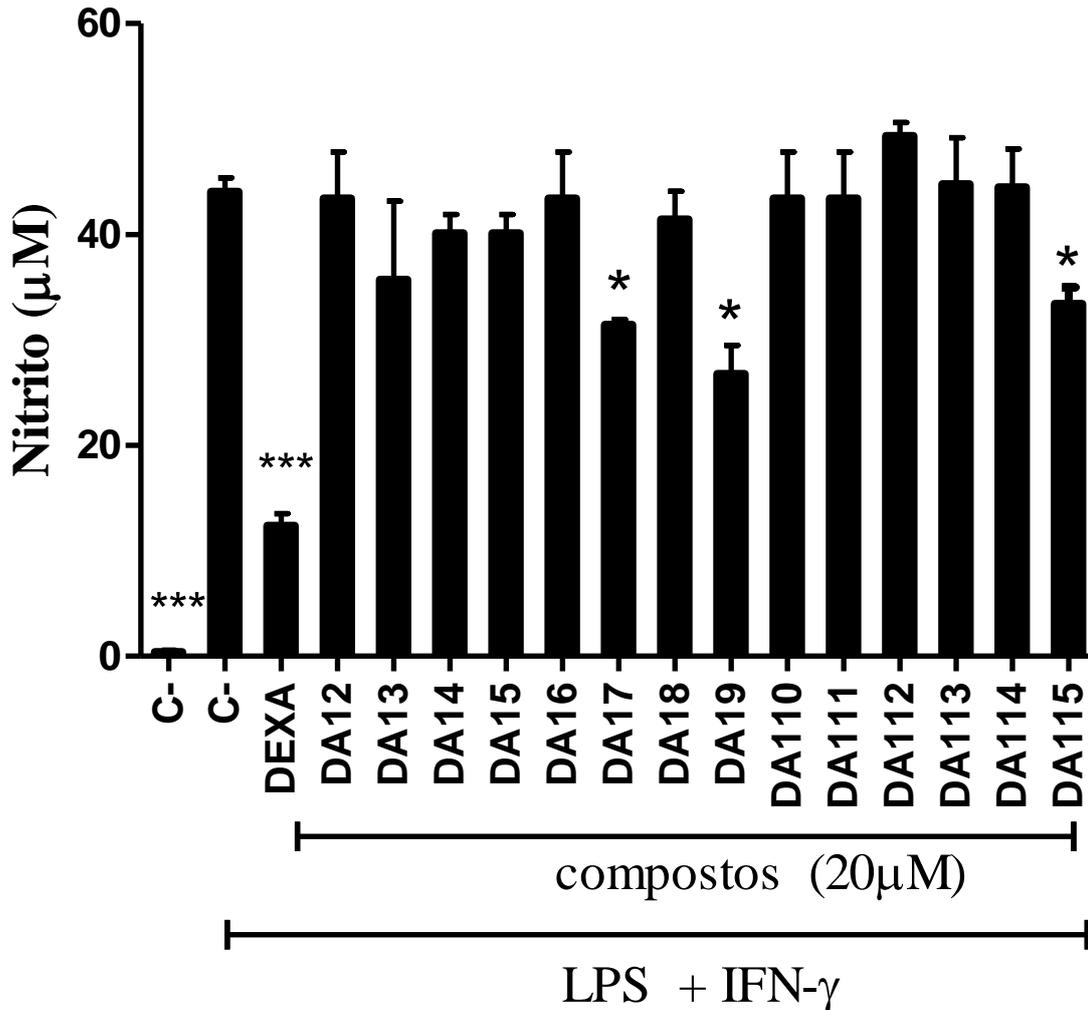


Figura 12: Triagem dos compostos frente a produção de óxido nítrico por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ e tratados com os compostos na concentração de 20 μ M. A dexametasona (Dexa) foi utilizada como inibidor de referência. Determinado 24 h após tratamento pelo método de Griess. Barra de erros expressam o desvio padrão. (ANOVA one-way): *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ em comparação com o C- estimuladas e não-tratadas.

