

SÍNTESE, AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIEDEMATOGÊNICAS E RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE DERIVADOS 5-ARILIDRAZONIL-N-FENIL PIRAZOLAS*Antonio C. C. Freitas[#], Eliezer J. Barreiro, Anibal de Lima Pereira

Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) - Faculdade de Farmácia - UFRJ - Cidade Universitária - 21941-270 - Rio de Janeiro - RJ

Edna F. R. Pereira e Nuno A. Pereira

Departamento de Farmacologia Clínica e Experimental - ICB - UFRJ

Recebido em 10/11/93; aceito em 15/12/94

In recent published papers three compounds BW 755C (5), CBS-1108 (3) and FPL 62064:30 (4) were described as inhibitors of both pathways of arachidonic acid's metabolism and having important antiinflammatory, analgesic, antialergic, antiasmatic activities. In our medicinal chemistry laboratories, continuing a research program which aims the synthesis and pharmacological evaluation of arachidonic acid enzymes inhibitors we synthesized 16 new hydrazone pyrazolic derivatives which were planned as hybrid bioisosteres compounds of 3-5. These compounds were tested for antiinflammatory, analgesic activity using mice paw oedema test induced by carrageenin and induced contortions using mice intraperitoneally pre-treated with an acetic acid diluted solution. We are able to detect to compound 5-pyrazolylhydrazone (21) the best pharmacological profile as antiedematogenic agent. This derivative seems to be a true lead-compound which could be further submitted to rational approaches of drug design in order to improve its biological profile.

Keywords: medicinal chemistry; hydrazonopyrazolic derivatives; arachidonic acid; antiedematogenic activity.

Inúmeros trabalhos relacionam os efeitos terapêuticos dos agentes antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIA) com sua capacidade de interferir na bioformação dos autacóides. Desde os estudos clássicos de Vane¹ sobre o mecanismo de ação do ácido acetil salicílico (AAS)(1) e da indometacina (2) a racionalização mais aceita dos efeitos biológicos desta classe de fármacos tem sido a inibição do metabolismo do ácido araquidônico (AA) via prostaglandinas (PG)², i.e. inibindo a cicloxi- genase (Quadro 1).

O AA é substrato para dois tipos de enzimas oxidativas, um grupo denominado cicloxi- genase (CO) e outro chamado lipoxigenase (LO). O primeiro conduz a bioformação das PG's enquanto que o segundo (5-LO, 12-LO e 15-LO) leva à formação de diferentes classes de eicosanóides alicíclicos que são os leucotrienos (LT's), ácidos hidroxi- eicosatetraenóicos (HETE's) e hidroperoxi- eicosatetraenóicos (HPTE's) (Quadro 1).

Fármacos do tipo AAS inibem a biossíntese de prostaglan- dinas (PGBS), mas não impedem a bioformação do LTB₄, um importante agente quimiotático para leucócitos polimorfonu- cleares (PMN), pela ação da 5-LO sobre o AA. Estes resulta- dos evidenciam que a simples inibição da CO pelos agentes antiinflamatórios não-esteroidais clássicos, não assegura um efeito antiinflamatório tão eficaz quanto a inibição dupla da CO e 5-LO.

Foram, recentemente, descritos na literatura compostos do tipo hidrazonil-heterocíclicos, tais como, CBS-1108 (3)³, FPL- 62064:30 (4)⁴ e o BW-755C (5)⁵ (Figura 1), capazes de apre- sentar um amplo espectro de propriedades antiinflamatórias, especialmente em modelos experimentais farmacológicos onde substâncias inibidoras da CO são inativas, sugerindo uma ação inibidora da 5-LO (5-LOI).

Recentemente iniciamos um programa de pesquisas que visa a síntese de novos inibidores de enzimas da cascata do AA, com propriedades antiinflamatórias e analgésicas. Baseando- nos nas estruturas de 3-5 propomos como objetivo sintético uma série de derivados (6) que apresentam uma relação estru- tural híbrida de 3 e 5 conforme ilustra a Figura 2. Consideran- do-se que o composto 5 comporta uma função N-arilidrazona endocíclica e que o derivado 3 possui a mesma unidade estru- tural como um grupo espaçador entre anéis heteroaromáticos, definimos a classe de N-fenilpirazolilidrazonas (6) como obje- tivo de estudo. Os resultados são descritos neste trabalho.

Trabalho anterior deste laboratório⁶ descreveu a síntese e avaliação farmacológica de uma série de 5-arilaminopirazóis funcionalizados (7) como potentes agentes analgésicos perifé- ricos planejados estruturalmente como relacionados ao com- posto FPL-62064:30 (4) em fase de ensaios clínicos⁴, utilizan- do conceitos de bioisosterismo, como estratégia de modifica- ção molecular (Figura 2)¹⁵.

