

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

MIRELLA ANDRADE SILVA

**Planejamento, síntese, biotransformação e avaliação
farmacológica de novos candidatos a protótipos de
fármacos antipsicóticos.**

Goiânia

2010

MIRELLA ANDRADE SILVA

Planejamento, síntese, biotransformação e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Menegatti
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira
Goiânia

2010

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela vida e pela chance de poder aprimorar meus conhecimentos.
- Aos meus pais (Elzimir e José Maurício) e meu irmão (Vitor) pelo amor, ensinamento e apoio, e por acreditarem que eu conseguiria realizar esse sonho.
- Ao Douglas, meu namorado, amigo, companheiro, pela paciência, pelo carinho.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti pela orientação, pela oportunidade e pelos ensinamentos e discussões.
- À Prof^a. Dr^a Valéria de Oliveira pela co-orientação e pelo apoio.
- Ao Prof. Dr. Luciano do IQ da UFG pela realização dos espectros de RMN de ^1H e de HMBC e HMQC.
- À banca pela presença e pelas sugestões.
- Aos técnicos do LCQM por cederem o aparelho de infravermelho para realização dos espectros de IR.
- Aos colegas do LaBioCon (Kelly, Emmanuel, Keyla e Vinicius) e do LQFM (Carlos, Karinna, Patrícia, Ana Emília, Thaís, Adriane).
- As minhas amigas Kamilla e Angela, por mesmo de longe, fazerem parte da minha felicidade.
- A minha colega e amiga Adriane da Silveira Gomes, pelas lições, apoio e momentos de descontração e concentração no LaBioCon.
- A minha colega de mestrado, Laura Mairink, pelo carinho, companheirismo, força e amizade em todos os momentos.
- Aos meus colegas mestres Fabiula Ines Martins, Francislene Lavor Batista, Lênis Medeiros e Marcelo do Nascimento Gomes por terem feito parte da minha vida acadêmica e pessoal.
- A Fernanda, secretária do Programa de Pós-graduação pelo apoio incondicional nestes dois anos.
- A estagiária Juliana pela ajuda nos experimentos.
- A CAPES pelo apoio financeiro.

“O débil, acovardado, indeciso e servil não conhece, nem pode conhecer o generoso impulso que guia aquele que confia em si mesmo, e cujo prazer não é de ter conseguido a vitória, se não de sentir capaz de conquistá-la”.

William Shakespeare

RESUMO

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos descreveremos neste trabalho o planejamento de novos derivados *N*-fenilpiperazínicos (**44**) e (**45**), originalmente desenhados a partir da clozapina (**27**) e do LASSBio 579 (**40**) que apresenta perfil antagonista de receptores dopaminérgicos D₂. O composto 1-(4-nitrofenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-il)metil)piperazina (**44**) foi submetido ao ensaio farmacológico *in vitro* em cérebro de ratos visando avaliar a atividade de antagonismo dos receptores dopaminérgicos D₂ e serotoninérgicos 5-HT_{2A} e 5-HT_{1A}. Paralelamente ao trabalho sintético e farmacológico foram realizados estudos de bioconversão utilizando fungos filamentosos e obtivemos número de metabólitos em quantidade inferior àqueles obtidos pela bioconversão dos compostos LASSBio 579 (**40**). Foram isolados e caracterizados 4-(4-((4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)metil)-1H-pirazol-1-il)fenol (**72**) o metabólito 4-(4-((4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)metil)-1H-pirazol-1-il)fenol (**75**) obtidos através da hidroxilação no anel aromático A dos compostos (**44**) e (**45**). Concluímos que a proteção do anel D contribuiu para diminuição do metabolismo, comprovado pelo menor número de metabólitos produzidos pela bioconversão dos candidatos a protótipos de fármacos (**44**) e (**45**). Portanto, o planejamento estrutural e a metodologia sintética empregada no mesmo foram validados através da caracterização estrutural, porém os mesmos não apresentaram afinidade pelos receptores dopaminérgicos (D₂) e serotoninérgicos (5-HT_{2A} e 5-HT_{1A}) frente aos antipsicóticos atípicos de referência.

Palavras – chave: Esquizofrenia, antipsicóticos, *N*-fenilpiperazínicos

ABSTRACT

In the scope of a research program that aim the design, synthesis and pharmacological evaluation of new lead-compounds, we will describe in this work the design of new *N*-phenylpiperazines derivatives originally designed from clozapine (**27**) and LASSBio 579 (**40**) that shows antagonist profile in dopaminergic receptors. The compound 1-(4-nitrophenyl)-4-((1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazine (**45**) was submitted to *in vitro* pharmacology assay in brain rat tissues to evaluate the inhibitory activity of D₂ dopaminergic receptors and 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} serotonergic. Besides synthetic and pharmacological works its realized biotransformation studies using filamentous fungi and resulted lower number of metabolites than previous studies of (**40**) biotransformation. Was observed a *p*-hydroxylated metabolites in the aromatic ring A of 1-(4-methoxyphenyl)-4-((1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazine (**44**) and 1-(4-nitrophenyl)-4-((1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazine (**45**) were isolated and purified. We concluded that substitution of the D ring contributes to protect from enzymatic metabolism, confirmed by lower number of produced metabolites by biotransformation of the compound (**40**) . In work, we concluded that the structural design and the synthetic methodology used was validated through structural characterization, but the compounds not show inhibitory profile of dopaminergics (D₂) and serotonergics receptors (5-HT_{2A} e 5-HT_{1A}) in front of the reference atypical antipsychotic.

Word keys: schizophrenia, phenilpiperazine, antipsycotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos	16
Figura 2 – Antipsicóticos mais vendidos no ano de 2009. quetiapina (1), olanzapina (2) e aripiprazol (3).	20
Figura 3 - Novos fármacos antipsicóticos: asenapina (4), bifeprunox (5), iloperidona (6), paliperidona (7) e risperidona (8).	20
Figura 4 – Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos.	21
Figura 5 – Estrutura química do mesilato de imatinibe (9).	22
Figura 6 - Estrutura química dos anti-histamínicos de segunda-geração fexofenadina (10), terfenadina (11), desloratadina (12) e loratadina (13).	23
Figura 7 – Estrutura química da talidomina (14).	24
Figura 8 – Áreas do cérebro mais acometidas pela doença, adaptado de www.mocoplast.com.br .	27
Figura 9 – Estrutura química: dopamina (15), anfetamina (16) e sulpirida (17).	28
Figura 10 – – Metabólitos da dopamina encontrados no cérebro de ratos tratados com (20) e (21), adaptado de Menegatti <i>et al</i> , 2004.	29
Figura 11 – Estrutura química clorpromazina (20) e haloperidol (21).	29
Figura 12 – Estrutura química da reserpina (27)	32
Figura 13 – Estrutura química da clozapina (28).	33
Figura 14 – Metabólitos produzidos a partir da biotransformação da atorvastatina (29), adaptado de Manzoni e Rollini, 2002.	36
Figura 15 - Estrutura química do ezetimibe (30).	37
Figura 16 - – Metabólitos (32) e (33) obtidos pela biotransformação da evodiamina (31) pelo fungo <i>P. janthinellum</i> , adaptado de Li <i>et al</i> , 2006.	38
Figura 17 – Principais metabólitos formados pela biotransformação do omeprazol (34) por <i>C. elegans</i> , adaptado de Pearce & Lushnikova, 2006.	39
Figura 18– Dois principais metabólitos produzidos pela biotransformação da (37). O metabólito (38) foi obtido majoritariamente por <i>C. echinulata</i> e o metabólito (39) foi obtido por biotransformação utilizando <i>M. isabelina</i> , adaptado de Lacroix <i>et al</i> , 1999.	40

Figura 19 - Estratégia para o desenvolvimento dos candidatos a protótipos de fármacos <i>N</i> -fenilpiperazínicos, adaptado de Fraga <i>et al</i> , 2009.	41
Figura 20 – Biotransformação do (40) via metabolismo <i>in vitro</i> utilizando <i>C.echinullata</i> produzindo metabólito (44), adaptado de Gomes, 2007.	42
Figura 21 - Candidatos a protótipos de fármacos (45) e (46) originalmente planejados a partir do protótipo (44).	43
Figura 22 – Processo de extração dos derivados após incubação.	54
Figura 23 – Análise retrossintética dos compostos (45) e (46)	57
Figura 24 - Mecanismo de reação de condensação para obtenção do intermediário (49), adaptado de Warren <i>et al</i> , 2001.	60
Figura 25 – Mecanismo de reação para formação do intermediário (51), adaptado de Warren <i>et al</i> ,2001.	63
Figura 26 – Mecanismo de aminação redutiva para obtenção dos compostos (45) e (46)	66
Figura 27 – Espectro de ultravioleta do composto (45).	74
Figura 28 – Espectro de ultravioleta do composto (46).	74
Figura 29 – Dados de ultravioleta produtivos finais (45) e (46) comparativamente ao composto (41).	75
Figura 30 – Rota de fragmentação proposta para o composto (45).	79
Figura 31 – Rota de fragmentação proposta para o composto (77).	81
Figura 32 – Voltamogramas cíclicos das moléculas (45) e (46) em NaCl 0,1 M, pH 7,0.	82
Figura 33 - Efeito do pH sobre os compostos (45) e (46) em NaCl, 0,1 M, 0 a 1,25 V; 100 mVs ⁻¹	83
Figura 34 - Difração de raio-X do composto (46).	84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Os quinze fármacos que mais venderam no ano de 2009, adaptado de IMSHealth, 2009. 17
- Tabela 2 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (à esquerda) e RMN de ^{13}C (à direita) dos compostos **(45)** e **(46)** 72
- Tabela 3 – Metabólitos identificados por CCD para os compostos **(45)** e **(46)** utilizando diversas cepas 77
- Tabela 4: CI_{50} nM para inibição de receptores comparativamente aos antipsicóticos atípicos de referência 86

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Mercado farmacêutico global dividido em regiões, adaptado de IMSHealth, 2009. 16
- Gráfico 2: Medicamentos em desenvolvimento para distúrbios mentais, adaptado PhRMA, 2008 17
- Gráfico 3 – Comparativo entre metabólitos obtidos no LaBioCon por bioconversão utilizando diferentes cepas para os compostos **(41)**, **(45)** e **(46)** 77
- Gráfico 4: Ensaio de ligação do composto LQFM 004 **(45)** em diferentes concentrações frente aos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e D₂-like 85

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 – Espectro de RMN de ^1H do composto (46)	68
Espectro 2 – Expansão da região dos aromáticos do espectro de RMN de ^1H do composto (46)	68
Espectro 3 – Expansão da região dos alifáticos do espectro de RMN de ^1H do composto (46)	69
Espectro 4 – Espectro de RMN de ^1H do composto (45)	70
Espectro 5 – Expansão da região dos aromáticos do espectro de RMN de ^1H do composto (45)	70
Espectro 6 – Expansão da região dos alifáticos do espectro de RMN de ^1H do composto (45).	71
Espectro 7 – Espectro de massas mostrando o pico do íon molecular do composto (45) formando um aduto com o amônio.	78
Espectro 8 – Espectro de massas do composto (74) mostrando os picos dos íons base e o pico do íon molecular.	79
Espectro 9 – Espectro de massas do composto (77) obtido através da biotransformação do composto (46).	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ca.	Cerca de
SNC	Sistema Nervoso Central
ASG	Antipsicóticos de Segunda Geração
APG	Antipsicóticos de Primeira Geração
FDA	Food Drug and Administration
SAR	Relação Estrutura Atividade
HTS	High-throughput screening
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
COMT	Catecol-O-metiltransferase
MAO	Monoamino oxidase
SUS	Sistema Único de Saúde
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substância Bioativas - UFRJ
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal - UFG
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão - UFG
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ESPECTROS

LISTA DE ABREVIATURAS

GLOSSÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1. Mercado farmacêutico global	15
2.2 Protótipos antipsicóticos em desenvolvimento	18
2.3 Planejamento de novos fármacos	19
2.4 Histórico da esquizofrenia	24
2.5 Fisiopatologia da doença	26
2.6 Impacto sócio-econômico	30
2.7 Evolução do tratamento	31
2.8 Estudos de metabolismo	33
2.8.1 Estudo do metabolismo na descoberta de novos fármacos	35
2.9 Planejamento do composto LASSBIO 579	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Parte experimental	45
4.2 Metodologia sintética	45
4.2.1 Procedimento para a síntese de fenil-1 <i>H</i> -pirazol (49) (FINAR e HURLOCK, 1957; FREITAS <i>et al</i> , 1991).	47
4.2.2 Procedimento para a formilação de 1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbaldeído (51) (BLAZEVIC <i>et al</i> , 1979)	48

