

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NATHALIA MARIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADOS 3-HIDROXI-
PIPERIDINIL-N-BENZIL-ACILARILIDRAZÔNICOS EM MODELOS DE DOR
CENTRAL E NEUROPÁTICA**

Alfenas/MG

2018

NATHALIA MARIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADOS 3-
HIDROXI-PIPERIDINIL-N-BENZIL-ACILARILIDRAZÔNICOS EM MODELOS DE
DOR CENTRAL E NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica. Orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Júnior. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Josie Resende Torres da Silva.

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Santos, Nathalia Mariano dos.
S237a Avaliação da atividade antinociceptiva de derivados 3-hidroxi-piperidínil-
N-benzil-acilarilidrazônicos em modelos de dor central e neuropática /
Nathalia Mariano dos Santos. -- Alfenas/MG, 2018.
105 f.: il --

Orientador: Claudio Viegas Júnior.
Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de
Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
Bibliografia.

1. Dor. 2. Analgésicos. 3. Analgésicos Opioides. 4. Analgesia.
5. Hidrazonas. I. Viegas Júnior, Claudio. II. Título.

CDD-547

Nathalia Mariano dos Santos

“Avaliação da atividade antinociceptiva de derivados 3-hidroxi-piperidinil-N-Benzil-Acilarilidrazônicos nos modelos de dor central e neuropática”

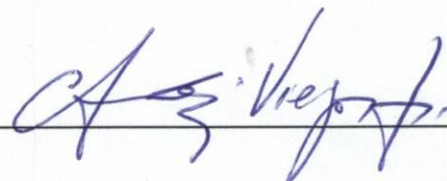
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 28/11/2017

Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: _____



Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: _____



Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Instituição: Universidade Estadual Paulista -
UNESP

Assinatura: _____



Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim. Em especial à minha família, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para superar as todas as dificuldades ao longo deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Viegas Jr., por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, onde tive a oportunidade de crescer muito, não só profissionalmente, mas também como pessoa. Também agradeço muito por ter estado ao meu lado para resolver todos os percalços e, principalmente, por todo o incentivo para eu sempre dar o melhor de mim.

À minha família, pelo amor, incentivo e por sempre apoiarem as minhas decisões. Obrigada por ser meu porto seguro e pelos valores que levo comigo.

À Jully, por ter me incentivado, tanto a entrar no mestrado quanto por ter estado ao meu lado dando força pra continuar em todos os momentos.

Aos queridos amigos de laboratório, Vanessa, Matheus, Sarah, Kris, Cindy, Rafael, Amanda, Carla, Flávia, Ariele, Graziela, Letícia, Suellen, Isadora, Isabelle e Mayara, pelos ensinamentos, companheirismo, conversas, incentivo, conselhos e por todo o carinho.

À minha coorientadora Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva e ao prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva pela colaboração com este trabalho, pelos ensaios realizados e pela atenção e disposição em fazê-los.

Às discentes do Programa de Biociências Aplicadas à Saúde, Nayara Caroline Pereira e Angélica Pontes e Silva de Albuquerque, pela ajuda com a realização dos ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva e à Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti pelos ensaios de formalina e rota-rod, pelas contribuições com este trabalho, esclarecimentos e suporte.

Antecipadamente, à banca examinadora pelo aceite e por todas as contribuições que, certamente, serão muito bem-vindas para o aprimoramento deste trabalho.

À UNIFAL-MG e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela oportunidade.

À CAPES, CNPq, FINEP, FAPEMIG e INCT-INOVAR pelo suporte financeiro e pela bolsa que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que contribuíram para que este trabalho desse certo, o meu muito obrigada!

RESUMO

A dor é um problema de saúde mundial e seu tratamento é baseado, principalmente, no uso de fármacos, a despeito de não existirem ainda medicamentos totalmente eficazes sem efeitos colaterais para os diversos tipos de dor. Como consequência, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de novos protótipos de candidatos a fármacos analgésicos mais potentes, seguros e eficazes, buscando aprimorar a terapêutica da dor e, sobretudo, o bem-estar do indivíduo. Neste contexto, a estrutura privilegiada *N*-acilidrazona se destaca nos últimos anos com diversos derivados já relatados com atividade antinociceptiva. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que uma série de híbridos moleculares *N*-acilidrazônicos, desenvolvidos originalmente como protótipos multialvo para o tratamento da doença de Alzheimer, apresentaram uma potencial atividade antinociceptiva. Em vista desses resultados preliminares, estas substâncias foram selecionadas como estruturas-chave para este estudo farmacológico mais aprofundado, buscando uma melhor caracterização do seu perfil antinociceptivo e sua potencial atividade em modelos *in vivo* de dor central e neuropática. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a síntese e investigação da atividade antinociceptiva de derivados 3-hidroxi-piperidinil-*N*-benzil-acilarilidrazônicos, bem como de seu possível mecanismo de ação. Para isto, foram utilizados o modelo de dor central de retirada da cauda (*tail flick*) e de dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático (CCI). O pré-tratamento foi realizado com as substâncias **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** e **PQM-75** na dose de 100 µmol/kg (v.o.) e morfina (1 mg/kg) (i.p.), além de tratamento com solução salina ou naloxona (30 µg) (i.t.). No teste *tail flick* foi observado um aumento significativo de latência dos animais por ação de **PQM-56** nos tempos de 1,5 e 3,5 horas e **PQM-75** nos tempos 0,5, 1,5, 3,5 e 6,5 horas, quando comparados ao grupo controle. No modelo de dor neuropática, o tratamento com **PQM-56** e **PQM-75** também levou ao aumento significativo do limiar nociceptivo nos tempos 0,5, 1,5, 3,5 e 6,5 horas, quando comparados ao grupo controle. Em ambos os casos, o efeito antinociceptivo foi bloqueado pelo tratamento com naloxona, indicando que o mecanismo de ação ocorre pela via opioide e, portanto, que **PQM-56** e **PQM-75** têm efeito central, sugerindo que estas substâncias, podem representar inovação no desenvolvimento de novos protótipos de candidatos a fármacos com ação antinociceptiva central, com aplicação potencial como analgésicos contra dor neuropática, sem efeitos adversos na coordenação motora.

Palavras chaves: Dor. Atividade antinociceptiva. Opioide. Analgesia central. Dor neuropática.
3-hidroxi-piperidinil-*N*-benzil-acilarilidrazonas.

ABSTRACT

Pain is a worldwide health problem and its treatment is mainly based on drugs, in spite of do not already exist really effective medicines, without adverse effects, for the treatment of the diverse types of pain. Thus, there is a great need for the development of novel potent, effective and secure analgesic drug candidate prototypes, improving pain therapeutics and, most importantly, the individual well-being. In this context, the privileged structure of *N*-acylhydrazone has been highlighted in the last years with many reported derivatives with antinociceptive activity. Early studies of our research group showed that a series of *N*-acylhydrazone molecular hybrids, originally developed as multi-target drug prototypes for the treatment of Alzheimer's disease, exhibited a potential antinociceptive activity. In view of these preliminary results, these compounds were selected as key-structures for an in-depth pharmacological study, searching for a better characterization of the antinociceptive profile and its potential activity in *in vivo* models of central and neuropathic pain. Therefore, the goal of this work was the synthesis and investigation of the antinociceptive activity of 3-hydroxy-piperidine-*N*-benzyl-acyl-hydrazone derivatives, as well as their possible mechanism of action. For this purpose, it was used the central pain model of tail flick and the neuropathic pain model of chronic constriction of the sciatic nerve (CCI). The pre-treatment was performed with compounds **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** e **PQM-75** at a dose of 100 $\mu\text{mol/Kg}$ (v.o) and morphine (1 mg/Kg) (i.p.), aside treatment with saline or naloxone (30 μg) (i.t.). In the tail flick assay, it was observed a significative increase in the latency time of the animals by the action of **PQM-56** in the 1,5 and 3,5 hours and of **PQM-75** in the 0,5, 1,5, 3,5 and 6,5 hours, in comparison to the control group. In the neuropathic pain model, the treatment with **PQM-56** and **PQM-75** also led to a significative increase in the nociceptive threshold in the 0,5, 1,5, 3,5 and 6,5 hours, in comparison to the control group. In both cases, the antinociceptive effect was blocked by treatment with naloxone, indicating that the mechanism of action occurs by via opioid and, therefore, that **PQM-56** and **PQM-75** have central effect. These results suggest that both substances could represent innovation in the development of new drug candidate prototypes with central antinociceptive action, with potential appliance as neuropathic analgesics, without adverse effects on motor coordination.

Keywords: Pain. Antinociceptive activity. Opioid. Central analgesy. Neuropathic pain. 3-hydroxy-piperidine-*N*-benzyl-acylaryl-hydrazones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação dos tipos de dor quanto a duração e quanto a origem neurofisiológica.....	18
Figura 2 -	Anatomia fisiológica da sinapse.....	21
Figura 3 -	Estrutura química de alguns neurotransmissores: acetilcolina (1), norepinefrina (2), epinefrina (3), histamina (4), ácido gama-aminobutírico (GABA) (5), glicina (6) e serotonina (7).....	22
Figura 4 -	Organização topológica em lâminas dos corpos celulares e fibras da medula espinhal.....	23
Figura 5 -	Via ascendente da dor.....	24
Figura 6 -	Escala analgésica da dor - OMS.....	26
Figura 7 -	Estrutura química de alguns anti-inflamatórios não esteroidais: Aspirina (Ácido acetilsalicílico) (8), naproxeno (9), ibuprofeno (10) e nimesulida (11).....	27
Figura 8 -	Estrutura química de alguns opioides usados no controle da dor: codeína (12), diidrocodeína (13), morfina (14).....	28
Figura 9 -	Estrutura química de alguns antidepressivos tricíclicos usados no controle da dor: amitriptilina (15), dotiepina (16), imipramina (17).....	28
Figura 10 -	Estrutura química de alguns antiepiléticos: gabapentina (18), e pregabalina (19); e da lidocaína (20) usados no controle da dor.....	29
Figura 11 -	Representação da estrutura da <i>N</i> -acilidrazona (NAH).....	31
Figura 12 -	Alguns exemplos de compostos com atividade antinociceptiva desenvolvidos pelo grupo LASSBio que contêm a subunidade <i>N</i> -acilidrazona.....	31
Figura 13 -	Efeito das substâncias-teste PQM-56, PQM-65, PQM-67, PQM-73, PQM-74, PQM-75, PQM-76, PQM-84 (100 µmol/kg), indometacina (100 µmol/kg) e morfina (39 µmol/kg) sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina, respectivamente primeira e segunda fase.....	34
Figura 14 -	Estruturas das substâncias mais ativas na 1ª fase do teste de formalina eleitas como ponto de partida para este estudo.....	34

Figura 15 -	Rota sintética para obtenção das substâncias-alvo PQM-56 (30a) , PQM-65 (30b) , PQM-67 (30c) e PQM-75 (30d)	38
Figura 16 -	Reação de aminação redutiva para obtenção do 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoato de metila (27).....	38
Figura 17 -	Reação de hidrazinólise para a obtenção de 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoidrazida (28).....	39
Figura 18 -	Reação de acoplamento para obtenção das <i>N</i> -acilidrazonas PQM-56 (30a) , PQM-65 (30b) , PQM-67 (30c) e PQM-75 (30d)	40
Figura 19 -	Etapas da cirurgia de CCI: Nervo ciático exposto, amarração em quatro pontos com fios de seda e sutura, respectivamente.....	47
Figura 20 -	Delineamento experimental para o modelo de dor central.....	49
Figura 21 -	Delineamento experimental para o modelo de dor neuropática.....	49
Figura 22 -	Proposta de mecanismo para obtenção da <i>N</i> -benzilpiperidina (27) através de uma reação de aminação redutiva.....	52
Figura 23 -	Espectro de absorção na região do IV de (27) (ATR).....	53
Figura 24 -	Conformação em cadeira de sistemas piperídínicos com hidrogênios em posições axial e equatorial.....	54
Figura 25 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (27) (300 MHz, CD ₃ OD).....	55
Figura 26 -	Espectro de RMN de ¹³ C do composto (27) (75 MHz, CD ₃ OD).....	56
Figura 27 -	Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CD ₃ OD) do composto (27).....	57
Figura 28 -	Ampliação do mapa de contorno HSQC (300 MHz, CD ₃ OD) do composto (27).....	57
Figura 29 -	Proposta de mecanismo para obtenção da hidrazida (28) através de uma reação de hidrazinólise.....	58
Figura 30 -	Espectro de absorção na região do IV de (28) (ATR).....	59
Figura 31 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (28) (300 MHz, CD ₃ OD).....	60
Figura 32 -	Espectro de RMN de ¹³ C do composto (28) (75 MHz, CD ₃ OD).....	61
Figura 33 -	Proposta de mecanismo para obtenção das <i>N</i> -acilidrazonas PQM-56 (30a) , PQM-65 (30b) , PQM-67 (30c) e PQM-75 (30d)	62
Figura 34 -	Espectro de absorção na região do IV de (30a) (ATR).....	64
Figura 35 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (30a) (300 MHz, (CD ₃) ₂ SO).....	65
Figura 36 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (30a) (300 MHz, CD ₃ OD).....	66
Figura 37 -	Espectro de RMN de ¹³ C do composto (30a) (75 MHz, (CD ₃) ₂ SO).....	67

Figura 38 -	Espectro de massas de alta resolução do composto PQM-56 (30a) (ESI-MS).....	68
Figura 39 -	Espectro de absorção na região do IV de (30b) (ATR).....	69
Figura 40 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (30b) (300 MHz, CD ₃ OD).....	70
Figura 41 -	Espectro de RMN de ¹³ C do composto (30b) (75 MHz, CD ₃ OD).....	71
Figura 42 -	Espectro de massas de alta resolução do composto PQM-65 (30b) (ESI-MS).....	72
Figura 43 -	Espectro de absorção na região do IV de (30c) (ATR).....	73
Figura 44 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (30c) (300 MHz, (CD ₃) ₂ SO).....	74
Figura 45 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (30c) (300 MHz, CD ₃ OD).....	75
Figura 46 -	Espectro de RMN de ¹³ C do composto (30c) (75 MHz, (CD ₃) ₂ SO).....	76
Figura 47 -	Espectro de massas de alta resolução do composto PQM-67 (30c) (ESI-MS).....	77
Figura 48 -	Espectro de absorção na região do IV de (30d) (ATR).....	78
Figura 49 -	Espectro de RMN de ¹ H do composto (30d) (300 MHz, C ₅ D ₅ N).....	79
Figura 50 -	Espectro de RMN de ¹³ C do composto (30d) (75 MHz, C ₅ D ₅ N).....	80
Figura 51 -	Espectro de massas de alta resolução do composto PQM-75 (30d) (ESI-MS).....	81
Figura 52 -	Estrutura química dos compostos da série-alvo.....	81
Figura 53 -	Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância PQM-56 (100 μmol/kg, v.o.). A administração de PQM-56 foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (± S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veic+Sal, P<0,05.....	83
Figura 54 -	Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância PQM-65 (100 μmol/kg, v.o.). A administração de PQM-65 foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (± S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veic+Sal, P<0,05.....	84

- Figura 55 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância **PQM-67** (100 µmol/kg, v.o.). A administração de **PQM-67** foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veic+Sal, $P < 0,05$ 85
- Figura 56 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância **PQM-75** (100 µmol/kg, v.o.). A administração de **PQM-75** foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veic+Sal, $P < 0,05$ 86
- Figura 57 - Limiar de retirada de pata em gramas avaliado pelo teste de von Frey eletrônico em animais SHAM (gráfico A) e CCI (gráfico B) pré-tratados com a substância **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** ou **PQM-75** na dose de 100 µmol/kg, v.o.; ou veículo e morfina. O limiar basal (B2) foi avaliado 7 dias após B1, e em seguida foram administradas as substâncias, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais por grupo. *Diferente de SHAM/Veic+Sal (gráfico A) ou CCI/Veic+Sal (gráfico B), $P < 0,05$ 88
- Figura 58 - Compostos com a subunidade *N*-acilidrazona relatados com atividade antinociceptiva..... 90
- Figura 59 - Efeitos do tratamento oral com veículo, **PQM-56**, **PQM-75** ou xilazina (2 mg/kg; s.c.) na coordenação motora (tempo de permanência na haste rotativa em segundos) nos tempos 30, 60 e 120 minutos após o tratamento. Cada coluna representa a média (\pm S.E.M.) para 6 camundongos em cada grupo. Os asteriscos indicam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva.....	48
Tabela 2 -	Dados das <i>N</i> -acilidrazonas-alvo (30a-d).....	63
Tabela 3 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (27) (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta$ ^1H e $^*\delta$ ^{13}C).....	100
Tabela 4 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (28) (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta$ ^1H e $^*\delta$ ^{13}C).....	101
Tabela 5 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (30a) (^1H CD_3OD , 300 e ^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta$ ^1H e $^*\delta$ ^{13}C)..	102
Tabela 6 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (30b) (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta$ ^1H e $^*\delta$ ^{13}C).....	103
Tabela 7 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (30c) (^1H CD_3OD , 300 e ^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta$ ^1H e $^*\delta$ ^{13}C)..	104
Tabela 8 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (30d) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta$ ^1H e $^*\delta$ ^{13}C).....	105

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
ATR	- <i>Attenuated total reflectance</i>
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCI	- <i>Chronic Constriction Injury</i>
<i>d</i>	- Dupleteo
F.M.	- Fórmula molecular
GABA	- Ácido γ -aminobutírico
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	- Hertz
i.p.	- Intraperitoneal
i.t.	- Intratecal
IV	- Infravermelho
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
<i>m</i>	- Multipleteo
MHz	- Megahertz
M.M.	- Massa molar
NAH	- <i>N</i> -acilidrazona
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ppm	- Partes por milhão
Pt	- Prototropismo
RMN	- Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	- Simpleto
SNC	- Sistema nervoso central
<i>t</i>	- Tripleto
TCA _s	- Antidepressivos tricíclicos
TMS	- Tetrametilsilano
v.o.	- Via oral
δ	- Deslocamento químico
<i>v</i>	- Número de ondas (cm^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	DOR.....	17
2.2	FISIOLOGIA DA DOR.....	20
2.3	FARMACOLOGIA DA DOR.....	25
2.4	MODELOS ANIMAIS PARA A AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA.....	29
2.5	N-ACILIDRAZONAS COMO SUBESTRUTURAS NO PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	30
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	33
3.1	JUSTIFICATIVA.....	33
3.2	OBJETIVO GERAL.....	35
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1	QUÍMICA.....	36
4.1.1	Generalidades.....	36
4.1.2	Abordagem sintética para a série de moléculas-alvo.....	37
4.1.3	Reação de aminação redutiva entre 4-formilbenzoato de metila (25) e 3-hidroxi-piperidina (26).....	38
4.1.4	Reação de hidrazinólise entre 4[(3-hidroxi-piperidin-1-ila)metileno]benzoato de metila (27) e monoidrato de hidrazina.....	39
4.1.5	Reação geral para obtenção das N-acilidrazonas-alvo (30a-d).....	40
4.1.6	Dados de caracterização dos compostos.....	41
4.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VIVO</i>	44
4.2.1	Animais.....	45
4.2.2	Substâncias.....	45
4.2.3	Modelo de dor central - Teste de retirada da cauda (<i>tail flick</i>).....	46
4.2.4	Modelo de dor neuropática - “ <i>Chronic Constriction Injury</i> ” (CCI).....	46
4.2.5	Testes de nociceção mecânica - Pressão crescente na pata (von Frey eletrônico).....	47
4.2.6	Grupos experimentais.....	48

4.2.7	Delineamento de estudo.....	48
4.2.8	Teste de coordenação motora (Rota-rod).....	49
4.2.9	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS- ALVO.....	51
5.1.1	Síntese do 4-(3-hidroxi-piperidin-1-ila)benzoato de metila (27).....	51
5.1.2	Síntese da 4-((3-hidroxi-piperidin-1-ila)metileno)benzoidrazida (28).....	58
5.1.3	Síntese do N-(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1- ila)metileno)benzoidrazida: PQM-56 (30a).....	61
5.1.4	Síntese do N-(4-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1- ila)metileno)benzoidrazida: PQM-65 (30b).....	68
5.1.5	Síntese do N-(4-fluorbenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1- ila)metileno)benzoidrazida: PQM-67 (30c).....	72
5.1.6	Síntese do N-((4-piperidin-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1- ila)metileno) benzoidrazida: PQM-75 (30d).....	77
5.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	81
6	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE.....	100

1 INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência multidimensional que envolve aspectos sensoriais e emocionais que, geralmente, tem uma função protetora, porém quando patológica pode afetar de forma significativa a qualidade de vida. Ela é definida como “experiência sensorial e emocional desconfortável causada por danos reais ou potenciais aos tecidos, ou descrita em termos deles” (IASP, 2012). De fato, a dor está presente na vida de milhões de pessoas, como pode ser observado em um gráfico publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) relatando as principais causas de mortes em 2015 e dentre elas se destacam doenças cardíaca, pulmonares, câncer, AIDS, diabetes, entre outras, notando-se que dentre essas principais causas existe a presença da dor (WHO, 2017). Embora tenha ocorrido um avanço na medicina para o tratamento de doenças severas, ainda existe uma grande deficiência na terapêutica para o tratamento da dor decorrente destas doenças. Assim, a dor é considerada um problema de saúde mundial e acarreta em inúmeras consequências sociais e econômicas (HENSCHKE; KAMPER; MAHER, 2015).

A forma mais comum de tratar a dor é utilizando fármacos. De maneira geral, faz-se o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), opioides, antidepressivos, anticonvulsivantes (antiepilépticos), anestésicos locais, entre outros (GUINDON, 2017). Porém, todos possuem alguma limitação para algum tipo de dor, como a baixa eficiência no tratamento e grande variedade de efeitos colaterais como, por exemplo, depressão respiratória e dependência causadas pelo uso de opioides (EGUCHI, 2004). Neste contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas, incluindo a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos eficazes e seguros, continua a ser de suma importância, mobilizando esforços em todo o mundo, tanto na academia quanto na indústria farmacêutica.

Existem várias maneiras de classificar a dor e dentre elas estão quanto a sua duração e quanto a origem neurofisiológica, sendo que cada tipo de dor possui um mecanismo de ação, sendo alguns de extrema complexidade. Para este estudo, nós elegemos modelos de dor central e neuropática, sendo que os fármacos que possuem ação no sistema nervoso central estão entre os mais utilizados no mundo e fármacos para dor neuropática ainda são bastante deficientes devido à alta complexidade deste tipo de dor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir é apresentada uma revisão da literatura sobre dor, sua fisiologia, modelos animais para estudo de atividade antinociceptiva, farmacologia da dor e *N*-acilidrazonas como estruturas privilegiadas no planejamento de fármacos.

2.1 DOR

Segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser descrita como uma “experiência sensorial e emocional desconfortável causada por danos reais ou potenciais aos tecidos, ou descrita em termos deles” (IASP, 2012). Ela serve como um alerta para indicar um potencial dano ao organismo desencadeando assim uma série de ações para preservá-lo (MILLAN, 1999).

Os termos dor e nocicepção têm significados diferentes. Denomina-se nocicepção a manifestação fisiológica, ou seja, a parte sensorial, são os mecanismos pelos quais os estímulos nocivos passam até chegar ao córtex, já a dor possui além dessa manifestação fisiológica, o componente emocional, que é a interpretação afetiva desses estímulos (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; FURST, 1999).

Existem diversos tipos de dor, e cada uma delas tem seu próprio mecanismo, sendo assim importante entender melhor como cada um age para fazer um tratamento adequado. Uma das maneiras de classificar a dor é quanto a sua duração sendo que ela pode ser dividida em dor aguda ou crônica (Figura 1). A dor aguda tem um tempo limite e desaparece quando cessa o estímulo nocivo, já a dor crônica tem como característica ser de longa duração, mais de três meses, sendo considerada um grande problema de saúde em países mais desenvolvidos, afetando aproximadamente 20 % da população adulta (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; TRACEY; MANTYH, 2007).

A dor crônica geralmente não é bem localizada, e costuma ser maciça, dolorida, contínua ou recorrente (VITOR et al., 2008). Ela atinge mais de 120 milhões de americanos custando US\$ 600 bilhões devido a gastos médicos, diminuição da produtividade, absenteísmo e incapacidade. No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre dor são escassos, porém, estima-se que a prevalência de dor crônica seja de 40 % na população (MENDEZ et

al., 2017). O tratamento da dor crônica moderada e grave ainda representa um grande desafio, pois não existem terapias eficientes a longo prazo, com poucos efeitos colaterais e que sejam acessíveis financeiramente (GUINDON, 2017). Porém, uma mudança na mentalidade dos pesquisadores em tratar a dor crônica como uma doença e não um sintoma tem gerado grandes avanços neste campo (TRACEY; MANTYH, 2007).

Outra forma de classificar a dor é pela sua origem neurofisiológica: dor nociceptiva, inflamatória ou patológica (Figura 1). A dor nociceptiva ocorre devido a detecção de estímulos nocivos pelos nociceptores e age como um sistema de proteção que detecta e diminui o contato com estes estímulos que podem ser, por exemplo, o contato com algo muito quente, frio ou afiado. Esta dor é de alto limiar e ocorre somente com estímulos intensos (WOOLF, 2010).

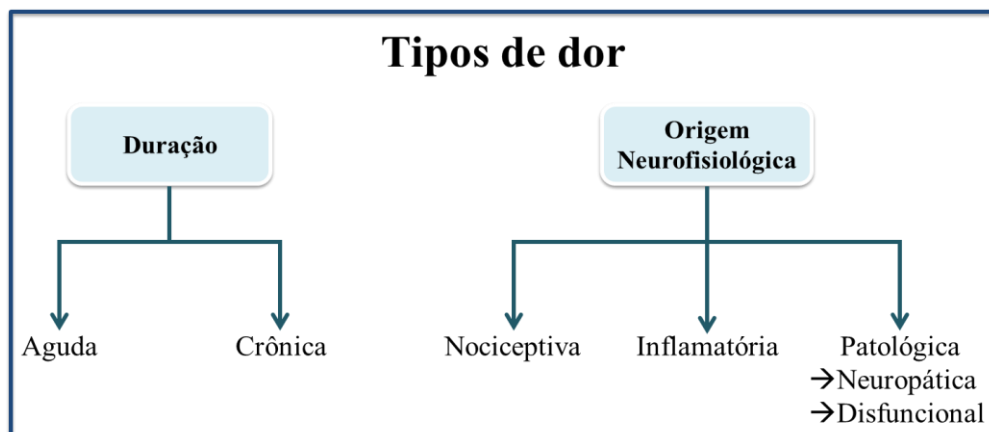


Figura 1 - Classificação dos tipos de dor quanto a duração e quanto a origem neurofisiológica.
Fonte: Do autor.

A dor inflamatória também tem caráter protetor e aparece devido a ativação do sistema imunológico por causa da lesão ou infecção, sendo considerada uma das características cardinais da inflamação. Como se tem uma sensibilização no tecido após o dano, a dor ajuda a reduzir o risco de danos promovendo uma melhor recuperação já que desencoraja o contato com a área lesionada (WOOLF, 2010). Geralmente, após ser resolvida a lesão tecidual, a dor inflamatória desaparece, porém, em algumas doenças crônicas como artrite reumatoide, esta dor continua enquanto houver inflamação ativa (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Já a dor patológica, não tem caráter protetor e resulta do mau funcionamento do sistema nervoso, como no caso da dor neuropática e disfuncional, sendo que este mau funcionamento pode ser considerado uma doença (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WOOLF, 2010). Na dor disfuncional não existe um estímulo nocivo, inflamação ou danos no

sistema nervoso e, portanto, na maioria dos casos, não se sabe ao certo o motivo causador da manifestação ou persistência desta dor (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor define dor neuropática como “dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial” (IASP, 2012). Ela é uma forma de dor crônica extremamente difícil de ser tratada devido a sua complexa fisiopatologia (KAMI; TAJIMA; SENBA, 2017). A dor neuropática pode ser periférica, devido a lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial periférico, tendo entre suas principais causas: neuropatia diabética, neuralgia trigeminal, neuralgia pós-herpética, dor pós-operatória e pós-traumática persistente, dor neuropática após amputação, dentre outros. Ou pode ser central, devido a lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial central, tendo entre suas principais causas: o acidente vascular cerebral, lesão medular, doença de Parkinson e doenças neurodegenerativas em geral (IASP, 2012; SZCZUDLIK et al., 2014). A dor neuropática possui alguns sintomas característicos como: disestesia, que são sensações anormais desagradáveis; hiperalgesia que é uma percepção melhor da dor quando se tem os estímulos nocivos; e alodinia que é uma resposta anormal dolorosa quando se tem estímulos não nocivos (VELASCO; O’SULLIVAN; SHERIDAN, 2017).

Assim, a dor neuropática é decorrente de doenças/injúrias que acometem o sistema nervoso periférico de maneira direta ou sistema nervoso central (SNC) (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1999). Desta forma, ocorre um aumento da sensibilidade dolorosa devido ao dano tecidual, e assim, os estímulos inócuos podem ser percebidos como sensação dolorosa. Esta nocicepção pode ocorrer por alterações centrais ou espinhais, com relevante sensibilização dos neurônios aferentes primários periféricos (BARON; BINDER, 2004; WALKER; PERKINS; DRAY, 1995). Também ocorre a formação de neuromas, devido a lesão de um nervo periférico, o que gera excitabilidade dos potenciais de ação conduzindo o influxo sensorial, que independe de estimulação periférica (DEVOR, 2006; LIU et al., 2001). Em adição, fibras adjacentes ao nervo lesado geram hiperexcitabilidade ectópica, que são decorrentes da expressão de canais de sódio (COLLOCA et al., 2017; DEVOR, 2006). No modelo de dor neuropática também ocorre um processo chamado de Degeneração Walleriana, em que ocorre a liberação de mediadores e recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão, sendo ele caracterizado pela remoção de axônios que sofreram decomposição de mielina, gerando síntese e liberação de mediadores inflamatórios (DUBOVÝ, 2011; TRACEY; WALKER, 1995). As opções atuais para o tratamento a dor neuropática não são totalmente eficazes e possuem diversos efeitos colaterais como toxicod dependência, constipação, hipotensão ortostática, sonolência e hiperalgesia (LI, 2017).

2.2 FISIOLOGIA DA DOR

Quando se tem um estímulo nocivo, os responsáveis por fornecer informações sobre um possível dano são os nociceptores, que são receptores sensoriais especializados (FEIN, 2011). Os nociceptores são terminações nervosas livres e estão presentes nas camadas superficiais da pele e de diferentes órgãos e tecidos (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; GUYTON; HALL, 2011). Estes neurônios tem um limiar de ativação alto, precisando de estímulos intensos como mecânico, térmico ou químico, porém a sensibilização dos nociceptores pode diminuir o limiar de ativação e até mesmo gerar atividade espontânea (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; FEIN, 2011). Nem todos os nociceptores são sensíveis a apenas um tipo de estímulo, podendo alguns serem sensíveis a vários estímulos diferentes, assim, eles podem ser classificados quanto ao tipo de estímulo ao qual respondem: nociceptores mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. Os mecânicos respondem a pressão intensa; térmicos a temperaturas extremas ($> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$; $< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$); Polimodais respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos; E os silenciosos respondem a estímulos químicos (FEIN, 2011).

Estes nociceptores são constituídos por fibras nervosas, sendo que a velocidade com que o potencial de ação é transmitido varia de acordo com o tipo de fibra. As fibras C são amielinizadas e mais lentas e as fibras A δ , A β e A α mielinizadas e mais rápidas. A literatura indica que as fibras C amielinizadas e A δ levemente mielinizadas são as responsáveis por transmitir o sinal aferente dos nociceptores, que é entendido como dor. Porém, estas fibras também podem transmitir outros sinais de estímulos que não são nocivos como, por exemplo, frio e calor, assim, nem toda fibra C e A δ são nociceptores (FEIN, 2011).

A transdução do estímulo nocivo ocorre quando o estímulo (mecânico, térmico ou químico) é convertido em um sinal elétrico que irá desencadear o início do potencial de ação na célula (FORNASARI, 2014). Ela ocorre nos terminais periféricos dos nociceptores, que possuem proteínas transdutoras especializadas, sendo a maioria delas canais iônicos. Quando ocorre o estímulo nocivo, estes canais podem se abrir em resposta, e assim tornam-se permeáveis aos íons cálcio e sódio, sendo estes responsáveis pela despolarização do terminal (FORNASARI, 2014).

O processo pelo qual o potencial de ação percorre os axônios dos nociceptores para chegar até a medula espinhal é chamado de condução. Para que ela aconteça, é preciso que os canais de sódio voltagem-dependentes convertam o potencial gerado nos terminais periféricos

dos nociceptores em um potencial de ação. Ao chegar no terminal do nociceptor, localizado no corno dorsal da medula espinhal, o potencial de ação promove a abertura do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo N, o que permite o influxo de Ca^{2+} , e assim ocorre a liberação de neurotransmissores (FORNASARI, 2014). Uma abordagem usada para o desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos para o controle da dor é o bloqueio de canais de Ca^{2+} , o que inibe a liberação de neurotransmissores. O fármaco ziconotídeo (Prialt®), um produto natural de origem marinha, se liga diretamente a estes canais de Ca^{2+} , agindo como analgésico (MOLINSKI et al., 2009).

Já a transmissão do sinal doloroso ocorre com a sinapse entre os nociceptores e os neurônios de segunda ordem (FORNASARI, 2014). Os nociceptores transmitem a informação de um estímulo nocivo aos neurônios superiores por meio de sinapses onde se tem liberação de neurotransmissores, que é controlada diretamente pelo potencial de membrana sináptica (FEIN, 2011). O neurônio pré-sináptico libera por seu terminal os neurotransmissores, que por sua vez, atuam nos receptores presentes na membrana do neurônio pós-sináptico (Figura 2).

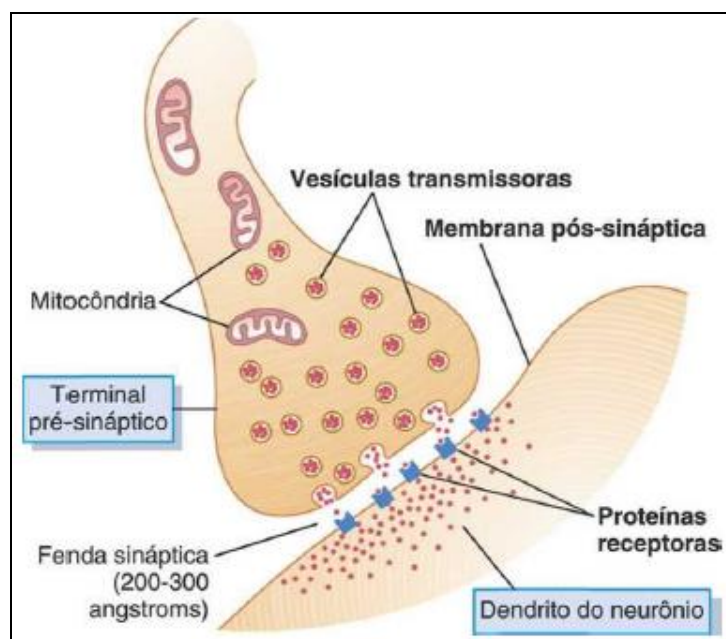


Figura 2 - Anatomia fisiológica da sinapse.
Fonte: Adaptado de Guyton e Hall (2011).

Estes neurotransmissores, incluindo aminoácidos e neuropeptídios, podem promover a inibição, excitação ou modificar a sensibilidade do neurônio pós-sináptico, sendo a acetilcolina (1, Figura 3), norepinefrina (2, Figura 3), epinefrina (3, Figura 3), histamina (4, Figura 3), ácido gama-aminobutírico (GABA) (5, Figura 3), glicina (6, Figura 3) e serotonina (7, Figura 3) alguns dos mais conhecidos (GUYTON; HALL, 2011).