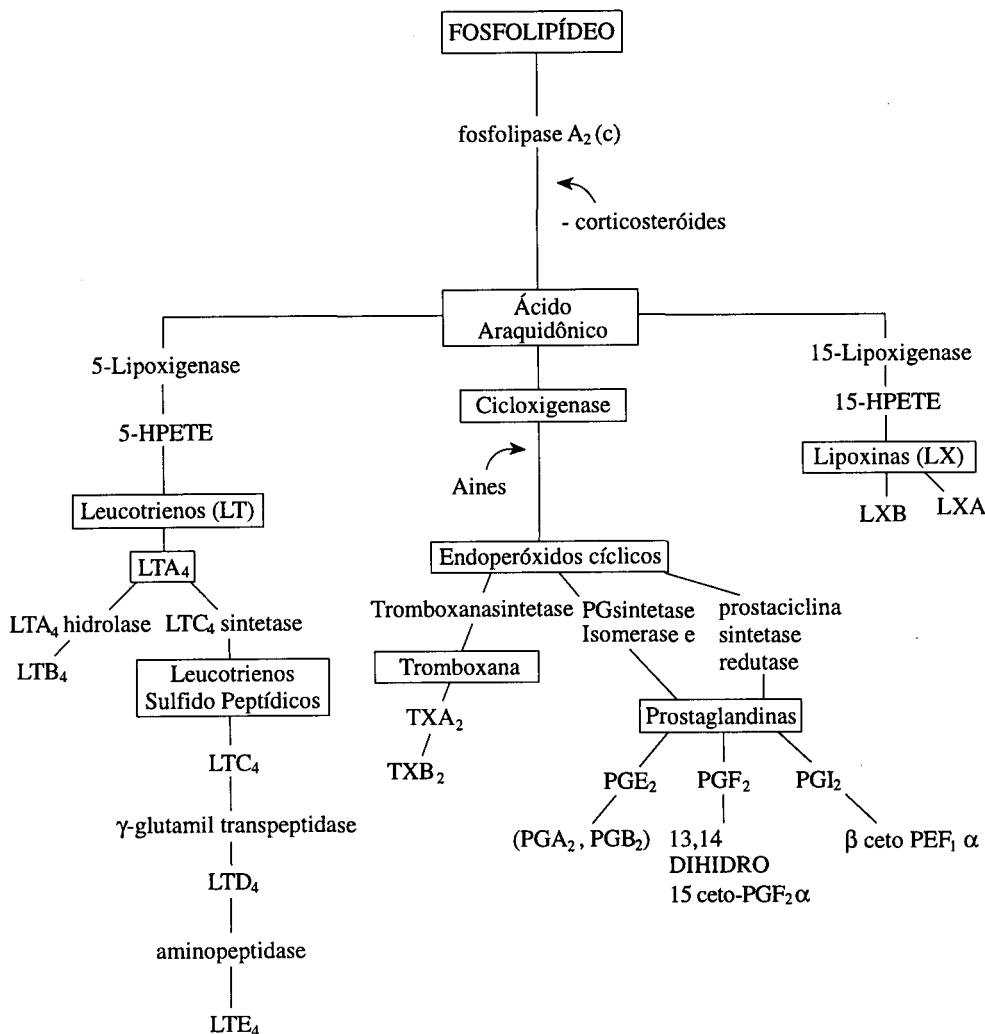
Os novos derivados 5-hidrazonopirazolas funcionalizados (10- 25), foram sintetizados através de reações de condensações en- tre hidrazinilpirazola (9) com aldeídos funcionalizados, utilizan- do-se como intermediário-chave o 1-fenil-3-metil-4-nitro-5-clo- ro pirazola (8) (figuras 3 e 4). Estes novos compostos foram avaliados farmacologicamente, utilizando-se testes in vivo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético⁷, permeabi- lidade vascular⁷ e edema de pata induzida por carragenina⁸, vi- sando-se comprovar o perfil antiedematogênico antecipado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente visando correlacionar os efeitos do substituinte presente na sub-unidade fenólica de (6), na atividade observada analisou-se os valores de ED₅₀ obtidos no teste de analgesia verificando as doses necessárias para reduzir o número de con- torções dolorosas induzidas por injeção intraperitoneal de solu- ções 0,2% de ácido acético. Neste ensaio as substâncias (10,

* Contribuição N 05 do LASSBio, UFRJ.

[#] Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Cosmético, Faculdade de Farmácia, UFF.



Quadro 1. Metabolismo do ácido araquidônico.

13, 14, 15, 20, 21, 22), administradas p.o. em concentrações variadas, utilizando-se propilenoglicol como veículo, indicaram a dose efetiva média em 50% dos camundongos observados ($n=6$) (ED_{50}) encontradas na Tabela 1.

