



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS NEUROATIVOS**

Ricardo Menegatti

MARÇO, 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS NEUROATIVOS**

Ricardo Menegatti

TESE DE DOUTORADO REALIZADA NO LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E
SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS (LASSBio)-FACULDADE DE FARMÁCIA-
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO-SOB ORIENTAÇÃO DOS
PROFESSORES DOUTORES:

ELIEZER J. BARREIRO

&

CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA

Rio de Janeiro-Brasil

Março de 2005

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS NEUROATIVOS**

Ricardo Menegatti

TESE SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS

Eliezer J. Barreiro (LASSBio-FF-UFRJ) (Presidente)

Carlos A. M. Fraga (LASSBio-FF-UFRJ)

Valdir Cechinel Filho (Núcleo de Investigação Químico-Farmacêuticas-UNIVALI-SC)

Roberto T. Sudo (Departamento de Farmacologia Básica e Clínica-UFRJ)

Ricardo B. de Alencastro (Instituto de Química-UFRJ)

Vítor F. Ferreira (Departamento de Química-UFF)

Claudia M. Rezende (Instituto de Química-UFRJ) (Suplente)

Carlos R. Kaiser (Instituto de Química-UFRJ) (Suplente)

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências,
junto ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FICHA CARTOGRÁFICA

MENEGATTI, Ricardo

Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos
Candidatos a Protótipos de Fármacos Neuroativos. Rio de Janeiro, UFRJ, IQ, 2005.

xxxv, V I. 124 p, ANEXO. 50p.

Tese: Doutor em Ciências (Química Orgânica)

1- GABA

2- Hipnóticos

3- Analgésicos

4-Teses

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro-IQ.

II. Título

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas-LASSBio-Faculdade de Farmácia-Departamento de Fármacos-UFRJ, sob a orientação dos professores doutores Eliezer J. Barreiro e Carlos Alberto Manssour Fraga.

AGRADECIMENTOS

- Aos professores Dr. Carlos A. M. Fraga e Dr. Eliezer J. Barreiro, pelas discussões, esclarecimentos e pela oportunidade de realizar o trabalho no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas-LASSBio.
- À Dra. Gisele Zapata-Sudo e ao Dr. Roberto T. Sudo, do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelo trabalho em colaboração referente aos ensaios farmacológicos *in vivo*.
- Ao Dr. François G. Noël e a doutoranda Daniele Valentini pela realização dos ensaios *in vitro* de “binding” preliminares.
- Ao Dr. Carlos M. R. Sant’Anna, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela colaboração na parte de modelagem molecular.
- Ao Dr. Alvicler Magalhães e a técnica Eliane G. de Carvalho da Central Analítica de Farmanguinhos-FioCruz, pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C).
- Ao Dr. Antonio J. R. da Silva do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela disponibilidade de uso do aparelho de ultravioleta e liofilizador.
- Ao doutorando Guilherme V. M. de A. Vilela do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelas discussões dos cálculos teóricos de estado de transição.
- À amiga Mami Yano com a qual compartilhei meu cotidiano durante parte de minha estada no Rio de Janeiro.
- A todos os colegas e amigos (Alexandra B. Lopes, Aline C. Azevedo, Ana L. P. Miranda, André F. Paula, Angélica Lima, Anna C. Cunha, Anna M. C. Benite, Arthur

E. Kümmerle, Bianca H. Jaber, Bruna S. Saboia, Carla M. S. Menezes, Carla S. Pinheiro, Carolina M. Duarte, Cínthia L. D. Torreão, Daniel F. Schulz, Daniel I. Lacerda, Daniel , Danilo P. Sant'Ana, Débora Faoro, Emanuel G. Amarante, Fátima M. Carvalho, Fernanda C. F. Brito, Fernanda G. Oliveira, Gilberto M. S. Silva, Heleno J. Bezerra Netto, Hugo Verli, Jorge L. M. Tributino, Jean L. Santos, João X. Araújo Jr., Josiane Neves, Leandro L. Silva, Lídia M. Lima, Lis H. P. Teixeira, Luiz A. S. Romeiro, Mariana L. Duarte, Mariana B. Vilella, Márcia P. Veloso, Marina V. Martins, Monique A. Brito, Nelilma C. Romeiro, Patrícia C. Lima, Ramon D. F. Leite, Raquel M. Araújo, Renata B. Lacerda, Susana V. S. Cardoso, Vagner D. Pinho, Valter L. C. Gonçalves, Vladimir A. Michelotto) do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas-LASSBio, com os quais convivi durante minha estada no laboratório.

- Aos meus familiares Arthur Menegatti Putezel, Cristóvão Luís Menegatti Ferreira da Silva, Maria Izabel Menegatti, Marina Catarina Magalhães Menegatti, Nelson Menegatti e Yara Menegatti, pelo apoio e incentivo incondicionais.
- Às centrais analíticas do NPPN e do IQ, pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear RMN ^1H e RMN ^{13}C e infravermelho.
- Aos órgãos CNPq, FUJB, FAPERJ e programa PRONEX de fomento, pelo apoio financeiro.
- E, desde já, a banca examinadora por aceitar o convite.

RESUMO

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novas substâncias bioativas, esse trabalho descreve a síntese de uma nova família de compostos heterotricíclicos **49-52**, planejados estruturalmente a partir do protótipo zolpidem (**6**), fármaco empregado no tratamento das desordens de ansiedade face às suas propriedades hipnótico-sedativas seletivas. Recentemente, também foi caracterizado importante perfil analgésico para o protótipo zolpidem (**6**), o que o caracteriza como fármaco de perfil dual.

Os compostos 7-(4-clorofenil)-3-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**49**), 3-fenil-1-metil-7-(4-nitrofenil)-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**50**) 3-fenil-1-metil-7-(4-metilfenil)-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**51**) e 3-fenil-7-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**52**), foram submetidos, preliminarmente, a ensaios *in vitro*, contudo não obteve-se êxito devido à falta de solubilidade dos mesmos em meio aquoso. Em etapa posterior, os derivados 7-(4-clorofenil)-3-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**49**) e 3-fenil-1-metil-7-(4-nitrofenil)-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**50**) foram bioensaiados *in vivo* em modelo farmacológico clássico, onde demonstraram prolongar o tempo de hipnose induzida pelo sal sódico do pentobarbital (**4**) e de induzirem hipnose quando administrados isoladamente, apresentando $DH_{50}=105,0$ e $42,6 \mu\text{g/Kg}$, respectivamente. O perfil analgésico central dos compostos 7-(4-clorofenil)-1-3-fenil-metil-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**49**), 3-fenil-1-metil-7-(4-nitrofenil)-3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**50**) 3-fenil-1-

metil-7-(4-metilfenil)-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (51) e 3-fenil-7-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (52) foi avaliado no ensaio da placa quente, onde todos os derivados apresentaram atividade, com destaque para 49 e 51 que apresentaram 100 e 85% de efeito antinociceptivo, respectivamente.

Desta forma, pode-se caracterizar o sucesso do planejamento racional empregado no desenho estrutural destes novos compostos 49-52, o qual permitiu a identificação de promissores protótipos de fármacos hipnótico-sedativos e analgésicos centrais. Ademais, a metodologia sintética empregada na obtenção dos compostos 49-52 descritos neste trabalho se mostrou adequada, permitindo sua síntese em rendimentos globais modestos.

ABSTRACT

In the scope of a research program that aims the design, synthesis and pharmacological evaluation of new bioactive compounds, we describe in this work the design, the synthesis of a new series of heterocyclic compounds **49-52**, which were structurally designed by using zolpidem (**6**) as a lead-compound, of drug that present hypnotic and sedative effect. Additionally, recent reports have described that zolpidem (**6**) is also an important lead-compound of analgesic agent.

The biological assays of the new compounds 7-(4-chlorophenyl)-1-methyl-3-phenyl-3,6,7,8-tetrahydropyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine-6,8-dione (**49**) and 1-methyl-7-(4-nitrophenyl)-3-phenyl-3,6,7,8-tetrahydropyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine-6,8-dione (**50**) were performed *in vivo*, into sleeping time assay, indicating an hypnotic profile with $DH_{50}=105,0$ e $42,6 \mu\text{g/Kg}$, respectively. At the next stage compounds 7-(4-chlorophenyl)-1-methyl-3-phenyl-3,6,7,8-tetrahydropyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine-6,8-dione (**49**), 1-methyl-7-(4-nitrophenyl)-3-phenyl-3,6,7,8-tetrahydropyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine-6,8-dione (**50**), 7-(4-methylphenyl)-1-methyl-3-phenyl-3,6,7,8-tetrahydropyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine-6,8-dione (**51**) and 7-phenyl-1-methyl-3-phenyl-3,6,7,8-tetrahydropyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine-6,8-dione (**52**) were submitted to hot plate assay where all them were able to promote an analgesic activity, with highlight to derivatives **49** and **51** that reverted in 100% and 85, respectively the algesic stimulation. These results indicated a therapeutic profile related to the lead-compound zolpidem (**6**).

Finally, the results described in this work indicated that new effective lead-compounds were identified by using an adequate rational basis in the structural

design. The synthesis of these new compounds **49-52** was accomplished in a modest overall yield employing classical reactions.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xxiii
ÍNDICE DE ESPECTROS	xxv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xxviii
GLOSSÁRIO	xxx
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - MERCADO FARMACÊUTICO E FÁRMACOS NEUROATIVOS	1
1.2 - PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS NEUROATIVOS	1
1.3 - IMPACTO SOCIO-ECONÔMICO DAS DESORDENS DE ANSIEDADE	6
1.4 - LINHA DO TEMPO E EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO DAS DESORDENS DE ANSIEDADE	7
1.5 - HISTÓRICO DA DESCOBERTA DOS BENZOAZEPÍNICOS	10
1.5.1 – ESTUDO TEÓRICO SOBRE O DERIVADO 6-CLORO-2- CLOROMETIL-4-FENILQUINAZOLINA-3-ÓXIDO (11)	12
1.6 - TRANSMISSÃO GABAÉRGICA - ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO-GABA (23), PRINCIPAL VIA INIBITÓRIA DO SNC DE MAMÍFEROS	16
1.6.1 - VIA BIOSINTÉTICA E METABÓLICA DO GABA (23)	16
1.6.2 - O COMPLEXO RECEPTOR GABAÉRGICO	18
1.6.2.1 - RECEPTOR GABA _A	18
1.6.2.1.1 - RECEPTOR GABA _A : ESTRUTURA E FUNÇÕES	19
1.6.2.1.2 - RECEPTORES GABA _A E ATIVIDADE INTRÍNSECA DOS LIGANTES DE RECEPTORES DE BENZODIAZEPÍNICOS	25
1.6.2.2 - RECEPTOR GABA _C	27
1.6.2.3 - RECEPTOR GABA _B	27
1.6.3 - FLEXIBILIDADE DO AGONISTA NATURAL GABA (23)	30
2- OBJETIVOS	35

2.1- PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DE NOVOS DERIVADOS HETEROTRÍCICLOS 49-52 CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE AGENTES HIPNÓTICO-SEDATIVOS E ANALGÉSICOS	36
2.2- ANÁLISE RETROSINTÉTICA DOS NOVOS DERIVADOS HETEROTRÍCICLOS 49-52	38
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1- METODOLOGIA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS LASSBio 49-52	40
3.2 – OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE HETERO DIELS-ALDER, ENVOLVIDA NA ETAPA-CHAVE PARA OBTENÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS HETEROTRÍCICLOS LASSBio 49-52	53
3.2.1 – EFEITO DO SOLVENTE	53
3.2.2 – CONSIDERAÇÕES ESTEREOQUÍMICAS ENVOLVIDAS EM REAÇÕES DIELS-ALDER	54
3.2.3 – ESTUDO DO ESTADO DE TRANSIÇÃO DA REAÇÃO DE HETERO DIELS-ALDER, ATRAVÉS DO EMPREGO DE MECÂNICA QUÂNTICA EM NÍVEL SEMI-EMPÍRICO AM1	56
3.3 – RESULTADOS FARMACOLÓGICOS	69
3.3.1 – ENSAIOS DE “BINDING” DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50)	69
3.3.2 – INFLUÊNCIA DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) SOBRE O TEMPO DE HIPNOSE INDUZIDA PELO SAL SÓDICO DO PENTOBARBITAL (4)	70
3.3.3 – AVALIAÇÃO DO TEMPO DE HIPNOSE INDUZIDA PELOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50)	72
3.3.4 – AVALIAÇÃO DO PERFIL CONVULSIVANTE DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50)	74
3.3.5 – AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTINOCICEPTIVO DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49), LASSBio 873 (50), LASSBio 980 (51) E LASSBio 981 (52) NO ENSAIO DA PLACA QUENTE	76
3.3.5.1 – RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE PARA A ATIVIDADE ANALGÉSICA OBSERVADA PARA OS DERIVADOS 49-52	82

3.4 – COMPORTAMENTO DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) E LASSBio 873 (50) FRENTE AO MODELO DE RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE QUANTITATIVO (QSAR) PARA LIGANTES BENZODIAZEPÍNICOS	84
4- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	89
5- MATERIAL E MÉTODOS	91
5.1- PARTE EXPERIMENTAL	91
5.2- METODOLOGIA SINTÉTICA	93
5.2.1- PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DOS DERIVADOS <i>N</i> -FENILMALEIMIDINAS SUBSTITUÍDAS 53-56 (CAVA <i>et al.</i> , 1973)	93
5.2.1.1 - 1-(4-CLOROFENIL)-2,5-DIDRO-1 <i>H</i> -PIRROLA-2,5-DIONA (53) (CAVA <i>et al.</i> , 1973)	94
5.2.1.2 - PREPARAÇÃO DO DERIVADO 1-(4-NITROFENIL)-2,5-DIDRO-1 <i>H</i> -PIRROLA-2,5-DIONA (54) (CAVA <i>et al.</i> , 1973)	95
5.2.2.3 - PREPARAÇÃO DO DERIVADO 1-(4-METILFENIL)-2,5-DIDRO-1 <i>H</i> -PIRROLA-2,5-DIONA (55) (CAVA <i>et al.</i> , 1973)	96
5.2.1.4 - 1-FENIL-2,5-DIDRO-1 <i>H</i> -PIRROLA-2,5-DIONA (56) (CAVA <i>et al.</i> , 1973)	97
5.2.2 - OBTENÇÃO DE 1-FENIL-3-METIL-1 <i>H</i> -5-PIRAZOLAMINA (58)	98
5.2.3 - <i>N,N</i> -DIMETIL-1-FENIL-3-METIL-1 <i>H</i> -5-PIRAZOLILIMINOMETANAMINA (57) (MASON <i>et al.</i> , 2001)	100
5.2.4 - PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DOS DERIVADOS LASSBio (49-52) (MASON <i>et al.</i> , 2001)	101
5.2.4.1- 7-(4-CLOROFENIL)-3-FENIL-1-METIL-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4- <i>B</i>]PIRROLO[3,4- <i>D</i>]PIRIDINA-6,8-DIONA (49) (MASON <i>et al.</i> , 2001)	102
5.2.4.2 - 3-FENIL-1-METIL-7-(4-NITROFENIL)-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4- <i>b</i>]PIRROLO[3,4- <i>d</i>]PIRIDINA-6,8-DIONA (50) (MASON <i>et al.</i> , 2001)	104
5.2.4.3 - 3-FENIL-1-METIL-7-(4-METILFENIL)-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4- <i>B</i>]PIRROLO[3,4- <i>D</i>]PIRIDINA-6,8-DIONA (51) (MASON <i>et al.</i> , 2001)	106
5.2.4.4 - 3-FENIL-7-FENIL-1-METIL-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4-	108

B]PIRROLO[3,4-D]PIRIDINA-6,8-DIONA (52) (MASON <i>et al.</i> , 2001)	
5.3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	110
5.3.1 - ATIVIDADE HIPNÓTICA EM CAMUNDONGOS	110
5.3.1.1 - DETERMINAÇÃO DA DOSE HIPNÓTICA MÉDIA (DH ₅₀) EM CAMUNDONGOS	110
5.3.2 - ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	111
5.3.2.1 - PLACA QUENTE	111
5.4 – PROTOCOLO DO ESTUDO TEÓRICO DE MODELAGEM MOLECULAR	113
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Os dez medicamentos que mais faturaram e suas respectivas cifras em bilhões de dólares, no ano de 2004 (adaptado de http://www.imshealth.com).	2
Figura 2 – Linha do tempo e evolução do tratamento das desordens de ansiedade.	9
Figura 3 – Propriedades sedativo-hipnóticas do diazepam (7) e pentobarbital (4) (adaptado de Lüllmann e Mohr, 2004).	10
Figura 4 – Via biosintética e metabólica do GABA (23) e sua ação em receptores GABAérgicos (adaptado de Owens e Kriegstein, 2002).	17
Figura 5 – Seqüência de eventos envolvidos no desenvolvimento e formação dos circuitos neurais (adaptados de Ben-Ari, “Ménage à trois”-1997).	20
Figura 6 – Modelo subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA _A e de receptor GABA _A (adaptado de Smith e Olsen, 1995; Sigel e Buhr, 1997).	21
Figura 7 – Modelo de estratégia “knock-in point”, onde o resíduo de His-101 foi substituído pelo resíduo de Arg-101 (adaptado de Wisden e Stephens, 1999).	23
Figura 8 – Classificação dos ligantes 20 , 30-33 de receptores benzodiazepínicos, face às suas atividades intrínsecas (adaptado de Grupta, 1995; Wolff, 1997; Williams e Lemke, 2002).	26
Figura 9 – Modelo de receptor GABA _B heterodímero, formado pela associação das sub-unidades GABA _B R1 e GABA _B R2 (adaptado de Marshall <i>et al.</i> , 1999).	29
Figura 10 – Mapa de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au ³) para as principais conformações 38-43 adotadas pelo GABA (23), sob o cálculo de “Single-Point”, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1, segundo as projeções de Newman, demonstrados em uma faixa de -92,1 (vermelho) a 28,7 Kcal/mol (azul) (POTAPOV, 1979).	31

Figura 11 – Rotâmeros α (44) e β (45) do GABA (23) (adaptado de Williams e Lemke 2002; Fraga, 2001).	32
Figura 12 – Diferença de estabilidade das conformações sinperiplanar (48) e antiperiplanar (47) da molécula do etano (46), frente ao efeito hiperconjugativo (adaptado de Schreiner, 2002).	33
Figura 13 – Desenho estrutural dos novos derivados heterotricíclicos 49-52 , planejados a partir do protótipo zolpidem (6), um fármaco hipnótico-sedativo e analgésico.	35
Figura 14 – Sobreposição do e LASSBio 980 (51) e do protótipo zolpidem (6), após otimização geométrica e análise conformacional sistemática, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.	37
Figura 15 – Mapas de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au 3) de LASSBio (51) e zolpidem (6), respectivamente, demonstrados em uma faixa de -53,2 (vermelho) a 21,0 Kcal/mol (azul).	37
Figura 16 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	47
Figura 17 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	49
Figura 19 – Bandas de absorção do derivado LASSBio 981 (52) no UV, empregando clorofórmio como solvente.	52
Figura 20 – Considerações sobre a estereoquímica do produto formado, face à diastereoisomeria do dieno e aproximação <i>endo/exo</i> (adaptado de Trost, 1991).	55
Figura 21 – Otimização geométrica e análise conformacional sistemática de 56 , 91 e 92 , através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1; Cálculo de “Single-point” sobre a conformação de menor energia para o orbital LUMO; Mapas de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au 3) de 56 , 91 e 92 , demonstrados em uma faixa de -50,5 (vermelho) a 28,7 Kcal/mol (azul) para 56 , -44,8 (vermelho) a 157,5 Kcal/mol (azul) para 91 e -133,7 (vermelho) a 255,8 Kcal/mol (azul) para 92 .	59

- Figura 22 – Otimização geométrica e análise conformacional sistemática do intermediário-chave **57** e **92-94** através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1; Cálculo de “Single-point” sobre a conformação de menor energia para o orbital HOMO; Mapas de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au³) do intermediário-chave **57** e **92-94**, demonstrados em uma faixa de -65,2 (vermelho) a 27,4 Kcal/mol (azul) para **57**, -67,4 (vermelho) a 29,8 Kcal/mol (azul) para **93**, 3,4 (vermelho) a 147,5 Kcal/mol (azul) para **92** e 4,4 (vermelho) a 151,0 Kcal/mol (azul) para **94**. 61
- Figura 23 – Interpretação da maior estabilidade do diastereoisômero (*Z*) **92**, em termos de efeito hiperconjugativo, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico. 63
- Figura 24 – Rearranjo sigmatrópico 1,3 para conversão isômero (*E*) **93** em isômero (*Z*) **94**, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1. 64
- Figura 25 – Cálculo de estado de transição para a reação hetero Diels-Alder 4+2, com aproximação *endo*, envolvendo o intermediário-chave *N,N*-dimetil-3metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), isômero *E* **57** e 1-fenil-2,5-didro-1*H*-pirrola-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1. 66
- Figura 26 – Cálculo de estado de transição para a reação hetero Diels-Alder 4+2, com aproximação *endo*, envolvendo o intermediário-chave *N,N*-dimetil-3metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), isômero *Z* **92** e 1-fenil-2,5-didro-1*H*-pirrola-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1. 67
- Figura 27 – Cálculo de estado de transição para a reação hetero Diels-Alder 4+2, com aproximação *exo*, envolvendo o intermediário-chave *N,N*-dimetil-3metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), isômero *E* **57** e 1-fenil-2,5-didro-1*H*-pirrola-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1. 68
- Figura 28 – Registro do Eletroencefalograma (EEG) em rato após injeção de 40 µg/Kg *i.v.* de LASSBio 872 (**49**) em ratos. O animal foi anestesiado com 76

opióide e curarizado com atropina.

Figura 29 – Particularidades do metabolismo do fármaco zolpidem (**6**) 84
(adaptado de Wermuth, 1996; Sanger e Depoortere, 1998).

Figura 30 – Mapa de campo eletrostático de COMFA para LASSBio 872 (**49**) 86
(azul) e LASSBio 873 (**50**) (alaranjado).

Figura 31 – Mapa de campo estérico de COMFA para LASSBio 872 (**49**) 88
(azul) e LASSBio 873 (**50**) (alaranjado).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa de custo para o desenvolvimento de novos fármacos (adaptado de Rawlins, 2004).	3
Tabela 2 – Abundância relativa dos subtipos de receptores GABA _A encontrados no cérebro de ratos (adaptado McKernan e Whiting, 1996).	22
Tabela 3 – Modelo de estratégia “knock-in” sob a sub-unidade α dos receptores GABA _A , onde o resíduo de Histidina-101 foi substituído pelo resíduo de Arginina-101 (adaptado de Wisden e Stephens, 1999 e Möhler, Crestani e Rudolph, 2001).	24
Tabela 4 – Quadro comparativo das estruturas e propriedades dos receptores GABAérgicos no SNC (adaptado de Johnston, 1996).	29
Tabela 5 – Cálculo “Single-Point”, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1, sobre as principais conformações adotadas pelo GABA (23), segundo as projeções de Newman (POTAPOV, 1979).	34
Tabela 6 – Descritores físico-químicos dos substituintes fenílicos dos derivados LASSBio 49-52 (adaptado de Barreiro e Fraga, 2001).	38
Tabela 7 – Pontos de fusão e freqüências de estiramento das carbonilas imidínicas dos derivados 53-56 , no I.V..	42
Tabela 8 – Pontos de fusão e rendimentos dos derivados 49-52 .	45
Tabela 9 – Descritores físico-químicos para os derivados 49-52 .	45
Tabela 10 – Deslocamentos químicos (δ) em ppm, dos derivados 49-52 , no RMN ¹ H.	48
Tabela 11 – Deslocamentos químicos (δ) em ppm, dos derivados 49-52 , no RMN ¹³ C.	50
Tabela 12 – Freqüências de estiramento para os derivados 49-52 , no I.V..	51
Tabela 13 – Comprimento de onda e absorvidade molar (ϵ) dos derivados 49-52 , na região do ultravioleta (200-400 nm), empregando clorofórmio como solvente.	53
Tabela 14 – Solventes utilizados na reação de hetero Diels-Alder e rendimentos obtidos.	54

Tabela 15 – Cálculos teóricos sobre a 1-fenil-2,5-didro-1 <i>H</i> -pirrola-2,5-diona (56), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.	58
Tabela 16 – Cálculos teóricos sobre o intermediário-chave <i>N,N</i> -dimetil-3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -5-pirazoliliminometanamina (57) e 93-94 através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.	60
Tabela 17 – Perfil das reações de hetero Diels-Alder estudadas através de Mecânica Quântica em nível semi-empírico.	69
Tabela 18 – Subtipos de receptores opióides (adaptado de Stefano <i>et al.</i> , 2000)	77
Tabela 19 - Correlação das curvas dose-resposta do efeito antinociceptivo para os derivados LASSBio 872 (49), LASSBio 873 (50), LASSBio 980 (51) e LASSBio 981 (52) e os correspondentes coeficientes de partição	82

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Principais classes bioquímicas de alvos de fármacos para as terapias atuais (adaptado de Drews, 2000).	4
Gráfico 2 – Lista do biênio 1999-2000 de novos candidatos a protótipos de agentes neuroativos em fase clínica ou em curso de aprovação pelo FDA (adaptado de PHRMA, 2000).	5
Gráfico 3 – Lista do biênio 2001-2002 de novos candidatos a protótipos de agentes neuroativos em fase clínica ou em curso de aprovação pelo FDA (adaptado de PHRMA, 2002).	6
Gráfico 4 – Efeito do LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) na duração do efeito hipnótico do sal sódico do pentobarbital (4). Cada ponto representa a média ± EPM. N=10 camundongos por dose. *P<0,05 quando comparado ao controle (tratamento com DMSO).	72
Gráfico 5 – Hipnose induzida pela injeção <i>i.v.</i> de LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) em camundongos.	73
Gráfico 6 – Duração da hipnose dose dependente induzida pela injeção <i>i.v.</i> de LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) em camundongos. O número de camundongos utilizados está apresentado entre parênteses. *P<0,05 quando comparado com a dose de 25 µg/Kg .	74
Gráfico 7 – Convulsão induzida pela injeção <i>i.v.</i> de LASSBio 872 (49) e LASSBio (50) em camundongos.	75
Gráfico 8 – Analgesia induzida pela injeção <i>i.p.</i> de LASSBio 872 (49) sem (azul) e com (verde e vermelho) pré-tratamento com naloxona (99) em camundongos.	78
Gráfico 9 – a) Analgesia induzida pela injeção <i>i.p.</i> de LASSBio 873 (50) na dose de 2 mg/Kg; b) Analgesia induzida pela injeção <i>i.p.</i> de LASSBio 873 (50) na dose de 4 mg/Kg, sem (amarelo) com (azul) pré-tratamento com naloxona (99) em camundongos.	79
Gráfico 10 – Analgesia induzida pela injeção <i>i.p.</i> de LASSBio 980 (51) sem (verde e vermelho) ou com (azul) pré-tratamento com naloxona (99) em camundongos.	80
Gráfico 11 – Analgesia induzida pela injeção <i>i.p.</i> de LASSBio 981 (52) sem	81

(amarelo) ou com (azul) pré-tratamento com naloxona (**99**) em camundongos.

ÍNDICE DE ESPECTROS

E. 1 – Espectro de RMN ^1H do derivado 53 (CDCl ₃ /TMS/300 MHz).	1
E. 2 – Espectro de Pendant do derivado 53 (CDCl ₃ /TMS/75 MHz).	2
E. 3 – Espectro de IV do 53 (Pastilha de KBr).	3
E. 4 – Espectro de RMN ^1H do derivado 54 (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	4
E. 5 – Espectro de RMN ^1H do derivado 54 (CDCl ₃ /TMS/500 MHz), expansão.	5
E. 6 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado 54 (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	6
E. 7 – Espectro de IV do derivado 54 (Pastilha de KBr).	7
E. 8 – Espectro de RMN ^1H do derivado 55 (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	8
E. 9 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado 55 (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	9
E. 10 – Espectro de IV do derivado 55 (Pastilha de KBr).	10
E. 11 – Espectro de RMN ^1H do derivado 56 (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	11
E. 12 – Espectro de RMN ^1H do derivado 56 (CDCl ₃ /TMS/500 MHz), expansão.	12
E. 13 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado 56 (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	13
E. 14 – Espectro de IV do derivado 56 (Pastilha de KBr).	14
E. 15 – Espectro de RMN ^1H do derivado 58 (CDCl ₃ /TMS/300 MHz).	15
E. 16 – Espectro de Pendant do derivado 58 (CDCl ₃ /TMS/75 MHz).	16
E. 17 – Espectro de IV do derivado 58 (Pastilha de KBr).	17
E. 18 – Espectro de RMN ^1H do derivado 57 (CDCl ₃ /TMS/300 MHz).	18
E. 19 – Espectro de Pendant do derivado 57 (CDCl ₃ /TMS/75 MHz).	19
E. 20 – Espectro de IV do derivado 57 (Pastilha de KBr).	20
E. 21 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 872 (49) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	21
E. 22 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 872 (49) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz), expansão.	22
E. 23 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 872 (49) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	23
E. 24 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 872 (49) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz), expansão.	24
E. 25 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 872 (49) (CDCl ₃ /TMS/125	25

MHz).	
E. 26 – Espectro de IV do derivado LASSBio 872 (49) (Pastilha de KBr).	26
E. 27 – Espectro de UV do derivado LASSBio 872 (49) [$UV\lambda^{CHCl_3}$ max nm (log ϵ): 386,2 (0,021); $\epsilon_{MAX}=1.220$ e max nm (log ϵ): 285,6 (0,593); $\epsilon_{MAX}=34.476$].	27
E. 28 – Espectro de RMN 1H do derivado LASSBio 873 (50) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	28
E. 29 – Espectro de RMN 1H do derivado LASSBio 873 (50) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz) , expansão.	29
E. 30 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 873 (50) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	30
E. 31 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 873 (50) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	31
E. 32 – Espectro de IV do derivado LASSBio 873 (50) (Pastilha de KBr).	32
E. 33 – Espectro de UV do derivado LASSBio 873(50) [$UV\lambda^{CHCl_3}$ max nm (log ϵ): 386,2 (0,023); $\epsilon_{MAX}=1.377$ e max nm (log ϵ): 293,0 (0,593); $\epsilon_{MAX}=34.970$].	33
E. 34 – Espectro de RMN 1H do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	34
E. 35 – Espectro de RMN 1H do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl ₃ /TMS/500 MHz) , expansão.	35
E. 36 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	36
E. 37 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz) , expansão.	37
E. 38 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl ₃ /TMS/125 MHz) , expansão.	38
E. 39 – Espectro de IV do derivado LASSBio 980 (51) (Pastilha de KBr).	39
E. 40 – Espectro de UV do derivado LASSBio 980 (51) [$UV\lambda^{CHCl_3}$ max nm (log ϵ): 386,2 (0,022); $\epsilon_{MAX}=1.215$ e max nm (log ϵ): 285,2 (0,593); $\epsilon_{MAX}=33.094$].	40

E. 41 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 981 (52)	41
(CDCl ₃ /TMS/500 MHz).	
E. 42 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 981 (52)	42
(CDCl ₃ /TMS/500 MHz) , expansão.	
E. 43 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 981 (52)	43
(CDCl ₃ /TMS/125 MHz).	
E. 44 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 981 (52)	44
(CDCl ₃ /TMS/125 MHz) , expansão.	
E. 45 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl ₃ /TMS/125	45
MHz).	
E. 46 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl ₃ /TMS/125	46
MHz), expansão.	
E. 47 – Espectro de HMBC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl ₃ /TMS/125	47
MHz), expansão.	
E. 48 – Espectro de HMBC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl ₃ /TMS/125	48
MHz), expansão.	
E. 49 – Espectro de IV do derivado LASSBio 981 (52) (Pastilha de KBr).	49
E. 50 – Espectro de UV do derivado LASSBio 980 (52) [UV λ^{CHCl_3} max nm	50
(log ϵ): 386,2 (0,025); $\epsilon_{\text{MAX}}=1.330$ e max nm (log ϵ): 283,6 (0,593);	
$\epsilon_{\text{MAX}}=36.702$].	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

λ - comprimento de onda

δ - deslocamento químico

μ - momento de dipolo

$\Delta\delta$ - variação do deslocamento químico

Abs – absorvância

AMPA - α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ccf – cromatografia de camada fina

DL₅₀ – dose letal cinquenta %

et al. - *et alli*

GABA – ácido γ -aminobutírico

HMBC – espectroscopia de correlações heteronucleares $^{13}\text{C} \times ^{13}\text{C}$ (RMN 2D)

HMQC – espectroscopia de correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (RMN 2D)

Hz – hertz

i.p. – intra peritoneal

i.v. - intra venosa

IV – infravermelho

J – constante de acoplamento

LASSBio – Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas

NMDA - *N*-metil-*D*-aspartato

Rf – fator de retenção

RMN ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono ^{13}C

RMN ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio ^1H

SAR – relação estrutura-atividade

UV – ultravioleta

GLOSSÁRIO

Absortividade molar: É a constante característica do soluto, associada à quantidade de radiação UV que é absorvida por uma solução de concentração conhecida, através de uma trajetória de dimensões conhecidas (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Antipsicóticos atípicos: São fármacos empregados na terapêutica da esquizofrenia e que apresentam como os efeitos colaterais extrapirâmídais e os sintomas Parkinsonianos (WILSON, SANYAL e VAN TOL, 1998).

Antipsicóticos clássicos: São fármacos empregados na terapêutica da esquizofrenia que apresentam baixos níveis de efeitos extrapirâmídais e sintomas Parkinsonianos (WILSON, SANYAL e VAN TOL, 1998).

Atividade intrínseca: Efeito biológico dos agonistas, ou seja, a alteração da função celular, depende da efetividade com que a ativação do receptor desencadeia as reações acopladas de transdução de sinal (LÜLLMANN e MOHR, 2004).

Bandas B: As bandas benzóides se encontram presentes nos espectros de UV de sistemas aromáticos ou heteroaromáticos, podendo uma substância apresentar mais de uma destas bandas (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Bandas K: As bandas K são atribuídas a transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ em sistemas conjugados ou aromáticos substituídos por cromóforos. Geralmente apresenta valores de absortividade molar (ϵ_{\max}) > 10.000 (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Cromóforo: Grupamento insaturado, covalentemente ligado à uma molécula orgânica, responsável pela absorção eletrônica (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Deficiência de atenção/Desordens de hiperatividade: Deficiência de atenção/Desordens de hiperatividade (DADH) são um complexo dano neurológico que resulta em uma superestimulação no padrão de comportamento e dificuldade de concentração. Enquanto ela afeta crianças primariamente, um número crescente de adultos vem sendo diagnosticado com a mesma. Meninos são afetados cerca de três vezes mais, quando comparados às meninas. Crianças com DADH são cheias de energia, inquietas, impulsivas, imprudentes, irritáveis, emocionalmente imaturas e agressivas. A DADH freqüentemente leva a atos anti-sociais e dificuldade de aprendizagem, muito embora seu QI seja normal. Nenhuma causa definida tem sido estabelecida, mas alguns pesquisadores cogitam sobre o papel hereditário¹.

Demência: É a degeneração das funções do sistema nervoso central (SNC), tais como capacidade de aprendizagem e memória. O declínio natural destas funções com a idade é bastante amplificado nos casos de demência¹.

Depressão: É caracterizado pelo sentimento de intensa tristeza, a qual pode seguir uma perda recente ou outros eventos tristes, contudo está fora das proporções para o determinado evento e persiste por tempo demasiadamente longo¹.

Desordem depressiva maior (ou síndrome depressiva maior): Esta inclui um episódio de depressão definida como um distúrbio de humor persistente (por pelo menos 2 semanas), mais pelo menos 4 dos seguintes: distúrbios de sono, mudanças na atividade psicomotora, perda de habilidade à experiência de prazer e interesse, fadiga, sentimento depreciativo ou de culpa, dificuldade em se concentrar e preocupação com a morte ou desejo de morrer. A depressão maior está associada com dificuldade no convívio social. A adição de episódio de mania caracteriza desordem bipolar ou desordem maníaco-depressiva. A característica essencial de

¹ <http://www.phrma.org>

mania é um período distinto quando o humor predominante é elevado, expansivo ou irritado, com sintomas associados incluindo hiperatividade, pressão de fala, idéias de violentas, excesso de amor-próprio, diminuição da necessidade de sono, distração e envolvimento excessivo em atividades espalhafatosas, bizarras ou desorganizadas¹.

Desordens de ansiedade: São um grupo de doenças mentais nas quais os sintomas de ansiedade, são a principal característica e há sobreposição entre síndromes específicas¹.

Desordem de ansiedade generalizada: É diagnosticada quando um paciente tem experiências irreais, ou excesso de ansiedade e preocupação (expectativa apreensiva)¹.

Desordem obsessivo-compulsiva: É uma neurose caracterizada primariamente por pensamentos recorrentes e persistentes que são intensos, repugnantes, assustadores, absurdos ou alienados, acompanhados de rituais, comportamento repetitivo, geralmente irracionais e bizarros¹.

Doença de Alzheimer: É a deterioração crônica progressiva e raramente reversível de todas as funções mentais. Manifestações iniciais incluem a diminuição da atenção de curto período, redução do poder de concentração, mudanças de personalidade e esquecimento. Com o progresso da doença, ocorre a perda de habilidade computacional, problemas em encontrar palavras e dificuldade com atividades ordinárias. Por fim ocorre severa perda de memória, desorientação completa, isolamento social e perda da independência¹.

Efeito batocrômico: É quando ocorre o deslocamento da absorção para um comprimento de onda maior, quando comparado à uma substância de referência (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Esquizofrenia: (G. schizō- dividir ou clivar + G. phren- mente) Termo cunhado por Bleuler que veio substituir a denominação demência precoce; o tipo mais comum de psicose, caracterizado por um distúrbio nos processos de raciocínio, tais como ilusões e alucinações e extenso retraimento do interesse do indivíduo em relação a outras pessoas e ao mundo exterior, assim como a introversão em si mesmo. A esquizofrenia hoje é considerada uma síndrome. A esquizofrenia ainda pode ser classificada em ambulatorial, catatônica, latente, hebefrênica, paranóide, processual, pseudoneurótica, reativa e simples (TEIXEIRA, 1979).

Fobias: São respostas de intensa ansiedade, persistente, irreais, a situações externas específicas. Pessoas com fobia social são ansiosas evitam situações sociais ou as enfrentam com grande carga de “stress”¹.

Janela terapêutica: É a razão entre a dose tóxica e dose terapêutica, onde quanto maior a razão mais seguro é o fármaco (LÜLLMANN e MOHR, 2004).

Modulação alostérica: É um sítio de ligação modulatório sob um receptor que é topograficamente distinto do sítio de ligação do agonista (CHRISTOPOULOS, 2002).

Narcose: É a inibição funcional reversível do sistema nervoso produzida pela administração de fármacos que com inconsciência e sem dor, sem reações de esquiva e sem reflexos vegetativos mais fortes, realizada para permitir procedimentos cirúrgicos (LÜLLMANN e MOHR, 2004).

Obesidade: É o acúmulo excessivo de gordura corporal. Geralmente, pessoas cujo peso é 20% ou mais acima do ponto médio de sua faixa de peso sob uma tabela de altura/peso padrão, são considerados obesos¹.

Plasticidade neural: São processos pelos quais sinapses são modificadas em estrutura ou função em resposta a diferentes estímulos ou ambientes (GAIARSA, CAILLARD e BEM-ARI, 2002).

Paranóia: (G. perturbação, loucura, de *para-* + *nōeo-*, pensar) Distúrbio mental grave porém raro, caracterizado pela presença de delírios sistematizados, em uma personalidade sob outros aspectos intacta. Quando os sintomas são relativamente brandos e a enfermidade mental não existe, a condição é chamada de personalidade paranóica (TEIXEIRA, 1979).

Psicose: (G. animação PSYCH-) Distúrbio mental que causa grande distorção ou desorganização da capacidade mental de uma pessoa, da resposta afetiva e da capacidade de reconhecer a realidade, comunicar-se e relacionar-se com os outros até o ponto de interferir com sua capacidade de satisfazer as exigências ordinárias da vida cotidiana. As psicoses se dividem em duas classificações principais, de acordo com suas origens; psicoses associadas às síndromes cerebrais orgânicas (e.g. síndrome de Korsakoff) e psicoses funcionais (e.g. as esquizofrênicas ou psicoses maníco-depressivas) (TEIXEIRA, 1979).

Receptores Ionotrópicos: É o termo que descreve um receptor que exerce seus efeitos através da modulação da atividade de canais iônicos (OWENS e KRIEGSTEIN, 2002).

Receptores Metabotrópicos: É o termo que descreve um receptor que exerce seus efeitos através da modulação da ativação enzimática (OWENS e KRIEGSTEIN, 2002).

Síndrome pré-menstrual (SPM)/desordem disfórica pré-menstrual (DDPM): É referido às variações fisiológicas e sintomas de humor que aparecem durante as

últimas duas semanas do ciclo menstrual e desaparecem no final do fluxo do mês. Psiquiatras e outras profissionais de saúde mental tendem a usar o termo DDPM para descrever um conjunto específico de sintomas de humor que interferem com papéis ou funções sociais. A SPM está relacionada a sintomas físicos tais como inchaço, sensibilidade nos seios e mudanças no apetite. A DDPM tem com parte de seus sintomas depressão do humor, ansiedade ou tensão, irritabilidade, dificuldade de concentração, hipersensível, ou desejo por alimentos e sentimento de dominação¹.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - MERCADO FARMACÊUTICO E FÁRMACOS NEUROATIVOS

Estima-se que a indústria farmacêutica mundial, movimentou, somente no ano de 2004, 500 bilhões de dólares, sendo 230 bilhões de dólares movimentados apenas na América do Norte. Os fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC) são responsáveis por 12,0% do mercado mundial¹.

Na classificação anual de 2004, onde os dez fármacos mais vendidos são listados em função de seus faturamentos, podemos encontrar dois fármacos neuroativos, como ilustra a Figura 1. O antipsicótico atípico olanzapina (**1**) (CHAKRABARTI, HOTTEN e TUPPER, 1993) ocupa a terceira posição nesta classificação e movimenta US \$ 4.8 bilhões de dólares, enquanto o antidepressivo sertralina (**2**) (QUALLICH e WILLIAMS, 1988) ocupa a décima posição e movimenta US \$ 3.4 bilhões de dólares. Somados, ambos faturam US \$ 8.2 bilhões de dólares no mercado farmacêutico mundial, sendo deste 75,5% movimentados apenas nos Estados Unidos².

1.2 - PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS NEUROATIVOS

Os custos relativos à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos tem sofrido um aumento significativo nos últimos trinta anos. Dados recentes apontam que os custos para o desenvolvimento de um único fármaco chegam US \$ 800 milhões de dólares, apresentando uma taxa de crescimento anual de 7.4% (RAWLINS, 2004; DiMASI, HANSEN e GRABOWSKI, 2003).

² <http://www.imshealth.com>

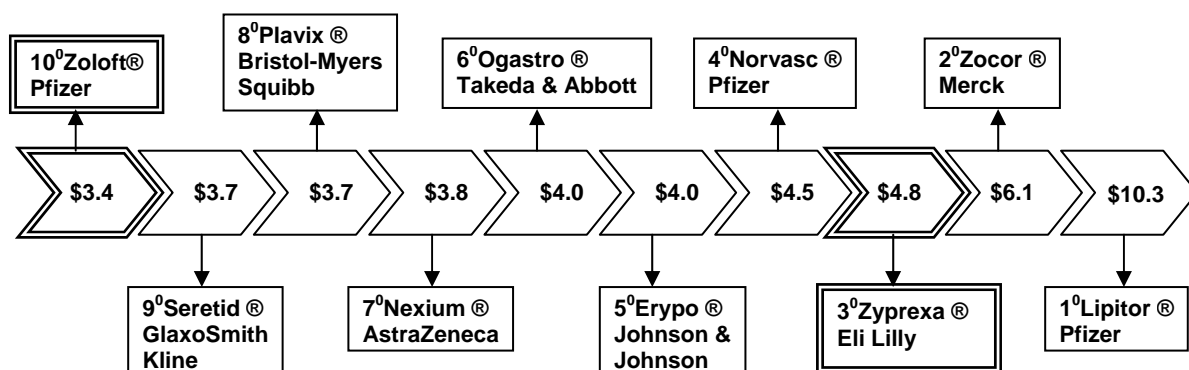
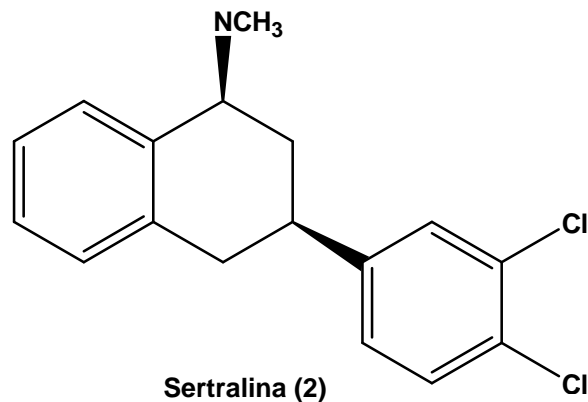
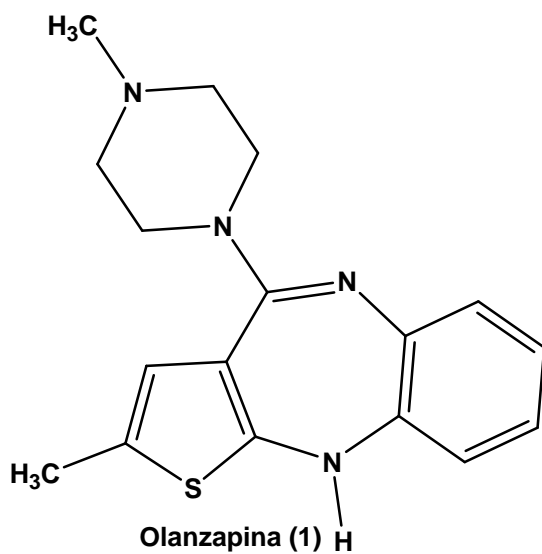


Figura 1 – Os dez medicamentos que mais faturaram e suas respectivas cifras em bilhões de dólares, no ano de 2004 (adaptado de <http://www.imshealth.com>).



Como ilustrado na Tabela 1, a fatia mais onerosa do processo que leva ao desenvolvimento de novos fármacos é constituída pelos componentes biológicos, tanto no que se refere aos testes pré-clínicos e clínicos. Já o componente químico não ultrapassa 20% do valor total, como ilustrado na Tabela 1 (RAWLINS, 2004).

O custo elevado se deve em parte ao aumento do rigor da legislação vigente, no que tange à aprovação de fármacos a serem lançados no mercado (RAWLINS, 2004), face ao precedente histórico como foi o caso da talidomida que levou ao desenvolvimento de anomalias congênitas nos filhos das gestantes que fizeram uso da mesma (COELHO, 2001; LIMA, FRAGA e BARREIRO, 2001).

Tabela 1 – Estimativa de custo para o desenvolvimento de novos fármacos (adaptado de Rawlins, 2004).

Componentes	Custo Pré-aprovado em US \$ milhões (%)	
	Grupo Boston Consulting (2001)	DiMasi <i>et al.</i> (2003)
Biológico	370 (42%)	-
Químico	160 (18%)	-
Segurança pré-clínica	90 (10%)	-
Pré-clínicos globais	620 (70%)	335 (42%)
Clínicos	260 (30%)	467 (58%)
Total	880 (100%)	802 (100%)

Contudo, a elevação dos custos se deve às novas abordagens empregadas em pesquisa e desenvolvimento de fármacos, como a química combinatória, química computacional, ensaios automatizados e “marketing”, onde se encontram embutidos altos volumes de investimentos (BLEICHER *et al.*, 2003; WALTERS e NAMCHUK, 2003).

Como ilustrado no Gráfico 1, dentre ca. 500 fármacos conhecidos, até o momento, a grande maioria destes atua sobre receptores (45%) ou enzimas (28%),

seguido da ação sobre hormônios e fatores (11%), canais iônicos (5%), ácido dexoribonucléico-DNA (2%) e receptores nucléicos (2%) (DREWS, 2000). Há ainda ca. 7% dos fármacos para os quais os alvos permanecem desconhecidos (DREWS, 2000). Através destes dados podemos concluir que biorreceptores³ são os principais alvos bioquímicos para ação dos fármacos.

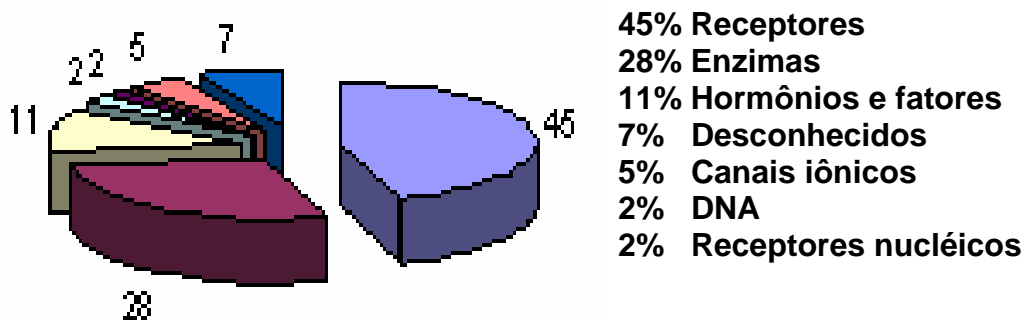


Gráfico 1 – Principais classes bioquímicas de alvos de fármacos para as terapias atuais (adaptado de Drews, 2000).

A “Pharmaceutical Research and Manufacturers”, associação fundada em 1958, publicou nos biênios 1999-2000 e 2001-2002 listagens de novos candidatos a protótipos a fármacos relacionados a ca. dez doenças de maior incidência sobre o SNC, como ilustrado nos Gráficos 2 e 3^{1,2}.

³ A idéia de quimiorreceptores foi cogitada pela primeira vez por Paul Ehrlich, enquanto aluno de medicina na Universidade de Strasbourg no período entre 1872-1874, quando observou a afinidade de corantes por alguns tecidos biológicos (MAEHLE, PRÜLL e HALLIWELL, 2002).

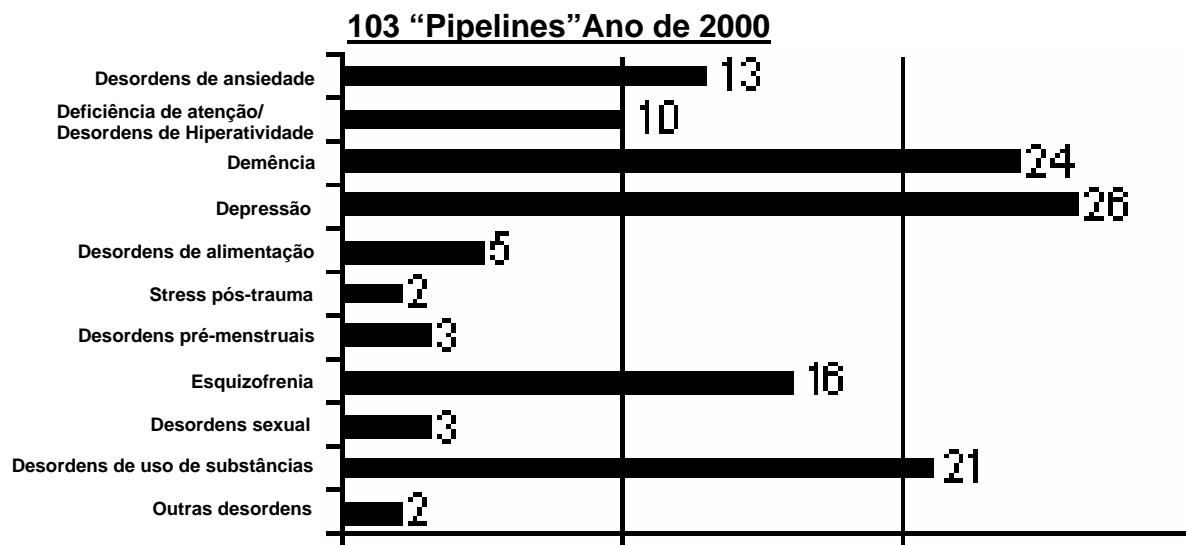


Gráfico 2 – Lista do biênio 1999-2000 de novos candidatos a protótipos de agentes neuroativos em fase clínica ou em curso de aprovação pelo FDA (adaptado de PHRMA, 2000).

Estes protótipos se encontram em fase clínica ou em curso de aprovação pelo “Food and Drug Administration-(FDA)”. Estima-se que no biênio de 1999-2000 foram investidos ca. \$ 6 bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento dos 103 candidatos a protótipos de fármacos neuroativos¹.

Segundo o Instituto Nacional de Saúde Mental dos EUA, ca. 50 milhões de americanos apresentam alguma forma de doença que acomete o SNC (PHRMA, 2002). Muito embora nos últimos cinquenta anos a neurofarmacoterapia tenha sofrido importantes avanços, algumas fisiopatologias centrais ainda precisam ser melhores caracterizadas. Felizmente, muitos pacientes acometidos por doença de Alzheimer (DA), depressão ou mesmo esquizofrenia, puderam se beneficiar destes avanços da farmacoterapia e hoje podem ser reintegrados ao convívio social, em muitos casos tornando-se novamente pessoas produtivas, mesmo que afastados de centros ambulatoriais¹.

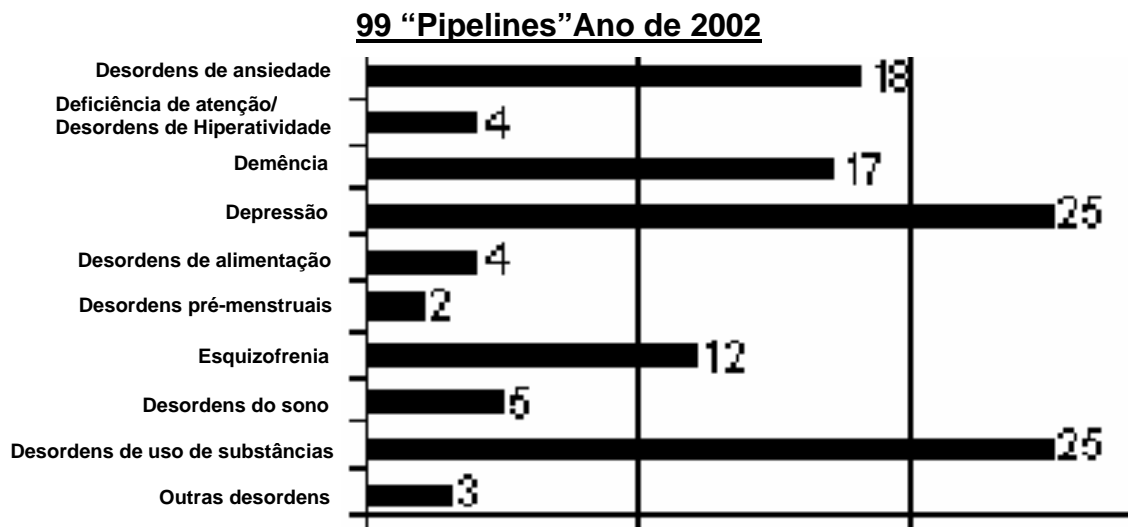


Gráfico 3 – Lista do biênio 2001-2002 de novos candidatos a protótipos de agentes neuroativos em fase clínica ou em curso de aprovação pelo FDA (adaptado de PHRMA, 2002).

Neste contexto, podemos concluir que a pesquisa e desenvolvimento de fármacos neuroativos se torna um importante instrumento de promoção de saúde.

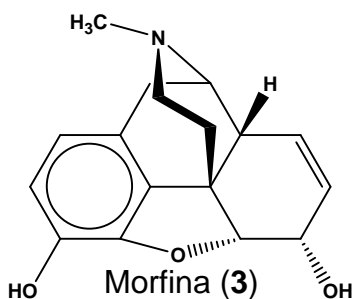
1.3 - IMPACTO SOCIO-ECONÔMICO DAS DESORDENS DE ANSIEDADE

Segundo o Instituto Nacional de Saúde Mental dos EUA, desordens de ansiedade que incluem desordem de pânico, desordem compulsiva obsessiva, desordem de “stress” pós-traumático, desordem de ansiedade generalizada e fobias, afetam 19 milhões de adultos entre 18 a 54 anos, o que corresponde a 13% das pessoas nesta faixa etária¹. Cerca de quatro milhões de americanos na idade entre 18 e 54 anos, *ie.* 2,8% das pessoas nesta faixa etária, apresentam desordens de ansiedade generalizada. Aproximadamente 2,4 milhões de americanos adultos apresentam desordens de pânico, as quais são cerca de duas vezes mais comum em mulheres¹. A desordem de pânico é freqüentemente complicada pelas desordens de depressão maior, álcool e substâncias de abuso. A desordem de pânico também

ocorre paralelamente a outras desordens de ansiedade específicas, incluindo fobia social (30%) desordens de ansiedade generalizadas (25%), fobias específicas (20%) e desordens compulsivas obsessivas (10%). Cerca de 5,3 milhões de americanos na idade entre 18 e 54 anos (3,7%) apresentam fobia social, a qual afeta ambos os sexos em iguais proporções¹.

1.4 - LINHA DO TEMPO E EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO DAS DESORDENS DE ANSIEDADE

A origem etimológica do termo hipnose nos remete à Grécia Antiga, onde, segundo a mitologia, Hipnos figurava como deus do sono. Hipnos e o irmão Thanatos, personificação masculina da morte, são frutos do enlace amoroso entre a Noite e Erebe. O deus alado Morfeu, patrono dos sonhos, é um dos filhos de Hipnos e tem a função de tomar a forma humana durante o sonho dos homens (GRIMAL, 1976). O nome do fármaco (-) morfina (**3**) (GILMARTIN, 1984), principal alcalóide opiáceo presente em ca. 9-14% na espécie *Papaver somniferum*, deriva do nome do deus Morfeu (WILLIAMS e LEMKE, 2002). A morfina apresenta potentes propriedades analgésicas com dose efetiva $DE_{50(\mu 1)} = 6 \text{ nM}$ (SNYDER e PASTERNAK, 2003).



A genealogia da família do sono, também encontra paralelo nas vias de neurotransmissão GABAérgica (Hipnos) e opióide (Morfeu). Recentemente, tem sido demonstrado que a via gabaérgica participa da modulação da analgesia e hiperalgesia no córtex cerebral (JASMIN *et al.*, 2003). Derivados opióides também interferem na neurotransmissão GABAérgica, provavelmente através da redução da liberação pré-sináptica do neurotransmissor, resultando na inibição da mesma (VAUGHAN *et al.*, 1997).

Entre as substâncias mais antigas empregadas no tratamento das desordens de ansiedade se encontram as bebidas alcoólicas (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Na China, datam de 7000 A.C. os primeiros registros da preparação e emprego de bebidas alcoólicas, obtidas a partir da fermentação de arroz, mel e frutas (MCGOVERN *et al.*, 2004). No Egito Antigo, também foram encontrados relatos de bebidas alcoólicas obtidas a partir da fermentação de cereais, que seriam um parente próximo à cerveja que conhecemos hoje (BAINES e MÁLEK, 1996). Em meados do século XIX o emprego de sais de brometo para induzir sedação se tornou bastante popular. Na janela compreendida entre meados do século XIX e início do século XX, substâncias orgânicas como hidrato de cloral e paraformaldeído também foram introduzidos na terapêutica (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). No início do século XX, os derivados barbitúricos **4** representaram o primeiro marco relevante no tratamento das desordens de ansiedade. Face aos resultados terapêuticos promissores, à época, foram sintetizados ca. 2.500 análogos de pentobarbital (**4**), dos quais menos de uma dúzia chegou ao mercado (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Os fármacos como pentobarbital (**4**) predominaram no mercado

farmacêutico até a década de 60, época do advento da classe dos fármacos benzodiazepínicos, e.g. clordiazepóxido (5).

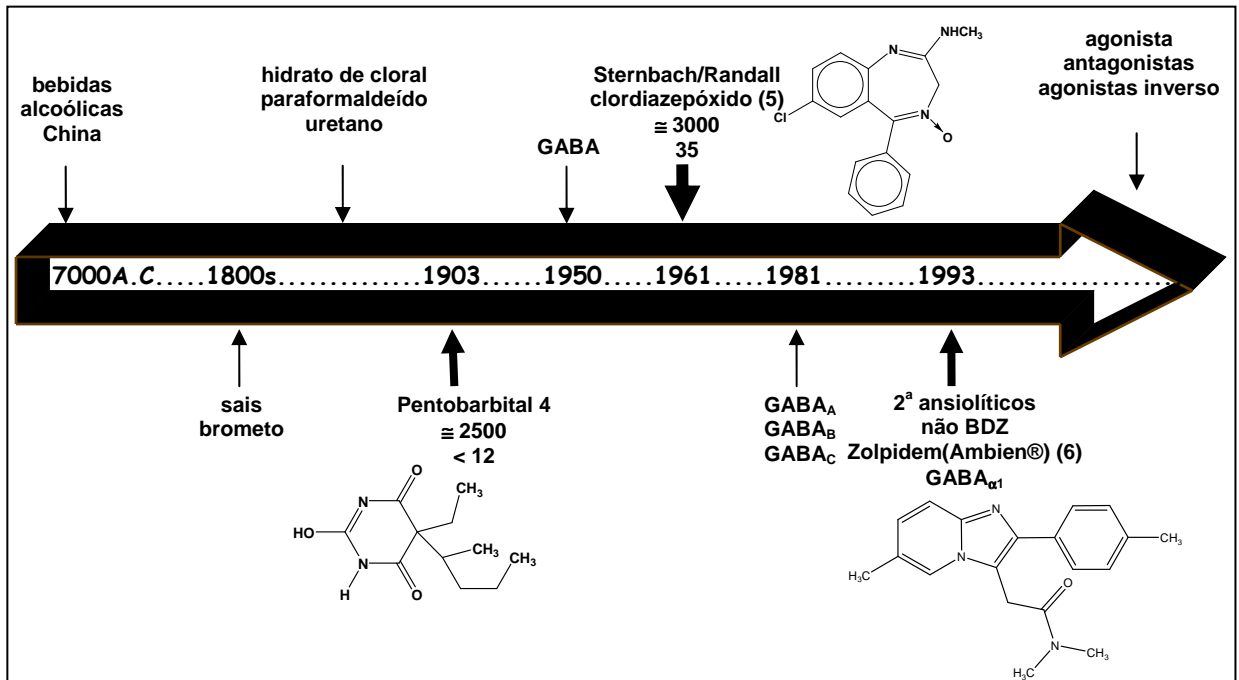


Figura 2 – Linha do tempo e evolução do tratamento das desordens de ansiedade.

A partir do seu lançamento no mercado farmacêutico mundial, os fármacos benzodiazepínicos (5) passaram a dominar a terapêutica das desordens de ansiedade (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Uma das principais diferenças entre o fármaco diazepam (7) e o pentobarbital (4) diz respeito às suas janelas terapêuticas. Enquanto o diazepam (7) não excede o efeito de narcose (Figura 3), ou seja, não apresenta a tendência de induzir depressão da atividade cerebral de forma generalizada, o pentobarbital (4) excede à narcose e pode induzir depressão do centro respiratório no SNC, levando a óbito, (HARDMAN e LIMBIRD, 2001; LÜLLMANN e MOHR, 2004). Pelo exposto, podemos concluir que o fármaco diazepam (7) apresenta maior segurança terapêutica em comparação ao pentobarbital (4).

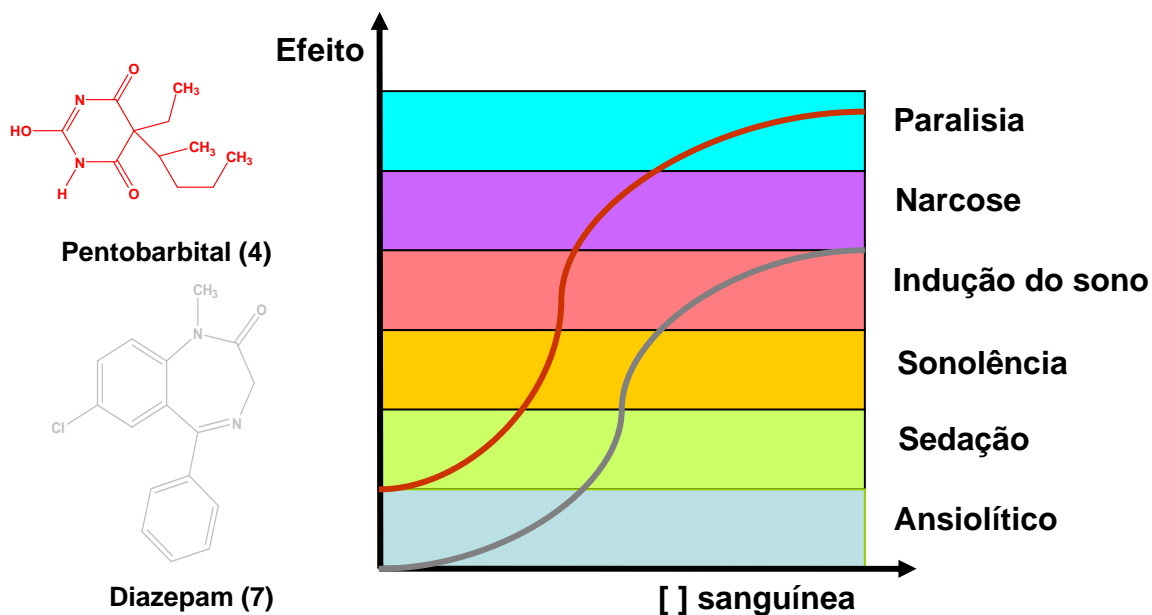
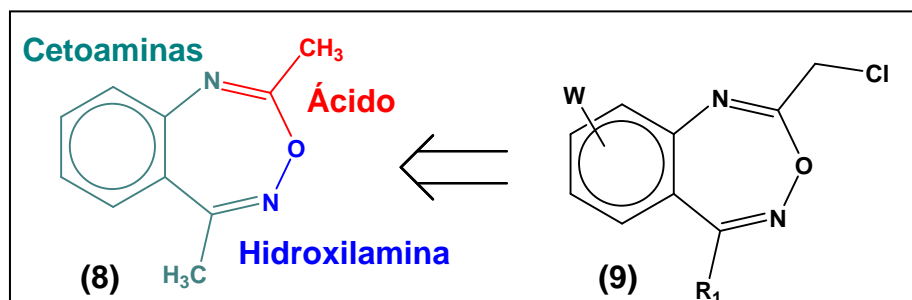


Figura 3 – Propriedades sedativo-hipnóticas do diazepam (7) e pentobarbital (4) (adaptado de Lüllmann e Mohr, 2004).