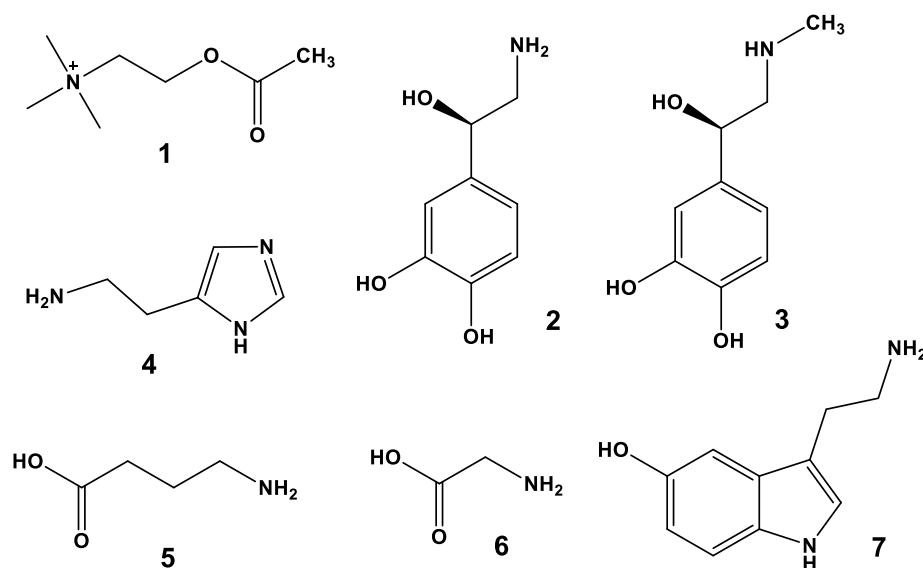


Figura 3 - Estrutura química de alguns neurotransmissores: acetilcolina (1), norepinefrina (2), epinefrina (3), histamina (4), ácido gama-aminobutírico (GABA) (5), glicina (6) e serotonina (7).
Fonte: Do autor.

Os receptores presentes nas membranas dos neurônios são proteínas e geralmente são alvos de fármacos usados no controle da dor. Quando o neurotransmissor se liga ao receptor, ocorre uma reação em cadeia de efeitos secundários que podem resultar em ativação/inibição de enzimas presentes na célula ou em um fluxo de íons devido a modulação de receptores de membrana. A célula pode conter vários tipos de receptores, porém cada receptor é específico para um tipo de mensageiro. Cerca de 30 % dos fármacos atuam em receptores acoplados a proteína G, sendo então esta família de receptores de suma importância para a química medicinal. Alguns exemplos de receptores acoplados a proteína G são: receptores opioides, adrenérgicos e muscarínicos (PATRICK, 2013).

Uma característica muito importante da sinapse é o princípio da condução unidirecional, ou seja, a transmissão acontece sempre em uma direção, sendo do neurônio pré-sináptico para o neurônio pós-sináptico. Este princípio permite que os sinais sejam direcionados à alvos específicos (Figura 2) (GUYTON; HALL, 2011).

Os aferentes primários se projetam no corno dorsal da medula espinhal onde ocorre a sinapse com os neurônios de segunda ordem (BASBAUM et al., 2009). Estes neurônios estão presentes na substância cinzenta da medula, que é dividida em 10 lâminas distintas (Figura 4) sendo que estas representam uma organização topográfica de fibras e células (HANNON; ATCHISON, 2013). O nociceptores A δ se projetam na lâmina I e V, enquanto que os nociceptores C se projetam em lâminas I e II. Já as fibras aferentes do tipo A β se projetam em

lâminas III, IV e V (BASBAUM et al., 2009). As lâminas diretamente envolvidas com a nociceção são a I e II, sendo que nestas camadas os nociceptores liberam neurotransmissores, como por exemplo, glutamato e substância P, que serão responsáveis pela sinapse com o neurônio de segunda ordem (HANNON; ATCHISON, 2013).

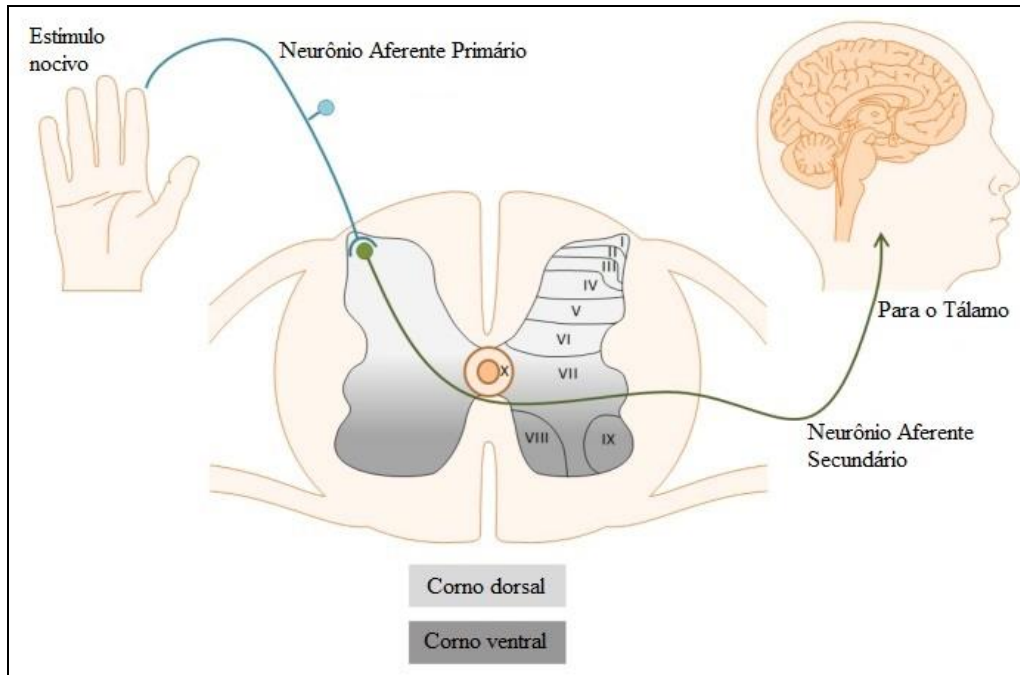


Figura 4 – Organização topológica em lâminas dos corpos celulares e fibras da medula espinhal. Fonte: Adaptado de Hannon e Atchison (2013).

Após a sinapse dos nociceptores com os neurônios de segunda ordem presentes no corno dorsal da medula espinhal, estas fibras aferentes de segunda ordem seguem o trato espinotalâmico e ascendem contralateralmente até o tálamo, onde transmitem o estímulo nocivo. Em seguida, esta informação é transmitida ao córtex somatossensorial, onde este estímulo será interpretado como doloroso, sendo esta via chamada de via ascendente da dor (Figura 5) (BASBAUM et al., 2009). Os neurônios ascendentes também ativam outras regiões superiores (córtex cingulado e insular) por meio de conexões no núcleo parabraquial, que estão presentes no tronco encefálico e na amígdala (BORROTO-ESCUELA et al., 2013).

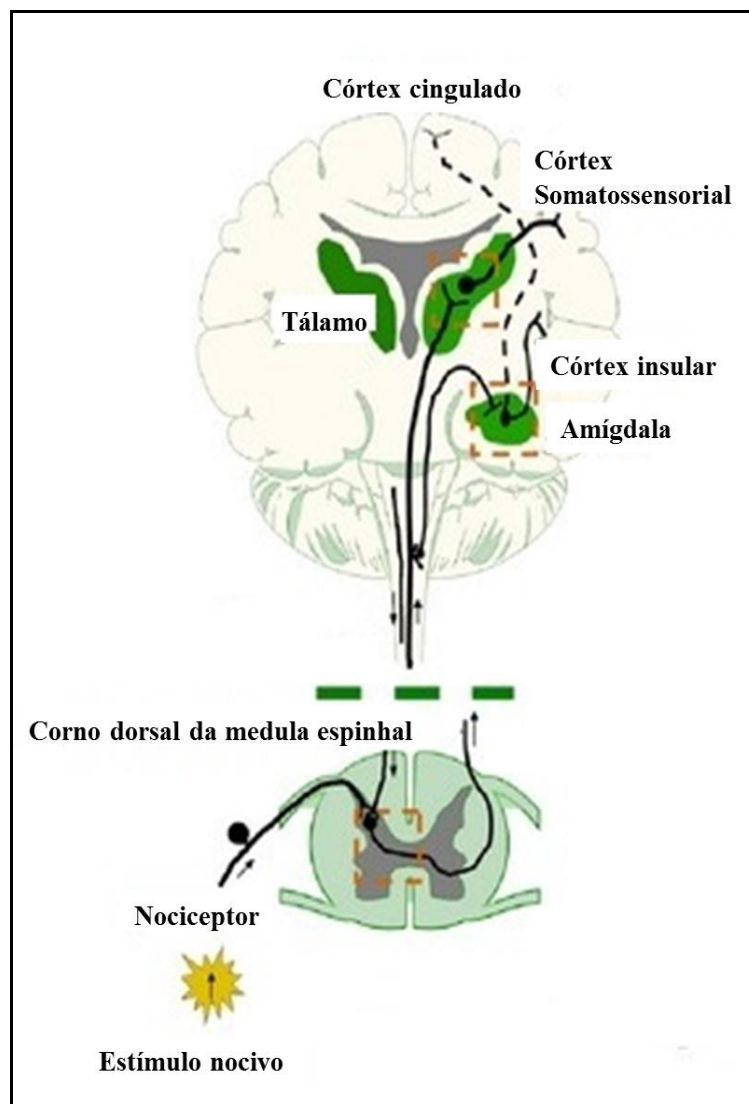


Figura 5 – Via ascendente da dor.
 Fonte: Adaptado de Borroto-Escuela et al., (2013).

Assim, não existe uma única área responsável por interpretar a experiência dolorosa, mas sim um “centro de dor” onde o córtex somatossensorial está relacionado com propriedades sensoriais-discriminatórias, e o córtex cingulado e insular, estão relacionados com os componentes emocionais. (BASBAUM et al., 2009).

Entretanto, a transmissão desse sinal nervoso passa por uma modulação ao chegar na medula, ou seja, nem todos os sinais serão transmitidos devido a ação de interneurônios locais e neurônios de projeção da via descendente (FORNASARI, 2014). Este fenômeno de modulação pode inibir ou facilitar a transmissão nociceptiva e é explicado pela teoria das portas de Melzack e Wall. As Fibras do tipo A β , responsáveis pela transmissão de estímulos não-nociceptivos, são mais rápidas, pois são mielinizadas e agem ativando interneurônios inibitórios na substância gelatinosa da medula, o que resulta em inibição do disparo de neurônios de segunda ordem, já as fibras nociceptivas como as fibras C que são

mais lentas, inibem os interneurônios inibitórios além de ativarem os neurônios de segunda ordem (LENT, 2004). Assim, fibras nociceptivas abrem o portão de controle da dor e fibras não-nociceptivas fecham esse portão.

Além das fibras aferentes periféricas, as fibras das vias descendentes, que têm sua origem no tronco encefálico e regiões como córtex, tálamo, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal e núcleo magno da rafe, também tem um papel importante de modulação, agindo como um sistema analgésico endógeno e atuam nas estruturas do corno dorsal da medula liberando neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e endorfinas que agem de forma a modular a transmissão do sinal doloroso (LENT, 2004; MILLAN, 2002).

2.3 FARMACOLOGIA DA DOR

O controle da dor tem sido uma área bem estudada, sendo que os receptores opioides ainda são parte relevante. Porém, tem-se dado uma maior atenção também para o uso de fármacos adjuvantes e anti-inflamatórios, que além de controlar a dor, também diminuem o uso de opioides (MACPHERSON, 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu em 1986 uma escala analgésica para o controle da dor devido ao câncer (Figura 6). Esta escala indica o uso oral dos analgésicos levando em conta o aumento da potência e dose até que a dor tenha sido aliviada, o que resulta de 80-90 % de sucesso em pacientes com câncer, porém, casos de dor crônica não relacionada ao câncer raramente conseguem o efeito desejado, pois a dosagem tem que ser limitada devido a efeitos adversos. A escala é dividida em degraus, sendo o primeiro uma dor leve e é indicado o uso de analgésicos não opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), já o segundo passo é para dores moderadas e inclui opioides fracos e por fim o terceiro degrau para dores severas onde se inclui opioides fortes como a morfina, que por serem mais potentes, também tem efeitos colaterais mais agravados como dependência e depressão respiratória (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016).

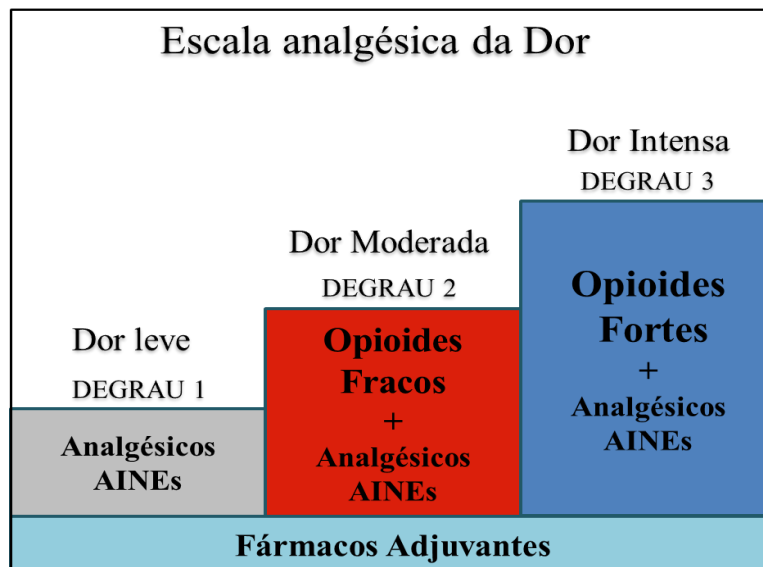


Figura 6 – Escala analgésica da dor - OMS.

Fonte: Adaptado de Hylands-White; Duarte e Raphael (2016).

Em todos os degraus devem ser usados também os fármacos adjuvantes, que são fármacos para reduzir os sintomas de ansiedade e medo (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016). Entre os adjuvantes estão inclusos fármacos ansiolíticos, que reduzem a ansiedade devido a dor; hipnóticos, que induzem ao sono e assim combatem a insônia muitas vezes relacionada com a dor; e também relaxantes musculares, que são responsáveis por aliviar espasmos musculares (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016).

De modo geral, os fármacos usados para o controle da dor são: anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opioides, antidepressivos, anticonvulsivantes (antiepilépticos), anestésicos locais entre outros (GUINDON, 2017).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) possuem atividades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas, sendo eles uma das famílias de fármacos que estão entre as mais vendidas no mundo (GUNTER et al., 2017). Eles inibem as enzimas cicloxigenase (COX-1 e COX-2) de modo a reduzir a produção de substâncias inflamatórias, assim, eles reduzem a inflamação e proporcionam um alívio da dor, porém, eles podem apresentar algum distúrbio para o sistema gastrointestinal (GUNTER et al., 2017). Os AINEs podem ser classificados em não seletivos, atuando tanto em COX-1 como COX-2, onde se inclui a aspirina (8, Figura 7), naproxeno (9, Figura 7) e ibuprofeno (10, Figura 7), e os seletivos para COX-2 como a nimesulida (11, Figura 7) (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016; SIMON; PRINCE, 2016). O uso de AINEs é muito comum para dores leves ou moderadas, porém para tratamento de dores intensas é comum o uso dos AINEs com opioides (MACPHERSON, 2000).

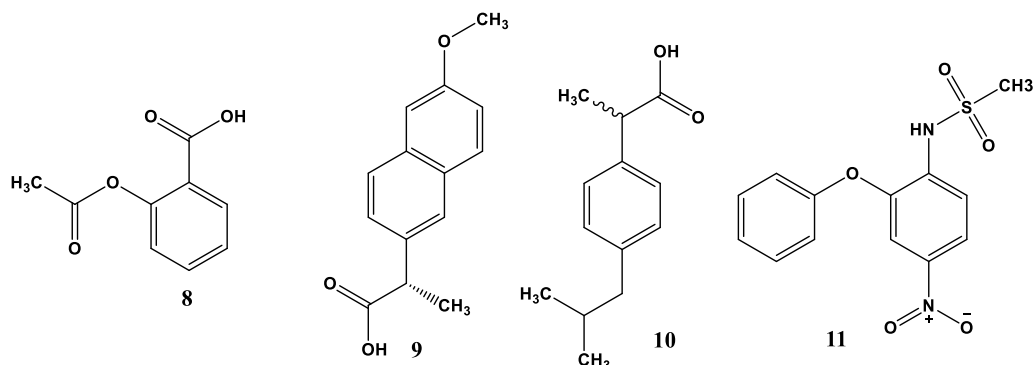


Figura 7 – Estrutura química de alguns anti-inflamatórios não esteroidais: Aspirina (Ácido acetilsalicílico) (8), naproxeno (9), ibuprofeno (10) e nimesulida (11).

Fonte: Do autor.

O ópio é um produto natural extraído da papoula (*Papaver somniferum*), que vem sendo usado com finalidades sociais e medicinais há milhares de anos, principalmente no controle da dor, sendo ele constituído por vários alcaloides como a morfina, codeína e tebaína. O termo opioides inclui todos os compostos sintéticos, semissintéticos, de ocorrência natural e também os endógenos que tem a capacidade de interagir com receptores opioides presentes no corpo (PATRICK, 2013). Alguns destes opioides usados no controle da dor são: codeína (12, Figura 8) e diidrocodeína (13, Figura 8) para dor moderada e morfina (14, Figura 8) para dor severa. Os ligantes naturais para estes receptores opioides são os peptídeos opioides endógenos, que são divididos em três famílias clássicas: encefalinas, endorfinas e dinorfinas (BRUNTON et al., 2006).

Os três tipos clássicos de receptores opioides são o Mi (μ), Kapa (κ) e Delta (δ). Estes receptores quando ligados a um agonista promovem analgesia, porém, existem outros efeitos adversos desencadeados, sendo alguns deles bem perigosos como a depressão respiratória, que pode ser fatal, dependência e tolerância (EGUCHI, 2004). Os receptores opioides são da família de receptores acoplados a proteína G e agem de duas formas para promover a analgesia: eles abrem canais de K^+ dos neurônios pós-sinápticos causando uma hiperpolarização da célula e assim evitam que continue a transmissão do sinal. E também fecham canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem presentes nos neurônios pré-sinápticos, evitando assim que sejam liberados neurotransmissores (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). Os opioides são indicados para o alívio de dores severas, porém não são uma boa alternativa para um tratamento a longo prazo, principalmente devido as suas características como a tolerância e dependência.

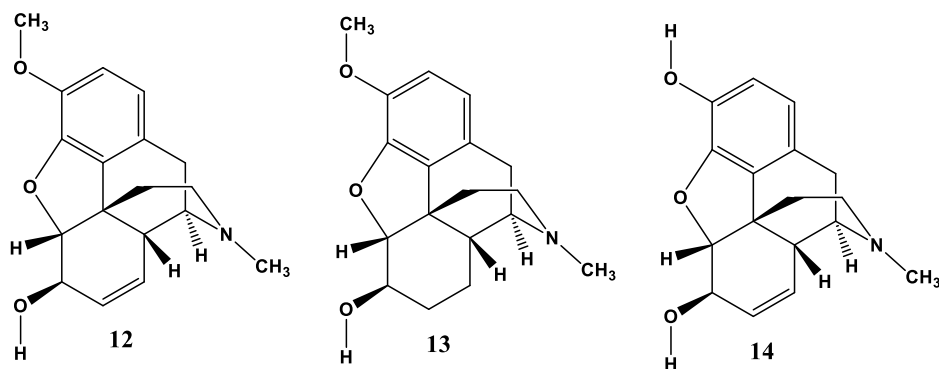


Figura 8 – Estrutura química de alguns opioides usados no controle da dor: codeína (**12**), diidrocodeína (**13**), morfina (**14**).

Fonte: Do autor.

Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) agem de forma a aliviar a depressão, a dor e problemas com o sono, sendo eles indicados principalmente para pessoas com dor crônica (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016). Para o tratamento de dor neuropática, os antidepressivos e anticonvulsivantes são considerados fármacos de primeira linha. Antidepressivos tricíclicos como a amitriptilina (**15**, Figura 9), dotiepinga (**16**, Figura 9) e imipramina (**17**, Figura 9) agem de forma a inibir a reabsorção de serotonina e norepinefrina, e canais de sódio nos neurônios. Alguns efeitos adversos presentes no uso de TCAs são: sedação, tontura, constipação, boca seca e visão turva, assim, pode haver algumas limitações quanto ao seu uso (LAAR et al., 2012).

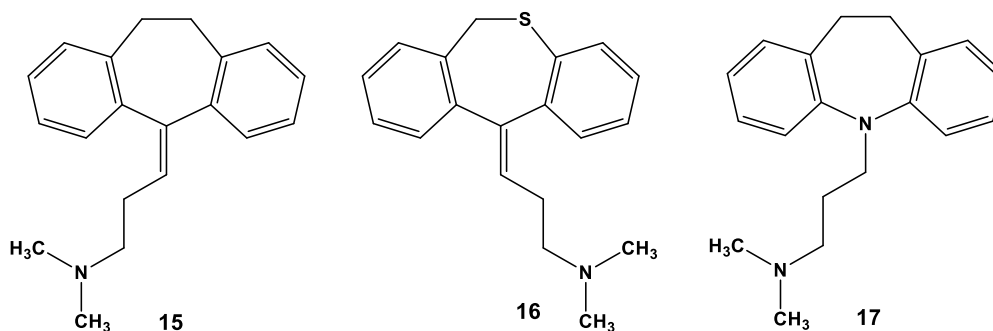


Figura 9 – Estrutura química de alguns antidepressivos tricíclicos usados no controle da dor: amitriptilina (**15**), dotiepinga (**16**), imipramina (**17**).

Fonte: Do autor.

Os antiépiléticos, também chamados de anticonvulsivantes, como a gabapentina (**18**, Figura 10) e pregabalina (**19**, Figura 10) reduzem a liberação de neurotransmissores como glutamato, noradrenalina, serotonina e substância P nos terminais dos neurônios proporcionando a analgesia. Eles se ligam a subunidade alfa-2-delta de canais de cálcio

dependentes de voltagem para que ocorra esta modulação dos neurotransmissores. Contudo, o uso de ambos também tem algumas limitações devido a efeitos adversos como sonolência, tontura e tremores (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016; LAAR et al., 2012).

Anestésicos locais como a lidocaína (**20**, Figura 10) também são frequentemente usados no controle da dor. A lidocaína atua bloqueando canais de sódio, assim inibindo despolarização do neurônio. Ela é usada principalmente para alívio da dor neuropática periférica (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2016).

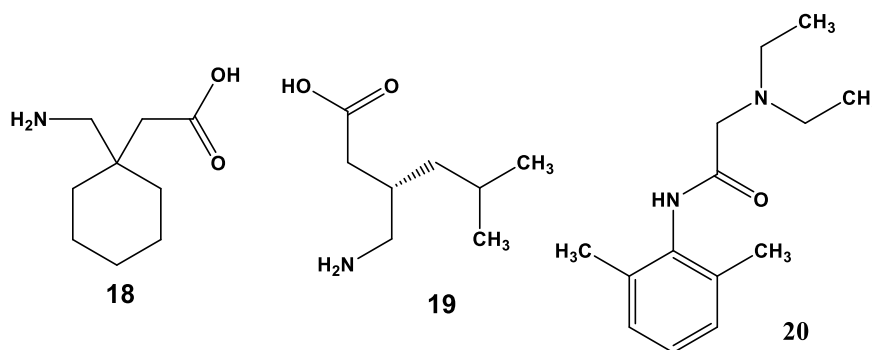


Figura 10 – Estrutura química de alguns antiepiléticos: gabapentina (**18**), pregabalina (**19**); e da lidocaína (**20**) usados no controle da dor.

Fonte: Do autor.

2.4 MODELOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA

Para auxiliar nas pesquisas no desenvolvimento de novos fármacos para o controle da dor, tem-se desenvolvido modelos animais de avaliação de atividade antinociceptiva cada vez mais eficientes (COLLEONI; SACERDOTE, 2010; WALKER; FOX; URBAN, 1999;). A ausência de comunicação verbal é uma das grandes dificuldades ao se avaliar a dor em animais, desta forma, são avaliadas as reações comportamentais do animal perante o estímulo nociceptivo para fazer uma estimativa de dor. Estes testes de nocicepção funcionam como um sistema de entrada-saída em que a entrada é o estímulo (mecânico, térmico, químico ou elétrico) e a saída é a reação do animal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

O teste de retirada de cauda é usado para avaliar substâncias de ação central, como as que possuem um mecanismo de ação semelhante aos opioides e pode ser feito com ratos e camundongos (BARROT, 2012; SILVA et al., 2013). Para sua realização, é aplicada uma fonte de calor radiante em uma pequena porção da cauda, o que resulta em uma reação de retirada da cauda, sendo cronometrada a latência (tempo de reação do movimento) (LE

BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Um efeito antinociceptivo é considerado quando ocorre aumento da latência, sendo importante definir o limiar de corte para evitar que a pele sofra algum dano, assim como estabelecer a intensidade da fonte de calor e a porção da cauda que será estimulada, pois estes fatores influenciam na latência (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Para a avaliação da dor neuropática existem mais de 40 modelos animais para experimentação, sendo estes de suma importância para se ter melhor compreensão da fisiopatologia deste tipo de dor (LI, 2017; VELASCO; O’SULLIVAN; SHERIDAN, 2017). Neste contexto, o modelo de dor neuropática utilizado de constrição crônica do nervo ciático (CCI), descrito por Bennet e Xie (1988), consiste na amarração deste nervo em quatro pontos, o que simula uma situação de compressão nervosa crônica como a causada por uma hérnia de disco lombar (ZIMMERMANN, 2001). Neste modelo animal, estão presentes sensações espontâneas observadas como episódios frequentes de lambidas e agitação da pata afetada e sensações evocadas (alodinia e hiperalgesia). A sensação dolorosa é observada de 2 a 7 dias após a cirurgia e pode durar por até dois meses (JANICKI; PARRIS, 2008).

O teste de pressão crescente na pata (von Frey eletrônico) é utilizado para avaliar o limiar mecânico de retirada da pata no modelo de dor neuropática. Este teste é realizado com um anestesímetro eletrônico e o contato com a superfície plantar da pata afetada se dá através de uma ponteira de polipropileno, em que se aplicada uma pressão crescente até que se tenha uma resposta comportamental característica de retirada da pata seguida de “*flinch*” (SILVA et al., 2013). Assim, é observado um efeito antinociceptivo quando ocorre um aumento do limiar de retirada da pata.

2.5 N-ACILIDRAZONAS COMO SUBESTRUTURAS NO PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Estruturas privilegiadas são ditas aquelas que podem ser facilmente funcionalizadas e que possam exercer pontos de interação para mais de um tipo de biorreceptor. Dentre elas, as subunidades *N*-acilidrazonas (NAHs) representam um híbrido funcional de um grupo imina e uma amida, assumindo propriedades próprias e a capacidade de interação seletiva com diferentes biorreceptores em função da natureza dos substituintes (Figura 11) (MAIA; TESCH; MANSSOUR-FRAGA, 2014). Com o intuito de comprovar o caráter farmacofórico

desta subunidade, foram realizadas alterações estruturais em vários protótipos ativos, onde o grupo imina foi suprimido levando aos respectivos derivados de amida, os quais não apresentaram atividade biológica quando submetidos aos mesmos ensaios que os protótipos com a subunidade NAH (DUARTE; BARREIRO; MANSSOUR-FRAGA, 2007).

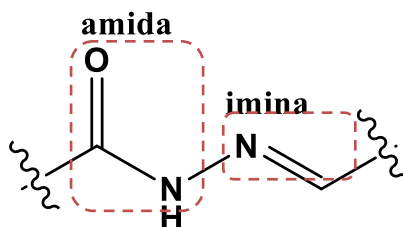


Figura 11 - Representação da estrutura da *N*-acilidrazona (NAH).
Fonte: Do autor.

Apesar desta subunidade ser relatada com potencial terapêutico desde a década de 1970, somente nos últimos anos seus derivados estão sendo mais explorados (MAIA; TESCH; MANSSOUR-FRAGA, 2014). Um dos grupos de pesquisa brasileiro que tem estudado amplamente esta estrutura é o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sendo que já relataram diversos derivados de *N*-acilidrazonas bioativos com propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória, antitrombótica, dentre outras (BARREIRO et al., 2002). Alguns destes protótipos com propriedades antinociceptivas estão ilustrados na Figura 12.

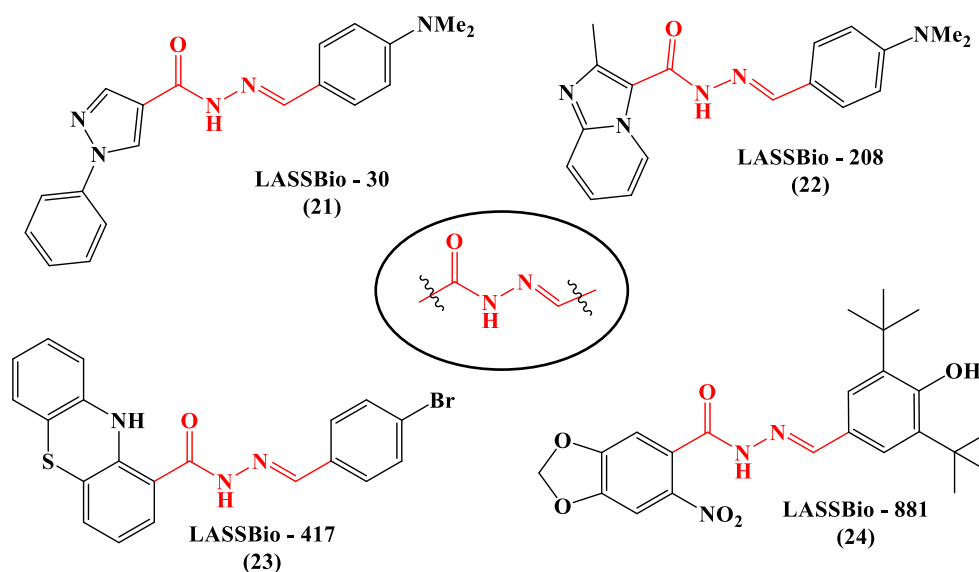


Figura 12 - Alguns exemplos de compostos com atividade antinociceptiva desenvolvidos pelo grupo LASSBio que contêm a subunidade *N*-acilidrazona
Fonte: Adaptado de Duarte; Barreiro e Fraga (2007).

A subunidade *N*-acilidrazona, por ser uma estrutura privilegiada, oferece uma grande versatilidade para o desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos, inclusive para moléculas com atividade antinociceptiva. Além disso, protótipos bioativos, podem ser otimizados através de modificações estruturais com o intuito de melhorar suas propriedades farmacocinéticas (BARREIRO et al., 2002). Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de novos protótipos com esta subunidade tem ganhado grande relevância nos últimos anos.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A justificativa, objetivo geral e os específicos deste trabalho se encontram descritos a seguir.

3.1 JUSTIFICATIVA

Embora o arsenal terapêutico disponível para o tratamento da dor seja amplo, o controle de algumas condições dolorosas ainda é muito deficiente, pois os fármacos disponíveis não são eficazes e apresentam uma grande variedade de efeitos adversos. Neste contexto, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos que sejam mais potentes e seguros, principalmente para condições dolorosas de origem central crônicas e de alta intensidade. Neste trabalho, visamos a ressíntese e a avaliação do perfil antinociceptivo de substâncias que já haviam sido preparadas por nosso grupo de pesquisa, mas que foram originalmente planejadas como protótipos candidatos a fármacos com perfil de ação multialvo contra a doença de Alzheimer (VIEGAS, 2013). Durante uma etapa preliminar de triagem quanto à atividade anti-inflamatória, alguns compostos demonstraram atividade relevante no ensaio de formalina, composto por duas fases distintas. A primeira fase que ocorre nos primeiros 5 minutos é a fase neurogênica onde é avaliada a reação do animal aos estímulos nociceptivos e após 15 min da administração da formalina, é avaliada a fase inflamatória (Figura 13).

Teste de Formalina

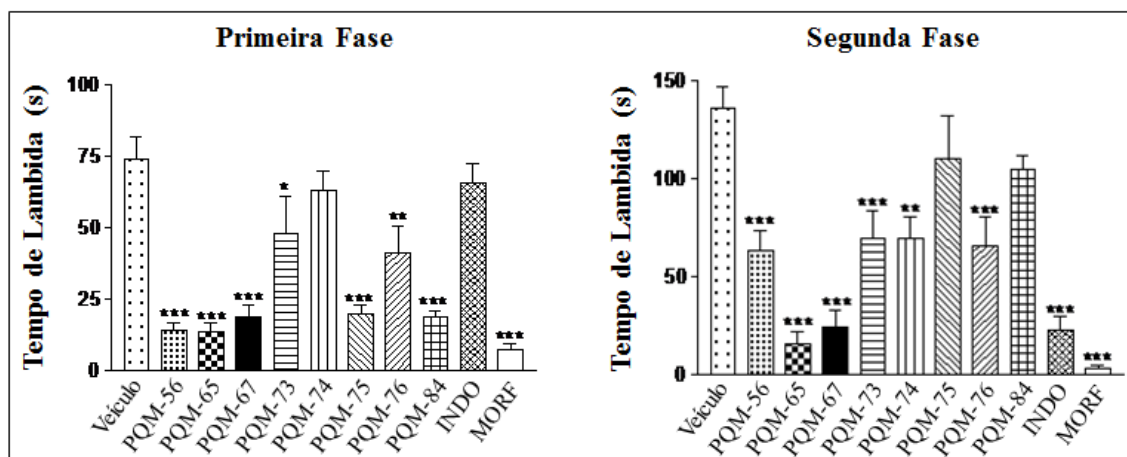


Figura 13 - Efeito das substâncias-teste **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67**, **PQM-73**, **PQM-74**, **PQM-75**, **PQM-76**, **PQM-84** (100 $\mu\text{mol/kg}$), indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$) e morfina (39 $\mu\text{mol/kg}$) sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina, respectivamente primeira e segunda fase.

Fonte: Viegas, F.P.D., Dissertação de Mestrado, 2013.

Diante destes resultados, é evidente que as substâncias **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** e **PQM-75** (Figura 14) apresentaram atividade relevante na fase neurogênica do ensaio, sugerindo um possível efeito antinociceptivo. Portanto, estas substâncias foram eleitas como estruturas-chave para um estudo mais aprofundado sobre seu efeito antinociceptivo em modelos de dor central e neuropática. Os resultados obtidos poderão ser úteis à identificação de novos candidatos a fármacos analgésicos, com padrão estrutural inédito por meio de modificações estruturais adicionais, buscando a otimização do perfil farmacológico.

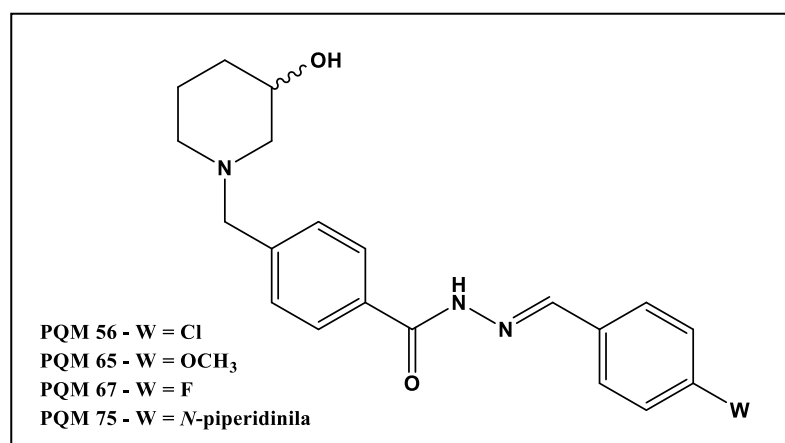


Figura 14 - Estruturas das substâncias mais ativas na 1ª fase do teste de formalina e eleitas como ponto de partida para este estudo.

Fonte: Do autor.

3.2 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral a ressíntese e a avaliação farmacológica *in vivo* da atividade antinociceptiva de uma série de derivados 3-hidroxi-piperidinil-*N*-benzil-acilarilidrazônicos em modelos de dor central e neuropática, assim como a investigação de possível mecanismo de ação, com a finalidade de se identificar novos protótipos candidatos a fármacos.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Ressíntese e confirmação estrutural de uma série de derivados 3-hidroxi-piperidinil-*N*-benzil-acilarilidrazônicos (Figura 14);
- b) Avaliação da atividade antinociceptiva *in vivo* da série-alvo de moléculas em modelos de dor central e neuropática;
- c) Identificação das substâncias mais promissoras e investigação de possíveis mecanismos de ação e de possíveis efeitos indesejáveis sobre o SNC.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Neste tópico abordaremos as partes química e farmacológica.