Nesta série observa-se que a ação analgésica aumenta na medida que se potencializa a parte lipofílica do anel fenílico, sendo que os compostos 13, 15, 20, 21 apresentam um menor valor de ED_{50} . Entretanto a combinação de efeitos mesoméricos e indutivos obtidos nos anéis polissubstituídos parece sugerir que os efeitos hidrofóbicos não são os únicos a potencializarem a ação analgésica neste ensaio farmacológico, pois o composto (21) mostrou-se como (20) um dos mais ativos da série quando comparado com (10), indicando que a subunidade piperonila "per-se", com substituintes doadores de elétrons, pode ter influências distintas na ação analgésica uma vez que a introdução de outros grupamentos em C-6 (eg. 21: 6- NO_2 ; 22: 6-Br) altera significativamente o perfil farmacológico observado. Estes resultados sugerem que os efeitos eletrônicos da subunidade $-OCH_2O-$ modificam significativamente em função da natureza de um segundo grupamento de capacidade distinta eletronicamente. A presença de substituintes *meta*-orientados na subunidade fenila parece reduzir o efeito analgésico observado (14 vs 10), cabendo assinalar que a avaliação do intermediário (9) neste ensaio demonstrou que a presença da unidade estrutural hidrazona é relevante para a atividade (ED_{50} 250mg/Kg). A retirada da subunidade $-N=CH-$ no substituinte em C-5 do anel pirazólico potencializa a ação analgésica verificada neste

ensaio (7 Ar = $C_6 H_5$, ED_{50} = 6.70 mg/Kg)¹⁰.

O ensaio do efeito dos compostos (10, 13, 15, 20 e 22) sobre a permeabilidade vascular foi verificado como indicativo da ação antiinflamatória, não sendo possível entretanto através deste ensaio, privilegiar-se nenhum dos mediadores envolvidos neste processo, em particular.

Os valores de ED_{50} obtidos (Tabela 1) não permitiram nenhuma análise conclusiva sobre os efeitos dos substituintes da subunidade fenila, apenas indicando que o derivado (21), apresentando a subunidade estrutural dioxolana-nitrada e o composto (13), possuindo um grupo *para*-metoxila, foram os mais ativos da série. Embora estes substituintes possam ser considerados como capazes de influenciarem a lipofilia do anel fenílico de maneira similar, comparando-se a nível de efeitos eletrônicos os valores de ED_{50} de (13) e (21) observa-se que não é evidente nenhum tipo de correlação entre a atividade ao nível da permeabilidade vascular com o substituinte do anel fenila, parecendo indicar que a presença do substituinte NO_2 em C-6 na subunidade piperonila (21) potencializa sobremaneira a atividade¹⁶. Por outro lado, quando compara-se os valores de ED_{50} dos derivados (10) e (13), observa-se que a introdução do grupamento *para*-metoxila potencializa a ação, independente da natureza doadora de elétrons do substituinte uma vez que o composto (15) foi pouco ativo. Os resultados obtidos parecem indicar que os efeitos dos substituintes, nestes dois primeiros ensaios, apresentam um certo antagonismo, visto que em (20) e (21) a ação analgésica se mantém aproximadamente com o

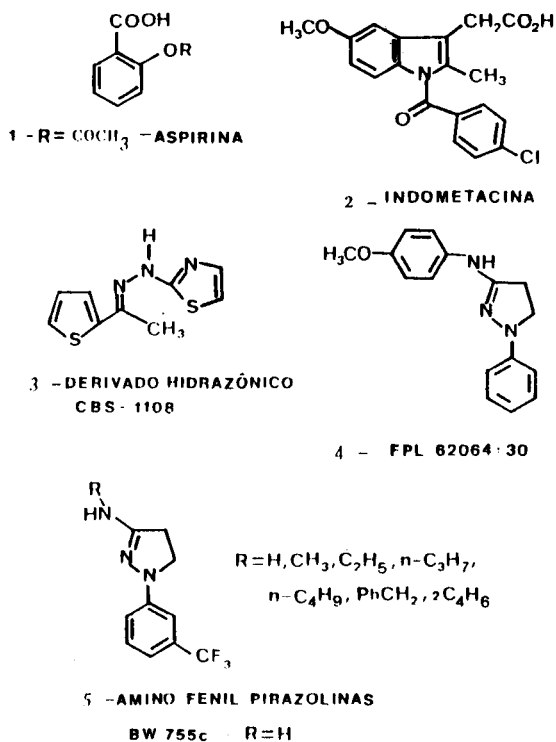


Figura 1

mesmo perfil, enquanto que no ensaio da permeabilidade os efeitos observados apresentam uma marcante potencialização em favor deste último, i.e. (21). O mesmo observa-se entre (13) e (15) nestes dois testes, demonstrando que a ação analgésica aparentemente independe da ação sobre a permeabilidade vascular, ao menos de uma forma direta. É possível antecipar que se o efeito sobre a permeabilidade depende da liberação de mediadores eicosanóídicos, os fatores estruturais de (10) podem ser modulados para uma ação analgésica majoritária ou vice-versa.

Com estes resultados farmacológicos em mãos decidiu-se avaliar a atividade dos compostos mais ativos na permeabilidade vascular, quanto a capacidade de reduzir o edema induzido na pata de rato pela carragenina, um ensaio típico para drogas inibidoras da CO. Incluiu-se os derivados (10) e (22) neste ensaio, embora tenham se mostrado pouco ativos na permeabilidade, de maneira a permitir uma comparação dos eventuais efeitos dos substituintes do anel fenila. Os resultados obtidos, demonstrados na Tabela 1, indicaram uma fraca ação antiinflamatória, exceção feita outra vez ao derivado (21), que mostrou um perfil antiedematogênico adequado, quando se observa os valores de ED₅₀ para as três atividades, confrontando-se com aqueles obtidos para a indometacina (2) usada como padrão.