O óxido nítrico em altos níveis é analisado como um biomarcador em processos inflamatórios, já que sua produção pela óxido nítrico sintase (iNOS) encontra-se em excesso nos distúrbios inflamatórios, sendo assim um bom alvo para fármacos anti-inflamatórios. Os

compostos sintetizados foram avaliados diante dos seus efeitos inibitórios frente a produção do NO em células de macrófagos J774, os quais foram estimulados por LPS e INF- γ . Estas células foram tratadas com as moléculas na concentração de 20 μ M, e o fármaco anti-inflamatório esteroideal Dexametasona (Dexa) foi utilizado como inibidor de referência.

De acordo com o resultado descrito na **figura 12**, observa-se que os compostos DA 1.7, 1.9 e DA 1.15, apresentaram inibição significativa sobre o NO. As duas moléculas, DA 1.7 e DA 1.9, apresentam seus radicais substituídos na posição *meta*, como também os compostos DA 1.8 e DA 1.10. Contudo, DA 1.7 e DA 1.9 apresentam substituintes que são classificados como Ativadores do Anel Aromático, que são os radicais $-\text{OCH}_3$ (efeito de ressonância doador de elétrons), e $-\text{CH}_3$ (efeito indutivo doador de elétrons), respectivamente. Essa similaridade pode contribuir para a atividade inibitória da produção de NO destas moléculas, visto que, estes dois compostos apresentam tais características sobre o biomarcador.

Já os compostos DA 1.8 e DA 1.10, detém radicais que desativam o anel aromático, que são $-\text{Cl}$ (efeito indutivo retirador de elétrons – desativador fraco), e $-\text{CF}_3$ (efeito indutivo retirador de elétrons – desativador forte), respectivamente. Esse fator pode contribuir para a carência de atividade inibitória destes compostos frente ao NO, já que mesmo apresentando radicais na posição *meta* os compostos não demonstraram inibição sobre ele.

A molécula DA 1.15 também demonstrou atividade significativa sobre a produção de óxido nítrico, mesmo apresentando um radical, na porção anilina, desativador de anel aromático, o $-\text{Cl}$ (Cloro). A sua particularidade refere-se a posição do radical, que está em *orto*, isso pode ter contribuído para melhoria da atividade biológica.

Os outros compostos com substituintes na posição *para*, sendo os radicais tanto ativadores como desativadores do anel aromático, não produziram atividade frente a inibição do óxido nítrico. O composto DA 1.12 (radicais di-Cloro), o composto DA 1.14 (hibridização com o tiazol), assim como o não substituído DA 1.1, também não diminuíram a produção do NO.

| Compostos | Citotoxicidade CC ₅₀ ± S.D (µM) | % Inibição do NO (Valor ± D.P) |
|---------------|---|--------------------------------|
| DA1.7 | >100 | 32±0.4 |
| DA1.9 | >100 | 38±0.9 |
| DA1.15 | >100 | 22±0.4 |
| DEXA | 91.1±1.9 | 63±1.5 |
| VG | 2.8±0.1 | - |

Tabela 2: Citotoxicidade avaliada frente a macrófagos J774 e porcentagem de inibição do óxido nítrico (NO). VG = violeta de genciana. D.P. = desvio padrão.

A **tabela 2** mostra que a citotoxicidade dos compostos com atividades significativas, é maior que **100 µM**, sendo menos tóxico que a dexametasona (composto de referência). Diante desta tabela, também é detectado que o composto **DA 1.9** apresentou atividade mais significativa diante dos demais, sendo assim, ele foi testado em concentrações de 20, 10 e 2.5 uM, a fim de verificar a relação entre a dose/concentração e a resposta biológica da molécula frente ao óxido nítrico e TNF- α (**Figura 13 e 14**).