4.1 QUÍMICA

A seguir são descritas todas as etapas químicas para a obtenção dos compostos.

4.1.1 Generalidades

As substâncias-alvo deste projeto foram sintetizadas no Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM), na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Para o acompanhamento das etapas da rota sintética, empregou-se cromatografia em camada delgada (CCD) e para purificar os compostos a cromatografia em coluna (CC) e/ou recristalização. Todas as substâncias foram analisadas por IV e RMN de ^1H e ^{13}C , cujos dados foram comparados com os dados dos padrões do PeQuiM para confirmação estrutural. Todos os reagentes da síntese são das marcas Sigma-Aldrich ou Acros, sem purificações adicionais. Já os solventes metanol e etanol, utilizados na forma anidra, foram tratadas seguindo a literatura (PERRIN; ARMAREGO, 1988).

Para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se sílica-gel 60 G Merck® de 0,25 mm de espessura sobre lâminas de alumínio F₂₅₄, da marca Merck e a visualização das substâncias foi feita em câmara escura com lâmpada de UV ($\lambda = 254$ ou 365 nm). A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com gel de sílica flash da marca Sigma-Aldrich (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm). Para as faixas de fusão, foi utilizado o equipamento Marte (PFM II) com amostra triturada e empacotada em tubo capilar.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram gerados por um espectrômetro Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific USA) acoplado a Pike Gladi ATR Technologies.

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foi utilizado um espectrômetro Bruker AC-300 operado em 300 MHz (^1H) e em 75 MHz

(^{13}C) do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG e o sinal do tetrametilsilano (TMS) presente nos solventes deutерados foi utilizado como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades estão abreviadas da seguinte maneira: *s* (simpleto), *d* (dupleto), *dd* (duplo dupleto), *t* (tripleto), *m* (multiplete), *quint* (quinteto), *q* (quarteto). A numeração adotada para os átomos nas estruturas não corresponde à numeração da nomenclatura IUPAC. Isso foi feito para que os compostos com estruturas análogas pudessem ter seus dados de RMN comparados, quando necessário.

Para obtenção dos espectros de massas, foi utilizado um LC Agilent 1290 e um espectrômetro de massas Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS. As amostras foram diluídas em 1 mL de MeOH, seguida de uma nova diluição de uma alíquota de 5 μl da solução em 1 mL de MeOH. Em seguida, 2 μl dessa solução foi injetada pelo auto-amostrador do LC por infusão direta na fonte de eletrospray do espectrômetro de massas. A fase móvel utilizada do LC foi MeOH/0.1 % Ácido fórmico na vazão de 0.1 mL/min. A fonte de ionização foi de eletrospray que operou no modo positivo e os parâmetros utilizados foram: Temperatura do gás de nebulização 290 $^{\circ}\text{C}$, Nozzle Voltage 320 V, voltagem do capilar 3500 V, vazão do gás de secagem 14 mL/min, pressão do gás de nebulização 45 psig, temperatura e vazão do gás auxiliar de 350 $^{\circ}\text{C}$ e 12 mL/min, respectivamente. O analisador quadrupolo operou na faixa de m/z 100-1500, fragmentador 50 V, voltagem do octapolo 750 V, e aquisição de um espectro obtido com alta resolução no TOF até a 5^a casa decimal.

4.1.2 Abordagem sintética para a série de moléculas-alvo

A rota sintética para a série-alvo está delineada na Figura 15 e teve como material de partida o éster comercial 4-formilbenzoato de metila (**25**), que foi inicialmente submetido a uma reação de aminação redutiva com 3-hidroxipiperidina racêmica (**26**) na presença de NaBH_3CN e ZnCl_2 , levando ao éster *N*-benzilpiperidínico (**27**). Em uma segunda etapa, o composto (**27**) reagiu com monodrato de hidrazina, originando a hidrazida (**28**), que é o intermediário-chave desta rota. A reação da hidrazida (**28**) com benzaldeídos adequadamente substituídos (**29**) forneceu as substâncias-alvo (**30a-d**) (PQM-56, PQM-65, PQM-67 e PQM-75).

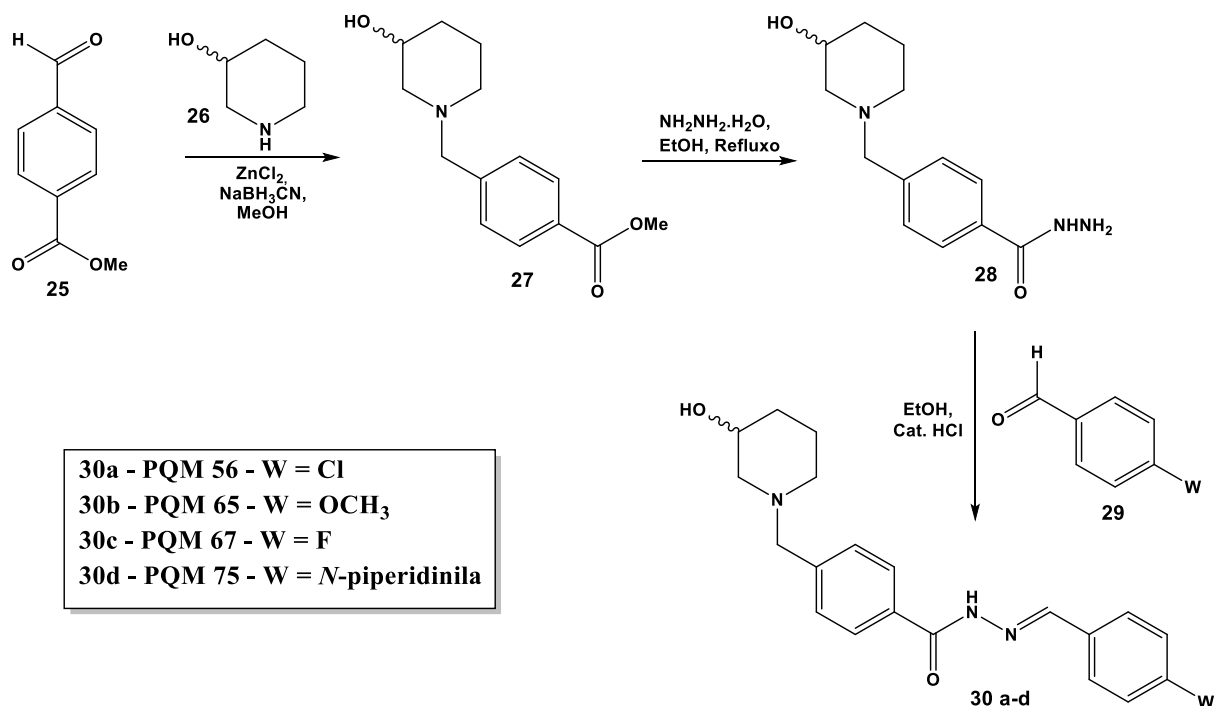


Figura 15 - Rota sintética para obtenção das substâncias-alvo **PQM-56 (30a)**, **PQM-65 (30b)**, **PQM-67 (30c)** e **PQM-75 (30d)**.

Fonte: Do autor.

4.1.3 Reação de aminação redutiva entre 4-formilbenzoato de metila (25) e 3-hidroxipiperidina (26)

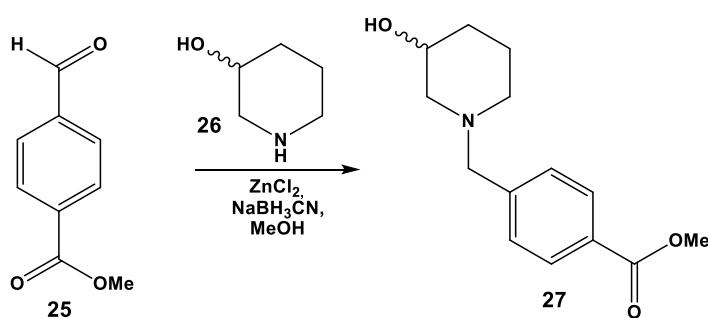


Figura 16 - Reação de aminação redutiva para obtenção do 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoato de metila (27).

Fonte: Do autor.

A primeira etapa da rota sintética é a reação de aminação redutiva (Figura 16). Em um balão monotubulado de 50 mL adicionou-se 12,2 mmols (1 eq.) do éster comercial (25), 14,6 mmols (1,2 eq.) de 3-hidroxipiperidina (26) e 10 mL de metanol anidro, mantendo-se a solução sob agitação por 1 hora, a temperatura ambiente. Em um segundo balão de 50 ml,

adicionou-se 12,2 mmols (1 eq.) de NaBH_3CN , 6,1 mmols (0,5 eq.) de ZnCl_2 anidro e 6 mL de metanol anidro, mantendo-se a solução sob agitação por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a mistura contida no segundo balão ao primeiro balão, sob agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 60/40, revelador: luz ultravioleta). A reação foi finalizada acrescentando-se 10 mL de água destilada seguida da adição de uma solução de NaOH (20 %) até $\text{pH} \sim 12$, mantendo-se a agitação magnética por 10 minutos adicionais. A mistura foi então extraída com diclorometano (5 x 20 mL) e as fases orgânicas reunidas foram lavadas com uma solução saturada de NaCl (2 x 25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida (KIM et al., 1985). O resíduo obtido foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: acetato de etila/metanol 90/10). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu o produto (**27**) (2,55 g, 10,2 mmols, F.M.: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$, M.M.: $249,1365 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) como sólido branco, com 84 % de rendimento.

4.1.4 Reação de hidrazinólise entre 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoato de metila (**27**) e monodrato de hidrazina

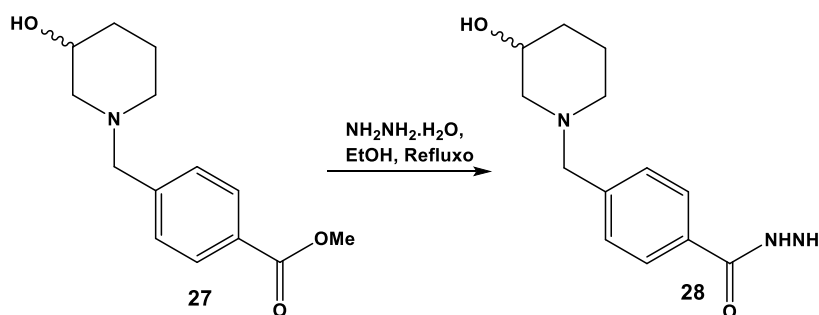


Figura 17 - Reação de hidrazinólise para a obtenção de 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoidrazida (**28**).

Fonte: Do autor.

A segunda etapa é uma reação de hidrazinólise (Figura 17). Adicionou-se 4,0 mmols (1 eq.) de 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoato de metila (**27**), 120,4 mmols (5,87 mL, 30 eq.) de monodrato de hidrazina a 98 % e 10 mL de etanol anidro em um balão monotubulado de 50 mL. Manteve-se a solução em refluxo a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 horas e após o término reacional, verificado por CCD, removeu-se o solvente em rotaevaporador e purificou-

se o produto em coluna cromatográfica (eluente: acetato de etila/metanol 80/20) (ROMEIRO et al., 2009). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu o produto (**28**) (0,8 g, 3,2 mmols, F.M.: $C_{13}H_{19}N_3O_2$, M.M.: $249,1477 \text{ g.mol}^{-1}$) como um sólido branco, com 80 % de rendimento.

4.1.5 Reação geral para obtenção das *N*-acilidrazonas-alvo (**30a-d**)

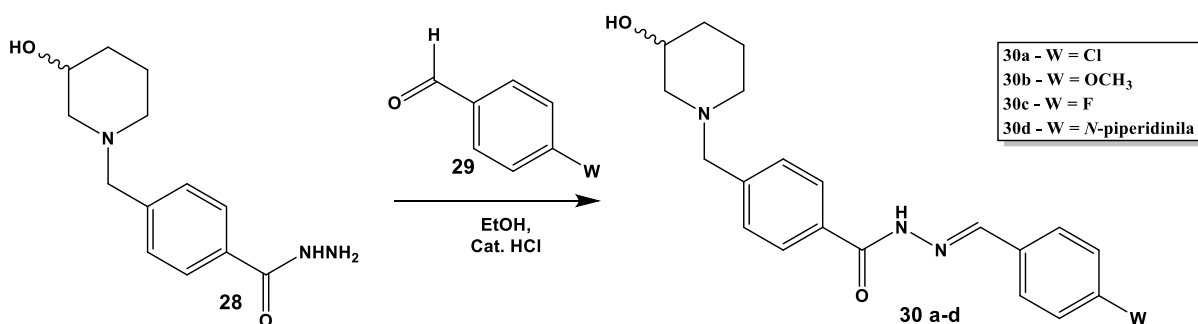


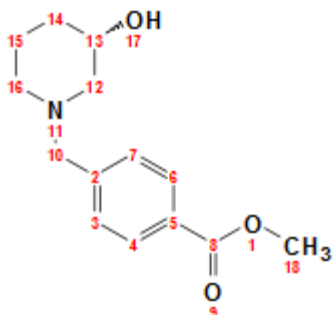
Figura 18 - Reação de acoplamento para obtenção das *N*-acilidrazonas PQM-56 (**30a**), PQM-65 (**30b**), PQM-67 (**30c**) e PQM-75 (**30d**).

Fonte: Do autor.

E por fim, o acoplamento com benzaldeídos (Figura 18). Adicionou-se em um balão monotubulado 1,2 eq. molar do benzaldeído de interesse (**29**), 3 mL de etanol anidro e 4 gotas de solução de HCl 37 %. Depois de solubilizado o aldeído, adicionou-se 1 eq. de hidrazida (**28**), já solubilizada em 2 mL de etanol anidro e se manteve sob agitação em temperatura ambiente. As reações duraram cerca de 3 h e foram todas acompanhadas por CCD. Retirou-se o solvente em rota evaporador e purificou-se as *N*-acilidrazonas em coluna cromatográfica (eluente: acetato de etila/metanol 70/30) ou por recristalização (LIMA et al., 2000).

4.1.6 Dados de caracterização dos compostos

Nome do composto: 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoato de metila (**27**)



F.M.: C₁₄H₁₉NO₃

M.M.: 249,1365 g.mol⁻¹

Características: Sólido branco

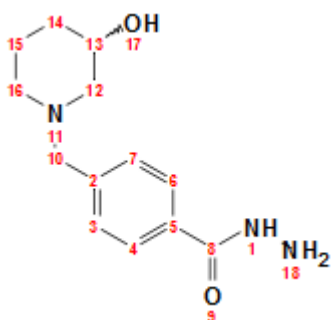
Rendimento: 84 %

IV-ATR (v_{max}, cm⁻¹): 3335, 3035, 3005, 2937, 2788, 1712, 1606, 1574, 1438, 1370, 1277, 1057.

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300 MHz): 1,29-1,17 (*m*, 1H, H-14); 1,62-1,49 (*m*, 1H, H-15); 1,77-1,69 (*m*, 1H, H-15'); 1,96-1,86 (*m*, 2H, H-12 e H-14'); 2,08-2,00 (*m*, 1H, H-16); 2,70-2,64 (*m*, 1H, H-16'); 2,87-2,83 (*m*, 1H, H-12'); 3,64-3,54 (*m*, 1H, H-10); 3,70-3,61 (*m*, 1H, H-13); 3,89 (*s*, 3H, H-18); 7,44 (*d*, 2H, *J* = 8,4, H-3 e H-7); 7,96 (*d*, 2H, *J* = 8,4, H-4 e H-6).

RMN ¹³C (δ, CD₃OD, 75 MHz): 24,0 (C-15); 33,8 (C-14); 52,6 (C-18); 54,4 (C-16); 61,7 (C-12); 63,5 (C-10); 67,9 (C-13); 130,3 (C-5); 130,5 (C-3, C-4, C-6 e C-7); 144,7 (C-2); 168,4 (C-8).

Nome do composto: 4[(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno]benzoidrazida (**28**)



F.M.: C₁₃H₁₉N₃O₂

M.M.: 249,1477 g.mol⁻¹

Características: Sólido branco

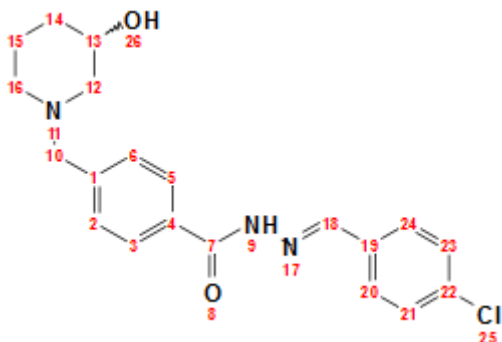
Rendimento: 80 %

IV-ATR (v_{max}, cm⁻¹): 3326, 3272, 3189, 3062, 3021, 2943, 2803, 2360, 2341, 1623, 1573, 1531, 1504, 1228.

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300 MHz): 1,29-1,17 (*m*, 1H, H-14); 1,62-1,49 (*m*, 1H, H-15); 1,78-1,70 (*m*, 1H, H-15'); 1,97-1,86 (*m*, 2H, H-12 e H-14'); 2,10-2,02 (*m*, 1H, H-16); 2,72-2,66 (*m*, 1H, H-16'); 2,88-2,84 (*m*, 1H, H-12'); 3,63-3,54 (*m*, 1H, H-10); 3,71-3,63 (*m*, 1H, H-13); 7,43 (*d*, 2H, *J* = 8,4, H-3 e H-7); 7,75 (*d*, 2H, *J* = 8,4, H-4 e H-6).

RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 75 MHz): 23,9 (C-15); 33,8 (C-14); 54,3 (C-16); 61,6 (C-12); 63,5 (C-10); 67,8 (C-13); 128,2 (C-3 e C-7); 130,7 (C-4 e C-6); 133,2 (C-5); 142,8 (C-2); 169,5 (C-8).

Nome do composto: *N*-(4-clorobenzilideno-4-(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno) benzoidrazida



Código: PQM-56 (30a)

F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_2$

M.M.: 371,1401 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características: Sólido branco

Rendimento global: 62 %

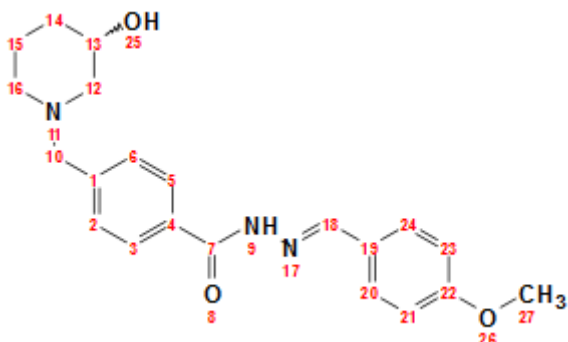
HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 372,1478

IV-ATR (ν_{max} , cm^{-1}): 3310, 3171, 3029, 2933, 1645, 1596, 1551, 1486, 1287, 1087, 1065.

RMN ^1H (δ , CD_3OD , 300 MHz): 1,01-0,92 (*m*, 1H, H-14); 1,29-1,14 (*m*, 1H, H-15); 1,71-1,51 (*m*, 1H, H-15'); 2,01-1,94 (*m*, 2H, H-12 e H-14'); 2,75-2,55 (*m*, 1H, H-16); 3,03-2,96 (*m*, 1H, H-16'); 3,11-3,06 (*m*, 1H, H-12'); 3,92-3,86 (*m*, 1H, H-13); 4,12-4,03 (*m*, 1H, H-10); 7,46 (*d*, 2H, *J* = 8,1, H-20 e H-24); 7,65 (*d*, 2H, *J* = 8,1, H-2 e H-6); 7,86 (*d*, 2H, *J* = 8,4, H-21 e H-23); 8,03 (*d*, 2H, *J* = 8,1, H-3 e H-5); 8,45 (*s*, 1H, H-18).

RMN ^{13}C (δ , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz): 22,6 (C-15); 32,9 (C-14); 53,0 (C-16); 60,1 (C-12); 61,3 (C-10); 65,6 (C-13); 128,3 (C-3 e C-5); 129,4 (C-2, C-6, C-20, C-21, C-23 e C-24); 132,8 (C-19 e C-4); 133,8 (C-22); 134,9 (C-1); 147,0 (C-18); 163,5 (C-7).

Nome do composto: *N*-(4-metoxibenzilideno-4-(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno) benzoidrazida



Código: PQM-65 (30b)

F.M.: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$

M.M.: 367,1896 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características: Sólido cinza

Rendimento global: 40 %

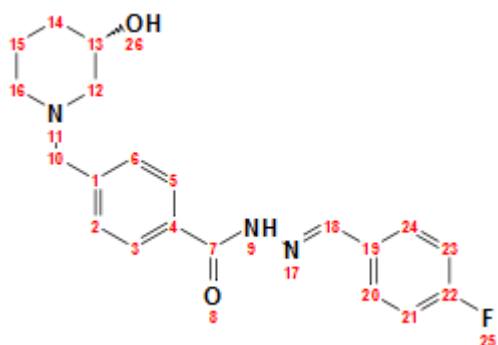
HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 368,1982

IV-ATR (ν_{\max} , cm^{-1}): 3322, 3208, 3031, 3004, 2933, 1651, 1602, 1556, 1506, 1455, 1366, 1248, 1024.

RMN ^1H (δ , CD_3OD , 300 MHz): 1,32-1,26 (*m*, 1H, H-14); 1,64-1,54 (*m*, 1H, H-15); 1,93-1,76 (*m*, 2H, H-15' e H-14'); 2,08-2,01 (*m*, 1H, H-12); 2,21-2,14 (*m*, 1H, H-16); 2,77-2,71 (*m*, 1H, H-16'); 2,93-2,88 (*m*, 1H, H-12'); 3,72-3,66 (*m*, 2H, H-10 e H-13); 3,84 (*s*, 3H, H-27); 6,99 (*d*, 2H, $J = 8,7$, H-21 e H-23); 7,52 (*d*, 2H, $J = 8,1$, H-2 e H-6); 7,78 (*d*, 2H, $J = 8,7$, H-20 e H-24); 7,93 (*d*, 2H, $J = 8,4$, H-3 e H-5); 8,34 (*s*, 1H, H-18).

RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 75 MHz): 23,7 (C-15); 33,5 (C-14); 54,4 (C-16); 55,9 (C-27); 61,4 (C-12); 63,3 (C-10); 67,6 (C-13); 115,3 (C-21 e C-23); 128,0 (C-19); 128,8 (C-3 e C-5); 130,6 (C-20 e C-24); 130,9 (C-2 e C-6); 133,3 (C-4); 142,8 (C-1); 150,8 (C-18); 163,3 (C-22); 166,6 (C-7).

Nome do composto: *N*-(4-fluorbenzilideno-4-(3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno) benzoidrazida



Código: PQM-67 (30c)

F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_2$

M.M.: 355,1696 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características: Sólido branco

Rendimento global: 46 %

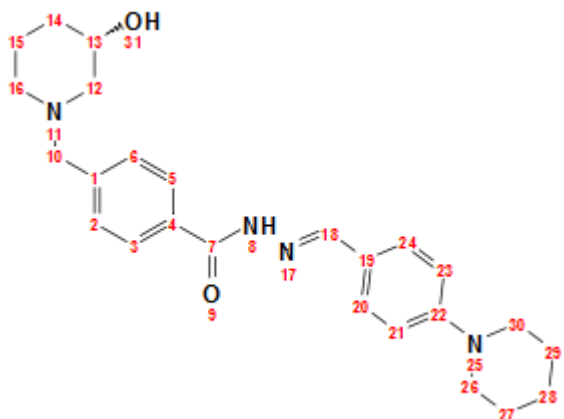
HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 356,1786

IV-ATR (ν_{\max} , cm^{-1}): 3327, 3243, 3031, 2934, 2359, 2342, 1651, 1602, 1551, 1507, 1250, 1169, 1025.

RMN ^1H (δ , CD_3OD , 300 MHz): 1,32-1,24 (*m*, 1H, H-14); 1,63-1,52 (*m*, 1H, H-15); 1,80-1,73 (*m*, 1H, H-15'); 2,02-1,92 (*m*, 2H, H-12 e H-14'); 2,15-2,08 (*m*, 1H, H-16); 2,74-2,69 (*m*, 1H, H-16'); 2,92-2,86 (*m*, 1H, H-12'); 3,70-3,65 (*m*, 2H, H-10 e H-13); 7,18 (*t*, 2H, $J_{21,23-\text{F}} = 9,0$, H-21 e H-23); 7,52 (*d*, 2H, $J = 7,8$, H-2 e H-6); 7,95-7,88 (*m*, 4H, H-20, H-24, H-3 e H-5); 8,39 (*s*, 1H, H-18).

RMN ^{13}C (δ , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz): 23,3 (C-15); 33,3 (C-14); 53,0 (C-16); 61,1 (C-12); 61,8 (C-10); 66,1 (C-13); 116,0 (*d*, 2C, $J_{21,23-\text{F}} = 21,8$, C-21 e C-23); 127,7 (C-2 e C-6); 128,7 (C-3 e C-5); 129,3 (*d*, 2C, $J_{20,24-\text{F}} = 8,3$, C-20 e C-24); 131,1 (C-19); 131,8 (C-4); 142,7 (C-1); 146,7 (C-18); 163,2 (C-7); 163,2 (*d*, 1C, $J_{22-\text{F}} = 246$, C-22).

Nome do composto: N-((4-piperidi-1-ila)benzilideno-4-(3-hidroxi-piperidin-1-ila)metileno)benzoidrazida



Código: PQM-75 (30d)

F.M.: C₂₅H₃₂N₄O₂

M.M.: 420,2525 g.mol⁻¹

Características: Sólido amarelo

Rendimento global: 50 %

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ : 421,2604

IV-ATR (v_{max}, cm⁻¹): 3323, 3032, 2934, 2360, 2342, 1655, 1602, 1551, 1507, 1252, 1025.

RMN ¹H (δ, C₅D₅N, 300 MHz): 1,47-1,39 (*m*, 6H, H-27, H-28 e H-29); 1,72-1,55 (*m*, 3H, H-15', H-15 e H-14); 2,24-1,98 (*m*, 4H, H-16', H-16, H-14', H-12); 2,65-2,63 (*m*, 1H, H-12'); 3,13-3,09 (*m*, 4H, H-26 e H-30); 3,59-3,48 (*m*, 1H, H-10); 4,09-4,02 (*m*, 1H, H-13); 6,97 (*d*, 2H, *J* = 8,7, H-21 e H-23); 7,50 (*d*, 2H, *J* = 8,1, H-2 e H-6); 7,92 (*d*, 2H, *J* = 8,7, H-20 e H-24); 8,26 (*d*, 2H, *J* = 8,1, H-3 e H-5); 8,72 (*s*, 1H, H-18); 12,36 (*s*, 1H, H-8).

RMN ¹³C (δ, C₅D₅N, 75 MHz): 23,5 (C-15); 24,5 (C-28); 25,7 (C-27 e C-29); 33,8 (C-14); 49,2 (C-26 e C-30); 53,6 (C-16); 61,6 (C-12); 62,5 (C-10); 66,8 (C-13); 115,4 (C-21 e C-23); 124,9 (C-19); 128,1 (C-2 e C-6); 129,3 (C-20 e C-24); 129,6 (C-3 e C-5); 134,0 (C-4); 142,1 (C-1); 149,2 (C-18); 153,4 (C-22); 164,6 (C-7).

4.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

Neste tópico são descritos os ensaios antinociceptivos *in vivo* que foram avaliados sob responsabilidade dos Profs. Drs. Josie Resende Torres da Silva e Marcelo Lourenço da Silva, ambos docentes da Faculdade de Fisioterapia (UNIFAL-MG) e ensaio de rota-rod realizado pelos Profs. Drs. Alexandre Giusti-Paiva e Fabiana Cardoso Vilela Giusti, do departamento de Ciências Fisiológicas (UNIFAL-MG).

4.2.1 Animais

Foram utilizados 216 ratos machos Wistar pesando de 200 a 250 g para os testes de *tail flick* e von Frey e para o ensaio de rota-rod, foram utilizados 24 camundongos Swiss pesando de 30-40 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno com água e ração comercial *ad libitum*, mantidos sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e com ciclo claro e escuro de 12 horas. Antes de cada teste, os animais ficaram em jejum de *overnight* apenas com água *ad libitum* e ao término do experimento, os animais foram sacrificados com isoflurano. Todos os animais foram ambientados por um período de pelo menos 30 min antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre 7:00 horas e 17:00 horas à temperatura de 23 ± 2 °C. Todos os experimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa, estabelecidas pelo Comitê de Ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Federal de Alfenas (CEUA-UNIFAL-MG). O presente estudo foi aprovado para execução segundo o parecer emitido pelo CEUA-UNIFAL-MG sob o protocolo n°: 02/2016.

4.2.2 Substâncias

O pré-tratamento foi realizado com as substâncias **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** e **PQM-75**, que foram administradas na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, que é a dose utilizada em ensaios anteriores do grupo, por via oral após terem sido solubilizadas com o veículo (5 % DMSO em salina 0,9 %) e o sulfato de morfina (1 mg/kg), que foi administrado por via intraperitoneal sendo este um fármaco opioide utilizado como controle positivo. O tratamento foi realizado com solução de salina 0,9 % ou naloxona (30 μg , após diluição em salina 0,9 %) administradas por via intratecal, sendo a naloxona um antagonista opioide. Para as soluções administradas por via oral e intraperitoneal foi utilizado um volume fixo de administração (0,1 mL/100 g) e as administradas por intratecal um volume de 10 μL . Para a administração intratecal, foi utilizada a técnica descrita por Papir-Kricheli et al. (1987), na qual cada animal permaneceu anestesiado por isoflurano e foi realizada tricotomia da região lombar. Com a

coluna arqueada, uma agulha hipodérmica nº 26 foi inserida no espaço subaracnóide da cauda equina medular, perfurando a região medial entre as vértebras L4 e L5 (± 1) num ângulo de aproximadamente 45°. Um reflexo caudal foi visualizado quando a agulha entrou no espaço subaracnóide indicando que a punção foi correta (MESTRE, 1994). Além disso, também foi utilizado a xilazina em salina 0,9 % (2 mg/kg, s.c.) como controle positivo para o teste de rota-rod.

4.2.3 Modelo de dor central - Teste de retirada da cauda (*tail flick*)

Para avaliar a latência de retirada de cauda foi utilizado o teste de retirada da cauda (*tail flick*) descrito por D`amour e Smith (1941) e modificado por Azami et al. (1982). Os animais, posicionados sobre o equipamento de analgesímetro, foram imobilizados cuidadosamente e a porção da cauda, entre 2 e 4 cm de sua extremidade, foi posicionada sobre um filamento de níquel-cromo que foi aquecido progressivamente (aproximadamente 9 °C/segundo) a partir da temperatura ambiente ($23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) até que temperatura nociva (53 °C) fosse atingida em aproximadamente 3 segundos. Para evitar dano tecidual, foi estabelecido um limiar de 6 segundos, sendo então o aquecimento automaticamente interrompido. Antes do tratamento, o limiar basal para o reflexo de retirada de cauda de todos os animais foi avaliado em três medidas consecutivas realizadas com intervalos de 5 minutos.

4.2.4 Modelo de dor neuropática - “*Chronic Constriction Injury*” (CCI)

Neste estudo, foi utilizado o modelo experimental de dor neuropática de constrição crônica do nervo ciático (CCI) que consiste na amarração deste nervo em quatro pontos (BENNET; XIE, 1988). Antes de iniciar a cirurgia, foi utilizado isoflurano a 2 % por via inalatória, para anestésiar os animais. O nervo ciático foi exposto na região abaixo do glúteo e posteriormente foi ligado com quatro amarrações com fio de seda separados por 2 mm e, para finalizar, foi realizada a sutura da musculatura e da pele sobre os nervos (Figura 19). Para prevenir a hipotermia, os animais foram mantidos sob aquecimento e, em seguida, foram recolocados no biotério de manutenção. Os animais do grupo SHAM (falso operado) apenas

passaram pela cirurgia, mas não tiveram a amarração do nervo ciático. Sete dias após o procedimento, os animais do grupo CCI foram testados e considerados hiperalgésicos quando o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos no teste de von Frey correspondeu a, pelo menos, 50 % do limiar de resposta basal.



Figura 19 - Etapas da cirurgia de CCI: Nervo ciático exposto, amarração em quatro pontos com fios de seda e sutura, respectivamente.

Fonte: Do autor.

4.2.5 Testes de nocicepção mecânica - Pressão crescente na pata (von Frey eletrônico)

Para avaliar o limiar mecânico de retirada da pata foi utilizado o teste de von Frey eletrônico, que analisa a hiperalgesia através de uma pressão crescente na pata dos ratos.

Os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico sobre uma tela de metal, para proporcionar acesso a pata, e foram aclimatizados por 20 minutos antes do teste. Para realização do teste, foi utilizado um analgesímetro eletrônico. Este aparelho é constituído de um contador digital de força o qual é expresso em gramas e um transdutor de pressão.

O contato do transdutor de pressão foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno, aplicado perpendicularmente, à superfície plantar da pata traseira dos animais (FARGHALY et al., 2016). Quando houve uma resposta caracterizada como sacudida (*flinch*) da pata, o estímulo foi interrompido e a intensidade registrada, sendo o limiar expresso em gramas e calculado pela média da triplicata.

4.2.6 Grupos experimentais

Os grupos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva (n = 6 por grupo) foram divididos segundo a Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva.

Grupo A <i>(tail flick)</i>	Grupo B <i>(CCI - von Frey)</i>	Grupo C <i>(SHAM - von Frey)</i>
Salina + Veículo	Salina + Veículo	Salina + Veículo
Salina + PQM 56	Salina + PQM 56	Salina + PQM 56
Salina + PQM 65	Salina + PQM 65	Salina + PQM 65
Salina + PQM 67	Salina + PQM 67	Salina + PQM 67
Salina + PQM 75	Salina + PQM 75	Salina + PQM 75
Salina + Morfina	Salina + Morfina	Salina + Morfina
Naloxona + Veículo	Naloxona + Veículo	Naloxona + Veículo
Naloxona + PQM 56	Naloxona + PQM 56	Naloxona + PQM 56
Naloxona + PQM 65	Naloxona + PQM 65	Naloxona + PQM 65
Naloxona + PQM 67	Naloxona + PQM 67	Naloxona + PQM 67
Naloxona + PQM 75	Naloxona + PQM 75	Naloxona + PQM 75
Naloxona + Morfina	Naloxona + Morfina	Naloxona + Morfina

Fonte: Do autor.

4.2.7 Delineamento de estudo

Para o teste de retirada da cauda foi avaliada uma medida basal (B1) e em seguida foram administradas as substâncias (100 μ mol/kg; v.o.), morfina (1 mg/kg; i.p.) ou veículo (v.o.), após 30 min foi administrada salina (i.t.) ou naloxona (0,3 μ g; i.t.) e em seguida foram avaliados os tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 horas após o pré-tratamento (Figura 20).

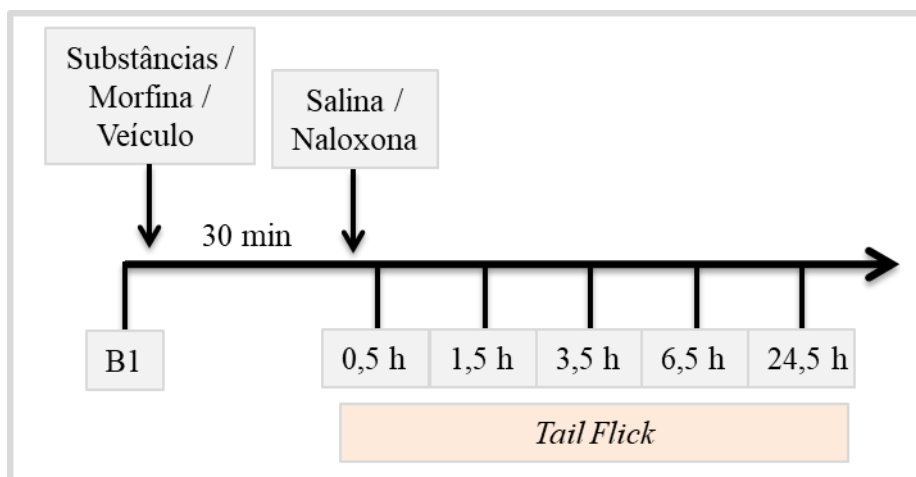


Figura 20 - Delineamento experimental para o modelo de dor central.