Finalmente, pode-se observar que os efeitos dos substituintes

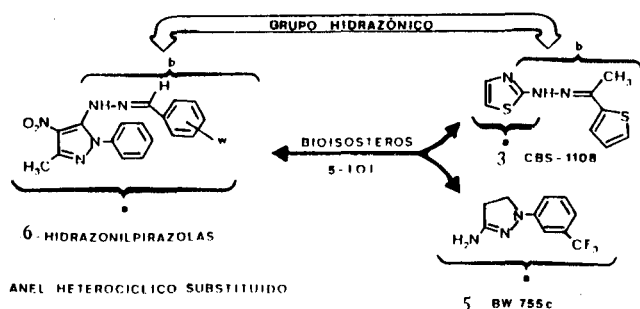
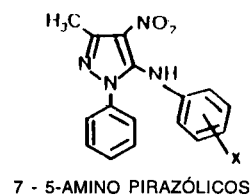


Figura 2. Relação bioisostérica.



da unidade fenila na atividade antiedematogênica desta série de derivados não permite uma racionalização simples com os efeitos lipofílicos ou hidrofóbicos dos substituintes, sugerindo efeitos múltiplos, inclusive eletrônicos, capazes de modificarem as interações com bioreceptores complexos, ou agindo indiretamente na modulação das respostas edematogênicas, interferindo com mais de um sítio. Cabe analisar, além dos fatores eletrônicos, outros efeitos possíveis de justificarem o perfil biológico observado, especialmente quanto a capacidade de armadilhar radicais ao nível do sítio ativo de determinada enzima-receptor envolvida na atividade, podendo o momento dielétrico ou o

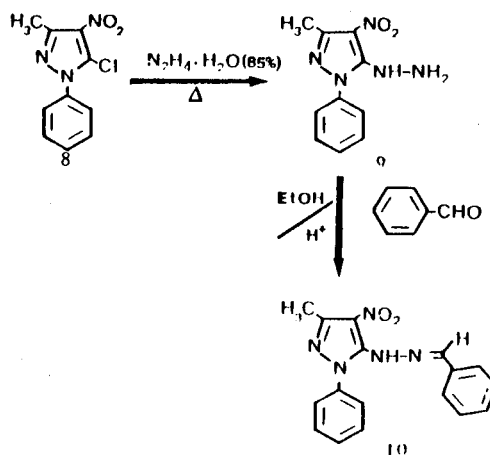


Figura 3. Esquema sintético para a obtenção do derivado 10.

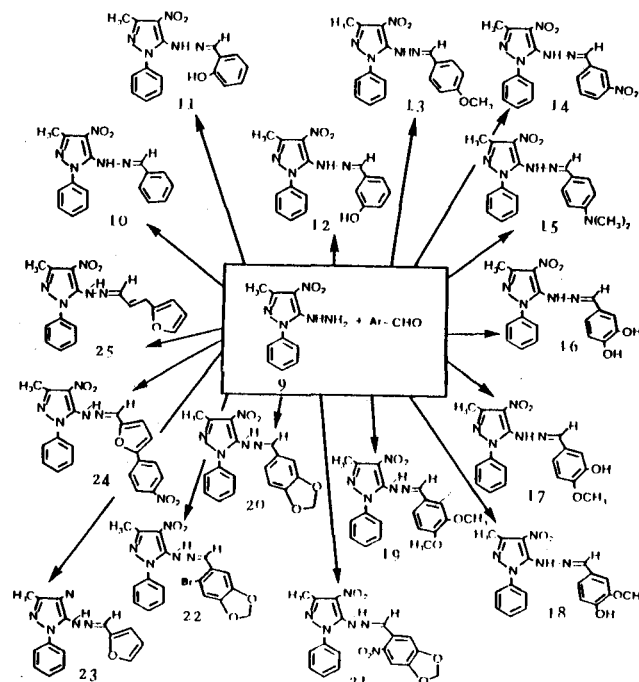
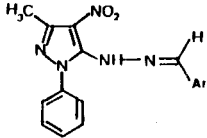


Figura 4. Síntese dos derivados (10) à (25).

Tabela 1. Valores de ED₅₀ para perfil antiedematogênico dos derivados Hidrazonilpirazólicos (6).



	Composto (Ar)	Contorções ^c	ED ₅₀ (mg/Kg) ^a Permeabilidade	Edema
10	C ₆ H ₅	10,1	50,2	66,5
13	pOMe-C ₆ H ₄	6,41	1,67	160,4
15	pNMe ₂ -C ₆ H ₄	6,37	89,6	-
14	mNO ₂ -C ₆ H ₄	12,4	66,2	-
21	6-NO ₂ -Pip ^b	3,21	7,77	8,50
20	Pip	3,39	134,7	68,2
22	6-Br-Pip	6,44	150,0	180,4
2	Indometacina	8,81	3,63	3,47

^a ED₅₀ - calculada pelo gráfico de Hill⁹;

^b Pip = piperonila;

^c Contorções - o número de contorções de cada grupo representa a média ± erro padrão de 10 animais.

calor de formação indicarem uma possível correlação estrutura-atividade.

