

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL/MG

Graziella dos Reis Rosa Franco

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS ARIL-ACILIDRAZÔNICOS DO
CANABIDIOL**

Alfenas/MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL/MG

Graziella dos Reis Rosa Franco

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS ARIL-ACILIDRAZÔNICOS DO
CANABIDIOL**

Defesa de dissertação apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior.
Co-orientadora: Dra. Vanessa Silva Gontijo

Alfenas/MG

2019

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

F825s Franco, Graziella dos Reis Rosa
Síntese e avaliação de novos análogos aril-acilidrazônicos do canabidiol /
Graziella dos Reis Rosa Franco. – Alfenas/MG, 2019.
139 f.: il --

Orientador: Cláudio Viegas Júnior.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de
Alfenas, Alfenas, MG, 2019.
Bibliografia.

1. Canabidiol. 2. Canabinoides. 3. Doenças Neurodegenerativas.
4. Antioxidantes. 5. Antidepressivos. I. Viegas Júnior, Cláudio. II. Título.

CDD-547

Graziella dos Reis Rosa Franco

“Síntese e avaliação de novos análogos aril-acilidrazônicos do canabidiol”

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: 08, 02, 2019

Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Lucas Lopardi
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho à minha família, em especial meus pais, que sempre me incentivaram e apoiaram no decorrer destes anos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes dois anos de mestrado, algumas pessoas me ajudaram para que este sonho se tornasse realidade. Eu agradeço primeiramente a Deus, que desde o começo abriu as portas pra mim, mesmo quando eu pensava que não ia dar certo, porque se não fosse da vontade d'Ele e não estivesse em conformidade com os Seus planos para a minha vida, nada disso teria dado certo.

Agradeço aos meus pais (Seneval e Gislaine) que sempre me incentivaram a fazer pós-graduação, e por 1 ano e meio falaram na minha cabeça para eu estar dando continuidade os meus estudos e futuramente tornar-me professora universitária, os quais me deram todo o suporte necessário por estes anos de estudo e dedicação, e muitas vezes me viram sofrer. Também ao meu noivo, Marcos Paulo, que aguentou ficar mais longe de mim por estes anos, e me apoiou, e aquietou meu coração nos momentos de estresse provenientes dos desafios laboratoriais.

Agradeço à equipe do PeQuiM, em especial e, primeiramente, ao Prof. Dr. Claudio Viegas Jr. que abriu as portas do laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM) e apostou/acreditou em mim, me dando uma grande oportunidade de ampliar meus conhecimentos na área de química orgânica, sendo meu mentor. Aos colegas por todo apoio, cumplicidade, troca de conhecimento, festinhas, risadas e principalmente pela amizade que eu espero levar por toda vida; em especial à Vanessa, minha coorientadora, que me ajudou muitíssimo desde o primeiro contato com o laboratório, nas reações e colunas que não davam certo (rs); sem o seu ensino, sua dedicação e paciência nada disso seria possível.

Aos meus colaboradores; no laboratório de Fisiologia a Profa. Dra. Fabiana Giusti e as suas alunas Tatiane e Ana Claudia que me auxiliaram nos testes *in vivo* e onde pudemos ter boas conversas sobre a vida e me tranquilizavam em relação aos testes e também sobre o futuro (casamento).

RESUMO

Este trabalho teve seu enfoque na síntese de análogos racionalmente planejados, inspirados na estrutura do canabidiol (CBD), tendo as *R*- e *S*-carvonas como materiais de partida. Foram sintetizadas, caracterizadas e avaliadas por estudos *in silico* e farmacológicos 8 substâncias denominadas **PQM-242** a **PQM-249** com padrão estrutural inédito. A análise da atividade sequestrante de radicais DPPH mostrou que as substâncias apresentaram propriedades antioxidantes semelhantes à quercetina e ao ácido ascórbico, com destaque para **PQM-247**, com $CI_{50} = 4,76\mu M$ e um bom perfil quelante de metais, especialmente para Zn^{2+} . O estudo *in silico* das propriedades ADME sugeriu que **PQM-244**, **PQM-245**, **PQM-248** e **PQM-249** têm a possibilidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, gerando uma melhor atividade no SNC, enquanto que o *docking* molecular mostrou que os compostos-alvo possuem uma boa afinidade com os receptores canabinoides, especialmente com o receptor CB1, para o qual a **PQM-249** exibiu uma afinidade discretamente maior que o CBD. A avaliação farmacológica *in vitro* mostrou que as substâncias não são citotóxicas, à exceção de **PQM-244** e **PQM-247** que apresentaram valores de CC_{50} de 2,92 e 7,95 μM , respectivamente. Nos modelos de atividade tipo-antidepressiva (teste de nado forçado e teste de suspensão pela cauda) e tipo-ansiolítica (teste de campo aberto e teste claro-escuro), as substâncias não demonstraram efeito ansiolítico. Entretanto, os resultados indicaram que elas atuam como antidepressivos na dose de 100 μM (10mg/Kg para o CBD) com destaque para **PQM-249** que mostrou efeito antidepressivo em ambos os ensaios.

Palavras-chave: Canabidiol. Canabinoides. Doenças neurodegenerativas. Antioxidante.

Antidepressiva.

ABSTRACT

This work focused on the synthesis of rationally drug designed, inspired by the structure of cannabidiol (CBD), with *R* and *S*-carvone as starting materials. Eight substances named **PQM-242** to **PQM-249**, with novel structural pattern, were synthesized, characterized and evaluated by *in silico* and pharmacological models. The analysis of the scavenging activity of DPPH radicals showed their antioxidant properties similar to quercetin and ascorbic acid, especially for **PQM-247** with IC₅₀ of 4.76 μM and a good metal chelating activity, especially for Zn²⁺. The *in silico* study suggested that **PQM-244**, **PQM-245**, **PQM-248** and **PQM-249** have adequate ability for overcoming the blood brain barrier, leading to better CNS activity, whereas molecular docking studies showed that the target-compounds have good affinities for cannabinoid receptors, especially for CB1, for which **PQM-249** exhibited an affinity slightly greater than CBD. *In vitro* pharmacological evaluation showed that the target-substances are not cytotoxic, except for **PQM-244** and **PQM-247**, which exhibited CC₅₀ values of 2.92 and 7.95 μM, respectively. In the antidepressive-type models (forced swimming test and tail suspension test) and anxiolytic-type models (open field test and light-dark test), the substances did not show an anxiolytic effect. However, they have been shown to act as antidepressants in the dose of 100 μM (10 mg/kg for CBD), highlighting compound **PQM-249** that showed antidepressant effect in both tests.

Keywords: Cannabidiol. Cannabinoids. Neurodegenerative diseases. Antioxidant. Antidepressant.

LISTA DE ESQUEMAS E ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 - Planejamento racional das séries A-E baseadas na estrutura do CBD (2).....	43
Esquema 2 - Análise retrossintética.....	46
Esquema 3 - Abordagem sintética para a obtenção da série-alvo A de análogos aril-acilidrazônicos do canabidiol (2).	47
Esquema 4 -Tentativa de obtenção da di-hidrocarvona.	48
Esquema 5 - Tentativa de obtenção dos precursores-chave para a síntese da série D.....	49
Esquema 6 - Rota sintética adotada para a obtenção dos análogos aril-acilidrazônicos do CBD PQM-242 a PQM-249.	50
Esquema 7 -Síntese dos ésteres (36-39) derivados de ácido benzoíco, por reação de esterificação de Fischer, na presença de H ₂ SO ₄ como catalisador e CH ₃ OH.....	51
Esquema 8 - Mecanismo da reação de esterificação de Fischer.....	52
Esquema 9 - Síntese das benzoidrazidas (40-43), através de reação de hidrazinólize, para a formação do intermediário chave.	56
Esquema 10 - Proposta mecanística para a etapa de hidrazinólize.....	57
Esquema 11 - Síntese dos compostos finais (44-51)	61
Esquema 12 - Proposta mecanística para a obtenção das benzoidrazonas (44-51).	61
Esquema 13 - Síntese dos ésteres (36-39), por reação de esterificação de Fischer, na presença de H ₂ SO ₄ como catalisador e CH ₃ OH.	84
Esquema 14 - Síntese das benzoidrazidas (40-43), através de reação de hidrazinólize, para a formação do intermediário-chave.	86
Esquema 15 - Reações de acoplamento das benzoidrazidas (40-43) com as carvonas (R e S).88	
Figura 1- Estruturas químicas do Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC, 1) e canabidiol (CBD, 2).	19
Figura 2 - Ilustração de aspectos morfológicos da <i>Cannabis sativa</i> e <i>C. indica</i>	21
Figura 3 - Estrutura dos principais canabinoides encontrados na <i>Cannabis</i>	22
Figura 4 - Estruturas químicas dos endocanabinoides:AEA (11), AG (12), noladina (13), virodamina (14) e N-aracdonildopamina (15).	23
Figura 5 - Representação esquemática do sistema endocanabinoides	24
Figura 6 - Exemplos de estruturas dos agonistas de receptores canabinoides CP 55,244 (16) e WIN 56,098 (17).	26
Figura 7 - Estrutura química de SR 144528 (18), um antagonista de CB2.....	28
Figura 8 - Aspectos conformacionais do THC: (direita) e do CBD (esquerda).	29

Figura 9 - Estrutura dos metabólitos 7-hidroxicanabidiol (19) e 7-carboxicanabidiol (20). ...	29
Figura 10 - Possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito neuroprotetor do canabidiol.	31
Figura 11 - Estruturas de alguns exemplos de fármacos antipsicóticos: haloperidol (21) e clozapina (22).	35
Figura 12 - Estrutura química da olanzapina (22)	40
Figura 13 - Espectro de absorção na região do IV da 4-hidroxibenzoato de metila (36) (ATR).	53
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 4-hidroxibenzoato de metila (36).	54
Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da 4-hidroxibenzoato de metila (36).	55
Figura 16 - Espectro de absorção na região do IV da 4-hidroxibenzoidrazida (40) (ATR).....	58
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da 4-hidroxibenzoidrazida (40). 59	
Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da 4-hidroxibenzoidrazida (40). 60	
Figura 19 - Espectro de absorção na região do IV da benzoidrazona PQM-242 (44) (ATR).. 62	
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto PQM-242 (44). 63	
Figura 21 - Modelo dos acoplamentos geminais (A) e vicinais (B) que ocorrem na molécula de acordo com J	64
Figura 22 - Modelo de das áreas cônicas que influenciam no deslocamento dos H16 e H14 . 65	
Figura 23 - Dependência da magnitude de $^2J_{\text{HCH}}$, a constante de acoplamento	65
Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto PQM-242 (44). 67	
Figura 25 - Expansão do mapa de contornos HMQC do composto PQM-242 (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	67
Figura 26 - Espectro de massas <i>ESI</i> do composto PQM-242 (44)	68
Figura 27 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-247 (48) 69	
Figura 28 - Modelo molecular de CB2 com o ancoramento do Taranabant. 74	
Figura 29 - Viabilidade celular a partir do tratamento com as substâncias PQM-242 a PQM-245	77
Figura 30 - Viabilidade celular a partir do tratamento com as substâncias PQM-246 a PQM-249	78
Figura 31 - Número de entradas no centro (A), no número de entradas na periferia (B) e no número total.....	79

Figura 32 - Tempo de permanência no claro (A) e no tempo de permanência no escuro (B) do CBD e PQM-242 a PQM-249 quando comparadas ao veículo no teste claro-escuro.	80
Figura 33 - Tempo de imobilidade do CBD e PQM-242 a PQM-249 quando comparadas ao veículo no teste de nado forçado	81
Figura 34 - Tempo de imobilidade do CBD e PQM-242 a PQM-249 quando comparadas ao veículo no teste de suspensão pela cauda.....	82
Figura 35 - Aparato para o teste de claro-escuro.....	99
Figura 36 - Exemplo de como o animal é suspenso.....	99
Figura 37 - Espectro de absorção na região do IV do composto 4-metoxibenzoato de metila (37) (ATR).....	114
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 4-metoxibenzoato de metila (37).....	114
Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 4-metoxibenzoato de metila (37).....	115
Figura 40 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-diidroxibenzoato de metila (38) (ATR).....	115
Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 3,4-diidroxibenzoato	116
Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 3,4-diidroxibenzoato	116
Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-dimetoxibenzoato de metila (39) (ATR).....	117
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoato de	117
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, (CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoato de	118
Figura 46 - Espectro de absorção na região do IV do composto 4-metoxibenzoidrazida (41) (ATR).....	118
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 4-metoxibenzoidrazida (41).....	119
Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, (CDCl_3) do composto 4-metoxibenzoidrazida (41).....	119

Figura 49 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-di-hidroxibenzoidrazida (42) (ATR).....	120
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto 3,4-di-hidroxibenzoidrazida (42).....	120
Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto 3,4-di-hidroxibenzoidrazida (42).....	121
Figura 52 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43) (ATR).....	121
Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43).....	122
Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43).....	122
Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-243 (45) (ATR).....	123
Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-243 (45)...	123
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-243 (45)....	124
Figura 58 - Espectro de Massas (<i>ESI</i>) do composto PQM-243.....	124
Figura 59 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-243.	125
Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-244 (46) (ATR).....	125
Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-244 (46).....	126
Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-244 (46).....	126
Figura 63 - Espectro de Massas (<i>ESI</i>) do composto PQM-244.....	127
Figura 64 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-244.	127
Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-245 (47) (ATR).....	128
Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-245 (47).....	128
Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-245 (47).....	129
Figura 68 - Espectro de Massas (<i>ESI</i>) do composto PQM-245.....	129
Figura 69 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-245 (47)...	130
Figura 70 - Espectro de Infravermelho do composto PQM-247 (48) (ATR).....	130
Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-247 (48)...	131
Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-247 (48)....	131
Figura 73: Espectro de Massas (<i>ESI</i>) do composto PQM-247.....	132
Figura 74: Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-247 (48)...	132
Figura 75 - Espectro na região do IV do composto PQM-246 (49) (ATR).	133
Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-246 (49)...	133

Figura 77 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-246 (49)....	134
Figura 78: Espectro de Massas (<i>ESI</i>) do composto PQM-246.....	134
Figura 79 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-246 (49)...	135
Figura 80 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-249 (50) (ATR).....	135
Figura 81 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-249 (50).....	136
Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-249 (50).....	136
Figura 83 - Espectro de Massas (<i>ESI</i>) do composto PQM-249.....	137
Figura 84 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-249 (50)...	137
Figura 85 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-248 (51) (ATR).....	138
Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-248 (51).....	138
Figura 87 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-248 (51).....	139
Figura 88 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-248 (51)...	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da avaliação de atividade antioxidante dos compostos PQM-242 (44) , PQM-243 (45) , PQM-244 (46) , PQM-245 (47) , PQM-246 (48) , PQM-247 (49) , PQM-248 (50) , PQM-249 (51)	71
Tabela 2 - Dados da predição ADME dos compostos finais.....	73
Tabela 3 - Previsão de afinidade nos receptores CB1 e CB2 a partir do Docking Molecular.	75
Tabela 4 - Determinação da concentração citotóxica para 50% das células.	78

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

2-AG	2-aracdonoilglicerol
5-HT _{1a}	Receptor serotoninérgico
AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilciclase
Ach	Neurotransmissor acetilcolina
AchT	Colina acetiltransferase
ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
AEA	Anandamida
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APP	gene da proteína precursora β -amiloide
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
β A	β -amiloide
CAM	Medicina complementar alternativa
CB1	Receptor canabinoide do tipo 1
CB2	Receptor canabinoide do tipo 2
CBC	Canabiconemo
CBD	Canabidiol
CBE	Canabielsoin
CBG	Canabigerol
CBL	Canabicyclol
CBN	Canabinol
CBND	Canabinodiol
CBT	Canabitriol
D2R	Receptores dopaminérgicos do subtipo D2
DA	Doença de Alzheimer
DAGL α e β	Diacilglicerol-lipase alfa e beta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EEG	Eletroencefalograma
ERN	Espécies reativas de nitrogênio

ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAAH	Hidrolase de amida de ácido graxo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Neurotransmissor Ácido gama-aminobutírico
GPRC	Receptores acoplados a proteína G
GPR55	Receptor 55 acoplado a proteína G
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MAGL	Monoacilglicerol
MHz	Mega Hertz
MPP+	Neurotoxina que causa os sintomas permanentes na DP
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina precursor da MPP+
NAPE	N-acil-fosfatidiletanolamina-fosfolipase
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NF	Nado Forçado
NOE	Efeito nuclear Overhauser
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomas
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SD	Síndrome de Dravet
SEC	Sistema endocanbinoide
SEM	Erro padrão da média
SLG	Síndrome de Lennox-Gasteaut
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPC	Suspensão pela Cauda
TBA	Brometo de tetrabutilamônio
Δ ⁸ - THC	Δ ⁸ -tetraidrocandiol
THC	Δ ⁹ -tetraidrocandiol
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Teste de nado forçado
TRPV	Receptor potencial transiente vaniloide

USP

Universidade Estadual de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	A PLANTA <i>Cannabis sativa</i>	21
2.2	OS CANABINOIDES	21
2.3	SISTEMA ENDOCANABINOIDE (SEC)	23
2.3.1	Receptores endocanabinoides	25
2.3.1.1	O receptor CB1.....	25
2.3.1.2	O receptor CB2.....	26
2.4	O CANABIDIOL	28
2.4.1	Ação do canabidiol no organismo	30
2.5	DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) QUE PODEM SER TRATADAS POR CBD.....	32
2.5.1	Epilepsia	32
2.5.2	Esquizofrenia	34
2.5.3	Doença de Parkinson (DP)	36
2.5.4	Doença de Alzheimer (DA)	38
3	JUSTIFICATIVA	42
4	OBJETIVOS	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1	QUÍMICA.....	45
5.1.1	Síntese e caracterização dos ésteres (36, 37, 38 e 39) derivados de ácidos benzoicos: ácido 4-hidroxibenzoico (32), ácido 4-metoxibenzoico (33), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (34) e ácido 3,4-dimetoxibenzoico (35).	50
5.1.2	Síntese e caracterização das benzoidrazidas: 4-hidroxibenzoidrazida (40), 4-metoxibenzoidrazida (41), 3,4-diidroxibenzoidrazida (42) e 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43).	56

5.1.3	Síntese e caracterização das benzoidrazonas PQM-242 (44), PQM-243 (45), PQM-244 (46), PQM-245 (47), PQM-246 (49), PQM-247 (48), PQM-248 (51) e PQM-249 (50).....	60
5.1.4	Avaliação da atividade quelante de metais	69
5.1.5	Atividade Sequestrante de Radicais DPPH	70
5.1.6	Predição das propriedades físico-químicas ADME dos compostos finais.....	72
5.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	76
5.2.1	Avaliação da viabilidade celular pela técnica MTT.....	76
5.2.2	Avaliação das atividades antidepressivas e ansiolíticas em testes com animais	78
6	PARTE EXPERIMENTAL	83
6.1	QUÍMICA.....	83
6.1.1	Generalidades	83
6.1.2	Síntese dos ésteres: 4-hidroxibenzoato de metila (36), 4-metoxibenzoato de metila (37), 3,4-diidroxibenzoato de metila (38), 3,4-dimetoxibenzoato de metila (39).	84
6.1.3	Síntese das benzoidrazidas: 4-hidroxibenzoidrazida (40), 4-metoxibenzoidrazida (41), 3,4-di-idroxibenzoidrazida (42) e 3,4 dimetoxibenzoidrazida (43).	86
6.1.4	Síntese dos análogos acilidrazônicos (44-51) do canabidiol	88
6.1.5	Avaliação da atividade quelante de metais	93
6.1.6	Atividade Sequestrante de Radicais DPPH	93
6.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	94
6.2.1	Animais	94
6.2.1.1	Ensaio <i>in vitro</i>.....	94
6.2.1.2	Testes <i>in vivo</i>.....	95
6.2.2	Cultura de célula.....	95
6.2.3	Ensaio de toxicidade	96
6.2.4	Concentração das substâncias utilizadas nos testes comportamentais.	96
6.2.5	Delineamento Experimental dos testes comportamentais.....	97
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	101

REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICES.....	114

1. INTRODUÇÃO

O primeiro uso documentado da *Cannabis* para fins terapêuticos aparece por volta de 2300 a.C., por um imperador chinês, que prescreveu a *chu-ma* (*Cannabis* fêmea) para o tratamento de constipação, gota, beribéri, malária, reumatismo e problemas menstruais, sendo classificada por ele como um dos Supremos Elixir da Imortalidade¹. A busca por efeitos terapêuticos a partir da *Cannabis* é estudado por cientistas há mais de 50 anos e, nos últimos 10 anos, há uma nova fase de estudos que destacam componentes da maconha, como o Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC, **1**) e canabidiol (CBD, **2**, **Figura 1**) para uso como medicamentos².

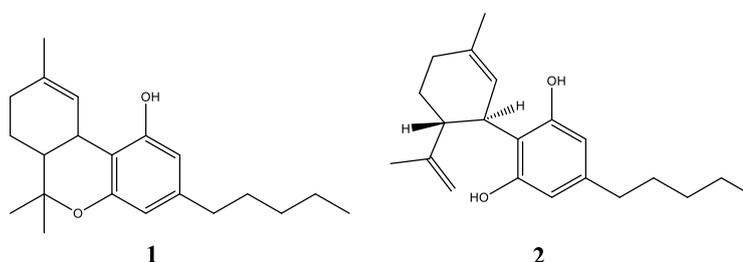


Figura 1- Estruturas químicas do Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC, 1) e canabidiol (CBD, 2).

Fonte: Do Autor.

O CBD (**2**) é uma das substâncias encontradas na *Cannabis sativa*, isolado pela primeira vez em 1943 por Rogers Adams. Entretanto, somente em 1963 sua estrutura foi completamente elucidada³, constituindo cerca de 40% nos extratos da *Cannabis*⁴. Na literatura, há relatos de cerca de 60 outros tipos de canabinoides identificados, além de outros compostos não-canabinoides, totalizando cerca de 300 metabólitos secundários^{5,6}. O primeiro relato dos efeitos anticonvulsivantes da cannabis foi feito na Europa em meados do século XIX, dito como sendo um anticonvulsivante do mais alto valor, e ter um poder laxante único. Tais descrições informais levaram a estudos clínicos que mostram que CBD pode ajudar muitos pacientes a permanecer quase livres de convulsões, sem nenhuma toxicidade, deterioração comportamental ou tolerância¹.

Em suma a maconha já foi utilizada para o tratamento de várias enfermidades, com efeitos contra o glaucoma e dificuldades respiratórias, atuando ainda como antiemético, antibiótico, antitumoral, antidepressivo e anti-inflamatório¹. Seus efeitos incluem também o sistema nervoso central, ajudando a tratar doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, como a esquizofrenia, epilepsia, doença de Parkinson e ansiedade⁷. O CBD, ao contrário do THC (**1**),

tem características de ser não-psicoativo, não causando alterações psicossensoriais, tendo baixa toxicidade e alta tolerância em humanos⁸.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir a revisão bibliográfica.

2.1 A PLANTA *Cannabis sativa*

A *Cannabis* é um arbusto originário da Ásia, pertencente à família das Cannabaceas, cujas espécies mais conhecidas são a *Cannabis sativa* e *Cannabis indica* (**Figura 2**). É uma planta anual, dioica, cuja a espécie feminina difere da masculina, sendo que na planta fêmea se encontra a maior porcentagem de compostos psicoativos, na qual são produzidos na forma ativa em pelos granulosos em forma de resina. Esta resina, é conhecida como “haxixe” e possui mais de 400 compostos químicos, dentre os quais os mais conhecidos são os canabinoides^{9,10}.

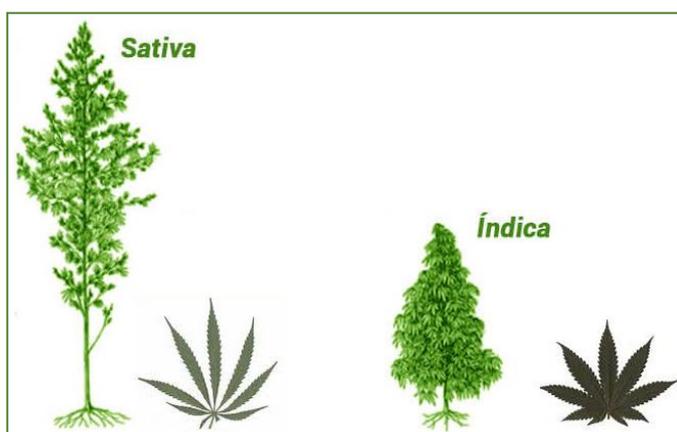


Figura 2 - Ilustração de aspectos morfológicos da *Cannabis sativa* e *C. indica*.

Fonte: Do Autor.

2.2 OS CANABINOIDES

Mais de 100 compostos terpeno-fenólicos foram identificados na resina de *Cannabis*, sendo 61 canabinoides com estruturas análogas, diferindo apenas na unidade terpênica, sendo divididos em 10 grupos principais, incluindo produtos de degradação, precursores ou subprodutos^{9,11}. São eles o Canabigerol (CBG, **3**), Canabícronemo (CBC, **4**), Δ^8 -THC (**5**),

Canabiciolol (CBL, **6**), Canabielsoin (CBE, **7**), Canabinol (CBN, **8**), Canabinodiol (CBND, **9**), Canabitriol (CBT, **10**), os quais tem suas estruturas demonstradas na **Figura 3**.

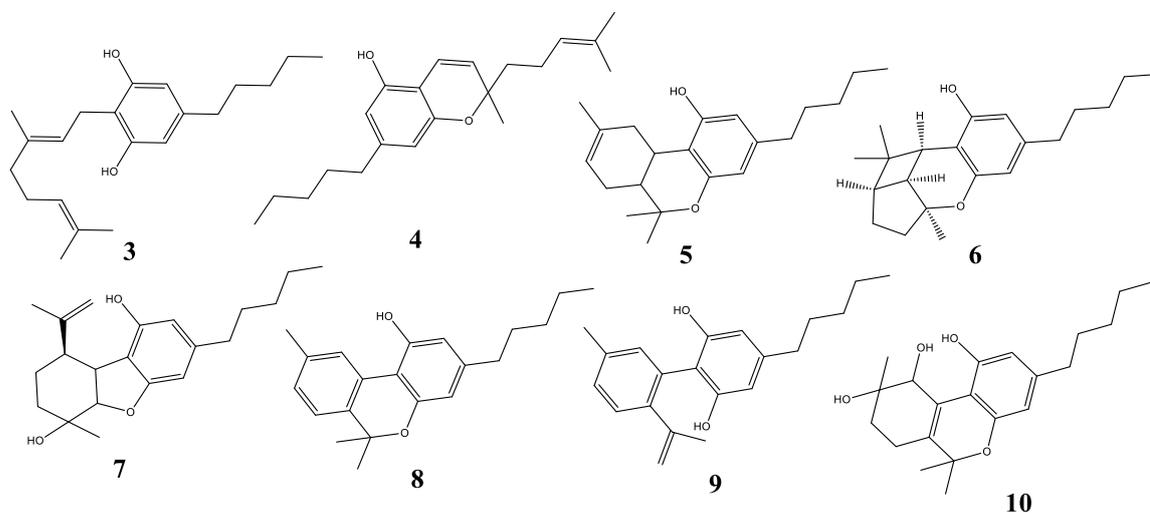


Figura 3 - Estrutura dos principais canabinoides encontrados na *Cannabis*.
Fonte: Do Autor.

Os compostos originalmente identificados no gênero *Cannabis* foram chamados coletivamente de canabinoides, com efeitos associados aos receptores canabinoide de tipo 1 e 2 (CB1 e CB2), podendo ser classificados como i) endocanabinoides (**Figura 4**), de origem natural não-vegetal, produzidos por estimulação fisiológica no organismo; ii) fitocanabinoides, de origem vegetal (**Figura 3**); e, por fim, os iii) canabinoides sintéticos (**Figura 6**)⁶. Independente da classe, os canabinoides possuem estruturas químicas similares, contendo cerca de 21 átomos de carbono⁹, porém sem um mecanismo e/ou local de ação farmacológico comum¹².

Os fitocanabinoides agem de forma indiscriminada na região cerebral, nos receptores CB1, causando efeitos complexos que são conhecidos como a “tétrade” de efeitos canabinoides: analgesia, hipotermia, sedação e catalepsia, principalmente em doses altas^{6,13}. Já os canabinoides endógenos, produzidos fisiologicamente pelo cérebro, atuam de modo semelhante ao THC, sendo derivados de ácido graxos polinsaturados¹⁴, sendo altamente lipofílicos com baixa solubilidade em água¹⁵. Os representantes mais bem descritos desta classe são a anandamida (AEA, **11**) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG, **12**)^{6,16}, sendo **11** o primeiro a ser descoberto após a caracterização do receptor CB1¹⁷⁻¹⁹. Além destes, a noladina ou éter 2-araquidonilglicerol (**13**)²⁰, virodamina (**14**) e a *N*-araconildopamina (**15**)²¹, também compõem a família dos eicosanoides²² (**Figura 4**), como os principais moduladores da função sináptica (agonistas de CB1). Ao serem ativados no SNC, regulam várias funções neurais e

comportamentais e, por meio da sinalização retrógrada, medeiam as formas de plasticidade a curto e longo prazo, tanto nas sinapses excitatórias como nas inibitórias^{18,23}

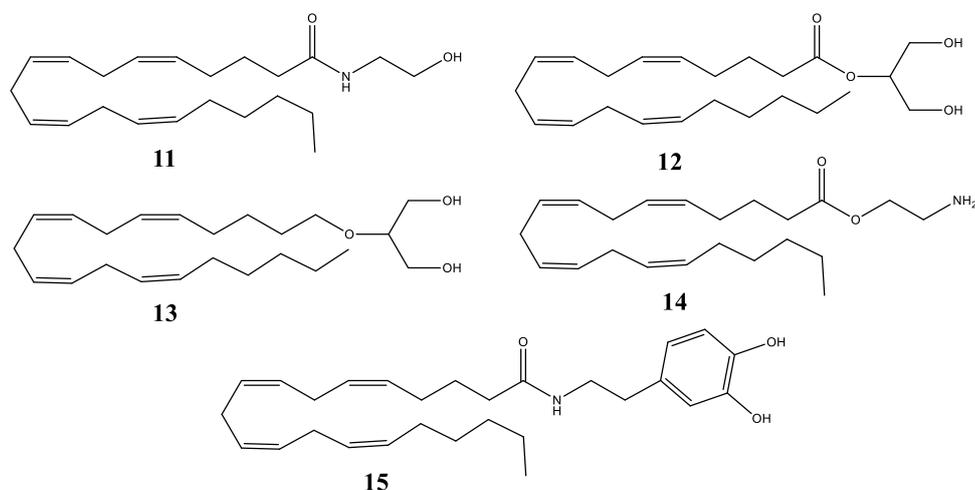


Figura 4 - Estruturas químicas dos endocanabinoides: AEA (**11**), AG (**12**), noladina (**13**), virodamina (**14**) e *N*-aracdonildopamina (**15**).

Fonte: Do Autor

De modo geral, os canabinoides sintéticos surgiram como fármacos de abuso, compreendendo estruturas diversas, com farmacologia muitas vezes desconhecida, representando um problema de saúde pública. Podendo atuar como agonistas CB1 com alta eficácia e com efeitos narcóticos, alucinógeno, depressor e dependência²⁴. Apesar de terem sido utilizados como drogas de abuso, estes possibilitaram um direcionamento no SEC, devido a utilização de ligantes seletivos para CB1 e/ou CB2 com farmacoterapêutica aprimorada e baixa toxicidade, sendo então capazes de reduzir a receptação e degradação ou aumentar a síntese de endocanabinoides¹⁵. Importante salientar que alguns análogos de canabinoides naturais e seus metabólitos, atuam como antagonistas de receptores canabinoides e moduladores do sistema canabinoide endógeno, sendo candidatos promissores para pesquisas clínicas e uso terapêutico¹⁶.

2.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE (SEC)

Em 1988, foi identificado o receptor CB1, um receptor ativado pelo THC e análogos e, em 1993, foi identificado o receptor CB2²⁰. A clonagem dos receptores endocanabinoides e a descoberta dos ligantes endógenos permitiu um avanço significativo na compreensão das bases moleculares de seus papéis fisiológicos e funções de sinalização^{23,25}. É demonstrado que o SEC está envolvido em múltiplas funções no organismo, incluindo alimentação (apetite), dor

(analgésia), aprendizagem, memória, neurogênese, metabolismo, estresse / ansiedade, sono por termorregulação e função das células imunes^{15,18}. O SEC, como é mostrado na **figura 5**, é constituído pelos receptores específicos CB1 e CB2, cuja ativação por seus ligantes envolvem uma variedade de enzimas, transportadores e outras proteínas relacionadas à síntese, mobilização e captação micromoléculas^{19,26,27}. Dentre estas, merecem destaque as enzimas para biossíntese *N*-acil-fosfatidiletanolamina-fosfolipase (NAPE) e diacilglicerol-lipase alfa (DAGL α) e beta (DAGL β)²⁸ e degradação dos endocanabinoides, tais como a hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH) e a lipase de monoacilglicerol (MAGL)²⁹, bem como o transportador de membrana anandamida (EMT), o qual facilita o movimento da AEA (**3**) pela membrana celular¹⁸. A atividade do receptor canabinoide pode ser modulada diretamente pela ligação do ligante ou, indiretamente, pela modulação dos níveis de endocanabinoides (p.e., inibição enzimática)¹².

Uma vez sintetizados, os endocanabinoides são rapidamente degradados; no entanto, até agora apenas os dois endocanabinoides parecem desempenhar um papel relevante no funcionamento do SEC, o 2-AG (**12**, agonista total CB1/CB2) e AEA (**11**, agonista parcial CB1/CB2)^{14,19}, salientando que estas moléculas variam em termos de afinidade com os receptores-alvo, podendo haver seletividade ou especificidade na sua ativação²⁰.

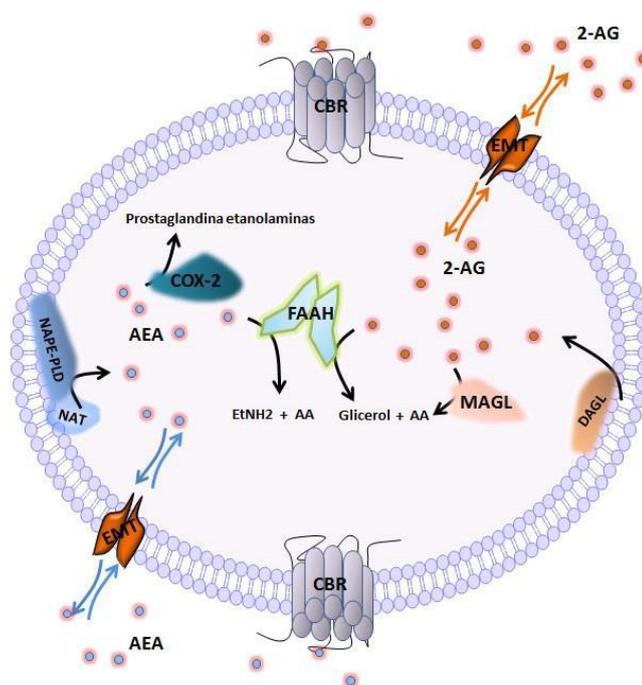


Figura 5 - Representação esquemática do sistema endocanabinoide

Fonte: Fonseca, B.M.;2013²⁰

O SEC tem demonstrado ser fortemente ativo em várias condições³⁰, sendo sugerido como um sistema de sinalização pró-homeostático e pleiotrópico, ou seja, causa múltiplos efeitos no organismo, existindo uma ligação entre um desequilíbrio no SEC e doenças neurodegenerativas (na Doença de Parkinson (DP) os níveis de 2-AG são mais elevados do que em indivíduos saudáveis), bem como em doenças como obesidade, diabetes e distúrbios do sono²⁹. Este exerce funções importantes, como a liberação retrógrada de neurotransmissores, controle da excitabilidade neuronal e regulação de várias formas de plasticidade sináptica³¹. Diante de atividade neuronal excessiva, os endocanabinoides são gerados sob demanda³² nos neurônios pós-sinápticos e não são armazenados em vesículas^{19,21}.

A ativação dos receptores canabinoides afeta ações de vários neurotransmissores como a acetilcolina (ACh), dopamina, GABA, glutamato, serotonina (5-HT), noradrenalina e opioides endógenos^{13,21,30}. Este pode suprimir ou aumentar a liberação de neurotransmissores dependendo de como a sinalização do SEC ocorre, por exemplo a sinalização via-astrócitos com a ativação de CB1 leva a liberação de glutamato que irão atuar nos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato)^{18,23}. Dependendo da região cerebral em que os endocanabinoides são produzidos, efeitos fisiológicos muito diferentes são gerados, sendo os mais conhecidos, a regulação de temperatura corporal (hipotálamo), regulação do apetite (hipotálamo), redução do limiar de dor (córtex) e modulação de processos cognitivos (gânglio basal)⁶. Estes efeitos são mediados por ações agonistas ou antagonistas dos receptores CB1 e CB2³⁰.

2.3.1 Receptores endocanabinoides

Existem dois receptores primários conhecidos como CB1 e CB2, o quais foram identificados por meio de análogos de THC quimicamente modificados e marcados radiotivamente¹⁹. Estes, são receptores metabotrópicos clássicos, acoplados à proteína $G_{i/o}$ ^{26,33} presente na membrana celular³⁴ e a sua ativação leva a uma diminuição no nível intracelular de um segundo mensageiro, AMPc³⁵; estes se diferenciam na sequência de aminoácidos, em mecanismos de sinalização, distribuição e sensibilidade a certos ligantes que mostram marcada seletividade para um ou outro tipo de receptor²². Ambos contêm sete domínios transmembranares abrangentes acoplados às proteínas $G_{i/o}$ ¹⁹, negativamente à adenililciclase (AC) e de forma positiva para proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs)^{13,18,29}. Os receptores canabinoides são encontrados em todo o organismo, com alta concentração no SNC^{6,26} e sistema nervoso periférico (SNP).

Os agonistas de receptores canabinoides são classificados em 4 grupos de acordo com a sua estrutura química. O primeiro é o “grupo canabinoide clássico”, incluindo derivados dibenzopirano como o THC (**1**, **Figura 1**); o segundo é o “grupo canabinoide não-clássico”, que consiste em análogos bicíclicos e tricíclicos do THC que carecem de um anel pirano (p.e. CP 55,244, **16**); o terceiro é constituído de aminoalquilindóis (p.e. WIN 56,098, **17**, **Figura 6**), com estruturas que diferem bastante dos dois primeiros grupos e, por fim, o quarto grupo, caracterizado pelos eicosanoides, que contém o ácido araquidônico e derivados, sendo que o protótipo deste foi desenvolvido a partir da anandamida (**11**, **Figura 4**).³⁶

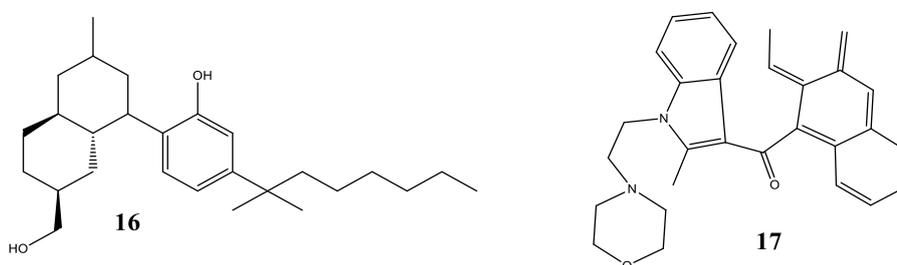


Figura 6 - Exemplos de estruturas dos agonistas de receptores canabinoides CP 55,244 (**16**) e WIN 56,098 (**17**).

Fonte: Do Autor.

Existem também subtipos de receptores canabinoides e receptores vaniloides (TRPV), que estão envolvidos nas funções fisiológicas complexas do sistema canabinoide²¹, além de receptores de serotonina (5-HT_{1A})³⁷, GPR55 e receptores nucleares da família PPARs^{21,37,38}, que respondem pela coordenação motora, processamento de memória, controle do apetite, modulação da dor e neuroproteção¹⁶.

2.3.1.1 O receptor CB1

Em 1990 foi identificado e clonado o receptor CB1²⁹. No DNA e RNA humano contém o gene receptor para a codificação de CB1 (*CNR1*)¹⁹, o qual se encontra no cromossomo 6, e possui 472 ou 473 aminoácidos que o codificam³⁶. É um receptor transmembrânico que converte estímulos extracelulares em vias de sinalização intracelular a jusante¹⁴.

É o mais abundante GPCR encontrado no SN, sendo localizado no SNC e SNP nos terminais pré-sinápticos, de forma heterogênea, sendo que as regiões mais densas são córtex cerebral, hipocampo, gânglios basais e cerebelo^{16,35,36,39} o que reflete a importância deste no

controle motor, no processamento de memória, na modulação da dor^{9,22}, resposta emocional, homeostase energética e funções cognitivas superiores, tendo sido encontrado pós-sinapse e na glia, na região pós-sináptica regulam a excitabilidade e plasticidade sináptica através da modulação de canais de K^{+19} , onde os neurônios são hiperpolarizados, fechando canais de Ca^{2+} dependentes de tensão e ativando canais de K^{+16} , produzindo os efeitos típicos da maconha na psique e na circulação^{19,22}.

Os agonistas de CB1, sejam eles endocanabinoides ou fitocanabinoides, agem provocando a liberação de neurotransmissores e diminuindo a excitação neural^{6,11,32}. O 2-AG (**12**) atua como agonista de CB1, e AEA (**11**) como agonista parcial¹⁴, a ligação por um agonista no sítio ortostérico leva a efeitos psicomiméticos, a de um agonista inverso leva a perda de apetite, enquanto que um antagonista gera efeitos depressores. Os receptores CB1 desempenham um papel importante na neuroproteção e o aumento do tônus endocanabinoide³¹ e diferentes ligantes ortostérico tem sido propostos como uma abordagem terapêutica para tratar doenças neurodegenerativas (DP), epilepsia, ansiedade e depressão^{29,39}.

2.3.1.2 O receptor CB2

Estruturalmente, existe uma homologia de apenas 44% na estrutura primária entre CB2 e CB1³⁶, sendo aquele somente identificado em 1993²⁹, o qual é codificado no cromossomo 1 pelo gene *CNR2*^{15,19}. Sabe-se que a maior expressão de CB2 no sistema imune é responsável pela modulação da liberação de citocinas inflamatórias^{22,40}. No sistema imunológico as linhagens de linfócitos que expressam CB2 são linfóide, mieloide e monocítica, incluindo células B e T, monócitos e macrófagos, células dendríticas, células de morte natural e neutrófilos^{29,41}; já no SNC, ocorre em áreas específicas como a micróglia e na região pós-sináptica^{9,14}.

A ativação de receptores CB2, parece mediar efeitos imunossupressores e antinociceptivos^{20,29} e não acarreta em efeitos psicoativos como aqueles relacionados à maconha²². Um estudo introduziu o SR 144528 (**18**, **Figura 7**) como o primeiro antagonista, altamente potente, seletivo e oralmente ativo para o receptor CB2, com uma seletividade CB2/CB1 de 700 vezes⁴². Estudos mais recentes têm apontado agonistas CB2 específicos como possíveis candidatos a fármacos eficazes para o tratamento de inflamação e dor, especialmente dor neuropática, além destes receptores serem possíveis alvos para doenças neurodegenerativas⁴³.

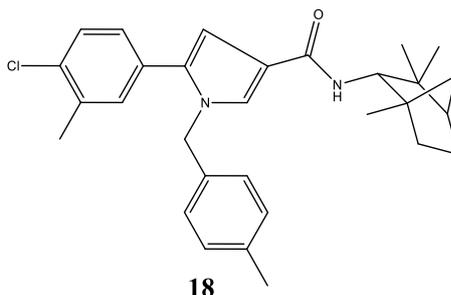


Figura 7 - Estrutura química de SR 144528 (**18**), um antagonista de CB2.

Fonte: Do Autor

2.4 O CANABIDIOL

O CBD (**2**) é um fitocanabinoide não-psicomimético, derivado de *C. sativa*^{13,33} encontrado em pêlos glandulares²⁹, que teve sua estrutura elucidada na década de 60, por Raphael Mechoulam e colaboradores⁴⁴. É um composto terpeno-fenólico, com 21 átomos de carbono⁴⁵, podendo constituir até 40% dos extratos da planta⁴⁶. O isômero encontrado naturalmente é o (-)-canabidiol¹³. O CBD (**2**) tem uma conformação onde os seus anéis possuem mais ou menos um angulo reto, diferentemente do THC (**1**) que possui uma configuração planar³ (**Figura 8**). As diferenças estruturais entre CBD e THC são determinantes para que assumam conformações bastante distintas, respondendo por distintas possíveis interações, em natureza e magnitude, com os receptores canabinoides. Desta forma, é explicado por que CBD não se liga de forma efetiva ao CB1, por ser restrito estericamente^{3,26} e, portanto, não produz a téttrade dos efeitos canabinoides^{13,37}, ou seja, não causa efeitos psicomiméticos e ansiogênicos nem induz a dependência pelo uso repetido, tendo então um melhor perfil de segurança em relação a outros canbinoides⁴⁷. Sendo que sua ação está associada a CB2, podendo atuar como modulador alostérico negativo, ou seja, ele diminui a afinidade/eficácia do ligante ortostérico³⁵.



Figura 8 - Aspectos conformacionais do THC: (direita) e do CBD (esquerda).

Fonte: Do Autor.

É um produto lipossolúvel, sintetizado a partir de precursores de ácidos graxos no organismo^{12,45}, e metabolizado pelo fígado gerando os metabólitos 7-hidroxicanabidiol (**19**) e 7-carboxicanabidiol (**20**)^{13,48} (**Figura 9**). As concentrações de **1** e **2** na *Cannabis* podem variar muito, devido as variedade utilizada, plantas-clones, clima, solo, patógenos e outros fatores⁵, o que justifica a preocupação com fito-preparações, visto que os extratos utilizados não possuem um padrão.

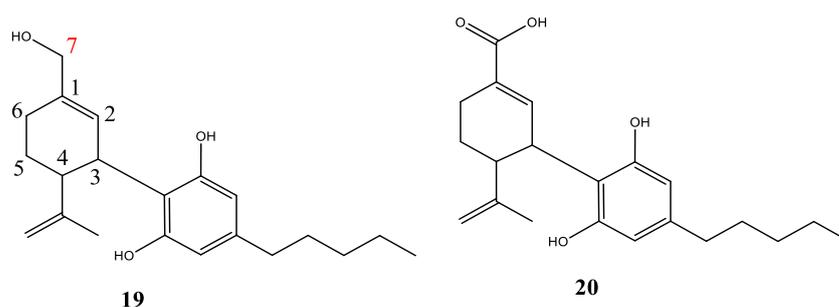


Figura 9 - Estrutura dos metabólitos 7-hidroxicanabidiol (**19**) e 7-carboxicanabidiol (**20**).

Fonte: Do Autor.

O CBD (**2**) tem propriedades antioxidantes que dependem da sua estrutura química. Também mostra efeitos neuroprotetores que aumentam a viabilidade celular³³, além de atuar como anti-inflamatórios, anticonvulsivante, antioxidante, antiemético, ansiolítico, antidepressivo⁴⁹, possui baixa toxicidade e alta tolerabilidade em seres humanos e outras espécies^{8,34}, portanto, um candidato potencial para o tratamento de processos

neuroinflamatórios, epilepsia, lesões oxidativas, vômitos e náuseas, ansiedade e esquizofrenia^{13,37,50}.

Com base nas suas propriedades anticonvulsivantes foi utilizado como alternativa para o tratamento de epilepsia e para o tratamento de distúrbios do sono^{21,51}, além de ser sugerido como agente terapêutico para tratamento de desordem neurológicas oxidativas⁵². Outros estudos comportamentais e neuroquímicos sugerem que o CBD tem um perfil farmacológico semelhante ao dos antipsicóticos atípicos^{46,47,50,53}.

Diante deste contexto, os resultados já disponíveis fortalecem a necessidade de avanços e investimentos em pesquisa nesta área, buscando um melhor entendimento do SEC, na busca por novos canabinoides naturais e sintéticos, visando sua aplicação clínica e ampliação do arsenal terapêutico disponível em doenças psíquicas e neurodegenerativas.

2.4.1 Ação do canabidiol no organismo

O CBD (2), apesar de ser um constituinte da *Cannabis*, é desprovido dos efeitos típicos da planta, diferentemente do THC que induz a ansiedade e efeitos psicóticos, sendo o principal ingrediente psicoativo^{8,9}. O mecanismo de ação do CBD ainda não está totalmente elucidado⁵⁴, sendo provável que ele não tenha receptores tão específicos como o THC²², podendo modular vários receptores concomitantemente, motivo pelo qual tem sido descrito como um potencial candidato a fármaco multialvo^{34,55}.

Estudos sugerem que o CBD possa atuar no organismo como modulador do THC¹⁶. Apesar de sua baixa afinidade com CB1⁵⁴, este possui uma ação antagonista neste receptor, enquanto que o THC é um agonista parcial^{25,56} e inibi alguns efeitos causados pelo THC como; intoxicação, sedação e taquicardia e preserva suas ações benéficas⁴⁷. Outro estudo demonstra que o CBD se comporta como um modulador alostérico de CB1, por meio do qual são explicados os efeitos causados *in vivo*³⁹. Em contrapartida, é dito como um agonista inverso de CB2 podendo contribuir com as propriedades anti-inflamatórias^{21,29}, apresenta também efeitos ansiolíticos e/ou antipsicóticos^{46,57}. Além de possuir propriedades analgésicas, antieméticas e anticancerígenas¹⁶, afeta também a plasticidade sináptica e facilita a neurogênese³³.

Outros receptores também podem ser modulados pelo CBD, incluindo receptores de potencial transiente⁵⁸ (TRPV1, TRPV2, TRPA1 e TRPM8) onde atua como agonista o que explica os efeitos antipsicóticos e as curvas dose-resposta em forma de sino⁵⁹, receptor órfão ligado à proteína G (GPR55), receptor serotoninérgico (5-HT_{1A}), e receptores gama ativado

pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ)^{11,21,29}. Além disso inibi a captação sináptica de noradrenalina, GABA, adenosina e dopamina e estimular a atividade de receptores de glicina $\alpha 3$ e $\alpha 1$ ⁶⁰. A ativação de cada um desses receptores (**Figura 10**) é dependente da concentração de CBD, cujo efeito poderá ser de inibição/bloqueio ou aumento da atividade de alguns tipos de receptores³⁴.

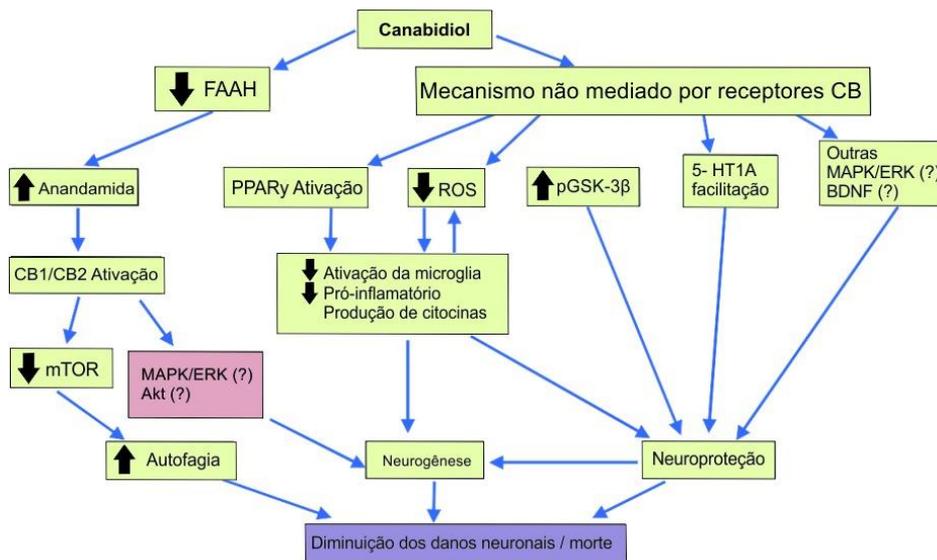


Figura 10 - Possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito neuroprotetor do canabidiol.

Fonte: Adaptado da ref. Pop, E.,1999.⁵²

A estimulação de TRPV1 pelo CBD tem um efeito máximo de eficácia semelhante ao da capsaicina^{13,16}, além de inibir a captação e hidrólise de AEA, aumentando assim a sua concentração na biofase²². A capacidade do CBD de inibir a FAAH, enzima que catalisa a degradação da AEA²⁰, tem sido sugerida como um possível mecanismo para explicar os seus efeitos antipsicóticos⁵³ e antidepressivos em modelos animais⁶¹, aumentando assim a ação destas moléculas endógenas nos receptores canabinoides³⁷, ou seja, a manipulação dos níveis de AEA e o bloqueio de TRPV1 representam uma nova estratégia para o desenvolvimento de fármacos antidepressivos⁶¹. Visto que, TRPV1 pode estar envolvido na mediação de respostas ao estresse favorecendo a ação de antidepressivos⁶¹.

É demonstrado que o efeito antidepressivo e ansiolítico causado pelo CBD é dependente dos níveis de serotonina, a qual desempenha um papel importante na regulação emocional, resposta ao estresse e neurobiologia da depressão⁶², ocorrendo uma facilitação da neurotransmissão mediada pelo 5HT_{1a}^{47,59}, através da modulação alostérica deste receptor⁴⁷. O CBD exerce controle dinâmico sobre Ca²⁺ intracelular, induzindo uma mudança bidirecional

no nível deste íon intracelular que depende da excitabilidade celular. Em condições fisiológicas normais de Ca^{2+} , o CBD aumenta ligeiramente Ca^{2+} intracelular, enquanto que condições de alta excitabilidade exerce efeito oposto. Como um antagonista GPR55, o CBD reduz a liberação de glutamato, sugerindo um potencial mecanismo anticonvulsivo¹¹.