Fonte: Do autor.

Para avaliar o limiar nociceptivo mecânico no modelo de dor neuropática utilizando o teste de von Frey, fez-se uma medida basal (B1) seguida da cirurgia de CCI ou SHAM. Após 7 dias, foi avaliada uma medida basal (B2) e em seguida foram administradas as substâncias (100 $\mu\text{mol/kg}$; v.o.), morfina (1 mg/kg; i.p.) ou veículo (v.o.), após 30 min foi administrada salina (i.t.) ou naloxona (0,3 μg ; i.t.) e em seguida foram avaliados os tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 horas após o pré-tratamento (Figura 21).

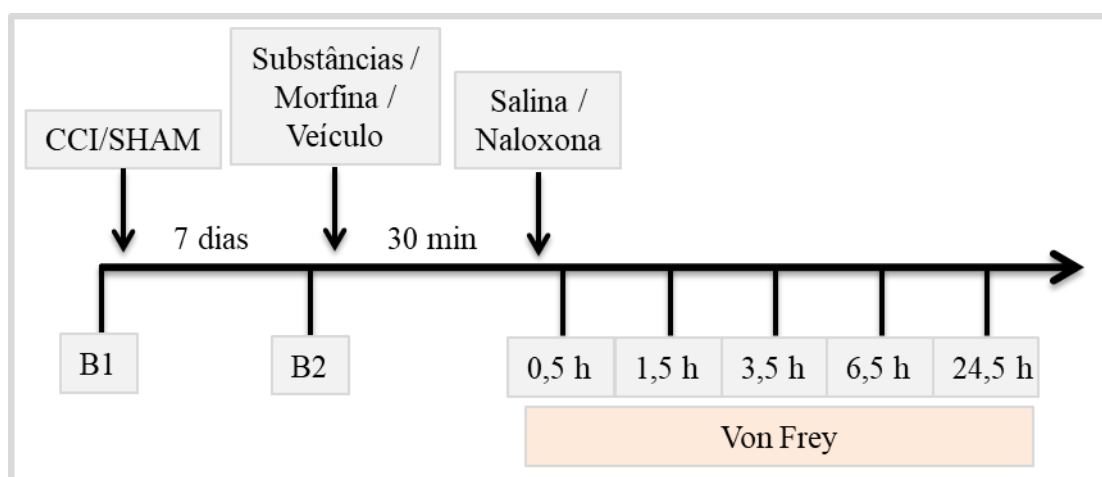


Figura 21 - Delineamento experimental para o modelo de dor neuropática.

Fonte: Do autor.

4.2.8 Teste de coordenação motora (*Rota-rod*)

A coordenação motora foi avaliada segundo Dunham e Miya (1957), como o tempo em que o animal passou caminhando no rota-rod, durante 2 minutos (tempo de corte). O

aparelho (Ugo Basile mod. 7600) utilizado consta de uma barra giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, com rotação constante (16 rpm). Camundongos Swiss (n = 6 por grupo) foram submetidos a três sessões de treinamento no dia que antecede o experimento. A coordenação motora foi avaliada imediatamente antes (basal), 30, 60 e 120 minutos após o tratamento oral com veículo, **PQM-56**, **PQM-75** e xilazina (2 mg/kg, s.c.; controle positivo) (DUNHAM; MIYA, 1957; SCHNEIDER et al., 2018).

4.2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 e foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Os resultados foram analisados por: Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparação de 2 fatores. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho, sendo primeiramente os resultados químicos e posteriormente os resultados farmacológicos.

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS-ALVO

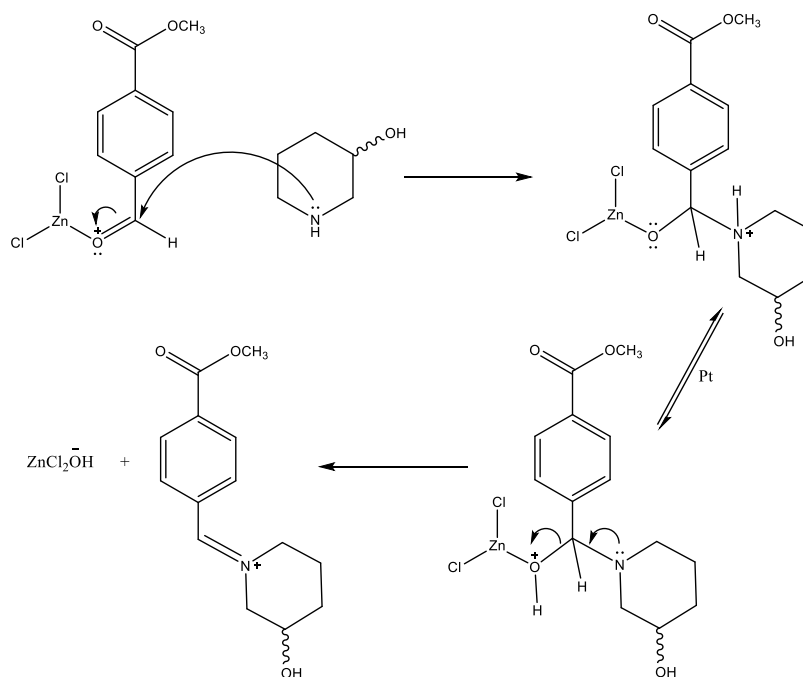
Neste tópico estão descritos e discutidos os resultados químicos da dissertação.

5.1.1 Síntese do 4-(3-hidroxipiperidin-1-ila)benzoato de metila (27)

A rota sintética é baseada no acoplamento inicial de 4-formilbenzoato de metila (**25**) e 3-hidroxipiperidina (**26**), gerando o 4-(3-hidroxipiperidin-1-ila)benzoato de metila (**27**), por meio de uma reação de aminação reductiva, com rendimento de 84 %.

Em uma primeira etapa, o $ZnCl_2$ age como um ácido de Lewis e ativa a carbonila do aldeído, deixando-a mais eletrofílica. Assim, ocorre o ataque nucleofílico da 3-hidroxipiperidina na carbonila mais reativa do composto. O intermediário quaternário formado sofre prototropismo seguido da formação do íon imínio (KIM et al., 1985). Em seguida, o íon imínio sofre uma redução por $NaBH_3CN$ levando a formação da *N*-benzilpiperidina. O $NaBH_3CN$ foi utilizado como agente redutor pois o grupo ciano é retirador de elétrons, assim, o $NaBH_3CN$ é menos reativo que o $NaBH_4$ e, portanto, ocorre uma redução seletiva da ligação $C=N$ na presença de aldeído e cetona em pH 5-7 (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971). É importante também o controle do pH (5-6) pois em pHs mais baixos, a amina deixa de ser nucleofílica devido a sua protonação. Uma proposta de mecanismo para a formação do composto (**27**) está representada na Figura 22.

Etapa I



Etapa II

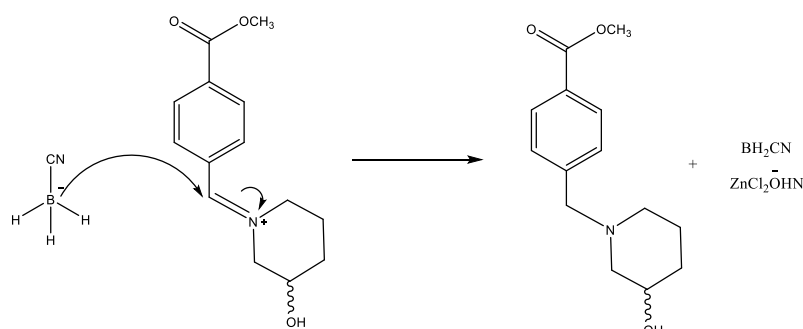


Figura 22 - Proposta de mecanismo para obtenção da *N*-benzilpiperidina (**27**) através de uma reação de aminação redutiva.

Fonte: Do autor.

O produto foi purificado em coluna cromatográfica e para sua análise estrutural foram gerados espectros no IV, espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e mapa de contorno HSQC.

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 23) foram observadas as bandas mais características referentes ao composto (**27**), como as bandas referentes à deformação axial de O-H em 3335 cm^{-1} , deformação axial de C=O de éster em 1712 cm^{-1} e as duas bandas em 1277 cm^{-1} e 1057 cm^{-1} , referentes à deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-O de éster. Entre 2937 cm^{-1} e 2788 cm^{-1} bandas características das deformações axiais de C-H sp^3 . A banda de deformação axial da ligação C-N está possivelmente sobreposta com a banda de deformação axial de C-O em 1277 cm^{-1} devido ao alargamento da mesma. Em 1438 cm^{-1} e em 1370 cm^{-1} bandas de deformação angular assimétrica e simétrica do C-H de metila. Também foram observadas as bandas entre 3035 cm^{-1} e 3005 cm^{-1} que foram

atribuídas à deformação axial de C-H sp^2 , assim como na região de 1606 cm^{-1} a 1574 cm^{-1} as bandas referentes à deformação axial de C=C de anel aromático.

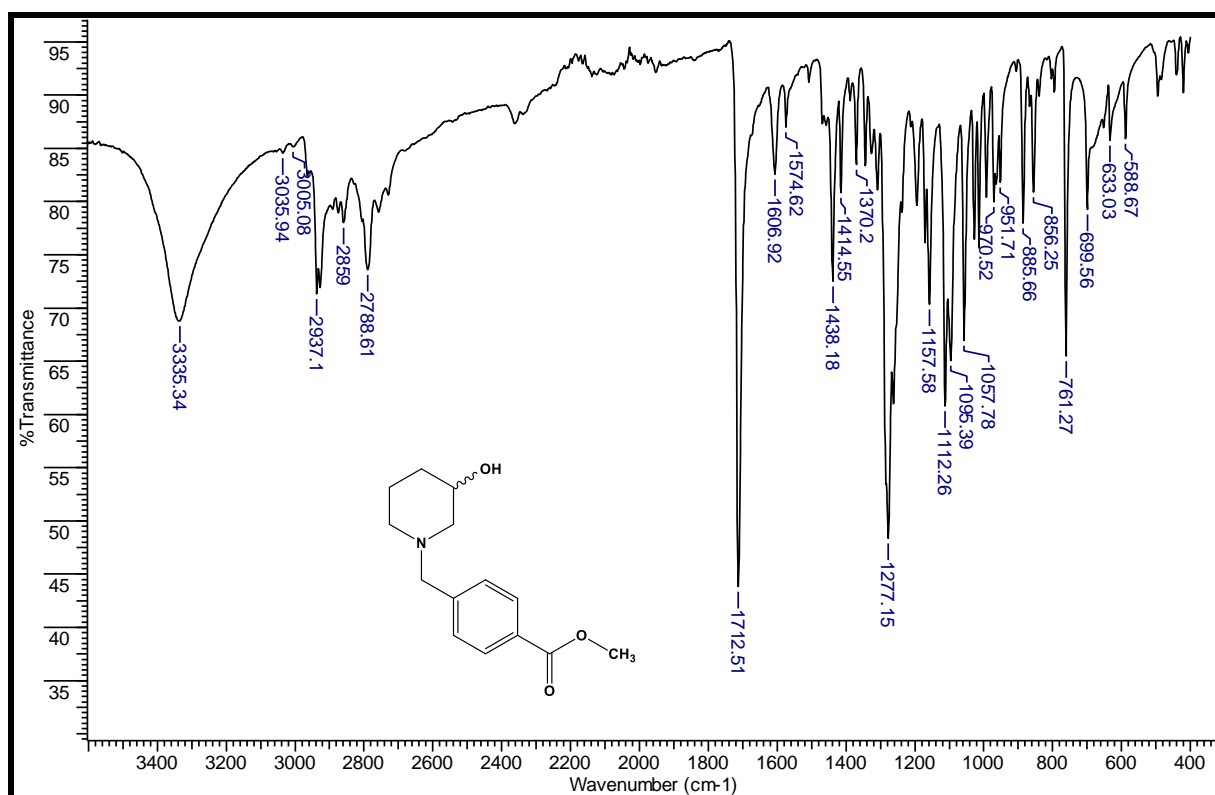


Figura 23 - Espectro de absorção na região do IV de (27) (ATR).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H do composto (27) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios do núcleo piperidínico entre 3,71 ppm e 1,17 ppm. O anel piperidínico pode ser representado por duas conformações em cadeira, que, em temperatura ambiente, se interconvertem rapidamente (Figura 24). Observou-se no espectro a separação dos sinais referentes aos hidrogênios em posição equatorial (He) e axial (Ha) devido a esta conformação e aos substituintes (OH) e (R_1) estarem presentes em ambientes químicos diferentes. Os átomos de hidrogênio em posição equatorial são geralmente mais desblindados que os axiais, pois estão em relação *syn* ao par de elétrons do nitrogênio segundo Rubiralta; Giralt e Diez (1991), aparecendo assim com um deslocamento maior.

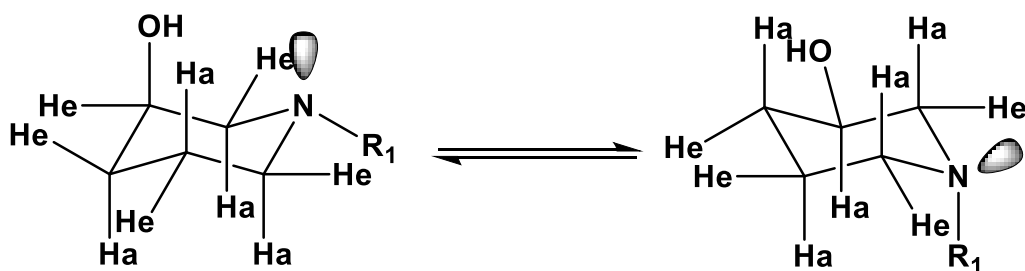


Figura 24 - Conformação em cadeira de sistemas piperidínicos com hidrogênios em posições axial e equatorial.

Fonte: Adaptado de Rubiralta; Giralt e Diez (1991).

Geralmente a regra (n+1) é utilizada para prever os padrões de separação dos sinais (acoplamento) no espectro de hidrogênio, porém, segundo Pavia et al. (2013) quando os hidrogênios presentes no mesmo carbono não são quimicamente equivalentes (diastereotópicos), essa regra deixa de ser aplicada, já que esses hidrogênios possuem deslocamento químico diferente, como no caso dos hidrogênios do núcleo piperidínico. Nestes casos, para explicar o padrão de separação no espectro, cada hidrogênio deve ser analisado de forma separada e também levar em consideração o acoplamento com cada um dos hidrogênios de forma independente, assim, o padrão de separação dos sinais para moléculas com átomos vizinhos não equivalentes é bem complexo (PAVIA et al., 2013). Átomos de hidrogênio de um mesmo carbono quando adjacentes a um centro estereogênico também podem ser diastereotópicos, podendo ocorrer assim a separação destes sinais (PAVIA et al., 2013). Observou-se que os hidrogênios metilênicos de toda a série, são diastereotópicos, e devido a ausência de outros hidrogênios vizinhos, era esperado uma separação dos sinais em dois dupletos, porém, como a diferença de deslocamento químico destes hidrogênios é muito pequena, não ocorreu a separação completa destes sinais, e observou-se, assim, a presença de um multipletto.

Baseado nestas observações foram atribuídos os sinais para o espectro de RMN de ^1H do composto (27) (Figura 25): Observou-se um simpleto referente aos hidrogênios metoxílicos H-18 em 3,89 ppm, também foram observados dois dupletos característicos dos hidrogênios do anel aromático em 7,44 ppm e 7,96 ppm referentes aos H-3, H-7 ($J_{3,7-4,6} = 8,4$) e H-4, H-6 ($J_{4,6-3,7} = 8,4$), respectivamente. Os hidrogênios metilênicos H-10 diastereotópicos foram observados como um multipletto entre 3,64-3,54 ppm. Já o multipletto observado entre 3,70-3,61 ppm é referente ao H-13. E também foram observados sete multipletos referentes aos hidrogênios do anel piperidínico na região entre 2,87 ppm e 1,17 ppm.

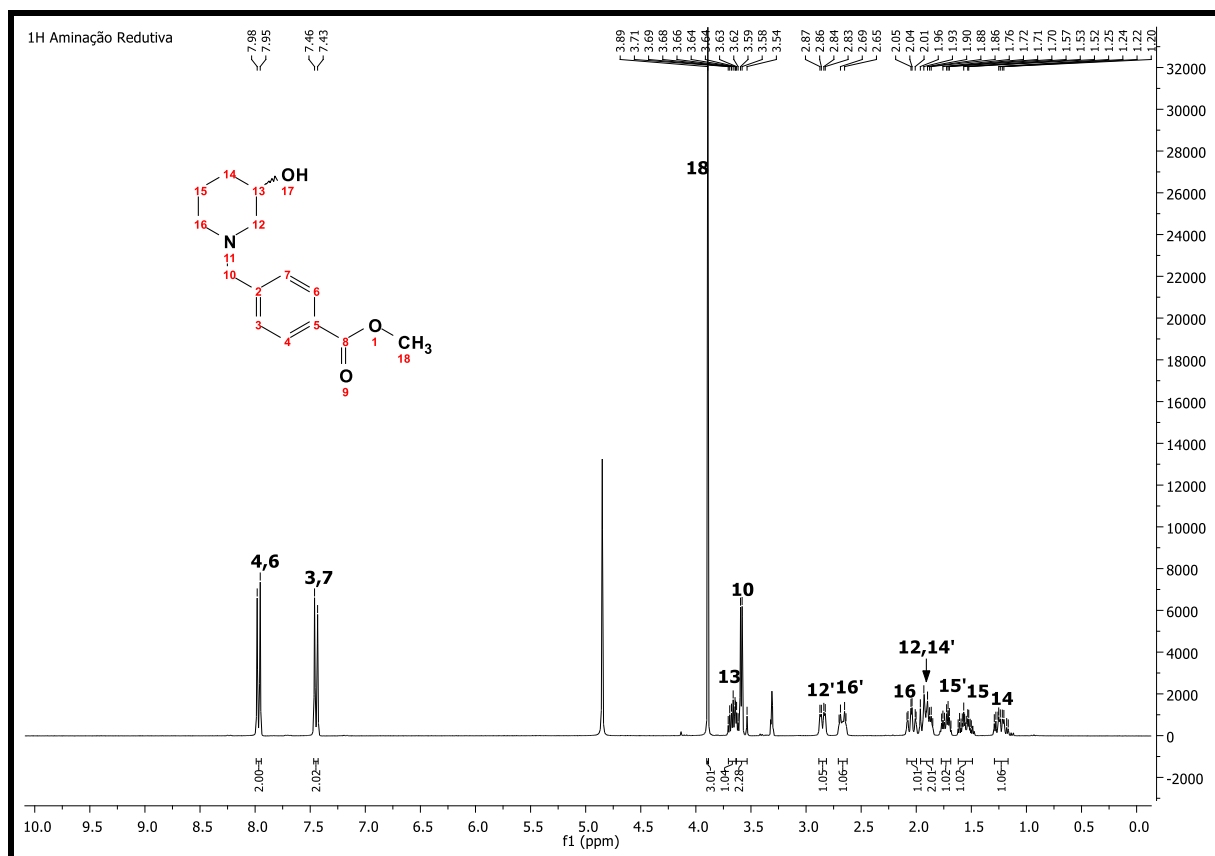


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do composto (27) (300 MHz, CD_3OD).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto (27) (Figura 26), se observou todos os sinais característicos. O sinal em 52,6 ppm refere-se ao carbono metoxílico C-18, os carbonos do núcleo aromático C-3, C-4, C-5, C-6 e C-7 estão representados entre 130,5-130,3 ppm e o C-2 em 144,7 ppm. Os carbonos piperidínicos C-12, C-13, C-14, C-15 e C-16 estão representados entre 67,9-24,0 ppm. Já o sinal em 63,5 ppm refere-se ao C-10, e em 168,4 ppm ao C-8, respectivamente. Todos os dados foram comparados com os dados mais recentes de referência do PeQuiM e se encontram na Tabela 3 (Apêndice A) (OLIVEIRA, 2017).

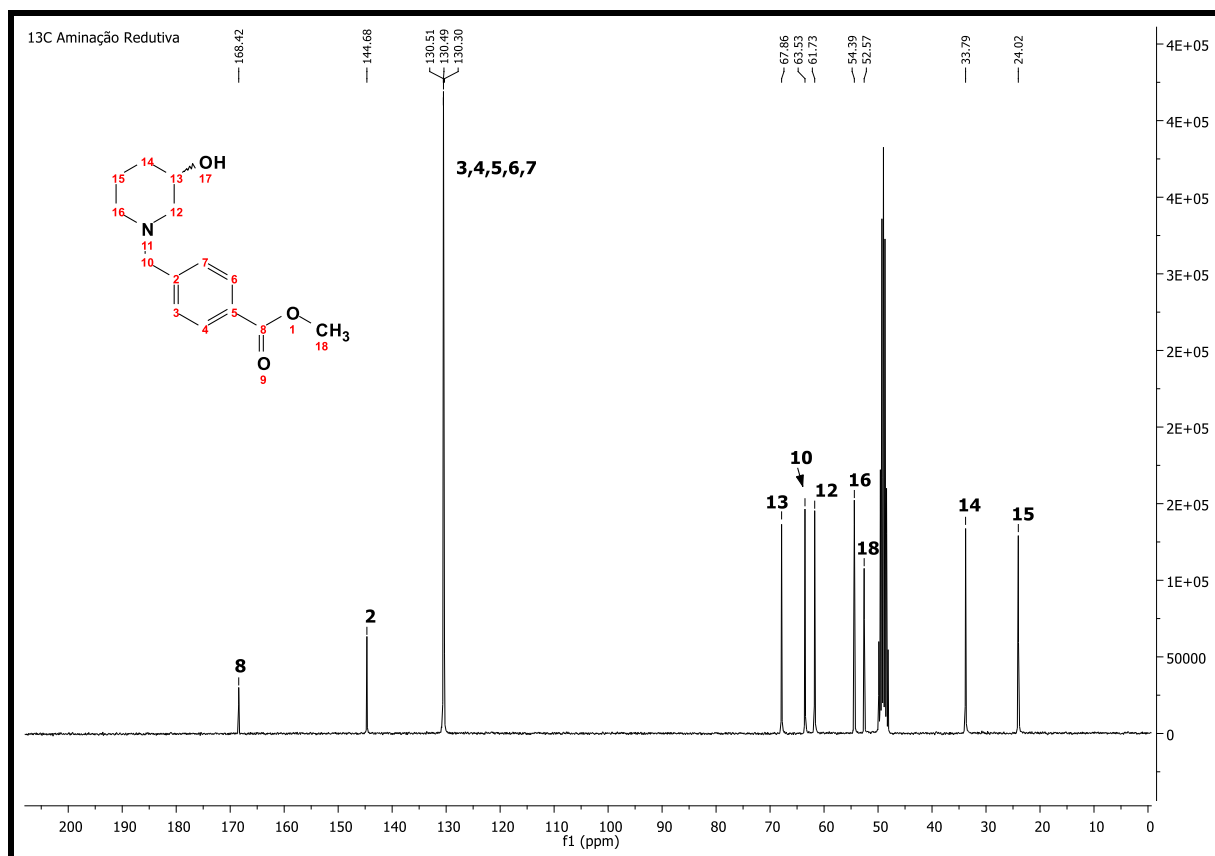


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto (27) (75 MHz, CD_3OD).

Fonte: Do autor.

No mapa de contorno HSQC (Figura 27) é possível observar a correlação entre os sinais dos hidrogênios e carbonos. Observou-se a correlação dos sinais dos hidrogênios e carbonos do núcleo aromático em 7,96 ppm H-4 e H-6, 7,44 ppm H-3 e H-7 e 130,5 ppm C-3, C-4, C-6 e C-7. Para melhor atribuição, fez-se uma ampliação da região dos sinais restantes (Figura 28): Os hidrogênios H-18 em 3,89 ppm estão correlacionados ao carbono C-18 em 52,6 ppm, já o H-13 entre 3,70-3,61 ppm correlaciona com C-13 em 67,9 ppm, e os hidrogênios metilênicos H-10 em 3,61 ppm e 3,56 ppm correlacionam com o C-10 em 63,5 ppm. Os hidrogênios H-12' (equatorial) entre 2,87-2,83 ppm e H-12 (axial) entre 1,96-1,86 ppm se correlacionam com o C-12 em 61,7 ppm. Observou-se também os hidrogênios H-16' entre 2,70-2,64 ppm e H-16 entre 2,08-2,00 ppm que se correlacionam com o C-16 em 54,4 ppm. Já os hidrogênios H-14' entre 1,96-1,86 ppm e H-14 entre 1,29-1,17 ppm se correlacionam com o C-14 em 33,8 ppm e os hidrogênios H-15' entre 1,77-1,69 ppm e H-15 entre 1,62-1,49 ppm estão correlacionados com o C-15 em 24,0 ppm.

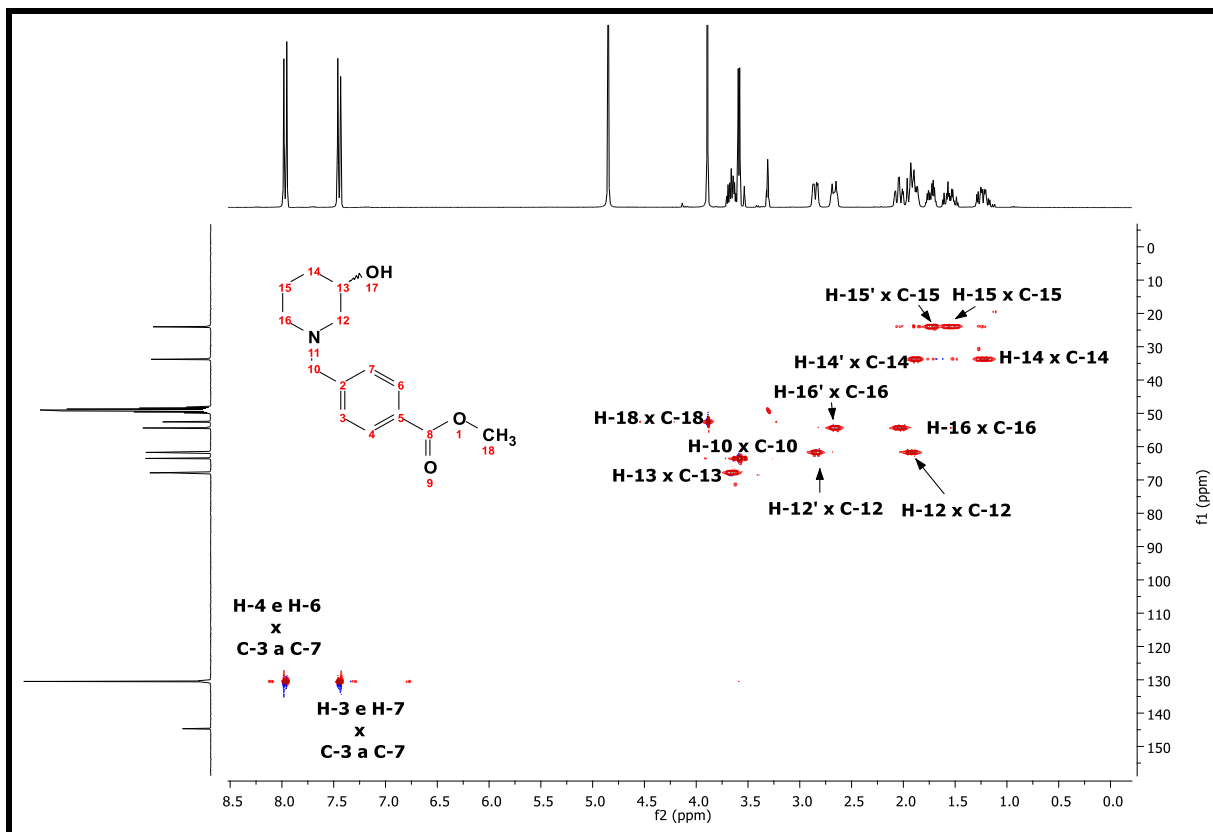


Figura 27 - Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CD₃OD) do composto (27).

Fonte: Do autor.

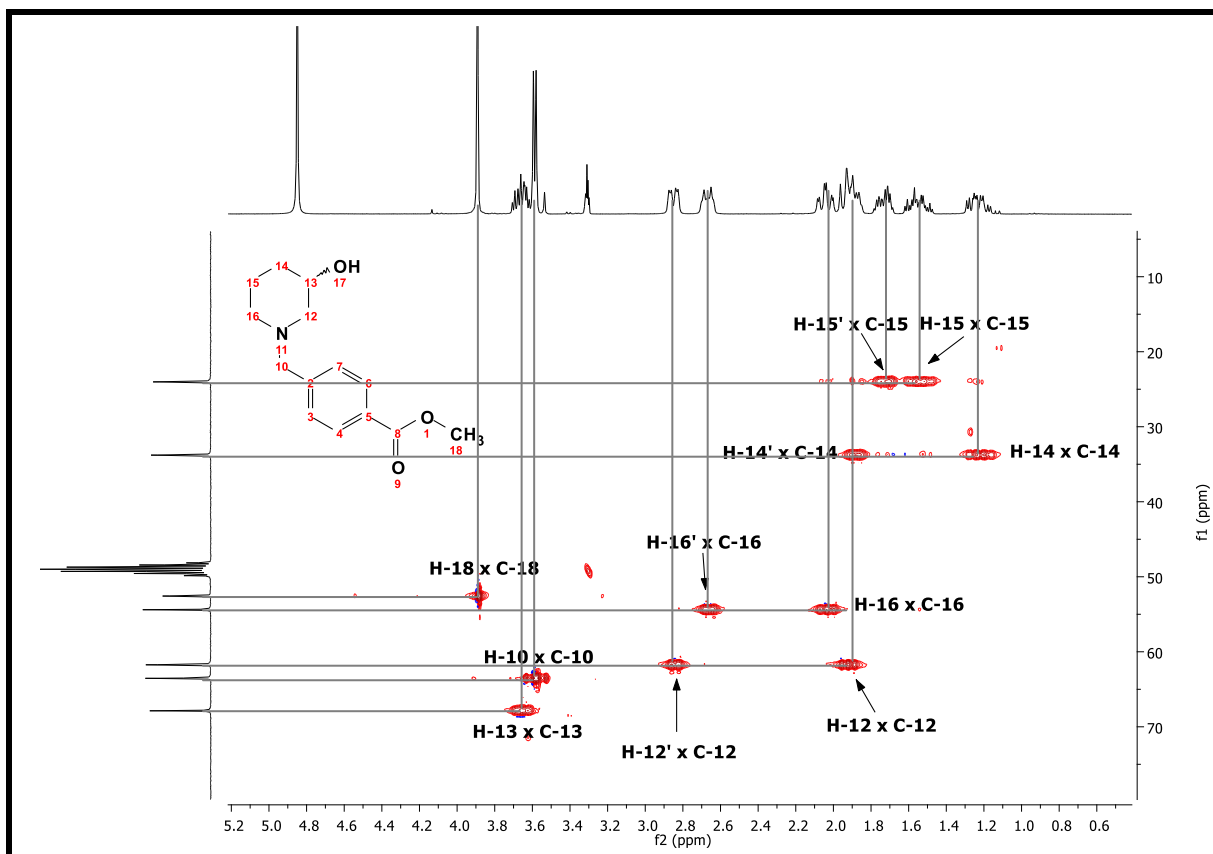


Figura 28 - Ampliação do mapa de contorno HSQC (300 MHz, CD₃OD) do composto (27).

Fonte: Do autor.

5.1.2 Síntese da 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno)benzoidrazida (**28**)

A segunda etapa da rota sintética proposta foi uma reação de hidrazinólise do éster (**27**) com monohidrato de hidrazina para a obtenção da hidrazida (**28**), com rendimento de 80 %. Nesta reação, o éster *N*-benzilpiperidínico (**27**) sofre uma adição nucleofílica de hidrazina à carbonila seguida da abstração de um próton da subunidade NH_2NH_2 pelo par de elétrons do oxigênio. Este intermediário sofre prototropismo seguido da eliminação de metanol e reestabelecimento da carbonila, obtendo-se a hidrazida (**28**). Uma proposta de mecanismo para a formação do composto (**28**) está representada na Figura 29.

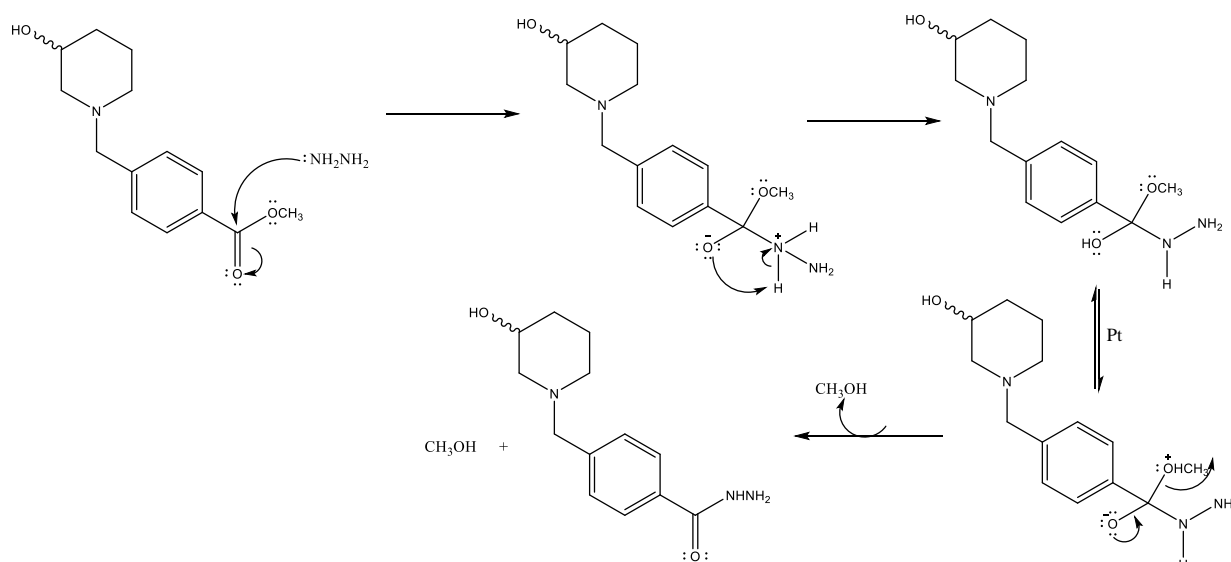


Figura 29 - Proposta de mecanismo para obtenção da hidrazida (**28**) através de uma reação de hidrazinólise. Fonte: Do autor.

O produto foi purificado em coluna cromatográfica e para sua análise estrutural foram gerados espectros no IV e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 30) foram observadas as bandas mais características referentes ao composto (**28**), como as bandas referentes a deformação axial O-H em 3189 cm^{-1} e deformação axial de NH_2 em 3326 cm^{-1} e 3272 cm^{-1} . Deformação angular de N-H em 1531 cm^{-1} , deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ de amida em 1623 cm^{-1} , e deformação axial da ligação C-N em 1228 cm^{-1} . Entre 2943 cm^{-1} e 2803 cm^{-1} bandas da deformação axial de C-H sp^3 . Também foram observadas as bandas entre 3062 cm^{-1} e 3021 cm^{-1} que foram atribuídas à deformação axial de C-H sp^2 , assim como na região de 1573 cm^{-1}

e 1504 cm^{-1} as bandas referentes à deformação axial de C=C de anel aromático. Já em 2360 cm^{-1} e 2341 cm^{-1} , bandas características da presença de CO_2 no ambiente.