Por outro lado, recentes trabalhos descrevendo a natureza citossólica Ca⁺⁺, ATP-dependente da 5-LO¹¹, bem como o envolvimento do fator transmembrânico de ativação da 5-LO (FLAP¹²) interferindo no transporte de elétrons, configuram que a ação destes derivados, especialmente (21), pode estar modificando o potencial de redução médio deste complexo sistema enzimático, explicando sua atividade. Esta hipótese será verificada no laboratório.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na síntese e avaliação das propriedades antiedematogênicas da série de derivados hidrazonilpirazólicos (7) ilustram a validade da estratégia do bioisosterismo adotada para se definir a estrutura destes compostos, como autênticos híbridos estruturais dos inibidores duplos de CO/5-LO, CBS-1108 e BW-755C. O perfil de atividade observado para (21) indica que este derivado pode ser considerado preliminarmente como um protótipo adequado para o planejamento posterior de novos inibidores de enzimas da cascata do AA, sinteticamente acessíveis. Os eventuais efeitos intra-moleculares da estrutura do derivado (7), assim como a preferência ou não de conformeros favoráveis envolvendo os substituintes em C-4 e C-5 do núcleo pirazólico, tais como a eventual diferença de estabilidade entre os possíveis diastereoisômeros a nível da insaturação N=C, estão sendo estudados no momento por cálculos de mecânica molecular no laboratório¹³, objetivando determinar-se quais parâmetros estruturais poderão correlacionar-se com atividade antiedematogênica observada para (21), indicando quais modificações estruturais posteriores deverão ser introduzidas nesta série, que sugere para o grupamento arilidrazona uma importante unidade farmacofórica para a atividade antiedematogênica observada.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e Métodos

Os espectros na região do infravermelho (I.V.), foram obtidos em espectrofotômetros Perkin-Elmer, de feixe duplo, modelo 783 e modelo 1600 séries FTIR, usando pastilhas de brometo

de potássio anidro ou películas aplicadas com diclorometano. Os valores para as absorções são referidos em número de onda, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm⁻¹).

Os espectros de ressonância magnética nuclear prótonica (PMR) foram obtidos em temperaturas variáveis nos seguintes aparelhos: 60 MHz em EM 360 (NPPN), 200 MHz em AC 200 Bruker (UFRRJ), 200 MHz em Gemini 200 Varian (NPPN), 300 MHz em VXR 300 Varian (CENPES), 300 MHz em AC 300 Bruker (SOUZA CRUZ), 80 MHz em WP 80 Bruker (FRANÇA), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico são referidos em (δ) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas no seguinte modo: s-singlete, d-dublete, dd-duplo dublete, td-triplo dublete, m-multiplete, sl-sinal largo.

Os espectros de massas de baixa resolução (E.M), foram a 70 ev em aparelho GC/VG Micromass 12 (NPPN) e GC/MS HP 6895 (SOUZA CRUZ), com representação automática dos espectros por computador. Os fragmentos foram descritos como relação entre as unidades de massa atômica e carga (m/z) e a abundância relativa em porcentagem (%).

Nas cromatografias de adsorção em coluna foi utilizado gel de sílica de tamanho de partícula 0,063-0,2 mm (70-230 mesh) (ASTM/Merck-Darmstadt).

Nas cromatografias de camada fina (C.C.F) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de Kiesegel 60F, espessura de camada 0,2 mm (Merck-Darmstadt). Nas C.C.F. preparativas foram utilizadas placas de vidro preparadas com gel de sílica G + F₂₅₄ (Merck-Darmstadt). As misturas eluentes foram preparadas volume a volume (v/v).

A visualização das substâncias em C.C.F. foi feita em lâmpada de U.V. (254 - 365 nm).

A determinação dos pontos de fusão foram feitas em aparelho Buchi 510.

Os solventes utilizados para fins sintéticos foram tratados e redestilados.

A remoção parcial dos solventes foi realizada à pressão reduzida em evaporador rotatório. Em todos os casos a remoção completa dos solventes foi feita em sistema de alto vácuo, com pressão variando entre 10 e 0,1 mm Hg.

Todos os rendimentos obtidos foram calculados sobre o produto bruto.

Todos os espectros de I.V. foram registrados, utilizando-se pastilha de KBr.

Todos os espectros de PMR foram registrados numa solução de DMSO d₆ (cerca de 0,3 M).

Protocolos Experimentais dos Derivados Sintéticos

1-Fenil-3-metil-4-nitro-pirazol-5-ilhidrazina (9)

Em um balão de 3 bocas, equipado com condensador de refluxo e funil de adição, colocam-se 2,3g (9,6 mM) de 5-cloro-1-fenil-3-metil-4-nitro-pirazol (8) e 15ml de etanol. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo e através de um funil de adição, goteja-se lentamente por um período de 5 minutos, 1,9ml de hidrato de hidrazina à 85%. Completada a adição, a mistura reacional foi deixada sob refluxo por 15 minutos. Após o término da reação, resfriou-se e o precipitado foi filtrado à vácuo e cristalizado em etanol. Obteve-se 3,6g (67%) de (9) como um sólido de cor laranja (p.f. 150-151°C).