4.2.3 Procedimento para a síntese do 1-(4-nitrofenil)-4-((1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)piperazina (45).	49
4.2.4 Procedimento para a síntese do 1-(4-metoxifenil)-4-((1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)piperazina (46)	50
4.3 Bioconversão	51
4.3.1 Técnica cromatográfica	51
4.3.2 Técnicas microbiológicas	51
4.3.2.1 Microrganismos	51
4.3.3. Meio de cultura	52
4.3.4. Manutenção das cepas	52
4.3.5. Triagem	53
4.3.6 Incubação em escala Semipreparativa	53
4.3.6.1. Filtração e extração	54
4.3.6.2. Purificação e isolamento	55
4.4. Ensaio eletroquímico	55
4.5 Ensaio farmacológico	56
4.5.1. Ensaio de binding	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 – Análise retrossintética	57
5.1.1 – Intermediário chave 1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol (49)	57
5.1.2 Intermediário chave 1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbaldeído (51)	60
5.1.3 Aminoação redutiva: etapa chave da rota sintética	63
5.2 Elucidação estrutural	66
5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	66
5.2.2 Ultravioleta (UV)	73
5.3 Bioconversão	75
5.3.1 Composição dos meios de cultura	75
5.3.2 Solventes	75
5.3.3 Screenig para escolha da melhor cepa	76
5.3.4 Análise estrutural dos compostos obtidos em escala semi preparativa	78
5.4 Estudos eletroquímicos	81
5.5 Difração de raios-X	84

5.6 Ensaios farmacológicos	85
5.6.1 Ensaio de binding	85
6. CONCLUSÕES	87
7. PERSPECTIVAS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de medicamentos movimentou em 2009 cerca de U\$ 808 bilhões. É o terceiro maior mercado econômico, perdendo apenas para o mercado de energia e alimentos. Em relação a 2008 houve um crescimento de 7,0%, sendo que a maior parte das vendas se concentrou no eixo das nações desenvolvidas – Estados Unidos, União Européia e Japão. Apesar de a América Latina ter respondido por apenas 5,67% desse total, apresentou crescimento expressivo de 10,6% (TOTAL, 2009).

Existe uma preocupação na busca de novos fármacos para tratamento de doenças que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Entre as patologias que se destacam está a esquizofrenia. Esta doença é de etiologia multifatorial com envolvimento fisiopatológico de diferentes regiões no cérebro. Previamente, o córtex pré-frontal dorsal foi identificado como a maior região acometida pelas disfunções, a qual se acredita ser a região que mais contribui para a maioria dos distúrbios cognitivos da doença (BROOKSBANK, 2001).

Essa doença tem impacto global expressivo, visto que afeta a faixa da população em idade produtiva causando um ônus para o sistema de saúde. Este quadro preocupante levou ao aumento de pesquisas, a fim de desenvolver novos fármacos antipsicóticos que fossem mais eficazes, seguros e que apresentassem menos efeitos colaterais (FRAGA et al, 2009).

A partir do planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica de derivados heterocíclicos funcionalizados, previamente propostos como ligantes de receptores D₂, foram obtidos nesse trabalho novos candidatos a protótipo de fármacos antipsicóticos planejados a partir de modificação estrutural do antipsicótico clozapina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Mercado Farmacêutico Global

No ano de 2009, a Indústria Farmacêutica Mundial movimentou cerca de U\$

808 bilhões, apresentando taxa de crescimento global de 7% em relação a 2008, sendo que, apenas a América do Norte e a Europa, juntos, correspondiam a 70,48%, ou seja, U\$ 569,7 bilhões, enquanto que na América Latina este valor ficou aproximadamente em torno U\$ 45,8 bilhões que correspondem a 5,67% dos fármacos vendidos (Gráfico 1). Tendo em vista números de vendas de fármacos tão expressivos, faz-se necessário a busca por investimentos em pesquisa e na inovação de novas moléculas que possam ser economicamente viáveis para a produção industrial, com eficácia, segurança e ausência de efeitos colaterais, quando comparados aos fármacos disponíveis no mercado (TOTAL, 2009).

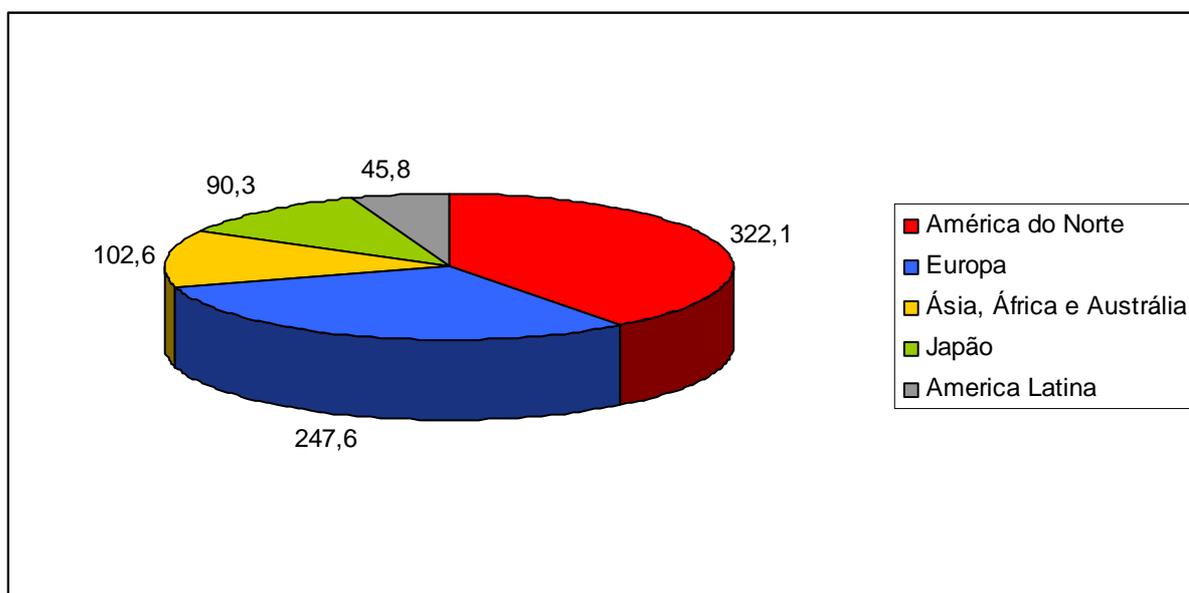


Gráfico 1 – Mercado farmacêutico global em bilhões de dólares dividido em regiões, adaptado de IMSHealth, 2009.

Entre os quinze fármacos mais vendidos em 2009 (Tabela 1), têm-se fármacos para diferentes aplicações terapêuticas, como para a redução do colesterol, a prevenção e tratamento da asma, em quadros de artrite e artrose. Porém, destacamos os fármacos empregados no tratamento de pacientes com esquizofrenia, *i.e.* antipsicóticos de segunda geração (ASG) ou atípicos como a quetiapina (1), olanzapina (2) e aripiprazol (3) (Figura 2) (TOP, 2009). (1), (2) e (3) ocupam, respectivamente, a quinta, a nona e décima quarta posições na lista dos quinze fármacos mais vendidos no ano de 2009, onde a soma da venda destes três fármacos ultrapassou dezesseis bilhões de dólares neste mesmo ano (TOP, 2009).

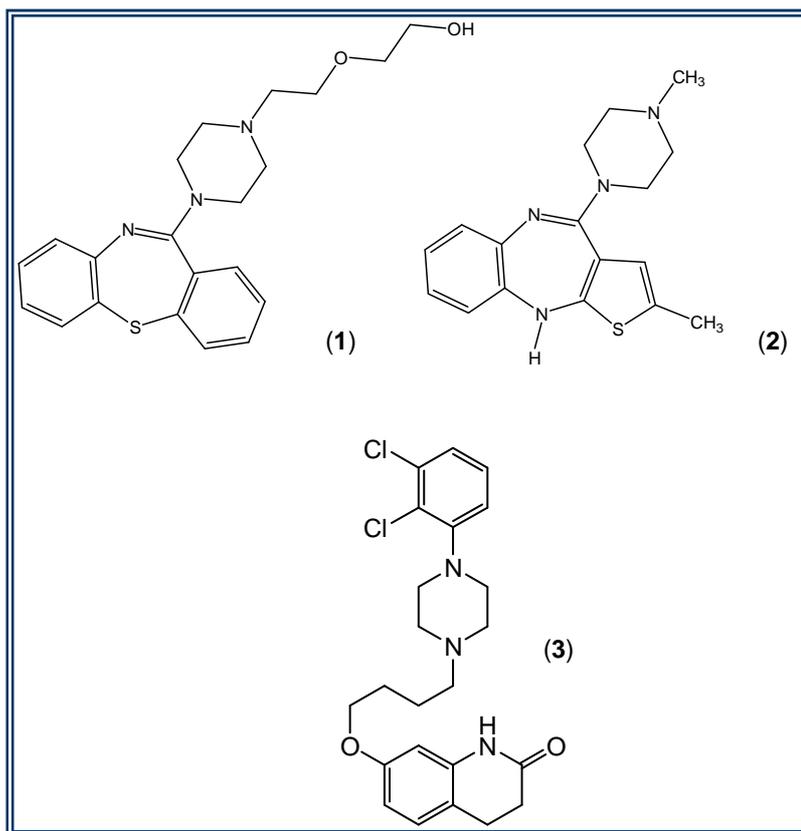


Figura 2 – Antipsicóticos mais vendidos no ano de 2009. quetiapina (1), olanzapina (2) e aripiprazol (3).

Tabela 1 – Os quinze fármacos que mais venderam no ano de 2009, adaptado de IMSHealth, 2009.

[Redacted Table Content]	
--------------------------	--

Fármacos que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) apresentam uma significativa participação no mercado farmacêutico, com taxa de crescimento de

8,6% projetada sobre o ano de 2008. Em 2009, a “Pharmaceutical Research and Manufacturers of America” (PhRMA) publicou uma lista com 301 novos candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento de doenças que acometem o SNC (Gráfico 2). Estes se encontram em fase clínica ou em curso para aprovação pelo “Food Drug and Administration” (FDA) para entrarem no mercado farmacêutico. Destes novos protótipos publicados, 45 são destinados ao tratamento da esquizofrenia (REPORT, 2008). A classe de fármacos para o tratamento dessa patologia, i.e. antipsicóticos ocupou no ano de 2009 a sétima posição dentre as classes terapêuticas que mais vendem no mundo, correspondendo a U\$23,248 bilhões em vendas (TOP, 2009).

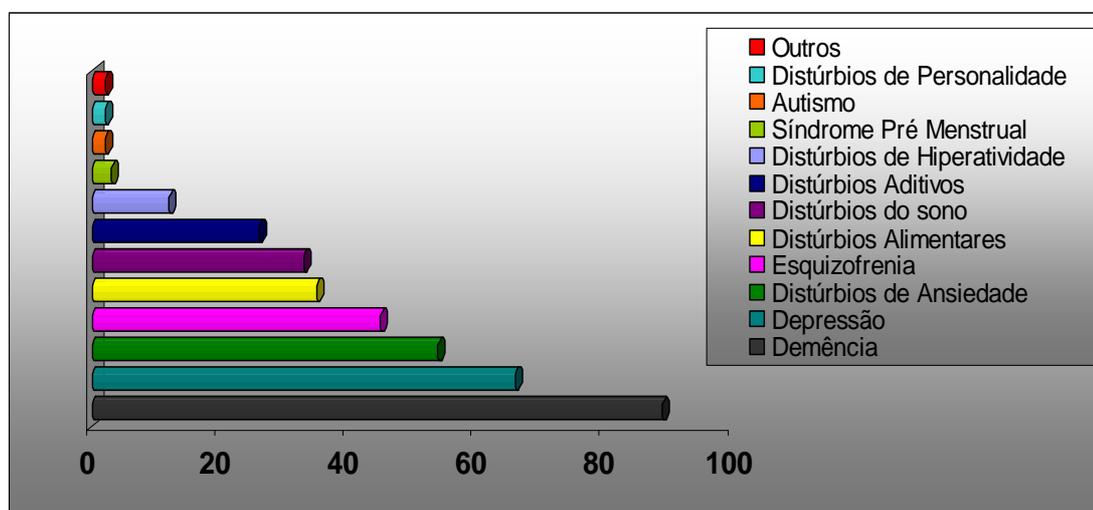


Gráfico 2 – Medicamentos em desenvolvimento para distúrbios mentais, adaptado de PhRMA, 2008 (Alguns fármacos estão sendo desenvolvidos para mais de uma desordem).

