

**Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

FABIULA INES MARTINS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE NOVOS CANDIDATOS A
PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS
DESENHADOS A PARTIR DO NEROLIDILCATECOL**

UFG

Goiania, 2009

FABIULA INES MARTINS

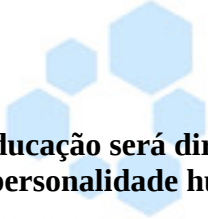
**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE NOVOS CANDIDATOS A
PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS,
DESENHADOS A PARTIR DO NEROLIDILCATECOL**



**Dissertação apresentada à
Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Goiás como
requisito para a obtenção de título
de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Menegatti
Co-orientador: Prof. Dr. José Ricardo Sabino**

Goiania, 2009



A educação será direcionada ao desenvolvimento integral da personalidade humana e ao fortalecimento do respeito pelos direitos humanos fundamentais.

Art. 26, Declaração Universal dos Direitos Humanos

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela força, sabedoria e por permitir que mais esta etapa da minha vida fosse cumprida, tendo a certeza que sempre estive ao meu lado em todos os momentos.
- Aos meus pais, Eunice Figueiredo Martins e Dirceu Martins Júnior, pelo amor incondicional e por terem sempre me incentivado e me ensinado a importância da educação, da dedicação e do trabalho.
- Ao meu irmão Rodrigo Figueiredo Martins e a minha cunhada Érica Núbia Cirillo, que estão sempre presentes na minha vida.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti, pela paciência, pela atenção e orientação constantes, por estar sempre disponível e aberto à discussão, mesmo diante de minhas dificuldades, para que pudéssemos concretizar este trabalho.
- Ao Prof. Dr. José Ricardo Sabino pelo auxílio na parte de modelagem molecular.
- Ao Prof. Dr. Elson Alves da Costa pelo auxílio na parte de ensaios farmacológicos.
- Ao meu amigo Marcelo Gomes do Nascimento pela amizade construída, pelas conversas e risadas, pelo companheirismo, pelos conselhos e pelo carinho.
- As minhas amigas Laura M. Nassau, Mirella Andrade e Silva e Adriane da Silveira Gomes pelo companheirismo e pelos momentos e frases amarelas.
- Aos alunos de iniciação científica, em especial, Karina Bannach Reis e Tomaz Nikono Rodrigues Silva, pela amizade e pela grande ajuda nas várias etapas deste trabalho.
- A todos os amigos, que convivem comigo seja em casa ou no trabalho, obrigada pela paciência, pelo carinho e por acreditarem em mim.

RESUMO

A inflamação é uma reação local dos tecidos envolvendo reações neurológicas, vasculares, humorais e celulares, objetivando eliminar o agente causal e diminuir o dano celular. As prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, são exemplos de mediadores químicos da inflamação, originados a partir da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 é uma enzima que hidrolisa fosfolipídios presentes na membrana celular na posição sn-2 produzindo lisofosfolipídios e ácido araquidônico, tendo um papel chave na produção de mediadores lipídicos inflamatórios. A pesquisa e desenvolvimento de novas entidades químicas seguras, eficazes e que apresentem menos efeitos colaterais para um determinado alvo terapêutico, constitui o principal objeto de inovação tecnológica das indústrias farmacêuticas. Devido aos efeitos colaterais dos inibidores seletivos da produção de eicosanóides presentes atualmente no mercado, o controle da produção de ácido araquidônico (AA) pela inibição da PLA2 surge como um vantajoso tratamento para as condições patológicas que são causadas pelos mediadores do AA. Neste trabalho foram estudadas rotas sintéticas para obtenção de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios obtidos por meio do planejamento racional de novos derivados piperazínicos originalmente desenhados a partir do nerolidilcatecol (**16**) e do arilsulfonilpiperazina (**17**) para apresentarem perfil inibitório da enzima PLA2 secretada.

Os compostos finais sintetizados, N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamida (**18**), *E*-N-(3,7-dimetilocta-2,6-dienil) benzo[d][1,3]dioxol-5-amina (**19**), (*E*)-N-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (**20**), (*E*)-4-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)(aminometil)fenol (**21**) e (*E*)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)-N-(4-idroxifenil)metanosulfanoamida (**22**) foram submetidos a ensaios farmacológicos “in vitro” para avaliação da inibição enzimática da sPLA2 e caracterização por meio de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C).

Baseados nos resultados obtidos por meio dos ensaios farmacológicos concluímos que os compostos sintetizados (**18**, **19**, **21**, **22**) apresentaram perfil anti-inflamatório esperado. Quanto às metodologias sintéticas empregadas para obtenção dos compostos finais (**18-22**) os resultados obtidos demonstraram serem esta viáveis nas suas execuções permitindo a obtenção de compostos com rendimentos adequados e com eficiência no perfil de purificação.

Palavras-chave: fosfolipase A2, anti-inflamatórios, rotas sintéticas.

ABSTRACT

Inflammation is a local reaction of tissue involving neurological, vascular, humoral and cellular reactions to eliminate the causal agents and reduce the cellular damages. Prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes are examples of chemical inflammation mediators, resulting for the action of the enzyme phospholipase A₂ (PLA₂). The PLA is a enzyme that hydrolyses membrane phospholipids in the sn-2 position resulting in lisophospholipids and arachidonic acid (AA), taking a key role in the production of lipidic inflammatory mediators. The research and development of new chemical entities security, effective and that presents less side effects to the particular therapeutic target, constituted the principal objective of technological innovation in pharmaceuticals industry. Due the side effects of selective inhibitors of the production of eicosanoids currently presents in the market, control of production of AA by inhibiting PLA₂ is a useful treatment for pathological conditions that are caused by mediators of the AA. In this work synthetic routes were studied to obtain new candidates prototypes of anti-inflammatory drugs obtained by rational planning of new piperazines derivatives originally designed from nerolidylcatechol (**25**) and arilsulfonilpiperazines (**26**) to presents the inhibitory profile of secreted PLA₂ enzyme.

The final synthesized compound, N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamide (**18**), *E*-N-(3,7-dimetylocta-2,6-dienyl) benzo[d][1,3]dioxol-5-amine (**19**), (*E*)-N-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (**20**), (*E*)-4-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)(aminometil)fenol (**21**) e (*E*)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)-N-(4-idroxifenil)metanosulfanoamida (**22**) were submitte to in vitro pharmacological assays to evaluated the enzymatic inhibition of sPLA₂ and characterization by hydrogen nuclear magnetic resonance (RMN ¹H) and the 13 carbon nuclear magnetic resonance (RMN ¹³C).

Based on the obtained results by pharmacological assays can be concluded that the final synthesized compounds (**18**, **19**, **21**, **22**) presents good anti-inflammatory profiles. As the synthetic methods employed to obtain the final molecules (**18-22**) the results showed be viable in its execution enable an obtainment of compounds with appropriate yields and efficiency in the profile of purification.

Key words: phospholiase A₂, anti-inflammatory drugs, synthetic routes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Visão esquemática da Cadeia de Inovação em Fármacos, adaptado de Global Alliance for TB Drug Development. The Boston Consulting Group, 2000	07
FIGURA 02- Processo Inflamatório, adaptado de: www.bio.davidson.edu/.../chem02.html	12
FIGURA 03- Mediadores químicos gerados pelo ácido araquidônico, adaptado de Garg et al., 2003.....	13
FIGURA 04- Contorno do sítio ativo das ciclooxygenases COX 1 e COX 2, adaptado de Simmons et al., 2004	15
FIGURA 05- Representação em fita da estrutura tridimensional de uma LOX PDB ID 4L2V, adaptado de www.rcsb.org/pdb/home	16
FIGURA 06- Mediadores químicos gerados a partir da cascata do ácido araquidônico, adaptado de Cashman, 1996	17
FIGURA 07- Especificidade da ação de PLA2 sobre a posição sn-2 de fosfolípidos de membrana, adaptado de Nelson e Cox, 2005	18
FIGURA 08- Representação em fita da estrutura tridimensional de uma PLA2 de <i>Daboia russelli pulchella</i> PDB ID 1G6V, adaptado de www.rcsb.org/pdb/home	19
FIGURA 09- Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, adaptado de GOODMAN & GILMAN, 2003.....	30
FIGURA 10- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 006 (18) e paracetamol (5), através do emprego do programa SPARTAN PRO	47
FIGURA 11- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 001 (19) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do programa SPARTAN PRO	51
FIGURA 12- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 014 (20) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do programa SPARTAN PRO	52
FIGURA 13- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 015 (21) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do programa SPARTAN PRO	53
FIGURA 14- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 016 (22) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do programa SPARTAN PRO	56
FIGURA 15- Espectro de RMN ¹ H expandido na região de hidrogênios aromáticos, do composto (18)	57

FIGURA 16- Espectro de HMBC expandido na região aromática, do composto (18).....	58
FIGURA 17- Espectro de RMN ¹ H expandido na região aromática, do composto (20)	59
FIGURA 18- Espectro de RMN ¹ H expandido na região de hidrogênios vinílicos, do composto (20)	60
FIGURA 19- Região dos hidrogênios alifáticos, do composto (20).....	60
FIGURA 20- Estrutura ribossômica da sPLA2 solvatada em esfera de água, adaptado de CHANDRA, 2002. Figura editada no programa NAMD	63
FIGURA 21- Cálculos da sPLA2 solvatada em esfera de água, através o emprego do programa NAMD. Figura editada no programa VMD	64
FIGURA 22- Cálculos da sPLA2 solvatada em caixa de água, através o emprego do programa NAMD. Figura editada no programa VMD	65
FIGURA 23- Visualização da formação de halos em placa de Petri representando inibição da atividade de PLA2	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Projeção de Vendas e Crescimento do Mercado Farmacêutico na América Latina em 2007, adaptado de IMS HEALTH, 2007	04
TABELA 02 – Grupos e subgrupos da família PLA2. Adaptado de Chakraborti, 2003	20
TABELA 03 – Descrição das estruturas das isoformas da PLA2 secretada. Adaptado de Schaloske e Dennis , 2006	22
TABELA 04 – Inibidores de isoformas da fosfolipase A2 geralmente usados. Adaptado de Cummings, 2000	31
TABELA 05- Cálculo de “single point” da LQFM 006 (18) e paracetamol (5), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO.....	48
TABELA 06- Cálculo de “single point” da LQFM 001 (19) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO	52
TABELA 07- Cálculo de “single point” da LQFM 014 (20) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO	52
TABELA 08- Cálculo de “single point” da LQFM 015 (21) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO	53
TABELA 09- Cálculo de “single point” da LQFM 016 (22) e 4-nerolidilcatecol (16), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO	56

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 – Mercado Farmacêutico Global , por região em 2008. Adaptado de IMS HEALTH, 2009.....	03
GRÁFICO 02- Ensaio da inibição, <i>in vitro</i> , da atividade da PLA2 presente na peçonha de <i>Bothrops moojim</i> (controle padrão) pelo composto LQFM 001 [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão	66
GRÁFICO 03- Ensaio da inibição, <i>in vitro</i> , da atividade da PLA2 presente na peçonha de <i>Bothrops moojim</i> (controle padrão) pelo composto LQFM 006 [mmol]. A quercetina (2,22 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle negativo	67
GRÁFICO 04- Ensaio da inibição, <i>in vitro</i> , da atividade da PLA2 presente na peçonha de <i>Bothrops moojim</i> (controle padrão) pelo composto LQFM 015 [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão	68
GRÁFICO 05- Ensaio da inibição, <i>in vitro</i> , da atividade da PLA2 presente na peçonha de <i>Bothrops moojim</i> (controle padrão) pelo composto LQFM 016 [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão	68
GRÁFICO 06- Ensaio da inibição, <i>in vitro</i> , da atividade da PLA2 presente na peçonha de <i>Bothrops moojim</i> (controle padrão) pelo 4-nerolidilcatecol [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão	69

ANEXOS

ESPECTRO 1- Espectro de IV do composto LQFM 006	86
ESPECTRO 2- Espectro de RMN ^1H do composto LQFM 006	87
ESPECTRO 3- Espectro de RMN HMBC do composto LQFM 006	88
ESPECTRO 4- Espectro de IV do composto LQFM 001	89
ESPECTRO 5- Espectro de RMN ^1H do composto LQFM 001	90
ESPECTRO 6- Espectro de IV do composto (20)	91
ESPECTRO 7- Espectro de RMN ^1H do composto (20)	92
ESPECTRO 8- Espectro de RMN HMBC do composto (20)	93
ESPECTRO 9- Espectro de IV do composto (21)	94
ESPECTRO 10- Espectro de RMN ^1H do composto (21)	95
ESPECTRO 11- Espectro de IV do composto (22)	96
ESPECTRO 12- Espectro de RMN ^1H do composto (22)	97
Script do Estudo da dinâmica da Enzima PLA2	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido Araquidônico

AINEs – Anti-inflamatórios Não-Esteroidais

Asp - Aspartato

Ca - cerca de

ccd - Cromatografia de Camada Delgada

CDCl₃ - Clorofórmio Deuterado

CDER - *Drug Evaluation and Research* (Avaliação da Droga e Pesquisa)

cPLA2 - Fosfolipase A2 Citosólica

COX - Cicloxigenase

DNA- Desoxiribonuclease

EUA- Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration* (Administração de Alimento e Droga)

GC - Glicocorticóides

His - Histidina

hsp - *heat shock protein* (Calor de transformação proteica)

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz - Hertz

IL-1 - Interleucina 1

iPLA2 - PLA2 Cálcio Independente

IV - Infravermelho

J - Constante de Acoplamento

KBr - Brometo de Potássio

kDa - quilo Dalton

LOX - Lipoxigenase

LPS - Lipopolisacarídeos

LTC4 - Leucotrieno C

LTD4 - Leucotrieno D4

LTE4 - Leucotrieno E4

MHz - Mega Hertz

NCEs - *New Chemical Entities* (Novas Entidades Químicas)

NMEs - *New Molecular Entities* (Novas Entidades Moleculares)

PAF - Fator de Agregação Plaquetária

PGI₂ - Prostaciclina

PGD₂ - Prostaglandina D₂

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PLA₂ - Fosfolipase A₂

p/v – peso/volume

QSAR - *Quantitative Structure Activity Relationships* (Relações Quantitativas Estrutura e Atividade)

R_f - Fator de Retenção

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono ¹³C

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Screening - triagem

Ser - Serina

sPLA₂ - Fosfolipase A₂ Secretada

TMS - Tetrametilsilano

TXA₂ - Tromboxano A₂

US - *United State* (Estados Unidos da América)

UV – Ultravioleta

v/v – volume/volume

\$ - sifrão de valor monetário

μm - micromolar

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	03
2.1. O Mercado Farmacêutico Global	03
2.2. Química Medicinal	05
2.2.1. Síntese Orgânica Medicinal	08
2.2.2. Modelagem Molecular	09
2.2.3. Ensaios Farmacológicos	10
2.3. Processo Inflamatório	11
2.3.1. Mediadores Químicos da Inflamação	12
2.3.1.1. Mediadores químicos da inflamação gerados a partir das enzimas ciclooxigenases	13
2.3.1.2. Mediadores químicos da inflamação gerados a partir da enzima 5-lipoxigenase	16
2.3.1.3. Fator de Ativação de Plaquetas (PAF)	16
2.3.2. PLA2 e suas Isoformas	17
I. PLA2 Secretada (sPLA2)	21
II. PLA2 Citosólica (cPLA2)	22
III. PLA2 Cálcio Independente (iPLA2)	23
IV. PAF Acetilhidrolase (PAF-AH)	23
V. PLA2 Lisossomal	23
2.3.3. Inibidores dos Mediadores Químicos da Cascata do Ácido Araquidônico	24
2.3.3.1. Fármacos Anti-inflamatórios Esteróides – Corticóides	24
2.3.3.2. Fármacos Anti-inflamatórios Não-Esteróides (AINEs)	27
2.3.3.3. Inibidores da sPLA2	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo Geral	33
3.2. Objetivos Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35

4.1. Parte Experimental	35
4.2. Metodologia Sintética	36
4.2.1. <i>N</i> -(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamida (MUKHOPADHYAY et al., 2004)	36
4.2.2. Procedimento Geral para a Reação de Aminoação Redutiva (LUO et al., 2004)	37
4.2.2.1. <i>E-N</i> -(3,7-dimetilocta-2,6-dienil) benzo[d] [1,3]dioxol-5-amina (LUO et al., 2004)	38
4.2.2.2. (<i>E</i>)- <i>N</i> -(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (LUO et al., 2004)	39
4.2.2.3. (<i>E</i>)-4-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)(aminometil)fenol (LUO et al., 2004)	40
4.2.3. Procedimento Geral para a Reação de Sulfonação	41
4.2.3.1. (<i>E</i>)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)- <i>N</i> -fenilmetanosulfanoamida	42
4.3. Metodologia de Modelagem Molecular	43
4.4. Metodologias Farmacológicas	43
4.4.1. Inibição da Atividade da PLA2	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Síntese Orgânica Medicinal	44
5.1.1. Caracterização Estrutural	56
5.1.1.1. <i>N</i> -(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamida (18), LQFM 006	57
5.1.1.2. Derivados (<i>E</i>)- <i>N</i> -(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (19-21)	58
5.1.1.3. (<i>E</i>)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)- <i>N</i> -(4-hidroxifenil)metanosulfanoamida (22)	62
5.2. Estudo de Modelagem Molecular	62
5.3. Ensaios Farmacológicos	65
5.3.1. Inibição da Atividade da PLA2	65
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por pesquisa de fármacos a etapa destinada à eleição criteriosa do alvo terapêutico para o tratamento de uma determinada fisiopatologia. A aplicação de estratégias de planejamento estrutural para desenho de ligantes do alvo selecionado pode utilizar as estratégias de modificação molecular clássicas da Química Medicinal, tais como: bioisosterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular, ou pelo emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e o estudo da relação estrutura-atividade quantitativo (QSAR). Compreende, ainda, realizar a determinação das atividades farmacológicas do ligante, que uma vez ativo “*in vivo*”, preferencialmente por via oral, passa a ser denominado protótipo (BARREIRO e MANSSOUR, 2001; BARREIRO, 2002; WERMUTH, 2003; LIMA e BARREIRO, 2005).

As estratégias modernas empregadas no planejamento racional de novos compostos protótipos podem se basear na abordagem fisiopatológica. Esta abordagem permite planejar a estrutura química de uma nova molécula com base na definição prévia do mecanismo de ação terapêutica. Esta ação, por sua vez, depende do alvo terapêutico escolhido, ou seja, a biomacromolécula a qual o novo fármaco irá se ligar para alterar um determinado processo bioquímico (BARREIRO, 2007).

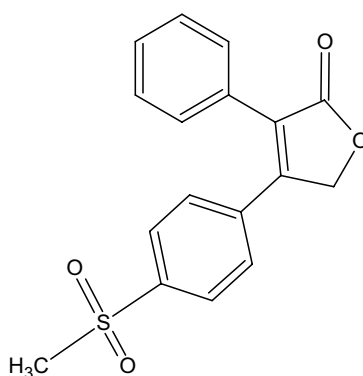
Dentre as fisiopatologias mais frequentes está o processo inflamatório. Este processo é uma resposta complexa, não específica e coordenada dos tecidos a um dano, o qual envolve, em linhas gerais, permeabilidade vascular, migração de células sangüíneas e passagem de plasma para os tecidos danificados. As moléculas que medeiam os eventos iniciais da inflamação são as moléculas de adesão, as quais são fundamentais para a migração dos leucócitos até a superfície dos vasos sangüíneos. Esta migração envolve complexas reações que são controladas por inúmeros mensageiros intracelulares chamados mediadores (MASLINSKA e GAJEWSKI, 1998). A magnitude da resposta inflamatória é crítica para os organismos, pois uma resposta deficiente pode resultar em infecções secundárias, enquanto uma resposta excessiva pode ser mais prejudicial do que o dano inicial (CZURA, FRIEDMAN e TRACEY, 2003).

Os agentes utilizados na terapêutica anti-inflamatória constituem um grupo variado de fármacos que diferem quanto à estrutura química, utilização clínica e efeitos tóxicos e indesejados (SILVA, 2006).

Atualmente, há 86 candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios em fase clínica e/ou em curso para serem aprovados pela FDA “Food and Drug Administration” (PhRMA, 2008).

A busca por novos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) mais eficazes e melhor tolerados é constante e tem sido impulsionada através dos estudos com os agentes liberadores de óxido nítrico, inibidores de peroxidase, enantiômeros de AINEs conhecidos, AINEs associados a antireumáticos moduladores de citocinas e inibidores seletivos da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) (ARONSO, 2006). A introdução dos inibidores seletivos da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), conhecidos como “coxibs”, merece destaque porque resultou na maior utilização de novos fármacos de todos os tempos. Os “coxibs” foram desenvolvidos com base na hipótese de que a inibição seletiva da COX-2 resultaria na manutenção dos efeitos terapêuticos dos AINEs com restrição de seus efeitos deletérios tradicionais (EMERY, 2001).

Com a descoberta da COX-2, isoforma induzida e expressa predominantemente durante o processo inflamatório, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menores efeitos adversos (FITZGERALD e PATRONO, 2001). Entretanto, estes fármacos apresentam alguns efeitos colaterais observados com os AINEs tradicionais, principalmente em nível renal, manifestando-se por um aumento na incidência de hipertensão e edema (SCHNITZER, 2001). O rofecoxibe (**1**) (AINE, COX-2) foi retirado do mercado em 2004 devido à constatação de efeitos cardiovasculares decorrentes, em parte, da inibição da isoforma COX-2 presente no endotélio vascular, levando a um desequilíbrio do processo homeostático entre a produção de prostaciclina no endotélio vascular e tromboxano A₂ nas plaquetas (CAIRNS, 2007).



(1)

Devido aos efeitos colaterais dos inibidores seletivos da produção de eicosanóides, o controle da produção de ácido araquidônico (AA) pela inibição da sPLA2 surge como um vantajoso tratamento para as condições patológicas que são causadas pelos mediadores do AA (RIZZA et al., 1999).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. MERCADO FARMACÊUTICO GLOBAL

A indústria farmacêutica constitui um oligopólio mundial em que historicamente predomina a competição por inovação (ACHILLADELIS e ANTONAKIS, 2001). É por meio do lançamento contínuo de novos produtos que as empresas buscam uma melhor colocação no mercado em relação a seus concorrentes (QUEIROZ e VELAZQUEZ, 2001).

Atualmente, a indústria é altamente globalizada e movimenta cerca de US\$ 773,1 bilhões de dólares/ano, sendo considerado o 3º maior mercado econômico mundial, ficando atrás apenas do mercado de energia e alimentos (IMS HEALTH, 2009). De acordo com dados fornecidos pelo IMS “Health Market Prognosis” a região que apresentou maior crescimento em relação ao mercado farmacêutico foi a região da Ásia/África/Austrália (15,3%) e da América Latina (12,6%) (Gráfico 01).

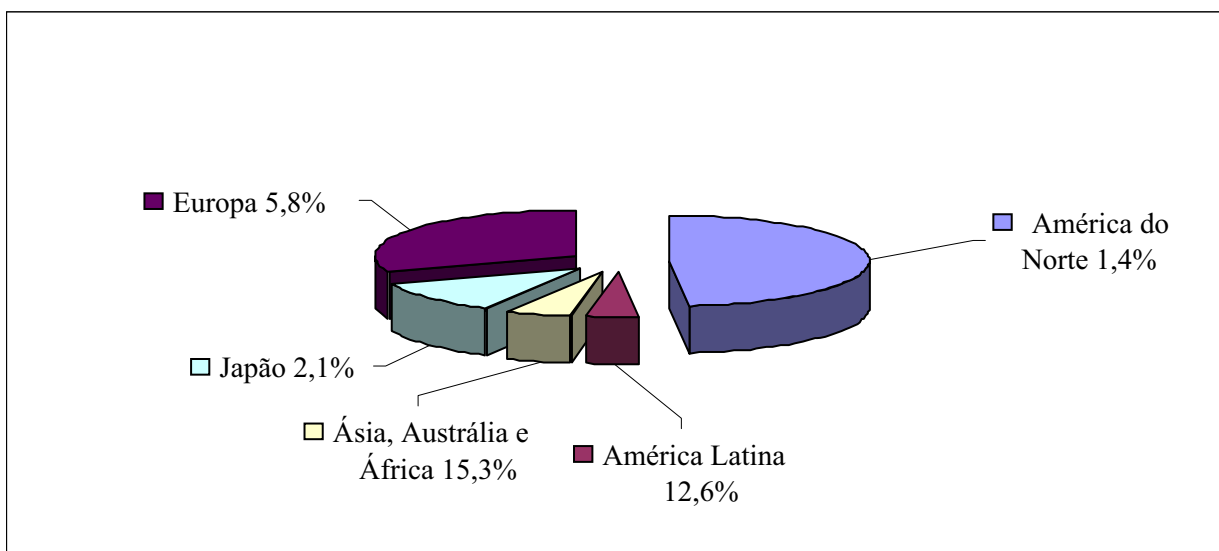


GRÁFICO 01 – Crescimento do Mercado Farmacêutico Global, por região em 2008, adaptado de IMS Health, 2009.

De acordo com dados da “IMS HEALTH”, o Brasil apresentava um declínio frente ao mercado farmacêutico em 1995, de 44% - 33%, devido a condições econômicas. Mais recentemente tem demonstrado, junto ao México e Venezuela, um aumento em seu desempenho, apresentando taxa de crescimento de 9,5% ao ano, em 2007. Com US\$ 9,6 bilhões de vendas projetadas, o Brasil representou estimadamente 34% do total do mercado da América Latina (IMS HEALTH, 2007).

TABELA 01 – Projeção de Vendas e Crescimento do Mercado Farmacêutico na América Latina em 2007, adaptado de IMS HEALTH, 2007.

	Estimativas de Vendas Anuais em 2005 (bilhões US\$)	Crescimento Anual Estimado em 2007 (%)	Divisão do Mercado por Região em 2007 (%)
América Latina	28,3	11,5	100
Brasil	9,6	9,5	34
México	8.5	7.9	30
Venezuela	3.0	28.8	11
Argentina	2.6	17.4	9
Colômbia	1.3	4	5
Outros	3.3	12.5	11

Entre os anos de 1990 a 2003, o “Drug Evaluation and Research” (CDER) da agência norte americana FDA aprovou 1.171 novas aplicações de fármacos “New Drug Applications”, (NDAs), deste total apenas 34% correspondiam a novas entidades moleculares, “New Molecular Entities”, (NMEs), definidas como substâncias ativas originais, sem registro ou comercialização prévia nos EUA. Os demais 66%, em sua maioria, correspondiam a aplicações de novas formulações de fármacos previamente aprovados. Estes dados são corroborados pela afirmativa de K. Maggon de que somente cerca de 30% de todas as “New Chemical Entities” (NCEs) aprovadas seriam de fato inovadoras (PRENTIS, 1998; HODGSON, 2001).

2.2. QUÍMICA MEDICINAL

A Química Medicinal, segundo definição da IUPAC (União Internacional de química Pura e Aplicada) “é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos de ciência biológica, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica”. Um projeto de Química Medicinal compreende as etapas de pesquisa, otimização e desenvolvimento do protótipo (WERMUTH, 2003).

O método de descoberta de fármacos baseado na modificação estrutural de moléculas conhecidas leva à identificação de novos compostos-protótipos que atuam pelo mesmo mecanismo farmacológico da molécula de origem. Esta estratégia é largamente empregada na indústria farmacêutica que pesquisa novos fármacos (BARREIRO e MANSSOUR, 2005).

Esta complexa tarefa envolve múltiplos fatores, responsáveis pela resposta terapêutica desejada e decorrentes da complexidade dos sistemas biológicos, abrangendo diversos conceitos, de diferentes disciplinas não podendo ser cumprida aleatoriamente.