O CBD exerce seus efeitos neuroprotetores através das suas propriedades antioxidantes, sendo superior ao α -tocoferol e ascorbato, diminuindo os danos neurais causados pela βA (β -amiloide) e neurotoxicidade causada pelos receptores NMDA, ocorrendo através de PPAR γ e pela ubiquitinação da APP (Proteína precursora amiloide)^{47,63}. O estudo dos efeitos do CBD dose-dependentes sugerem que a dose é um fator crucial na atividade e em sua aplicação, o que pode, pelo menos em parte, explicar seus efeitos variados em decorrência da possibilidade de atuação por múltiplos mecanismos de ação²⁵.

2.5 DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) QUE PODEM SER TRATADAS POR CBD.

Distúrbios neuropsiquiátricos são condições médicas complexas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das causas mais comuns de incapacidade⁶⁴. Atualmente, é geralmente aceito que muitos sintomas neuropsiquiátricos manifestam-se nos estágios iniciais da doença neurodegenerativa e, em muitos casos, são considerados indicadores prodrômicos⁶⁵, estes podem resultar de mudanças neuroplásticas significativas que levam a novos pontos de referência da função cerebral, por exemplo alterações induzidas pelo estresse e diminuição da neurogenese⁴⁷.

A atividade neuronal intensa é um pré-requisito para a função cerebral adequada. Entretanto, a atividade neuronal excessiva pode comprometer neurônios individuais, redes neuronais inteiras e até mesmo a vida do organismo. Portanto, o cérebro precisa estar protegido quando há anormalidades fisiológicas e hiperatividade, existindo assim um equilíbrio ténue entre a comunicação excitatória e inibitória entre os neurônios³². Um outro fator importante, que sustenta a complexidade associada às doenças neurodegenerativas e quadros psicóticos é que uma única doença neurológica pode estar associada a múltiplos quadros psiquiátricos e com o envolvimento de múltiplos alvos moleculares⁶⁶.

2.5.1 Epilepsia

A ocorrência de epilepsia na população mundial é de cerca de 1%³². Os neurônios trocam intensamente informações entre si usando tanto neurotransmissores inibitórios, quanto excitatórios, existindo um equilíbrio entre eles. Quando este é perturbado, a intensidade da transmissão excitatória pode exceder a um limiar fisiológico e convulsões epiléticas podem ocorrer³². Nesta situação, ocorrem intensas descargas elétricas no cérebro que não podem ser controladas pela própria pessoa, causando os sintomas característicos de movimentos descontrolados do corpo⁶⁷. Dependendo do indivíduo e da gravidade da disfunção neurológica, podem ocorrer de crises mais graves, também chamadas de *grand mal*, onde se tem convulsões musculares por todo o corpo, até crises mais leves que levam somente a um lapso de consciência, que duram apenas alguns segundos, chamadas de *petit mal*. Neste caso, o efeito em longo prazo devido à atividade neuronal excessiva pode levar a degeneração de neurônios³².

O termo "convulsões" descreve uma alteração excessiva e paroxística na atividade elétrica de um grupo de neurônios. A epileptogênese (período de latência) refere-se a uma cascata pouco conhecida de eventos que gradualmente transmuta um cérebro não-epilético em um que desencadeia convulsões espontâneas⁶⁰. Esta doença neurológica não tem cura, mas pode ser controlada com medicamentos. Qualquer pessoa pode ter uma crise epilética em algum momento da vida, podendo ser causada por um traumatismo craniano, doenças como meningite, ou consumo excessivo de álcool⁶⁷. O tratamento é feito com medicamentos anticonvulsionantes como fenobarbital, fenitoína, valproato ou carbamazepina que irão restaurar a função cerebral e diminuir a duração das crises epiléticas⁶⁸, ao passo que não possuem características antiepileptogênicas ou modificadoras da doença⁶⁰.

A utilização de *Cannabis* e seus derivados é um tipo de tratamento alternativo, que tem despertado um grande interesse na comunidade científica mundial nos últimos anos, com grande impacto social. Considerando que cerca de 40% dos adultos epiléticos usam ou usaram medicina complementar e alternativa (CAM) como consequência da falta de eficácia da terapêutica convencional padrão, além de seus efeitos colaterais ou outros fatores, como o acesso à medicação⁵⁵. O sistema endocanabinoide tem sido estudado em animais, como um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos antiepiléticos⁵⁵. O CBD tem sido investigado como anticonvulsionante e, ao contrário dos anticonvulsionantes clinicamente utilizados, não exibe efeitos neurotóxicos ou motores secundários^{12,34,51}.

O primeiro relato do uso de CBD no tratamento de convulsão foi publicado em 1843, pelo médico irlandês William Brook O'Shaughnessy, para tratar uma menina indiana recém-nascida que sofria de graves de convulsões¹⁷. Foi demonstrado que o CBD reduz a gravidade da crise e a letalidade em modelo *in vivo*⁸, sugerindo a necessidade de um estudo mais

aprofundado, uma vez que, possivelmente, os efeitos anticonvulsivantes do CBD surjam por mecanismos independentes de receptores canabinoides⁸. O CBD demonstra efeito anticonvulsivante em muitos modelos animais agudos, mas há dados limitados em modelos crônicos⁶⁰. Os mecanismos antiepilépticos do CBD não são conhecidos, mas podem incluir efeitos no transportador nucleosídico equilibrante, no receptor órfão GPR55 acoplado à proteína G, modulação de TRPV1, 5-HT1a e de glicina $\alpha 3$ e $\alpha 1$ ³⁴. A liberação de endocanabinoides evita a neurotoxicidade induzida pela convulsão e, portanto, a atividade epileptiforme desencadeia uma liberação neuroprotetora por demanda de endocanabinoides (ou aumenta os níveis de endocanabinoides numa via a jusante não relacionada com a neuroproteção)¹¹.

Atualmente, uma atenção especial tem sido dedicada a pacientes com síndrome de Dravet (SD) e síndrome de Lennox-Gastaut (SLG), uma vez que são considerados bons candidatos em potencial para um estudo com CBD, dada à necessidade de terapias mais eficazes e melhor toleradas para estas epilepsias³⁴. A SD é uma forma epiléptica rara que inicia-se no primeiro ano de vida e se perpetua pelo resto da vida com convulsões frequentes e prolongadas levando a atrasos comportamentais e de desenvolvimento⁶⁹. A SLG também tem seu aparecimento na primeira infância sendo caracterizada por uma tríade de sinais, que inclui múltiplos tipos de crises, comprometimento cognitivo de moderado a grave e um EEG anormal de complexos de ondas e espículas lentas^{70,71}, sendo fisicamente perigosa devido a diversas quedas e lesões que comprometem a qualidade de vida, sendo que a recuperação completa livre de convulsões e desenvolvimento normal é incomum⁷¹. Os EUA, através do FDA (*Food and Drug Administration*) aprovaram o uso do Epidiolex (GW Pharmaceutical) que é uma solução oral a base de canabidiol para o tratamento das SD e SDL para pacientes acima de 2 anos de idade, sendo o primeiro medicamento em uma nova categoria de drogas antiepilépticas⁷²⁻⁷⁴.

2.5.2 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma disfunção cerebral, com alterações muito características de certas estruturas do cérebro, tais como o estriado, o hipocampo e o córtex pré-frontal⁷⁵. É um dos distúrbios psiquiátricos mais complexos e, possivelmente, um dos menos compreendidos⁵³, com incidência típica no início da idade adulta ou no final da adolescência⁷⁵, causando delírios, alucinações e distúrbios cognitivos⁵⁰. Desde a introdução da nova geração de antipsicóticos atípicos na década de 1990, poucas opções clinicamente significativas de tratamento novo para

a esquizofrenia emergiram apesar de uma necessidade persistente¹⁴, devido a mesma ser uma doença incapacitante e multidimensional⁷⁶. Os pacientes são susceptíveis a experimentar três categorias de sintomas: positivo (alucinações, ilusão, distúrbios de pensamento e distúrbios do movimento), negativos (*flat affect*, anedonia, apatia, alogia, falta de socialidade, avolição) e sintomas cognitivos, principalmente atenção e déficits de memória⁵³. Os antipsicóticos atuais são parcialmente eficazes contra sintomas positivos, mas não tratam com sucesso os sintomas negativos³⁴. Cerca de 35% dos esquizofrênicos sofrem de depressão que compromete sua qualidade de vida e aumenta o risco de suicídio⁶⁵.

As principais hipóteses para a instalação e progressão desta neuropatologia são as chamadas teorias dopaminérgicas e glutamatérgicas. A primeira explica os sintomas positivos, como consequência da alteração dos níveis de dopamina e de seu sistema de recaptação, enquanto que a segunda parece explicar os sintomas positivos, negativos e cognitivos⁵³. Os fármacos disponíveis na terapêutica atual, atuam primariamente no bloqueio dos receptores dopaminérgicos do subtipo D2 mesolímbico e mesocortical (D2R), um mecanismo que não é entendido para tratar a causa subjacente ou distúrbio neuroquímico^{34,50}. Os fármacos antipsicóticos típicos (p.e. haloperidol (**21**)) exibem elevada afinidade nos receptores D2, induzindo a efeitos motores secundários (p.e. tremores), enquanto que os antipsicóticos atípicos (p.e. clozapina (**22**, **Figura 11**)) são terapêuticamente eficazes não exibindo nenhum efeito secundário⁴⁶. O CBD é comparável ao haloperidol (**21**) em termos de redução da hipotonoração induzida pela apomorfina, porém desprovido de efeitos colaterais extrapiramidais, mesmo em altas doses^{13,50}. Dada à necessidade de reduzir os efeitos colaterais dos antipsicóticos comerciais e contornar sua baixa eficácia em alguns sintomas esquizofrênicos, os canabinoides têm sido sugeridos como um possível tratamento alternativo para a esquizofrenia^{50,53}.

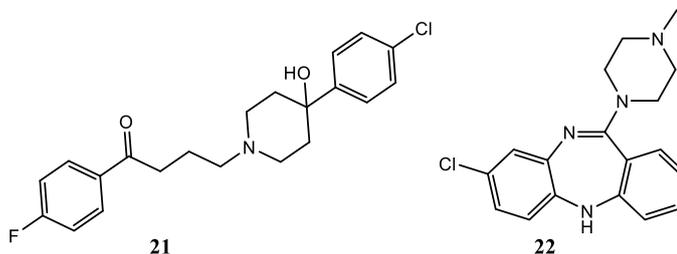


Figura 11 - Estruturas de alguns exemplos de fármacos antipsicóticos: haloperidol (**21**) e clozapina (**22**).

Fonte: Do Autor

Em contraponto, vários canabinoides têm demonstrado um grande potencial terapêutico em diversos sintomas psiquiátricos³⁴, com destaque ao CBD. Em modelos animais farmacológicos, genéticos e de desenvolvimento neurológico, além de estudos clínicos e pré-clínicos tem demonstrado uma eficácia significativa para o tratamento da esquizofrenia^{47,50}. A primeira vez que o CBD foi testado para uso terapêutico de CBD em paciente esquizofrênico em 1995, num indivíduo que não respondia ao tratamento convencional, sendo administrada uma dose de 1500 mg/dia (v.o.) por 4 semanas, com uma melhora significativa durante o tratamento, com declínio após sua interrupção²⁵.

O CBD atenua a hiperlocomoção induzida por psicoestimulantes, diminui o gatilho sensomotor, déficits na função cognitiva e diminuição da interação social, os quais são anormalidades comportamentais⁴⁷. Em estudos de ressonância magnética funcional (RMf), o CBD demonstrou alterar a função cerebral nas áreas límbica e neocortical, justamente as que apresentam anormalidades na esquizofrenia³⁴. Os dados disponíveis sugerem que a esquizofrenia está associada à expressão de receptores de canabinoides em diferentes áreas do cérebro, além de uma série de estudos investigando o impacto dos polimorfismos do gene *CNR1*, codificando para o receptor CB1, sobre o risco de desenvolver doença psicótica¹⁴. O foco atual dos estudos da ação do CBD tem sido direcionado, principalmente, no combate aos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, sendo deixado de lado os sintomas cognitivos, o qual os antipsicóticos atuais não tem grande eficácia⁵³, um estudo realizado pela GW Pharmaceutical com 88 pacientes esquizofrênicos mostrou alívio dos sintomas psicóticos, além de melhoras os sintomas negativos e cognitivos^{47,77}. O CBD é ativo tanto em modelos dopaminérgicos laboratoriais, quanto em modelos glutamatérgicos de esquizofrenia, ressaltando que a prevalência de psicose gerada pelo uso da maconha é menor quando esta contém maiores teores de CBD³⁴. Vale ressaltar que os mecanismos pelo qual CBD exerce efeitos antipsicóticos não são esclarecidos, podendo estar relacionados ao aumento de AEA, ou envolver neurônios GABA positivos⁴⁷.

2.5.3 Doença de Parkinson (DP)

A doença de Parkinson (DP) é um transtorno neurodegenerativo progressivo, incapacitante e sem cura até o momento. Os medicamentos existentes para o tratamento apenas atenuam os sintomas, não alterando o curso ou a progressão de doenças subjacentes, tendo então grande impacto socioeconômico por esta estar relacionada com a maior expectativa de vida⁷⁸.

Um terço dos doentes, tem psicose devido a DP, particularmente nas fases mais avançadas da doença⁷⁹.

Sua sintomatologia inclui tremores involuntários, braquidinesia, instabilidade postural e rigidez, evoluindo para incontinência, incapacidade funcional e morte⁸⁰, como consequência da degeneração de neurônios dopaminérgicos⁸¹ na substância negra, devido ao estresse oxidativo⁷⁸. A vulnerabilidade seletiva neurodegenerativa pode ser ocasionada pela excitotoxicidade devido ao aumento da concentração de glutamato no cérebro; o qual medeia transmissão sináptica excitatória rápida no cérebro de mamíferos. Quando o Glu é excessivamente liberado ou acumulado no tecido cerebral, leva a morte celular excitotóxica, por permitir um influxo de Ca^{+2} nos receptores de NMDA (é um canal iônico permeável ao cálcio com importantes funções na fisiologia e patologia do cérebro) que pode ativar os processos neurodegenerativos dentro dos neurônios, podendo estar envolvido no processo de aprendizado e memória^{78,82}. A MPP+, um metabólito da MPTP, é uma neurotoxina relevante para a DP, pois esta é absorvida pelos neurônios dopaminérgicos induzindo a morte celular⁸³. A degeneração neuronal pode ocorrer por um processo multifatorial, com a interação de fatores genéticos e ambientais⁷⁸.

Atualmente são ministrados grande número de agentes de várias classes farmacológicas que, quando habilmente aplicadas, conduzem em geral a um dramático impacto na melhoria da capacidade funcional e da duração da vida⁷⁸ de pacientes com DP. O único fármaco antipsicótico com reais benefícios a DP é a clozapina (**22 – Figura 11**), por não causar agravamento motor, entretanto pode causar efeitos colaterais inaceitáveis cardiovasculares e neurológicas⁷⁹, sendo que antipsicóticos atípicos não devem ser utilizados devido a efeitos motores extrapiramidais⁶⁵. A memantina tem sido utilizada como um antagonista não competitivo de NMDA, gerando poucos efeitos secundários obtendo-se uma vantagem terapêutica contra a neurotoxicidade mediada por este receptor⁸⁴. Existem técnicas terapêuticas não farmacológicas que tem exercido efeitos positivos no humor, quanto no comprometimento cognitivo, sendo elas; estimulação magnética transcraniana repetitiva e terapia eletroconvulsiva, as quais ainda devem passar por um estudo a longo prazo para serem tidas como práticas de rotina⁶⁵.

Alguns medicamentos e preparações a base de canabinoides tem sido propostos como terapia à DP, atuando como neuroprotetores na substância negra, evitando a morte neuronal causada por diferentes estímulos citotóxicos em modelos experimentais de DP⁸⁰. O CBD pode facilmente atravessar a barreira hematoencefálica e exercer seus efeitos benéficos sobre o cérebro⁸³. A ação antioxidante do CBD pode ser responsável por seu efeito neuroprotetor, por

reduzir a toxicidade do glutamato mediada por receptores NMDA, sendo mais protetor que o ascorbato e α -tocoferol^{25,59}, protegendo a degeneração dos neurônios dopaminérgicos no nigro-estriatal⁷⁹. A capacidade de ativar receptores CB2 e, por sua vez, bloquear os receptores CB1 pode servir para aliviar os sintomas parkinsonianos e deter ou retardar a neurodegeneração⁸⁰.

A despeito dos esforços dedicados aos estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos do CBD e dos avanços já obtidos, seu mecanismo de ação em geral, e particularmente na DP, permanece obscuro⁸¹. Em um estudo piloto aberto com 6 pacientes que possuíam psicose relacionada a DP, foi avaliado a eficácia, tolerabilidade e segurança da administração do CBD em doses flexíveis (iniciando com 150mg/dia) por 4 semanas, não tendo nenhum efeito adverso durante o tratamento, sugerindo que o mesmo é bem tolerado, tem eficácia e segurança⁷⁹. Num estudo recente, envolvendo 21 pessoas portadoras da DP, sem comorbidade psiquiátrica, realizado na Universidade Estadual de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto - SP, demonstrou um possível efeito do CBD na melhoria de qualidade de vida dos pacientes, quando tratados com 300 mg/dia de CBD durante 6 semanas⁸¹. Um estudo utilizando células PC12 e a neurotoxina MPP+ mostrou que o CBD protege contra a morte celular e a perda de neurites induzida por MPP+⁸³.

2.5.4 Doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, sendo que a idade é um dos principais fatores de risco^{12,85}. Foi descoberta por Alois Alzheimer, o qual acompanhou o caso de uma paciente internada no Hospital de Psiquiátrico de Frankfurt até a sua morte, sendo estudado morfológicamente e histologicamente o cérebro da mesma caracterizando assim a doença⁸⁶.

É uma desordem neurodegenerativa multifatorial, devido a degradação de neurônios colinérgicos em muitas áreas do SNC acompanhada de dramática redução de neurotransmissores⁸⁷, além de outras vias estarem alteradas levando ao processamento de energia primária, danos devido ao estresse oxidativo e inflamação⁸⁸, sendo associada com a deterioração cognitiva progressiva, levando à alteração comportamental, da cognição e memória, aprendizado, perda de consciência, incapacidade funcional e morte, sendo um dos grandes desafios em saúde pública deste século^{80,89}.

A DA pode ser dita como precoce ou tardia, sendo que a precoce manifesta-se antes dos 60 anos, evolui rapidamente, e está relacionada a fatores genéticos (transmissão mendeliana

autossômica dominante, mutação do gene APP⁹⁰ e preselininas (PSEN 1 e PSEN 2⁸⁵) estresse oxidativo⁹¹. A tardia ocorre após os 60 anos está associada ao aumento da predisposição para a formação de placas senis e de emaranhados neurofibrilares no cérebro, com perdas de neurônios colinérgicos, redução de massa encefálica, dentre outras alterações do SNC^{87,92}. Aproximadamente 95% dos pacientes sofrem com a DA tardia, no entanto a forma precoce é mais grave do que o anterior e está associada a uma taxa mais rápida de progressão, mostrando-se clinicamente indistinguíveis⁸⁵. A doença possui três fases sintomatológicas distintas, iniciando por lapsos esporádicos de memória, em seguida o paciente passa demonstrar esquecimento de detalhes de eventos diários e de sua vida passada, e por último passa a depender de cuidados permanentes, com dificuldade em se comunicar e reconhecer familiares, tornando-se incapaz de realizar atividades básicas como alimentação e higiene pessoal⁸⁷.

A fisiopatologia da DA está amplamente relacionado ao estresse oxidativo neuronal e à instalação de um processo neuroinflamatório²⁵. Existem hoje várias hipóteses pelas quais ocorrem a DA. A primeira, e mais antiga, é a hipótese colinérgica, dada a importância da função colinérgica no aprendizado e memória; ocorre a diminuição na concentração da colina acetiltransferase (AChT), enzima responsável pela síntese da acetilcolina (ACh)⁹².

A segunda é a hipótese glutamatérgica; onde o glutamato, um neurotransmissor que medeia a transmissão sináptica excitatória rápida, a sua hiperestimulação pode resultar em danos neuronais, excito toxicidade, a qual leva em última instância à sobrecarga de cálcio neuronal e tem sido implicada em distúrbios neurodegenerativos, este estimula uma série de receptores pós-sinápticos, incluindo o receptor NMDA, que tem sido particularmente implicado nos processos de memória, demência⁹¹⁻⁹³.

A terceira hipótese é a da cascata amiloide, onde há a acumulação extracelular maciça de agregados β A sendo este considerado um evento crucial da doença⁸⁹, estes fragmentos com 39-43 aminoácidos são liberados a partir da APP através da ação de α - e γ – secretases tornando os neurônios vulneráveis a excito toxicidade e apoptose por uma ruptura da homeostase intracelular de Ca^{2+} , além de fatores neurotóxicos como espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio [ERN – ex. óxido nítrico (NO)] e citocinas, onde o hipocampo, amígdala e córtex cerebral são os mais vulneráveis^{80,90,91}. A hiperfosforilação da proteína TAU; cuja função é estabilizar os micro túbulos dos axônios, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contatos interneuronais⁸⁷; resulta na desagregação da estrutura dos micro túbulos, com liberação intracelular de fragmentos proteicos que, por serem insolúveis, formam emaranhados e depósitos neurofibrilares alterando a comunicação interneuronal⁸⁰ e corroborando para a neuroinflamação e degeneração, características patológica da doença.

Atualmente existem cerca de 50 tratamentos para a DA e sua eficácia e segurança estão sendo testadas, incluindo drogas que podem remover placas, imunoterapia com anticorpos β A, anti-inflamatórios não esteroides e estatinas ⁹¹. O haloperidol (**21** – **Figura 11**) é um neuroléptico típico, que pode controlar a agressão de pacientes com DA, porém seu uso não é recomendado para outros sintomas devido a efeitos colaterais graves, já os neurolépticos atípicos (p.e. olanzapina, **22** – **Figura 12**) são extensivamente usados, por causar menos reações adversas, e melhorando sintomas psicológicos e comportamentais⁶⁵.

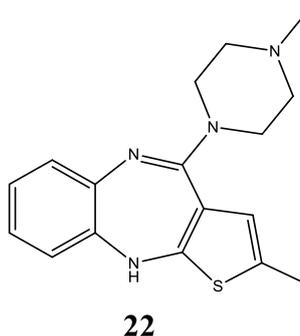


Figura 12 - Estrutura química da olanzapina (**22**)

Fonte: Do Autor.

O SEC ganhou muita atenção como um novo potencial alvo farmacoterapêutico em várias doenças neurodegenerativas, incluindo DA. Estudos recentes apontam que o uso de canabinoides pode levar à redução do estresse oxidativo, da neuroinflamação e da apoptose causada por β A, promovendo mecanismos de reparação intrínsecos do cérebro ^{59,80}, no entanto, a associação entre as alterações CB1 e o desenvolvimento da neuropatologia DA é pouco clara e muitas vezes contraditória, sendo que existem evidências que perturbações no SEC podem ser um fator de risco ou um biomarcador da DA^{31,40}. Os agonistas específicos de CB2, tem sido estudados, pois este receptor não causa efeitos psicoativos, sendo que sua atividade está implicada na redução de moléculas pró-inflamatórias em resposta a estímulos prejudiciais e no controle da sobrevivência neural ⁸⁸. A produção de eicosanoides é um pré-requisito para a inflamação e PLA₂s (fosfolipase A₂) são enzimas-chave que iniciam a cascata de ácido araquidônico (AA), levando à geração de múltiplos produtos eicosanoides durante a inflamação aguda e crônica⁹¹.

Westlake e cols. (1994) investigaram a ligação *in vitro* de um canabinoide sintético (³H] CP 55,940) em cérebros humanos post-mortem, normal (n=3), com DA (n=5) e outras formas de patologia cortical (n=5), demonstrando que houve uma redução de 37 - 45% no

hipocampo, 49% no caudado, e 20 – 24% na substancia negra e *globus pallidus* em cérebros com DA. Um estudo demonstrou que a expressão de CB1 no RNAm está alterada em ratos transgênicos (3xTg DA) em zonas cerebrais particularmente envolvidas em processos de aprendizagem e memória e onde o impacto da neuropatologia DA é mais proeminente ³¹. Também é demonstrado que o receptor CB2 está envolvido na neuropatologia da doença. Um estudo com camundongos amiloides transgênicos (J20 CNR2 – com o receptor intacto e sem o receptor) mostrou que o receptor CB2 está envolvido tanto na redução da patologia da placa amiloide na DA como também no apoio ao potencial de terapias canabinoides para reduzir a β A ⁴⁰. Outro estudo envolvendo um agonista específico de CB2 (JW 133) em camundongos transgênicos (β APP/PS1) é capaz de melhorar os sintomas cognitivos em um modelo experimental de DA, reduzindo a inflamação, estresse oxidativo respostas β A, atividade GSK3 β , e hiperfosforilação tau em torno das placas β A. ⁸⁸. Esposito e cols. demonstraram que o CBD inibe a hiperfosforilação da proteína TAU em células neuronais PC12 estimuladas com β A, a qual é uma das características mais representativas da DA, sendo que o mecanismo molecular do efeito neuroprotetor induzido por CBD ainda é desconhecido ⁸⁹.

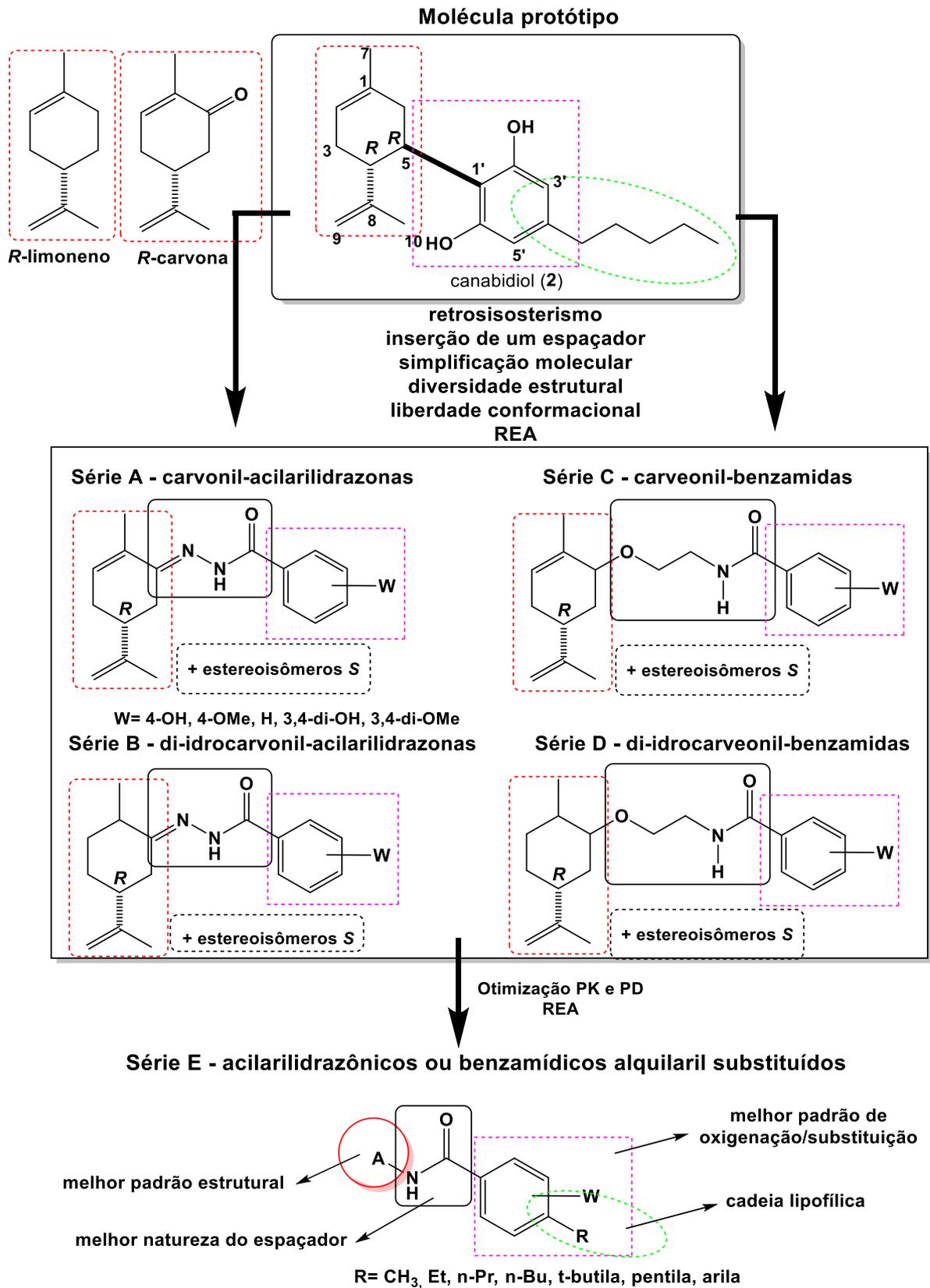
A função neuroprotetora do SEC pode ocorrer através de uma variedade de mecanismos, por exemplo; através da ativação do receptor CB1, recentemente foi demonstrado que a AEA regulava positivamente a via Notch-1, via que desempenha um papel fundamental na neurogênese, na memória a longo prazo e no desenvolvimento neuronal, restabelecendo a neurodegeneração da DA e as alterações da memória ³¹. Um estudo, post-mortem no córtex pré-frontal, utilizou um rádio ligante seletivo para CB1, para investigar as variações regionais de CB1, sendo este um fator da progressão da patologia; através dos estágios Braak, demonstrou-se que o CB1 é inversamente proporcional aos estágios Braak na patologia TAU ⁹⁵.

Os possíveis efeitos neuroprotetores e antioxidantes do CBD destacam a importância de estudos adicionais e aprofundados sobre seu potencial terapêutico, com aplicação potencial na terapêutica da doença de Alzheimer ²⁵.

3. JUSTIFICATIVA

Em vista dos esforços dedicados ao estudo do canabidiol, seus análogos e derivados canabinoides para um melhor entendimento de sua farmacologia e de sua potencial aplicação terapêutica em doenças psíquicas e neurodegenerativas, que afetam e incapacitam milhares de pessoas em todo o mundo, a literatura mostra vários resultados científicos clinicamente promissores para esta classe de compostos neuroativos. Diante dos dados mais recentes, acredita-se que o canabidiol, seus análogos e derivados, possuem, de fato, propriedades importantes na modulação de alvos moleculares envolvidos em disfunções do SNC, possibilitando uma nova vertente para o desenvolvimento de fármacos e medicamentos seguros e eficazes no tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento convencional, possibilitando uma melhora em sua qualidade de vida e quiçá, sua cura.

Neste contexto, um amplo projeto de síntese e avaliação de ligantes análogos ao CBD foi planejado em nosso grupo de pesquisa, levando à concepção de diferentes séries-alvo de ligantes, explorando-se modificações estruturais em diferentes sítios da estrutura molecular de monoterpenos como a carvona e o limoneno, subestruturas contidas no arcabouço molecular do CBD (**Esquema 1**). Estas séries foram racionalmente planejadas com base na estrutura do canabidiol (**2**), buscando-se avaliar a influência da inserção de subunidades espaçadoras (b) acilidrazona e oxietilamida entre a unidade metil-isopropenil-cicloexânica (a), na variação do número, posição e natureza dos substituintes hidroxila e metoxila no anel aromático (c) e da estereoquímica do sítio C-isopropenila (**Esquema 1**). Além disso, pretende-se avaliar a importância da cadeia alifática (d) na subunidade aromática que, possivelmente, tem papel na modulação das propriedades hidrofóbicas e suas implicações na biodisponibilidade e na capacidade de transpor a barreira hematoencefálica. Desta forma, idealizou-se novos padrões estruturais análogos ao do CBD, mas que permitam o acesso a moléculas inéditas e com perfil de ação semelhante, mantendo suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias pela presença de substituintes oxigenados no anel aromático, além de seu potencial de interação com receptores CB1, CB2 e TRPV1, envolvidos na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como DA e DP, além de distúrbios psíquicos, como esquizofrenia e epilepsia. Nestas séries-alvo serão ainda avaliadas a importância farmacofórica de funcionalidades como a ligação dupla endocíclica da subunidade terpênica presente na molécula-protótipo **2**, além da relevância da estereoquímica da subunidade terpênica.



Esquema 1 - Planejamento racional das séries A-E baseadas na estrutura do CBD (2).
 Fonte: Do Autor

4. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto incluem a síntese e a avaliação *in vitro* e *in vivo* dos efeitos neuroestimuladores, neuroprotetores, antioxidantes, anti-inflamatórios da série-alvo **A** de análogos aril-acilidrazônicos do CBD (**Esquema 1**).

Como objetivos específicos, tem-se:

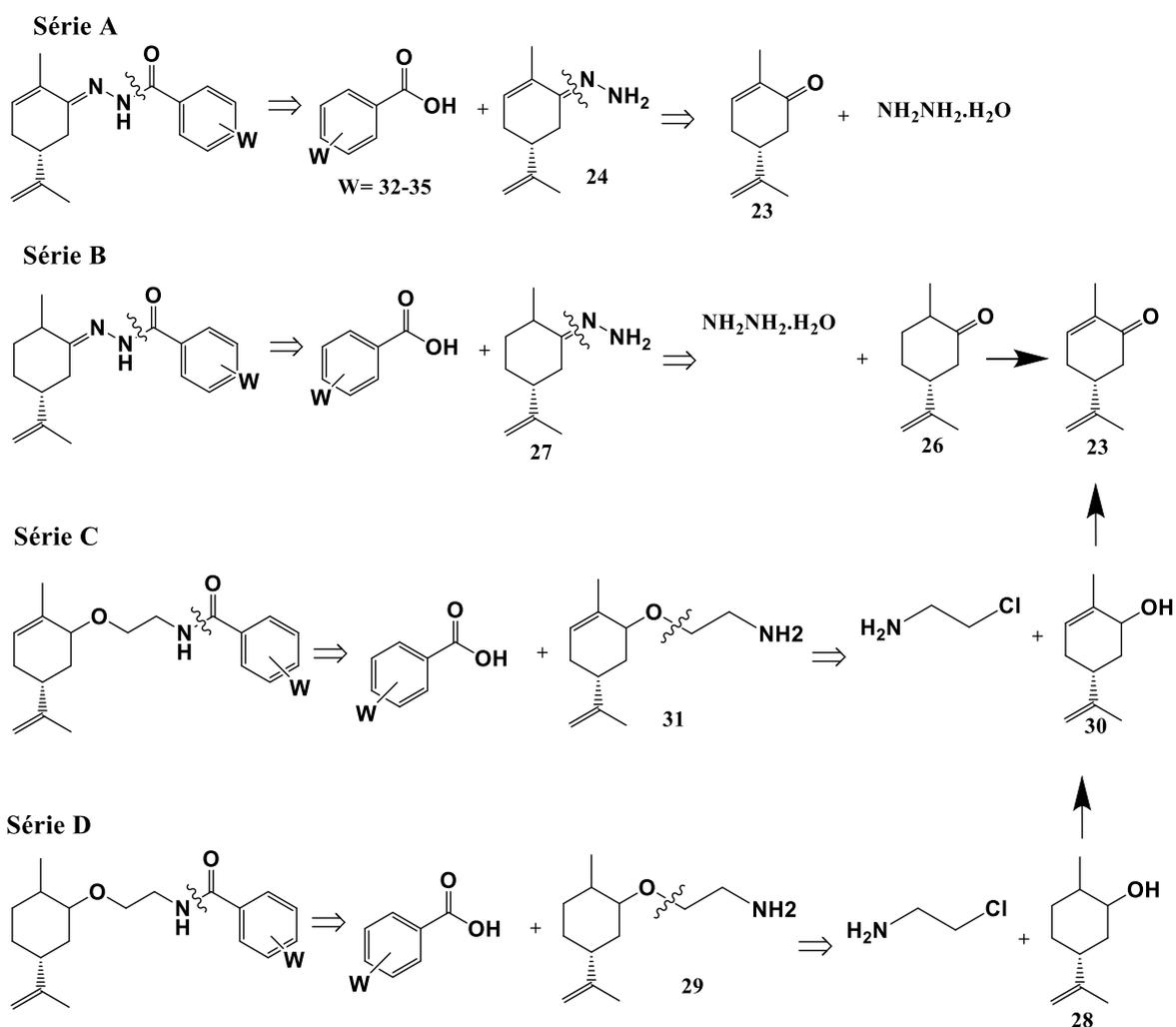
- a) Síntese, purificação e caracterização estrutural da série inédita de análogos acilidrazônicos (**A**) do canabidiol;
- b) Avaliação farmacológica da série-alvo: *in vitro*, por meio do teste de viabilidade celular-MTT, neuroproteção, e em modelos comportamentais preditivos de ansiedade e de depressão .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os resultados e a respectiva discussão provenientes deste trabalho.

5.1 QUÍMICA

A partir da análise retrossintética (**Esquema 2**) vislumbrou-se que as séries propostas poderiam ser obtidas partindo-se das *R* e *S*-carvona (**23**), a qual é uma subunidade estrutural presente no arcabouço molecular do CBD. Para a série **A**, a desconexão da ligação NH-C=O na molécula-alvo indica que esta poderá ser obtida por uma reação de substituição nucleofílica acílica entre a hidrazona (**24**) e ácidos carboxílicos (**32-34**) adequadamente funcionalizados. Por sua vez, o **24** poderá ser obtido por reação de hidrazonação da respectiva carvona (**23**) com monidrato de hidrazina. Para a série **B** ocorre o mesmo tipo de desconexão NH-C=O, pela qual se obtém os precursores **32-34** e a hidrazona (**27**), esta então poderá ser obtida através da reação com o monidrato de hidrazina com a diidrocarvona (**26**), sendo que a última é obtida através da redução da dupla endocíclica da carvona (**23**). Para a série **C** e **D** também temos a desconexão NH-C=O, obtendo assim os ácidos carboxílicos (**32-34**) e os respectivos amino éteres (**31** e **29**). Para o amino éter (**31**) a desconexão C-O resulta nos precursores cloroetilamina e carveol (**30**), este último poderá ser obtido através de uma redução por hidretos. Para o amino éter **29** a mesma desconexão C-O leva aos precursores cloroetilamina e ao diidrocarveol (**28**), que será obtido através da redução da dupla endocíclica e redução por hidretos da ligação C=O da carvona (**23**).

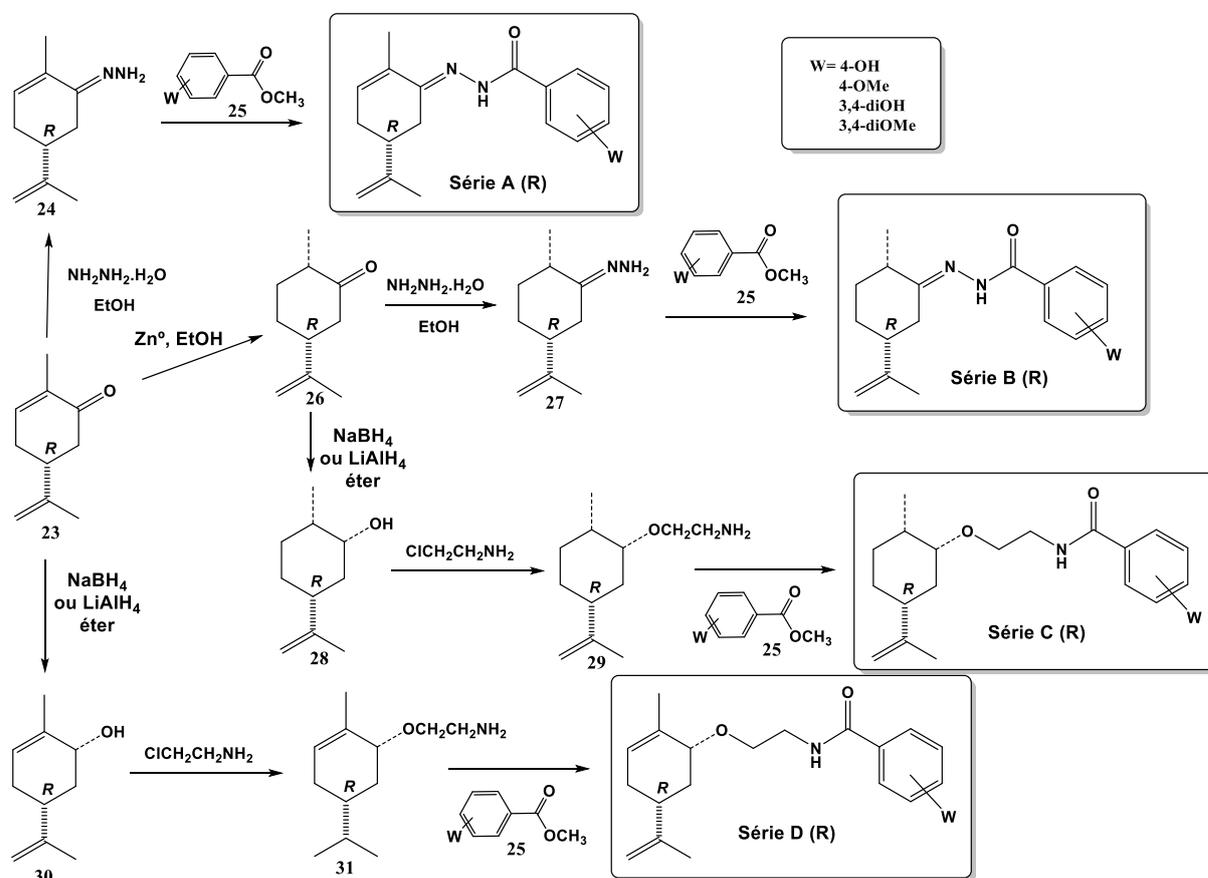


Esquema 2 - Análise retróssintética

Fonte: Do Autor

Baseado na análise retróssintética, foi delineado um planejamento sintético para a obtenção das séries-alvo A-E, baseado nas *R*-(-)-carvona e *S*-(+)-carvona comerciais como materiais de partida (**Esquema 3**). Tomando-se como exemplo a *R*-(-)-carvona (**23**), esta é inicialmente convertida na respectiva hidrazona (**24**), por reação com monohidrato de hidrazina. Em etapa subsequente, uma reação de acoplamento com uma série de metilbenzoatos funcionalizados (**25**) levou à série-alvo **A**. O mesmo material de partida **23** (ou seu estereoisômeros **23-S**) poderá ser submetido à uma redução quimiosseletiva da ligação dupla conjugada, com $\text{Zn}^0/\text{KOH}/\text{etanol}$ para gerar a diidrocarvona (**26**). Uma vez obtida, a diidrocarvona (**26**) será, então, convertida na respectiva hidrazona **27**, que será subsequentemente acoplada a uma série de metilbenzoatos funcionalizados (**25**), gerando a série de di-hidrocarvonil-acilidrazonas **B** desejada. A redução da carbonila de **26**, deverá

fornecer o respectivo diidrocarveol (**28**), que será reagido com 2-cloroetilamina para gerar o derivado amino éter **29**. O acoplamento de **29** com a série de metilbenzoatos **25** deverá levar à série de di-hidrocarveolil-benzamidas **C**. Partindo-se da carvona **23**, uma reação de redução por hidretos deverá levar ao respectivo carveol (**30**). A reação deste álcool com 2-cloroetilamina deverá levar ao respectivo amino éter **31** que, sendo subsequentemente acoplado à série de ésteres **25**, deverá gerar a série-alvo de diidrocarveolil-benzamidas **D**. Toda a abordagem sintética descrita para as séries **A-D(R)**, partindo da *R*-(-)-carvona (**23**) foi reproduzida, partindo de seu antípoda óptico *S*-(+)-carvona, fornecendo as séries-alvo **A-D(S)**, com inversão da configuração absoluta do C-4 estereogênico na subunidade terpênica do CBD.

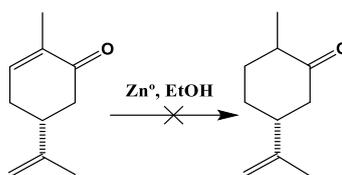


Esquema 3 - Abordagem sintética para a obtenção da série-alvo A de análogos aril-acilidrazônicos do canabidiol (2).

Fonte: Do Autor.

Numa proposta inicial, planejou-se para este trabalho a síntese das 4 séries A-D e, possivelmente, a série E, como uma proposta adicional de racionalização e otimização dos dados preliminarmente obtidos com as 4 séries iniciais. Desta forma, o projeto foi iniciado pela obtenção das matérias primas necessárias à condução da síntese das 4 séries -alvo em paralelo.

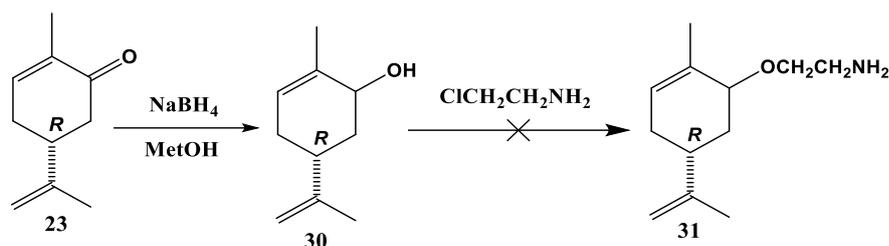
Para as séries B e C, a tentativa de preparação da diidrocarvona (**26**) foi realizada pela redução da dupla endocíclica da carvona (*R* ou *S*) com a utilização de Zn metálico/KOH em etanol, não se obteve o produto desejado. Pela experiência prévia de nosso grupo, este resultado poderia ser decorrente do tipo de agitação utilizada nesse experimento, pois é necessária uma agitação mecânica vigorosa do sistema reacional heterogêneo, o que não foi possível de reproduzir com a utilização de agitação magnética. Desta forma, decidimos por não dar seguimento, naquele momento, às séries B e C.



Esquema 4 -Tentativa de obtenção da di-hidrocarvona.

Fonte: Do Autor.

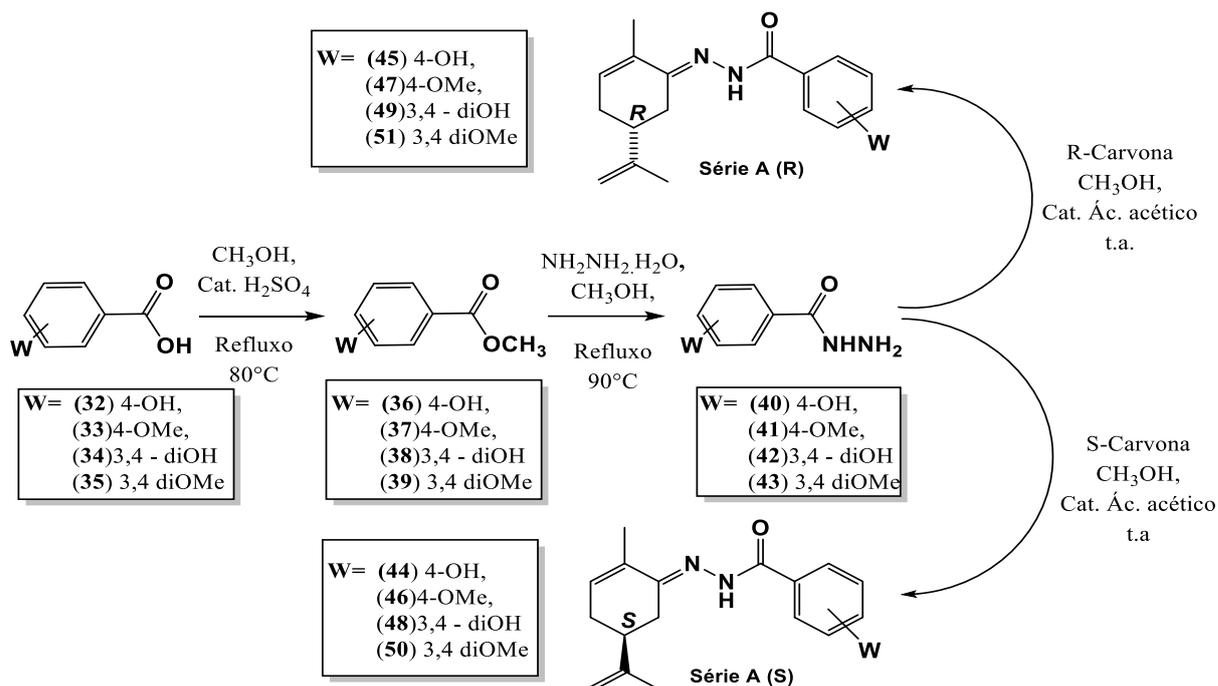
Para a série D, seria necessária a redução da carbonila da carvona, utilizando-se NaBH_4 ou LiAlH_4 em éter etílico, para a obtenção do carveol correspondente. Foram realizadas tentativas de redução com NaBH_4 com dois solventes diferentes, éter etílico em um primeiro experimento e metanol em uma nova tentativa. Com a utilização de éter etílico, a reação só se completava após 24h, o que conseguiu-se reduzir para cerca de 30 minutos com metanol anidro. As reações foram acompanhadas por CCD em sílica, eluídas com hexano/acetato de etila (90:10) e reveladas com reagente de vanilina sulfúrica. O produto foi caracterizado por RMN de ^1H e de ^{13}C , confirmando a obtenção do carveol (**30**). Numa etapa subsequente, **30** foi submetido à reação com 2-cloroetilamina para inserção do espaçador éter presente na série-alvo D. Numa primeira tentativa foi utilizado CHCl_3 como solvente e a reação não evoluiu; numa outra tentativa foi testada a síntese de Williamson⁹⁶, empregando-se a 2-cloroetilamina, NaOH , TBA em meio de éter etílico. A reação foi acompanhada por CCD, entretanto, não foi observada nenhuma evolução na reação (**Esquema 5**). Diante destes resultados negativos e da carência de recursos para aquisição de outros reagentes e, sobretudo, do tempo curto para conclusão do mestrado com resultados consistentes, decidimos focar o trabalho somente na síntese da série A.



Esquema 5 - Tentativa de obtenção dos precursores-chave para a síntese da série D.

Fonte: Do Autor.

Para a série A, foram testadas 3 diferentes alternativas sintéticas para obtenção dos produtos desejados. Numa primeira proposta, a carvona foi reagida com ácido trifloroacético (TFA, 0,05 eq.) e monohidrato de hidrazina (1,5 eq.) para obtenção da hidrazona correspondente, como descrito por Corey (1979)⁹⁷. O produto obtido foi caracterizado por RMN de ¹H e de ¹³C, mas foi obtido em muito baixo rendimento. Numa segunda alternativa, Satheshi e cols.⁹⁸ descreveram uma metodologia que utilizava a precipitação como forma de isolamento do produto da reação. No nosso caso, entretanto, foi obtido um óleo amarelo que levou ao produto desejado em rendimento em torno de 2%. Diante dos resultados anteriores, em que as reações se mostravam bastante “suja” devido a presença de sinais de graxa provenientes do hexano que foi utilizado como eluente, e os produtos de difícil purificação e rendimento, partimos para uma nova rota sintética, onde temos como material de partida ácidos benzoicos funcionalizados (**32-35**) para a obtenção dos respectivos ésteres (**36-39**), que seriam convertidos nas benzoidrazidas correspondentes (**40-43**). Uma vez obtidas, os intermediários-chave **40-43** seriam, então, acoplados às carvonas *R* e *S*. De fato, a adoção desta rota contornou os inconvenientes anteriores e levaram à obtenção dos produtos desejados **PQM-242 a PQM-249** (**44-51**, Esquema 6).



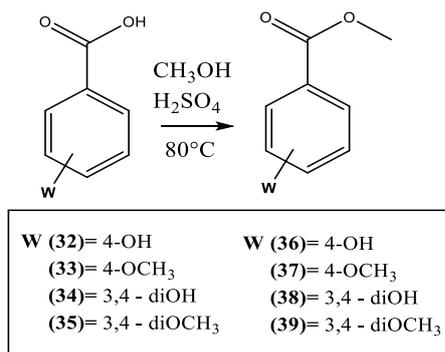
Esquema 6 - Rota sintética adotada para a obtenção dos análogos aril-acilidrazônicos do CBD **PQM-242** a **PQM-249**.

Fonte: Do Autor.

5.1.1 Síntese e caracterização dos ésteres (36, 37, 38 e 39) derivados de ácidos benzoicos: ácido 4-hidroxibenzoico (32), ácido 4-metoxibenzoico (33), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (34) e ácido 3,4-dimetoxibenzoico (35).

A primeira etapa de síntese dos ésteres consistiu na conversão de diferentes ácidos benzoicos comerciais com diferentes padrões de substituição (32-35) nos seus respectivos ésteres (36-39) (Esquema 7).

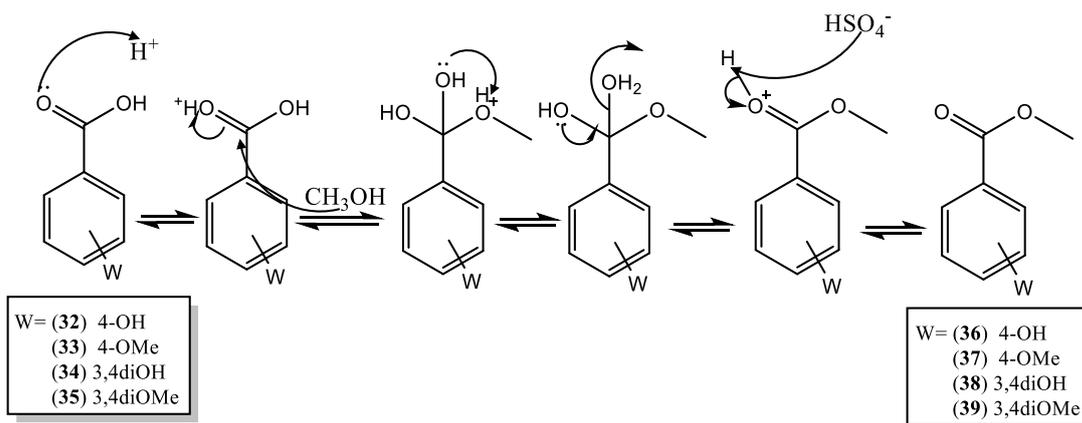
Os ésteres 4-metoxibenzoato de metila (37) e 3,4-dimetoxibenzoato de metila (39), devido a temperatura do banho do rota-evaporador que é próxima ao faixa de fusão destes ésteres (48°-52°C⁹⁹ e 59°-62°C¹⁰⁰ respectivamente), foram obtidos como um óleo de coloração levemente amarelada, que ao serem levados para o freezer tem-se a formação dos cristais, enquanto que o 4-hidroxibenzoato de metila (36) e o 3,4-diidroxibenzoato de metila (38) foram obtidos como sólidos de coloração branca-amarelada. Os ésteres 4-hidroxibenzoato de metila (36), 4-metoxibenzoato de metila (37), 3,4-diidroxibenzoato de metila (38) e 3,4-dimetoxibenzoato de metila (39) foram obtidos com 84-93% de rendimento, após purificação por filtração a vácuo dos cristais.