2.2 Protótipos antipsicóticos em desenvolvimento

As companhias de pesquisa farmacêutica estão desenvolvendo 301 novos candidatos a fármacos para ajudar os 60 milhões de americanos adultos que sofrem de alguma forma de doenças mentais, por exemplo, doença de Alzheimer, depressão, esquizofrenia, dependência de álcool ou drogas de abuso. Todos esses candidatos a protótipos de fármacos se encontram em fase clínica ou aguardando aprovação pelo FDA (REPORT, 2008).

Dos 45 candidatos a protótipos de fármacos que se encontravam em desenvolvimento para o tratamento da esquizofrenia no ano de 2008, cinco foram submetidos para aplicação terapêutica no mesmo ano e três deles estão aguardando registro (REPORT, 2008). Estes novos fármacos já estão disponíveis

para comercialização e são eles a asenapina (4), bifeprunox (5), iloperidona (6), paliperidona (7) e (2) (REPORT, 2009). A (7) é um metabólito ativo da risperidona (8) (Figura 3) que contém uma mistura racêmica de (+) paliperidona e (-) paliperidona, possuindo ação antagonista de receptores D_2 e $5-HT_{2A}$ e ainda tem efeito antagonista α_1 e α_2 adrenérgico e H-1 histaminérgico. A (6) se mostrou ativa como antagonista dos receptores noradrenérgicos (α_{2c}), dopaminérgicos (D_{2A} e D_3) e serotoninérgicos ($5-HT_{1A}$ e $5-HT_6$) (KALKMAN *et al*, 2003).

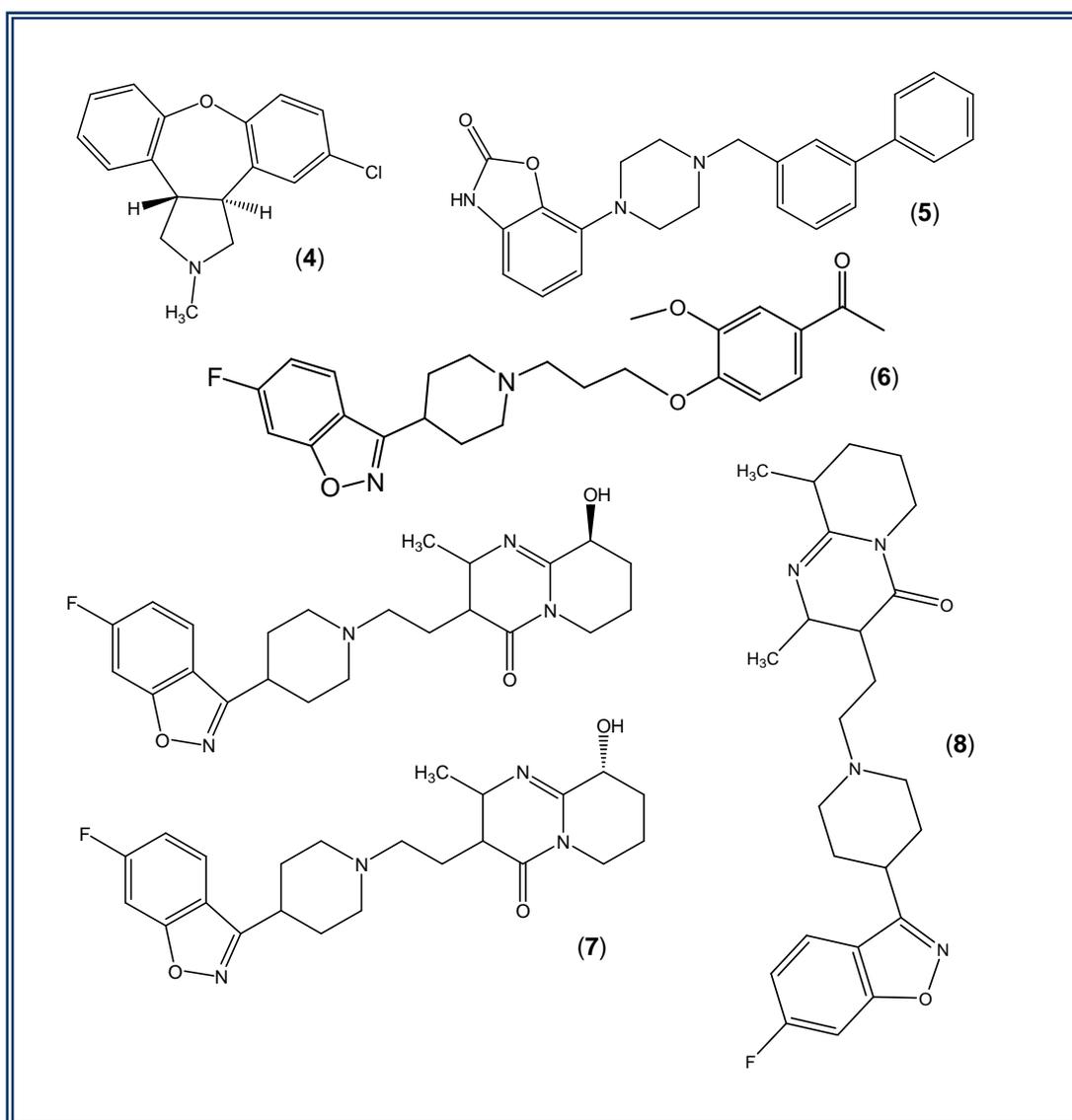


Figura 3 – Novos fármacos antipsicóticos: asenapina (4), bifeprunox (5), iloperidona (6), paliperidona (7) e risperidona (8).

2.3 Planejamento de novos fármacos

O planejamento e o desenho estrutural de novas moléculas que possuam propriedades farmacoterapêuticas, capazes de representar novos protótipos de fármacos, é uma tarefa complexa pela multiplicidade de fatores que influenciam a resposta terapêutica de um fármaco. Este precisa apresentar elevada eficácia, relativo às propriedades farmacodinâmicas - aquelas que regem as interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor e resultam na resposta terapêutica desejada - e farmacocinéticas – as quais estão relacionadas aos fatores de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco na biofase, resultando no perfil de biodisponibilidade (BARREIRO & FRAGA, 2009).

Todos esses fatores estão envolvidos com a Química Medicinal, que segundo definição da IUPAC, é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação em nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR) (WERMUTH, 2003).

O processo da descoberta de fármacos, nas indústrias farmacêuticas, sofreu profunda reestruturação e mudança de paradigmas, quando comparamos o modelo empregado na década de 50 até o final da década de 80 em relação ao modelo vigente. No período de 1950-1980, o Químico Medicinal com apoio do colaborador Farmacologista, eram os pilares dos programas de pesquisa de fármacos. As estratégias de modificação molecular – típicas da Química Medicinal – foram implementadas e os princípios racionais do processo de otimização do composto-protótipo estabelecidos e empregados, pela primeira vez, a partir da aplicação da estratégia de bioisosterismo (LIMA & BARREIRO, 2005). No final dos anos 80 e início da década de 90, o processo da descoberta de fármacos nas indústrias farmacêuticas observou uma mudança significativa, estabelecendo-se um novo paradigma – beneficiado pelos avanços em tecnologias analíticas, sintéticas, de caracterização estrutural, da introdução da química combinatória (QC), do “high-throughput screening” (HTS), biologia molecular, ciências genômicas e ultra-HTS (GERSHELL & ATKINS, 2003) (Figura 4).

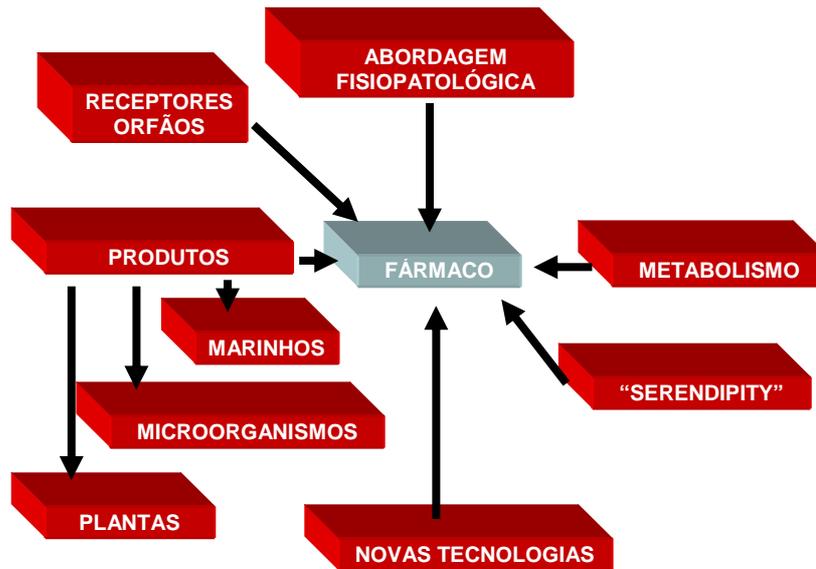


Figura 4 – Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos.

O processo da descoberta de fármacos baseado na abordagem fisiopatológica, culminou com a produção das chamadas “magic bullets”, altamente seletivas, a exemplo do mesilato de imatinibe, Gleevec®, Novartis (9), que revolucionou o tratamento da leucemia mielóide crônica (LYDON & DRUKER, 2004). Entretanto, nos últimos anos, tem-se considerado os mecanismos de ação celulares e bioquímicos associados a várias desordens fisiopatológicas com características multifatoriais. Portanto, a eficácia no tratamento dessas doenças seria dependente de uma intervenção em mais de um alvo molecular, o que pode ser alcançado pelos chamados “smart drugs”, ou seja, fármacos de ação múltipla, mistos, duplos ou simbióticos. Curiosamente, a maior parte dos fármacos modernos com ação múltipla foi descoberta fortuitamente e o mecanismo de ação elucidado *a posteriori*, como é o caso do antipsicótico (2), Zyprexa®, da companhia Eli Lilly. No entanto, o planejamento de fármacos ou protótipos simbióticos, é possível e primariamente baseado no método de combinação de grupamentos farmacóforicos, a partir de ligantes ou de protótipos seletivos para os alvos previamente eleitos com base em seu papel na fisiopatologia que se pretende tratar (MORPHY & RANKOVIC, 2005).

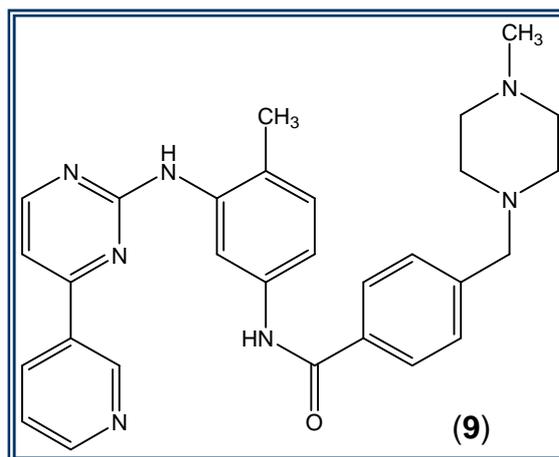


Figura 5 – Estrutura química do mesilato de imatinibe (9).

Outra abordagem atual empregada na identificação de novos protótipos é baseada no estudo do metabolismo de xenobióticos. Em tese, o principal objetivo do metabolismo de fármacos é a transformação de uma molécula farmacologicamente ativa em metabólitos hidrossolúveis para sua melhor excreção renal. Entretanto, não são raros os exemplos em que uma transformação metabólica conduz à formação de substâncias biologicamente ativas. O perfil farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico dos metabólitos ativos, identificados, pode ser superior, igual ou inferior ao fármaco que lhe deu origem. Quando identificados e realizados os estudos de atividade e segurança comparativos ao fármaco original, podem se tornar fármacos mais seguros e eficazes ou serem utilizados como molde molecular para o desenho de fármacos “me too”, ou seja, fármacos com estrutura química semelhante, porém com atividade farmacológica superior. Exemplos de metabólitos ativos, que se tornaram fármacos mais potentes, seguros e que apresentam menos efeitos colaterais quando comparados ao fármaco original, são relativamente abundantes e incluem a descoberta dos anti-histamínicos de segunda-geração fexofenadina (10) (Allegra®) a partir da terfenadina (11) (Teldane®) e desloratadina (12) (Clarinet®) a partir da loratadina (13) (Claritin®) (Figura 6) (FURA et al, 2004).