No contexto da química medicinal, o planejamento criterioso de novos candidatos a protótipos de fármacos se torna uma ferramenta importante na Pesquisa e Desenvolvimento (P&D). Ao se fazer o planejamento de uma molécula que pode se tornar um potencial candidato a protótipo de fármaco, deve-se escolher um alvo farmacológico cuja estrutura conhecida permite buscar a melhor estratégia para construção do ligante desejado (BARREIRO, 2002).

Podemos sumarizar os objetivos da química medicinal como a compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos, envolvendo a relação entre estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos, considerando os fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzem em propriedades de uso terapêuticos úteis e, que, portanto, represente um novo composto protótipo, candidato efetivo a um novo fármaco (VIEGAS et al., 2006).

A descoberta de fármacos, pela indústria farmacêutica, é considerada por especialistas uma atividade complexa, multifatorial, cara, demorada, envolvendo a aplicação de técnicas e metodologias modernas e cuja produtividade é questionada com base em dados que demonstram a relação inversamente proporcional entre os investimentos em P&D e a descoberta de NCEs (MILNE, 2003).

O processo de inovação na indústria farmacêutica é o que conforma a dinâmica competitiva do setor (SCHWARTZMAN, 2001).

As ponderações sobre um novo fármaco são resultado direto da avaliação das necessidades e oportunidades de mercado em uma dada área terapêutica. O desenvolvimento de novos produtos se dá de forma simultânea e imprevisível, em complexos científico-tecnológicos organizados em rede, que incluem todas as etapas relevantes da cadeia de geração-produção de conhecimentos e produtos. A inovação na indústria farmacêutica se expressa, também, com tarefas de desenvolvimento de melhorias. Muitas vezes os produtos têm roupagens novas ou alguma agregação de valor (por exemplo, melhor absorção pelo organismo) sem apresentarem novidades terapêuticas: a isso chamamos de **inovações incrementais (“me-better”)**. O desenvolvimento de uma nova molécula que pode servir de base para um novo medicamento a ser patenteado pode vir a tornar-se uma **inovação radical (“breakthrough innovation”)** (VIEIRA e OHAYON, 2006).

Para clarear o sentido do que seja um produto inovador, Santoro (2000) nos apresenta uma classificação das inovações de produto na indústria farmacêutica, a partir da rota de síntese química, a saber: (i) identificação (“screening”) de nova substância ativa (nova substância ativa) – descoberta; (ii) obtenção de nova molécula derivada de análises estrutural-atividade (nova entidade química; novo fármaco) – invenção; (iii) nova formulação farmacêutica/composto (novo medicamento) – inovação radical; (iv) desenvolvimento de nova substância ativa ao redor de estrutura química já conhecida – inovação incremental; (v) novas indicações de uso para entidades químicas já conhecidas (novo alvo) – inovação incremental; (vi) novas associações de formulações (três em um, por exemplo) – inovação incremental; (vii) duplicação de produtos já comercializados (genérico ou similar) – mera cópia do composto, a menos que agregue algum valor, como por exemplo, a introdução de um novo excipiente para melhorar a absorção do medicamento pelo organismo.

A complexidade da cadeia de inovação em fármacos, que se inicia, como mencionado, com a eleição do alvo terapêutico indo até a descoberta do novo composto protótipo, da NEQ (Nova Entidade Química) autêntico candidato a novo fármaco, destaca sua principal característica, a natureza multidisciplinar desta cadeia, que abrange, além das Ciências Farmacêuticas, outras disciplinas das áreas afins (Figura 01). A inovação mais importante no setor farmacêutico ocorre no desenvolvimento do produto, para o qual há uma busca permanente por aumento de eficácia, segurança de uso e redução dos efeitos colaterais. Este processo sobrevém pela mudança das características do fármaco, para torná-lo mais eficaz e para que provoque menos efeitos adversos ou colaterais, além de mudanças na

composição dos outros componentes da formulação, para potencializar a ação do fármaco, tais como alterar a velocidade de sua liberação no organismo (FILHO e PAN, 2003).

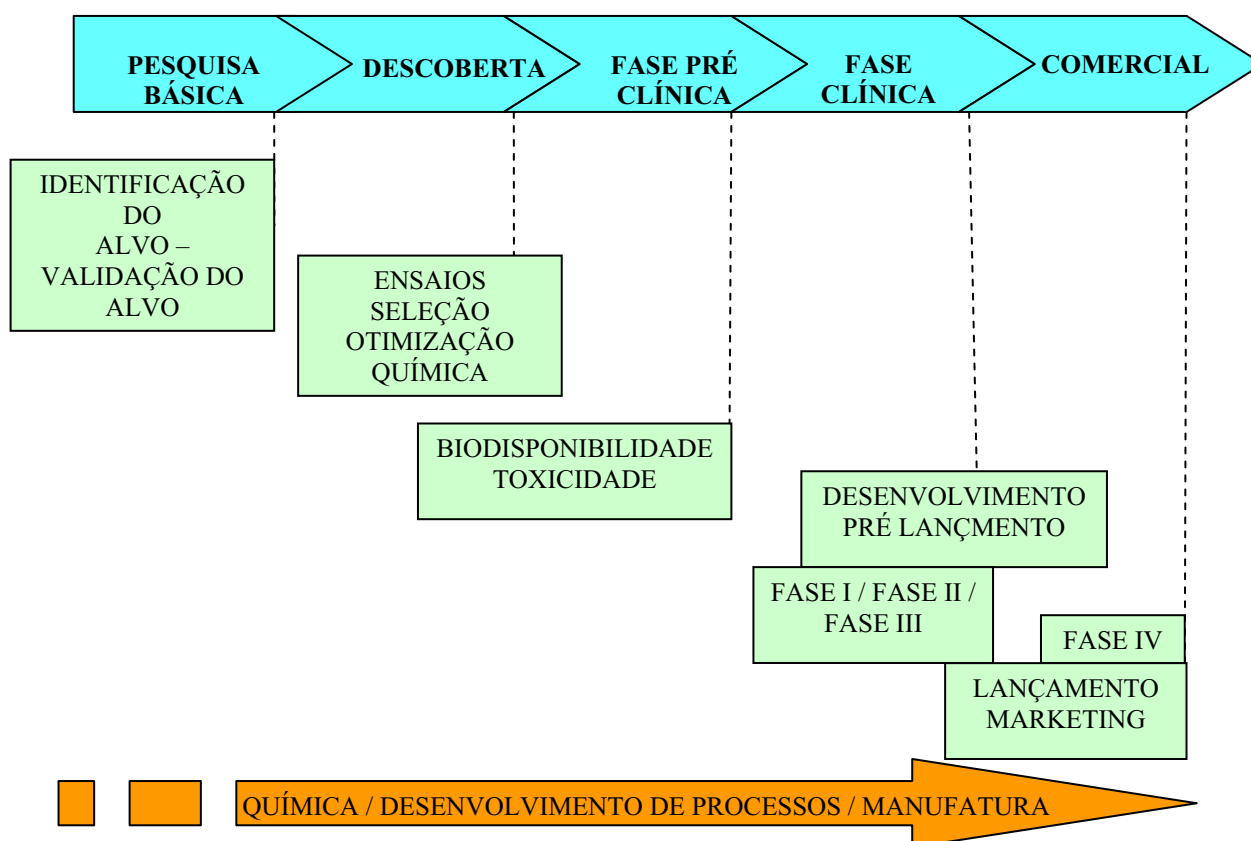


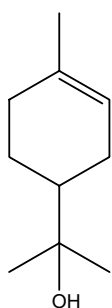
FIGURA 01- Representação esquemática da Cadeia de Inovação em Fármacos, adaptado de “Global Alliance for TB Drug Development”. The Boston Consulting Group, PhRMA, 2000.

A análise da produtividade das multinacionais farmacêuticas, aferida por sua capacidade inovadora, revela uma tendência ao maior número de inovações incrementais em relação às inovações radicais. Entretanto, a descoberta de uma inovação radical aumenta os lucros e serve de modelo para a criação, posterior, de uma ou mais inovações incrementais. Esta nova realidade resulta do reconhecimento dos desafios, riscos e maior incidência de insucessos para a introdução no mercado de fármacos inovadores, utilizando o paradigma industrial de descoberta de fármacos. Por estas razões, as grandes multinacionais farmacêuticas confiam nas inovações incrementais, os chamados fármacos “me-too” ou cópias terapêuticas, como forma de assegurar lucros e competitividade industrial (LIMA, 2007).

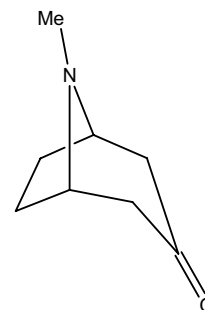
2.2.1. SÍNTESE ORGÂNICA MEDICINAL

A Química Orgânica sintética, nas duas últimas décadas, mostrou que é possível a preparação de produtos naturais, ou mesmo não naturais, bastante complexos, tarefa que exige uma boa dose de criatividade, inteligência e perseverança. O contínuo desenvolvimento de novas metodologias sintéticas e o aperfeiçoamento constante das técnicas de análise orgânica, conjugados com uma grande variedade de reações e metodologias, associadas aos avanços das técnicas instrumentais, permitiu a preparação de moléculas com alto controle da enantiosseletividade (CORREIA et al., 2002).

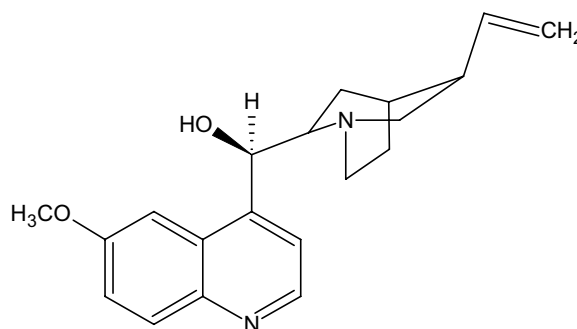
Ao longo da história muitas sínteses totais de substâncias complexas marcaram o desenvolvimento da área de síntese orgânica, principalmente porque muitas destas sínteses trouxeram à luz novas metodologias. Por exemplo, já em 1904 a síntese do α -terpineol (**2**) (W. H. Perkin) e em 1917, a síntese da tropinona (**3**) (R. Robinson) revelavam uma sofisticada abordagem retrossintética. A síntese de um alvo complexo como a quinina (**4**) em 1944, por Robert Woodward e William von Eggers Doering, pode ser considerada como uma das grandes realizações da síntese orgânica na primeira metade do século (CORREIA et al., 2002).



(2)



(3)



(4)

Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar potência e segurança, garantindo assim um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (WERMUTH, 2004).

A conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma única nova molécula, representa a estratégia de hibridação molecular, útil no desenho da arquitetura molecular de um novo composto protótipo (BARREIRO e MANSSOUR, 2001). Moléculas híbridas podem resultar da associação de duas atividades principais distintas (síntese associativa) ou de um composto com dupla ação intrínseca. No primeiro caso, as duas entidades farmacofóricas estão ligadas e reorganizadas, enquanto que no segundo, o padrão estrutural responsável pela atividade não seja tão evidente. (WERMUTH et al., 2003).

Uma vez descoberto o novo composto-protótipo, a etapa seguinte na cadeia de inovação em fármacos é sua otimização. Nesta etapa, devem ser identificadas as distintas contribuições farmacofóricas de todas as subunidades estruturais, de maneira a orientar as modificações moleculares introduzidas na estrutura do composto-protótipo ampliando a diversidade estrutural deste padrão molecular, o que é significativamente relevante para elaboração de pedidos de proteção intelectual desta descoberta. Na etapa de otimização do composto-protótipo, o emprego de técnicas de química computacional aplicadas ao desenho de fármacos são particularmente úteis (BARREIRO e MANSSOUR, 2005).

2.2.2. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias. Ela compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais, sendo usada para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Estes métodos abrangem

estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular entre outros, sendo aplicáveis desde átomos isolados a biomacromoléculas (SANTOS et al., 2007).

A modelagem molecular fornece informações importantes para o processo de planejamento de fármacos, pois permite a obtenção de propriedades específicas de um composto que podem influenciar na interação com seu receptor, como por exemplo, o logP, a refratividade molar, o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO. Assim, ela tem se tornado uma ferramenta indispensável não somente no processo de planejamento, mas também na otimização de protótipos já existentes (BARREIRO et al., 1997).

Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser utilizado em uma determinada abordagem da modelagem molecular, e todas elas derivam de três principais: (a) *ab initio* (método derivado da mecânica-quântica e está incluído em diversos pacotes de modelagem molecular, como Gaussian e Gamess, é um método puramente teórico utilizado para moléculas com no máximo 100 átomos); (b) semi-empírico (método também derivado da mecânica-quântica, está incluso em diversos pacotes de modelagem molecular, como Spartan e MOPAC, e incluem os Hamiltonianos AM1 (austin model 1) e PM3 (parametric method 3), entre outros); (c) mecânica molecular (baseados em valores experimentais) (SILVA e RIBEIRO, 2008).

A modelagem molecular tem se apresentado como ferramenta importante no estudo da interação de ligantes e receptores. A quantificação da energia de interação entre moléculas e suas proteínas-alvo, a determinação de relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica, a proposição de sítios, orientações e conformações putativos de interação de ligantes ainda não co-cristalizados e a observação do comportamento dinâmico de moléculas e complexos de interesse farmacológicos podem ser citadas como algumas das áreas nas quais a modelagem molecular vem contribuindo para a química medicinal e o planejamento de novos fármacos (VERLI e BARREIRO, 2005).

2.2.3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

A química medicinal compreende, também, avaliar através de bioensaios *in vitro* que, em caso de sucesso, nos fornecerá o ligante do biorreceptor eleito como alvo-terapêutico. Uma vez disponível sinteticamente em estado de pureza adequado, o novo ligante é

submetido à etapa de validação do conceito terapêutico, à origem da eleição do alvo, compreendendo o emprego de bioensaios farmacológicos “*in vivo*”. Esta etapa é crítica no processo, pois além de validar experimentalmente o conceito terapêutico do alvo eleito, permite identificar as propriedades farmacocinéticas do ligante candidato a novo composto-protótipo (BARREIRO e MANSSOUR, 2005).

2.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é fundamentalmente uma resposta cujo objetivo consiste em livrar o organismo da causa inicial da lesão, como exemplo pode-se citar: micróbios, toxinas, traumas e das consequências desta lesão, que podem ser, células e tecido necrótico. Sem inflamação, as infecções seguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam e os órgãos danificados poderiam tornar-se comprometidos permanentes (ROBBINS et al., 2005).

Os componentes básicos de um processo inflamatório consistem em eventos celulares e humorais interdependentes que culminam com a reparação do tecido e a restauração da função (CARVALHO, 2002). Logo, a inflamação pode ser resumida em um dano inicial (por agentes químicos, físicos e biológicos) que causa a liberação de mediadores inflamatórios, denominada fase irritativa, o surgimento de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (fase vascular; exsudação plasmática e celular) denominada de fase exsudativa; e a proliferação de células do tecido conectivo representando a fase reparativa (BORNE, 2002).

Os fenômenos irritativos constituem um conjunto de modificações provocadas pelo agente inflamatório que resultam na liberação de mediadores químicos responsáveis pelos fenômenos subseqüentes da inflamação (PEREIRA, 2006).

Uma variedade de mediadores químicos endógenos, incluindo fatores imunológicos e quimiotáticos de diferentes fontes (leucócitos e plaquetas ativados, do metabolismo do ácido araquidônico como prostaglandinas e leucotrienos, das cascatas de coagulação e do sistema complemento) tem sido reconhecida por exercer papéis importantes no processo inflamatório (BRODY, 1997; BORNE, 2002).

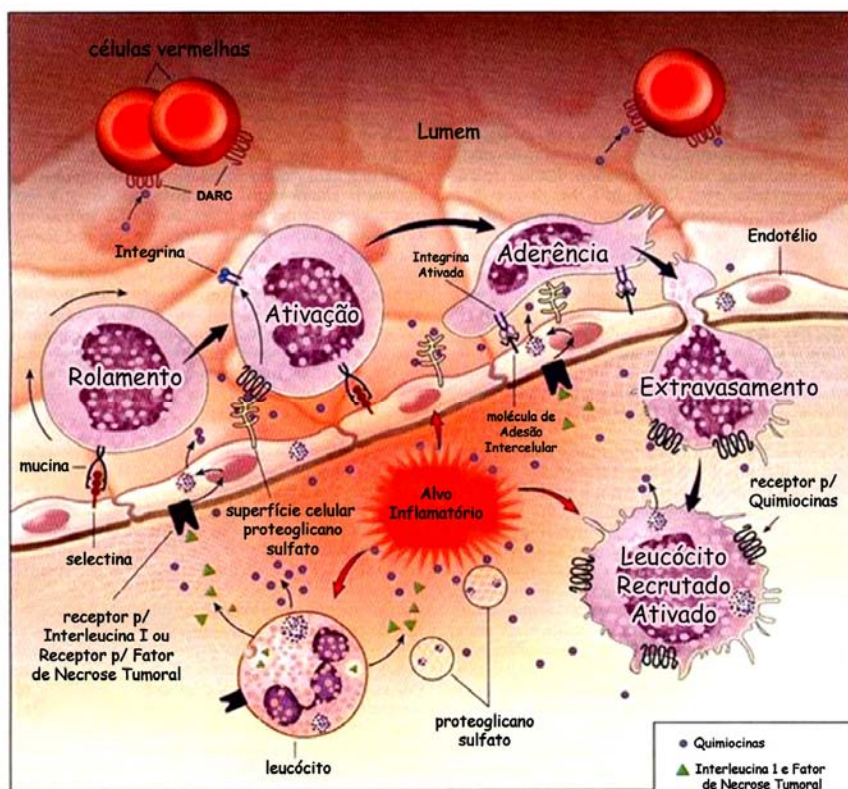


FIGURA 02- Processo Inflamatório, adaptado de: www.bio.davidson.edu/.../chem02.html

2.3.1. Mediadores Químicos da Inflamação

Atuando de maneira isolada, em combinações ou em sequência, os mediadores químicos amplificam a resposta inflamatória e influenciam em sua evolução. A ocorrência de processos inflamatórios pode ser desencadeada por diversos processos fisiológicos promovidos por respostas imunes, tanto celulares, quanto enzimáticas (CROUVEZIER et al., 2001).

Quanto a sua origem, podem ser provenientes do plasma, de células e de tecidos necróticos. Os mediadores de origem celular, normalmente, estão sequestrados em grânulos intracelulares, que precisam ser secretados, a exemplo, histamina nos grânulos dos mastócitos, ou são sintetizados originalmente, a exemplo, prostaglandinas e citocinas, em resposta aos mais variados estímulos inflamatórios. As principais fontes celulares são plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos, mastócitos e células mesenquimais como endotélio, músculo liso, fibroblasto (BOYCE, 2005; ROBBINS et al., 2005).

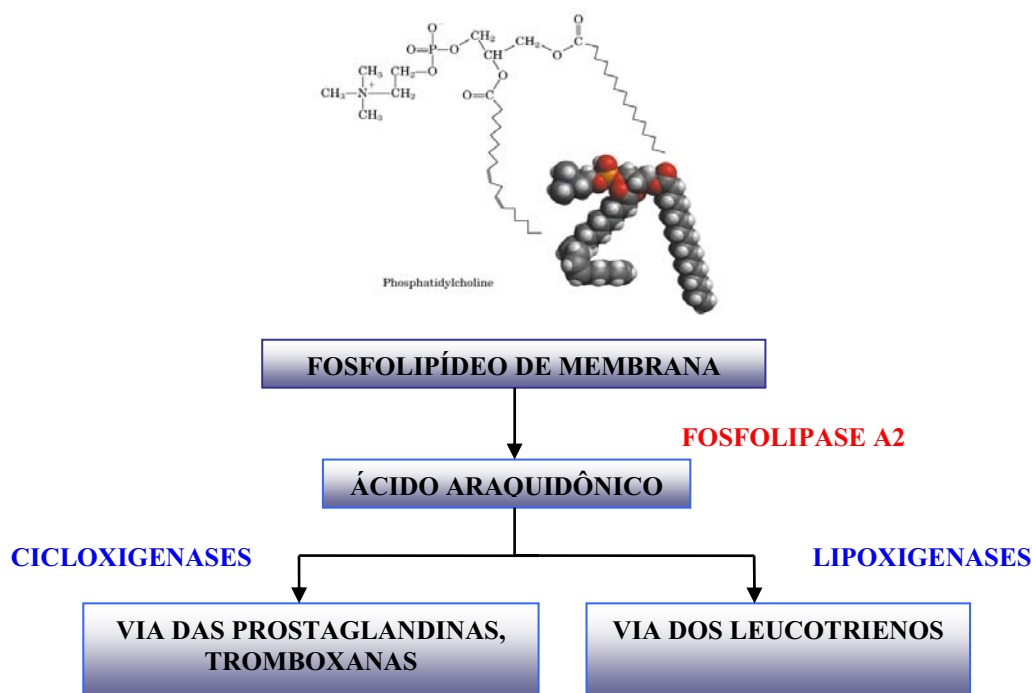


FIGURA 03- Mediadores químicos gerados pelo ácido araquidônico, adaptado de Cummings et al. 2000.

2.3.1.1. Mediadores químicos da inflamação gerados a partir das enzimas Cicloxigenases

Os produtos gerados pela via das cicloxigenases (COXs) dependem da célula envolvida. Por exemplo, nas plaquetas esta via leva à síntese de tromboxano A₂ (TXA₂), no endotélio vascular ocorre síntese de prostaciclina (PGI₂), nos macrófagos resulta em síntese de PGE₂, enquanto que os mastócitos sintetizam prostaglandinas (PGD₂).

As PGs mais importantes são PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂. O TXA₂ é um potente agente agregador plaquetário e vasoconstrictor. A PGI₂ é um vasodilatador, um inibidor potente da agregação plaquetária e, também, potencializa, de sobremaneira, os efeitos da quimiotaxia e do aumento de permeabilidade de outros mediadores. O desequilíbrio de TXA-PG foi implicado como um evento precoce na formação de trombos nos vasos sangüíneos coronários e cerebrais (FLOWER, 2003).

As PGs também estão implicadas na patogenia da dor, febre e edema durante os eventos inflamatórios (DAVIES et al., 1984; HIGGS et al., 1984), sendo a PGE₂ um potente agente hiperalgésico. As PGs, particularmente, as PEG₂, sensibilizam os nociceptores, reduzindo o limiar de excitabilidade dos mesmos, facilitando a atividade alogênicas substâncias que são capazes de estimular, diretamente os nociceptores, a exemplo, histamina,

bradicinina, substância P, produzindo dor declarada (VANE e BOTTING, 1995; CHICORRO et al., 2004). O envolvimento das PGs nos episódios de febres está associado com a produção de PGE₂ no hipotálamo, estimulado pela produção de citocinas interleucina (IL-1) a partir de endotoxinas bacterianas, a exemplo, lipopolissacarídeos (LPS).

Até o momento, já foram caracterizadas três isoformas de enzimas COXs, também conhecidas como COX-1, COX-2 e COX-3 (SIMMONS et al., 2004; CHANDRASEKHARAN et al., 2002; WARNER e MITCHELL, 2002).

A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada e é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, é considerada importante na proteção da mucosa estomacal. A COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas, *i.e.*, IL-1, IL-2 e do fator de necrose tumoral (TNF- α), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos e foi constatada como sendo constitutiva do endotélio vascular, rins, pulmão e cérebro. A COX-1 e a COX-2 são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica de fosfolipídios da membrana. O número de aminoácidos que compõe as duas isoenzimas é bastante semelhante, variando de 599 aminoácidos para a COX-1 e de 604 aminoácidos para a COX-2 (JOUZEAU et al., 1997).

É importante assinalar que a COX-1, mas não a COX-2, é constitutivamente expressa no estômago. Isso explica a ocorrência acentuadamente reduzida de toxicidade gástrica com o uso de inibidores seletivos da COX-2 (GOODMAN & GILMAN, 2003).

As estruturas das COX-1 e COX-2 já foram bem definidas por difração de raio-X, sendo homodímeros. Cada monômero consiste de três grandes sítios: um domínio tipo fator de crescimento epidérmico, um domínio membrana-ligante e um domínio catalítico que contem ambos os sítios ativos COX e peroxidase. Ambas as estruturas revelam um canal que se estende do centro do sítio catalítico até a superfície do sítio membrana-ligante. A região membrana ligante das COX-1 e COX-2 fica incorporada no interior da membrana plasmática, permitindo que o AA (6) livre tenha acesso ao sítio ativo ou canal, onde este é ciclizado à PGG₂. Outra interação com o sítio ativo resulta na redução da PGG₂ em PGH₂. A maioria dos AINEs compete com o AA (6) na ligação com o sítio ativo (HAWKEY, 1999).

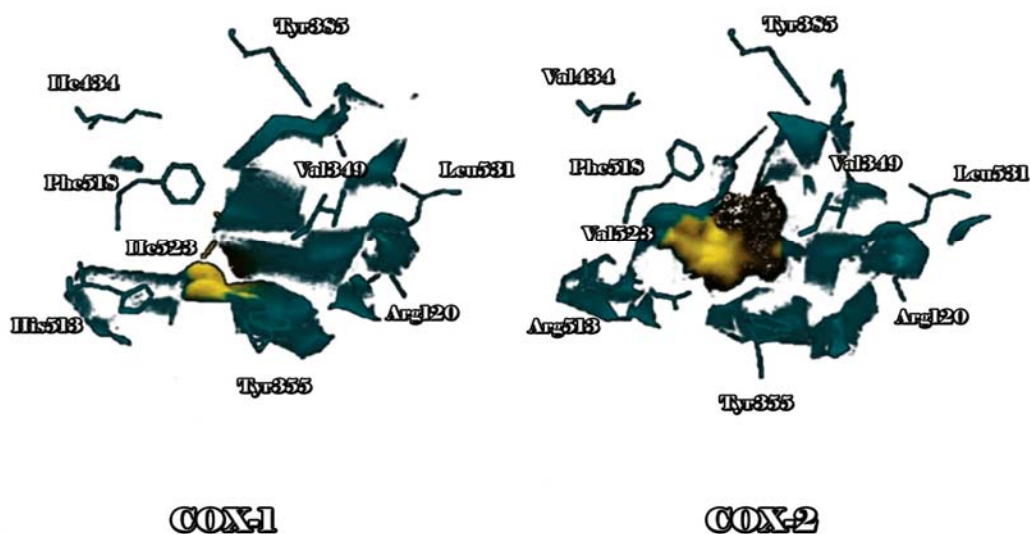
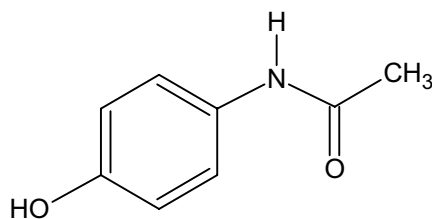


FIGURA 04- Contorno do sítio ativo das cicloxigenases COX 1 e COX 2, adaptado de Simmons et al., 2004.

A expressão de uma terceira variante catalítica da COX (COX-3) foi demonstrada em estudos “*in vitro*” com linhagens de macrófagos. A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, uma vez que deriva do mesmo gene dessa isoforma, encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao paracetamol (**5**) do que a COX-1 e COX-2 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).



(5)

2.3.1.2. Mediadores químicos da inflamação gerados a partir da enzima 5-lipoxigenase

A segunda classe de enzimas, da qual o AA (6) pode ser substrato, é representada pelas lipoxigenases. A 5-Lipoxigenase (5-LOX) é a enzima predominante nos neutrófilos e após a ativação celular a 5-LOX transfere-se para a membrana nuclear e interage com uma proteína reguladora associada à membrana, 5-LOX (FLAP). O principal produto, 5-HETE, que é quimiotático para neutrófilos, é convertido em uma família de compostos conhecidos como leucotrienos (LTB₄). O LTB₄ é um agente quimiotático potente e ativador das respostas funcionais dos neutrófilos, como a agregação e a aderência de leucócitos ao endotélio venular, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas. Os leucotrienos que contêm cisteinil, C₄, D₄ e E₄ (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) causam vasoconstrição intensa, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (RUBIN e FARBER, 2002; WILLIAMS, LEMKE e FOYE, 2002).