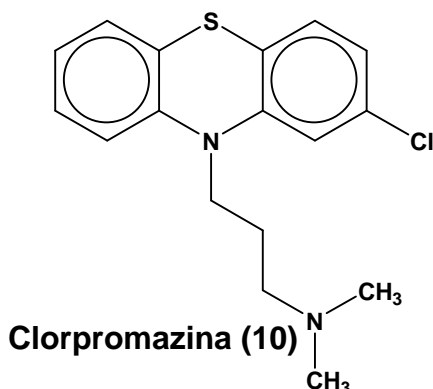
1.5 - HISTÓRICO DA DESCOBERTA DOS BENZOAZEPÍNICOS

A descoberta dos fármacos benzodiazepínicos **5** se deve aos trabalhos fortuitos de Leo H. Sternbach no início da década de 50, nos laboratórios de Hoffmann-La Roche, em New Jersey (STERNBACH, 1979). Aproveitando a experiência adquirida em seu trabalho de pós-doutoramento com o núcleo benzoheptoxidiazinas (**8**) (Esquema 1), Sternbach implementou um programa de pesquisa dentro da companhia Hoffmann-La Roche. Como este núcleo heterocíclico era de fácil acesso sintético (Figura 4) e não havia sido muito explorado à época, foi planejada a síntese do intermediário-chave heptoxidiazinas **9**, para em etapas subseqüentes ser funcionalizado com aminas na cadeia lateral. Daí a origem da máxima de Sternbach, onde afirmava que “...substâncias com caráter básico geralmente apresentam atividade...” (STERNBACH, 1979; WOLFF, 1997; WILLIAMS e LEMKE, 2002;).



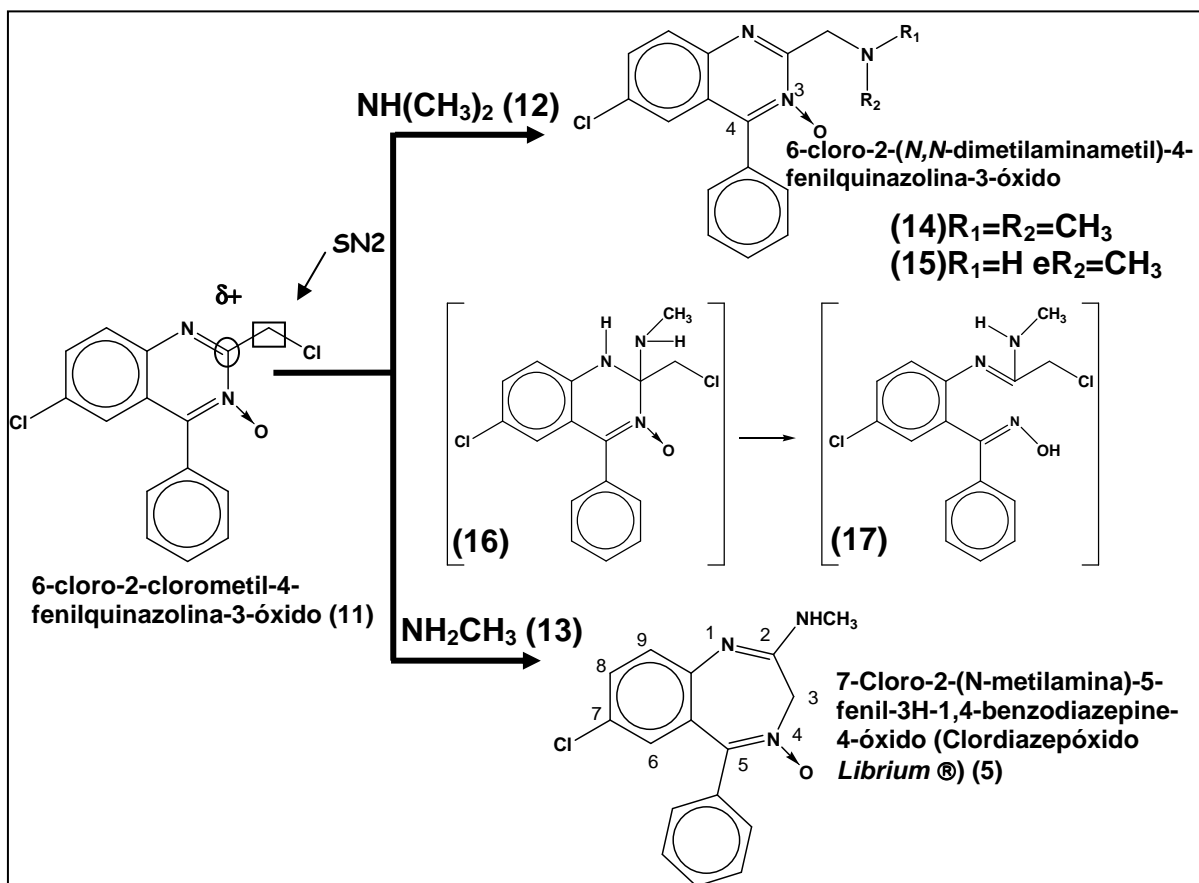
Esquema 1

Em parte, isto se deve à influência do fármaco clorpromazina (**10**) (CHARPENTIER *et al.*, 1952), primeiro antipsicótico clássico introduzido na terapêutica, efetivo no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia (WILLIAMS e LEMKE, 2002).



Durante o processo de síntese e elucidação estrutural do intermediário **9**, Sternbach observou a formação do derivado quinazolinico **11** (Esquema 2) no lugar do produto desejado **9**. Face ao resultado inesperado, optou por dar continuidade à proposta inicial, substituindo do derivado **9** pelo derivado quinazolinico **11**. O trabalho iniciou pela reação do intermediário 6-cloro-2-clorometil-4-fenilquinazolina-3-óxido (**11**) com *N,N*-dimetilamina (**12**), levando aos derivados 6-cloro-2-(*N,N*-dimetilaminometil)-4-fenilquinazolina-3-óxido (**14**), produtos da reação de substituição nucleofílica de segunda ordem. Este projeto consumiu cinco anos de trabalho e esforços, contudo não permitiu a identificação de qualquer protótipo promissor. A partir da segunda metade de 1955, Sternbach se envolveu em outros

projetos, passando a se ocupar do isolamento e purificação de antibióticos. Contudo, em abril de 1957, durante o período de limpeza e arrumação do laboratório, Reeder, um colaborador de Sternbach, tomou conhecimento de sólidos cristalinos de aspecto interessante que haviam sido esquecidos sobre a bancada, desde 1955. Mais tarde foram identificados como a forma de base livre e sal cloridrato do derivado **5**. Quando o intermediário 6-cloro-2-clorofenil-4-fenilquinazolina-3-óxido (**11**) reagia com metilamina (**13**), o produto obtido não era o 6-cloro-2-(*N*-metilaminometil)-4-fenilquinazolina-3-óxido (**15**) desejado, mas o derivado 7-cloro-2-(*N*-metilamina)-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepine-4-óxido (**5**), formado em ca. 80% de rendimento a partir da adição do grupo amina ao átomo de carbono imínico **16**, seguido de eliminação **17** e *N*-alquilação intramolecular **5** (STERNBACH, KAISER e REEDER, 1960). Mesmo sem grandes expectativas, o derivado **5** foi submetido aos ensaios farmacológicos e em maio de 1957 o farmacólogo Randall identificava os primeiros resultados relativos às propriedades tranqüilizantes e sedativas (STERNBACH, 1979; GUPTA, 1995; WOLFF, 1997; WILLIAMS e LEMKE, 2002). Em 1960, dois anos e meio após os resultados iniciais, o fármaco **5** denominado clordiazepóxido (**5**) recebeu aprovação do FDA em tempo recorde, entrando no mercado farmacêutico sob o registro de Librium®, medicamento marco de uma das mais promissoras classes terapêutica da história da farmacoterapia (HARDMAN e LIMBIRD, 2003).



Esquema 2

Em 1987 Leo H. Sternbach foi contemplado com o prêmio “DISCOVERERS AWARD 1987” concedido pela Associação de Produção Farmacêutica dos Estados Unidos, em reconhecimento às suas contribuições na descoberta dos fármacos benzodiazepínicos³.

Após o Librium® (5) ter entrado no mercado farmacêutico, foram sintetizados ca. 3.000 análogos de benzodiazepínicos, dos quais ca. 35 chegaram ao mercado farmacêutico, a exemplo dos derivados **18-21** (HARDMAN e LIMBIRD, 2001).

De modo geral, os fármacos benzodiazepínicos **18-21** variam quanto ao efeito farmacológico produzido, uma vez que, além de induzirem efeito ansiolítico e hipnótico-sedativo, os mesmos também podem apresentar propriedades

miorelaxantes, anticonvulsivantes e anestésicas muito exploradas na manutenção na sedação durante procedimentos cirúrgicos (LÜLLMANN e MOHR, 2004). Ademais, os mesmos também variam quanto ao tempo de duração do efeito que pode ser de ação ultra curta, ação curta, ação intermediária e ação longa (HARDMAN e LIMBIRD, 2001).

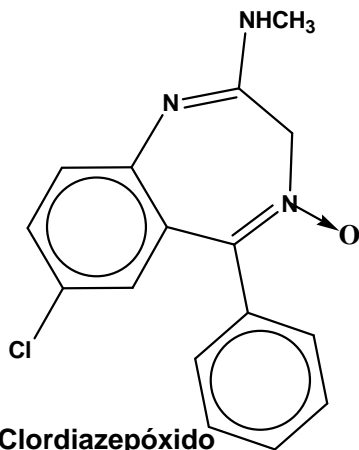
A busca de novos candidatos a protótipos de fármacos que modulassem as desordens de ansiedade culminou na identificação de novos padrões estruturais com propriedades benzodiazepínicas (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Neste contexto, foram identificados fármacos não-benzodiazepínicos apresentando ação hipnótica-sedativas, como zolpidem (Ambien®) (**6**) (SANGER e DEPOORTERE, 1998), pertencente à classe das imidazo[1,2-a]piridíνας (KAPLAN e GEORGE, 1983).

O zolpidem (Ambien®) (**6**), foi aprovado pelo FDA em 1993, cinco anos após já estar sendo empregado na Europa (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Pode-se considerar que sua introdução no mercado farmacêutico constitui uma inovação terapêutica, pois o mesmo apresenta alta seletividade pela sub-unidade α_1 do receptor GABA_A com $K_i = 27\text{nM}$ e $K_i = 109\text{ nM}$, no cerebelo e hipocampo, respectivamente (SANGER e DEPOORTERE, 1998).

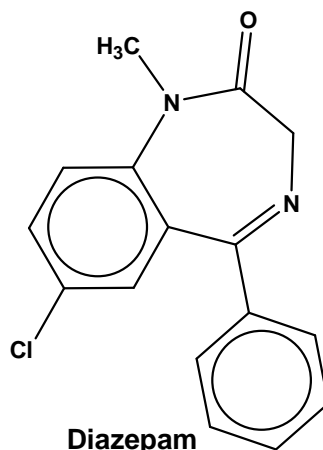
Por outro lado, o fármaco alpidem (Ananxyl®) (**22**), um análogo do zolpidem (**6**) identificado no mesmo programa de pesquisa (KAPLAN e GEORGE, 1983), foi retirado do mercado farmacêutico em 1995, por apresentar hepato-toxicidade (BERSON *et al.*, 2001).

Ao contrário do que se pensava até pouco tempo, alguns fármacos benzodiazepínicos podem ser reconhecidos por receptores benzodiazepínicos

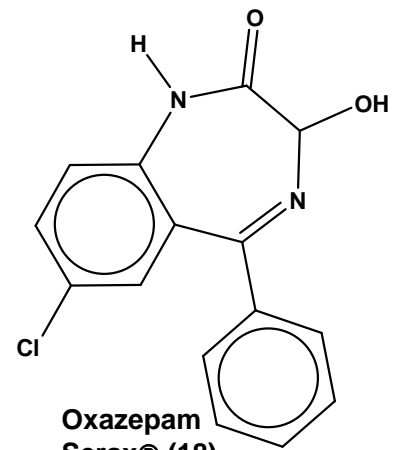
localizados em tecido periféricos (RBP) (VERMA e SNYDER, 1989; GAVISH *et al.*, 1999). Estes RBP já foram localizados na medula adrenal, rins, hepatócitos, testículos, ovários, útero, pulmões, além do próprio cérebro e podem estar associados à modulação de vários eventos fisiológicos (GAVISH *et al.*, 1999).



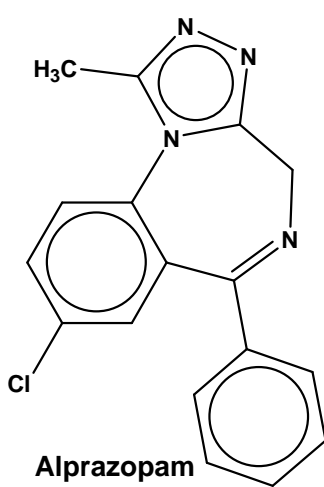
Clordiazepóxido
Librium® (5)



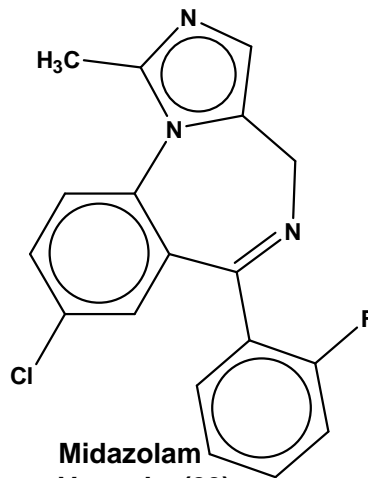
Diazepam
Valium® (7)



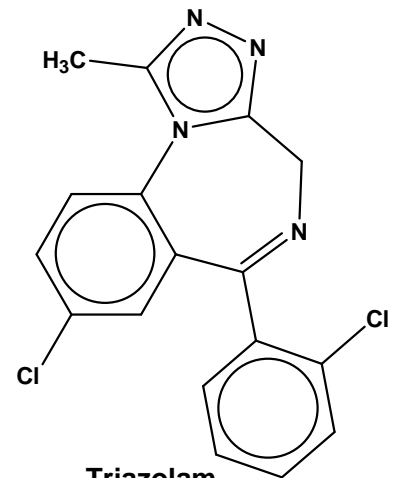
Oxazepam
Serax® (18)



Alprazolam
Xanax® (19)

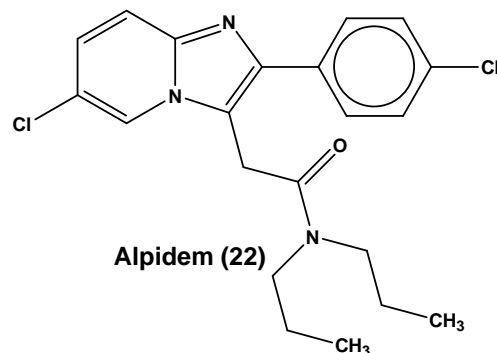
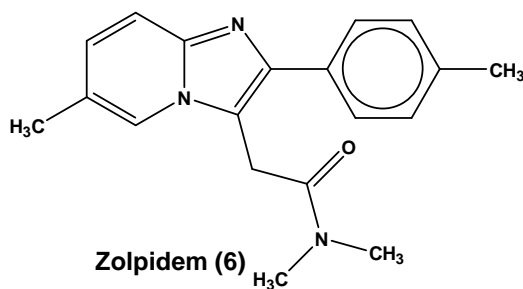


Midazolam
Versed® (20)



Triazolam
Halcion® (21)

Particularmente no caso do alpidem (22), foi observado que o mesmo se liga a RBP localizado sobre as mitocôndrias de hepatócitos e interfere nas suas funções por um mecanismo ainda pouco compreendido (BERSON *et al.*, 2001).



1.6 - TRANSMISSÃO GABAÉRGICA - ÁCIDO γ -AMINOBTÍRICO-GABA (23), PRINCIPAL VIA INIBITÓRIA DO SNC DE MAMÍFEROS

O GABA (23) foi identificado pela primeira vez no SNC de mamíferos em meados do século XX (AWAPARA *et al.*, 1950; ROBERTS e FRANKEL, 1950). Nas décadas subseqüentes, estudos de extratos de cérebros de mamíferos levaram ao isolamento do fator I, sendo posteriormente caracterizado como o próprio GABA (23) (BAZEMORE, ELIOTT e FLOREY, 1957). Estudos posteriores em crustáceos permitiram aumentar o conjunto de evidências, que vieram a confirmar o perfil inibitório do GABA (23) no SNC (KRAVITZ, KUFFLER e POTTER, 1963; KRAVITZ e POTTER, 1965; OTSUKA *et al.*, 1966). O GABA (23) foi o primeiro exemplo de neurotransmissor caracterizado por apresentar propriedades inibitórias, uma vez que à época só eram conhecidas as ações dos neurotransmissores excitatórios (OWENS e KRIEGSTEIN, 2002).

1.6.1 - VIA BIOSINTÉTICA E METABÓLICA DO GABA (23)

No cérebro de mamíferos, o GABA (23) é sintetizado a partir do glutamato (24) em uma reação catalisada pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) (ERLANDER *et al.*, 1991). O GABA (23) é então estocado em vesículas com auxílio do transportador vesicular de neurotransmissor (VGAT) e sua liberação na fenda

sináptica se dá através de exocitose cálcio dependente (FON e EDWARDS, 2001). Os efeitos do GABA (23) podem ser mediados pela ativação de receptores ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) ou metabotrópicos (GABA_B), os quais podem se localizar pré- e pós-sinápticamente (CHERUBINI e CONTI, 2001). A sinalização do GABA (23) é terminada pela recaptação do neurotransmissor nos terminais nervosos ou células da glia da vizinhança, através de transportadores de membrana plasmática de GABA (GAT). Depois o GABA (23) é metabolizado pela reação de transaminação catalisada pela enzima GABA transaminase (GABA-T), como ilustrado na Figura 4 (CHERUBINI e CONTI, 2001).

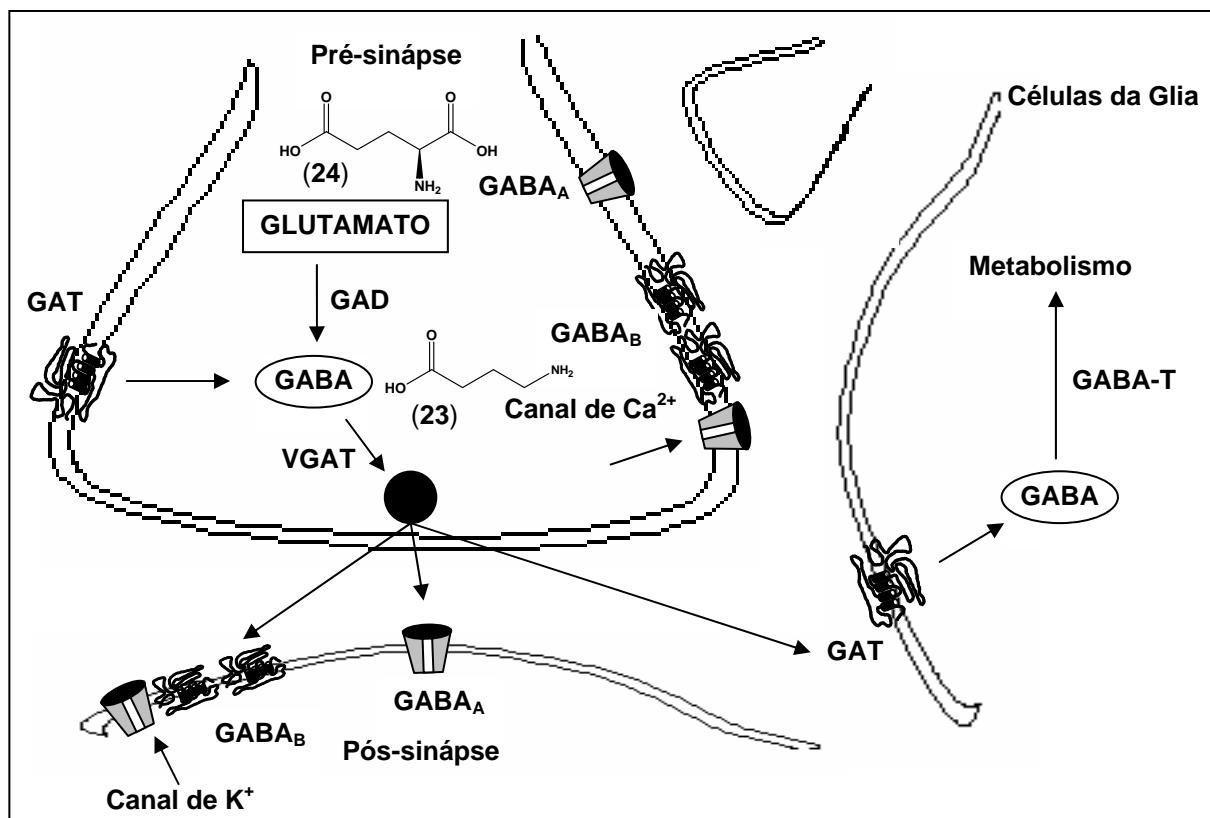
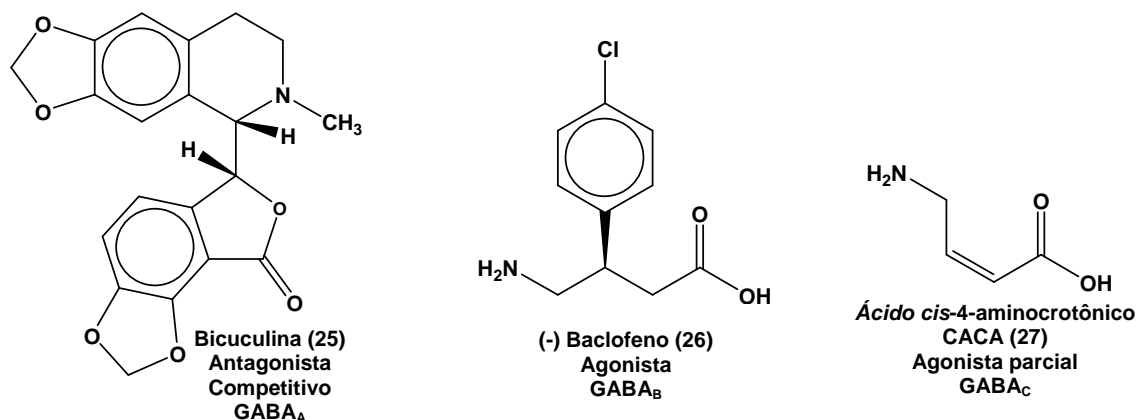


Figura 4 – Via biosintética e metabólica do GABA (23) e sua ação em receptores GABAérgicos (adaptado de Owens e Kriegstein, 2002).

1.6.2 - O COMPLEXO RECEPTOR GABAÉRGICO

O estudo dos receptores GABAérgicos teve início na década de 70, quando se observou que o GABA (**23**) era capaz de ativar canais de íons cloreto sensíveis ao alcalóide bicuculina (**25**) (CURTIS *et al.*, 1970; BORMANN e FEIGENSPAN, 1995). A terminologia de GABA_A e GABA_B só veio mais tarde, quando foram identificados receptores que eram insensíveis à bicuculina (**25**) e sensíveis ao baclofeno (**24**) (HILL e BOWERY, 1981). Posteriormente, um terceiro tipo de receptor insensível à bicuculina (**25**) e baclofeno (**26**), mas sensível ao ácido *cis*-aminocrotônico (CACA) (**27**) foi identificado como GABA_C (DREW, JOHNSTON e WEATHERBY, 1984).



1.6.2.1 - RECEPTOR GABA_A

Os receptores GABA_A são membros da superfamília de canais iônicos que incluem os receptores de acetilcolina nicotínicos, receptores de glicina, receptores de NMDA, receptores de AMPA e receptores de serotonina 5-HT₃ (OWENS e KRIEGSTEIN, 2002). Nesta classe de receptores, a formação do complexo entre ligante e biomacromolécula induz uma mudança conformacional no canal da proteína permitindo um fluxo de entrada ou saída de íons, dependendo do gradiente

eletroquímico do meio (HARDMAN e LIMBIRD, 2001; OWENS e KRIEGSTEIN, 2002).

1.6.2.1.1 - RECEPTOR GABA_A: ESTRUTURA E FUNÇÕES

Os receptores GABA_A, particularmente, constituem canais de íons cloreto e mediam a inibição sináptica que pode ocorrer pré- e pós-sinápticamente. Como o potencial de membrana em equilíbrio para íons cloreto é, em geral, ligeiramente negativo em relação ao potencial em repouso da célula, o aumento da permeabilidade de íons cloreto hiperpolariza a célula, reduzindo assim a sua excitabilidade (OKUNO, CALDAS e CHOW, 1986; HARDMAN e LIMBIRD, 2001).

Entretanto, recentemente o receptor GABA_A tem recebido atenção devido a sua modulação excitatória no período pré-natal, onde se encontra envolvido no desenvolvimento e formação dos circuitos neurais que vão desde migração dos neurônios, arborização e estabelecimento das conexões sinápticas (BEN-ARI *et al.*, 1997; OWENS, KRIGSTEIN, 2002; BEN-ARI, 2002).

Como ilustrado na Figura 5, no período pré-natal o receptor GABA_A modula a saída de íons cloreto do interior do neurônio para o meio extracelular, fazendo com que haja despolarização da célula. Esta despolarização ativa canais iônicos de cálcio e sódio voltagem dependentes, acarretando na amplificação da despolarização, que caracteriza o perfil excitatório necessário ao desenvolvimento neural. Próximo ao estágio final da maturação neural, a despolarização mediada pelo receptor GABA_A desbloqueia o receptor glutamatérgico *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) que se encontra bloqueado pelo íon magnésio. Ao final da primeira semana pós-natal, o efeito excitatório é mediado principalmente pelos receptores

glutamatérgicos sensíveis α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) e parcialmente por aqueles sensíveis ao NMDA, enquanto os receptores GABAérgicos passam a modular um perfil inibitório (BEN-ARI *et al.*, 1997).

Como ilustrado na Figura 6, os receptores de GABA_A apresentam uma estrutura protéica heteropentamérica, que pode ser constituída pela combinação de diversas subunidades derivadas de genes ou famílias de genes relacionados (SIEGHART, 1995; BARNARD *et al.*, 1998; RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001).

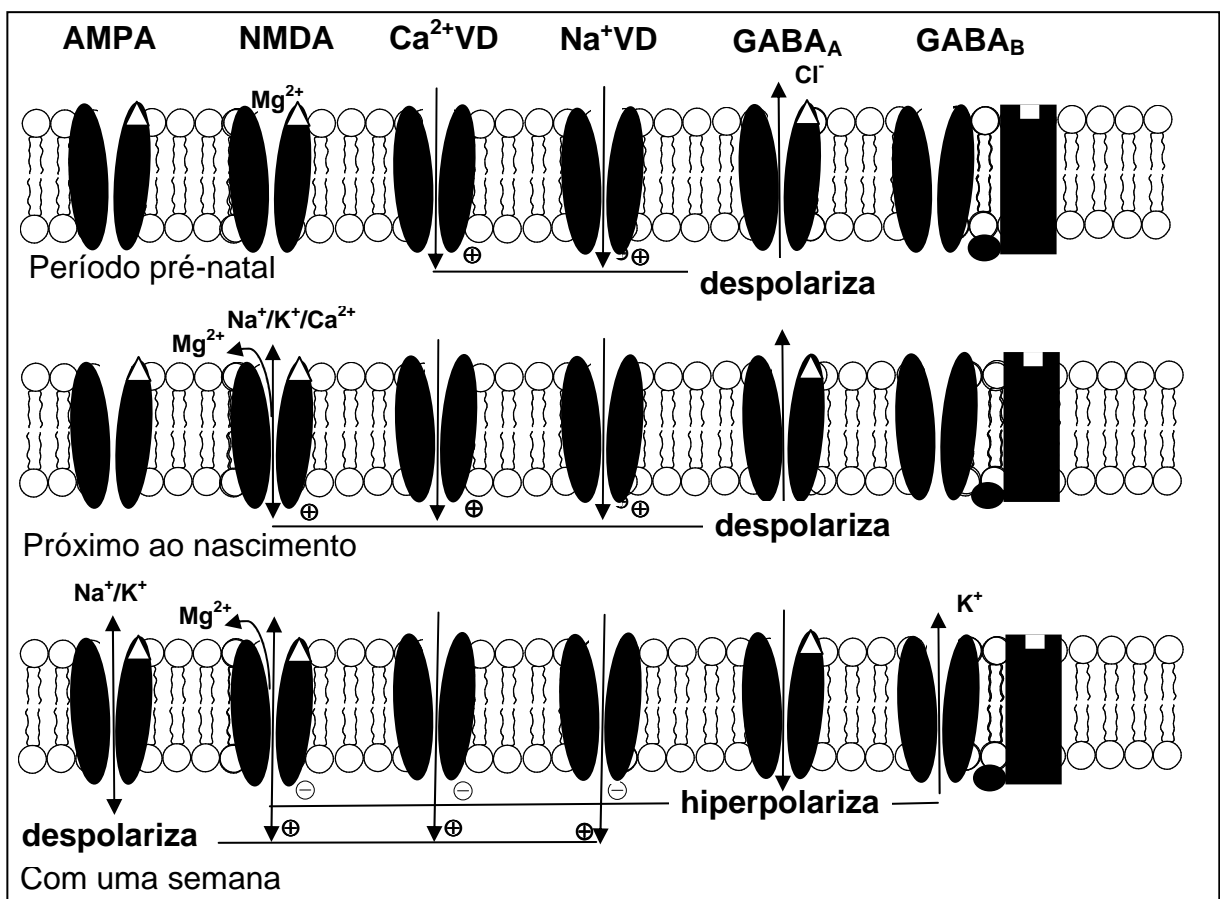


Figura 5 – Seqüência de eventos envolvidos no desenvolvimento e formação dos circuitos neurais (adaptados de Ben-Ari, “Ménage à trois”-1997).

Já foram identificados 15 subunidades α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , e θ que compõem os receptores GABA_A em mamíferos (SIEGHART, 1995; BARNARD *et al.*, 1998;

RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001). Como ilustrado na Figura 6, cada subunidade do receptor GABA_A é constituída individualmente de quatro regiões transmembrânicas e ambas as regiões *N*-terminal e *C*-terminal se localizadas na região extracelular. Como podemos observar, as segundas regiões transmembrânicas das subunidades que compõem o receptor GABA_A formam, somadas, o diafragma e as paredes do poro do canal iônico (SMITH e OLSEN, 1995; SIGEL e BUHR, 1997).

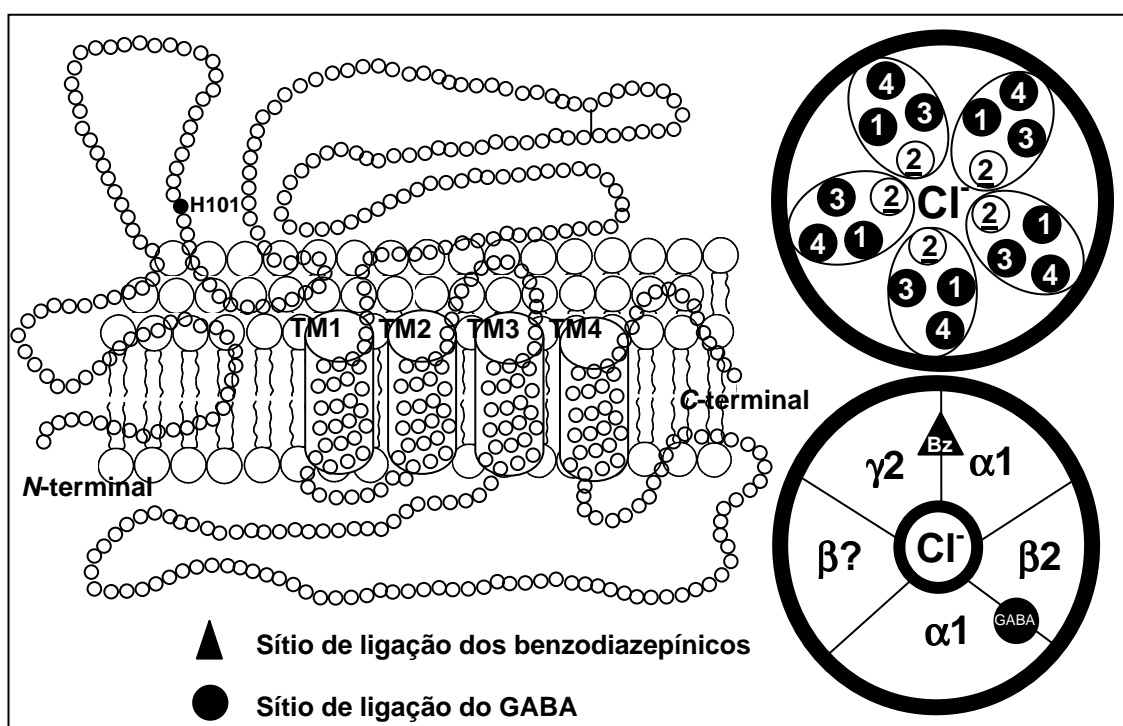


Figura 6 – Modelo subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_A e de receptor GABA_A (adaptado de Smith e Olsen, 1995; Sigel e Buhr, 1997).

Das combinações destas subunidades é possível compor mais de quinhentos subtipos de receptores GABA_A (SIEGHART, 2000). Dentre a gama de combinações possíveis das subunidades, algumas delas são preferidas, como ilustrado na Tabela 2 (MCKERNAN, WHITING, 1996). Como resumido na Figura 6, já foi demonstrado que sob as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 2$ se situa o domínio de ligação do

GABA (**23**) para ativação do canal iônico, enquanto que sob as subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ se situa o sítio de ligação dos benzodiazepínicos **5** e **7** (WISDEN e STEPHENS, 1999; RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001; MÖHLER, CRESTANI e RUDOLPH, 2001).

Através de dissecação genética, os receptores GABA_A foram submetidos à análise de “gene-knockout” e “knock-in point”, para se hierarquizar as contribuições das várias subunidades frente aos efeitos ansiolíticos, sedativos, relaxantes musculares e anticonvulsivantes (RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001).

Tabela 2 – Abundância relativa dos subtipos de receptores GABA_A encontrados no cérebro de ratos (adaptado McKernan e Whiting, 1996).

Subtipos	(%)	Localização
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	43	Interneurônios no hipocampo e córtex e células de Purkinje.
$\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$	18	Motoneurônios na coluna espinhal e células piramidais do hipocampo.
$\alpha 3\beta n\gamma 2/\gamma 3$	17	Neurônios colinérgicos e monoaminérgicos.
$\alpha 2\beta n\gamma 1$	8	Glia de Bergamann, núcleo do sistema límbico e pâncreas.
$\alpha 5\beta 3\gamma 2/\gamma 3$	4	Células piramidais do hipocampo.
$\alpha 4\beta \delta$	3	Tálamo e girus dentato do hipocampo.
$\alpha 6\beta \gamma 2$	2	Células do grânulo cerebelar.
$\alpha 6\beta \delta$	2	Células do grânulo cerebelar.

A estratégia “gene-knockout” poderia fornecer informações importantes das funções mediadas pelo receptor GABA_A. Entretanto, os resultados obtidos poderiam ser mascarados devido à plasticidade neural, através de alterações estruturais e funcionais, capazes de compensar a mutação sofrida (RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001; GAIARSA, CAILLARD e BEN-ARI, 2002). Ademais, a estratégia “gene-knockout” pode gerar animais com fenótipo letal, com baixa taxa de sobrevivência (RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001).

Por outro lado, através da estratégia “knock-in point” (Figura 7) é possível realizar mutações pontuais, onde apenas o resíduo de aminoácido desejado é substituído, dando origem a novos subtipos de receptores não naturais (WISDEN e STEPHENS, 1999; RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001; MÖHLER, CRESTANI e RUDOLPH, 2001).

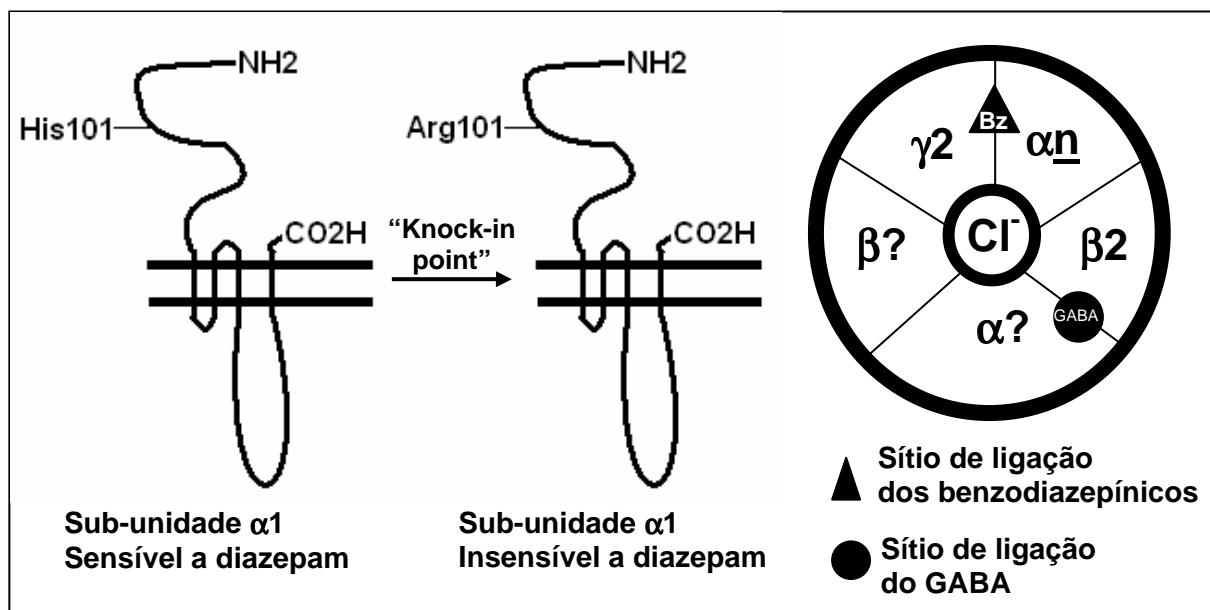
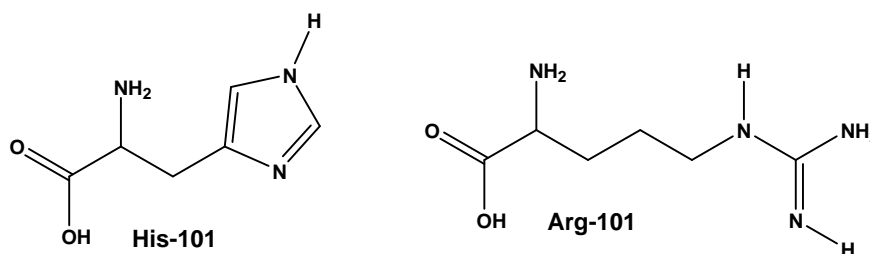


Figura 7 – Modelo de estratégia “knock-in point”, onde o resíduo de His-101 foi substituído pelo resíduo de Arg-101 (adaptado de Wisden e Stephens, 1999).

Os sítios de ligação dos fármacos benzodiazepínicos 7 sob as subunidades α dos receptores GABA_A apresentam como característica comum, a conservação do resíduo de His-101 (RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001).



Quando foi realizada a substituição do resíduo de His-101 por um resíduo de Arg-101 sob a subunidade $\alpha 1$, se observou que o diazepam (7), na dose de 30

mg/Kg, falhou quanto à habilidade de induzir sedação (RUDOLPH *et al.*, 1999; MCKERNAN *et al.*, 2000).

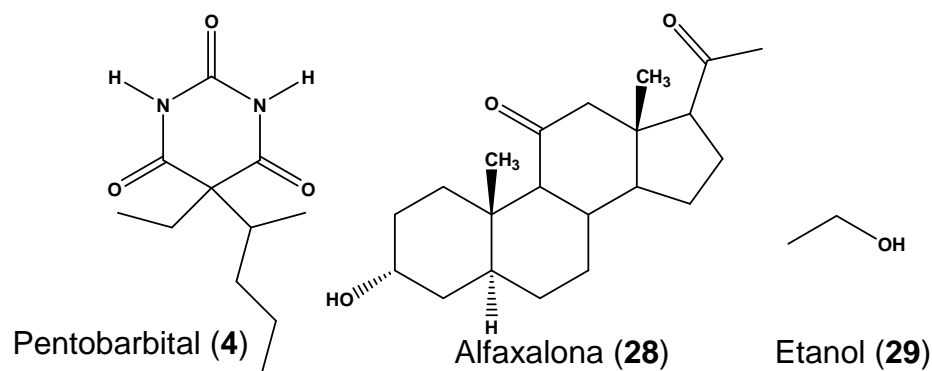
O mesmo tipo de estudo foi realizado sobre receptores de GABA_A contendo a subunidade $\alpha 2$ e se observou que os animais tratados apresentavam ausência de efeito ansiolítico quando tratados com diazepam (**7**) (LÖW *et al.*, 2000). Vale destacar que as mutações “knock-in point” realizadas sob as subunidades α não alteraram a funcionalidade do domínio do ligante natural GABA (**23**) sobre os receptores GABAérgicos (RUDOLPH, CRESTANI e MÖHLER, 2001). Na Figura 7 e na Tabela 3, se encontram resumidas as principais mutações e os efeitos farmacológicos caracterizados para cada subunidade (WISDEN e STEPHENS, 1999; MÖHLER, CRESTANI e RUDOLPH, 2001).

Tabela 3 – Modelo de estratégia “knock-in” sob a subunidade α dos receptores GABA_A, onde o resíduo de Histidina-101 foi substituído pelo resíduo de Arginina-101 (adaptado de Wisden e Stephens, 1999 e Möhler, Crestani e Rudolph, 2001).

Efeito farmacológico	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
Sedação	+	-	-
Ansiólise	-	+	-
Miorelaxante	-	ND*	ND*
Anticonvulsivante	+	-	-

*ND=Não determinado.

Além dos sítios de ligação para os benzodiazepínicos, e.g. **7** e o próprio GABA (**21**), os receptores GABA_A também são sensíveis a outros ligantes como pentobarbital (**4**), derivados esteroidais **28** (COVEY *et al.*, 2001) e álcool **29** (SIEGHART, 1995; BARNARD *et al.*, 1998).



É interessante destacar que os derivados esteroidais **28** apresentam uma particularidade frente aos receptores GABAérgicos, já que classicamente os mesmos são conhecidos por atuarem sob receptores nucleicos (MURRAY *et al.*, 2002), enquanto nos receptores GABAérgicos se ligam a receptores de membrana celular (MELCANGI e PANZICA, 2001).

1.6.2.1.2 - RECEPTORES GABA_A E ATIVIDADE INTRÍNSECA DOS LIGANTES DE RECEPTORES DE BENZODIAZEPÍNICOS

Como ilustrado na Figura 8, os ligantes de receptores benzodiazepínicos podem ser classificados com relação às suas atividades intrínsecas em agonista **20**, agonista parcial **30**, antagonista **31**, agonista parcial inverso **32** e agonista inverso **33**, (CHEBIB e JOHSNTON, 2000). Estes ligantes podem ainda ser sub-classificados em dois sub-grupos, ou seja, aqueles que possuem e aqueles que não possuem atividade intrínseca. Os derivados **20**, **30**, **32** e **33** apresentam atividade intrínseca, pois ao se ligarem ao receptor induzem alterações nas funções celulares e conseqüente transdução de sinal (CHEBIB e JOHSNTON, 2000). Por outro lado, o antagonista **31** se comporta apenas como um ligante do receptor, sem entretanto ser capaz de induzir qualquer resposta celular (GRUPTA, 1995; WOLFF, 1997; WILLIAMS e LEMKE, 2002; CHEBIB e JOHSNTON, 2000). Existem casos, no

entanto, em que a ausência de indução de resposta pelo fármaco, a e.g. flumazenil (31), é benéfica, uma vez que fármacos pertencentes a esta classe podem ser empregados como detoxificantes, em quadros de intoxicação por “overdose” de benzodiazepínicos 5 e 7 ou mesmo pelo uso de substâncias de abuso que manifestem seus efeitos através da ligação receptores benzodiazepínicos localizados sobre o receptor GABA_A, uma vez que 31 agem competindo pelo sítio de ligação de 5 e 7 (HARDMAN e LIMBIRD, 2001).

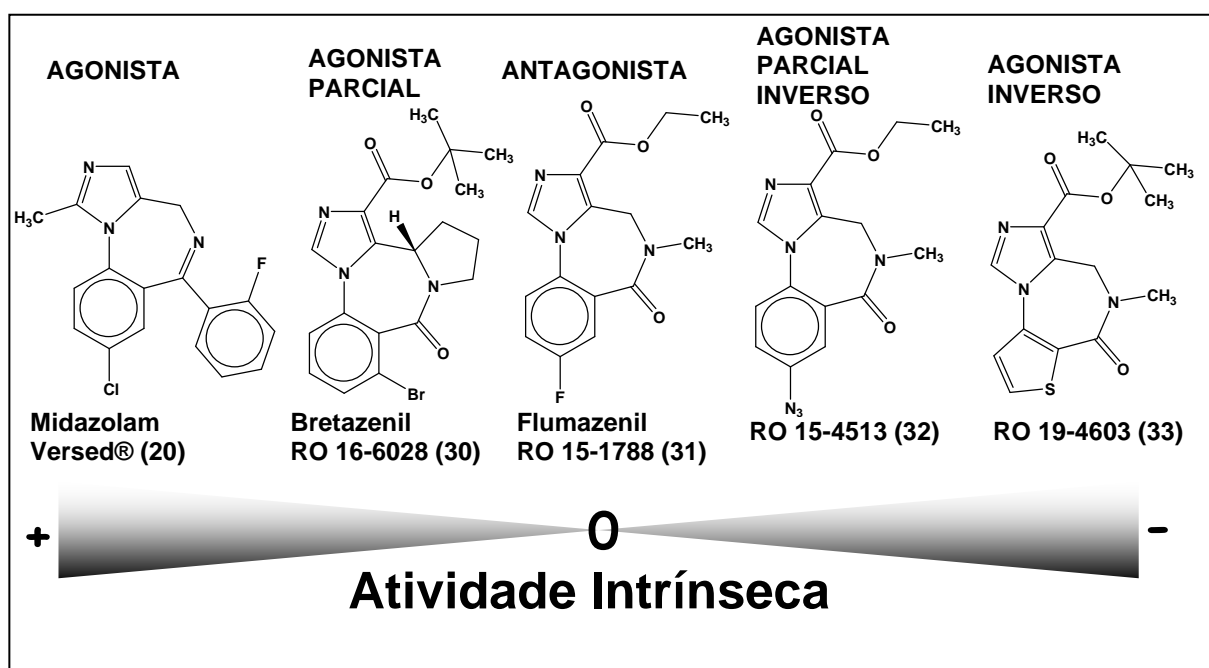


Figura 8 – Classificação dos ligantes 20, 30-33 de receptores benzodiazepínicos, face às suas atividades intrínsecas (adaptado de Grupta, 1995; Wolff, 1997; Williams e Lemke, 2002).

Neste contexto, a atividade intrínseca do midazolam (20) faz com que a ligação do mesmo ao receptor GABA_A se traduza em efeito ansiolítico e sedativo, que é o efeito terapêutico esperado (WOLFF, 1997; HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Por outro lado, os agonistas inversos como 33, manifestam efeitos opostos aqueles observados para a atividade agonista benzodiazepínica, podendo manifestar atividade ansiogênica e pró-convulsivante (GRUPTA, 1995; WOLFF, 1997;

WILLIAMS e LEMKE, 2002). Entretanto, ligantes benzodiazepínicos agonista inversos tem sido investigados quanto a seu efeito positivo sobre a melhora do performance cognitiva, podendo vir a ter aplicação terapêutica no tratamento do Mal de Alzheimer (CHAMBERS *et al.*, 2002).

Por sua vez, moléculas como os derivados **30** e **32** apresentarão uma resposta traduzida pela redução de suas potências, quando comparadas aos respectivos agonistas **20** ou agonistas inversos **33** plenos.

1.6.2.2 - RECEPTOR GABA_C

O receptor GABA_C como o receptor GABA_A, também é um receptor ionotrópico, permeável a íons cloreto, mas diferente quanto a estrutura, propriedades farmacológicas, bem com sua localização nos terminais de células-bipolares na retina de mamíferos (ZHANG *et al.*, 2001). Como ilustrado na Tabela 4, os receptores GABA_C apresentam como principais diferenças frente aos receptores GABA_A, a maior sensibilidade ao agonista natural GABA (**23**) (EC₅₀= 1 µM), corrente de canal único mais rápida (8 ps) e maior tempo médio de abertura do canal (150 ms) (JOHNSTON, 1996). Até o momento, apenas três sub-unidades do receptor GABA_C foram clonadas e diferentemente dos receptores GABA_A, homopentâmeros funcionais são encontrados (JOHNSTON, 1996; ZHANG *et al.*, 2001).

1.6.2.3 - RECEPTOR GABA_B

O receptor GABA_B (Figura 9) foi o primeiro receptor acoplado à proteína G heterodimérico encontrado quando, até então só eram conhecidos receptores homodiméricos ou monoméricos (MARSHALL *et al.*, 1999). Já foram identificados

heterodímeros para receptores dopaminérgicos D₂ (MARSHALL *et al.*, 1999) e opióides δ e κ, sendo que este último apresenta propriedades diferentes dos monômeros (JORDAN e DEVI, 1999).

Os receptores GABA_B se encontram acoplados à proteína G estimulatórias (Gs) e proteína G inibitórias (Gi). A proteína Gs pode ser acoplada a canal de cálcio ou a canal de potássio. Quando acoplada a canal de cálcio, leva à diminuição das correntes de cálcio, e com isso à diminuição da liberação de neurotransmissores, sob as terminações. Quando acoplada ao canal de potássio, ela aumenta a condução de íons K⁺ e com isso provoca uma hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos (BOWERY *et al.*, 2002; BETTLER, KAUPMANN e BOWERY, 1998; BILLINTON *et al.*, 2001).

Como ilustrado na Figura 10, tanto o GABA (**23**) ou agonistas se ligam à subunidade 1 do heterodímero e induzem mudanças conformacionais no receptor que serão transmitidas ao domínio C-terminal. Ambos os domínios C-terminais das duas subunidades se encontram comunicados no interior da célula. Entretanto, apenas o domínio C-terminal de subunidade 2 está conectada com a proteína G (MARSHALL *et al.*, 1999).

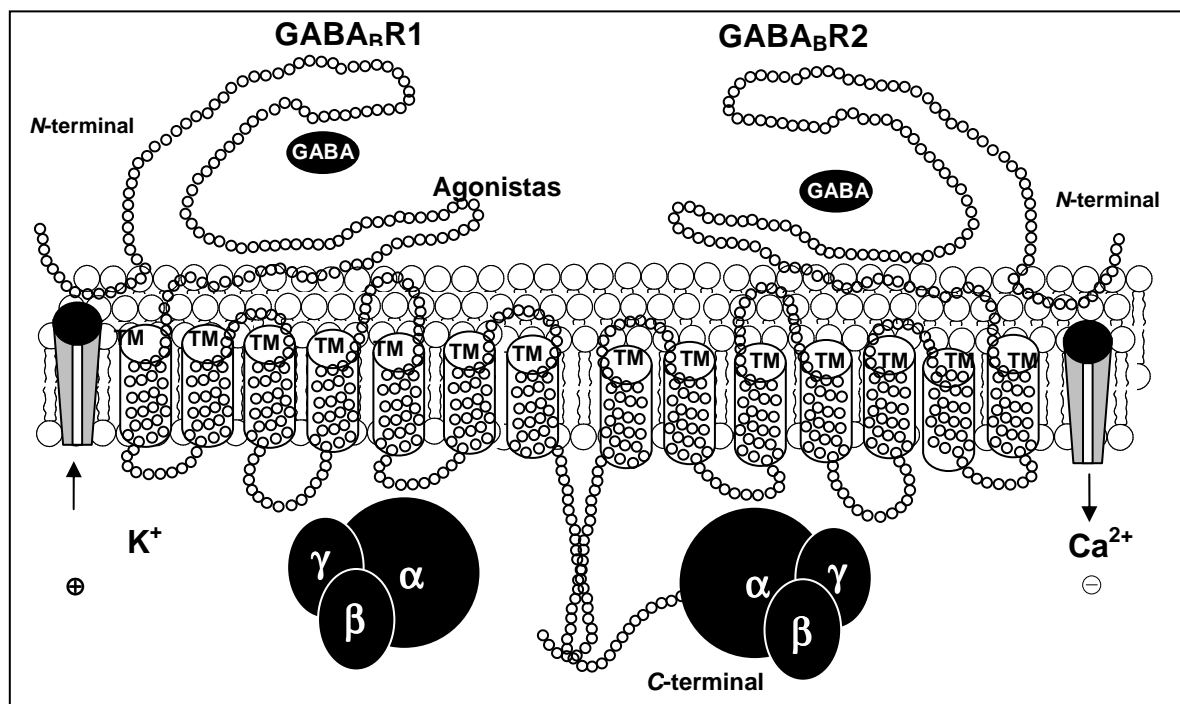
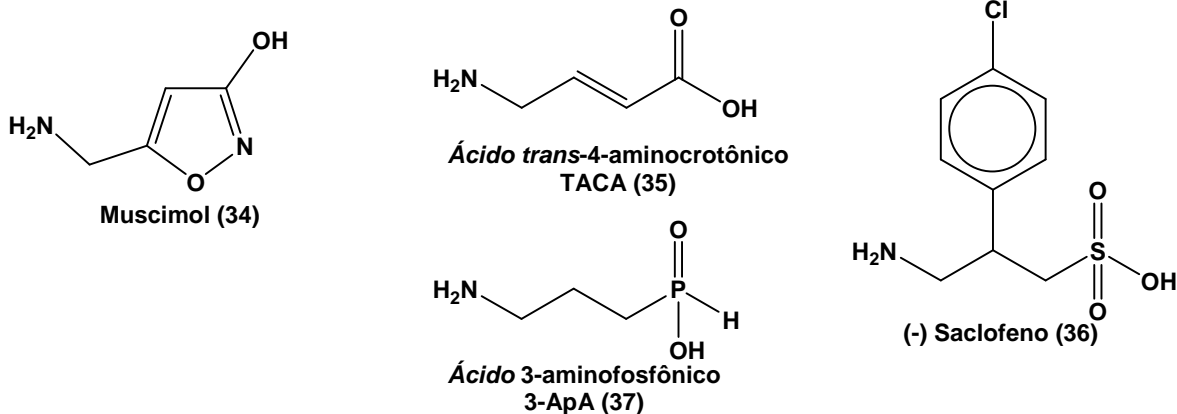


Figura 9 – Modelo de receptor GABA_B heterodímero, formado pela associação das sub-unidades GABA_BR1 e GABA_BR2 (adaptado de Marshall *et al.*, 1999).

Tabela 4 – Quadro comparativo das estruturas e propriedades dos receptores GABAérgicos no SNC (adaptado de Johnston, 1996).

Características	GABA _A	GABA _B	GABA _C
Mecanismo	Ionotrópico-Cl ⁻	Metabotrópico-PG	Ionotrópico-Cl ⁻
Subunidades	α ₁₋₆ , β ₁₋₃ , γ ₁₋₃ , δ, ε, e θ	-	ρ ₁₋₃
Ω canal	≈30ps	-	≈8ps
t _{1/2} abertura	≈25ms	-	≈150ms
GABA (21)	≈10μM(EC ₅₀)	≈10μM(EC ₅₀)	≈ 1μM(EC ₅₀)
Agonista	Muscimol (34)	Baclofeno (26)	TACA (35)
Antagonista competitivo	Bicuculina (25)	Saclofeno (36)	3-APA (37)



1.6.3 - FLEXIBILIDADE DO AGONISTA NATURAL GABA (23)

A grande variedade de subtipos de receptores GABAérgicos, se deve em parte à elevada flexibilidade do ligante natural GABA (23). A Figura 10 ilustra as principais conformações adotadas pelo GABA (23), quando consideramos que o ângulo diedro é rodado com incremento de 60°. Desta forma, podemos identificar seis conformações, e.g. sinperiplanar (38) que apresenta um ângulo de diedro (θ) de 0°, + sinclinal (+sin) (39) com ângulo de diedro (θ) de 60°, + anticlinal (+ac) (40) com ângulo de diedro (θ) de 120°, antiperiplanar (41) com ângulo de diedro (θ) de 180° e as correspondentes – sinclinal (-sin) (42) e – anticlinal (-ac) (43), com ângulo de diedro (θ) de 60° e ângulo de diedro (θ) de 120°, respectivamente (POTAPOV, 1979).

Como destacado na Figura 12, além das conformações preferencialmente adotadas pelo GABA (23), podem ainda ser encontrados os rotâmeros α -(44) e β -(45), que se originam a partir da ausência de simetria na subunidade ácido carboxílico e amina quando traçamos um plano imaginário sobre a conformação antiperiplanar (41). O rotâmero α (44) é caracterizado quando os grupos de maior prioridade se encontram em lados opostos em relação ao plano imaginário. Por sua vez, o rotâmero β (44) se caracteriza quando os grupos de maior prioridade se

encontram do mesmo lado em relação ao plano de imaginário (WILLIAMS e LEMKE, 2002).

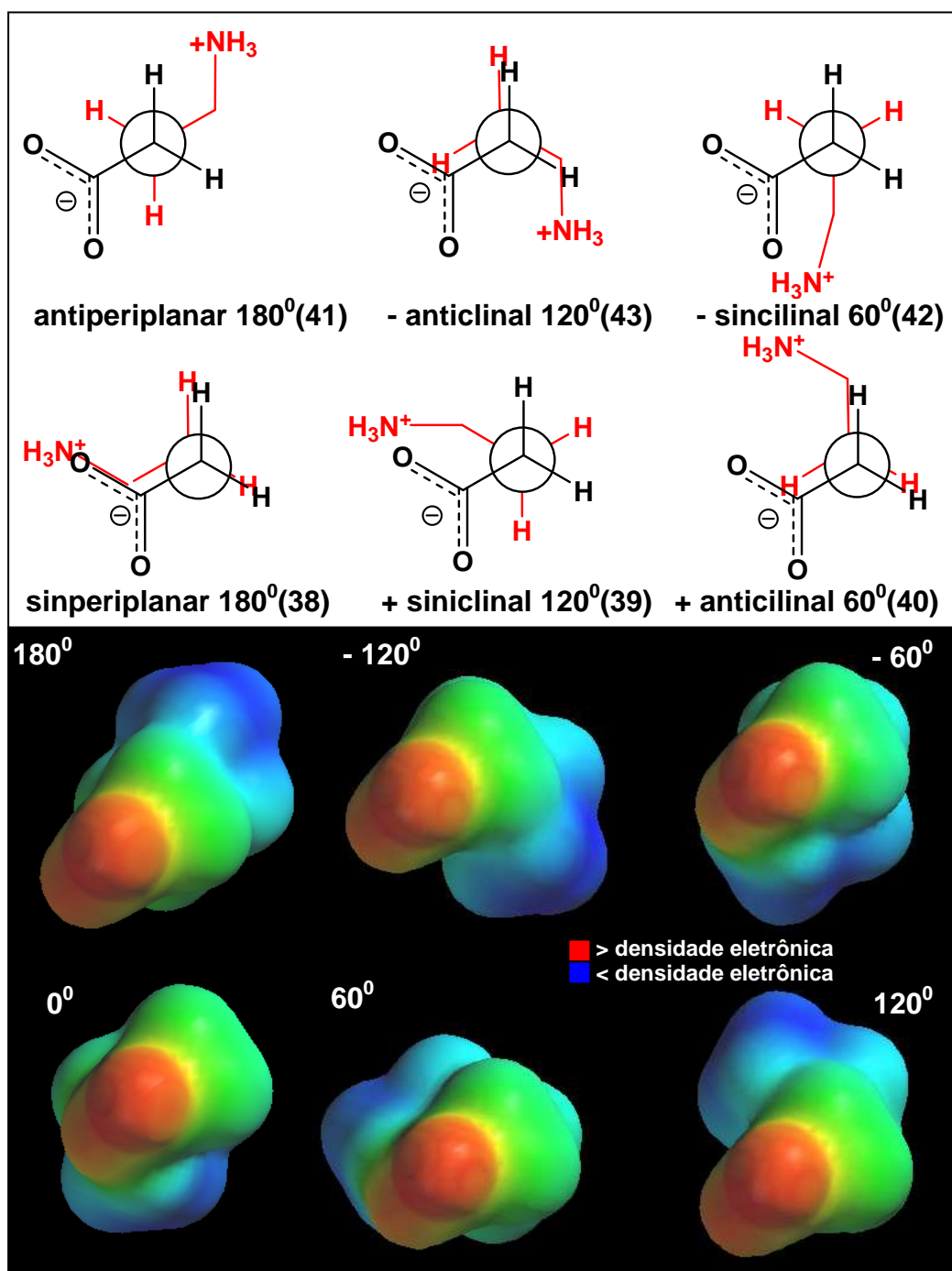


Figura 10 – Mapa de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total ($0,002 e/au$ 3) para as principais conformações **38-43** adotadas pelo GABA (**23**), sob o cálculo de “Single-Point”, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1, segundo as projeções de Newman, demonstrados em uma faixa de $-92,14$ (vermelho) a $28,68$ Kcal/mol (azul) (POTAPOV, 1979).

Para a conformação antiperiplanar (41), por exemplo, temos o seu desdobramento nos rotâmeros α -(44) e β -(45) o que amplia o número de conformações possíveis para o GABA (23). As diferentes formas de interação entre ligante e biomacromolécula, que podem traduzir incremento ou perda de sítios de interação, como ilustrado na Figura 11 (WILLIAMS e LEMKE 2002; FRAGA, 2001).

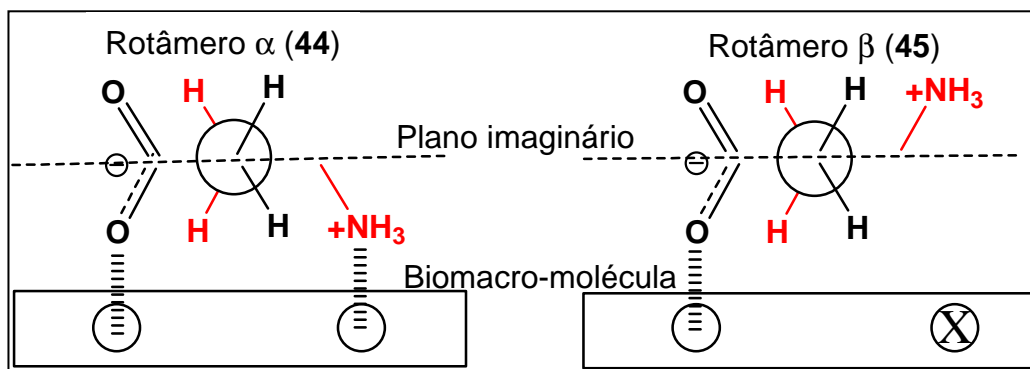


Figura 11 – Rotâmeros α -(44) e β -(45) do GABA (23) (adaptado de Williams e Lemke 2002; Fraga, 2001).

A Tabela 5 ilustra os dados obtidos por cálculo de “single point” empregando o método semi-empírico AM1, para as principais conformações 38-43 adotadas pelo GABA (23) na forma ionizada, em meio com constante dielétrica da água ($\epsilon= 80$). Através da análise estrutural dos mapas de potencial eletrostático na Figura 10, podemos concluir que os valores relativos de energia, corroboram aqueles classicamente descritos na literatura (POTAPOV, 1979). Vale destacar que a ordem de estabilidade das conformações 38-43 é diretamente proporcional ao momento dipolo, uma vez que as conformações antiperiplanar (41), mais estável (-74,25 Kcal/mol), é a que apresenta maior momento dipolo ($\mu= 20,87$) e a conformação sinperiplanar (38), menos estável (-26,41 Kcal/mol) é a que apresenta menor momento dipolo ($\mu= 8,44$).