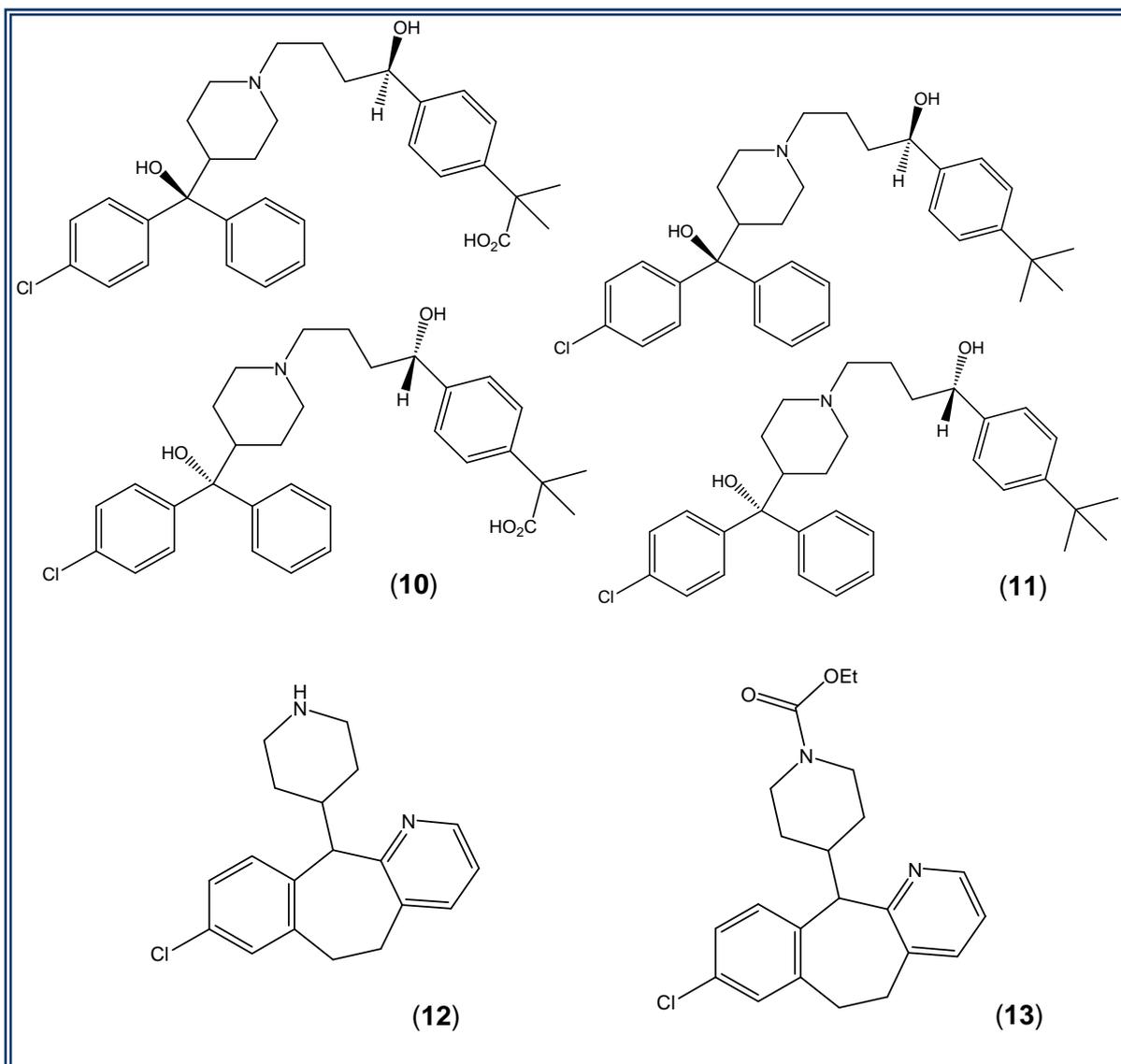


Figura 6 – Estrutura química dos anti-histamínicos de segunda-geração fexofenadina (10), terfenadina (11), desloratadina (12) e loratadina (13).

Para ressaltar a importância dos estudos de metabolismo no desenvolvimento de novos fármacos, devemos dar ênfase à história da talidomida (14) (Figura 7), que começou a ser comercializada em 1957 como fármaco sedativo-hipnótico, amplamente vendido em países europeus, asiáticos, no Canadá e América do Sul, tornando-se o medicamento mais vendido na Alemanha Ocidental para o tratamento da insônia (LIMA, FRAGA & BARREIRO, 2001).

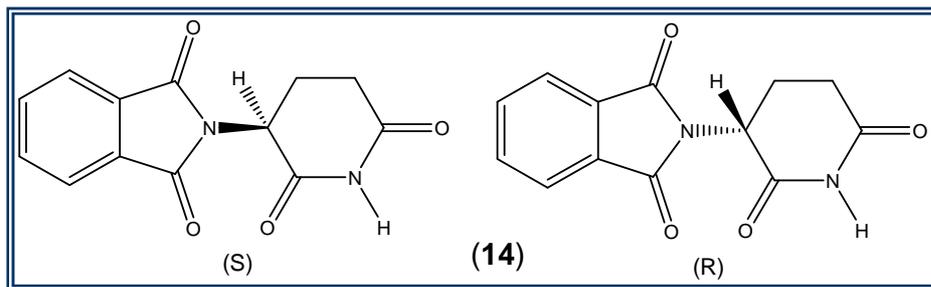


Figura 7 – Estrutura química da talidomina (14).

No início da década de 60, a (14) foi prescrita mundialmente como sedativo e agente anti náuseas, indicada no alívio do mal-estar matinal comum em gestantes, sendo responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas, que foram posteriormente atribuídas ao seu perfil teratogênico. Após confirmação e divulgação destes graves efeitos colaterais, este fármaco teve sua licença para comercialização cancelada em 1961(LIMA, FRAGA & BARREIRO, 2001). Posteriormente foi descoberto que o efeito teratogênico era proveniente do emprego do enantiômero de configuração relativa (S), enquanto seu antípoda (R) era desprovido de ação teratogênica (LIMA, FRAGA & BARREIRO, 2001).

2.4 Histórico da esquizofrenia

Médicos da época do antigo Egito e do segundo milênio antes de Cristo (ALEXANDER & SELESNICK, 1966; ADITYANJEE *et al*, 1999) atribuíam que a psicose era uma doença física do coração e do útero, originada nos vasos sanguíneos ou de “purulência, material fecal, veneno ou demônios” (CARLSSON, 2005). Médicos gregos acreditavam que as desilusões e paranóia causadas pela psicose eram devido à falta de harmonia entre humor corporal do sangue, muco, e bile amarela ou negra (ALEXANDER & SELESNICK, 1966; ROCCATAGLIATA, 1991; EVANS, MCGRANTH & MILNS, 2003; CARLSSON, 2005). Hipócrates supôs que esse desequilíbrio humoral, isto é, desequilíbrio entre os quatro humores do corpo, os quais são o sangue, fleuma, bile amarela e bile negra afetavam o SNC (EVANS MCGRANTH & MILNS, 2003), e, conseqüentemente, a constituição biológica dos seres humanos causando a insanidade (MICALE & PORTER, 1994).

Em 1851, Falvet descreveu primeiramente a doença como uma loucura cíclica, em razão de ter ciclos alternados de mania e depressão. Vinte anos após, Hecker definiu a mesma doença como Hebefrenia ou uma mente parda,

indisciplinada, referindo-se a Hebe, deusa grega da juventude (WALTERS, 2008). Kahlbaum, em 1874 definiu as desordens catatônicas e paranóicas da mente, onde o termo catatonia descrevia uma desordem de movimento caracterizada pela rigidez do músculo associado com as posturas incomuns e medo comparando às manequins. Então, em 1889, o psiquiatra alemão Emil Kraepelin denominou a doença de *dementia praecox* para descrever os sintomas correntemente associados à esquizofrenia. O termo *dementia* tornou-se útil para descrever os defeitos observados no funcionamento perceptual e cognitivo, enquanto *praecox* se referia ao início da desordem na idade adulta avançada (ALEXANDER e SELESNICK, 1966; ADITYANJEE et al, 1999).

O termo esquizofrenia foi empregado em 1911 pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler. Derivada do grego a palavra raiz *schizo*, significa separação, e *phrene*, significa mente, a “separação” refere-se à separação ou fragmentação do pensamento (ALEXANDER e SELESNICK, 1966; DAVISON e NEALE, 1998; ADITYANJEE et al, 1999), a separação entre os sentimentos subjetivos e experiências humanas (WALTERS, 2005), ou indicar separação no funcionamento psíquico. Ainda, Bleuler foi o primeiro a descrever os sintomas positivos caracterizados por delusões, alucinações, e desorganização da fala ou comportamento, e os sintomas negativos como embotamento afetivo, volição e apatia da doença (ADITYANJEE et al, 1999).

A definição de esquizofrenia de Bleuler, como sendo uma desordem associativa, onde várias vias de neurotransmissores se encontram envolvidas, vai ao encontro à biografia de John Nash Jr, retratado no filme “Uma mente brilhante”, vencedor do Oscar 2002 de melhor filme e melhor diretor por Ron Howard. Nash começou a apresentar sintomas de esquizofrenia enquanto acadêmico, *i.e.* paranóia e depressão, sendo levado a sucessivas internações em hospitais psiquiátricos. Nestes ambientes fez uso de tratamento farmacológico, além de terapia de choque com insulina. Nash foi contemplado com prêmio Nobel de Ciências Econômicas em 1994 por seu trabalho com teoria de jogos, ratificando que a doença pode ser controlada através do emprego de medicamentos (wikipedia.org).

2.5 Fisiopatologia da doença

A esquizofrenia é uma doença de etiologia multifatorial que envolve a fisiopatologia de diferentes regiões no cérebro e vias de neurotransmissores. Previamente, o córtex pré-frontal dorsal foi identificado como a maior região acometida pelas disfunções e acredita-se contribuir para a maioria dos distúrbios cognitivos da doença (BROOKSBANK, 2001). É uma patologia do SNC que incide sobre 2% da população mundial, cuja distribuição independe de sexo, idade, raça e nível sócio-econômico, representando enorme desafio à neurociência (MENEGATTI et al, 2004).

Pesquisas mostraram evidências da transmissão genética da doença, embora as taxas de risco variem muito (BILDER e LACHMAN, 2004). Parentes de primeiro grau, *i.e.* pai, irmão ou filhos de pessoas com esquizofrenia são 3% a 7% mais suscetíveis a desenvolver a doença, quando comparados à população em geral. Um risco mais elevado, de 5% a 10% existe para irmãos e filhos (JONES e CANNON, 1998). O risco aumenta para 13% para a criança com um parente com esquizofrenia e varia de 35% a 40% para a criança com dois parentes com esquizofrenia. Os fatores genéticos colaboram com aproximadamente 60% da possibilidade para desenvolver esquizofrenia (LEE et al, 2005).

A teoria do envolvimento de neurotransmissores em doenças mentais é uma das mais antigas, mais resistentes e mais influentes das teorias neuroquímicas modernas (BAUMEISTER e FRANCIS, 2002). Este modelo foca na transmissão química no córtex pré-frontal, hipocampo e lobo temporal do cérebro. Postula que o aumento da atividade de dopamina (**15**) em seus receptores nestas áreas resulta em alucinações e delírios (BEEBE, 2003). A disfunção de (**15**) poderia ser um mecanismo primário para a elaboração de delírios e percepções de ilusões (LECRUBIER e KAPUR, 2005). O aumento nos níveis de (**15**) no córtex pré-frontal e límbico tem sido encontrado em pessoas com esquizofrenia (VAN ELST et al, 2005). O aumento pré-frontal das concentrações de (**15**) tem sido ainda associado com funcionamento cerebral debilitado. A pesquisa mudou o foco do estudo das mudanças do neurotransmissor para o estudo de como um sistema neurotransmissor interage com outros sistemas do cérebro. Parece ser uma interação entre o papel da (**15**) dentro da neurobiologia do cérebro, experiências fenomenológicas da mente e aspectos farmacológicos da psicose na esquizofrenia

(KAPUR et al, 2004). Pesquisadores encontraram anormalidades dopaminérgicas no tálamo em pacientes com esquizofrenia (CLINTON *et al*, 2005) (Figura 8).

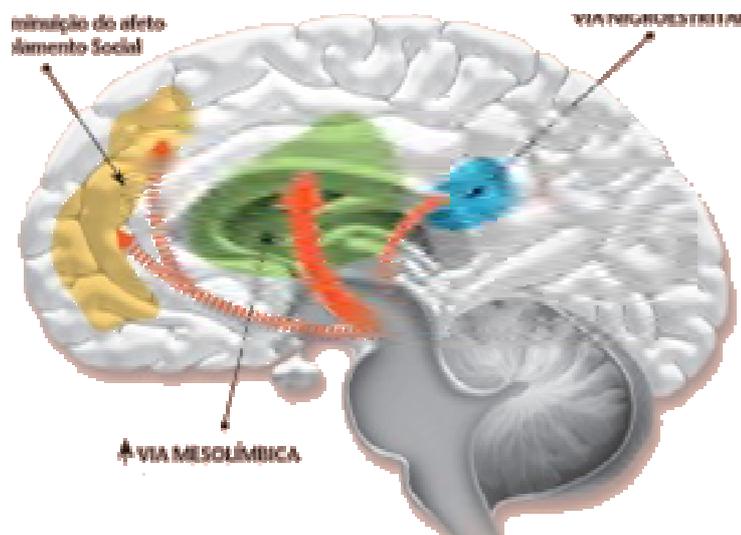


Figura 8 – Áreas do cérebro mais acometidas pela doença, adaptado de www.mocoplast.com.br.