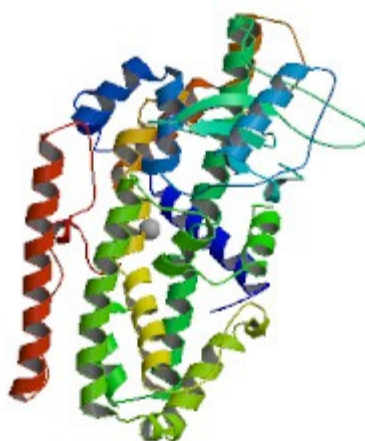


FIGURA 05- Representação em fita da estrutura tridimensional de uma LOX PDB ID 4L2V, adaptado de www.rcsb.org/pdb/home.

2.3.1.3. Fator de Ativação Plaquetária (PAF) gerado a partir do lisoglicerofosforilcolina

O PAF é uma classe de mediadores vasoativos com a estrutura de um lisofosfolípido acetilado. É sintetizado por mastócitos e basófilos, sendo que sua liberação pode ser estimulada pela imunoglobulina E (IgE). Pode ser sintetizado por plaquetas, neutrófilos, monócitos e pelo endotélio (STEVENS e LOWE, 2002). É um potente vasodilatador, que reduz a resistência vascular periférica e a pressão arterial quando injetado por via intravenosa;

promove também o aumento da permeabilidade vascular e o movimento para fora da vasculatura. O PAF é um potente estimulador de agregação plaquetária “*in vitro*”, que é acompanhada pela liberação de TXA_2 e do conteúdo granuloso das plaquetas, além de ser um fator quimiotático para os eosinófilos, neutrófilos e monócitos.

O PAF extracelular exerce suas reações ao estimular um receptor de superfície celular ligada à proteína G que foi detectado nas membranas plasmáticas de vários tipos celulares (GOODMAN & GILMAN, 2003).

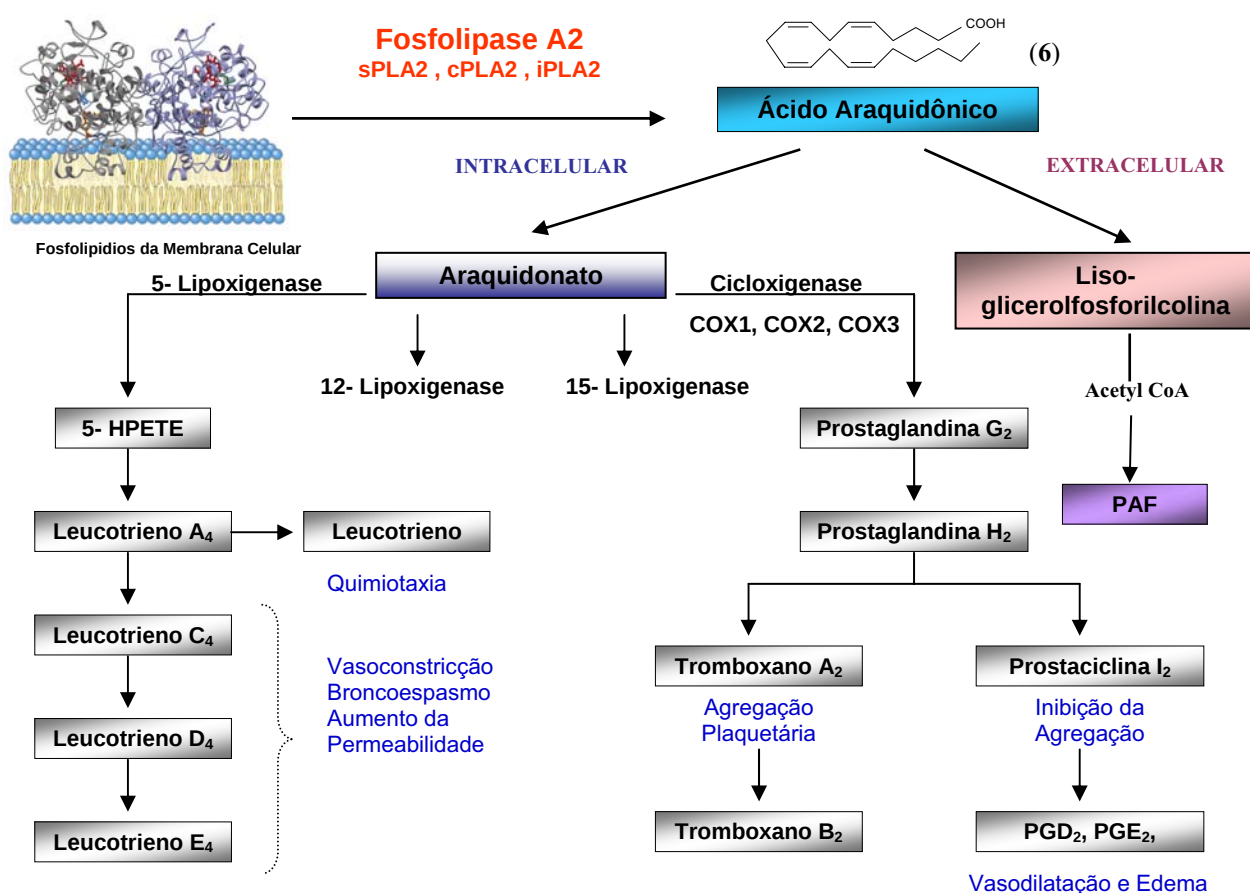


FIGURA 06- Mediadores químicos gerados a partir da Cascata do Ácido Araquidônico, adaptado de Cashman, 1996.

2.3.2. PLA2 e suas Isoformas

As fosfolipases são uma grande família de enzimas ubíquas na natureza, que podem diferir quanto aos seus tamanhos moleculares, localização em compartimentos distintos, *i.e.* suco gástrico de mamíferos, peçonha de serpentes, abelhas e escorpiões. As mesmas são

divididas em várias classes de acordo com sua seqüência primária de aminoácidos, bem como o arranjo e localização de suas pontes dissulfeto (KINI, 1997).

A descoberta das PLA2 foi feita a partir da observação de que o suco pancreático de animais e da peçonha de serpentes é capaz de hidrolisar a fosfatatidilcolina, bem como outros tipos de fosfolipídios. A PLA2 tem uma ampla distribuição no reino animal com participação em inúmeros fenômenos fisiopatológicos e/ou fisiológicos. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, nos mamíferos, especialmente no homem onde podem ser encontrados em diversos tipos de tecidos, tanto intracelularmente como extracelularmente (DENNIS, 1997).

A PLA2 é uma enzima que hidrolisa fosfolipídios presentes na membrana celular na posição sn-2 produzindo lisofosfolipídios e AA (6), tendo um papel chave na produção de mediadores lipídicos inflamatórios (YEDGER et al., 2003). O aumento da atividade da PLA2 pode ser causado por agentes que produzem alterações nos fosfolipídios de membrana resultando na exposição preferencial de substratos lipídicos. Por exemplo, o stress oxidativo pode levar ao rearranjo dos fosfolipídios de membrana como os ácidos graxos esterificados na posição sn-2 que são mais acessíveis para a PLA2. Ademais, excessos de toxicantes e/ou oxidantes no dano celular pode resultar na liberação de fosfolipídios intactos da membrana expondo eles mesmos a ligação éster sn-2 (CHAKRABORTI, 2003).

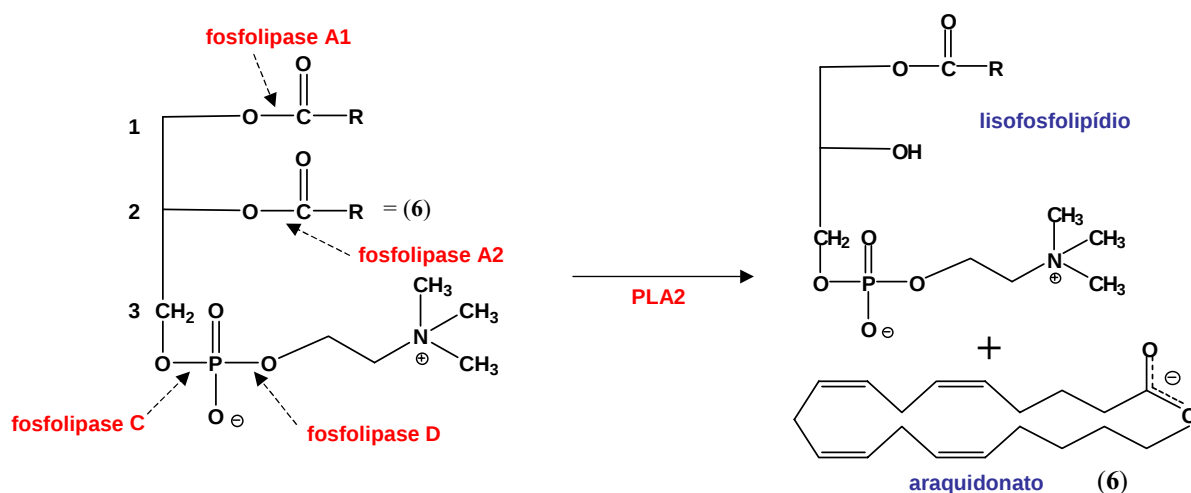


FIGURA 07- Especificidade da ação de PLA2 sobre a posição sn-2 de fosfolipídios de membrana, adaptado de Nelson e Cox, 2005.

Sabe-se que as PLA2s de venenos apresentam uma ampla preferência por substratos fosfolipídicos, as quais são determinadas pela topologia de superfície específica da região da

proteína que interage com a superfície da membrana. Estudos cristalográficos, fluorimétricos e de Ressonância Magnética Nuclear propuseram uma superfície protéica de ligação interfacial comum para as PLA2s. Esta superfície inclui o sítio ativo e nos grupos I/II é definida por uma fenda na superfície hidrofóbica altamente conservada que liga a cadeia do ácido graxo do substrato fosfolipídico, juntamente com um anel de resíduos carregados e polares. Esta superfície é denominada de sítio de reconhecimento interfacial, IRS ou i-face (ARAGÃO, 2005).

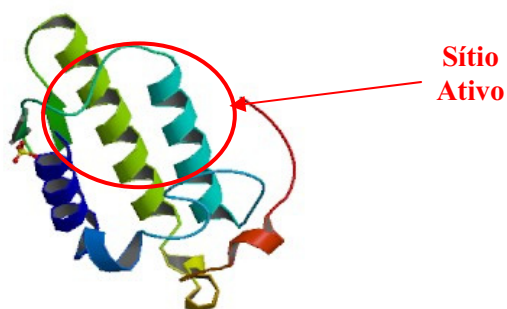


FIGURA 08- Representação em fita da estrutura tridimensional de uma PLA2 de *Daboia russelli pulchella* PDB ID 1G6V, adaptado de www.rcsb.org/pdb/home.

As diversas isoformas de fosfolipases isoladas, ou obtidas através da comparação das seqüências gênicas, são atualmente divididas em pelo menos dez grupos e vários subgrupos dependendo do critério usado, englobando proteínas com tamanhos variando entre 13 e 100 kDa e 5 a 8 pontes dissulfetos, que podem necessitar ou não de íons Ca^{+2} para sua atividade catalítica. De modo geral, esta família de enzimas apresenta seu sítio ativo conservado, constituído pelos resíduos de aminoácidos histidina 48 (His48) e aspartato 49 (Asp49), que, em alguns casos, pode se encontrar complexado a um íon cálcio (Ca^{2+}) em uma subunidade molecular denominada de alça de cálcio, onde o mesmo atua como co-fator enzimático (BALSINDE et al., 2002).

TABELA 02- Grupos e subgrupos da família PLA2, adaptado de Chakraborti, 2003.

GRUPOS		FONTES	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO (kDA)
I	A	Cobras, Kraits	Secretada	13-15
	B	Pâncreas de suínos/humanos	Secretada	
II	A	Serpentes, víboras, líquido sinovial	Secretada	13-15
	B	humano	Secretada	13-15
	C	Gaboon viper	Secretada	13-15
		Testículos de ratos/camundongos, abelhas, lagarto	Secretada	16-18
III	A	Rins de ratos, U937 humano	Citosólica	85
	B	Cérebro humano	Citosólica	100
	C	Coração /músculo esquelético humano	Citosólica	65
V		Pulmão/coração de humanos/ratos/camundongos, P388D1 macrófagos	Secretada	14
VI		P388D1 macrófagos, células CHO	Intracelular	80-85
VII	A	Plasma humano	Secretada	45
	B	Cérebro bovino		42
VIII		Cérebro bovino	Citosólica	29
IX		Caracol marinho	Secretada	14
X		Leucócitos humanos	Secretada	14

A superfamília da PLA2 compreende um número de muitas diferentes proteínas que pode ser dividida em até cinco principais tipos de enzimas: PLA2 secretada (sPLA2), PLA2 citosólica (cPLA2), PLA2 cálcio independente (iPLA2), a PAF acetilhidrolase e a PLA2 lisossomal. A função das enzimas de certos grupos é baseada no mecanismo catalítico *i.e.* His/Asp, Ser/Asp ou Ser/His/Asp hidrolase, bem como em suas características estruturais e funcionais (SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

Altos níveis de PLA2 têm papel importante em vários processos biológicos incluindo a geração de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, via liberação de AA (6), bem como na regulação de metabolismo dos lipídios (GLASER,1995).

São considerados, portanto, enzimas pré-inflamatórias e sua inibição seletiva no local da inflamação tem sido reconhecida como um alvo terapêutico desejável (YEDGAR, 2006).

I. PLA2 Secretada (sPLA2)

As PLA2s secretadas são pequenas proteínas secretadas (14-18 kDa), usualmente contendo de 5 a 8 pontes dissulfídicas. Este grupo de enzima utiliza a histidina como sítio ativo e requer μM níveis de cálcio para a catálise (SINGER et al., 2002).

Existem, ao menos, 17 isoformas da PLA2 secretada em humanos com a maioria das pesquisas focadas naqueles grupos conhecidos como IIA, V e X. Estudos demonstram que várias isoformas de PLA2 secretada em humanos são expressas durante a resposta inflamatória de vários tecidos, como por exemplo, coração, fígado, rim, macrófago, pulmão e intestino (TRIGGIANI, 2005).

No ambiente celular as PLA2s secretadas podem atuar durante o processo de secreção, em compartimentos secretórios ou no espaço extracelular (VALENTIN et al., 2000). Estudos realizados nas últimas décadas identificaram mecanismos alternativos de ação da sPLA2 ligada a sua capacidade para ativar células inflamatórias e induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios, além dos eicosanóides. Estes efeitos são na maioria correlacionados com a atividade enzimática da sPLA2 e ocorrem devido a interação da sPLA2 com receptores específicos e/ou outras moléculas de superfície expressa nas células alvo. Outros estudos têm demonstrado que a ativação intracelular da sPLA2 sinaliza eventos nas células inflamatórias levando a geração de segundos mensageiros (ex. aumento de Ca^{+2}), fosforilação de quinases (ex.: MAPKs) e ativação de fatores de transcrição (ex.: fator nuclear Kappa B). Estas propriedades adicionais da sPLA2 lança nova luz sobre os efeitos biológicos relevantes para a inflamação e imunorregulação exercidos por estes mediadores extracelulares (TRIGGIANI, 2005).

Os resíduos catalíticos das sPLA2s estão localizados em uma das extremidades do sítio ativo. A fenda hidrofóbica de acesso ao sítio catalítico é formada pelos resíduos Leu2, Phe4, Ile9, Ala102, Ala103 e Phe106. O sítio catalítico é circundado pela i-face, a qual age como um domínio ou sítio de ligação interfacial. Todas as estruturas ativas de sPLA2s contêm a mesma díade catalítica: His48-Asp49. As propriedades que diferenciam as diversas sPLA2s são, geralmente, os resíduos que formam a i-face e outros resíduos da superfície protéica que fazem parte de domínios de reconhecimento para outras funções (tais como miotoxicidade e neurotoxicidade) (BERG et al., 2001).

TABELA 03- Descrição das estruturas das isoformas da PLA2 secretada, adaptado de Schaloske e Dennis, 2006.

GRUPO	FONTE	MASSA MOLECULAR (kDa)	PONTES DISSULFÍDICAS
IA	Cobras e Kraits	13-15	7
IB	Pâncreas humano/suíno	13-15	7
IIA	Serpentes, líquido sinovial humano	13-15	7
IIB	Gaboon viper	13-15	6
IIC	Testículos de rato / animal marinho	15	8
IID	Baço/pâncreas de humano/ animal marinho	14-15	7
IIE	Útero/coração/cérebro de humano/ animal marinho	14-15	7
IIF	Embrião/testículo de humano/ animal marinho	16-17	6
III	Humanos/animal marinho/lagarto/abelha	15-18 55 (humano/animal marinho)	8
V	Macrófago/pulmão/coração de humano e animal marinho	14	6
IX	Veneno de caracol (conodipina-M)	14	6
X	Leucócito/timo/baço de humano	14	8
XIA	Broto de Arroz Verde (PLA2-I)	12.4	6
XIB	Broto de Arroz Verde (PLA2-II)	12.9	6
XII	Humano/animal marinho	19	7
XIII	Parvovírus	<10	0
XIV	Bactérias/fungos simbióticos	13-19	2

II. PLA2 Citosólica (cPLA2)

As cPLA2s são extensas proteínas com tamanhos variáveis (61-114kDa), são encontradas na fração citosólica de praticamente todos os tipos de células estudadas e são reguladas pelo cálcio para a translocação da enzima na membrana intracelular (SHIRAI et al., 2005).

A estrutura cristalográfica da cPLA2 de humanos demonstra dois domínios distintos, onde um aminoácido terminal dependente da ligação de Ca^{2+} ou C2 dominante e outro domínio catalítico contendo sítios ativos de resíduos de Ser228 e Ser549 (BALSINDE et al., 1999).

A ativação da cPLA2 pode ser mediada por vários sinais, como uma cascata de fosforilação, elevação intracelular de $[\text{Ca}^{2+}]$ e, talvez, níveis de inositol 4,5 fosfatidilbifosfato (MOSIOR et al., 1998). Na célula que não expressa sPLA2, a maioria do AA (6) é mobilizado pela cPLA2 durante a ativação celular. Contudo, naquelas células que contém sPLA2, o volume de AA (6) parece ser mediado pela sPLA2 e não pela cPLA2 (KUWATA, 1998).

III. PLA2 Cálcio Independente (iPLA2)

As iPLA2s são enzimas Ca^{2+} independentes e utilizam a Ser como sítio catalítico. As funções da iPLA2 incluem remodelagem do fosfolípido, degradação do AA (6) resultando na formação de eicosanóides e expressão protéica (TANG et al., 1997).

A iPLA2 não apresenta participação ativa na liberação do AA (6), sendo mais provável, esta família de enzimas interferir com o metabolismo do AA (6) via ciclo de desacetilação/ reacetilação lipídica. Recentes estudos ressaltam a participação da iPLA2 na formação de túbulos de membranas que aparecem em várias organelas intracelulares (LIPPINCOTT et al., 2001).

IV. PAF ACETILHIDROLASE (PAF-AH)

A PAF-AH hidrolisa a ligação éster sn-2 do Fator de Agregação Plaquetária (PAF) e é relacionada com fosfolípidos pró-inflamatórios e suas bioatividades. Existem pelo menos quatro isoformas distintas da PAF-AH: Ia, Ib, II e a forma eritrocítica (TJOELKER e STAFFORINI, 2000).

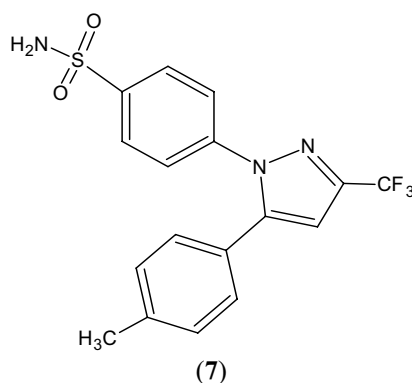
V. PLA2 Lisossomal

Esta enzima foi descoberta inicialmente no cérebro de bovino. Uma sequência purificada desta enzima demonstrou sequências idênticas a lisofosfolipase lecitina humana: colesterol aciltransferase. Esta enzima possui resíduos de His e Asp conservados sugerindo a presença de uma tríade no sítio catalítico Ser/His/Asp (HIRAOKA, 2002).

2.3.3. Inibidores dos Mediadores Químicos da Cascata do Ácido Araquidônico

Os fármacos anti-inflamatórios constituem a classe de medicamentos mais vendidos em todo o mundo, mesmo apresentando vários efeitos colaterais, sobretudo no que se refere ao trato gastrointestinal (SANTOS et al., 2007).

O processo inflamatório crônico pode ser tratado por diferentes intervenções terapêuticas, visto sua complexidade e a diversidade dos mediadores fisiológicos envolvidos. A forma clássica compreende o emprego de inibidores da prostaglandina-endoperoxído sintase (PGHS), enzima responsável pela transformação do AA (6), liberado pela PLA2, em PGs flogísticas como os agentes AINEs clássicos e, recentemente, pelo uso de agentes AINEs seletivos para a isoforma COX-2, induzida da PGHS, representados pelo rofecoxib (1) e celecoxib (7), introduzidos em 1999, no Brasil, pela MSD e Pfizer/Searle, respectivamente (BARREIRO et al, 2002).



2.3.3.1. Fármacos Anti-inflamatórios Esteróides – Corticóides

Os glicocorticóides (GC) pertencem à classe dos hormônios esteróides, com um núcleo básico derivado do colesterol–ciclopentano perhidrofenantreno. O representante

natural é o cortisol ou hidrocortisona, um composto com 21 átomos de carbono. Os GC apresentam como característica a possibilidade de atravessar a membrana lipoprotéica das células, ligando-se a receptores citosólicos e exercendo sua ação no interior do núcleo, onde interagem com o DNA através de transcrições gênicas, ou com outras proteínas implicadas no processo de transcrição através de ações não genômica, específica ou inespecífica (DAMIANI et al., 2001).

O mecanismo clássico de ação dos GC implica a ligação do esteróide a receptores citosólicos que, dimerizados, dirigem-se ao núcleo celular e ligam-se a regiões promotoras do DNA onde, na maioria das vezes, induzem à transcrição.

No mecanismo de ação tipo 1, os glicocorticóides ligam-se a um receptor localizado no citoplasma das células-alvo, através de sua subunidade carboxiterminal. O receptor de glicocorticóide (RG) inativado está ligado a um complexo protéico (~330 kDa) que inclui duas proteínas sensíveis ao calor de 90 kDa (hsp 90), uma imunofilina de 59 kDa e várias outras proteínas. Após a ligação entre o RG e o glicocorticóide, ocorre a dissociação das hsp90, expondo dois sinais de localização nuclear, e permitindo ao complexo ativado mover-se rapidamente ao núcleo e ligar-se ao DNA. Dentro do núcleo os receptores de glicocorticóides formam um dímero que se liga a sítios de ligação do DNA denominados “elementos de resposta de glicocorticóides” (GRE). A ligação do esteróide ao GRE costuma levar, mais freqüentemente, a uma indução na transcrição de vários genes, dentre eles, os que codificam lipocortina, vasocortina, endonuclease, ribonucleases, endopeptidases, somatostatina, fator inibidor de migração, receptores para hormônios e citocinas (IL-1, IL-2).

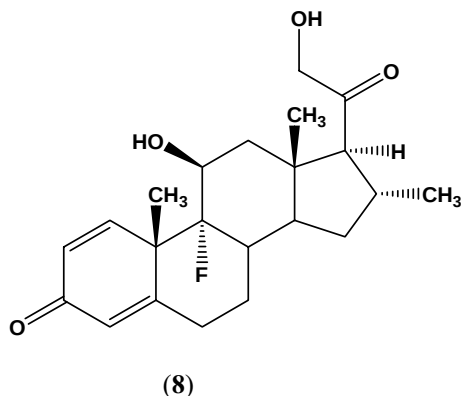
No entanto, pode ocorrer também uma inibição da transcrição gênica. Ocorre que a maioria das interleucinas e citocinas, que são induzidas no processo inflamatório e que são bloqueadas pelos GC, não apresenta, nas regiões promotoras de seus genes, os “elementos de resposta aos glicocorticóides”, que são os locais onde o complexo GC-Receptor se liga (DAMIANI et al., 2001).

Verificou-se que, ao lado da ação genômica dos GC, pode haver ação por interação proteína/proteína, sem interação com o DNA. Neste mecanismo de ação (tipo 2), não há ligação com os GREs. Os glicocorticóides ativam a proteína ativadora-1 (AP-1), um fator de transcrição composto de dímeros da família de proteínas Jun e Fos (poderia haver interação com outros fatores nucleares, como por exemplo, Kapa/B). Isto leva, mais freqüentemente, à inibição da transcrição de vários genes envolvidos nas respostas inflamatória e/ou imune como citocinas, sintetase do óxido nítrico, COXs, PLA2, elastase, collagenase, ativador de plasminogênio. Quando os níveis dos glicocorticóides caem, ocorre uma dissociação rápida

destes com os receptores intranucleares, com parada da resposta transcricional. Como os glicocorticóides são responsáveis pela síntese de macromoléculas, pode levar algumas horas a dias para que os seus efeitos se façam presentes. Por outro lado, a duração das ações dos glicocorticóides pode prolongar-se até algum tempo após a queda de seus níveis.

A ligação do GC com receptores de diferentes capacidades de interação quer com proteínas, quer com o próprio DNA, responde pelas diferentes potências das várias preparações esteróides (BAXTER, 1990; BAXTER, 1992).

Os corticosteróides, a exemplo, dexametasona (**8**) podem ser utilizados para suprimir a destruição tecidual que afetam diversas doenças inflamatórias, os quais promovem a síntese de um inibidor da PLA2 e inibem a liberação do AA (**6**) nas células inflamatórias. O inibidor regulador induzido pelos corticóides é conhecido atualmente como uma família de proteínas, referidas como lipocortinas (RUBIN e FARBER, 2002).



O uso terapêutico dos corticosteróides resulta em duas categorias de efeitos tóxicos: aquela decorrente da interrupção da terapia com esteróides e aquela resultante do uso contínuo de doses supra-fisiológicas. A complicação mais grave da suspensão de um GC é a insuficiência supra-renal aguda, resultante da interrupção demasiada rápida dos GCs após terapia prolongada (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Nos últimos 50 anos, os GC têm sido a droga com efeito anti-inflamatório e imunossupressor mais comumente utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. Seus excelentes efeitos terapêuticos como anti-inflamatório e imunossupressor são, freqüentemente, acompanhados por graves e, algumas vezes, irreversíveis efeitos colaterais, como diabetes mellitus, úlcera péptica, síndrome de Cushing com supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma, entre outras, ficando o uso dos GC limitado por estes efeitos colaterais (CASTRO, 2005).

2.3.3.2. Fármacos Anti-inflamatórios Não-Esteróideais (AINEs)

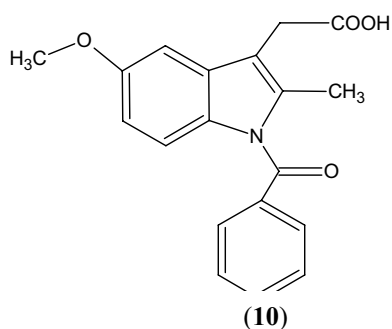
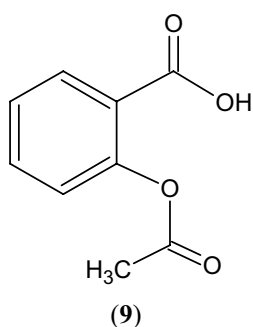
Os AINEs constituem um grupo heterogêneo de fármacos que possuem em comum certas ações terapêuticas, como atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória, além de características estruturais comuns. Ademais os mesmos atuam na biossíntese das PGs, agindo diretamente na inibição de enzimas das COXs, sem qualquer atuação na via LOXs (WILLIAMS, LEMKE e FOYE, 2002).