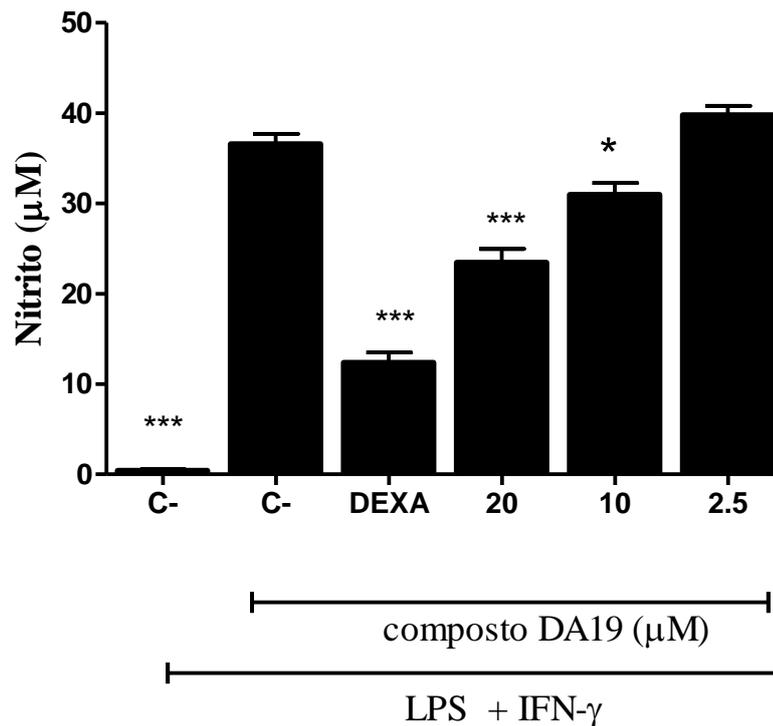


Figura 13: Curva concentração-resposta frente a produção de óxido nítrico por macrófagos J774 estimulados com LPS e $\text{INF-}\gamma$ e tratados com o composto DA 1.9 nas concentrações de 20, 10 e 2.5 μM . A dexametasona (Dexa) foi utilizada como inibidor de referência. Determinado 24 h após tratamento pelo método de Griess. (ANOVA one-way): *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ em comparação com o C- estimuladas e não-tratadas.

Na dose de 20 μM (**Figura 13**) o composto DA 1.9 apresentou resposta mais significativa do que a dose de 10 μM , mostrando que com a diminuição da concentração utilizada, ocorre menor inibição da produção de NO induzido por LPS e $\text{INF-}\gamma$ em macrófagos J774, ou seja, a resposta se dá de acordo com o aumento da dose. Com a dose de 2.5 μM , a molécula não demonstrou atividade.

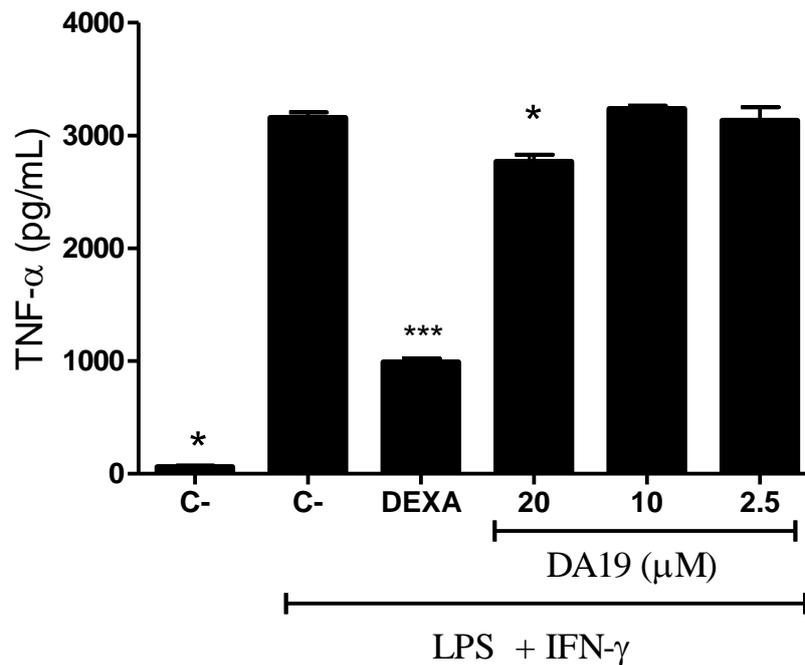


Figura 14: Secreção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ e tratados com o composto DA19 nas concentrações de 20, 10 e 2.5 μ M. A dexametasona (Dexa) foi utilizada como inibidor de referência. Determinado 4 h após tratamento pelo método do ELISA. (one-way ANOVA): *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ em comparação com o C- estimuladas e não-tratadas.