Recentemente tem sido feito uma re-leitura sobre as razões que levam a maior estabilidade da conformação antiperiplanar. Através de cálculos teóricos para molécula do etano (**46**), tem-se observado que o efeito hiperconjugativo para a conformação antiperiplanar (**47**) é mais efetivo devido o melhor entrelaçamento entre os orbitais σ C-H ligante com o orbital σ^* C-H anti-ligante, quando comparado a conformação sinperiplanar (**48**), como ilustrado na Figura 12 (WEINHOLD, 2001; POPHRISTIC e GOODMAN, 2001; SCHREINER, 2002).

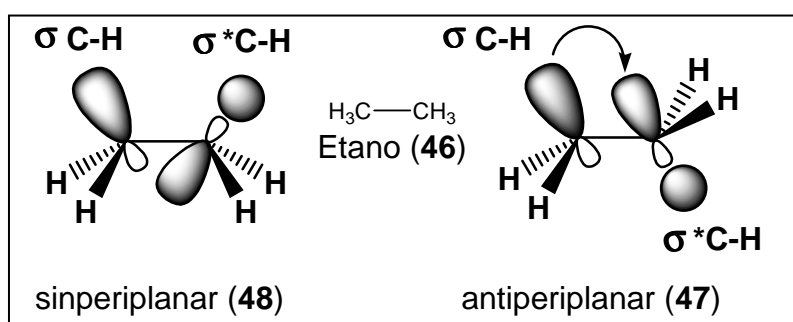


Figura 12 – Diferença de estabilidade das conformações sinperiplanar (**48**) e antiperiplanar (**47**) da molécula do etano (**46**), frente ao efeito hiperconjugativo (adaptado de Schreiner, 2002).

Em relação aos volumes (\AA^3), novamente as maiores variações observadas são para as conformações sinperiplanar (**38**) e antiperiplanar (**41**), sendo de 123,28 e 129,53 \AA^3 , respectivamente.

Através da análise das distâncias entre as subunidades amônio e carboxilato, se observou que quatro entre as seis conformações apresentam a distância entre 1,40-2,93 \AA , que provavelmente se deve a interações eletrostáticas (SMITH e MARCH, 2001).

Tabela 5 – Cálculo “Single-Point”, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1, sobre as principais conformações **38-43** adotadas pelo GABA (**23**) na forma ionizada, em água ($\epsilon = 80$), segundo as projeções de Newman (POTAPOV, 1979).

Ângulo de Diedro(θ)	Energia (Kcal/mol)	Momento dipolar(μ)	Distância interatômica ($^+\text{NH}_3\text{-CO}_2^-$ Å)	Volume(Å^3)
180 ⁰	-74,25	20,87	4,69	129,53
120 ⁰	-61,91	17,22	2,93	129,07
60 ⁰	-30,47	10,11	1,56	124,69
0 ⁰	-26,41	8,44	1,40	123,28
-60 ⁰	-52,28	15,02	2,23	127,77
- 120 ⁰	-72,36	20,19	4,04	129,11

2 - OBJETIVOS

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica, de novos candidatos a protótipos de fármacos neuroativos, este trabalho descreve o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novos derivados heterocíclicos **49-52** (Figura 13), candidatos a protótipos de agentes hipnótico-sedativos e analgésicos centrais.

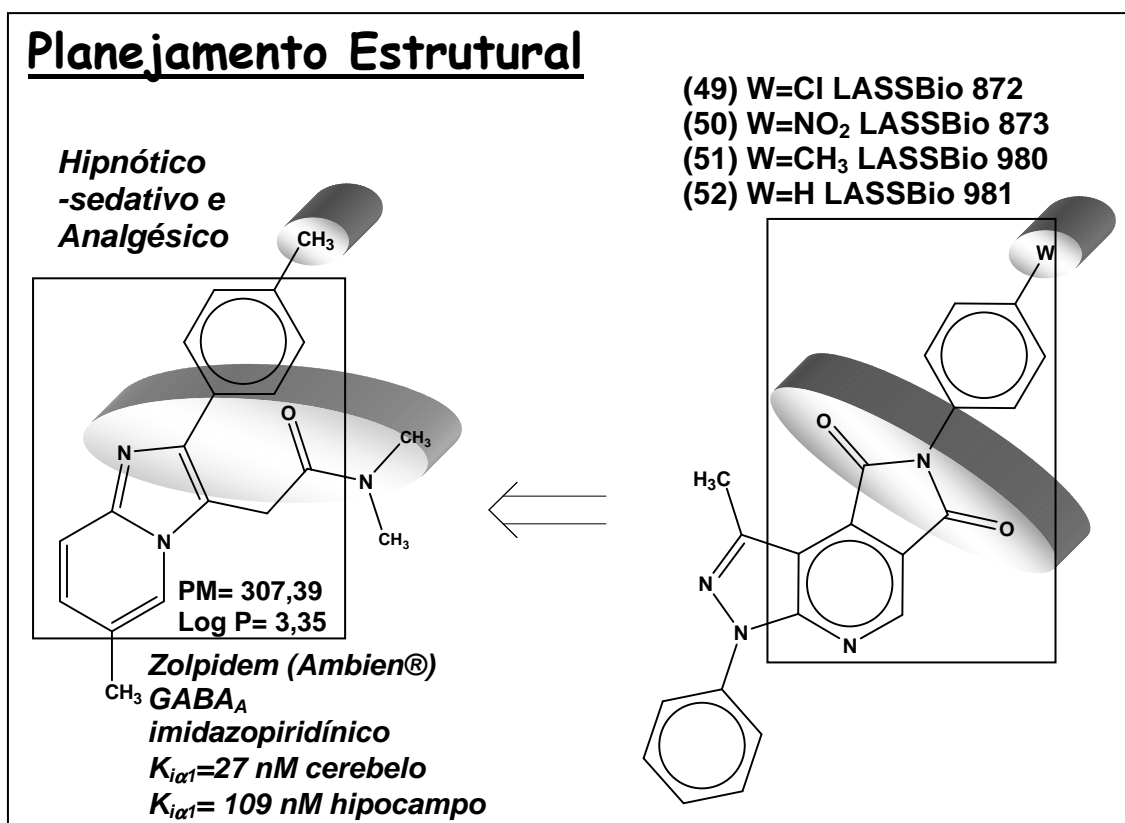


Figura 13 – Desenho estrutural dos novos derivados heterocíclicos **49-52**, planejados a partir do protótipo zolpidem (**6**), fármaco hipnótico-sedativo e analgésico.

2.1 - PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DE NOVOS DERIVADOS HETEROTRÍCÍCLICOS **49-52** CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE AGENTES HIPNÓTICO-SEDATIVOS E ANALGÉSICOS

Os novos candidatos heterocíclicos **49-52** foram planejados a partir do protótipo zolpidem (**6**), que apresenta propriedades hipnótico-sedativas, face à sua ação agonista sobre os receptores GABA_A, e.g. $K_{i\alpha1} = 27$ nM cerebelo e $K_{i\alpha1} = 109$ nM hipocampo (SANGER e DEPOORTERE, 1998). Adicionalmente, recentemente se identificou que o protótipo zolpidem (**6**) também apresenta importantes propriedades analgésicas, por mecanismo farmacológico ainda não elucidado, podendo vir a ser útil no tratamento de dor crônica (ZAKS, 2004).

Através da análise da Figura 14, podemos observar que os novos derivados heterotricíclicos **49-52** mantêm relação isostérica com o protótipo zolpidem (**6**), como destacado pela sobreposição manual (PC Spartan Pro) das estruturas do LASSBio 980 (**51**) e do zolpidem (**6**). Na mesma Figura, podemos observar que há uma diferença em torno 15° , entre o ângulo diedro θ entre o anel de cinco membros e sub-unidades fenílicas *para*-substituídas, quando comparamos o LASSBio 980 (**51**) e o protótipo zolpidem (**6**), uma vez que o LASSBio 980 (**51**) apresenta $\theta = 30,05^\circ$ e o zolpidem (**6**) o $\theta = 46,95^\circ$.

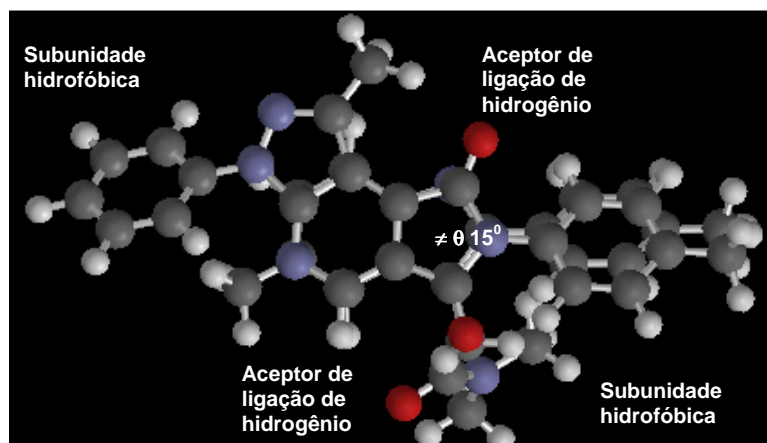


Figura 14 – Sobreposição do LASSBio 980 (**51**) e do protótipo zolpidem (**6**), após otimização geométrica e análise conformacional sistemática, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

Os mapas de potencial eletrostáticos de ambos os compostos ilustrados na Figura 15, fornecem informações adicionais quanto a distribuição eletrônica do LASSBio 980 (**51**) e zolpidem (**6**). Neste sentido, foi possível identificar subunidades isostéricas e.g. regiões de maior densidade eletrônicas (vermelho) presentes no LASSBio 980 (**51**) e protótipo zolpidem (**6**), que podem vir a ser reconhecidas de maneira semelhante pela biomacromolécula.

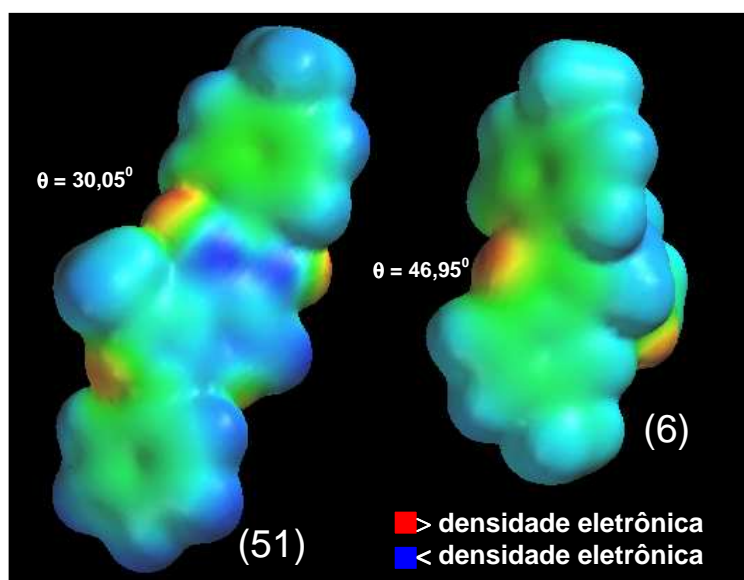


Figura 15 – Mapas de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au³) de LASSBio 980 (**51**) e zolpidem (**6**), respectivamente, demonstrados em uma faixa de -53,2 (vermelho) a 21,0 Kcal/mol (azul).

O padrão de substituição *para*-fenila (W) dos derivados **49-52**, foi eleito com base em descritores físico-químicos (Tabela 6), a fim de se analisar os efeitos eletrônicos (σ_p), a lipossolubilidade (π_p), bem como o efeito estérico (RM) dos substituintes, como ilustrado na Figura 13 (BARREIRO e FRAGA, 2001).

Tabela 6 – Descritores físico-químicos dos substituintes fenílicos dos derivados LASSBio **49-52** (adaptado de Barreiro e Fraga, 2001).

Substituinte	σ_p^a	π_p^b	RM ^c
Cl	0,23	0,73	6,03
NO ₂	0,78	0,22	7,36
CH ₃	-0,17	0,60	5,65
H	0,00	0,00	1,03

^aConstante de Hammett *para*.

^bValores de hidro-lipossolubilidade.

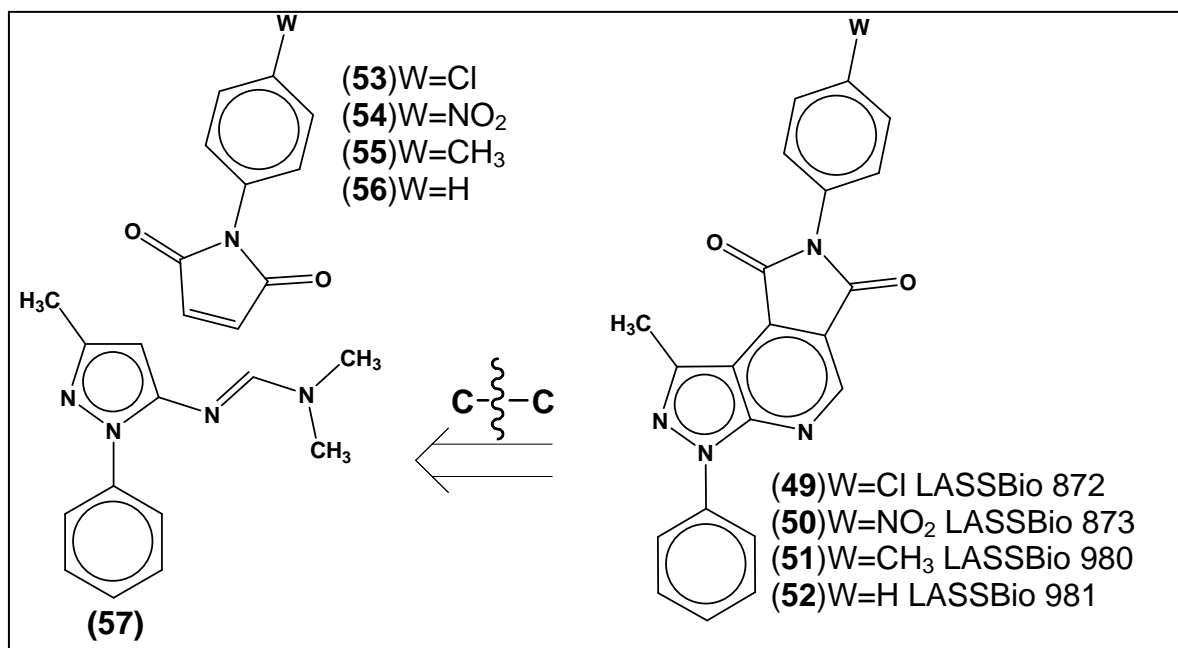
^cRefratividade molar.

Ademais, os novos derivados heterotricíclicos **49-52** contemplam o perfil farmacocinéticos preconizados por Lipinski (LIPINSKI, 2004). Segundo as regras de Lipinski ou dos cinco, candidatos a protótipos de fármacos devem apresentar número de unidades de massa atômica menor ou igual a quinhentos, número de sítios aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a dez, número de sítios doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a cinco, além de coeficiente de partição entre 2-3, como observado para o protótipo zolpidem (**6**) Figura 13 (LIPINSKI, 2004).

2.2 - ANÁLISE RETROSINTÉTICA DOS NOVOS DERIVADOS HETEROTRICÍCLICOS **49-52**

Através da análise retrosintética (Esquema 3), podemos observar que os novos derivados **49-52** podem ser obtidos em processo “one pot”, através da

abordagem que envolve na etapa-chave a reação de hetero Diels-Alder, do intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) com 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados [W=Cl (**53**), W=NO₂ (**54**), W=CH₃ (**55**) e W=H (**56**)].



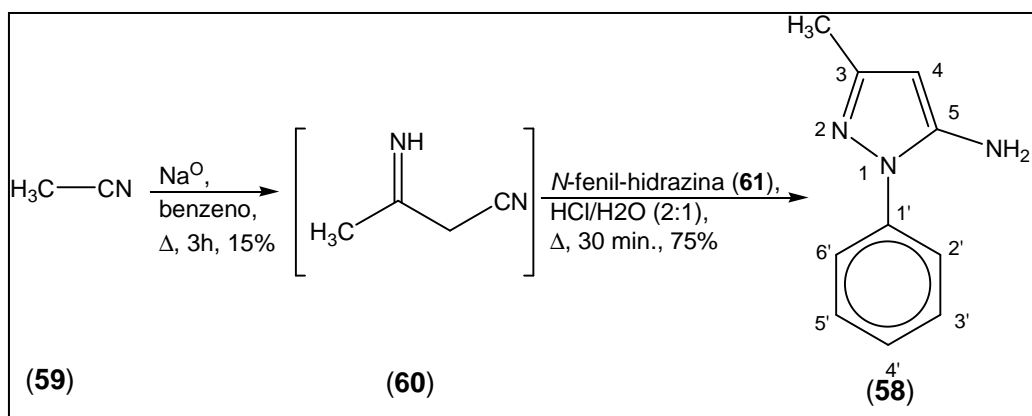
Esquema 3

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - METODOLOGIA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS LASSBio 49-52

A análise retrosintética (Esquema 3) para a obtenção dos derivados LASSBio 872 (**49**), LASSBio 873 (**50**), LASSBio 980 (**51**) e LASSBio 981 (**52**), explorou metodologia de construção do sistema heterocíclico utilizado anteriormente no laboratório para a obtenção de 1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazolamina (**58**) (DIAS, ALVIM e BARREIRO, 1994).

A síntese destes novos compostos foi iniciada com a reação de auto-condensação da acetonitrila (**59**), através do emprego de sódio metálico em benzeno, à temperatura de refluxo, sob atmosfera de nitrogênio, que forneceu a β-iminobutironitrila (**60**) em modestos 15% de rendimento. O derivado **60** foi submetido, em seguida, sem purificação, à reação de condensação quimiosseletiva (Esquema 4) com *N*-fenil-hidrazina (**61**), empregando ácido clorídrico, à temperatura de refluxo, condições reacionais que conduziram ao derivado desejado **58**, em 75% de rendimento (P.F.= 110⁰C) (DIAS, ALVIM e BARREIRO, 1994).



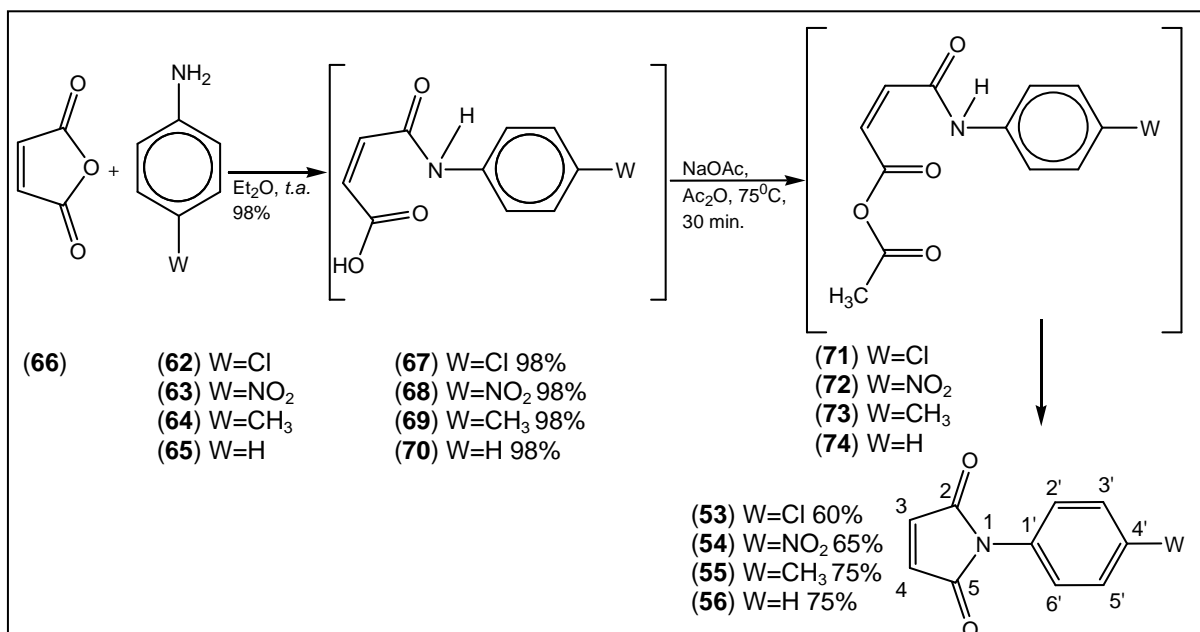
Esquema 4

Através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) do **58**, pode-se observar dois sigletos em $\delta=2,24$ e $5,44$ ppm, referentes à sub-unidade metila e ao átomo de hidrogênio em C-4 do anel pirazólico, com valor de integração igual a três e um, respectivamente; um multiplete entre $\delta=7,27-7,56$ ppm, relativos aos cinco átomos de hidrogênio fenílicos foi também identificado (DIAS, ALVIM e BARREIRO, 1994).

Os derivados 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados **53-56** (Esquema 5), por sua vez, foram obtidos através do método de Cava e colaboradores (CAVA *et al.*, 1973), que compreende a condensação quimiosseletiva de anilinas funcionalizadas [$\text{W}=\text{Cl}$ (**62**), $\text{W}=\text{NO}_2$ (**63**), $\text{W}=\text{CH}_3$ (**64**) e $\text{W}=\text{H}$ (**65**)] com anidrido maleico (**66**), em meio de éter etílico em temperatura controlada entre 15 e 20°C , fornecendo os correspondentes ácidos 3-fenilcarbamoil-(*Z*)-2-propenóicos substituídos [$\text{W}=\text{Cl}$ (**67**) 98%, $\text{W}=\text{NO}_2$ (**68**) 98%, $\text{W}=\text{CH}_3$ (**69**) 98% e $\text{W}=\text{H}$ (**70**) 98%] em rendimentos quantitativos (HARGREAVES, PRITCHARD e DAVE, 1970; CAVA *et al.*, 1973; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003). Visando, na etapa seguinte, a desidratação quimiosseletiva dos ácidos 3-fenilcarbamoil-(*Z*)-2-propenóicos substituídos **67-70**, estes foram transformados inicialmente nos correspondentes anidridos mistos [$\text{W}=\text{Cl}$ (**71**), $\text{W}=\text{NO}_2$ (**72**), $\text{W}=\text{CH}_3$ (**73**) e $\text{W}=\text{H}$ (**74**)] através do tratamento com anidrido acético, acetato de sódio e aquecimento à temperatura de 75°C (CAVA *et al.*, 1973). Estes intermediários **71-74** foram desidratados “in situ”, fornecendo as respectivas 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados [$\text{W}=\text{Cl}$ (**51**) 60%, $\text{W}=\text{NO}_2$ (**52**) 65%, $\text{W}=\text{CH}_3$ (**53**) 75% e $\text{W}=\text{H}$ (**54**) 75%], caracterizados através de seus P.F. e freqüências de estiramento das carbonilas imidínicas no infravermelho (I.V.), estando de acordo com as freqüências de

estiramento descritas para maleímidas *N*-substituídas (Tabela 7) (HARGREAVES, PRITCHARD e DAVE, 1970; CAVA *et al.*, 1973; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003;).

Nesta etapa ocorre uma adição nucleofílica do átomo de nitrogênio amídico à carbonila α,β -insaturada dos anidridos **71-74**, seguido de eliminação do grupo abandonador acetato.



Esquema 5

Tabela 7 – Pontos de fusão e freqüências de estiramento das carbonilas imidínicas dos derivados **53-56**, no I.V..

Derivados	P.F.	ν C=O (cm ⁻¹)
53	103-105 °C	1776-1712
54	140-142 °C	1723-1712
55	135-137 °C	1780-1708
56	65 °C	1774-1709

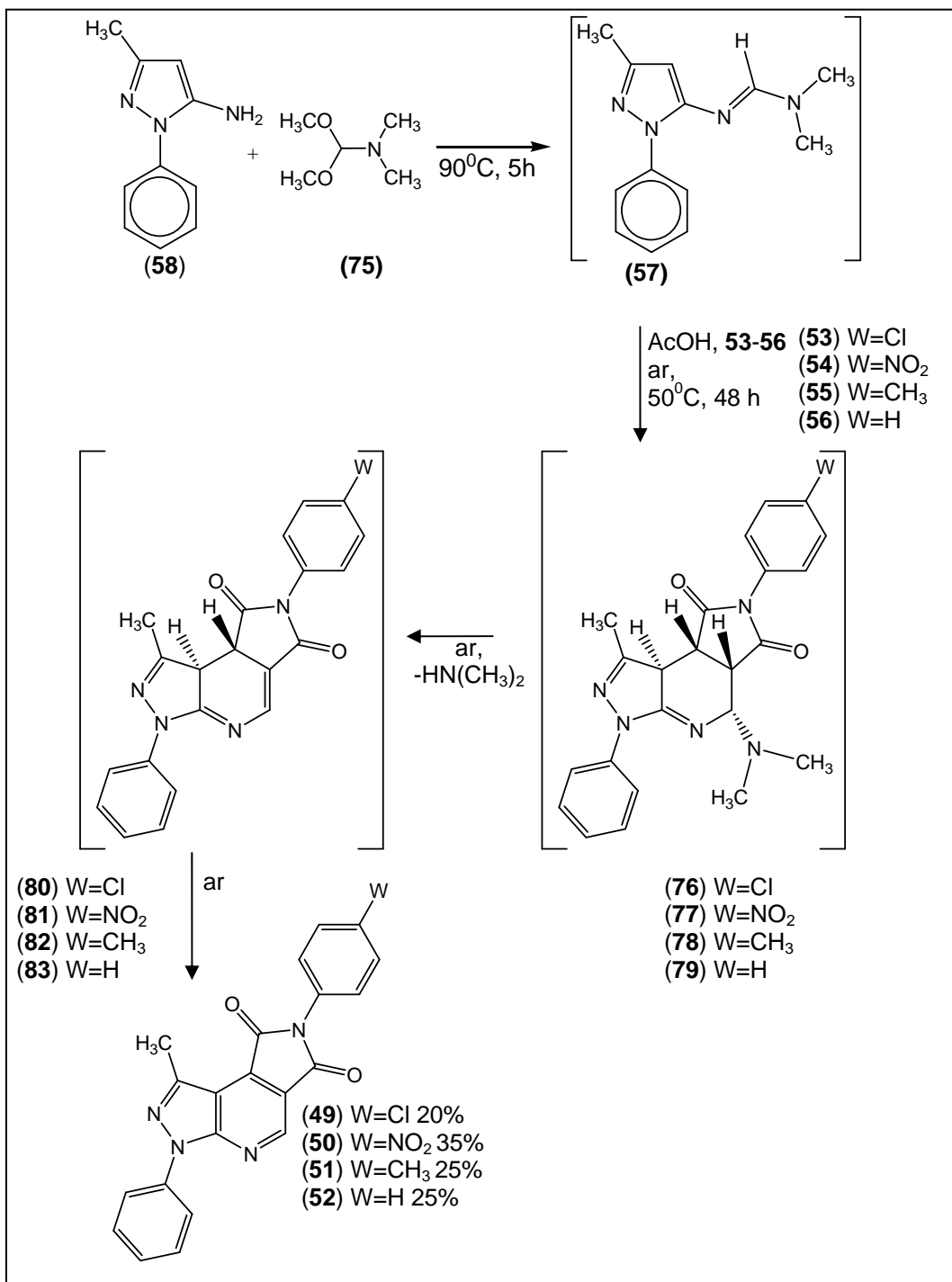
Quando o intermediário **58** foi submetido à reação de condensação (Esquema 6) com dimetilacetal da dimetilformamida (**75**), à temperatura de 90°C, por cinco horas, forneceu o intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina **57**, como um óleo de cor bege, em rendimento

quantitativo, acompanhado por c.c.f. (MASON *et al.*, 2001). No entanto, quando **57** foi isolado para caracterização através de RMN ^1H , ^{13}C e I.V., se observou no espectro de RMN ^1H , dois singletos em $\delta = 5,64$ e $5,40$ ppm, em proporção de 2:1, referentes aos átomos de hidrogênio em C-4 do anel pirazólico de **57** e **58**, respectivamente. Muito embora se observe a conversão completa de **58** em **57** através de c.c.f., é provável que durante o isolamento o produto formado **57** esteja sendo hidrolisado ao material de partida **58**.

O Esquema 6 ilustra ainda o emprego de estratégia sintética convergente, envolvendo a reação de hetero Diels-Alder na etapa-chave, através do emprego do intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) (dieno) e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados [W=Cl (**33**), W=NO₂ (**54**), W=CH₃ (**55**) e W=H (**56**)] (dienófilos), em ácido acético, à temperatura de 50^oC (MASON *et al.*, 2001). Neste processo “one pot”, na primeira etapa ocorre uma reação de hetero Diels-Alder de demanda normal, onde a etapa determinante da velocidade é controlada pelo orbital HOMO_{dieno} (BUONORA, OLSEN e OH, 2001), com aproximação do tipo endo, entre o intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados **53-56**, levando aos adutos de Diels-Alder [W=Cl (**76**), W=NO₂ (**77**), W=CH₃ (**78**) e W=H (**79**)] em que o átomo de hidrogênio α -carbonila se encontra em relação antiperiplanar ao grupo abandonador *N,N*-dimetilamino, como será discutido adiante.

Na etapa subsequente ocorre a reação de eliminação do grupamento dimetilamino presente nos compostos **80** (W=Cl), **81** (W= NO₂), **82** (W= CH₃) e **83** (W=H) e posterior aromatização oxidativa, fornecendo os derivados desejados **49**

(W=Cl), **50** (W= NO₂), **51** (W= CH₃) e **52** (W=H) em rendimentos de 20%, 35%, 25% e 25%, respectivamente (Tabela 8).



Esquema 6

Tabela 8 – Pontos de fusão e rendimentos dos derivados **49-52**.

Derivados	P.F.	%
LASSBio 872 (49)	246-248 °C	20
LASSBio 873 (50)	238-240 °C	35
LASSBio 980 (51)	231-233 °C	25
LASSBio 981 (52)	228-230 °C	25

Os novos derivados **49-52** contemplam os descritores farmacocinéticos preconizados por Lipinski (Tabela 9), uma vez que apresentam massa atômica inferior à quinhentas unidades; coeficiente de partição menor do que cinco; menos de dez sítios aceptores de ligação de hidrogênio (LIPINSKI, 2004).

Em relação ao padrão de funcionalização da subunidade fenólica (Tabela 9), os cálculos dos coeficientes de partição efetuados com o programa Pallas 2.0, revelaram que o derivado LASSBio 872 (**49**) substituído pelo átomo de cloro apresenta maior coeficiente de partição (Log $P= 3,28$) quando comparado com o derivado LASSBio 981 (**51**) não substituído (Log $P= 2,55$), enquanto o derivado LASSBio 873 (**50**) apresenta do menor coeficiente de partição (Log $P= 2,47$).

Tabela 9 – Descritores físico-químicos para os derivados **49-52**.

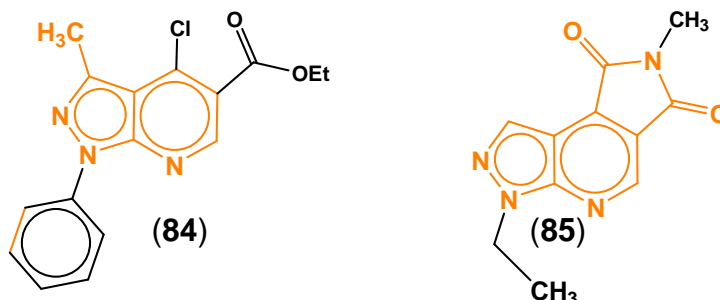
Derivados	σ_p	π_p	Log P^*	P.M.
LASSBio 872 (49)	0,23	0,73	3,28	388,8
LASSBio 873 (50)	0,78	0,22	2,47	399,4
LASSBio 980 (51)	-0,17	0,60	2,99	368,4
LASSBio 981 (52)	0,00	0,00	2,55	354,3

*Programa Pallas 2.0

Como ilustrado na Figura 16, o espectro do derivado LASSBio 981 (**52**) apresenta dois singletos, em $\delta= 2,98$ e $9,16$ ppm, referentes a subunidade metila e ao átomo de hidrogênio (H-5), com valor de integração igual a três e um hidrogênio. Os mesmos sinais, nos demais derivados **49-51** (Tabela 10), não apresentam

variações significativas, podendo estar relacionados à diferença de concentração das amostras analisadas. As variações mais significativas sobre os valores de deslocamento químico, ocorreram nas sub-unidades fenílicas face ao efeito eletrônico (σ_p) dos substituintes cloro em **49**, nitro em **50** e metila em **51**. Para o derivado LASSBio 873 (**50**) os átomos de hidrogênio 3'' e 5'' são os mais desblindados, com $\delta = 8,44$ (2H, d, $J = 9,0$ Hz), considerando os átomos de hidrogênio fenílicos. Nos demais derivados LASSBio **49**, **51** e **52**, os átomos de hidrogênio 2'' e 6'' foram os mais desblindados por se encontrarem localizados em posição *orto* às carbonilas imidínicas.

Os assinalamentos dos espectros de RMN ^{13}C (Tabela 11) para a unidade heterotricíclica central (alaranjado) (Figura 17), foram realizados com auxílio de compostos com padrão estrutural semelhante, descritas previamente no laboratório **84** (DIAS, ALVIM e BARREIRO, 1994), bem com de compostos **85** descritos recentemente na literatura (DÍAZ-ORTIZ *et al.*, 2000), além das técnicas de HMQC e HMBC. Já para efetuarmos os assinalamentos das subunidades fenílicas (azul) (Figura 16), foram considerados os assinalamentos prévios dos materiais de partida, *i.e.* 1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazolamina (**58**), *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados [W=Cl (**33**), W=NO₂ (**54**), W=CH₃ (**55**) e W=H (**56**)].



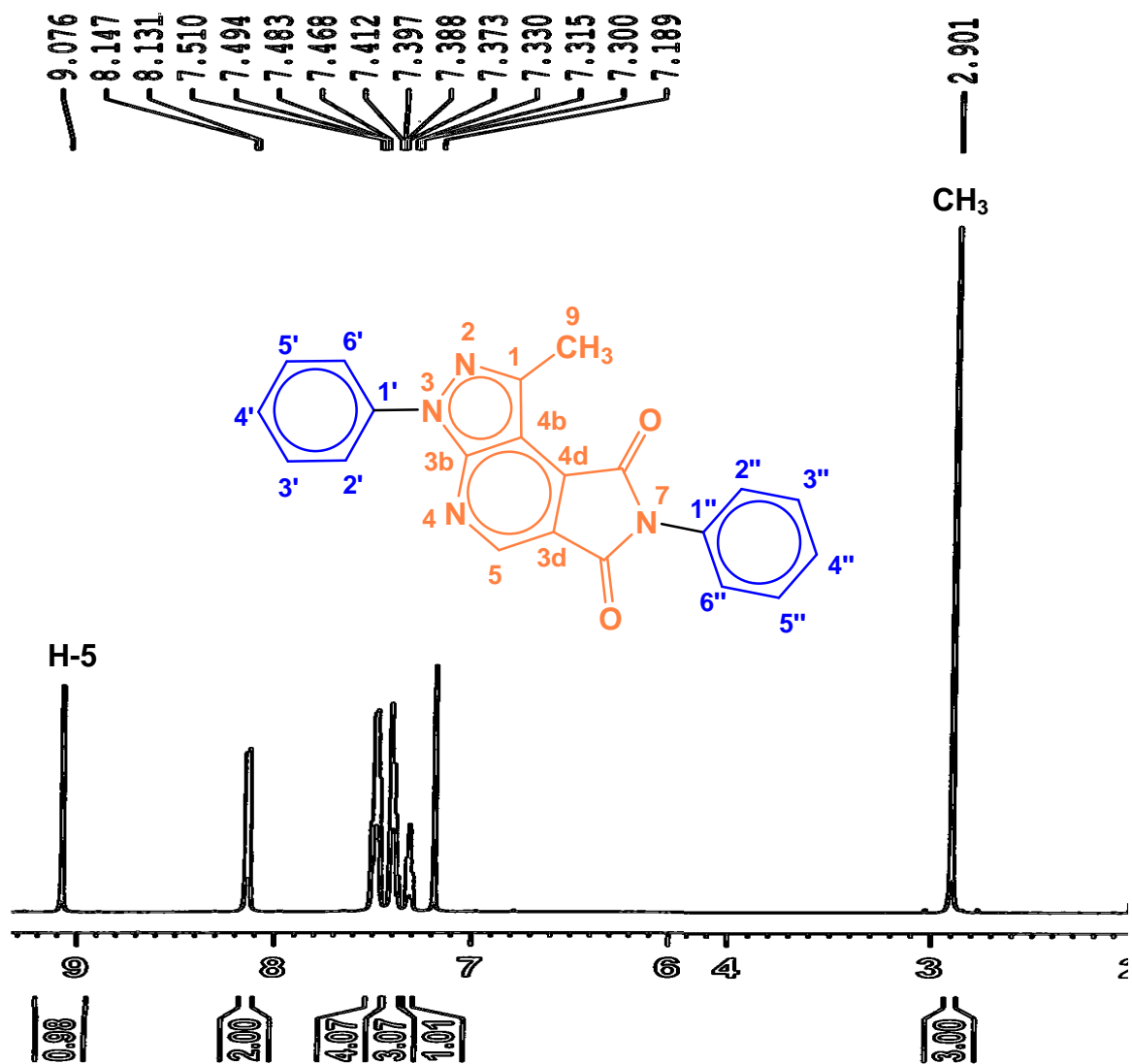
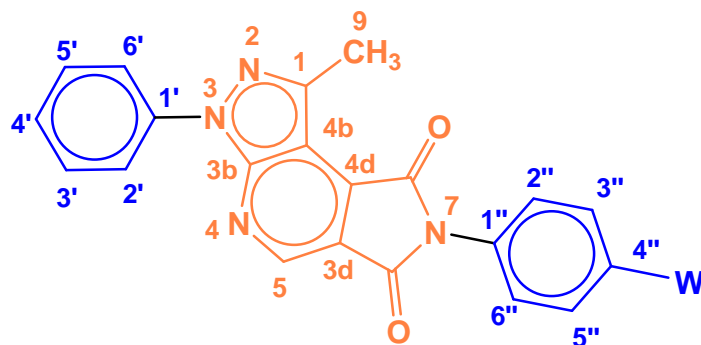


Figura 16 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl₃/TMS/500 MHz).

Tabela 10 - Deslocamentos químicos (δ) em ppm, dos derivados LASSBio **49-52**, no RMN $^1\text{H}^*$.



N ^o	LASSBio 872 (49)	LASSBio 873 (50)	LASSBio 980 (51)	LASSBio 981 (52)
5	9,16 (1H, s)	9,20 (1H, s)	9,14 (1H, s)	9,16 (1H, s)
9	2,98 (3H, s)	3,00 (3H, s)	2,97 (3H, s)	2,98 (3H, s)
2' e 6'	8,23-8,21 (2H, m)	8,23-8,22 (2H, m)	8,23-8,21 (2H, m)	8,23-8,22 (2H, m)
3' e 5'	7,60-7,57 (2H, m)	7,61-7,58 (2H, m)	7,58-7,55 (2H, m)	7,60-7,55 (4H, m)
4'	7,42-7,39 (1H, m)	7,44-7,41 (1H, m)	7,40-7,37 (1H, m)	7,42-7,38 (1H, m)
2'' e 6''	7,53 (2H, d, J= 8,2 Hz)	7,82 (2H, d, J= 9,0 Hz)	7,36 (4H, s)	7,50-7,45 (3H, m)
3'' e 5''	7,84 (2H, d, J= 8,2 Hz)	8,44 (2H, d, J= 9,0 Hz)	7,36 (4H, s)	7,60-7,55 (4H, m)
W	-	-	2,45 (3H, s)	7,50-7,45 (3H, m)

*Valores obtidos à 500 MHz, usando clorofórmio deuterado como solvente.

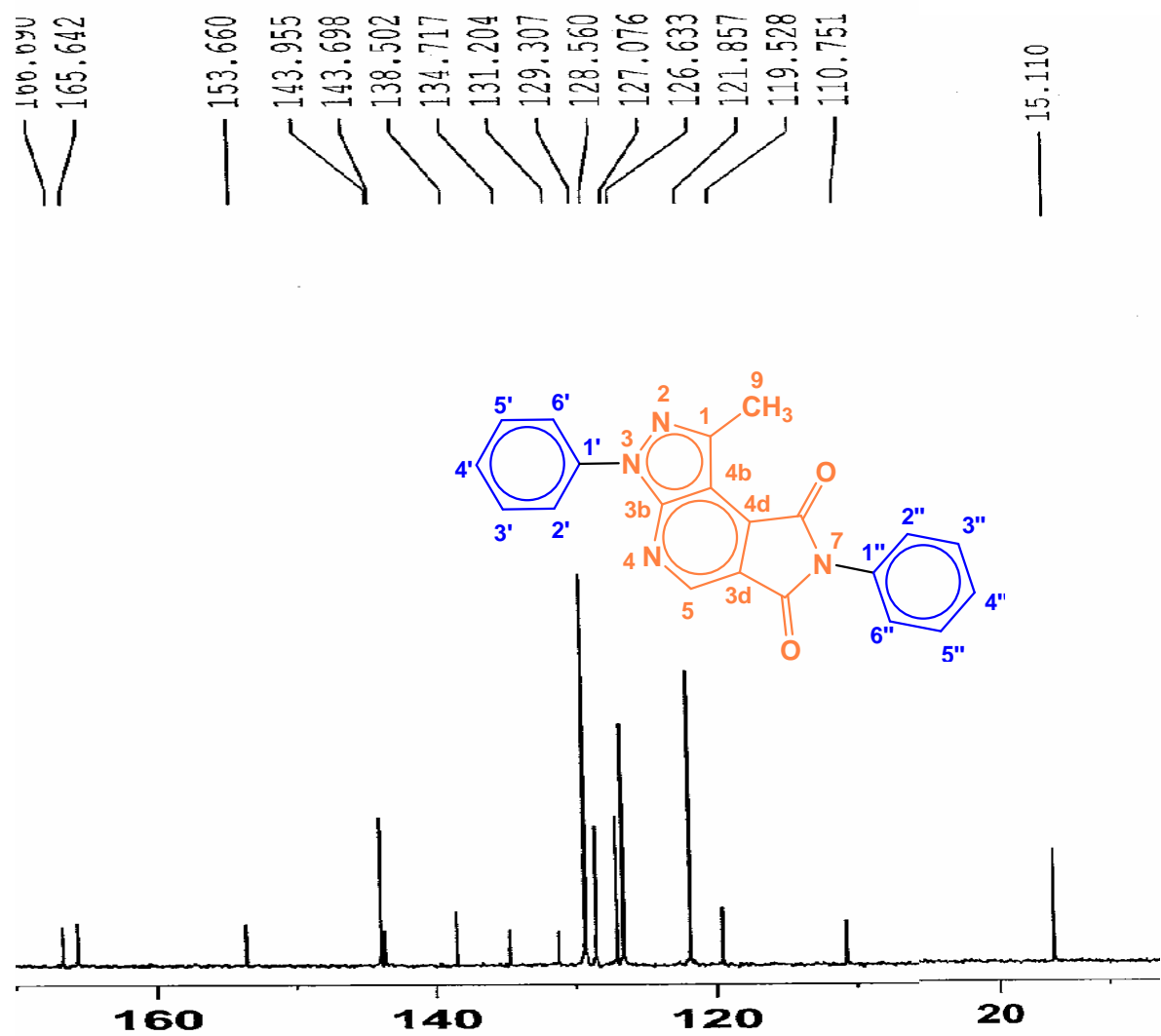
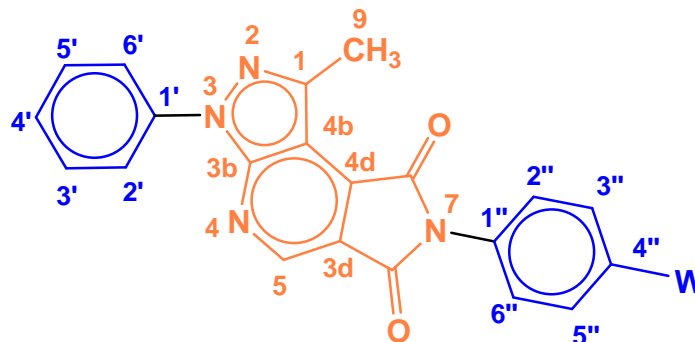


Figura 17 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C) do derivado LASSBio 981 (52) ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/125$ MHz).

Tabela 11 - Deslocamentos químicos (δ) em ppm, dos derivados LASSBio **49-52**, no RMN $^{13}\text{C}^*$.



N ^o	LASSBio 872 (49)	LASSBio 873 (50)	LASSBio 980 (51)	LASSBio 981 (52)
1	153,8	153,8	153,7	153,7
3b	143,8	143,9	143,7	143,8
4b	110,8	110,8	110,8	110,8
3d	119,4	119,1	119,6	119,6
4d	134,6	134,3	134,8	134,8
5	144,0	144,3	143,9	144,0
9	15,1	15,2	15,1	15,2
1'	138,6	138,4	138,7	138,6
2' e 6'	122,0	122,0	121,8	121,9
3' e 5'	129,6	129,4	129,3	129,4
4'	127,2	127,4	127,1	127,1
1''	134,4	137,1	138,6	131,3
2'' e 6''	129,6	126,6	130,0	126,7
3'' e 5''	127,8	124,7	126,5	129,4
4''	129,8	146,7	128,6	128,6
W	-	-	21,3	-
Carbonilas	166,5 e 165,4	166,9 e 165,9	166,9 e 165,8	166,7 e 165,7

*Valores obtidos à 125 MHz, usando clorofórmio deuterado como solvente.

Não foi possível fazer a distinção entre as carbonilas imidínicas, uma vez que elas não apresentaram correlação com o átomo de carbono C-5 do anel heterotríclico.

As frequências de estiramento observadas para os derivados **49-52**, variaram sutilmente, *i.e.* $\Delta \sim 10 \text{ cm}^{-1}$, quando comparadas com as frequências de estiramento dos 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados **53-56** (Tabela 7), mas estão de acordo com as frequências descritas na literatura (HARGREAVES, PRITCHARD e DAVE, 1970).

Tabela 12 – Frequências de estiramento para os derivados **49-52**, no I.V..

Derivados	$\nu \text{ C-H}$	$\nu \text{ C=O (cm}^{-1}\text{)}$
49	3092-3072	1774-1726
50	3124-3004	1776-1727
51	3111-3041	1778-1720
52	3112-3055	1779-1717

Os espectros de UV foram obtidos apenas para os derivados **49-52** a fim de se avaliar o perfil de transições eletrônicas (Figura 18) que geralmente são sensíveis ao efeito dos substituintes presentes sobre subunidades aromáticas (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Como ilustrado na Figura 19, de maneira geral os derivados **49-52** apresentaram duas faixas de absorbância (Tabela 8), uma comum a todos em 386,2 nm e outra que variou entre 283,6-293 nm. Ao correlacionarmos as faixas de absorção e absortividade molar (ϵ), podemos inferir que ambas as bandas de absorção observadas são relativas às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (Figura 19) (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991). As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ na faixa de 386,2 nm, com ϵ entre 1.215 e 1.377 se referem às bandas B, que são comuns às

substâncias aromáticas. Por outro lado, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ na faixa entre 283,6-293 nm, com ϵ entre 33.094 e 36.702 se referem às bandas K, presentes em sistemas aromáticos substituídos por cromóforos, e.g. carbonilas imidínicas. Vale destacar que as transições eletrônicas observadas nem sempre envolvem apenas os orbitais de fronteira HOMO e LUMO, podendo haver participação tanto dos orbitais HOMO e HOMO -1, bem como de LUMO e LUMO +1.

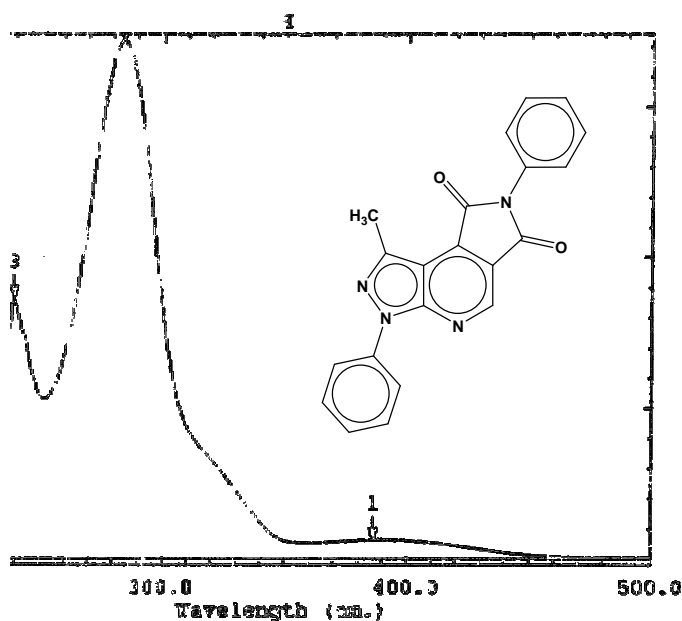


Figura 19 – Bandas de absorção do derivado LASSBio 981 (**52**) no UV, empregando clorofórmio como solvente.

Em relação à faixa de absorção relativas às bandas K, o efeitos dos substituintes nos derivados LASSBio 872 (**49**), LASSBio 873 (**50**) e LASSBio 980 (**51**) apresentaram efeito batocrômico (Tabela 13) quando comparados ao derivado não substituído LASSBio 981 (**52**), pois estes deslocaram a absorção para comprimento de onda maior (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Tabela 13 – Comprimento de onda e absorvidade molar (ϵ) dos derivados **49-52**, na região do ultravioleta (200-400 nm), empregando clorofórmio como solvente.

Derivados	λ (nm)	ϵ_{\max}^*	Abs	[$1 \times 10^{-5} \text{M}$]
LASSBio 872 (49)	386,2	1.220	0,021	1,72
	285,6	34.476	0,593	
LASSBio 873 (50)	386,2	1.377	0,023	1,67
	293	34.970	0,584	
LASSBio 980 (51)	386,2	1.215	0,022	1,81
	285,2	33.094	0,599	
LASSBio 981 (52)	386,2	1.330	0,025	1,88
	283,6	36.702	0,690	

* $\epsilon_{\max} = \text{Abs} / [\text{C}] \times 1$ (adaptado de Silverstein, Bassler e Morrill, 1991)

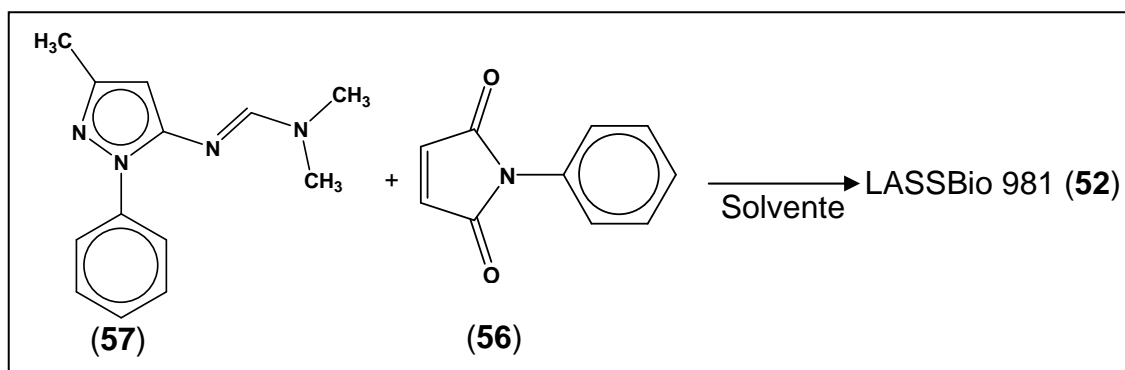
3.2 – OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE HETERO DIELS-ALDER, ENVOLVIDA NA ETAPA-CHAVE PARA OBTENÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS HETEROTRÍCICLOS **49-52**

Muito embora o protocolo sintético utilizado ter sido descrito por Mason como sendo otimizado, quando o mesmo foi empregado no processo de obtenção dos derivados **49-52**, não obtivemos bons rendimentos, *i.e.* 20-35% (MASON *et al.*, 2001) o que nos levou a estudar minuciosamente as condições experimentais desta etapa.

3.2.1 – EFEITO DO SOLVENTE

A reação modelo do intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) foi estudada (Esquema 7), visando verificar-se o efeito do solvente (Tabela 14) empregado sobre a formação do produto desejado. A substituição do solvente original, ácido acético, por clorofórmio e dimetilsulfóxido, acarretou no aumento do rendimento para 50 e 75%, respectivamente. Os resultados obtidos

experimentalmente sugerem uma correlação com dados descritos na literatura, onde emprego de solventes polares favorece a aproximação endo em reações Diels-Alder (GARCÍA, MAYORAL e SALVATELLA, 2000).



Esquema 7

Tabela 14 – Solventes utilizados na reação de hetero Diels-Alder e os respectivos rendimentos obtidos.

Solvente	% ^{a)}
Ácido acético	25
Clorofórmio	50
Dimetilsulfóxido	75

^{a)}% do derivado heterocíclico LASSBio 981 (**52**) produzido.

3.2.2 – CONSIDERAÇÕES ESTEREOQUÍMICAS ENVOLVIDAS EM REAÇÕES DIELS-ALDER

Na Figura 20 se encontram ilustrados alguns exemplos de reação Diels-Alder, que apresenta estreita similaridade com o sistema empregado na etapa-chave para a obtenção dos derivados **49-52**, destacando a importância da relação diastereoisomérica do dieno, da qual decorre a estereoquímica do aduto da reação de Diels-Alder (TROST e FLEMING, 1991).

Quando o dieno **86** reage com anidrido maleico (**66**) (Figura 20), através de aproximação *endo*, o aduto **87** obtido apresenta ambas as subunidades R₁ e R₄ em

orientação antiperiplanar aos átomos de hidrogênio α -carbonila, condição esta necessária para eliminação do grupo *N,N*-dimetilamino (MASON *et al.*, 2001) presente nos derivados **49-52**. No entanto, quando o anidrido maleico (**66**) reage com o dieno **88** (Figura 20), via aproximação *endo*, se observa que a subunidade R_4 se encontra em relação sinperiplanar ao átomo de hidrogênio α -carbonila **89**, interferindo sobre a cinética de eliminação do grupo *N,N*-dimetilamino, devido aos fatores geométricos e conformacionais associados ao processo.

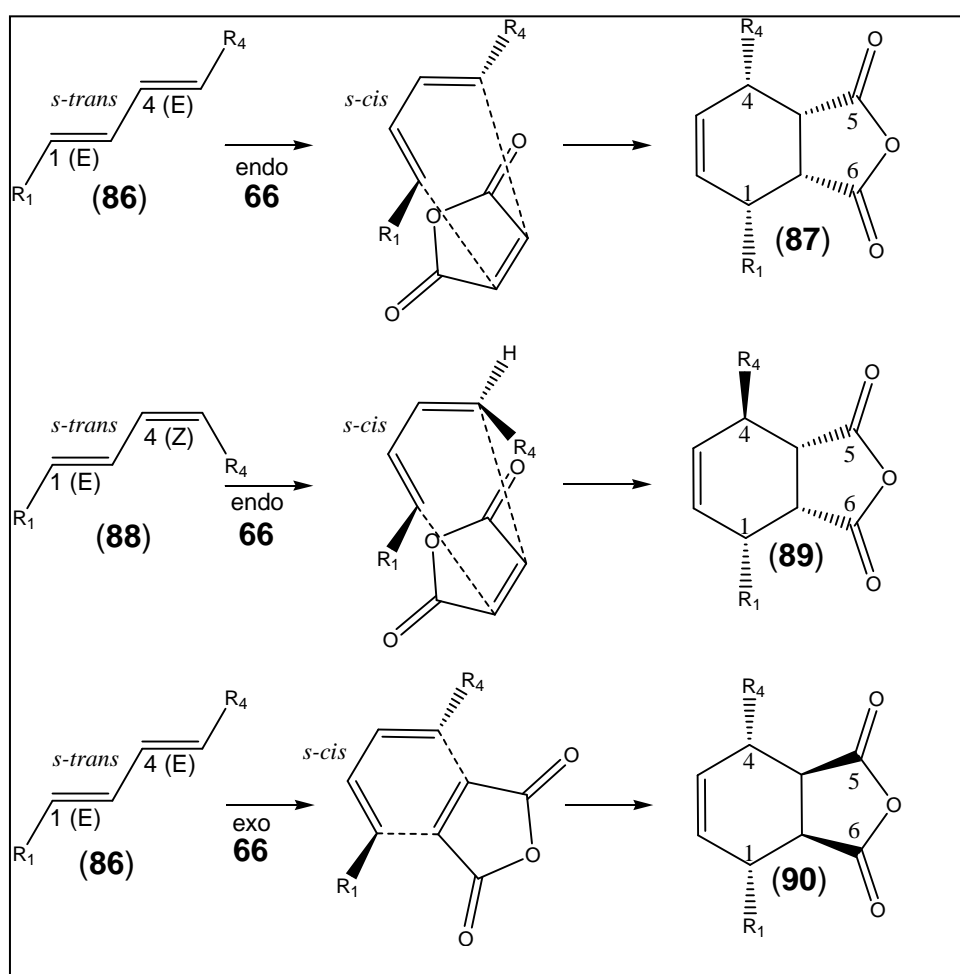


Figura 20 – Considerações sobre a estereoquímica do produto formado, face à diastereoisomeria do dieno e aproximação *endo/exo* (adaptado de Trost e Fleming, 1991).

Na terceira situação (Figura 20), o anidrido maleico (**66**) reage com o dieno **86** através de aproximação *exo*, fornecendo o aduto **90**, onde ambas as subunidades R₁ e R₄ se encontram com orientação sinperiplanar aquela dos átomos de hidrogênio α -carbonila (TROST e FLEMING, 1991).

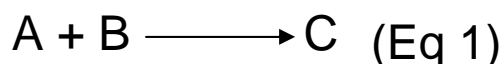
Pelo exposto, podemos concluir que entre as três vias analisadas, a única que favorece a formação dos derivados **49-52** é aquela que leva ao aduto **87** (Figura 20).

3.2.3 – ESTUDO DO ESTADO DE TRANSIÇÃO DA REAÇÃO DE HETERO DIELS-ALDER, ATRAVÉS DO EMPREGO DE MECÂNICA QUÂNTICA EM NÍVEL SEMI-EMPÍRICO AM1

Após os estudos experimentais, iniciamos um trabalho preliminar de modelagem molecular no intuito de se obter informações qualitativas frente às propostas de aproximações antecipadas pro Trost e Fleming (TROST e FLEMING, 1991), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico. Todos os cálculos foram realizados no vácuo, desta forma as comparações entre os dados obtidos através de cálculos teóricos e obtidos experimentalmente em solvente tem apenas caráter qualitativo.

Como ilustrado no Esquema 3, a velocidade v de uma reação (Eq 1) é proporcional a concentração dos reagentes e também é função de uma constante cinética k (Eq 2), que por sua vez, é relacionada a descritores físico-químicos. Na teoria do estado de transição, k da equação de Arrhenius (Eq 3) mantém estreita relação com a temperatura e pressão. A variação de energia livre ΔG^\ddagger (Eq 5) fornece a medida da altura da barreira de potencial que a reação deve transpor para

que a mesma se processe. A ΔG^\ddagger pode ser modulada por componentes entálpicos e entrópicos (JENNER, 2002; ISAACS, 1995).



$$v = - d[A]/dt = - d[B]/dt = d[C]/dt = k [A][B] \quad (\text{Eq 2})$$

$$k = A \exp(- E/RT) \text{ Equação de Arrhenius} \quad (\text{Eq 3})$$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (\text{Eq 4})$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (\text{Eq 5})$$

Neste ponto, vale ressaltar que o método de mecânica quântica em nível semi-empírico, não permite se obter a energia de ativação dos estados de transição objeto deste estudo, porque não é parametrizado para descrever componentes entrópicos (Eq 5). Desta forma, estaremos analisando as variações de calor de formação, que traduzem somente as contribuições entálpicas. Entretanto, se considerarmos que reações de Diels-Alder apresentam geometria no estado de transição relativamente organizada, o que lhes confere certa rigidez, podemos inferir que o termo entálpico deve prevalecer sobre o termo entrópico, no que diz respeito à sua estabilidade.

Antes da etapa de construção dos arquivos de entrada para traçarmos o perfil da reação e posterior cálculo do estado de transição, foi necessário realizarmos um estudo teórico prévio sobre os reagentes envolvidos, para compreender como se dará a sobreposição dos orbitais. Estes estudos foram efetuados através do emprego de mecânica quântica em nível semi-empírico AM1.

Neste contexto, a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) (Figura 21) foi submetida à otimização geométrica, seguido de análise conformacional sistemática. Sobre a conformação de menor energia foi efetuado cálculo de “single point”, a fim de analisarmos o coeficiente de contribuição dos átomos envolvidos na reação de Diels-Alder. Como mencionado anteriormente, foi observado que os rendimentos variaram em função do solvente empregado. Neste sentido, os cálculos foram realizados considerando as possibilidades de a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) se encontrar na forma neutra **56** e monoprotionada **91** (Tabela 15).

Tabela 15 – Cálculos teóricos sobre a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

	ΔH	LUMO
Neutra 56	6,43 Kcal/mol	-1,27 eV
Monoprotionada 91	179,21 Kcal/mol	-6,52 eV

Os valores de calor de formação obtidos indicam que só a forma neutra **56** e monoprotionada **91** são viáveis, com $\Delta H = 6,43$ Kcal/mol e $\Delta H = 179,21$ Kcal/mol, respectivamente. Em relação aos valores de LUMO, se observa que a forma monoprotionada **91** deve ser mais reativa por apresentar menor valor de orbital LUMO (-6,52 eV).

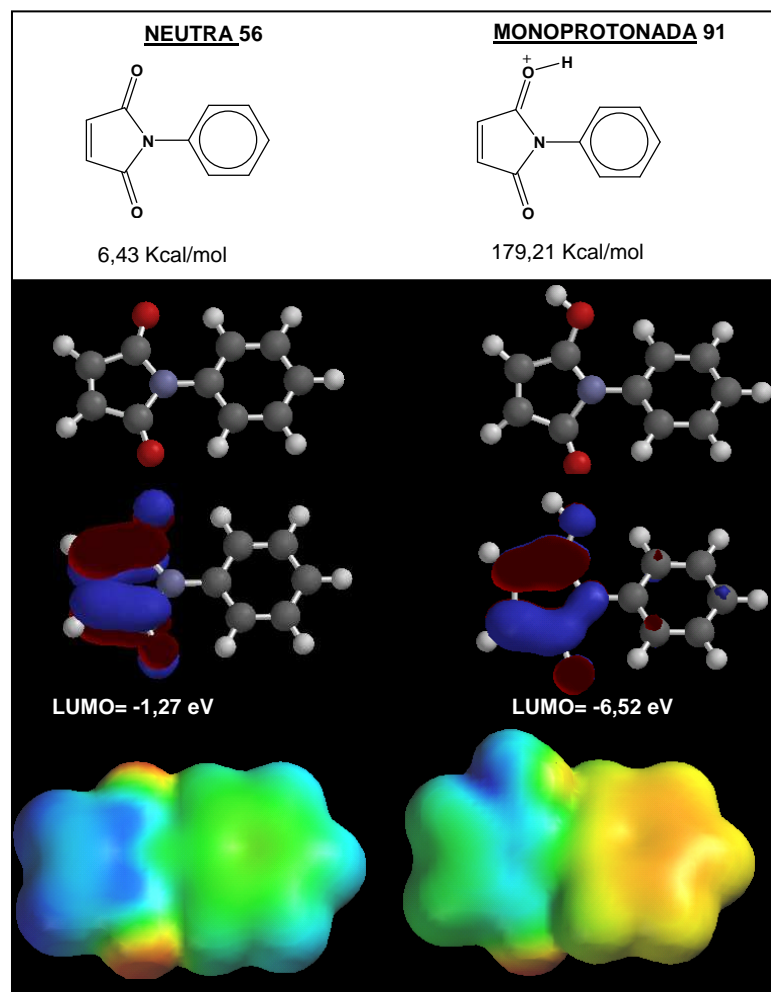


Figura 21 – Otimização geométrica e análise conformacional sistemática de **56** e **91**, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1; Cálculo de “Single-point” sobre a conformação de menor energia para o orbital LUMO; Mapas de potencial eletrostático sobreposto dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au³) de **56** e **91** demonstrados em uma faixa de -50,5 (vermelho) a 28,70 Kcal/mol (azul) para **56**, -44,80 (vermelho) a 157,50 Kcal/mol (azul) para **91** .

O emprego de ácidos, geralmente ácidos de Lewis, é uma estratégia utilizada com bastante frequência em reações de Diels-Alder de demanda normal, pois diminuiu a energia do orbital LUMO do dienófilo, o que leva ao aumento da velocidade da reação (TROST e FLEMING, 1991).

A mesma abordagem teórica foi efetuada para o *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**). O intermediário *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) também foi considerado sob a forma neutra e

protonada, além das formas tautoméricas *E* e *Z*, pois como ilustrado na Figura 22, diferenças diastereoisoméricas do dieno conduzem a produtos distintos, onde fatores geométricos e conformacionais podem interferir na cinética de eliminação do grupo *N,N*-dimetilamino.