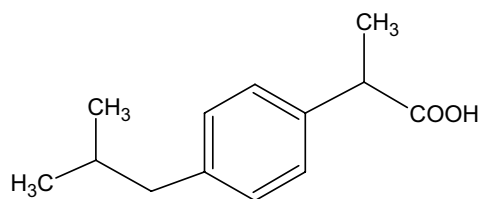
Os diversos tipos de AINEs inibem de forma diferenciada as enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e são classificados como inibidores não seletivos e inibidores seletivos da COX-2 (FITZGERALD, 2003).

Os AINEs são, em sua maioria, ácidos orgânicos e, ao contrário do ácido acetilsalicílico (**9**), atuam como inibidores reversíveis da atividade da cicloxigenase. Como ácidos orgânicos, os compostos em geral são bem absorvidos por via oral, ligam-se altamente às proteínas plasmáticas e são excretados por filtração glomerular ou secreção tubular (GOODMAN & GILMAN, 2003).

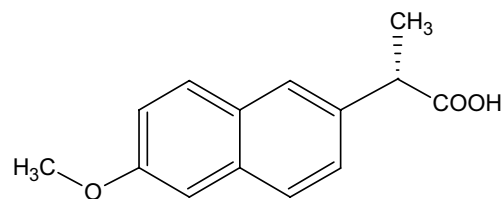
Ao contrário do ácido acetilsalicílico (**9**), cuja duração da ação é determinada pela taxa de síntese de novas cicloxigenases, a duração de ação de todos os outros AINEs que são inibidores reversíveis das COXs, está primariamente relacionada com a depuração farmacocinética dos fármacos pelo organismo. Os AINEs podem ser, a grosso modo, divididos em dois grupos: os com meias-vidas curtas (menor de 6 h) e os com meias-vidas longas (maior de 10 h). Como os AINEs são ácidos orgânicos estes acumulam-se nos locais de inflamação, o que representa uma propriedade farmacocinética interessante para fármacos usados como anti-inflamatórios (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Como representantes do grupo destacam-se o ácido acetilsalicílico (**9**) e vários outros grupos de ácidos orgânicos, que incluem os derivados do ácido arilalanóico, *i.e.*, indometacina (**10**) e ibuprofeno (**11**), naproxeno (**12**), além da família dos oxicams, *i.e.*, piroxicam (**13**), tenoxicam (**14**), entre outros (INSEL, 1996).

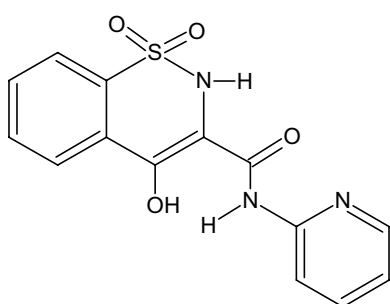




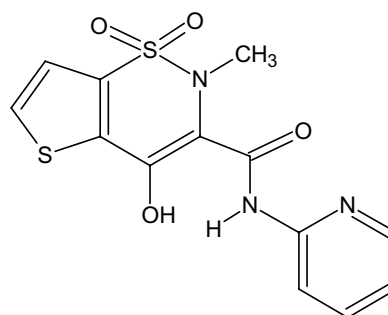
(11)



(12)



(13)



(14)

Os AINEs constituem o grupo de medicamentos que são largamente usados para combater a febre e a dor aguda ou crônica. Representam as medicações mais vendidas em todo o mundo e, em conjunto com os analgésicos e antitérmicos, correspondem a aproximadamente 30% dos medicamentos utilizados (prescritos ou não por médicos) (HILARIO et al., 2006).

A história dos AINEs remete ao uso de extrato de casca de salgueiro no início da história e avança até a fronteira dos avanços tecnológicos e novas indicações para o uso de aspirina® e outros anti-inflamatórios (JONES, 2001).

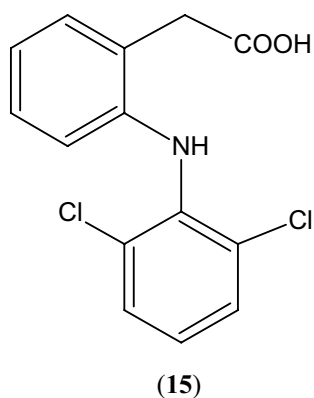
O ácido acetilsalicílico (AAS) (9) é o protótipo dos AINEs e pode ser considerado o precursor dos demais agentes anti-inflamatórios. Entretanto, cerca de 15% dos pacientes mostram intolerância à aspirina. Seu principal mecanismo de ação é a inibição irreversível da atividade das isoenzimas cicloxigenases COX-1 e COX-2, por acetilação covalente de um resíduo de serina próximo ao sítio ativo das cicloxigenases, que propiciam a transformação do ácido araquidônico em PGH₂, que é o precursor imediato da PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂ e TXA₂, ocorrendo bloqueio da produção de tromboxane A₂. É importante lembrarmos que as plaquetas produzem a PGH₂ que é responsável pela liberação do TXA₂, um potente agregante plaquetário e vasoconstrictor. Este tem suas ações contrabalançadas pela liberação

da prostaciclina (PGI₂) das células endoteliais vasculares, produzindo vasodilatação e inibindo a agregação plaquetária (OLIVEIRA, 2001).

As plaquetas são particularmente suscetíveis à inativação irreversível e prolongada da cicloxigenase mediada pelo AAS, visto que têm pouca ou nenhuma capacidade de biossíntese protéica e, assim, são incapazes de regenerar a enzima cicloxigenase. Em termos práticos, isso significa que uma dose única de AAS irá inibir a cicloxigenase plaquetária durante toda a vida da plaqueta (8-11 dias); nos seres humanos é suficiente uma dose diária de AAS de apenas 40 mg para produzir este efeito (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Dos agentes antiagregantes, o AAS (**9**) é o mais empregado e conseqüentemente o mais bem conhecido de sua classe. Uma metanálise de aproximadamente 50 estudos demonstrou que esta droga é capaz de reduzir em 15% a mortalidade por eventos vasculares fatais e 30% dos não fatais. Estudos randomizados demonstraram que baixas doses, como 75 mg, são efetivas para a redução do risco do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), ou morte em pacientes com Síndrome Coronariana Aguda (SCA) e angina crônica. São também efetivas em diminuir a mortalidade e a ocorrência de Acidente Vascular Encefálico (AVE) em pacientes com isquemia cerebral transitória (OLIVEIRA, 2001).

O diclofenaco (**15**) é um dos AINEs mais utilizados na terapêutica, aprovado em cerca de 120 países desde sua introdução há 25 anos atrás, e é o 30º fármaco no ranking dos 200 mais vendidos nos Estados Unidos da América (BANDARAGE et al., 2000). Apesar de sua larga utilização, o diclofenaco não é um fármaco seletivo COX-2, e seu uso crônico está relacionado com alterações na integridade e função gastrointestinal (VELÁZQUEZ et al., 2005).



A síntese da COX-2 está aumentada nos processos inflamatórios, tanto nas articulações, como no endotélio vascular e tecido renal. Fármacos com ação seletiva sobre a

COX-2 inibem a síntese da prostaglandina I₂, que tem ação vasodilatadora e impede a adesão de leucócitos ao endotélio vascular (BRICKS e SILVA, 2005).

O paracetamol (5) é um AINE antipirético e analgésico, porém desprovido em grande parte de atividade anti-inflamatória. Esta última pode ser explicada pelo fato deste inibir efetivamente as cicloxigenases no cérebro, mas não nos locais de inflamação nos tecidos periféricos. E também, parece inibir a enzima apenas num ambiente de baixo teor de peróxido, o que pode explicar em parte sua baixa atividade anti-inflamatória, visto que os locais de inflamação, em geral, contêm concentrações elevadas de peróxidos produzidos pelos leucotrienos (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Paralelamente à descoberta da COX-2, foi desenvolvida a classe dos AINEs de 2ª geração, uma vez que estes apresentam maior índice de seletividade pela COX-2. Estudos mais recentes levaram ao desenvolvimento de um grupo de fármacos anti-inflamatórios seletivos. Estes fármacos são amplamente utilizados em tratamentos de osteoartrites e artrite reumatóide.

Entretanto, os AINEs de segunda geração, inibidores da COX-2, que apresentam alto índice de seletividade, de forma semelhante aos demais AINEs, podem promover alterações da função renal, resultando principalmente em edema periférico, hipertensão, inibição da excreção renal de água e sódio e hipercalemia. A hipercalemia pode ser resultante da redução na liberação de renina mediada por prostaglandina, que por sua vez promove uma redução na formação de aldosterona e decréscimo na excreção de potássio no túbulo distal (HINZ e BRUNE, 2002).

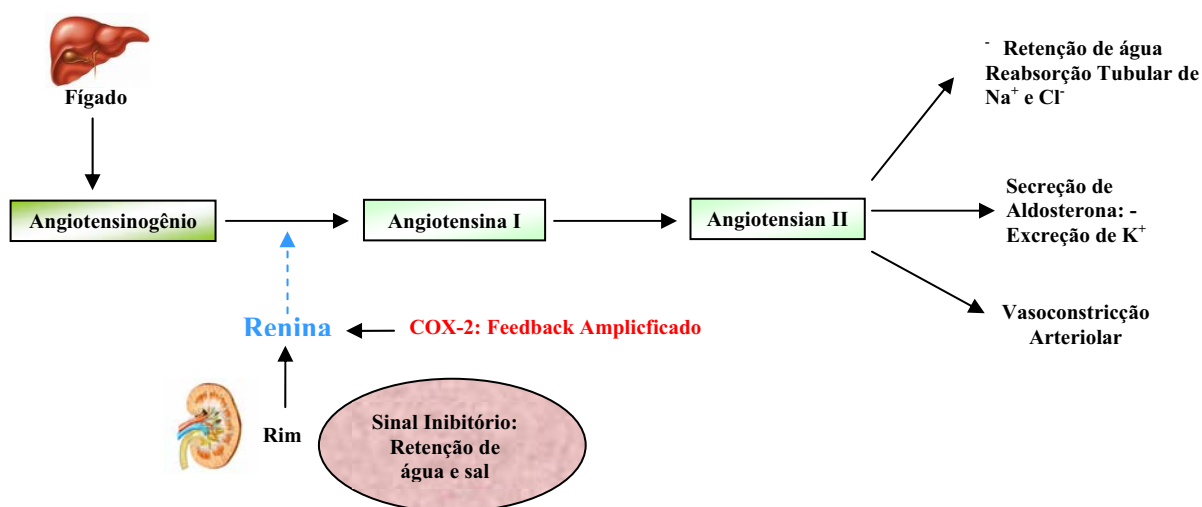


FIGURA 09- Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, adaptado de GOODMAN & GILMAN, 2003.

2.3.3.3. Inibidores da sPLA2

Os mediadores derivados do AA (6) estão envolvidos em uma ampla variedade de atividades fisiológicas e sua produção excessiva está envolvida na fisiopatologia de numerosas doenças como é o caso das inflamações, alergias, doenças do sistema nervoso central, desenvolvimento de câncer e metástase, doenças cardiovasculares e uma variedade de doenças do pulmão (YEDGER et al., 2003).

Dados os inconvenientes da inibição seletiva da produção de eicosanóides, o controle da produção de AA (6) pela inibição da PLA2 no local da inflamação emerge como uma estratégia inovadora e alternativa aos fármacos anti-inflamatórios que já se encontram no mercado. A inibição da sPLA2 pode resultar na supressão de importantes classes de lipídios pró-inflamatórios. Ademais, o uso de inibidores da PLA2 tem sido considerado como uma estratégia no tratamento de doenças inflamatórias e dano tecidual (SNYDER, 1995).

Muitos dos novos inibidores de PLA2 não foram potentes ou específicos para as isoformas. Mais recentemente, vários novos inibidores de sPLA2 têm sido desenvolvidos. A Tabela 04 lista vários inibidores de PLA2 incluindo as isoformas que eles inibem e o tipo de inibição (CUMMINGS et al., 2000).

TABELA 04- Inibidores de isoformas da PLA2 geralmente usados, adaptado de Cummings et al., 2000.

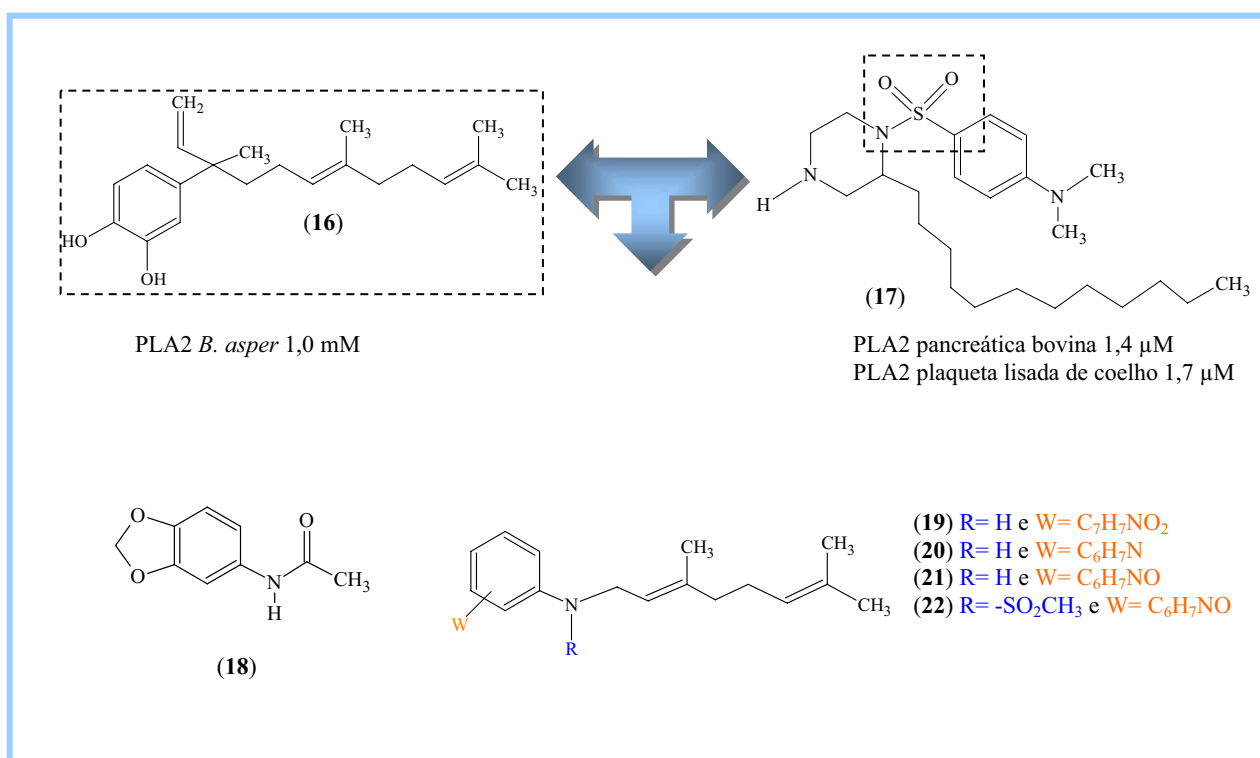
INIBIDOR	ISOFORMA ESPECÍFICA	TIPO DE INIBIÇÃO
Manoalida	Geral	Irreversível
Bromida <i>p</i>-Bromofenacil	Geral	Irreversível
Ácido propanosulfônico 3-(3-Acetamida-1-benzil-2-2-etilindolil-5-oxi) (LY311727)	sPLA2	Competitivo
Trifluorometil araquidonil cetona	cPLA2, iPLA2	Reversível
Araquidonilmetil fluorofosfanato	cPLA2, iPLA2	Reversível Irreversível
BEL	iPLA2	Irreversível

A PLA2, particularmente a do grupo IIA, tem demonstrado um papel importante na fisiopatologia de várias doenças, como artrite, choque séptico, danos múltiplos, peritonite difusa e pancreatite aguda. Nestas patologias humanas, o aumento significativo da atividade da PLA2 tem sido descrito correlacionado com a severidade da doença. Além disso, a sPLA2 tem um papel principal na propagação e amplificação de outras desordens inflamatórias (BOUKLI et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios, foi descrito neste trabalho o planejamento de novos candidatos a protótipos de fármacos (18-22) originalmente desenhados a partir dos protótipos nerolidilcatecol (16) e do arilsulfonilpiperazina (17), por apresentarem perfil inibitório da enzima sPLA2.



ESQUEMA 1

As séries propostas (18-22) foram desenhadas através do emprego de hibridação molecular, onde foram agregadas subunidades estruturais presentes no nerolidilcatecol (16), bem como presentes no derivado arilsulfonilpiperazina (17). Vale salientar que vários fármacos, *i.e.* celecoxibe (7), apresentam em sua estrutura a subunidade sulfonamida.

3.2. Objetivos Específicos

- I. Sintetizar os compostos objeto de estudo (18-22) através do emprego da síntese orgânica medicinal.
- II. Efetuar os ensaios farmacológicos dos compostos alvo frente ao método de Habermann e Hardt.
- III. Efetuar o estudo teórico através do emprego de dinâmica molecular sobre um protótipo eventualmente identificado a fim de melhor compreender o processo dinâmico envolvido nas interações entre os compostos planejados e seu alvo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parte Experimental

Os compostos sintetizados foram caracterizados através das metodologias convencionais de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C).

Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos a 75 MHz e o de RMN ^1H a 300 MHz em aparelho Varian Mercury plus (Instituto de Química da Universidade de Brasília-IQ-UnB), os espectros de RMN ^1H , de HMBC e HSQC foram obtidos no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em aparelho Bruker Avance a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C e as amostras foram dissolvidas em CDCl_3 tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS).

Os espectros na região do infravermelho (I.V.) foram obtidos em um aparelho Perkin-Elmer Spectrum Bx-II FT-IR System do Laboratório de Controle de Qualidade da Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de alumínio Whatman F 254, 0,2 mm de espessura empregando-se como fase móvel (CH_2Cl_2 :MeOH) 95:5 e (*n*-hexano:AcOEt) 70:30.

A visualização dos compostos foi realizada através de CCD e detecção por lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm). O citral foi monitorado nas reações através do revelador em CCD 2,4-dinitrofenilhidrazina e as aminas aromáticas com *p*-dimetilaminobenzaldeído.

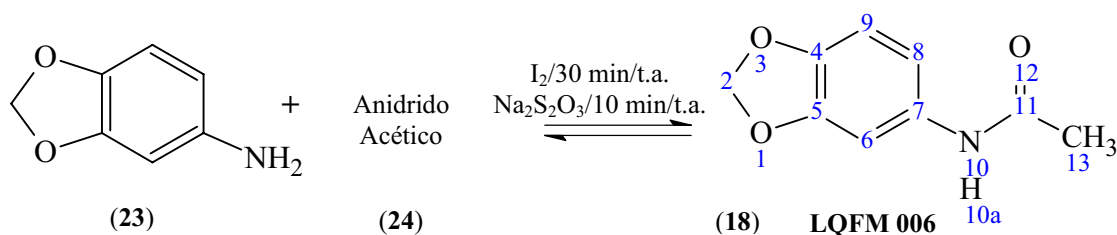
A acidificação e neutralização, quando necessárias, foram efetuadas através do emprego de solução de HCl 10% (v/v) e solução de NaHCO_3 10% (p/v). A neutralização foi monitorada com papel pHmetro da marca Merck. Para removermos o catalisador I_2 empregamos solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10% (p/v).

As fases orgânicas foram secas com Na_2SO_4 anidro (sulfato de sódio) e o solvente removido à pressão reduzida.

Para análise dos resultados farmacológicos foi utilizado o programa de avaliação estatística ANNOVA.

4.2. Metodologia Sintética

4.2.1. N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamida (MUKHOPADHYAY et al., 2004)



Em um béquer de 50 mL foram adicionados 500 mg de 3,4-metilenodioxianilina (3,64 mmol **(23)**), 0,4 mL de anidrido acético (3,71 mmol) **(24)** e 0,026 mg de I_2 . A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente, posteriormente foram adicionados 20 mL de CH_2Cl_2 e adicionado 20 mL de solução aquosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (tiosulfato de sódio) 10% e a mistura resultante foi mantida sob agitação por mais 10 minutos. Ao término, a fase orgânica foi separada e seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado à pressão reduzida, obtendo-se 400 mg de produto **(18)** (61,4%), como um óleo preto, R.f.= 0,50; (CH_2Cl_2 :MeOH) 95:5.

RMN- ^1H (500 MHz) CDCl_3 / TMS (δ): δ = 7,72 (1H, s, N-H); δ = 7,17 (1H, d, J=2,0 Hz, H-6); δ = 6,77 (1H, dd, J=2,0 e 8,4 Hz, H-8); δ = 6,70 (1H, d, J= 8,4 Hz, H-9); δ = 5,92 (2H, s, H-2); δ = 2,12 (3H, s, H-13).

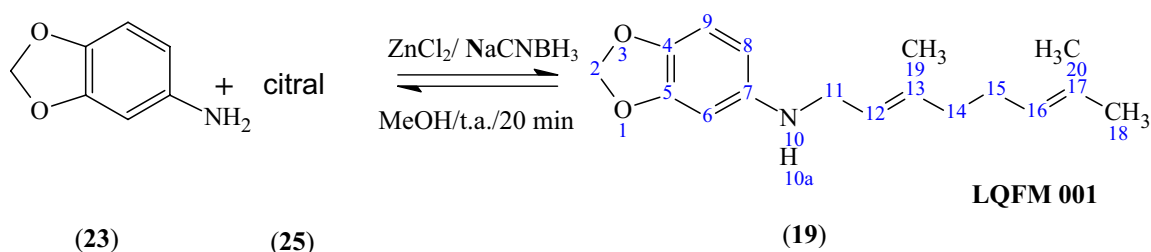
RMN - ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 / TMS (δ): δ = 168,6 (C-11); δ = 144,3 (C-5); δ = 147,5 (C-4); δ = 132 (C-7); δ = 113,6 (C-8); δ = 108,2 (C-9); δ = 101,4 (C-2);

I.V. máx. (cm^{-1}): 3350 (v N-H); 3150 (v CH); 2918 (v CH_3); 1659 (v C=O).

4.2.2. Procedimento Geral para a Reação de Aaminação Redutiva (LUO et al., 2004)

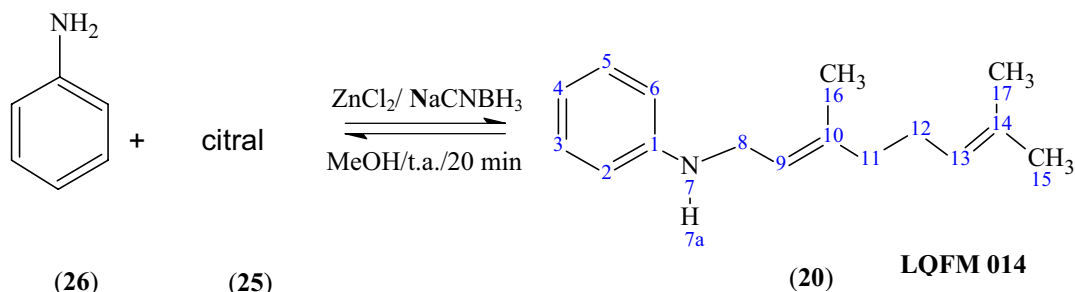
Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 3 mL de metanol, 1,0 mmol de citral (**25**), 0,50 mmol de ZnCl_2 (cloreto de zinco), permanecendo sob agitação por cinco minutos. Na sequência foram adicionados (1,02 mmol) das anilinas (**23**, **26**, **27**), permanecendo sob agitação por cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,50 mmol de NaCNBH_3 (cianoborohidreto de sódio) e a mistura reacional permaneceu sob agitação por 20 minutos, à temperatura ambiente (ta). Ao término da reação, monitorada através de CCD, foram adicionados 40 mL de solução aquosa de HCl 10% e mantida sob agitação por cinco minutos. Após este período, o excesso de citral (**25**) foi removido através de extração com alíquotas de *n*-hexano (5x10 mL). Posteriormente, a fase aquosa foi neutralizada com 20 mL de solução aquosa de NaHCO_3 10%, verificado através do emprego de papel pH-metro $\sim 6,5$, e extraído com alíquotas de CH_2Cl_2 (3x15 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

4.2.2.1. E-N-(3,7-dimetilocta-2,6-dienil) benzo[d] [1,3]dioxol-5-amina (LUO et al., 2004)



Foram obtidos 200 mg (71,8%) de *E*-N-(3,7-dimetilocta-2,6-dienil) benzo[d] [1,3]dioxol-5-amina (**19**), como um óleo marrom escuro, R. f.=0,92 (CH₂Cl₂:MeOH) 95:5. RMN- ¹H (300 MHz) CDCl₃ / TMS (δ): δ= 6,66-6,06 (4H, m, H-9, H-6 e H-8); δ= 5,85 (2H, s, H-2); δ= 5,32 (2H, m, H-11); δ= 5,08 (1H, m, H-12); δ= 3,63 (1H, s, N-H); δ= 2,11-2.032 (2H, m, H-14); δ= 1,74 (3H, s, H-19); δ= 1,69 (3H, s, H-20); δ= 1,61 (3H, s, H-18). I.V. máx. (cm⁻¹): 3301 (ν N-H); 3100 (ν C-H); 2936 (ν CH₃); 1684 (ν C=O); 1373 (ν C-N).

4.2.2.2. (E)-N-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (LUO et al., 2004)

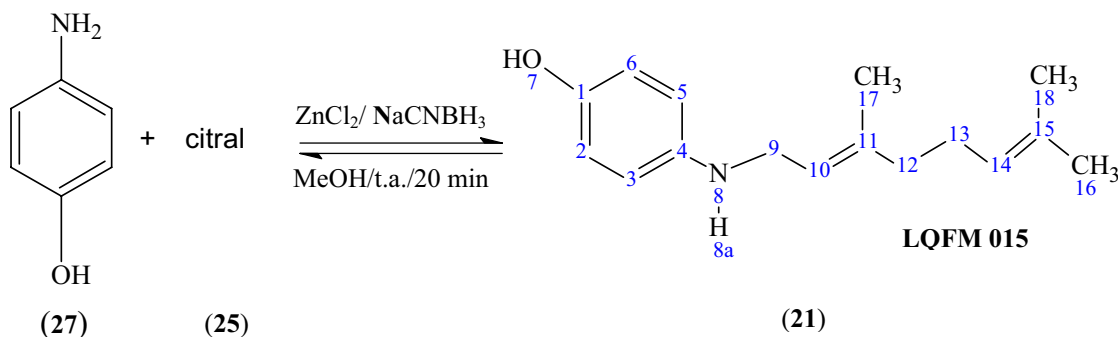


Foram obtidos 180 mg (77,1%) de (*E*)-*N*-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (**20**), como um óleo marron claro, R. f.= 0,91; (*n*-hexano:AcOEt) 70:30.

RMN- ^1H (500 MHz) CDCl_3 / TMS (δ):): δ = 5,36-5,32 (1H, m, H-9); δ = 5,13-5,07 (1H, m, H-13); δ = 3,70 (1H, dd, J = 6,8 e 0,7 Hz, H-8a); δ = 3,68 (1H, dd, J = 6,8 e 1,14 Hz, H-8b); δ = 2,05-2,02 (2H, m, H-11); δ = 2,07-2,13 (2H, m, H-12); δ = 1,75 (1H, dd, J =1,2 e 2,5 Hz, N-H); δ = 1,71 (3H, sl, CH_3); δ = 1,69 (3H, d, J =1,2, CH_3); δ = 1,61 (3H, d, J = 1,1 Hz, CH_3).

I.V. máx. (cm^{-1}): 3558 (v N-H); 3100 (v C-H); 2906 (v CH_3); 1375 (v C-N).