Sabendo que a inflamação envolve a ativação de citocinas pró-inflamatórias e que os análogos da talidomida apresentam atividade frente a inibição de TNF- α , o efeito da molécula DA 1.9, foi avaliado em três diferentes concentrações, em relação a expressão do TNF- α foi estudada em macrófagos J774 estimulados por LPS e IFN- γ (**Figura 14**). Na figura 14, temos que na concentração de 20 μ M o composto DA 1.9 inibe, de forma não tão significativa quanto a dexametasona, a produção de TNF- α . Porém, também mostraram que a atividade foi dose dependente, assim como em relação ao NO. Nas concentrações de 10 e 2.5 μ M, o DA 1.9 não foi efetivo para inibir o TNF- α .

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Foram sintetizadas e analisadas estruturalmente através de técnicas espectroscópicas uma série de 14 derivados *N*-(arilaminometil)ftalimidas e 1 *N*-(tiazolaminometil)ftalimidas. Metodologias simples foram utilizadas e os compostos obtidos apresentaram-se puros, com rendimentos que variaram de 16 a 77%.
- A partir dos resultados, pode-se indicar que a presença de radicais ativadores do anel aromático na posição *meta*, pode contribuir para inibição do óxido nítrico pelos compostos, já que, o DA-1.7 e principalmente o **DA-1.9** exibiram atividade, acarretando inibição do biomarcador NO. Outro fator detectado foi que a resposta do composto **DA-1.9**, tanto para inibir NO como TNF- α depende da concentração utilizada, ou seja, é dose-dependente.
- A posição *orto* também parece ser benéfica para inibição do NO, já que o composto DA 1.15 apresentou atividade relevante, porém, para melhor conclusão deste ponto, seria necessária a síntese de mais compostos com radicais nesta posição a fim de melhorar esta relação estrutura X atividade.
- Estes três compostos apresentaram melhor toxicidade do que o composto de referência, mostrando assim, mais um ponto promissor destas moléculas.
- Um maior número de modificações estruturais pode ser utilizado a fim de melhorar a relação estrutura-atividade de *N*-(arilaminometil)-ftalimidas, e assim, incrementar mais o estudo.
- Assim como, pode-se avaliar a atividade *in vivo* da molécula **DA-1.9** sobre os mediadores da inflamação, a fim de rastrear de forma mais completa seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, I.S. **Imunologia Celular e Molecular** Tradução de FARIAS, A. S., 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.
- ABDEL-AZIZ, A. A. M.; EL-AZAB, A. S.; ATTIA, S. M.; AL-OBAID, A. M.; AL-OMAR, M. A.; EL-SUBBAGH, H. I. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents, **Eur. J. Med. Chem.** 46 (2011) 4324–4329. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.002.
- AKGÜN, H.; KARAMELEKOĞLU, İ.; BERK, B.; KURNAZ, I.; SARIBIYIK, G.; ÖKTEM, S. *et al.*, Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 20, p. 4149–4154, 2012.
- AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. - Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J.**, v. 4, p. 2860-67, 1990. Review.
- ALANAZI, A. M.; EL-AZAB, A. S.; AL-SUWAIDAN, I. A.; ELTAHIR, K. E. H.; ASIRI, Y. A.; ABDEL-AZIZ, N. I. *et al.*, Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 92, p. 115–123, 2015.
- ALESSIO, P. D.; MOUTET, M.; COUDRIER, E.; DARQUENN, E. S.; CHAUDIERE, J. - ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF- α are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, p. 979-987, 1998.
- ALIANÇA, A. S. S.; OLIVEIRA, A. R.; FEITOSA, A. P. S.; RIBEIRO, K. R. C.; CASTRO, M. C. A. B.; LEITE, A. C. L.; ALVES, L; C.; BRAYNER, F. A. *In vitro* evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives, **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 105 (2017) 1–10.
- ALKIM, C.; ALKIM, H.; KOKSAL, A. R.; BOGA, S.; SEN, I. Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. **Int. J. Inflamm.**, v. 2015, 2015.
- APPLETON, I.; TOMLINSON, A.T.; WILLOUGHBY, D. A. Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Advances in Physiology Education**, v.35, p.27-78, 1996.
- BACH, D.-H.; LIU, J.-Y.; KIM, W.K.; HONG, J.-Y.; PARK, S. H.; KIM, D.; QIN, S.-N.; LUU, T.-T.-T.; PARK, H. J.; XU, Y.-N.; LEE, S. K. Synthesis and biological activity of new phthalimides as potential anti-inflammatory agents, **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 25 (2017) 3396–3405.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 361-371, 2009.
- BANBURY, L.K.; SHOU, Q.; RENSHAW, D.E.; et al. Compounds from *Geijera parviflora* with prostaglandin E2 inhibitory activity may explain its traditional use for pain relief. **J. Ethnopharmacol**, 163:251–255, 2015.