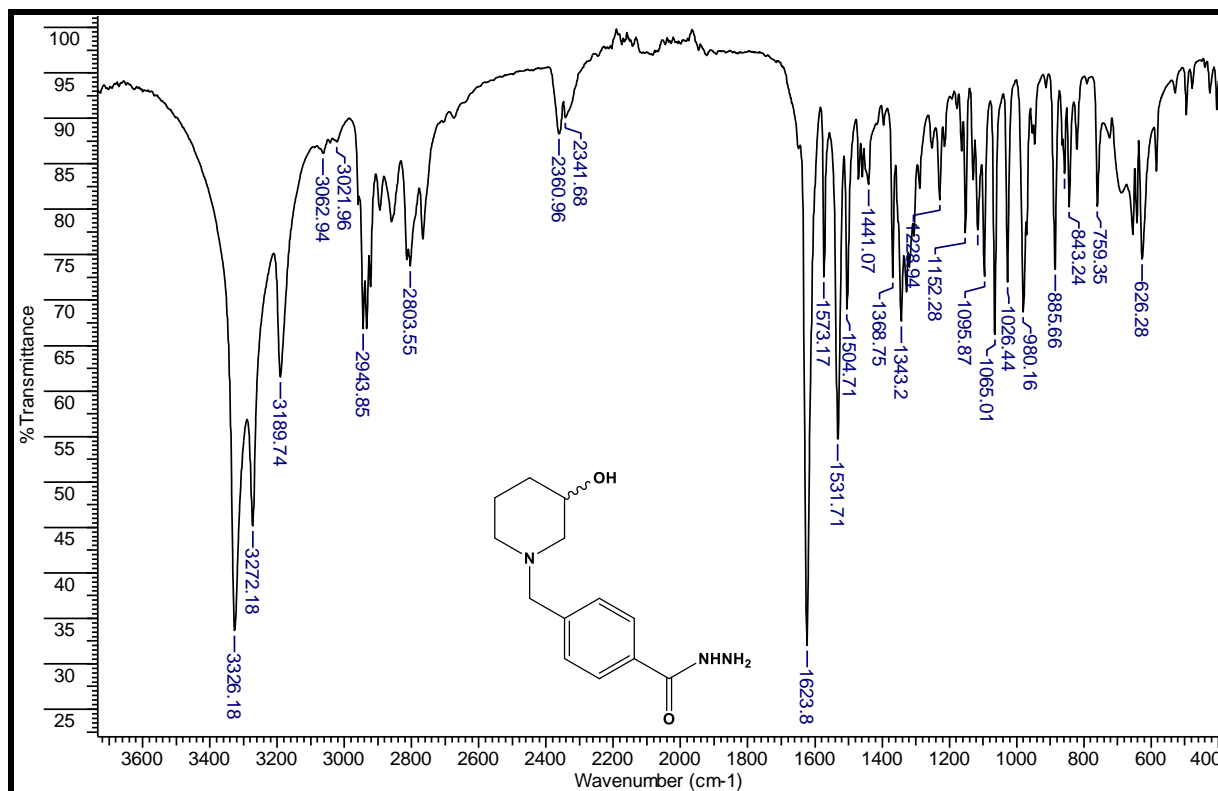


Figura 30 - Espectro de absorção na região do IV de (28) (ATR).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H do composto (28) (Figura 31), se observou a ausência de um simpleto em 3,89 ppm dos hidrogênios metoxílicos característicos do material de partida. Foi observada a presença de dois dupletos em: 7,75 ppm referente aos H-4 e H-6 ($J_{4,6-3,7} = 8,4$), e em 7,43 ppm referentes aos H-3 e H-7 ($J_{3,7-4,6} = 8,4$). O multipletto observado entre 3,63-3,54 ppm é referente ao H-10 e o multipletto entre 3,71-3,63 ppm ao H-13. Os demais hidrogênios pertencentes ao núcleo piperidínico estão presentes como 7 multipletos entre 2,89-1,17 ppm.

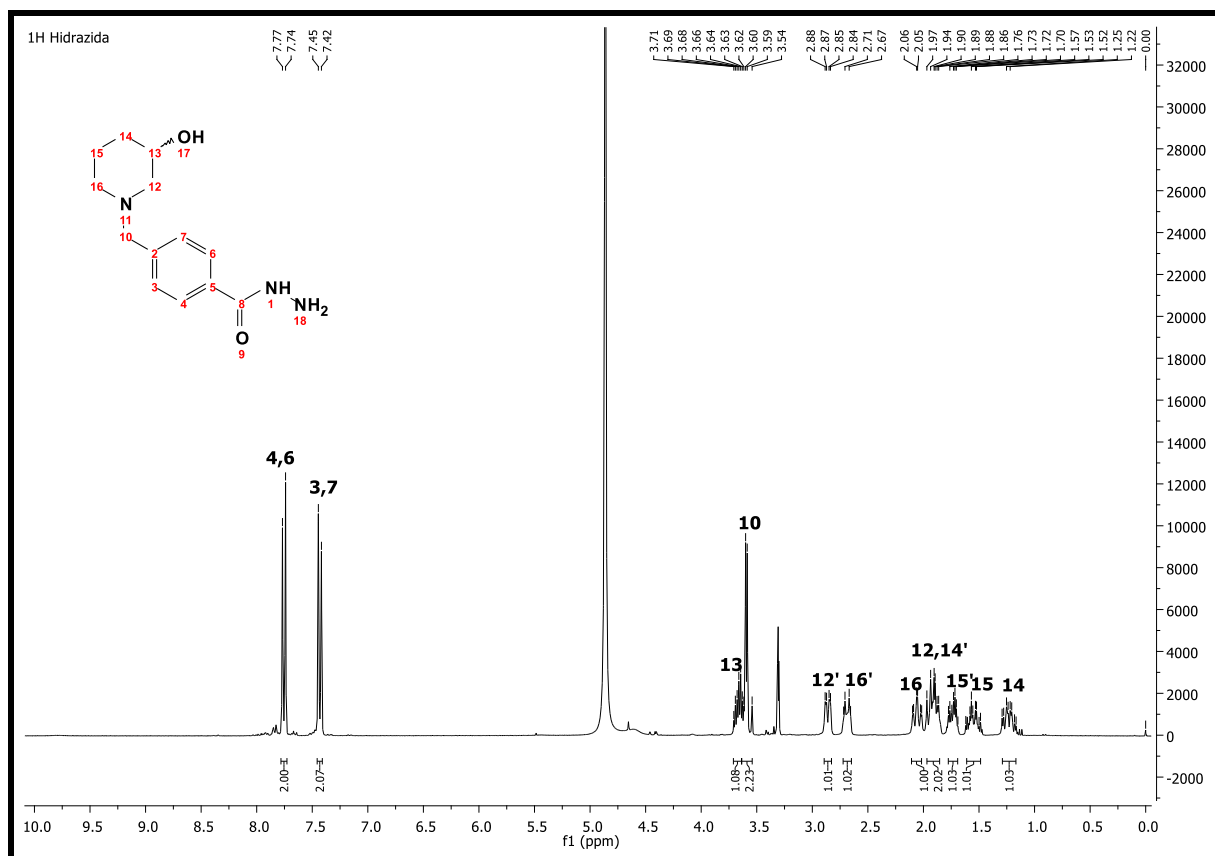


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H do composto (**28**) (300 MHz, CD_3OD).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 32), se observou todos os sinais característicos do produto (**28**) assim como a ausência do simpleto em 52,6 ppm característico do material de partida (**27**). Os sinais dos carbonos do núcleo aromático C-3 e C-7 estão representados em 128,2 ppm, C-4 e C-6 em 130,7 ppm, C-5 em 133,2 ppm e C-2 em 142,8 ppm. Já os carbonos piperídínicos C-12, C-13, C-14, C-15 e C-16 estão representados entre 67,8-23,9 ppm. Já o sinal em 63,5 ppm refere-se ao C-10, e em 169,5 ppm ao C-8, respectivamente. Todos os dados foram comparados com os dados de referência do PeQuiM e se encontram na Tabela 4 (Apêndice A) (OLIVEIRA, 2017).

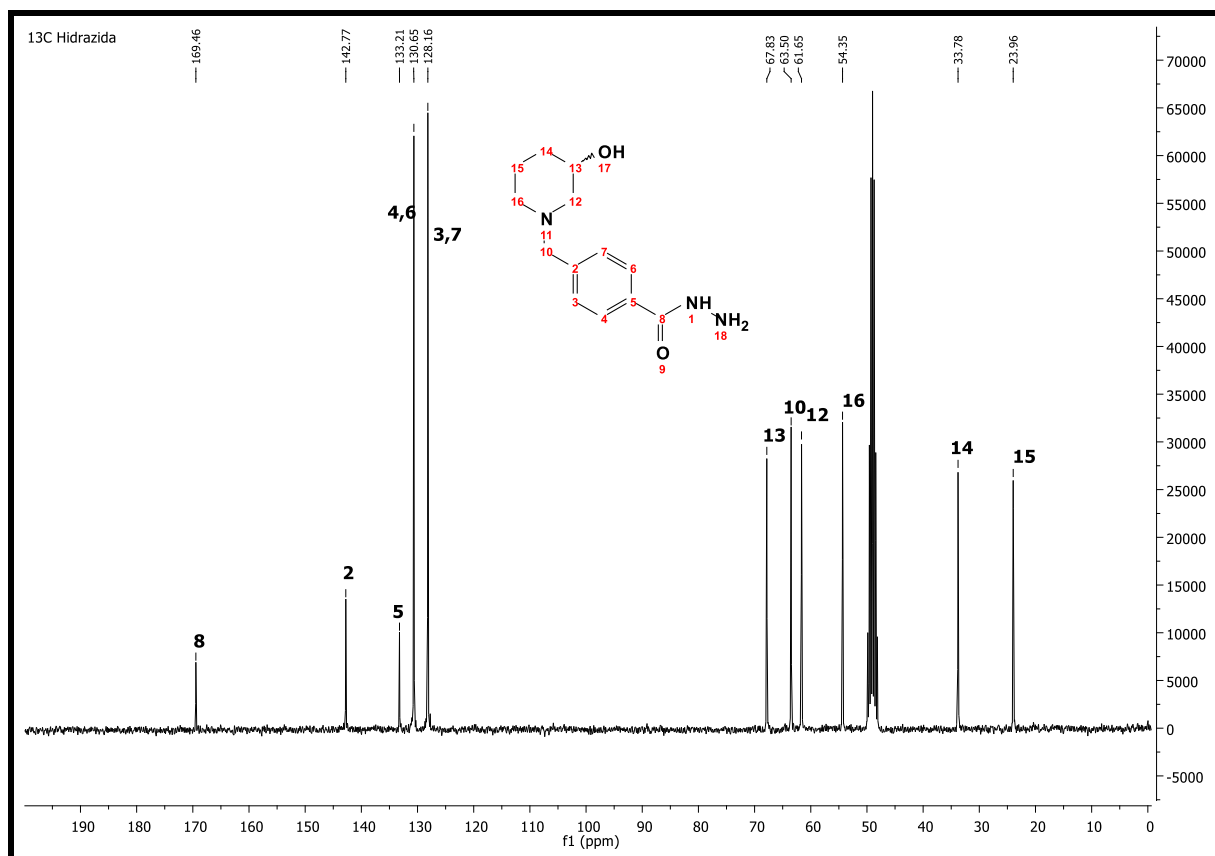


Figura 32 - Espectro de RMN de ¹³C do composto (28) (75 MHz, CD₃OD).
Fonte: Do autor.

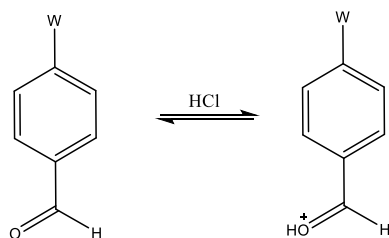
5.1.3 Síntese do *N*-(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno)benzoidrazida: PQM-56 (30a)

A última etapa da rota sintética consistiu no acoplamento da hidrazida (28) com os benzaldeídos substituídos (29) para a obtenção dos produtos finais PQM-56 (30a), PQM-65 (30b), PQM-67 (30c) e PQM-75 (30d).

O mecanismo se inicia pela protonação do oxigênio da carbonila dos respectivos benzaldeídos e assim deixando a carbonila mais eletrofílica. Em uma segunda etapa, ocorre um ataque nucleofílico feito pela amina primária da hidrazida à carbonila do benzaldeído, levando a formação de um intermediário tetraédrico *N*-protonado. Neste intermediário, ocorre a transferência de um próton do nitrogênio para o oxigênio e a formação da dupla ligação (C=N), durante a abstração de um próton por uma base contida no meio e eliminação de uma molécula de água, obtendo assim as *N*-acilidrazonas da série-alvo.

Uma proposta de mecanismo para a formação dos compostos **(30a-d)** está representada na Figura 33.

Etapa I



Etapa II

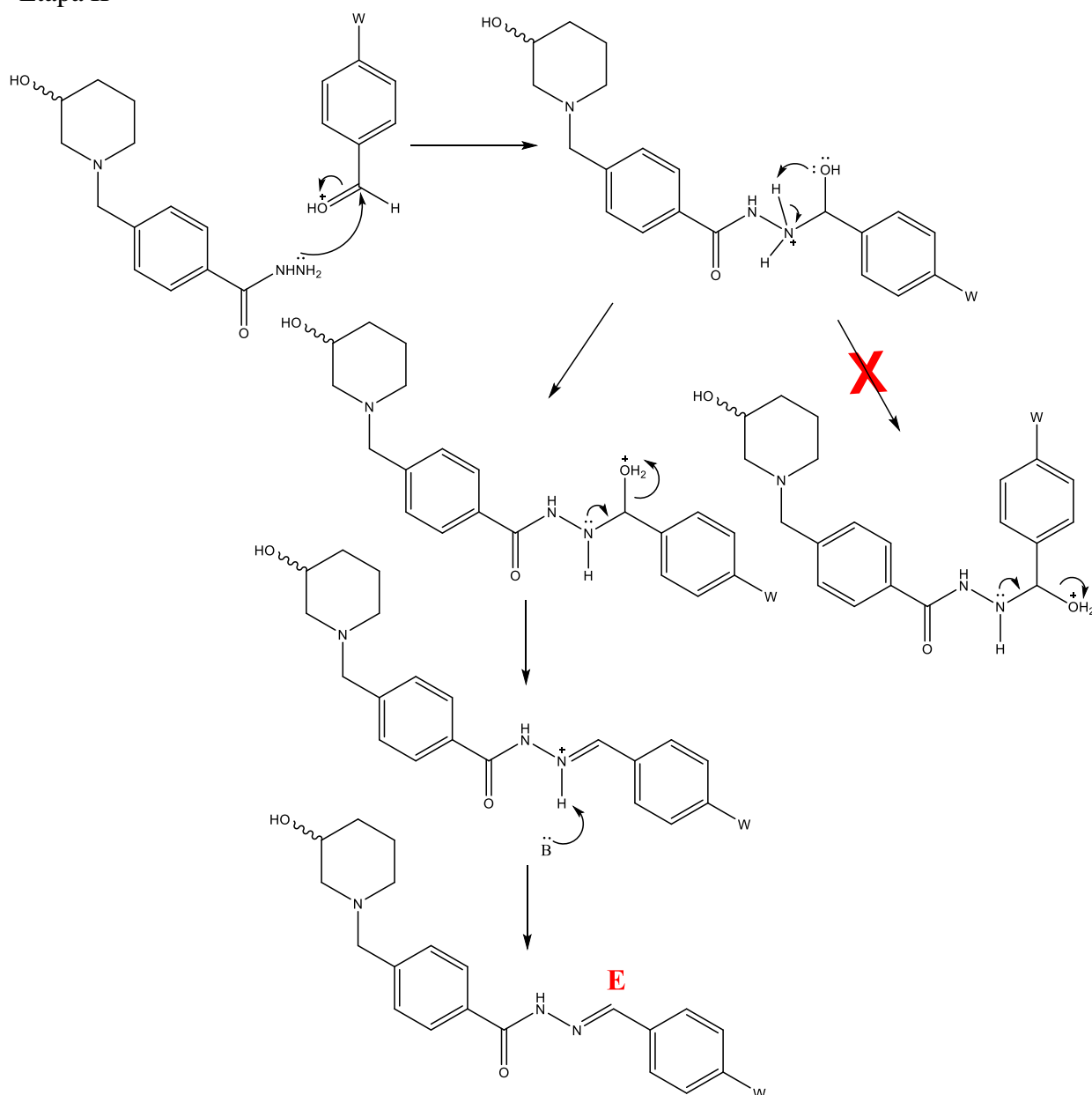


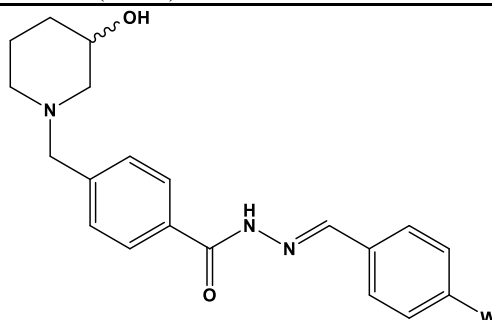
Figura 33 - Proposta de mecanismo para obtenção das *N*-acilidrazonas **PQM-56 (30a)**, **PQM-65 (30b)**, **PQM-67 (30c)** e **PQM-75 (30d)**.

Fonte: Do autor.

Ao utilizar hidrazidas primárias como nucleófilos na reação com compostos carbonilados, dois íons imínio (isômeros geométricos) podem ser formados. Quando se tem a neutralização do íon imínio, pela desprotonação do nitrogênio, pode haver a formação de *N*-acilidrazonas (*E* e *Z*), porém, segundo Palla et al. (1986) ocorre preferencialmente a formação do diastereoisômero *E* em reações de condensação de hidrazidas com aldeídos catalisadas com ácido, pois este é mais estável já que os grupos volumosos ficam mais afastados e assim é termodinamicamente mais favorável. Além disso, ao analisar os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de todas as hidrazonas desta série, foi possível observar a presença de um único sinal simples referente ao hidrogênio imínico e um sinal referente ao carbono imínico, assim, o deslocamento químico destes sinais corroboram com a afirmação da presença do diastereoisômero *E*.

Na Tabela 2, estão descritos os códigos do PeQuiM, os substituintes e algumas propriedades como F.M., M.M., aspecto físico, faixa de fusão e rendimento das respectivas *N*-acilidrazonas da série.

Tabela 2: Dados das *N*-acilidrazonas-alvo (30a-d).



Código	Substituinte	FM	MM	Aspecto físico	Rendimento Global	Faixa de Fusão (°C)
PQM-56 (30a)	Cl	C ₂₀ H ₂₂ ClN ₃ O ₂	371,1401	Sólido branco	62 %	212-215
PQM-65 (30b)	OCH ₃	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₃	367,1896	Sólido cinza	40 %	188-190
PQM-67 (30c)	F	C ₂₀ H ₂₂ FN ₃ O ₂	355,1696	Sólido branco	46 %	216-218
PQM-75 (30d)	<i>N</i> -Piperidinila	C ₂₅ H ₃₂ N ₄ O ₂	420,2525	Sólido amarelo	50 %	190-195

Fonte: do autor.

As respectivas *N*-acilidrazonas da série foram purificadas por recristalização e/ou coluna cromatográfica e para sua análise estrutural foram gerados espectros no IV e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . O primeiro composto da série é **PQM-56 (30a)**, o qual tem sua análise estrutural descrita a seguir e, para os demais compostos, segue a análise nos tópicos seguintes.

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 34) foram observadas as bandas características referentes ao composto (**30a**), como a banda referente a deformação axial N-H entre 3310 cm^{-1} e 3171 cm^{-1} sendo esta sobreposta pela deformação axial de O-H. Já a banda de deformação angular de N-H é observada em 1551 cm^{-1} . Deformação axial de C=O de hidrazida em 1645 cm^{-1} , deformação axial da ligação C-O de álcool em 1065 cm^{-1} , deformação axial de C-N em 1287 cm^{-1} , e a banda de deformação axial de C-Cl em 1087 cm^{-1} . Na região de 2933 cm^{-1} banda características de deformação axial de C-H sp^3 e na região de 3029 cm^{-1} bandas características da deformação axial de C-H sp^2 de anel aromático. Também foram observadas bandas características de deformação axial de C=C de anel aromático entre 1596 cm^{-1} e 1486 cm^{-1} .

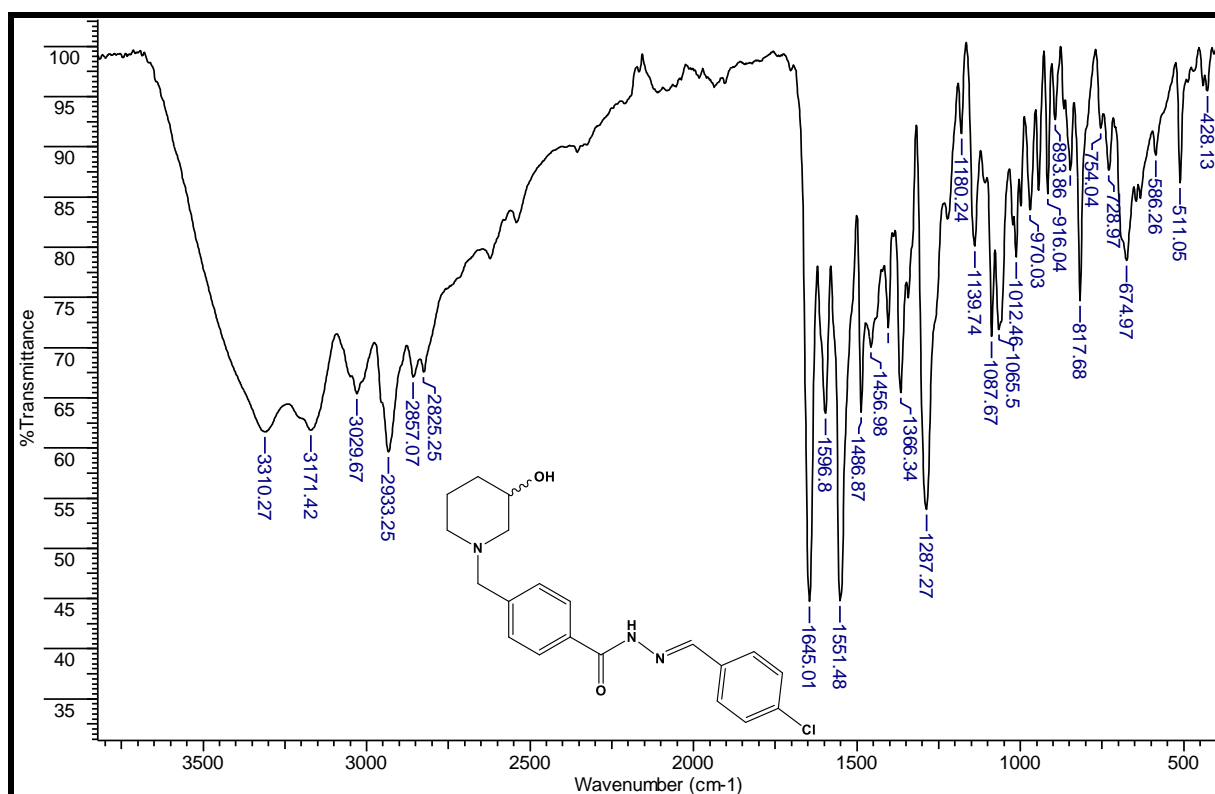


Figura 34 - Espectro de absorção na região do IV de (**30a**) (ATR).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H do composto (**30a**) (Figura 35) feito em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, os sinais referentes ao H-10 e H-13 não apareceram, pois a água do DMSO deuterado aparece na

mesma região, assim, fez-se um novo espectro de RMN de ^1H em CD_3OD para confirmar a presença destes sinais.

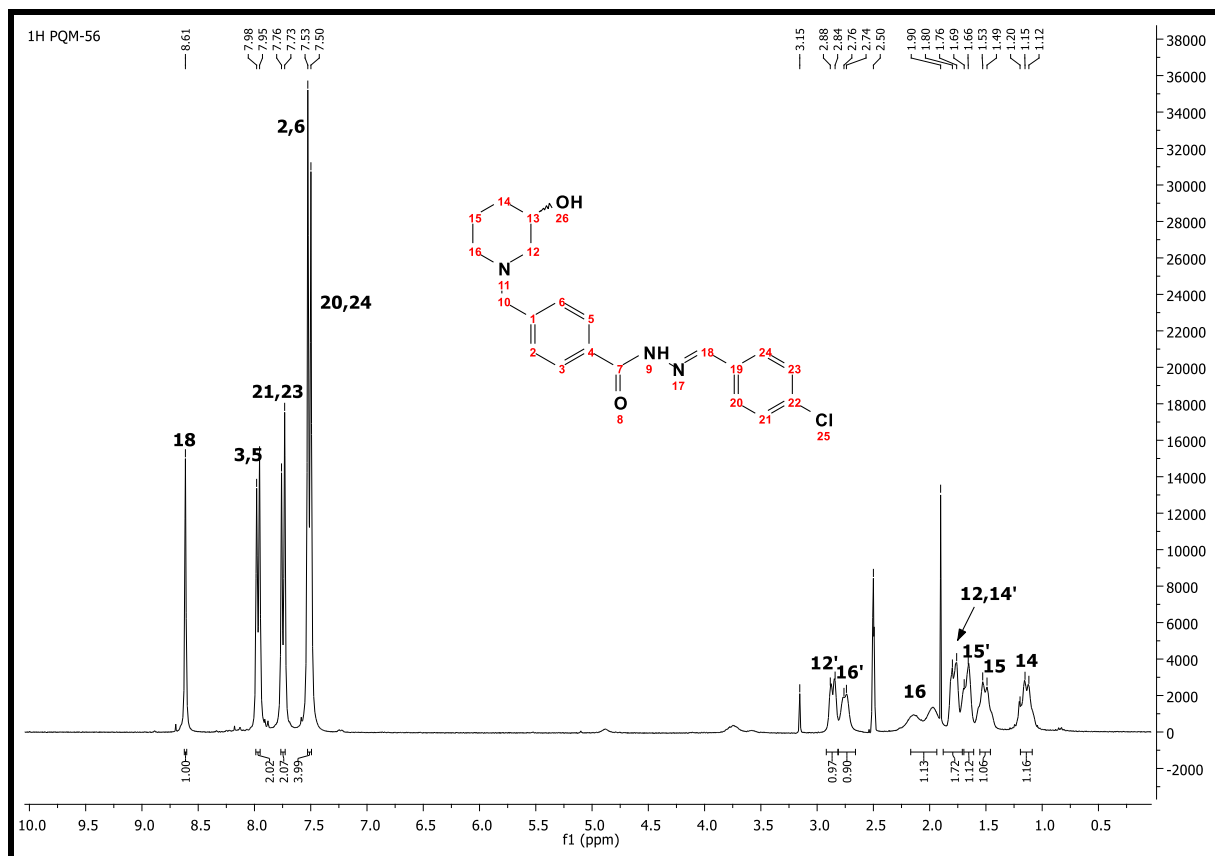


Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H do composto (**30a**) (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).
Fonte: Do autor.

No novo espectro de ^1H feito em CD_3OD (Figura 36) do composto (**30a**), se observou todos os sinais característicos do composto. O hidrogênio H-18 que confirma a formação do produto foi observado como um simpleto em 8,45 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos foram observados entre 8,04-7,45 ppm como quatro dupletos ($J_{3,5-2,6} = 8,1$; $J_{2,6-3,5} = 8,1$; $J_{21,23-20,24} = 8,4$; $J_{20,24-21,23} = 8,1$), já os multipletos observados entre 4,12-3,85 ppm referem-se aos H-10 e H-13. Também foram observados os sinais na faixa 3,11-1,16 ppm referentes aos hidrogênios do núcleo piperidínico.

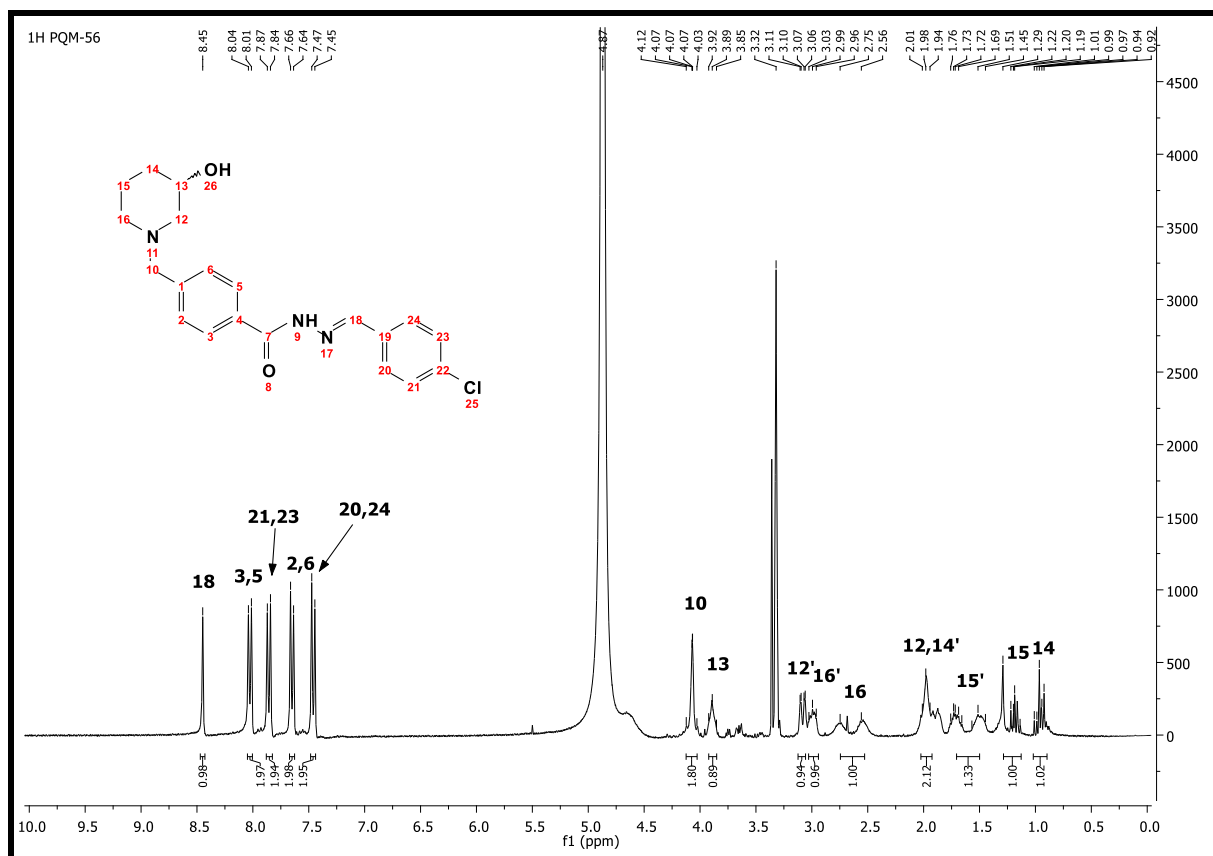


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H do composto (30a) (300 MHz, CD_3OD).
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37), se observou todos os sinais característicos do composto (30a). O sinal em 61,3 ppm é referente ao C-10 e em 65,6 ppm refere-se ao C-13. Os demais sinais na faixa de 60,1-22,6 ppm são referentes ao núcleo piperidínico. O sinal em 163,5 ppm é referente ao C-7 e em 147,0 ppm ao C-18. Já os sinais dos carbonos dos anéis aromáticos estão na faixa de 134,9-128,3 ppm. Todos os dados foram comparados com os dados de referência do PeQuiM e se encontram na Tabela 5 (Apêndice A) (OLIVEIRA, 2017).

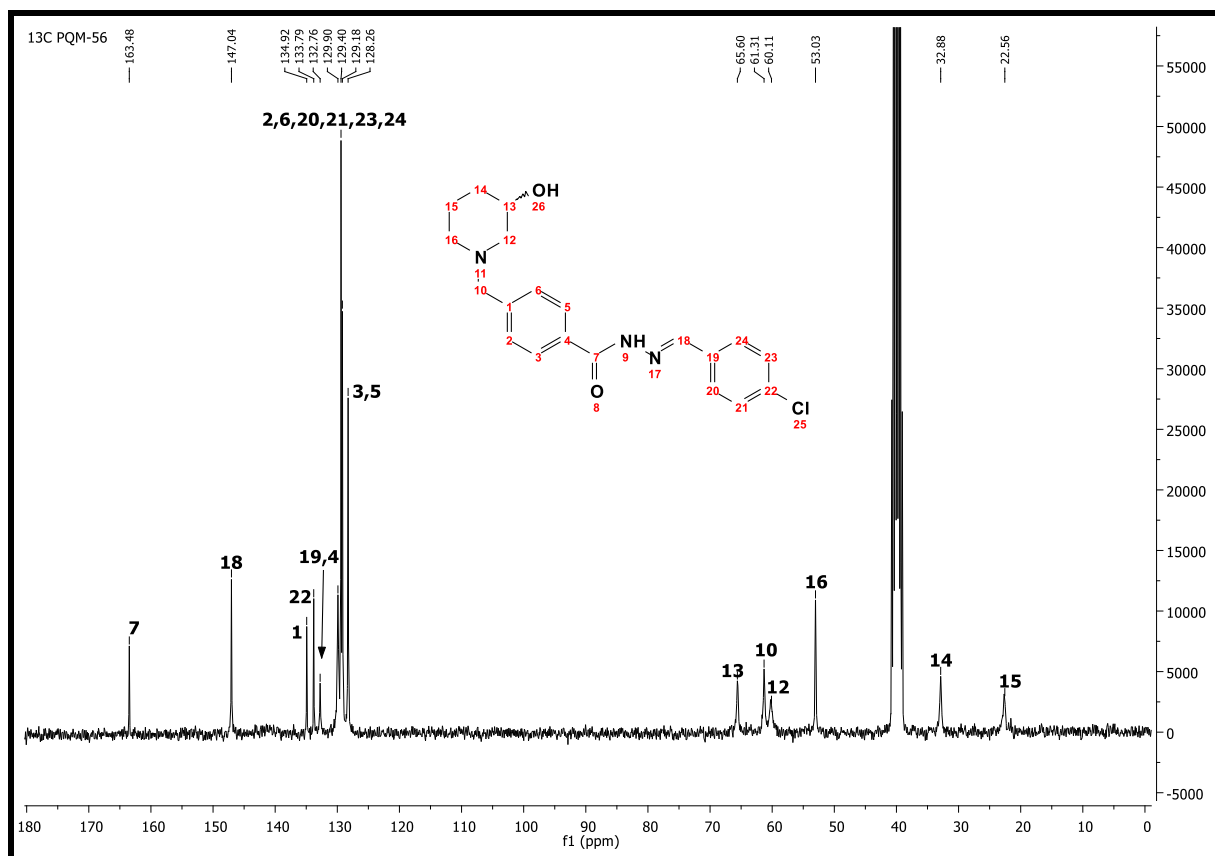


Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto (**30a**) (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).
 Fonte: Do autor.

Para os produtos finais da série, também foram obtidos os espectros de massas de alta resolução. No espectro de massas do composto **PQM-56 (30a)** (Figura 38) foi identificado o pico-íon-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação massa/carga (m/z) de 372,1489, sendo o calculado de 372,1478.

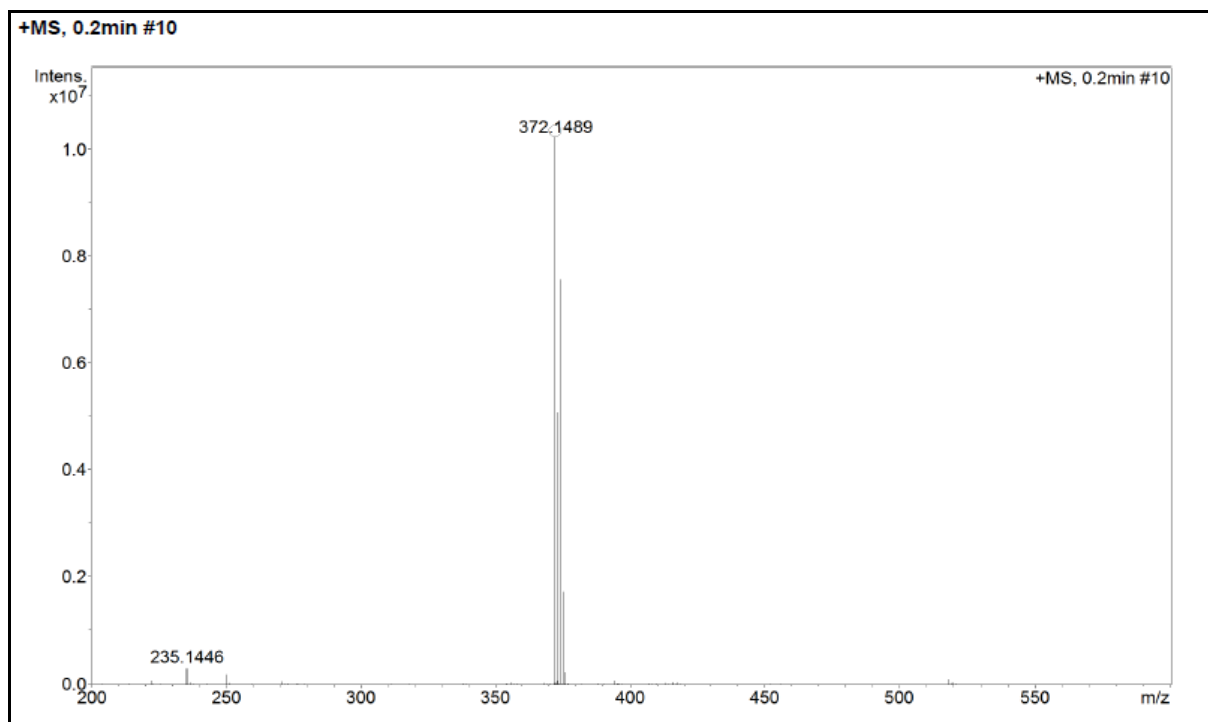


Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução do composto **PQM-56 (30a)** (ESI-MS).
Fonte: do autor.