Através da análise dos valores de calor de formação (Figura 22 e Tabela 16), novamente observamos que as formas neutras (*E*)-**57** e (*Z*)-**92** são mais estáveis, quando comparadas com as formas protonadas (*E*)-**93** e (*Z*)-**94**, por apresentarem valores de calor de formação menores. Em relação aos orbitais HOMO (Figura 22 e Tabela 16), as formas protonadas **93** e **94** diminuem os valores do orbital HOMO, o que torna o dieno menos reativo.

Tabela 16 – Cálculos teóricos sobre o intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) e **92-94** através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

	Calor de formação (<i>H</i>)	HOMO
Neutra (<i>E</i>)- 57	129,92 Kcal/mol	-8,46 eV
Neutra (<i>Z</i>)- 92	126,22 Kcal/mol	-8,75 eV
Protonada (<i>E</i>)- 93	290,32 Kcal/mol	-11,92 eV
Protonada (<i>Z</i>)- 94	285,29 Kcal/mol	-12,64 eV

Como mencionado anteriormente, em reações de Diels-Alder de demanda normal, a etapa determinante da velocidade é controlada pelo orbital HOMO_{dieno}. Desta forma, qualquer perturbação que aumente a diferença entre o orbital HOMO do dieno e orbital LUMO do dienófilo, diminuem a velocidade da reação. Através da Figura 22, podemos observar que o átomo de carbono C-4 do anel pirazólico apresenta maior coeficiente de contribuição no orbital HOMO.

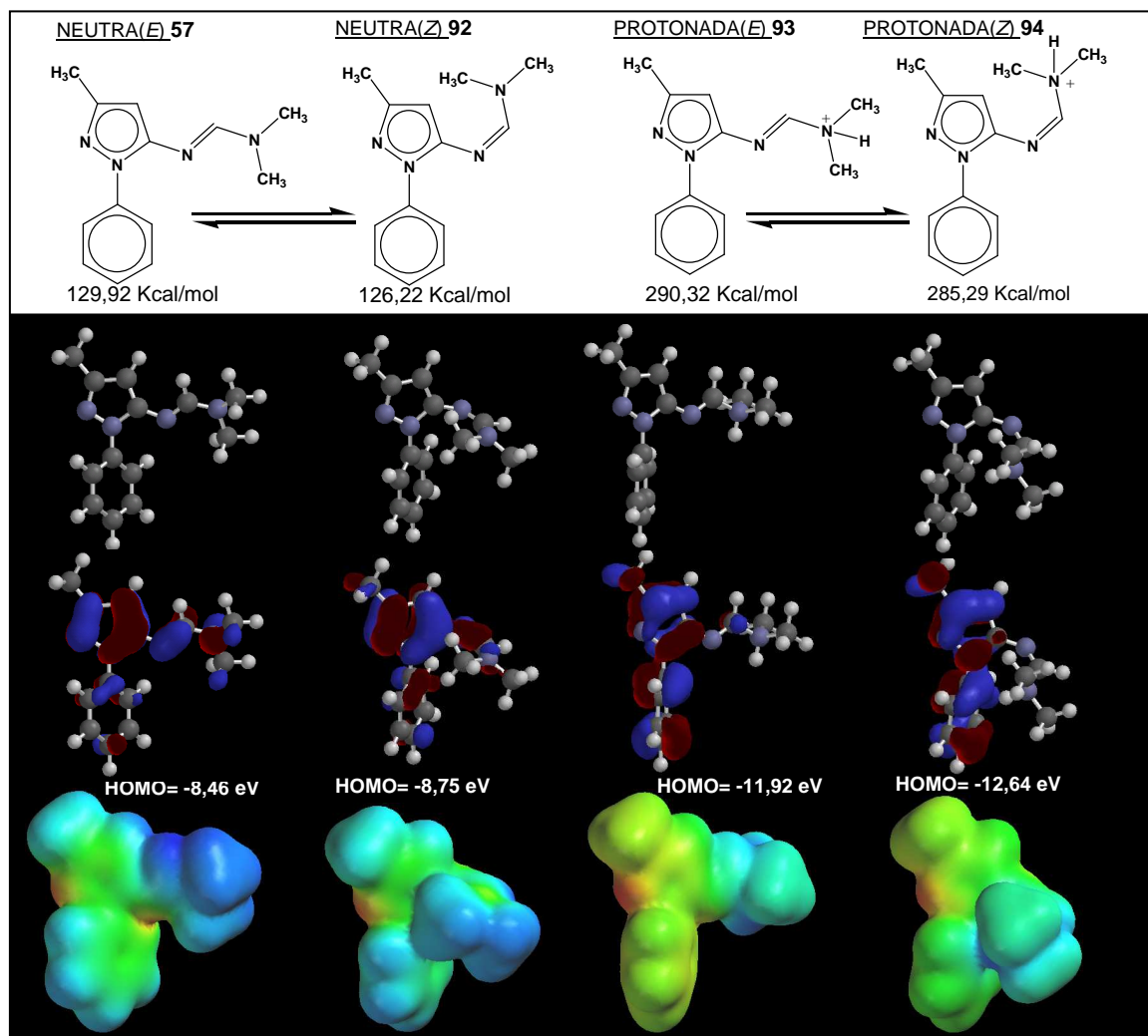


Figura 22 – Otimização geométrica e análise conformacional sistemática do intermediário-chave **57** e **92-94**, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1; Cálculo de “Single-point” sobre a conformação de menor energia para o orbital HOMO; Mapas de potencial eletrostático sobrepostos dentro da densidade eletrônica total (0,002 e/au³) do intermediário-chave **57** e **92-94** demonstrados em uma faixa de -65,2 (vermelho) a 27,4 Kcal/mol (azul) para **57**, -67,4 (vermelho) a 29,8 Kcal/mol (azul) para **92**, 3,4 (vermelho) a 147,5 Kcal/mol (azul) para **93** e 4,4 (vermelho) a 151,0 Kcal/mol (azul) para **94**.

Em relação aos diastereoisômeros (*E*) e (*Z*) (Figura 22 e Tabela 16), podemos observar que o diastereoisômero (*Z*), apresenta tanto para a forma neutra **92**, quanto para forma protonada **94**, sutis diferenças no calor de formação. A variação do calor de formação para os diastereoisômeros na forma neutra **57** e **92** é ca. 3,00 Kcal/mol e ca. 5,00 Kcal/mol para a forma protonada **93** e **94**.

Esta diferença de estabilidade pode ser interpretada em termos de efeito hiperconjugativo. Neste caso, no diastereoisômero (*Z*)-**92** os orbitais envolvidos na conjugação de densidade eletrônica apresentam a orientação adequada para que o par de elétrons do átomo de nitrogênio *N*-sp² contribua com densidade eletrônica para o orbital antiligante σ^* C-H, caracterizando efeito hiperconjugativo mais efetivo. No caso do diastereoisômero (*E*)-**57**, os orbitais não apresentam a orientação adequada e conseqüentemente não apresentam a estabilidade adicional decorrente do efeito hiperconjugativo.

Uma forma indireta de se caracterizar o efeito hiperconjugativo é através da análise do comprimento das ligações envolvidas no processo de hiperconjugação (WEINHOLD, 2001; POPHRISTIC e GOODMAN, 2001; SCHREINER, 2002). Quando ocorre efeito hiperconjugativo (Figura 23), a ligação entre os orbitais envolvidos na transferência de densidade eletrônica se torna mais curta e a ligação formada no lobo oposto do orbital antiligante que recebe a densidade eletrônica se alonga. Como podemos observar na Figura 23, o comprimento da ligação entre os orbitais envolvidos transferência de densidade eletrônica para o diastereoisômero (*Z*)-**92** é de 1,29 Å, um pouco menor, quando comparada com o diastereoisômero (*E*)-**57**, onde se observou comprimento de ligação igual 1,31 Å. Os comprimentos das ligações que aumentam sua densidade eletrônica, não apresentaram a correlação esperada, o que pode sugerir que o método de cálculo empregado, o método semi-empírico AM1, não é completamente parametrizado para descrever com precisão este tipo de interação.

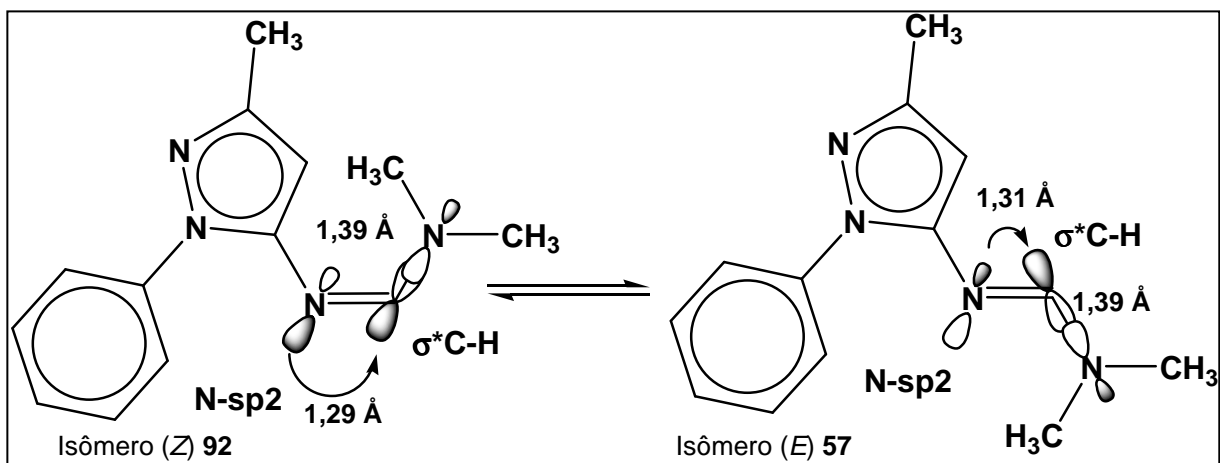


Figura 23 – Interpretação da maior estabilidade do diastereoisômero (*Z*) **92**, em termos de efeito hiperconjugativo, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico.

Uma vez que havíamos avaliado ambos os tautômeros, a próxima etapa foi avaliar a barreira energética envolvida na interconversão entre os mesmos. Muito embora em solução a tautomeria deva envolver a participação do solvente, principalmente em meio ácido, a fim de simplificar o método de cálculo empregado, abordamos a tautomeria em termos de rearranjo sigmatrópico 1,3, para a qual existe precedente na literatura (GU *et al.*, 2000; BHARATAM e KHANNA, 2004).

Como ilustrado na Figura 24, a proposta de rearranjo sigmatrópico 1,3 sugere que a tautomeria pode ocorrer. A conversão do tautômero **94** no tautômero **95** envolve barreira entálpica de ativação de 44,58 Kcal/mol. O tautômero **95**, que apresenta a dupla ligação deslocada sobre a subunidade *N,N*-dimetilamina, pode fazer com a ligação simples nitrogênio-carbono gire 180° para se converter no tautômero **96**, em processo que envolve entalpia de ativação 15,32 Kcal/mol, relativamente menor por não envolver estado de transição de quatro membros. O processo sigmatrópico 1,3 para a conversão de **96** em **93**, necessitou de entalpia de ativação de 61,58 Kcal/mol.

Através dos valores de entalpia de ativação obtidos nos cálculos, podemos concluir que estados de transição de quatro membros envolvem entalpia de ativação mais elevadas, porque são estados de transição bastante tensionados. A tautomeria em solução e ácido catalisada deve envolver barreiras de entalpia de ativação menores do que as obtidas através de cálculo, uma vez que estados de transição de quatro membros não devem estar envolvidos no processo.

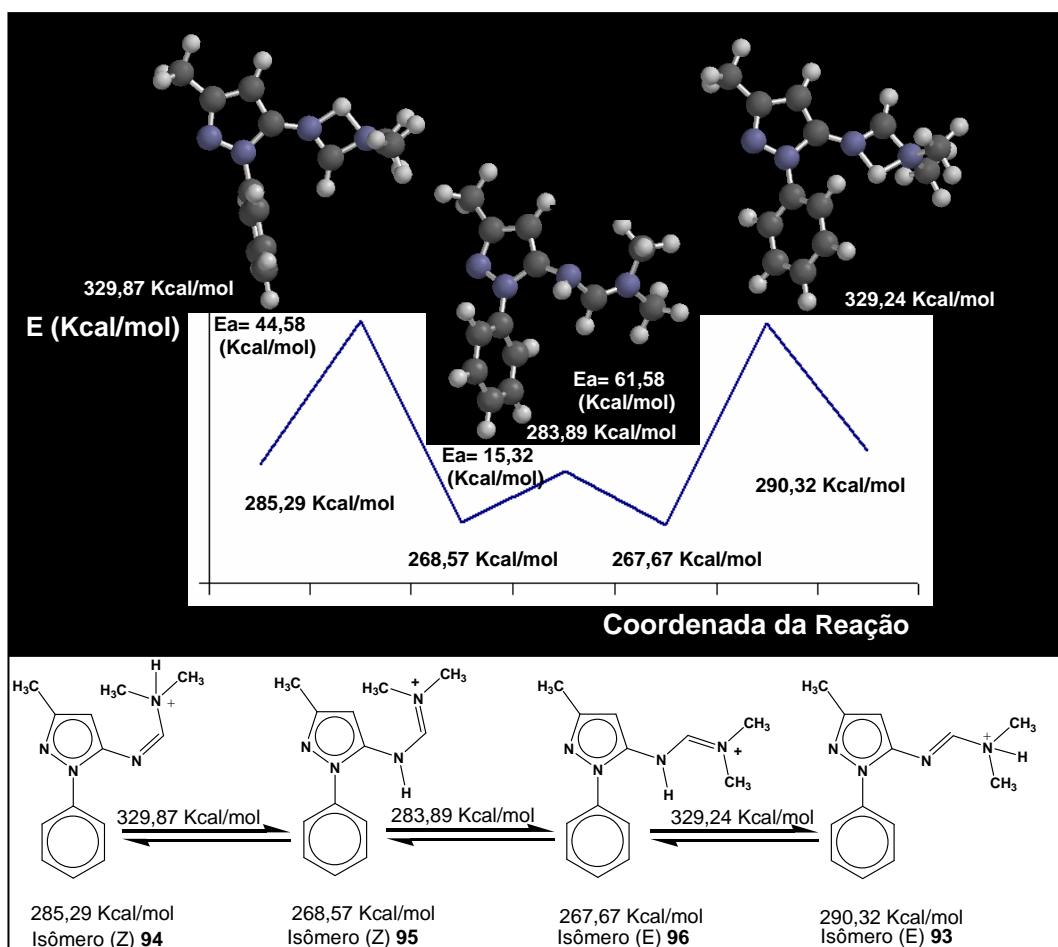


Figura 24 – Rearranjo sigmatrópico 1,3 para interconversão entre os isômeros protonados (E)-93 e (Z)-94, através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

Como os resultados experimentais haviam demonstrado que através de condições de solvente polar aprótico e em meio neutro a reação entre o intermediário *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (57) e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (56) resultou na obtenção de melhor rendimento (75

%), iniciamos o estudo de estado de transição buscando condições que mais se aproximassem daquelas observadas experimentalmente (KAZLAUSKAS, 2001).

Neste contexto (Figura 25), empregamos a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) na forma neutra **56** e o *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) na forma tautomérica *E*, com aproximação *endo*. Através deste cálculo obtivemos estado de transição assincrônico, com barreira entálpica de 27,29 Kcal/mol. Muito embora estados de transição assincrônicos sejam descritos na literatura (SAETTEL *et al.*, 2002), sua confirmação requer caracterização experimental, a fim de se descartar que não seja uma limitação do método empregado no estudo. Através da Figura 25, é possível se observar que a ligação que está sendo formada com o átomo de carbono quatro do anel pirazólico que apresenta maior coeficiente de contribuição no orbital HOMO apresenta comprimento de 1,95 Å. Já a outra ligação simples em formação, apresenta comprimento de 2,59 Å.

A geometria deste estado de transição conduz ao aduto de Diels-Alder que apresenta a orientação adequada para que ocorra a eliminação do grupo *N,N*-dimetilamino.

Como ilustrado na Figura 20, foi possível prever que o aduto de Diels-Alder decorrente da reação entre a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) na forma neutra **56** e o *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) na forma do tautômero (*Z*)-**92**, com aproximação *endo* (Figura 27), não apresenta a orientação adequada para favorecer a eliminação do grupo *N,N*-dimetilamino.

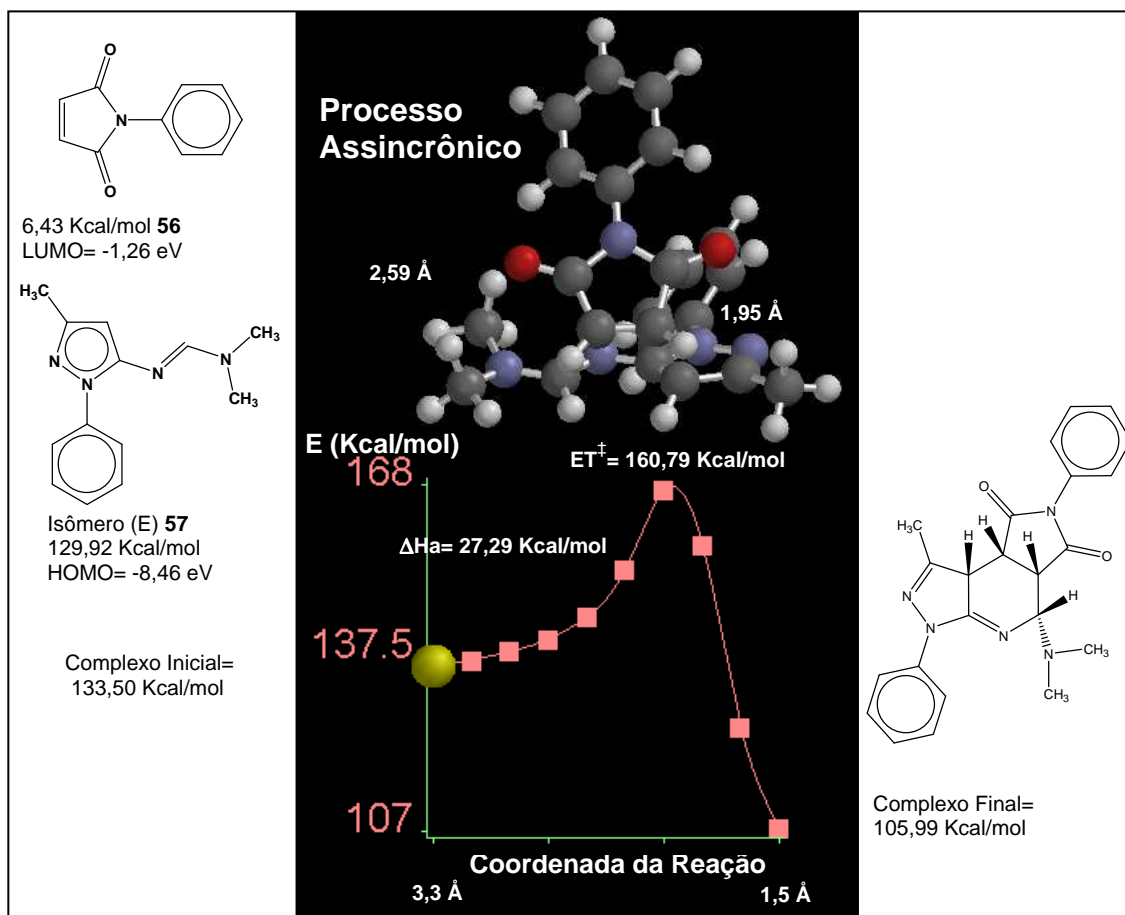


Figura 25 – Cálculo de estado de transição para a reação hetero Diels-Alder 4+2, com aproximação endo, envolvendo o intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), isômero *E* **57** e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

Entretanto, como já havíamos evidenciado que o processo tautomérico é passível de ocorrer, restava saber qual seria a barreira entálpica da reação hetero Diels-Alder. Estes dados permitiriam inferir se poderíamos estar observando um processo competitivo, em meio ácido, no qual os fatores geométricos e conformacionais estariam interferindo sobre a cinética da reação.

O estado de transição (Figura 26) obtido também se mostrou assincrônico, apresentando barreira de entalpia de ativação de 31,81 Kcal/mol, bastante semelhante ao processo anterior 27,29 Kcal/mol.

Face ao valor de entalpia de ativação ser bastante próximo, é provável que em meio ácido, esteja havendo competição entre os diastereoisômeros.

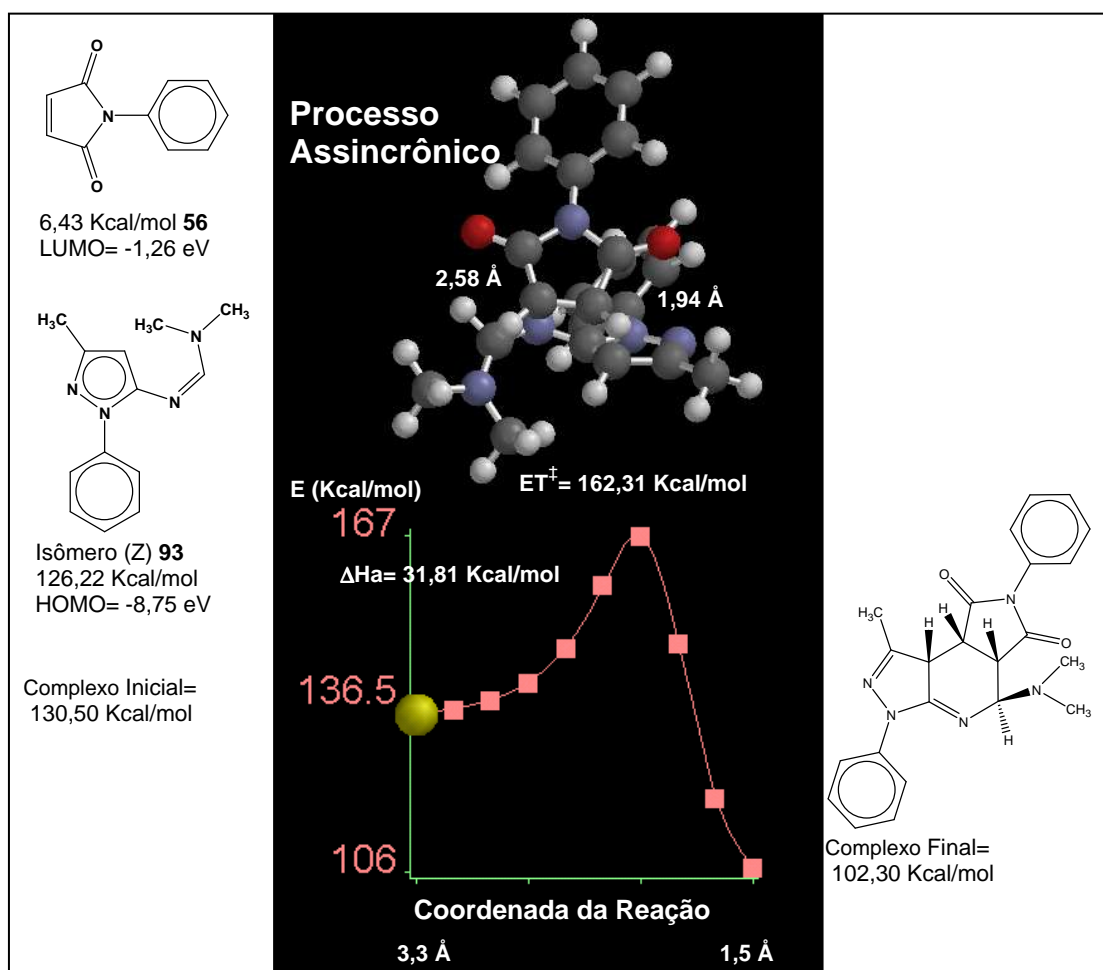


Figura 26 – Cálculo de estado de transição para a reação hetero Diels-Alder 4+2, com aproximação endo, envolvendo o intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), isômero *Z* **92** e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

Ao considerarmos que a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) na forma neutra **56** e o *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) na forma do tautômero **57**, com aproximação *exo* (Figura 27), também poderiam estar acontecendo, poderiam resultar em outros processos competitivos, no qual a geometria do aduto de Diels-Alder não apresentaria a orientação adequada para a eliminação do resíduo *N,N*-dimetilamino.

Quando avaliamos o valor da barreira de entalpia de ativação obtido (25,10 Kcal/mol) (Figura 27), podemos constatar sua semelhança com aquelas obtidas nos outros processos discutidos previamente.

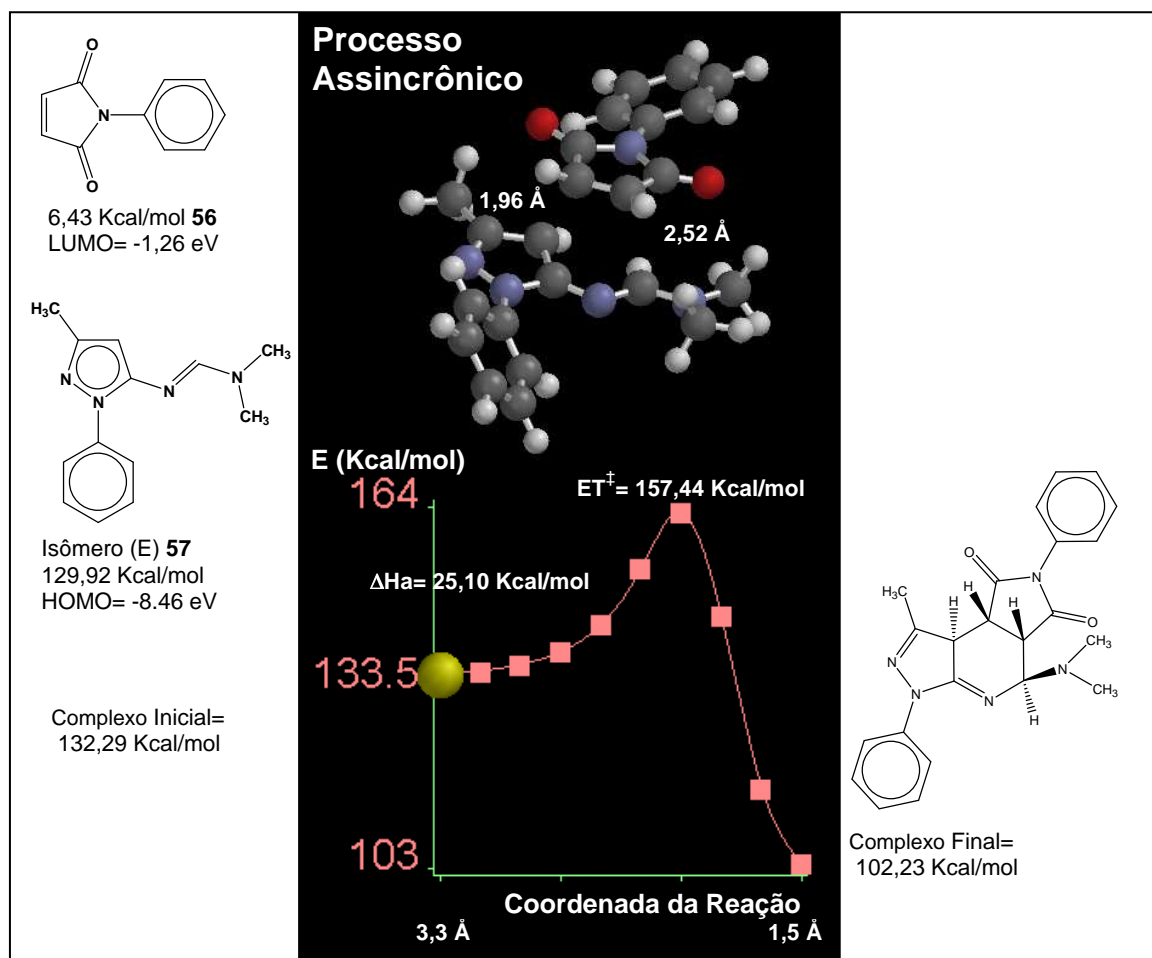


Figura 27 – Cálculo de estado de transição para a reação hetero Diels-Alder 4+2, com aproximação exo, envolvendo o intermediário-chave *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), isômero E **57**, e 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**), através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1.

Os dados obtidos através de cálculo teórico (Tabela 17) apresentam boa correlação com as observações discutidas na Figura 20, permitindo a predição da estereoquímica do produto formado, uma vez que as barreiras entálpicas obtidas apresentam valores bastante próximos. Neste caso, somente a reação onde empregamos a 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona (**56**) na forma neutra **56** e o *N,N*-dimetil-1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**) na forma do

tautômero **57**, conduzem ao produto que atende a fatores geométricos e conformacionais necessários à eliminação do grupo *N,N*-dimetilamino. Por outro lado, o tautomerismo catalisado por ácido, pode favorecer processos competitivos, que desfavorecem a formação do produto desejado.

Através da análise das entalpias de formação dos produtos, podemos observar que os três processos estudados apresentam caráter exotérmico (ΔH_{rxn}), ca. - 30,00 Kcal/mol. Segundo o postulado de Hammond, reações exotérmicas apresentam estado de transição adiantado, com geometria que se assemelha ao material de partida (HAMMOND, 1954).

Tabela 17 – Perfil das reações de hetero Diels-Alder estudadas através de Mecânica Quântica em nível semi-empírico.

Reação	57 + 56 (endo)	93 + 56 (endo)	57 + 56 (exo)
Inicial (Kcal/mol)	133,50	130,50	132,29
ET [‡] (Kcal/mol)	160,79	162,31	157,44
Final (Kcal/mol)	105,99	102,30	102,23
ΔH_a (Kcal/mol)	27,29	31,81	25,10
ΔH_{rxn} (Kcal/mol)	-27,51	-28,20	-30,06

Calculado $\Delta H_a = H(ST^{\ddagger}) - H(\text{complexo inicial})$

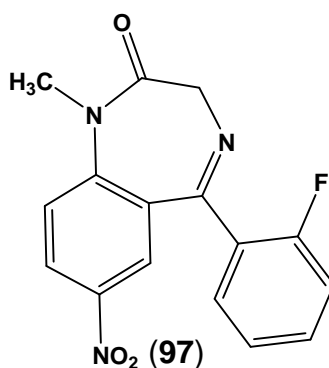
Calculado $\Delta H_{rxn} = H(\text{complexo final}) - H(\text{complexo inicial})$

3.3 - RESULTADOS FARMACOLÓGICOS

3.3.1 - ENSAIO DE “BINDING” DOS DERIVADOS LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**)

Inicialmente, os novos derivados heterotricíclicos LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) foram submetidos a ensaios preliminares de “binding”, através do emprego de ca. de 200 μg de proteína (preparação bruta de sinaptossoma de cérebro de rato) foram incubadas por 90 minutos a 4°C na presença de [³H]-flunitrazepam (**97**) 0,2nM, KREBS-Tris (pH 7,2 a 25°C) e concentrações crescentes

de agente competidor (flunitrazepam (**98**) não radioativo) ou das molécula testada, LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**).



Este ensaio permitiria validarmos o planejamento estrutural, uma vez que se avaliaria a capacidade das substâncias **49** e **50** serem reconhecidas pelo receptor GABA_A, inferido através do deslocamento de um radioligante conhecido. Contudo, devido a ausência de solubilidade dos novos derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) no meio em que o ensaio é realizado, não foi possível validarmos o planejamento estrutural através deste bioensaio. As tentativas para obtenção dos correspondentes cloridratos, tartaratos e citratos, que em tese seriam mais solúveis em meio aquoso, não lograram sucesso.

3.3.2 – INFLUÊNCIA DOS DERIVADOS LASSBio 872 (**49**) E LASSBio 873 (**50**) SOBRE O TEMPO DE HIPNOSE INDUZIDA PELO SAL SÓDICO DO PENTOBARBITAL (**4**)

Na tentativa de contornarmos as limitações encontradas nos ensaios *in vitro*, a etapa subsequente envolveu a avaliação do perfil central dos novos derivados heterotricíclicos **49-52** em modelos farmacológicos *in vivo*.

Neste contexto, o modelo de “sleeping time” (Gráfico 4) foi o primeiro ensaio eleito a fim de se avaliar as propriedades hipnótico-sedativas dos derivados

LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**). Neste ensaio se avalia a influência dos compostos bioativos na duração da hipnose induzida pelo sal sódico do pentobarbital (**4**). Neste ensaio foram empregados camundongos (n=10) por dose, doses crescentes (1, 2, 4, 6 e 10 mg/Kg) do derivado LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) e DMSO como veículo, administradas por injeção via *i.p.*. Após trinta minutos, foi administrada a injeção *i.v.* do sal sódico do pentobarbital (**4**), na dose de 25 mg/Kg e posteriormente se avaliou a duração da hipnose, bem como perda do reflexo e postura.

Através da análise de curva dose-resposta (Gráfico 4), que relaciona o tempo de hipnose a doses crescentes dos derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**), se observou que tanto o LASSBio 872 (**49**) quanto o LASSBio 873 (**50**) apresentaram a habilidade de prolongar o tempo de duração da hipnose induzida pelo pentobarbital (**4**), com concentração efetiva 50% (EC_{50}) igual a 4,3 mg/Kg (11,1 μ mol/Kg) e 3,1 mg/Kg (7,7 μ mol/Kg), respectivamente. Na dose de 6 mg/Kg, o derivado LASSBio 872 (**49**), que apresenta maior coeficiente de partição ($\text{Log } P=3,28$) atingiu o efeito máximo, aumentando o tempo de hipnose do controle de $41 \pm 17,4$ min para $90,9 \pm 5,1$ min. Na mesma dose do derivado LASSBio 873 (**50**), que apresenta $\text{Log } P=2,47$, aumentou o tempo de duração da hipnose de $162,7 \pm 25,8$ min, *ca.* de quatro vezes o tempo do controle. Os resultados farmacológicos obtidos neste bioensaio não apresentaram correlação direta entre o coeficiente de partição e atividade hipnótica observada, sugerindo que o efeito hipnótico deve estar relacionado aos aspectos farmacodinâmicos do reconhecimento pelo biorreceptor envolvido.

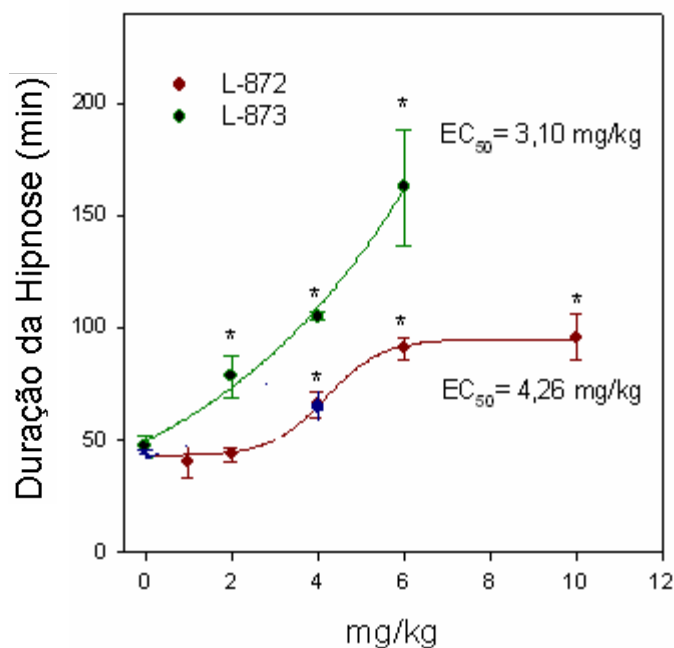


Gráfico 4 – Efeito do LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) na duração do efeito hipnótico do sal sódico do pentobarbital (**4**). Cada ponto representa a média \pm EPM. N=10 camundongos por dose. *P<0,05 quando comparado ao controle (tratamento com DMSO).

Estes resultados sugerem que os novos derivados **49** e **50** podem estar sendo reconhecidos por receptores GABAérgicos, principal via inibitória no SNC de mamíferos, uma vez que os mesmos foram capazes de aumentar o tempo de hipnose induzida pelo sal sódico do pentobarbital (**4**).

3.3.3 – AVALIAÇÃO DO TEMPO DE HIPNOSE INDUZIDA PELOS DERIVADOS LASSBio 872 (**49**) E LASSBio 873 (**50**)

Uma vez que se observou que os derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) apresentaram efeito sinérgico frente a hipnose induzida por pentobarbital (**4**) sugerindo a participação de receptores GABAérgicos, ambos os compostos foram administrados, isoladamente para se avaliar seus efeitos hipnóticos em camundongos (Gráfico 5). Neste ensaio foram empregados camundongos (n=10)

por dose, doses crescentes dos derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) (25 a 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), empregando DMSO como veículo, administradas por injeção via *i.v.*. Através das medidas de percentual da duração da hipnose foi calculada a dose que promoveu hipnose em 50% dos animais testados (DH_{50}), sendo igual 105,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para o LASSBio 872 (**49**) e 42,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para o LASSBio 873 (**50**). Desta forma, podemos concluir que LASSBio 873 (**50**) se apresenta como o derivado mais potente em prolongar o tempo de hipnose induzida pelo pentobarbital (**4**) assim como em induzir hipnose o que sugere a participação de receptores GABAérgicos.

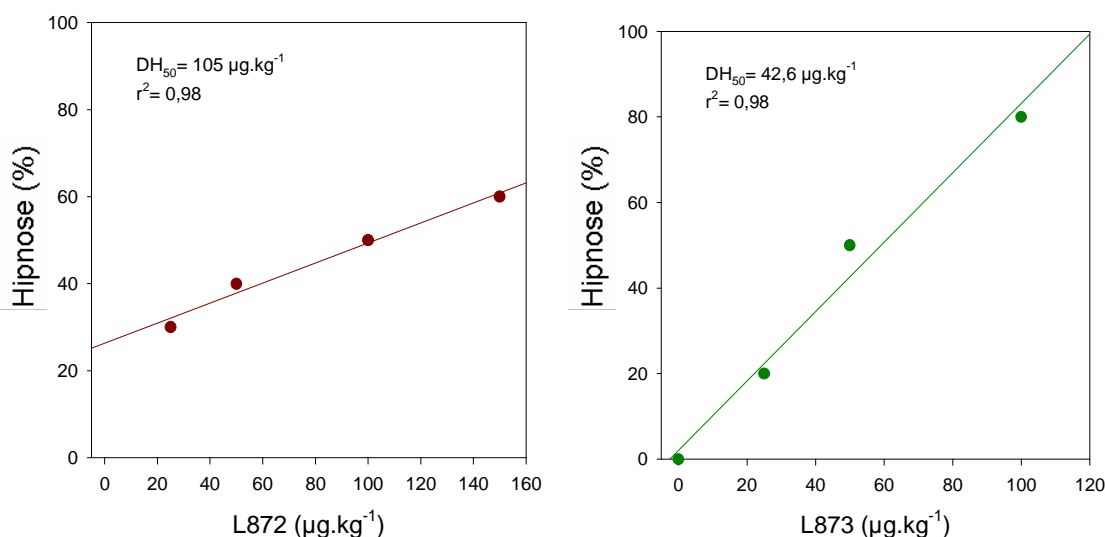


Gráfico 5 – Hipnose induzida pela injeção *i.v.* de LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) em camundongos.

Como ilustrado no Gráfico 6, o efeito hipnótico observado para ambas as substâncias é dose dependente. Desta forma, através da análise do Gráfico 6, podemos observar que o derivado LASSBio 872 (**49**) apresentou duração de $26,1 \pm 5,2$ e $53,7 \pm 9,3$ segundos nas doses de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Resultados semelhantes também foram obtidos para o derivado LASSBio 873 (**50**), onde se observou que o tempo de duração de hipnose foi de $27,9 \pm 8,4$ e $49,6 \pm 3,9$ segundos nas doses de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente.

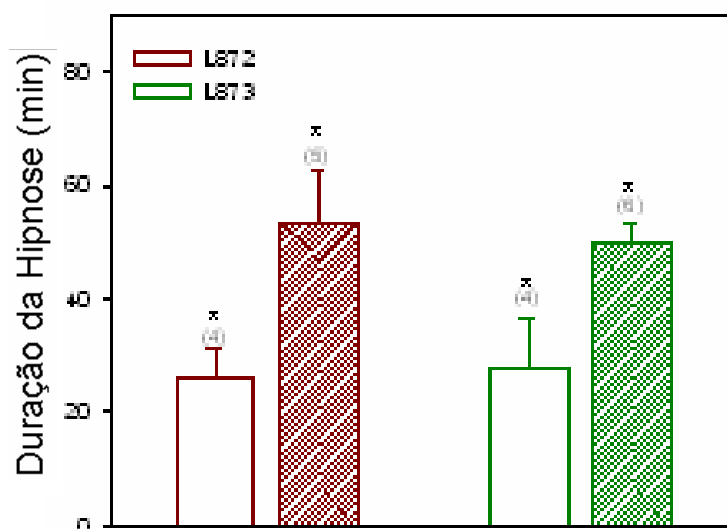


Gráfico 6 – Duração da hipnose dose dependente induzida pela injeção *i.v.* de LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) em camundongos. O número de camundongos utilizados está apresentado entre parênteses. *P<0,05 quando comparado com a dose de 25 µg/Kg .

3.3.4 – AVALIAÇÃO DO PERFIL CONVULSIVANTE DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) E LASSBio 873 (50)

Durante o curso dos experimentos farmacológicos relatados acima foi observado que quando se modificava a via de administração dos derivados LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) de *i.p.* para *i.v.*, os animais passavam a apresentar convulsões. Como mencionado anteriormente, é descrito na literatura por Seighart (1995) que os receptores GABA_A podem ser modulados por ligantes que podem induzir convulsões. Adicionalmente, estes receptores também se mostram sensíveis à atividade intrínseca dos ligantes (GRUPTA, 1995; WOLFF, 1997; CHEBIB e JOHNSON, 2000; WILLIAMS e LEMKE, 2002). No entanto, as razões que levaram à indução de convulsões após a mudança da via de administração ainda não estão completamente compreendidas, mas podem estar relacionadas à quantidade de substância livre na biofase.

Uma vez observado o perfil convulsivante, foram determinadas as doses que promovem convulsões em 50% dos animais testados (DC_{50}) (Gráfico 7) para os derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**). Estas foram identificadas como sendo iguais a 61,0 e 74,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Como conclusões parciais dos resultados até então obtidos, podemos inferir que LASSBio 873 (**50**) apresenta perfil mais hipnótico (42,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) do que convulsivante (74,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), já que a DH_{50} observada é menor do que a DC_{50} . Por outro lado, o derivado LASSBio 872 (**49**) apresenta perfil pró-convulsivante, pois a DC_{50} (61,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) é menor do que a DH_{50} (105,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), estando estas respostas possivelmente evocando receptores GABAérgicos.

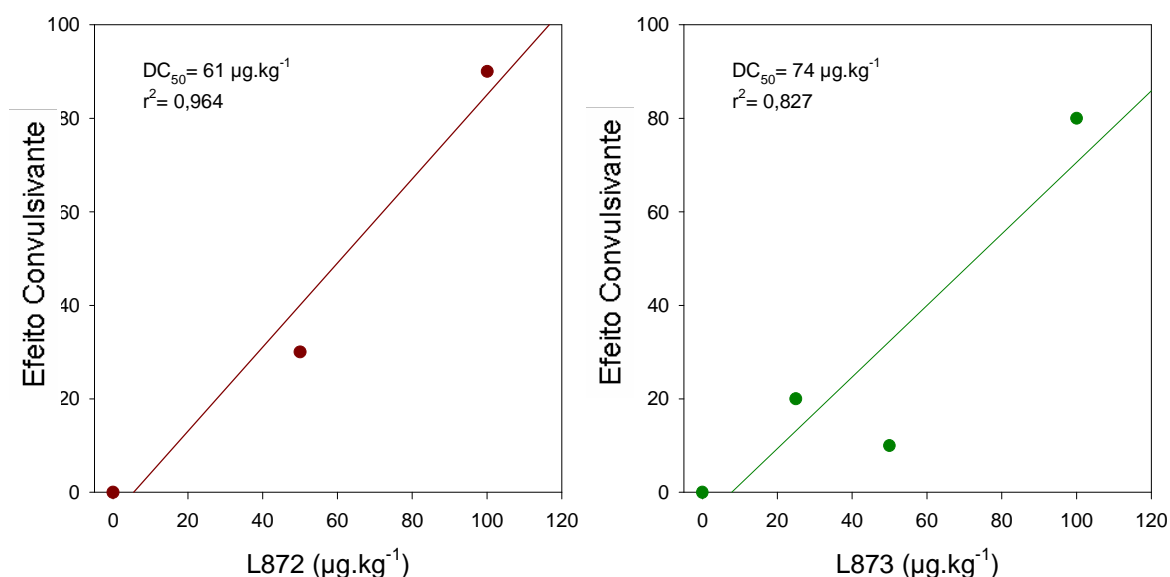


Gráfico 7 – Convulsão induzida pela injeção *i.v.* de LASSBio 872 (**49**) e LASSBio (**50**) em camundongos.

O comportamento farmacológico de LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) se tornou mais evidente através da análise do registro do eletroencefalograma obtido (Figura 28) após a administração de doses de LASSBio 872 (**49**) inferiores a DC_{50} , *i.e.* 40,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, quando o rato passa a manifestar convulsões.

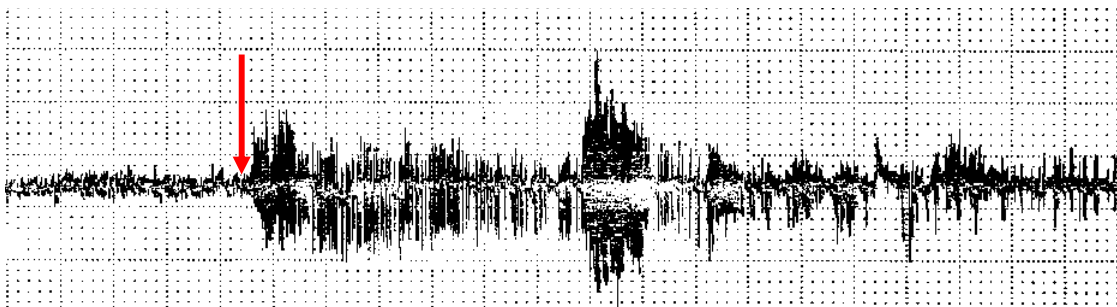


Figura 28 – Registro do Eletroencefalograma (EEG) em rato antes e após injeção de 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ i.v. de LASSBio 872 (49) em ratos. O animal foi anestesiado com opióide e curarizado com atropina.

3.3.5 – AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTINOCICEPTIVO DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49), LASSBio 873 (50), LASSBio 980 (51) E LASSBio 981 (52) NO ENSAIO DA PLACA QUENTE

Face ao tropismo dos derivados LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) pelo SNC, confirmado nos ensaios anteriores, outro modelo farmacológico foi eleito para se avaliar as possíveis propriedades centrais que não poderiam ser observadas através dos modelos até então estudados.

Neste contexto, o teste da placa quente, desenvolvido por Jacob e Ramabadrán, foi empregado com o intuito de avaliar os efeitos analgésicos centrais destas substâncias identificadas nos fármaco protótipo zolpidem (6) (JACOB e RAMABADRAN, 1978). Neste ensaio foram empregados camundongos (n=10) por dose, temperatura da placa a 52°C, doses crescentes dos derivados LASSBio 872 (49), LASSBio 873 (50), LASSBio 980 (51) e LASSBio 981 (52) (0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 mg/Kg), e DMSO como veículo, administradas por injeção via *i.p.*. Os tempos de permanência sobre a placa quente foram registrados nos intervalos 0, 5, 15, 30, 40, 60, 90, 105 e 120 minutos. O tempo máximo de permanência na placa é de trinta e cinco segundos para que não haja lesão dos animais. Quando os animais foram pré-

tratados apenas com DMSO os mesmos permaneceram na placa por $13,9 \pm 1,26$ segundos.

Como observado no Gráfico 8, o derivado LASSBio 872 (**49**) na dose de 6 $\mu\text{g/Kg}$ ($15,5 \mu\text{mol/Kg}$), atingiu praticamente o efeito máximo no ensaio em questão, após quinze minutos, caracterizando, assim, que além das propriedades hipnóticas observadas anteriormente, este derivado apresenta potentes propriedades analgésicas.

O efeito analgésico observado quando associado ao efeito convulsivante identificado anteriormente durante a administração *i.v.*, pode sugerir perfil semelhante àqueles dos opióides. De fato, é descrito na literatura que a morfina (**3**) em determinadas doses, além do efeito analgésico apresenta efeito convulsivante, semelhante ao observado para LASSBio 872 (**49**) (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). Para avaliarmos a hipótese onde o derivado LASSBio 872 (**49**) poderia estar sendo reconhecido por receptores opióides, avaliamos, no ensaio da placa quente, os efeitos da naloxona (**98**), um antagonista opióide inespecífico, uma vez que são descritos pelo menos 5 subtipos (Tabela 18) de receptores opióides (STEFANO *et al.*, 2000).

Tabela 18 – Subtipos de receptores opióides (adaptado de Stefano *et al.*, 2000).

Subtipo de receptor		Ligante
μ	$\mu 1$	Morfina e encefalinas
	$\mu 2$	Morfina
	$\mu 3$	Alcalóides opióides
δ	$\delta 1$	Encefalinas
	$\delta 2$	Met-encefalinas
κ	κ	Cetociclazocina e dinorfina
ϵ	ϵ	β -Endorfina
σ	σ	(+)- <i>N</i> -Alilnormetazocina

Quando os camundongos foram pré-tratados (Gráfico 8) com 1 mg/Kg de naloxona (**99**), se observou redução para 80% do efeito analgésico do derivado LASSBio 872 (**49**), após cinco minutos. Ao se aumentar a dose de naloxona (**99**) para 2 mg/Kg se observou redução do efeito analgésico para 50%, após cinco minutos. Estes resultados indicam que a atividade analgésica de LASSBio 872 (**49**) pode estar sendo mediada por receptores opióides, uma vez que a co-administração do antagonista opióide inespecífico naloxona (**99**) reduz significativamente a atividade analgésica de **49**.

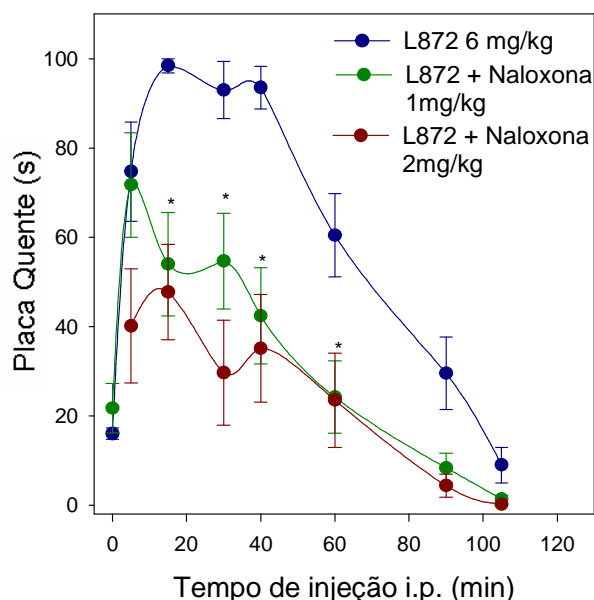
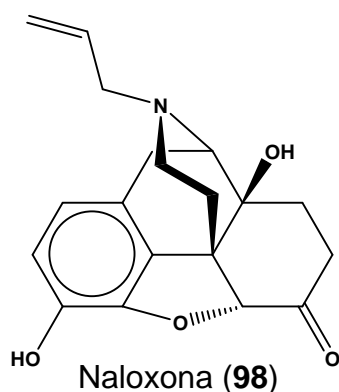


Gráfico 8 – Analgesia induzida pela injeção *i.p.* de LASSBio 872 (**49**) sem (azul) e com (verde e vermelho) pré-tratamento com naloxona (**98**) em camundongos.

O derivado LASSBio 873 (**50**) (Gráfico 9), no mesmo ensaio, também apresentou atividade analgésica em torno de 60% na dose de 2 mg/Kg (5,0 $\mu\text{mol/Kg}$), apresentando seu efeito máximo após *ca.* dez minutos. Com o aumento da dose para 4 mg/Kg (10,0 $\mu\text{mol/Kg}$), houve aumento da atividade analgésica para *ca.* 75% e o efeito máximo foi observado após quarenta minutos. Novamente, quando os camundongos foram pré-tratados com 1 mg/Kg de naloxona (**98**), se observou redução do efeito analgésico para 20% após cinco minutos, quando do derivado LASSBio 873 (**50**) foi usado na dose de 2 mg/Kg. Contudo, quando o derivado LASSBio 873 (**50**) foi usado na dose de 4 mg/Kg, o efeito analgésico foi reduzido para 40% após 20 minutos, quando os animais foram pré-tratados com 1 mg/Kg de naloxona (**98**).

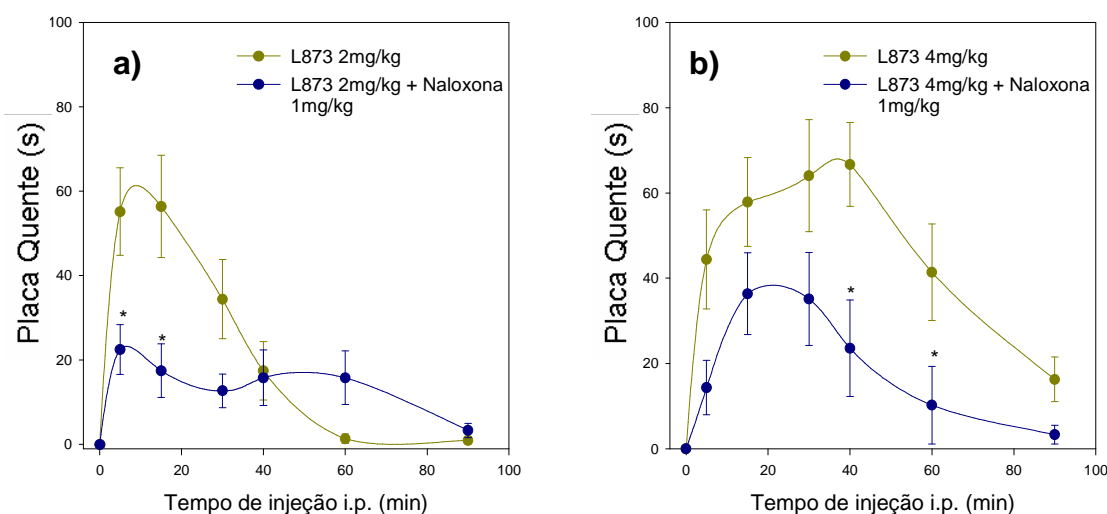


Gráfico 9 – a) Analgesia induzida pela injeção *i.p.* de LASSBio 873 (**50**) na dose de 2 mg/Kg; b) Analgesia induzida pela injeção *i.p.* de LASSBio 873 (**50**) na dose de 4 mg/Kg, sem (amarelo) com (azul) pré-tratamento com naloxona (**98**) em camundongos.

O derivado LASSBio 980 (**51**) (Gráfico 10), que apresenta padrão de substituição na subunidade fenila igual a do protótipo zolpidem (**6**)⁴, apresentou atividade analgésica ca. 85% na dose de 4 mg/Kg (10,8 μ mol/Kg), apresentando efeito máximo após trinta minutos, tendo sido identificado como o segundo mais ativo da série. O pré-tratamento com 1 mg/Kg de naloxona (**98**) acarretou em redução para ca. 20% da atividade analgésica, após trinta minutos.

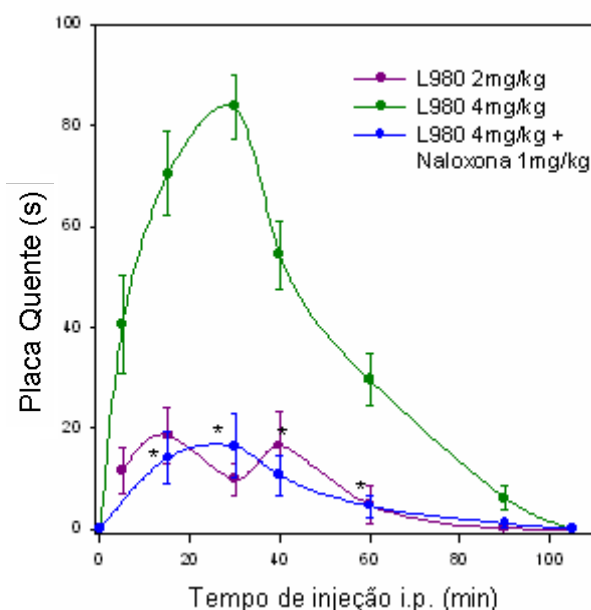


Gráfico 10 – Analgesia induzida pela injeção *i.p.* de LASSBio 980 (**51**) sem (verde e vermelho) ou com (azul) pré-tratamento com naloxona (**98**) em camundongos.

Por sua vez, o derivado LASSBio 981 (**52**) que é a substância de referência para se avaliar os efeitos eletrônicos (σ), estéricos (RM) e de lipossolubilidade (π) dos substituintes (Cl **49**, NO₂ **50**, CH₃ **51** e H **52**), apresentou atividade, ca. 65,% na dose de 6 mg/Kg (16,9 μ M), apresentando efeito máximo após trinta minutos. O pré-

⁴ Muito embora o zolpidem (**6**) tenha entrado no Mercado Farmacêutico à ca. de dez anos, não há qualquer menção na literatura sobre o mecanismo de ação da atividade analgésica observada, nem sobre seu comportamento frente aos receptores opióides.

tratamento com 1 mg/Kg de naloxona (**98**) acarretou em redução para ca. 20% da atividade analgésica, após quinze minutos.

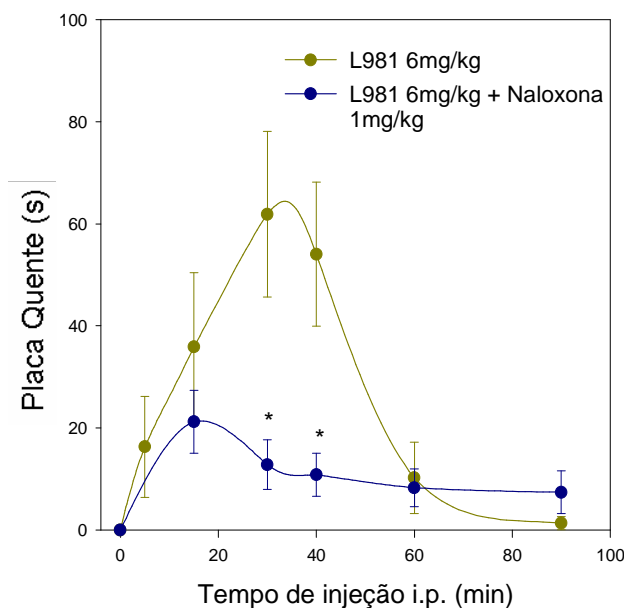


Gráfico 11 – Analgesia induzida pela injeção *i.p.* de LASSBio 981 (**52**) sem (amarelo) ou com (azul) pré-tratamento com naloxona (**98**) em camundongos.

3.3.5.1 – RELAÇÃO ESTRUTURA QUÍMICA ATIVIDADE ANALGÉSICA OBSERVADA PARA OS DERIVADOS **49-52**

Na Tabela 19 se encontram descritos os percentuais de atividade antinociceptiva em função dos tempos nos quais as leituras foram tomadas. Estes dados sugerem que no caso da atividade antinociceptiva os fatores farmacocinéticos parecem prevalecer frente aos fatores farmacodinâmicos. Neste contexto, podemos observar correlação entre os valores de coeficiente de partição e o tempo através do qual o efeito máximo foi observado, onde o derivado LASSBio 872 (**49**) com Log $P=3,28$ apresentou seu efeito máximo *i.e.* ~100% em quinze minutos, enquanto o derivado LASSBio 873 (**50**) com Log $P= 2,47$ apresentou efeito máximo de 75% em quarenta minutos. Isto parece traduzir que o efeito do átomo de halogênio presente

em **49** auxilia o mesmo a transpor a barreira hemato-encefálica, através do aumento da lipossolubilidade.

Por outro lado, não observamos correlação linear em termos de valores de coeficiente de partição e atividade farmacológica, pois o derivado LASSBio 873 (**50**) que possui efeito antinociceptivo intermediário (ca. 75%) apresenta menor valor de coeficiente de partição (Log $P= 2,47$).

Através da Tabela 19 também podem ser observadas diferenças quanto à redução da atividade antinociceptiva em função do tempo, o que pode estar traduzindo diferenças quanto ao perfil de metabolismo dos derivados LASSBio 872 (**49**), LASSBio 873 (**50**), LASSBio 980 (**51**) e LASSBio 981 (**52**).

Tabela 19 – Correlação das curvas dose-resposta do efeito antinociceptivo para os derivados LASSBio 872 (**49**), LASSBio 873 (**50**), LASSBio 980 (**51**) e LASSBio 981 (**52**) e os correspondentes coeficientes de partição.

LASSBio 872 (49)	LASSBio 873 (50)	LASSBio 980 (51)	LASSBio 981 (52)
Log $P= 3,28^*$ [15,5 μM]	Log $P= 2,47$ [10,0 μM]	Log $P= 2,99$ [10,8 μM]	Log $P= 2,55$ [16,9 μM]
15' 100%	15' 60%	15' 70%	15' 35%
20' 90%	20' 60%	20' 80%	20' 40%
30' 90%	30' 65%	30' 85%	30' 65%
40' 90%	40' 75%	40' 60%	40' 50%
60' 60%	60' 45%	60' 35%	60' 15%
80' 40%	80' 30%	80' 20%	80' 5%
90' 30%	90' 20%	90' 10%	90' 5%

*Programa Pallas 2.0.

De maneira geral o metabolismo de fármacos se processa em duas fases, onde em um primeiro momento ocorre a introdução de um grupamento polar para posterior condensação com uma subunidade polar, usualmente de ácido glicurônico. Após a condensação na segunda fase, o perfil da molécula orgânica em questão adquire um caráter mais hidrofílico, facilitando, assim, sua excreção na urina (BARREIRO, SILVA e FRAGA, 1996).

É descrito na literatura que derivados *para*-substituídos, principalmente por átomos de halogênio, apresentam tempo de meia vida ($t_{1/2}$) aumentado, em relação aos derivados não funcionalizados na posição *para* (WILLIAMS e LEMKE, 2002; BARREIRO, SILVA e FRAGA, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2001).

É provável que devido a este fato, todos os derivados LASSBio 872 (**49**), LASSBio 873 (**50**) e LASSBio 980 (**51**), *para*-substituídos, apresentaram maior $t_{1/2}$ quando comparados ao derivado LASSBio 981 (**52**) não funcionalizado. Entre os derivados *para*-substituídos, o LASSBio 980 (**51**) apresentou o menor $t_{1/2}$, o que provavelmente se deve a particularidades na sua metabolização, semelhante aquela descrita para o protótipo zolpidem (**6**).

O zolpidem (**6**) muitas vezes é considerado um hipnótico de escolha, porque além de sua seletividade funcional, apresenta $t_{1/2}$ médio de aproximadamente duas horas, dissociando, assim, os efeitos colaterais de outros fármacos que apresentam ação prolongada (HARDMAN e LIMBIRD, 2001; SANGER e DEPOORTERE, 1998). A meia vida relativamente curta do zolpidem (**6**) decorre da sua metabolização (WERMUTH, 1996; SANGER e DEPOORTERE, 1998) através de processo oxidativo da subunidade metila que é transformada no correspondente grupo ácido carboxílico **99**, durante a primeira fase (Figura 29). Dentro deste contexto, é provável que o derivado LASSBio 980 (**51**) esteja sendo metabolizado de maneira análoga ao zolpidem (**6**), o que justificaria seu menor $t_{1/2}$ quando comparado com os demais derivados *para*-substituídos.

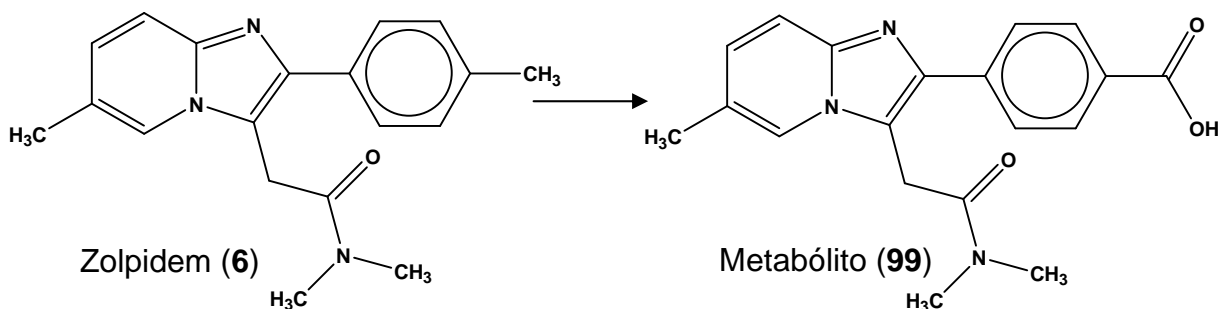


Figura 29 – Particularidades do metabolismo do fármaco zolpidem (6) (adaptado de Wermuth, 1996; Sanger e Depoortere, 1998).