Esquema 7 -Síntese dos ésteres (**36-39**) derivados de ácido benzoico, por reação de esterificação de Fischer, na presença de H₂SO₄ como catalisador e CH₃OH.

Fonte: Do Autor.

O método escolhido para etapa de síntese foi uma esterificação de Fischer empregando-se ácido sulfúrico como catalizador e metanol como nucleófilo e solvente da reação, sendo, portanto, uma substituição nucleofílica acídica. Nesta etapa reacional, um par de elétrons proveniente do oxigênio carbonílico do ácido carboxílico realiza um ataque ao hidrogênio ácido proveniente do ácido sulfúrico, ocorrendo então uma transferência do próton do ácido sulfúrico para o oxigênio carbonílico. O que faz com que o carbono ligado a carbonila seja mais suscetível a um ataque nucleofílico, por ser um centro mais eletrofílico, que ocorre por parte da molécula de metanol, onde um par de elétrons proveniente do oxigênio do metanol se coordena ao carbono da carbonila, deslocando um par de elétrons na ligação dupla em sentido ao oxigênio e assim reestabelecendo a neutralidade do oxigênio carbonílico, que na etapa anterior se encontrava com carga positiva. Posteriormente, ocorre o prototropismo onde o hidrogênio proveniente do grupo metoxila migrará para uma das hidroxilas para formação de uma molécula de água “mascarada”, a qual será liberada no meio assistida pela migração de um dos pares de elétrons da outra hidroxila como o restabelecimento da dupla ligação. Finalmente, uma base presente no meio reacional realiza a abstração do hidrogênio coordenado ao oxigênio carbonílico, que acarreta na obtenção do composto do éster. A proposta mecanística para a reação é apresentada no **Esquema 8**.



Esquema 8 - Mecanismo da reação de esterificação de Fischer.

Fonte: Do Autor.

Como exemplo de elucidação estrutural para essa série de compostos, será apresentada a caracterização do composto 4-hidroxibenzoato de metila (**36**). Este composto foi caracterizado por análise dos seus espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C . No espectro de absorção na região do infravermelho (IV, **Figura 13**) foram observadas as principais bandas esperadas para a estrutura do 4-hidroxibenzoato de metila (**36**): $3348,01\text{ cm}^{-1}$ banda referente ao estiramento da hidroxila (OH), em 3045 cm^{-1} banda de deformação axial de ligação C-H de aromáticos, que muitas vezes é sobrepostas por outras bandas características desta região, em 2954 cm^{-1} banda de estiramento de carbono sp^3 ; em 2359 cm^{-1} e 2342 cm^{-1} bandas referentes a ligação C=C do anel aromático, em 1674 cm^{-1} banda referente ao estiramento da ligação C=O de éster, bandas de média intensidade referente a vibrações do núcleo aromático em 1583 cm^{-1} , 1511 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} e 1427 cm^{-1} ; duas bandas em, 1277 cm^{-1} e 1191 cm^{-1} referente a ligação C-O de ésteres coordenado a anéis aromáticos.

O valor base para a banda de C=O de ésteres é em 1735 cm^{-1} devido ao efeito de retirada de elétrons (efeitos indutivos), deixa a ligação C=O mais forte, ficando em uma frequência mais alta. Nos espectros de IV temos bandas de C=O na região entre 1716 cm^{-1} a 1674 cm^{-1} essa variação pode ser explicada devido aos efeitos de conjugação com o anel aromático fazendo com que ocorra a diminuição das frequências de absorção da carbonila e também devido aos substituintes do anel aromático que estão na posição para do anel e são grupos doadores de elétrons.

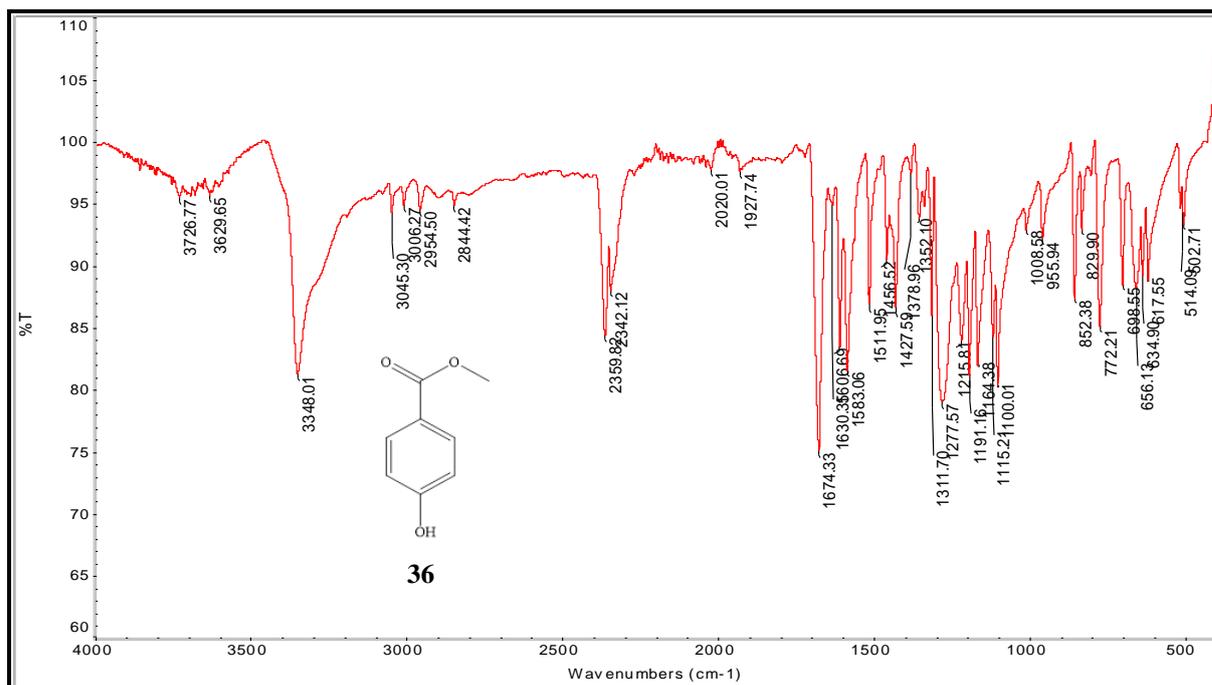


Figura 13 - Espectro de absorção na região do IV da 4-hidroxibenzoato de metila (**36**) (ATR).

Fonte: Do Autor

No espectro de RMN de ^1H , do composto 4-hidroxibenzoato de metila (**36**) foram observadas a presença dos seguintes sinais: um simpleto em δ 3,90 atribuído ao hidrogênio H10, um duplete em δ 6,88 ($J= 8,9$ Hz) referente aos hidrogênios H2 e H4 e um duplete em δ 7,95 ($J= 8,9$ Hz) atribuído aos hidrogênios H1 e H5. Os hidrogênios do grupo metoxila se encontram mais desblindados, em relação ao TMS, devido ao efeito de eletronegatividade causado pelo átomo de oxigênio ligado ao grupo metila, esse efeito é chamado de blindagem diamagnética e substituintes eletronegativos como o oxigênio reduzem a blindagem diamagnética, aos hidrogênios do anel aromático dois efeitos atuam sobre a desblindagem dos prótons, a eletronegatividade causada pelos átomos de oxigênio e a anisotropia magnética que é causada pelo campo magnético formado pela circulação dos elétrons π ao redor do anel, que leva a desblindagem dos prótons ligados ao anel aromático causando um deslocamento químico maior. Sendo que os hidrogênios 1 e 5 possuem o mesmo ambiente químico e sofrem a influência da eletronegatividade causada pela carbonila, sendo assim mais desblindados, enquanto que os hidrogênios 2 e 4 possuem o mesmo ambiente químico e sobre influência da eletronegatividade causada pelo oxigênio do grupo hidroxila ou a influência do grupo metoxila que doa densidade eletrônica deixando estes hidrogênios mais blindados. Os dupletos observados são devido ao acoplamento *spin-spin* entre os átomos de hidrogênios em carbonos vizinhos, assim temos que o hidrogênio 1 é afetado pelo *spin* do hidrogênio 2 e vice-versa, bem como o H5 é afetado pelo H4, e a constante de acoplamento (J) é a medida da intensidade que um núcleo é afetado pelo

outro, sendo que para hidrogênios em posição *orto* o ${}^3J \approx 7-10$ Hz, sendo encontrados nos espectros valores entre 6-9 Hz para 3J .

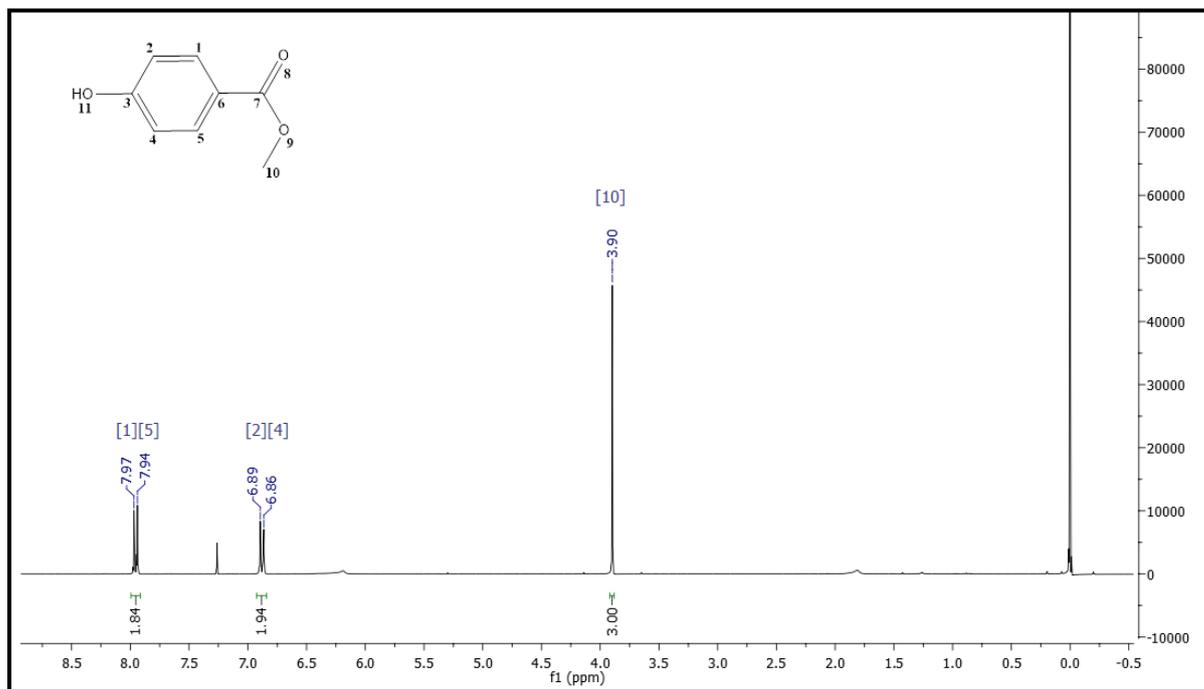


Figura 14 - Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3) da 4-hidroxibenzoato de metila (**36**).

Fonte: Do Autor.

Já no espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ do composto 4-metoxibenzoato de metila (**37**, Figura 38, Apêndice A) tem-se a presença de 3 hidrogênios da metoxila que possuem deslocamento próximo ao grupo metoxila do éster, devido a eletronegatividade do oxigênio. E no espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ do composto 3,4-diidroxibenzoato de metila (**38**, Figura 41, Apêndice A) destaca-se a presença dos hidrogênios das hidroxilas (δ 9,78 H11 e δ 9,36 H12), e a presença de acoplamentos em meta (${}^4J \approx 2-3\text{Hz}$) entre os hidrogênios H1 e H5, o que também é visto no espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ do composto 3,4-dimetoxibenzoato de metila (**39**, Figura 44, Apêndice A).

No espectro de RMN de ${}^{13}\text{C}$ do composto 4-hidroxibenzoato de metila (**36**) foi observada a presença dos seguintes sinais: em δ 167,3, um sinal característico do carbono carbonílico; em δ 160,2 atribuído ao C3, os carbonos do anel aromático em δ 132,0 atribuído ao C1/C5 e δ 115,3 atribuído ao C2/C4; em δ 122,4 atribuído ao C6 e o sinal em δ 52,1 atribuído ao C10. De maneira análoga ao que acontece com os átomos de hidrogênios, os átomos de carbono também sofrem os efeitos de átomos mais eletronegativos e da anisotropia magnética devido aos elétrons π do anel aromático, entretanto esses deslocamentos químicos são até 20 vezes maiores, pois estes

fatores agem por meio de uma ligação¹⁰¹. O C7 é o carbono mais desblindado pelo efeito da eletronegatividade causada pelos dois oxigênios do éster, enquanto que o C3 sofre a ação de apenas um átomo eletronegativo sendo mais desblindado do que os demais carbonos do núcleo aromático. Estes sinais são menos intensos por não sofrerem o efeito nuclear Overhauser (NOE), o que também ocorre com o C6. Este efeito prevê que átomos de carbono com hidrogênios diretamente ligados tem seu sinal intensificado, assim a intensidade do sinal aumenta com a quantidade de hidrogênios ligados ao carbono.

Devido a uma simetria existente na molécula temos que os C1 e C5 são idênticos e por isso seus sinais são intensos (ou seja, duplicado a intensidade) e sofrem o efeito da eletronegatividade causada pelo grupo éster, sendo que a mesma intensidade é esperada para os C2 e C4 e estes são mais blindados pelo efeito da eletronegatividade ser menor. E o carbono C10 devido a eletronegatividade do oxigênio tem seu sinal menos blindado, tendo assim um deslocamento esperado para carbonos saturados com átomos eletronegativos (25-80 ppm). O mesmo efeito ocorre nos compostos **37** e **39** (Figuras 39 e 45 respectivamente, Apêndice A) que possuem grupos metoxila na posição 3 e 4 do anel aromático, sendo que estes são menos desblindados por não estarem próximos a carbonila. Nos compostos **38** (Figura 42, apêndice A) e **39** observamos todos os carbonos do anel aromático por estes serem trissubstituídos, não possuírem carbonos equivalentes, assim os deslocamentos são influenciados pela proximidade com grupos eletronegativos.

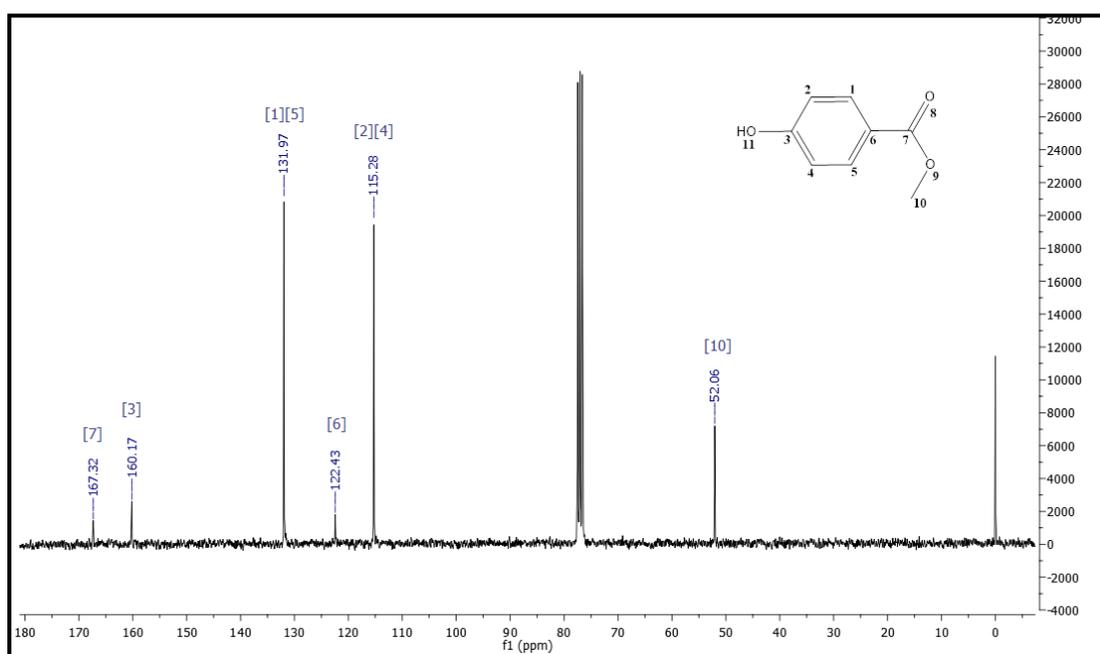
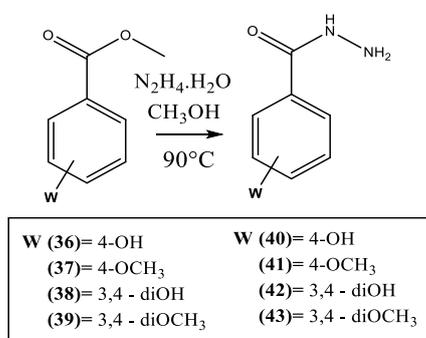


Figura 15 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da 4-hidroxibenzoato de metila (**36**).
Fonte: Do Autor

5.1.2 Síntese e caracterização das benzoidrazidas: 4-hidroxibenzoidrazida (40), 4-metoxibenzoidrazida (41), 3,4-diidroxibenzoidrazida (42) e 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43).

As benzoidrazidas foram sintetizadas a partir dos respectivos ésteres (36-39) por reação com monidrato de hidrazina ($N_2H_4 \cdot H_2O$).

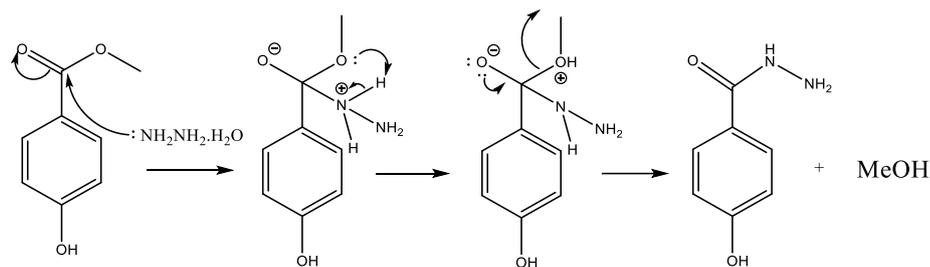
Em todos os experimentos, os produtos brutos de reação foram obtidos como sólidos de coloração branco-amarelada, que foram filtrados a vácuo e lavados abundantemente com água destilada fornecendo a 4-hidroxibenzoidrazida (40), 4-metoxibenzoidrazida (41), 3,4-diidroxibenzoidrazida (42) e 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43), em rendimentos de 84-93%.



Esquema 9 - Síntese das benzoidrazidas (40-43), através de reação de hidrazinólise, para a formação do intermediário chave.

Fonte: Do Autor.

O mecanismo proposto para a reação de hidrazinólise dos ésteres 36-39 já é descrito na literatura¹⁰²⁻¹⁰⁵ e está baseado no ataque nucleofílico da hidrazina à carbonila do éster. Numa etapa posterior, ocorre uma transferência de próton do grupo amino, para o oxigênio do grupo metoxila, tornando-a melhor grupo abandonador. Em seguida, tem-se a restituição da dupla ligação carbono-oxigênio da carbonila, com a eliminação de metanol e formação da hidrazida correspondente.



Esquema 10 - Proposta mecanística para a etapa de hidrazinólise.

Fonte: Do Autor

A elucidação estrutural de todas as benzoidrazidas obtidas foram realizadas por análises dos dados espectroscópicos no IV e RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Como exemplo segue o conjunto de espectros da 4-hidroxibenzoidrazida (**40**). No espectro de absorção na região do infravermelho (IV, **Figura 16**) foram observadas as seguintes bandas para a estrutura do 4-hidroxibenzoidrazida (**29**): 3312 cm^{-1} banda referente a ligação N-H(NH_2) de amida, em 3268 cm^{-1} banda referente ao estiramento da hidroxila, em 3192 cm^{-1} banda referente ao estiramento da ligação N-H em 2999 cm^{-1} banda de deformação axial de C-H do anel aromático; em 1606 cm^{-1} banda referente a C=O de amida; bandas de média intensidade referente ao estiramento da ligação C=C do anel aromático em 1536 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1463 cm^{-1} , 1393 cm^{-1} ; em 1587 cm^{-1} banda de deformação angular simétrica no plano de NH_2 .

O valor base encontrado para banda de carbonila de amida é em 1690 cm^{-1} , esse valor está em uma frequência mais baixa do que os ésteres devido ao efeito de ressonância existente com o átomo de nitrogênio aumentando o caráter de ligação simples da carbonila e diminuindo a frequência de absorção C=O, devido a efeitos de conjugação com o anel aromático faz com que as frequências de absorções sejam menores que o valor base.

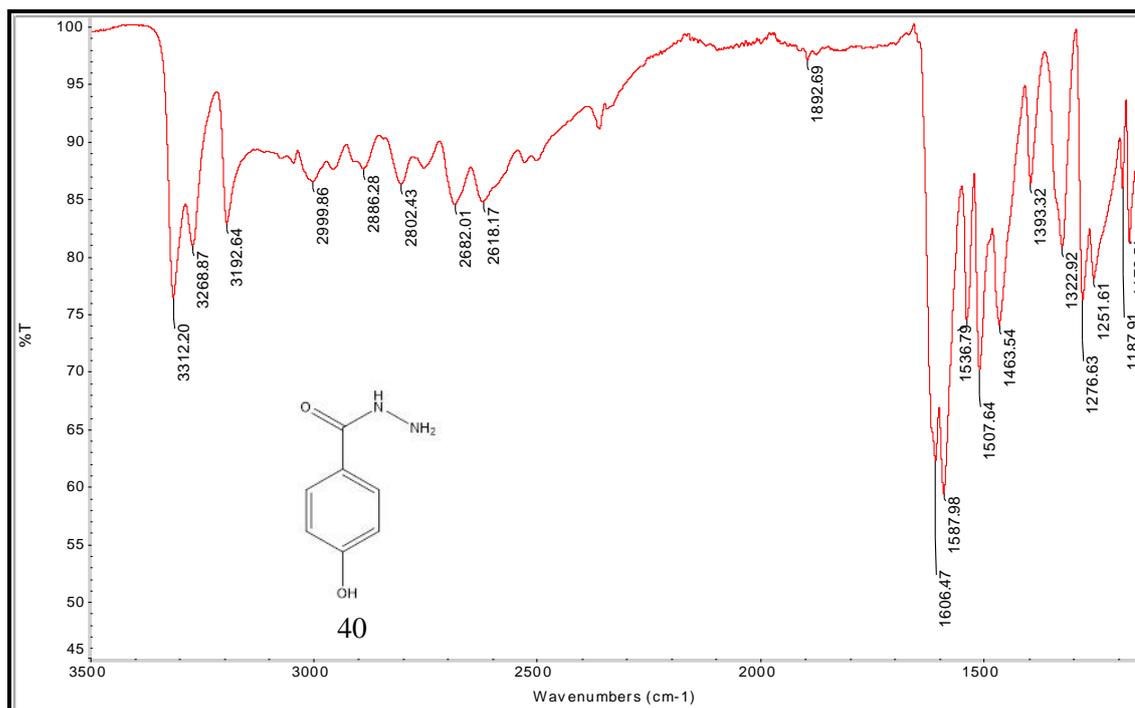


Figura 16 - Espectro de absorção na região do IV da 4-hidroxibenzoidrazida (**40**) (ATR).
Fonte: Do Autor

No espectro de RMN de ¹H da 4-hidroxibenzoidrazida (**40**, **Figura 17**) foram observadas a presença dos seguintes sinais: um simpleto em δ 4,38 atribuído ao hidrogênio H10, um duplete em δ 6,78 ($J= 7,3$ Hz) referente aos hidrogênios H2 e H4 e um duplete em δ 7,69 ($J= 7,45$ Hz) atribuído aos hidrogênios H1 e H5, um simpleto em δ 9,49, referente a H9. Este sinal foi atribuído a H9 devido a presença de sinais com deslocamento próximos nos demais espectros de RMN de ¹H das demais benzoidrazidas (**41-42**, **Figura 48 e 50** respectivamente, Apêndice A), não podendo então ser atribuído ao hidrogênio proveniente da hidroxila (H11). Visto que este hidrogênio sofre uma troca rápida com o hidrogênio proveniente da água encontrada no solvente dificultando a sua visualização em espectros de RMN, fazendo com que não ocorra o acoplamento de *spin* com hidrogênios vizinhos (caso tenha), sendo visualizados como um simpleto ou uma banda alargada de acordo com a velocidade da troca. O mesmo efeito ocorre com os hidrogênios da amina e amida. Em moléculas que tenham o nitrogênio podem ocorrer o alargamento quadrupolar e desacoplamento por causa do nitrogênio apresentar *spin* unitário ($I=1$) o qual apresenta um momento de quadrupolo de tamanho moderado o que levará a três situações diferentes de acordo com o solvente e a temperatura. Temos então, o momento de quadrupolo pequeno onde tem-se o acoplamento ¹⁵N-¹H, o momento de quadrupolo elevado onde não se veem acoplamentos tendo um estado de *spin* médio observando um simpleto e por último o momento de quadrupolo moderado o que leva ao alargamento dos picos ¹⁰¹. Nota-se

então que em todas as benzoidrazidas (**40-43**) e nos compostos finais (benzoidrazonas) (**44-51**) temos o momento de quadrupolo elevado do nitrogênio onde este apresenta-se como um simpleto nos espectros de RMN de ^1H .

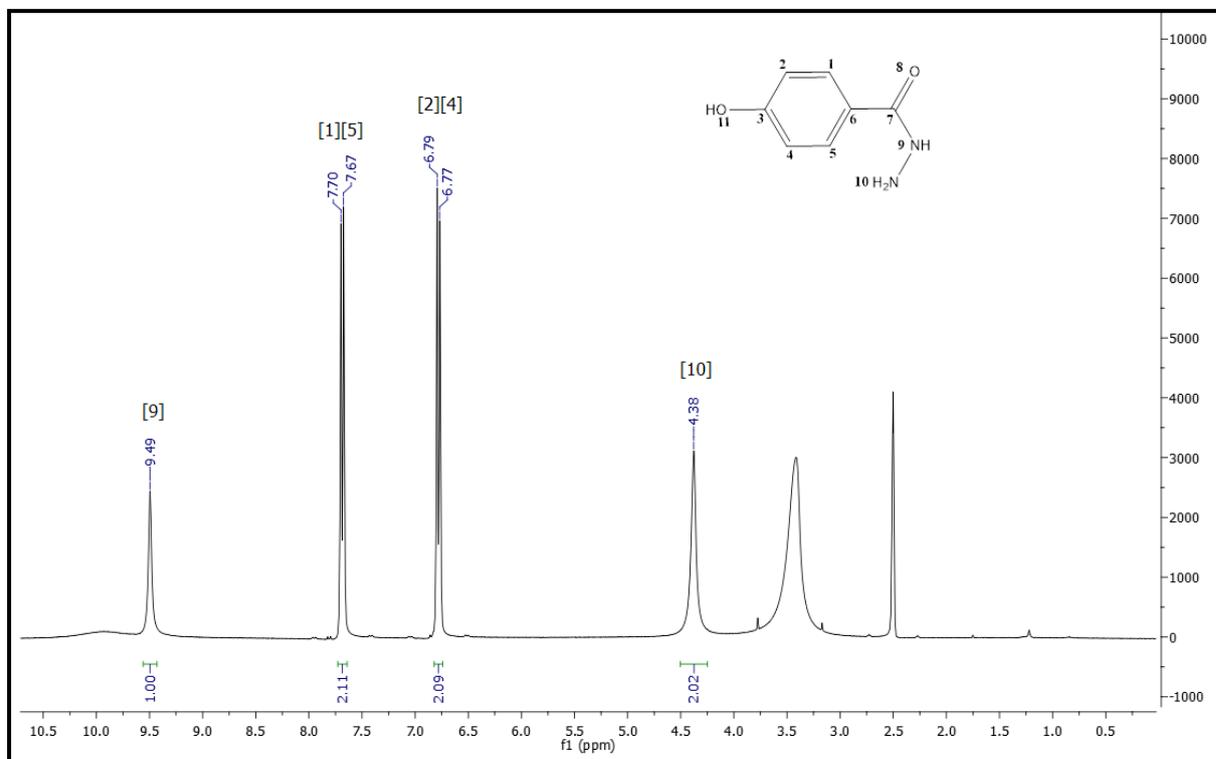


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da 4-hidroxibenzoidrazida (**40**).
Fonte: Do Autor

No espectro de RMN de ^{13}C da 4-hidroxibenzoidrazida (**40**, **Figura 18**) foram observadas a presença dos seguintes sinais: sinais referentes ao núcleo aromático em δ 128,9 e δ 114,9 dos carbonos C1/C5 e C2/C4 respectivamente e em δ 124,0 atribuído ao carbono C6, em δ 160,1 referente ao C3 e em δ 166,1 o sinal do carbono carbonílico C7. O mesmo conjunto de informações colocadas no espectro da 4-hidroxibenzoato de metila (**36**) é válido para as benzoidrazidas, sendo que para a diferenciação de um ou outro composto é devido à ausência do sinal referente a metoxila do éster que estaria na região de 25-80 ppm.

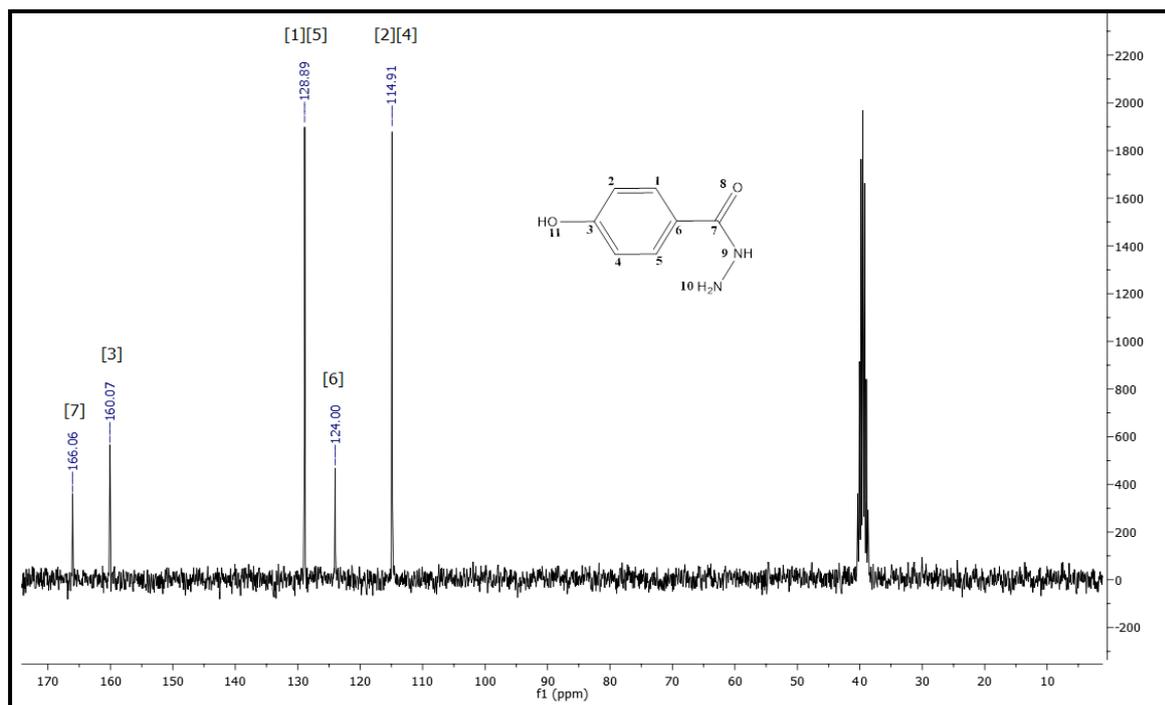
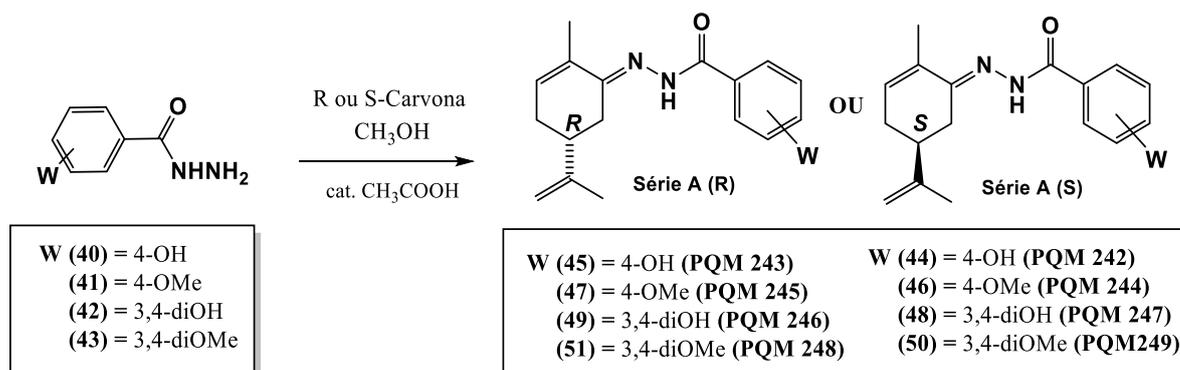


Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da 4-hidroxibenzoidrazida (**40**).

Fonte: Do Autor

5.1.3 Síntese e caracterização das benzoidrazonas PQM-242 (**44**), PQM-243 (**45**), PQM-244 (**46**), PQM-245 (**47**), PQM-246 (**49**), PQM-247 (**48**), PQM-248 (**51**) e PQM-249 (**50**).

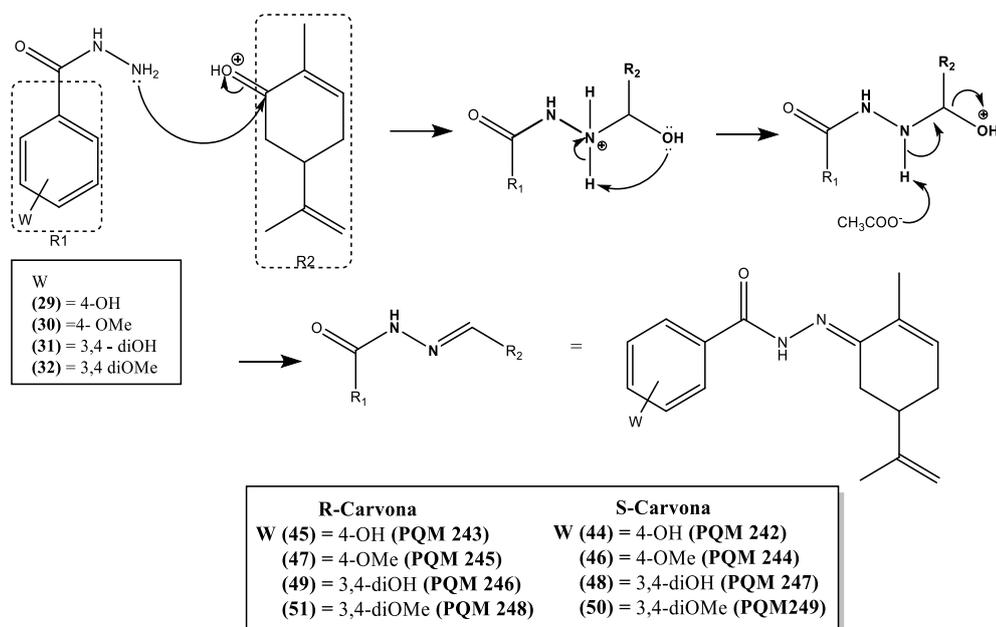
A última etapa da síntese para a obtenção das moléculas-alvo consistiu em uma reação de acoplamento entre os intermediários-chave 4-hidroxibenzoidrazida (**40**), 4-metoxibenzoidrazida (**41**), 3,4-dihidroxibenzoidrazida (**42**) e 3,4-dimetoxibenzoidrazida (**43**), obtidos na etapa anterior com as *R* e *S*-carvonas, que resultou nas respectivas benzoidrazonas [PQM-242 (**44**), PQM-243 (**45**), PQM-244 (**46**), PQM-245 (**47**), PQM-246 (**49**), PQM-247 (**48**), PQM-248 (**51**) e PQM-249 (**50**)].



Esquema 11 - Síntese dos compostos finais (**44-51**)

Fonte: Do Autor.

A reação tem início com um ataque nucleofílico pelo par de elétrons da hidrazida ao carbono carbonílico da carvona, que se encontra previamente ativada pelo ácido acético. Em seguida ocorre uma transferência de próton do nitrogênio para a hidroxila por prototropismo, tornando-a melhor grupo abandonador a partir de então. Em seguida tem-se abstração do próton coordenado ao N pelos íons acetato presentes no meio reacional, que leva a formação da ligação π N=C com a liberação de uma molécula de água no meio e obtenção da benzoidrazona (PQM-242 (**44**), PQM-243 (**45**), PQM-244 (**46**), PQM-245 (**47**), PQM-246 (**49**), PQM-247 (**48**), PQM-248 (**51**) ou PQM-249 (**50**, Esquema 12).

Esquema 12 - Proposta mecanística para a obtenção das benzoidrazonas (**44-51**).

Fonte: Do autor

Como exemplo de elucidação estrutural para essa série de compostos, será apresentada aqui a caracterização do composto PQM-242 (**44**). Este composto foi caracterizado pela análise dos seus espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e Massas, em comparação aos dados espectrais obtidos para a benzoidrazida **40**, utilizada como precursora. No espectro de absorção na região do infravermelho (IV, **Figura 19**) foram observadas as seguintes bandas para a estrutura do PQM-242 (**44**): em 3371 cm^{-1} banda de deformação axial de hidroxila (OH), 3237 cm^{-1} banda de NH de amida, em 2919 cm^{-1} e 2849 cm^{-1} bandas de deformação axial de ligação C-H de cadeia alifática de carbonos primário e carbono terciário, em 1663 cm^{-1} banda de C=O de amida,

em 1639 cm^{-1} banda de intensidade média referente a ligação C=C de alcenos, 1609 cm^{-1} banda referente a ligação C=N, em 1586 cm^{-1} , 1526 cm^{-1} , 1504 cm^{-1} bandas de intensidades variadas referentes as ligações C=C de aromáticos, em 1445 cm^{-1} e 1262 cm^{-1} bandas de deformação axial de C-N, em 1229 cm^{-1} banda de média intensidade referente a ligação C-O de fenol, por fim em 847 cm^{-1} banda de deformação angular referente a C-H de aromáticos para-substituídos.

Para os compostos finais temos o mesmo valor base para carbonila de amida (1690 cm^{-1}) entretanto o efeito de ressonância com o par de elétrons do nitrogênio é diminuído pois este pode fazer tanto a ressonância com a carbonila quanto com o grupo imina (C=N), fazendo com os valores de absorção estejam em frequências maiores do que as benzoidrazidas precursoras e mais próximos do valor base.

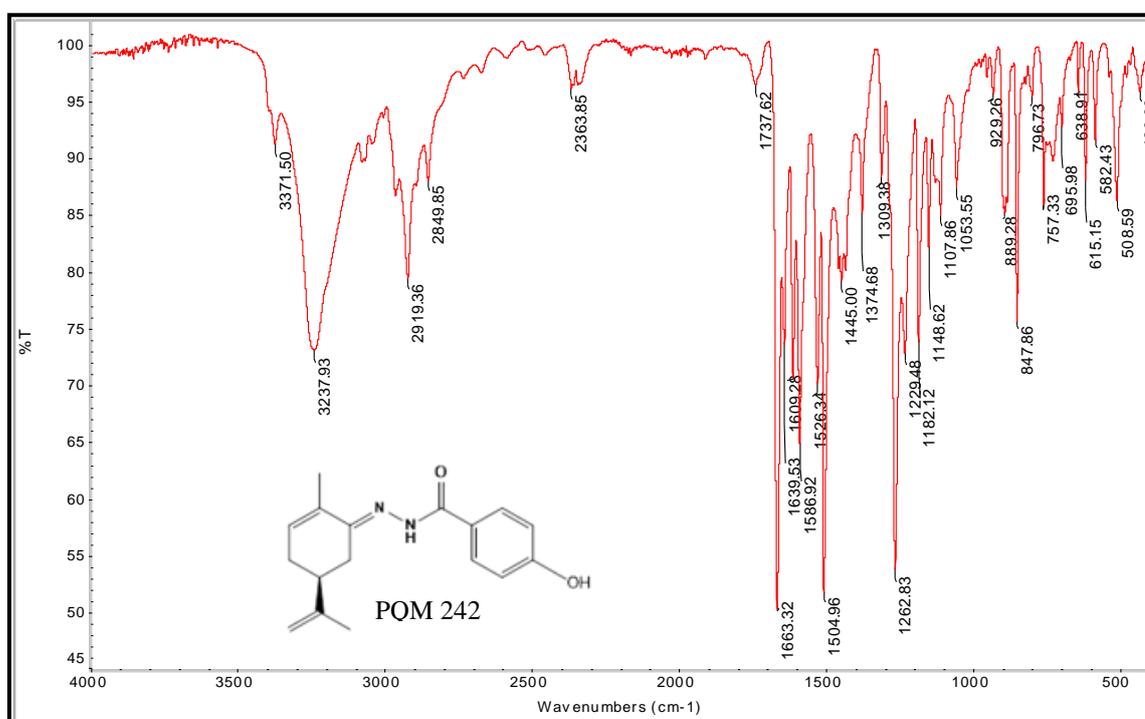


Figura 19 - Espectro de absorção na região do IV da benzoidrazona PQM-242 (**44**) (ATR).
Fonte: Do Autor

No espectro de RMN de ^1H , do composto PQM-242 (**44**) (**Figura 20**) foi observada a presença dos seguintes sinais: um simpleto em δ 10,4 atribuído ao hidrogênio H9, um duplete em δ 7,72 ($J= 8,56\text{ Hz}$) referente aos hidrogênios H1 e H5 e um duplete em δ 6,82 ($J= 8,51\text{ Hz}$) atribuído aos hidrogênios H2 e H4, um simpleto em δ 6,17 atribuído ao hidrogênio H13, um duplete em δ 4,79 ($J=9,12\text{ Hz}$) referente ao hidrogênio H18, um duplete em δ 2,93 ($J= 15,62\text{ Hz}$) atribuído ao hidrogênio H16, em δ 2,32 um duplete ($J=14,76\text{ Hz}$) referente ao H15, um duplete em δ 2,23 ($J=7,00\text{ Hz}$) atribuído ao H14, um multipletto com δ 2,11-2,16 é atribuído

aos hidrogênios H14 e H16, um simpleto em δ 1,74 referente ao hidrogênio H19 e um simpleto em δ 1,83 referente ao hidrogênio H20.

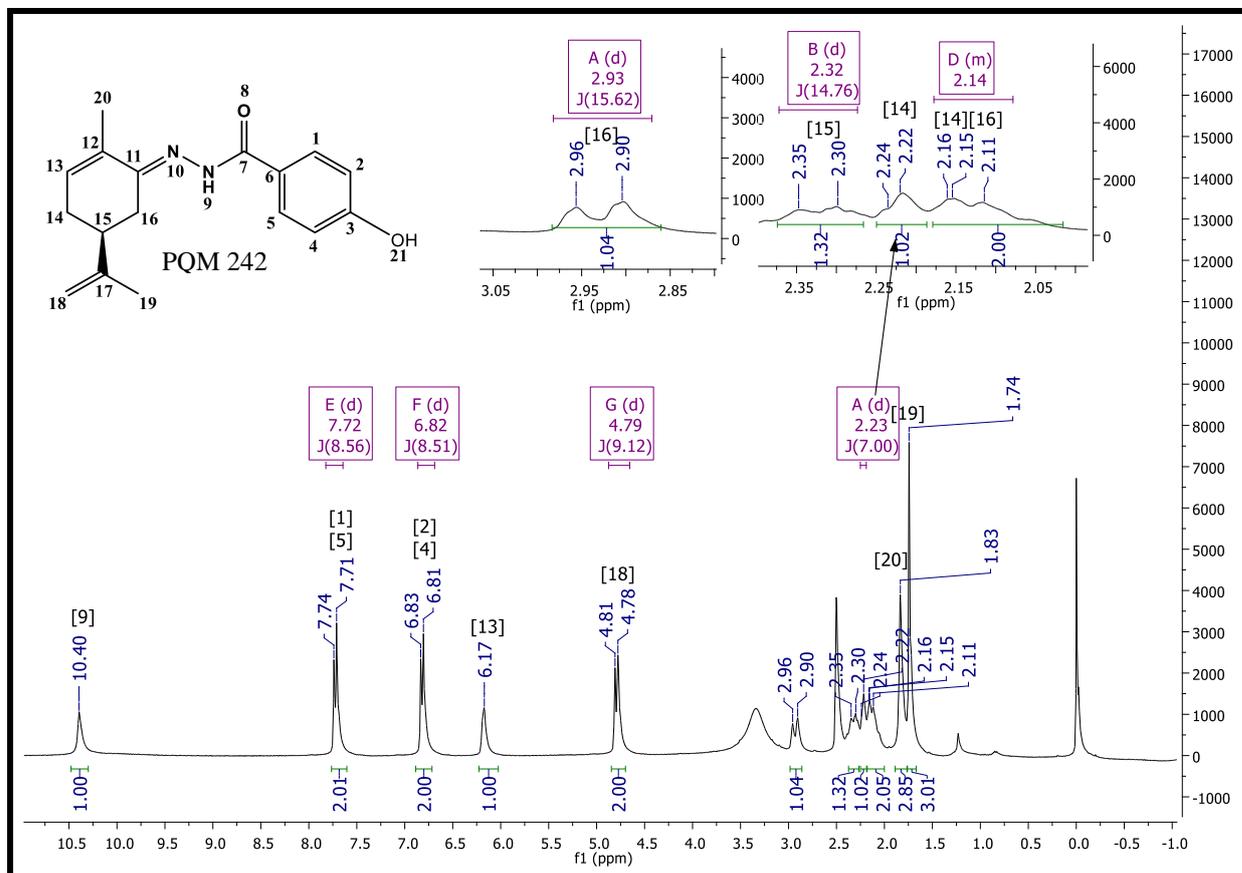


Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-242 (**44**).

Fonte: Do Autor

Destaca-se a presença de hidrogênios diastereotópicos (H14 e H16) devido a presença de um estereocentro em C15, os quais estão em um ambiente químico diferente e por isso temos a presença 2 sinais com deslocamentos diferentes para cada um dos hidrogênios. Para um dos hidrogênios H16 devido a resolução do RMN temos a presença de dupletos e duplos dupletos devido a acoplamento dos hidrogênios geminais e do acoplamento com o hidrogênio vicinal (H15), o qual está mais desblindado do que os demais hidrogênios (H14 e H15) pela proximidade com o átomo de nitrogênio que é um elemento eletronegativo, apresentando deslocamentos químicos entre 2,95 a 2,75 ppm. Nos espectros de RMN de ^1H dos compostos PQM-242 ($^2J=15,62$ Hz), PQM-244 ($^2J=16,04$ Hz), PQM-245 ($^2J=15,41$ Hz), PQM-246 ($^2J=17,40$ Hz), PQM-247 ($^2J=16,27$ Hz) e PQM-248 ($^2J=15,39$ Hz) os sinais apresentam-se como dupletos e o valor de 2J apresentado é correspondente ao acoplamento geminal do H16, a qual é dependente do ângulo diedro (α) entre as ligações, no cicloexeno o $\alpha \approx 109^\circ$ resultando

em ${}^2J=12-18$ Hz. Nos compostos PQM-243 e PQM-249, temos a presença de duplos dupletos observando assim a presença do acoplamento vicinal entre o H16 e H15 com ${}^3J=2,96$ Hz para o PQM-243 e ${}^3J=3,39$ Hz para PQM-249, esses valores de acoplamento estão de acordo quando ocorre a interação de um hidrogênio axial com equatorial ou quando os hidrogênios estão preferencialmente na posição equatorial, resultando assim em $\alpha \approx 60^\circ$, como demonstrado na **figura 21**.

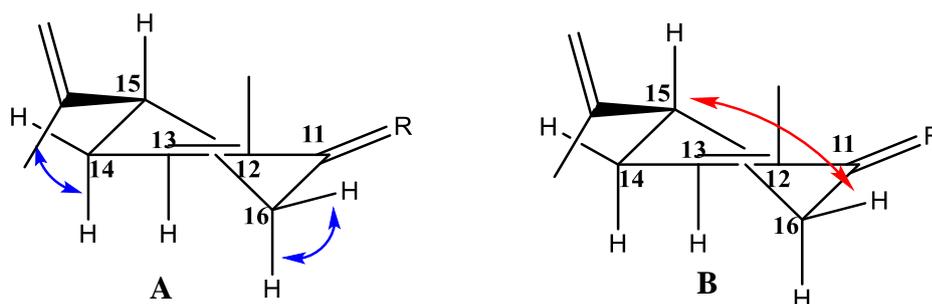


Figura 21 - Modelo dos acoplamentos geminais (A) e vicinais (B) que ocorrem na molécula de acordo com J .

Fonte: Do Autor

Para um dos hidrogênios H14 os deslocamentos variam entre 2,22-2,33 ppm, é observado para os compostos que possuem grupos hidroxila (**PQM-242**, **PQM-243**, **PQM-246** e **PQM-247**) o deslocamento ocorre em campo mais alto do que para os compostos com a presença de grupo metóxi ($-\text{OCH}_3$), ocorre também diferença nos acoplamentos destes compostos. Nos compostos **PQM-244**, **PQM-245**, **PQM-248** e **PQM-249** tem-se a presença de um duplo tripleto enquanto que nos demais este sinal ocorre como duplete e simpleto (**PQM-247**), isso pode ser explicado, possivelmente, devido à resolução dos espectros de RMN, pelo tempo de aquisição de dados e as diferenças estruturais entre as moléculas. A mesma interpretação que é realizada para o H16 é válida para o H14, sendo que o H14 irá acoplar-se com H13 e H15 os quais são acoplamentos vicinais, além do acoplamento geminal. Como exemplo o espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ de **PQM-246** (**Figura 76**, Apêndice B) mostra o acoplamento vicinal entre H14 e H13, visto que a constante de acoplamento, 3J , tem o mesmo valor 4,38 Hz para ambos hidrogênios, valores próximos de acoplamentos podem ser notados nos demais espectros. Os outros dois hidrogênios H14 e H16 tem seus sinais em uma mesma região de campo alto (2,05-2,20 ppm), em geral na forma de um multiplete. Estes sofrem o efeito de anisotropia diamagnética e por isso são mais blindados. As duplas ligações, geram um campo magnético pela circulação induzida dos elétrons π , formando assim áreas cônicas as quais são blindadas.

Assim sendo, um dos hidrogênios H14 está na área cônica formada pela dupla ligação entre os carbonos C17 e C18 enquanto que o H16 sofre a ação da área cônica devido a ligação C=N.

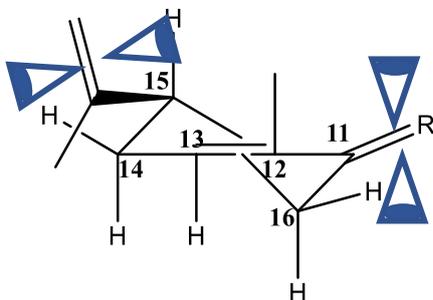


Figura 22 - Modelo de das áreas cônicas que influenciam no deslocamento dos H16 e H14
Fonte: Do Autor.

Nota-se também o acoplamento geminal nos H18, o qual é dependente do ângulo α formado pelas ligações HCH, em geral as constantes de acoplamento J aumentam conforme o ângulo α diminui¹⁰¹, como é mostrado na **Figura 23**, isso porque os orbitais se aproximam e as correlações de *spin* eletrônico ficam maiores, existem outras três características que afetam a constante de acoplamento geminal; a dependência da hibridização do átomo de carbono, o efeito do substituinte e o efeito do substituinte- π vizinho, fazendo com que estes variem de -20 Hz a 40 Hz¹⁰⁶, sendo encontrado valores entre 8,98-11,67 Hz nos espectros de RMN de ^1H .