5.1.4 Síntese do *N*-(4-metoxibenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno)benzoidrazida: **PQM-65 (30b)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 39) foram observadas as bandas mais características referentes ao composto (**30b**), como a banda referente a deformação axial N-H entre 3322 cm^{-1} e 3208 cm^{-1} sendo esta sobreposta pela deformação axial de O-H. Já a banda de deformação angular de N-H em 1556 cm^{-1} , deformação axial de C=O de hidrazida em 1651 cm^{-1} , deformação axial da ligação C-O de álcool em 1024 cm^{-1} , e a deformação axial de C-N em 1248 cm^{-1} . Na região de 2933 cm^{-1} banda características da deformação axial de C-H sp^3 e na região entre 3031 cm^{-1} e 3004 cm^{-1} bandas características da deformação axial de C-H sp^2 de anel aromático. Também foram observadas bandas características de deformação axial de C=C de anel aromático entre 1602 cm^{-1} e 1506 cm^{-1} . Já em 1455 cm^{-1} e em 1366 cm^{-1} bandas de deformação angular assimétrica e simétrica do C-H da metila.

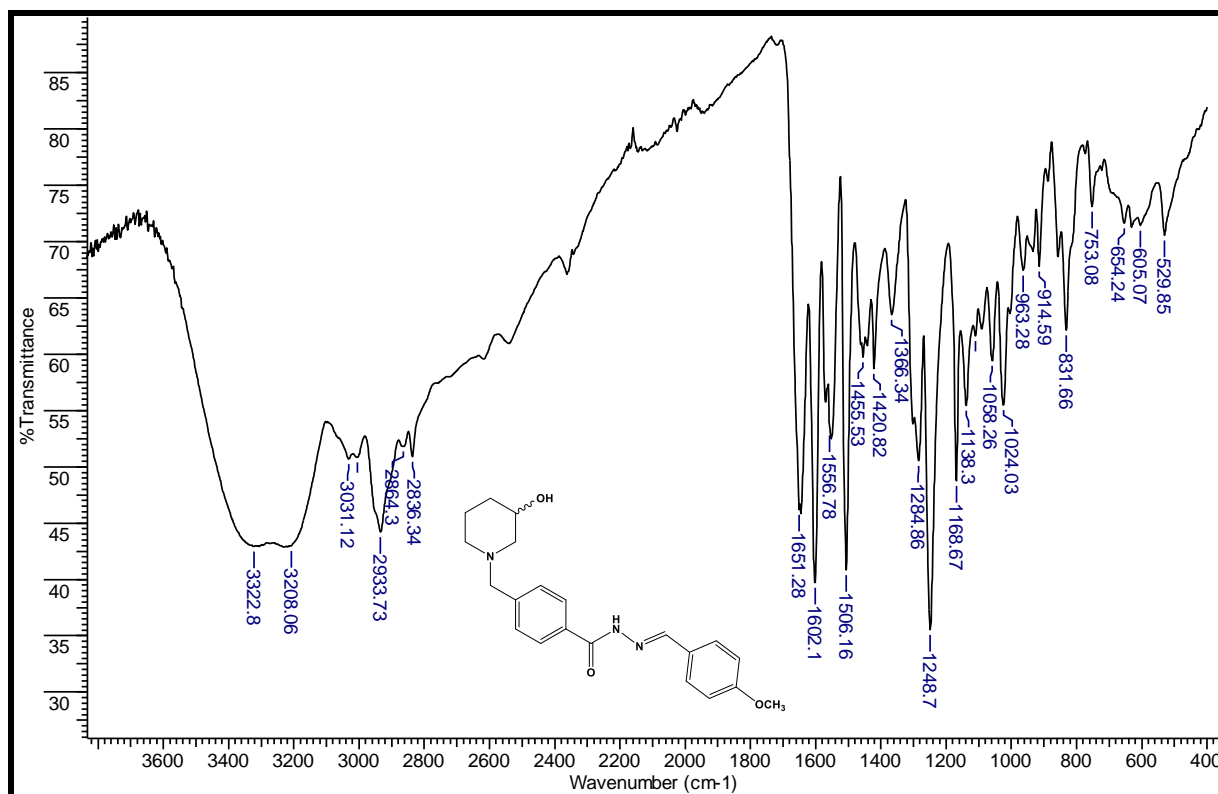


Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV de (30b) (ATR).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H do composto (30b) (Figura 40) foi observado a presença de um multiplete em 3,72-3,66 ppm referente aos hidrogênios H-13 e H-10. Os sinais dos hidrogênios do anel aromático estão na faixa de 7,94-6,97 ppm em forma de quatro dupletos ($J_{3,5-2,6} = 8,4$; $J_{2,6-3,5} = 8,1$; $J_{21,23-20,24} = 8,7$; $J_{20,24-21,23} = 8,7$) e os sinais na faixa 2,93-1,26 são referentes aos hidrogênios do núcleo piperidínico. Em 8,34 ppm está o simpleto do H-18 e em 3,84 ppm os sinais dos hidrogênios metoxílicos H-27, o que comprova a formação do produto **PQM-65**.

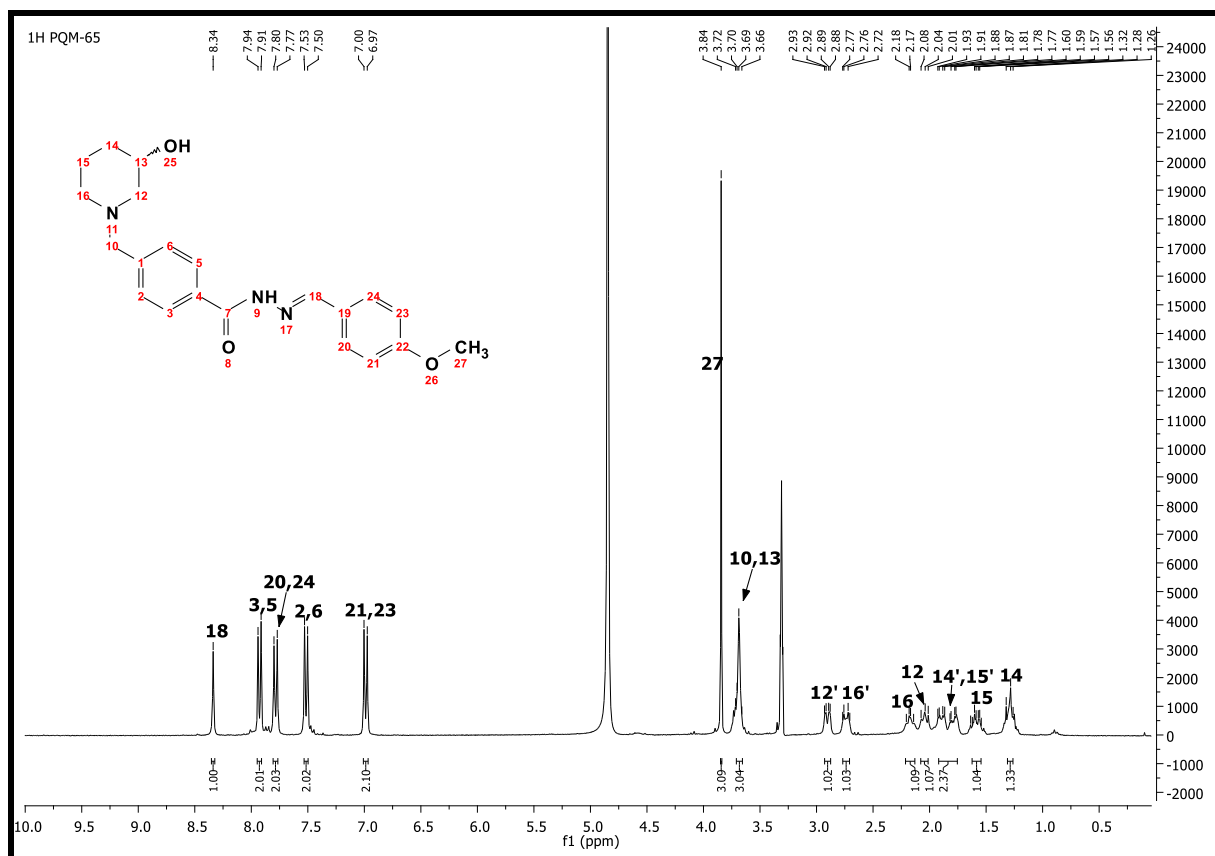


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H do composto (30b) (300 MHz, CD_3OD).
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 41), se observou todos os sinais característicos do composto (30b). Os sinais referentes ao C-18 e C-27 que comprovam a formação do produto PQM-65 são observados em 150,8 ppm e 55,9 ppm, respectivamente. O sinal em 63,3 ppm é referente ao C-10, e os demais sinais na faixa de 67,6-23,7 ppm são referentes ao núcleo piperidínico. O sinal em 166,6 ppm é referente ao C-7, e os demais sinais na faixa de 163,3-115,3 ppm são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos. Todos os dados foram comparados com os dados de referência do PeQuiM e se encontram na Tabela 6 (Apêndice A) (OLIVEIRA, 2017).

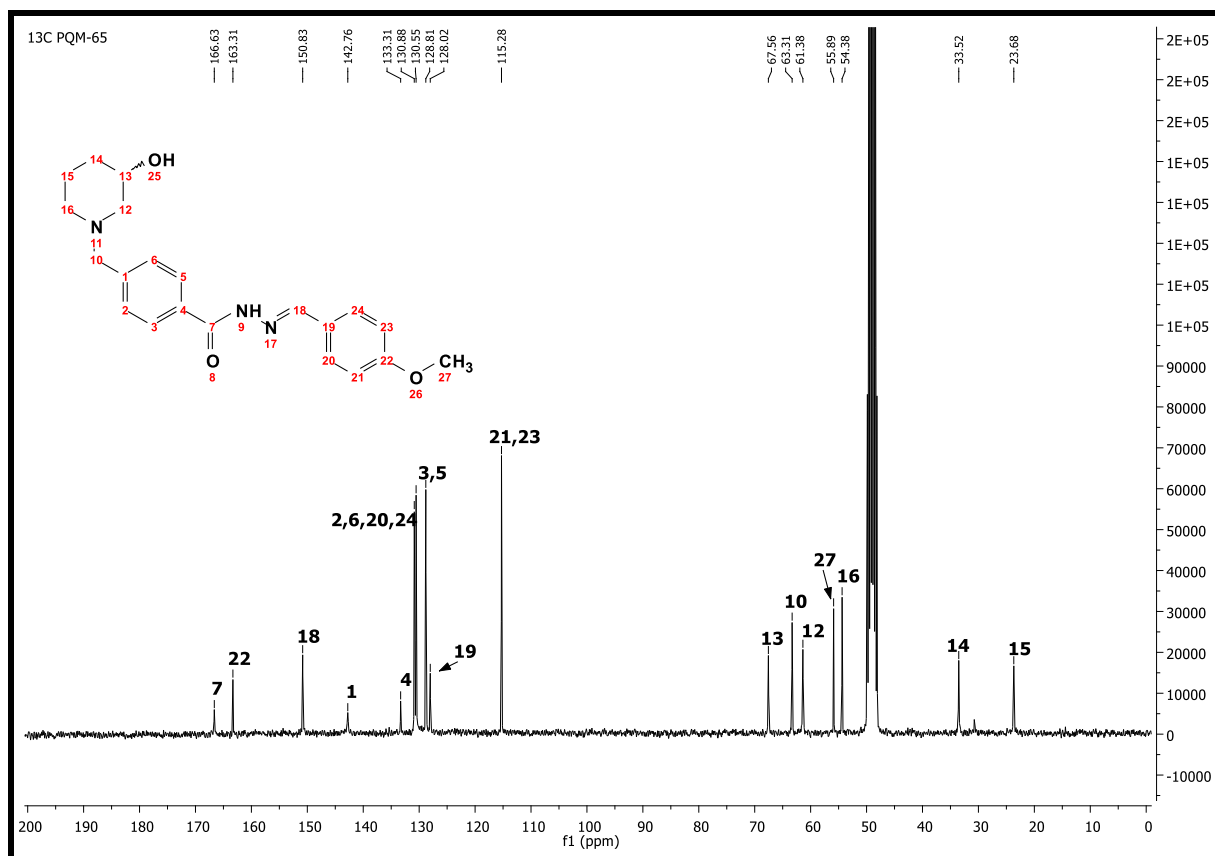


Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **(30b)** (75 MHz, CD_3OD).

Fonte: Do autor.

No espectro de massas do composto **PQM-65 (30b)** (Figura 42) foi identificado o pico-íon-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação massa/carga (m/z) de 368,1982, sendo o calculado de 368,1974. Também foi identificado o pico para $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com m/z de 390,1788.

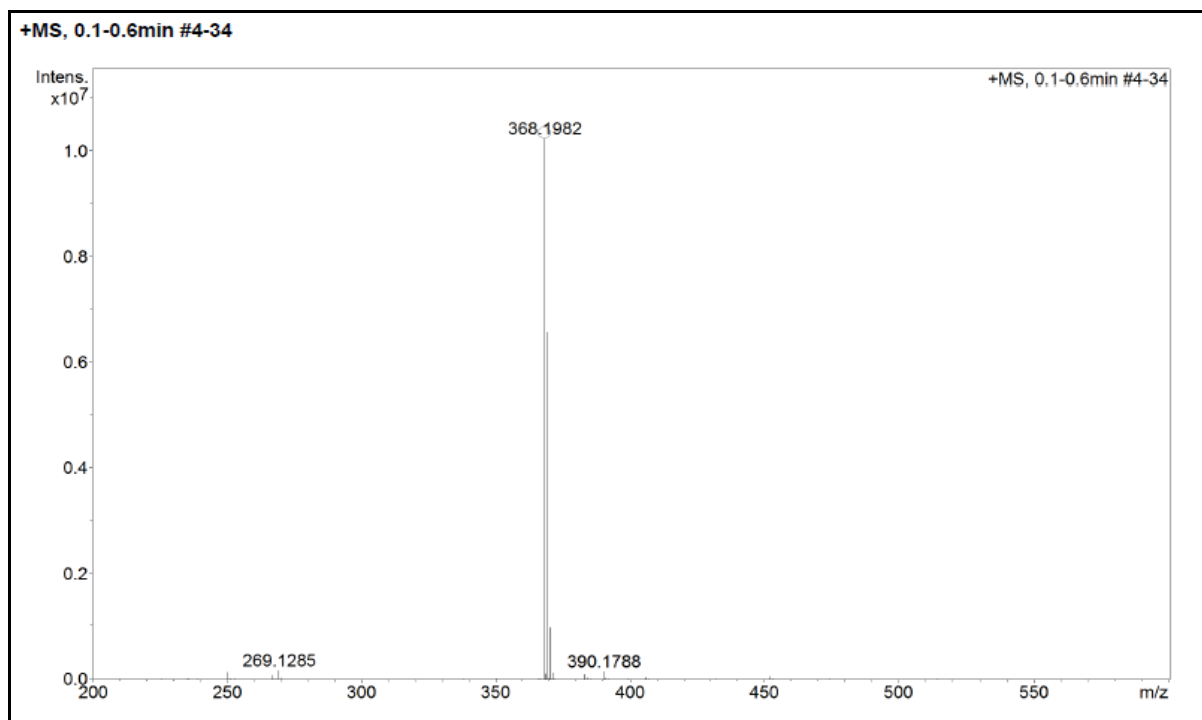


Figura 42 - Espectro de massas de alta resolução do composto **PQM-65 (30b)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor.

5.1.5 Síntese do *N*-(4-fluorbenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metileno)benzoidrazida: **PQM-67 (30c)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 43) foram observadas as bandas mais características referentes ao composto (**30c**), como a banda referente a deformação axial N-H entre 3327 cm^{-1} e 3243 cm^{-1} sendo esta sobreposta pela deformação axial de O-H. Já a banda de deformação angular de N-H em 1551 cm^{-1} , banda de deformação axial de C=O de hidrazida em 1651 cm^{-1} , deformação axial da ligação C-O de álcool em 1025 cm^{-1} , e a deformação axial de C-N em 1250 cm^{-1} . Na região de 2934 cm^{-1} banda características da deformação axial de C-H sp^3 e na região de 3031 cm^{-1} banda característica da deformação axial de C-H sp^2 de anel aromático. Também foram observadas bandas características de deformação axial de C=C de anel aromático entre 1602 cm^{-1} e 1507 cm^{-1} . Já em 1169 cm^{-1} banda característica de deformação axial de C-F e em 2359 cm^{-1} e 2342 cm^{-1} , bandas características da presença de CO_2 no ambiente.

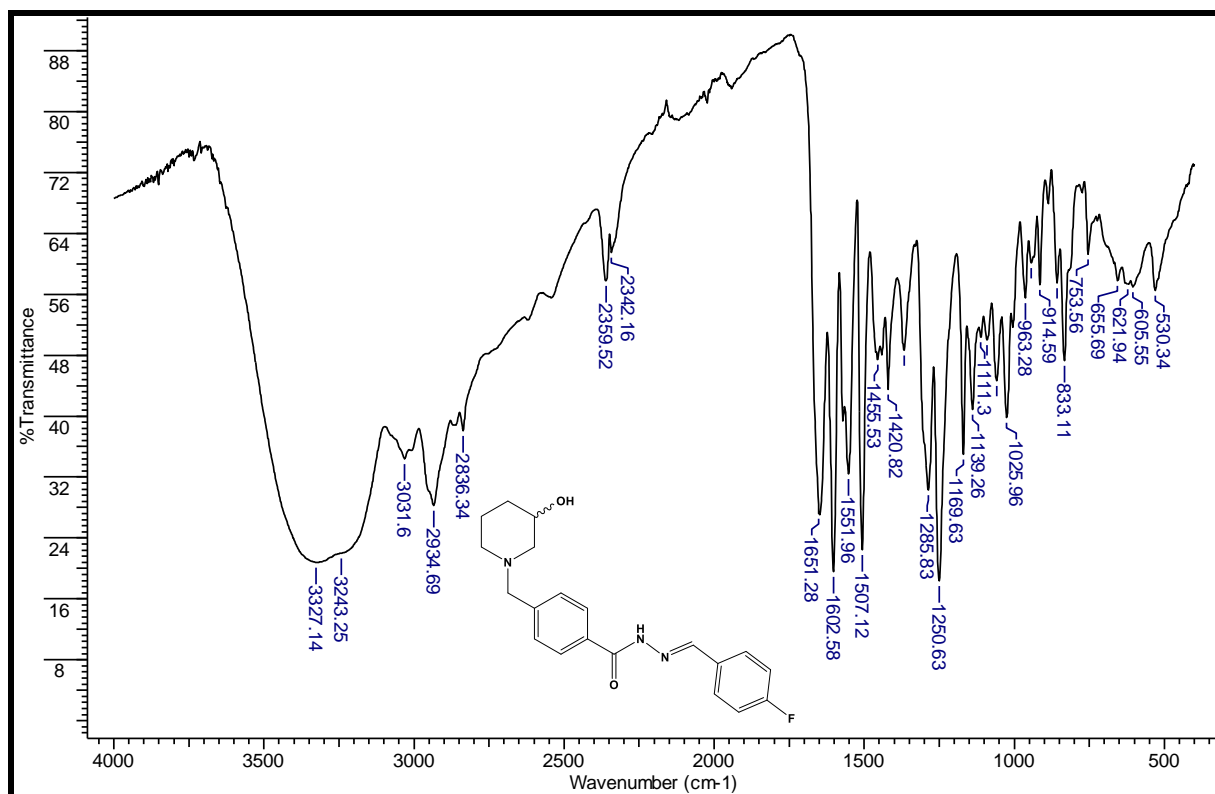


Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV de **(30c)** (ATR).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H do composto **(30c)** (Figura 44) feito em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, os sinais referentes ao H-10 e H-13 não apareceram, pois a água do DMSO deuterado aparece na mesma região, assim, fez-se um novo espectro de RMN de ^1H em CD_3OD para confirmar a presença destes sinais.

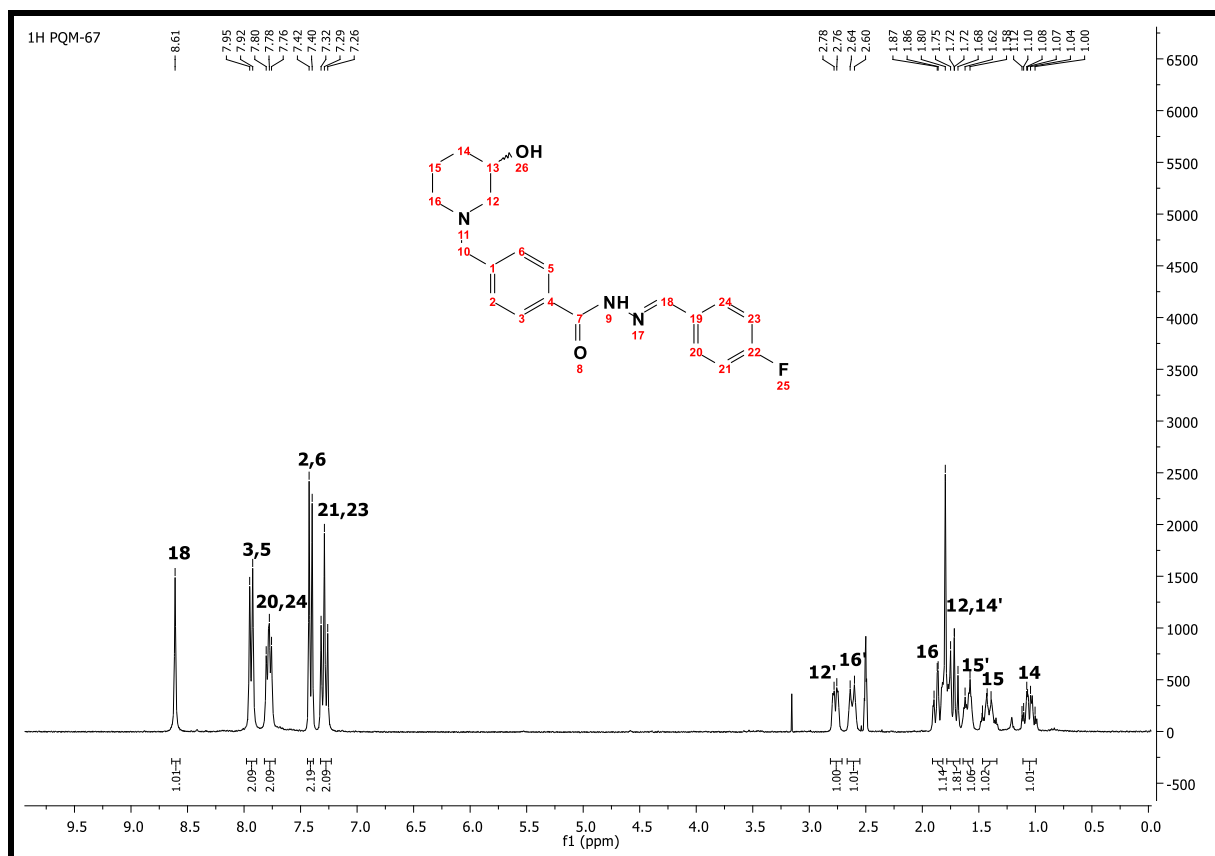


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H do composto (**30c**) (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

Fonte: Do autor.

No novo espectro de ^1H feito em CD_3OD (Figura 45) do composto (**30c**), se observou todos os sinais característicos do composto. O hidrogênio H-18 que confirma a formação do produto foi observado como um simpleto em 8,39 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos foram observados entre 7,94-7,15 ppm como um duplete ($J_{2,6-3,5} = 7,8$) um triplete ($J_{21,23-\text{F}} = 9,0$) e um multiplete, já o multiplete observado entre 3,70-3,65 ppm se refere aos H-10 e H-13. Também foram observados os sinais na faixa 2,92-1,24 ppm referentes aos hidrogênios do núcleo piperidínico.

Uma característica comum de RMN de ^1H e ^{13}C em compostos fluorados é o acoplamento com o F, que ocorre devido ao seu número quântico de spin (I) ser $\frac{1}{2}$ e com longos tempos de relaxação, sendo suficientes para serem observados (BRANCO et al., 2015). As constantes de acoplamento observadas estão de acordo com as da literatura (PRETSCH; BUHLMANN; BADERTSCHER, 2009). No espectro de RMN de ^1H foi observado a presença de um triplete em 7,19 ppm ($J_{21,23-\text{F}} = 9,0$) referente aos H-21 e H-23 acoplados ao flúor. Esperava-se também que houvesse outro triplete referente aos H-20 e H-24 acoplados ao F, porém observou-se um multiplete devido a sobreposição de sinais.

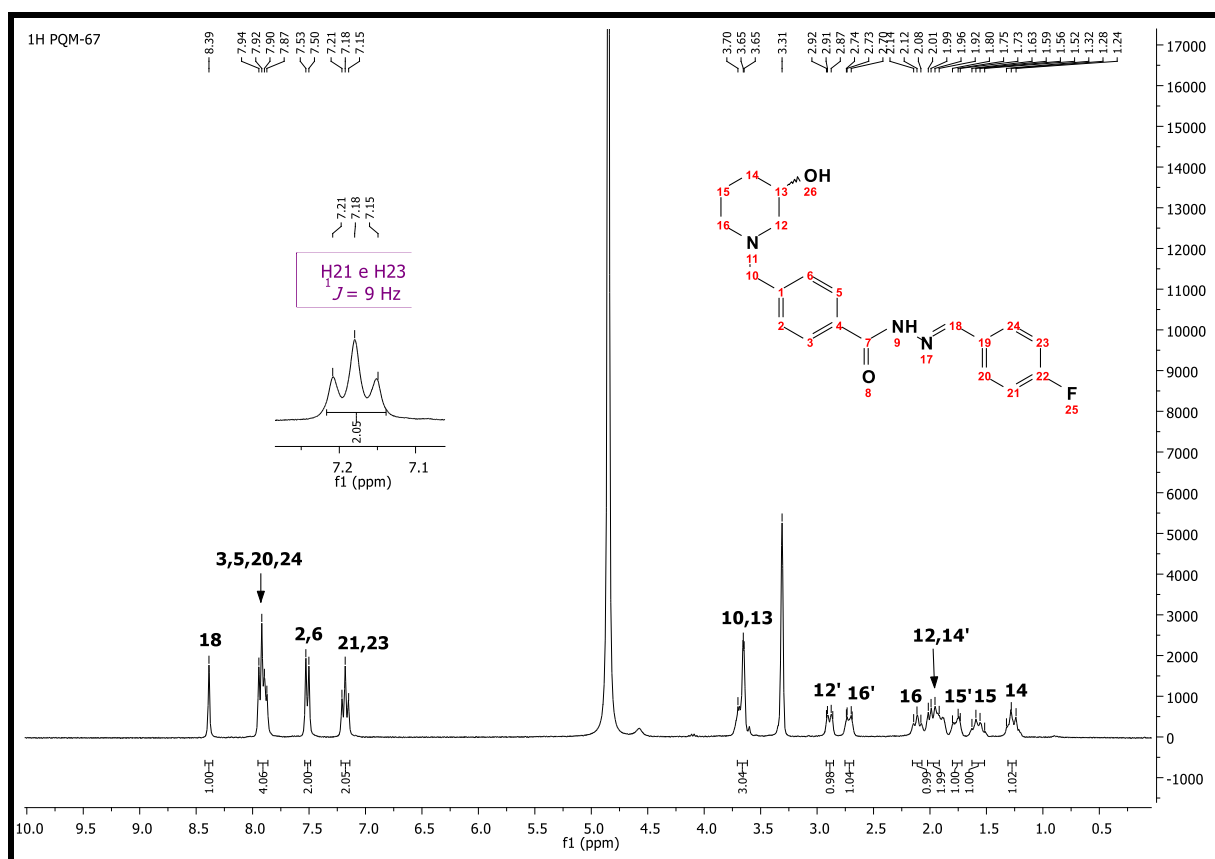


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H do composto (**30c**) (300 MHz, CD_3OD).
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46), se observou todos os sinais característicos do composto (**30c**). Os sinais observados separados em 164,8 ppm e 161,5 ppm são referentes ao carbono ligado ao flúor C-22, que aparecem desta maneira devido ao acoplamento com o F ($^1J_{22-\text{C}} = 246$ Hz). Também foi observado o acoplamento com o F dos C-21 e C-23 ($^2J_{21,23-\text{F}} = 21,8$ Hz) e dos C-20 e C-24 ($^3J_{20,24-\text{F}} = 8,3$ Hz), sendo todos condizentes com a literatura (PRETSCH; BUHLMANN; BADERTSCHER, 2009). Já o sinal em 163,2 ppm refere-se ao C-7, e em 146,7 ppm está representado o sinal do C-18 característico do produto e os demais sinais referentes aos carbonos dos anéis aromáticos estão compreendidos na faixa de 142,7-115,8 ppm. Já os carbonos do núcleo piperidínico estão representados pelos sinais entre 66,1-23,3 ppm. O sinal do C-10 está representado em 61,8. Todos os dados foram comparados com os dados de referência do PeQuiM e se encontram na Tabela 7 (Apêndice A) (OLIVEIRA, 2017).

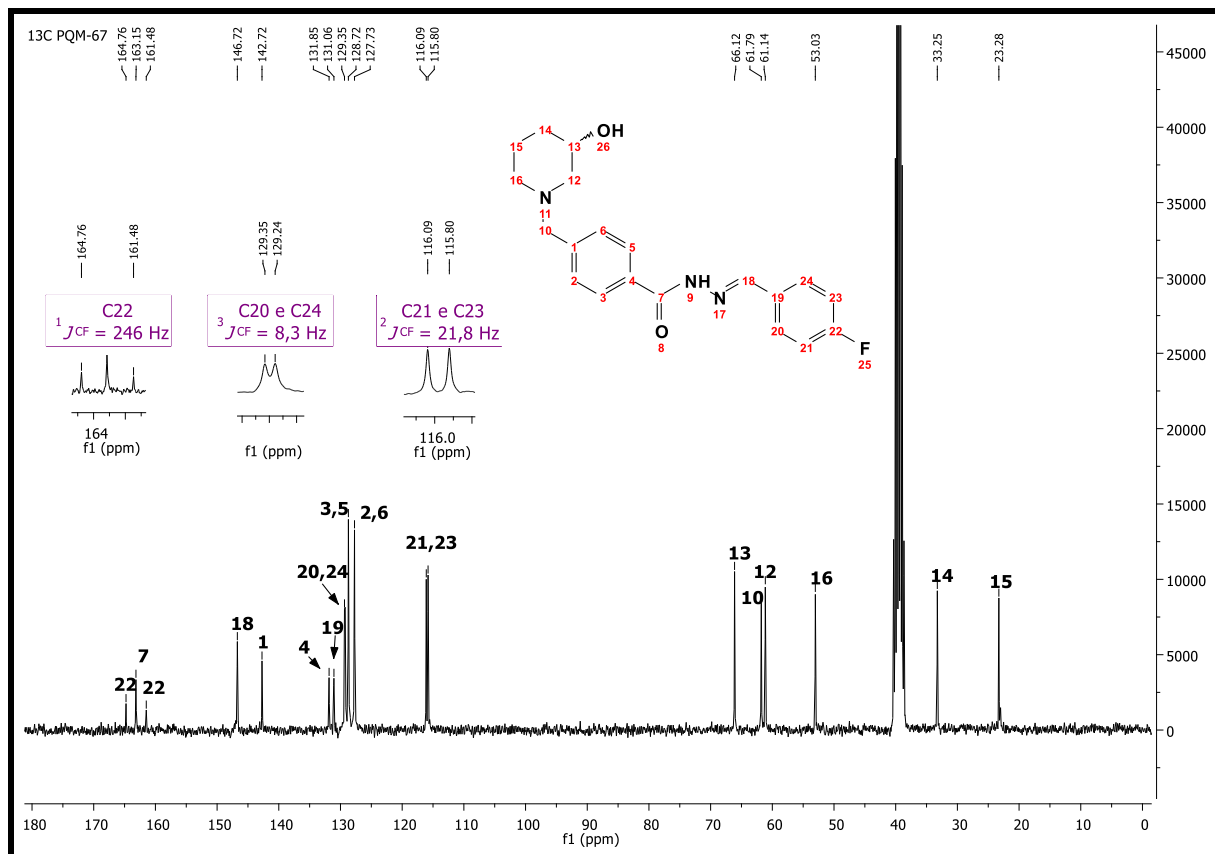


Figura 46 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto (30c) (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

Fonte: Do autor.

No espectro de massas do composto **PQM-67 (30c)** (Figura 47) foi identificado o pico-íon-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação massa/carga (m/z) de 356,1786, sendo o calculado de 356,1774. Também foi identificado o pico para $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com m/z de 378,1585.

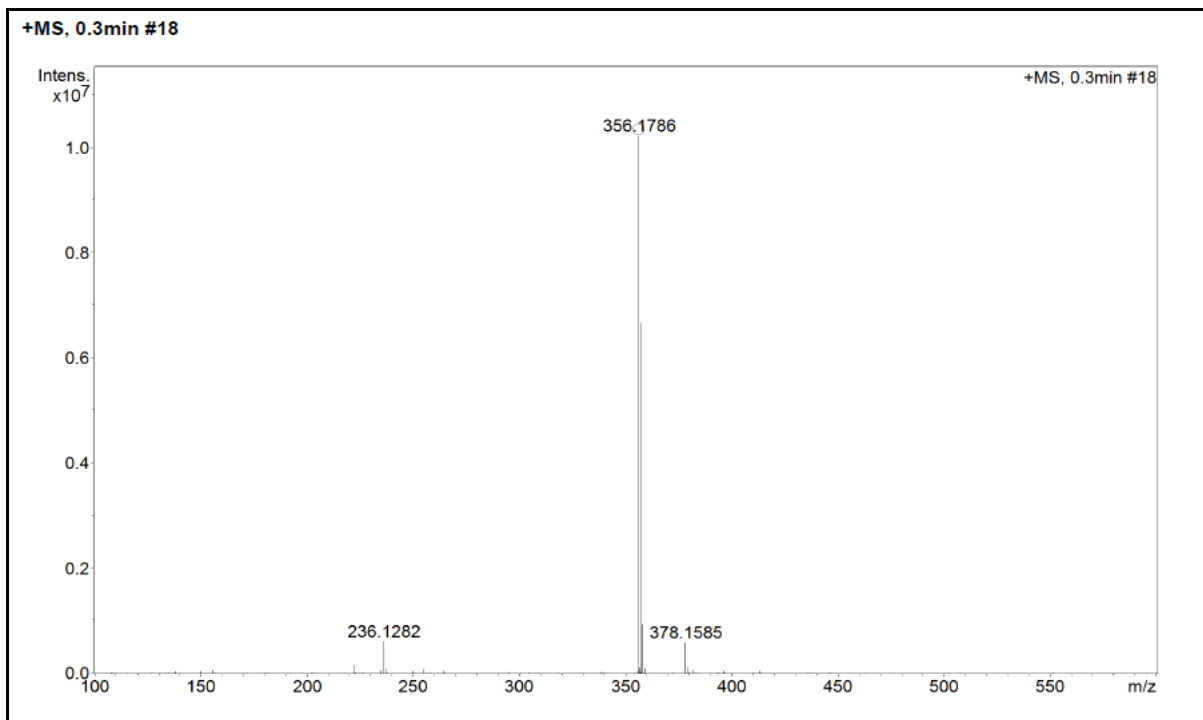


Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução do composto **PQM-67 (30c)** (ESI-MS).
Fonte: do autor.