3.4 – COMPORTAMENTO DOS DERIVADOS LASSBio 872 (49) E LASSBio 873 (50) FRENTE AO MODELO DE RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE QUANTITATIVO (QSAR) PARA LIGANTES BENZODIAZEPÍNICOS

Como mencionado anteriormente, não foi possível se precisar a ação dos derivados LASSBio 872 (49) e LASSBio 873 (50) sobre os receptores GABA_A, através dos ensaios de “binding”, face aos seus perfis de solubilidade inadequados. Visando buscar uma correlação entre a atividade hipnótica identificada e a estratégia de planejamento empregada, utilizamos uma abordagem indireta através de modelo teórico de relação estrutura química atividade farmacológica (QSAR).

Neste contexto, reeditamos um modelo de QSAR para ligantes benzodiazepínicos que havia sido publicado anteriormente no laboratório (VERLI *et al.*, 2002), empregando metodologia de Análise Comparativa de Campos Moleculares (COMFA). Para tanto, utilizamos o mesmo banco de moléculas empregado na construção do modelo original e seguimos o mesmo padrão de alinhamento previamente estabelecido, o que acarretou em economia de tempo e esforços.

A partir da sobreposição do banco de 58 moléculas que apresentam perfil de atividade entre ativo pIC_{50} experimental = 9,51, de atividade intermediária pIC_{50}

experimental = 5,92 e inativo pIC_{50} experimental = 3,60, as quais haviam sido ensaiadas no mesmo protocolo farmacológico, foi possível se gerar mapas de campos eletrostáticos e estéricos. Desta forma, podemos discriminar através do comportamento eletrostático, regiões do mapa que são representadas pela cor azul que indicam que subunidades com baixa densidade eletrônica podem ser melhor acomodadas, enquanto as regiões de cor vermelha acomodam melhor as subunidades com maior densidade eletrônica. A partir do modelo construído, é possível se inserir moléculas externas, que apresentem padrão estrutural semelhante, para as quais o modelo prevê o perfil de atividade em termos de pIC_{50} calculado.

Neste ponto, vale ressaltar que os derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) foram ensaiados em protocolo farmacológico diferente daquele em que as moléculas que compuseram o banco de dados do modelo. Portanto, quaisquer conclusões relativas às moléculas sintetizadas no laboratório tem apenas caráter qualitativo.

Como ilustrado na Figura 30, quando os derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) foram analisados no mapa de campos eletrostáticos, podemos observar de que maneira os mesmos se alinham em relação aos campos descritores, além de obtermos a predição teórica de sua atividade, que foram de pIC_{50} calculado = 5,31 e pIC_{50} calculado = 7,88, respectivamente. Muito embora, como já frisado anteriormente, nossas análises apresentem um caráter qualitativo, os valores preditos teoricamente apresentam correlação com os valores obtidos experimentalmente, onde o derivado LASSBio 873 (**50**) se destacou apresentado

maior pIC_{50} calculado= 7,88 e menor DH_{50} = 42,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, quando comparado ao LASSBio 872 (**49**) com pIC_{50} calculado= 5,31 e maior DH_{50} = 105,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Através da análise dos campos eletrostático e estérico, é possível se inferir que a subunidade constituída pelas carbonilas e fenila *para*-substituída apresentam maior relevância. Para ambos os derivados, os átomos de oxigênio carbonílicos se encontram em regiões do mapa em que subunidades com maior densidade podem ser bem acomodadas. Sob o ponto de vista farmacodinâmico, como cogitado anteriormente, o derivado e LASSBio 873 (**50**) suplanta o derivado LASSBio 872 (**49**) em efeito hipnótico, porque pode efetuar maior número de interações permitidas com o modelo teórico de receptor. Através de análise mais apurada, é possível se observar que os átomos de oxigênio da subunidade nitro se encontram localizados sobre regiões do mapa em que subunidades com maior densidade eletrônica podem ser acomodadas.

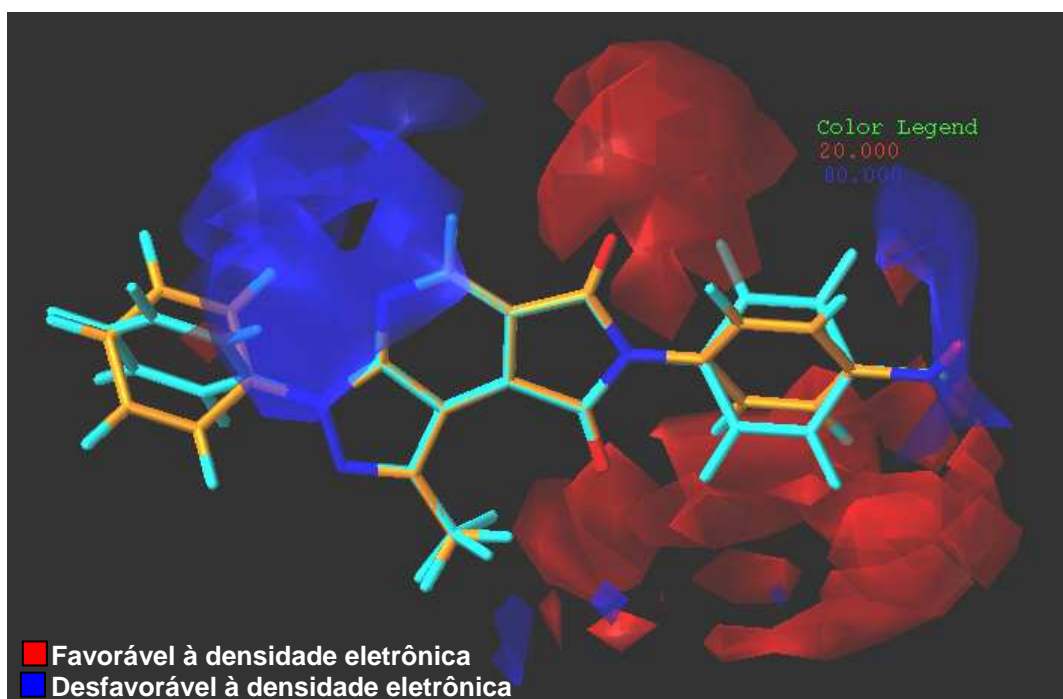


Figura 30 – Mapa de campo eletrostático de COMFA para LASSBio 872 (**49**) (azul) e LASSBio 873 (**50**) (alaranjado).

Estes resultados sugerem que no domínio do mapa teórico do biorreceptor alvo, sobre o qual se encontra a sub-unidade nitro do derivado LASSBio 873 (**50**), interações eletrostáticas envolvendo cargas formais sejam relevantes para a atividade hipnótica observada.

Em relação ao mapa de campo estérico (Figura 31), novamente parece que a subunidade constituída pela fenila *para*-substituída é a região de maior relevância. Em termos estéricos, os derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**) não apresentam restrição relevantes, exceto por uma sutil aproximação do átomo de cloro do derivado LASSBio 872 (**49**) à margem da região amarela, que é sensível a efeito estérico.

Através da análise dos mapas de campo eletrostático e estérico, podemos inferir que os componentes eletrônicos parecem ser mais importantes para a atividade hipnótica.

A sobreposição das estruturas tridimensionais dos derivados LASSBio 872 (**49**) e LASSBio 873 (**50**), apresenta valor de RMS=0,844. Muito embora o valor de RMS traduz boa correlação entre os novos derivados heterocíclicos **49** e **50**, o perfil de interações efetuadas pelos substituintes demonstrou ser importante para a modulação da atividade hipnótica com o bioreceptor-alvo.

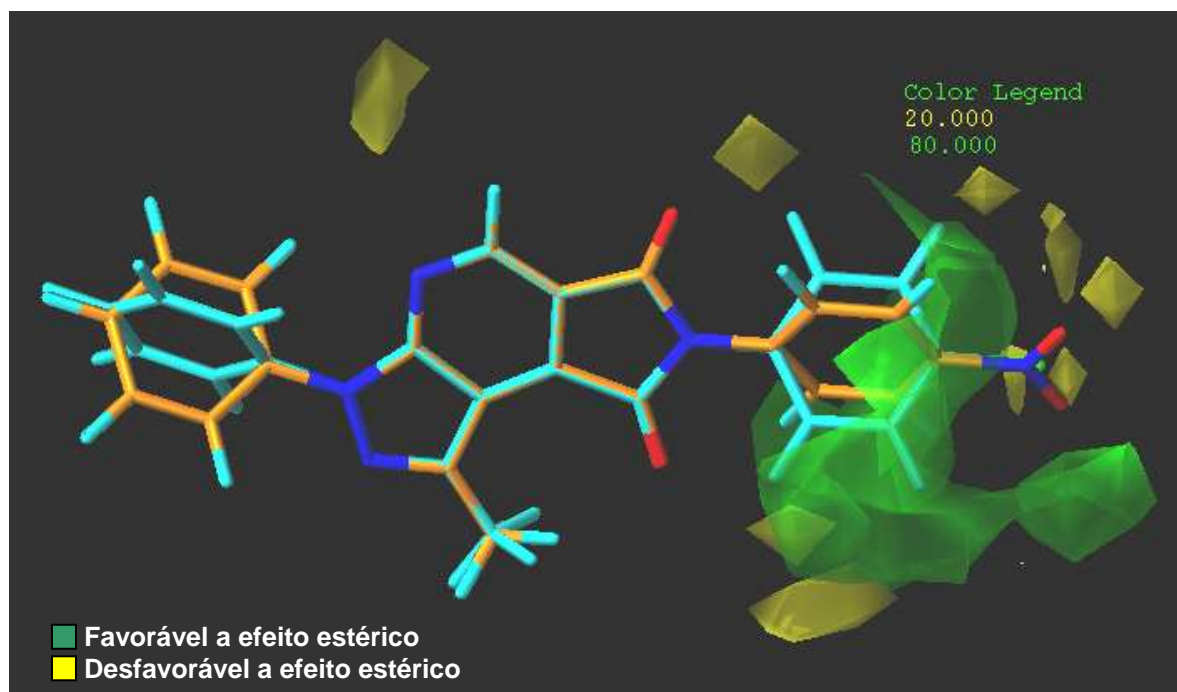


Figura 31 – Mapa de campo estérico de COMFA para LASSBio 872 (**49**) (azul) e LASSBio 873 (**50**) (alaranjado).

4- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir-se que o planejamento empregado no desenho estrutural dos novos derivados heterotricíclicos **49-52** se mostrou adequado, uma vez que os compostos-alvos **49** e **50** apresentaram perfil de atividade semelhante àquela do protótipo zolpidem (**6**).

Quando submetidos ao protocolo do ensaio de “sleeping time”, que avalia a hipnose induzida pelo sal sódico do pentobarbital (**4**), os derivados 7-(4-clorofenil)-3-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**49**), 3-fenil-1-metil-7-(4-nitrofenil)-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**50**), apresentaram $DH_{50}=105,0 \mu\text{g/Kg}$ e $42,6 \mu\text{g/Kg}$, respectivamente.

Em relação ao ensaio de analgesia, os derivados 7-(4-clorofenil)-3-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**49**), 3-fenil-1-metil-7-(4-nitrofenil)-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**50**), 3-fenil-1-metil-7-(4-metilfenil)-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**51**) e 3-fenil-7-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona (**52**) apresentaram importantes propriedades antinociceptivas, com destaque para os derivados LASSBio 872 (**49**) com 100% e LASSBio 980 (**51**) com 85% de atividade analgésica.

Ademais, a metodologia sintética empregada para a obtenção dos novos derivados heterotricíclicos **49-52** se mostrou adequada, muito embora, na etapa-chave que envolve a reação de hetero Diels-Alder, os rendimentos obtidos tenham sido modestos quando utilizamos o protocolo original. No entanto, a troca do solvente original por dimetilsulfóxido permitiu a otimização do rendimento do derivado **51** estudado. O estudo teórico através do emprego de Mecânica Quântica

em nível semi-empírico forneceu informações qualitativas relativas ao estado de transição das reações de hetero Diels-Alder, contudo os cálculos necessitam ser refinados através do emprego de método *ab initio* ou DFT.

A caracterização farmacológica da eventual participação dos receptores benzodiazepínicos no mecanismo de ação hipnótica e/ou analgésica dos novos compostos heterotricíclicos será avaliada nos mesmos protocolos, empregando como padrões e bloqueadores da atividade observada, fármacos moduladores de receptores benzodiazepínicos como e.g. zolpidem (6, agonista) e o flumazenil (31, antagonista).

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - PARTE EXPERIMENTAL

Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos a 125 MHz, em aparelho Bruker (Fiocruz-Farmanguinhos) e a 75 MHz, em aparelho Bruker DRX-300 (IQ-UFRJ). As amostras foram dissolvidas em CDCl₃, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna .

Os espectros de RMN-¹H foram obtidos em aparelhos Bruker (Fiocruz-Farmanguinhos) e Bruker DRX-300 (IQ-UFRJ), operando respectivamente, a 500 MHz e 300 MHz. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna, exceto para as amostras analisadas no aparelho Bruker a 500 MHz para RMN ¹H e 125 MHz para RMN ¹³C. Neste caso, as escalas dos espectros foram corrigidas a partir do deslocamento químico do solvente CDCl₃.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Quimis Modelo Q340.23.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um aparelho Nicolet Magna IR 760 (DQI-UFRJ), utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Os espectros na região do ultra-violeta (UV) foram obtidos em um aparelho SHIMADZU UV-1601 do (NPPN-UFRJ), utilizando clorofórmio como solvente e referência interna.

Para cromatografia de camada fina (ccf), foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 F 254, com 0,2 mm de espessura (Merck-Darmsadt), utilizando-se como fase móvel *n*-hexano:acetato de etila (70:30) ou CH₂Cl₂:metanol (95:5).

A visualização das substâncias em ccf foi realizada em lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

Nas cromatografias de adsorção em coluna, utilizou-se gel de sílica 100-200 *mesh* (Merck) como fase estacionária.

A fase orgânica das reações foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

Quando necessário, os reagentes e/ou solventes foram tratados seguindo os protocolos descritos por Perrin e colaboradores (1966). O benzeno foi seco na presença de sódio metálico e benzofenona, permanecendo sob agitação até adquirir cor azul, sendo posteriormente destilado e armazenado sob atmosfera de nitrogênio. A acetonitrila foi seca na presença de hidreto de cálcio, permanecendo sob agitação por duas horas. Na seqüência foi destilada e armazenada sob atmosfera de nitrogênio.

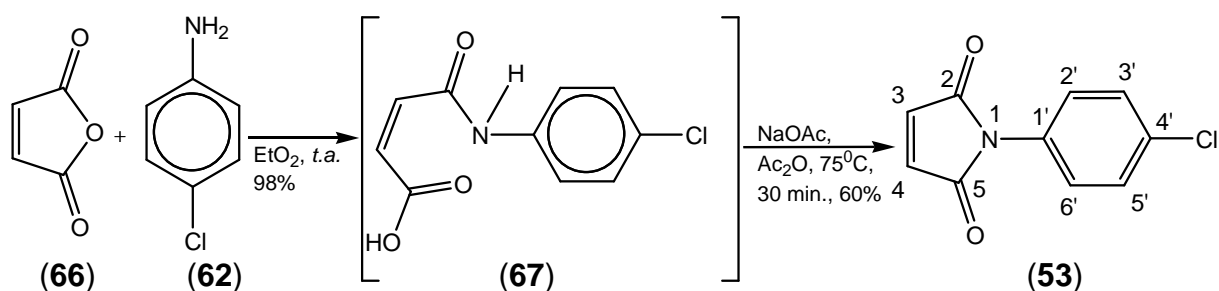
5.2 – METODOLOGIA DE SÍNTESE

5.2.1 - PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DOS DERIVADOS 1-FENIL-2,5-DIIDRO-1*H*-PIRROLO-2,5-DIONA FUNCIONALIZADAS (CAVA *et al.*, 1973)

Foram adicionados a um balão de duas bocas de 120 mL, equipado com condensador de refluxo, 53,69 mmol de anidrido maleico (**55**) e 70 mL de éter etílico, e 53,69 mmol das anilinas funcionalizadas [W=Cl (**51**), W=NO₂ (**52**), W=CH₃ (**53**) e W=H (**54**)], solubilizadas em 6 mL de éter etílico, lentamente. A suspensão permaneceu sob agitação, à temperatura entre 15 e 20^oC resfriado em banho de gelo, por uma hora. O precipitado obtido foi filtrado em funil de Buckner e lavado com éter etílico. Os correspondentes ácidos 3-fenilcarbamoil-(Z)-2-propenóicos substituídos [W=Cl (**56**), W=NO₂ (**57**), W=CH₃ (**58**) e W=H (**59**)].

Foram adicionados a um balão de 50 mL contendo 21,28 mmol de acetato de sódio e 19 mL de anidrido acético e 52,61 mmol dos ácidos 3-fenilcarbamoil-(Z)-2-propenóicos substituídos. A mistura reacional foi aquecida à temperatura de 70^oC por *ca.* meia hora. Ao término da reação, acompanhada por cromatografia de camada fina, a mistura reacional foi vertida em gelo picado e o precipitado filtrado em funil de Buchner. O sólido obtido foi purificado através de cromatografia de adsorção em coluna, empregando clorofórmio como fase móvel, fornecendo os correspondentes 1-fenil-2,5-diidro-1*H*-pirrolo-2,5-diona funcionalizados **53-56**.

5.2.1.1 - 1-(4-CLOROFENIL)-2,5-DIIDRO-1H-PIRROLO-2,5-DIONA (**53**) (CAVA *et al.*, 1973)



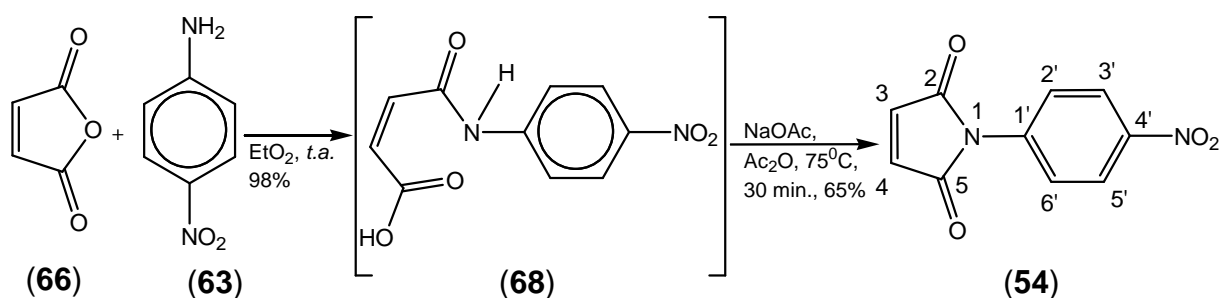
Foram obtidos 6,5 g (60%) de 1-(4-clorofenil)-2,5-diidro-1H-pirrolo-2,5-diona, como cristais amorfos de cor bege, P.F.=103-105⁰C, Rf=0,73 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e Rf=0,27 (n-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ¹H (300 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,44 (2H, d, J= 8,8 Hz, H-2' e 6'); 7,32 (2H, d, J= 8,8 Hz, H-3' e 5'); 6,86 (2H, s, H-3 e 4); (Espectro 1)

RMN - ¹³C (75 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 168,0 (C=O); 134,3 (C-3 e 4); 134,0 (C-1'); 129,4 (C-3' e 5'); 129,4 (C-4'); 127,2 (C-2' e 6'); (Espectro 2)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3086-3074 (ν C-H); 1776-1712 (ν C=O); 1402-1388 (ν C-N-C); 1097 (ν C-Cl); (Espectro 3)

5.2.1.2 - PREPARAÇÃO DO DERIVADO 1-(4-NITROFENIL)-2,5-DIIDRO-1H-PIRROLO-2,5-DIONA (**54**) (CAVA *et al.*, 1973)



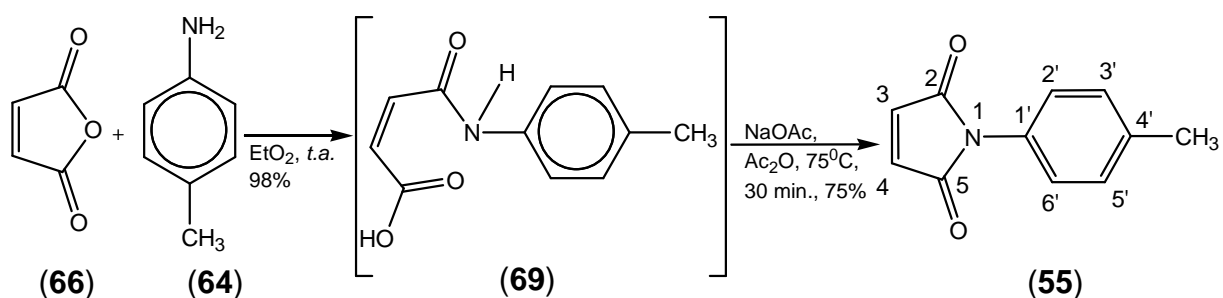
Foram obtidos 7,4 g (65%) de 1-(4-nitrofenil)-2,5-diidro-1H-pirrolo-2,5-diona, como cristais amorfos de cor amarela, P.F.=160-162⁰C, Rf=0,88 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e Rf=0,27 (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 8,34 (2H, d, J= 9,5 Hz, H-3' e 5'); 7,69 (2H, d, J= 9,5 Hz, H-2' e 6'); 6,94 (2H, s, H-3 e 4); (Espectro 4 e 5)

RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 168,6 (C-2 e 5); 146,3 (C-4'); 137,2 (C-1'); 134,7 (C-3 e 4); 125,6 (C-3' e 5'); 124,6 (C-2' e 6'); (Espectro 6)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3099-3033 (ν C-H); 1723-1712 (ν C=O); 1406-1391 (ν C-N-C); 343-1307 (ν C-NO₂); 855-826 (ν C-NO₂); (Espectro 7)

5.2.1.3 - PREPARAÇÃO DO DERIVADO 1-(4-METILFENIL)-2,5-DIIDRO-1H-PIRROLO-2,5-DIONA (**55**) (CAVA *et al.*, 1973)



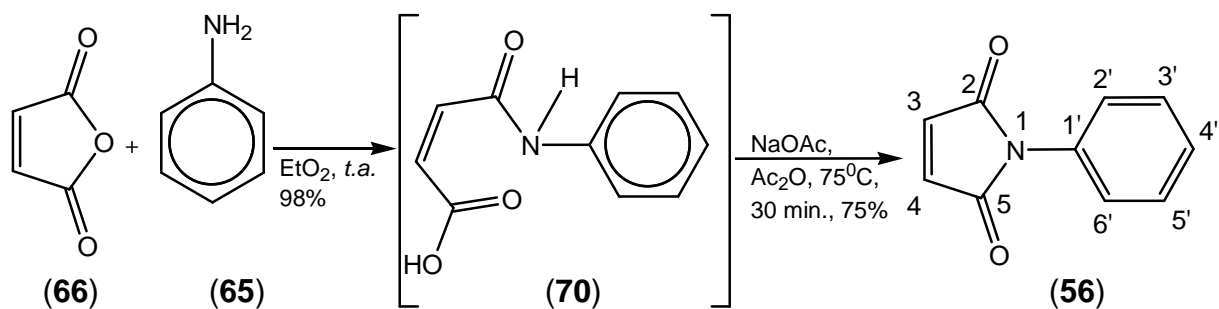
Foram obtidos 7,4 g (75%) de 1-(4-metilfenil)-2,5-diidro-1H-pirrólo-2,5-diona, como cristais amorfos de cor amarela, P.F.=135-137⁰C, Rf=0,89 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e Rf=0,40 (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,18 (2H, d, J= 8,2 Hz, H-2' e 6'); 7,12 (2H, d, J= 8,2 Hz, H-3' e 5'); 6,71 (2H, s, H-3 e 4); 2,30 (3H, s, CH₃); (Espectro 8)

RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 169,6 (C-2 e 5); 137,9 (C-1'); 134,0 (C-3 e 4); 129,7 (C-3' e 5'); 128,5 (C-4'); 126,1 (C-2' e 6'); 21,0 (CH₃); (Espectro 9)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3092 (ν C-H); 2983-2919 (ν C-H); 1780-1708 (ν C=O); 1403-1392 (ν C-N-C); (Espectro 10)

5.2.1.4 - 1-FENIL-2,5-DIIDRO-1H-PIRROLO-2,5-DIONA (**56**) (CAVA *et al.*, 1973)



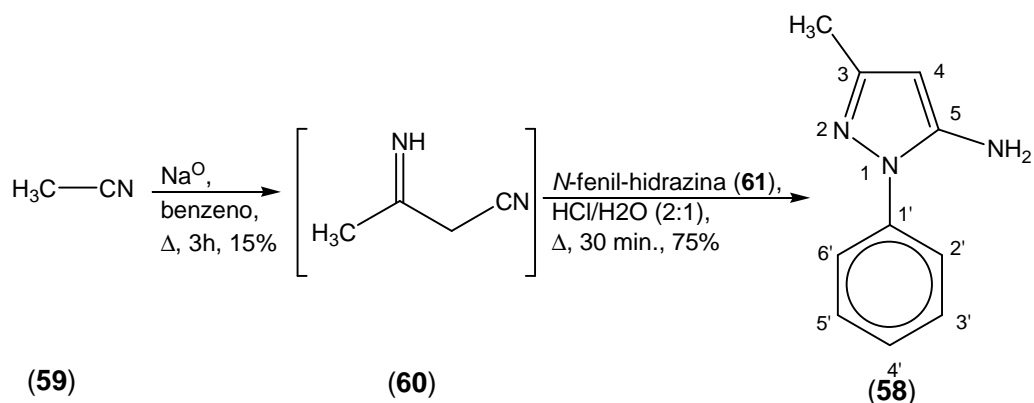
Foram obtidos 6,8 g (75%) de 1-fenil-2,5-diidro-1H-pirrolo-2,5-diona, como cristais agulha de cor amarela, P.F.= 65°C (Lit 89°C), $R_f=0,87$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}-95:5$) e $R_f=0,39$ (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ^1H (500 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 7,49-7,45 (2H, m, 2' e 6'); 7,39-7,33 (3H, m, H-3', 4' e 5'); 6,84 (2H, s, H-3 e 4); (Espectro 11 e 12)

RMN - ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 169,6 (C-2 e 5); 134,2 (C-3 e 4); 131,2 (C-1'); 129,2 (C-3' e 5'); 128,0 (C-4'); 126,1 (C-2' e 6'); (Espectro 13)

I.V. Máx. (KBr) cm^{-1} : 3093-3072 (ν C-H); 1774-1709 (ν C=O); 1402-1382 (ν C-N-C); (Espectro 14)

5.2.2 - OBTENÇÃO DE 1-FENIL-3-METIL-1H-5-PIRAZOLAMINA (**58**)



Formam adicionados a um balão de 125 mL, 26,6 mL de benzeno seco foi adicionado 0,26 atg de sódio metálico (6g) finamente cortado, sob atmosfera de nitrogênio. A mistura foi mantida sob agitação magnética e refluxo. Em seguida foram adicionados 60 mL (1,03 mol) de acetonitrina (**59**) através de seringa hipodérmica e o sistema mantido em refluxo por 3 horas. Ao término da reação, foi adicionado etanol, lentamente, ao meio reacional a fim de consumir o sódio remanescente. O produto foi vertido em água e extraído com diclorometano, seco sob sulfato de magnésio, filtrado e evaporado o solvente, fornecendo um líquido viscoso **60**, de cor amarelo claro, em 15% de rendimento.

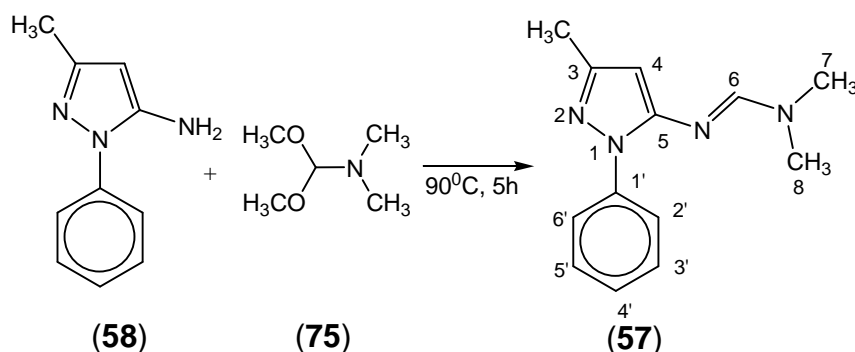
Sobre a β -iminobutyronitrila (**60**) formada adicionou-se 12mL (0.12 mol) de *N*-fenil-hidrazina (**61**) e 16,7 mL de uma solução 2:1 (v/v) de ácido clorídrico e água. A mistura permaneceu sob agitação magnética e aquecimento à temperatura de refluxo por 30 min. O término da reação foi indicado por c.c.f., a mistura reacional foi vertida me água gelada e o meio neutralizado com solução de NaOH a 10%, obtendo-se um precipitado de cor alaranjada em 75% de rendimento. Este, após purificação em etanol e água até turvação, forneceu **58**, com P.F.= 110⁰C.

RMN - ¹H (300 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm): 7,56-7,27 (5H, m, H-2'-6'); 5,44 (1H, s, H-4); 3,79 (2H, s, NH₂); 2,24 (3H, s, CH₃); (Espectro 15)

RMN - ^{13}C (75 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 149,4 (C-5); 145,3 (C-3); 138,7 (C-1');
129,4 (C-3' e 5'); 127,0 (C-4'); 123,8 (C-2' e 6'); 90,7 (C-4); 14,0 (CH_3); (Espectro 16)
I.V. Máx. (KBr) cm^{-1} : 3447 (ν N-H); 3267 (ν N-H); 3134 (ν C-H); 1623 (ν N-H); 1470
(ν C-N); 1070 (ν N-H); (Espectro 17)

5.2.3 - *N,N*-DIMETIL-3-METIL-1-FENIL-1*H*-5-PIRAZOLILIMINOMETANAMINA (**57**)

(MASON *et al.*, 2001)



Foram transferidos para um balão de 25 mL, 0,43 g (2,5 mmol) de 1-fenil-3-metil-1*H*-5-pirazolamina (**58**), 0,37 mL (2,75 mmol) de dimetilacetal da dimetilformamida (**75**) e mistura reacional mantida à temperatura de 90°C por 5 horas. Ao término da reação, acompanhado através de c.c.f., foram adicionados 30 mL de água e extraído com diclorometano. A fase orgânica seca com sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida. Foram obtidos 0,56 g (98%) de *N,N*-dimetil-3-metil-1-fenil-1*H*-5-pirazoliliminometanamina (**57**), como óleo de cor marrom, $R_f=0,37$ (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e $R_f=0,11$ (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

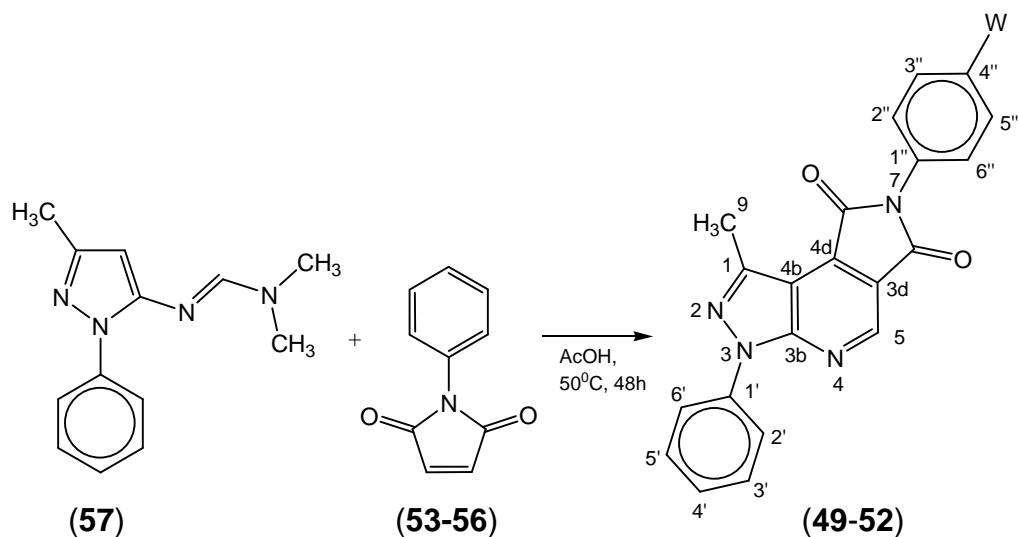
RMN - ¹H (300 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,85-7,82 (2H, m, H-2'-6'); 7,69 (1H, s, 6-H); 7,50-7,17 (3H, m, H-3', 4' e 5'); 2,97-2,96 (6H, m, CH₃); 2,27 (3H, s, CH₃); (Espectro 18)

RMN - ¹³C (75 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 154,2 (C-6); 151,9 (C-5); 148,7 (C-3); 139,0 (C-1'); 129,4 (C-3' e 5'); 125,2 (C-4'); 123,1 (C-2' e 6'); 90,9 (C-4); 40,1 (CH₃), 34,4 (CH₃); 13,7(CH₃); (Espectro 19)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3135 (ν C-H); 1625 (ν C-H); 1070 (ν C=N); (Espectro 20)

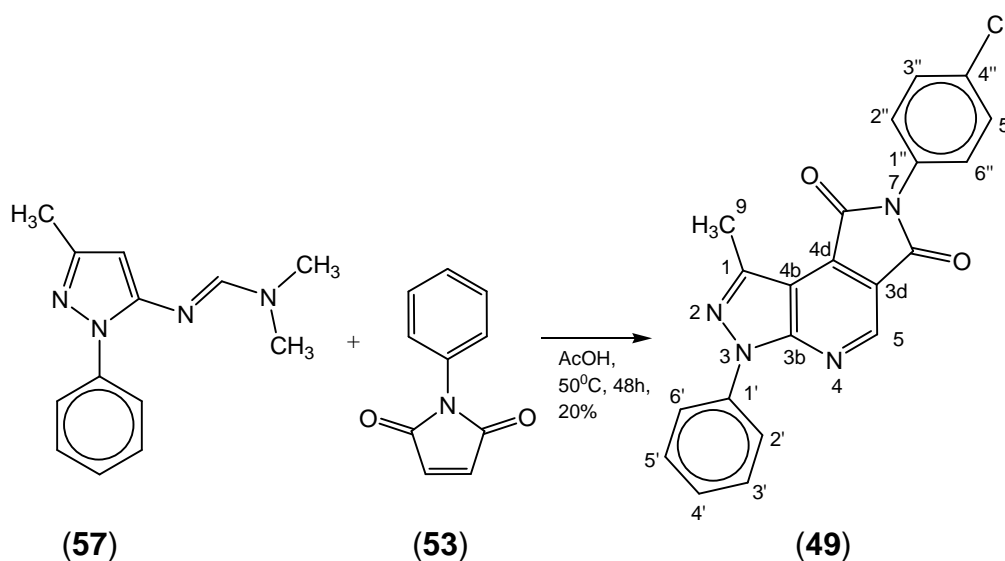
5.2.4 - PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DOS DERIVADOS (49-52)

(MASON *et al.*, 2001)



Foram adicionadas, a um balão de 50 mL, (2,5 mmol) de *N,N*-dimetil-3-metil-1-fenil-1H-5-pirazoliminometanamina (57), 10 mL de ácido acético, (5 mmol) de 1-(4-clorofenil)-2,5-diidro-1H-pirrolo-2,5-diona, mantendo sob agitação e à temperatura de 50°C por 48 horas. Ao término da reação, a suspensão foi filtrada em funil de Buchner e lavado com etanol.

5.2.4.1- 7-(4-CLOROFENIL)-3-FENIL-1-METIL-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4-B]PIRROLO[3,4-D]PIRIDINA-6,8-DIONA (**49**) (MASON *et al.*, 2001)



Foram obtidos 0,19 g (20%) de 7-(4-clorofenil)-3-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-b]pirrolo[3,4-d]piridina-6,8-diona, como cristais amorfos de cor amarela, P.F.=246-248⁰C, R_f=0,87 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e R_f=0,64 (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9,16 (1H, s, H-5); 8,23-8,21 (2H, m, H-2' e 6'); 7,60-7,57 (2H, m, H-3' e 5'); 7,53 (2H, d, J= 8,2 Hz, H-2'' e 6''); 7,84 (2H, d, J=8,2 Hz, H-3'' e 5''); 7,42-7,39 (1H, m, H-4'); 2,98 (3H, s, H-9); (Espectro 21 e 22)

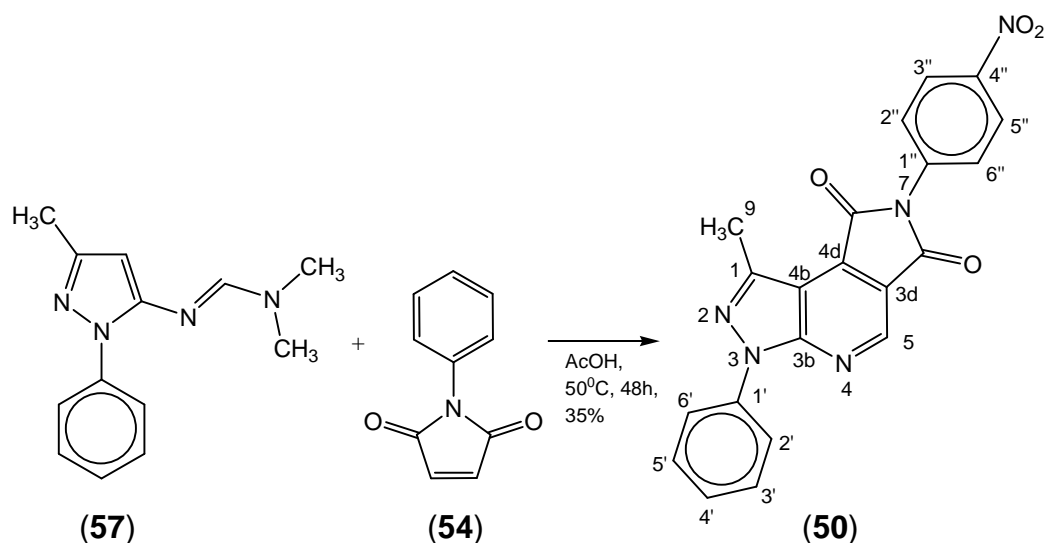
RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 166,5 (C=O); 165,4 (C=O); 153,8 (C-1); 144,0 (C-5); 143,8 (C-3b); 138,6 (C-1'); 134,6 (C-4d); 134,4 (C-1''); 129,8 (C-4''); 129,6 (C-2'' e 6''); 129,4 (C-3' e 5'); 127,8 (C-3'' e 5''); 127,2 (C-4'); 122,0 (C-2' e 6'); 119,4 (C-3d); 110,8 (C-4b); 15,1 (C-9); (Espectro 23-25)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3092-3072 (ν C-H); 1774-1726 (ν C=O); 1092 (ν C-Cl); (Espectro 26)

UVλ^{CHCl₃} max nm (log ε): 386,2 (0,021); ε_{MAX}=1.221; (Espectro 27)

UV λ^{CHCl_3} max nm (log ϵ): 285,6 (0,593); $\epsilon_{\text{MAX}}=34.477$; (Espectro 27)

5.2.4.2 - 3-FENIL-1-METIL-7-(4-NITROFENIL)- 3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4-*b*]PIRROLO[3,4-*d*]PIRIDINA-6,8-DIONA (**50**) (MASON *et al.*, 2001)



Foram obtidos 0,70 g (35%) de 3-fenil-1-metil-7-(4-nitrofenil)- 3,6,7,8-tetraidropirazolo[3,4-*b*]pirrolo[3,4-*d*]piridina-6,8-diona, como cristais amorfos de cor laranja claro, P.F.=238-240⁰C, R_f=0,87 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e R_f=0,56 (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9,20 (1H, s, H-5); 8,44 (2H, d, J=9,0 Hz, H-3'' e 5''); 8,23-8,22 (2H, m, H-2' e 6'); 7,82 (2H, d, J= 9,0 Hz, H-2'' e 6''); 7,61-7,58 (2H, m, H-3' e 5'); 7,44-7,41 (1H, m, H-4'); 3,00 (3H, s, H-9); (Espectro 28 e 29)

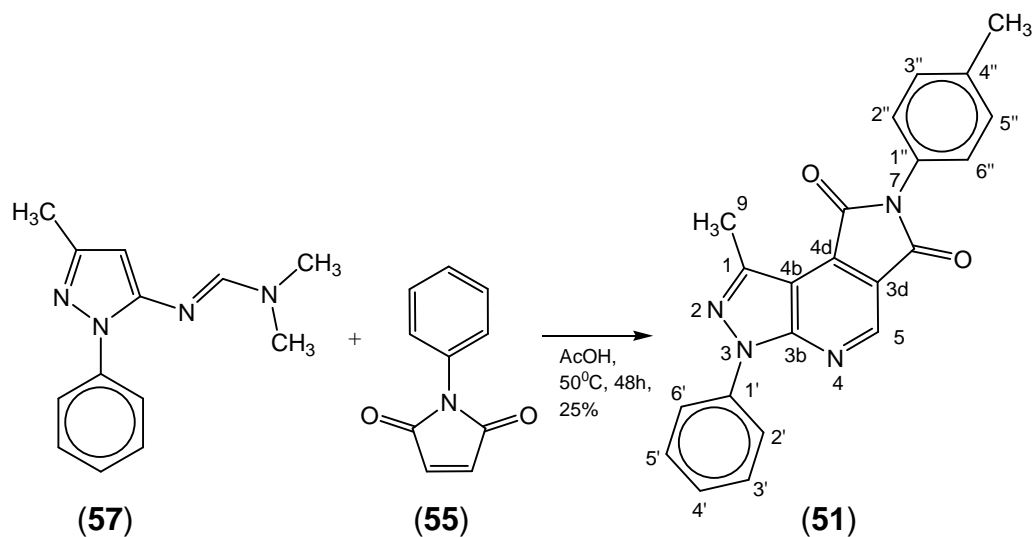
RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 166,9 (C-8); 165,9 (C-6); 153,8 (C-1); 146,7 (C-4''); 144,3 (C-5); 143,9 (C-3b); 138,4 (C-1'); 137,1 (C-1''); 134,3 (C-4d); 129,4 (C-3' e 5'); 127,4 (C-4'); 126,6 (C-2'' e 6''); 124,7 (C-3'' e 5''); 122,0 (C-2' e 6'); 119,1 (C-3d); 110,8 (C-4b); 15,2 (C-9); (Espectro 30 e 31)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3124-3004 (ν C-H); 1776-1727 (ν C=O); 1350-1380 (ν C-NO₂); 848 (ν C-NO₂); (Espectro 32)

UVλ^{CHCl₃} max nm (log ε): 386,2 (0,023); ε_{MAX}=1.377; (Espectro 33)

UV λ_{CHCl_3} max nm (log ϵ): 293,0 (0,584); $\epsilon_{\text{MAX}}=34.970$; (Espectro 33)

5.2.4.3- 3-FENIL-1-METIL-7-(4-METILFENIL)-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4-B]PIRROLO[3,4-D]PIRIDINA-6,8-DIONA (**51**) (MASON *et al.*, 2001)



Foram obtidos 0,23 g (25%) de 3-fenil-1-metil-7-(4-metilfenil)-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-b]pirrolo[3,4-d]piridina-6,8-diona, como cristais amorfos de cor amarela, P.F.=231-233⁰C, Rf=0,84 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e Rf=0,80 (*n*-hexano:acetato de etila-7:3).

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9,14 (1H, s, H-5); 8,23-8,21 (2H, m, H-2' e 6'); 7,58-7,55 (2H, m, H-3' e 5'); 7,40-7,37 (1H, m, H-4'); 7,36 (4H, s, H-2'', 3'', 5'' e 6''); 2,97 (3H, s, H-9); 2,45 (3H, s, CH₃); (Espectro 34 e 35)

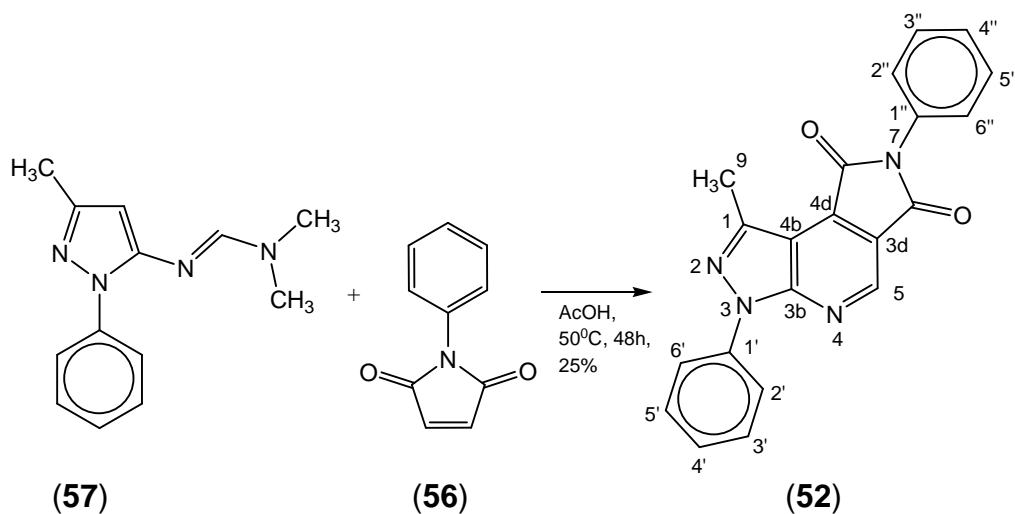
RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 166,9 (C=O); 165,8 (C=O); 153,7 (C-1); 143,9 (C-5); 143,7 (C-3b); 138,7 (C-1'); 138,6 (C-1''); 134,8 (C-4d); 130,0 (C-3' e 5'); 129,3 (C-2'' e 6''); 128,6 (C-4''); 127,1 (C-4'); 126,5 (C-3'' e 5''); 121,8 (C-2' e 6'); 119,6 (C-3d); 110,8 (C-4d); 21,3 (C-10); 15,1 (C-9); (Espectro 36-38)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3111-3041 (ν C-H); 2920-2854 (ν C-H); 1778-1720 (ν C=O); (Espectro 39)

UVλ^{CHCl₃} max nm (log ε): 386,2 (0,023); ε_{MAX}=1.215; (Espectro 40)

UV λ_{CHCl_3} max nm (log ϵ): 293,0 (0,584); $\epsilon_{\text{MAX}}=33.094$; (Espectro 40)

5.2.4.4 - 3-FENIL-7-FENIL-1-METIL-3,6,7,8-TETRAIDROPIRAZOLO[3,4-B]PIRROLO[3,4-D]PIRIDINA-6,8-DIONA (**52**) (MASON *et al.*, 2001)



Foram obtidos 0,22 g (25%) de 3-fenil-7-fenil-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirazolo[3,4-b]pirrolo[3,4-d]piridina-6,8-diona, como cristais amorfos de cor amarela, P.F.=228-230⁰C, Rf=0,84 (CH₂Cl₂:MeOH-95:5) e Rf=0,79 (n-hexano:acetato de etila-7:3).

Quando empregamos o mesmo protocolo experimental, substituindo apenas o solvente original ácido acético por clorofórmio e dimetilsulfóxido, o rendimento da reação aumento para 50 e 75%, respectivamente.

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9,16 (1H, s, H-5); 8,23-8,22 (2H, m, H-2' e 6'); 7,60-7,55 (4H, m, H-3', 5', 3'' e 5''); 7,50-7,45 (3H, m, H-2'', 4'' e 6''); 7,42-7,38 (1H, m, H-4'); 2,98 (3H, s, H-9); (Espectro 41 e 42)

RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 166,7 (C=O); 165,7 (C=O); 153,7 (C-1); 144,0 (C-5); 143,8 (C-3b); 138,6 (C-1'); 134,8 (C-4d); 131,3 (C-1''); 129,4 (C-3', 5', 2'' e 6''); 128,6 (C-4''); 127,1 (C-4'); 126,7 (C-3'' e 5''); 121,9 (C-2' e 6'); 119,6 (C-3d); 110,8 (C-4b); 15,2 (C-9); (Espectro 43-48)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 3112-3055 (ν C-H); 1779-1717 (ν C=O); (Espectro 49)

UV λ^{CHCl_3} max nm (log ϵ): 386,2 (0,022); $\epsilon_{\text{MAX}}=1.330$; (Espectro 50)

UV λ^{CHCl_3} max nm (log ϵ): 285,2 (0,599); $\epsilon_{\text{MAX}}=36.702$

5.3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

5.3.1 - ATIVIDADE HIPNÓTICA EM CAMUNDONGOS

O teste denominado de “sleeping time” possibilita a avaliação da duração da hipnose induzida por um barbitúrico, o pentobarbital sódico (4) que é administrado por via intravenosa (*i.v.*) na veia da cauda do camundongo, na dose de 25mg/kg. A duração da hipnose é determinada a partir do momento da injeção venosa e perda do reflexo de postura do camundongo. Este protocolo experimental possibilita a identificação de substâncias que possam interferir com o tempo de hipnose induzida pelo barbitúrico. Cerca de 160 camundongos suíços machos (18 a 25g) foram aleatoriamente distribuídos em 16 grupos experimentais. Um dos grupos foi considerado controle, onde o DMSO isoladamente foi administrado por via *i.p.* 30 minutos antes da injeção venosa do pentobarbital sódico. A administração de cada composto em teste nas doses de 1 a 10 mg.kg⁻¹ foi feita em cada grupo experimental e a duração da hipnose cronometrada. Os valores do tempo de hipnose foram comparados entre os grupos e considerados significativamente diferentes do grupo controle (DMSO) quando $P < 0,05$.

5.3.1.1 - DETERMINAÇÃO DA DOSE HIPNÓTICA MÉDIA (DH₅₀) EM CAMUNDONGOS

Camundongos suíços machos, pesando entre 18 e 25 g foram utilizados para a determinação da dose hipnótica média (DH₅₀). Uma única dose que variou de 25 a 150 µg.kg⁻¹ de cada composto-teste foi injetado por via intravenosa (*i.v.*) a grupos de pelo menos 10 animais. O composto foi diluído em DMSO e preparado imediatamente antes dos experimentos. Após a administração, os animais foram

observados e se determinava o percentual de cada grupo que apresentava hipnose, ou seja, a perda do reflexo de postura. Gráficos relacionando dose com número de ocorrência de hipnose (em percentual) foram obtidos. Assim, foi possível se determinar dose dos compostos que induzia hipnose em 50% dos animais testados (DH₅₀).

5.3.2 - ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

5.3.2.1 - PLACA QUENTE

A atividade analgésica central foi avaliada utilizando-se o teste da placa quente. Este teste consiste em colocar o camundongo sobre uma placa metálica (Letica LE 7406) aquecida a $52 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ e marcar seu tempo de permanência na placa sem levar as patas dianteiras à boca, o que indica resposta ao estímulo térmico (Kuraishi et al., 1983). O tempo é determinado até o momento de retirada da pata em camundongos sem ou com tratamento prévio das novas moléculas. O tempo máximo de permanência do animal na placa (“cut off”) foi de 35 segundos. As substâncias foram injetadas *i.p.* nas doses que variaram de 0,5 a 8 mg.kg⁻¹. O animal foi colocado sobre a placa quente de 5 a 120 min após a administração dos diferentes compostos para determinar a presença ou ausência do efeito analgésico num período prolongado. No grupo controle foi injetado apenas DMSO. Foram utilizados 10 camundongos suíços machos, pesando entre 18 a 25g para cada composto testado. Os resultados foram expressos em média \pm EPM do tempo de permanência em segundos. O teste de “t” Student foi usado para a análise estatística dos efeitos nas várias doses testadas comparado com o controle. As

diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. A atividade analgésica (%)

foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade analgésica} = \frac{(\text{latência pós-tratamento}) - (\text{latência pré-tratamento})}{(35 \text{ sec}) - (\text{latência pré-tratamento})} \times 100$$

5.4 – PROTOCOLO DO ESTUDO TEÓRICO DE MODELAGEM MOLECULAR

Os cálculos foram realizados em um PC com processador Athlon de 1.8 GHz, com 512 MB de memória RAM, utilizando o programa PC Spartan Pro.

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”.

Em relação aos estudos dos estados de transição, os arquivos de entrada foram construídos no programa PC Spartan Pro. A determinação do perfil das reações foi realizado sem otimização geométrica prévia. Sobre o ponto de maior energia, foi realizado o cálculo de estado de transição através do emprego de Mecânica Quântica em nível semi-empírico AM1. Os estados de transição foram validados através da observação de apenas uma frequência de vibração imaginária das ligações que estão sendo rompidas e formadas no processo.

Os valores de coeficiente de partição ($\log P$) foram calculados teoricamente, empregando o programa Palla 2.0.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Awapara, J.; Landau, A.; Fuerst, F.; Seale, B. L.; Free γ -aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 35-39.

Baines, J.; Málek, J.; **O Mundo Egípcio - Deuses, Templos e Faraós**. 1ª ed, Edições del Prado: Madri, 1996.

Barnard, E. A.; Skolnick, P.; Olsen, R. W.; Mohler, H.; Sieghart, W.; Biggio, G.; Braestrup, C.; Bateson, A. N.; Langer, S. Z.; International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 291-313.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 1ª ed, Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

Barreiro, E. J.; Silva, J. F. M.; Fraga, C. A. M.; Noções básicas do metabolismo de fármacos. *Quim. Nova* **1996**, *19*, 641-650.

Bazemore, A. W.; Elliott, K. A. C.; Florey, E.; Isolation of factor I. *J. Neurochem.* **1957**, *1*, 334-339.

Ben-Ari, Y.; Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 728-739.

Ben-Ari, Y.; Khazipov, R.; Leinekugel, X.; Caillard, O.; Gaiarsa, J.; GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 523-529.

Berson, A.; Descatoire, V.; Sutton, A.; Fau, D. ; Maulny, B. ; Vadrot, N. ; Feldmann, G. ; Berthon, B. ; Tordjmann, Pessayre, D. ; Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: role of

mitochondrial permeability transition and metabolic activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 793-800.

Bettler, B.; Kaupmann, K.; Bowery, N.; GABA_B receptors: drugs meet clones. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1998**, *8*, 345-350.

Bharatam, P. V.; Khanna, S.; Rapid racemization in thiazolidinediones: a quantum chemical study. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3784-3788.

Billinton, A.; Ige, A. O.; Bolam, J. P.; White, J. H.; Marshall, F. H.; Emson, P. C.; Advances in the molecular understanding of GABA_B receptors. *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 277-282.

Bleicher, K. H.; Böhm, H.; Müller, K.; Alanine, A. I.; Hit and lead generation : beyond high-throughput screening. *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 369-378.

Bormann, J.; Feigenspan, A.; GABA_C receptors. *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 515-518.

Bowery, N. G.; Bettler, B. Froestl, W.; Gallagher, J. P.; Marshall, F.; Raiteri, M.; Bonner, T. I.; Enna, S. J.; International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 247-264.

Buonora, P.; Olsen, J.; Oh, T.; Recent developments in imino Diels-Alder reactions. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6099-6138.

Cava, M. P.; Deana, A. A.; Muth, K.; Mitchell, A. J.; N-Phenylmalimide. *Org. Synth. Coll.* **1973**, *5*, 944.

Cechinel Filho, V.; Campos, F.; Corrêa, R.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Quim. Nova.* **2003**, *26*, 230-241.

Chakrabarti, J. K.; Hotten, T. M.; Tupper, D. E.; 2-Methyl-thieno-benzodiazepine, *US pat.* 5.229.382 **1993**.

Chambers, M. S.; Atack, J. R.; Bromidge, F. A.; Broughton, H. B.; Cook, S.; Dawson, G. R.; Hobbs, S. C.; Maubach, K. A.; Reeve, A. J.; Seabrook, G. R.; Wafford, K.; MacLeod, A. M.; 6,7-Dihydro-2-benzothiophen-4(5*H*)-ones: a novel class of GABA-A α 5 receptor inverse agonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1176-1179.

Charpentier, P.; Gailliot, P. ; Jacob, R. ; Gaudechon, J. ; Buisson, P.; Recherches sur les diméthylaminopropyl-*N*-phénothiazines substituées. *Acad.Sci.* **1952**, *235*, 59.

Chebib, M.; Johnston, G. A. R.; GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1427-1447.

Cherubini, E.; Conti, F.; Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 155-162.

Christopoulos, A.; Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drugs Discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 198-210.

Coelho, F. A. S.; Fármacos e quiralidade. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* **2001**, *3*, 23-32.

Covey, D. F.; Evers, A. S.; Mennerick, S.; Zorumski, C. F.; Purdy, R. H.; Recent developments in structure-activity relationships for steroid modulators of GABA_A receptors. *Brain Res. Rev.* **2001**, *37*, 91-97.

Curtis, D.; Duggan, A. W.; Felix, D. ; Johnston, G. A. R.; *Nature* **1970**, *226*, 1222-1224.

Dias, L. R. S.; Alvim, M. J. F.; Barreiro. E. J.; Synthesis and analgesic properties of 5-acyl-aryhydrazone 1-*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives. *Pharm. Acta. Helv.* **1994**, *69*, 163-169.

Díaz-Ortiz, A.; Carrillo, J. R.; Cossío, F. P.; Gómez-Escalonilla, M. J.; Hoz, A.; Moreno, A.; Prieto, P.; Synthesis of pyrazolo[3,4-*b*]pyridines by cycloaddition reactions under microwave irradiation. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1569-1577.

DiMasi, J.; Hanser, R. W.; Grabowski, H. G.; The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health. Econ.* **2003**, *22*, 151-185.

Drew, C. A.; Johnston, G. A. R.; Weatherby, R. P.; Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci. Lett.* **1984**, *52*, 317-321

Drews, A.; Drug Discovery: A historical perspective. *Science* **2000**, *287*, 1960-1964.

Erlander, M. G.; Tilakaratne, N. J.; Feldblum, S.; Patel, N.; Tobin, A. J.; Two genes encode distinct glutamate decarboxilases. *Neuron* **1991**, *7*, 91-100.

Fleming, I.; **Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions**. 1th ed, John Wiley & Sons: New York, 1978.

Fon, E. A.; Edwards, R. H.; Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve* **2001**, *24*, 581-601.

Fraga, C. A. M.; Razões da atividade biológica: interações micro- e biomacromolécula. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* **2001**, *3*, 33-42.

Gaiarsa, J.; Caillard, O.; Ben-Ari, Y.; Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trens Neurosci.* **2002**, *25*, 564-570.

García, J. I. ; Mayoral, J. A. ; Salvatella, L. ; Do secondary orbital interactions really exist ? *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 658-664.

Gavish, M. ; Bachman, I. ; Shoukrun, R. ; Katz, Y. ; Veenman, L. ; Weisinger, G. ; Weizman, A. ; Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 629-650.

Gilmartin, R.; **The Index Merck**, 10^a ed, New Jersey : Merck & Co. Inc., 1984.

Grimal, P.; **Dictionnaire de la Mythologie Grecque et Romaine**. 5^e ed, Presses Universitaires de France : Paris , 1976.

Gu, J. ; Tian, A. ; Li, W. ; Wong, N. ; Intramolecular proton transfer in the tautomers of C8 oxidative adenine : a DFT study. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10692-10698.

Gupta, S. P.; Recent advances in benzodiazepine receptor (BZR) binding studies. *Progr. Drug Res.* **1995**, *45*, 67-106.

Hammond, G. S.; A correlation of reaction rates. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 334.

Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10th ed, McGraw-Hill: New York, 2001.

Hargreaves, M. K.; Pritchard, J. G.; Dave, H. R.; Cyclic carboxylic monoimides. *Chem. Rev.* **1970**, *70*, 439-469.

Hill, D. R.; Bowery, N. G.; ³H-Baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* **1981**, *290*, 149-152.

Isaacs, N.; **Physical organic chemistry**. 2th ed, Prentice Hall: England, 1995.

Jacob, J. J. C.; Ramabadran, K.;. *Brit. J. Pharmacol.* **1978**, *64*, 91-98.

Jasmin, L.; Rabkin, S. D.; Granato, A. ; Boudah, A. ; Ohara, P. T. ; Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature* **2003**, *424*, 316-320.

Jenner, G.; Comparative activation modes in organics synthesis. The specific role of high pressure. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5185-5202.

Johnston, G. A.; GABA_C receptors: relatively simple transmitter –gater ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 319-323.

Jordan, B. A.; Devi, L. A. ; *Nature* **1999**, *399*, 697-700.

Kaplan, J. P.; George, P.; Imidazo[1,2-a] pyridine derivatives and their application as pharmaceuticals. *US pat. 4.382.938* **1983**.

Kazlauskas, R.; Modeling – a tool for experimentalists. *Science* **2001**, *21*, 2277-2278.

Kravitz, E. A.; Kuffler, S. W.; Potter, D. D.; γ -Aminobutyric acid and other blocking compounds in crustácea. III. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. *J. Neurophysiol.* **1963**, *26*, 739-751.

Kravitz, E. A.; Potter, D. D.; A further study of the distribution of γ -Aminobutyric acid between excitatory and inhibitory axons of the lobster. *J. Neurochem.* **1965**, *12*, 323-328.

Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; O renascimento de um fármaco: talidomida. *Quim. Nova* **2001**, *24*, 683-688.

Lipinski, C. A.; Lead- and drug-like compounds: the rele-of-five revolution. *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, *1*, 337-341.

Löw, K.; Crestani, F.; Keist, R.; Benke, D.; Brünig, I.; Benson, J. A.; Fritschy, J. M.; Rüllicke, T.; Bluethmann, H.; Möhler, H.; Rudolph, U.; Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **2000**, *290*, 131-134.

Lüllmann, H.; Mohr, K.; **Farmacologia Texto e Atlas**. 4^a ed, Artmed Editora: Porto Alegre, 2004.

Maehle, A.; Prüll, C.; Halliwell, R.; The emergence of the drug receptor theory. *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 637-641.

Marshall, F. H.; Jones, K. A.; Kaupmann, K.; Bettler, B.; GABA_B receptors – the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 396-399.

Mason, H. J.; Wu, X.; Schmitt, R.; Macor, J. E.; Yu, G.; Synthesis of fused pyridopyrrolidine dione derivatives using hetero Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8931-8934.

McGovern, P. A.; Zhang, J.; Tang, J.; Hall, G. R.; Moreau, R. A.; Nuñez, A.; Butrym, E. D.; Richards, M. P.; Wang, C.; Cheng, G.; Zhao, Z.; Wang, C.; Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *P. N. A. S.* **2004**, *101*, 17593-17598.

McKernan *et al.*; Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α 1 subtype. *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 587-592.

McKernan, R. M.; Whiting, P. J.; Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 139-143.

Melcangi, R. C.; Panzica, G. C.; Steroids in the nervous system: a pandora's Box?. *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 311-312.

Möhler, H.; Crestani, F.; Rudolph, U.; GABA_A-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1*, 22-25.

Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.; **Harper: Bioquímica**. 9^a ed, Atheneu: São Paulo, 2002.

Okuno, E.; Caldas, I. L.; Chow, C.; **Física para ciências biológicas e biomédicas**. 1^a ed, Harbra: São Paulo, 1986.

Trost, B. M.; Fleming, I.; **Comprehensive organic synthesis**. 1th ed, Pergamon: Oxford, 1991.

Otsuka, M.; Iverson, L. L.; Hall, Z. W.; Kravitz, E. A.; Release of γ -Aminobutyric acid from inhibitory nerves of lobster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1966**, *56*, 1110-1115.

Owens, D. F.; Kriegstein, A. R.; Is there more to GABA than synaptic inhibition?. *Nature Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 715-727.

Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R.; **Purification of Laboratory Chemicals**, 1th ed, Pergamon Press: London, 1966.

Pophristic, V.; Goodman, L.; Hyperconjugation not steric repulsion leads to the staggered structure of ethane. *Nature* **2001**, *411*, 565-568.

Potapov, V.; **Stereochemistry**, 1th ed, MIR Publishers: Moscow, 1979.

Quallich, G. J.; Williams, M. T.; Process for preparing a 4,4-diphenylbutanoic acid derivative. *US pat. 4.777.288* **1988**.

Rawlins, M. D.; Cutting the cost of drug development?. *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 360-364.

Roberts, E.; Frankel, S.; γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 55-63.

Rudolph, U.; Crestani, F.; Benke, D.; Brünig, I.; Benson, J. A.; Fristchy, J. M.; Martin, J. R.; Bluethmann, H.; Möhler, H.; Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Nature* **1999**, *401*, 796-800.

Rudolph, U.; Crestani, F.; Möhler, H.; GABA_A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 188-194.

Saettel, N. J.; Wiest, O.; Singleton, D. A.; Meyer, M. P.; Isotope effects and the mechanism of an electron-transfer-catalyzed Diels-Alder Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11552-11559.

Sanger, D. J.; Depoortere, H.; The pharmacology and mechanism of action of zolpidem. *CNS Drug Rev.* **1998**, *4*, 323-340.

Schreiner, P. R.; Teaching the right reasons: lessons from the mistaken origin of the rotational barrier in ethane. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2002**, *41(19)*, 3579-3581.

Sieghart, W.; Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* **1995**, *47*, 181-234.

Sieghart, W.; Unraveling the functions of GABA_A receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 411-413.

Sigel, E.; Buhr, A.; The benzodiazepine binding site of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 425-429.

Silverstein, R. M.; Bassler, G. C. ; Morrill, T. C. ; **Spectrometric identification of organic compounds**. 5th ed, John Wiley & Sons, INC: New York, 1991.

Smith, G. B.; Olsen, R. W.; Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16*, 162-168.

Smith, M. R.; March, J.; **March's advanced organic chemistry**. 5th ed, John Wiley & Sons, INC: New York, 2001.