- BARBOSA, M. L. de C. **Otimização do protótipo LASSBio-68: Planejamento, Síntese e caracterização do perfil anti-inflamatório.** Instituto de Química, Rio de Janeiro, UFRJ, 2009.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, pp. 556-563, 2010.
- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
- BLACK, R. A.; BIRDE, T. A.; MOHLER, K. M. Agents that Block TNF- α Synthesis or Activity. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v.32, p.241-250, 1997.
- BOCHUD, P.Y.; HAWN, T.R.; SIDDIQUI, M.R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON, S.; ABRAHAM, I.; ARGAW, A.T.; JANER, M.; ZHAO, L.P.; KAPLAN, G., and ADEREM, A. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy **The Journal of Infectious Diseases**, **197**: 253-261, 2008.
- BORGES, L.G.; FROEHLICH, P. Talidomida – Novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **49**: 96-102, 2003.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J. Pathol.**, v. 214, p. 149-60, 2008. Review.
- BRUCKDORFER R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, n. 1-2, p. 3-31. 2005.
- CARDOSO, M.V.D.O.; MOREIRA, D.R.M.; FILHO, G.B.O.; CAVALCANTI, S.M.T.; COELHO, L.C.D.; ESPÍNDOLA, J.W.P.; *et al.* Design, synthesis and structure–activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities, **Eur. J. Med. Chem.** 96 (2015) 491–503.
- CARDOSO, M.; HERNANDES, M.; MOREIRA, D.; PONTES, F.; SIMONE, C.; LEITE, A.; *et al.*, Structural Insights Into Bioactive Thiazolidin-4-one: Experimental and Theoretical Data, **Lett. Org. Chem.** 12 (2015) 262–270.
- CAROSSA, S. *et al.* Oral nitric oxide during plaque deposition. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlim, n.31, v.10, p.876-9, 2001.
- CHANAN-KHAN, K.C.; MILLER, L.; MUSIAL, D.; LAWRENCE, S.; PADMANABHAN, K.; TAKESHITA, *et al.*, Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study, **J. Clin. Oncol.** 24 (2006) 5343-5349, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.05.0401>.
- CHAPARRO, M.; GUERRA, I.; MUÑOZ-LINARES, P.; GISBERT, J.P. Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 35, p. 971-986, 2012.
- CHEN, G. Y; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 827-837, 2010.
- COELHO, L.C.D., CARDOSO, M.V. de O., MOREIRA, D.R.M., GOMES, P.A.T. M., CAVALCANTI, S.M.T., OLIVEIRA, A.R., *et al.*, Novel phthalimide derivatives with TNF- α

and IL-1 β expression inhibitory and apoptotic inducing properties, **Medchemcomm.** 5 (2014) 758.

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

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides : Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, pp. 241-256, 2009.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRESS, S. - Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, v. 18, n. 487-492, 1997.

ESCÁRCEGA, R. O. et al. The transcription factor nuclear factor- κ B and cancer. **Clinical Oncology**, v.19, p.154–61, 2007.