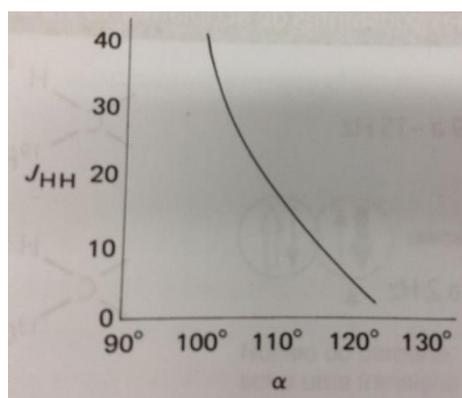


Figura 23 - Dependência da magnitude de $^2J_{HCH}$, a constante de acoplamento

Fonte: Introdução a Espectroscopia, 2015.¹⁰¹

Os hidrogênios dos grupos metila (H19 e H20) se diferenciam pela proximidade com o nitrogênio, assim os hidrogênios H20 são mais desblindados do que os hidrogênios H19 pelo efeito da eletronegatividade causada pelo átomo de nitrogênio. Nos compostos hidroxilados (**PQM-242**, **PQM-243**, **PQM-246** e **PQM-247**) mostraram ter um deslocamento maior para o hidrogênio H9 (10,33 a 10,40 ppm) do que os compostos metoxilados (8,81 a 8,92 ppm), isso pode ser explicado pelo grupo hidroxila ser um grupo retirador de densidade eletrônica enquanto que o grupo metoxila é doador de densidade eletrônica blindando mais estes hidrogênios. No espectro de RMN de ^{13}C , do composto PQM-242 (**44**, **Figura 24**) foi observada a presença dos seguintes sinais: em δ 163,6 referente ao carbono C7, em δ 160,3 refere-se ao carbono C3, em δ 156,2 referente ao carbono C11, em δ 133,4 referente ao carbono C12, sinais referentes ao núcleo aromático em δ 132,4 e δ 114,6 dos carbonos C1/C5 e C2/C4 respectivamente, em δ 124,5 atribuído ao carbono C6, em δ 129,8 referente ao carbono C13, em δ 29,6 atribuído ao carbono C14, com δ 147,6 o sinal do carbono C17, em δ 110,0 refere-se ao carbono C18, em δ 20,4 foi atribuído o sinal do carbono C19 e por fim em δ 17,9 o sinal do carbono C20. De maneira geral nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos finais tem-se a presença dos carbonos provenientes das *R* e *S*-carvonas acrescidos daqueles provenientes da estrutura das benzoidrazidas, já discutidos. Temos então a presença de carbonos saturados sp^3 na região de 15-30 ppm (C14, C19, C20), sendo que os sinais dos carbonos C16 e C15 não foram distinguidos, sendo que C16 possui o mesmo deslocamento que o C14, enquanto que C15 está encoberto pelo sinal do solvente utilizado, o qual podem ser observados pela técnica de contorno HMQC (**Figura 25**). Apresenta-se também os sinais de carbonos sp^2 na região de 110-150 ppm sendo eles os C12, C13, C17 e C18, pelo qual o C12 e C13 tem seus deslocamentos influenciados pelos efeitos de eletronegatividade. E por fim, neste espectro temos a presença do C11, o qual dificilmente é visto os demais espectros pois carbonos sem hidrogênios não sofrem o efeito NOE e, por isso, os sinais são geralmente pouco intensos ou inexistentes.

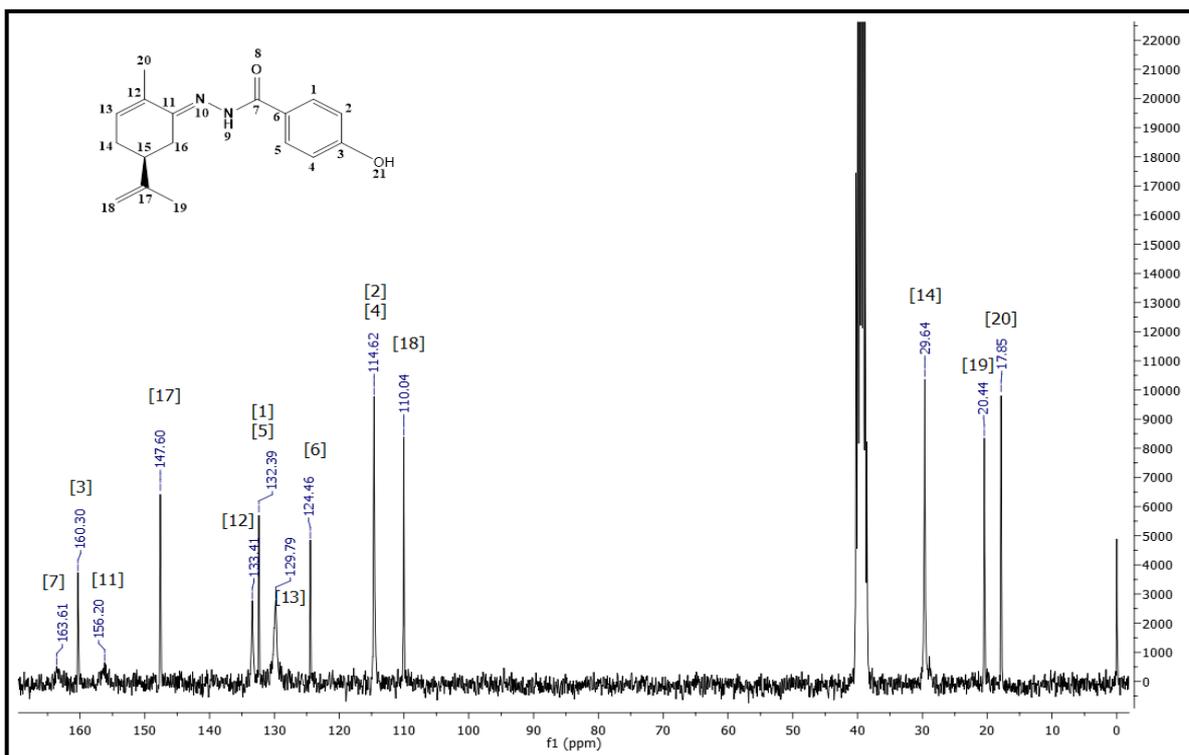


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-242 (**44**).
Fonte: Do Autor

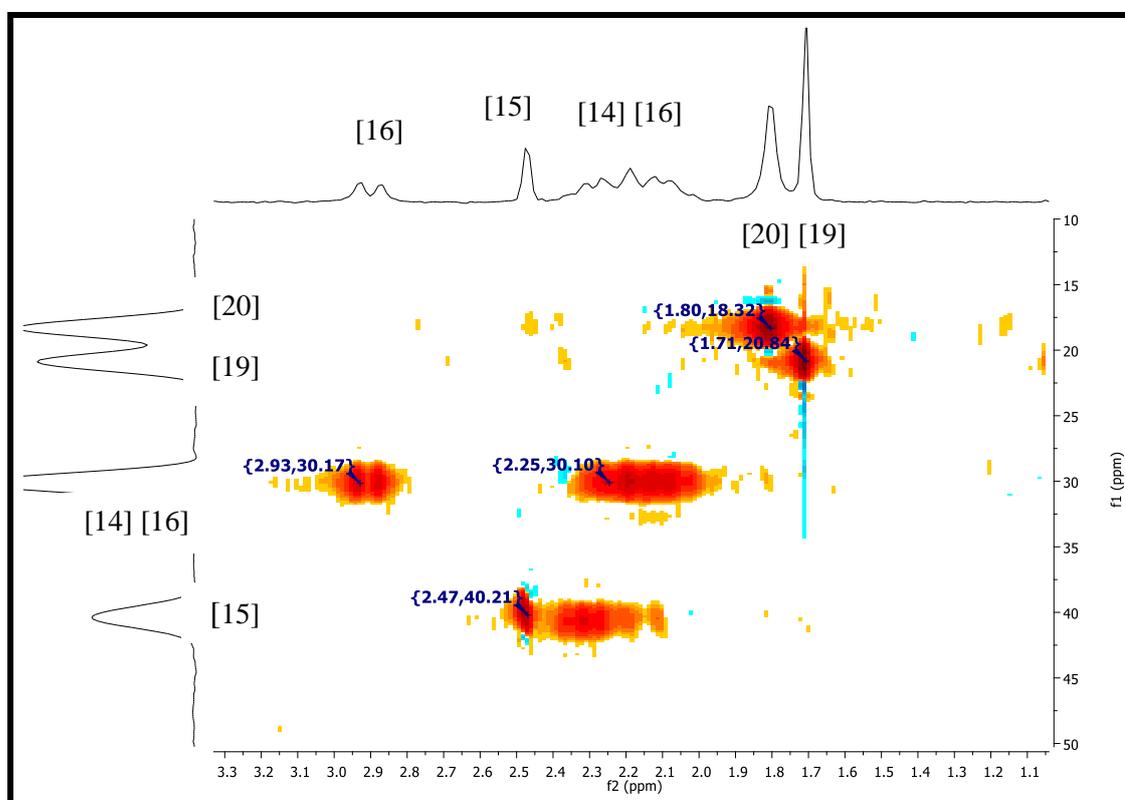


Figura 25 - Expansão do mapa de contornos HMBC do composto PQM-242 (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$).
Fonte: Do Autor

Os espectros de massas foram obtidos através da ionização por eletrospray (*ESI*) no modo positivo, por apresentarem grupamentos básicos como a amida, sendo facilmente protonadas¹⁰⁷. A técnica *ESI* é considerada branda possibilitando a análise das moléculas sem que haja fragmentação¹⁰⁸, ocorrendo a formação de íons no estado gasoso¹⁰⁹ através do qual três tipos de íons podem ser gerados; os íons moleculares (M^+ ou M^-), moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) e por fim moléculas cationizadas ou anionizadas ($[M+Na]^+$ e/ou $[M+Cl]^-$), a formação destes íons ocorrem através de 3 processos, as reações redox, reações ácido/base e a coordenação com cátions (família 1A) ou ânions (principalmente cloretos) respectivamente¹⁰⁷.

No espectros de massas apresentados observou-se predominantemente a formação de moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$) seguida pelas moléculas protonadas ($[M+H]^+$), isso se dá devido a estrutura molecular onde temos a presença de sistema π conjugado e funções básicas (como amidas)¹⁰⁷. A **Figura 26** apresentou um pico em 307,14 referente a razão m/z do íon do composto **PQM-242** $[C_{17}H_{20}N_2O_2+Na]^+ = m/z$ 307,1422 em maior abundância, seguido pelo pico $[C_{17}H_{20}N_2O_2+H]^+ = m/z$ 285,1577 essas mesmas razões m/z foram observadas para o composto **PQM-243** (**Figura 58**, Apêndice B).

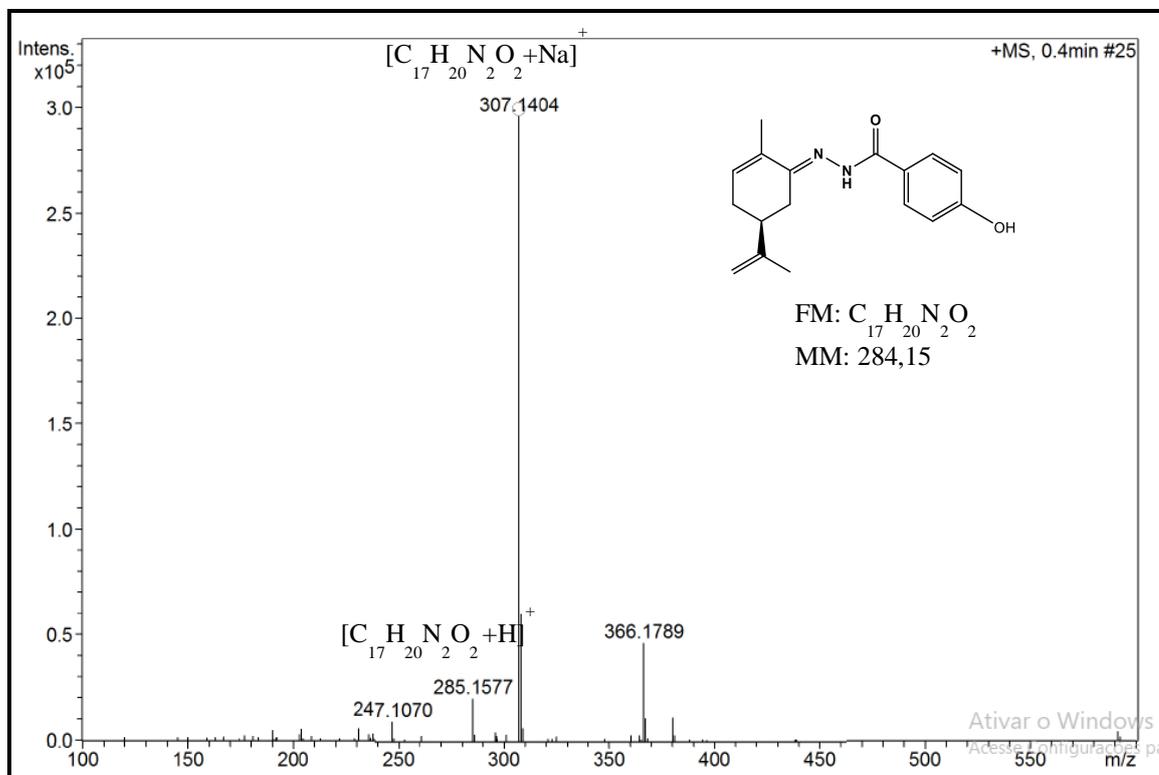


Figura 26 - Espectro de massas *ESI* do composto **PQM-242** (**44**).

Fonte: Do Autor.

5.1.4 Avaliação da atividade quelante de metais

A habilidade de quelação a íons metálicos é avaliada pela formação de um complexo formado entre a substância-teste e o metal, impedindo que os íons metálicos possam agir como um iniciador da oxidação lipídica¹¹⁰. Os metais de transição desempenham um papel importante na formação de radicais livres de oxigênio em organismos vivos¹¹¹. O ferro é conhecido por ser o metal de transição mais pró-oxidante, o qual decompõe peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e lipídios em radicais livres através da reação de Fenton¹¹¹. Assim agentes quelantes capturam íons metálicos e possivelmente previnam ou retardam a oxidação lipídica produzida por estes¹¹⁰. Em pacientes com DA, íons metálicos como Cu^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+2} estão implicados na formação de placas amiloides recentemente um estudo demonstrou que os quelantes de cobre/zinco solubilizam placas amiloides¹¹². Portanto, a capacidade de quelação de metal é usada como um indicador adicional de atividade antioxidante, geralmente em combinação com outros ensaios antioxidantes¹¹⁰. A fim de elucidar a atividade quelante de metais, todas as substâncias-alvo (**44-51, PQM-242 a PQM-249**) foram avaliadas quanto à capacidade de quelação a Cu^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+2} , biometais importantes na homeostase cerebral (Apêndice B). A figura 27 mostra a representação gráfica do espectro de absorvância UV *vis.* de **PQM-247**, composto com melhor perfil quelantes, especialmente para Zn^{+2} .

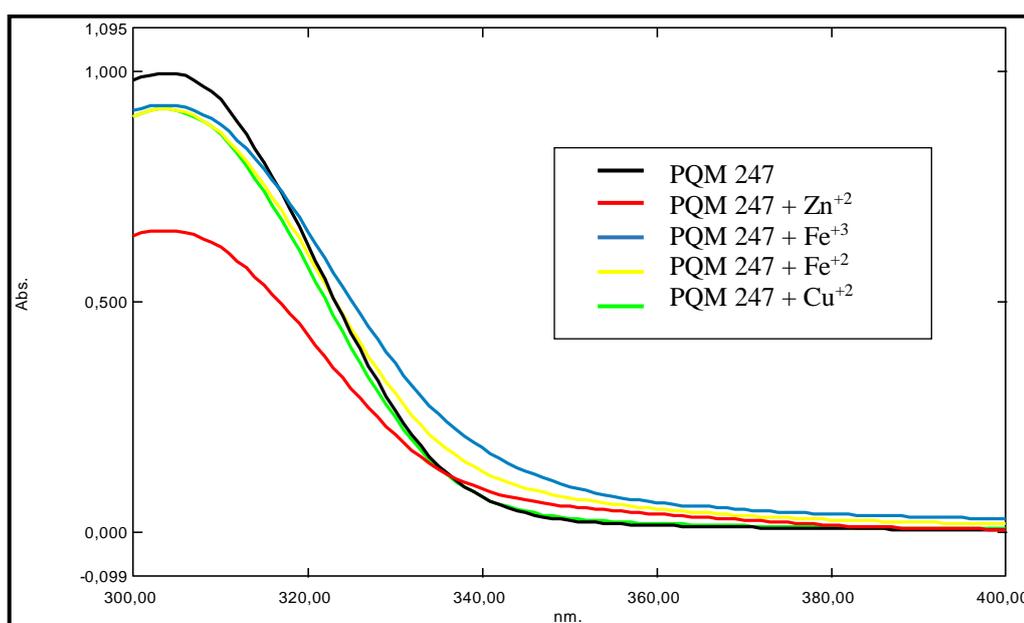


Figura 27 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância **PQM-247 (48)**.

Fonte: Do Autor

Os dados experimentais evidenciaram que **PQM-247** apresentou um efeito hipocrômico, caracterizado pela diminuição da intensidade da absorbância quando ocorre a quelação com os metais avaliados, quando analisado a intensidade da absorbância do composto em relação quando se tem os cátions metálicos juntamente com o composto testado. Nos demais gráficos de complexação metal-composto (Apêndice B) podem ser tanto observados o efeito hiper-crômico, o qual aumenta da intensidade de absorbância, como o hipocrômico. Esses efeitos devem se a complexação do metal com o composto, que causa alteração na intensidade de absorção, em associação com a presença de grupos auxocrômicos (que correspondem à grupos funcionais presente no composto - por exemplo: grupo hidroxila (-OH), o grupo amina (-NH₃), o grupo aldeído (-CHO) e o grupo metanotiol (-SCH₃)), em conjugação com um grupo cromóforo (por exemplo: C=C, C=O ou NO₂) que é capaz de modificar a capacidade absorção luz e assim o comprimento de onda (λ)¹⁰¹. Nota-se também que nos compostos *para*-disubstituídos (**PQM-242** a **PQM-245**) possuem intensidades de absorbância diferentes devido a presença de grupos retiradores (p.e. -OH, **PQM-242** e **PQM-243**) e doadores (p.e. -OCH₃, **PQM-244** e **PQM-245**) de elétrons, assim quando temos grupos doadores e retiradores em posições para do anel benzênico, o grupo doador aumenta a intensidade da banda de absorção, devido a interações de ressonância¹⁰¹.

5.1.5 Atividade Sequestrante de Radicais DPPH

A redução do púrpura 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) para o DPPH-H (amarelo) é um método clássico e rápido para avaliar a atividade sequestrante de radicais¹¹³, baseia-se na doação de elétrons do antioxidante para o DPPH^{110,114}. A absorbância diminui como resultado de uma mudança de cor púrpura para amarelo, à medida que o radical é absorvido pelos antioxidantes¹¹⁴, sendo esta uma indicação da eficácia do antioxidante. Portanto, este método baseia-se no pressuposto de que a atividade antioxidante é igual à sua capacidade de doação de elétrons ou o chamado poder redutor¹¹⁰.

Este ensaio foi realizado utilizando-se ácido ascórbico e quercetina como controles positivos. Como pode ser observado na tabela 2, o composto **PQM-244** teve $CI_{50} = 14,15 \pm 0,62$ comparável ao ácido ascórbico ($CI_{50} = 14,92 \pm 0,17$), enquanto que os compostos **PQM-246** ($CI_{50} = 6,53 \pm 0,11$) e **PQM-247** ($CI_{50} = 4,76 \pm 0,22$) exibiram atividades semelhantes a quercetina ($CI_{50} = 5,62 \pm 1,82$), sendo os estes os 3 mais ativos da série, como demonstrado na **tabela 1**.

É interessante notar que os compostos **PQM-244** (4-OMe) e **PQM-247** (3,4-di-OH), que se assemelham por apresentarem a *S*-carvona como precursora, exibiram atividade antioxidante muito superior ao composto **PQM-246** que a despeito de ser 3,4-di-hidroxi-substituído, sua estrutura é constituída pela *R*-carvona.

Estes resultados evidenciaram que o sistema catecólico presente em **PQM-246** e **PQM-247** não é decisivo para a atividade antioxidante, com a configuração absoluta exercendo efeito auxofórico significativo, uma vez que os enantiômeros **PQM-246** e **PQM-247** tiveram atividades antioxidante diferentes, sendo **PQM-247** (*S*) mais potente. O mesmo pode ser inferido em relação aos compostos **PQM-244** e **PQM-245**, ambos 4-metoxilados, porém somente o isômero *S* (**PQM-244**) sendo ativo.

Tabela 1 - Resultados da avaliação de atividade antioxidante dos compostos **PQM-242** (44), **PQM-243** (45), **PQM-244** (46), **PQM-245** (47), **PQM-246** (48), **PQM-247** (49), **PQM-248** (50), **PQM-249** (51).

Substâncias	CI ₅₀ ± desvio padrão (µM)
PQM-242	>200
PQM-243	>200
PQM-244	14,15 ± 0,62
PQM-245	>200
PQM-246	6,53 ± 0,11
PQM-247	4,76 ± 0,22
PQM-248	>200
PQM-249	>200
Ácido Ascórbico	14,92 ± 0,17
Quercetina	5,62 ± 1,82

Fonte: Do Autor.

De fato, estruturas que possuem grupos fenólicos são capazes de doar o átomo de hidrogênio do OH fenólico para os radicais livres, além de ter um papel importante na eliminação de ERO por reações de abstração do átomo de hidrogênio^{115,116}, interrompendo assim a cadeia de propagação durante o processo de oxidação, sendo demonstrado que este efeito é modulado pelo substituintes do anel aromático¹¹⁵. Assim, grupos retiradores de elétrons favorecem a dissociação da ligação da ligação O-H, enquanto que grupos doadores de elétrons desfavorecem a dissociação da ligação devido a estabilização do radical fenoxila pelas estruturas de ressonância^{115,117}. Além disso, sabe-se que a presença de grupos di-*orto* –OH são mais

favoráveis às propriedades antioxidantes do que quando temos a presença de somente um grupo hidroxila¹¹⁵.

5.1.6 Predição das propriedades físico-químicas ADME dos compostos finais.

Sabidamente, alguns parâmetros físico-químicos e biológicos são fatores importantes para a fase farmacocinética de um candidato a fármaco¹¹⁸. Em função destes parâmetros, sua absorção, distribuição, metabolização, excreção (ADME) e toxicidade variam significativamente, sendo, portanto, decisivos para que um ligante possa ser classificado como potencial candidato a fármaco e que possa evoluir na cadeia de desenvolvimento farmacêutico para a produção de terapias mais seguras e eficazes¹¹⁹.

Diante destas considerações, alguns parâmetros foram estimados *in silico* (Tabela 2), utilizando o software Qikprop 3.1, o qual descreve as propriedades físico-químicas e a biodisponibilidade dos compostos. O programa possui 95% dos fármacos atualmente utilizados na terapêutica como banco de dados de referência. Este programa descreve uma série de parâmetros físico-químicos e químicos relacionados à farmacocinética e ao metabolismo prováveis das moléculas, dentre os quais podemos destacar, a atividade no SNC; o coeficiente de partição octanol/água (QpLogPo/w); o coeficiente de partição cérebro/sangue (QPLogBB) para fármacos administrados de forma oral; absorção oral humana qualitativa (Abs.Oral Hum.), porcentagem de absorção oral humana (% Abs.Hum.), dentre outros.

As propriedades físico-químicas fundamentais para um fármaco que atua no SNC estão relacionadas a capacidade deste em atravessar a barreira hematoencefálica, ou seja, este tem de ser entregue ao cérebro, sendo necessária uma concentração suficientemente elevada no sangue para produzir uma concentração do fármaco no seu receptor cerebral¹²⁰. Portanto o coeficiente de partição cérebro/sangue (QPLogBB) é um parâmetro fundamental para avaliar a adequação de um composto ao SNC, visto que os fármacos destinados a atuar no SNC devem penetrar a barreira hematoencefálica e os agentes de ação periférica não devem penetra-la evitando efeitos colaterais no SNC¹¹⁸.

Tabela 2 - Dados da predição ADME dos compostos finais.

Amostra	MM (g/mol)	SNC	QPLog Po/w	QPLogBB	Abs. Oral Hum.	% Abs. Oral Hum.
PQM-242	284,357	-1	3,263	-0,832	3	100
PQM-243	284,357	-1	3,522	-0,923	3	100
PQM-244	298,384	0	4,093	-0,342	3	100
PQM-245	298,384	0	4,095	-0,338	3	100
PQM-246	300,357	-2	2,539	-1,319	3	85,013
PQM-247	300,357	-2	2,529	-1,297	2	84,958
PQM-248	328,41	0	4,429	-0,502	3	100
PQM-249	328,41	0	4,33	-0,477	3	100
CBD	300,44	0	5,025	-0,43	3	100
Valores de referência	-	-2 a 2	-2 a 6,5	-3 a 1,2	1,2,3	>80% alta <25% pobre

Fonte: Dados obtidos do programa Qickprop 3.1, por colaboração com o Prof. Dr. Ihosvany Camps (UNIFAL-MG)

Destaca-se que os compostos que possuem grupos metoxila (-OCH₃) que são **PQM-244**, **PQM-245**, **PQM-248** e **PQM-249**, possuem melhor coeficiente de partição octanol/água sendo mais lipofílicos do que os compostos que possuem grupos hidroxilas (-OH), e por isso conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica, o que gera uma melhor atividade no SNC, como demonstrado na tabela acima. Tais compostos apresentam valores semelhantes ao encontrado para o CBD que é molécula inspiradora deste trabalho, demonstrando assim que compostos que possuem uma cadeia carbônica, ou seja, tenham propriedades lipofílicas podem ser atuantes no SNC, por atravessarem a barreira hematoencefálica.

5.1.7 Docking Molecular

Utilizando dados de ancoramento molecular foi construído um modelo do receptor CB2 (**Figura 28**), através da comparação com o modelo CB1 existente no PDB, através do Maestro Software. Os resultados da análise geométrica com o MolProbity indicaram que 97% dos resíduos encontrados em CB2 estão em regiões favorecidas, além de ter mostrado uma energia satisfatória e uma geometria de qualidade através do QMEANBrane e ProSA.

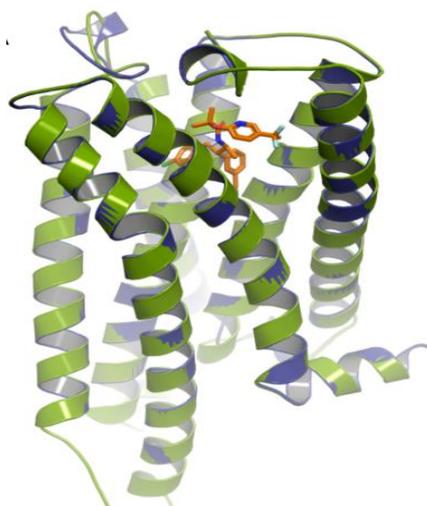


Figura 28 - Modelo molecular de CB2 com o ancoramento do Taranabant.

Fonte: Do Autor.

Para validação do protocolo de *docking* e do modelo de CB2 usado nos experimentos de ancoramento molecular foram previstos os modos de ligação do rimonabant (agonista inverso CB1) e do taranabant (antagonista CB1) com os receptores CB1 e CB2 através do programa DockThor, os quais interagem nos sítios de ligação por meio de interações hidrofóbicas. A tabela 3 mostra os dados da previsão de afinidade dos compostos sintetizados além do CBD e do rimonabant e taranabant que serviram como modelos de previsão do modo de ligação com os receptores CB1 e CB2.

Os dados indicam que os compostos-alvo sintetizados possuem uma menor afinidade com os receptores CB1 e CB2 do que o rimonabant e taranabant, sendo similares ao CBD (**2**), a exceção do **PQM-249** que apresentou maior afinidade pelo CB1 do que o CBD.

Tabela 3 - Previsão de afinidade nos receptores CB1 e CB2 a partir do Docking Molecular.

Composto	Afinidade Prevista em CB1	Afinidade Prevista em CB2
PQM-242	-9,859	-9,381
PQM-243	-9,838	-9,434
PQM-244	-10,120	-9,661
PQM-245	-9,937	-9,856
PQM-246	-9,721	-9,629
PQM-247	-9,655	-9,272
PQM-248	-10,290	-9,935
PQM-249	-10,562	-9,914
CBD	-10,412	-9,930
rimonabant	-11,790	-11,334
taranabant	-12,408	-11,964

Fonte: Do Autor.

Todos os compostos exibiram algum grau de seletividade para CB1 em relação ao CB2. O **PQM-249** (configuração *S*) foi previsto como o composto que tem maior afinidade em CB1 (-10,562 kcal/mol). Nota-se uma preferência do receptor CB1 pela configuração *S* dos compostos (**Tabela 3**). Pelo contrário, o receptor CB2 tem maior probabilidade de acomodar a configuração *R* dos mesmos compostos. Curiosamente, o isômero *S* de todos os compostos exibe um modo de ligação global semelhante ao modo de ligação previsto do CBD, exceto no caso do **PQM-249**, em que se previu que ambos os isômeros *R* e *S* interagem através de uma conformação invertida no local de ligação.

A substituição de dois grupos hidroxilo (**PQM-246** e **PQM-247**) no anel fenila diminuiu a afinidade de ligação, enquanto a presença dos dois grupos metoxila pode melhorar significativamente a afinidade para a cavidade receptora. Isto pode ser explicado pelo perfil hidrofóbico da cavidade de ligação onde essa porção dos compostos interage, portanto, a presença de grupos metoxila evita penalidades de solvatação polar, uma vez que não há resíduos polares de aminoácidos nessa região para realizar ligações de hidrogênio com tais grupos hidroxila; podendo conduzir a um aumento da afinidade de ligação na ordem de 0,5 kcal/mol para o composto **PQM-248** quando comparado com o **PQM-246**, e quase 1,0 kcal/mol para o composto **PQM-249** versus **PQM-247**. Essa tendência também é observada para o receptor CB2, em que o composto com os dois grupos metoxila exibe a melhor afinidade de ligação

prevista (-9,935 kcal/mol), semelhante à energia livre de ligação prevista do CBD (-9,930 kcal/mol).

5.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

A avaliação farmacológica delineada para este projeto é constituída de modelos *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade das substâncias em células dos astrócitos e *in vivo* para avaliação de desempenho comportamental, visando ao estudo de possíveis efeitos no sistema nervoso central sobre a atividade antidepressiva, ansiolítica.

5.2.1 Avaliação da viabilidade celular pela técnica MTT.

Para a determinação da citotoxicidade das substâncias foi utilizada cultura primária de astrócitos do hipocampo de ratos *Wistars* neonatos. A técnica utilizada se baseia na capacidade que as células viáveis com metabolismo ativo convertam o reagente MTT em MTT formazana, que tem coloração roxa, enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão¹²¹. Dessa forma, a coloração roxa é utilizada como um quantificador de viabilidade das células testadas.

Os astrócitos constituem uma grande parte das células do SNC possuindo papel importante na manutenção da saúde neuronal e função na barreira hematoencefálica, suas propriedades morfológicas e distribuição espacial contribuem para a plasticidade do SNC e manutenção da homeostase neuronal, anormalidades nessas funções tem implicados em doenças neurodegenerativas (p.e.: DA, DP)^{122,123}, é sugerido que na DA astrócitos reativos secretam numerosas citocinas e fatores neurotóxicos que favorecem a neurodegeneração, neuroinflamação levando a morte celular¹²³. Além disso, os astrócitos são importantes para a regulação de ERO, devido a glutathione que é um antioxidante chave e tem se mostrado protetora contra a morte neuronal e também seu papel na regulação de neurotransmissores como o glutamato e GABA, levando a uma menor excitotoxicidade do glutamato neuronal e diminuindo a morte celular¹²². De maneira geral os astrócitos liberam proteínas neurotóxicas ou protetoras após lesão ou em doenças neurodegenerativas, tendo efeitos prejudiciais como neuroinflamação e benéficos como neuroproteção e processos de reparo (p.e.: angiogênese)¹²³. Estudos demonstram que os astrócitos produzem AEA e 2-AG, e respondem a canabinoides exógenos,

visto que eles possuem receptores canabinoides; o CB1 encontrado nos astrócitos aumenta os níveis de Ca^{+2} o que estimula a liberação de glutamato ativando os receptores NMDA nos neurônios, assim existe uma interação ente astrócitos e SEC que afeta a neurotransmissão glutamatérgica²⁸. Portanto esse tipo de célula foi utilizado devido ao seu papel regulador no SNC, visto que ela está envolvida em algumas patologias neurodegenerativas, em processos neuroinflamatórios e com o SEC.

Os gráficos foram divididos em dois grupos devido a solubilidade dos compostos, o primeiro grupo foi solubilizado em etanol (**Figura 29**) e o segundo grupo em DMSO (**Figura 30**). De maneira geral as substâncias sintetizadas apresentaram uma boa viabilidade celular, não sendo citotóxicas. Nota-se que a substância **PQM-242** apresenta-se de forma mais homogênea, semelhante ao controle não exibindo um grande efeito citotóxico, com um valor alto de $CC_{50}=86,32\mu M$. Para os compostos **PQM-244** e **PQM-245**, a concentração de $50\mu M$ induz a morte celular, o que pode ser explicado pela ativação de uma via de sinalização específica no receptor que leva a morte celular, em alguns casos a concentração pode ativar vias de sinalização diferentes.

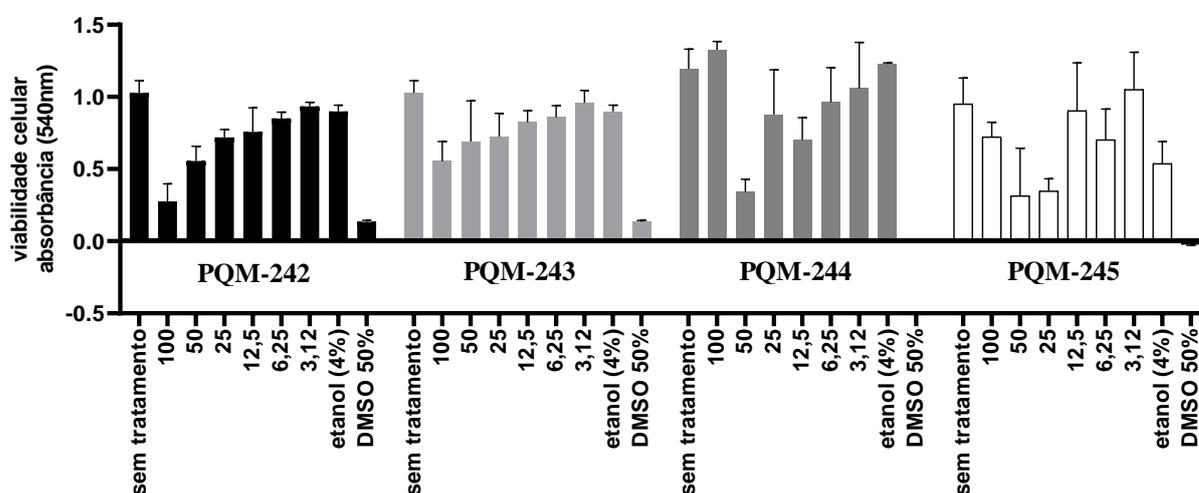


Figura 29 - Viabilidade celular a partir do tratamento com as substâncias **PQM-242** a **PQM-245**.

Nota: Ensaios realizados em quintuplicata. Concentração dos compostos estão em μM .

Fonte: Do Autor.

Demonstra-se a partir da **figura 30** que o DMSO na concentração de 4% causa a morte celular, e sugere-se que as substâncias protegem as células, pois mesmo na concentração de $100\mu M$ onde tem-se 4% de DMSO, houve crescimento celular. As substâncias **PQM-247** e **PQM-248** são menos citotóxicas a partir do aumento da diluição, ou seja, na concentração de

100 μ M induz a morte celular enquanto que a concentração de 3,12 μ M se assemelha a viabilidade celular sem tratamento.

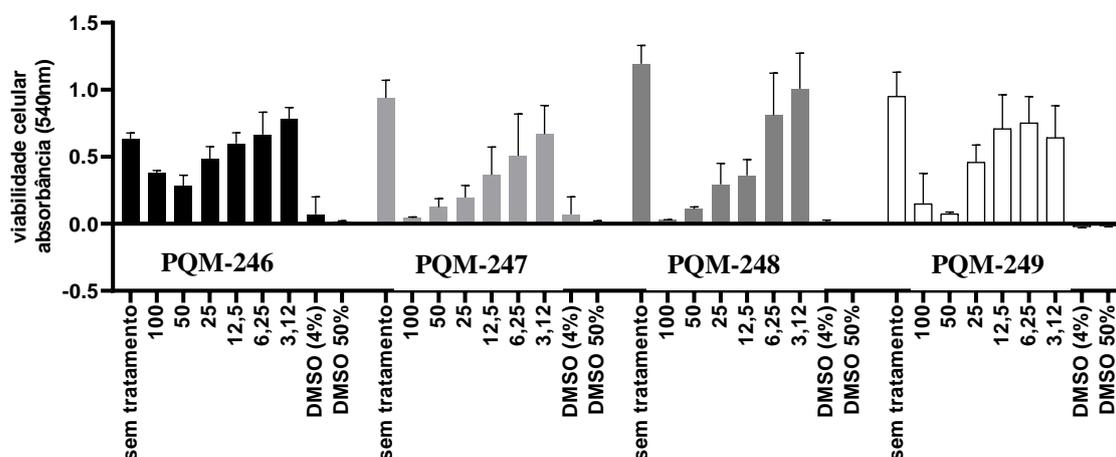


Figura 30 - Viabilidade celular a partir do tratamento com as substâncias **PQM-246** a **PQM-249**.

Nota: Ensaios realizados em quintuplicata. Concentração dos compostos estão em μ M.

Fonte: Do Autor.

A determinação do CC_{50} foi feita a partir da regressão linear, dos maiores valores para os menores, obtendo-se a **tabela 4**. A partir da qual é possível saber qual é a concentração citotóxica para 50% das células, determinando assim as concentrações mais viáveis para a continuidade do trabalho.

Tabela 4 - Determinação da concentração citotóxica para 50% das células.

Composto	CC_{50} (μ M)
PQM-242	86,32
PQM-243	20,46
PQM-244	2,92
PQM-245	11,89
PQM-246	18,86
PQM-247	7,95
PQM-248	10,73
PQM-249	32,69

Fonte: Do autor.

5.2.2 Avaliação das atividades antidepressivas e ansiolíticas em camundongos

Para a avaliação dos testes de comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo foram utilizados camundongos *Swiss* com 5 a 7 semanas. Sendo utilizadas doses de 10mg/kg de CBD aplica via i.p. e 100 μ M para as substâncias sintetizadas por meio de gavagem.

A **figura 31** mostra a avaliação do teste de campo aberto dos animais dos grupos veículo, CBD, **PQM-242** a **PQM-249**. O campo aberto é um teste que avalia parâmetros preditivos de ansiedade e além disso é útil para a análise da atividade locomotora dos animais, pois permite quantificar a atividade exploratória espontânea¹²⁴

De acordo com os resultados pode-se observar que as substâncias e o CBD (10 mg/kg) não alteraram parâmetros relacionados ao comportamento tipo-ansioso (pois não alteraram o número de entradas centrais) e também não alteraram a locomoção dos animais (uma vez que não houve diferença no número de entradas totais entre os animais testados quando comparados ao veículo).

Em um estudo de Sales e colaboradores utilizaram camundongos *Swiss* machos, foi verificado que o CBD na dose de 10mg/Kg, também não alterou o número de entradas totais dos animais expostos ao teste de campo aberto quando comparado ao seu grupo controle⁴⁹, assim como apresentado neste trabalho.

Importante ressaltar que a dose utilizada do CBD em nosso estudo não exerceu efeito ansiolítico, e de acordo com estudos prévios, a dose de CBD é um fator crucial na atividade e em sua aplicação²⁵, o que pode, pelo menos em parte explicar seus efeitos variados em decorrência da possibilidade de atuação em múltiplos receptores.

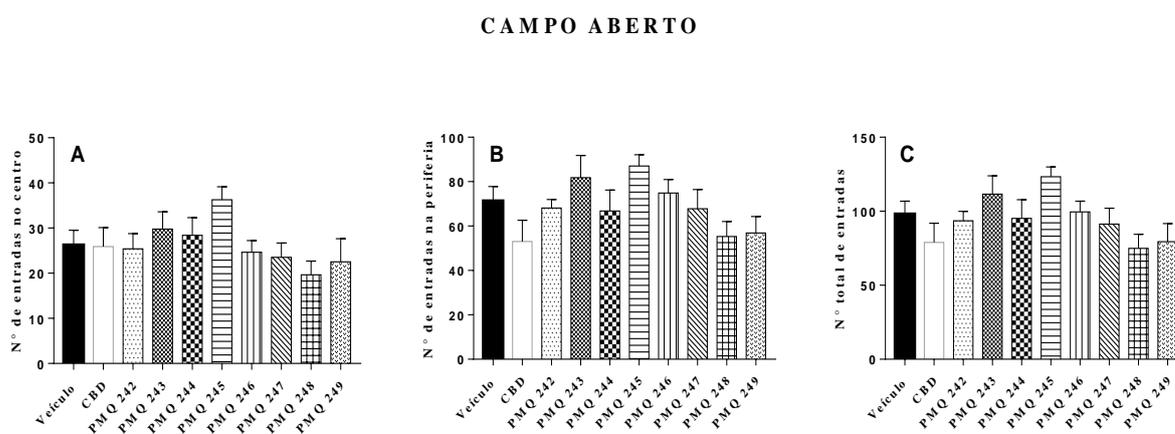


Figura 31 - Número de entradas no centro (A), no número de entradas na periferia (B) e no número total de entradas (C) do CBD e **PQM-242** a **PQM-249** quando comparados ao veículo no campo aberto.

Nota: Valores expressos como média \pm SEM (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste Newman-Keuls) com n=8 animais por grupo.

Fonte: Do Autor

A **figura 32** mostra a avaliação do teste claro-escuro dos animais dos grupos veículo, CBD, **PQM-242** a **PQM-249**. O teste claro-escuro avalia o comportamento preditivo de ansiedade no animal¹²⁵ e pesquisas com substâncias ansiolíticas demonstram que o animal permanece mais tempo no claro reduzindo o comportamento tipo-ansioso.

De acordo com os dados analisados pode-se observar que não houve diferença entre os grupos no tempo de permanência no claro e no tempo de permanência no escuro do CBD e **PQM-242** a **PQM-249** quando comparados ao veículo.

Deve-se levar em consideração que este é um estudo preliminar em que foi utilizada somente uma determinada dose das substâncias e do CBD.

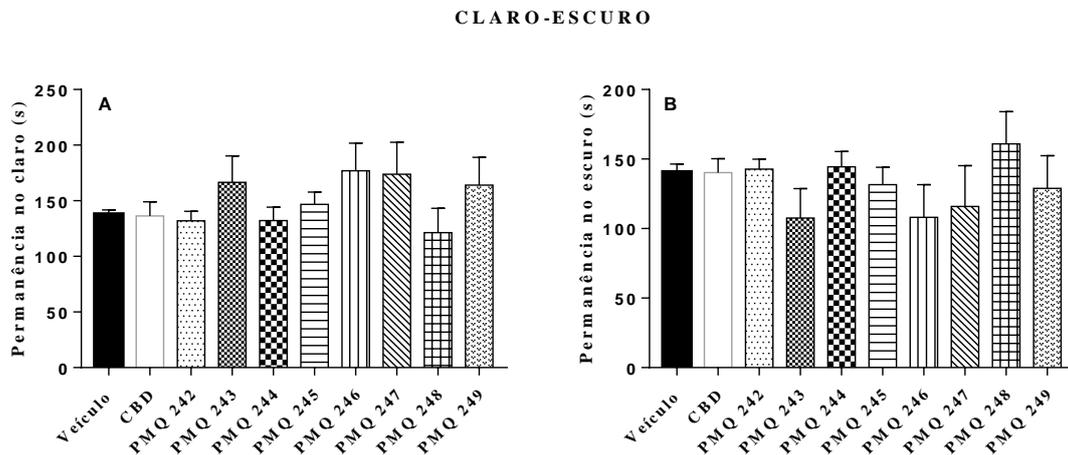


Figura 32 - Tempo de permanência no claro (A) e no tempo de permanência no escuro (B) do CBD e **PQM-242** a **PQM-249** quando comparadas ao veículo no teste claro-escuro.

Nota: Valores expressos como média±SEM (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste Newman-Keuls).

Com n=8 animais por grupo.

Fonte: Do Autor.

A **figura 33** mostra a avaliação do teste de nado forçado (NF) dos animais dos grupos veículo, CBD, **PQM-242** a **PQM-249**. O teste de nado forçado avalia parâmetros tipo-depressivo¹²⁶, como aumento do tempo de imobilidade devido a redução da motivação em escapar. Substâncias antidepressivas são capazes de aumentar a motivação em escapar, assim reduzindo o tempo de imobilidade.

De acordo com os dados analisados pode-se observar que houve redução no tempo de imobilidade dos animais tratados com as substâncias CBD e **PQM-245**, **PQM-246**, **PQM-247** ($p < 0,05$) e **PQM-249** ($p < 0,01$) quando comparados ao veículo; indicando que as substâncias

exerceram efeito antidepressivo. Sales e colaboradores⁴⁹ testaram as doses de 7, 10 e 30mg/Kg de CBD em camundongos *Swiss* machos no teste NF, com administração aguda (após 30 min da aplicação i.p. de CBD) e crônica (14 dias), e somente a dose de 10mg/Kg de CBD, que também utilizamos no nosso estudo, exibiu efeito antidepressivo.

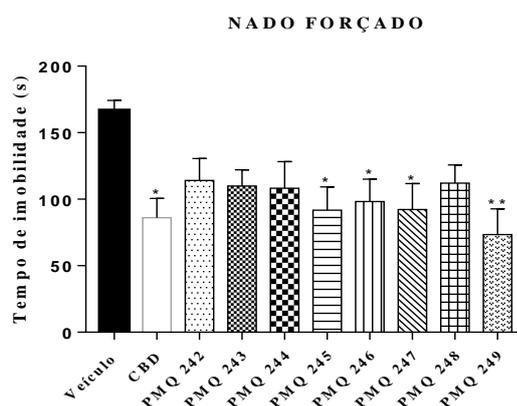


Figura 33 - Tempo de imobilidade do CBD e **PQM-242 a PQM-249** quando comparadas ao veículo no teste de nado forçado

Nota: Valores expressos como média±SEM *p<0,05 quando comparado **CBD, PQM-2445, PQM-246, PQM-247** ao veículo e **p<0,01 quando comparado **PQM-249** ao veículo (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste Newman-Keuls). Com n=8 para o CBD, n=11 para PQM-247 e PQM-249, n=12 para PQM-246, n=13 para veículo, PQM-242, PQM-244, PQM-245 e PQM-248, n=14 para PQM-243)

Fonte: Do Autor.

A **figura 34** mostra a avaliação do teste suspensão pela cauda (SPC) dos grupos veículo, CBD, **PQM-242 a PQM-249**. O teste de suspensão pela cauda avalia parâmetros preditivos de depressão¹²⁷. O animal quando submetido a uma situação de estresse inescapável apresenta dois tipos de comportamento, a mobilidade, devido a tentativa de escapar e a imobilidade devido à falta de motivação em escapar. Substâncias antidepressivas agem aumentando a motivação em escapar e conseqüentemente diminuindo o tempo de imobilidade.

De acordo com os dados analisados pode-se observar que houve redução no tempo de imobilidade do CBD e **PQM-249** (p<0,05) quando comparados ao veículo, indicando que essas substâncias têm efeito antidepressivo.

El-Alfy e colaboradores¹²⁸ demonstraram que as doses de 20, 100 e 200mg/Kg do CBD em camundongos DBA/2, não interferiram no tempo de imobilidade quando comparados ao veículo no teste de suspensão pela cauda. Porém, em um estudo de Schiavon e colaboradores¹²⁹ que utilizaram camundongos *Swiss* machos e doses de 3, 10 e 30mg/kg de CBD, houve uma redução no tempo de imobilidade nos animais administrados com CBD nas doses de 3 e

10mg/kg no teste do nado forçado. Embora os estudos de CBD ainda sejam controversos devido a utilização de várias doses e animais, pode-se verificar que a dose de CBD utilizada no nosso estudo foi capaz de exercer atividade antidepressiva.

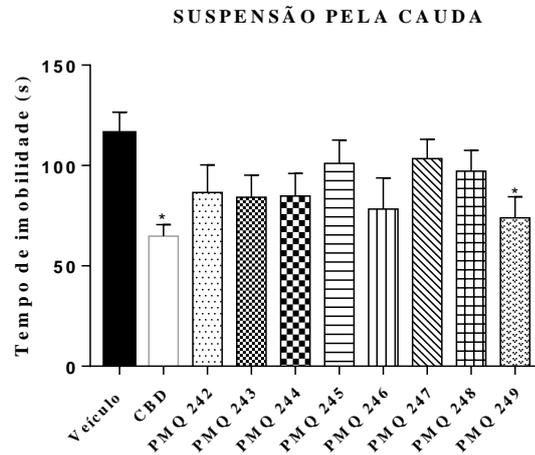


Figura 34 - Tempo de imobilidade do CBD e **PQM-242** a **PQM-249** quando comparadas ao veículo no teste de suspensão pela cauda.

Nota: Valores expressos como média±SEM * $p < 0,05$ quando comparado CBD, PQM-249 ao veículo (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste Newman-Keuls). Com $n=9$ para o PQM-245 e $n=8$ para os demais.

Fonte: Do Autor

6. PARTE EXPERIMENTAL

A síntese das substâncias-alvo deste projeto foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM), na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). A avaliação farmacológica *in vitro* da série-alvo para avaliação do efeito potencial sobre a epilepsia foi feita em colaboração com o laboratório de Bioquímica, na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marília Goulart. A avaliação farmacológica *in vivo* em modelos comportamentais da série-alvo, para avaliação do efeito potencial sobre a ansiedade e depressão foi feita em colaboração com o laboratório de Fisiologia, na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob a responsabilidade dos Profs. Drs. Alexandre Giusti-Paiva e Fabiana Cardoso Vilela. Os estudos de *docking* molecular foi realizado em parceria com o Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis-RJ, sob responsabilidade dos Drs. Laurent Dardenne e Isabella Alvim Guedes.

6.1 QUÍMICA

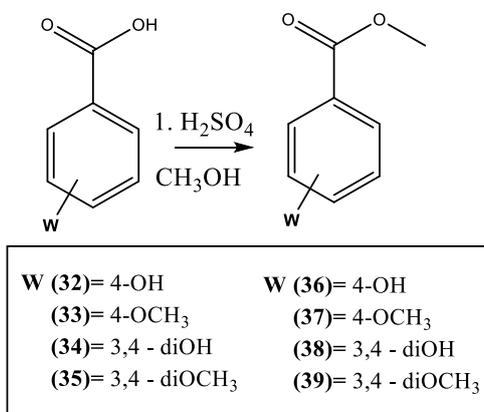
Em seguida todas as descrições dos processos químicos envolvidos na obtenção das substâncias estudadas.

6.1.1 Generalidades

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados no espectrômetro de Nicolet iS50 FTIR (Thermo Scientific USA) acoplado a Pike Gladi ATR Technologies (Instituto de Química – UNIFAL), por inserção direta da amostra. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados nos espectrômetros BRUKER AVANCE DRX 300 MHz (Instituto de Química, UNIFAL). Como referência interna foi utilizado o sinal do tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são 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 (duplete), t (triplete), m (multiplete), dd (duplo duplete), dt (duplo triplete). Os valores de J foram obtidos através do programa MestreNova. 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. Os espectros na região do ultravioleta (UV) foram obtidos por espectrofotômetro de UV-1800 series da Shimadzu, na faixa de 200-400nm, utilizando-se como solvente etanol. As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Fisher-Jonhs e não foram corrigidos (Instituto de Química, UNIFAL). As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em folha de gel de sílica 60 F₂₅₄, da marca Merck e as purificações por cromatografia em coluna foram realizadas em gel de sílica flash (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm), da marca Sigma-Aldrich. A visualização das substâncias foi feita em câmara de UV ($\lambda = 254$ ou 365 nm). Todas as etapas da rota sintética foram acompanhadas por cromatográfica em camada delgada (CCD) e purificadas através de coluna cromatográfica (CC) ou recristalização. Os solventes puros e/ou anidros utilizados foram preparados segundo procedimentos descritos por Armarego & Chai¹³¹. Metanol/Etanol anidro: foram secos com sulfato de magnésio anidro sob agitação por 2 horas, em seguida filtrado. O mesmo foi estocado em um recipiente adequado contendo peneira molecular do tipo A4 ativada. Peneira Molecular A4: foi ativada em mufla à 350 °C por 3 horas e posteriormente resfriada e mantida em um dessecador com CaCl₂. As *R* e *S* carvonas, foram previamente destiladas sob pressão reduzida. Os demais solventes utilizados foram utilizados sem prévia purificação e/ou destilação.

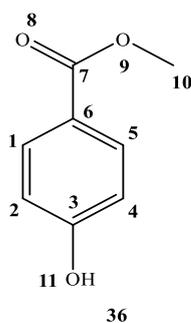
6.1.2 Síntese dos ésteres: 4-hidroxibenzoato de metila (36), 4-metoxibenzoato de metila (37), 3,4-diidroxibenzoato de metila (38), 3,4-dimetoxibenzoato de metila (39).



Esquema 13 - Síntese dos ésteres (36-39), por reação de esterificação de Fischer, na presença de H₂SO₄ como catalisador e CH₃OH.

Fonte: Do Autor

Em um balão monotubulado foram adicionados 7,24 mmols do ácido benzoico precursor (**32-35**), solubilizados em 10 mL de CH₃OH, sob agitação, seguido da adição de 0,97 mmol de H₂SO₄. A mistura racional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 24 h. O término da reação foi confirmado por CCD (eluente hexano/acetato de etila 80:20, revelador: câmara de ultravioleta 365 nm). A remoção do solvente sob pressão reduzida forneceu um sólido branco que após filtração à vácuo e lavagem com H₂O destilada em abundância, forneceu os respectivos ésteres metílicos **36** (1,06 g, 6,99 mmol), **37** (1,3 g, 7,82 mmol), **38** (1,24 g, 7,38 mmol) ou **39** (1,0 g, 5,09 mmol) como sólidos de cor branca.