Procedimento Geral de Obtenção dos Derivados 5-Hidrazono Pirazolas

Em um balão equipado com condensador de refluxo e agitador magnético, foram colocados quantidades estequiométricas de 1-fenil-3-metil-4-nitro-pirazol-5-ilhidrazina (9), 15ml de etanol, 1ml de ácido clorídrico e aldeídos aromáticos, sendo a

mistura reacional aquecida a refluxo durante 3 horas em banho de óleo. No final deste período a mistura reacional foi deixada resfriar e o sólido resultante filtrado à vácuo.

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de benzaldeído (10)

A partir de 1g (9,4 mM) de benzaldeído, obteve-se 1,31g de (10) (97%) (p.f. 205-206°C).

IV máx: 3254 (NH), 3051, 1613, 1520, 1461, 1382, 1271, 1109, 961, 886, 806 cm^{-1} .

PMR (300 MHz): 11,0 (s, 1H, NH), 8,3 (s, 1H, H-7"), 7,5 (m, 7H), 7,3 (m, 2H, H-2", H-6"), 6,9 ("d", 2H, H-3", H-5"), 7,3 (m, 1H, H-4"), 2,5 δ (s, 3H, CH₃).

EM (70 ev): m/z 321 (M⁺) (28%), 215 (27), 129 (41), 104 (16), 77 (100).

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de p-metoxibenzaldeído (13)

A partir de 1g (7,3 mM) de p-metoxibenzaldeído, obteve-se 1,39g de (13) (94%) (p.f. 210-211°C).

IV máx: 3243 (NH), 1610, 1515, 1434, 1382, 1306, 1249, 1132, 951, 891, 833 cm^{-1} .

PMR (300 MHz): 10,9 (s, 1H, NH), 8,2 (s, 1H, H-7"), 7,5 (m, 7H), 6,8 (d, 2H, H-2", H-6"), 6,9 (d, 2H, H-3", H-5"), 2,4 (s, 3H, CH₃), 3,8 δ (s, 3H, OCH₃).

EM (70 ev): m/z 351 (M⁺) (20%), 215 (14), 133 (47), 129 (45), 104 (16), 92 (45), 77 (100).

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de m-nitrobenzaldeído (14)

A partir de 1g (6,6 mM) de m-nitrobenzaldeído, obteve-se 1,46g de (14) (95%) (p.f. 220-221°C).

IV máx: 3244 (NH), 3074, 1617, 1530, 1455, 1354, 1121, 951, 806 cm^{-1} .

PMR (300MHz): 11,2 (s, 1H, NH), 8,4 (s, 1H, H-7"), 7,5 (m, 7H), 7,3 (d, 1H, H-2"), 7,6 (s, 1H, H-6"), 7,5 (m, 2H, H-3", H-5"), 8,1 (m, 1H, H-4"), 2,5 δ (s, 3H, CH₃).

EM (70 ev): m/z 366 (19%), 215 (25), 129 (48), 104 (16), 77 (100).

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de p-N,N-dimetilbenzaldeído (15)

A partir de 1g (6,7 mM) de p-N,N-dimetilbenzaldeído, obteve-se 1,44g de (15) (94%) (p.f. 206-207°C).

IV Máx: 3408 (NH), 2370, 1615, 1538, 1436, 1377, 1106, 1045, 766 cm^{-1} .

PMR (300 MHz): 10,8 (s, 1H, NH), 8,2 (s, 1H, H-7"), 7,5 (m, 7H), 6,7 (d, 2H, H-2", H-6"), 6,9 (d, 2H, H-3", H-5"), 2,6 (s, 3H, CH₃), 3,0 δ (s, 6H, N(CH₃)₂).

EM (70 ev): m/z 364 (M⁺) (100%), 147 (88), 129 (22), 120 (27), 104 (13), 77 (55).

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de piperonal (20)

A partir de 1g (6,6 mM) de piperonal, obteve-se 1,46g de (20) (95%) (p.f. 228-229°C).

IV máx: 3241 (NH), 2899, 1620, 1522, 1499, 1447, 1262, 1048, 939, 861 cm^{-1} .

PMR (300 MHz): 10,9 (s, 1H, NH), 8,2 (s, 1H, H-7"), 7,5 (m, 7H), 6,1 (d, 1H, H-6"), 6,6 (d, 1H, H-2"), 6,8 (d, 1H, H-3"), 2,4 (s, 3H, CH₃), 6,0 δ (s, 2H, OCH₂-O).

EM (70 ev): m/z 365 (M⁺) (58%), 215 (28), 148 (20), 129 (77), 104 (18), 77 (100).

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de nitro piperonal (21)

A partir de 1g (5,1 mM) de nitro piperonal, obteve-se 1,68g de (21) (97%) (p.f. 220-221°C).

IV máx: 3260 (NH), 2059, 1591, 1503, 1443, 1378, 1265, 1028, 925, 877 cm^{-1} .