Snyder, S. H.; Pasternak, G. W.; Historical review: opioid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 198-205.

Stefano, G. B.; Goumon, Y.; Casares, F.; Cadet, P.; Fricchione, G. L.; Rialas, C.; Peter, D.; Sonetti, D.; Guarna, M.; Welters, I. D.; Bianchi, E.; Endogenous morphine. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 436-442.

Sternbach, L. H.; Kaiser, S.; Reeder, E.; Quinazoline 3-oxide structure of compounds previously described in the literature as 3.1.4-benzoxadiazepine. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 475.

Sternbach, L. H.; The benzodiazepine story. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1-7.

Teixeira, S.; **Dicionário Médico Stedman**. Editora Guanabara Koogan S. A.: Rio de Janeiro, 1979.

Trost, B. M.; **Comprehensive organic synthesis**. ed, , 1991.

Vaughan, C. W.; Ingram, S. L.; Connor, M. A.; Christie, M. J.; How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* **1997**, *390*, 611-614.

Verli, H.; Albuquerque, M. G.; Alencastro, R. B.; Barreiro, E. J.; Local intersection volume: a new 3D descriptor applied to develop a 3D-QSAR pharmacophore model for benzodiazepine receptor ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 219-229.

Verma, A.; Snyder, S. H.; Peripheral type benzodiazepine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1989**, *29*, 307-322.

Walters, W. P.; Namchuk, M.; Designing screens: how to make your hits a hit. *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 259-266.

Weinhold, F.; A new twist on molecular Shape. *Nature* **2001**, *411*, 539-541.

Wermuth, C. G.; **The practice of medicinal chemistry**. 1th ed, Academic Press: London, 1996.

Williams, D. A.; Lemke, T. L.; **Foye's principles of Medicinal Chemistry**. 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2002.

Wilson, J.; Sanyal, S.; Van Tol, H.; Dopamine D₂ and D₄ receptor ligands: relation to antipsychotic action. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *351*, 273-286.

Wisden, W.; Stephens, D. N.; Towards better benzodiazepines. *Nature* **1999**, *401*, 751-752.

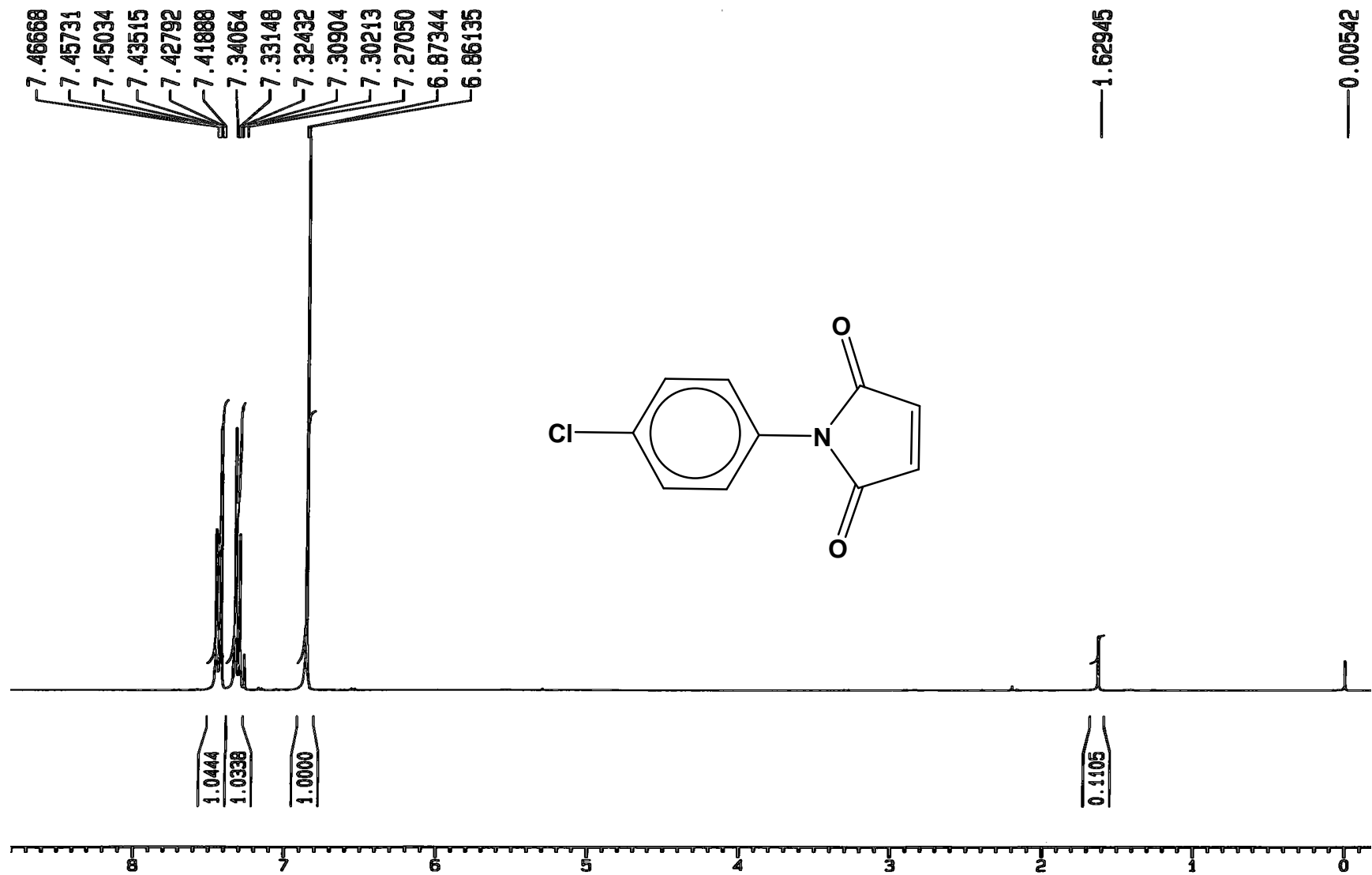
Wolff, M. E.; **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 5th ed, John Wiley & Sons: New York, 1997.

Zaks, A.; Method for inducing pain relief using imidazo[1,2-a]pyridine derivatives. *US pat. 204.443* **2004**.

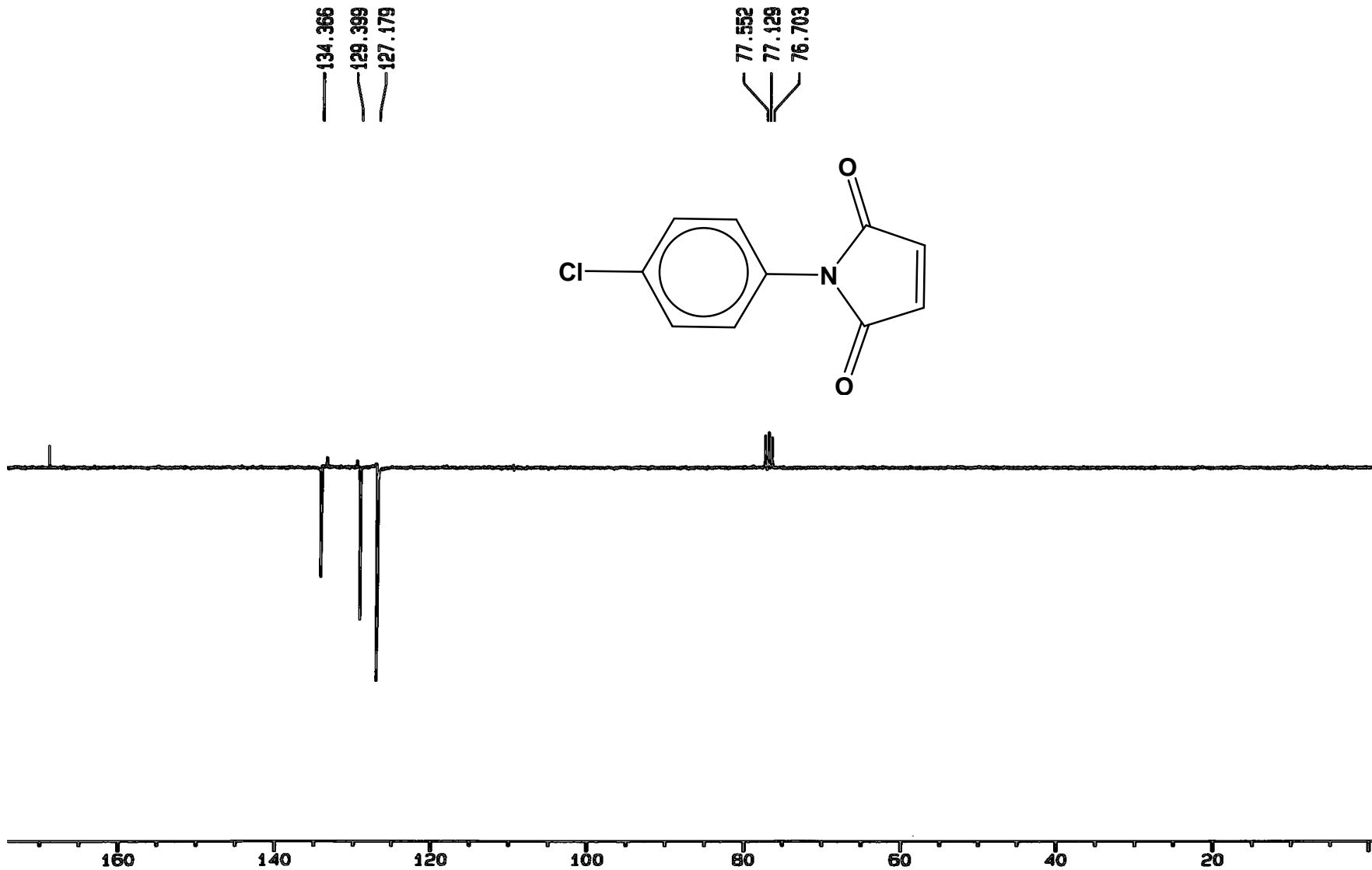
Zang, D.; Pan, Z.; Awobuluyi, M.; Lipton, S. A.; Structure and function of GABA_C receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, 22, 121-131.

Endereços eletrônicos consultados

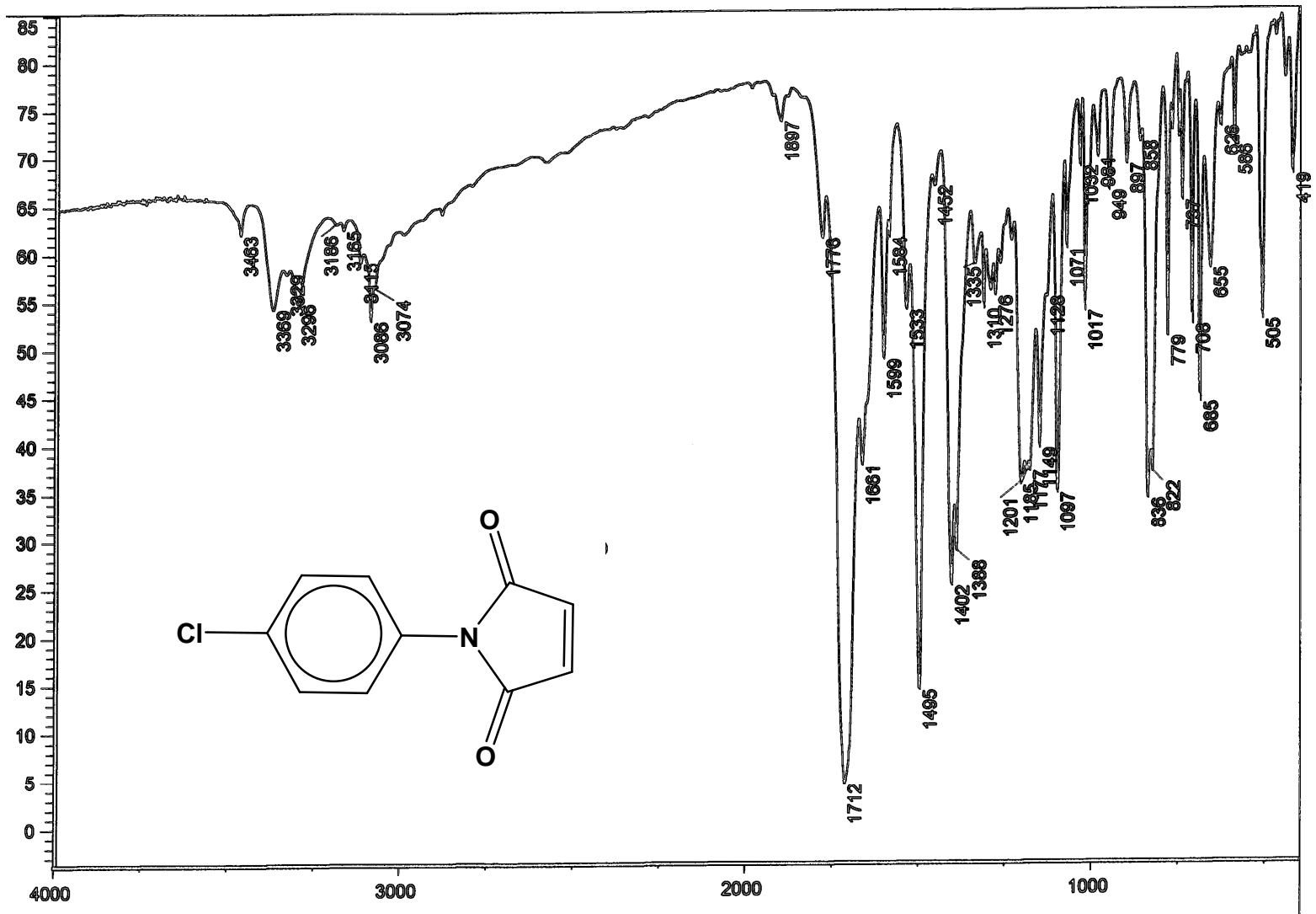
1. National Institute of Mental Health (www.nimh.nih.gov)
2. Office of the Surgeon General (www.surgeongeneral.gov)
3. U.S. Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov)
4. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (www.samhsa.gov)
5. National Institute on Aging (www.nia.nih.gov)
6. Office of National Drug Control Policy (www.whitehousedrugpolicy.gov)
7. 2001 Mayo Foundation for Medical Education and Research (www.mayo.edu)
8. American Obesity Association (www.obesity.org)
9. The National Women's Health Information Center (www.4woman.gov)



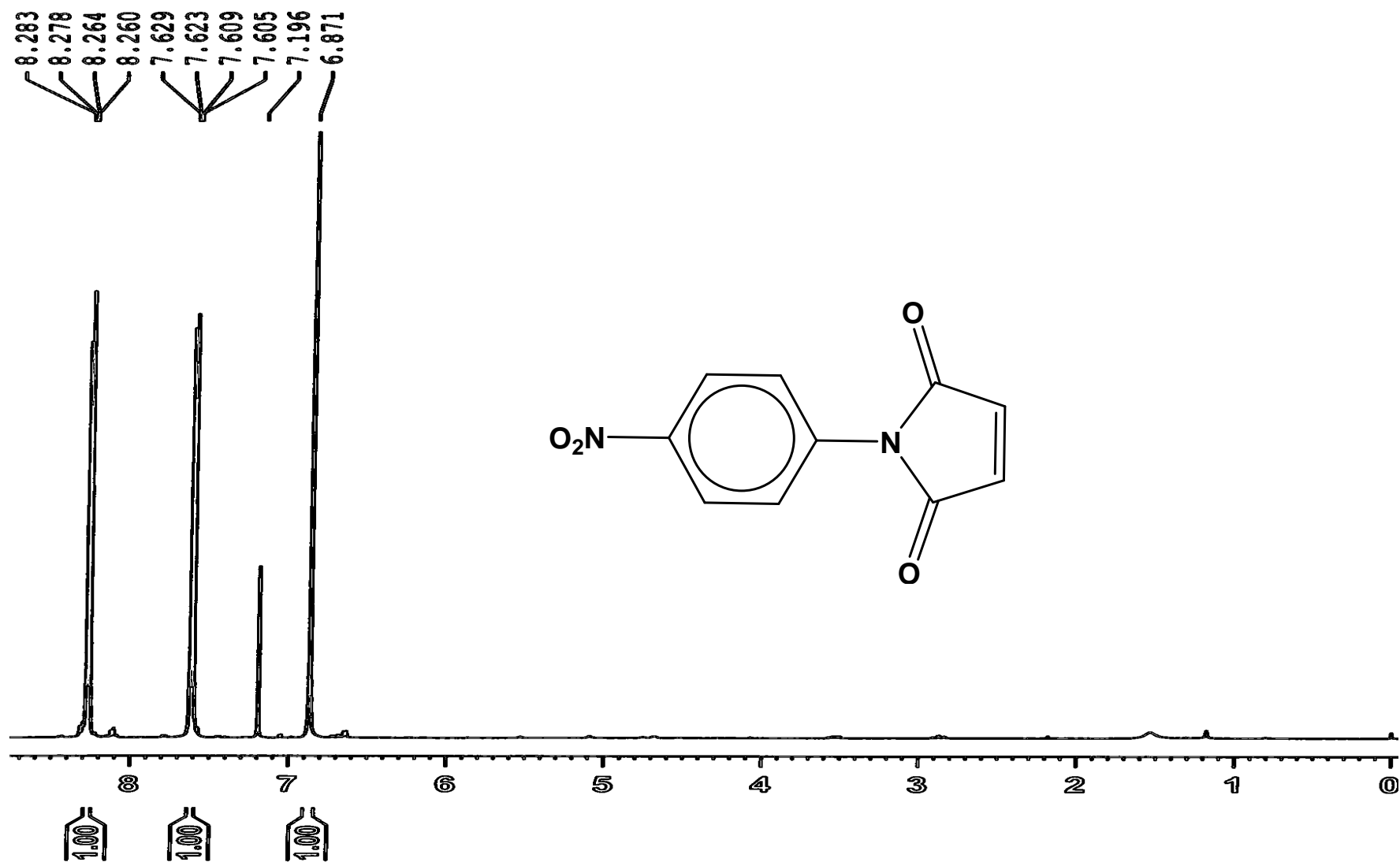
E. 1 – Espectro de RMN ^1H do derivado **53** (CDCl₃/TMS/300 MHz).



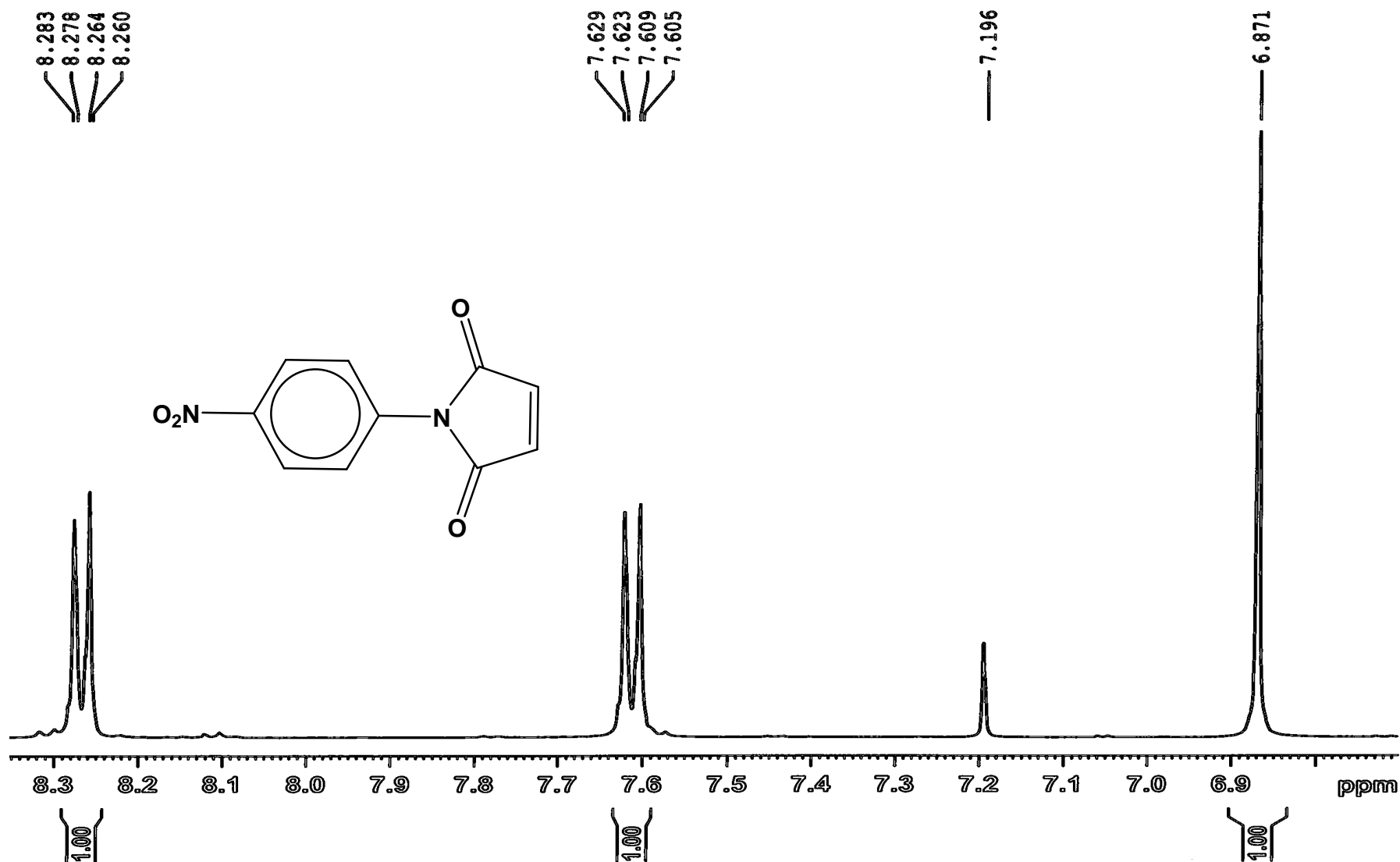
E. 2 – Espectro de Pendant do derivado **53** (CDCl₃/TMS/75 MHz).



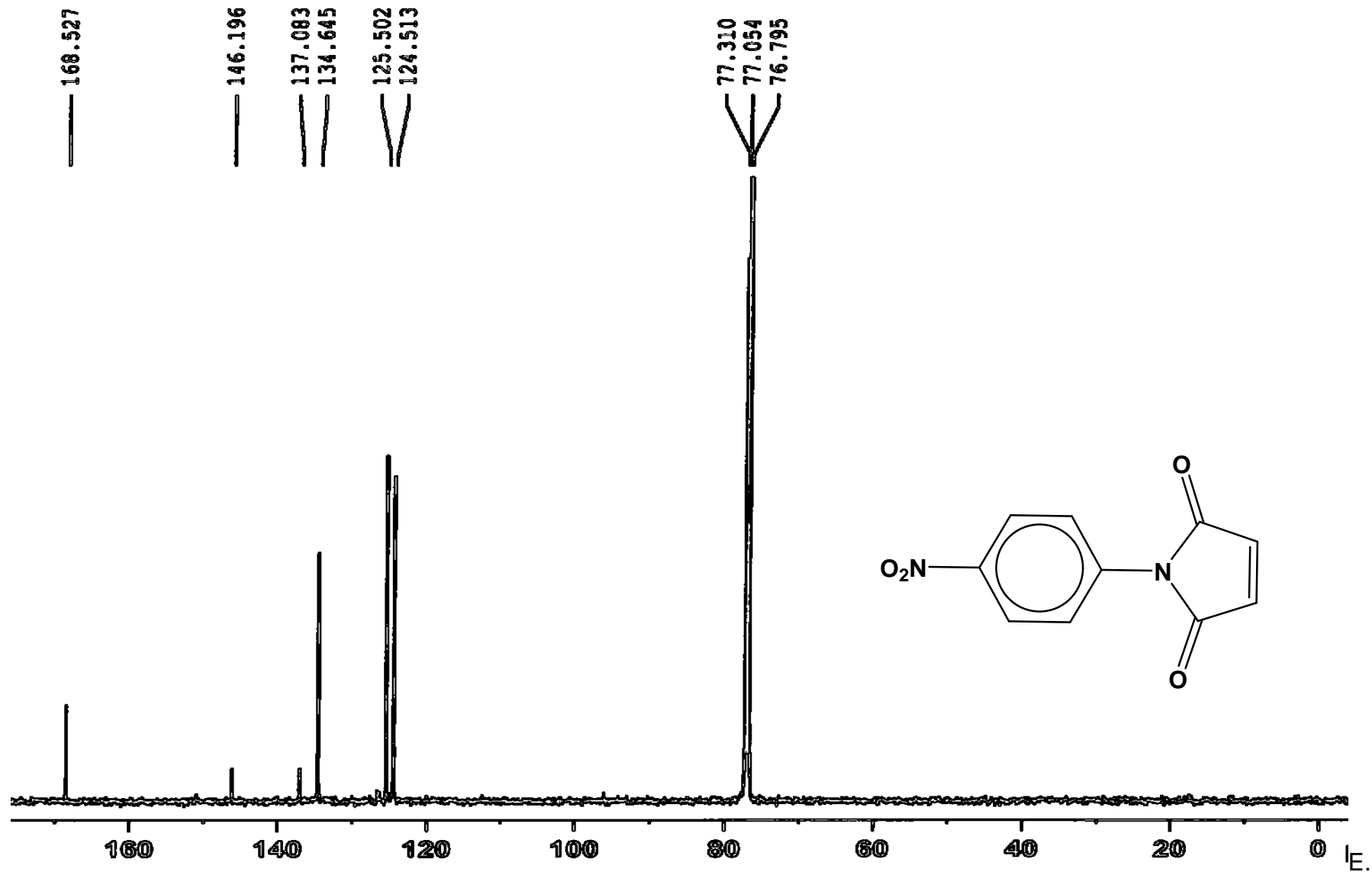
E. 3 – Espectro de IV do **53** (Pastilha de KBr).



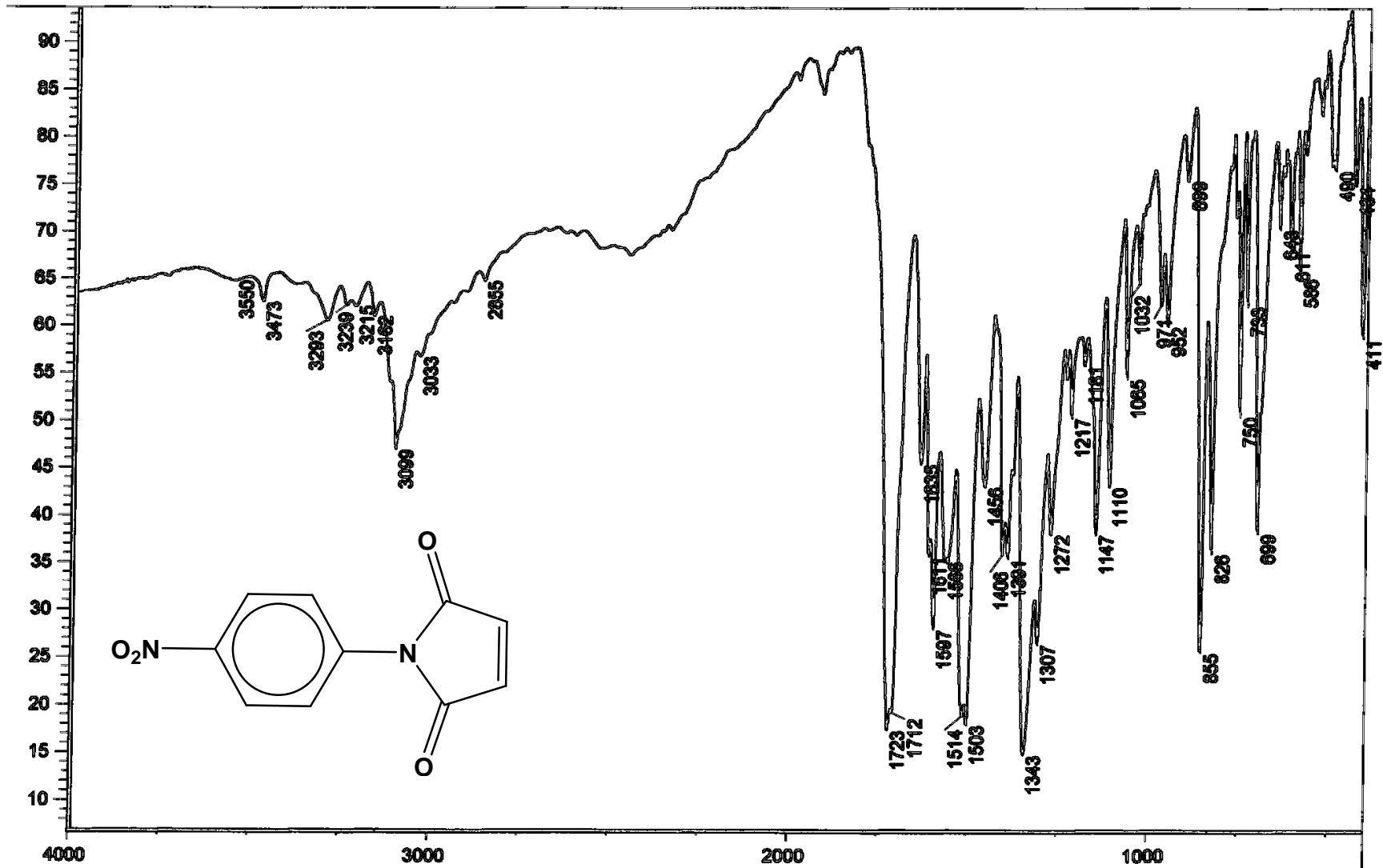
E. 4 – Espectro de RMN ^1H do derivado **54** ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/500 \text{ MHz}$).



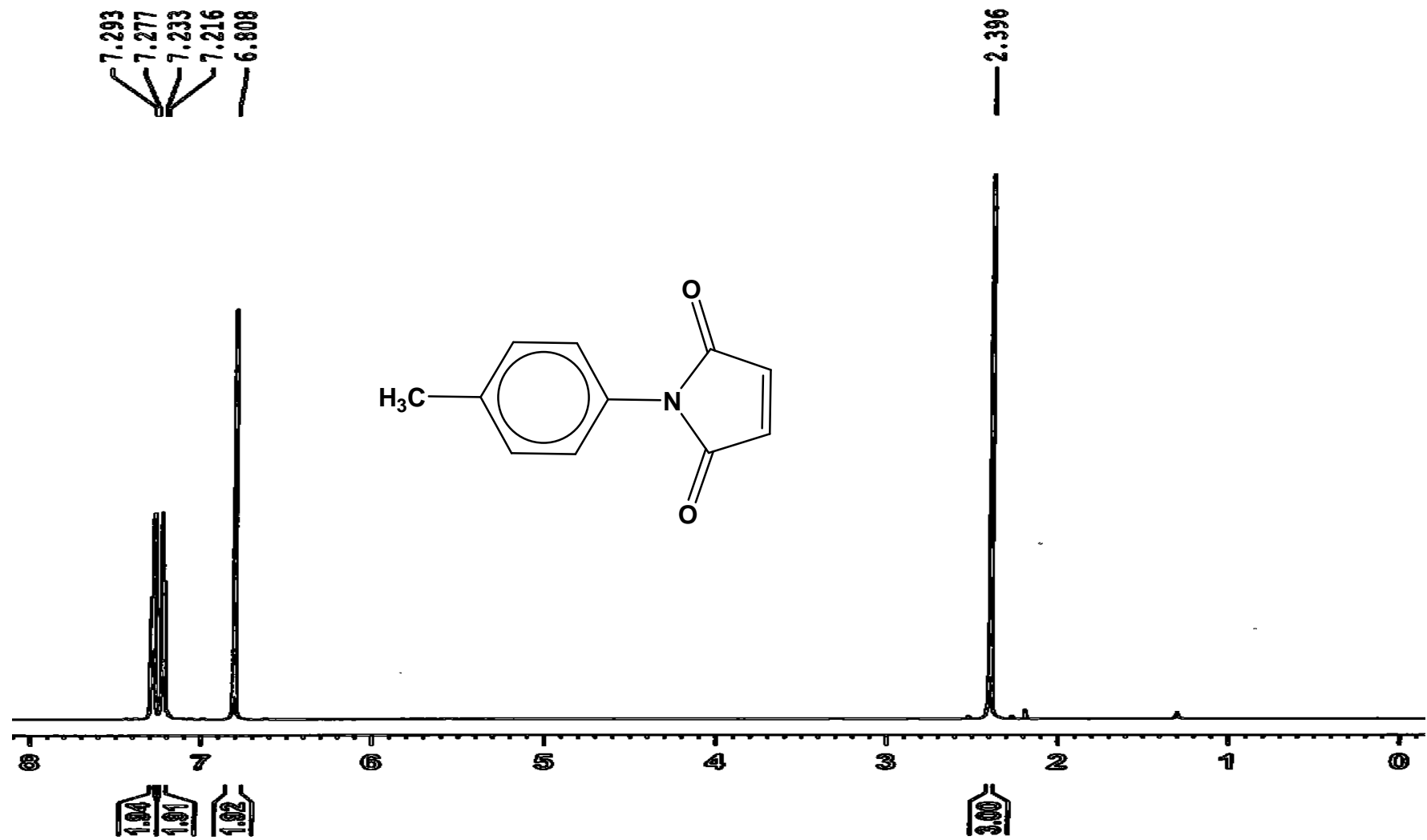
E. 5 – Espectro de RMN ^1H do derivado **54** (CDCl₃/TMS/500 MHz), expansão.



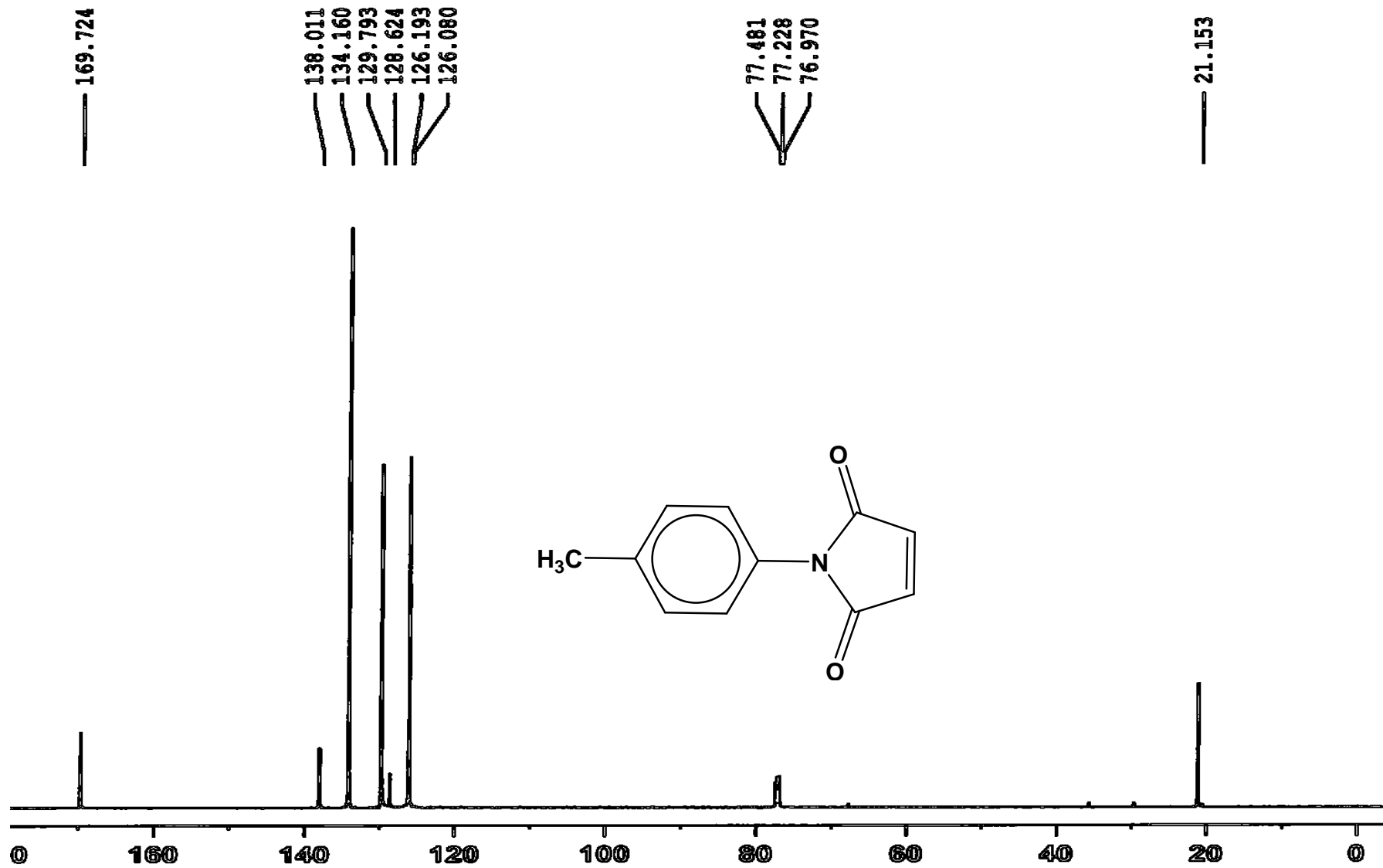
E. 6 – Espectro de RMN ¹³C do derivado 54 (CDCl₃/TMS/125 MHz).



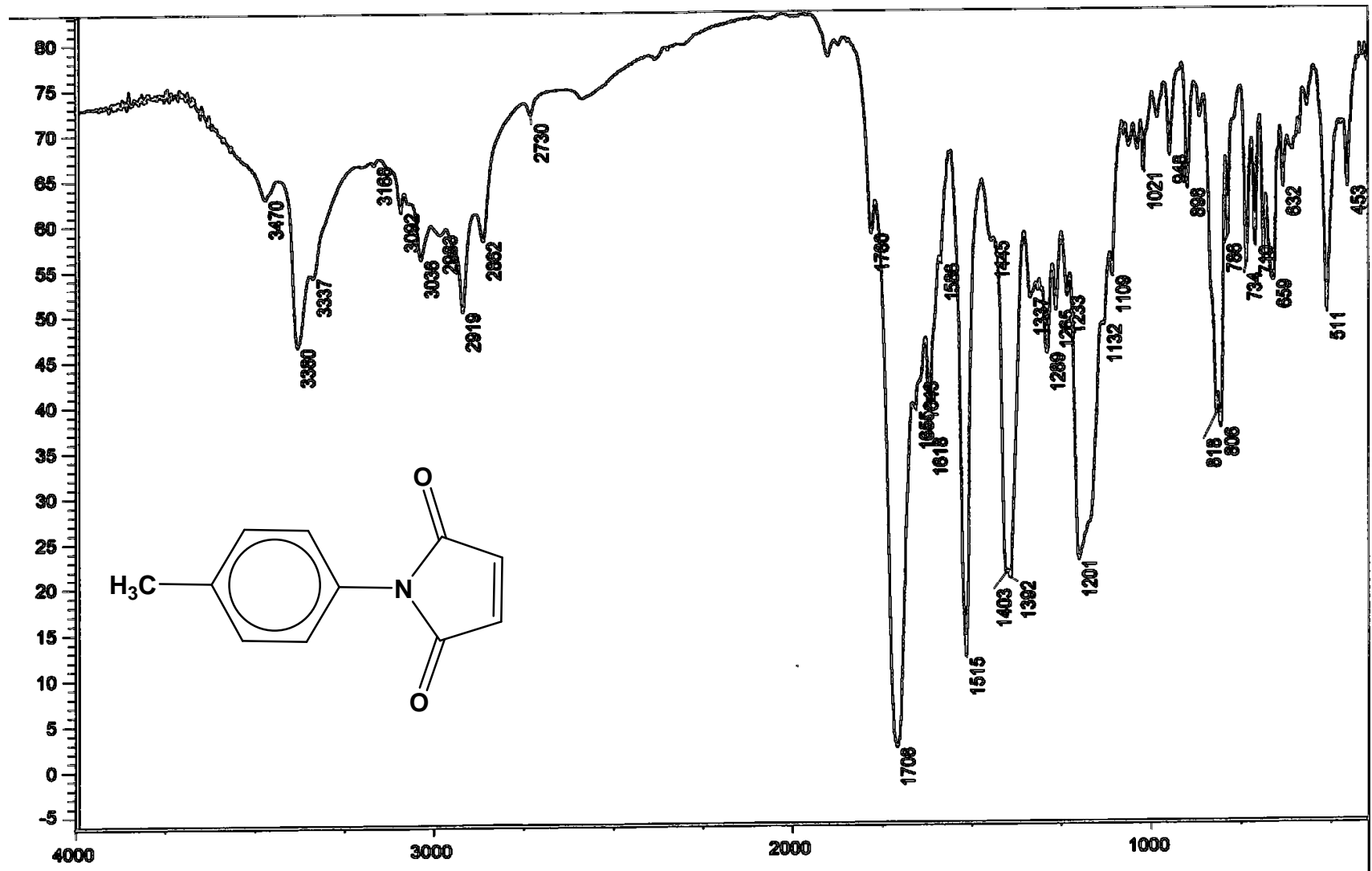
E. 7 – Espectro de IV do derivado **54** (Pastilha de KBr).



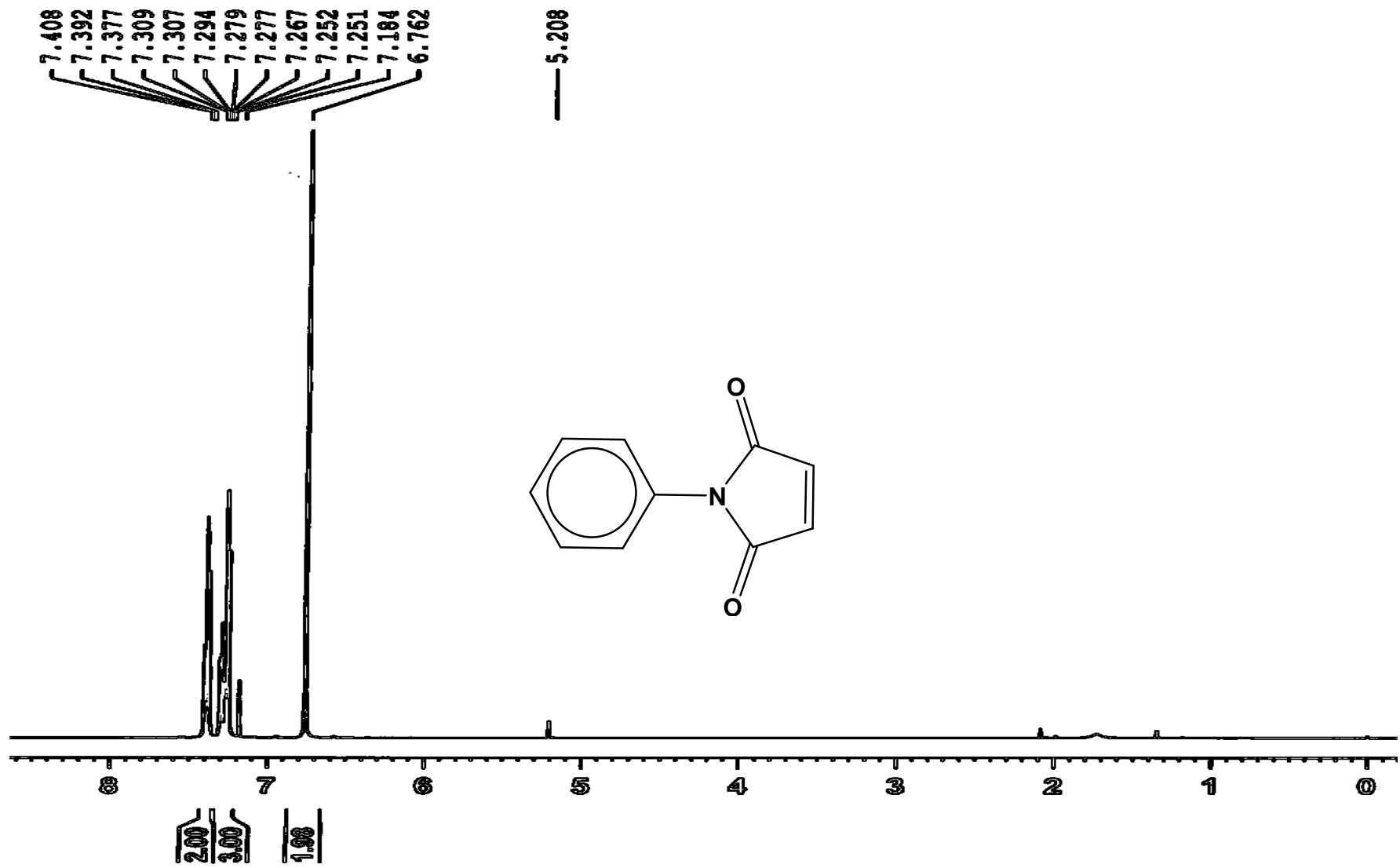
E. 8 – Espectro de RMN ^1H do derivado **55** ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/500$ MHz).



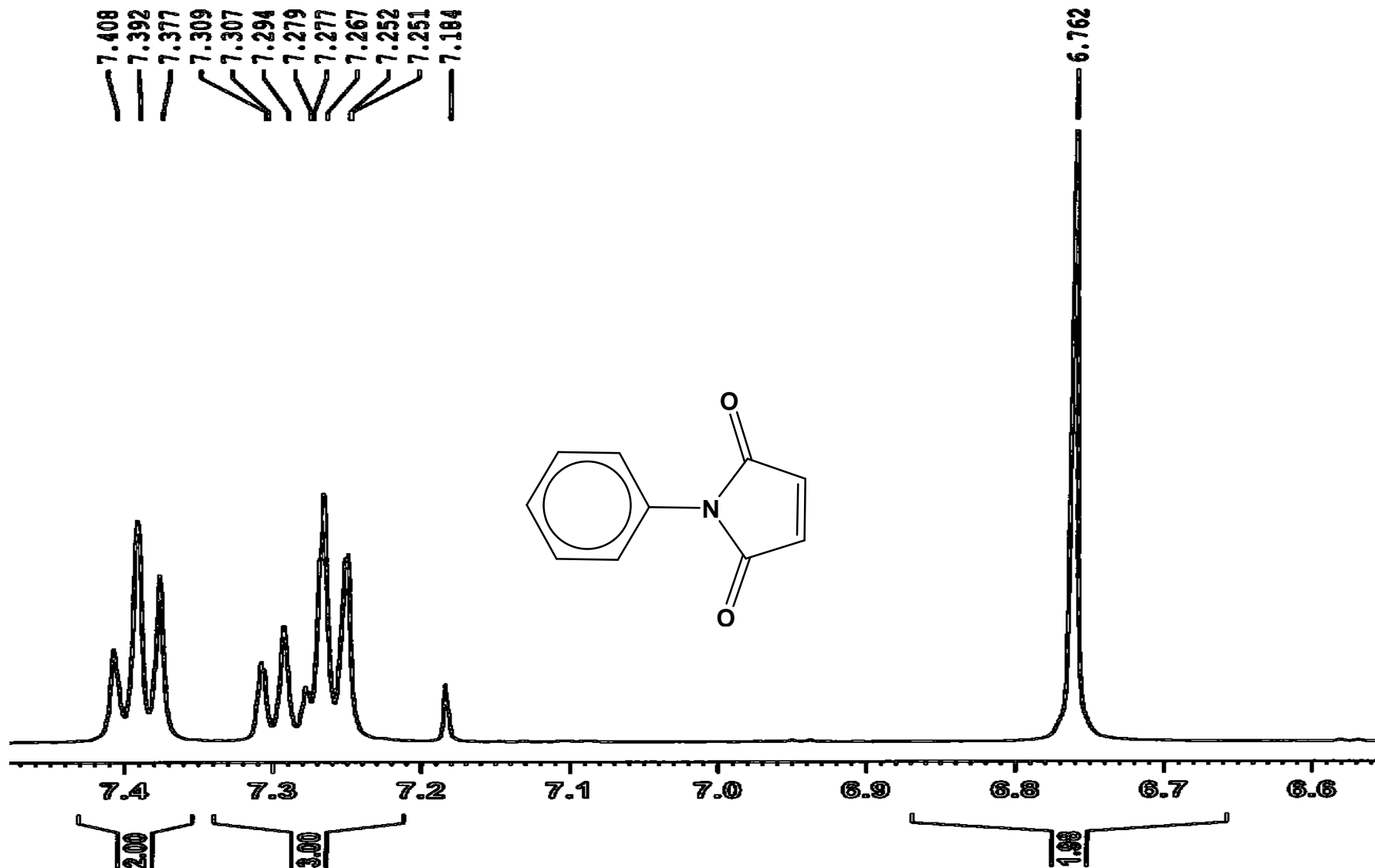
E. 9 – Espectro de RMN ¹³C do derivado **55** (CDCl₃/TMS/125 MHz).



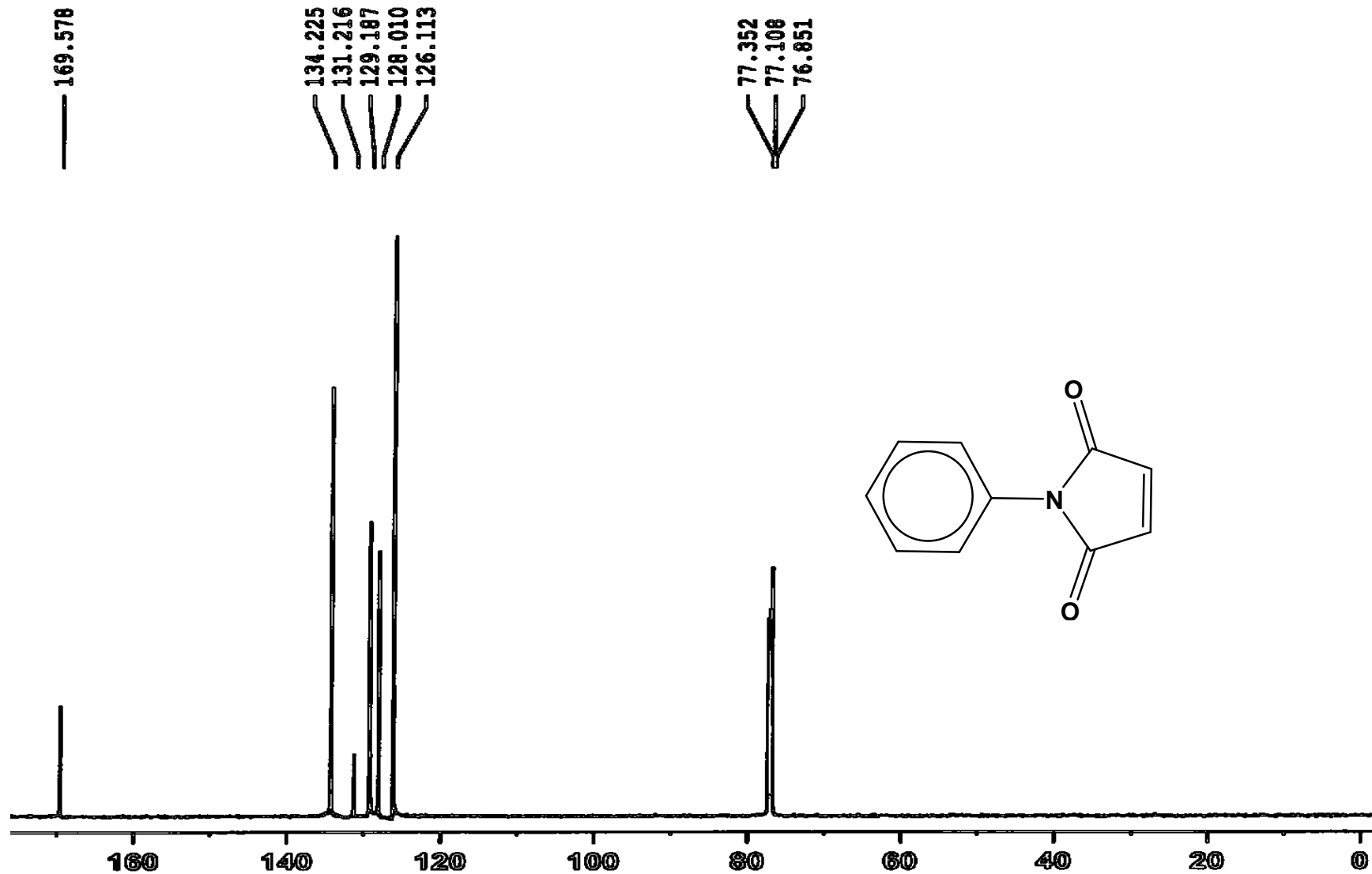
E. 10 – Espectro de IV do derivado **55** (Pastilha de KBr).



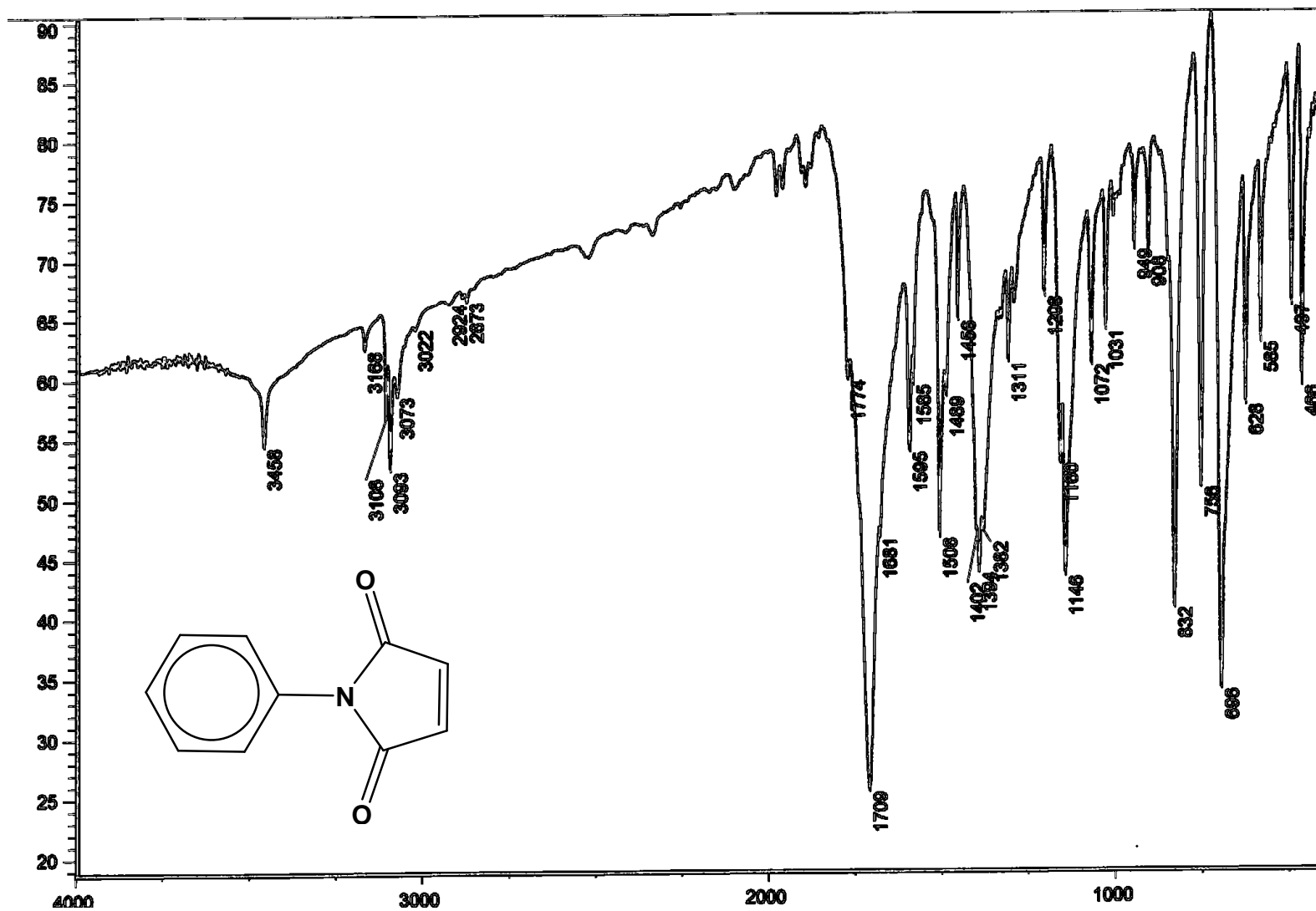
E. 11 – Espectro de RMN ¹H do derivado **56** (CDCl₃/TMS/500 MHz).



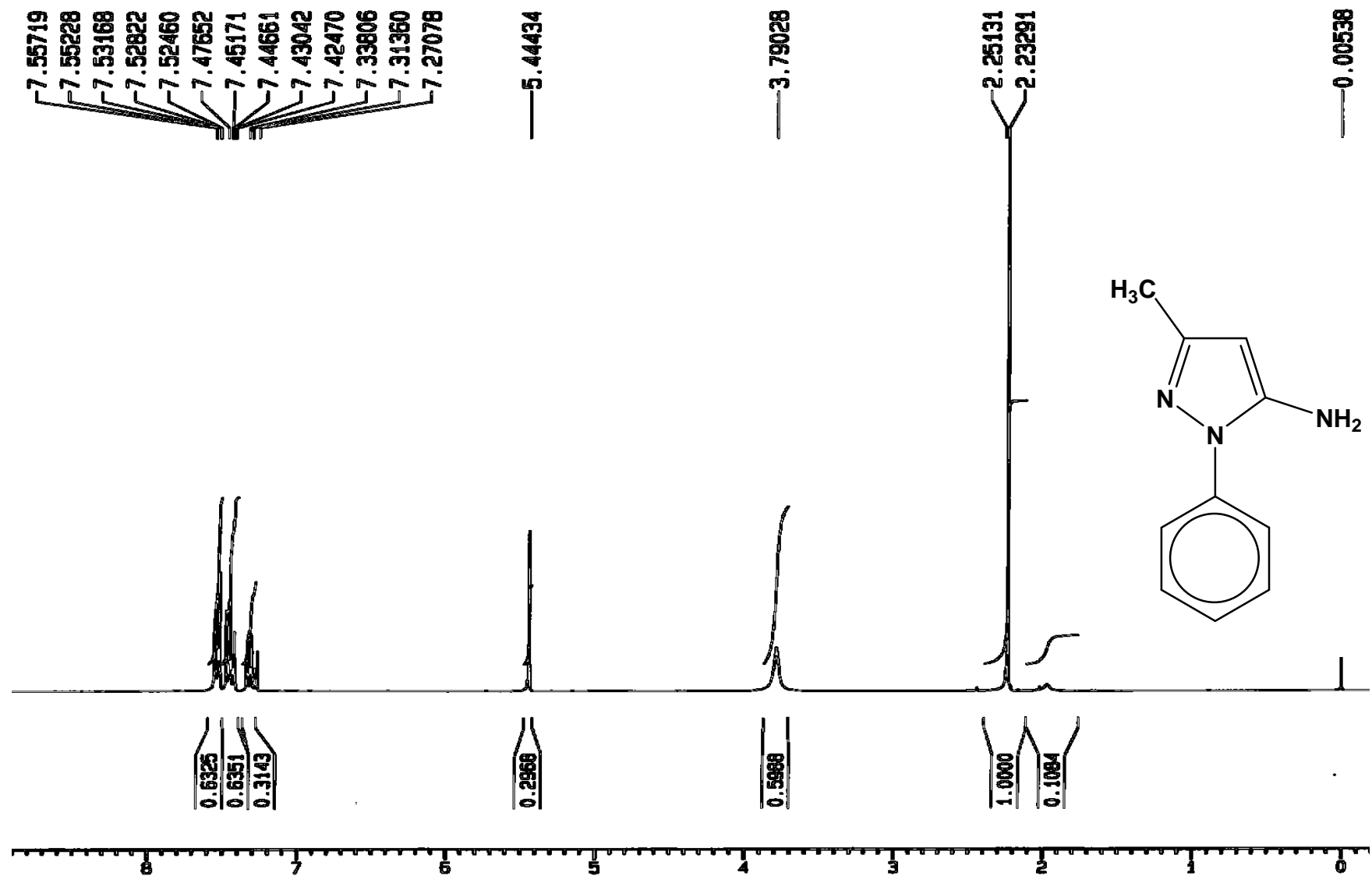
E. 12 – Espectro de RMN ¹H do derivado **56** (CDCl₃/TMS/500 MHz), expansão.



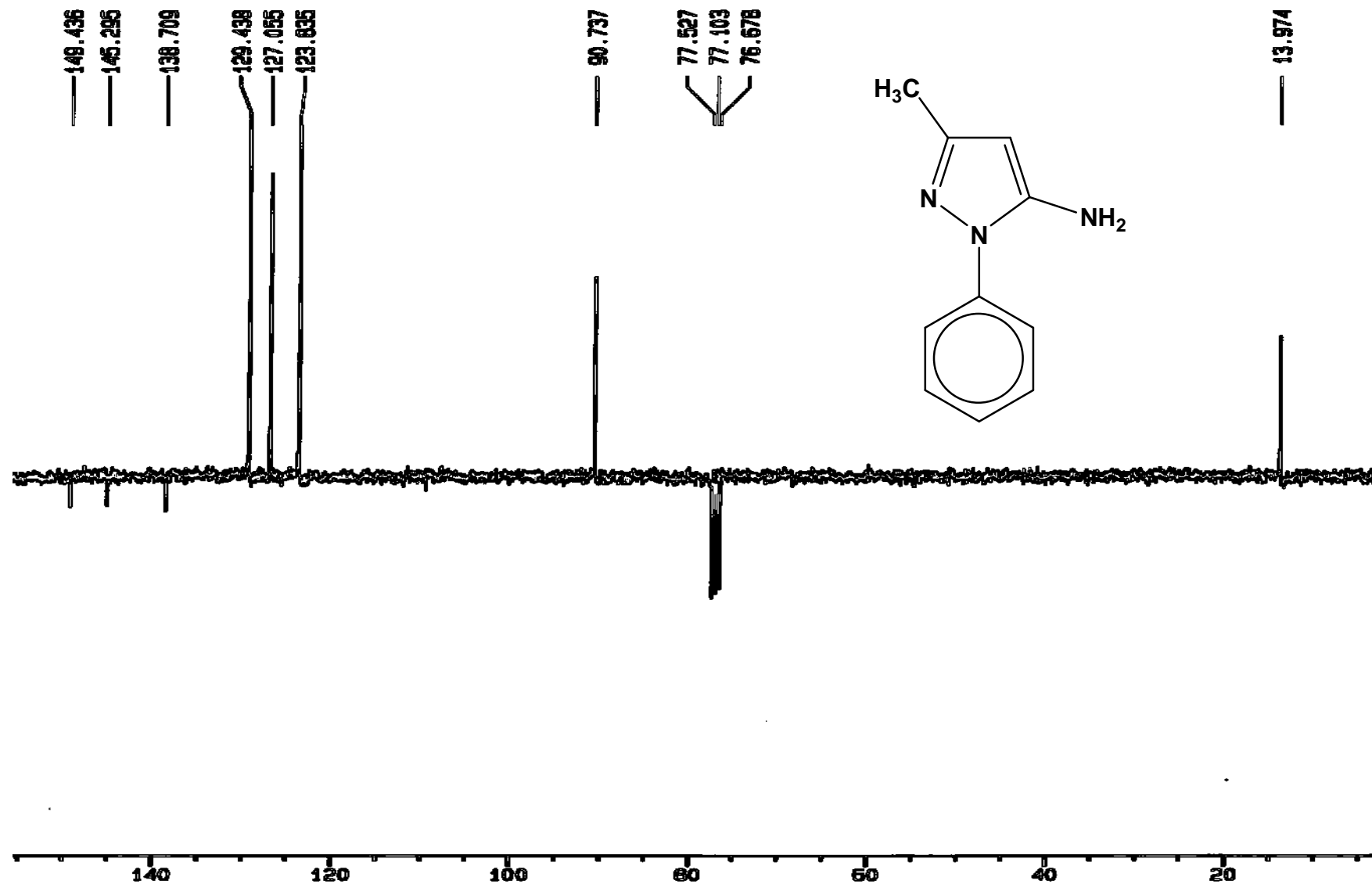
E. 13 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado **56** ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/125\text{ MHz}$).