Segundo Laruelle e colaboradores (1996), em um estudo de “Single Photon Emission Computed Tomography” (SPECT), demonstraram um maior aumento na liberação de (15) após administração de amfetamina (16) em pacientes esquizofrênicos quando comparados a controles, sendo a primeira evidência *in vivo* de desregulação de neurônios dopaminérgicos na esquizofrenia. Essas observações constituem a base da hipótese segundo a qual alterações nos níveis de (15) seriam responsáveis pelos sintomas observados na esquizofrenia. Uma hipótese mais recente foi postulada, onde a hipofunção dopaminérgica no córtex pré-frontal seria responsável pelos sintomas negativos e um evento primário na esquizofrenia, levando a uma hiperfunção dopaminérgica secundária no estriado, o que, por sua vez, levaria ao surgimento dos sintomas positivos (STONE et al, 2007). Existem evidências do envolvimento de outros sistemas neurotransmissores como o serotoninérgico (WONG e VAN, 2003), glutamatérgico (DEUTSCH et al, 1989; BRESSAN e PILOWSKY, 2003; STONE et al, 2007) e colinérgico (MAEHARA et al, 2008).

As primeiras evidências de que este era o sítio da atuação terapêutica surgiram pela observação da semelhança sintomatológica entre determinadas patologias dos lobos frontais e temporais com a esquizofrenia, além da notável importância do sistema límbico nas emoções e na memória (BALLONE e ORTOLANI, 2005).

A (15) liberada próxima aos capilares da circulação porto-hipofisária chega à hipófise anterior e provoca o aumento da liberação secundária de prolactina (BALLONE e ORTOLANI, 2005). Estudos realizados com 66 mulheres em fase de amamentação, com uma dose de 100 mg por dia de sulpirida (17), observaram um aumento significativo do volume de leite e elevação dos níveis séricos de prolactina em relação às mulheres que receberam placebo. Não foram observados efeitos adversos entre as crianças amamentadas pelas mães que fizeram uso de (17) (Figura 9) (CHAVES e LAMOUNIER, 2004).

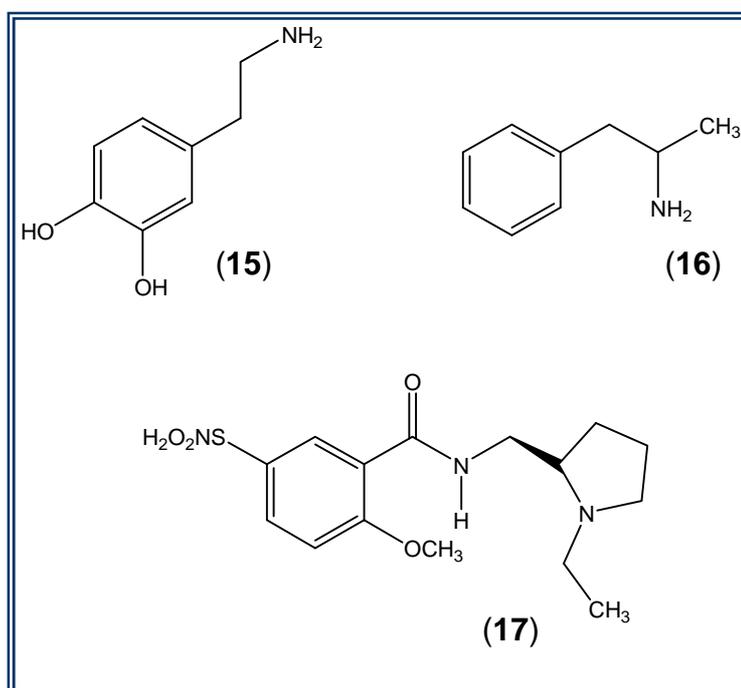


Figura 9 – Estrutura química: dopamina (15), anfetamina (16) e sulpirida (17).

A primeira evidência da hipótese dopaminérgica em quadros de esquizofrenia foi descrita por Carlsson, contemplado com prêmio Nobel de Medicina em 2001 e Lindqvist, em 1963, quando observaram o acúmulo de metabólitos da (15), *i.e.* ácido diidroxifenilacético (18) e ácido homovanílico (19) (Figura 10), no cérebro de coelhos tratados com clorpromazina (20) e haloperidol (21) (Figura 11). Assumindo que os antipsicóticos (20) e (21) bloqueiam os receptores D₂ pós-sinápticos, os autores propuseram que poderia estar ocorrendo recaptção neuronal do excesso de (15), com subsequente bioformação de (18) e (19) por ação das enzimas catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoamino oxidase (MAO) (MENEGATTI *et al.*, 2004).

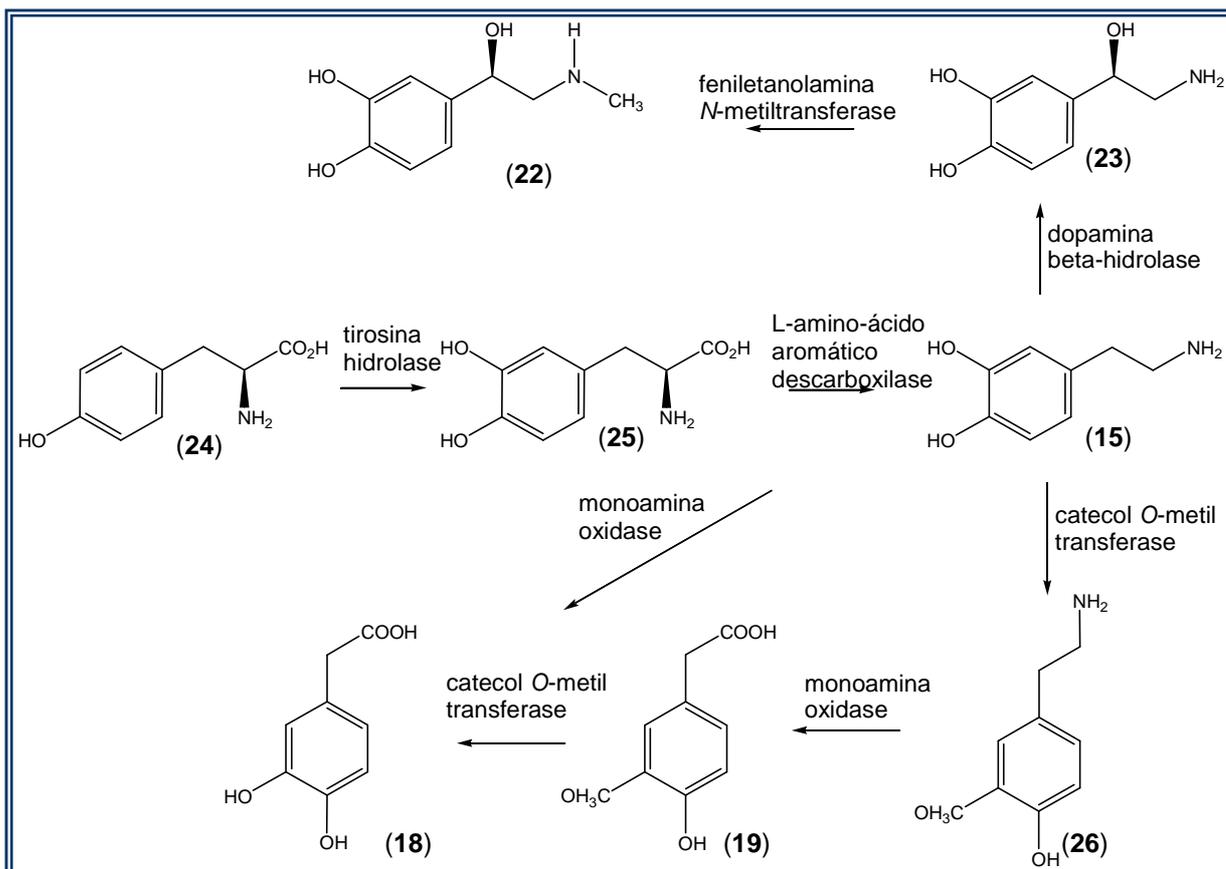


Figura 10 – Metabólitos da dopamina encontrados no cérebro de ratos tratados com (20) e (21), adaptado de Menegatti *et al*, 2004.

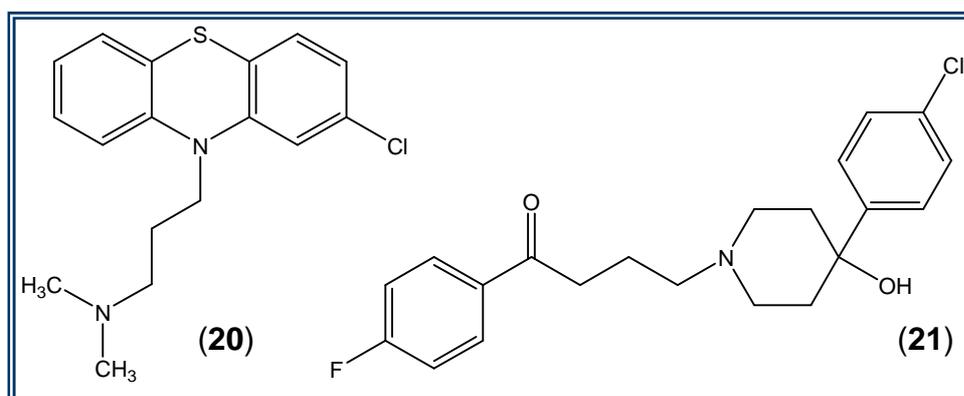


Figura 11 – Estrutura química clorpromazina (20) e haloperidol (21).

A partir dessa observação, propôs-se que os antipsicóticos agiriam por intermédio do antagonismo de receptores dopaminérgicos, o que causaria um aumento compensatório nos níveis de (15) (NETO *et al*, 2007).

2.6 Impacto sócio-econômico

A esquizofrenia é uma doença crônica com importante impacto negativo na qualidade de vida de seus pacientes, além de estar associada a altos custos decorrentes de tratamentos de longa duração e demandas especiais em relação aos serviços de saúde (KNAPP, 2002). De acordo com o Estudo Global de Carga das Doenças, a esquizofrenia causa um alto grau de incapacidade, o qual totaliza 1,1% do total de “desability-adjusted life-year” (DALYs), ou seja, anos de vida ajustados por incapacidade e 2,8% do total de “years lost due to desability” (YLDs), ou seja, anos de vida com incapacidade (DALRIO et al, 2007).

No relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), a esquizofrenia é listada como a oitava causa mundial por sobrecarga em DALYs no grupo com idade entre 15 e 44 anos. Uma revisão de estudos internacionais sobre custo em saúde mental, considerando as doenças psiquiátricas mais graves, nas quais se engloba a esquizofrenia foi realizada em 2005 (HU, 2006).

O estudo realizado nos Estados Unidos fez um levantamento dos custos relacionados à esquizofrenia no ano de 2002 (WU et al, 2005). Os custos médicos diretos foram levantados em bancos de dados públicos e privados (MediCal e MediCare). Os custos diretos não médicos foram estimados por custo dos benefícios sociais, gastos com pacientes que são moradores de rua e por pesquisas e treinamentos relacionados à esquizofrenia. Os custos indiretos foram calculados com base no desemprego, perda de produtividade no trabalho, mortalidade prematura por suicídio, bem como pelo valor do recurso humano do cuidador, considerando os valores de mercado.

Chegou-se a um valor estimado de U\$ 62,7 bilhões, sendo U\$ 22,7 bilhões relacionados a custos diretos, U\$ 7 bilhões para atendimentos ambulatoriais, U\$ 5 bilhões com medicações, U\$ 2,8 bilhões com internações e U\$ 8 bilhões com moradores de rua. Os custos diretos não médicos foram estimados em U\$ 7,6 bilhões e os custos indiretos em U\$ 32,4 bilhões, relacionados principalmente ao desemprego (WU et al, 2005).

A introdução dos medicamentos ASG no tratamento da esquizofrenia provocou um debate sobre os custos dos tratamentos farmacológicos. Em alguns aspectos, os novos antipsicóticos apresentam uma resposta clínica superior, quando comparados aos de primeira geração. Entretanto, os serviços de saúde discutem

sobre o alto preço destas medicações, tornando-se importante verificar se os custos adicionais justificam os benefícios clínicos por parte dessas entidades (LINDNER et al, 2009).