F. VAN RHEE, M.; DHODAPKAR, J. D.; SHAUGHNESSY, E.; ANAISSIE, D.; SIEGEL, A.; HOERING, et al., First thalidomide clinical trial in multiple myeloma: a decade, **Blood** 112 (2008) 1035-1038, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-02-140954>.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric Oxide (Review). *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.55, p.7–20,1996.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo , v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

GERSHON, D. Finding new uses for thalidomide . **Nature Medicine**, v.1, p.1230- 1230, 1995.

GOETZ, F. W.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S. Tumor necrosis factors. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p.487-97, 2004.

GOLDBLUM, S. E.; DING, X.; CAMPBELL-WASHINGTON, J. - TNF-alpha induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. C894-905, 1993.

HASHIMOTO, Y. et al. N-Alkylphthalimides: Structural Requirement Of Thalidomidal Action On 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Tumor Necrosis Factor α Production By Human Leukemia HL-60 Cells. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.43, p.177-179, 1995.

KAMIŃSKI, K.; OBNISKA, J.; WIKLIK, B.; ATAMANYUK, D. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. **Eur. J. Med. Chem.** v. 46 p. 4634–4641, 2011.

KAPLAN, G. Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. **Immunobiology**, v.191, p.564-568, 1994.

KELSEY, F. O. Thalidomide update: regulatory aspects. **Teratology**, 16: 221-225, 1988.

KLAUSNER, J.D.; MAKONKAWKEYOON, S.; AKARASEWI, P.; NAKATA, K.; KASINERK, W.; CORRAL, L.; DEWAR, R.L.; LANE, H.C.; FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and M. tuberculosis infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency**

Syndromes And Human

Retrovirology, 11: 247-257, 1996.

KOLB, H. et al. Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines. **Diabetologia**, v.39, p.1448–1454, 1996.

KONDO, S.; SAUDER, D. N. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, p. 1713-8, 1997.

KRÄNCKE, K.D. & FEHSEL, K. & KOLB-BACHOFEN, V. Endothelial cells as cytotoxic effector cells: cytokine-activated rat islet endothelial cells lyse syngeneic islet cells via nitric oxide. **Diabetologia**, v.40, p.150–155, 1991.

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

KRIEGLER, M.; PEREZ, C.; DEFAY, K.; ALBERT, I.; LU, S.D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. **Cell**, v. 53, p. 45-53, 1988.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Robbins & Cotran: **Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**. v. 10, n. 11, p. 1325-1334. 2010.

LEITE, A.C.L., BARBOSA, F.F., CARDOSO, M.V.D.O., MOREIRA, D.R.M., COÊLHO, L.C.D., SILVA, E.B., *et al.*, Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes, **Med. Chem. Res.** (2013).

LIEW, F. Y.; COX, F. E. G. Non-specific defense mechanisms. The role nitric oxide. **Immunology Today**, v.12, p.17–21, 1991.

Lu, M.Y.; Chen, C.C.; Lee, L.Y.; Lin, T.W.; Kuo, C.F.J. N6-(2-Hydroxyethyl)adenosine in the Medicinal Mushroom *Cordyceps cicadae* Attenuates Lipopolysaccharide-Stimulated Pro-inflammatory Responses by Suppressing TLR4-Mediated NF-κB Signaling Pathways. **Nat Prod**, 78: 2452–2460, 2015.

MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Immunology**, v.94, p.5243–5248, 1997.

MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39: 1489-1499, 2007.

Microbiologia e imunologia online. Disponível em:
<<http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter1.htm>>. Acesso em junho de 2017.

MIYACHI, H. et al. Novel Biological Response Modifiers: Phthalimides with Tumor Necrosis Factor-α Production-Regulating Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, p.2858–2865, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 1991;43(2):109-42.

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

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and Asthma. **Journal Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v. 19, n. 5, p. 340-354. 2009.

MOOS, R. von; STOLZ, R.; CERNY, Thomas; GILLESSEN, Silke. Thalidomide: from tragedy to promise. **Swiss Med Wkly**. V. 133, p. 77-87, 2003.

MORRIS, S.M., BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**. v. 266, p. 829-839. 1994.

MORRIS, R.; SOUTHAM, E.; BRAID, D.J.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. **Neurosci Lett**, 1992;137 (1):29-32.