4.2.2.3. (E)-4-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)(aminometil)fenol (LUO et al., 2004)



Foram obtidos 150 mg (60%) de (*E*)-4-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)(aminometil)fenol (21), como um óleo vermelho escuro, R.f.= 0,66; (*n*-hexano:AcOEt) 70:30.

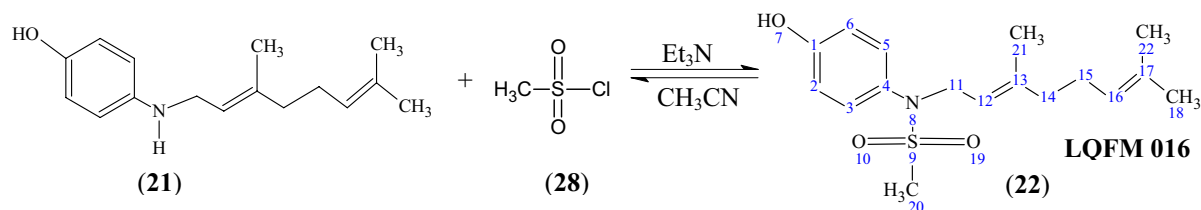
RMN- ^1H (500 MHz) CDCl_3 / TMS (δ): δ = 6,74 (2H, d, J =8,2 Hz, H-3 e H-5); δ = 6,91 (2H, d, J =8,2 Hz, H-2 e H-6); δ = 6,28 (1H, s, H-7); δ = 5,43-5,31 (1H, m, H-10); δ = 5,10-4,99 (1H, m, N-H); δ = 3,93-3,88 (1H, m, H-14); δ = 3,77-3,73 (2H, m, H-9); δ = 2,12-1,97 (4H, m, H-12 e H-13); δ = 1,66 (3H, s, CH_3); δ = 1,57 (3H, s, CH_3); δ = 1,55 (3H, s, CH_3).

I.V. máx. (cm^{-1}): 3427-3300 (ν N-H); 3200 (ν O-H); 2900 (ν CH_3); 1327 (ν C-N).

4.2.3. Procedimento Geral para a Reação de Sulfonação

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 5 mL de acetonitrila (CH_3CN), 1,0 mmol do derivado (**21**) 1,0 mmol de trietilamina (ET_3N), 1,0 mmol de cloreto de metanossulfonil ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$) (**28**), permanecendo sob agitação por uma hora. Ao término da reação, monitorada através de CCD, foram adicionados 45 mL de H_2O e a mesma foi extraída com alíquotas de CH_2Cl_2 (3x15 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

4.2.3.1.(E)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)-N-(4-idroxifenil)metanosulfanoamida



Foram obtidos 50 mg (50%) de (*E*)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)-N-(4-hidroxifenil)metanosulfanoamida (**22**), como um óleo marrom escuro, R.f= 0,80; (*n*-hexano:AcOEt) 70:30.

RMN- ^1H (500 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): δ = 7,16-7,12 (2H, dd, J =8,4 Hz, H-3 e H-5); δ = 6,85-6,80 (2H, dd, J =8,8 Hz, H-2 e H-6); δ = 5,23-5,10 (H, m, H-12); δ = 4,17-4,16 (1H, d, N-H); δ = 3,64-3,61 (1H, m, H-16); δ = 2,92-2,91 (2H, d, J =3,0 Hz, H-11); δ = 2,00-1,92 (4H, m, H-14 e H15); δ = 1,68-1,50 (9H, m, H-21, H-22 e H-18).

I.V. máx. (cm^{-1}): 3322 (v N-H); 3200 (v C-H); 2877 (v CH_3); 1307 (v C-N).

4.3. Metodologia de Modelagem Molecular

A parte relativa à modelagem molecular foi desenvolvida na Faculdade de Farmácia (FF) e Instituto de Física (IF) da Universidade Federal de Goiás sob forma de colaboração com o Dr. José Ricardo Sabino.

De maneira geral, os compostos estudados foram desenhados no programa PC Spartan Pro e submetidos a otimização geométrica através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1. Após a otimização geométrica os compostos foram submetidos à análise conformacional sistemática e as conformações de menor energia foram empregadas nos cálculos de “Single-point”.

O estudo da dinâmica teve início com a eleição da enzima PLA2, cujos dados se encontram disponíveis no “Protein Data Bank” (PDB). A partir destes dados, foram analisados seus arquivos de topologia e desenvolvido o primeiro “script” (em anexo) para realização das simulações. Paralelamente às simulações sobre a enzima PLA2, o composto objeto de estudo deste trabalho *i.e.* (19), ocorreu a parametrização para que se possa, na seqüência, dar continuidade aos estudos de dinâmica entre a enzima e o inibidor. A parametrização em questão está sendo realizada através do emprego do programa Gaussian 03 (FRISCH e POPLE, 2005).

Para o estudo das interações entre ligantes e enzimas através de dinâmica molecular, foi empregado o programa “Nanoscale Molecular Dynamics” (NAMD) (PHILLIPS, 2005), que é de domínio público.

4.4. Metodologias Farmacológicas

4.4.1. Inibição da Atividade da PLA2

O planejamento estrutural foi validado frente ao ensaio farmacológico baseado no método de inibição da atividade da PLA2, originalmente descrito por Habermann e Hardt (1972) e modificado para a quantificação da ação da fosfolipase A2 da peçonha de serpentes e avaliação de substâncias inibidoras (GUTIÉRREZ et al., 1988; FORTES-DIAS et al., 1999). A inibição da atividade da PLA2 foi avaliada através da formação de halo em substrato lipídico (fonte de ácidos graxos).

Como fonte da enzima PLA2 foi utilizada peçonha de *Bothrops moojim* (espécie de jararaca) obtida do Laboratório de Toxicologia, Controle de Estudos e Pesquisas Biológicas da Universidade Católica de Goiás (UCG) sob a coordenação da Prof. MSC Marta Regina Magalhães.

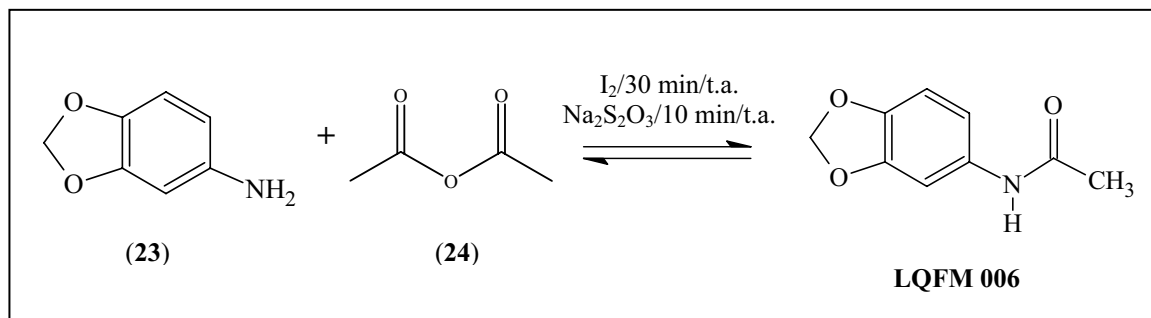
Uma solução de agarose (0,6%) em tampão Tris 0,05 M (pH 7,5) foi preparada e em seguida foi adicionado a essa solução 0,96% de suspensão de albumina de ovo, como fonte de substrato (1:3 em salina) e 0,96% de solução 0,01 M de CaCl_2 , transferindo-se para placas de Petri. Após solidificação do gel, foram perfuradas cavidades com dois milímetros de diâmetro. Em seguida foi inoculado a solução da peçonha de serpente (125 $\mu\text{g/mL}$), utilizada como controle padrão, juntamente com igual volume de LQFM 001, LQFM 006, LQFM 014, LQFM 015 e LQFM 016 em veículo DMSO 3% (6,66 mmol/mL) e como controle positivo foi utilizada quercetina em veículo DMSO 3% (6,66 mmol/mL) para o ensaio das moléculas LQFM 001, LQFM 006, LQFM 014, LQFM 015 e LQFM 016; após sessenta minutos 10 μL de cada mistura foram adicionados às cavidades. Após inoculação, as placas foram incubadas a 50°C por vinte horas, sendo então, realizada a medida dos halos, por meio de paquímetro, formados pela atividade da PLA2. Os resultados foram expressos em valores percentuais relativos ao grupo controle padrão.

Foi realizado também ensaio com o composto 4-nerolidilcatecol (**16**), obtido no Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética (BIOPK) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF – UFGO), nas concentrações de 11,93, 6,36, 3,18 e 1,59 mmol/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

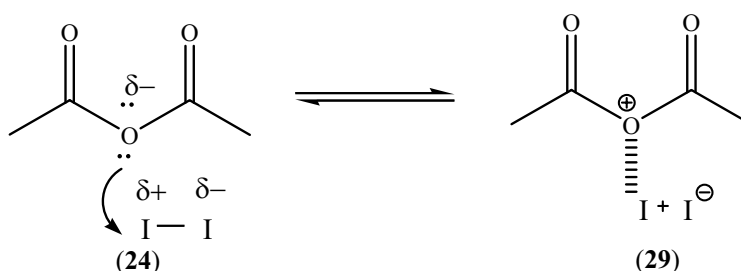
5.1. Síntese Orgânica Medicinal

O início da etapa de síntese orgânica medicinal se deu com a reação de acetilação do 3,4-metilenodioxianilina (**23**), sendo efetuada através do emprego de anidrido acético (**24**) e iodo molecular como catalisador (MUKHOPADHYAY, 2004), levando à obtenção do produto desejado (**18**) denominado de LQFM 006 em 61,4% de rendimento.



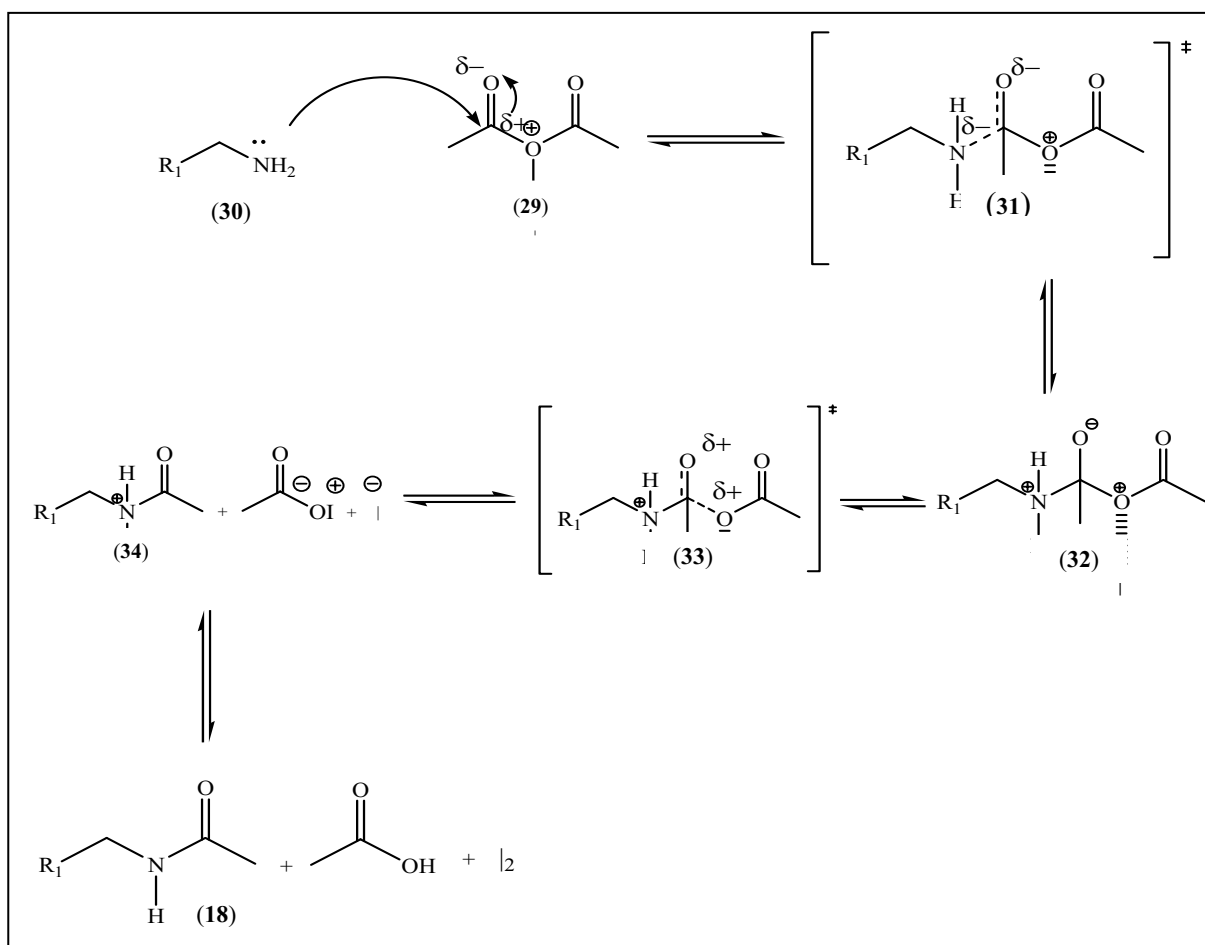
ESQUEMA 2

O mecanismo para a reação de acetilação pode ser dividido na etapa de ativação do anidrido acético (**24**) (Esquema 3), seguido das etapas de adição e eliminação (Esquema 4). Na etapa de ativação do anidrido acético, o iodo molecular se complexa com o anidrido acético (**24**) através de interações dipolo-dipolo, levando a formação da espécie (**29**).



ESQUEMA 3

Como ilustrado no Esquema 3, o catalisador iodo ao se complexar com o anidrido acético (**24**), o mesmo auxilia na etapa de eliminação do processo, uma vez que ao deixar o átomo de oxigênio positivo, o torna um melhor grupo abandonador (SARMA, 1997).



ESQUEMA 4

Devido à semelhança estrutural existente entre *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamida (**18**) e o fármaco paracetamol (**5**), que também inibe a enzima sPLA2 (HORTON e WOOD, 1989; HAMRICK e HARRIS, 1993), o mesmo foi sintetizado. No Esquema 5, é possível observar semelhanças entre o anel 4-hidroxifenil com o anel 1,3-benzodioxola, *i.e.* seis elétrons π , além de subunidades aceptoras de ligação de hidrogênio, na posição *para* acetamida, que se encontram à distância de 5.52 Å (**18**) e 5.58 Å (**5**) do átomo de nitrogênio amídico, respectivamente.

A fim de se analisar as similaridades estruturais tridimensionalmente, já mencionadas a partir da análise bidimensional, as moléculas (**18**) e (**5**) foram submetidas à análise conformacional, em nível semi-empírico, empregando a base Austim Model (AM1). Ao final da análise conformacional, as conformações de menor energia ao cálculo de “single point energy” (energia de um único ponto), de onde foram obtidas as informações de energia, área

($\text{\AA}^2$) volume ($\text{\AA}^3$) e momento dipolo, além da medida das distâncias envolvida entre as subunidades aceptoras de ligação de hidrogênio e átomo de nitrogênio amídico (Figura 10).

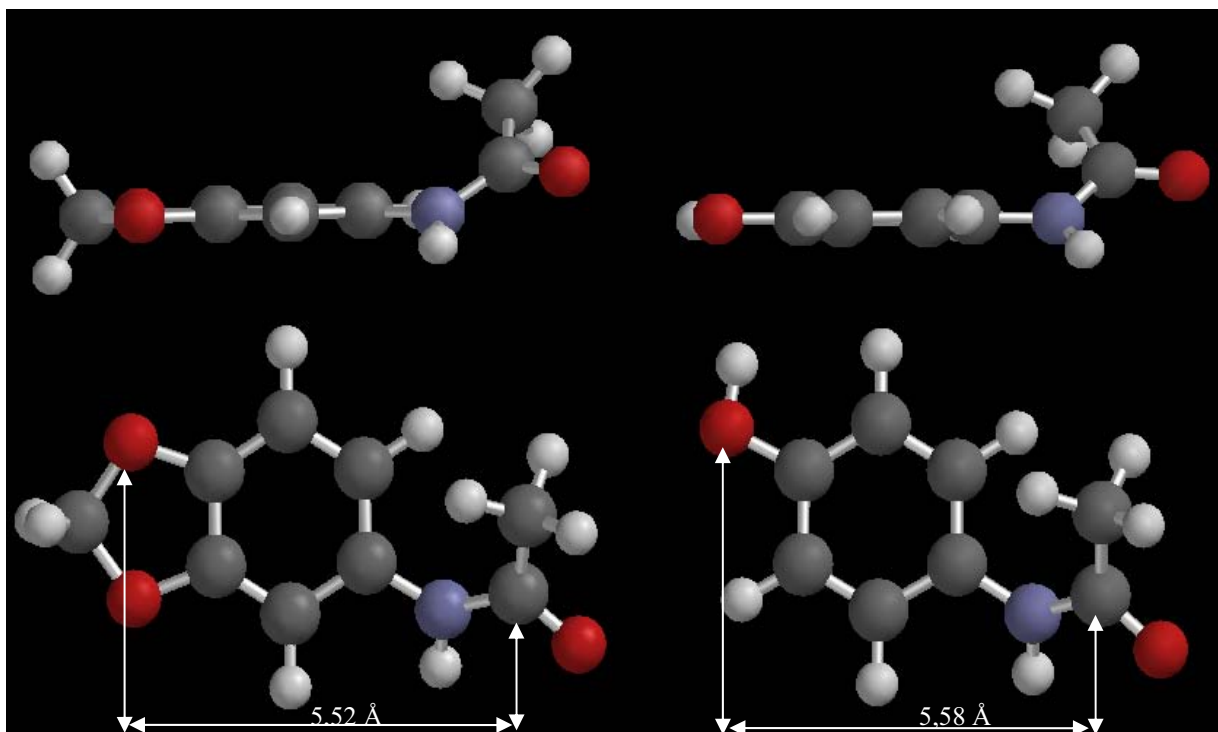
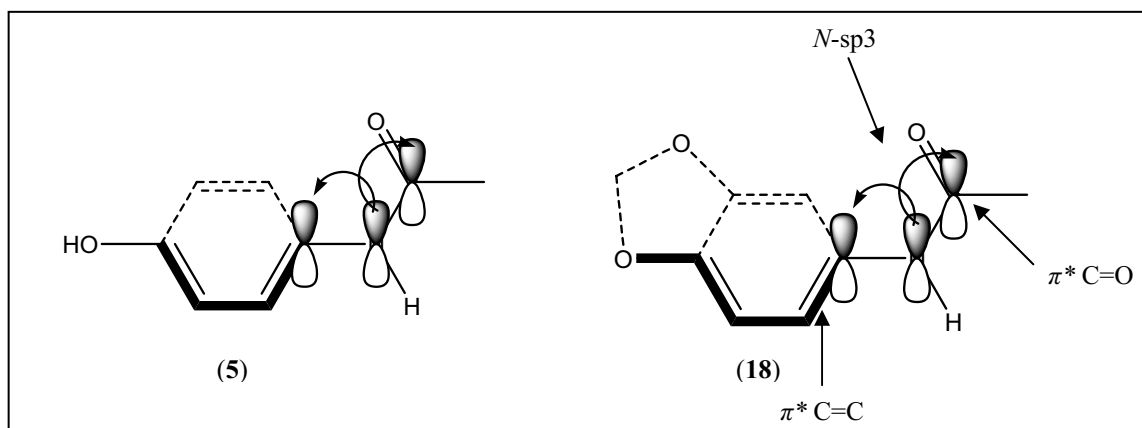


FIGURA 10- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 006 (**18**) e paracetamol (**5**), através do emprego do programa SPARTAN PRO.

Como pode ser observado na Tabela 05, as conformações de menor energia para os derivados (**18**) e (**5**), são $E = 58,411$ kcal/mol e $E = 59,102$ kcal/mol, respectivamente. Provavelmente as conformações observadas se devem a um provável efeito hiperconjugativo, como está ilustrado no Esquema 5. Neste sentido, o par de elétrons não ligantes do átomo de nitrogênio amídico do orbital ligante ($N\text{-}sp^3$) transfere densidade de elétrons para ambos orbitais antiligantes do anel aromático ($\pi^* \text{C}=\text{C}$) e subunidade carbonila ($\pi^* \text{C}=\text{O}$).

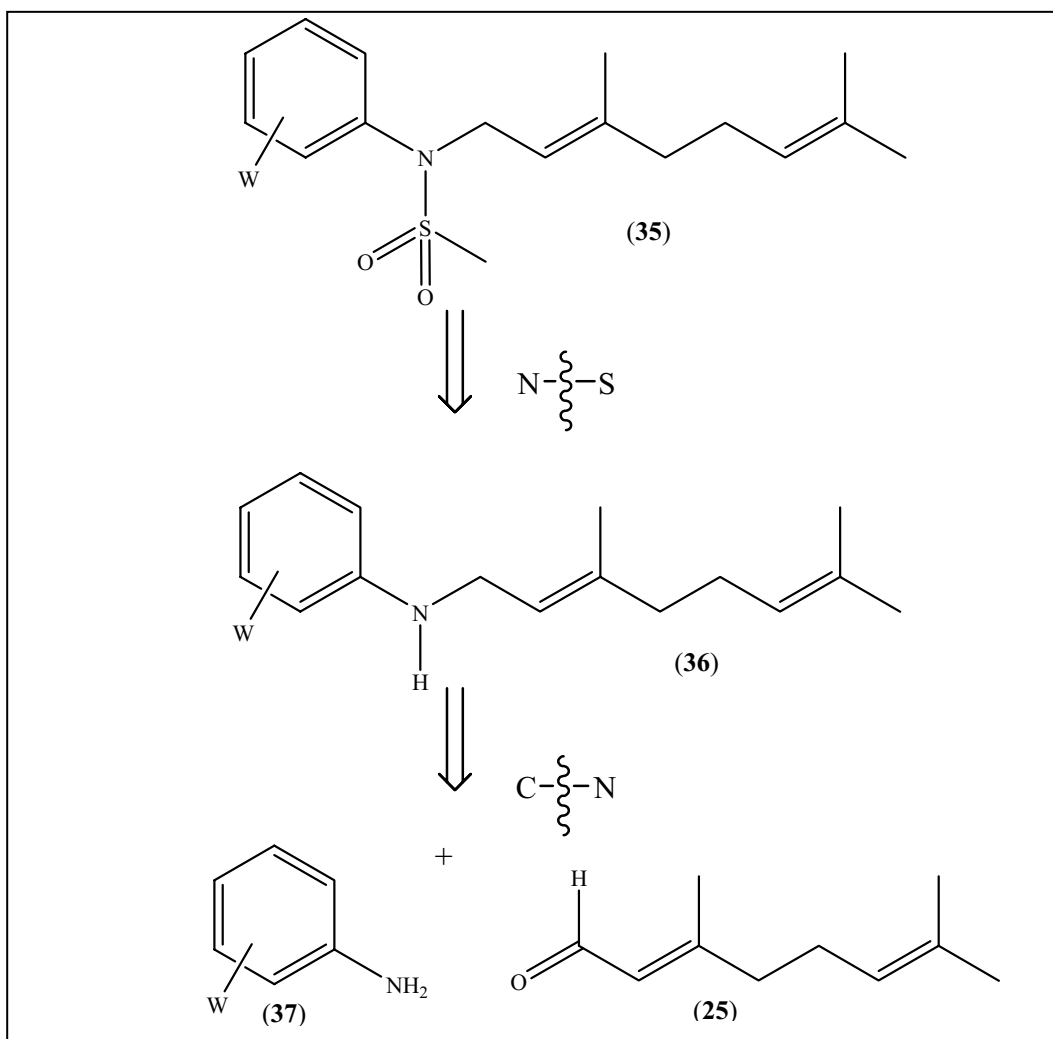


ESQUEMA 5

TABELA 05- Cálculo de “single point” da LQFM 006 (18) e paracetamol (5), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO.

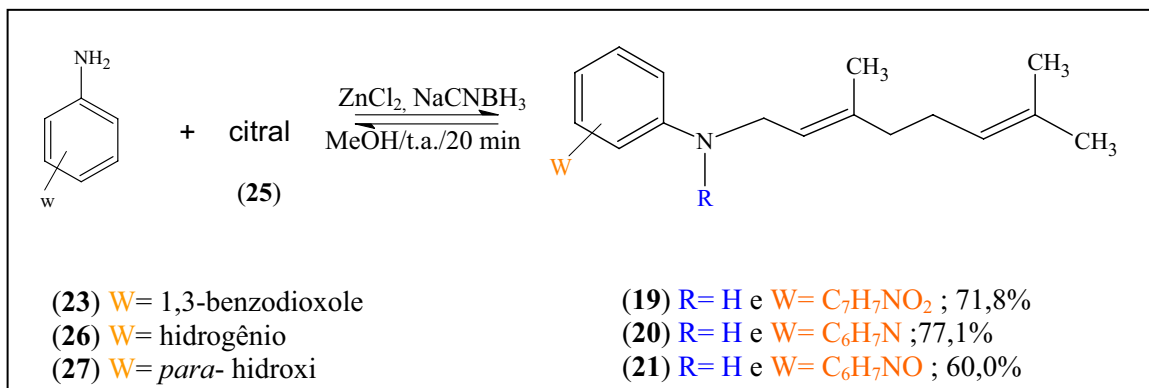
Parâmetros	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5- aril) acetamida	Paracetamol
Energia	58,411 kcal/mol	59,102 kcal/mol
Dipolo	3,34	2,61
Área	195,14 Å ²	196,24 Å ²
Volume	176,93 Å ³	176,94 Å ³

Através da análise retrossintética, ilustrada no Esquema 6, observa-se que o derivado (35) pode ser obtido a partir da desconexão da ligação N-S do derivado (36). Por sua vez, os derivados (36) podem ser obtidos a partir das desconexões das ligações C-N, obtidos a partir dos materiais de partida anilínicos (37) e citral (25).



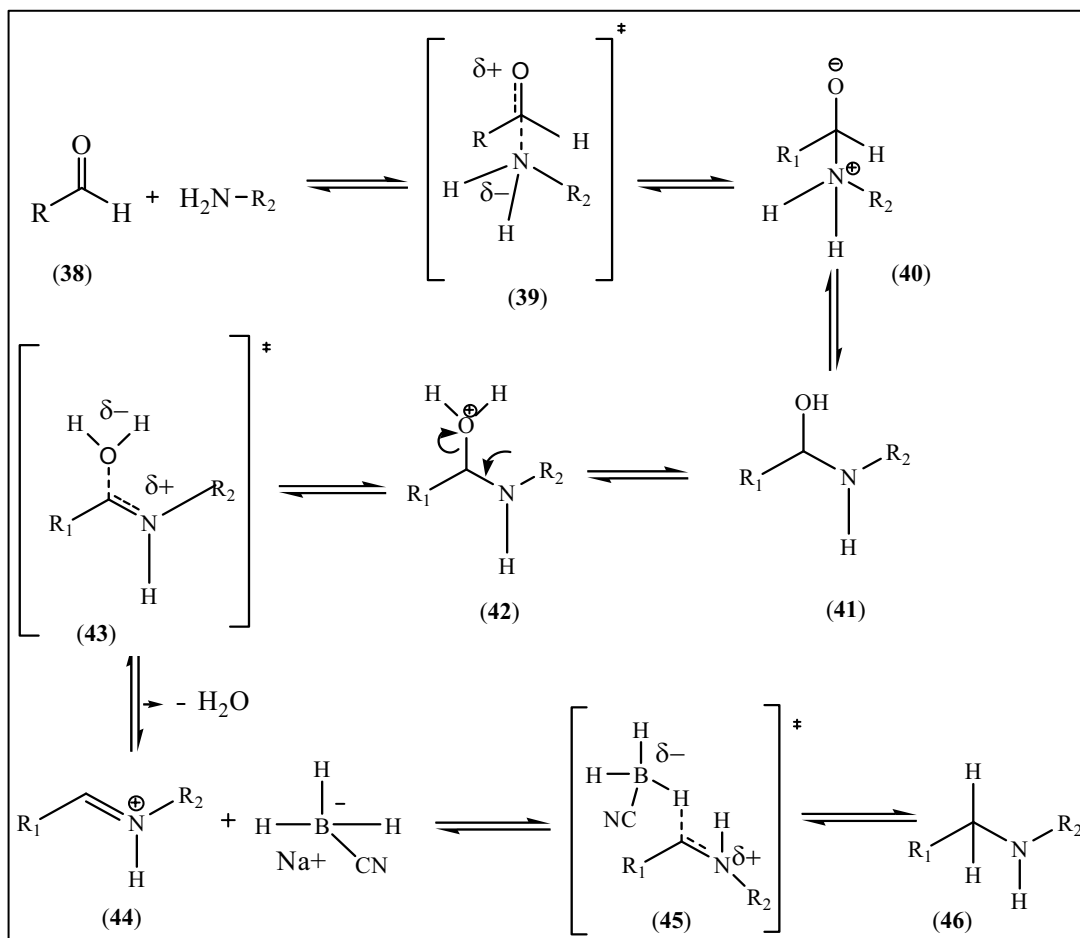
ESQUEMA 6

Dando sequência ao trabalho sintético, os derivados (**19-21**) foram obtidos a partir da reação de aminação redutiva, através do emprego de citral (**25**), cloreto de zinco e cianoborohidreto de sódio como agente redutor, em metanol, à temperatura ambiente, levando à obtenção dos compostos (**19**) 71,8%, (**20**) 77,1% e (**21**) 60,0% (Esquema 7) (LUO et al., 2004).