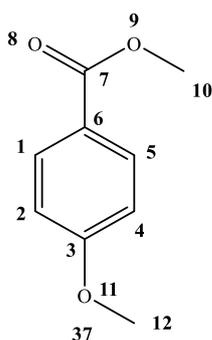
Rendimento: 84%

Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₈H₈O₃ **MM:** 152,15g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3348 (OH), 1673 (C=O), 1606,1583,1511,1456 (C=C), 1277 e 1191 (C-O éster), 1215 (C-O fenol), 846 (C-H aromático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,95 (d, 2H, J = 8,9, H1 e H5), 6,88 (d, 2H, J =8,9, H2 e H4), 3,90 (s, 1H, H10).

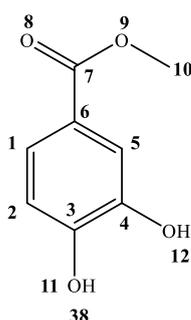
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 167,3 (C=O, C7), 160,2 (C-OH, C3), 132,0 (CH, C1 e C5), 122,4 (C-C, C6), 115,3 (CH, C2 e C4), 52,1 (CH, C10).



Rendimento: 96%

Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₉H₁₀O₃ **MM:** 166,18g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 2949 e 2841 (C-H, CH₃), 1702 (C=O), 1603, 1508, 1466 (C=C), 1317 e 1104 (C-O éster), 1280 e 1018 (C-O éter), 846 (C-H aromático). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,98 (d, 2H, J = 6,0, H1 e H5), 6,90 (d, 2H, J =7,2, H2 e H4), 3,88 (s, 1H, H10), 3,85 (s, 1H, H12). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 166,9 (C=O, C7), 163,4 (C-O, C3), 131,6 (CH, C1 e C5), 122,6 (C-C, C6), 113,6 (CH, C2 e C4), 55,4 (CH, C10) 51,9 (CH, C12).

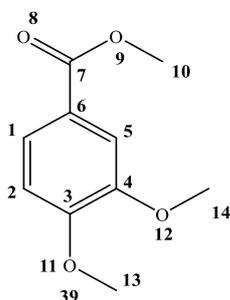


Rendimento: 69%

Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₈H₈O₄ **MM:** 168,15g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3191 (O-H), 1682 (C=O), 1606, 1519 e 1435 (C=C aromático), 1297 e 1064 (C-O éster), 883 e 823 (C-H aromático). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 9,78 (s, 1H, H11), 9,32 (s, 1H, H12), 7,35 (d, 1H, J =2,1 Hz, H5), 7,29 (dd, 1H, J =9 Hz e 2,1 Hz, H1), 6,81 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H2), 3,75 (s, 3H, H10). **RMN de ¹³C** (75

MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 166,7 (C=O, C7), 150,9 (C-OH, C3), 145,6 (C-OH, C4), 122,3 (CH, C1), 121,1 (C, C6), 116,8 (CH, C5), 115,9 (CH, C2), 52,1 (CH, C10).



Rendimento: 89%

Aspecto físico: sólido branco a levemente amarelado

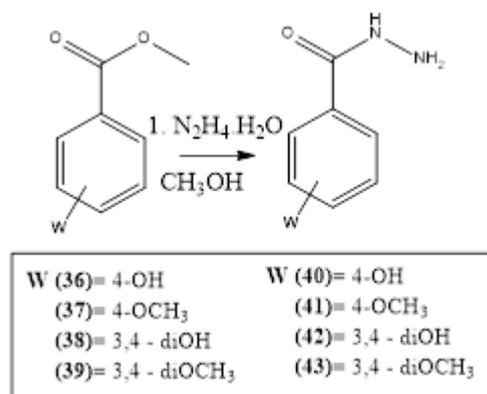
FM: C₁₀H₁₂O₄ **MM:** 196,20g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3033, 888 e 868 (C-H aromático), 2956 e 2933 (C-H, CH₃) 1716 (C=O), 1593, 1513, 1462, 1447 (C=C), 1288 e 1185 (C-O éster), 1227 e 1034 (C-O éter).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,70 (dd, 1H, *J*=9 Hz, 1,8 Hz, H1), 7,55 (d, 1H, *J*= 2,1, H5), 6,91 (d, 1H, *J*=9, H2), 3,94 (s, 6H, H13 e H14), 3,90 (s, 3H, H10).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 166,9 (C=O, C7), 153,0 (C-O, C3), 148,6 (C-O, C4), 123,6 (C-C, C6), 122,7 (CH, C1), 112,0 (CH, C5), 110,3 (CH, C2), 56,0 (CH, C13 e C14), 52,0 (CH, C10).

6.1.3 Síntese das benzoidrazidas: 4-hidroxibenzoidrazida (40), 4-metoxibenzoidrazida (41), 3,4-di-idroxibenzoidrazida (42) e 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43).

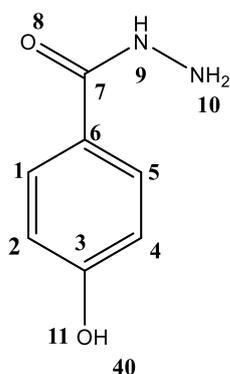


Esquema 14 - Síntese das benzoidrazidas (**40-43**), através de reação de hidrazinólise, para a formação do intermediário-chave.

Fonte: Do Autor

Em um balão monotubulado foram adicionados 6,76 mmol do respectivo éster metílico (**36-39**) e 10 eq. de monidrato de hidrazina (NH₂NH₂.H₂O) em 10 mL de metanol. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por 24 horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 80:20, revelador: luz ultravioleta). Ao

término da reação, a mistura teve o solvente removido sob pressão reduzida fornecendo um sólido branco, o qual foi lavado com H₂O destilada em abundância e filtrado à vácuo. Após secagem deste sólido forneceu o produto **40** (0,74 g, 6,57 mmol), **41** (0,78 g, 4,74 mmol), **42** (0,57 g, 3,40 mmol) ou **43** (0,77 g, 3,94 mmol) como sólido branco.



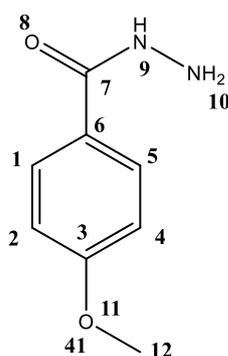
Rendimento: 72%

Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₇H₈N₂O₂ **MM:** 152,15g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3312 (N-H₂), 3268 (OH), 3192 (N-H), 2999 e 845 (C-H), 1606 (C=O), 1536, 1507, 1463, 1393 (C=C), 1276 (C-N), 1187 (C-O).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 9,49 (s, 1H, H₉), 7,69 (d, 2H, *J*=7,3 Hz, H₁ e H₅), 6,78 (d, 2H, *J*= 7,45 Hz, H₂ e H₄), 4,38 (s, 2H, H₁₀).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 166,1 (C=O, C₇), 160,1 (C-OH, C₃), 128,9 (CH, C₁ e C₅), 114,9 (CH, C₂ e C₄), 124,0 (C, C₆).



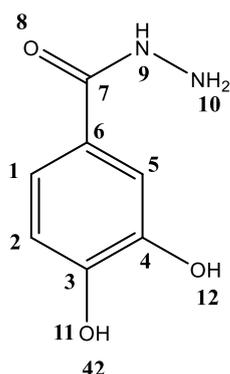
Rendimento: 65%

Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₈H₁₀N₂O₂ **MM:** 166,18 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3322 e 1574 (N-H), 3055 e 841 (C-H aromático), 2959 (C-H metílico), 1603 (C=O), 1253 e 1035 (C-O), 1340 (C-N).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 9,61 (s, 1H, H₉), 7,81 (d, 2H, *J*=6 Hz, H₁ e H₅), 6,98 (d, 2H, *J*=6 Hz, H₂ e H₄), 4,41 (s, 2H, H₁₀), 3,79 (s, 3H, H₁₂).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 165,7 (C=O, C₇), 161,5 (C-O, C₃), 128,7 (CH, C₁ e C₅), 125,6 (C, C₆), 113,6 (CH, C₂ e C₄), 55,3 (CH, C₁₂).



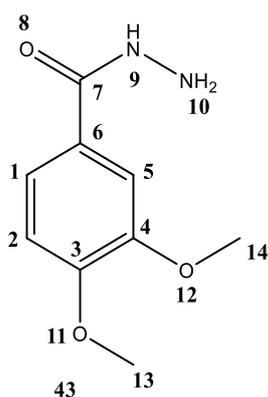
Rendimento: 55%

Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₇H₈N₂O₃ **MM:** 168,15 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3430 e 1639 (N-H), 3356 (O-H), 3276 (N-H, NH₂), 1657 (C=O), 1600, 1557, 1538, 1519 (C=C), 1278 (C-N), 1197 (C-O).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 9,42 (s, 1H, H₉), 7,26 (d, 1H, *J*=15, H₅), 7,18 (dd, 1H, *J*=9 Hz, 1,8 Hz, H₁), 6,75 (d, 1H, *J*=8,4 Hz, H₂), 4,36 (s, 2H, H₁₀).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 166,1 (C=O, C₇), 148,2 (C-OH, C₃), 144,8 (C-OH, C₄), 124,4 (CH, C₁), 124,4 (C, C₆), 118,5 (CH, C₅), 114,2 (CH, C₂).



Rendimento: 65%

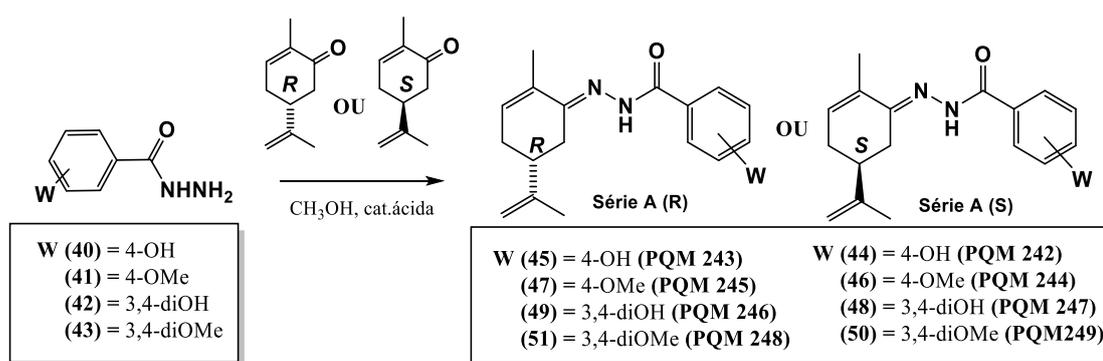
Aspecto físico: sólido branco **FM:** C₉H₁₂N₂O₃ **MM:** 196,21 g/mol

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3307 e 1597 (N-H), 2982 e 2938 (C-H metílicos), 1626 (C=O), 1256 (C-N), 1275 e 1017 (C-O), 878 e 834 (C-H).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,91 (s, 1H, H9), 7,39 (d, 1H, $J= 2,1$, H5), 7,30 (dd, 1H, $J= 6,3$ Hz, 2,1 Hz, H1), 6,84 (d, 1H, $J= 8,1$ Hz, H2), 3,91 (s, 6H, H13 e H14)

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168,5 (C=O, C7), 152,1 (C-O, C3 e C4), 149,1 (C, C6), 125,2 (CH, C1), 119,6 (CH, C5), 110,4 (CH, C2), , 56,0 (CH, C13 e C14).

6.1.4 Síntese dos análogos aril -acilidrazônicos (44-51) do canabidiol.



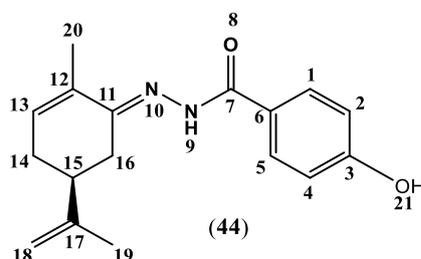
Esquema 15 - Reações de acoplamento das benzimidrazidas (**40-43**) com as carvonas (*R* e *S*).

Fonte: Do autor

Em um balão monotubulado de 25 mL adicionou-se o intermediário hidrazídico (**40**, **41**, **42** ou **43**) (1 eq.) em 15 mL de metanol seco e 1,0 eq. da carvona (*R* ou *S*). Deixou-se a mistura reagente sob agitação magnética durante 24 horas a temperatura ambiente. A evolução da reação e término foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 70:30, revelador: luz ultravioleta), notando-se a formação de um produto sem o consumo total do reagente. A destilação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu um resíduo que foi cromatografado em coluna de sílica flash (eluente: hexano/acetato de etila 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 0:100). A eliminação do metanol, sob pressão reduzida, forneceu o produto **44** (13 mg, 0,046 mmol), **45** (26 mg, 0,092 mmol), **46** (10 mg, 0,034 mmol), **47** (65 mg, 0,22 mmol), **48** (123 mg, 0,41mmol), **49** (84 mg, 0,28 mmol), **50** (87 mg, 0,27 mmol) ou **51** (29 mg, 0,09 mmol).

A fim de obter-se melhores rendimentos, foram realizadas algumas modificações na síntese proposta dos análogos aril-acilidrazônicos do CBD, com a adição de ácido acético

glacial para que a carbonila da cetona fosse ativada e a reação ocorre-se mais rapidamente. Portanto, em um balão monotulbaldo de 25 mL contendo 10 mL de metanol seco, adicionou-se (1 eq.) de carvona (*R* ou *S*) e gotas (15 gotas) de ácido acético glacial. Em seguida adicionou-se ao balão reacional a benzoidrazida (**40**, **41**, **42** ou **43**), gota-a-gota, previamente solubilizada em metanol seco (5 mL). A reação ocorreu em temperatura ambiente e sua evolução e término foram acompanhados por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 70:30, revelador: luz ultravioleta). Notou-se com esta nova metodologia abordada, uma redução do tempo reacional e aumento da conversão da benzoidrazida empregada ao produto de interesse. Com a eliminação do solvente, sob pressão reduzida, cristais brancos foram formados na parede do balão. Em seguida, estes cristais foram filtrados e lavados com metanol para retirar traços da carvona utilizada, obtendo-se então os produtos desejados **44** (43 mg, 0,15 mmol), **45** (30 mg, 0,11 mmol), **46** (63 mg, 0,21 mmol), **47** (51mg, 0,17mmol) ou **48** (117 mg, 0,39 mmol), como sólidos de cor branca amarelada. Nos casos em que não foi possível a utilização deste método de purificação, a obtenção dos produtos puros foi feita por cromatografia em coluna de sílica flash (eluente: hexano/acetato de etila 70:30). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu os produtos **50** (75 mg, 0,23 mmol), **51** (156 mg, 0,47 mmol), que foram obtidos como sólidos de cor branca a amarelo-pálido.



Rendimento: 20%

Faixa de Fusão: 214°-217° C

Aspecto físico: sólido branco amarelado

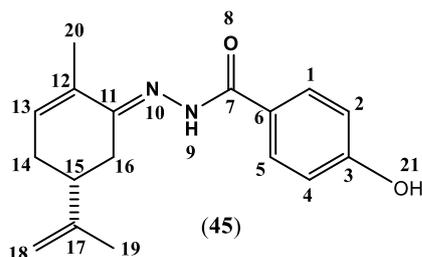
FM: C₁₇H₂₀N₂O₂

MM: 284,36 g/mol

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3371 (O-H), 3237 (N-H), 2919, 2849 e 847 (C-H), 1663 (C=O), 1639 (C=C) 1609 (C=N), 1586, 1526 e 1504 (C=C aromático), 1445 e 1262 (C-N), 1229 (C-O).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,40 (s, 1H, H₉), 7,72 (d, 2H, *J*=8,56, H₁ e H₅), 6,82 (d, 2H, *J*=8,51, H₂ e H₄), 6,17 (s, 1H, H₁₃), 4,79 (d, 2H, *J*=9,12, H₁₈), 2,93 (d, 1H, *J*=15,62, H₁₆), 2,32 (d, 1H, *J*=14,76, H₁₅), 2,23 (d, 1H, *J*=7,0, H₁₄), 2,11-2,16 (m, 2H, H₁₄ e H₁₆), 1,83 (s, 3H, H₂₀), 1,74 (s, 3H, H₁₉).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 163,6 (C=O, C₇), 160,3 (C-OH, C₃), 156,2 (C=N, C₁₁), 147,6 (C, C₁₇), 133,4 (C, C₁₂), 132,4 (CH, C₁ e C₅), 129,8 (CH, C₁₃), 124,5 (C, C₆), 114,6 (CH, C₂ e C₄), 110,0 (CH, C₁₈), 29,6 (CH, C₁₄), 20,4 (CH, C₁₉), 17,9 (CH, C₂₀).



Rendimento: 40%

Faixa de Fusão: 198°-200°C

Aspecto físico: sólido branco amarelado

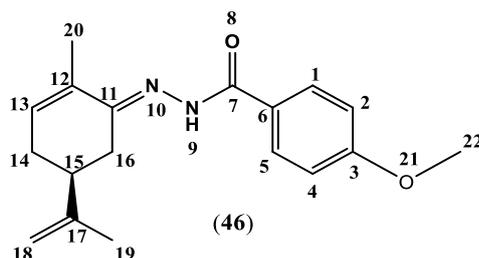
FM: C₁₇H₂₀N₂O₂

MM: 284,36g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3253 (N-H), 2922 (C-H), 1625 (C=O), 1606 (C=N), 1582, 1524 e 1498 (C=C aromático), 1373 (δ CH₃) 1281 (C-N), 1218 (C-O), 840 (δ C-H aromático).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,40 (s, 1H, H₉), 7,73 (d, 2H, *J*=8,67, H₁ e H₅), 6,82 (d, 2H, *J*=8,65, H₂ e H₄), 6,18 (d, 1H, *J*=4,54, H₁₃), 4,80 (d, 2H, *J*=9,77, H₁₈), 2,94 (dd, 1H, *J*=2,96 Hz, 16,07 Hz, H₁₆), 2,27-2,39 (m, 1H, H₁₅), 2,23 (d, *J*=6,53, 1H, H₁₄), 2,05-2,16 (m, 2H, H₁₄ e H₁₆), 1,84 (s, 3H, H₂₀), 1,75 (s, 3H, H₁₉).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 163,5 (C=O, C₇), 160,4 (C-OH, C₃), 156,3 (C=N, C₁₁), 147,7 (C, C₁₇), 133,6 (C, C₁₂), 132,5 (CH, C₁ e C₅), 124,6 (C, C₆), 130,0 (CH, C₁₃), 114,7 (CH, C₂ e C₄), 110,2 (CH, C₁₈), 29,8 (CH, C₁₄), 20,6 (CH, C₁₉), 18,0 (CH, C₂₀).



Rendimento: 10%

Faixa de Fusão: 160°-162°C

Aspecto físico: sólido branco amarelado

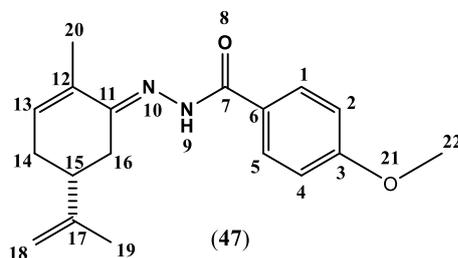
FM: C₁₈H₂₂N₂O₂

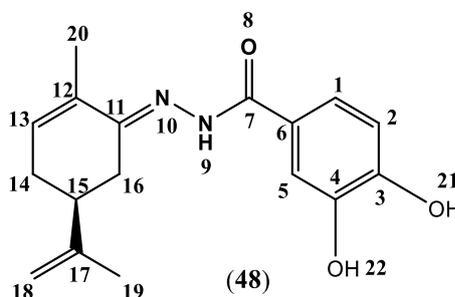
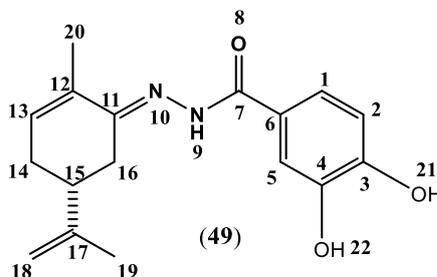
MM: 298,36 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹): 3258 (N-H), 3076 (C-H alceno), 1647 (C=O), 1635 (C=N), 1608 (C=C), 1577, 1522, 1498 e 1455 (C=C aromático), 1257 e 1038 (C-O), 845 (δ C=C aromático)

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,88 (s, 1H, H₉), 7,87 (s, 2H, H₁ e H₅), 6,93 (d, 2H, *J*= 8,84, H₂ e H₄), 6,16 (d, 1H, *J*=3,94 Hz, H₁₃), 4,82 (d, 2H, *J*=9,62 Hz, H₁₈), 3,86 (s, 3H, H₂₂), 2,77 (d, 1H, *J*=16,04 Hz, H₁₆), 2,48 (t, 1H, *J*=11,78, H₁₅), 2,32 (dt, *J*= 4,83 Hz/ 10,43 Hz, 1H, H₁₄), 2,09-2,20 (m, 2H, H₁₄ e H₁₆), 1,94 (s, 3H, H₂₀), 1,78 (s, 3H, H₁₉).

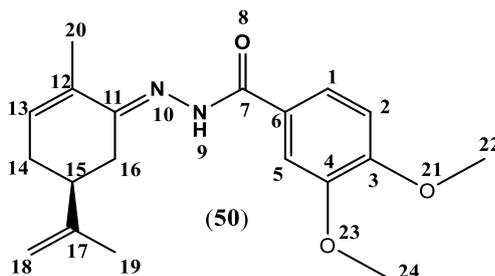
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 162,3 (C-O, C₃), 147,4 (C, C₁₇), 133,6 (CH, C₁ e C₅), 133,2 (C, C₁₂ e C₁₃), 129,2 (C, C₆), 113,8 (CH, C₂ e C₄), 110,6 (CH, C₁₈), 55,4 (CH, C₂₂), 40,8 (CH, C₁₅), 30,1 (CH, C₁₅), 28,8 (CH, C₁₄), 20,6 (CH, C₁₉), 18,0 (CH, C₂₀).



Rendimento: 57%**Faixa de Fusão:** 127°-130°C**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₁₈H₂₂N₂O₂**MM:** 298,36 g/mol**IV** ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3251 (N-H), 2918 (C-H), 1646 (C=O), 1635 (C=N), 1606, 1575, 1521 e 1498 (C=C aromático), 1255 (C-O).**RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,81 (s, 1H, H9), 7,96 (s, 2H, H1 e H5), 6,94 (d, 2H, J = 8,76, H2 e H4), 6,16 (d, J = 4,25 Hz, 1H, H13), 4,82 (d, 2H, J = 10,99, H18), 3,86 (s, 3H, H22), 2,75 (d, 1H, J =15,41 Hz, H16), 2,48 (t, 1H, J =11,43 Hz, H15), 2,32 (dt, J = 4,97 Hz 17,07 Hz, 1H, H14), 2,10-2,20 (m, 2H, H14 e H16), 1,93 (s, 3H, H20), 1,78 (s, 3H, H19).**RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 162,3 (C-O, C3), 147,4 (C, C17), 133,6 (CH, C1 e C5), 133,2 (C, C12 e C13), 129,2 (C, C6), 113,8 (CH, C2 e C4), 110,6 (CH, C18), 55,4 (CH, C22), 40,8 (CH, C15), 30,1 (CH, C15), 28,8 (CH, C14), 20,6 (CH, C19), 18,0 (CH, C20).**Rendimento:** 47%**Faixa de Fusão:** 246°-247°C**Aspecto físico:** sólido amarelo**FM:** C₁₇H₂₀N₂O₃**MM:** 300,36 g/mol**IV** ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3467 (N-H), 3181 (O-H), 1658 (C=O), 1600 (C=C), 1459 (δ CH₂), 1378 (δ CH₃), 1219 (C-O).**RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,34 (s, 1H, H9), 9,36 (s, 2H, H21 e H22), 7,29 (s, 1H, H5), 7,23 (d, J = 8,13, 1H, H1), 6,79 (d, 1H, J = 8,15, H2), 6,18 (s, 1H, H13), 4,80 (d, 2H, J = 9,57, H18), 2,92 (d, 1H, J =16,27, H16), 2,31-2,39 (m, 1H, H15), 2,23 (s, 1H, H14), 2,13 (dd, 2H, J = 14,19 Hz 19,38 Hz, H14 e H16), 1,84 (s, 3H, H20), 1,75 (s, 3H, H19).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 163,5 (C=O, C7), 156,1 (C=N, C11), 148,6 (C-OH, C4), 147,6 (C-OH, C3), 144,7 (C, C17), 133,4 (C, C12), 132,4 (CH, C13), 125,0 (C, C6), 119,8 (CH, C1), 115,5 (CH, C5), 114,7 (CH, C2), 110,1 (CH, C18), 29,7 (CH, C16), 20,4 (CH, C19), 17,9 (CH, C20).**Rendimento:** 57%**Faixa de fusão:** 244°-246°C**Aspecto físico:** sólido amarelo**FM:** C₁₇H₂₀N₂O₃**MM:** 300,36 g/mol**IV** ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3446 e 1519 (N-H), 3204 (O-H), 2963 (C-H, CH₃), 1685 (C=O), 1605 (C=C), 1434 (δ C-H, CH₂), 1228 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 10,33 (s, 1H, H9), 7,21 (d, $J=8,59$, 1H, H1), 6,78 (d, 1H, $J=8,05$, H2), 7,27 (s, 1H, H5), 6,18 (d, $J=4,38$ Hz, 1H, H13), 4,80 (d, 2H, $J=9,22$, H18), 2,91 (d, 1H, $J=17,40$, H16), 2,33 (dd, 1H, $J=9,49$ Hz 24,51Hz, H15), 2,23 (d, $J=4,38$ Hz, 1H, H14), 2,13 (dd, 2H, $J=12,28$ Hz e 20,50 Hz, H14 e H16), 1,84 (s, 3H, H20), 1,75 (s, 3H, H19).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 148,7 (C-OH, C4), 147,6 (C-OH, C3), 144,7 (C, C17), 133,4 (C, C12), 132,4 (CH, C13), 124,9 (C, C6), 119,8 (CH, C1), 115,6 (CH, C5), 114,7 (CH, C2), 110,1 (CH, C18), 29,6 (CH, C16), 28,9 (CH, C14), 20,4 (CH, C19), 17,9 (CH, C20).



Rendimento: 55%

Faixa de Fusão: 110°-113°C

Aspecto físico: sólido branco amarelado

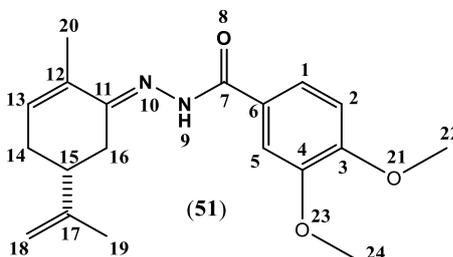
FM: C₁₉H₂₄N₂O₃

MM: 328,41 g/mol

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3309 e 1495 (N-H), 1633 (C=O), 1600 (C=C), 1581 (C=C aromático), 1462 ($\delta\text{C-H}$, CH₂), 1264 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,80 (s, 1H, H9), 7,59 (s, 1H, H1), 6,89 (d, 1H, $J=8,44$, H2), 6,18 (d, 1H, $J=4,49$ Hz, H13), 4,83 (d, 2H, $J=11,67$, H18), 3,94 (s, 6H, H22 e H24), 2,76 (dd, 1H, $J=3,39$ Hz, 15,12 Hz, H16), 2,48 (t, 1H, $J=12,27$ Hz, H15), 2,33 (dt, $J=4,97$ Hz, 15,12Hz, 1H, H14), 2,10-2,20 (m, 2H, H14 e H16), 1,95 (s, 3H, H20), 1,79 (s, 3H, H19).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 152,2 (C-O, C3 e C4), 152,2 (C=N, C11), 147,5 (C, C17), 133,9 (C, C12), 133,1 (CH, C13), 110,8 (CH, C18), 110,1 (CH, C2), 56,2 (CH, C22 e C24), 29,9 (CH, C14), 40,9 (CH, C15), 30,3 (CH, C16), 20,8 (CH, C19), 18,2 (CH, C20).



Rendimento: 25%

Faixa de Fusão: 125°-127°C

Aspecto físico: sólido amarelo

FM: C₁₉H₂₄N₂O₃

MM: 328,41 g/mol

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3218 e 1535 (N-H), 2968 e 2920 (C-H), 1633 (C=O), 1600, 1581, 1494, 1466 (C=C aromático), 1374 ($\delta\text{C-H}$, CH₃), 1284 (C-N), 1268 e 1021 (C-O), 1435 ($\delta\text{C-H}$, CH₂).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,92 (s, 1H, H9), 7,59 (s, 1H, H1), 6,78 (d, 1H, $J=8,05$ Hz, H2), 6,17 (d, 1H, $J=5,31$ Hz, H13), 4,80 (d, 2H, $J=8,98$, H18), 3,93 (s, 6H, H22 e H24), 2,79 (d, 1H, $J=15,39$, H16), 2,48

(t, 1H, $J=11,74$ Hz, H15), 2,33 (dt, 1H, $J=5,10$ Hz 17,11 Hz, H14), 2,10-2,20 (m, 2H, H14 e H16), 1,95 (s, 3H, H20), 1,78 (s, 3H, H19).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 152,0 (C-O, C3 e C4), 152,0 (C=N, C11), 147,4 (C, C17), 133,6 (C, C12), 133,2 (CH, C13), 110,6 (CH, C18), 110,1 (CH, C2), 56,1 (CH, C24), 56,0 (CH, C22), 40,8 (CH, C15), 30,2 (CH, C16), 28,9 (CH, C14), 20,6 (CH, C19), 18,1 (CH, C20).

6.1.5 Avaliação da atividade quelante de metais

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Gontijo et al. (2012)¹¹³ com algumas modificações. Cada amostra foi diluída em etanol na proporção de 1:10 (m/v), seguida de uma nova diluição na proporção de 1:10 (v/v). Às amostras foram acrescentadas 20 gotas de uma solução do metal (Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} ou Zn^{+2}) (1:10 m/v) separadamente, já na cubeta, e homogeneizada, para posterior leitura. As leituras foram realizadas no modo varredura na faixa de $\lambda = 200\text{-}400$ nm em espectrofotômetro UV/*vis*, as quais permitiu a visualização dos perfis gráficos da complexação metal-composto por variação dos valores de absorbância das bandas observadas e deslocadas.

6.1.6 Atividade Sequestrante de Radicais DPPH

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Gontijo et al. (2012)¹¹³ com modificações. Adicionou-se 4,0 mL da solução das amostras (nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em etanol, a serem testadas a 0,75 mL de solução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram lidas as absorbâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/*vis*. (em triplicata). O DPPH é um radical estável, de cor púrpura quando em solução etanólica apresenta uma banda de absorção a 517nm. Quando misturado a uma substância capaz de doar um hidrogênio e sequestrar o seu radical, o DPPH passa a 1,1-difenil-2-picrilidrazina (DPPH-H) de cor amarela. Quanto menor a absorbância maior o potencial sequestrante. Para avaliar a atividade captadora do radical, foi obtida a porcentagem de inibição,

de acordo com a equação: % de inibição = [(absorbância do controle - absorbância da amostra)/absorbância do controle] x 100.

A determinação da concentração de amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração (CI₅₀) inicial de DPPH foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada uma das substâncias.

6.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

A avaliação farmacológica foi realizada em conjunto com os laboratórios de fisiologia translacional e de bioquímica da UNIFAL-MG.

6.2.1 Animais

6.2.1.1 Ensaio *in vitro*

Para a realização dos experimentos, foram utilizados aproximadamente 15 (quinze) ratos da linhagem Wistar neonatos, nascidos a partir de matrizes obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Dois dias após o nascimento, os filhotes machos foram separados e submetidos ao procedimento para remoção do hipocampo. Para tanto, eles foram rapidamente eutanasiados por decapitação e o hipocampo foi dissecado e mantido em meio apropriado até o momento do processamento, descrito a seguir. Os procedimentos citados acima foram realizados no laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas. Foram aproveitados, para remoção do hipocampo, os animais eutanasiados para obtenção do hipotálamo no projeto “Efeitos da hiperosmolalidade e da estimulação peptidérgica na sinalização glutamatérgica em astrócitos hipotalâmicos *in vitro*” (com aprovação do comitê de ética local, protocolo número 585/2014). Esta emenda foi oficialmente comunicada ao CEUA e aprovada pelo mesmo.

6.2.1.2 Testes *in vivo*

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* macho, com idade de 7 semanas e pesando entre 35-45g originários do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram alojados no Laboratório de Fisiologia Translacional. Antes da realização dos experimentos os animais passaram por um período de ambientação (7 dias) ao novo ambiente onde foram mantidos em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção, com livre acesso a ração comercial e água. Estas caixas foram mantidas em sala com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de claro/escuro de 12-12 horas (Luz 7:00-19:00). Todos os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL (Protocolo nº: 21/2018). Após os experimentos a eutanásia foi realizada com um anestésico inalatório (excesso de halotano).

6.2.2 Cultura de células

A cultura primária de astrócitos foi realizada a partir dos hipocampos frescos coletados dos ratos neonatos. As amostras de tecidos foram então dissociadas com tripsina 0,05% e as células foram cultivadas em solução de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) contendo soro fetal bovino (10%) e 1% de solução de penicilina (10,000 IU/ml) - streptomomicina (10,000 $\mu\text{g/ml}$) (PS; Mediatech) por aproximadamente oito dias.

Em seguida, as células foram submetidas à agitação (200 rpm) por um período de 2h a 37°C , a fim de separar os oligodendrócitos e neurônios dos astrócitos. Após este processo, todo o meio foi descartado, houve a adição de tripsina 0,05% e a garrafa foi levada para a estufa por 15 minutos. Iniciando o processo de descolagem, adicionou-se solução DMEM e com a ajuda de um pipetador utilizamos fricção a jato para retirar a maior quantidade possível de células do fundo da garrafa. Todo o conteúdo da garrafa foi colocado em tubo falcon de 50ml e levado para a centrifuga a 1000 rpm por 4 minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado solução DMEM. Parte deste conteúdo foi transferido para um ependorf com adição do corante azul de tripano para a contagem das células.

Para a contagem de células foi utilizada a câmara de Neubauer, com a adição de aproximadamente 10 μL do conteúdo do ependorf, movendo-se por capilaridade até preencher completamente a lâmina previamente posicionada. Em seguida, a câmara foi colocada em um

microscópio e obtivemos aproximadamente $17,8 \times 10^5$ já com o fator de diluição de células em 10 μL de conteúdo.

6.2.3 Ensaio de toxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade dos derivados foi utilizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT). Os poços foram cobertos por aproximadamente 150 μL de DMEM contendo $0,5 \times 10^5$ células e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 .

Após o período de incubação o meio foi retirado e foi adicionado 150 μL de DMEM contendo os compostos **PQM-242** a **PQM-249** nas concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram utilizados controles de crescimento positivo, contendo apenas meio de cultura e células, controle negativo de crescimento contendo DMSO 50% e controle da citotoxicidade do solvente, contendo etanol na concentração utilizada para a diluição dos compostos, a placa foi então incubada por 48 horas. Após o período de incubação o meio foi retirado e as células foram cuidadosamente lavadas duas vezes com 150 μL de PBS. Após lavagem, foi adicionado 150 μL de DMEM contendo MTT na concentração de 0,5 mg/mL e as células foram novamente incubadas por 4 horas. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionaram-se 100 μL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. A placa foi agitada durante 15 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor espectrofotométrico de microplacas a 540nm.

A absorbância obtida das células controle, não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular¹³². Os dados foram avaliados utilizando regressão linear para se obter os valores de CC50 (concentração citotóxica para 50% das células).

6.2.4 Concentração das substâncias utilizadas nos testes comportamentais.

Para realização dos testes comportamentais foram utilizados a seguintes concentrações:

- Veículo (5% de DMSO + 5% de Tween 80 + 90% Salina) 10 mg/kg administrada por gavage;
- 10 mg/kg ¹³³ de CBD administrado intraperitonal (i.p.);
- 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ dos compostos **PQM-242** a **PQM-249** administradas por gavage.

Vale ressaltar que o mesmo veículo foi utilizado para a diluição do CBD e dos compostos e que os animais foram submetidos a um jejum de 8 horas antes da administração das substâncias. Os testes comportamentais foram realizados transcorridos 30 minutos da administração do CBD e após 1 hora para o veículo e os compostos.

6.2.5 Delineamento Experimental dos testes comportamentais

Nos procedimentos experimentais os animais foram divididos em 10 grupos:

- Grupo 1: animais tratados com veículo;
- Grupo 2: animais tratados com CBD;
- Grupo 3: animais tratados com **PQM-242 (44)**;
- Grupo 4: animais tratados com **PQM-243 (45)**;
- Grupo 5: animais tratados com **PQM-244 (46)**;
- Grupo 6: animais tratados com **PQM-245 (47)**;
- Grupo 7: animais tratados com **PQM-246 (48)**;
- Grupo 8: animais tratados com **PQM-247 (49)**;
- Grupo 9: animais tratados com **PQM-248 (50)**;
- Grupo 10: animais tratados com **PQM-249 (51)**.

Após a aplicação das substâncias-teste os animais foram submetidos aos ensaios de campo aberto (n=8 por grupo), seguido pelo ensaio de nado forçado (n=8 para o grupo 2; n=11 para os grupos 8 e 10; n=12 para o grupo 7; n=13 para os grupos 1, 3, 5, 6 e 9; n=14 para o grupo 4). Outros animais foram submetidos aos testes comportamentais de claro-escuro (n=8 por grupo) seguido pelo teste de suspensão pela cauda (n=9 para o grupo 6 e n=8 para os demais grupos). Os testes comportamentais foram realizados no período da manhã (7-12h) e estão descritos abaixo

6.2.5.1 Campo aberto

O aparato consiste em uma arena circular acrílica com diâmetro de 30 cm e paredes com 30 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes dos quais oito áreas junto as paredes do aparato são consideradas periféricas e as quatro áreas restantes consideradas centrais. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e filmado por cinco minutos, na ausência do experimentador, para posterior análise. Foi registrado o número de cruzamentos

com as quatro patas no centro, na periferia e o efeito antitigmotático (número de entradas no centro/número total de entradas). Este teste também é utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, considerando o número total de entradas com as quatro patas na periferia e o total de cruzamentos^{134,135}. Após cada animal ser exposto ao teste, o aparato foi limpo com álcool 5%.

Esse teste é um modelo preditivo para ansiedade, sugere-se que a atividade motora do animal é indicadora do seu estado emocional, assim sendo baixa atividade locomotora indicam a ansiedade do animal, sendo que a atividade no centro do campo é uma medida mais seletiva para ansiedade, enquanto que a atividade na periferia do aparato é um indicador da atividade locomotora do animal¹³⁶.

6.2.5.2 Nado Forçado

O teste do nado forçado é um modelo preditivo de parâmetros tipo depressivo, desenvolvido de acordo com o método descrito por Porsolt e colaboradores¹²⁶, visa avaliar a atividade antidepressiva através do desespero comportamental, no qual o animal desempenhará movimentos de fuga da situação e poucos minutos adotará uma postura imóvel¹³⁷. O tratamento com antidepressivos é capaz de reduzir o tempo de imobilidade do animal neste teste¹³⁷.

Utiliza-se um cilindro de acrílico, com dimensões de 24 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água à 25°C - 28°C até a altura de 40 cm. O volume de água permite que o animal nada ou boie sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. No dia do teste, os animais foram colocados no cilindro por 6 minutos e foi avaliado o tempo de latência e de imobilidade cronometrado durante a respectiva sessão. A análise foi realizada através da observação dos vídeos obtidos por filmagem dos 4 minutos finais^{126,135}.

6.2.5.3 Claro-escuro (*Light-dark*)

O aparato utilizado para realização do teste é uma caixa dividida em dois compartimentos: um com paredes pretas e tampa escura; e um com paredes brancas e iluminação direta. Estes compartimentos são separados por uma divisória do “tipo guilhotina”, com uma porta central de 7,5 x 7,5 cm, ao nível do chão (**Figura 29**). Cada animal foi alocado individualmente no centro da parte iluminada, de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa, sendo-lhe permitido explorar livremente os dois compartimentos durante 5 minutos.

Desta maneira foi registrado e analisado o tempo de permanência no compartimento claro, a latência para a entrada no compartimento escuro¹³⁸. Após a exposição de cada animal ao experimento, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Este teste baseia-se na aversão inata que o camundongo tem por áreas iluminadas, sendo que o aumento no número de transições do ambiente escuro para o claro, e o aumento do tempo de permanência no compartimento claro é um índice de atividade ansiolítica¹³⁶.

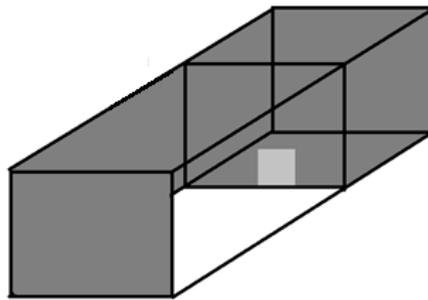


Figura 35 - Aparato para o teste de claro-escuro
Fonte: Do Autor.

6.2.5.4 Suspensão pela calda

O teste de suspensão pela cauda foi realizado através da suspensão do animal por meio de sua cauda com o auxílio de um esparadrapo¹³⁹ (**Figura 30**). Após a suspensão o animal será submetido à filmagem por 5 minutos e foram analisados parâmetros como: o registro do tempo total de imobilidade, a latência (tempo gasto entre o início do teste e o primeiro episódio de imobilidade). Neste teste o animal submetido a situação de estresse apresenta dois tipos de comportamento a agitação devido a tentativa de escape e a imobilidade, de maneira semelhante ao teste de NF os antidepressivos são capazes de aumentar o tempo de agitação¹³⁷.

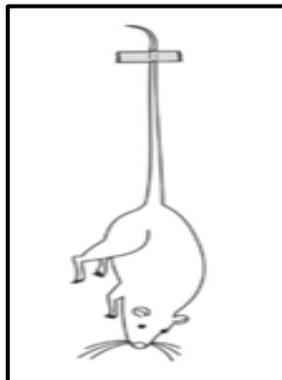


Figura 36 - Exemplo de como o animal é suspenso.

Fonte: Adaptado de Abelderia,
H.M. et al, 2013. ¹⁴⁰

6.2.5.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 7.0 e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Uma série de 8 compostos aril-acilidrazônicos análogos do canabidiol (**44-51**, **PQM-242-249**) foram sintetizados e devidamente caracterizados estruturalmente. Estudos computacionais foram realizados para predição de parâmetros ADME, indicando que todas as substâncias apresentam valores adequados de lipofilicidade, absorção oral humana e transposição da barreira hemato-encefálica. Estudos computacionais adicionais de ancoramento molecular sugeriram que as substâncias se ligam aos receptores CB1 e CB2, com mais afinidade para o primeiro, com destaque para a **PQM-249** que exibiu uma melhor afinidade para CB1 do que o CBD, visto que este é um modulador alostérico deste receptor.

A avaliação da atividade antioxidante, pelo ensaio de DPPH, revelou um perfil antioxidante bastante significativo para os compostos **PQM-244**, **PQM-246** e **PQM-247**, com potências comparáveis ao ácido ascórbico e à quercetina utilizados como referências. Além da atividade antioxidante, **PQM-247** demonstrou a melhor habilidade quelante de biometais, especialmente para Zn^{+2} , o que revela uma propriedade importante quando se trata de doenças do SNC, especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo e desregulação da concentração de biometais e respiração celular.

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que as substâncias desenvolvidas, a exceção de **PQM-244** e **PQM-247** que apresentaram valores abaixo de $10\mu M$, não são citotóxicas em cultura de astrócitos. Os testes comportamentais avaliaram a atividade antidepressiva e ansiolítica sugerindo que **PQM-245**, **PQM-246**, **PQM-247** e **PQM-249** além do CBD apresentaram atividade antidepressiva no teste de nado forçado, com destaque para a **PQM-249** que também apresentou atividade antidepressiva no teste de suspensão pela cauda.

Assim, sendo, é necessário continuidade do estudo com estas substâncias, obtendo-se os perfis dose-resposta de cada uma, para melhor avaliação das atividades antidepressivas e ansiolíticas além do aumento do número de animais por grupo para que se obtenha um resultado com maior robustez e a demonstração das vias em que estas atuam, para o desenvolvimento do seu perfil farmacológico.

REFERÊNCIAS

- (1) ROBISON, R. *O Grande Livro Da Cannabis*, 1. ed. Rio de Janeiro: Zahar, 1999.
- (2) SEGATTO, C. Maconha do bem. *Revista Época*. São Paulo. Disponível em: <<http://revistaepoca.globo.com/Epoca/0,6993,EPT797656-1664,00.html>>. Acesso em: 31 de jan. de 2017.
- (3) BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and Its Analogs: A Review of Their Effects on Inflammation. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v.23, n.7, p.1377–1385, 2015.
- (4) Wikipédia. *Canabidiol*. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Canabidiol>>. Acesso em: 31 de jan. 2017.
- (5) CILIO, M. R.; THIELE, E. A.; DEVINSKY, O. The Case for Assessing Cannabidiol in Epilepsy. *Epilepsia*, v.55, n.6, p.787–790, 2014.
- (6) PAMPLONA, F. A. Quais São e Pra Que Servem Os Medicamentos à Base de Cannabis? *Revista da Biologia*, v.13, n.1, p.28–35, 2014.
- (7) CANABIDIOL - Remédio à base de Maconha. *Revista Tua saude*. 2016. Disponível em: <<https://www.tuasaude.com/canabidiol/>>. Acesso em: 31 de jan. de 2017.
- (8) JONES, N. A.; et al. Cannabidiol Exerts Anti-Convulsant Effects in Animal Models of Temporal Lobe and Partial Seizures. *Seizure*, v.21, n.5, p.344–352, 2012.
- (9) MATOS, R. L. A., et al. O Uso Do Canabidiol No Tratamento Da Epilepsia. *Revista Virtual de Química*, v.9, n.2, p. 786-814, 2017.
- (10) MECHOULAM, R. et al. Chemical Basis of Hashish Activity. *Science*. v.169, n.8, p.611–612, 1970.
- (11) ROSENBERG, E. C., et al. Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics*, v.12, n.4, p.747–768, 2015.
- (12) HILL, A. J. et al. Phytocannabinoids as Novel Therapeutic Agents in CNS Disorders. *Pharmacology Therapeutics*, v.133, n.1, p.79–97, 2012.
- (13) LONG, L. E.; MALONE, D. T.; TAYLOR, D. A. The Pharmacological Actions of Cannabidiol. *Drugs of the Future*, v.30, n.7, p. 747–753, 2005.
- (14) SCHUBART, C. D. et al. Cannabidiol as a Potential Treatment for Psychosis. *Eur. Neuropsychopharmacology*. v.24, n.1, p.51–64, 2014.

- (15) MALFITANO, A. M. et al. *What We Know and Do Not Know about the Cannabinoid Receptor 2 (CB2)*. *Seminars in Immunology*, v.26, n.5, p.369–379, 2014.
- (16) LOHAR, V.; RATHORE, A. S. Cannabinoids : Pharmacological Profile of Promising Molecules. *Phytopharmacology*, v.4, n.1, p.41–52, 2012.
- (17) GONTIJO, C.; CASTRO, G. L.; CASTRO, A. D. Canabidiol e suas aplicações terapêuticas. *REFACER*. v.5, n.1, p.1-9, 2016.
- (18) MURILLO-RODRIGUEZ, E. et al. The Endocannabinoid System Modulating Levels of Consciousness, Emotions and Likely Dream Contents. *CNS e Neurological Disorders - Drug Targets*, v.16, n.4, p.370–379, 2017.
- (19) LUIS, J. et al. Neurobiology of Cannabis: From the Endocannabinoid System to Cannabis-Related Disorder. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. v.60, n.11, p.111–122, 2011.
- (20) FONSECA, B. M. et al. O Sistema Endocanabinóide – Uma Perspetiva Terapêutica. *Acta Farm. Port.* v.2, n.2, p.97–104. 2013.
- (21) PERNONCINI, K. V. Usos terapêuticos potenciais do canabidiol obtido da *Cannabis Sativa*. *Rev. UNINGÁ*, v.20, n.3, p.101–106, 2014.
- (22) GROTENHERMEN, F. Pharmacology of Cannabinoids. *Neuroendocrinol. Letters*. v.25 n.1–2, p.14–23, 2004.
- (23) CASTILLO, P. E. et al. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron*, v.76, n.1, p.70–81, 2012.
- (24) GRIM, T. W. et al. Stratification of Cannabinoid 1 Receptor (CB1 R) Agonist Efficacy : Manipulation of CB1R Density through Use of Transgenic Mice Reveals Congruence between In Vivo and in Vitro Assays. *American Society for Pharmacol. and Experimental Therapeutics*. [s.v], n.8, p.329–339, 2016.
- (25) ZUARDI, A. W. Cannabidiol: From an Inactive Cannabinoid to a Drug with Wide Spectrum of Action. *Rev. Bras. Psiquiatria*. v.30, n.3, p.271–280, 2008.
- (26) HOFMANN, M. E.; FRAZIER, C. J. Marijuana, Endocannabinoids, and Epilepsy: Potential and Challenges for Improved Therapeutic Intervention. *Exp. Neurol.* v.244, p.43–50, 2013.
- (27) BENITO, C. et al. β -Amyloid Exacerbates Inflammation in Astrocytes Lacking Fatty Acid Amide Hydrolase through a Mechanism Involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but Not CB1 or CB2 Receptors. *Br. J. Pharmacol.* v.166, n.4, p.1474–1489, 2012.

- (28) DE ALMEIDA, V.; MARTINS-DE-SOUZA, D. Cannabinoids and Glial Cells: Possible Mechanism to Understand Schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* v.268 n. 7, p.727–737, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00406-018-0874-6>.
- (29) PATIL, K. R. et al. Phytocannabinoids for Cancer Therapeutics: Recent Updates and Future Prospects. *Curr. Med. Chem.*, v.22, n.30, p.3472–3501, 2015.
- (30) GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *In Clinical Pharmacokinetics.* v.42, [s.n.], p.327–360, 2003.
- (31) BEDSE, G. et al. Altered Expression of the CB1 Cannabinoid Receptor in the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* v. 40, n.3, p.701–712, 2014.
- (32) LUTZ, B. On-Demand Activation of the Endocannabinoid System in the Control of Neuronal Excitability and Epileptiform Seizures. *Biochem. Pharmacol.* v.68, n.9, p.1691–1698, 2004.
- (33) CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol, Neuroprotection and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol. Res.*, v.112, n.1, p.119–127, 2016.
- (34) DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol: Pharmacology and Potential Therapeutic Role in Epilepsy and Other Neuropsychiatric Disorders. *Epilepsia*, v.55, n.6, p.791–802, 2014.
- (35) MARTÍNEZ-PINILLA, E. et al. Binding and Signaling Studies Disclose a Potential Allosteric Site for Cannabidiol in Cannabinoid CB2 receptors. *Front. Pharmacol.* v.8 n.10, p.1–10, 2017.
- (36) PERTWEE, R. G. Pharmacology of Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Pharmacol. Ther.*, v.74, n.2, p.129–180, 1997.
- (37) FERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. Cannabidiol for Neurodegenerative Disorders: Important New Clinical Applications for This Phytocannabinoid. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v.75, n.2, p.323–333, 2013.
- (38) O’SULLIVAN, S. E. An Update on PPAR Activation by Cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.*, v.173, n.12, p.1899–1910, 2016.
- (39) LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol Is a Negative Allosteric Modulator of the Cannabinoid CB1 Receptor. *Br. J. Pharmacol.* v.172, n.20, p. 4790–4805, 2015.
- (40) KOPPEL, J. et al. CB2 Receptor Deficiency Increases Amyloid Pathology and Alters Tau Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Mol. Med.* v.20,

- n.1, p.29–36, 2014.
- (41) ASHTON, J. Emerging Treatment Options for Spasticity in Multiple Sclerosis – Clinical Utility of Cannabinoids. *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.* v.1, [s.n.], p.15–23, 2011.
 - (42) RINALDI-CARMONA, M. et al. SR 144528, the First Potent and Selective Antagonist of the CB2 Cannabinoid Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.284, n.2, p.644–650, 1998.
 - (43) REDDY, D. S.; GOLUB, V. M. The Pharmacological Basis of Cannabis Therapy for Epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.357, n.4, p.45–55, 2016.
 - (44) MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish—I. The Structure of Cannabidiol. *Tetrahedron*, v.19, n.12, p.2073–2078, 1963.
 - (45) RUSSO, E. B. Cannabidiol Claims and Misconceptions. *Trends Pharmacol. Sci.* v.38 n.3, p. 198–201, 2017.
 - (46) ZUARDI, A. W. et al. Cannabidiol, a Cannabis Sativa Constituent, as an Antipsychotic Drug. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v.39, n.4, p.421–429, 2006.
 - (47) CAMPOS, A. C. et al. Plastic and Neuroprotective Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Cannabidiol in Psychiatric Disorders. *Front. Pharmacol.* v.8 n.5, 2017.
 - (48) UJVÁRY, I.; HANUŠ, L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis Cannabinoid Res.* v.1, n.1, p.90–101, 2016.
 - (49) SALES, A. J. et al. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Mol. Neurobiol.* v.55, n.6, p.1–12, 2018.
 - (50) RENARD, J. et al. Cannabidiol Counteracts Amphetamine-Induced Neuronal and Behavioral Sensitization of the Mesolimbic Dopamine Pathway through a Novel MTOR/P70S6 Kinase Signaling Pathway. *J. Neurosci.* v.36, n.18, p.5160–5169, 2016.
 - (51) CONSROE, P.; MARTIN, A.; SINGH, V. Antiepileptic Potential of Cannabidiol Analogs. *J. Clin. Pharmacol.* v.21, n.8–9 (Suppl), p.428S–436S, 1981.
 - (52) POP, E. Cannabinoids, Endogenous Ligands and Synthetic Analogs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v.3, n.4, p.418–425, 1999.
 - (53) DEIANA, S. Medical Use of Cannabis. Cannabidiol: A New Light for Schizophrenia.