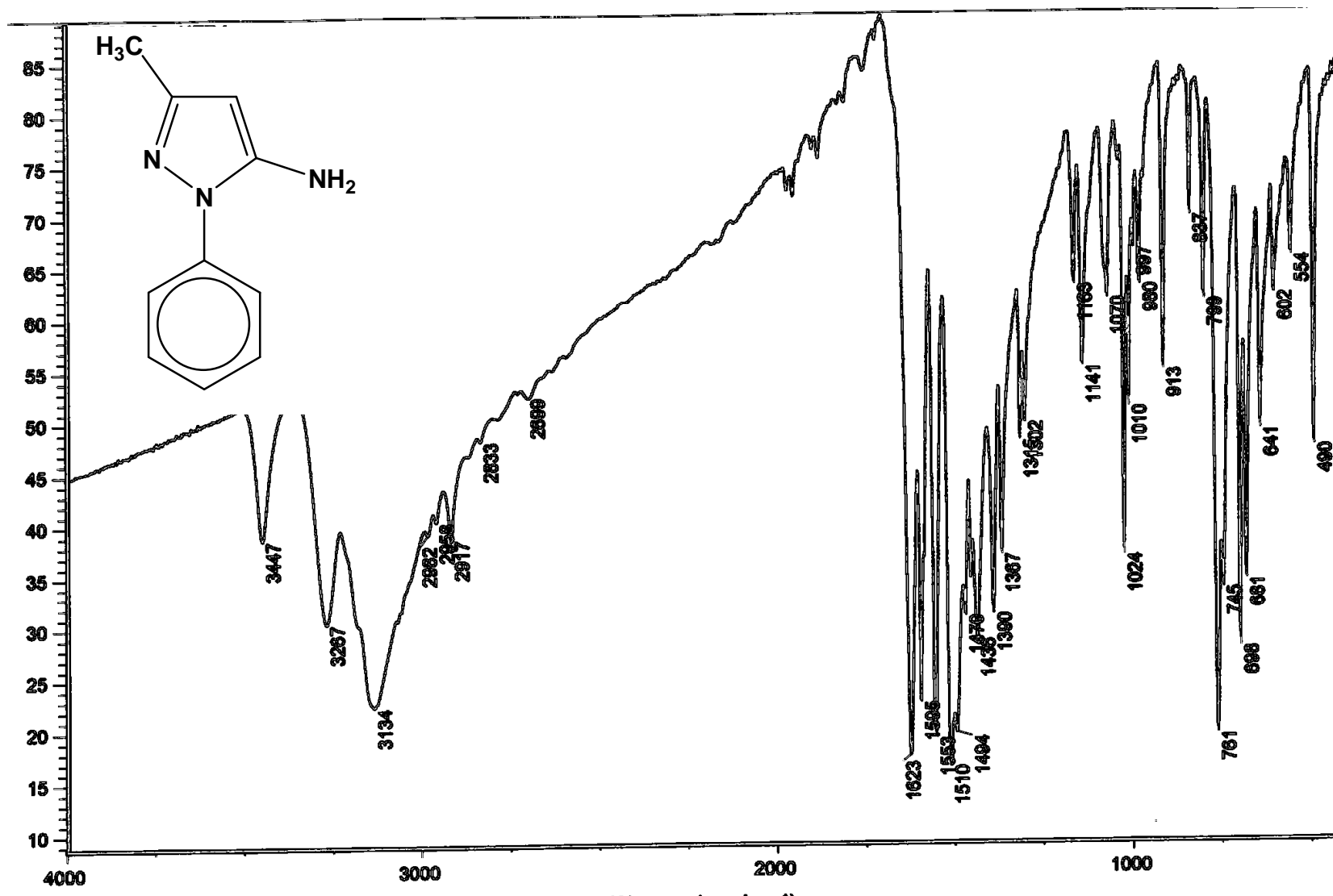
E. 14 – Espectro de IV do derivado **56** (Pastilha de KBr).



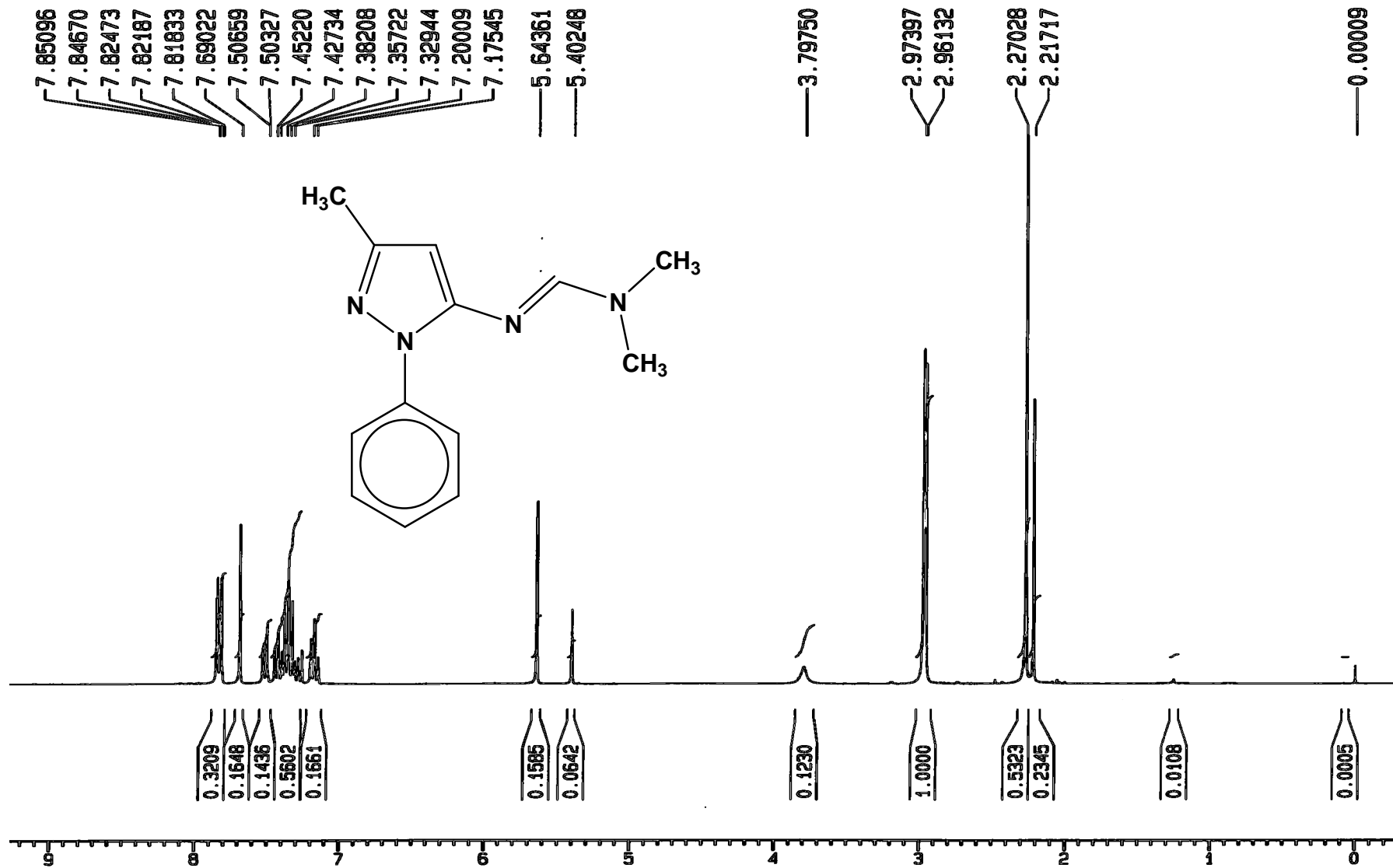
E. 15 – Espectro de RMN ^1H do derivado 58 ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/300\text{ MHz}$).



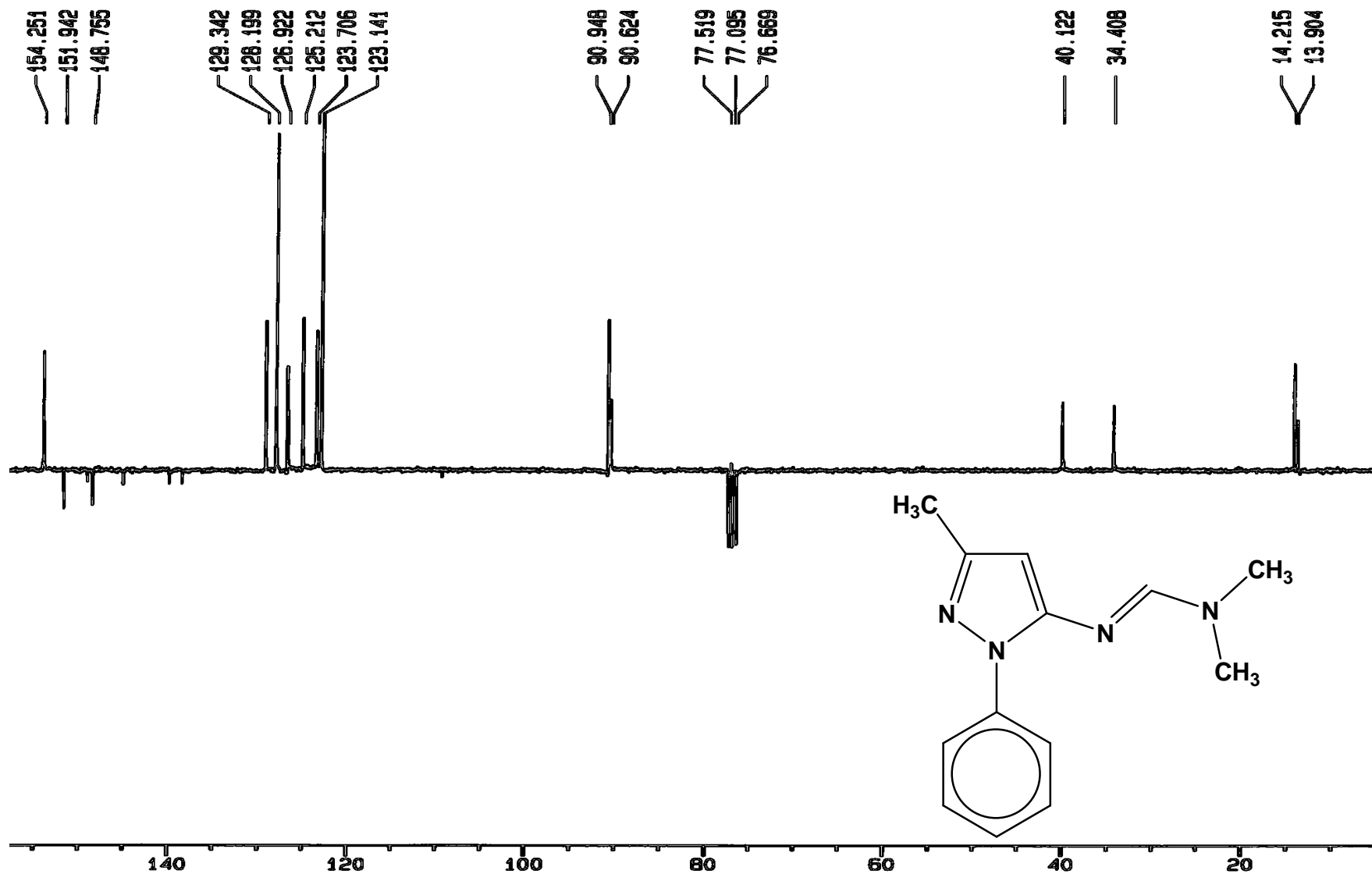
E. 16 – Espectro de Pendant do derivado 58 (CDCl₃/TMS/75 MHz).



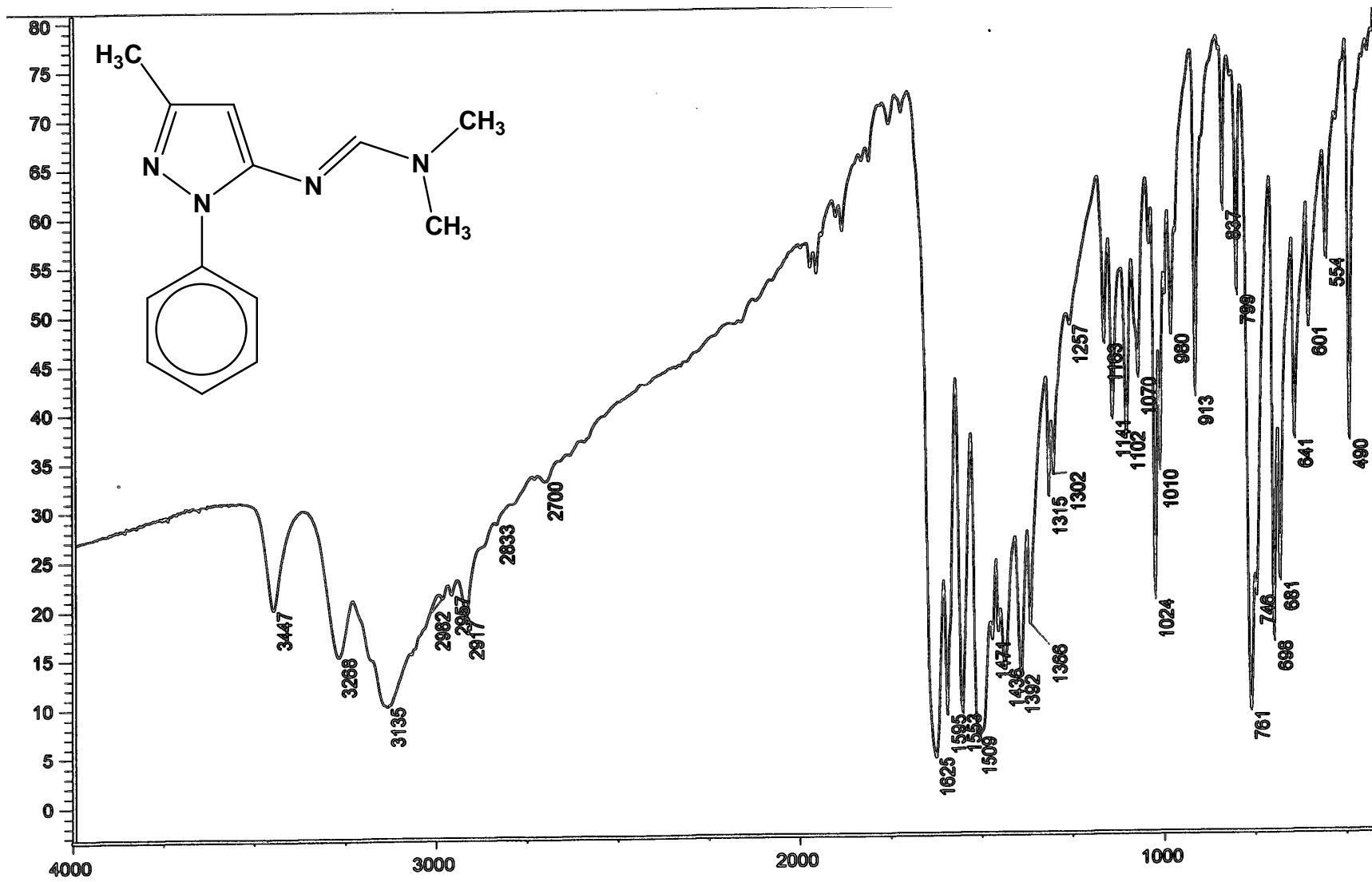
E. 17 – Espectro de IV do derivado 58 (Pastilha de KBr).



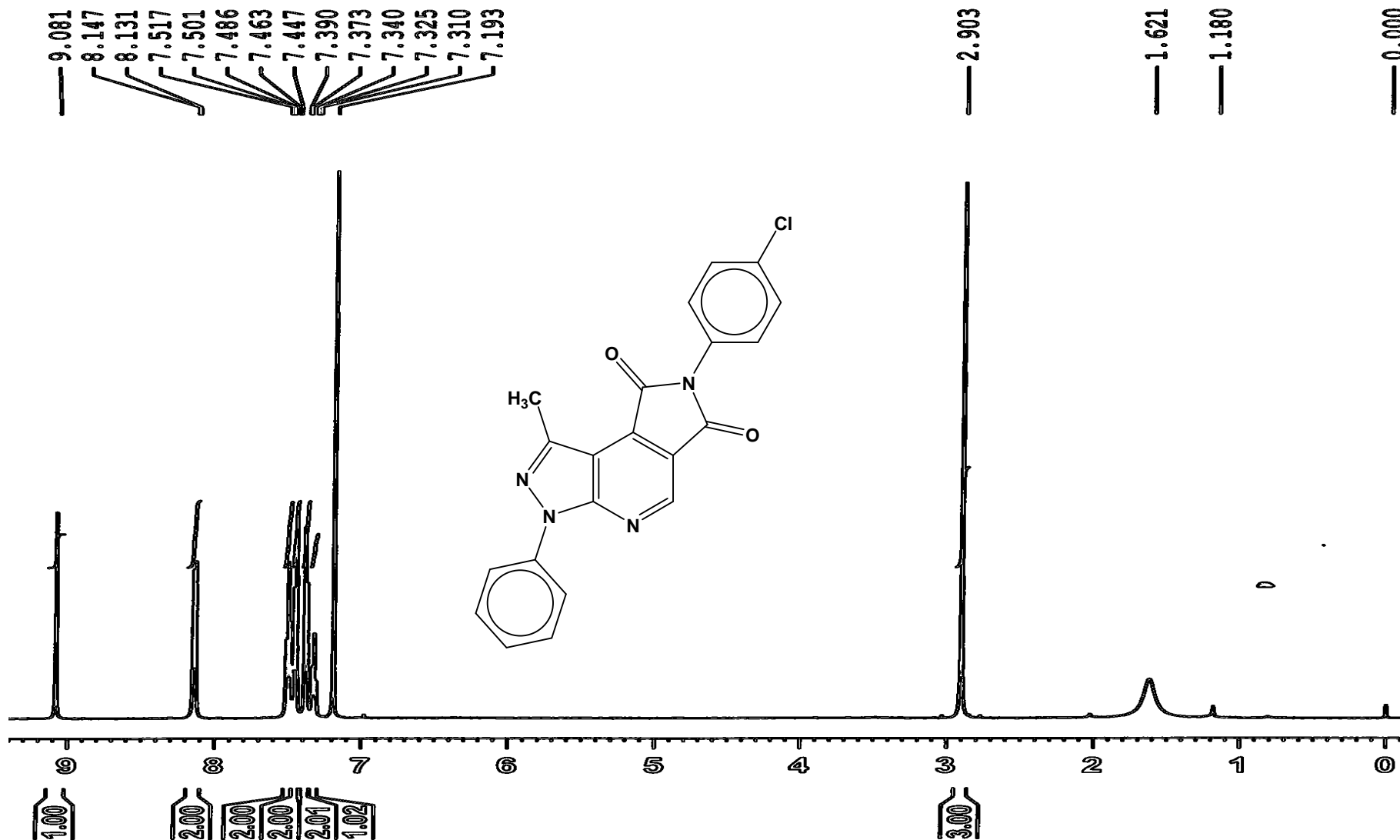
E. 18 – Espectro de RMN ¹H do derivado 57 (CDCl₃/TMS/300 MHz).



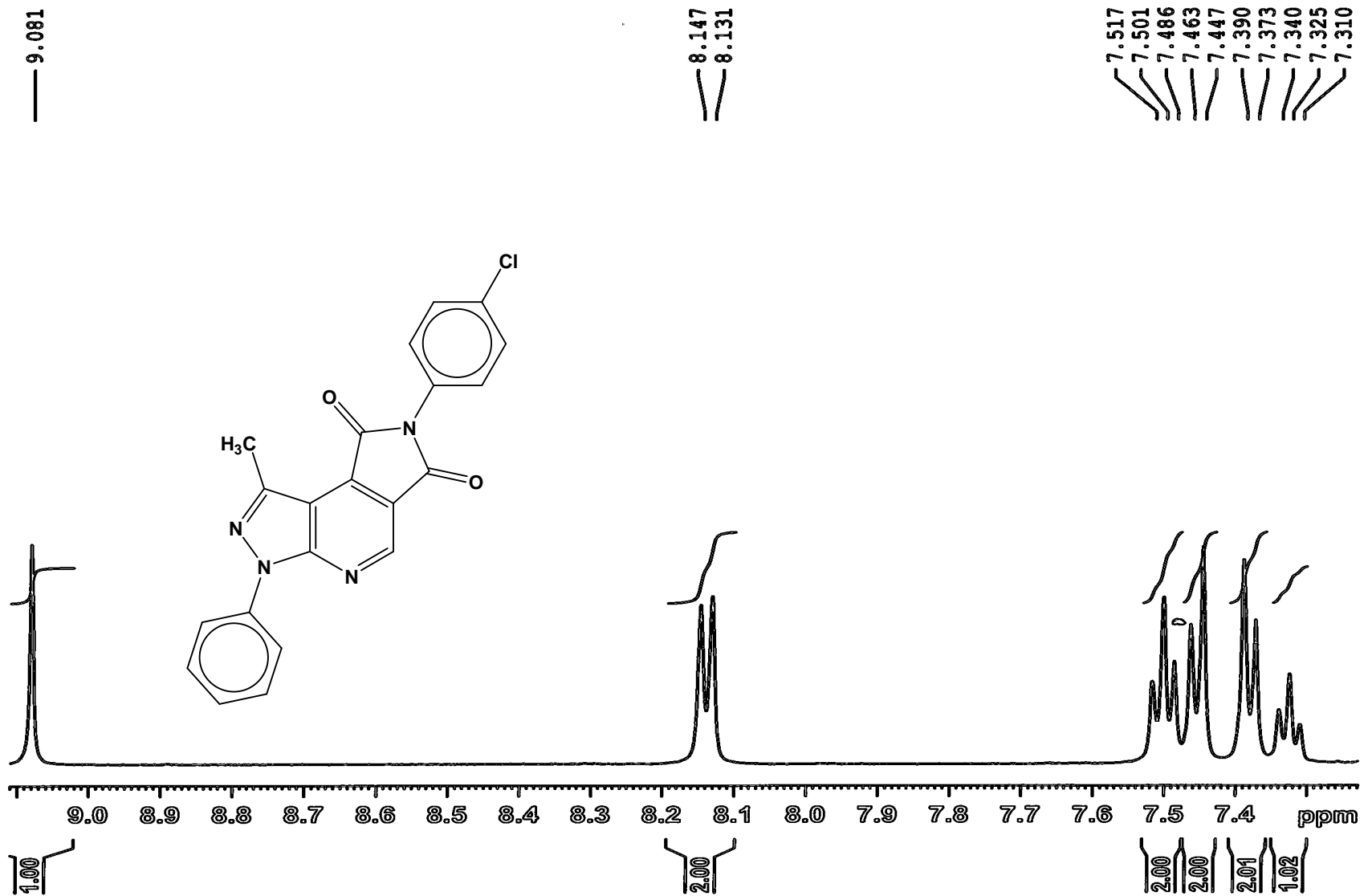
E. 19 – Espectro de Pendant do derivado **57** (CDCl₃/TMS/75 MHz).



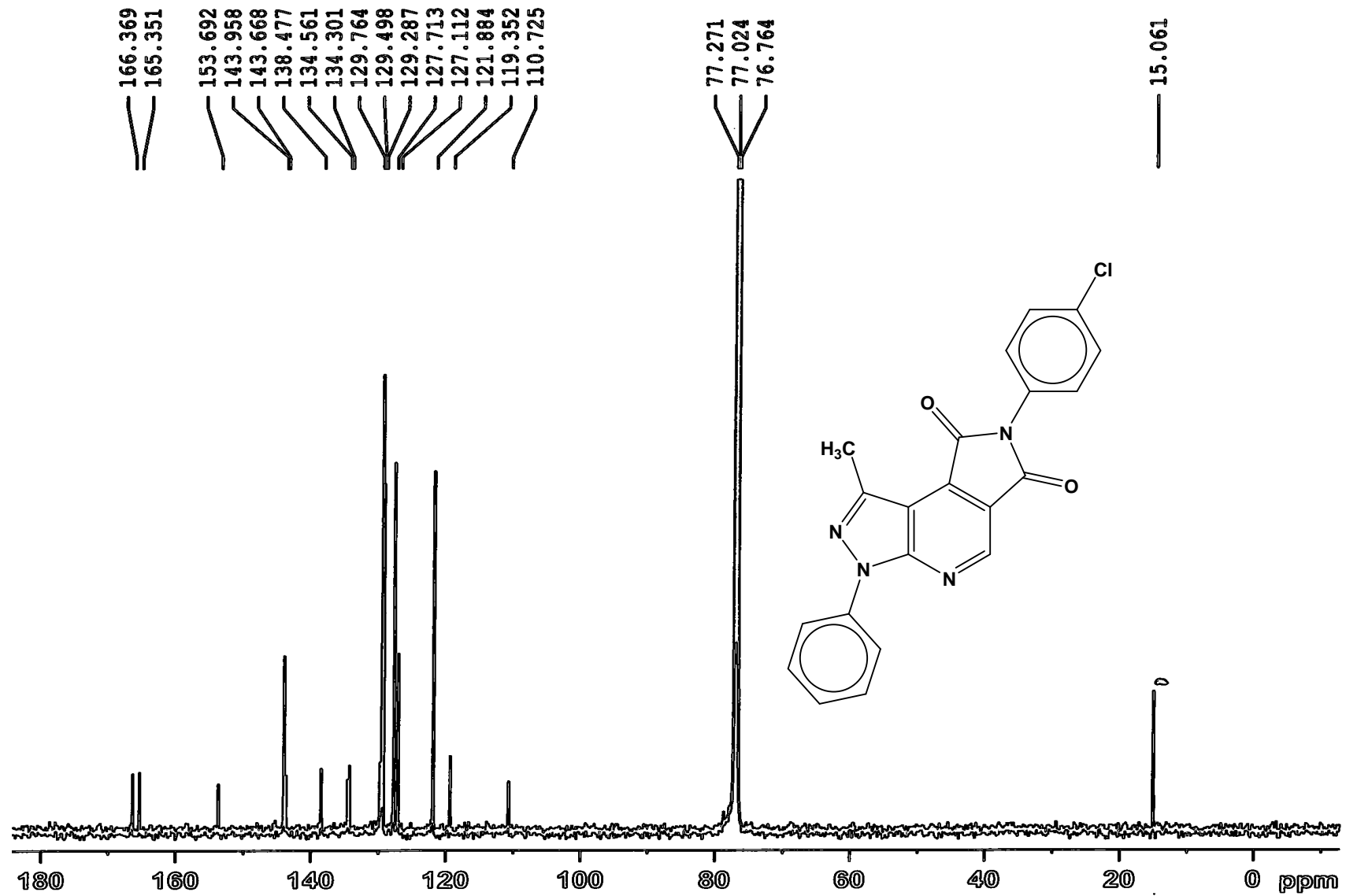
E. 20 – Espectro de IV do derivado **57** (Pastilha de KBr).



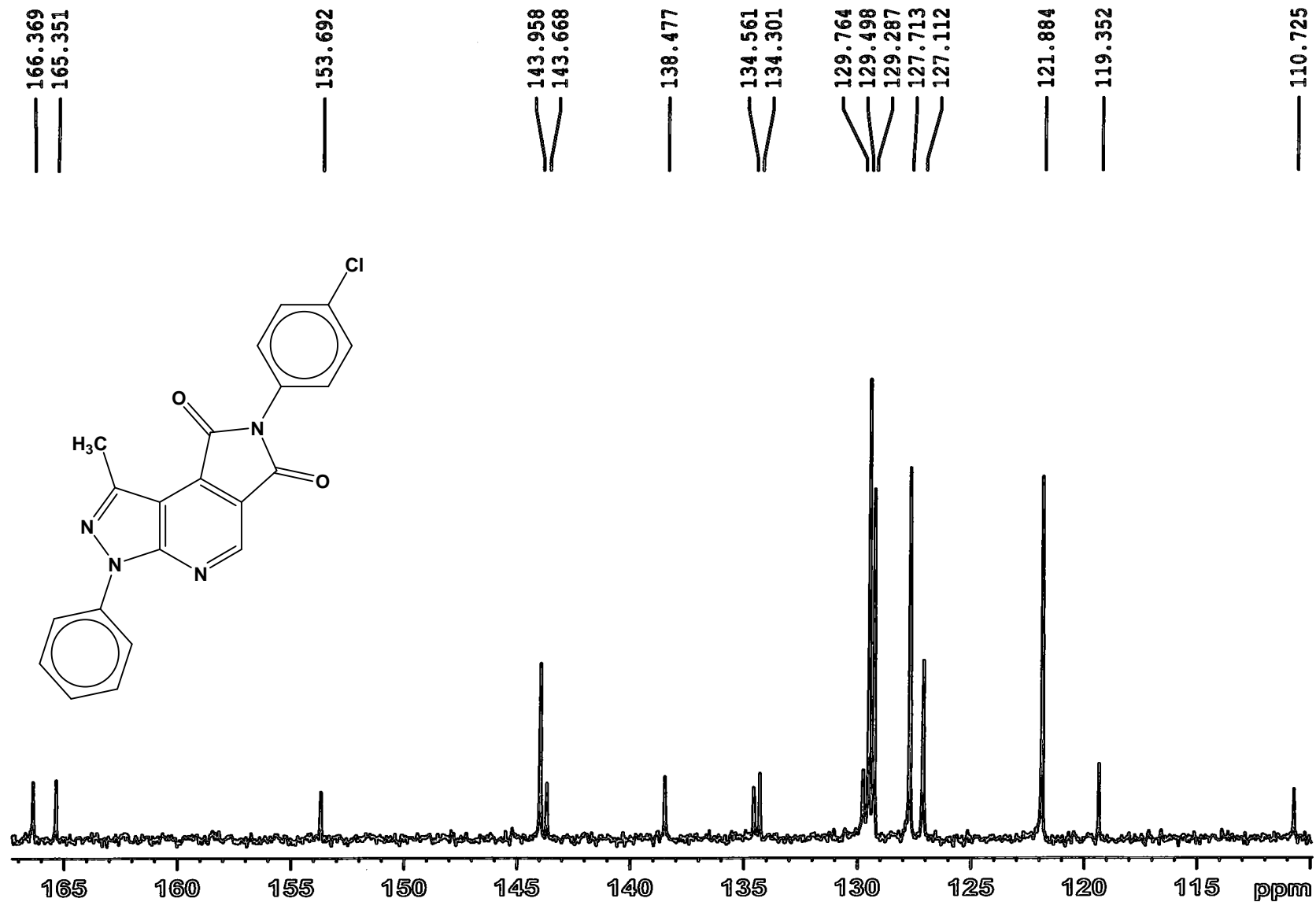
E. 21 – Espectro de RMN ¹H do derivado LASSBio 872 (**49**) (CDCl₃/TMS/500 MHz).



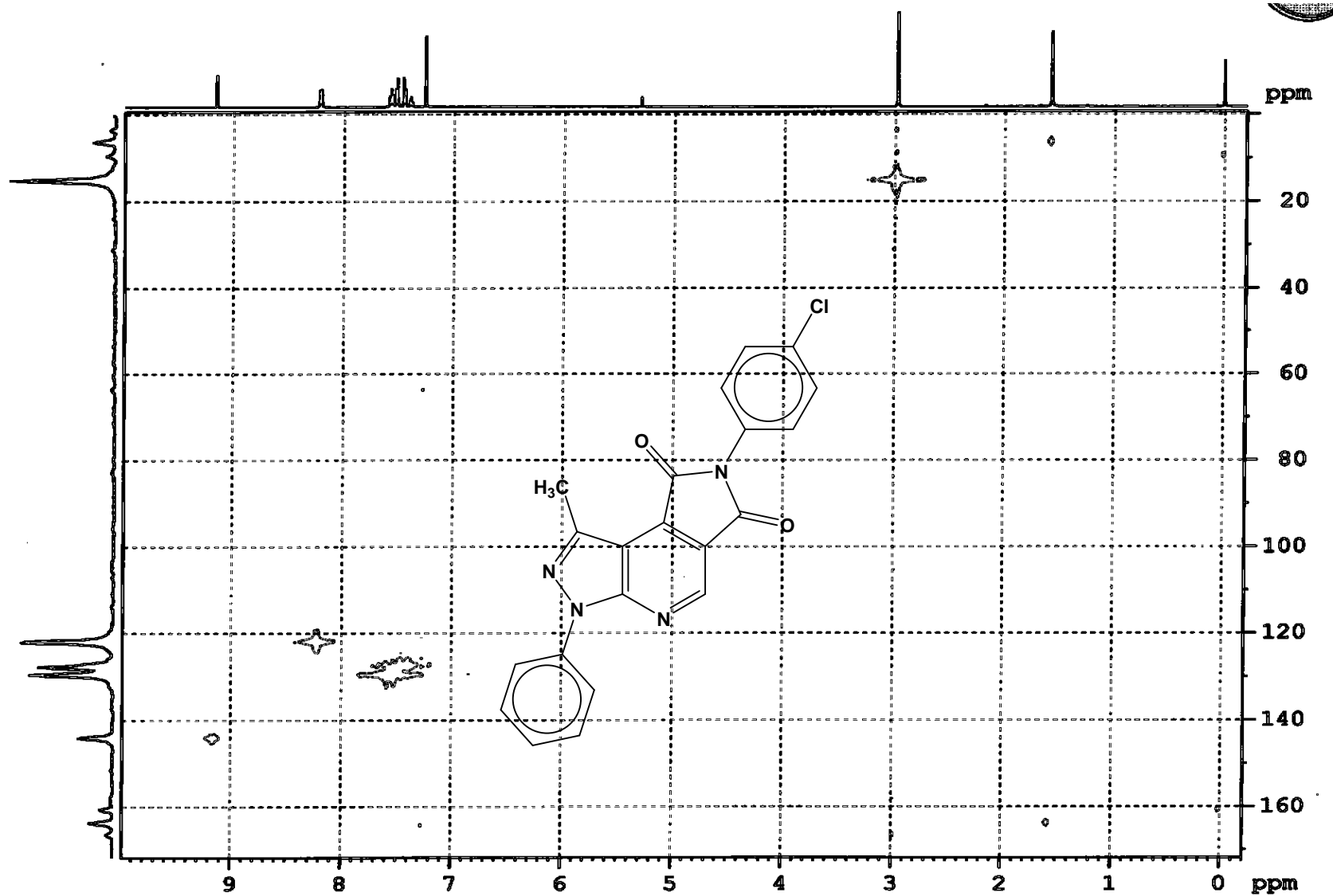
E. 22 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 872 (**49**) (CDCl₃/TMS/500 MHz), expansão.



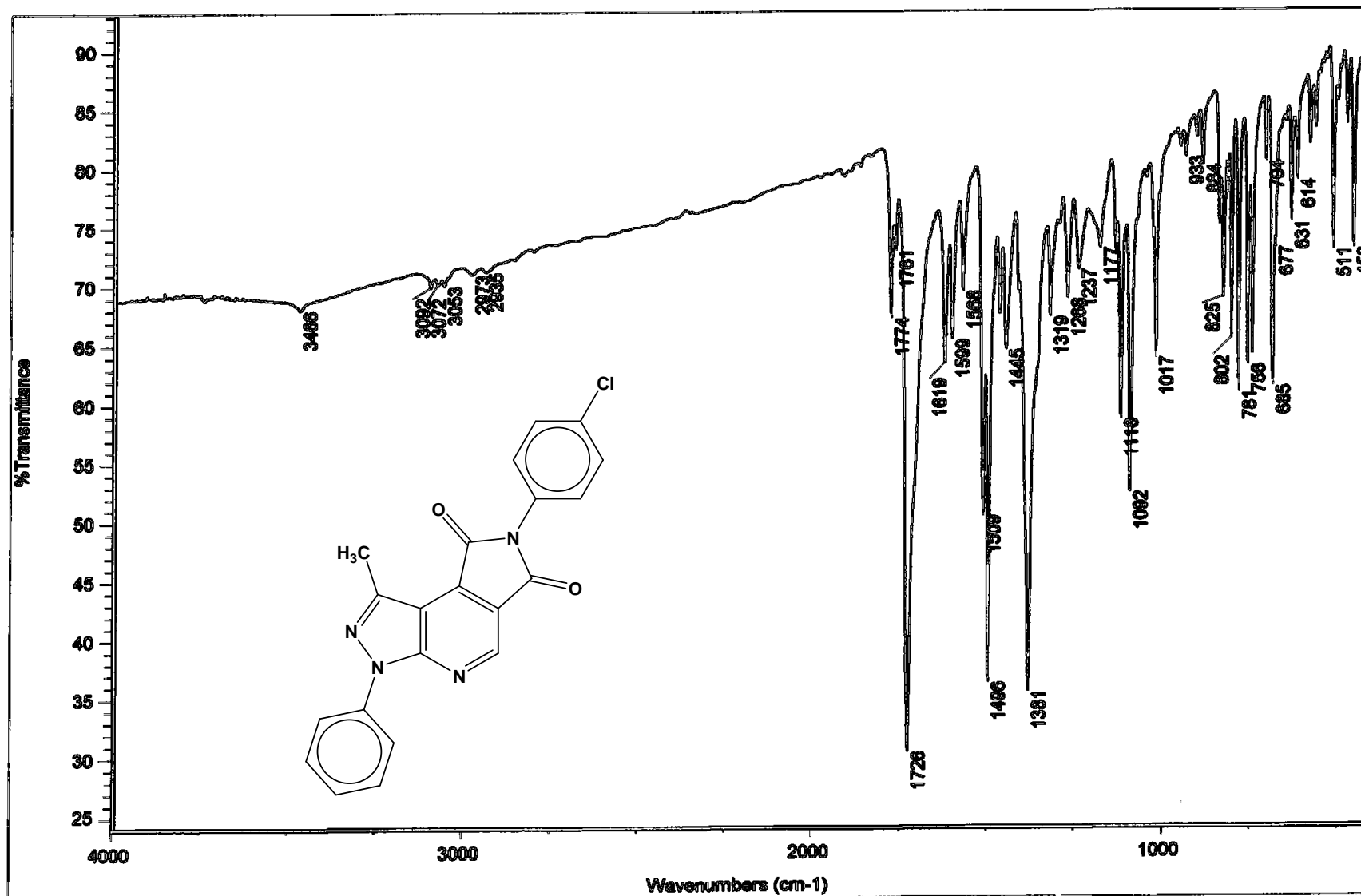
E. 23 – Espectro de RMN ¹³C do derivado LASSBio 872 (**49**) (CDCl₃/TMS/500 MHz).



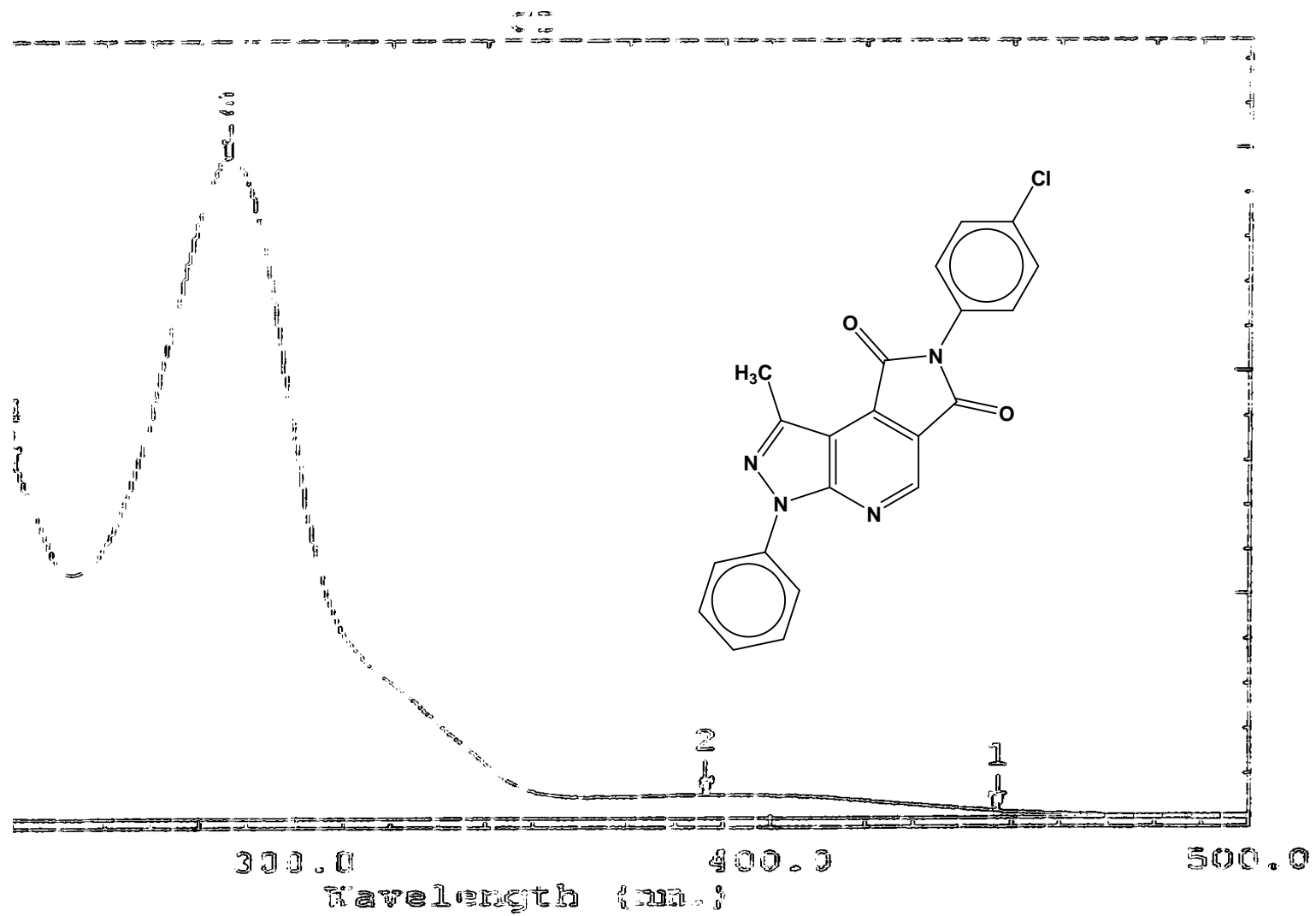
E. 24 – Espectro de RMN ¹³C do derivado LASSBio 872 (**49**) (CDCl₃/TMS/125 MHz), expansão.



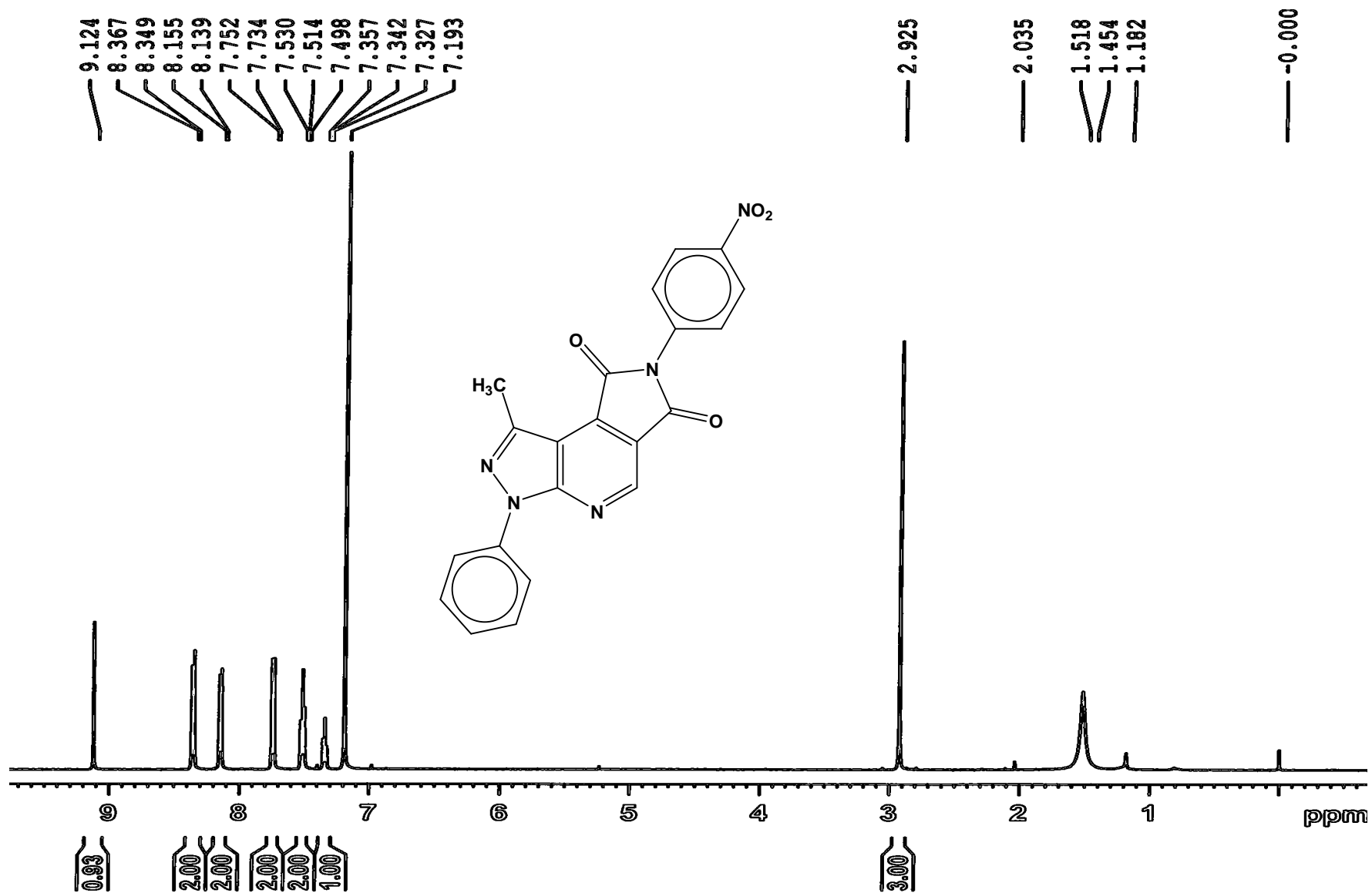
E. 25 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 872 (**49**) ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/125 \text{ MHz}$).



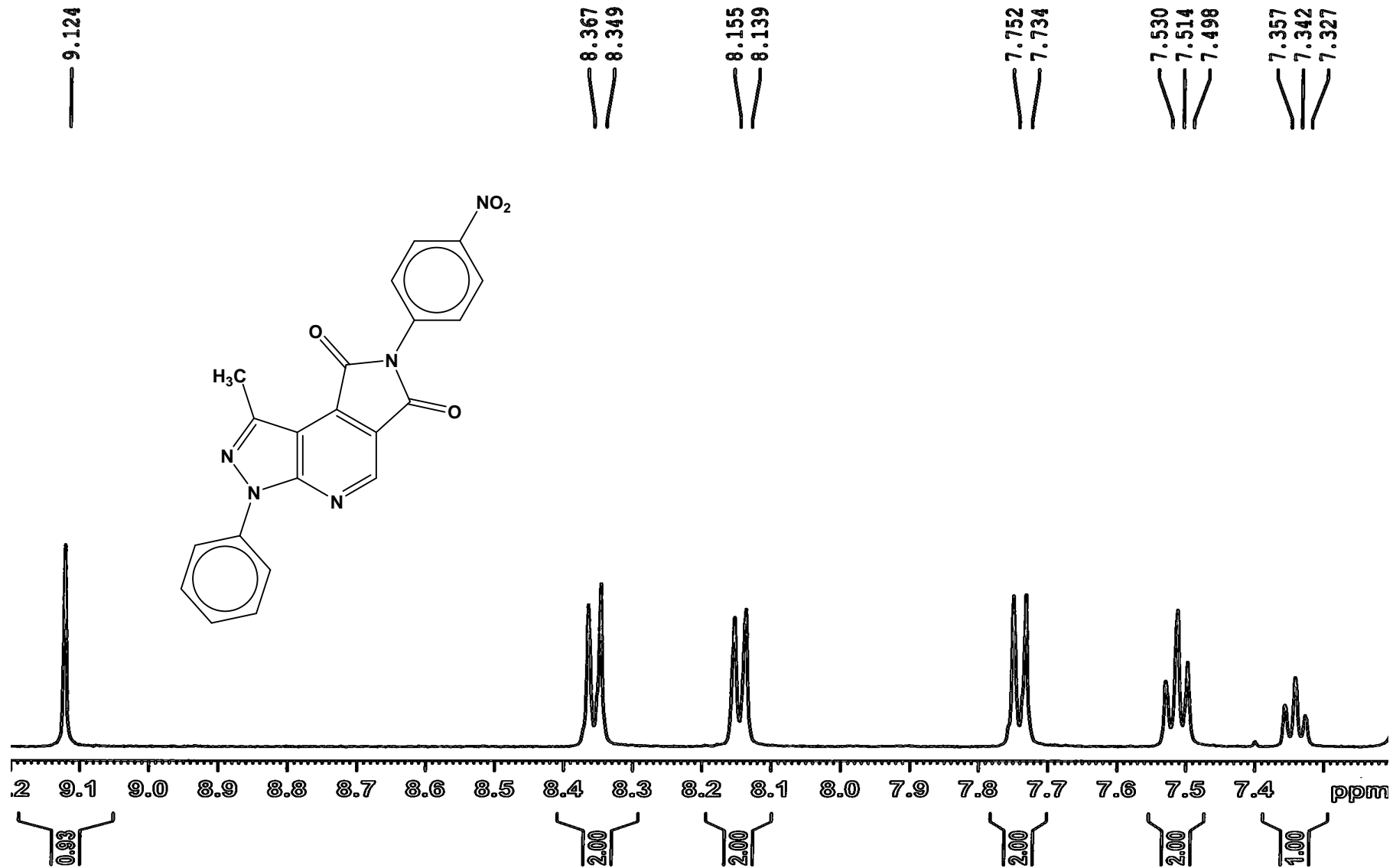
E. 26 – Espectro de IV do derivado LASSBio 872 (49) (Pastilha de KBr).



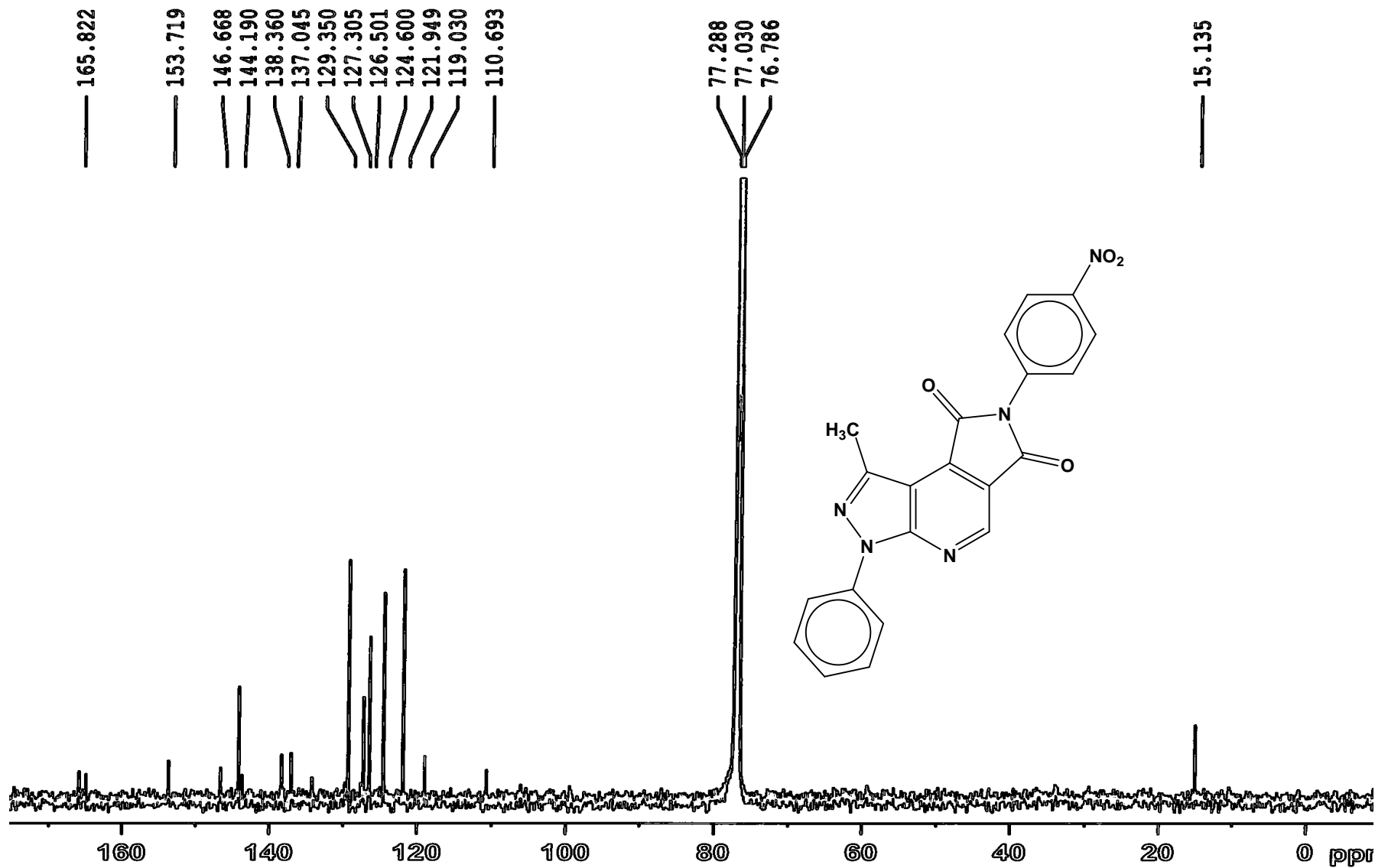
E. 27 – Espectro de UV do derivado LASSBio 872 (**49**) [UV λ^{CHCl_3} max nm (log ϵ): 386,2 (0,021); ϵ_{MAX} =1.220 e max nm (log ϵ): 285,6 (0,593); ϵ_{MAX} =34.476].



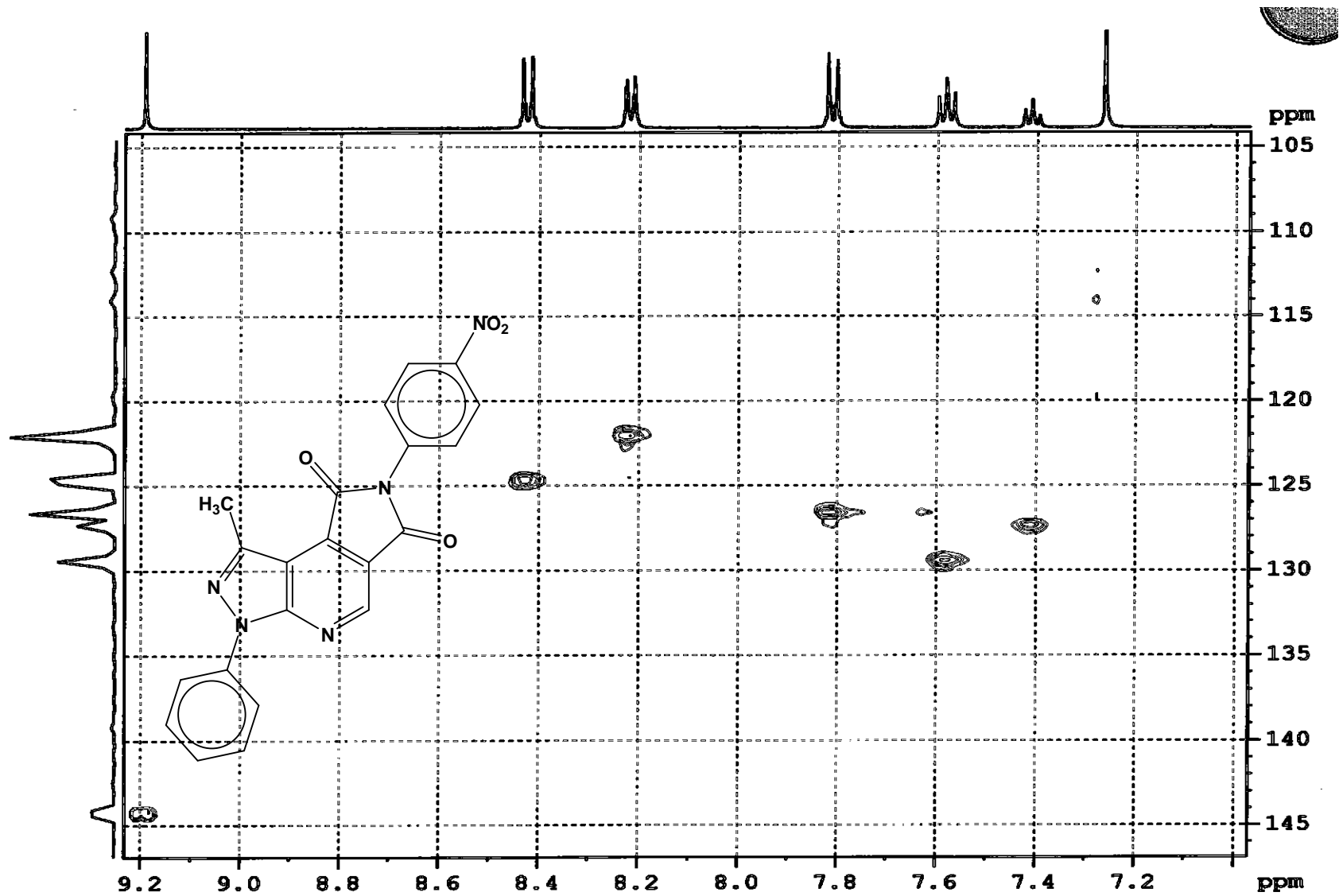
E. 28 – Espectro de RMN ¹H do derivado LASSBio 873 (**50**) (CDCl₃/TMS/500 MHz).



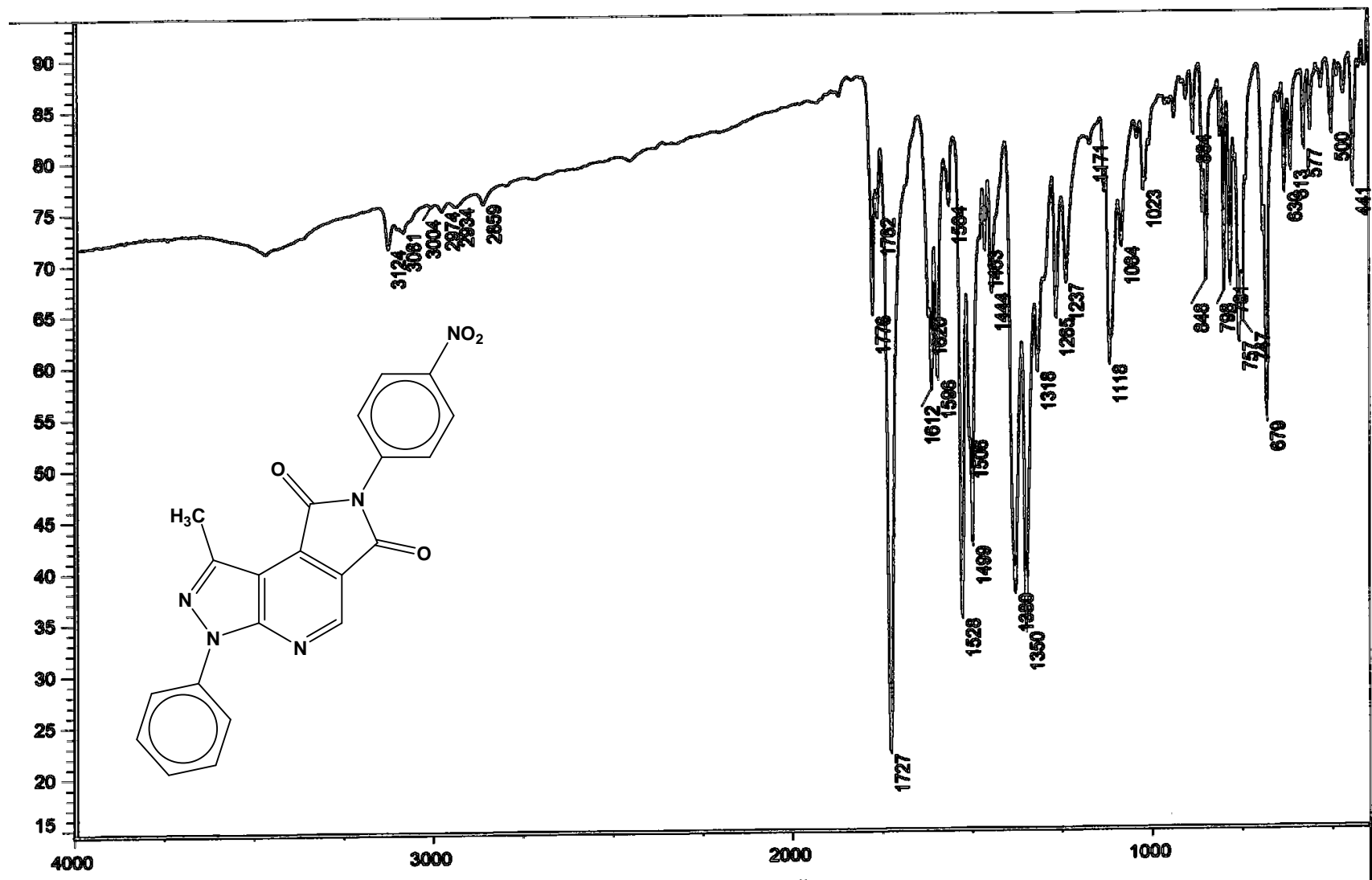
E. 29 – Espectro de RMN ¹H do derivado LASSBio 873 (**50**) (CDCl₃/TMS/500 MHz) , expansão.



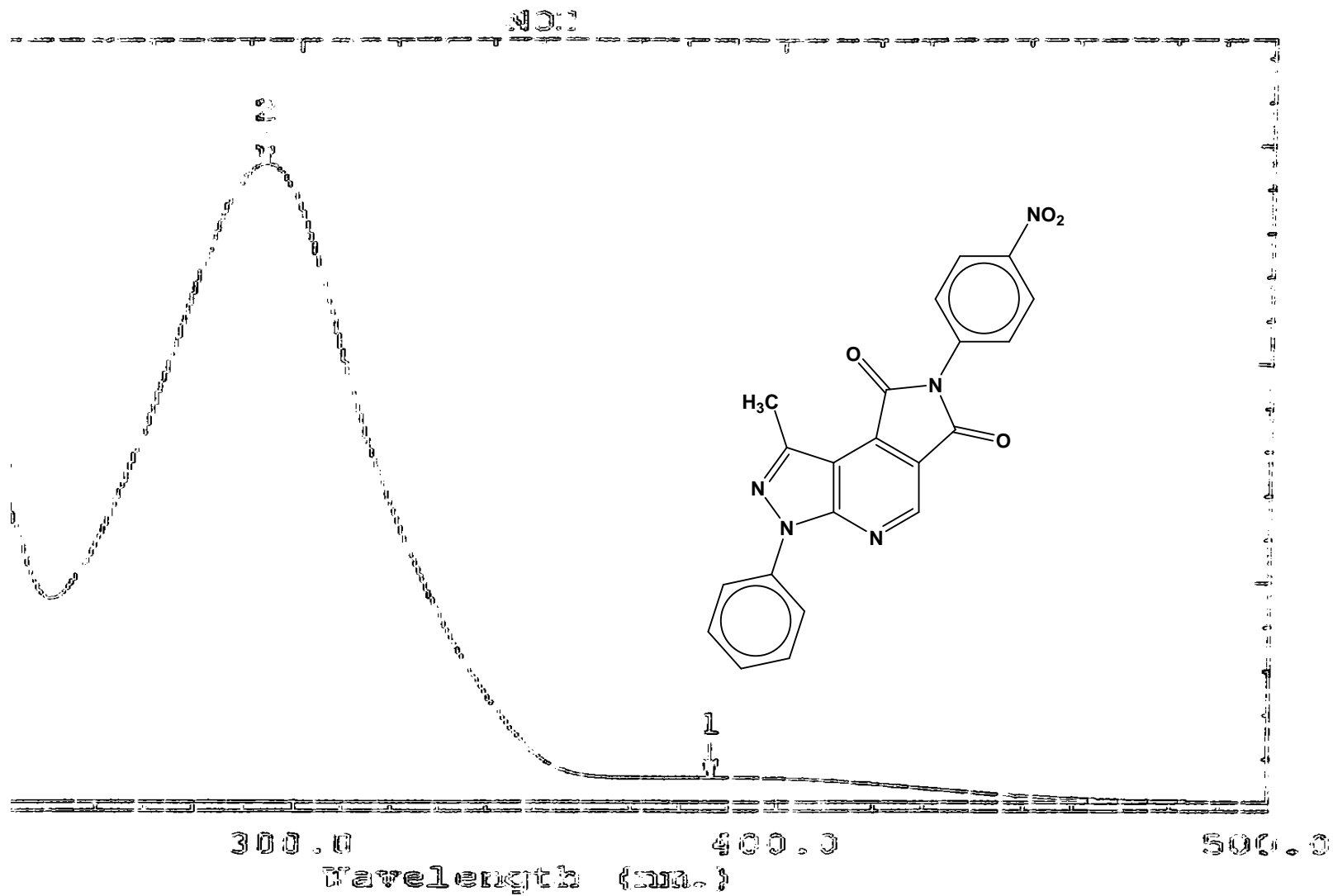
E. 30 – Espectro de RMN ¹³C do derivado LASSBio 873 (**50**) (CDCl₃/TMS/125 MHz).