ESQUEMA 7

Como se observa no Esquema 8, a reação de aminação redutiva envolve a formação do intermediário iminium (44), via etapa de adição (40) e eliminação (43), que, *in situ*, é reduzido (45) com cianoborohidreto de sódio. Nas condições experimentais empregadas, pode-se considerar que a etapa determinante da velocidade da reação é a etapa de adição à carbonila (38) (SILVA, 2007).



ESQUEMA 8

Estudos com o 4-nerolidilcatecol (**16**), isolado de extratos de *Piper umbellatum* L. e *Piper Pellatum* L. (nome popular: capeba), demonstraram efeito inibitório para a PLA2; este efeito pode ocorrer por duas vias: a) via inibição do sítio ativo ou suas proximidades ou b) via modificação de resíduos que são críticos para o mecanismo catalítico da enzima. A inibição da PLA2 pelo 4-nerolidilcatecol sugere que este pode ser usado como estrutura inicial para o desenvolvimento de novos inibidores da PLA2 (NÚÑEZ et al., 2005).

A fim de se analisar as similaridades estruturais tridimensionalmente os compostos da série das anilinas (**19-21**) obtidas através de reação de aminação redutiva foram submetidas à análise conformacional, em nível semi-empírico, empregando a base Austim Model (AM1).

Ao final da análise conformacional, a conformação de menor energia foi submetida ao cálculo de “single point energy”, de onde foram obtidas informações de energia das conformações, área ($\text{\AA}^2$) volume ($\text{\AA}^3$) e momento dipolo, além da medida das distâncias envolvida entre as subunidades aceptoras de ligação de carbono *para* e átomo de carbono vinílico para as moléculas LQFM 001 (12,30 $\text{\AA}$), LQFM 014 (12,33 $\text{\AA}$) e LQFM 015 (12,30 $\text{\AA}$) em relação as subunidades aceptoras de ligação de carbono *para* e átomo de carbono vinílico para o nerolidilcatecol (**16**) (12,00 $\text{\AA}$) (Figura 11 - 13).

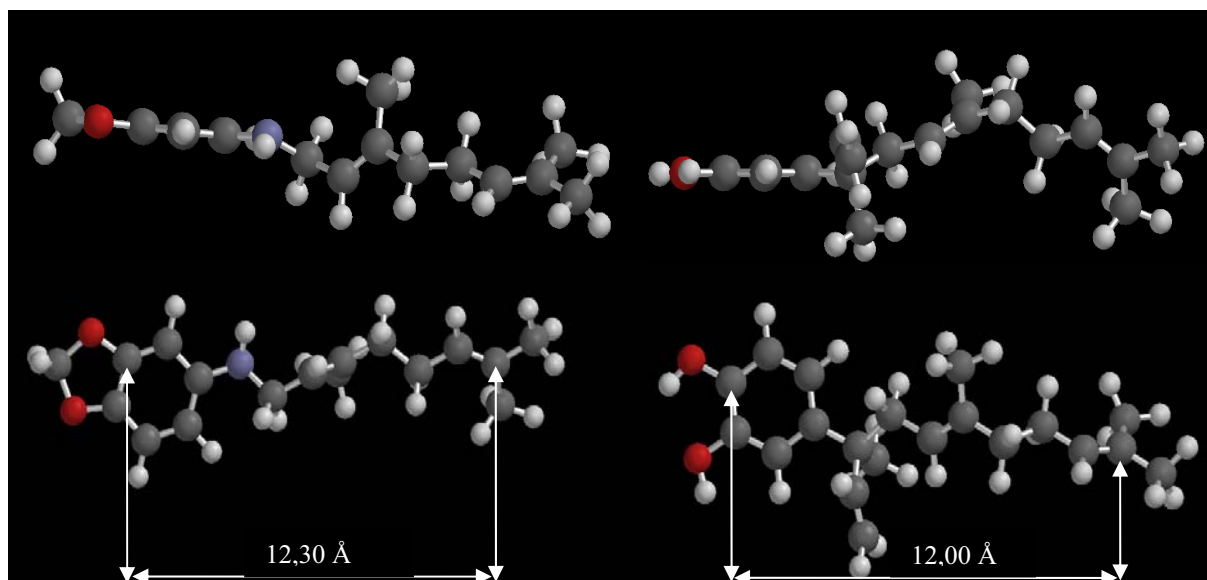


FIGURA 11- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 001 (**19**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do programa SPARTAN PRO.

TABELA 06- Cálculo de “single point” da LQFM 001 (**19**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO.

Parâmetros	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5- aril) acetamida	4-nerolidilcatecol
Energia	36,64 kcal/mol	60,43 kcal/mol
Dipolo	2,36	2,05
Área	367,23 Å ²	408,22 Å ²
Volume	343,27 Å ³	390,09 Å ³

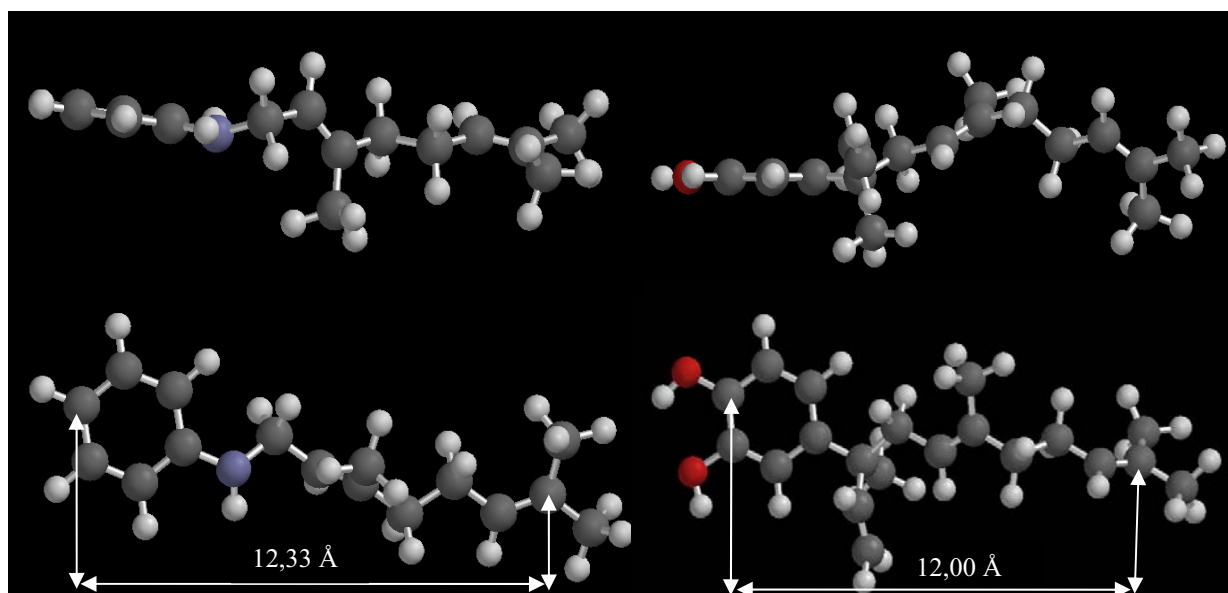


FIGURA 12- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 014 (**20**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do programa SPARTAN PRO.

TABELA 07- Cálculo de “single point” da LQFM 014 (**20**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO.

Parâmetros	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5- aril) acetamida	4-nerolidilcatecol
Energia	21,74 kcal/mol	60,43 kcal/mol
Dipolo	1,76	2,05
Área	338,50 Å ²	408,22 Å ²
Volume	312,67 Å ³	390,09 Å ³

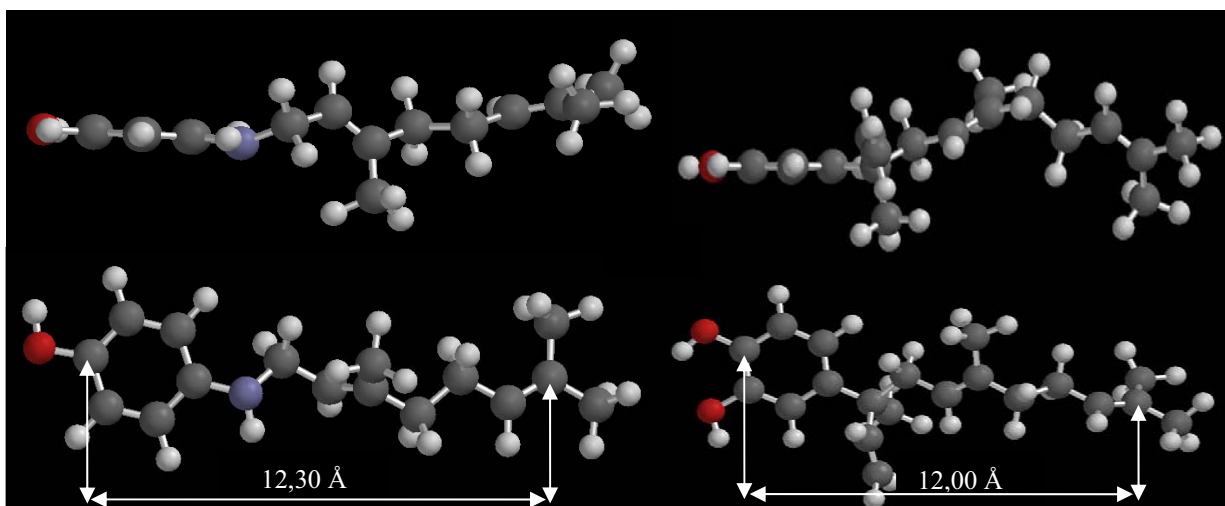
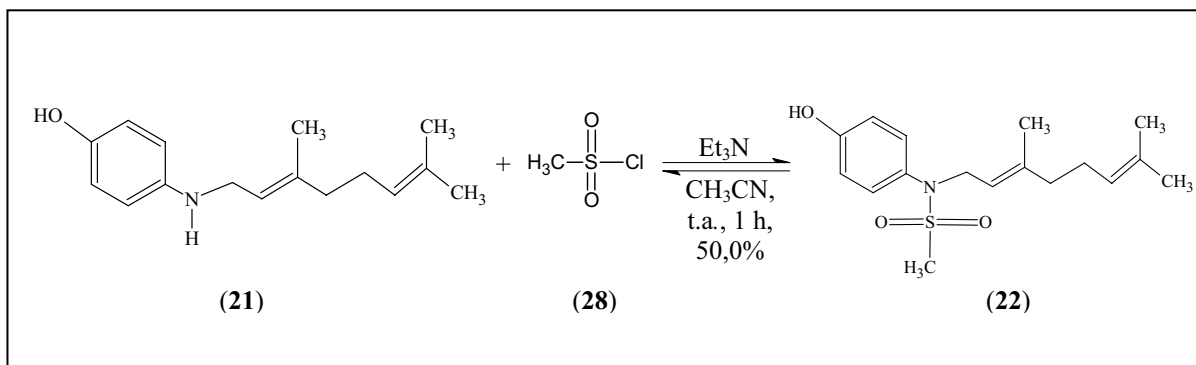


FIGURA 13- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 015 (**21**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do programa SPARTAN PRO.

TABELA 08- Cálculo de “single point” da LQFM 015 (**21**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO.

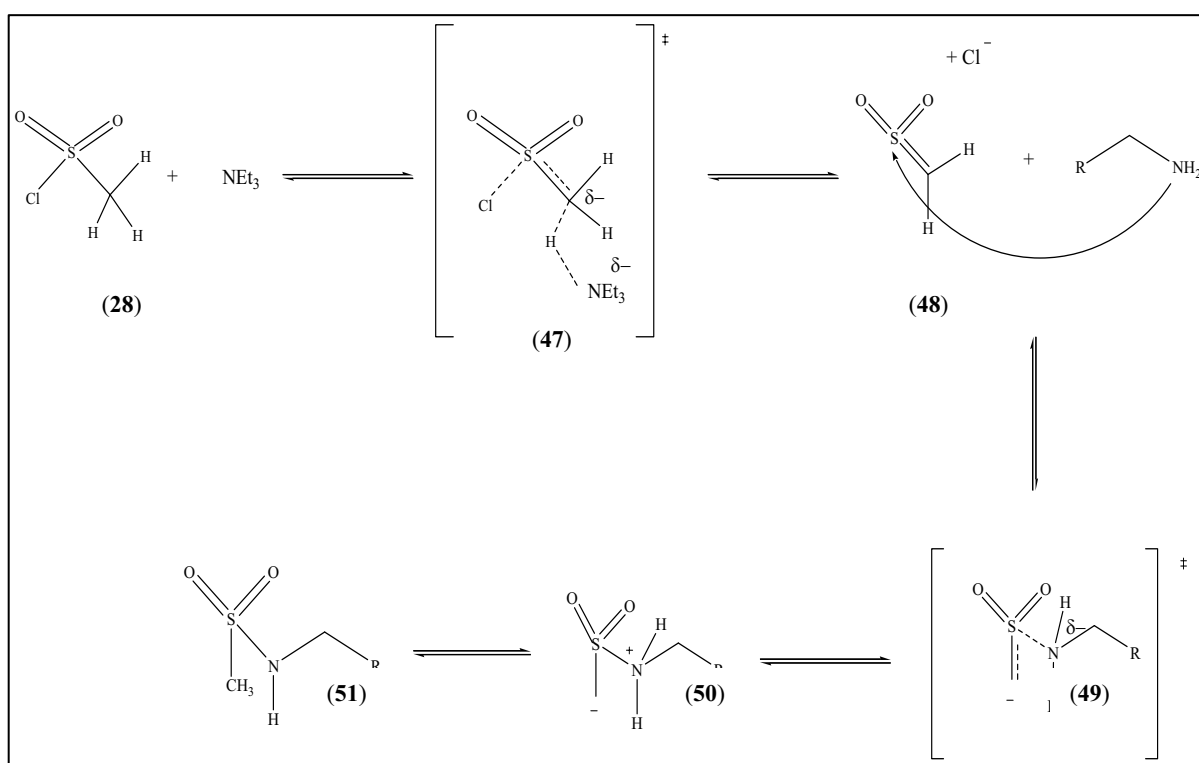
Parâmetros	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5- aril) acetamida	4-nerolidilcatecol
Energia	21,72 kcal/mol	60,43 kcal/mol
Dipolo	2,57	2,05
Área	350,09 Å ²	408,22 Å ²
Volume	323,48 Å ³	390,09 Å ³

Por sua vez, o derivado metilsulfonamida (**22**) foi obtido através da reação de (**21**) com cloreto de metanosulfonila (**28**), trietilamina, em meio de acetonitrila, à temperatura ambiente, logrando em 50% de rendimento.



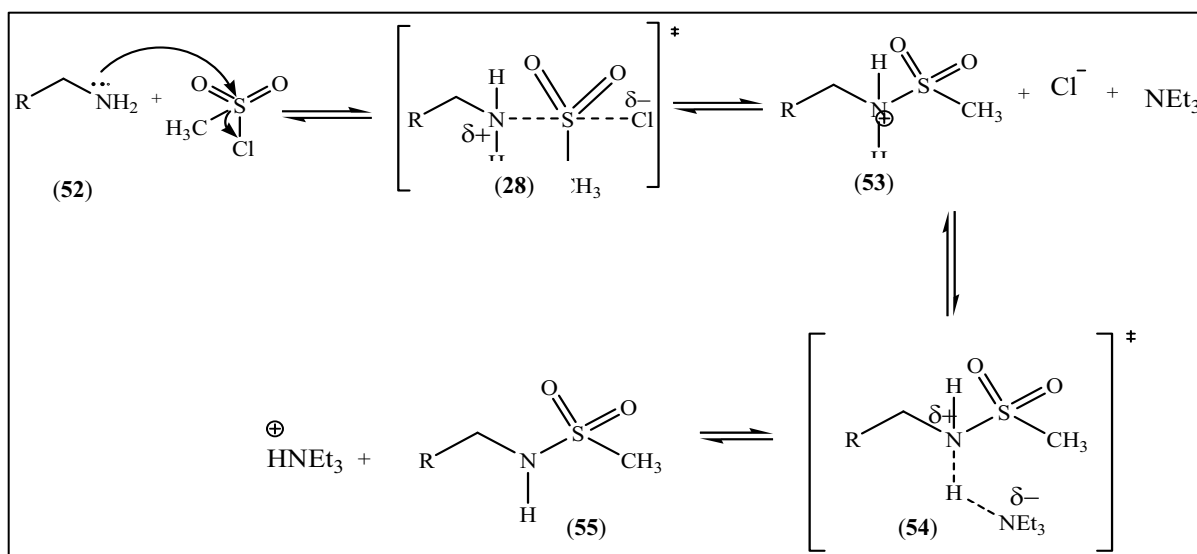
ESQUEMA 9

Sobre esta etapa sintética, pode-se cogitar duas hipóteses mecanísticas, onde a trietilamina pode participar no início do processo e no final da reação. Na primeira hipótese, a trietilamina pode abstrair o átomo de hidrogênio metílico do cloreto de metanosulfonila (**28**), dando origem a um carbânion (**47**), que pode ser estabilizado através de estruturas canônicas de ressonância. Na etapa subsequente, a amina ataca o átomo de enxofre do intermediário (**48**), levando à formação do intermediário (**49**), onde o átomo de nitrogênio se encontra protonado. Por fim, ocorre uma transferência de próton, que pode ser inter ou intramolecular, tornando o átomo de nitrogênio neutro novamente (**51**) (CLAYDEN et al., 2001).



ESQUEMA 10

A segunda hipótese se dá através de um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$). Neste caso, a amina (**52**) ataca o átomo de enxofre do cloreto de metanosulfonila (**28**), ao mesmo tempo em que o átomo de cloro é deslocado pela face oposta, através de um processo concertado. Na próxima etapa, a trietilamina abstrai o átomo de hidrogênio do nitrogênio protonado, levando ao produto final (**55**) (CLAYDEN et al., 2001).



ESQUEMA 11

O derivado metilsulfonamida (**22**) também foi submetido à análise conformacional, em nível semi-empírico, empregando a base Austim Model (AM1) e, posteriormente, à conformação de menor energia ao cálculo de “single point energy”, de onde foram obtidas informações de energia das conformações, área (Å²), volume (Å³) e momento dipolo, além da medida da distância envolvida entre as subunidades aceptoras de ligação de carbono *para* e átomo de carbono vinílico para a molécula LQFM 016 (11,00 Å) (Figura 14).

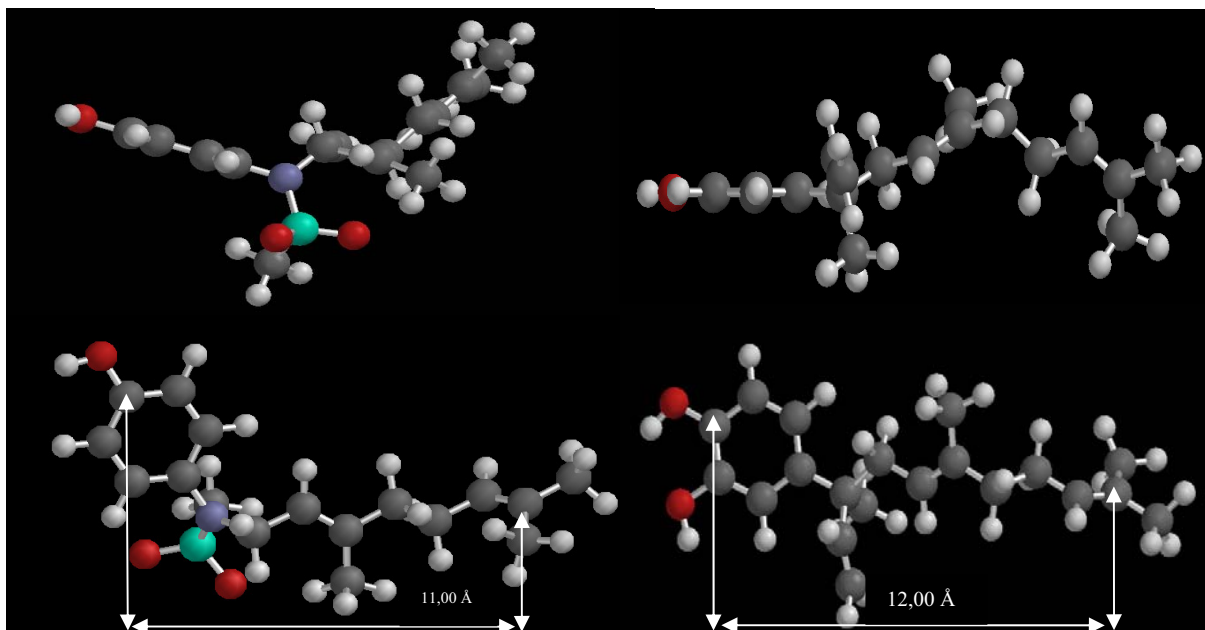


FIGURA 14- Análise conformacional e cálculo de “single point” da LQFM 016 (**22**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do programa SPARTAN PRO.

TABELA 09- Cálculo de “single point” da LQFM 016 (**22**) e 4-nerolidilcatecol (**16**), através do emprego do método semi-empírico AM1, programa SPARTAN PRO.

Parâmetros	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5- aril) acetamida	4-nerolidilcatecol
Energia	81,38 kcal/mol	60,43 kcal/mol
Dipolo	3,28	2,05
Área	400,53 Å ²	408,22 Å ²
Volume	383,13 Å ³	390,09 Å ³

5.1.1. Caracterização Estrutural

Todas os compostos objeto de estudo deste trabalho (**18-22**), foram caracterizados através do emprego de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C).

5.1.1.1. N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-aryl) acetamida (18), LQFM 006

Através da análise do espectro de infravermelho, foram observadas frequências de estiramento assimétricas em 3350 cm^{-1} , relativas à subunidade (ν N-H), bem como frequências de estiramento em 1659 cm^{-1} , relativas à subunidade (ν C=O). Apesar do espectro de infravermelho apresentar outras frequências, as duas mencionadas acima são as mais características, face à estrutura proposta.

Em relação à análise dos espectros de RMN ^1H , pode-se destacar que as posições dos três átomos de hidrogênios aromáticos foram atribuídas através dos seus padrões de acoplamento (FIGURA 16). Neste sentido, observou-se que o átomo de hidrogênio na posição 6 se encontra acoplado com o átomo de hidrogênio na posição 8, que se encontra em relação *meta* ao mesmo, apresentando constante de acoplamento $J=2.0\text{ Hz}$, em $\delta=7.17$. Por sua vez, o átomo de hidrogênio na posição 8 acopla tanto com o átomo de hidrogênio na posição 6, quanto com o átomo de hidrogênio na posição 9, que se encontra em relação *orto* ao mesmo. Devido a este padrão de acoplamento, o átomo de hidrogênio na posição 8 se apresenta no espectro como um duplo dubleto com constantes de acoplamento de $J= 2.0$ e 8.4 Hz , em $\delta=6.77$. Por fim, o hidrogênio na posição 9 se encontra acoplado com o átomo de hidrogênio na posição 8, se apresentando como um dubleto com constante de acoplamento $J=8.4\text{ Hz}$, em $\delta=6.70$. Os demais átomos de hidrogênios N-H, ponte benzodioxola e metila da molécula aparecem no espectro como singletos, nos deslocamentos químicos de 7.72, 5.92 e 2.12 ppm.

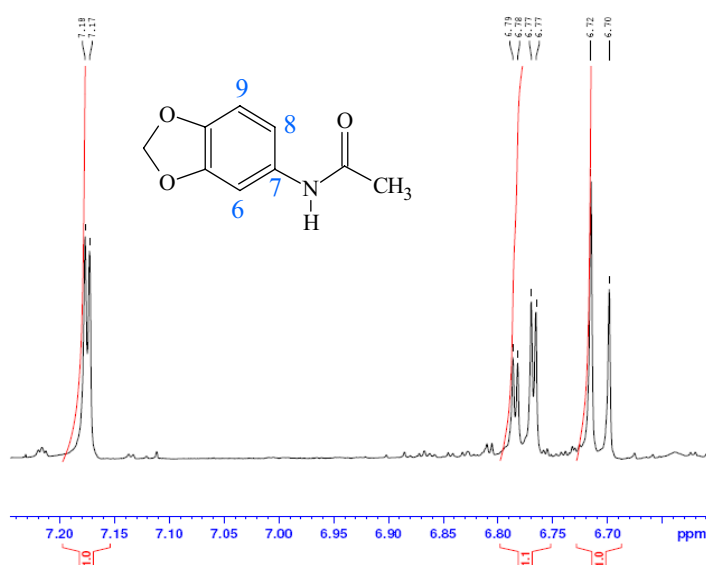


FIGURA 15- Espectro de RMN ^1H expandido na região de hidrogênios aromáticos do composto (18).

A atribuição dos átomos de carbono foi efetuada através da análise dos espectros de correlações bidimensionais, HSQC, onde observou-se acoplamentos 1J e HMBC, e acoplamentos $^{2,3}J$ (SILVERSTEIN, 2000). A atribuição dos átomos de carbono quaternários 4, 5 e 7 do anel aromático, se deu após a análise do espectro de HSQC. Uma vez identificados os átomos de carbono 2, 6 e 9, foram observadas as correlações entre o átomo de carbono 6, com os átomos de carbono 4 e 7, bem como do átomo de carbono 9 com o átomo de carbono 5, além do átomo de carbono 2 com os átomos de carbono 4 e 5.