5.1.6 Síntese do *N*-((4-piperidin-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-ila)metileno) benzoidrazida: **PQM-75 (30d)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 48) foram observadas as bandas mais características referentes ao composto (**30d**), como a banda referente a deformação axial N-H na região de 3323 cm^{-1} sendo esta sobreposta pela deformação axial de O-H. Já a banda de deformação angular de N-H em 1551 cm^{-1} , banda característica da deformação axial de C=O de hidrazida em 1655 cm^{-1} , deformação axial da ligação C-O de álcool em 1025 cm^{-1} , e a deformação axial de C-N em 1252 cm^{-1} . Na região de 2934 cm^{-1} banda características da deformação axial de C-H sp^3 e na região de 3032 cm^{-1} banda característica da deformação axial de C-H sp^2 de anel aromático. Também foram observadas bandas características de deformação axial de C=C de anel aromático entre 1602 cm^{-1} e 1507 cm^{-1} . Já em 2360 cm^{-1} e 2342 cm^{-1} , bandas características da presença de CO_2 no ambiente.

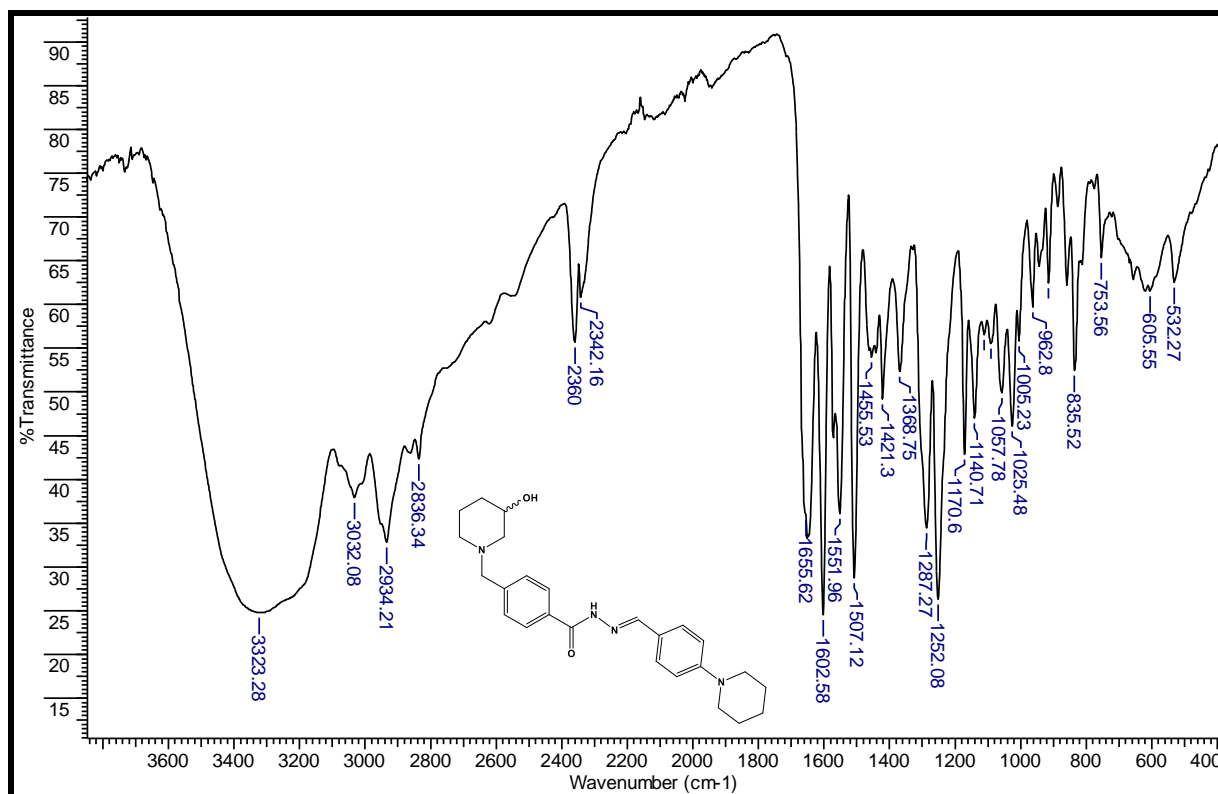


Figura 48 - Espectro de absorção na região do IV de **(30d)** (ATR).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ¹H do composto **(30d)** (Figura 49), se observou todos os sinais característicos do composto. O hidrogênio H-18 que confirma a formação do produto foi observado como um simpleto em 8,72 ppm, como mostra a parte ampliada do espectro. Foi observada a presença de quatro dupletos na faixa de 8,24-6,93 ppm referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos ($J_{3,5-2,6} = 8,1$; $J_{2,6-3,5} = 8,1$; $J_{21,23-20,24} = 8,7$; $J_{20,24-21,23} = 8,7$), já os sinais referentes aos H-10 e H-13 foram observados como dois multipletos em 3,59-3,48 ppm e 4,09-4,02 ppm, respectivamente. Em 12,36 ppm foi observado um simpleto referente ao H-8 amídico e os demais sinais dos hidrogênios dos núcleos piperidínicos estão presentes em multipletos na faixa de 3,13-1,36 ppm.

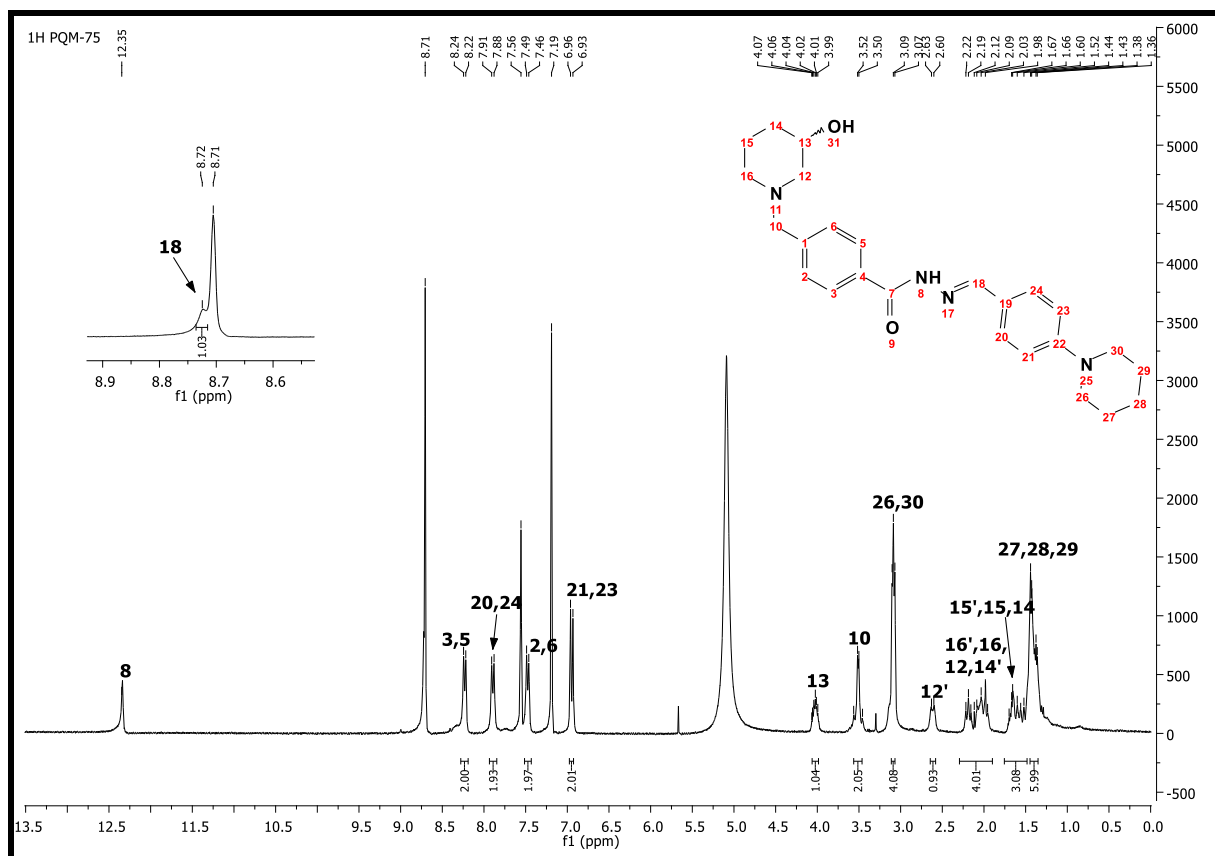


Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H do composto (**30d**) (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50), se observou todos os sinais característicos do composto (**30d**). O sinal em 164,6 ppm é referente ao carbono da carbonila C-7, e em 149,2 ppm ao C-18 característico do produto final. Os três tripletos compreendidos na faixa de 154,1-115,4 ppm são referentes à piridina (solvente); já os demais sinais presentes nesta faixa são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos. O sinal em 62,5 ppm é referente ao C-10, já os carbonos do núcleo piperidínico estão representados pelos sinais entre 66,8-23,5 ppm. Todos os dados foram comparados com os dados de referência do PeQuiM e se encontram na Tabela 8 (Apêndice A) (OLIVEIRA, 2017).

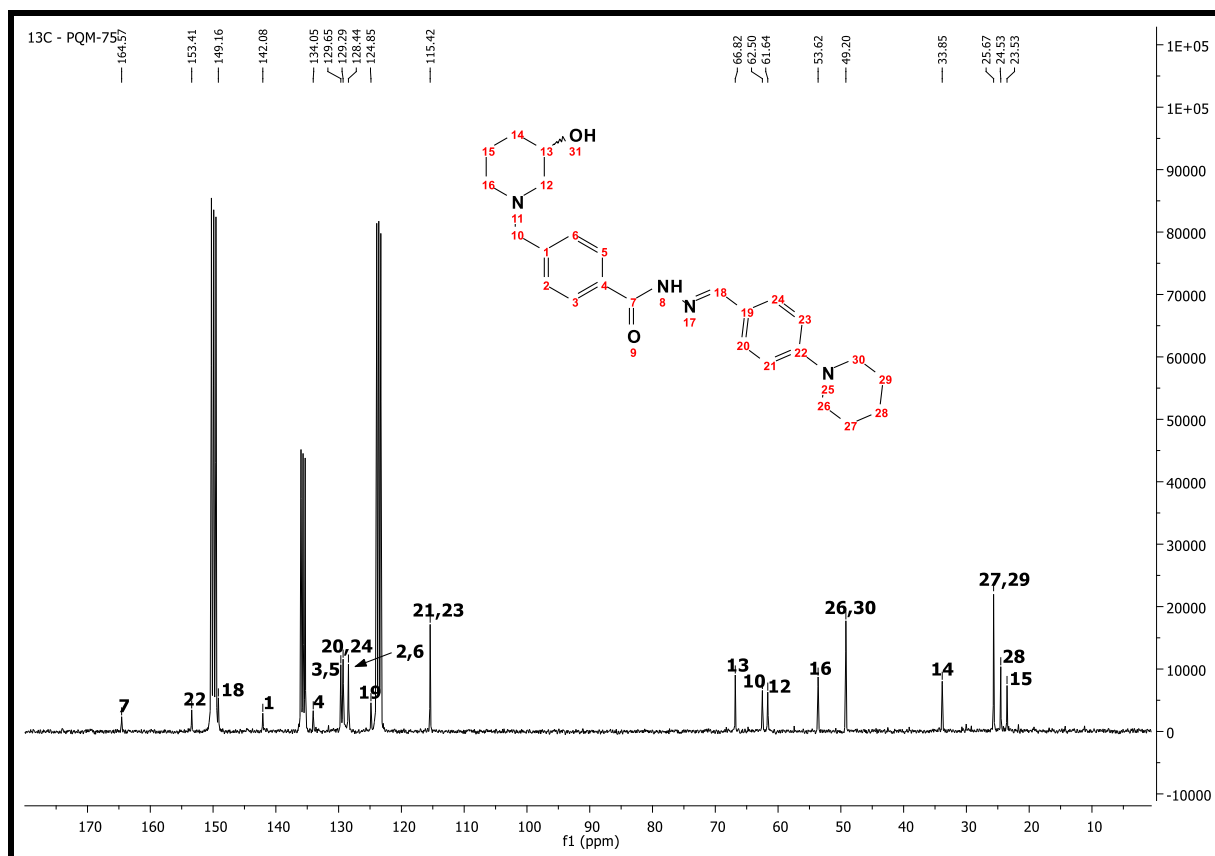


Figura 50 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto (**30d**) (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

Fonte: Do autor.

No espectro de massas do composto **PQM-75 (30d)** (Figura 51) foi identificado o pico-íon-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação massa/carga (m/z) de 421,2604, sendo o calculado de 421,2603. Também foi identificado o pico para $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com m/z de 443,2423.

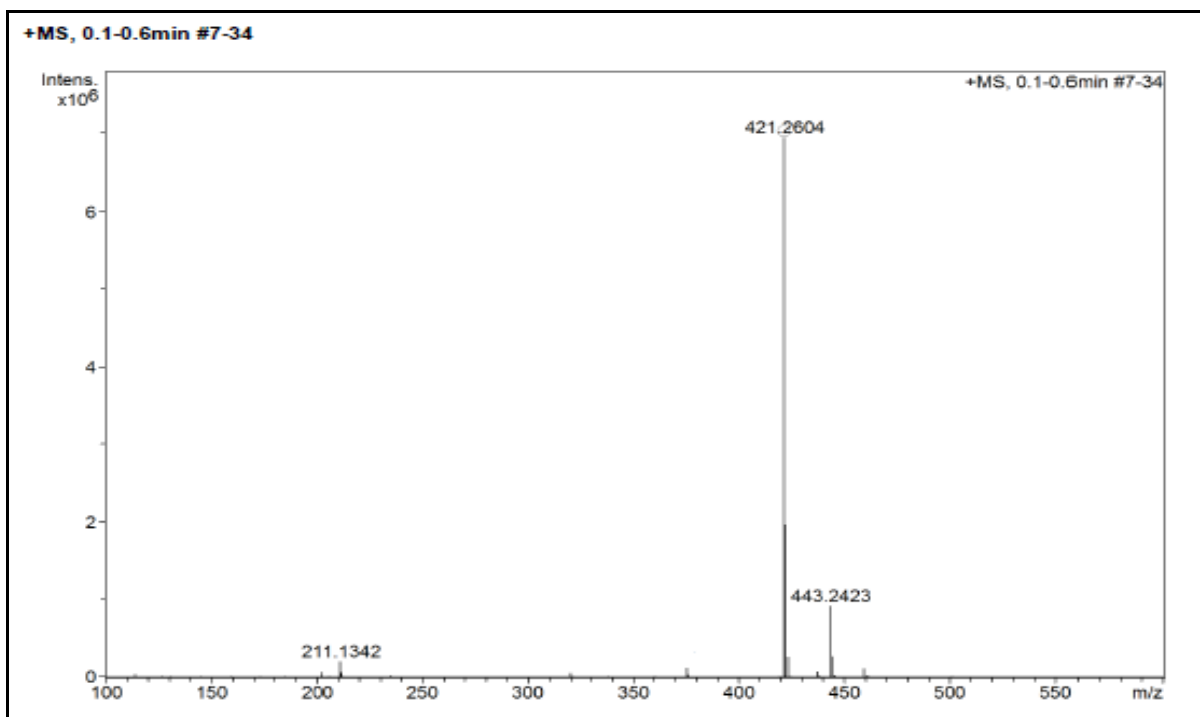


Figura 51 - Espectro de massas de alta resolução do composto **PQM-75 (30d)** (ESI-MS)
Fonte: Do autor.

5.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

As quatro substâncias sintetizadas, **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** e **PQM-75** (Figura 52), foram submetidas a ensaios farmacológicos *in vivo* para avaliação da atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor central e neuropática.

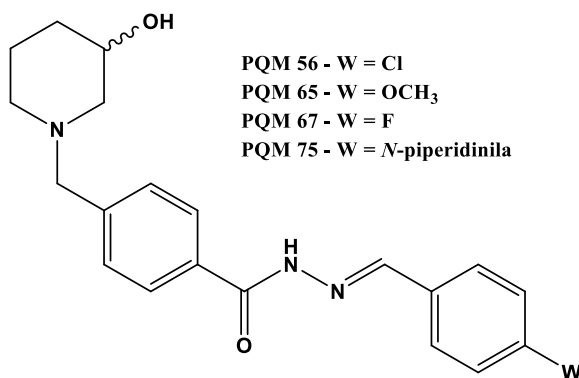


Figura 52 - Estrutura química dos compostos da série-alvo.
Fonte: Do autor.

O teste de formalina, realizado em um trabalho anterior do grupo com esta série de compostos, serviu como base para este trabalho. Neste modelo, fármacos que atuam na dor neurogênica e possuem ação no SNC, apresentam atividade na primeira fase.

Diante dos resultados obtidos e apresentados na Figura 13 (pag. 34), buscamos confirmar o efeito antinociceptivo das substâncias-alvo, bem como estudar se o possível mecanismo de ação seria por via opioide. A verificação do mecanismo de ação é feita pelo uso de antagonistas farmacológicos seletivos, que ao se ligarem a um receptor específico, impedem a ligação do respectivo agonista. Desta forma, neste estudo, foram utilizados como fármacos de referência a morfina, que é um agonista opioide e a naloxona, um antagonista opioide.

Opioides são todos os compostos que interagem com receptores opioides no corpo, e dentre eles, um dos mais conhecidos e efetivos é a morfina, sendo ela muito utilizada para tratamento de dores severas (PATRICK, 2013). Embora a morfina seja um analgésico potente, o seu uso vem acompanhado de diversos efeitos colaterais como constipação, depressão respiratória, náuseas, excitação, tolerância, dependência, dentre outros (PATRICK, 2013). Portanto, é de suma importância a busca por novos fármacos potentes, com menos efeitos colaterais e maior eficácia para o tratamento da dor.

Neste estudo, primeiramente utilizou-se o ensaio de retirada de cauda (*tail flick*), descrito por D`amour e Smith (1941) e modificado por Azami et al. (1982). Segundo Le Bars; Gozariu e Cadden (2001), neste modelo animal, são ativas substâncias que possuem atividade semelhante aos opioides, independentemente de sua origem ou natureza, fornecendo, com relativa rapidez, dados importantes para avaliação e seleção preliminar de novos candidatos a protótipos de fármacos antinociceptivos.

Na Figura 53 é mostrado o resultado da latência (em segundos) para a retirada da cauda em função de um estímulo térmico em animais pré-tratados com **PQM-56** (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.), veículo (v.o.) ou morfina (1 mg/kg, i.p.) e tratados com salina ou naloxona (30 μg). A análise de *two-way* ANOVA demonstrou que houve efeito no fator pré-tratamento ($F_{5,30}=73.0$, $P < 0,05$), no tempo ($F_{5,30}=326.1$, $P < 0,05$) e interação entre os 2 fatores tempo X pré-tratamento ($F_{25,150}=38.79$, $P < 0,05$).

A análise dos dados pelo pós-teste de Bonferroni demonstrou que os animais pré-tratados com veículo e tratados com naloxona (Veíc+Nal) não apresentaram alteração na latência de retirada de cauda, quando comparados com os animais do grupo Veíc+Sal. É possível observar o aumento do tempo de latência nos animais do grupo Morf+Sal,

comparados com os animais do grupo Veíc+Sal, efeito que permaneceu significativo por 6,5 horas após o pré-tratamento.

Como esperado, a naloxona (30 μg) bloqueou o efeito da morfina (1 mg/kg), uma vez que não houve alteração na latência para retirada de cauda dos animais do grupo Morf+Nal, em comparação ao grupo Morf+Sal. Os animais pré-tratados com **PQM-56** e tratados com salina (**PQM-56**+Sal), apresentaram aumento nas latências nos tempos de 1,5 e 3,5 horas após o pré-tratamento, comparando-se ao grupo Veíc+Sal. Esse efeito foi bloqueado também pelo tratamento com naloxona, não havendo alteração na latência para retirada da cauda nos animais do grupo **PQM-56**+Nal, em comparação aos animais tratados com **PQM-56** + Salina.

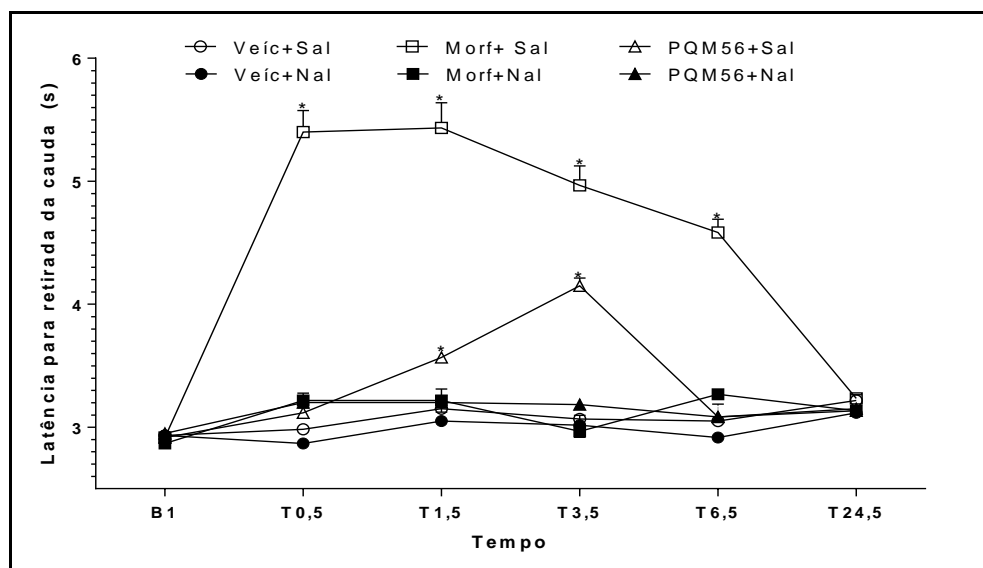


Figura 53 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância **PQM-56** (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.). A administração de **PQM-56** foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veíc+Sal, $P < 0,05$;

Fonte: Do autor.

A Figura 54 mostra os dados de latência (em segundos) para a retirada da cauda avaliada durante o teste de retirada da cauda de animais pré-tratados com **PQM-65** (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.), veículo (v.o.) ou morfina (1 mg/kg, i.p.) e tratados com salina ou naloxona (30 μg). Análise de *two-way* ANOVA demonstrou efeito nos fatores pré-tratamento ($F_{5,30}=126.8$, $P < 0,05$) e tempo ($F_{5,30}=347.1$, $P < 0,05$), com interação entre ambos os fatores tempo X pré-tratamento ($F_{25,150}=35.98$, $P < 0,05$). A análise dos dados pelo pós-teste de Bonferroni demonstrou que os animais pré-tratados com veículo e tratados com naloxona (Veíc+Nal) não apresentaram alteração na latência de retirada de cauda, em comparação com o grupo

Veíc+Sal. Também é possível evidenciar o aumento do tempo de latência nos animais do grupo Morf+Sal, quando comparados ao grupo Veíc+Sal, com efeito significativo em até 6,5 horas após o pré-tratamento.

Mais uma vez, como esperado, a naloxona (30 µg) bloqueou o efeito da morfina (1 mg/kg) em comparação ao grupo Morf+Sal. Já os animais pré-tratados com **PQM-65** e salina (**PQM-65+Sal**), não apresentaram aumento na latência em comparação ao grupo Veíc+Sal, da mesma forma que no grupo **PQM-65+Nal**, em comparação ao grupo **PQM-65+Sal**.

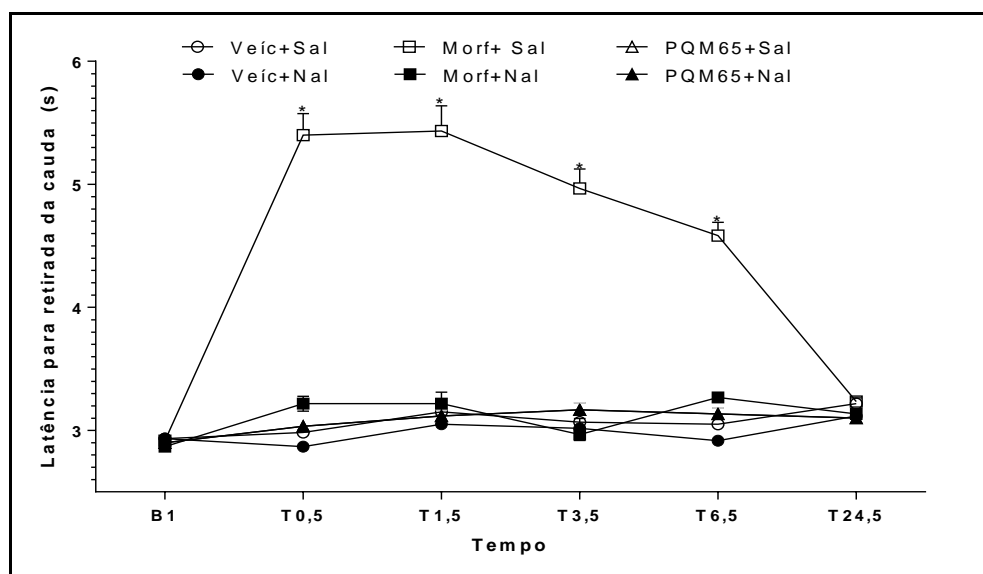


Figura 54 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância **PQM-65** (100 µmol/kg, v.o.). A administração de **PQM-65** foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veíc+Sal, $P < 0,05$;

Fonte: Do autor.

A substância **PQM-67** foi avaliada no mesmo modelo, cujos tempos de latência (em segundos) para a retirada de cauda estão mostrados na Figura 55. Os animais foram pré-tratados com **PQM-67** (100 µmol/kg, v.o.), veículo (v.o.) ou morfina (1 mg/kg, i.p.) e tratados com salina ou naloxona (30 µg). Análise de *two-way* ANOVA demonstrou efeito no fator pré-tratamento ($F_{5,30}=48.64$, $P < 0,05$), tempo ($F_{5,30}=386.5$, $P < 0,05$) e, novamente, interação entre os 2 fatores tempo X pré-tratamento ($F_{25,150}=41.73$, $P < 0,05$). A análise dos dados pelo pós-teste de Bonferroni demonstrou que o grupo de animais pré-tratados com veículo e tratados com naloxona (Veíc+Nal) não apresentou alteração na latência de retirada de cauda, comparado ao grupo Veíc+Sal. Por outro lado, o grupo tratado com Morf+Sal demonstrou alteração significativa no tempo de latência, quando comparados com os animais do grupo

Veíc+Sal, com efeito que se estendeu até 6,5 horas após o pré-tratamento. Como esperado, a naloxona (30 μg) bloqueou o efeito da morfina (1 mg/kg), não alterando a resposta ao estímulo doloroso do grupo Morf+Nal em comparação ao grupo Morf+Sal. De modo muito semelhante ao ensaio com **PQM-65**, a avaliação do efeito antinociceptivo por pré-tratamento com **PQM-67** (**PQM-67**+Sal), novamente não evidenciou efeito antinociceptivo, não aumentando o tempo de latência.

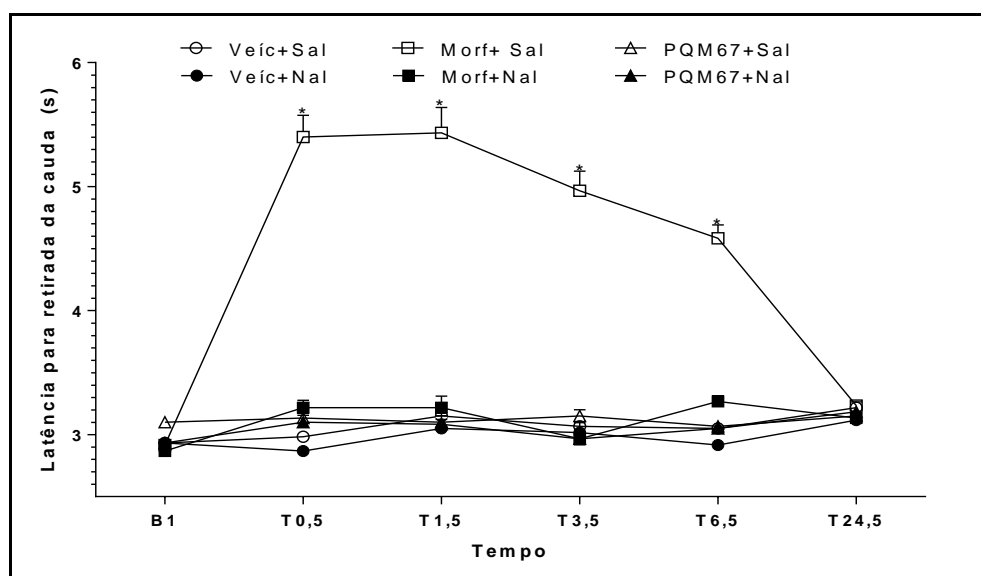


Figura 55 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância **PQM-67** (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.). A administração de **PQM-67** foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veíc+Sal, $P < 0,05$;

Fonte: Do autor.

De modo análogo ao descrito para as outras substâncias-teste, a Figura 56 mostra os dados da avaliação do efeito antinociceptivo pelo pré-tratamento com **PQM-75** (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.), veículo (v.o.) ou morfina (1 mg/kg, i.p.) e tratados com salina ou naloxona (30 μg). Na análise de *two-way* ANOVA evidenciou-se efeito nos fatores pré-tratamento ($F_{5,30}=69.16$, $P < 0,05$) e tempo ($F_{5,30}=176.0$, $P < 0,05$), com interação entre os 2 fatores tempo X pré-tratamento ($F_{25,150}=20.01$, $P < 0,05$). A análise dos dados conforme descrito anteriormente, demonstrou que não houve alteração de latência pós-tratamento com naloxona (Veíc+Nal), em comparação ao Veíc+Sal. No grupo tratado com Morf+Sal foi evidente o aumento da latência por até 6,5 h, efeito este bloqueado pela administração naloxona (30 μg). O pré-tratamento com **PQM-75** e salina (**PQM-75**+Sal), levou ao aumento significativo dos tempos de latência nos tempos de 0,5, 1,5, 3,5 e 6,5 horas após o pré-tratamento, quando comparados com ao

grupo Veic+Sal. Novamente, ficou evidente o efeito por via opioide, uma vez que a naloxona foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo no grupo **PQM-75+Nal** em comparação ao grupo tratado somente com **PQM-75+salina**.

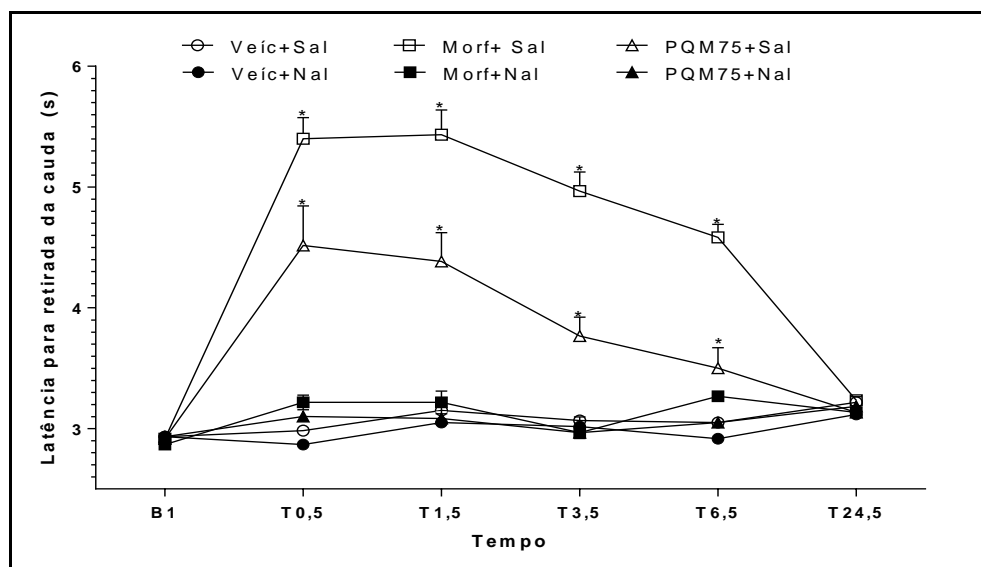


Figura 56 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de retirada da cauda em animais tratados com a substância **PQM-75** (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.). A administração de **PQM-75** foi logo após B1, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais. *Diferente de Veic+Sal, $P < 0,05$;

Fonte: Do autor.

Em suma, os dados obtidos no ensaio de *tail flick* revelaram que somente as substâncias **PQM-56** e **PQM-75** apresentaram efeito antinociceptivo central, evidenciado pelo aumento dos tempos de latência, traduzindo que os animais demoraram mais para ter a reação de retirada da cauda devido ao estímulo térmico, quando comparados aos animais do grupo controle (Veic+Sal). Este efeito não foi observado para **PQM-65** e **PQM-67**, cujos resultados não foram estatisticamente significativos, em comparação aos grupos controle.

O estudo do mecanismo de ação pode ser evidenciado como opioide, uma vez que os efeitos antinociceptivos de **PQM-56** e **PQM-75** foram totalmente revertidos pela ação de naloxona, um antagonista de receptores opioides, a exemplo do que ocorre com a morfina nas mesmas condições.

Em outra abordagem, foi avaliado o potencial efeito das substâncias-alvo sobre o modelo de dor neuropática de constrição crônica do nervo ciático (CCI). Neste modelo os animais foram submetidos à cirurgia para amarração do nervo ciático em quatro pontos (BENNET; XIE, 1988). Este modelo simula uma situação de compressão nervosa crônica como a causada por uma hérnia de disco lombar (ZIMMERMANN, 2001). O efeito

antinociceptivo foi avaliado pelo limiar mecânico de retirada de pata dos animais, submetidos ou não a CCI, pré-tratados com as diferentes substâncias e tratados com salina ou naloxona, via teste de alodinia mecânica (Von Frey eletrônico).

Os dados de avaliação do efeito antinociceptivo neuropático estão apresentados na Figura 57, em que o gráfico A representa o limiar de retirada (g) avaliado pelo teste de von Frey eletrônico, nos grupos SHAM (falso operados) e pré-tratados, após 7 dias da cirurgia SHAM, com as substâncias **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67**, **PQM-75** (100 $\mu\text{mol/kg}$), veículo por via oral ou morfina (1 mg/kg, i.p.) e tratados com salina ou naloxona (30 μg).

Uma medida controle foi realizada antes da cirurgia SHAM (B1), 7 dias após a cirurgia (B2) e após 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 horas (T0,5, T1,5, T3,5, T6,5 e T24,5) do pré-tratamento. A análise de *two-way* ANOVA demonstrou que houve efeito no fator pré-tratamento ($F_{11,385}=56.17$, $P < 0,05$), tempo ($F_{6,35}=4.08$, $P < 0,05$) e interação entre os 2 fatores tempo X pré-tratamento ($F_{66,385}=11.06$, $P < 0,05$). A análise dos dados pelo pós-teste de Bonferroni demonstrou que houve aumento do limiar de retirada nos animais do grupo SHAM Morf+Sal, quando comparados com os animais SHAM Veíc+Sal. Não houve diferença entre os demais grupos experimentais.

Já o segundo gráfico (B) da Figura 57 representa o limiar de retirada (g) avaliado pelo teste de von Frey eletrônico, nos grupos que passaram por cirurgia (CCI), com indução de dor neuropática, pré-tratados com dose única de 100 $\mu\text{mol/kg}$ das substâncias **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67**, **PQM-75** e veículo (v.o.) ou morfina (1 mg/kg, i.p.) e tratados com salina ou naloxona (30 μg). A avaliação nociceptiva foi realizada em três momentos: antes da indução da dor neuropática (B1), 7 dias após a cirurgia (B2) e após 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 horas (T0,5, T1,5, T3,5, T6,5 e T24,5) da administração do pré-tratamento. A análise de *two-way* ANOVA demonstrou que houve efeito no fator pré-tratamento ($F_{11,385}=595.4$, $P < 0,05$), tempo ($F_{6,35}=1174$, $P < 0,05$) e interação entre os 2 fatores tempo X pré-tratamento ($F_{66,385}=82.14$, $P < 0,05$). A análise dos dados pelo pós-teste de Bonferroni demonstrou que animais do grupo CCI, pré-tratados com veículo e tratados com naloxona (Veíc+Nal) não apresentaram alteração no limiar de retirada, quando comparados com animais do grupo Veíc+Sal.