NETO, J. F. G. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” da atividade biológica dos derivados da N-aminometilftalimida sobre *Trypanosoma Cruzi***. Dissertação de mestrado. UNICAMP. 2002.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 11, p. 366–378. 2010.

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

OLIVEIRA, A. R. **Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória *in vitro***. 2014. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 20, n. 2, p. 87–103, 2010.

PENNICA, D; NEDWIN, G. E.; HAYFLICK, J. S., SEEBURG, P. H., DERYNCK, R., PALLADINO, M. A., KOHR, W. J., AGGARWAL, B. B., GOEDDEL, D. V. Human Tumor Necrosis Factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, p. 724-729, 1984.

PEREZ, C.; ALBERT, I.; DEFAY, K.; ZACHARIADES, N.; GOODING, L.; KRIEGLER, M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-cell contact. **Cell**, v. 63, p. 251-258, 1990.

PESSOA, C., FERREIRA, P.M.P., LOTUFO, L.V.C., MORAES, M.O. de, CAVALCANTI, S.M.T., COELHO, L.C.D. *et al.*, Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes., **ChemMedChem**. 5 (2010) 523–8.

Protein Data Bank. Disponível em:

<<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1TNF&bionumber=1>>. Acesso em junho de 2017.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6ª Ed. Editora Elsevier, 2007.

RICE, Ellen. **Dr. Frances Kelsey: Turning the Thalidomide Tragedy into Food and Drug Administration Reform**. 2007.

- SENA, V.L.M.; SRIVASTAVA, R. M.; SIMONE, C. A.; GONÇALVES, S. M. C.; SILVA, R. O.; PEREIRA, M. A. Conventional and Microwave-Assisted Reaction of N-Hydroxymethylphthalimide with Arylamines: Synthesis of N-(Arylaminomethyl)-phthalimides, **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 18, No. 6, 1224-1234, 2007.
- SHARMA, U.; KUMAR, P.; KUMAR, N. and SINGH, B. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 678-704, 2010.
- SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review. **Journal of Heterocyclic Chemistry**. v. 47, n. 3, p. 491-502. 2010.
- SINGHAL, S. et al. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1565-1571, 1999.
- SNYDER, S.H.; DAWSON, T.M. Nitric oxide and related substances as neural messengers. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. book title. **New York: Raven Press**, 1995; p609-18.
- SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 10, p. 427-439. 2010.
- SUZUKI, T.; CHUNG-WAI, C.; DOWNEY, G.P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, n. 6, p. 1348-1361, 2008.
- TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; TUCKOVA, L.; STEPANKOVA, R.; HUDCOVIC, T.; PALOVA-JELINKOVA, L.H.; ROSSMANN, P.; SANCHEZ, D.; CINOVA, J.; HRNCU, T.; KVEKA, N.; FROLOVA, L.; UHLIZ, H.; POWRIE, F.; BLAND, P. Involvement of innate immunity in development diseases. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1051, pp.787-798, 2005.
- TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacol Ther.**, v. 117, p. 244-279, 2008.
- VARGESSON, Neil. Thalidomide Embryopathy: An Enigmatic Challenge. **ISRN Developmental Biology**, 2013.
- VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 411-452, 1992. Review.
- VAZQUEZ-LOMBARDI, R.; ROOME, B.; CHRIST, D. Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines. **Antibodies**. v. 2, p. 426-451. 2013.
- VERRI JR, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development. **Pharmacology & Therapeutics**. v.112, p.116-138. 2006.
- VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. **Simpósio: Semiologia e Fisiopatologia Clínicas**, v. 27, n.1/2, pp. 1-35, 1994.
- WALLIS, R. S. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, p. 601-611, 2008.
- WEI, X. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v.375, p.408-411, 1995.
- WINSTEAD, M.B.; HEINE, H.W., J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, 1913-1914.

Zhou, W.; LI, S.; LU, W.; YUAN, J.; XU, Y.; LI, H.; HUANG, J.; ZHAO, Z. Isoindole-1,3-dione derivatives as RSK2 inhibitors: synthesis, molecular docking simulation and SAR analysis. **Med. Chem. Commun.**, 2016, 7, 292–296.

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