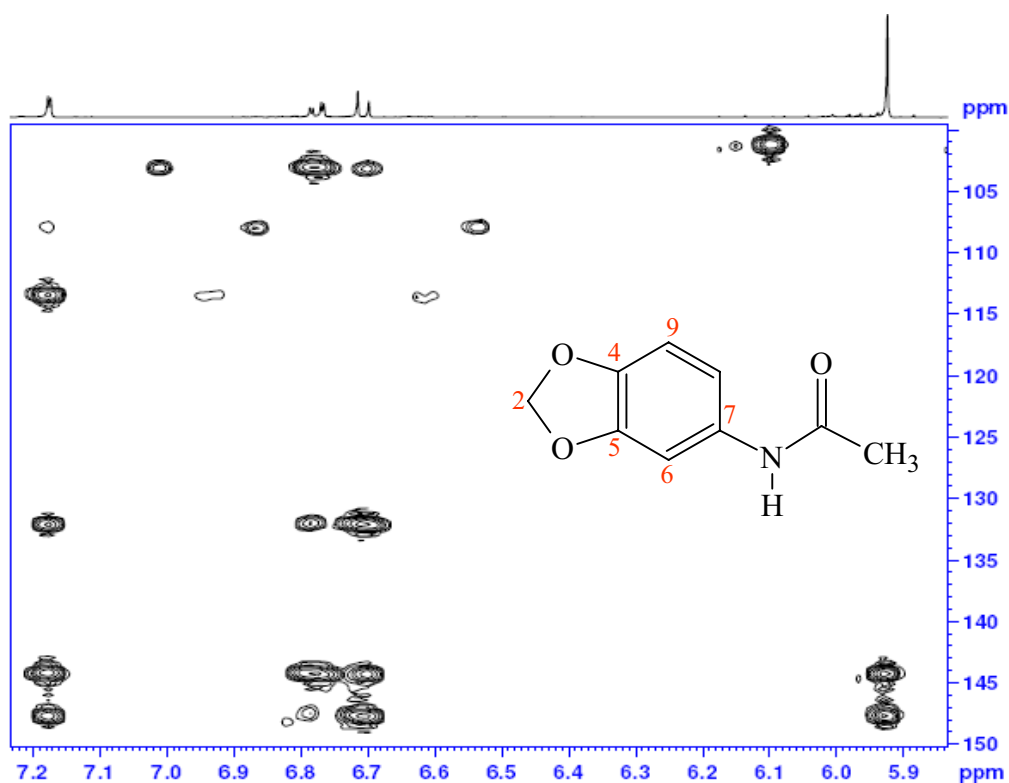


FIGURA 16- Espectro de HMBC expandido na região aromática do composto (18)

5.1.1.2. Derivados (E)-N-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)aminobenzeno (19-21)

Através da análise do espectro de infravermelho do derivado (19), foram observadas frequências de estiramento assimétricas em 3558 cm^{-1} , relativas à subunidade (ν N-H), frequências de estiramento em 3100 cm^{-1} , relativas à subunidade metila (ν C-H), bem como frequências de estiramento em 1600 cm^{-1} (ν C=C). Apesar do espectro de infravermelho apresentar outras frequências, as duas mencionadas acima são as mais características, face à estrutura proposta.

Ainda em relação ao espectro de infravermelho dos derivados da série das anilinas há a presença de frequências comuns, sendo estas frequências de estiramento (ν C-H) em 3100 cm^{-1} (**19 e 21**), frequências (ν CH₃) em 2936 cm^{-1} (**19**), 2906 cm^{-1} (**20**), 2900 cm^{-1} (**21**).

Em relação à análise dos espectros de RMN ¹H do derivado (**20**), pode-se observar que o espectro apresenta quatro regiões relativas a átomos de hidrogênios aromáticos entre $\delta=7.19\text{-}6.60$, átomos de hidrogênios vinílicos entre $\delta=5.37\text{-}5.07$, átomos de hidrogênios alifáticos α -monossustituídos entre $\delta=3.66\text{-}3.69$ e átomos de hidrogênios alifáticos entre $\delta=2.12\text{-}1.60$.

Na região dos átomos de hidrogênios aromáticos são observados 3 multipletos, dois deles com valor de integração relativos a dois átomos de hidrogênio cada e um deles relativo a um átomo de hidrogênio. Devido ao efeito de ressonância, onde o par de elétrons do átomo de nitrogênio pode entrar em ressonância com o anel aromático, as posições *para* e *orto* concentram maior densidade de elétrons, quando comparadas a posição *meta*. Logo, os hidrogênios da posição *meta* se encontram mais desblindados, em relação aos hidrogênios *para* e *orto*, apresentando deslocamentos químicos em $\delta=7.19\text{-}7.16$, $\delta=6.71\text{-}6.68$ e $\delta=6.62\text{-}6.60$, respectivamente.

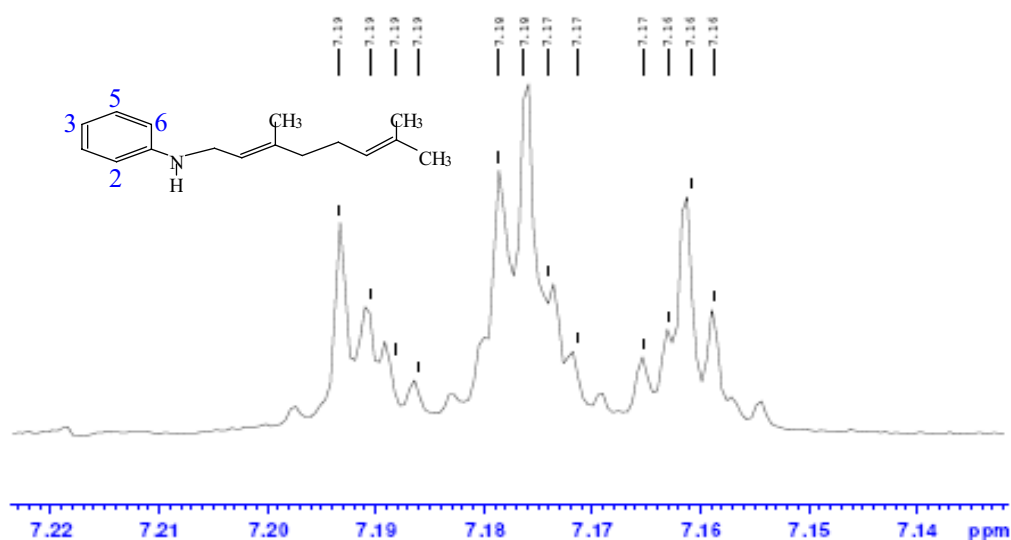


FIGURA 17- Espectro de RMN ¹H expandido na região aromática do composto (**20**).

Na região do espectro onde os átomos de hidrogênios vinílicos aparecem na posição 9 e na posição 13, para os quais não foi possível se estabelecer o padrão de multiplicidade,

devido à resolução dos sinais no espectro estes estão representados como dois multipletos, em $\delta=5.37\text{-}5.31$ e $\delta=5.13\text{-}5.07$. A partir dos espectros de correlações bidimensionais e de dados disponíveis no “Spectral Database System” (SDBS), foi possível se estabelecer que o átomo de hidrogênio mais desblindado é o da posição 9, enquanto o átomo de hidrogênio na posição 13 é o mais blindado.

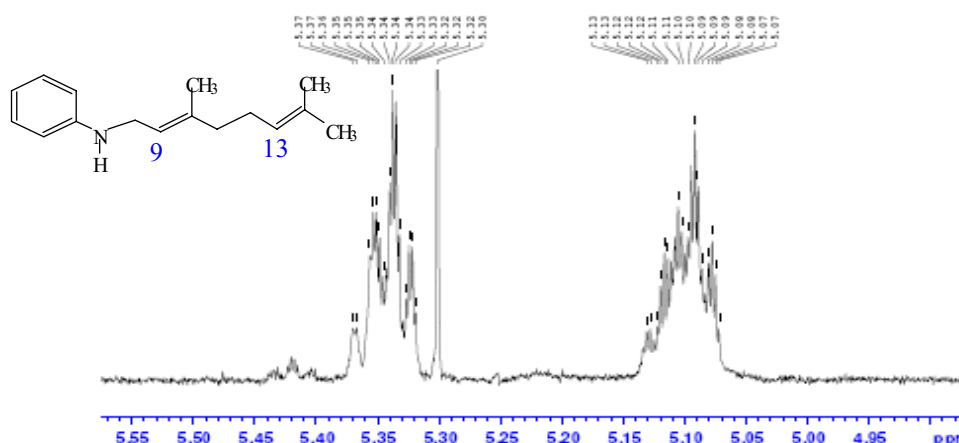


FIGURA 18- Espectro de RMN ^1H expandido na região de hidrogênios vinílicos do composto (20).

Na região do espectro dos hidrogênios alifáticos α -monossustituídos, é observado o acoplamento do átomo de hidrogênio na posição 8 com os átomos de hidrogênio nas posições 7, 9 e 16. Devido a este padrão de acoplamento, a multiplicidade do sinal é um triplo dubleto.

Face aos valores de constante de acoplamento tabelados (SILVERSTEIN, 2000), o acoplamento do átomo de hidrogênio com o hidrogênio na posição 9, ocorre com valor de $J=12.6$ Hz. O acoplamento com valor intermediário $J=6.7$ Hz, é relativo ao acoplamento entre o átomo de hidrogênio na posição 8 com o hidrogênio na posição 7. Devido ao maior afastamento, o menor valor de acoplamento $J=0.8$ Hz é relativo ao acoplamento do átomo de hidrogênio na posição 8 com o hidrogênio posição 16.

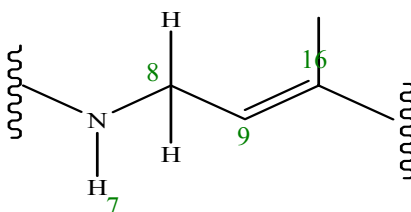


FIGURA 19- Região dos hidrogênios alifáticos do composto (20).

Na região do espectro dos hidrogênios alifáticos restantes 11, 12, 15, 16 e 17, observamos um multipeto relativo aos átomos de hidrogênios CH₂ na posição 11 e na posição 12 entre $\delta=2.12$ - 2.02 , devido ao padrão complexo de acoplamento, não foi possível extrair os valores de constantes de acoplamento. Os átomos de hidrogênio metílicos apresentam deslocamentos na posição 16 em $\delta=1.70$, na posição 17 em $\delta=1.68$ e na posição 15 em $\delta=1.60$, e suas atribuições foram possíveis por meio de auxílio de dados disponíveis no SDBS e espectro de HMBC.

O espectro de correlação HSQC para o composto (**20**) não apresentou qualidade satisfatória que permitisse sua análise, logo o mesmo será refeito. Já o espectro de correlação HMBC apresentou boa qualidade, sendo empregado na atribuição dos sinais com auxílio de dados do SBDS para a molécula do geraniol.

Através da análise do espectro de hidrogênio da molécula LQFM 001, observou-se na região de hidrogênios aromáticos há presença de três multipletos com deslocamentos em $\delta=6.66$, $\delta=6.25$ e $\delta=6.06$, todos com valores de integração relativos a um átomo de hidrogênio cada um. Por sua vez, os hidrogênios da ponte metilenodioxola na posição 2 aparecem com deslocamentos em $\delta=5.85$, com valor de integração de dois hidrogênios. Os átomos de hidrogênios vinílicos nas posições 12 e 16 apresentam valores de deslocamento em $\delta=5.32$ e $\delta=5.08$, como dois multipletos. Os átomos de hidrogênios alifáticos α -monossustituídos na posição 11 se encontram em $\delta=3.63$, como um multipeto. Os átomos de hidrogênios alifáticos CH₂ se encontram em $\delta=2.11$ - 2.03 , enquanto as três metilas nas posições 18, 19 e 20 se encontram com valores de deslocamentos em $\delta=1.74$, $\delta=1.69$ e $\delta=1.61$, respectivamente.

O espectro obtido para o composto (**21**) evidenciou a presença de diastereoisômeros *E/Z* nas posições 2 e 6, em uma proporção de 2.54:1.00¹, respectivamente, quando comparado aos valores de deslocamento da molécula (**20**). Devido à duplicação da molécula no espectro, face aos dois diastereoisômeros, a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos mesmos se torna mais laboriosa. Neste sentido, na região de hidrogênios aromáticos se encontram presentes dois duplos dubletos de ambos os diastereoisômeros, um em $\delta=6.97$ - 6.90 , relativos aos hidrogênios *orto* hidroxila e o outro em $\delta=6.88$ - 6.72 na posição *orto* aminas, ambos com $J=8.4$ Hz. Os hidrogênios vinílicos também se encontram duplicados sob forma de multipletos, onde o hidrogênio na posição 10 aparece entre $\delta=5.43$ - 5.31 , enquanto o hidrogênio na posição 14 aparece entre $\delta=5.10$ - 4.99 . Os átomos de hidrogênios alifáticos α -monossustituídos se encontram sob forma de dois multipletos em $\delta=3.93$ - 3.88 e $\delta=3.77$ - 3.73 .

¹ Atribuído a partir do átomo de H na posição 8.

Os átomos de hidrogênios alifáticos CH₂ se encontram em $\delta=2.12-1.97$, enquanto as três metilas nas posições 16, 17 e 18 se encontram em $\delta=1.70-1.54$.

5.1.1.3.(E)-(N)-(6-dienil,3,7-dimetilocta-2)-N-(4-idroxifenil)metanosulfanoamida (22)

Através da análise do espectro de RMN ¹H, também se constata que há a presença de mistura de diastereoisômeros E/Z, na proporção de 2.15:1.00². Da mesma forma que o espectro do material de partida (**21**), o espectro do produto sulfonado também apresenta dois duplos dubletos, sendo os *orto* hidroxí em $\delta=7.16-7.12$ e os *orto* metilsulfonamida em $\delta=6.85-6.80$. Os hidrogênios vinílicos também se encontram duplicados sob forma de multipletos, onde o hidrogênio na posição 12 aparece entre $\delta=5.43-5.19$, enquanto o hidrogênio na posição 16 aparece entre $\delta=5.10-4.97$. Os átomos de hidrogênios alifáticos α -monossustituídos se encontram sob forma de dois multipletos em $\delta=4.21-4.16$. Vale salientar que em relação ao material de partida (**21**), houve uma variação dos hidrogênios alifáticos α -monossustituídos de $\delta=3.93-3.88$ (**21**) para $\delta=4.21-4.16$ (**22**). Os hidrogênios metílicos da metilsulfona se encontram em $\delta=2.92$ e $\delta=2.91$, sob forma de singletos. Os átomos de hidrogênios alifáticos CH₂ se encontram em $\delta=2.04-1.92$, enquanto as três metilas nas posições 18, 21 e 22 se encontram em $\delta=1.70-1.50$.

5.2. Estudo de Modelagem Molecular

Foi realizado o estudo da dinâmica da estrutura cristalográfica da sPLA2 cujos dados foram extraídos do Protein Data Bank (PDB) sob o código 1KPM, uma vez que o cristal do complexo é o que melhor se enquadra em nosso estudo, devido a presença do inibidor vitamina E, que apresenta analogia estrutural com os compostos objeto de estudo deste trabalho (CHANDRA, 2002).

² Atribuído a partir da metila da metilsulfona.



FIGURA 20- Estrutura ribossômica do complexo formado entre a sPLA2 e a vitamina E com resolução de 1.8 Å, adaptado de CHANDRA, 2002. Figura editada pelo programa SPDBV.

Na sequência desta etapa do trabalho, para se obter simulações fiéis a parametrização da sPLA2 foi efetuada através do emprego do programa NAMD. Nesta etapa inicialmente foram retiradas as moléculas de água e foi feita a protonação da proteína, porém durante a simulação observou-se que as moléculas de água provenientes do cristal eram importantes para a estabilização da proteína abortando assim o passo da protonação conservando as moléculas de água. Para efeito de comparação, a sPLA2 foi submetida a condições de solvatação em sistema de esfera de água (Figura 21) e em sistema de caixa de água (Figura 22), afim de se obter o estado de menor energia.

Em uma reação há uma interação energética entre o solvente e o soluto. Por isto, as propriedades do soluto que dependem da energia como geometria, frequências vibracionais, energia total e espectro eletrônico, dependem do solvente. A presença de um solvente (sendo ele polar, particularmente) pode também estabilizar uma separação de cargas dentro da molécula. Isto não afeta apenas a energia, mas também resulta em uma alteração na densidade eletrônica e nas propriedades associadas.

Dada a importância do solvente há a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre seu papel ao longo do curso de uma reação caracterizando assim a importância da análise de solvatação (YOUNG, 2001).

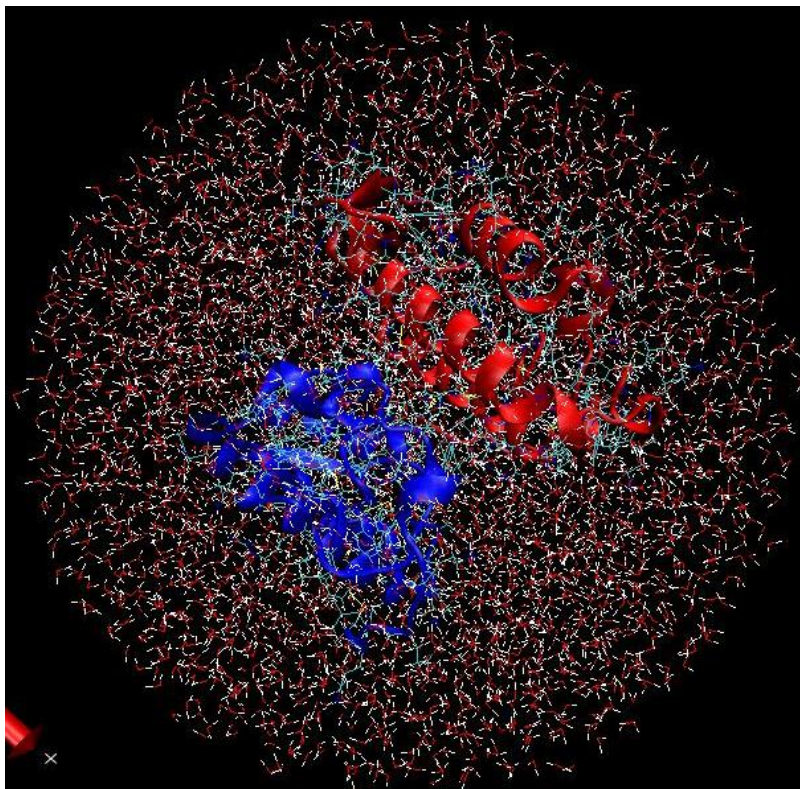


FIGURA 21- Cálculos da sPLA2 solvatada em esfera de água, através o emprego do programa NAMD. Figura editada no programa VMD.

No sistema de esfera de água a sPLA2 atingiu seu estado menor de energia em -17.500 kcal/mol, enquanto no sistema de caixa de água a mesma atingiu o estado menor de energia em -25.000 kcal/mol. Estes dados permitem concluir que o sistema de caixa de água foi mais adequado na estabilização da sPLA2, uma vez que o menor valor de estado de energia foram obtidos.

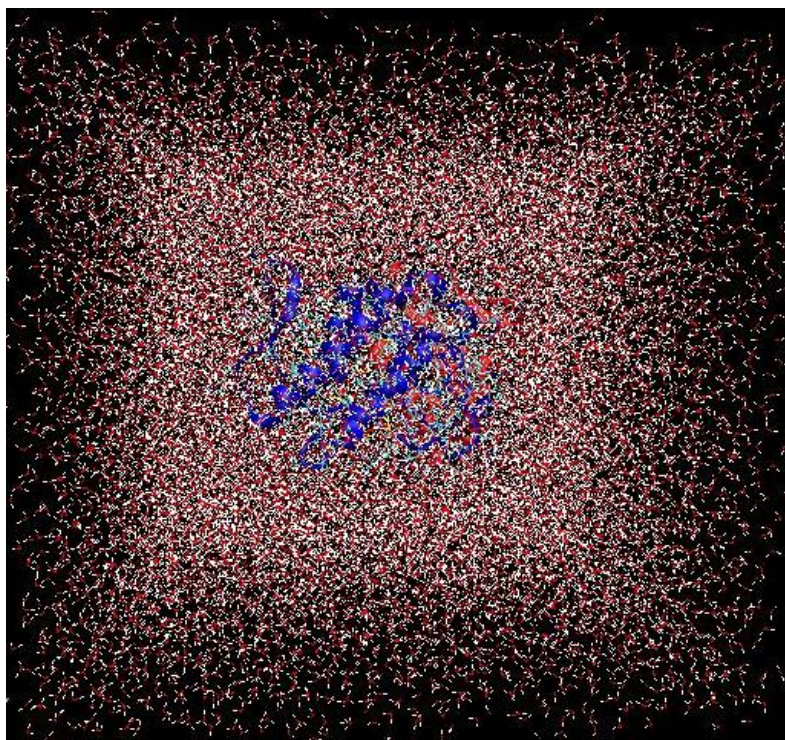


FIGURA 22- Cálculos da sPLA2 solvatada em caixa de água, através o emprego do programa NAMD. Figura editada no programa VMD.

5.3. Ensaios Farmacológicos

5.3.1. Inibição da Atividade da PLA2

A capacidade de inibir a atividade da PLA2 foi avaliada através do valor médio dos halos formados pela ação da enzima PLA2 em relação aos controles positivos utilizados.

As cavidades tratadas com a solução contendo peçonha (125 µg/mL) apresentaram valor médio do halo formado pela ação da enzima PLA₂ de $433,40 \pm 7,13 \text{ mm}^2$.

O composto LQFM 001 apresentou uma redução na formação das áreas dos halos de 27,7%, 27,7%, 9,9%, respectivamente, para as concentrações de 7,31, 3,66, 1,82 mmol/mL. Para a concentração de 0,91 mmol/mL não houve redução significativa da área do halo. O controle positivo (quercetina) apresentou uma redução da área do halo de 14,4% (Gráfico 02).



FIGURA 23- Visualização da formação de halos em placa de Petri representando inibição da atividade de PLA2.

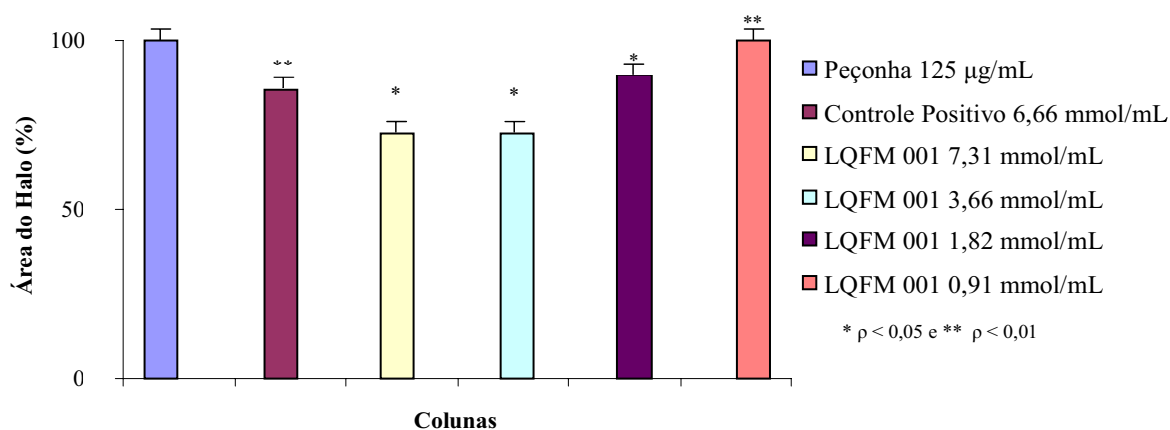


GRÁFICO 02- Ensaio da inibição, *in vitro*, da atividade da PLA2 presente na peçonha de *Bothrops moojimi* (controle padrão) pelo composto LQFM 001 [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão.

O composto LQFM 001 demonstrou capacidade inibitória da atividade da PLA2 nas concentrações 7,31, 3,66 e 1,82 quando comparadas ao controle padrão; o melhor resultado de inibição foi na concentração de 7,31 e 3,66 mmol/mL com redução na formação de área de hidrólise de 27,7%.

O composto LQFM 006 apresentou uma redução na formação das áreas dos halos de 17,2%, 16,6% e 11,3%, respectivamente, para as concentrações de 11,17, 5,58, 2,79 e 1,39 mmol/mL. O controle positivo (quercetina) apresentou uma redução da área do halo de 19,5% (Gráfico 03).

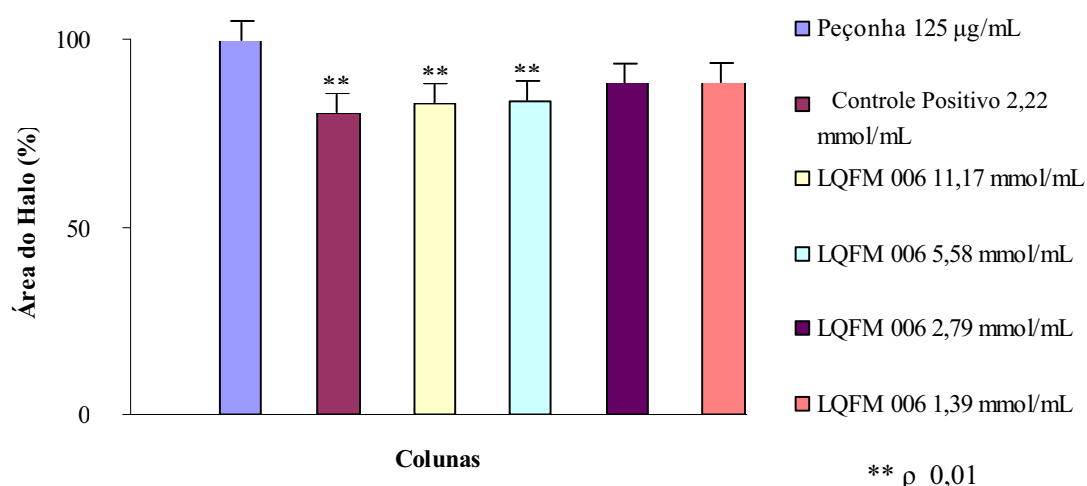


GRÁFICO 03- Ensaio da inibição, *in vitro*, da atividade da PLA2 presente na peçonha de *Bothrops moojimi* (controle padrão) pelo composto LQFM 006 [mmol]. A quercetina (2,22 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle negativo.

O composto LQFM 006 demonstrou capacidade inibitória da atividade da PLA2 em todas as concentrações ensaiadas quando comparadas ao controle padrão; o resultado mais significativo de inibição foi na concentração de 11,17 mmol/mL com redução na formação de área de hidrólise de 17,2%.

O composto LQFM 015 apresentou uma redução na formação das áreas dos halos de 18,1%, 14,9% e 9,4%, respectivamente, para as concentrações de 8,16, 4,08, 2,04 e 1,02 mmol/mL. O controle positivo (quercetina) apresentou uma redução da área do halo de 13,6% (Gráfico 04).

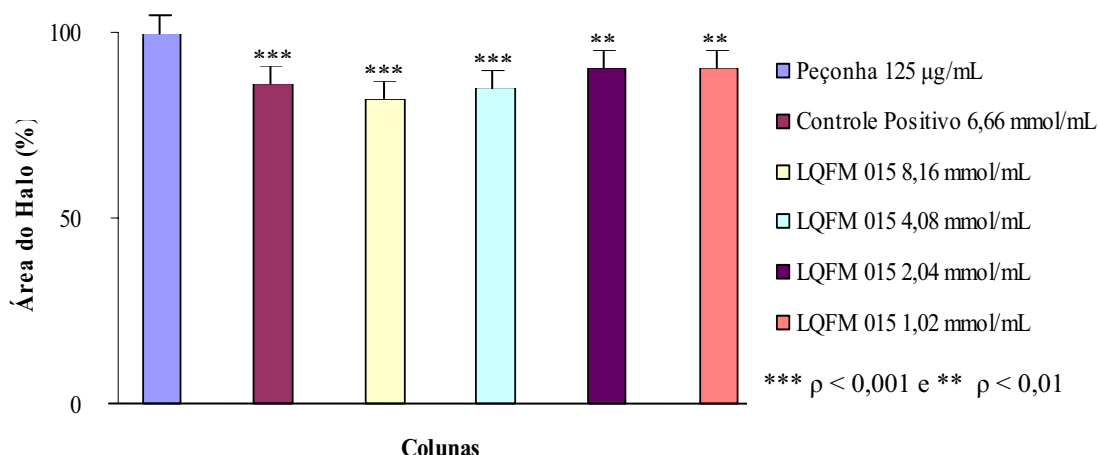


GRÁFICO 04- Ensaio da inibição, *in vitro*, da atividade da PLA2 presente na peçonha de *Bothrops moojim* (controle padrão) pelo composto LQFM 015 [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão.