Os dados obtidos e apresentados na Figura 57 evidenciam que os animais tratados com **PQM-56** e **PQM-75** apresentaram aumento significativo no limiar nociceptivo nos tempos T0,5, T1,5, T3,5 e T6,5, de modo análogo ao observado para a morfina, em comparação com o grupo Veíc+Sal. Interessante notar que **PQM-75** demonstrou neste modelo um efeito antinociceptivo de perfil muito similar ao da morfina, de longa duração abrangendo T0,5 a T6,5. Além disso, o tratamento com naloxona reverteu esses efeitos nos animais dos grupos

PQM-56+Nal, **PQM-75+Nal** e **Morf+Nal**, evidenciando mais uma vez que as substâncias-alvo atuam por via opioide. Não houve diferença entre os demais grupos experimentais.

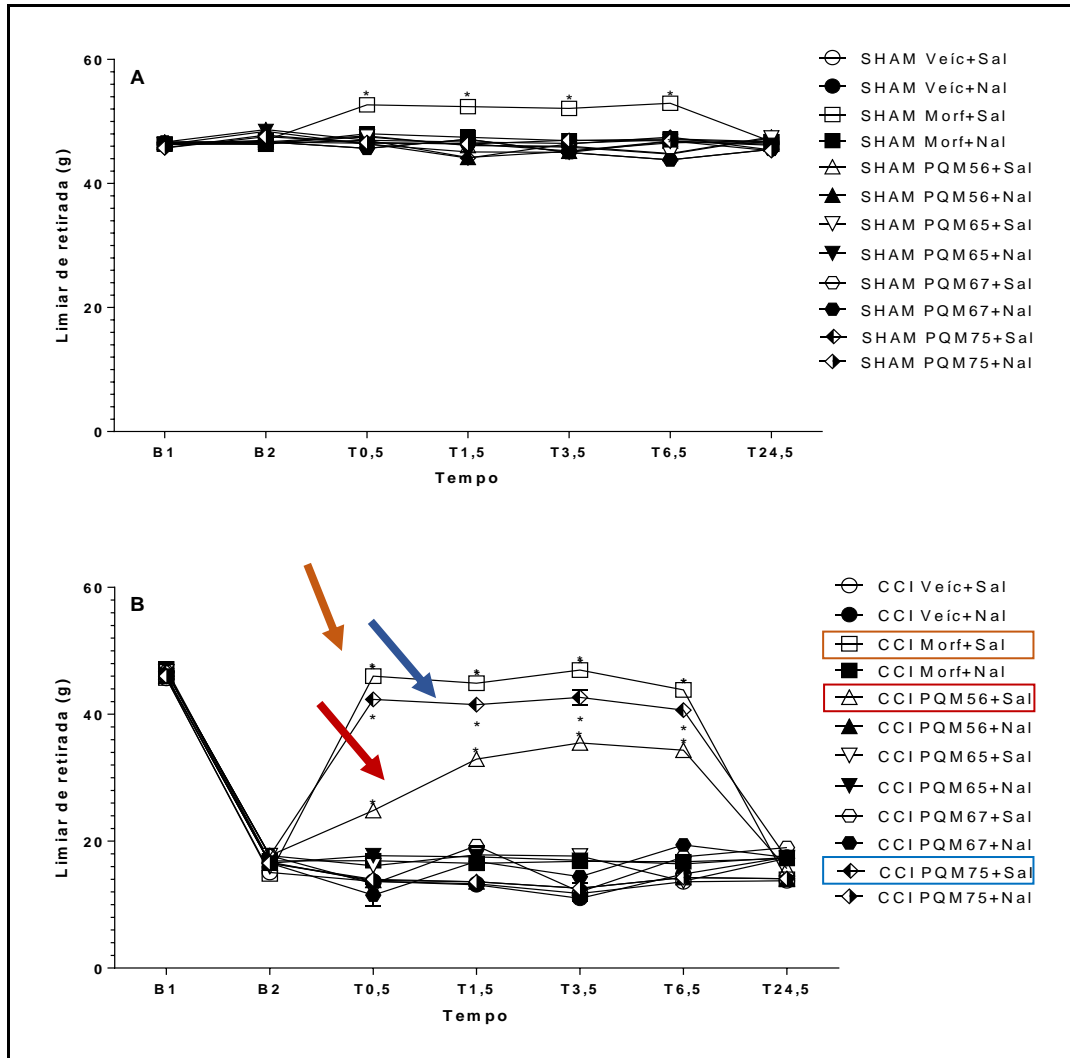


Figura 57 - Límiar de retirada de pata em gramas avaliado pelo teste de von Frey eletrônico em animais SHAM (gráfico A) e CCI (gráfico B) pré-tratados com a substância **PQM-56**, **PQM-65**, **PQM-67** ou **PQM-75** na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.; ou veículo e morfina. O limiar basal (B2) foi avaliado 7 dias após B1, e em seguida foram administradas as substâncias, após 30 min fez-se o tratamento com salina ou naloxona, seguido das avaliações nos tempos 0,5, 1,5, 3,5, 6,5 e 24,5 h após o pré-tratamento. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais por grupo. *Diferente de SHAM/Veic+Sal (gráfico A) ou CCI/Veic+Sal (gráfico B), $P < 0,05$;

Fonte: Do autor.

Todos os animais do grupo CCI e SHAM tiveram o limiar basal (B1) avaliado e em seguida os animais do grupo CCI foram submetidos à cirurgia com amarração do nervo ciático para indução da dor neuropática. Entretanto, os animais do grupo SHAM passaram apenas pela cirurgia onde foi exposto o nervo ciático, mas sem as amarrações (falsa operação). Após 7 dias, todos os animais destes grupos tiveram o limiar basal (B2) avaliado.

Os animais do grupo CCI apresentaram uma diferença significativa no limiar (B2) o que sugere que estes animais apresentaram dor neuropática, já os animais do grupo SHAM tiveram seu limiar (B2) semelhante ao (B1), o que evidenciou que a cirurgia SHAM não havia alterado o limiar de retirada da pata. Este tempo de 7 dias foi esperado já que pode levar de 2 a 7 dias para que a sensação dolorosa de dor neuropática apareça, sendo que ela pode durar até por dois meses após a cirurgia (JANICKI; PARRIS, 2008).

Em suma, a avaliação do efeito sobre a dor neuropática no teste von Frey eletrônico para os animais do grupo de CCI, tornou evidente que as substâncias **PQM-56** e **PQM-75** apresentam efeito antinociceptivo significativo, por via opioide, visto que houve um aumento expressivo no limiar de retirada da pata decorrente do estímulo mecânico. Por outro lado, as substâncias **PQM-65** e **PQM-67** não apresentaram efeito estatisticamente significativo. A evidente ação sobre a via opioide neste ensaio corrobora os dados obtidos anteriormente no modelo de *tail flick*, confirmando o mecanismo de ação.

Numa análise da estrutura-atividade, é importante notar a presença da subunidade *N*-acilidrazona, que tem sido amplamente descrita como um grupo auxofórico sendo que já foram relatados diversos derivados bioativos com propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias, antitrombóticas dentre outros (MAIA; TESCH; MANSSOUR-FRAGA, 2014). Um exemplo disso foi descrito por Duarte (2006) que demonstrou que o composto *N*-acilidrazônico LASSBio-881 (**24**, Figura 12, pag. 31), com significativa atividade antinociceptiva central. Este composto foi primeiramente avaliado quanto a sua atividade antinociceptiva pelo teste de formalina na dose de 100 µmol/kg, no qual LASSBio-881 foi ativo na primeira fase e não foi na segunda, indicando uma possível ação central. A confirmação de seu efeito antinociceptivo central foi realizada pelo teste de chapa quente (*hot plate*). No nosso caso, um perfil de atividade semelhante foi observado para **PQM-75**, que apresentou atividade na primeira fase do teste de formalina, sem, contudo ter efeito sobre a segunda fase, cujo efeito central foi confirmado no ensaio de *tail flick* e von Frey eletrônico.

Outro composto com a subunidade *N*-acilidrazona também relatado com atividade antinociceptiva central foi o LASSBio-417 (**23**, Figura 12, pag. 31) (SILVA et al., 2004). Este composto foi administrado na dose de 100 µmol/kg (v.o.) e submetido ao teste de placa quente juntamente com outros análogos, porém foi o de melhor atividade. Além destes, são relatados outros derivados como o LASSBio-171 (**31**, Figura 58) relatado por Leite et al. (1999) e LASSBio-349 (**32**, Figura 58) relatado por Figueiredo et al. (2000) que apresentaram atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Diaz et al. (2008) utilizando modelo de dor neuropática, relatou uma nova série de *N*-acilidrazonas, atuando como agonistas de receptores canabinoides do subtipo-2 (CB₂), sendo MDA 19 (**33**, Figura 58), o mais ativo.

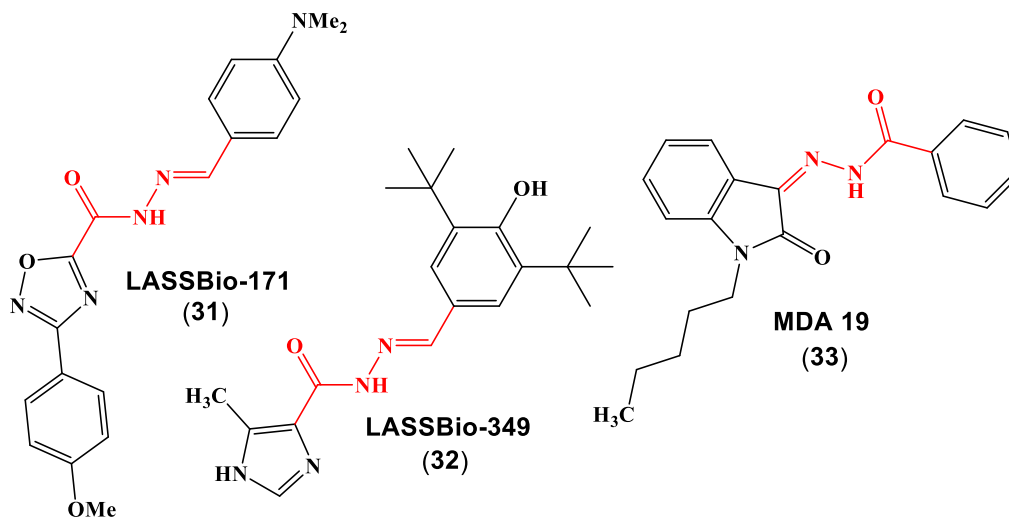


Figura 58 - Compostos com a subunidade *N*-acilidrazona relatados com atividade antinociceptiva.
Fonte: Do autor.

Uma análise comparativa dos dados obtidos para **PQM-56** e **PQM-75** em comparação com dados da literatura parece sugerir que a subunidade estrutural *N*-acilidrazona pode contribuir significativamente para a modulação de efeitos antinociceptivos. O padrão de substituição do anel aromático terminal (hidrazona) não parece seguir uma tendência quanto à natureza retiradora ou doadora de densidade eletrônica e seu efeito sobre a atividade analgésica, uma vez que os derivados 4-Cl (**PQM-56**) e 4-F (**PQM-67**) demonstraram atividade muito diferente, em favor de **PQM-56** que foi ativo. É possível que efeitos lipofílicos associados à presença do átomo de F em **PQM-67** possa ter alguma influência na passagem da barreira hemato-encefálica, prejudicando seu efeito central. Por outro lado, **PQM-65**, que possui um grupamento mais volumoso e doador de densidade eletrônica foi inativo, enquanto que **PQM-75**, substituído por uma unidade piperidinila, volumosa e mais lipofílica foi significativamente ativa, superando **PQM-56** no efeito neuropático. Estas observações não permitem concluir a cerca de efeitos auxofóricos dos substituintes, sobretudo pelo reduzido número de substâncias na série, o que compromete um estudo de relação estrutura-atividade mais adequado e conclusivo.

Para descartar os possíveis efeitos na coordenação motora, o que poderia gerar resultados falso positivos nos testes de nocicepção, julgamos interessante avaliar as substâncias mais ativas **PQM-56** e **PQM-75** no teste de rota-rod. Assim, estas substâncias

foram submetidas ao ensaio de rota-rod, no qual o animal é colocado sobre uma plataforma giratória e avalia-se sua coordenação motora e habilidade em manter-se sobre o objeto em movimento. Os resultados são apresentados na Figura 59 e evidenciam a ausência de qualquer efeito sobre a coordenação motora nos animais tratados com uma dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ de cada composto-teste, pois não alterou o tempo de permanência no rota-rod 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos, mas houve uma redução do tempo de permanência nos animais tratados com xilazina, um depressor do SNC, quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo. Estes resultados corroboram dados anteriores de nosso grupo em que não foram observados efeitos na locomoção por efeito destas substâncias no ensaio de campo aberto (*open field*) (VIEGAS, 2013).

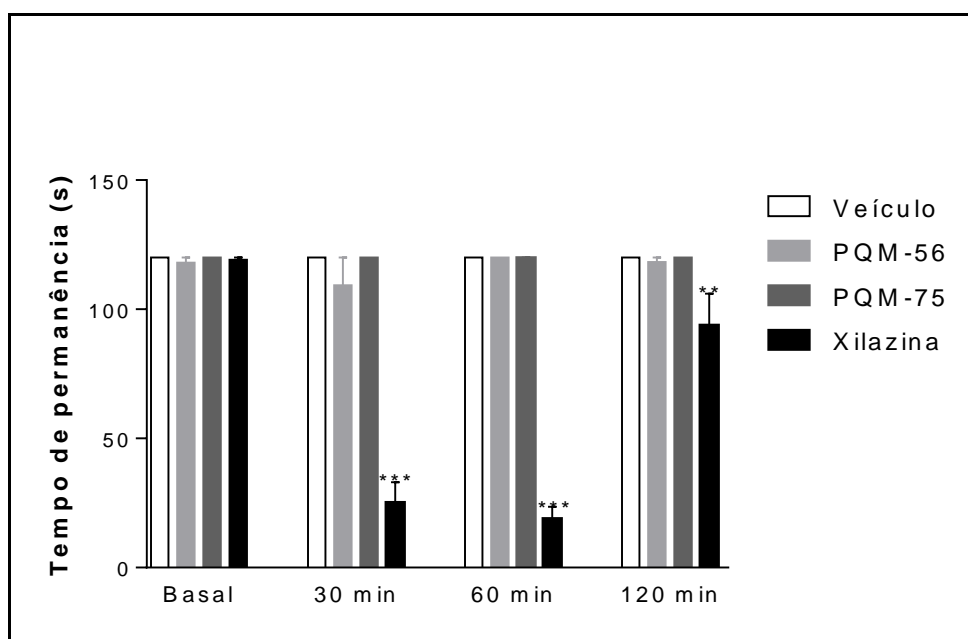


Figura 59 - Efeitos do tratamento oral com veículo, **PQM-56**, **PQM-75** ou xilazina (2 mg / kg; s.c.) na coordenação motora (tempo de permanência na haste rotativa em segundos) nos tempos 30, 60 e 120 minutos após o tratamento. Cada coluna representa a média (\pm S.E.M.) para 6 camundongos em cada grupo. Os asteriscos indicam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

As substâncias **PQM-56 (30a)**, **PQM-65 (30b)**, **PQM-67 (30c)** e **PQM-75 (30d)** foram obtidas com rendimentos globais de 40-62 %, após três etapas sintéticas. Todas as substâncias tiveram suas estruturas confirmadas por espectrometria de RMN de ^1H , ^{13}C e no IV. A avaliação desta série quanto à sua atividade antinociceptiva, observada preliminarmente no ensaio de formalina, foi confirmada nos modelos de retirada de cauda para avaliar analgesia central e de estimulação mecânica (Von Frey) em animais com amarração do nervo ciático para avaliação de analgesia neuropática. As substâncias **PQM-56** e **PQM-75** se destacaram em ambos os modelos, apresentando atividade antinociceptiva significativa em modelos experimentais de dor central e neuropática, na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$.

O estudo do mecanismo de ação revelou que estas substâncias atuam pela via opioide, visto que sua atividade foi revertida pela naloxona, evidenciando assim que estas substâncias possuem ação no SNC. As substâncias **PQM-56**, **PQM-65** e **PQM-67** já haviam sido testadas para o ensaio de campo aberto em ensaios prévios do nosso grupo na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, em que não foram observados efeitos adversos de locomoção. Este dado foi confirmado no ensaio de rota-rod, sem alteração na coordenação motora dos animais tratados com **PQM-56** e **PQM-75**, na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$.

Este conjunto de dados sugere fortemente que as substâncias **PQM-56** e **PQM-75** são potenciais candidatos a protótipos de fármacos com ação antinociceptiva, com padrão estrutural inovador, atuando na via opioide, com possível aplicação como analgésicos centrais e neuropáticos, porém sem efeito adversos na locomoção ou coordenação motora.

Ademais, estes resultados podem nortear futuras modificações estruturais ou novos derivados, utilizando-se do bioisosterismo como ferramenta de planejamento estrutural para a obtenção de uma nova série de compostos mais ativos, além de estudos adicionais com os enantiômeros puros.

Estudos adicionais de toxicidade aguda e crônica, bem como de estabilidade química, plasmática e de metabolismo precisam ser realizados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004.

AZAMI, J.; LLEWELYN M. B.; ROBERTS, M. H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**, v. 12, n. 3, p. 229-246, 1982.

BARON, R.; BINDER, A. How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept. **Orthopade**, v. 33, n. 5, p. 568-575, 2004.

BARREIRO, E. J. et al. A química medicinal de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BORCH, R. F.; BERNSTEIN, M. K.; DURST, H. D. The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 12, p. 2897-2904, 1971.

BORROTO-ESCUELA, D. O. et al. On the g-protein-coupled receptor heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions in the central nervous system: Focus on their role in pain modulation. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-17, 2013.

BRANCO, F. S. C. et al. Ressonância magnética nuclear de substâncias organofluoradas: um desafio no ensino de espectroscopia. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1237-1246, 2015.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman**. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

COLLEONI, M.; SACERDOTE, P. Murine models of human neuropathic pain. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1802, p. 924-933, 2010.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature reviews | disease primers**. v. 3, p. 1-19, 2017.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review Neuroscience**, v. 32, p. 1-32, 2009.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A Method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, n. 1, p. 74-79, 1941.

DEVOR, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 1S, p. S3-S12, 2006.

DIAZ, P. et al. Design and synthesis of a novel series of *N*-alkyl isatin acylhydrazone derivatives that act as selective cannabinoid receptor 2 agonists for the treatment of neuropathic pain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4932-4947, 2008.

DUARTE, C. D.; **Novos derivados *N*-acilidrazônicos planejados como candidatos a fármacos analgésicos e anti-inflamatórios**, 2006. 213 f. Tese (Doutorado em ciências). UFRJ-RJ, Rio de Janeiro, 2006.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; MANSSOUR-FRAGA, C. A. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini reviews in medicinal chemistry**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 11, p. 1108–1119, 2007.

DUBOVÝ P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy**. v. 193, p. 267–275, 2011.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.

EGUCHI, M. Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists. **Medicinal Research Reviews**, v. 24, n. 2, p. 182-212, 2004.

FARGHALY, H. S. M.; MAHMOUD, A. M.; ABDEL-SATER, K. A. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **European Journal of Pharmacology**, v. 776, p. 139-145, 2016.

FEIN, A. **Nociceptores**: As células que sentem dor. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line, 2011.

FIGUEIREDO, J. M. Design and synthesis of novel potent antinociceptive Agents: Methylimidazolyl *N*-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2243-2248, 2000.

FORNASARI, D. Pain pharmacology: focus on opioids. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 11, n. 3, p. 165-168, 2014.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 129-141, 1999.

GREGORY, N. et al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **Pain**, v. 14, n. 11, p. 1-26, 2014.

GUINDON, J. A novel inhibitor of endocannabinoid catabolic enzymes sheds light on behind the scene interplay between chronic pain, analgesic tolerance, and heroin dependence. **Neuropharmacology**, v. 114, p. 168-171, 2017.

GUNTER, B. R. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: ameta-analysis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, p. 27-38, 2017.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011.

HANNON, H. E.; ATCHISON, W. D. Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. **Marine Drugs**, v. 11, p. 680-699, 2013.

HENSCHKE, N.; KAMPER, S. J.; MAHER, C. G. The epidemiology and economic consequences of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 139-147, 2015.

HYLANDS-WHITE, N.; DUARTE, R. V.; RAPHAEL, J. H. An overview of treatment approaches for chronic pain management. **Rheumatology International**, 2016.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (2012). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/index.aspx>> Acesso em: 18 de Dez. 2016.

JANICKI, P. K.; PARRIS, W. Animal models for pain research. **Current Pain and Headache Reports**, v. 1, p. 271-277, 2008.

KAMI, K.; TAJIMA, F.; SENBA, E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. **Anatomical Science International**, v. 92, p. 79-90, 2017.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH editora Ltda, 2014.

KIM, S. et al. Zinc-modified cyanoborohydride as a selective reducing agent. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, p. 1927-1932, 1985.

LAAR, M. V. et al. Pain treatment in arthritis-related pain: Beyond NSAIDs. **The Open Rheumatology Journal**, v. 6, p. 320-330, 2012.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEITE, L. F. C. C. et al. Synthesis and analgesic profile of novel *N*-containing heterocycle derivatives: arylidene 3-phenyl-1,2,4-oxadiazole-5-carbohydrazide. **II Farmaco**, v. 54, p. 747-757, 1999.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência**, São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.

LIMA, P. C. et al. Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p.187-203, 2000.

LI, R. et al. Analgesic effect of coumarins from radix angelicae pubescentis is mediated by inflammatory factors and TRPV1 in a spared nerve injury model of neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 81-88, 2017.

LIU, C.N. et al. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. **Neuroscience**, v. 105, p. 265-75, 2001.

MACPHERSON, R. D. The pharmacological basis of contemporary pain management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, p. 163-185, 2000.

MAIA, R. DO C.; TESCH, R.; MANSSOUR FRAGA, C. A. Acylhydrazone derivatives: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 11, p. 1161–1170, 2014.

MENDEZ, S. P. et al. Desenvolvimento de uma cartilha educativa para pessoas com dor crônica. **Rev. dor**, v.18, n.3, p. 199-2011, 2017.

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 32, n. 4, p. 197-200, 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: a integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p.3474-3555, 2002.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 69-85, 2009.

OLIVEIRA, C. M. **Investigação da atividade antiproliferativa de derivados *N*-Benzil-piperidínicos acilidrazônicos**. 2017. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). UNIFAL-MG, Alfenas, 2017.

PALLA, G.; et al. Conformational behaviour and E/Z isomerization of *N*-acyl and *N*-aroylhydrazones. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3649-3654, 1986.

PAPIR-KRICHELI, D. et al. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. **Pain**, v. 31, n. 2, p. 263-276, 1987.

PATRICK, G. L. **An Introduction to medicinal chemistry**. 5. ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**. 5. ed. USA: Cengage Learning, 2013.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W.L.F. **Purification of laboratory chemicals**. 3. ed. England: Pergamon Press plc, 1988.

PRETSCH, E.; BUHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds: tables of spectral data**. 4. ed. Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2009.

ROMEIRO, N. C. et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-*N*-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.17, p. 641–652, 2009.

RUBIRALTA, M.; GIRALT, E.; DIEZ, A. **Structure, preparation, reactivity, and synthetic applications of piperidine and its derivatives**. 1. ed. New York: Elsevier Ltd, 1991.

SCHNEIDER, P. et al. Altered synaptic phospholipid signaling in PRG-1 deficient mice induces exploratory behavior and motor hyperactivity resembling psychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 1-7, 2018.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y.; A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1999.

SILVA, G. A. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10*H*-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3149–3158, 2004.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, p. 18-23, 2013.

SIMON, J. P.; PRINCE, S. E. Natural remedies for non-steroidal anti-inflammatory drug-induced toxicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, p. 71-83, 2017.

SZCZUDLIK, A. et al. Diagnosis and management of neuropathic pain: Review of literature and recommendations of the polish association for the study of pain and the polish neurological society – Part two. **Neurologia I Neurochirurgia Polska**, v. 48, n. 6, p. 423-435, 2014.

TRACEY, D. J.; WALKER, J. S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflammation Research**, v. 44, n. 10, p. 407-411, 1995.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W.; The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

VELASCO, M.; O'SULLIVAN, C.; SHERIDAN, G.K. Lysophosphatidic acid receptors (LPARs): Potential targets for the treatment of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 608-617, 2017.

VIEGAS, F. P. D. **Síntese e estudo farmacológico de novos candidatos a protótipos de fármacos de ação dupla úteis ao tratamento da doença de Alzheimer**, 2013. 155f. Dissertação (Mestrado em Química). UNIFAL-MG, Alfenas, 2013.

VITOR, A. O. et al. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **RECIIS**, v. 2, n. 1, p. 87-96, 2008.

WALKER, K.; FOX, A. J.; URBAN, L. A. Animal models for pain research. **Molecular Medicine Today**, v. 5, p. 319-321, 1999.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A.; Kinins and kinin receptors in the nervous system, **Neurochem Int**, v. 26, p. 1-16, 1995.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 01 Set. 2017.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal Pharmacology**, v. 429, p. 23-37, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabelas de dados obtidos e de comparação de RMN de ^1H e ^{13}C .Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**27**) (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta^1\text{H}$ e $^*\delta^{13}\text{C}$).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^*\delta^1\text{H}$ (ppm)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	--	--	--	144,7	--	143,3
3	7,44	d	8,4	130,5	7,43	129,1
4	7,96	d	8,4	130,5	7,95	129,1
5	--	--	--	130,3	--	129,1
6	7,96	d	8,4	130,5	7,95	129,1
7	7,44	d	8,4	130,5	7,43	129,1
8	--	--	--	168,4	--	167,0
10	3,64-3,54	m	--	63,5	3,57	62,1
12	(H ax) 1,96-1,86 (H eq) 2,87-2,83	m	--	61,7	(H ax) 1,91-1,86 (H eq) 2,86-2,82	60,3
13	3,70-3,61	m	--	67,9	3,70-3,62	66,5
14	(H ax) 1,29-1,17 (H eq) 1,96-1,86	m	--	33,8	(H ax) 1,24-1,19 (H eq) 1,91-1,86	32,4
15	(H ax) 1,62-1,49 (H eq) 1,77-1,69	m	--	24,0	(H ax) 1,58-1,49 (H eq) 1,76-1,68	22,6
16	(H ax) 2,08-2,00 (H eq) 2,70-2,64	m	--	54,4	(H ax) 2,06-2,02 (H eq) 2,67-2,64	53,0
18	3,89	s	--	52,6	3,88	51,2

Fonte: Do autor.

*Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) utilizados como referência do banco de dados do PeQuiM (OLIVEIRA, 2017).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**28**) (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta^1\text{H}$ e $^*\delta^{13}\text{C}$).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^*\delta^1\text{H}$ (ppm)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	--	--	--	142,8	--	141,3
3	7,43	d	8,4	128,2	7,42	126,8
4	7,75	d	8,4	130,7	7,75	129,2
5	--	--	--	133,2	--	131,8
6	7,75	d	8,4	130,7	7,75	129,2
7	7,43	d	8,4	128,2	7,42	126,8
8	--	--	--	169,5	--	168,0
10	3,63-3,54	m	--	63,5	3,57	62,1
12	(H ax) 1,97-1,86	m	--	61,6	(H ax) 1,96-1,90	60,2
	(H eq) 2,88-2,84				(H eq) 2,87-2,83	
13	3,71-3,63	m	--	67,8	3,67-3,63	66,4
14	(H ax) 1,29-1,17	m	--	33,8	(H ax) 1,28-1,21	32,4
	(H eq) 1,97-1,86				(H eq) 1,96-1,90	
15	(H ax) 1,62-1,49	m	--	23,9	(H ax) 1,59-1,51	22,5
	(H eq) 1,78-1,70				(H eq) 1,74-1,71	
16	(H ax) 2,10-2,02	m	--	54,3	(H ax) 2,08-2,01	52,9
	(H eq) 2,72-2,66				(H eq) 2,69-2,65	

Fonte: Do autor.

*Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) utilizados como referência do banco de dados do PeQuiM (OLIVEIRA, 2017).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**30a**) (^1H CD_3OD , 300 e ^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta^1\text{H}$ e $^*\delta^{13}\text{C}$).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^*\delta^1\text{H}$ (ppm)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	--	--	--	134,9	--	134,9
2	7,65	d	8,1	129,4	7,56	129,4
3	8,03	d	8,1	128,3	7,95	128,1
4	--	--	--	132,8	--	132,4
5	8,03	d	8,1	128,3	7,95	128,1
6	7,65	d	8,1	129,4	7,56	129,4
7	--	--	--	163,5	--	163,5
10	4,12-4,03	m	--	61,3	3,59	63,2
12	(H ax) 2,01-1,94 (H eq) 3,11-3,06	m	--	60,1	(H ax) 1,89-1,86 (H eq) 2,98-2,94	61,8
13	3,92-3,86	m	--	65,6	3,84	66,1
14	(H ax) 1,01-0,92 (H eq) 2,01-1,94	m	--	32,9	(H ax) 1,42-1,28 (H eq) 1,89-1,86	33,3
15	(H ax) 1,29-1,14 (H eq) 1,71-1,51	m	--	22,6	(H ax) 1,42-1,28 (H eq) 1,85-1,61	23,2
16	(H ax) 2,75-2,55 (H eq) 3,03-2,96	m	--	53,0	(H ax) 2,44-2,28 (H eq) 2,84	53,0
18	8,45	s	--	147,0	8,34	146,9
19	--	--	--	132,8	--	132,4
20	7,46	d	8,1	129,4	7,44	129,4
21	7,86	d	8,4	129,4	7,83	129,4
22	--	--	--	133,8	--	133,8
23	7,86	d	8,4	129,4	7,83	129,4
24	7,46	d	8,1	129,4	7,44	129,4

Fonte: Do autor.

*Dados de RMN de (^1H CD_3OD , 300 MHz) e (^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) utilizados como referência do banco de dados do PeQuiM (OLIVEIRA, 2017).

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**30b**) (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta^1\text{H}$ e $^*\delta^{13}\text{C}$).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^*\delta^1\text{H}$ (ppm)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	--	--	--	142,8	--	134,4
2	7,52	d	8,1	130,9	7,51	129,2
3	7,93	d	8,4	128,8	7,91	128,1
4	--	--	--	133,3	--	132,7
5	7,93	d	8,4	128,8	7,91	128,1
6	7,52	d	8,1	130,9	7,51	129,2
7	--	--	--	166,6	--	162,0
10	3,72-3,66	m	--	63,3	3,70	59,5
12	(H ax) 2,08-2,01 (H eq) 2,93-2,88	m	--	61,4	(H ax) 2,10-2,03 (H eq) 2,93-2,88	59,5
13	3,72-3,66	m	--	67,6	3,70	61,9
14	(H ax) 1,32-1,26 (H eq) 1,93-1,76	m	--	33,5	(H ax) 1,35-1,28 (H eq) 1,92-1,77	27,7
15	(H ax) 1,64-1,54 (H eq) 1,93-1,76	m	--	23,7	(H ax) 1,64-1,56 (H eq) 1,92-1,77	17,5
16	(H ax) 2,21-2,14 (H eq) 2,77-2,71	m	--	54,4	(H ax) 2,23-2,17 (H eq) 2,77-2,73	54,5
18	8,34	s	--	150,8	8,30	149,7
19	--	--	--	128,0	--	126,5
20	7,78	d	8,7	130,6	7,78	131,3
21	6,99	d	8,7	115,3	6,99	113,9
22	--	--	--	163,3	--	164,5
23	6,99	d	8,7	115,3	6,99	113,9
24	7,78	d	8,7	130,6	7,78	131,3
27	3,84	s	--	55,9	3,84	56,4

Fonte: Do autor.

*Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) utilizados como referência do banco de dados do PeQuiM (OLIVEIRA, 2017).

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**30c**) (^1H CD_3OD , 300 e ^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta^1\text{H}$ e $^*\delta^{13}\text{C}$).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^*\delta^1\text{H}$ (ppm)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	--	--	--	142,7	--	142,7
2	7,52	d	7,8	127,7	7,63	127,6
3	7,95-7,88	m	--	128,7	8,00	129,3
4	--	--	--	131,8	--	132,0
5	7,95-7,88	m	--	128,7	8,00	129,2
6	7,52	d	7,8	127,7	7,63	127,6
7	--	--	--	163,2	--	163,1
10	3,70-3,65	m	--	61,8	4,08	61,7
12	(H ax) 2,02-1,92 (H eq) 2,92-2,86	m	--	61,1	(H ax) 2,62 (H eq) 3,09-3,00	61,1
13	3,70-3,65	m	--	66,1	3,90	66,1
14	(H ax) 1,32-1,24 (H eq) 2,02-1,92	m	--	33,3	(H ax) 1,54-1,51 (H eq) 2,00	33,2
15	(H ax) 1,63-1,52 (H eq) 1,80-1,73	m	--	23,3	(H ax) 1,75-1,72 (H eq) 1,89-1,82	23,2
16	(H ax) 2,15-2,08 (H eq) 2,74-2,69	m	--	53,0	(H ax) 2,82 (H eq) 3,09-3,00	53,0
18	8,39	s	--	146,7	8,39	146,5
19	--	--	--	131,1	--	131,0
20	7,95-7,88	m	--	129,3	7,88	128,7
21	7,18	t	9,0	116,0	7,17	116,1
22	--	--	--	163,2	--	164,8; 161,5
23	7,18	t	9,0	116,0	7,17	116,1
24	7,95-7,88	m	--	129,3	7,88	128,7

Fonte: Do autor.

*Dados de RMN de (^1H CD_3OD , 300 MHz) e (^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) utilizados como referência do banco de dados do PeQuiM (OLIVEIRA, 2017).

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**30d**) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 e 75 MHz) e dados de referência do PeQuiM ($^*\delta^1\text{H}$ e $^*\delta^{13}\text{C}$).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^*\delta^1\text{H}$ (ppm)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	--	--	--	142,1	--	142,3
2	7,50	d	8,1	128,1	7,50	127,9
3	8,26	d	8,1	129,6	8,26	129,2
4	--	--	--	134,0	--	132,9
5	8,26	d	8,1	129,6	8,26	129,2
6	7,50	d	8,1	128,1	7,50	127,9
7	--	--	--	164,6	--	163,1
8	12,36	s	--	--	--	--
10	3,59-3,48	m	--	62,5	3,55-3,53	62,0
12	(H ax) 2,24-1,98	m	--	61,6	(H ax) 2,25-1,98	61,2
	(H eq) 2,65-2,63				(H eq) 2,67-2,63	
13	4,09-4,02	m	--	66,8	4,10-4,03	66,3
14	(H ax) 1,72-1,55	m	--	33,8	(H ax) 1,74-1,55	33,5
	(H eq) 2,24-1,98				(H eq) 2,25-1,98	
15	(H ax) 1,72-1,55	m	--	23,5	(H ax) 1,74-1,75	23,4
	(H eq) 1,72-1,55				(H eq) 1,74-1,75	
16	(H ax) 2,24-1,98	m	--	53,6	(H ax) 2,25-1,98	51,3
	(H eq) 2,24-1,98				(H eq) 2,25-1,98	
18	8,72	s	--	149,2	8,74	148,6
19	--	--	--	124,9	--	123,8
20	7,92	d	8,7	129,3	7,92	128,8
21	6,97	d	8,7	115,4	6,97	115,0
22	--	--	--	153,4	--	152,8
23	6,97	d	8,7	115,4	6,97	115,0
24	7,92	d	8,7	129,3	7,92	128,8
26	3,13-3,09	m	--	49,2	3,11	48,8
27	1,47-1,39	m	--	25,7	1,49-1,41	25,4
28	1,47-1,39	m	--	24,5	1,49-1,41	24,3
29	1,47-1,39	m	--	25,7	1,49-1,41	25,4
30	3,13-3,09	m	--	49,2	3,11	48,8

Fonte: Do autor.

*Dados de RMN de (^1H $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) e (^{13}C $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) utilizados como referência do banco de dados do PeQuiM (OLIVEIRA, 2017).