Atualmente no Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza os ASG apenas para pacientes refratários ao tratamento com os de primeira geração e registrados no "Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional". Um estudo feito em Santa Catarina mostrou que o gasto com a aquisição dos novos antipsicóticos para atender 4.258 pacientes no período de janeiro de 2000 a outubro de 2006 foi de U\$ 709.019,46. Em 2004 a (2) foi o terceiro medicamento mais solicitado e ocupou a segunda posição entre gastos com 59 medicamentos dispensados pelo programa de dispensação no estado de Santa Catarina (BLATT e FARIA, 2007). Embora os gastos com este tipo de medicação sejam elevados, informações mais precisas sobre sua efetividade não estão disponíveis e são escassos os estudos sobre custos dos tratamentos da esquizofrenia em pacientes atendidos pelo SUS (LINDNER et al, 2009).

Para quem inicia o tratamento com (2), ao final de cinco anos, o modelo estimou um custo total de U\$ 3.935,15. Para a opção de iniciar o tratamento com a (7) o custo estimado foi U\$ 5.964,57 por paciente. A utilidade estimada para pacientes que iniciam o tratamento com (2) foi praticamente idêntica à da (7), porém com um custo total de U\$ 10.423,12 (BLATT e FARIA, 2007).

2.7 Evolução do tratamento

Até a metade do século XX, afora a insulina e a eletroconvulsoterapia e mais excepcionalmente o choque cardiazólico, a malarioterapia e a lobotomia frontal, os recursos terapêuticos biológicos de que se dispunha para o tratamento de estados psicóticos agudos, limitava-se a medicamentos sedativos e hipnóticos, dotados de forte e inespecífica ação depressora em todo o SNC, e que em doses altas determinavam coma profundo com inibição dos centros respiratórios do tronco cerebral. As substâncias mais empregadas eram o hidrato de cloral, o brometo de sódio (usado em sonoterapia desde o 1897), o amital sódico (introduzido por *Bleckwenn* em 1929), e uma mistura à base dos ácidos dietil e dipropenil-barbitúrico que se tornaria conhecida em todo o mundo como SOMNIFEN®, introduzida por *Kläsi* nos anos 20. Também se recorria a preparados à base de ópio, como o

Laudanum, bebida composta de vermute, ervas e ópio, considerada muito eficaz, amparada pelo prestígio de seu introdutor, o célebre neurologista inglês do século XVII, *Thomas Sydenham* (FROTA, 2003).

Os alcalóides da *Rauwolfia serpentina*, planta descoberta e pioneiramente empregada na Europa por Leonhard Rauwolf no século XVI, mas desde muito conhecida da medicina tradicional hindu, somente viriam a ser considerados para emprego em psiquiatria com a síntese da reserpina (**27**) (Figura 12) pelos laboratórios da Ciba na Basileia, Suíça, no início da década de 50. O reconhecimento do potencial terapêutico antipsicótico da reserpina, abandonado em razão da grande latência de ação, depressão com risco de suicídio, intensa sedação e hipotensão, somente se daria, porém, após seu emprego experimental nos psicóticos conduzido por Nathan Smith Kline em Nova Iorque, dois anos após a introdução da (**20**) na França. Em doses terapêuticas, tanto a (**20**) como a (**27**), mostravam uma inédita ação sedativa seletiva, espécie de tranquilização ou indiferença emocional aos estímulos, sem induzir a narcose ou coma como se observava então, com doses maiores de barbitúricos, sais de bromo, opiáceos ou com o hidrato de cloral (FROTA, 2003).

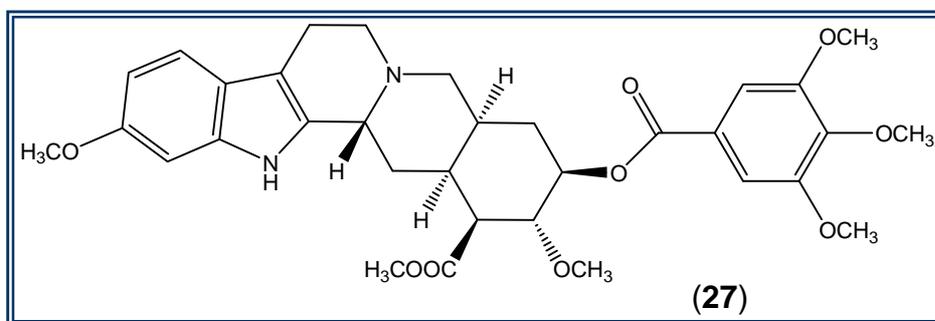


Figura 12 – Estrutura química da reserpina (**27**)

A (**20**) (Amplictil®) foi descoberta em 1957 e o (**21**) (Haldol®) em 1959. Com esses medicamentos foi possível alcançar mais de 60% de melhora, aumentando significativamente a expectativa de pacientes com esquizofrenia (SHEN, 1999).

Em 1970 surgem os ASG, que trouxeram uma nova perspectiva para o tratamento da doença. A clozapina (**28**) (Leponex®) (Figura 13), considerada o primeiro antipsicótico atípico foi descoberta em 1970, mas, devido ao problema da

agranulocitose causado, aparece no mercado somente em 1988, sendo aprovada para uso nos Estados Unidos em 1990 e no Brasil em 1992 (SHEN, 1999).

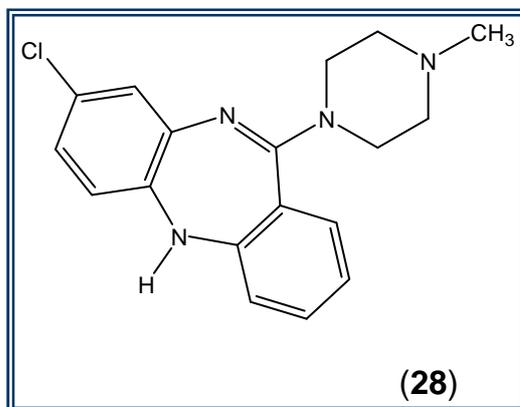


Figura 13 - Estrutura química da clozapina (28).

O fato de que todos os fármacos antipsicóticos bloqueiam os receptores dopaminérgicos sustenta o conceito que o sistema dopaminérgico está envolvido na esquizofrenia e no mecanismo de ação dos antipsicóticos. Até agora, seis tipos de receptores dopaminérgicos foram clonados do tecido cerebral. Estes receptores são subdivididos em duas famílias, referidas como D₁ e D₂. A família de receptores D₁ inclui os subtipos D_{1A} e D_{1B}, ainda conhecido como D₅ em humanos. A família de receptores D₂ inclui os subtipos D_{2S}, D_{2L}, D₃ e D₄ (MENEGATTI *et al*, 2004).

Os antipsicóticos são fármacos que atuam inibindo as funções psicomotoras, as quais podem encontrar-se aumentadas em estados de excitação e agitação. Paralelamente eles atenuam também os sintomas neuropsíquicos tais como os delírios e as alucinações. São substâncias químicas sintéticas, capazes de atuar seletivamente nas células nervosas que regulam os processos psíquicos no ser humano e a conduta em animais (MELTZER, 2002).

Os ASG são fármacos lipossolúveis e, com isso, têm facilitada sua absorção e penetração no SNC. Sua grande maioria possui meia vida longa, entre 20 e 40 horas, portanto demoram aproximadamente cinco dias para se instalar estado estável do fármaco no organismo (MELTZER, 2002). Este fenômeno é denominado de neuroplasticidade ou plasticidade neural, uma propriedade natural do sistema nervoso dos indivíduos caracterizada por alterações funcionais e/ou morfológicas nos neurônios em resposta a lesões, hormônios, fármacos ou estímulos ambientais. Os mecanismos pelos quais ocorrem os fenômenos de plasticidade podem incluir

modificações sinápticas do receptor, da membrana e neuroquímicas (MONÉZI & LÖHR, 2005).

Os APG, tais como (21) e (22), são eficazes em mais de 60% dos pacientes com esquizofrenia, atuando predominantemente nos sintomas chamados positivos e, em grau muito menor, nos chamados sintomas negativos. A hipotensão, sedação e tontura, efeitos colaterais comuns aos APG, normalmente acontecem devido à capacidade desses medicamentos bloquearem também os receptores α -adrenérgicos (MELTZER, 2002).

ASG de referência, (28) foi testado clinicamente na década de 70, na Europa. Infelizmente, observou-se que produzia granulocitopenia ou agranulocitose em taxa muito mais elevada (1% a 2%) do que aquela observada nos APG. Isso levou a sua retirada do mercado (KRUPP, 1989). A importância da (28) voltou a ser devidamente apreciada a partir de 1988, quando se demonstrou, em um ensaio duplo-cego com duração de seis semanas em pacientes hospitalizados resistentes, sua maior eficácia em 30% ou mais dos pacientes esquizofrênicos que não respondiam a pelo menos tentativas com outros antipsicóticos (KANE *et al*, 1988). A (28) mostrou-se eficaz no alívio dos sintomas positivos e dos negativos. Esse estudo demonstrou ainda que a (28) era bem tolerada nos pacientes que não toleravam outros antipsicóticos, voltando então a ser comercializada. Entretanto, sua principal indicação passou a ser, e continua sendo o tratamento à esquizofrenia refratária a outros antipsicóticos (KANE *et al*, 1988).

2.8 Estudos de metabolismo

Antes de qualquer fármaco ser aprovado para uso em humanos, extensivos estudos são realizados para estabelecer sua eficácia, segurança e ausência de toxicidade. A elucidação do metabolismo de fármacos constitui um passo importante e necessário para essa avaliação. A biotransformação de fármacos é geralmente considerada como uma reação de detoxificação levando a substâncias mais polares que serão mais facilmente eliminadas do organismo (AZERAD, 1999). O organismo usa estas reações como defesa contra quaisquer substâncias xenobióticas, incluindo fármacos e contaminantes ambientais. Para catalisar essas reações, nosso

organismo possui um sistema enzimático localizado principalmente no fígado (FURA, 2006).

Em alguns casos, o metabolismo pode levar à ativação de fármacos, produzindo substâncias farmacologicamente mais ativas ou metabólitos reativos tóxicos. Tradicionalmente, os estudos de metabolismo são realizados em modelos animais, perfusão de órgãos e cultura de células normais ou malignas (AZERAD, 1999).

Devido o impacto das reações de biotransformação nos fármacos, estudos de metabolismo *in vivo* e *in vitro* e estudos de farmacocinética são conduzidos como parte dos processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Adicionalmente, estudos *in silico*, onde uma triagem virtual para medir a afinidade e atividade biológica dos metabólitos ativos usando química computacional, podem ser realizados (FURA, 2006).

Tradicionalmente, estudos de metabolismo de fármacos *in vivo* envolvem a administração de fármacos a animais de laboratório. Os fluidos corporais *i.e.* plasma e urina desses animais são analisados para detectar presença e identificar os metabólitos (AZERAD, 1999).

A capacidade hidrolítica e redutiva de microrganismos têm sido utilizadas em reações preparativas, sendo então utilizados como modelo microbiano de metabolismo. Grande número de vantagens são observadas pelo uso destes como modelo para metabolismo de fármacos, como baixo custo, possibilidade de utilização de altas concentrações e reprodutibilidade do processo (AZERAD, 1999).

Dentre os microrganismos utilizados em reações de biotransformação destacam-se os fungos filamentosos, que são formados por células eucarióticas. O uso de organismos procarióticos, *i.e.* bactérias, está limitado às cepas de *Actinomicetos* (gêneros: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Mycobacteria* e *Corynebacteria*) por apresentarem um equipamento enzimático similar ao dos fungos. Algas unicelulares também têm sido empregadas em estudos de biotransformação, além de culturas de células de algumas plantas (AZERAD, 1999).

2.8.1 Estudo do metabolismo na descoberta de novos fármacos

Na maioria dos casos, o metabolismo dos fármacos leva à inativação farmacológica através da biotransformação em moléculas terapeuticamente inativas.

No entanto, o metabolismo de fármacos pode ainda resultar em ativação farmacológica, onde metabólitos farmacologicamente ativos são gerados. A formação de metabólitos farmacologicamente ativos pode ser mediada por metabolismo de fase I e fase II pelas enzimas do citocromo P450 (FURA et al, 2004).

As reações de biotransformação levando à ativação farmacológica de fármacos podem envolver hidroxilação de carbonos alifáticos e aromáticos, *N*-, *O*- ou *S*- dealquilação, epoxidação, redução, sulfatação, entre outros. Por exemplo, a atorvastatina (**29**), um fármaco antilipidêmico, é metabolizada em dois metabólitos ativos, 2- e 4-hidroxiatorvastatina via hidroxilação aromática (MANZONI e ROLLINI, 2002) (Figura 14).