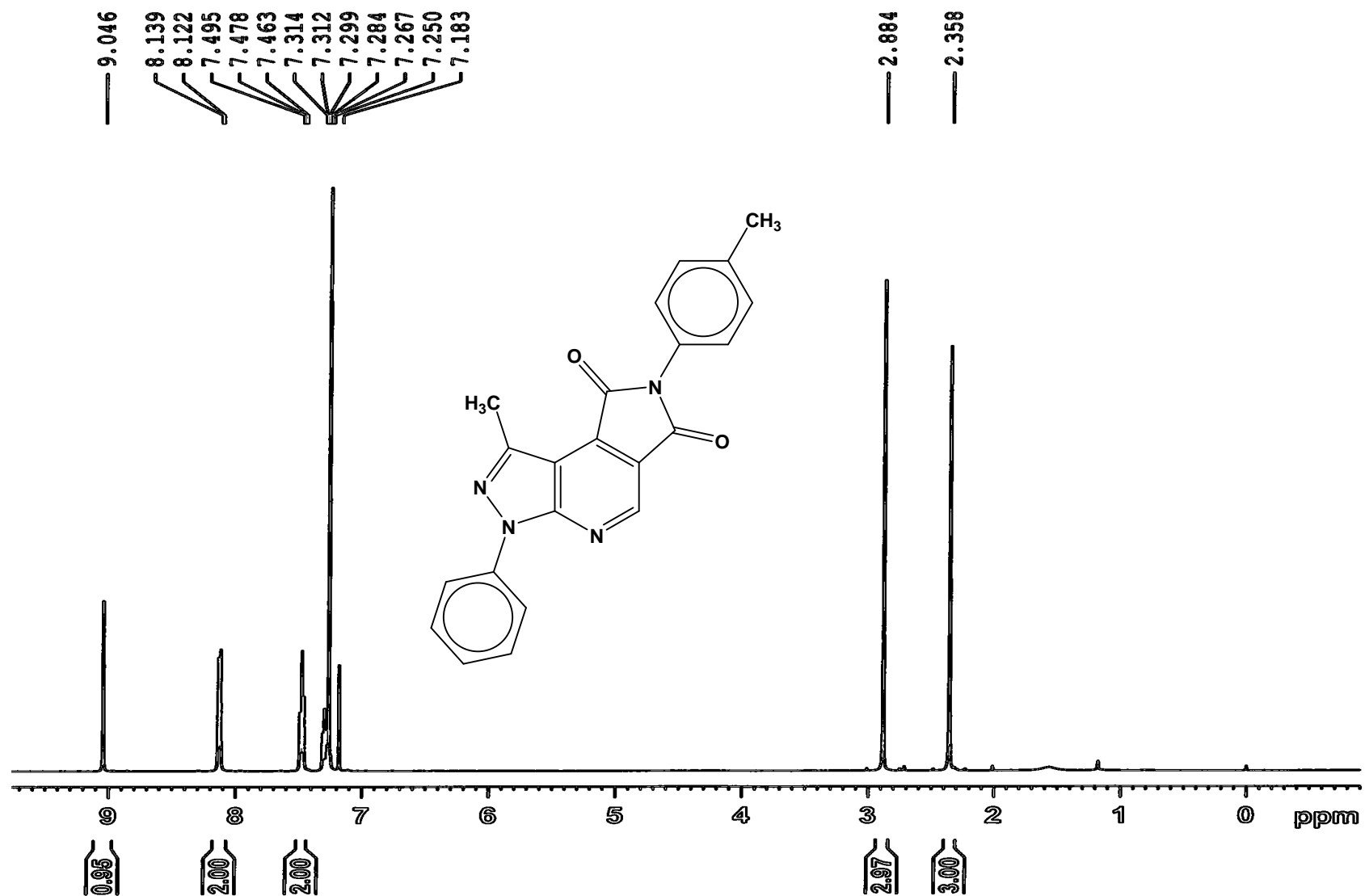
E. 31 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 873 (**50**) ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/125 \text{ MHz}$).



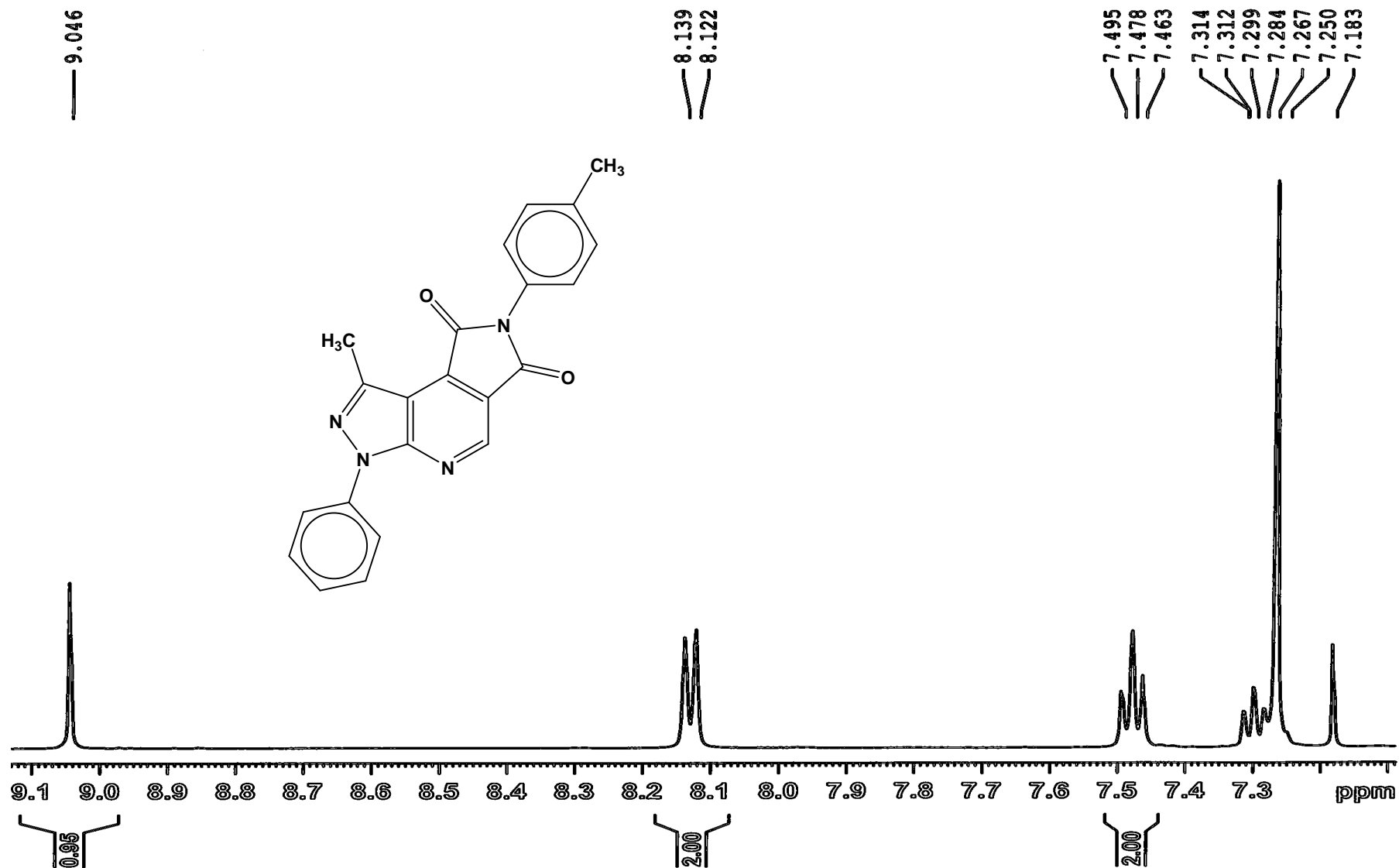
E. 32 – Espectro de IV do derivado LASSBio 873 (**50**) (Pastilha de KBr).



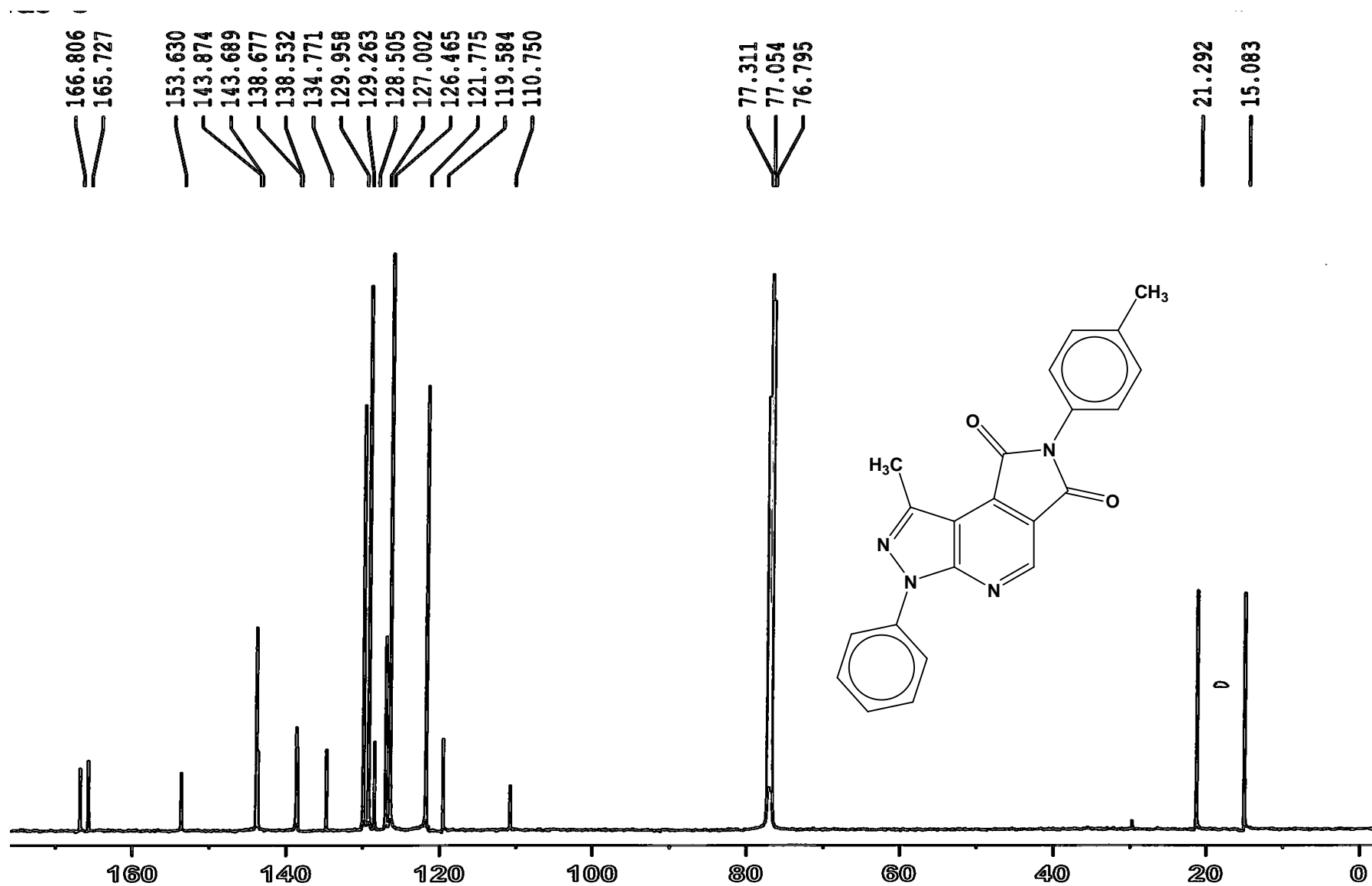
E. 33 – Espectro de UV do derivado LASSBio 873(**50**) [$UV\lambda^{CHCl_3}$ max nm (log ϵ): 386,2 (0,023); $\epsilon_{MAX}=1.377$ e max nm (log ϵ): 293,0 (0,593); $\epsilon_{MAX}=34.970$].



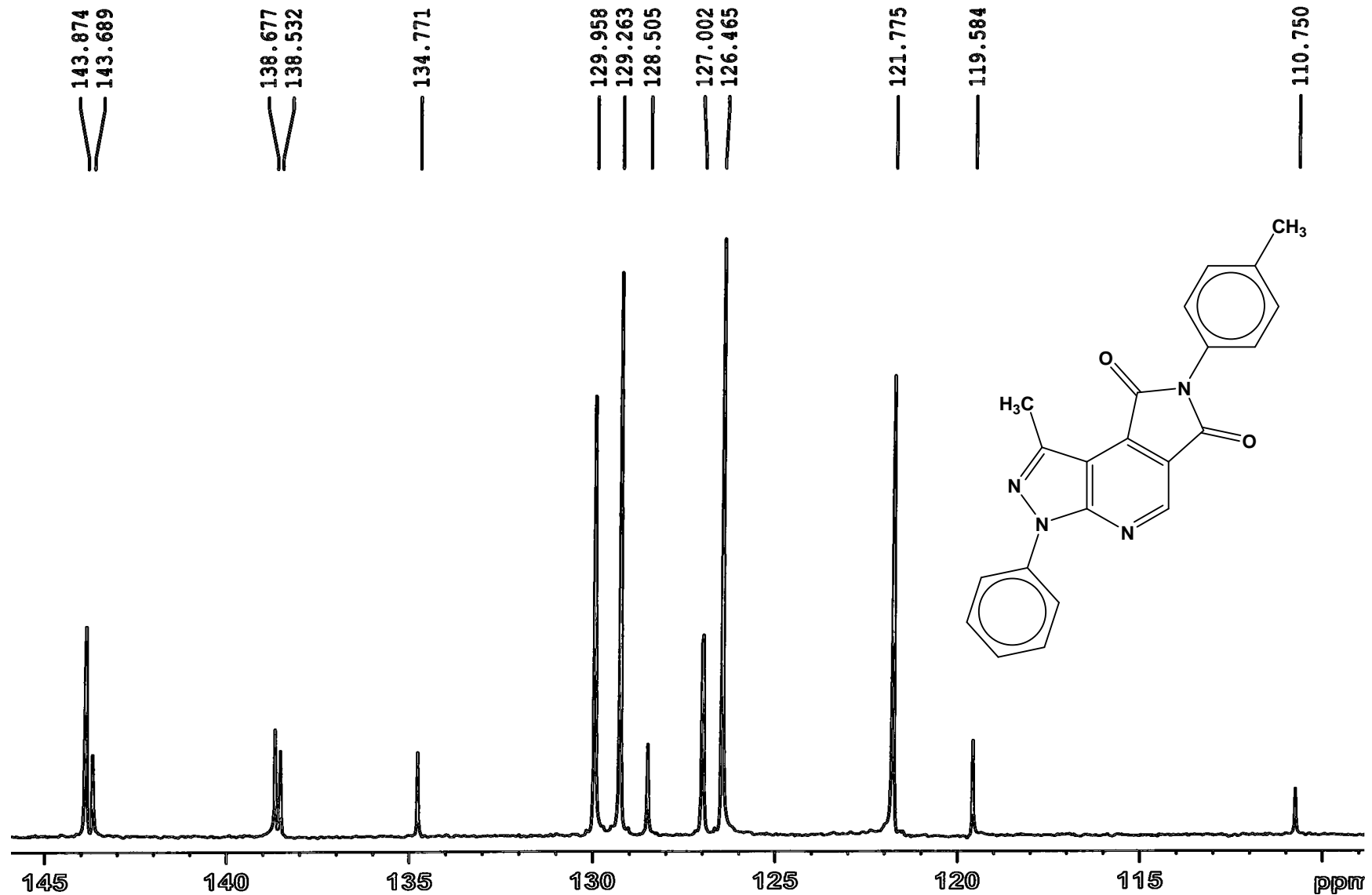
E. 34 – Espectro de RMN ¹H do derivado LASSBio 980 (**51**) (CDCl₃/TMS/500 MHz).



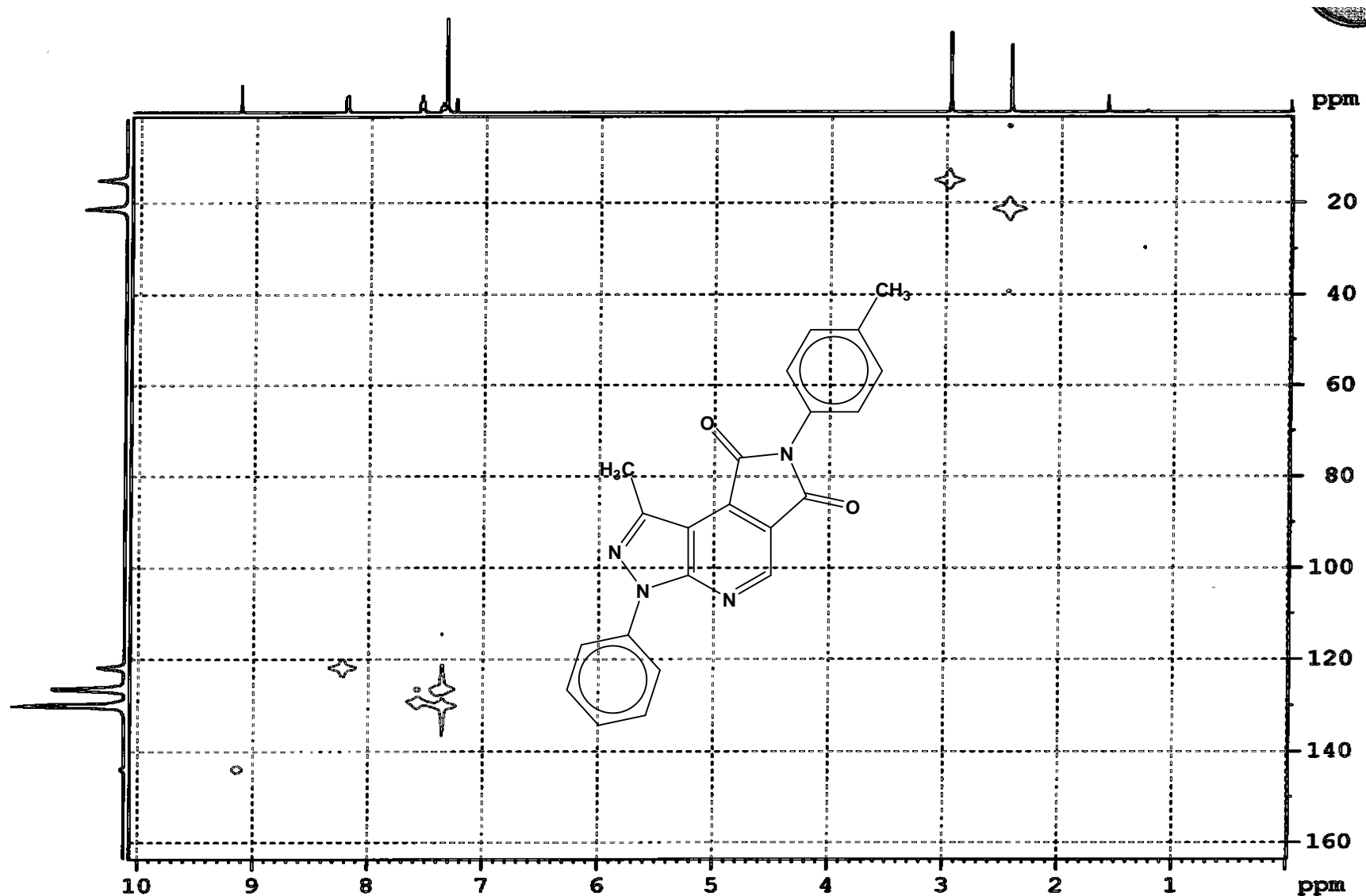
E. 35 – Espectro de RMN ¹H do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl₃/TMS/500 MHz) , expansão.



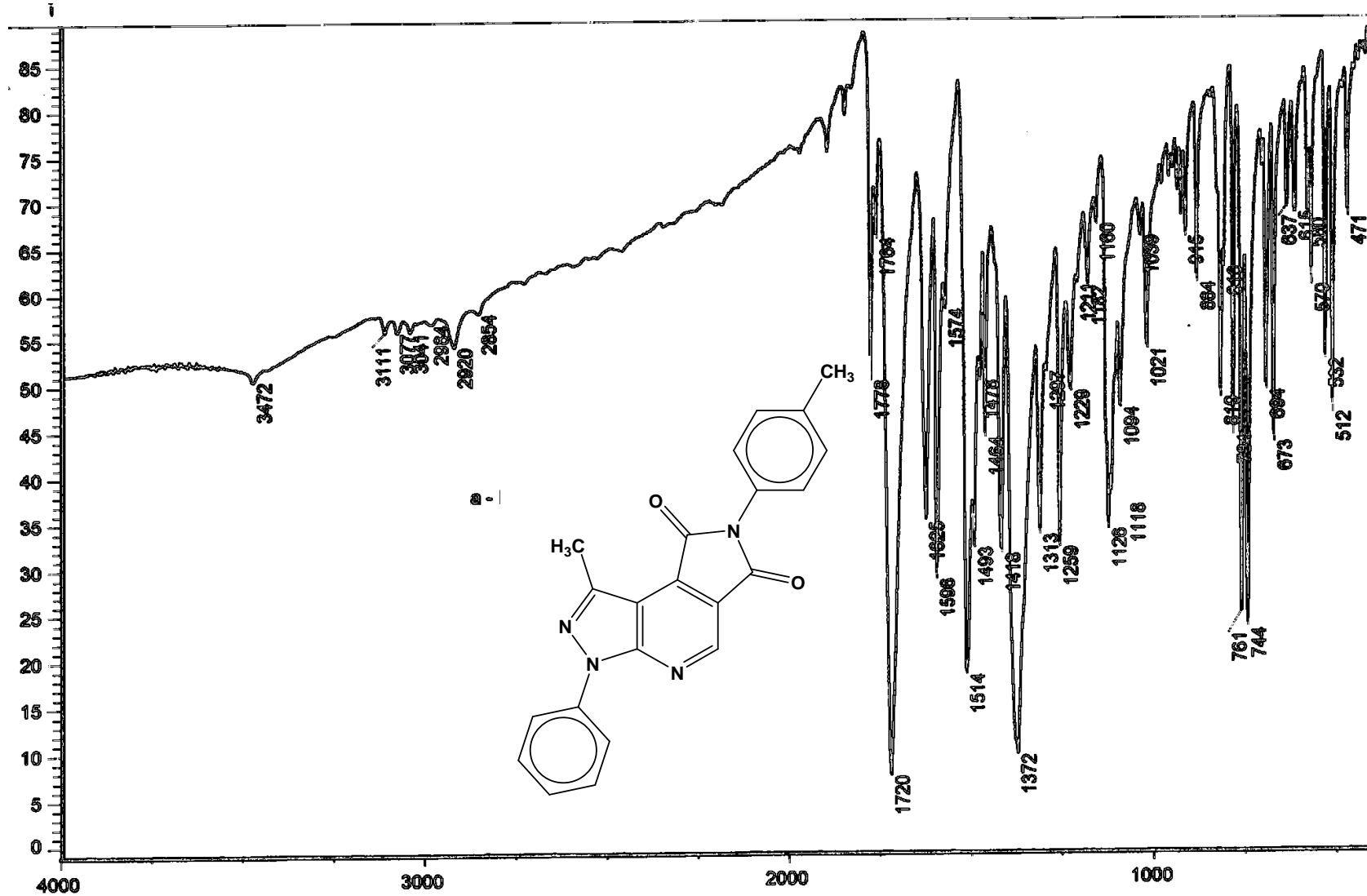
E. 36 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado LASSBio 980 (51) ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/125\text{ MHz}$).



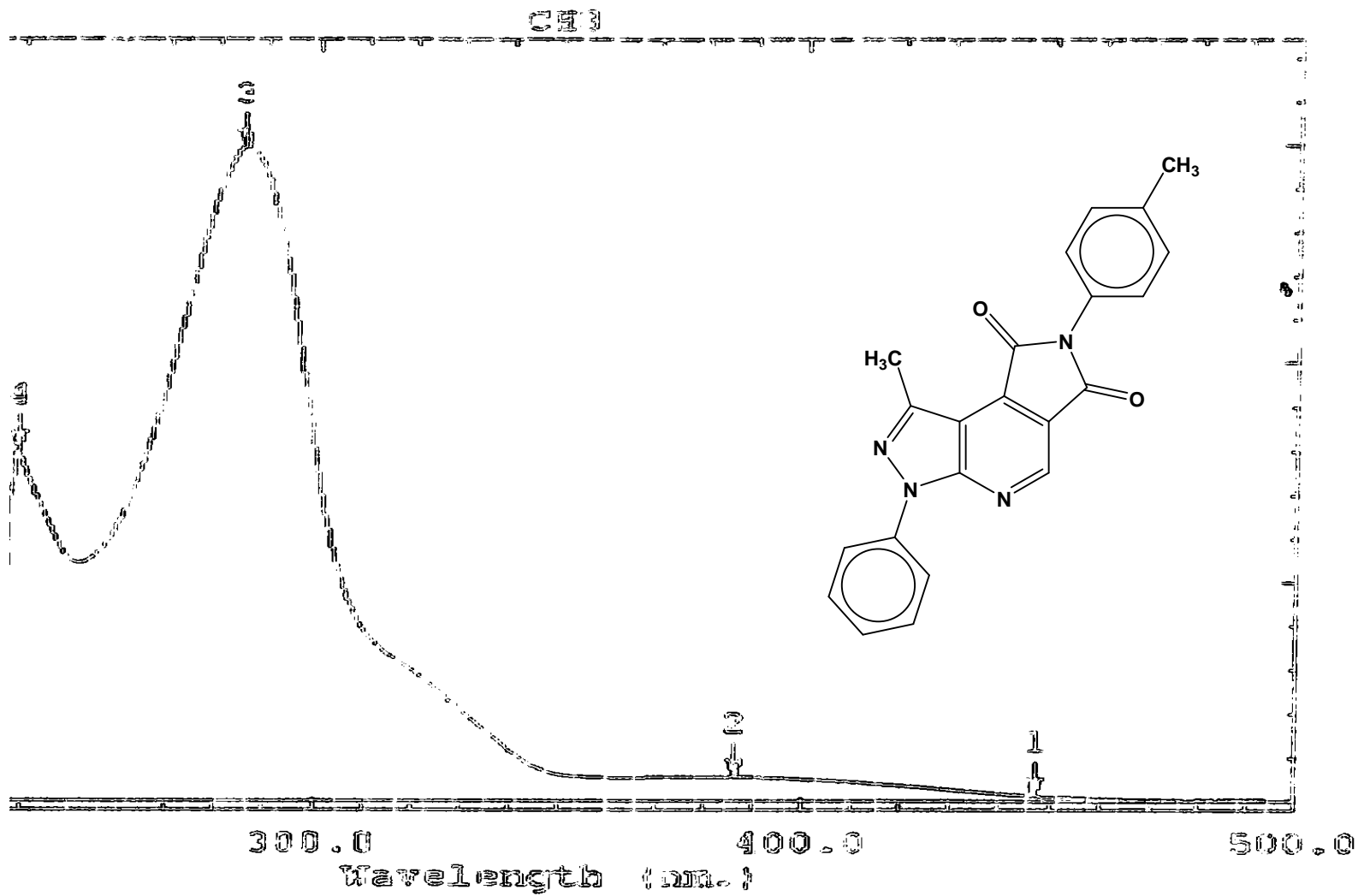
E. 37 – Espectro de RMN ¹³C do derivado LASSBio 980 (51) (CDCl₃/TMS/125 MHz) , expansão.



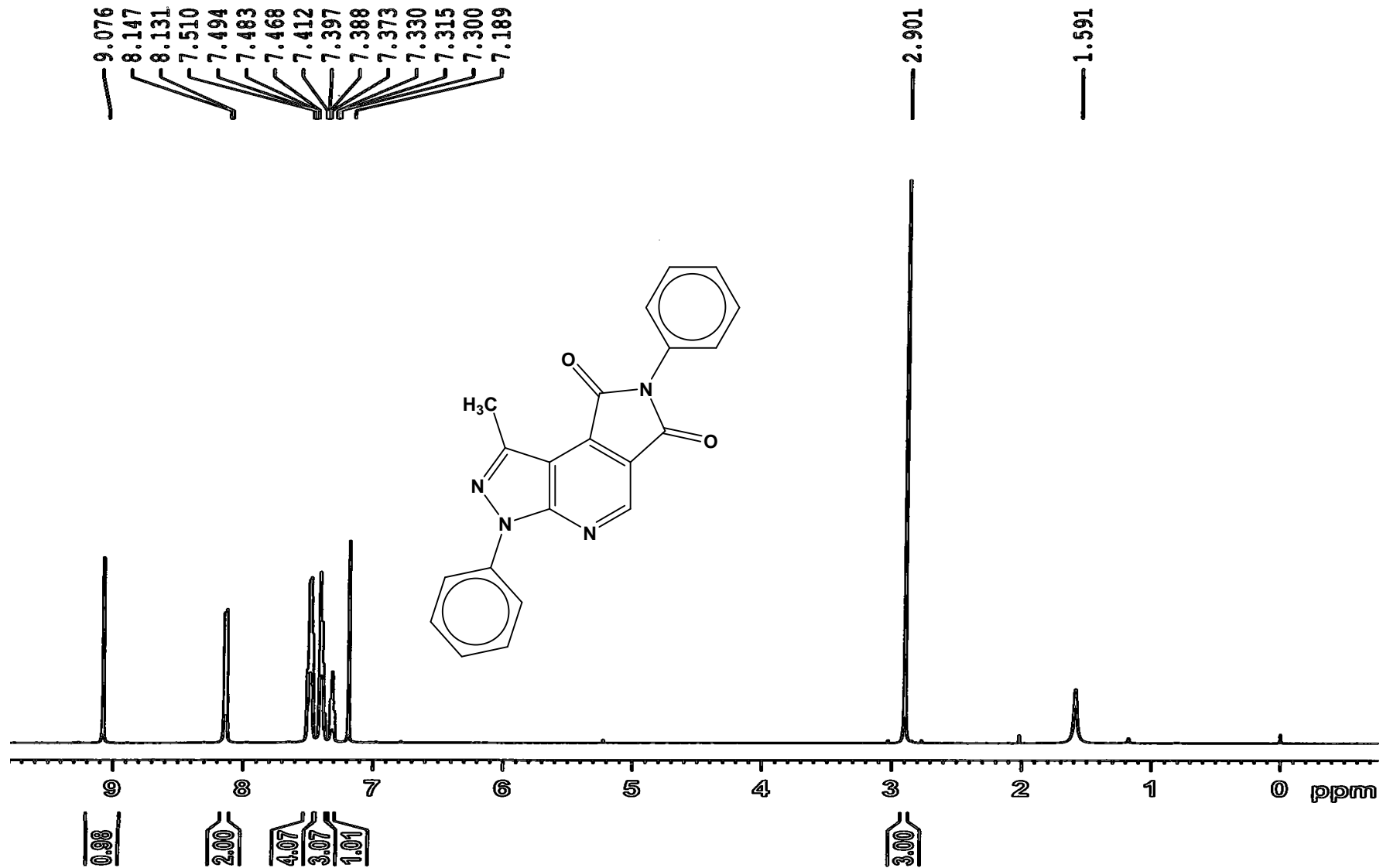
E. 38 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 980 (**51**) (CDCl₃/TMS/125 MHz), expansão.



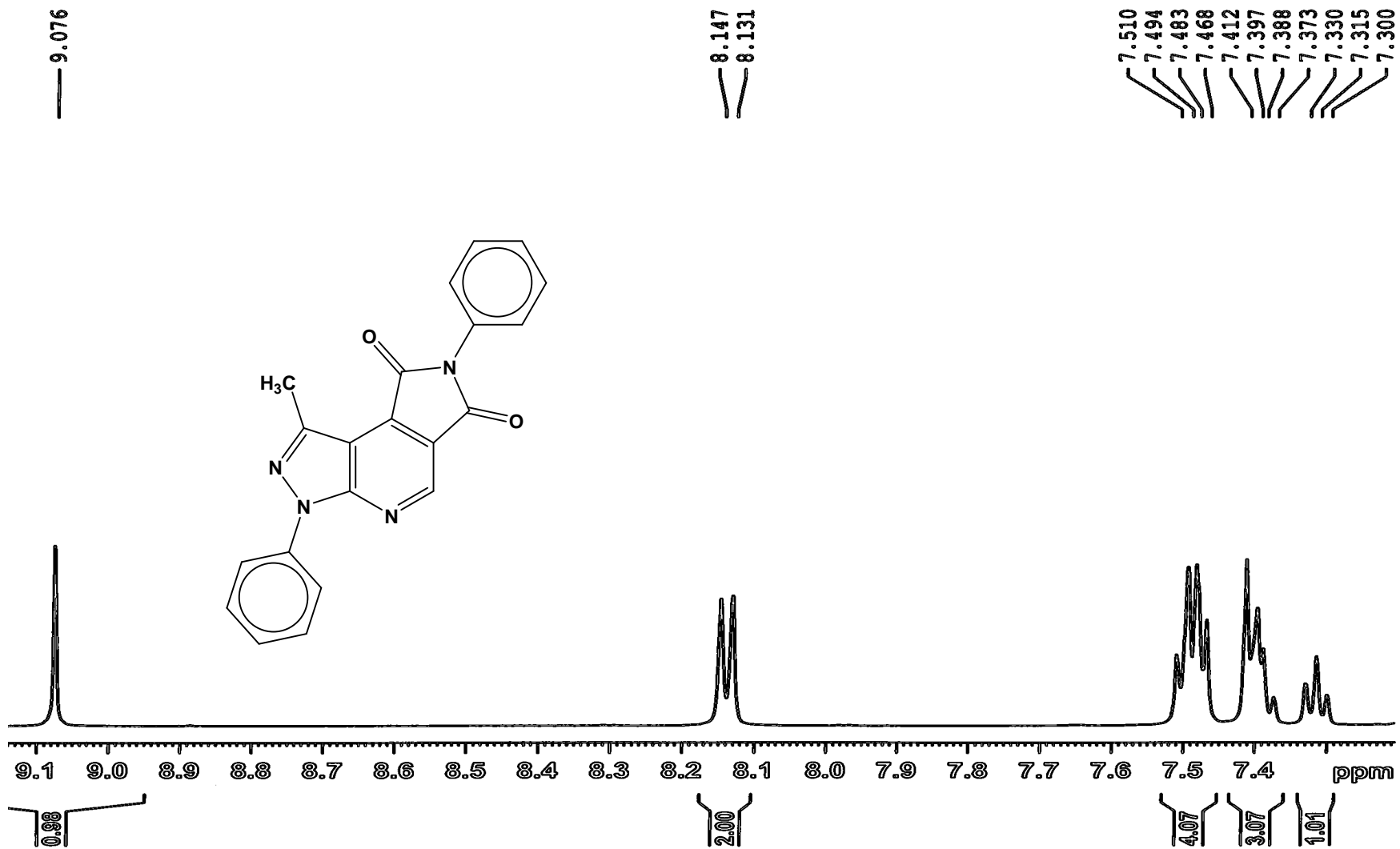
E. 39 – Espectro de IV do derivado LASSBio 980 (51) (Pastilha de KBr).



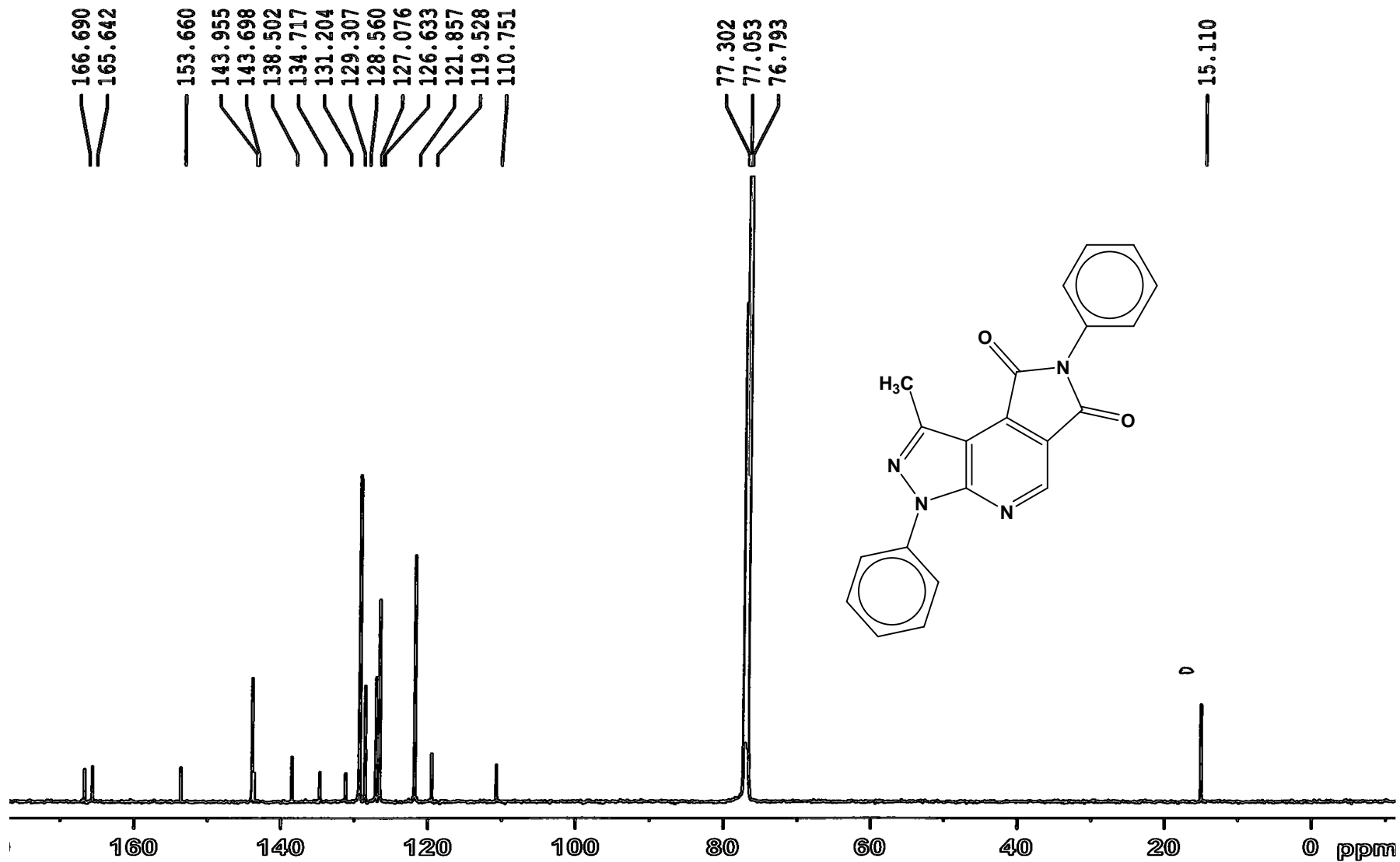
E. 40 – Espectro de UV do derivado LASSBio 980 (**51**) [$UV\lambda^{CHCl_3}$ max nm (log ϵ): 386,2 (0,022); ϵ_{MAX} =1.215 e max nm (log ϵ): 285,2 (0,593); ϵ_{MAX} =33.094].



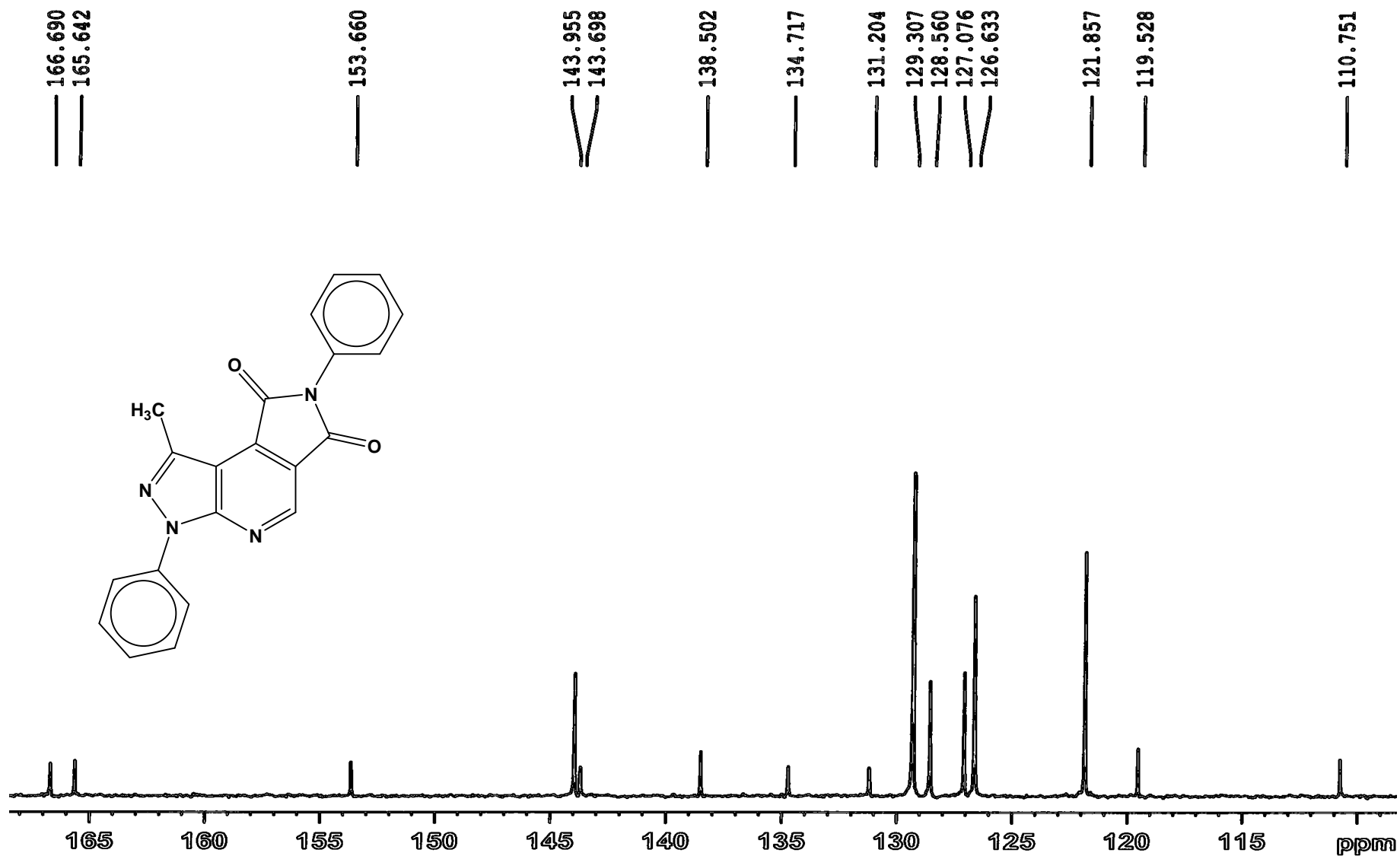
E. 41 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 981 (**52**) (CDCl₃/TMS/500 MHz).



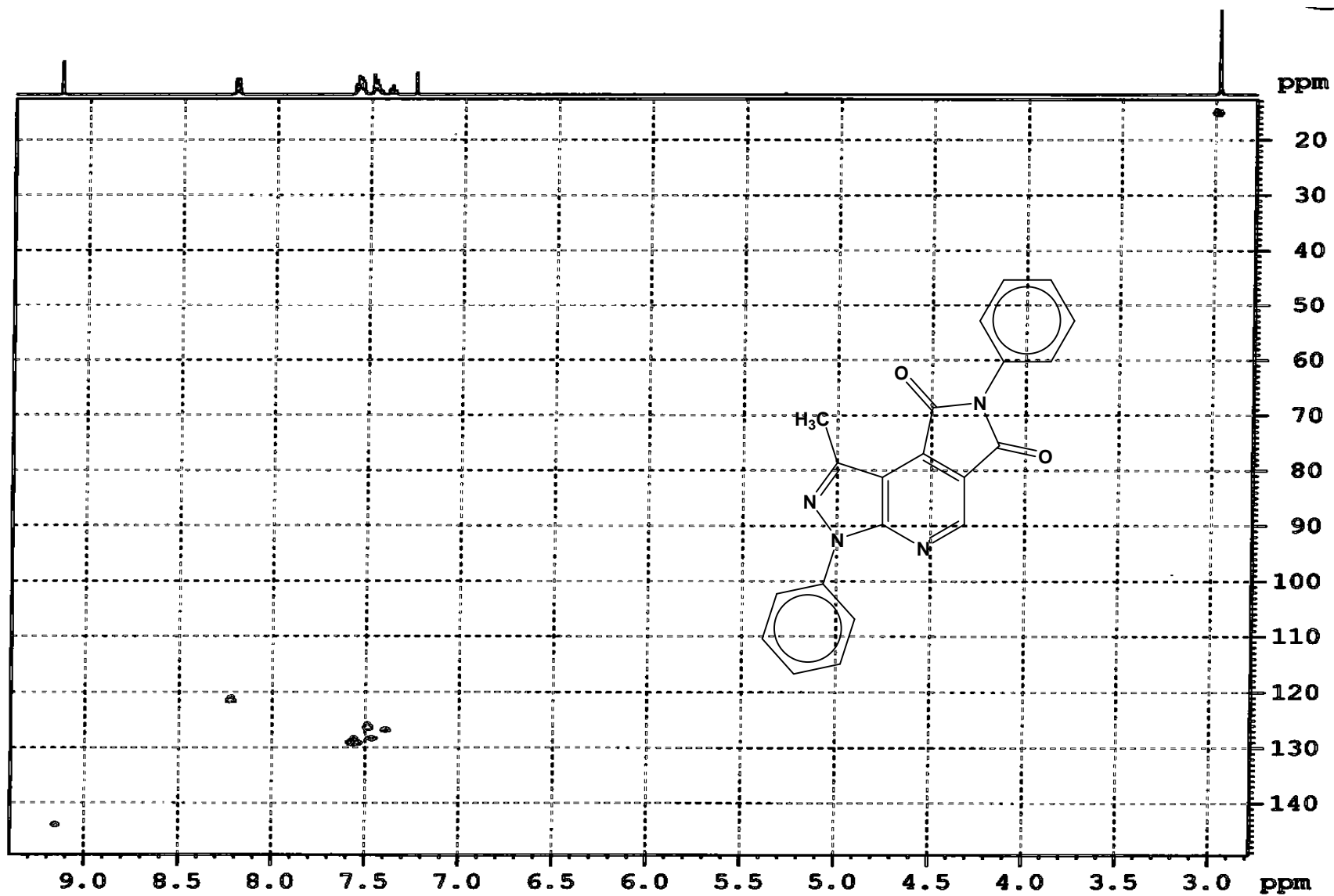
E. 42 – Espectro de RMN ^1H do derivado LASSBio 981 (**52**) (CDCl₃/TMS/500 MHz) , expansão.



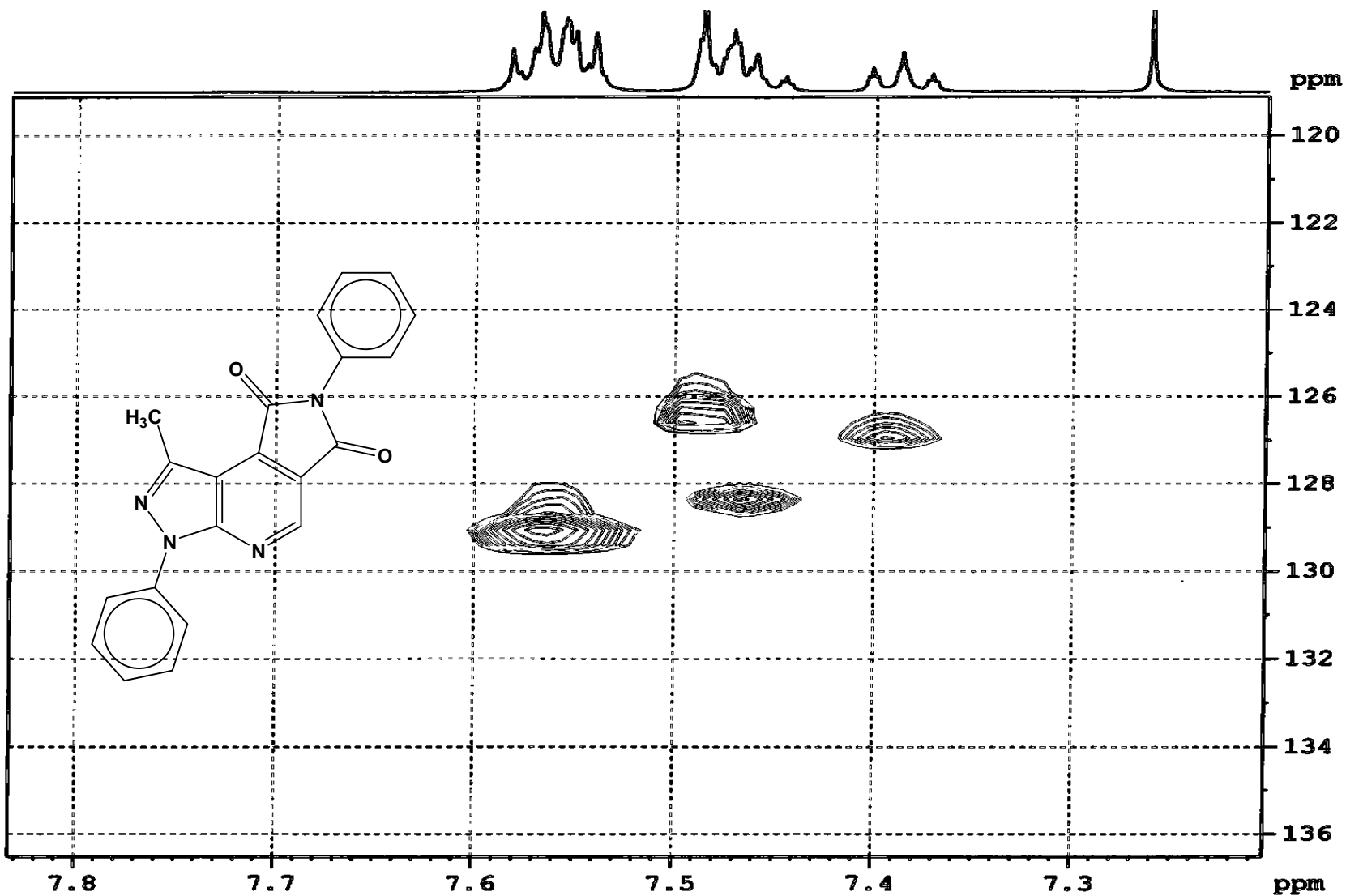
E. 43 – Espectro de RMN ¹³C do derivado LASSBio 981 (**52**) (CDCl₃/TMS/125 MHz).



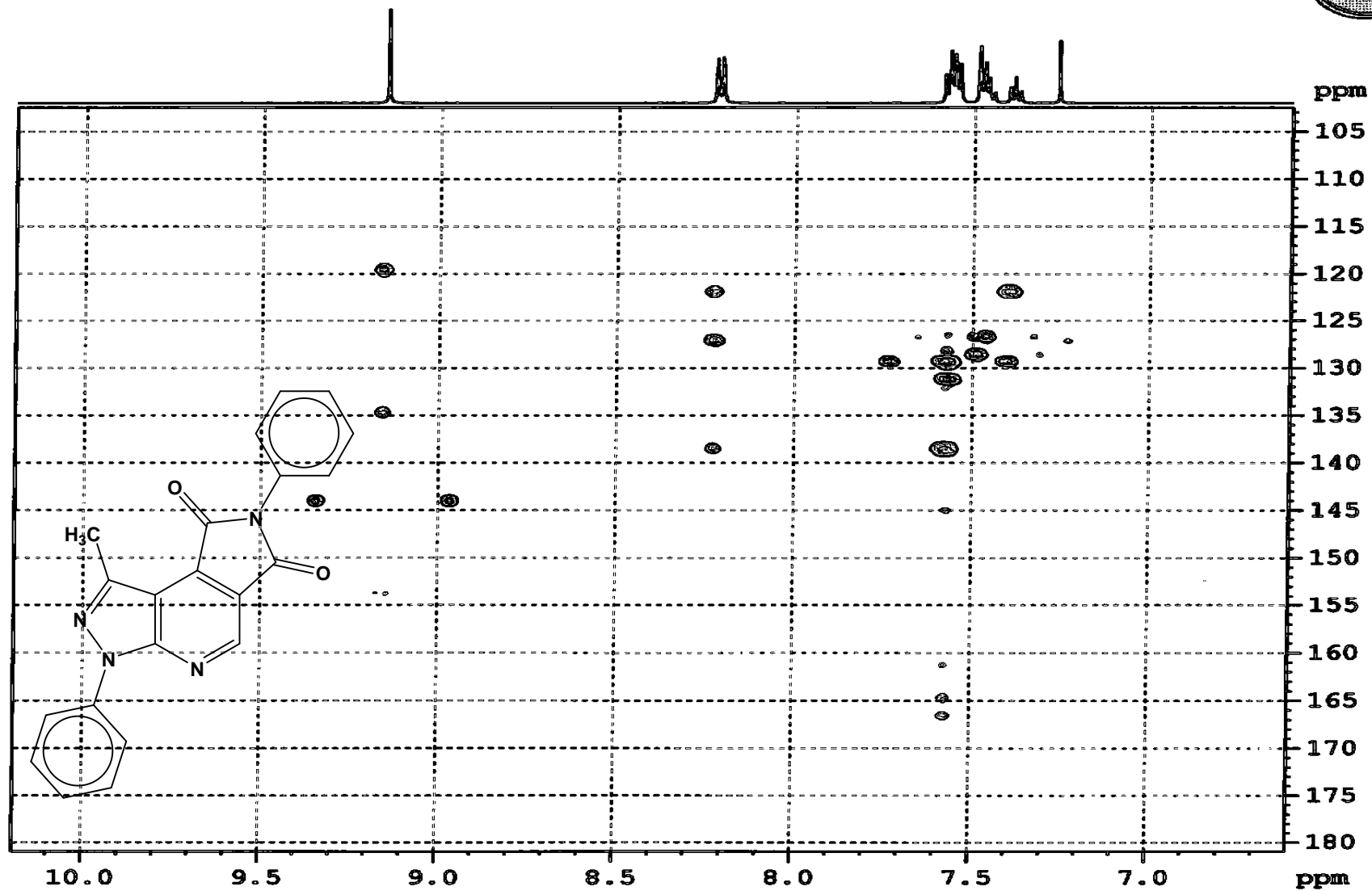
E. 44 – Espectro de RMN ¹³C do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl₃/TMS/125 MHz) , expansão.



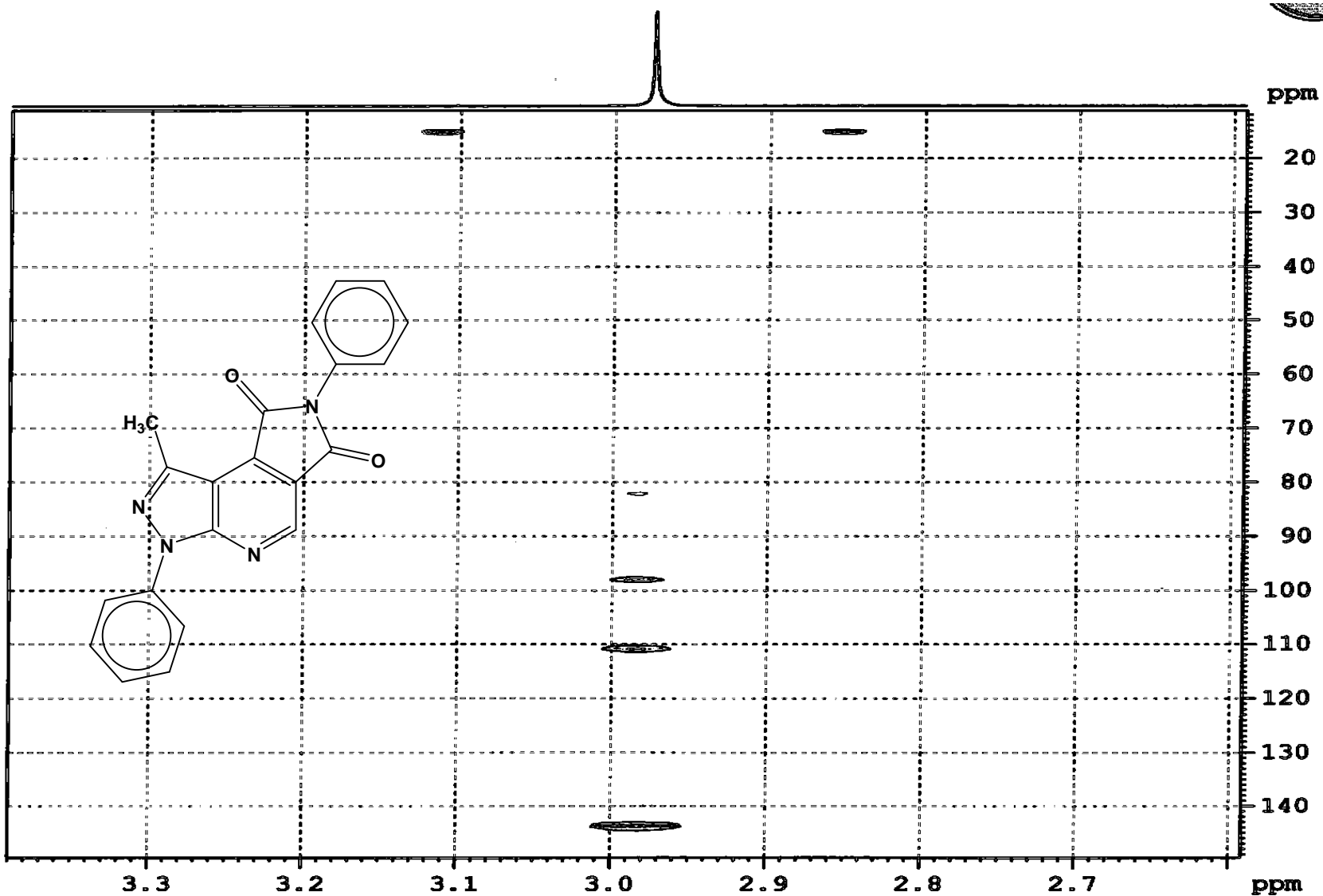
E. 45 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 981 (52) ($\text{CDCl}_3/\text{TMS}/125 \text{ MHz}$).



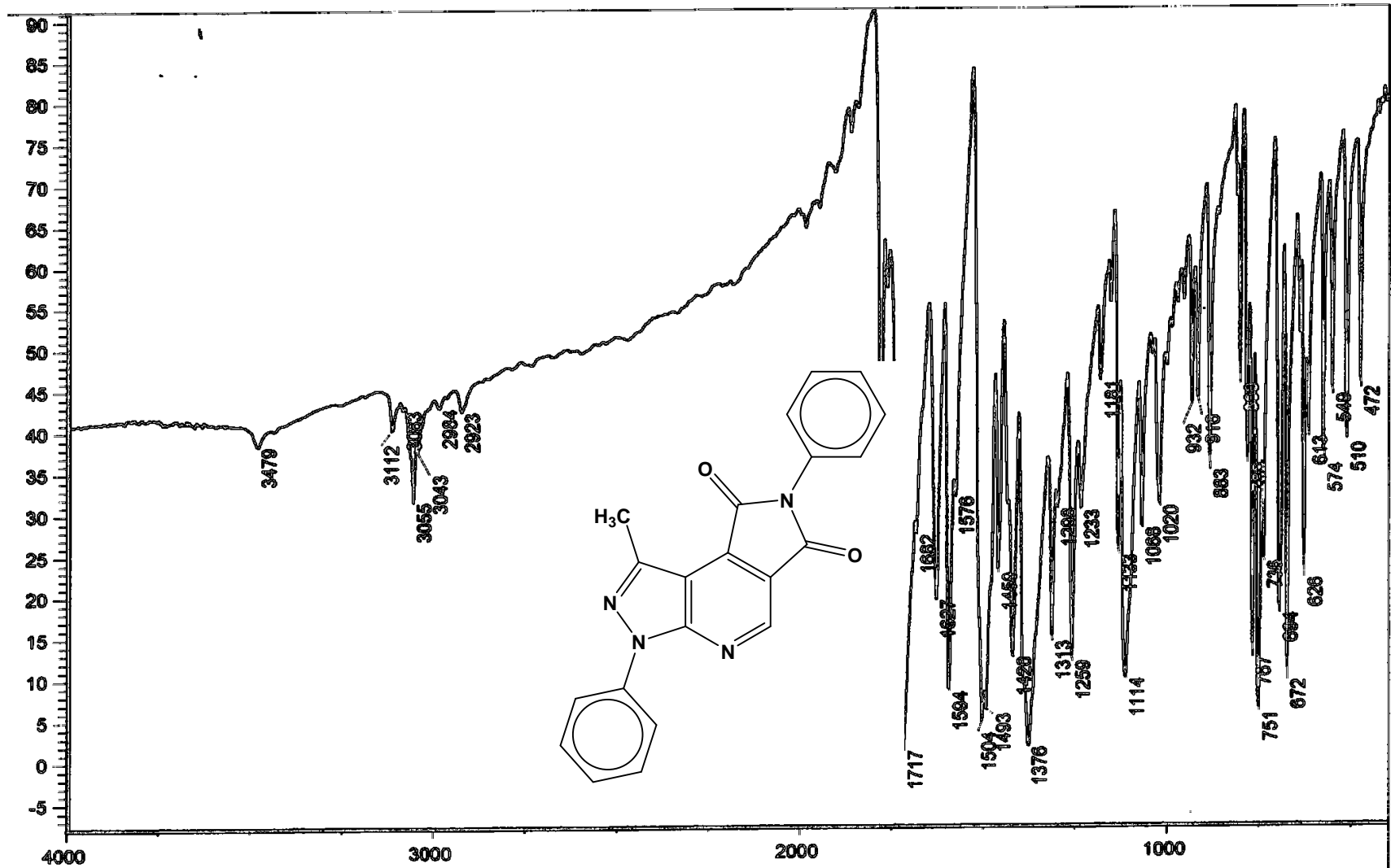
E. 46 – Espectro de HMQC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl₃/TMS/125 MHz), expansão.



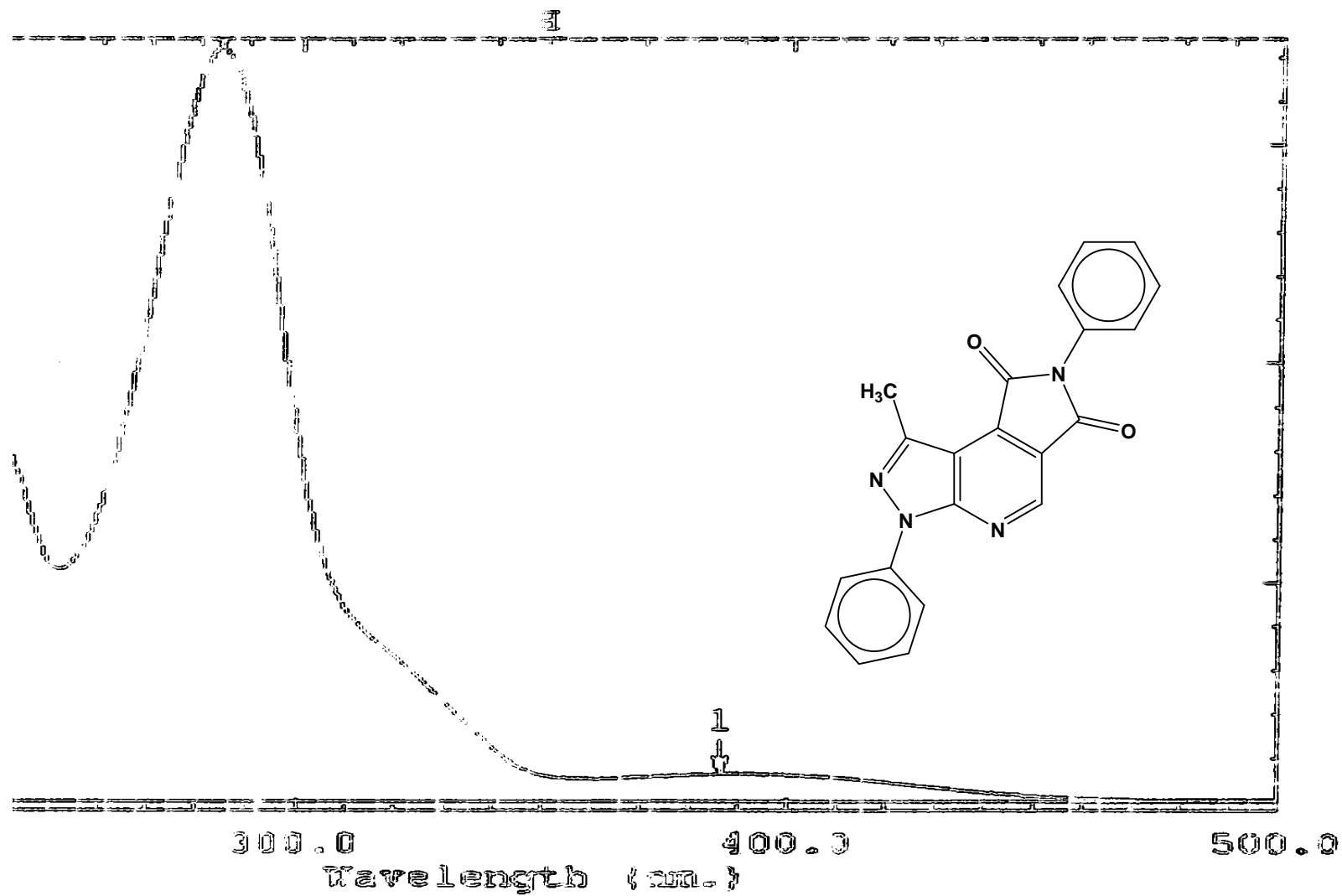
E. 47 – Espectro de HMBC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl₃/TMS/125 MHz), expansão.



E. 48 – Espectro de HMBC do derivado LASSBio 981 (52) (CDCl₃/TMS/125 MHz), expansão.



E. 49 – Espectro de IV do derivado LASSBio 981 (**52**) (Pastilha de KBr).



E. 50 – Espectro de UV do derivado LASSBio 980 (**52**) [$UV\lambda^{CHCl_3}$ max nm (log ϵ): 386,2 (0,025); ϵ_{MAX} =1.330 e max nm (log ϵ): 283,6 (0,593); ϵ_{MAX} =36.702].

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)