PMR (300 MHz): 11,5 (s, 1H, NH), 8,8 (s, 1H, H-7"), 7,4 (m, 7H), 5,7 (s, 2H, H-2", H-6"), 7,4 (m, 5H, H-2', H-6'), 5,7 (s, 2H, H-6"), 7,4 (s, 1H, H-3"), 2,4 (s, 3H, CH₃), 6,1 δ (s, 2H, O-CH₂-O).

EM (70 ev): m/z 410 (M⁺) (6%), 135 (82), 104 (19), 77 (100).

1-Fenil-3-metil-4-nitro-5-hidrazona pirazólica de bromo piperonal (22)

A partir de 1g (4,3 mM) de bromo piperonal, obteve-se 1,77g de (22) (95%) (p.f. 214-215°C).

IV máx: 3254 (NH), 2900, 1607, 1519, 1469, 1382, 1280, 1039, 936, 861 cm^{-1} .

PMR (300 MHz): 11,3 (s, 1H, NH), 8,3 (s, 1H, H-7"), 7,5 (M, 7H), 5,8 (s, 2H, H-2", H-6"), 7,1 (s, 1H, H-3"), 2,4 (s, 3H, CH₃), 6,1 δ (s, 2H, O-CH₂-O).

EM (70 ev): m/z 443,445 (M⁺) (23, 25%), 215 (35), 129 (82), 104 (13), 77 (100).

Protocolos Experimentais Farmacológicos

Testes das contorções e da permeabilidade vascular induzidas pelo ácido acético⁷

Neste teste foram empregados camundongos albinos, do biotério Central do CCS de linhagem não caracterizada, de ambos os sexos, com peso corporal entre 15 e 20g, mantidos com água e alimentação à vontade, à temperatura ambiente.

As drogas a serem ensaiadas foram introduzidas por sonda gástrica, nas doses de 5, 50 e 500mg/Kg, suspensas ou dissolvidas em propilenoglicol, sendo as diluições preparadas de forma a permitir a aplicação das doses sempre em volumes correspondentes a 0,1 ml/20g de peso corporal. Duas horas após este tratamento, os camundongos foram injetados, pela veia lateral da cauda, com o volume de 0,2ml de uma solução do corante azul de Evans à 1% e, 10 minutos depois, submetidos à aplicação intraperitonal de uma solução 0,1 N de ácido acético, na proporção de 0,1ml/10g de peso corporal, correspondendo a uma dose de 60 mg/Kg. O número de contorções observadas em cada um dos animais, nos 30 minutos seguintes a este tratamento, foi usado como critério de quantificação das reações de dor periférica neles produzidas.

Finda esta observação os animais foram sacrificados numa câmara saturada com vapor de éter etílico, sendo feita a abertura da cavidade abdominal de cada um deles, de modo a possibilitar a lavagem das vísceras com 8ml de água destilada retirando o corante extravasado. Os lavados assim obtidos foram filtrados em gase, tratados com 0,1ml de solução 0,1N de hidróxido de sódio e ajustados ao volume final de 10ml, com água destilada, sendo então submetidos à leitura em espectrofotômetro, a 500nm, o que permitiu a avaliação da quantidade de corante extravasado, usada como indicativo da perda plasmática resultante do aumento de permeabilidade vascular ocorrido.

Como controles negativos foram usados lotes de animais em que a aplicação das drogas-teste foi substituída pelo tratamento com propilenoglicol, na mesma proporção de volume usada nos lotes experimentais. Como controles positivos foram empregados lotes de camundongos tratados com indometacina, nas doses de 1, 5 e 10mg/Kg, em lugar das drogas-teste. Em todos os casos foram utilizados 10 animais por lote.

Teste do Edema de Pata⁸ induzido por carragenina

Neste teste foram usados lotes de 5 camundongos, da mesma característica dos utilizados no ensaio anteriormente, nas doses de 20, 50 e 100mg/Kg sendo também idênticas as condições de administração das drogas-teste ou de seus respectivos controles.

Duas horas após este tratamento, os animais receberam, na região subplantar da pata posterior direita, uma injeção de 0,05ml de uma solução de carragenina a 2%, dissolvida em

salina fisiológica (NaCl 0,9%), sendo feita, na pata contralateral, a aplicação do mesmo volume de salina fisiológica. Três horas após estas aplicações, tempo considerado adequado à pesquisa de edema máximo, foram medidos os volumes de ambas as patas, até o nível da articulação tibio-társica, traduzindo-se o edema produzido em cada um dos animais pela diferença entre os volumes da pata tratada com carragenina e a injetada com salina.

As medidas de volume de pata foram feitas com emprego de pletismógrafo de acordo com Ferreira⁸.

GLOSSÁRIO*

Agentes Antiinflamatórios Não-Esteroidais (NSAI) - Classe de substâncias que tem o seu mecanismo de ação básico via cascata do ácido araquidônico.

Cicloxiogenase (CO) - Também chamada de prostaglandina endoperóxido sintetase, esta enzima é responsável pela abstração do H do C₁₃, peroxidando os carbonos 11 e 15 do precursor ácido araquidônico levando a formação de prostaglandinas.