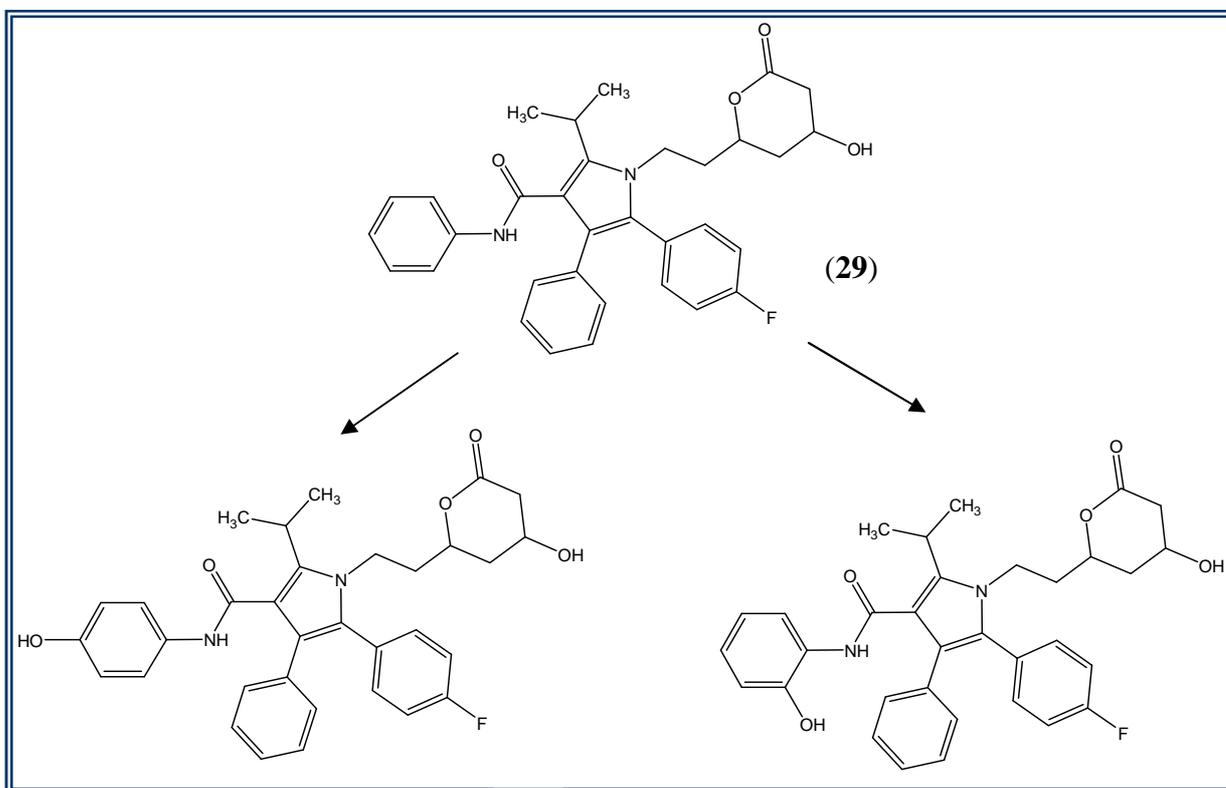


Figura 14 – Metabólitos produzidos a partir da biotransformação da atorvastatina (**29**), adaptado de Manzoni e Rollini, 2002.

Um metabólito ativo pode servir como um composto protótipo modificado que foi descoberto após novos estudos de relação estrutura atividade no estágio de otimização do protótipo durante o desenvolvimento de fármacos. Esta estratégia foi utilizada na descoberta do ezetimibe (**30**) (Figura 15), um inibidor de absorção do colesterol. Nestes estudos, um candidato a protótipo obteve um aumento da atividade farmacológica do metabólito após administração oral em ratos que foi

aproximadamente 30 vezes mais potente que o protótipo. Posteriormente, a otimização do metabólito através de modificações estruturais levou à descoberta do (30), uma molécula que é aproximadamente 400 vezes mais potente que o candidato a protótipo inicial (FURA *et al*, 2004).

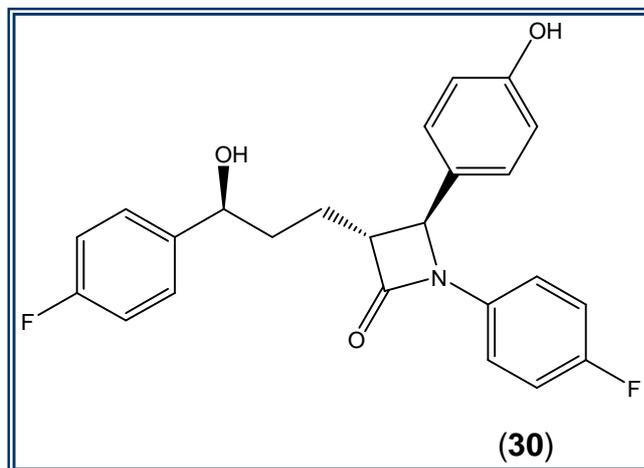


Figura 15 – Estrutura química do ezetimibe (30).

No estudo prospectivo, as rotas de metabolismo são primeiro exploradas em sistemas microbianos, para posteriormente serem aplicados em mamíferos. A previsão e confirmação da produção de metabólitos em mamíferos é facilitada pela obtenção de padrões analíticos usando o modelo microbiano (AZERAD, 1999). Um exemplo desse tipo de estudo foi dado pela biotransformação da evodiamina (31), um alcalóide extraído da *Evodia rutaecarpa*, tradicional na Medicina Chinesa, utilizada no tratamento de enxaqueca amenorréia, e náuseas, usando o fungo *Penicillium janthinellum* (LI *et al.*, 2006).

Inicialmente os estudos foram realizados *in vitro*, obtendo dois metabólitos (32) e (33) e posteriormente foi confirmado um desses metabólitos (33) como majoritário na urina de ratos após administração oral do composto. Ambos os metabólitos microbianos mostraram forte citotoxicidade (LI *et al.*, 2006) (Figura 16).

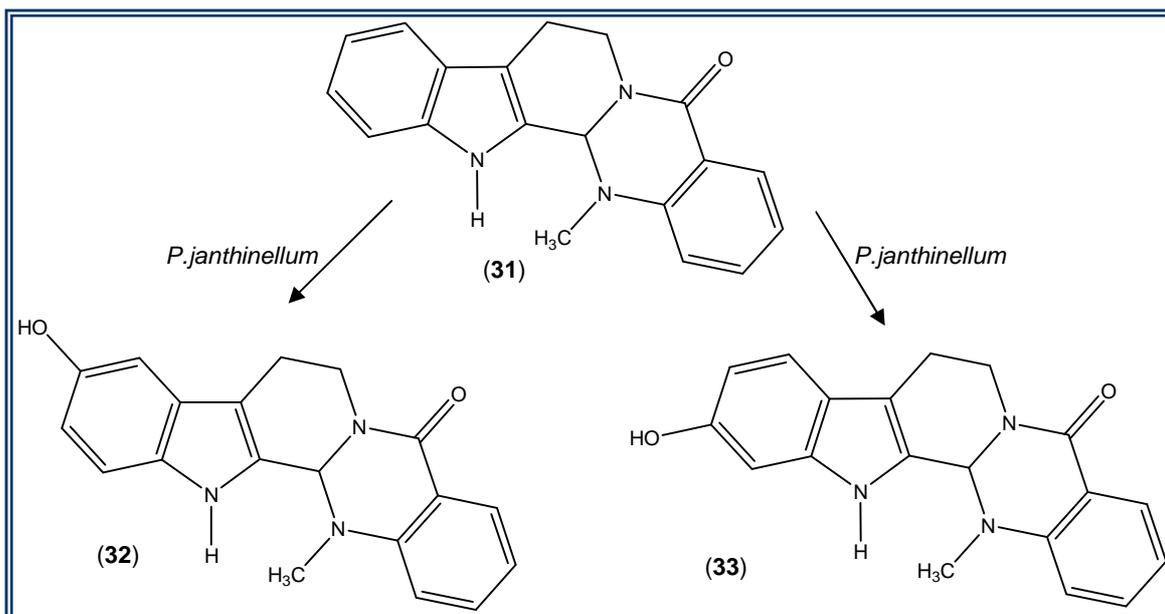


Figura 16 – Metabólitos (32) e (33) obtidos pela biotransformação da evodiamina (31) pelo fungo *P. janthinellum*, adaptado de Li *et al*, 2006.

O modelo de estudo retrospectivo é conduzido seguindo a exploração de rotas do metabolismo de mamíferos. Tais estudos podem ser usados para confirmar possíveis metabólitos de mamíferos, e servir posteriormente como documento e validação de biotransformação entre os dois sistemas (AZERAD, 1999).

Estudos do metabolismo do fármaco omeprazol (34) em humanos demonstraram completo e rápido metabolismo de fase I via enzimas do CYP450, levando principalmente à formação de omeprazol sulfona (35) e hidroxioimeprazol (36) (PEARCE & LUSHNIKOVA, 2006) (Figura 17). Primeiramente, foi estudado o metabolismo do (34) em cavalos e estudos *in vitro* utilizando *Cuninghamela elegans* reproduziram as transformações em seres humanos, obtendo cinco metabólitos dos quais três deles eram os mesmos obtidos *in vivo* (PEARCE & LUSHNIKOVA, 2006)

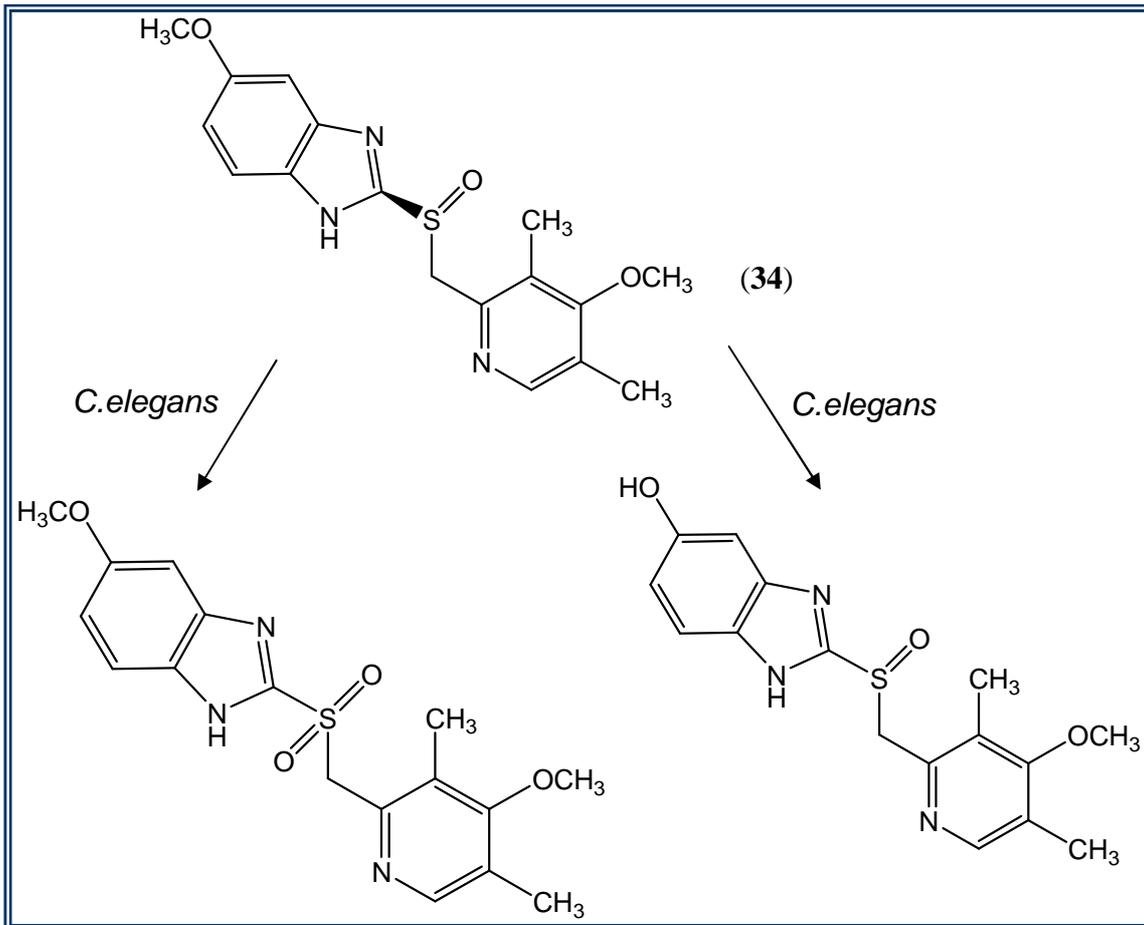


Figura 17 - Principais metabólitos formados pela biotransformação do omeprazol (34) por *C. elegans*, adaptado de Pearce & Lushnikova, 2006.