- Drug Test. Anal.* v.5, n.1, p.46–51, 2013.
- (54) CORDEIRO, J. F. P. et al. Perfil Antipsicótico Do Canabidiol. *Medicina.* v.47, n.2, p.112–119, 2014.
- (55) SZAFIARSKI, J. P.; MARTINA BEBIN, E. *Cannabis, Cannabidiol, and Epilepsy - From Receptors to Clinical Response.* *Epilepsy Behav.* v.41, p.277–282, 2014.
- (56) GORDHANDAS, C. *Aplicação de Agonistas Canabinoides Na Terapêutica e o Seu Impacto Sociopolítico- Económico.* 2014. Dissertação (Mestrado em ciências farmaceuticas) - Faculdade de ciência e tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal, 2014.
- (57) ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C. Cannabis Sativa: A Planta Que Pode Produzir Efeitos Indesejáveis e Também Trata-los. *Rev. Bras. Psiquiatr.* v.32, p.6–7, 2010.
- (58) MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.* v.11, n.1, p.1–15. 2019.
- (59) CAMPOS, A. C. et al. Multiple Mechanisms Involved in the Large-Spectrum Therapeutic Potential of Cannabidiol in Psychiatric Disorders. *Philos. Trans. R. Soc. B.* v.367, n.1607, p.3364–3378, 2012.
- (60) LEO, A.; RUSSO, E.; ELIA, M. Cannabidiol and Epilepsy: Rationale and Therapeutic Potential. *Pharmacol. Res.* v.107, p.85–92, 2016.
- (61) SARTIM, A. G.; MOREIRA, F. A.; JOCA, S. R. L. Involvement of CB1 and TRPV1 Receptors Located in the Ventral Medial Prefrontal Cortex in the Modulation of Stress Coping Behavior. *Neuroscience.* v.340, n.1, p.126–134, 2017.
- (62) SALES, A. J. et al. Antidepressant-like Effect Induced by Cannabidiol Is Dependent on Brain Serotonin Levels. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* v.86, n.6, p.255–261, 2018.
- (63) LIBRO, R. et al. Cannabidiol Modulates the Expression of Alzheimer’s Disease-Related Genes in Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* v.18, n.1, p.1–19, 2017.
- (64) WHO. Department of Health Statistics and Information Systems WHO. *Who methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2011.* Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/GlobalDALYmethods_2000_2011.pdf?ua=1>. Acesso em: 3 de jul. 2017.
- (65) SCHYF, C. J. VAN DER. Psychotropic Drug Development Strategies That Target

- Neuropsychiatric Etiologies in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Drug Dev. Res.*, v.77, n.8, p.458–468, 2016.
- (66) QUAGLIATO, E. M. A. B. *Fronteiras entre a neurologia e a psiquiatria*. Disponível em: <<http://www.psiquiatriageral.com.br/cerebro/fronteiras.htm>>. Acesso em: 6 de fev. de 2017.
- (67) FRAZÃO, D. A. *Saiba o que é, quais são os sintomas e se a epilepsia tem cura*. Disponível em: <<https://www.tuasaude.com/epilepsia/>>. Acesso em 6 de fev. de 2017.
- (68) _____. *Tratamentos da epilepsia*. Disponível em: <<https://www.tuasaude.com/tratamento-da-epilepsia/>>. Acesso em: 6 de fev. de 2017.
- (69) Dravet Syndrome Foundation. *What is Dravet Syndrome?*. Disponível em: <<https://www.dravetfoundation.org/what-is-dravet-syndrome/>>. Acesso em 5 de jul. de 2018.
- (70) DEVINSKY, O. et al. Effect of Cannabidiol on Drop Seizures in the Lennox–Gastaut Syndrome. *N. Engl. J. Med.* v.378, n.20, p.1888–1897, 2018.
- (71) About LGS. Disponível em: <<http://www.lgsfoundation.org/aboutlgs>> Acesso em 18 de set. de 2018.
- (72) Jornal O Globo. *EUA aprovam pela primeira vez medicamento à base de cannabis*. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/eua-aprovam-pela-primeira-vez-medicamento-base-de-cannabis-22819572>>. Acesso em 18 de set. de 2018.
- (73) FDA. *Epidiolex Prescribing Information*. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/2103651bl.pdf>. Acesso em 18 de set. de 2018.
- (74) GW Pharmaceuticals. *Epilepsy*. Disponível em: <<https://www.gwpharm.com/healthcare-professionals/research-trials/epilepsy>>. Acesso em 18 de set. de 2018.
- (75) ISEGER, T. A.; BOSSONG, M. G. A Systematic Review of the Antipsychotic Properties of Cannabidiol in Humans. *Schizophr. Res.* v.162, n.1–3, p.153–161, 2015.
- (76) MILELLI, A. et al. Perspectives in Designing Multifunctional Molecules in Antipsychotic Drug Discovery. *Drug Dev. Res.* v.443, n.7, p.437-443, 2016.
- (77) GW Pharmaceutical. *GW Pharmaceuticals Announces Positive Proof of Concept Data in Schizophrenia*. Disponível em: <<https://www.gwpharm.com/about-us/news/gw-pharmaceuticals-announces-positive-proof-concept-data-schizophrenia>> Acesso em 3

de out. de 2018.

- (78) CAMPOS, H. C. et al. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders I: Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. v.10, n.2, p.239–250, 2011.
- (79) ZUARDI, A W. et al. Cannabidiol for the Treatment of Psychosis in Parkinson's Disease. *J. Psychopharmacol*. v.23, n.8, p.979–983, 2009.
- (80) SUERO-GARCÍA, C.; MARTÍN-BANDERAS, L.; HOLGADO, M. Á. Efecto Neuroprotector de Los Cannabinoides En Las Enfermedades Neurodegenerativas. *Ars Pharm*. v.56, n.2, p.77–87, 2015.
- (81) CHAGAS, M. H. et al. Effects of Cannabidiol in the Treatment of Patients with Parkinson's Disease: An Exploratory Double-Blind Trial. *J Psychopharmacol*. v.28, n.11, p.1088–1098, 2014.
- (82) WITTMANN, M.; BENGTSON, C. P.; BADING, H. Extrasynaptic NMDA Receptors: Mediators of Excitotoxic Cell Death. *Pharmacol. Cereb. Ischemia*. p.253–266, 2004.
- (83) SANTOS, N. A. G. et al. The Neuroprotection of Cannabidiol against MPP⁺-Induced Toxicity in PC12 Cells Involves TrkA Receptors, Upregulation of Axonal and Synaptic Proteins, Neuritogenesis, and Might Be Relevant to Parkinson's Disease. *Toxicol. Vitro*. v.30, n.1, p.231–240, 2015.
- (84) CHEN, H. S. et al. Open-Channel Block of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Responses by Memantine: Therapeutic Advantage against NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity. *J. Neurosci*. v.12, n.11, p.4427–4436, 1992.
- (85) REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Reviews: Epidemiology of Alzheimer Disease. *Nat. Publ. Gr*. v.7, n.3, p.1–16, 2011.
- (86) HIPPIUS, H.; NEUNDORFER, G. The Discovery of Alzheimer's Disease. *Clin. Res*. v.5, n.1, p.101–108, 2003.
- (87) VIEGAS, F. P. D. et al. Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações Do Processo Neuroinflamatório. *Rev.Virtual de Quimica*. p.286–306, 2011.
- (88) ASO, E. et al. CB2 Cannabinoid Receptor Agonist Ameliorates Alzheimer-like Phenotype in ABPP/PS1 Mice. *J. Alzheimer's Dis*. v.35, n.4, p.847–858, 2013.
- (89) ESPOSITO, G. et al. The Marijuana Component Cannabidiol Inhibits β -Amyloid-Induced Tau Protein Hyperphosphorylation through Wnt/ β -Catenin Pathway Rescue in PC12 Cells. *J. Mol. Med*. v.84, n.3, p.253–258, 2006.

- (90) YAMAMOTO, S. et al. Transient Receptor Potential Channels in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1772, n.8, p.958–967, 2007.
- (91) DA ROCHA, M. D. et al. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders II: Alzheimer's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* v.10, n.2, p.251–270, 2011.
- (92) DE FALCO, A. et al. Doença de Alzheimer: Hipóteses Etiológicas e Perspectivas de Tratamento. *Química Nova.* p.63–80, 2016.
- (93) REISBERG, B. et al. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* v.348, n.14, p.1333–1341, 2003.
- (94) WESTLAKE, T. M. et al. Cannabinoid Receptor-Binding and Messenger-Rna Expression in Human Brain - an in vitro Receptor Autoradiography and in situ Hybridization Histochemistry Study of Normal Aged and Alzheimers Brains. *Neuroscience.* v.63, n.3, p.637–652, 1994.
- (95) FARKAS, S. et al. [¹²⁵I]SD-7015 Reveals Fine Modalities of CB₁ Cannabinoid Receptor Density in the Prefrontal Cortex during Progression of Alzheimer's Disease. *Neurochem. Int.* v.60, n.3, p.286–291, 2012.
- (96) GONÇALVES, A. M. M. N. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 3-Alkylpyridine Marine Alkaloid Analogs with Promising Anticancer Activity. *Mar. Drugs,* v.12, n.8, p.4361–4378, 2014.
- (97) COREY, E. J.; PEARCE, H. L. Total Synthesis of Picrotoxinin. *J. Am. Chem. Soc.* v.101 n.19, p.5841–5843, 1979.
- (98) SATHESHI, S. M.; GOPALAKRISHNAN, B.; DUGANATH, N. Synthesis and Analgesic Activity of Some New Semisynthetic Derivatives of Carvone. *J. Pharm. Chem.* v.5, n.3, p.32, 2011.
- (99) Chemical book. Methyl anisate | 121-98-2 Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5189041.htm>. Acesso em 6 de jun. 2018.
- (100) 3,4-dimetoxibenzoato de metila. Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/CASEN_2150-38-1.htm>. Acesso em 6 de jun. de 2018.
- (101) PAVIA, D. L. et al. *Introdução a Espectroscopia*, 4ª ed.; La Rosa, P., Cantarelli, L., Alencar, F., Eds.; Cengage learning: Bellingham, Washington, 2015.

- (102) GRIMSTER, N. P. et al. Aromatic Sulfonyl Fluorides Covalently Kinetically Stabilize Transthyretin to Prevent Amyloidogenesis While Affording a Fluorescent Conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* v.135, n.15, p.5656–5668, 2013.
- (103) XI, M.; et al. *Development of Hydroxy-Based Sphingosine Kinase Inhibitors and Anti-Inflammation in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis in Mice.* *Bioorg. Med. Chem.* v.24, n.14, p.3218–3230, 2016.
- (104) LEIGH, D. A. et al. Pyridyl-Acyl Hydrazone Rotaxanes and Molecular Shuttles. *J. Am. Chem. Soc.* v.139, n.20, p.7104–7109, 2017.
- (105) KARABANOVICH, G. et al. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-Oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium Tuberculosis. *J. Med. Chem.*, v.59, n.6, p. 2362–2380, 2016.
- (106) DISCONZI, F. B. *Análise de Dados de RMN, Deslocamentos Químicos e Constantes de Acoplamento Do Sistema de Hidrogênios ABX Em 3,5-Diaril-4,5-Diídro-1H-Pirazois.* 2012. Dissertação (Mestrado em química)- Centro de ciências naturais e exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.
- (107) CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim. Nova.* v.29 n.2, p.287–292, 2006.
- (108) WILSON, F.; PRINCIPLES, W.; BIOCHEMISTRY, T. *Espectrometria de massas.* Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/miyamoto/DEG_7_Espectrometria_de_massas.pdf>. Acesso em 10 de nov. de 2018.
- (109) Wikipédia. Eletrospray. Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/mcplwiki/eletrospray.html>>. Acesso em 22 de out. de 2018.
- (110) SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of Antioxidant Activity. *Journal of Functional Foods.* p.757–781, 2015.
- (111) PARLAK, A. E. et al. In Vitro Antioxidant Evaluation of Some Mannich Bases Which Contain Bis-1,2,4-Triazole Derivative. *J. Chem. Soc. Pakistan.* v.37, n.6, p.1192–1204, 2015.
- (112) KHAN, B. et al. Evaluation of Anti-Acetylcholinesterase Activity and Antioxidant Potential of Ricinine (a Central Nervous System Stimulant) Isolated from Ricinus Communis L. *J. Chem. Soc. Pakistan,* v.38, n.2, p.326–326, 2016.
- (113) GONTIJO, V. S. et al. Isolation and Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic

- Constituents of the *Garcinia Brasiliensis* Epicarp. *Food Chem.* v.132, n.3, p.1230–1235, 2012.
- (114) GUENANE, H.; GHERIB, A.; KRIKA, F. Minerals Analysis , Antioxidant and Chemical Composition of Extracts of *Laurus Nobilis* from Southern Algeria. *J. Mater. Environ. Sci.* v.7, n.11, p.4253–4261, 2016.
- (115) MORALES, J. C.; LUCAS, R. Structure-Activity Relationship of Phenolic Antioxidants and Olive Components. *Elsevier Inc.* 2010.
- (116) PIEMONTESE, L. et al. Donepezil Structure-Based Hybrids as Potential Multifunctional Anti-Alzheimer's Drug Candidates. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* v.33 n.1, p.1212–1224, 2018.
- (117) ORTEGA-MOO, C.; GARZA, J.; VARGAS, R. The Substituent Effect on the Antioxidant Capacity of Catechols and Resorcinols. *Theor. Chem. Acc.* v.135, n.7, p.1–12, 2016.
- (118) ZHU, L. et al. ADME Properties Evaluation in Drug Discovery: In Silico Prediction of Blood–brain Partitioning. *Mol. Divers.* v.22, n.4, p.1–12, 2018.
- (119) TIBBITTS, J. et al. Key Factors Influencing ADME Properties of Therapeutic Proteins: A Need for ADME Characterization in Drug Discovery and Development. *MAbs.* v.8, n.2, p.229–245, 2016.
- (120) ALMEIDA, J. R. DE. *Planejamento , Ensaio e Otimização in Silico de Novos Protótipos Inibidores Da Enzima Acetilcolinesterase*. Tese (Doutorado em ciências farmaceuticas)-Faculdade de ciências farmaceuticas,USP, Ribeirão Preto, 2015.
- (121) RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* v.1, n.7, p.1–31, 2016.
- (122) GORSHKOV, K. et al. Astrocytes as Targets for Drug Discovery. *Drug Discov.* v.23, n.3, p.673–680, 2018.
- (123) JHA, M. K. et al. Functional Dissection of Astrocyte-Secreted Proteins: Implications in Brain Health and Diseases. *Prog. Neurobiol.* v.162, p.37–69, 2018.
- (124) CARDOSO VILELA, F.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like Effect of *Sonchus Oleraceus* L. in Mice. *J. Ethnopharmacol.* v.124, n.2, p.325–327, 2009.
- (125) CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic Specificity of a Simple Animal Model for the Behavioral Actions of Benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v.15, n.5, p.695–699, 1981.

- (126) PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural Despair" in Rats and Mice: Strain Differences and the Effects of Imipramine. *Eur. J. Pharmacol.* v.51, n.3, p.291–294, 1978.
- (127) CAN, A. et al. The Tail Suspension Test. *J. Vis. Exp.* n.58, p.3–7, 2011.
- (128) EL-ALFY, A. T. et al. Antidepressant-like Effect of Delta9-Tetrahydrocannabinol and Other Cannabinoids Isolated from *Cannabis Sativa L.* *Pharmacol. Biochem. Behav.* v.95 n.4, p.434–442, 2010.
- (129) SCHIAVON, A. P. et al. Influence of Single and Repeated Cannabidiol Administration on Emotional Behavior and Markers of Cell Proliferation and Neurogenesis in Non-Stressed Mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* v,64, n.27–34, 2016.
- (130) SILVERTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos orgânicos.* LTC, 7.ed. 2007.
- (131) ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals;* Butterworth-Heinemann, EUA, 2003.
- (132) MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods,* v.65, p.55–63, 1983
- (133) LINGE, R.; et al. Cannabidiol Induces Rapid-Acting Antidepressant-like Effects and Enhances Cortical 5-HT/Glutamate Neurotransmission: Role of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology.* v.103, p.16–26, 2016.
- (134) VALLE, F. P. Effects of Strain, Sex, and Illumination on Open-Field Behavior of Rats. *Am. J. Psychol.* v.83, n.1, p.103–111, 1970.
- (135) VILELA, F. C. et al. Antidepressant-Like Activity of *Sonchus Oleraceus* in Mouse Models of Immobility Tests. *J. Med. Food.* v.13 n.1, p.219–222, 2010.
- (136) CRUZ, A.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos Animais de Ansiedade e o Estudo Experimental de Drogas Serotonérgicas. *Métodos em Neurociência.* p.192–217, 2012.
- (137) COSTA, A. P. R. *Estudos Da Estrutura Comportamental de Camundongos Nos Testes de Nado Forçado e Da Suspensão Pela Cauda.* Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Centro de ciências biológicas, UFSC, Santa Catarina, 2012.
- (138) DOUKKALI, Z. et al. Evaluation of Anxiolytic Activity of Methanolic Extract of *Urtica Urens* in a Mice Mode. *Behav. Brain Funct.* v.11, n.19, p.1–5, 2015.
- (139) STERU, L. et al. The Tail Suspension Test: A New Method for Screening Antidepressants in Mice. *Psychopharmacology,* v.85, n.367–370, 1985.

- (140) ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal Models as Tools to Study the Pathophysiology of Depression. *Rev. Bras. Psiquiatr.* v.35, p.112–120, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Espectros no Infravermelho e de RMN de ^1H e de ^{13}C dos produtos intermediários: ésteres (**37-39**), benzoidrazidas (**41-43**).

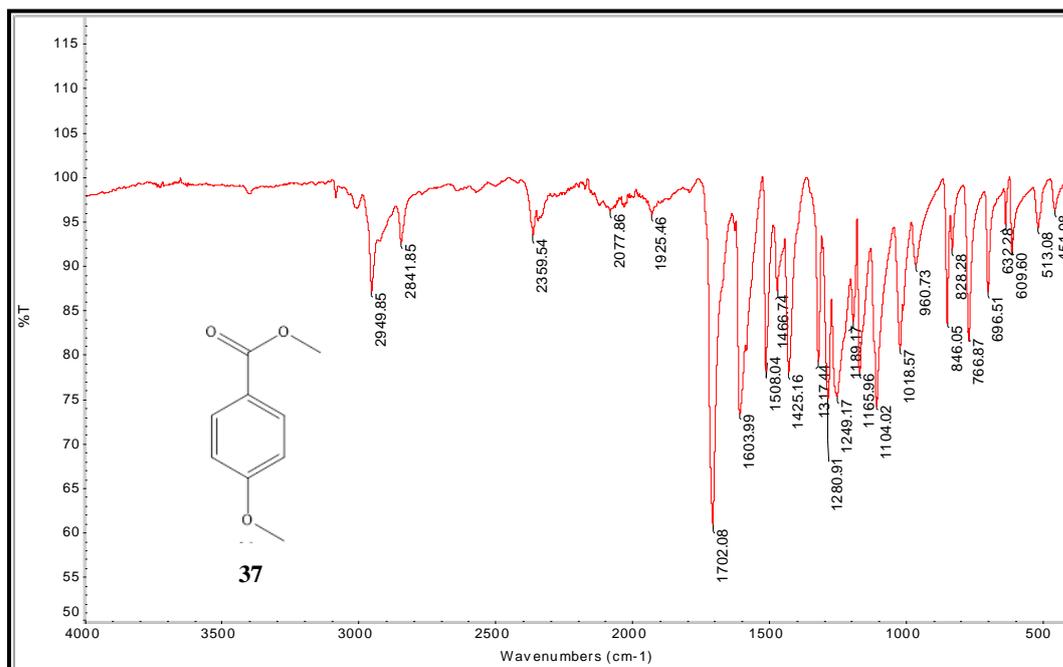


Figura 37 - Espectro de absorção na região do IV do composto 4-metoxibenzoato de metila (**37**) (ATR).
Fonte: Do Autor

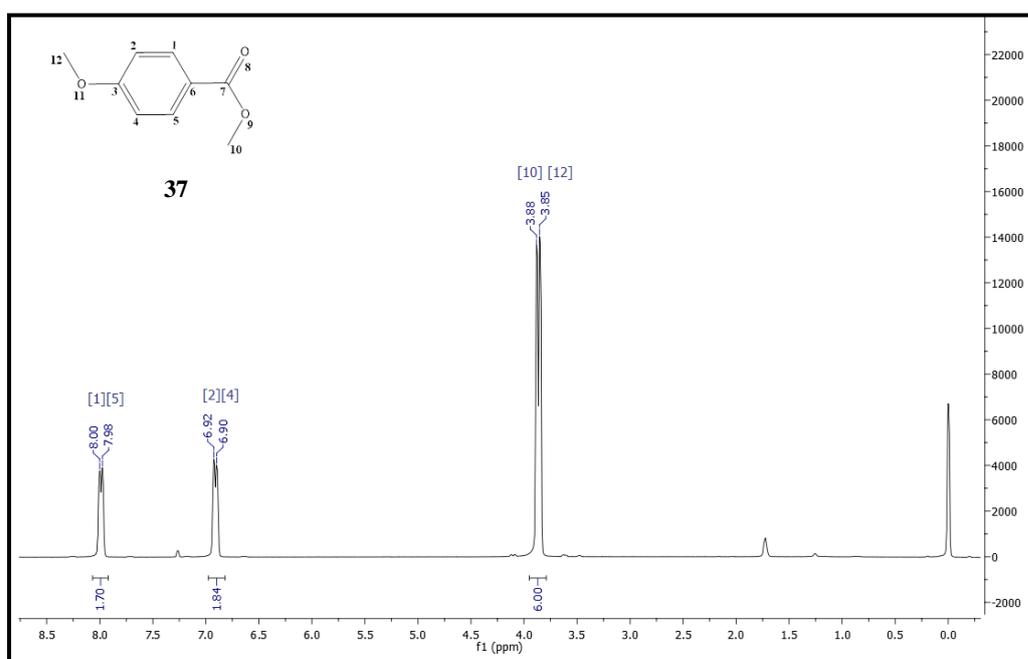


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 4-metoxibenzoato de metila (**37**).
Fonte: Do Autor.

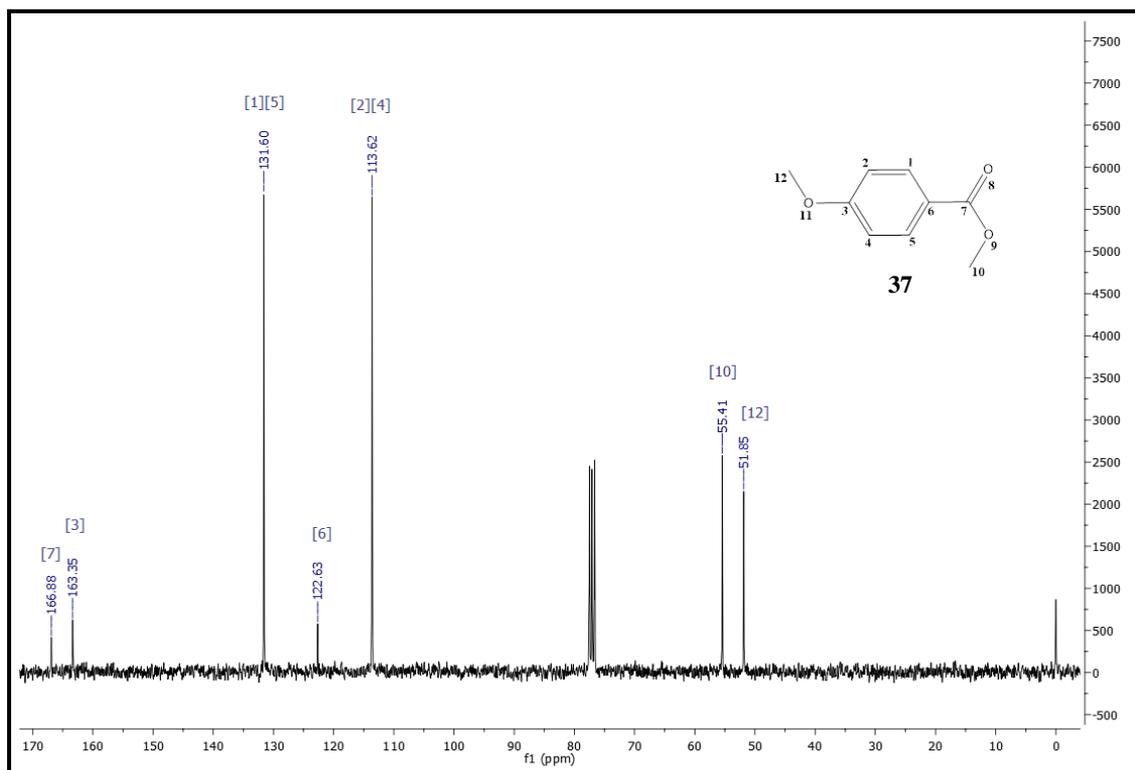


Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 4-metoxibenzoato de metila (37).
Fonte: Do Autor

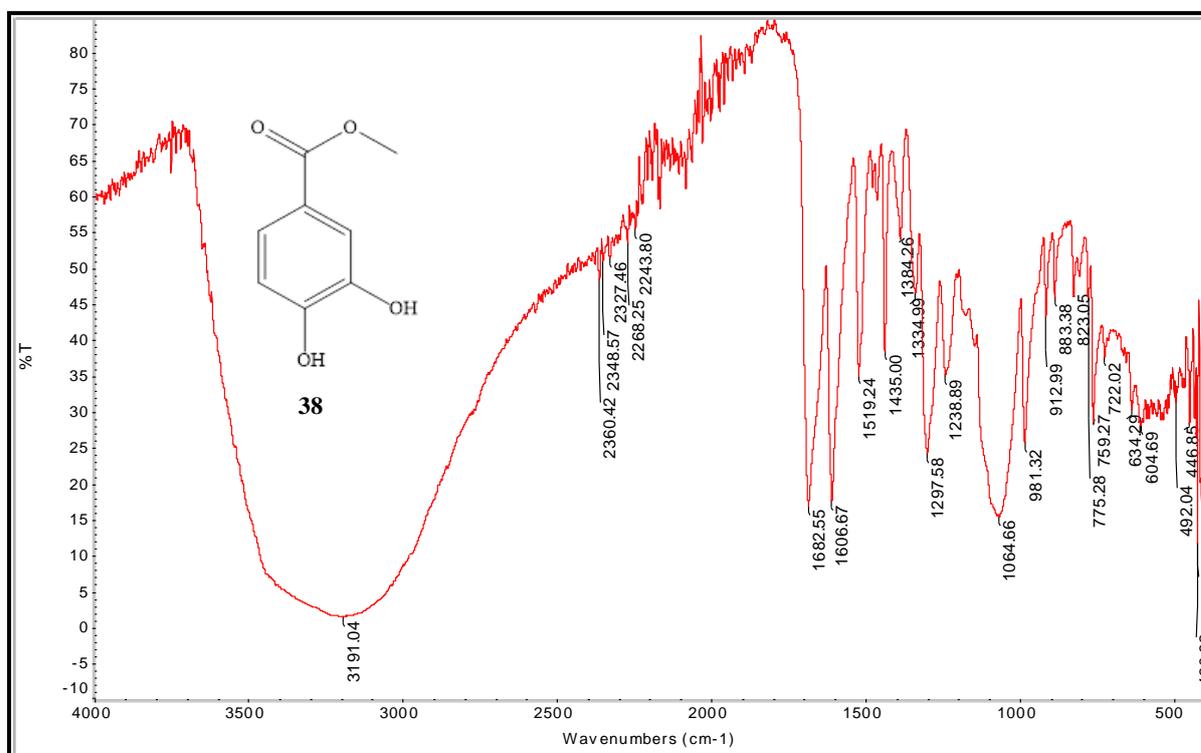


Figura 40 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-diidroxibenzoato de metila (38) (ATR).
Fonte: Do Autor.

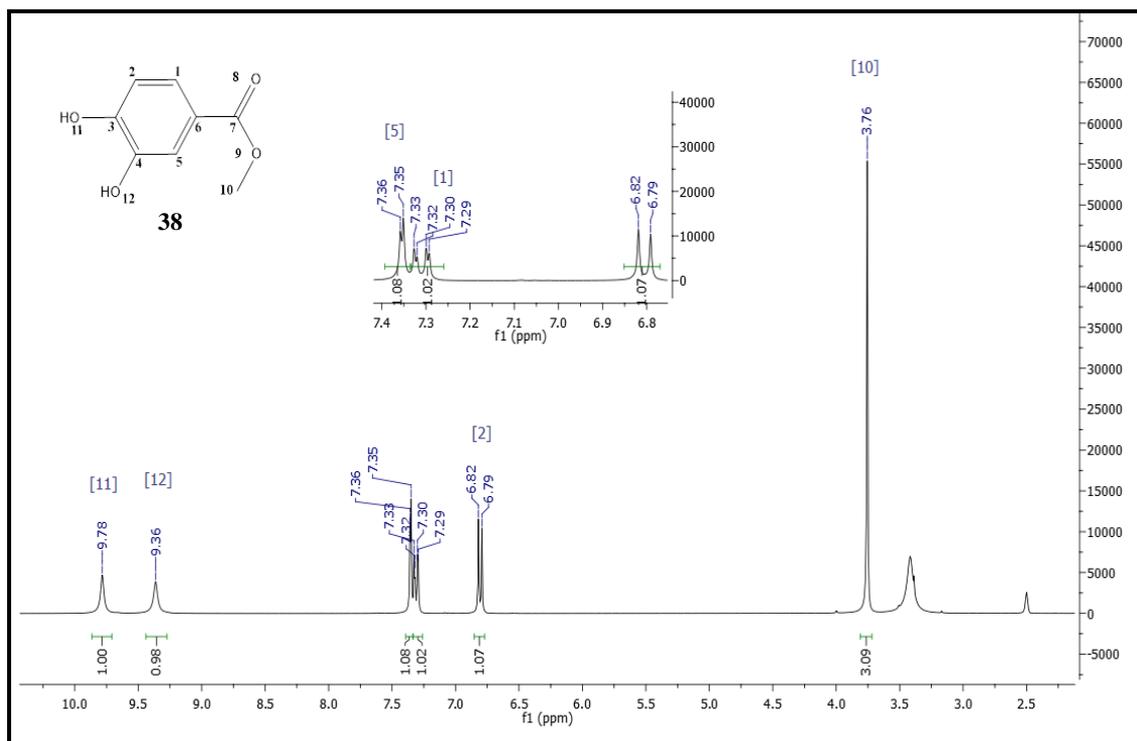


Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 3,4-diidroxibenzoato de metila (38).

Fonte: Do Autor

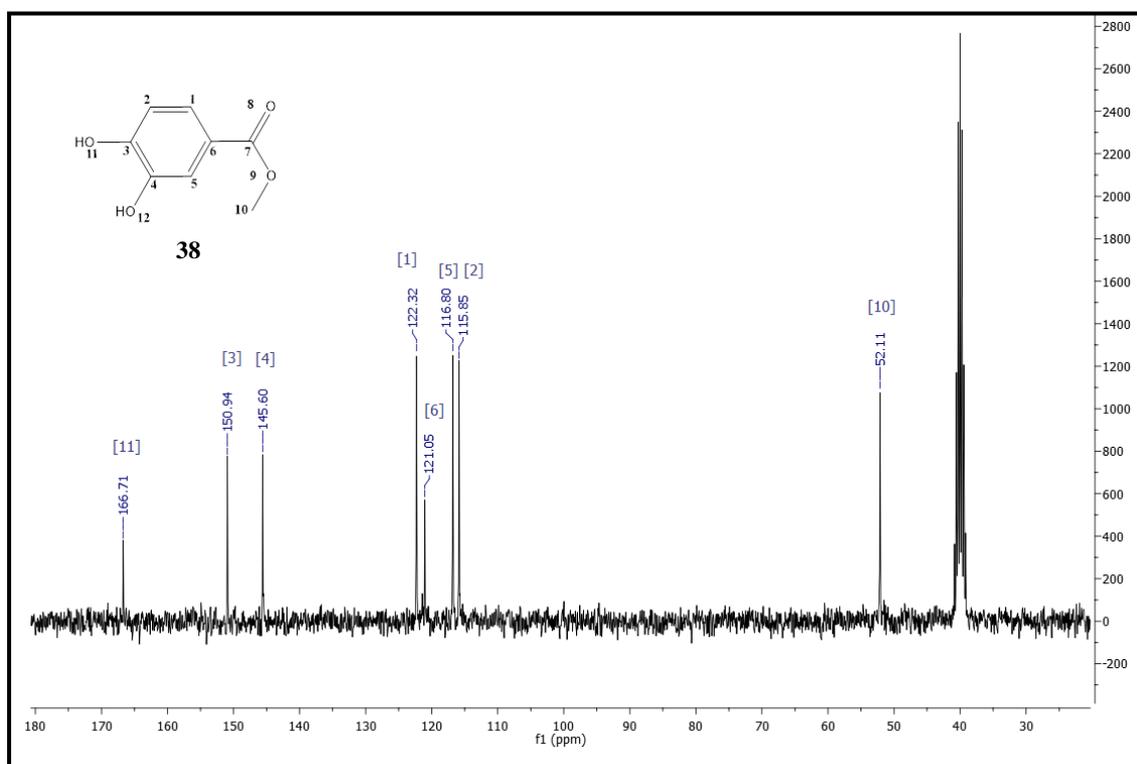


Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 3,4-diidroxibenzoato de metila (38).

Fonte: Do Autor

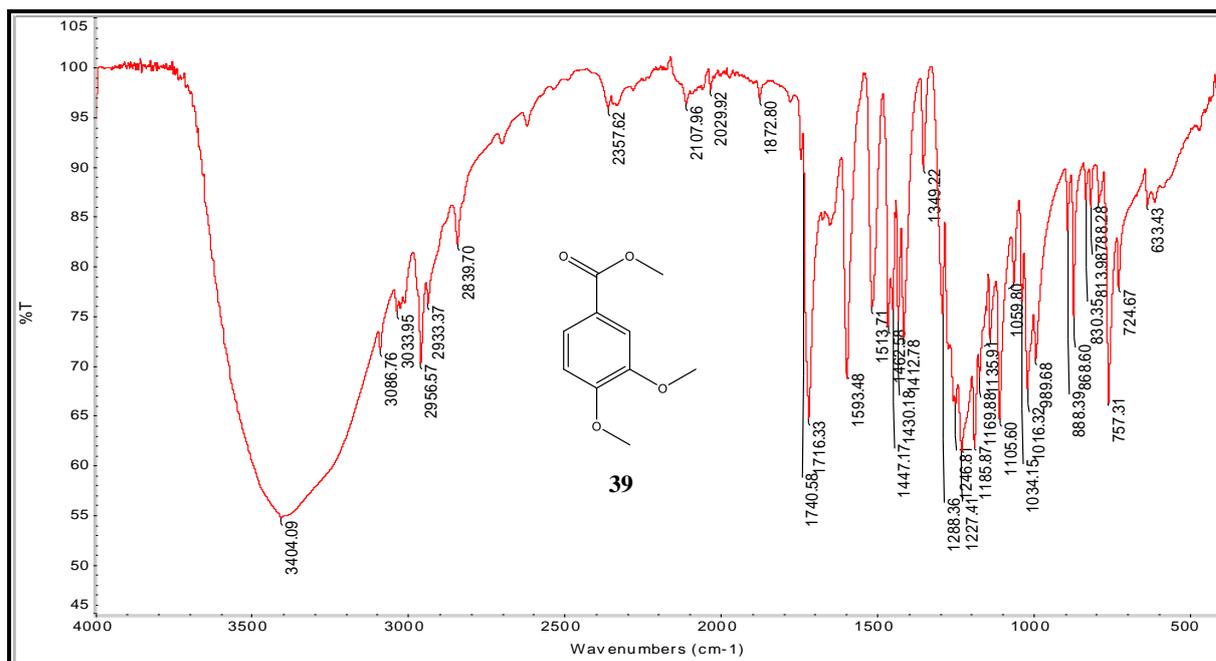


Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-dimetoxibenzoato de metila (**39**) (ATR).

Fonte: Do Autor.

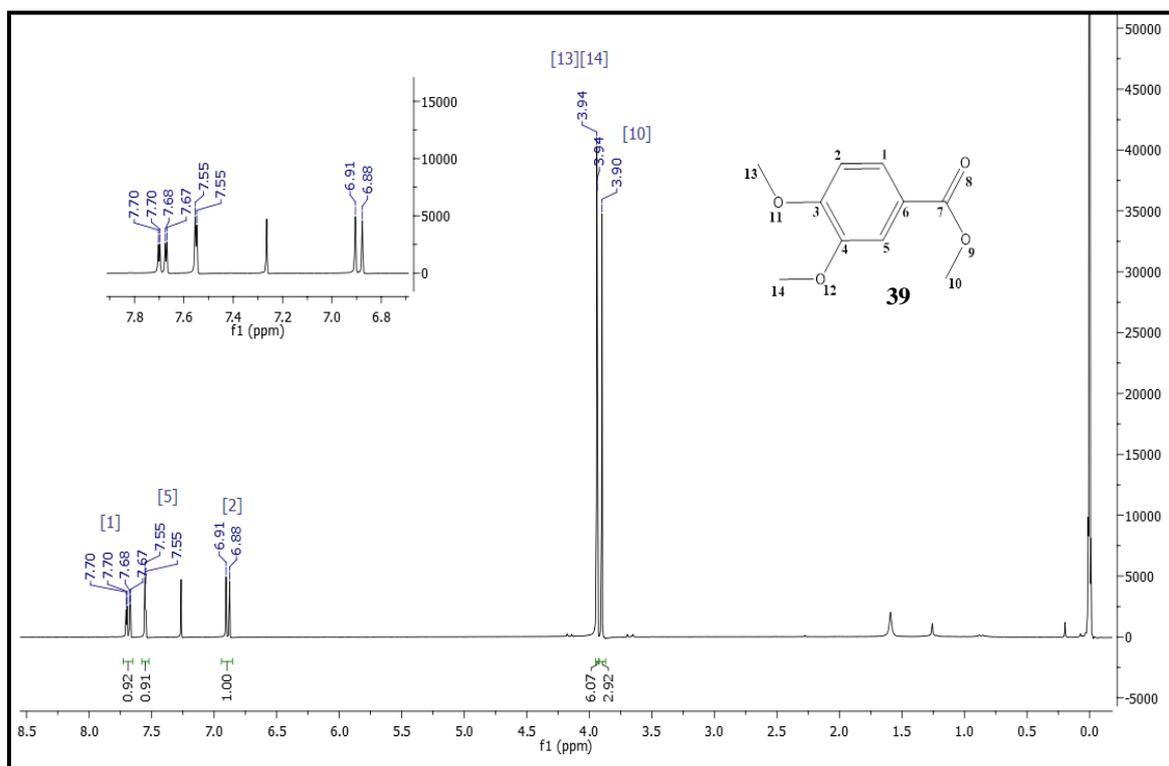


Figura 44 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 3,4-dimetoxibenzoato de metila (**39**).

Fonte: Do Autor.

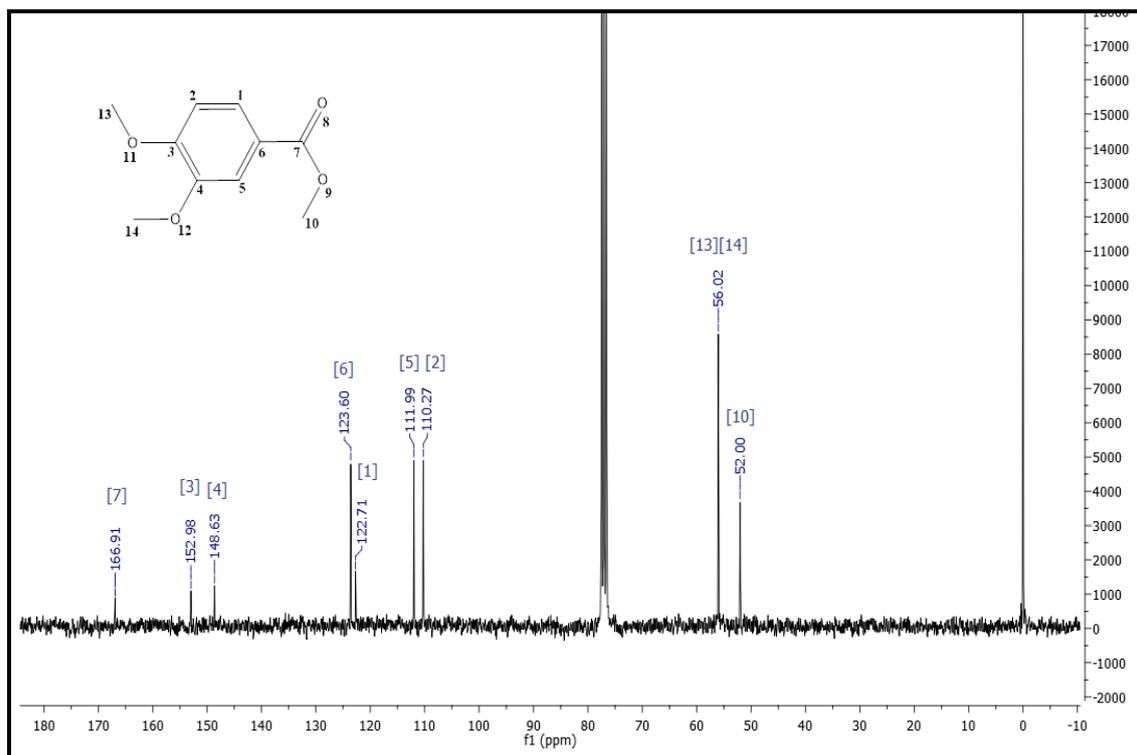


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoato de metila (**39**).

Fonte: Do Autor.

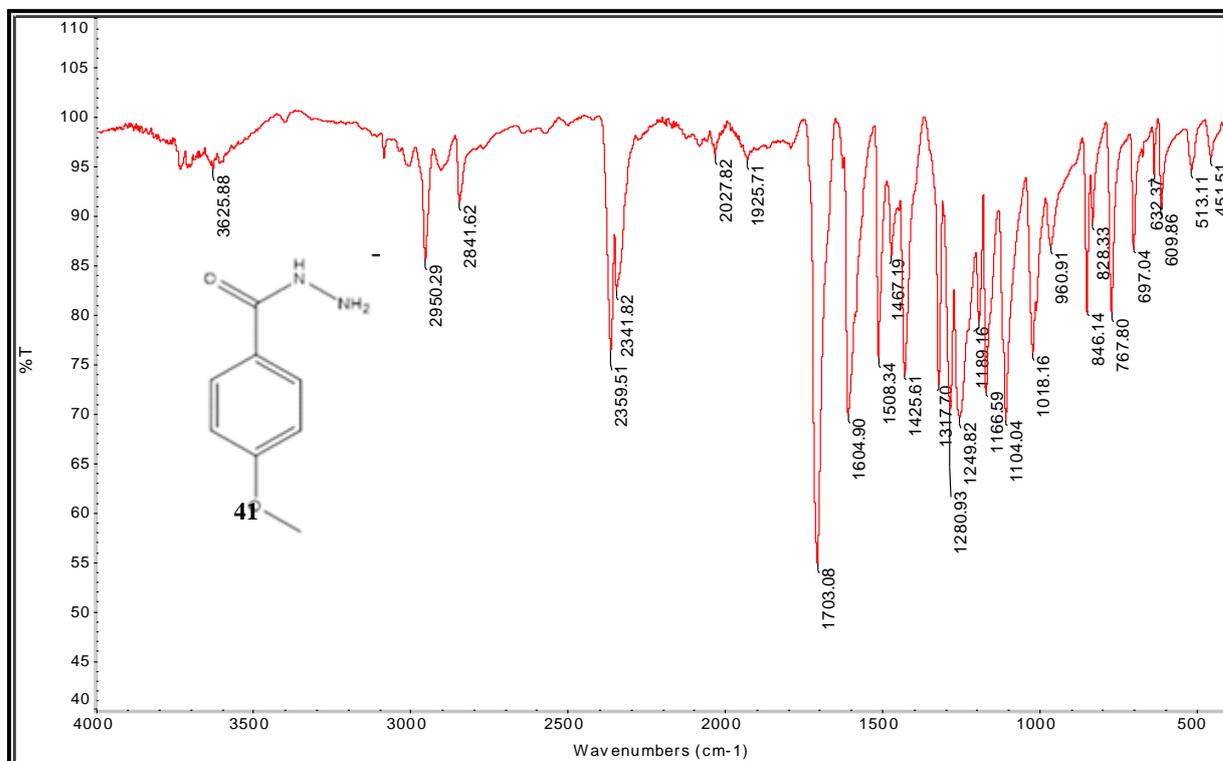


Figura 46 - Espectro de absorção na região do IV do composto 4-metoxibenzoidrazida (**41**) (ATR).

Fonte: Do Autor.

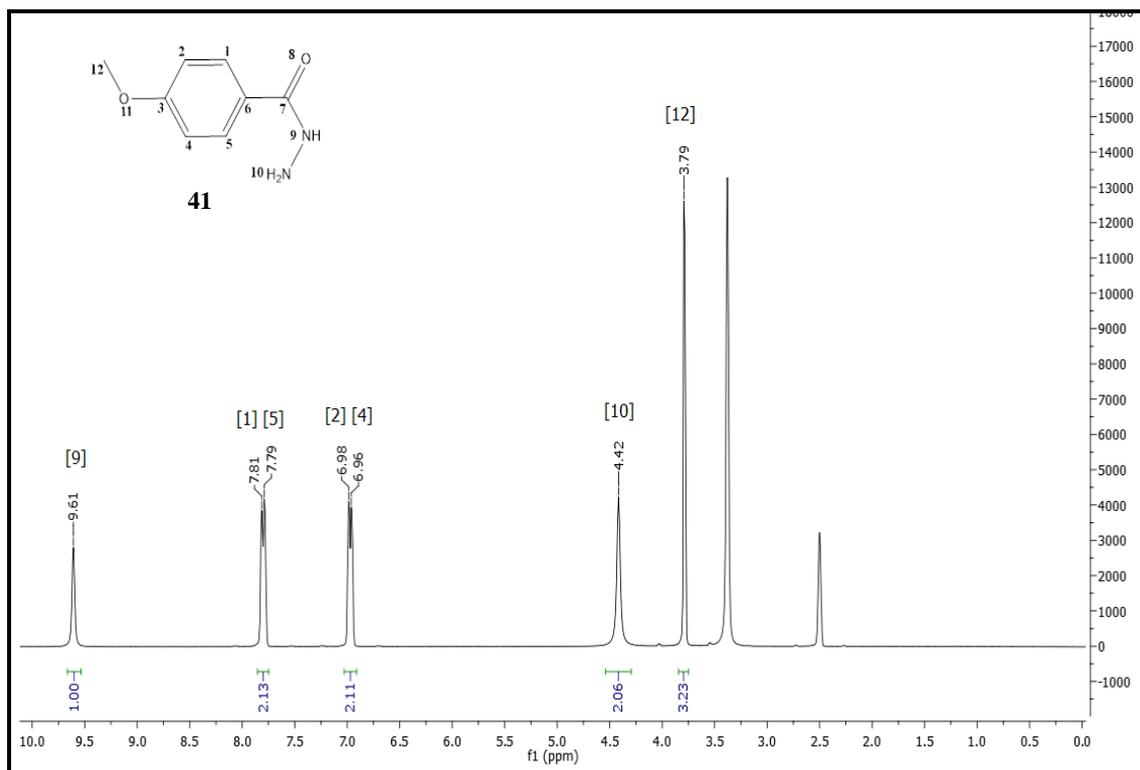


Figura 47 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 4-metoxibenzoidrazida (**41**).
Fonte: Do Autor.

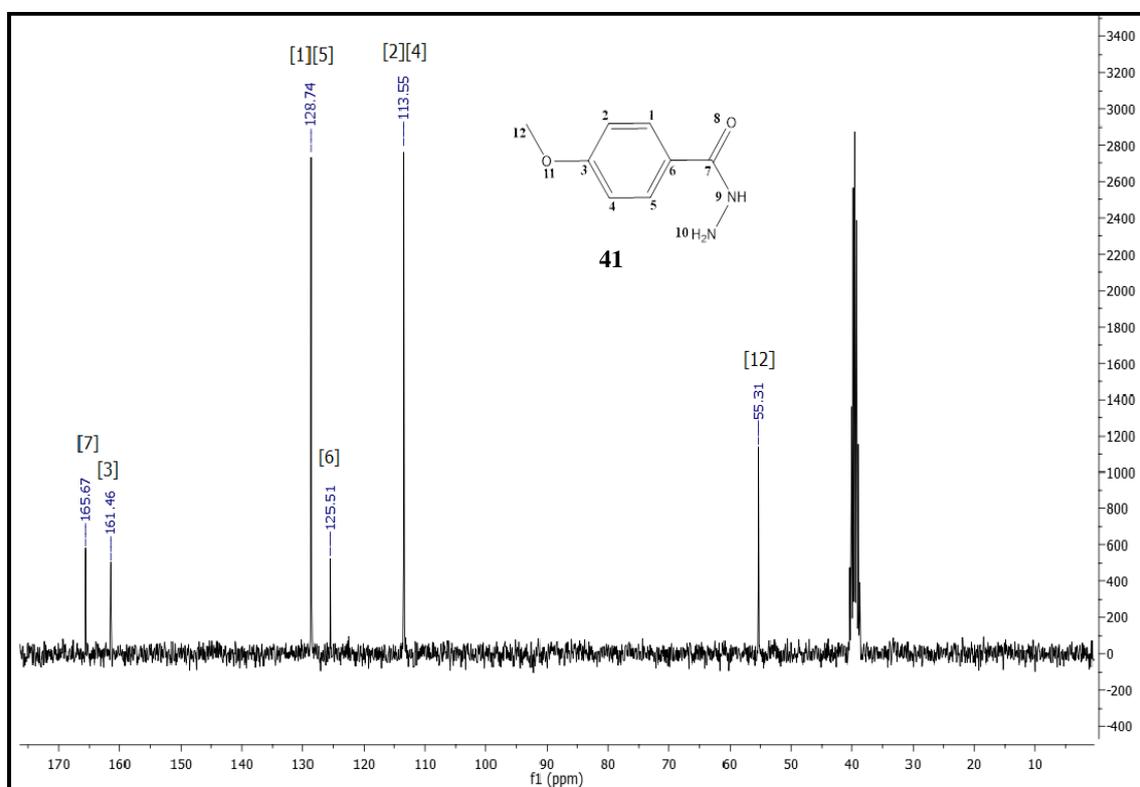


Figura 48: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 4-metoxibenzoidrazida (**41**).
Fonte: Do Autor.

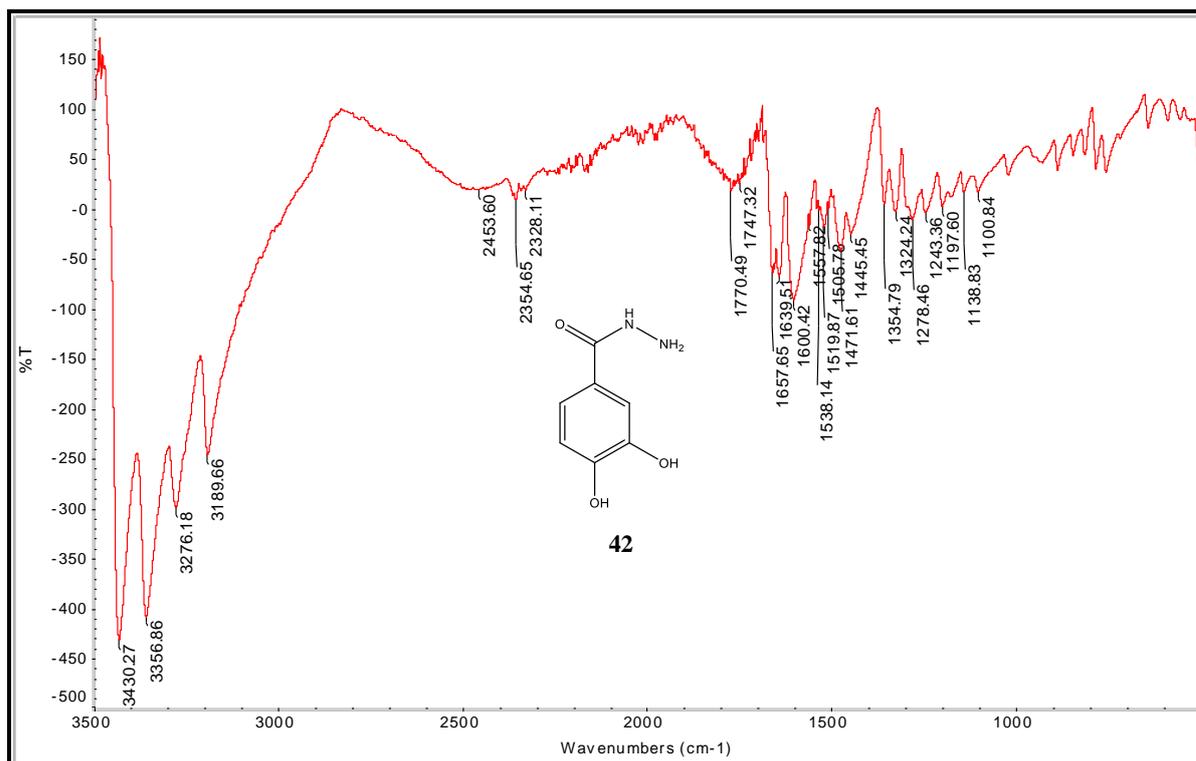


Figura 49 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-di-hidroxibenzoidrazida (**42**) (ATR).
Fonte: Do Autor.