Lipoxigenase (LO) - As enzimas lipoxigenases (5-LO, 12-LO e 15-LO) são enzimas citossólicas que catalisam de forma estereó e regioespecífica a incorporação de uma molécula de oxigênio nas posições C₅, C₁₀ e C₁₃ do ácido araquidônico, oxigenando derivados ácidos 5-hidroperoxieicosatetraenóicos 5-HPETE, 12-HPETE e 15-HPETE.

Cascata do Ácido Araquidônico (CAA) - Via da biossíntese de eicosanóides formados pela ação de diversas enzimas sobre o ácido araquidônico. O ácido araquidônico (ácido 5, 8, 11, 14 - eicosatetraenóico), é um ácido graxo poliinsaturado presente em grandes quantidades nos fosfolípidos de membrana.

Eicosanóides - Substâncias endógenas de biossíntese comum, a partir de ácidos graxos essenciais com importante perfil farmacológico. Englobam as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos, além das prostaciclinas.

Bioisosterismo - Modificação de uma substância líder realizada com sucesso para atenuar sua toxicidade ou modificar a sua atividade, podendo levar a uma alteração significativa do seu metabolismo.

Quimiotaxia - Afinidade ou repulsa de células ou organismos vivos, no sentido positivo ou negativo, para substâncias químicas. A quimiotaxia positiva regula a leucocitose.

CIRPE - Edema de pata de rato induzido por carragenina (modelo experimental para o estudo de drogas antiinflamatórias).

ED₅₀ - É a dose requerida de droga para produzir um efeito específico em 50% da população de animais ensaiados.

p.o - Administração de uma droga ou fármaco por via oral.

* Um glossário completo de termos utilizados em Química Medicinal (Medicinal Chemistry) elaborado pela Seção de Medicinal Chemistry da IUPAC está disponível na secretaria da Divisão de SAR-SBQ.

FLAP (5-lipoxigenase activating protein) - É uma proteína de membrana que junto com 5-LO é requerida para a biossíntese celulares.

Farmacóforos - Grupo relevante da molécula que interage com o receptor e são responsáveis por sua atividade.

Química Medicinal - Ciência que trata do descobrimento ou planejamento de um novo fármaco e seu desenvolvimento para o uso em medicina.

AGRADECIMENTOS

Os autores manifestam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelas bolsas concedidas e à FUJB-UFRJ (4825-9) e CNPq (50.0883-92.5) pelo auxílios financeiros concedidos.

REFERÊNCIAS

1. Vane, J. R.; *Nature New Biol.*, (1971), **231**, 23.
2. Van De Stadt, K. D.; *Neth. J. Med.*, (1982), **25**, 2.
3. Sincholle, D.; Bertez, C.; Legrand, A.; Conduzorgues, J. P.; Bonne, C.; *Arzbeim-Forsch.*, (1987), **35**, 1260.
4. Blackam, A.; Griffiths, R. J.; Norris, A. A.; Wood, B. E.; Li, S. W.; Hallam, C.; Mitchell, P. D.; Mann, J.; *Br. J. Pharmacol.*, (1988), **95**, 536p.
5. Copp, F. C.; Islip, P. J.; Tatson, J. E.; *Biochemical Pharmacol.*, (1984), **33**, 339.
6. Freitas, A. C. C.; Barreiro, E. J.; Pereira, E. F. R.; Pereira, N. A.; *Rev. Bras. Farm.*, (1993), **74**, 57.
7. a) Whittle, B. A.; *Biochem. Pharmacol.*, (1963), **12**(suppl), 17; b) Whittle, B. A.; *Br. J. Pharmacol.*, (1964), **22**, 246; c) Fernandes, R. M.; Contribuição para o conhecimento do efeito antiinflamatório e analgésico do bálsamo de copaiba e alguns de seus constituintes, Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da UFRJ, (1986).
8. Ferreira, S. H.; *J. Pharm. Pharmacol.*, (1979), **31**, 648.
9. Noel, F.; Cumps, J.; *Braz. J. Med. Biol. Res.*, (1989), **22**, 423.
10. Freitas, A. C. C.; Barreiro, E. J.; Pereira, A. L.; Silva, F. S. Q. da., Pereira, N. A., Pereira, E. F. R., *Resumos do 3rd Brazilian Meeting on Organic Synthesis*, (1989), 97.
11. a) Dixon, R. A. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1988), **85**, 416; b) Balkarek, J. M. et al., *J. Biol. Chem.*, (1988), **263**, 13937.
12. Ford-Hutchinson, A. W.; *Trends Pharmacol. Sci.*, (1991), **12**, 68.
13. Rodrigues, C. R.; Alencastro, R. B. de.; Barreiro, E. J.; *Resumos da 16ª Reunião anual SBQ*, (1993), SA.01.
14. Khan, M. A., Freitas, A. C. C., *J. Heterocyclic. Chem.*, (1983), **20**, 277.
15. a) Barreiro, E. J.; *Rev. Bras. Farm.*, (1991), **72**, 2; b) Barreiro, E. J.; *Rev. Bras. Farm.*, (1991), **72**, 34.
16. a) Topliss, J. G.; *J. Med. Chem.*, (1972), **15**, 1006; b) Topliss, J. G.; *J. Med. Chem.*, (1977), **20**, 463.