O composto LQFM 015 demonstrou capacidade inibitória da atividade da PLA2 em todas as concentrações ensaiadas quando comparadas ao controle padrão; o resultado mais significativo de inibição foi na concentração de 8,16 mmol/mL com redução na formação de área de hidrólise de 18,1%.

O composto LQFM 016 apresentou uma redução na formação das áreas dos halos de 15,5%, 7,2% e 2,6%, respectivamente, nas concentrações de 6,19, 3,09, 1,54 mmol/mL. Para a concentração de 0,77 mmol/mL não houve redução significativa. O controle positivo (quercetina) apresentou uma redução da área do halo de 13,9% (Gráfico 05).

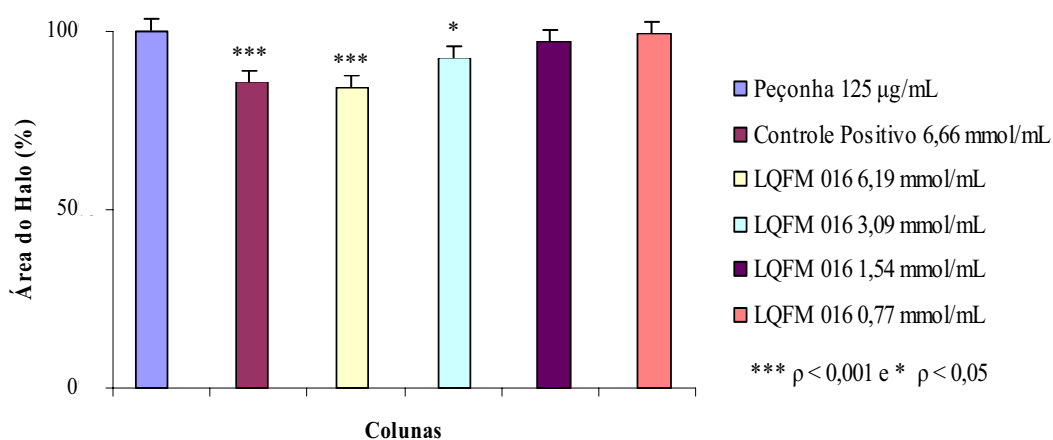


GRÁFICO 05- Ensaio da inibição, *in vitro*, da atividade da PLA2 presente na peçonha de *Bothrops moojim* (controle padrão) pelo composto LQFM 016 [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão.

O composto LQFM 016 demonstrou capacidade inibitória da atividade da PLA2 em todas as concentrações ensaiadas quando comparadas ao controle padrão; o resultado mais significativo de inibição foi na concentração de 6,19 mmol/mL com redução na formação de área de hidrólise de 15,5%.

O 4-nerolidilcatecol (**16**), composto utilizado como protótipo para as moléculas objeto de estudo deste trabalho, apresentou uma redução na formação das áreas dos halos de 24,64%, 14,55%, 11,34% e 6,38%, respectivamente, para as concentrações de 11,93, 6,36, 3,18 e 1,59 mmol/mL (Gráfico 06).

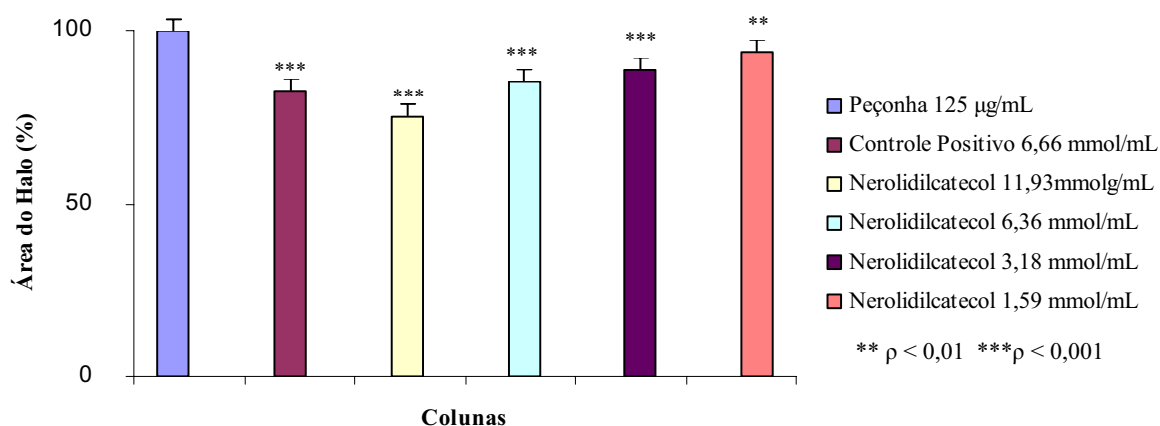


GRÁFICO 06- Ensaio da inibição, *in vitro*, da atividade da PLA2 presente na peçonha de *Bothrops moojimi* (controle padrão) pelo 4-nerolidilcatecol (**16**) [mmol]. A quercetina (6,66 mmol/mL) foi utilizada como controle positivo. As colunas representam a média $\pm$ do erro padrão em valores percentuais relativas ao grupo controle padrão.

O 4-nerolidilcatecol (**16**) demonstrou capacidade inibitória da atividade da PLA2 em todas as concentrações ensaiadas quando comparadas ao controle padrão; o resultado mais significativo de inibição foi na concentração de 11,93 mmol/mL com redução na formação de área de hidrólise de 24,64%.

De acordo com trabalho realizado por Núñez e colaboradores (2005), a capacidade de inibir a atividade da PLA2 do 4-nerolidilcatecol (**16**) é tempo e concentração dependentes, com efeito máximo observado na proporção inibidor/enzima de 10:1 (p/p) quando ensaiada em teste de clivagem de ácidos graxos presentes em substrato (albumina de ovo) utilizando como fonte de PLA2 10µg de peçonha de *Bothrops asper* incubados a 37°C por 30 minutos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Face aos resultados obtidos, conclui-se que o planejamento estrutural empregado se mostrou adequado, uma vez que os compostos LQFM 001 (**19**), LQFM 006 (**18**), LQFM 015 (**21**) e LQFM 016 (**22**) testadas, são reconhecidas pela enzima sPLA2.

Através do modelo *in vitro* de inibição da atividade da sPLA2, os compostos LQFM 001 (**19**), LQFM 006 (**18**), LQFM 015 (**21**) e LQFM 016 (**22**) apresentaram valores de redução na formação das áreas de hidrólise mais significativos nas maiores concentrações na ordem de 27,7%, 17,2%, 18,1% e 15,5%, respectivamente, quando comparadas a área de hidrólise do controle padrão (peçonha de *Bothrops moojim*). Os ensaios farmacológicos demonstraram também que os compostos ensaiados demonstraram atividade inibitória da sPLA2 satisfatória em relação ao protótipo estudado 4-nerolidilcatecol (**16**) apresentando redução da área de hidrólise tão significativa quanto o protótipo estudada. Isto demonstra que os compostos ensaiados (**19**, **18**, **21** e **22**) apresentam propriedades anti-inflamatórias com perfil inibitório da sPLA2 o que valida o planejamento e a síntese dos derivados anilínicos e que estes são dignos de estudos adicionais.

Ademais, as metodologias sintéticas eleitas para a obtenção dos compostos objeto de estudo, em escala de bancada, se mostraram adequados.

Os estudos de modelagem molecular permitiram avaliar o sistema de menor energia para se desenvolver a simulação, enquanto que a avaliação da dinâmica do processo de interação entre o protótipo LQFM 001 não foram conclusivos a ponto de avaliar a relação estrutura atividade.

Como perspectivas deste trabalho, pode-se citar a continuidade da síntese de outros derivados anilínicos de forma a se obter uma maior quantidade de protótipos a serem testados. Em relação aos ensaios farmacológicos, faz-se necessário ensaiar os protótipos obtidos em outros alvos farmacológicos na busca de outras atividades terapêuticas, visto sua analogia ao 4-nerolidilcatecol que apresenta além da atividade anti-inflamatória, possui também atividade anticâncer e antioxidante e a realização de ensaios *in vivo* para comprovação da atividade inibitória da sPLA2, como por exemplo, ensaio de indução da inflamação nas articulações sinoviais para quantificação do AA (**6**). Por fim, será dada continuidade às simulações de dinâmica molecular e “docking” para algum protótipo eventualmente obtido a partir dos ensaios farmacológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHILLADELIS, B.; ANTONAKIS, N. The Dynamics of Technological Innovation: The Case of the Pharmaceutical Industry. **Research Policy**, n. 30, p. 535-558, 2001.

ARAGÃO, E. A. Efeito Bactericida da Fosfolipase A2-Lys49: O Papel da Região C-terminal na Atividade de Bothropstoxina-I em Membranas Biológicas e Artificiais. Universidade de São Paulo, Artigo de Revisão, **Departamento de Química**, 2005.

ARONSO, J. K. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. Fifteenth Edition, **FBPharmacols**, 2006.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and Inhibition of Phospholipase A₂. **Annu. Reviews Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 175-89, 1999.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M.V.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ Regulation of Arachidonic Acid Mobilization. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, p. 2, 2002.

BANDARAGE, U. K. Nitrosothiol Esters of Diclofenac: Synthesis and Pharmacological Characterization as Gastrointestinal-Sparing Prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4005-16, 2000.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20 (3), 1997.

BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, C. A. M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **Art. Med. Editora Ltda**: Porto Alegre, p. 83-122, 2001.

BARREIRO, E. J. Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de Fármacos: A descoberta de Novo Agente Cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1172, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, L. P. A.; RODRIGUES, C. R. A Química Medicinal de N-acilidrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos Analgésicos, Antiinflamatórios e Anti-Trombóticos. **Química Nova**, v. 25, No. 1, p. 129-148, 2002.

BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, F. C. A. A Questão da Inovação em Fármacos no Brasil: Proposta de Criação do Programa Nacional de Fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, v. 28, Suplemento, S 56-S63, 2005.

BARREIRO, E. J. A Descoberta Racional de Fármacos. **Ciência Hoje**, v. 40, p. 26-31, 2007.

BAXTER, J. D. Minimizing the Side Effects of Glucocorticoids Therapy. **Adv. International Medicine**, 35, p. 173-94, 1990.

BAXTER, J. D. The Effects of Glucocorticoid Therapy. **Hospital Practice**, 27, p.111-8, 123-34, 1992.

BERG, O. G.; CAJAL, Y.; BUTTERFOSS, G. L.; GREY, R. L.; ALSINA, M. A.; YU, B. e JAIN, M. K. Interfacial Activation of Triglycerides lipase from *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa*: Kinetic parameters and a Basis for Control of the Lid. **Biochemistry**, v. 37 (19), p. 6615-27, 2001.

BORNE, R. F. Nonsteroidal Anti-Inflammatoryagents. In: WILLIAMS, D. A.;LEMKE, T. L. Foye's principles of medicinal chemistry. **5 ed. Baltimore**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 751-793, 2002.

BOUKLI, L.; TOUAIBIA, M.; MEDDAD-BELHABICH, N.; DJIMDE, A.; PARK, C.H.; KIM, J.J.;YOON, J.H.; LAMOURIA A.; HEYMANS, F. Design of New Potent and Selective Secretory Phospholipase A2 Inhibitors. Part 5: Synthesis and Biological Activity of

1-alkyl-4-[4,5-dihydro-1,2,4-[4H]-oxadiazol-5-one-3-ylmethylbenz-40-yl(oyl)] piperazines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, 1242–1253, 2008.

BOYCE, J. Eicosanoids Mediators of Mast Cells: Receptors, Regulation on Synthesis and Pathologic Implications. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 87, p. 59-79, 2005.

BRODY, T. Controle da Dor e da Inflamação com Medicamentos Anti-Inflamatórios Não-Esteróides. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana: da molecular à clínica. 2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 344-354, 1997.

CAIRNS, J. A. The Coxibs and Traditional Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: a Current Perspective on Cardiovascular Risks. **Journal Cardiology**, 23(2):125-31, 2007.

CARVALHO, W. A. Analgésicos, Antipiréticos e Anti-Inflamatórios. In: SILVA, P. Farmacologia 6 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 4312-455, 2002.

CASHMAN, J. N. The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. International Bibliographic Information on Dietary Supplements, 52 Suppl., p. 513-523, 1996.

CASTRO, M. Efeitos Antiinflamatórios e Antiproliferativos dos Glicocorticóides: Concordância ou Discordância? **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, 2005.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A2 Isoforms: a Perspective. **Cellular Signalling**, 15, p. 637–665, 2003.

CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; BETZEL, C.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. First Structural Evidence of a Specific Inhibition of Phospholipase A2 by alpha-Tocopherol (Vitamin E) and its Implications in Inflammation: Crystal Structure of the Complex Formed Between Phospholipase A2 and alpha-Tocopherol at 1.8 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, p. 215-222, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. COX-3, a Cyclooxygenase- 1 Variant Inhibited by Acetaminophen and Other Analgesic/Antipyretic Drugs: Cloning, Structure, and Expression. **Proc. Natl. Academic Science**, 99, p. 13926-13931, 2002.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. Oxford University Press, 2001.

CHICORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPONIO, A. R. Involvement of Bradykinin, cytokines, Sympathetic amines and Prostaglandins in Formalin-Induced Orofacial Nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141 (7), p. 1175-84, 2004.

CORREIA, C. R., COSTA R. P., FERREIRA F. V. Vinte e Cinco Anos de Reações, Estratégias e Metodologias em Química Orgânica. **Química Nova**, v. 25, supl.1, p. 82-89, 2002.

CROUVEZIER, S.; POWELL, B.; KEIR, D.; YAQOOB, P. The Effects of Phenolic Components of Tea on the Production of Pro-and Anti-inflammatory Cytokines by Human Leukocytes in vitro. **Cytokine**, v. 13, p. 280-286, 2001.

CUMMINGS, B. S., McHOWAT, J.; SCNELLMANN, R. G. Phospholipase A₂ in Cell Injury and Death. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 294, p. 793-9, 2000.

CZURA, C. J.; FRIEDMAN, S.G.; TRACEY, K.J. "Neural Inhibition of Inflammation: The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway". **Journal of Endotoxin Research**. v. 9, p. 409-413, 2003.

DAVIES, S.G. Organotransition Metal Chemistry: Application to Organic Synthesis. **Pergamon Press: Oxford**, 1984.

DAVIDSON COLLEGE. Biology Faculty. Disponível em: www.bio.davidson.edu/.../chem02.html. Acessado em: 12/2008.

DAMIANI, D.; KUPERMAN, H.; DICHTCHEKENIAN, V.; DELLA MANNA, T.; SETIAN, N. Corticoterapia e suas Repercussões: A Relação Custo–Benefício. Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança Prof. Pedro de Alcântara do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, p. 71-82, 2001.

DENNIS, E. A. The Growing Phospholipase A2 Superfamily of Signal Transduction Enzymes. **Trends Biochemistry Science**, p. 1-2, 1997.

EMERY, P. Cyclooxygenase-2: A Major Therapeutic Advance? **American Journal of Medicine**, 110:42S-45S, 2001.

FILHO, P. L. P.; PAN, S. S. K. Cadeia Farmacêutica no Brasil: Avaliação Preliminar e Perspectivas. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 18, p. 3-22, 2003.

FDA. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: www.fda.gov. Acessado em 12/2008.

FITZDEALD, G. A. COX-2 and Beyond: Approaches to Prostaglandin Inhibition in Human Disease. **Nature Reviews: Drug Discovery**, V. 2, 2003.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. **New England. Journal of Medicine**, 345, p. 433-442, 2001.

FLOWER, R. J. The Development of Cox-2 Inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**. [S.l.], v. 2, p. 179-191, 2003.

FORTES-DIAS, C. L.; JANNOTTI, M. L. D.; FRANCO, F. J. L.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Studies on the Specificity of CNF, a Phospholipase A2 Inhibitor Isolated from the blood Plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA2 from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, 37, p. 1747-59, 1999.

FRISCH, M. J.; POPLER, J. A. **Gaussian 03, revision B.05**. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

GLASER, K. B. Regulation of Phospholipase A2 Enzymes: Selective Inhibitors and their Pharmacological Potencial. **Adv. Pharmacology**, v. 32, p. 31-66, 1995.

GLOBAL Pharmaceutical Sales by Region, 2005. Disponível em: www.imshealth.com/ims/portal/front/articleC. Acessado em janeiro de 2009.

GOODAMN & GILMAN, A. As bases Farmacológicas da Terapêutica. **10 ed. McGraw-Hill**, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An Alternative in vitro Method for Testing the Potency of the Polyvalent Antivenom Produced in Costa Rica. **Toxicon**, 26, 4, p. 411-3, 1988.

HARBERMANN, E.; HARDT, K. L. A Sensitive and Specific Plate Test for the Quantification of Phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, p. 163-73, 1972.

HAMRICK, M. E.; HARRIS, S. R. Antagonism of Acetaminophen Hepatotoxicity by Phospholipase A2 Inhibitors. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 79, p. 23-44, 1993.

HAWKEY, C. J. **The Lancet**. 1999, 353: 307-314.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: Inibidores da Ciclooxygenase 2. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, S 206-12, 2006.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VENE, J. R. Eicosanoids in Inflammation. **Annals of Clinical Research**, v. 16 (5-60, p.287-99, 1984.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 10 Years Later. **of Pharmacology and Experience Therapeutic**. 300, p. 367-375, 2002.

HIRAOKA, M.; ABE, A.; SHAYMAN, J. A. Cloning and Characterization of a Lysosomal Phospholipase A2, 1-O-acylceramide Synthase. **Journal of Biology and Chemistry**, 277, p. 10090–10099, 2002.

HODGSON, J. ADMET - Turning Chemicals into Drugs. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 722, 2001.

HORTON, A. A.; WOOD, J.M. Effects of Inhibitors of Phospholipase A2 Cyclooxygenase and Tromboxane Synthetase on Paracetamol Hepatotoxicity in the Rat. **Eicosanoids**, v. 2, p. 123-129, 1989.

IMS HEALTH. MIDAS, 2007. Disponível em: www.imshealth.com. Acessado em junho/2007.

IMS HEALTH. IMS Market Prognosis, 2009. Disponível em: www.imshealth.com. Acessado em junho/2009.

INSEL, P. A. Fármacos Analgésico-Antipiréticos e Antiinflamatórios e Medicamentos Usados no Tratamento da Gota. **Editora McGraw-Hill**, p. 450-480, 1996.

JONES, R. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Prescribing: Past, Present, and Future. **The American Journal of Medicine**, 110, p. 4S-7S, 2001.

JOUZEAU, Y.; TERLAIN, B.; ABID, A. Cyclo-oxygenase Isoenzymes. How Recent Findings Affect Thinking about Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Drugs**, 53, p. 563-582, 1997.

KINI, R. M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. Chichester: John Wiley, p. 1, 1997.

KUWATA, H.; NAKATANI, Y.; MURAKAMI, M.; KUDO, I. Cytosolic Phospholipase A₂ is Required for Cytokine-induced Expression of Type IIA Secretory Phospholipase A₂ that Mediates Optimal Cyclooxygenase-2-dependent Delayed Prostaglandin E₂ Generation in Rat 3Y1 Fibroblasts. **Journal of Biology and Chemistry**, 273, p. 1733-40, 1998.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterrism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 12, p. 23-49, 2005.

LIMA, M. L. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, nº 6, p. 1456-1468, 2007.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; SNAPP, E.; KENWORTHY, A. Studying Protein Dynamics in Living Cells. **Nature Review Molecular Cell and Biology**, v. 2, p. 444-456, 2001.

LUO, G.; MATTSON, G. K.; BRUCE, M. A.; WONG, H.; MURPHY, B. J.; LONGHI, D.; ANTAL-ZIMANYI, I.; POINDEXTER, G. S. Isosteric *N*-arylpiperazine Replacements in a Series of Dihydropyridine NPY₁ Receptor Antagonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 5975-5978, 2004.

MASLINSKA, D.; GAJEWSKI, M. "Some Aspects of the Inflammatory Process". **Folia Neuropahtologica**, v. 36, p.199-204, 1998.

MILNE, G. M. Pharmaceutical Productivity: The Imperative for New Paradigms. *Annu. Rep. Med. Chem.*, v. 38, p. 383-397, 2003.

MOSIOR, M.; SIX, D. A.; DENNIS, E. A. Group IV Cytosolic Phospholipase A₂ Binds with High Affinity and Specificity to Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate Resulting in Dramatic Increases in Activity. **Journal of Biology and Chemistry**, 273, p. 2184-91, 1998.

MUKHOPADHYAY, B.; RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; RUSSEL, D. A.; FIELD, R. A. Streamlined Synthesis of Per-*O*-acetylated Sugars, Glycosil Iodides, or Thioglycosides from Unprotected Reducing Sugars. **Journal Organic Chemistry**, v. 69, p. 7758-7760, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. **New York: Worth Publishers**, 2000.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, IRMGARD; LOMONTE, B. Inhibitory Effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltratum* extracts Towards Myotoxic Phospholipases A2 from *Bothrops* Snake Venoms: Isolation of 4-nerolidicatecol as Active Principle. **Phytochemistry**, 66, p. 1017-1025, 2005.

OLIVEIRA, G. M. M. Antiagregantes Plaquetários. Artigo de Revisão. **Revista SOCE RJ**, v. XIV, 2001.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo: Patologia. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, p. 130-174, 2006.

PHILIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R. D.; KALE, L.; SCHULTEN, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. **Journal of Computation Chemistry**. v. 26, p.1781-1802, 2005.

PhRMA. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. **Report 2000**. Disponível em: www.phrma.org/publications.

PhRMA. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. **Report 2008**. Disponível em: www.phrma.org/publications.

PRENTIS, R. A.; LIS, Y.; WALKER, S. R. Pharmaceutical Innovation by the Seven UK-owned Pharmaceutical Companies (1964 –1985). **Journal of Clinical Pharmacology**, 25, p. 387-396, 1998.

QUEIROZ, S.; VELAZQUEZ, A. “Mudanças Recentes na Estrutura Produtiva da Indústria Farmacêutica”, in Negri, B. e Giovanni, G. (orgs.) Brasil: radiografia da saúde, **Instituto de Economia, Unicamp**, Campinas, 2001.

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Disponível em: www.rcsb.org/pdb/home.

RIZZA, C.; LEITINGER, N.; YUE, J.; FISHER, D. J.; WANG, D. A.; SHIH, P. J. Lysophosphatidic Acid as a Regulator of Endothelial/Leukocyte Interaction. **Laboratory Investigation**, 79:1227– 35, 1999.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. Pathologic Bases of Disease. **Ed. Elsevier**, 7th edition, p. 1504, 2005.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. Patologia: Fundamentos. México: Médica Panamericana. **Patologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

SANTOS, J. L.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; OLIVEIRA, H. P.; BUELONI, R. H.; BOFFO, E.; MACHADO, R. G. P.; LONGO, M. C.; CHUNG, M. C. Síntese e Modelagem Molecular do Novo Derivado Indolinônico como Candidato a Antiinflamatório COX-2 Seletivo. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 28, n.2, p. 235-240, 2007.

SANTORO, F. M. Innovación y Sendero Evolutivo en la Industria Farmacéutica: Los Casos de Argentina y España. **Cadernos de Gestão Tecnológica**, n. 48. São Paulo: CYTED-PGT/USP, 2000.

SARMA, J. C.; BORAH, R.; DEKA, N. Iodine as an Acetyl Transfer Catalyst. **Journal of Chemistry Research**, p. 110-111, 1997.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The Phospholipase A2 Superfamily and its Group Numbering System. **Biochemistry and Biophysics Research**, p. 1246-1259, 2006.

SCHNITZER, T. J. Cyclooxygenase-2 – Specific Inhibitors: Are They Safe? **American Journal of Medicine**, 110:46S-49S, 2001.

SCHWARTZMAN, S. A Pesquisa Científica e o Interesse Público. **Revista Brasileira de Inovação**, Rio de Janeiro: Finep, p. 368, 2001.

SILVA, A. L. M.; RIBEIRO, N. M. MODELAGEM MOLECULAR DE COMPOSTOS ORGÂNICOS. **III Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica Fortaleza - CE – 2008**.

SILVA, P. Farmacologia. 7 ed. **Ed. Guanabara Koogan**, 2006.

SILVA, R. A. Aaminação redutiva de Aldeídos e Cetonas Promovida por Zinco em meio Aquoso. Tese de Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6º Ed. **Editora LTC.**, 2000.

SHIRAI, Y.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Localization and Functional Interrelationships Among Cytosolic Group IV, Secreted Group V and Ca²⁺-independent Group VI Phospholipase A2s in P388D1 Macrophages Using GFP/RFP Constructs. **Biochemistry and Biophysics**, p. 119-129, 2005.

SINGER, A. G.; GHOMASHCHI, F.; LE CALVEZ, C.; BOLLINGER, S.; BEZZINE, M.; ROUAULT, M.; SADILEK, E.; NGUYEN, M.; LAZDUNSKI, G.; LAMBEAU, G; GELB,

M. H. Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A2. **Journal of Biology and Chemistry**, p. 48535-48549, 2002.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T.. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin Synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n 6, p. 387-437, 2004.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2. ed. Barueri: Manole, 2002.

SNYDER, F. Platelet-Activating Factor: The Biosynthetic and Catabolic Enzymes. **Biochemistry Journal**, p. 689-705, 1995.

TANG, J.; KRIZ, R. W.; WOLFMAN, N.; SHAFFER, M.; SEEHRA, J.; JONES, S. S. A Novel Cytosolic Calcium-Independent Phospholipase A2 Contains Eight Ankyrin Motifs. **Journal of Biology and Chemistry**, p. 8567-8575, 1997.

TJOELKER, L. W.; STAFFORINI, D. M. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolases in Health and Disease. **Biochemistry and Biophysics Research**, p. 102-23, 2000.

TRIGGIANI, M.; GRANATA, F.; GIANNATTASIO, G.; MARONE, G. Secretory Phospholipases A2 in Inflammatory and Allergic Diseases: Not Just Enzymes. **Journal of Allergy Clinical and Immunology**, p. 1000-1006, 2005.

VALENTIN, E.; SINGER, A. G.; GHOMASHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H.; LAMBEAU, G. Cloning and Recombinant Expression of Human Group IIF-Secreted Phospholipase A2. **Biochemistry and Biophysics Research**, p. 223-28, 2000.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. A Better Understanding of Anti-inflammatory Drugs Based on Isoforms of Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2). Advances in Prostaglandin, Tromboxane and Leukotriene. **Research**, v. 23, p. 41-8, 1995.

VELÁZQUEZ, C.; RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. Novel Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Possessing a Nitric Oxide Donor diazen-1-ium-1,2-diolate Moiety: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Nitric Oxide Release Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 4061-7, 2005.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. A Medicinal Chemistry Paradigm: Ligands and Receptor Flexibility. **Química Nova**, v. 28 (1), p. 95-102, 2005.

VIEIRA, V. M.; OHAYON, P. Inovação em Fármacos e Medicamentos: Estado-da-Arte no Brasil e Políticas de P&D. 2006.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the Gaps Toward a COX Continuum? **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.] v. 99, n. 21, p. 13371-13373, 2002.

WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. 2nd ed., **Academic Press: London**, p. 29, 2003.

WERMUTH, C. Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, (6), p. 1303-14, 2004.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. O. Principles of Medicinal Chemistry. In: BORNE, R. F. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents. **New York: Lippincott Williams & Wilkins**, 2002.

YEDGAR, S.; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. **Science Direct.**, p. 1373, 2006.

YEDGER, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Role of Secretory and Cytosolic Phospholipase A2 Enzymes in Lysophosphatidylcholine-Stimulated Monocyte Arachdonich Acid Release. **Biochemistry and Biophysics Research**, p. 257-62, 2003.

YOUNG, D. C. Computational Chemistry: A Pratical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems. **John Wiley & Sons: New York**, 2001.