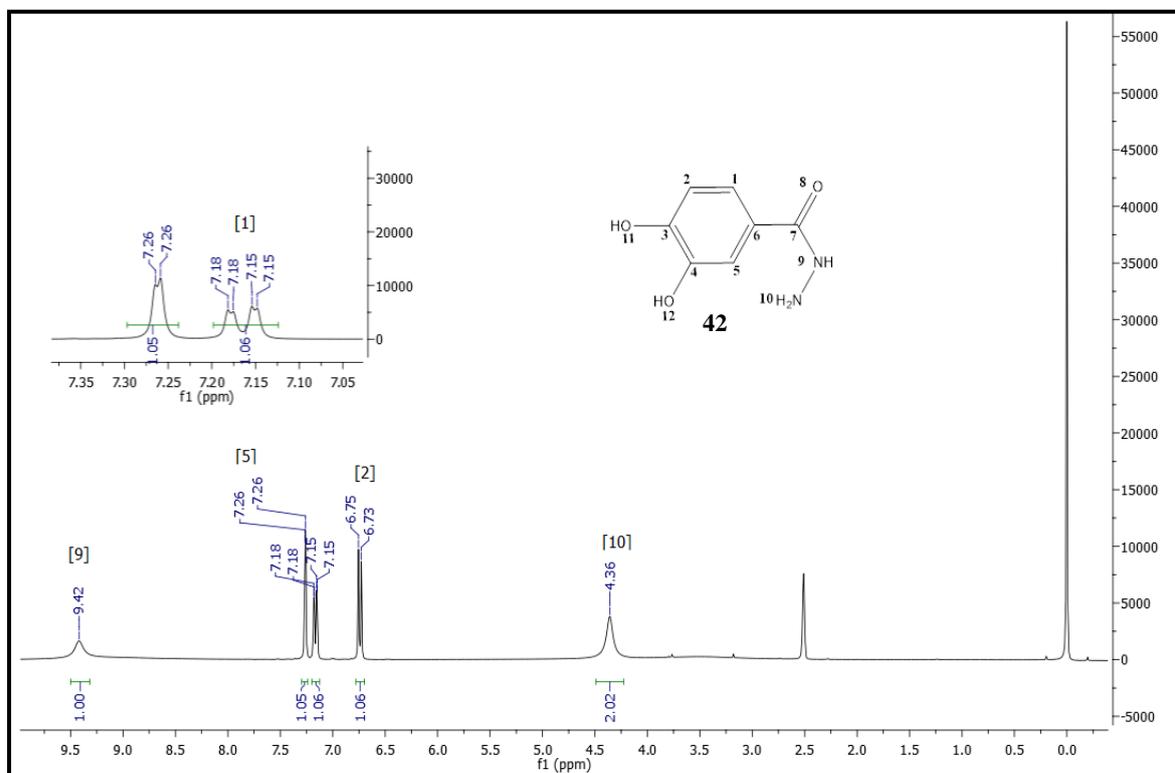


Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 3,4-di-hidroxibenzoidrazida (**42**).

Fonte: Do Autor.

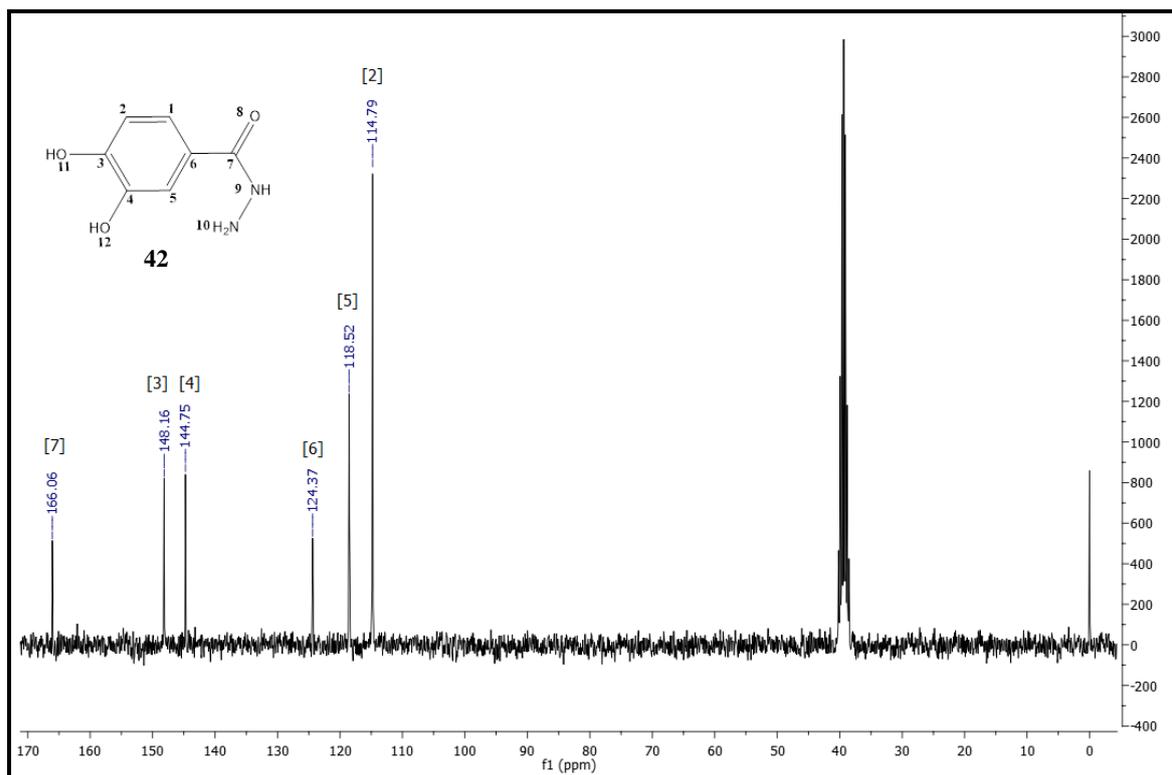


Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 3,4-di-hidroxibenzoidrazida (42).

Fonte: Do Autor.

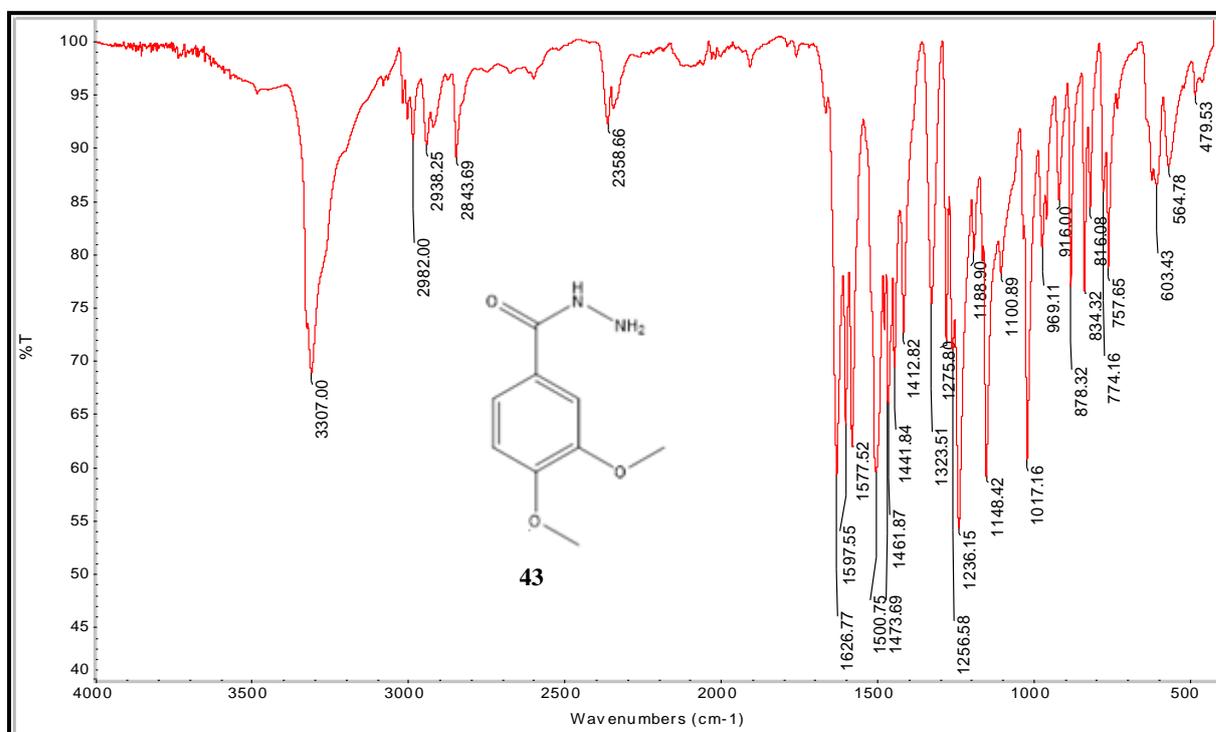


Figura 52 - Espectro de absorção na região do IV do composto 3,4-dimetoxibenzoidrazida (43) (ATR).

Fonte: Do Autor.

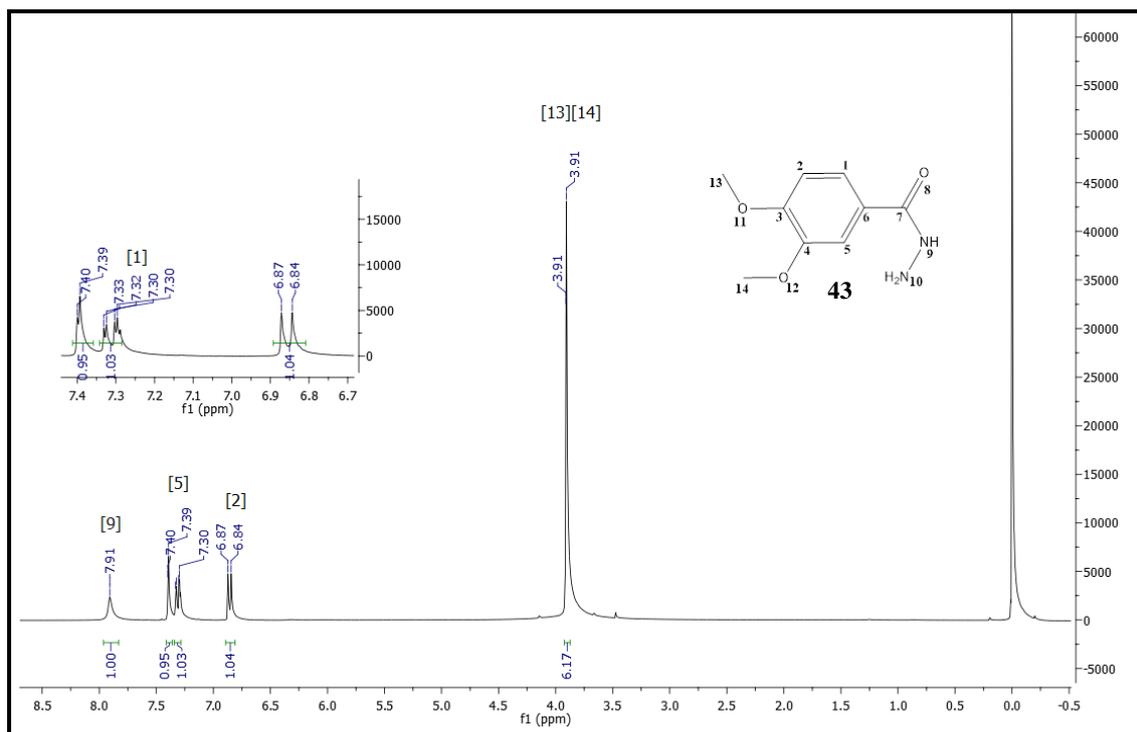


Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoidrazida (**43**).
Fonte: Do Autor.

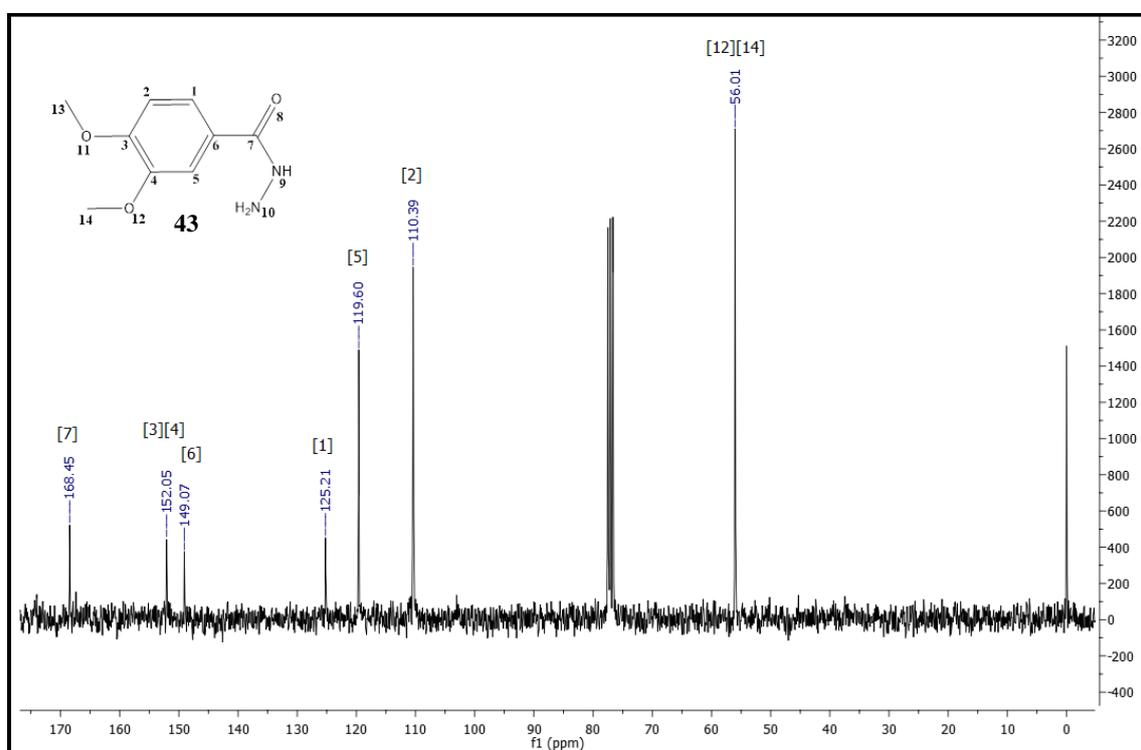


Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3,4-dimetoxibenzoidrazida (**43**).
Fonte: Do Autor.

APÊNDICE B- Espectros no IV, de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , de Massas e perfis quelantes dos compostos finais: benzoidrazonas (**45-51**).

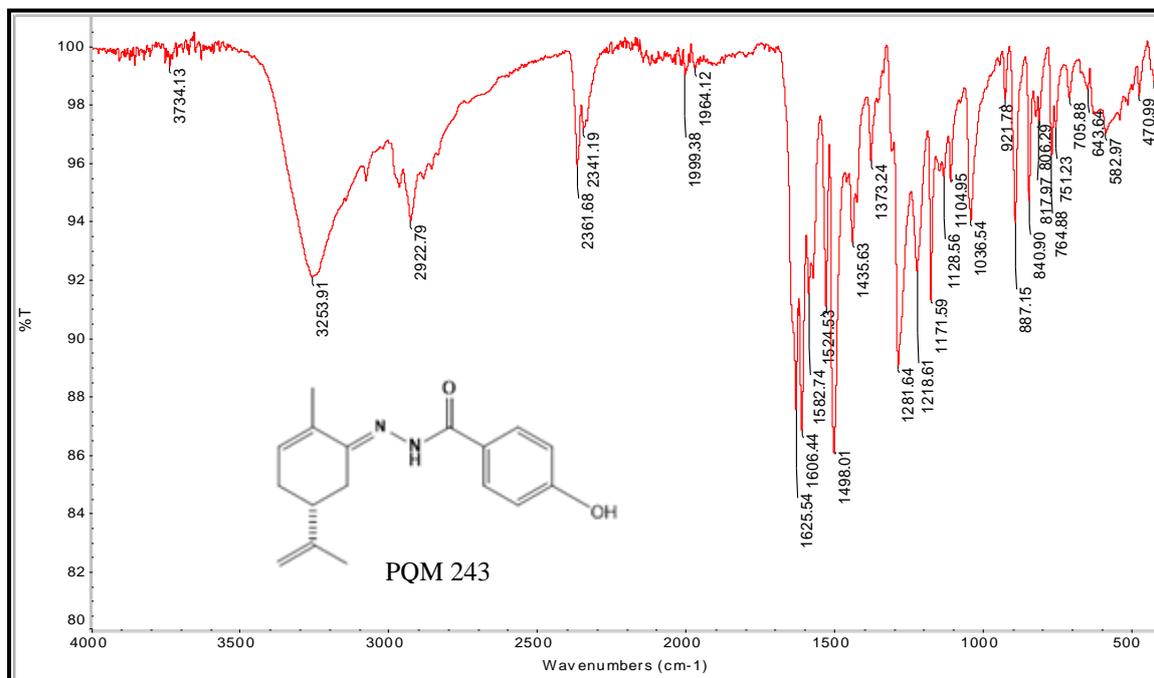


Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-243 (**45**) (ATR).

Fonte: Do Autor

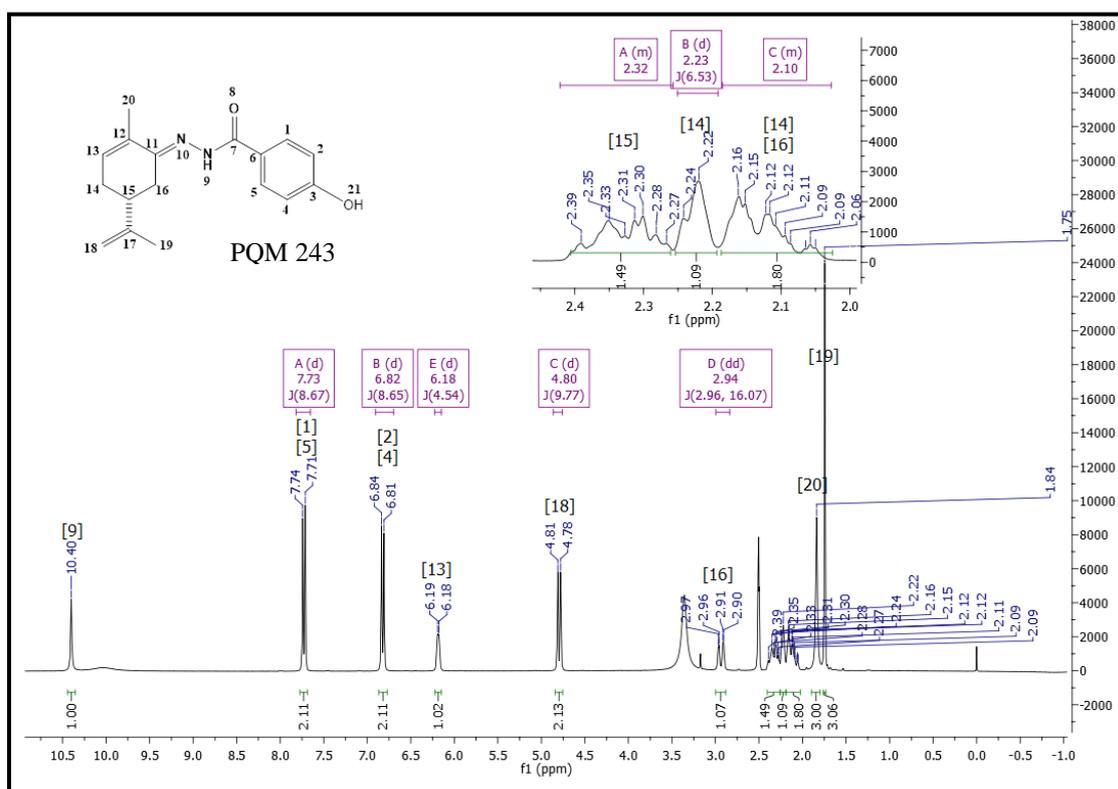


Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto PQM-243 (**45**).

Fonte: Do Autor

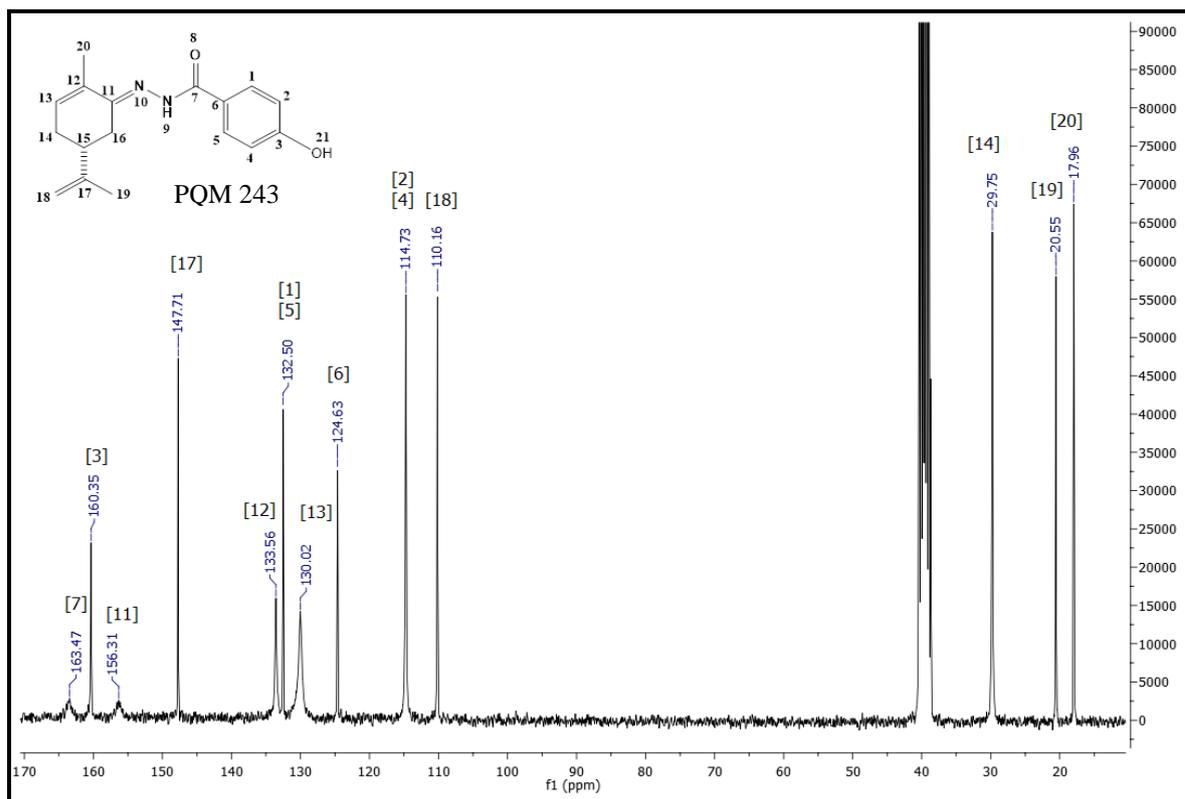


Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-243 (45)

Fonte: Do Autor

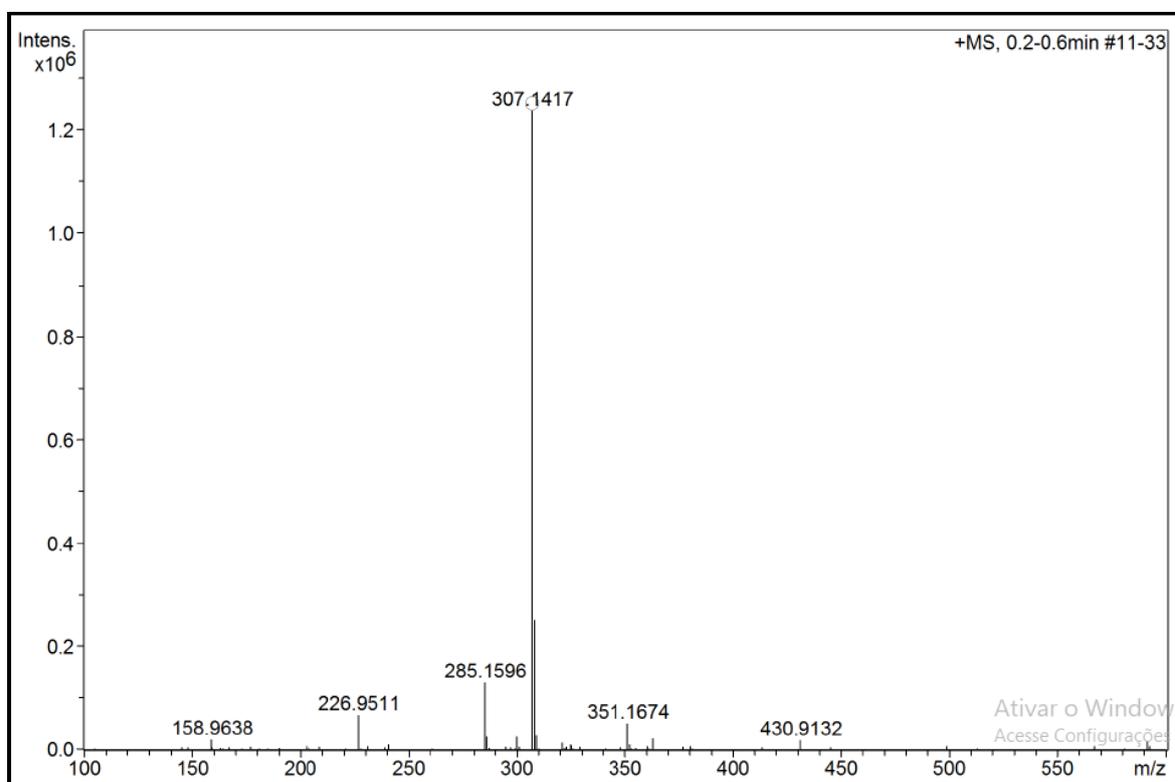


Figura 58 - Espectro de Massas (ESI) do composto PQM-243.

Fonte: Do Autor.

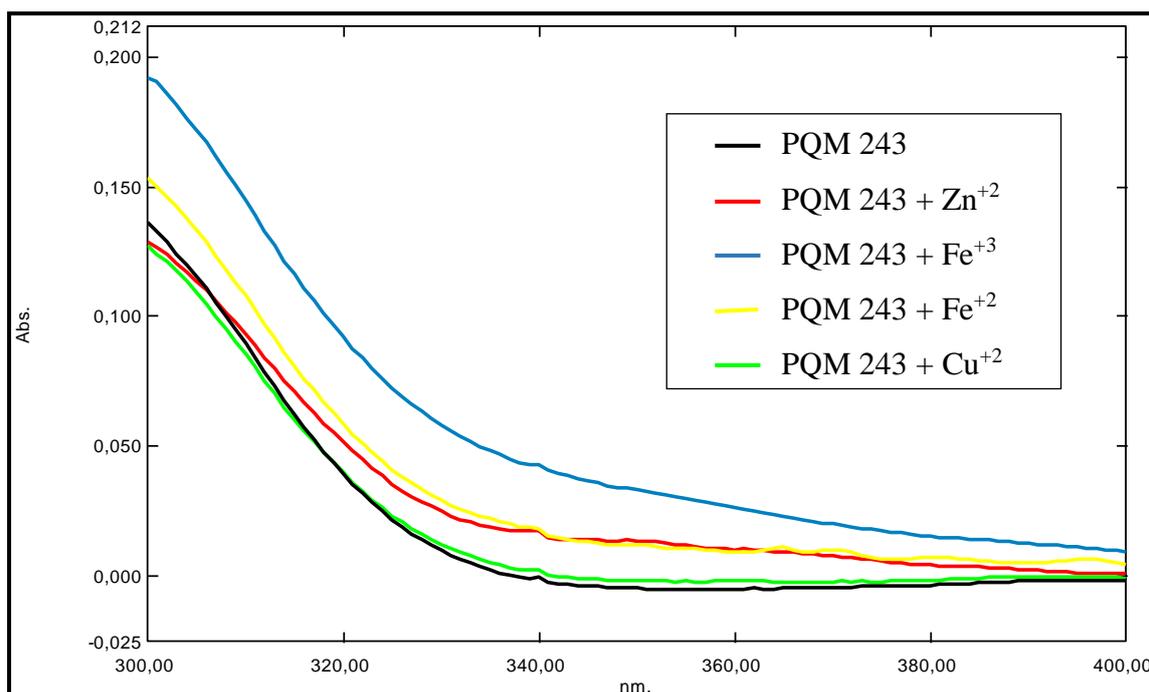


Figura 59 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-243.

Fonte: Do Autor

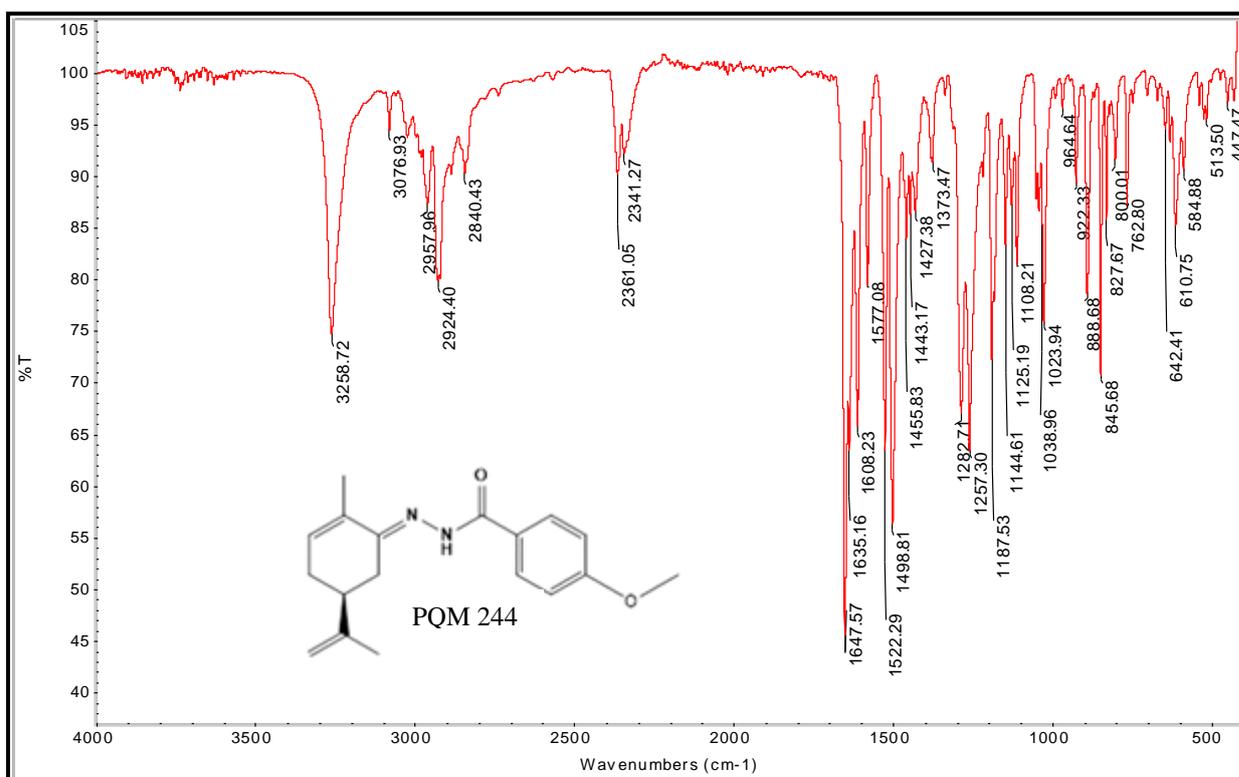


Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-244 (46) (ATR).

Fonte: Do Autor.

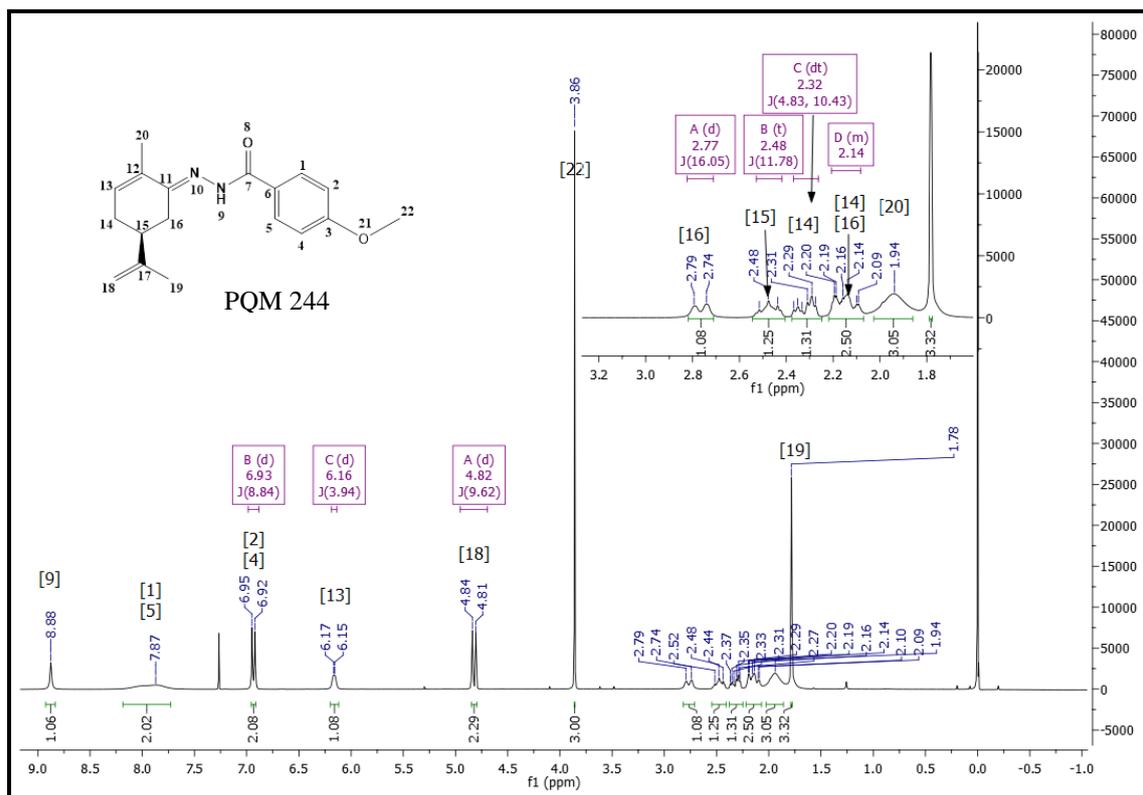


Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-244 (**46**).
Fonte: Do Autor.

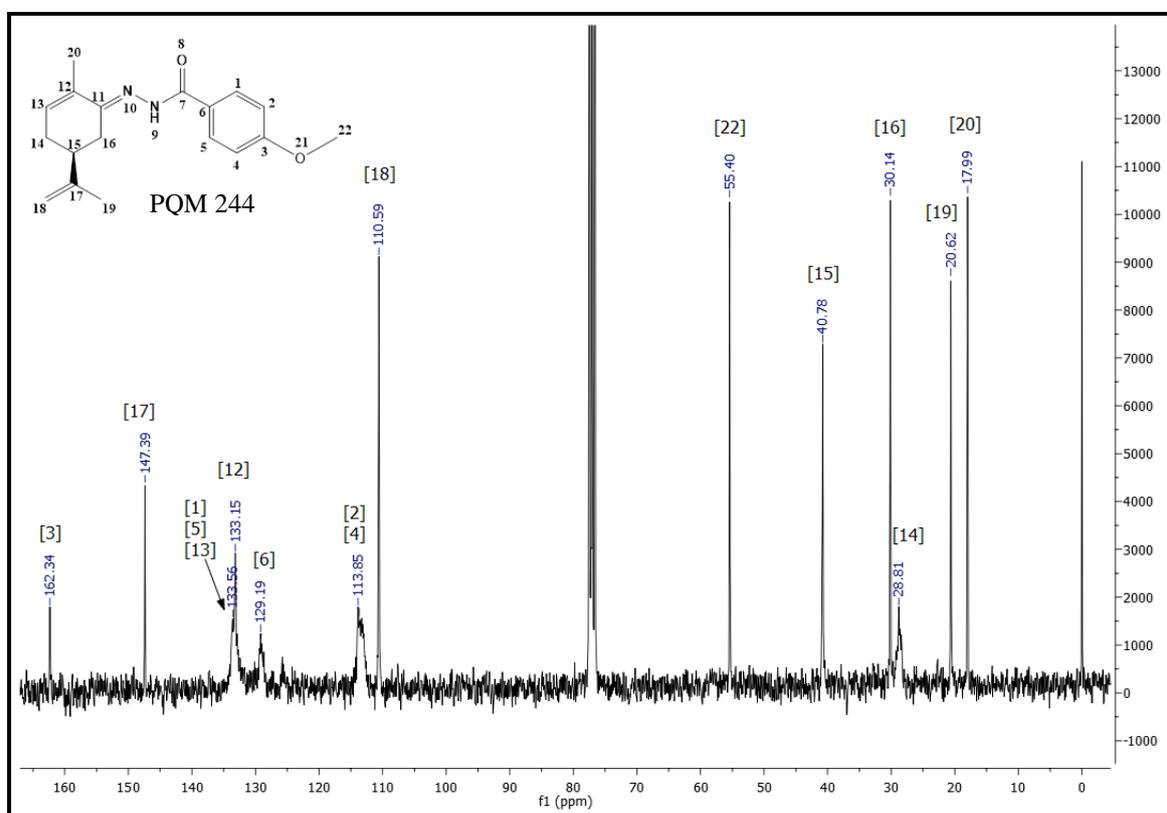


Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-244 (**46**).
Fonte: Do Autor.

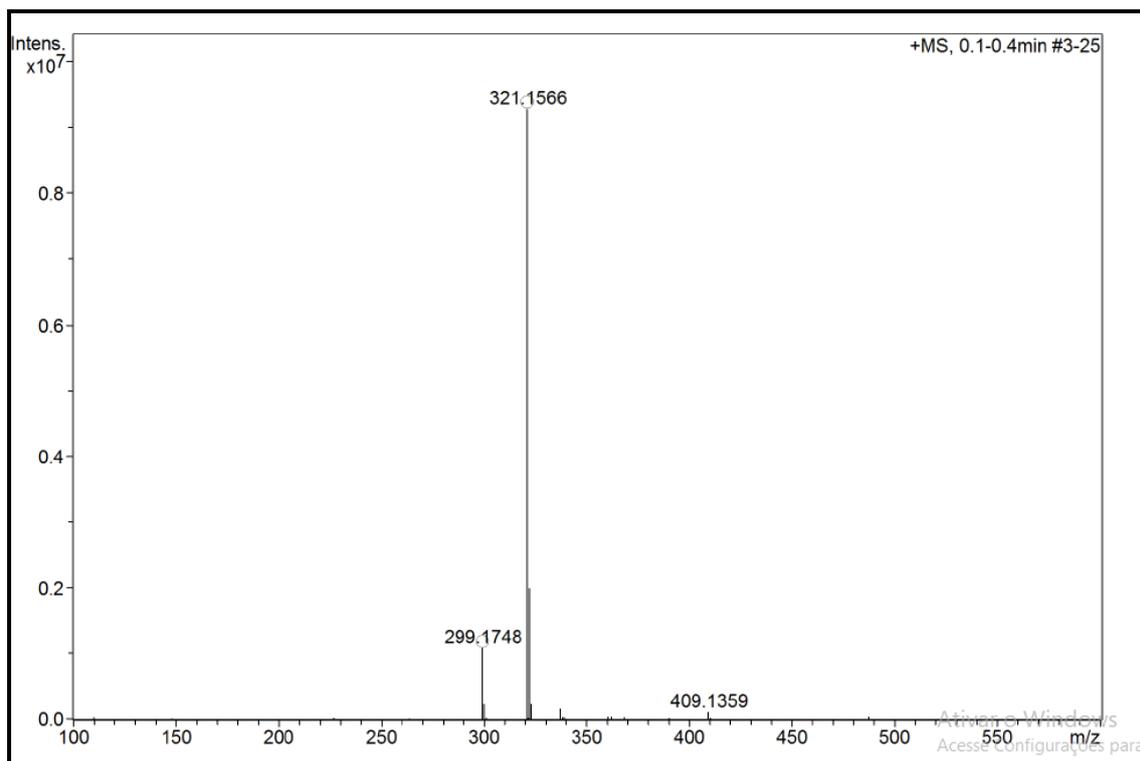


Figura 63 - Espectro de Massas (*ESI*) do composto PQM-244.

Fonte: Do Autor.

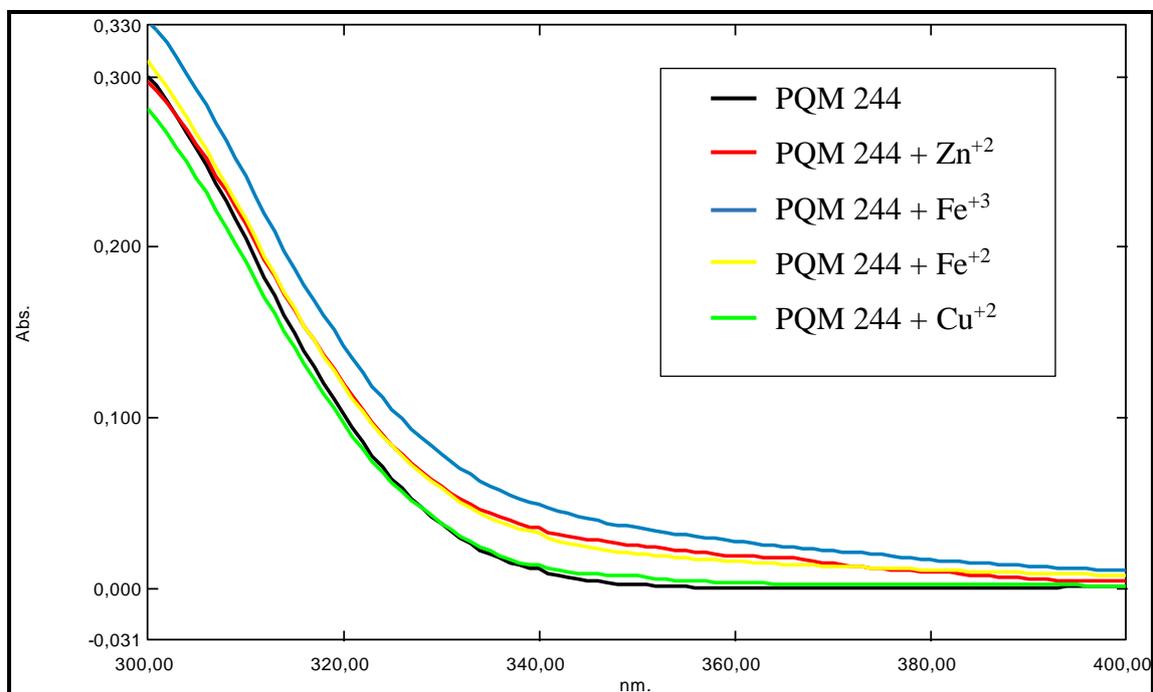


Figura 64 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-244.

Fonte: Do Autor

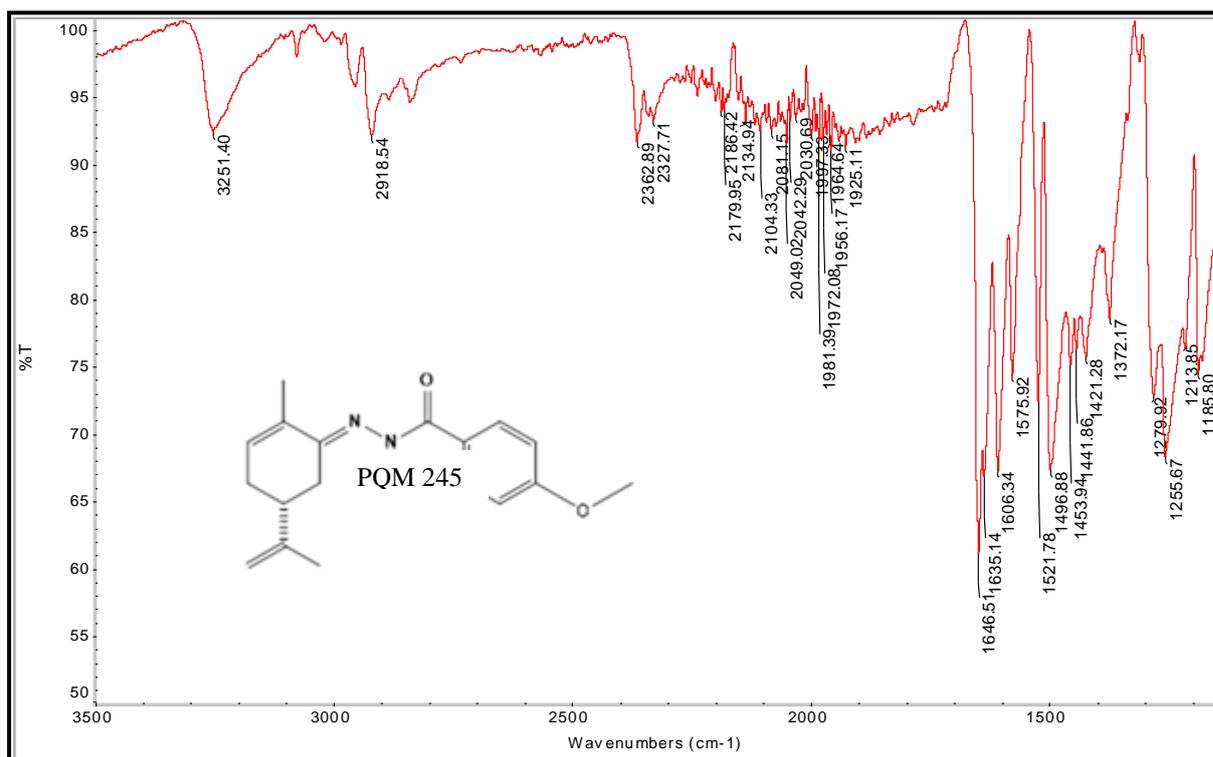


Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-245 (47) (ATR)

Fonte: Do Autor.

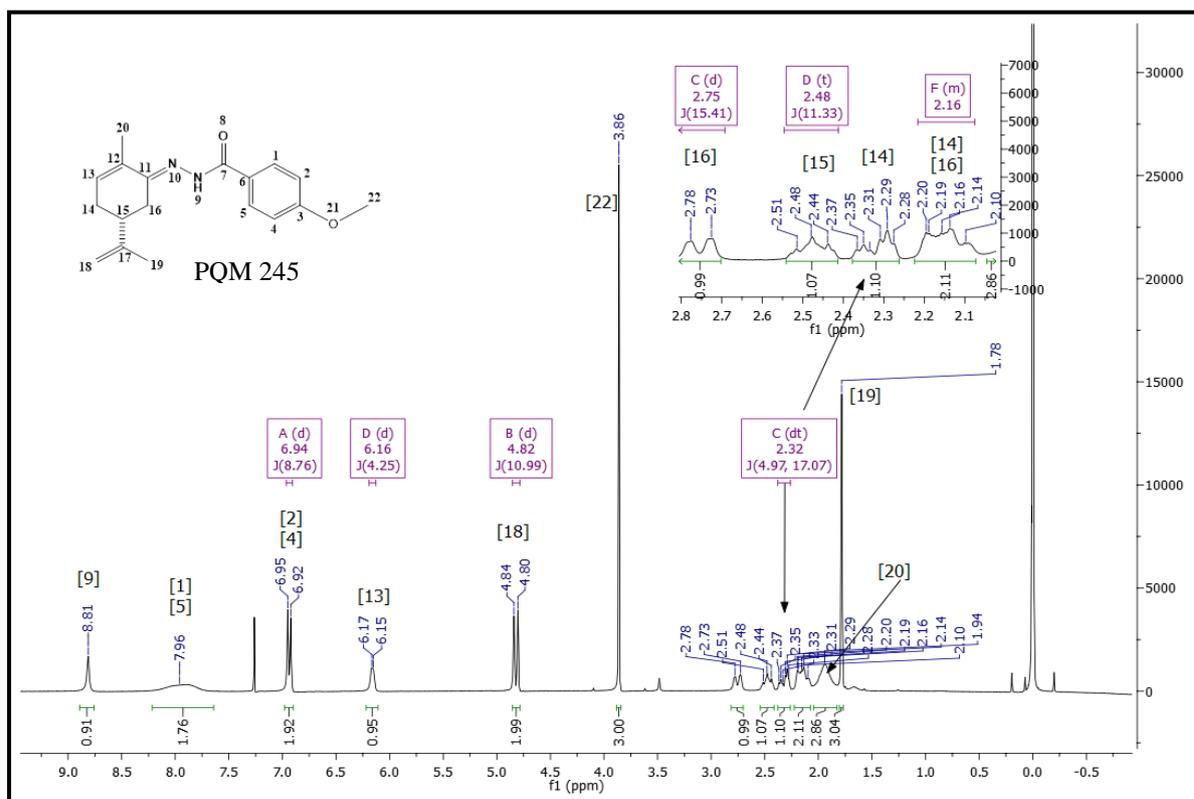


Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-245 (47)

Fonte: Do Autor.

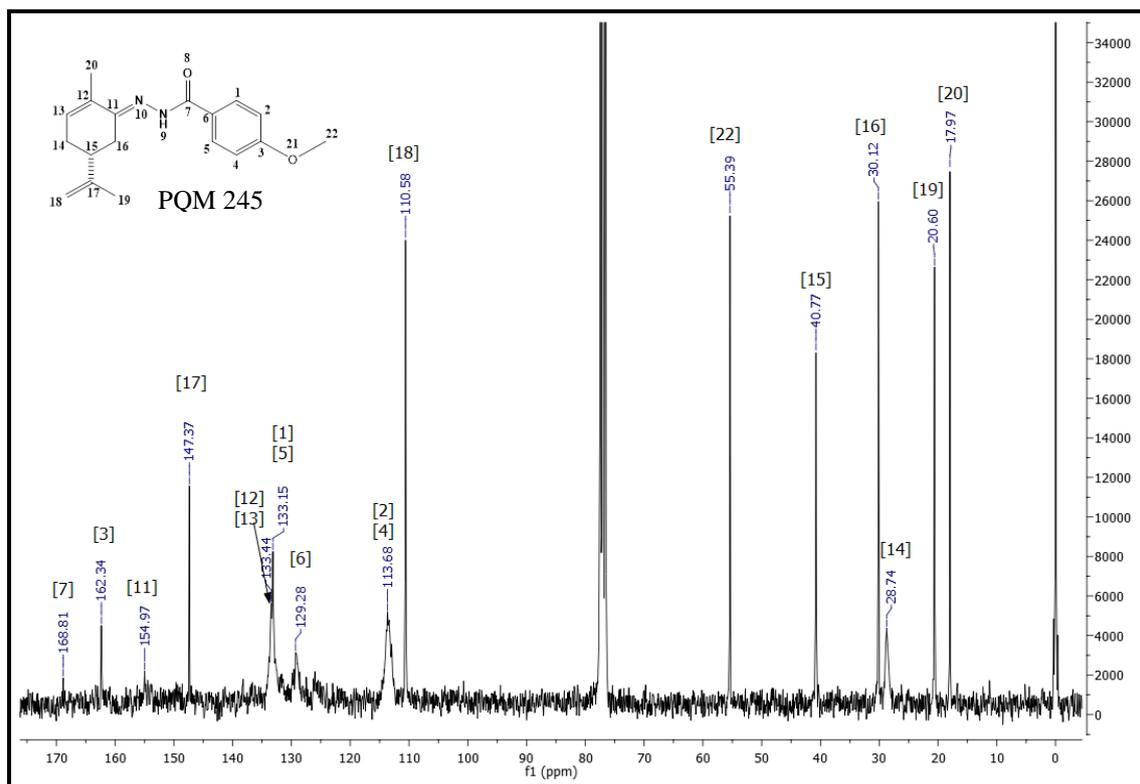


Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-245 (47)

Fonte: Do Autor.

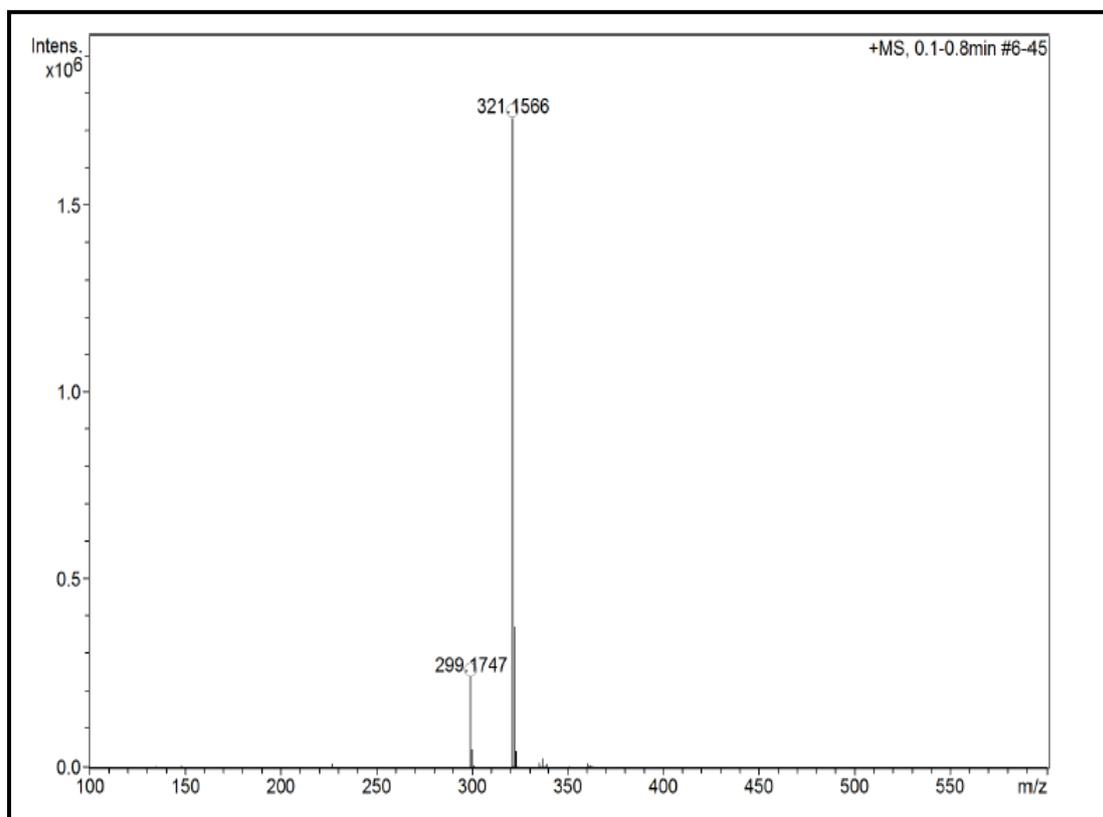


Figura 68 - Espectro de Massas (ESI) do composto PQM-245

Fonte: Do Autor

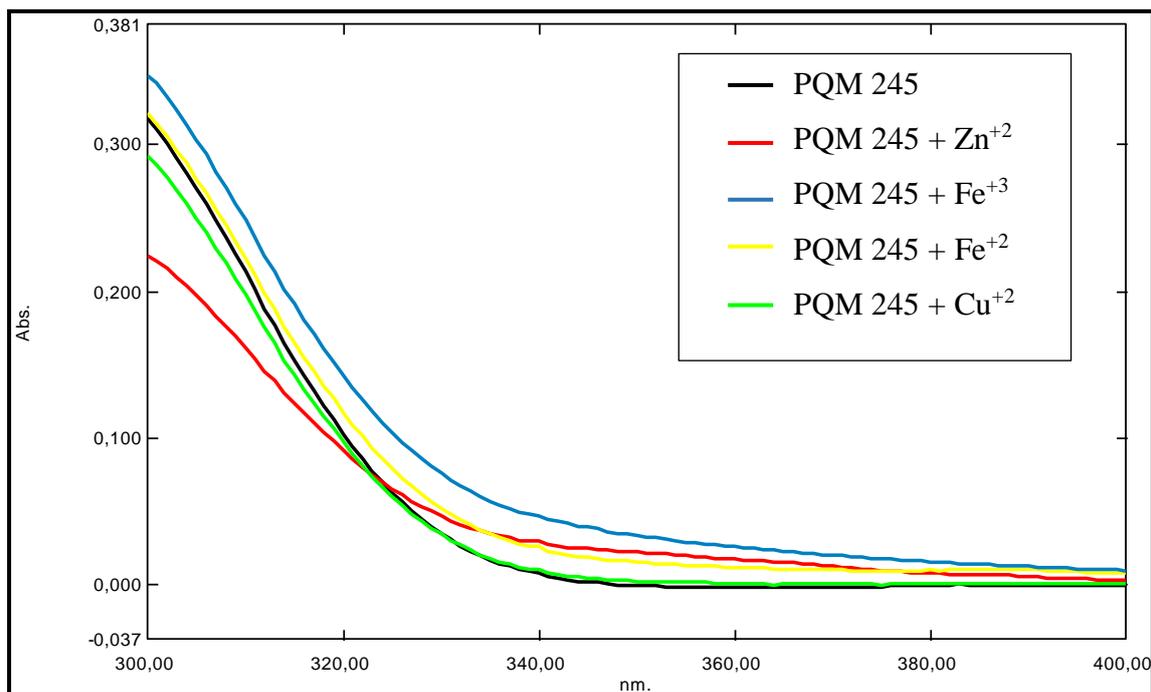


Figura 69 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-245 (**47**).

Fonte: Do Autor.

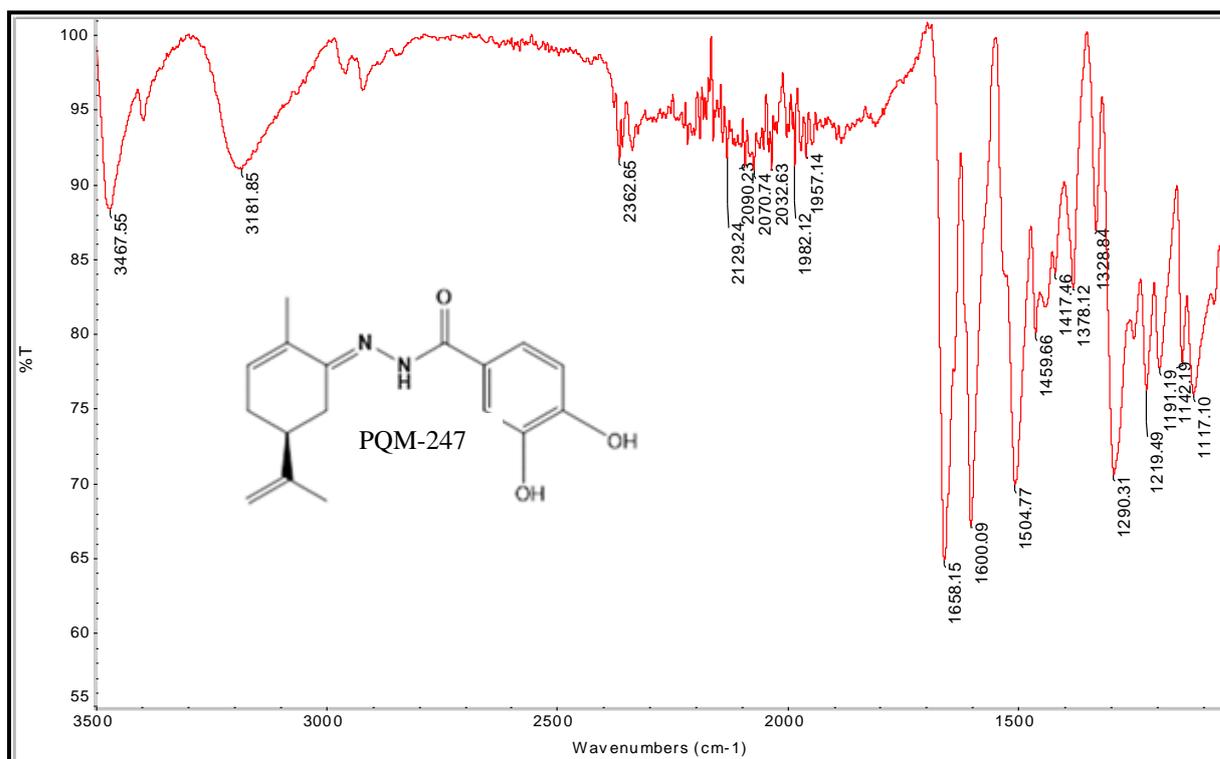


Figura 70 - Espectro de Infravermelho do composto PQM-247 (**48**) (ATR).

Fonte: Do Autor.

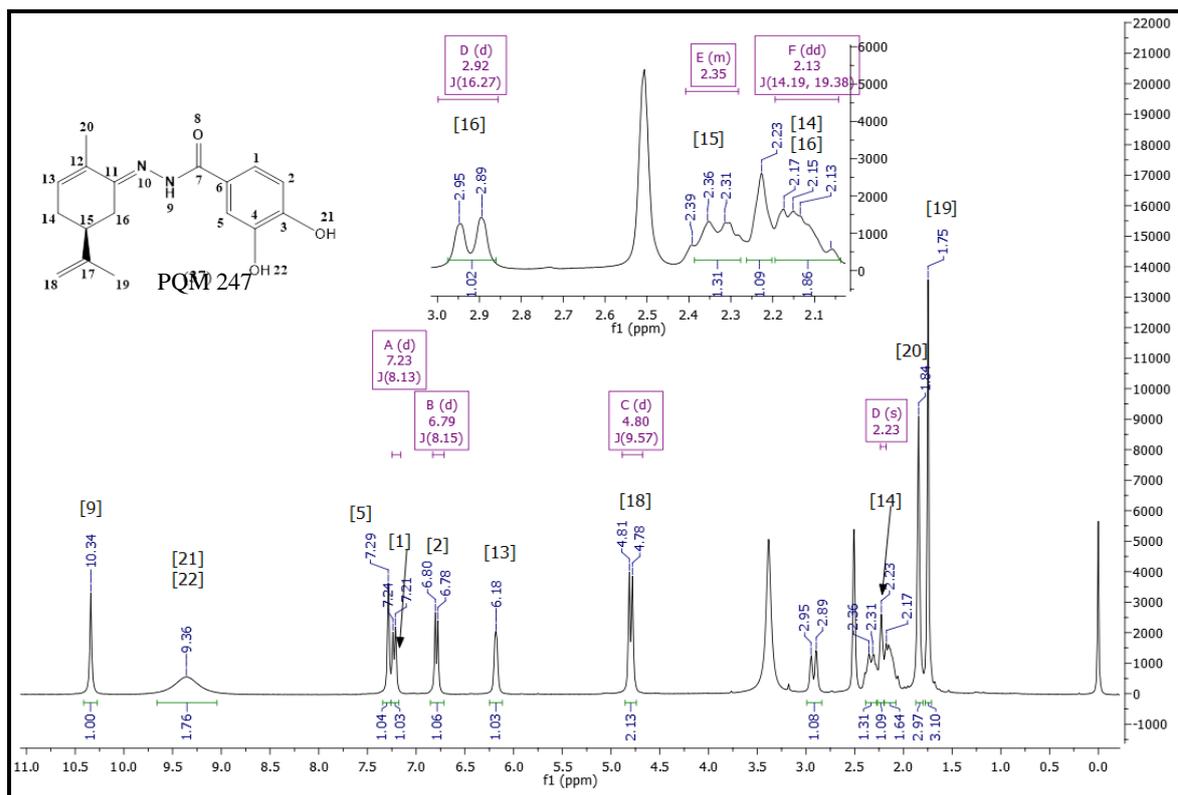


Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-247 (**48**).
 Fonte: Do Autor.

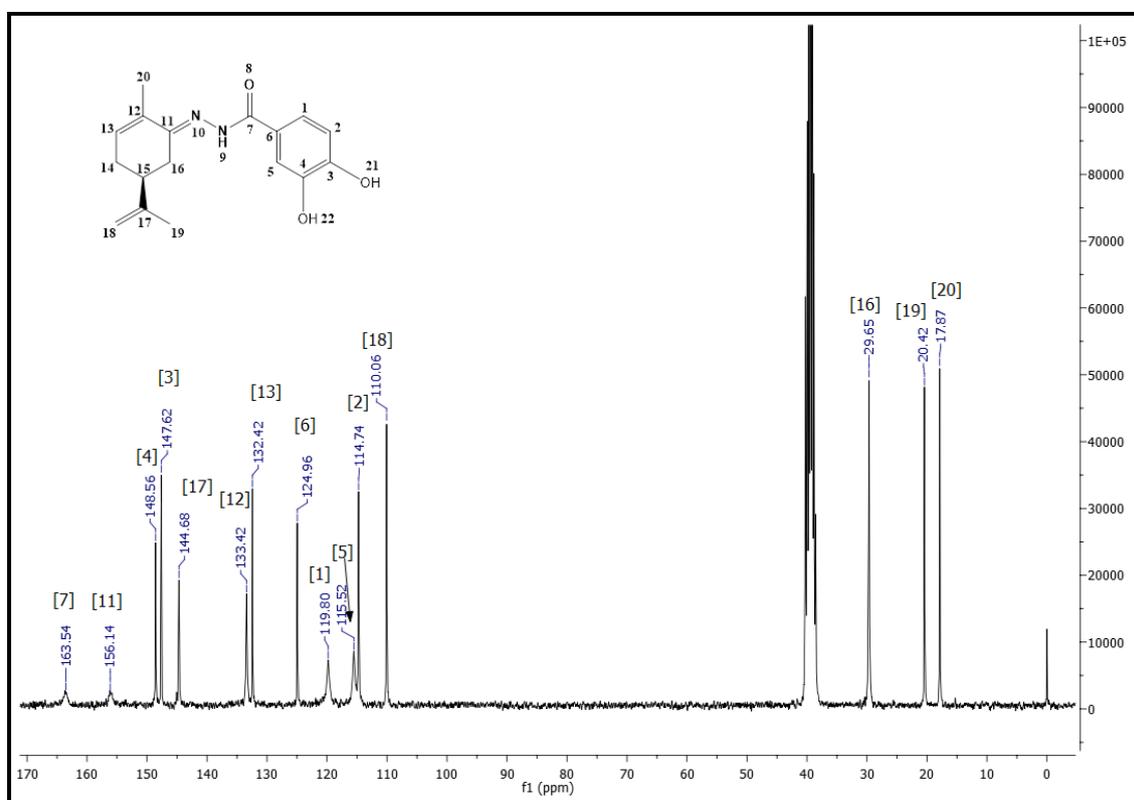


Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-247 (**48**).
 Fonte: Do Autor

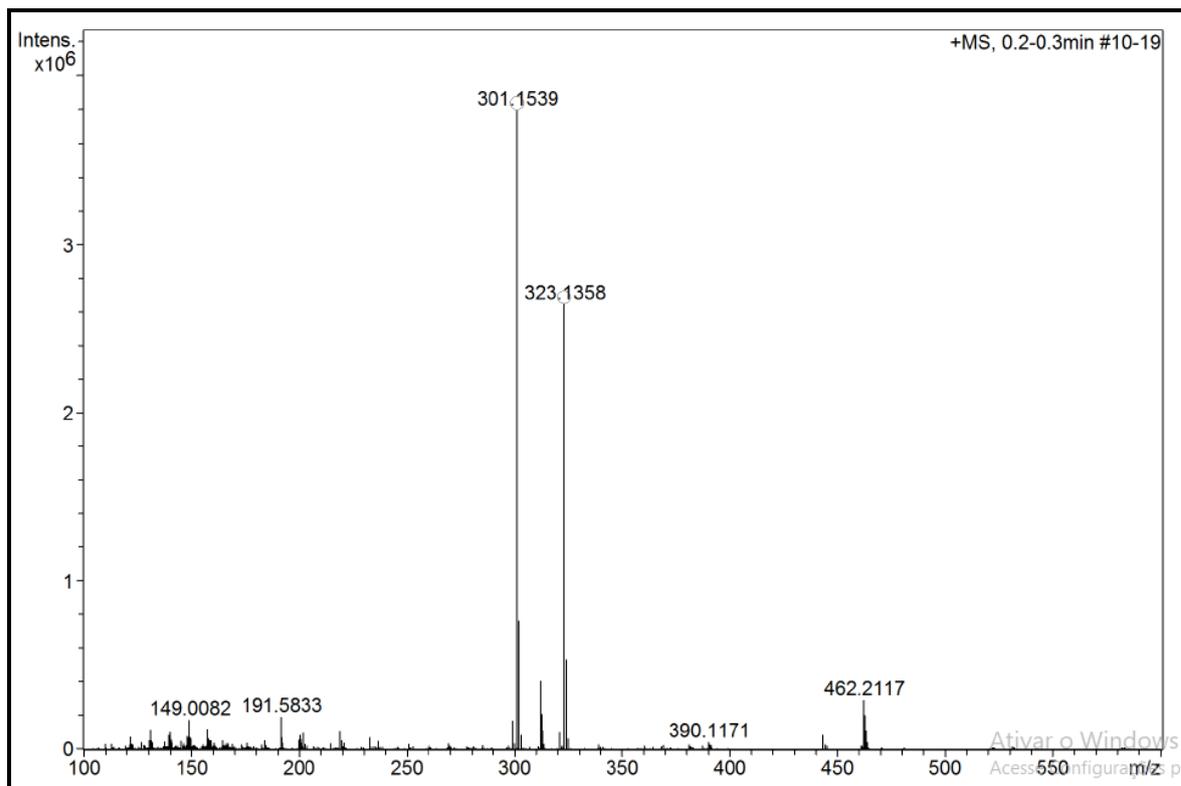


Figura 73: Espectro de Massas (ESI) do composto PQM-247.

Fonte: Do Autor

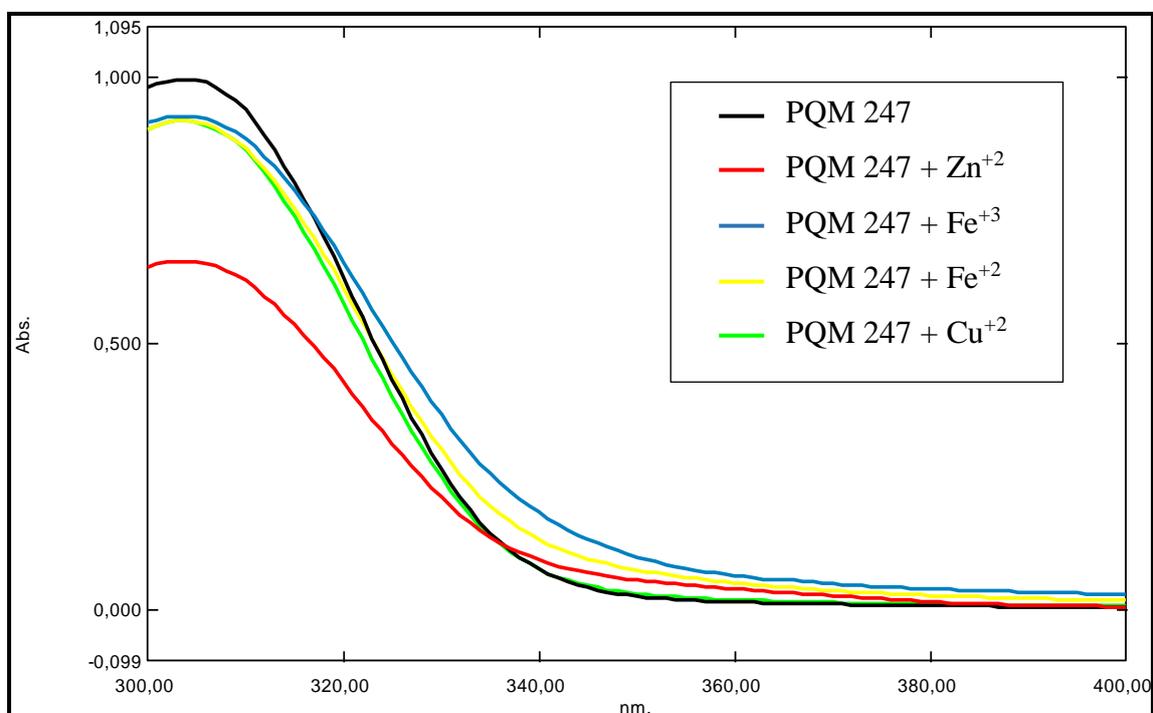


Figura 74: Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-247 (48).

Fonte: Do Autor

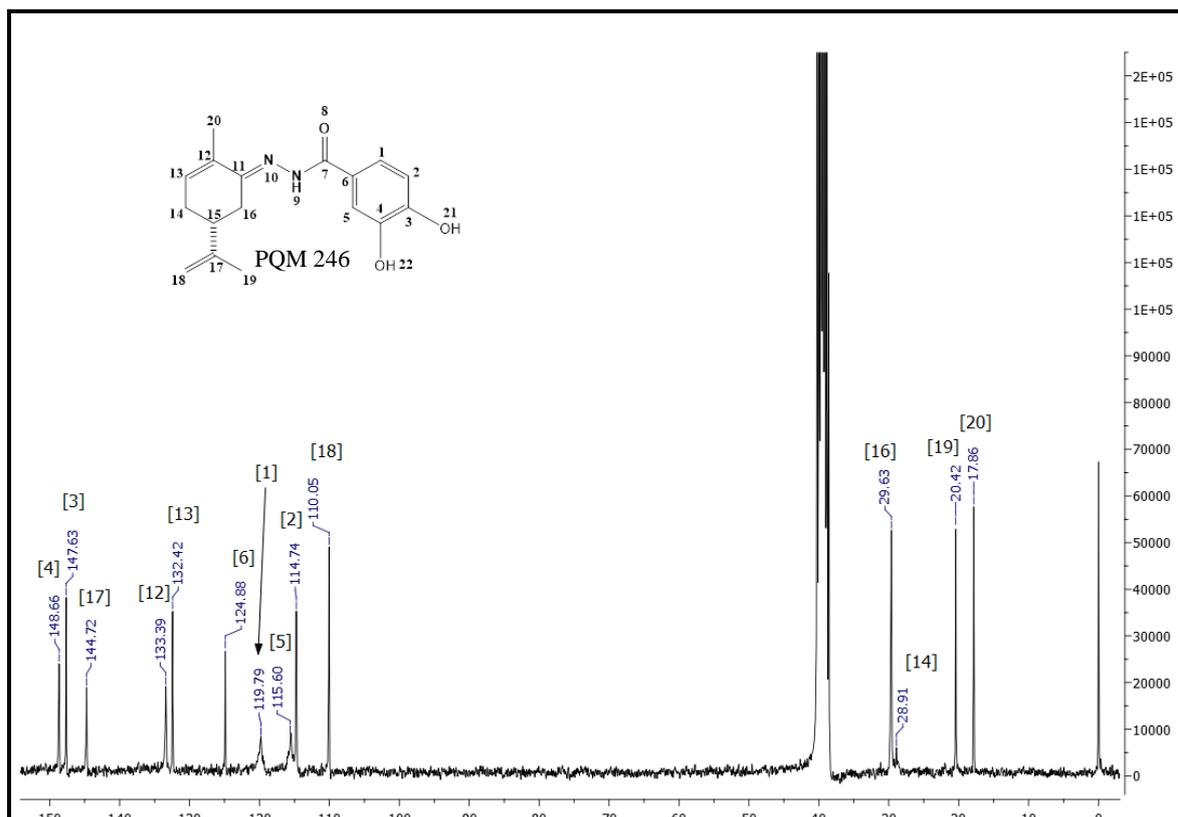


Figura 77 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-246 (49).

Fonte: Do Autor

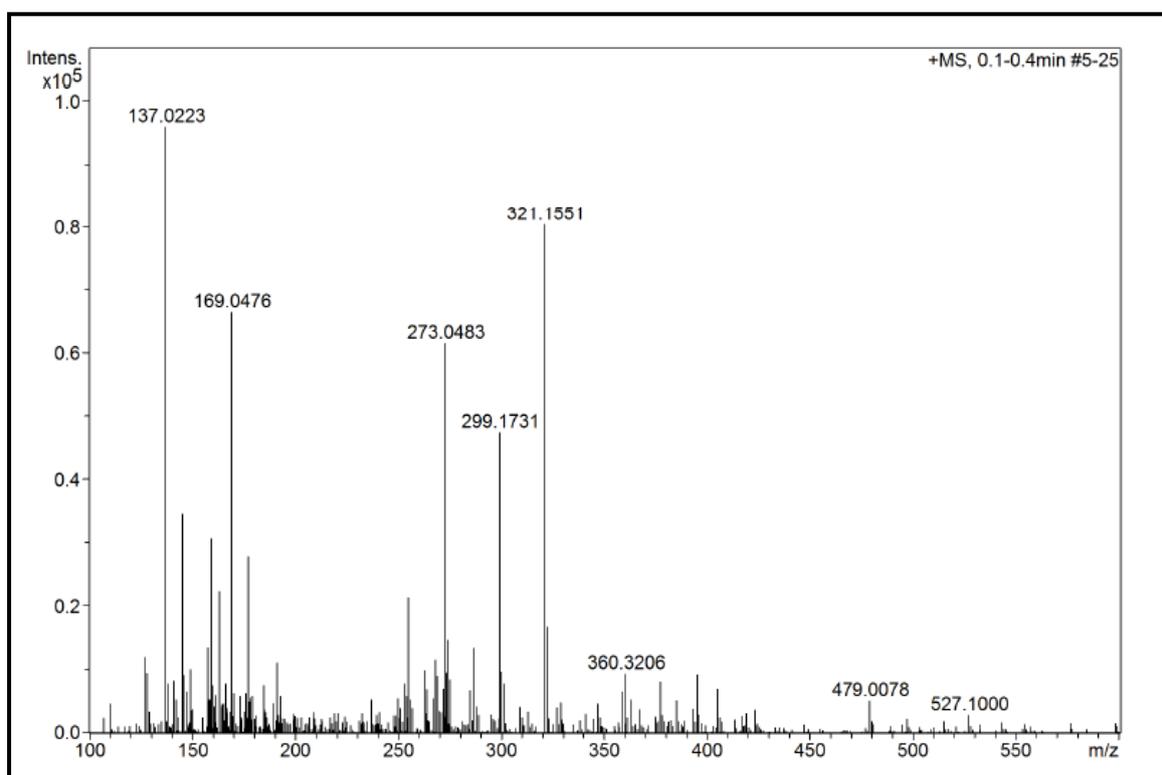


Figura 78: Espectro de Massas (ESI) do composto PQM-246.

Fonte: Do Autor

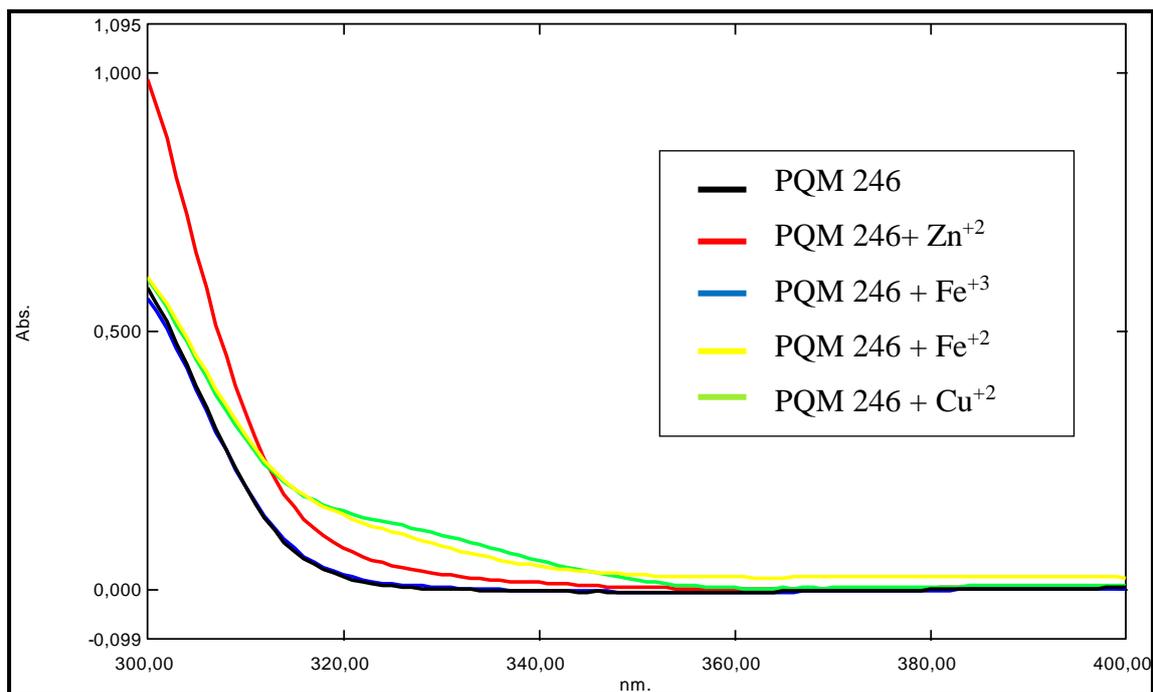


Figura 79 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-246 (**49**).

Fonte: Do Autor

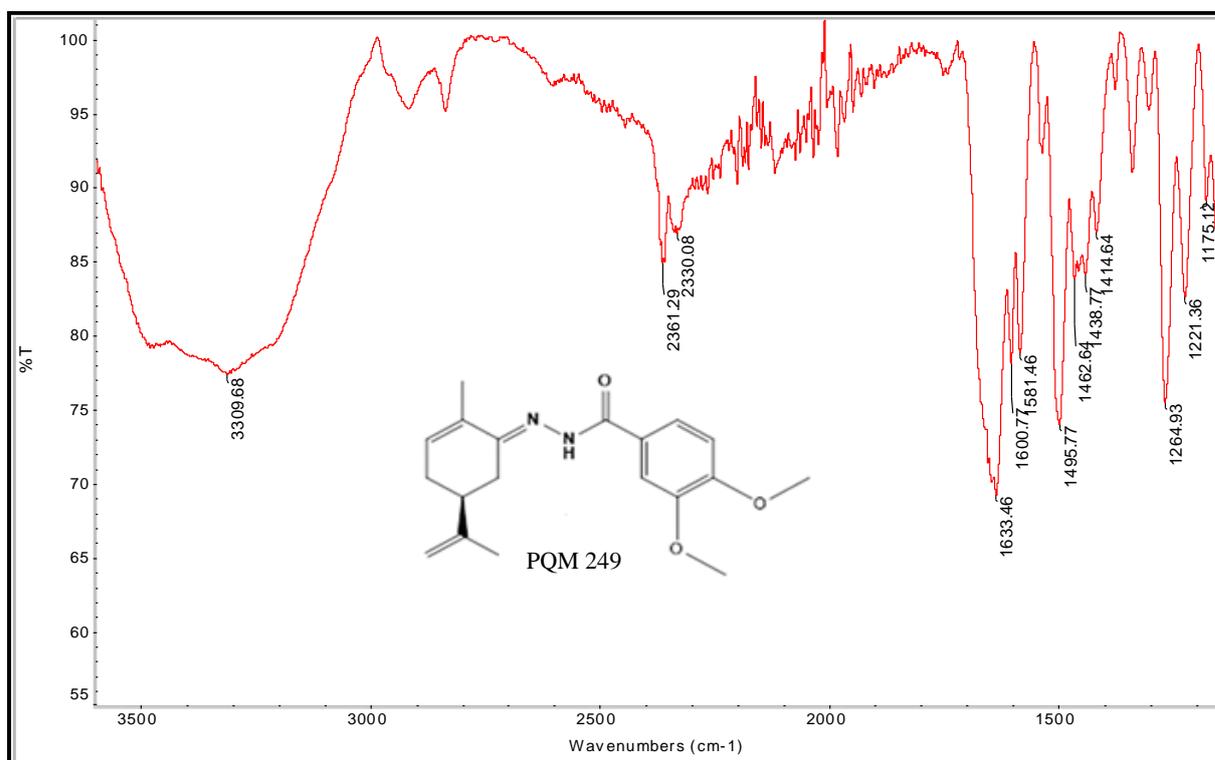


Figura 80 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-249 (**50**) (ATR).

Fonte: Do Autor.

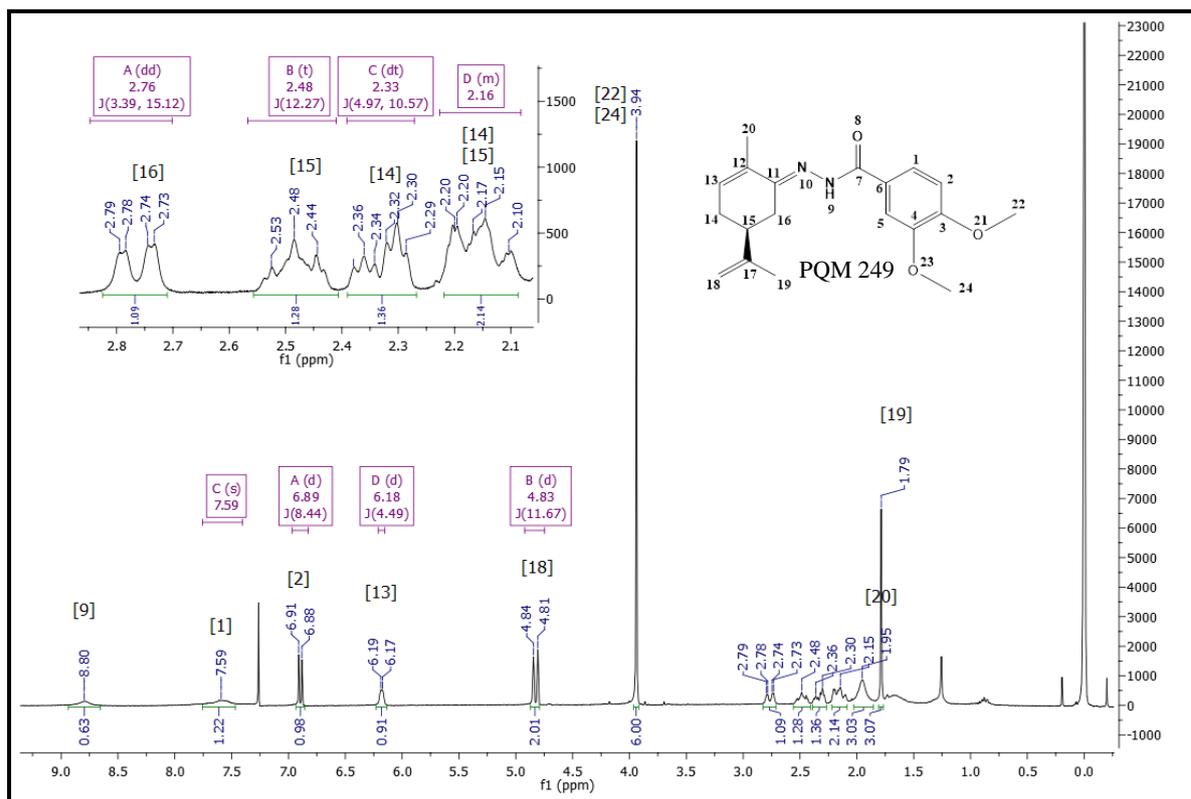


Figura 81 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto PQM-249 (**50**).

Fonte: Do Autor.

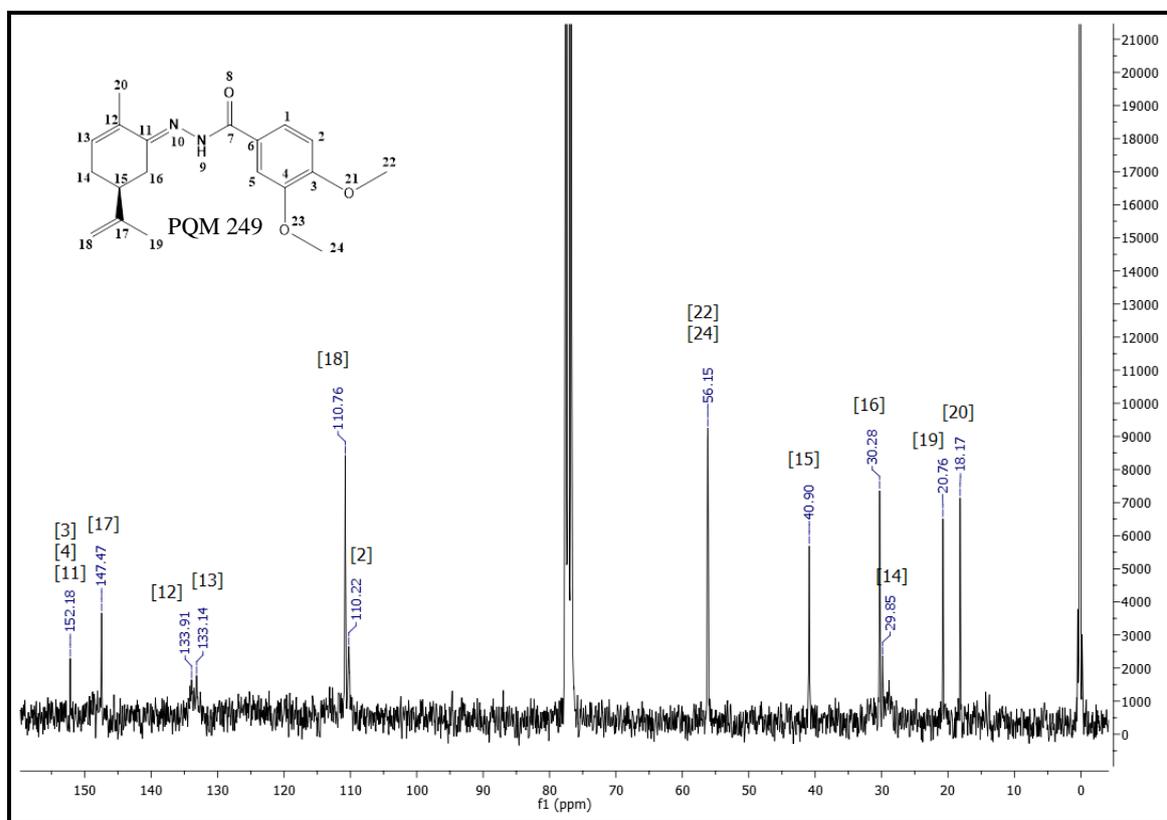


Figura 82 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto PQM-249 (**50**).

Fonte: Do Autor.

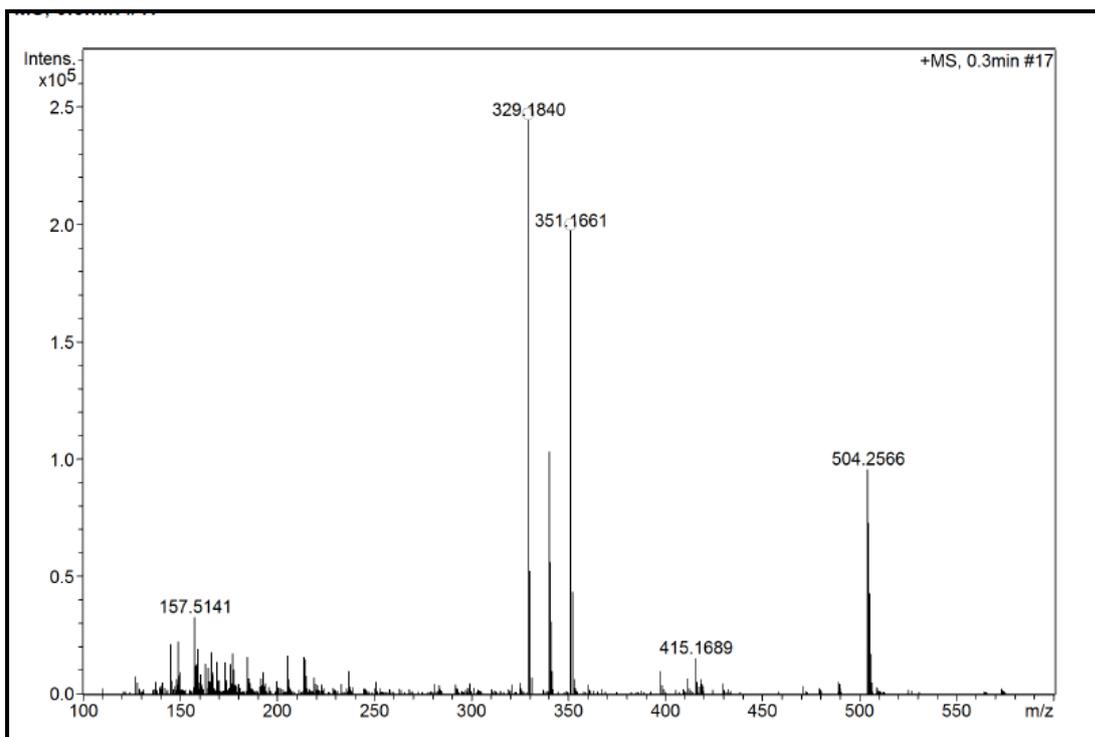


Figura 83 - Espectro de Massas (*ESI*) do composto PQM-249.

Fonte: Do Autor.

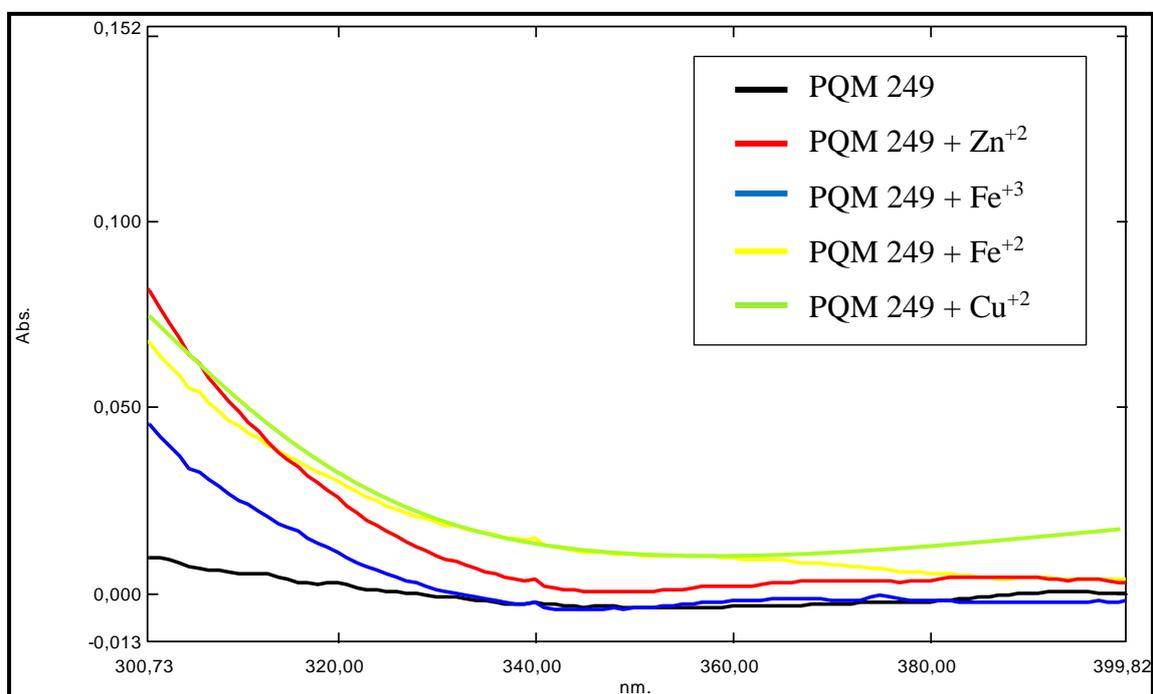


Figura 84 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-249 (**50**).

Fonte: Do Autor.

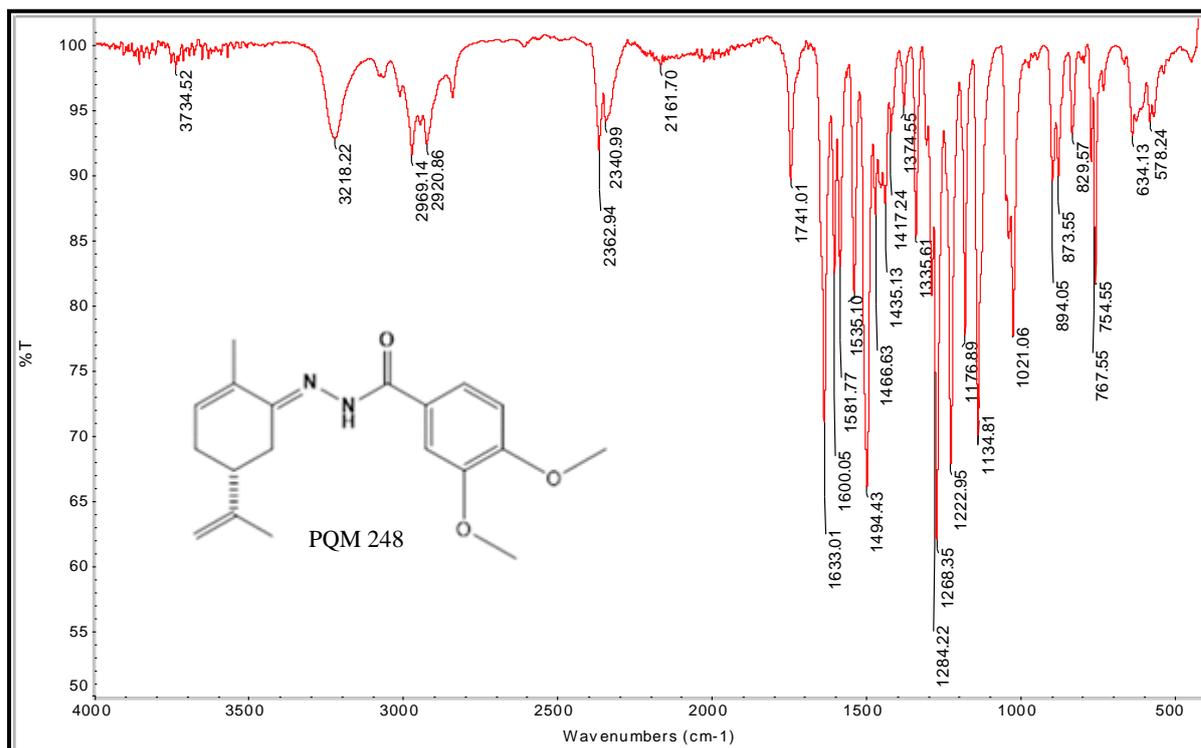


Figura 85 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-248 (51) (ATR).

Fonte: Do Autor.

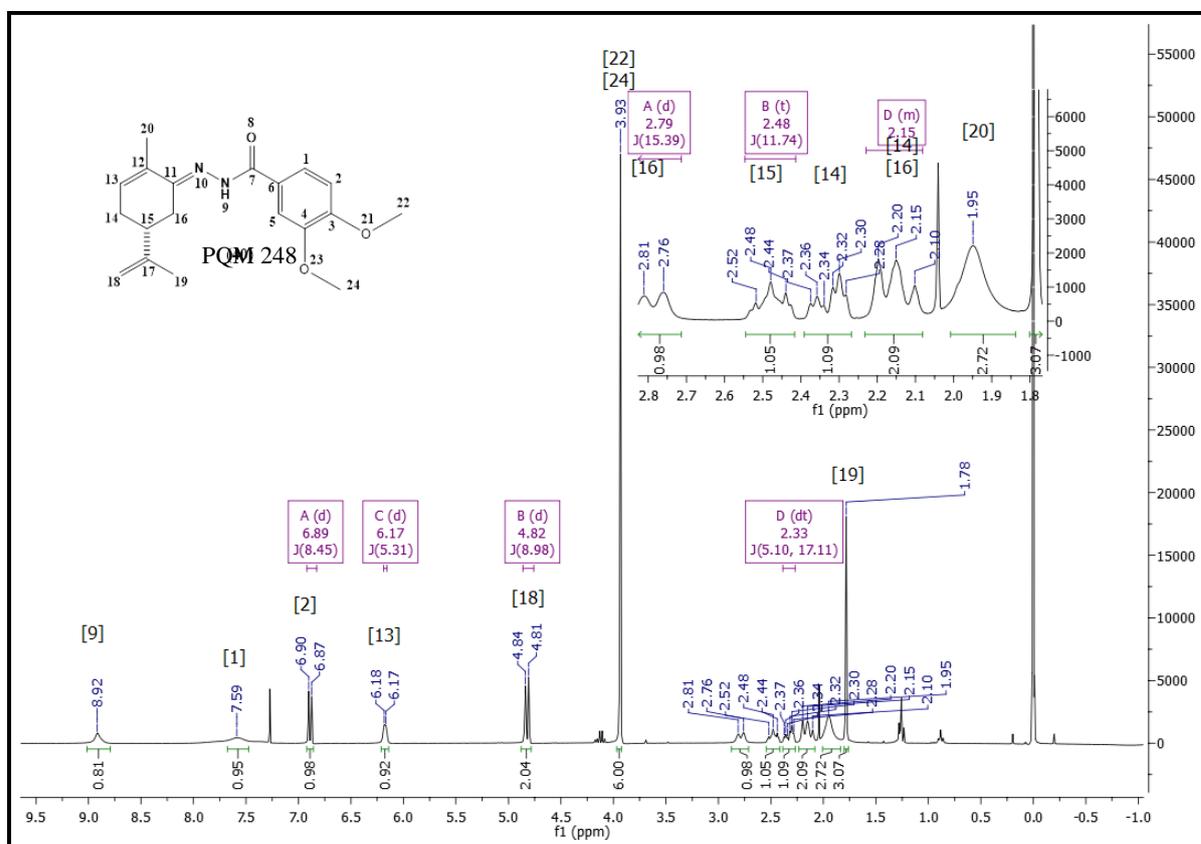


Figura 86 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto PQM-248 (51).

Fonte: Do Autor.

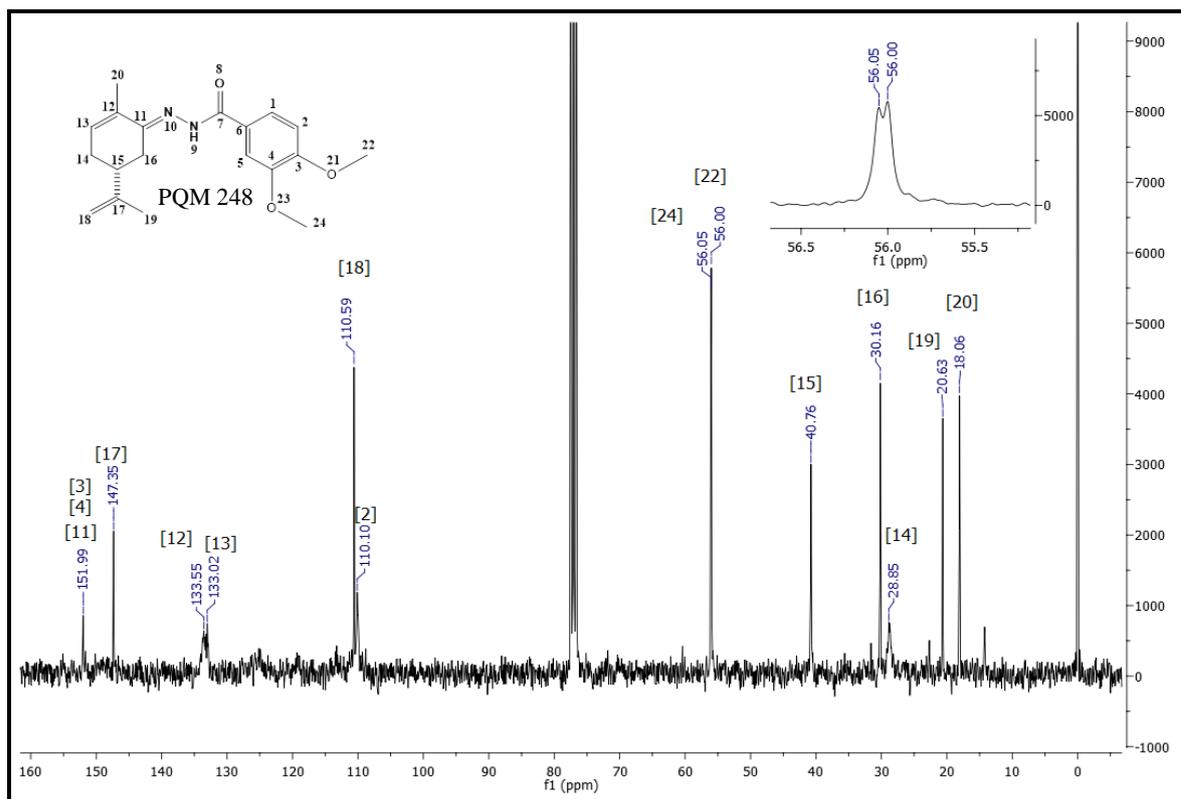


Figura 87 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM-248 (51)

Fonte: Do Autor.

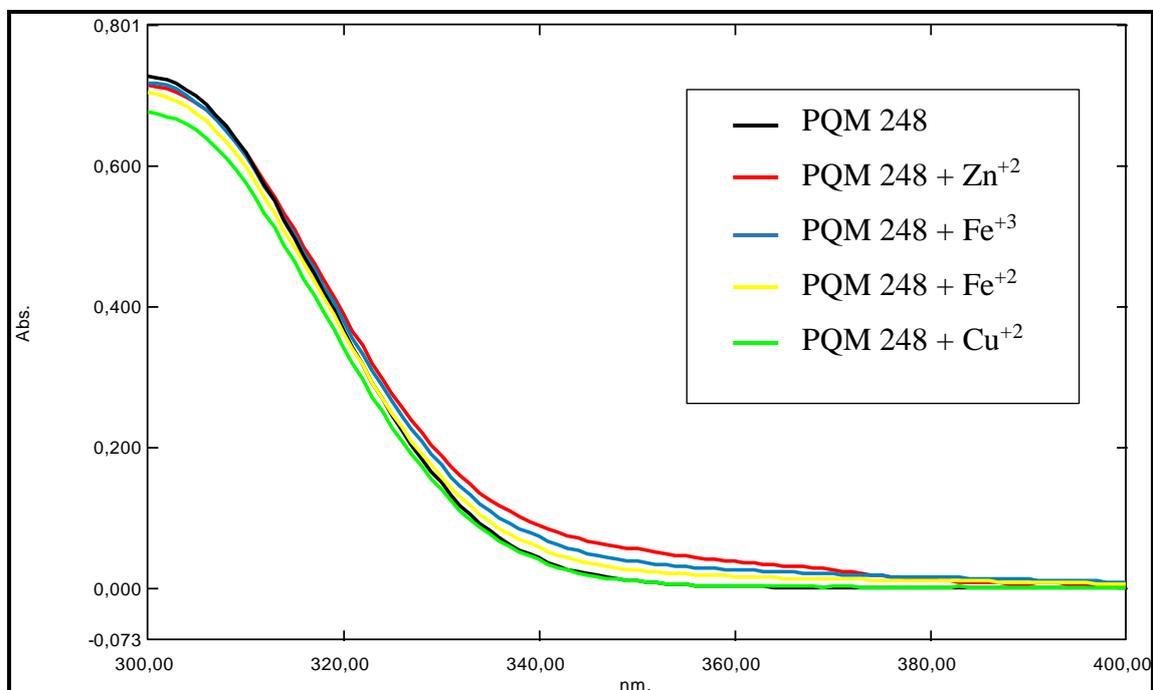


Figura 88 - Perfil gráfico da complexação metal-composto da substância PQM-248 (51).

Fonte: Do Autor.