Os estudos de metabolismos podem ser conduzidos em paralelo, ou seja, os estudos de metabolismo em microrganismos são realizados paralelamente aos estudos *in vivo*. Esse tipo de estudo foi realizado para a trimegestona (37), um fármaco progestomimético e regulador da assimilação de cálcio para terapia da osteoporose. Foram utilizadas 41 cepas de fungos e 10 cepas de *Streptomyces*, e todos foram capazes de biotransformar a (37). Nove metabólitos foram identificados, sendo que oito foram obtidos por hidroxilação e um deles por epoxidação (Figura 18) (LACROIX et al, 1999).

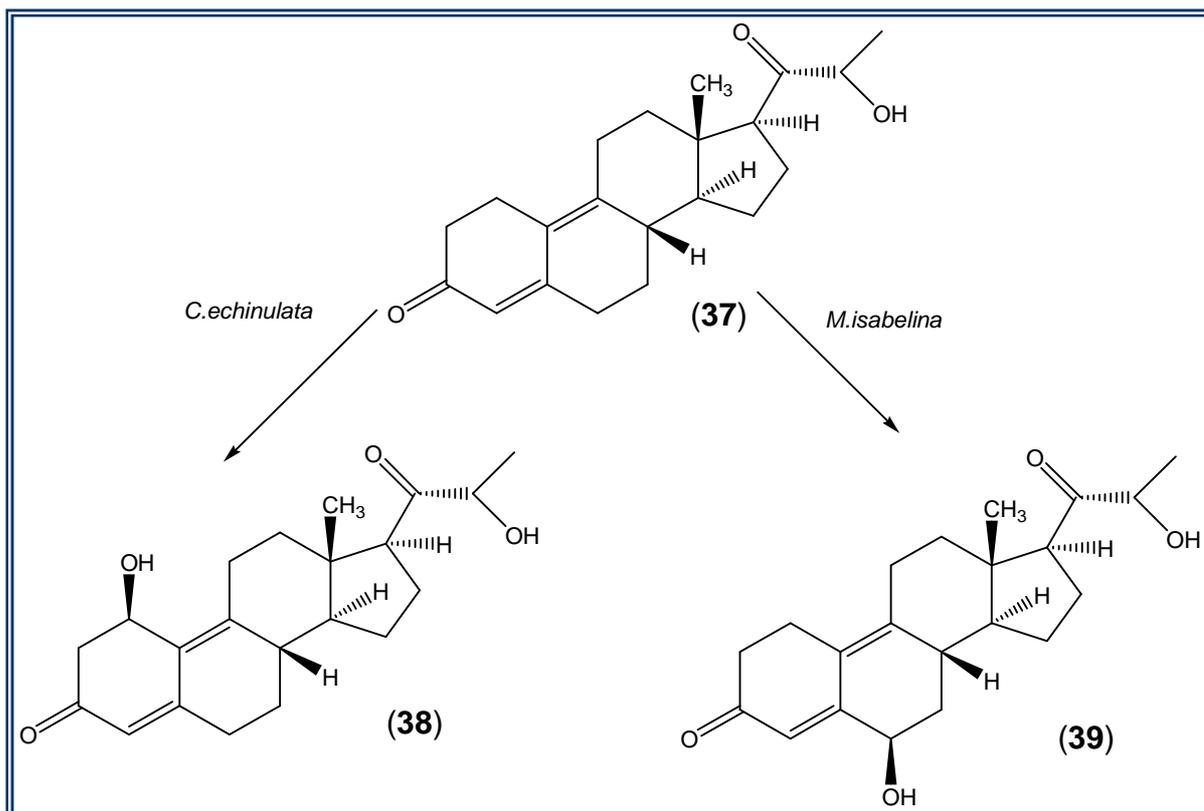


Figura 18 – Dois principais metabólitos produzidos pela biotransformação da (37). O metabólito (38) foi obtido majoritariamente por *C. echinulata* e o metabólito (39) foi obtido por biotransformação utilizando *M. isabelina*, adaptado de Lacroix et al, 1999.

2.9 Planejamento do composto LASSBIO 579

O perfil de atividade diferenciado da (28) resultou na gênese de novos análogos estruturais visando reproduzir sua ação antipsicótica sem, entretanto, apresentar seus efeitos adversos, através da aplicação de diferentes estratégias de modificação molecular (FRAGA et al, 2009).

Considerando a contínua necessidade de inovação no âmbito do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquizofrenia que possuam alta afinidade pelos receptores D₄ com limitada flexibilidade conformacional e ainda sejam desprovidos de efeitos colaterais hematológicos, foram obtidos a partir do planejamento estrutural, síntese e avaliação farmacológica, derivados heterocíclicos funcionalizados. MENEGATTI (2001) relatou a síntese de novos derivados *N*-fenilpiperazínicos através da simplificação molecular do ASG (28) e do candidato a protótipo antipsicótico L-741 (40), de modo a manter os grupamentos

farmacofóricos necessários para a interação com o bioreceptor alvo, *i.e.* os receptores dopaminérgicos (Figura 19).

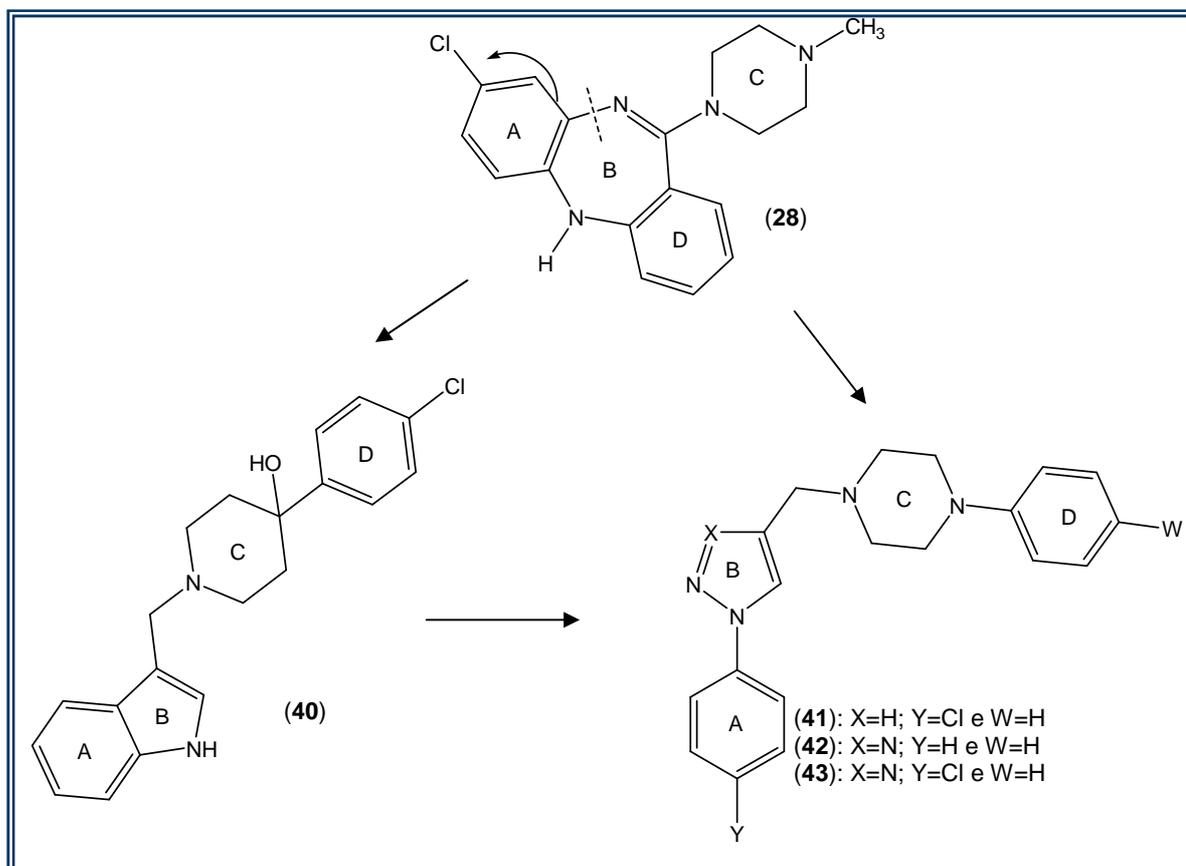


Figura 19 – Estratégia para o desenvolvimento dos candidatos a protótipos de fármacos *N*-fenilpiperazínicos, adaptado de Fraga *et al*, 2009.

Os candidatos a protótipo de fármacos LASSBio 579 (**41**) e LASSBio 581 (**43**) demonstraram perfil agonista de receptores dopaminérgicos D₂ e antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT, além de elevada segurança terapêutica enquanto o LASSBio 580 (**42**) apresentou perfil de antagonista de receptores D₂ dopaminérgicos (FRAGA *et al*, 2009).

GOMES (2007) utilizou fungos filamentosos (estudos *in vitro*) como modelo microbiano de metabolismo a fim de caracterizar os possíveis metabólitos obtidos pela biotransformação do candidato a protótipo de fármaco (**41**). Neste estudo, foi possível identificar um metabólito obtido pela hidroxilação na posição *para* do anel D 4-(4-((4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)metil)-1H-pirazol-1-il)fenol, denominado LaBioCon 23 (**44**) (GOMES, 2007) (Figura 20).

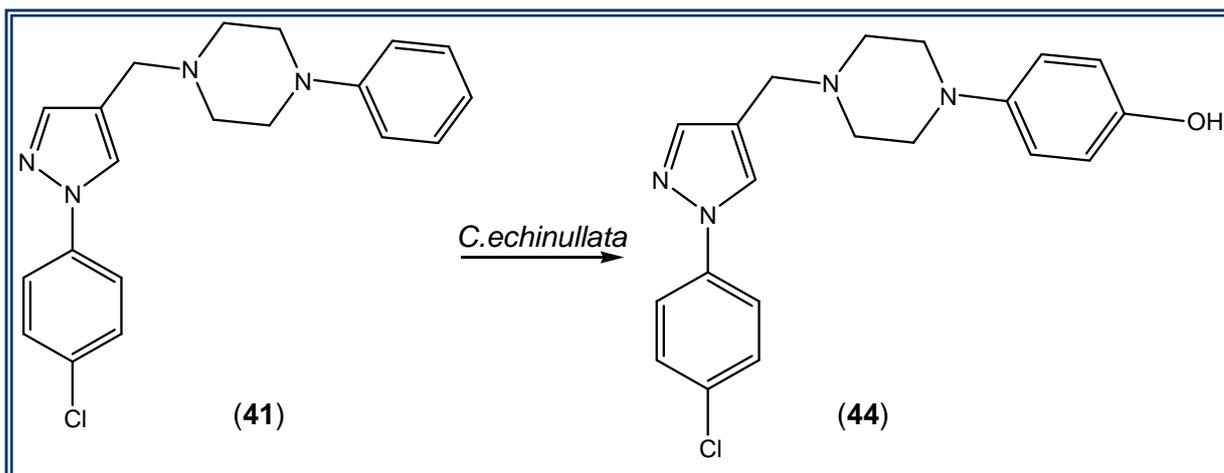


Figura 20 – Biotransformação do (40) via metabolismo *in vitro* utilizando *C.echinullata* produzindo metabólito (44), adaptado de Gomes, 2007.

Diante disso foi feita a proposta de que o anel A, ligado ao grupamento pirazol estaria protegido pelo substituinte Cl deixando então o anel D suscetível à metabolização. As moléculas obtidas 1-(4-nitrofenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-yl)metil)piperazina (45) e 1-(4-metoxifenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-yl)metil)piperazina (46) são derivados *N*-fenilpiperazínicos com estrutura molecular semelhantes ao composto (41). Foi considerada, ainda, a pseudosimetria da molécula (44), ou seja, que quando traçada uma linha na metade da molécula, as duas partes apresentariam comportamento semelhante. Foram utilizados substituintes que promovem a diminuição da densidade eletrônica (NO₂) e aumento da densidade eletrônica (OCH₃) propondo novos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos, a fim de observar se, submetidos ao metabolismo, haveria proteção do anel D e ataque ao anel desprotegido A.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, a síntese, a bioconversão e a avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos, descreveremos neste trabalho o planejamento, a síntese, bioconversão e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos LQFM 004 (**45**) e LQFM 005 (**46**) originalmente desenhados a partir do protótipo (**44**).

Os candidatos a protótipos de fármacos foram desenhados a partir do protótipo (**44**) com proteção do anel D a fim de observar sua suscetibilidade ao metabolismo, quando submetidos à bioconversão utilizando fungos filamentosos (Figura 21).

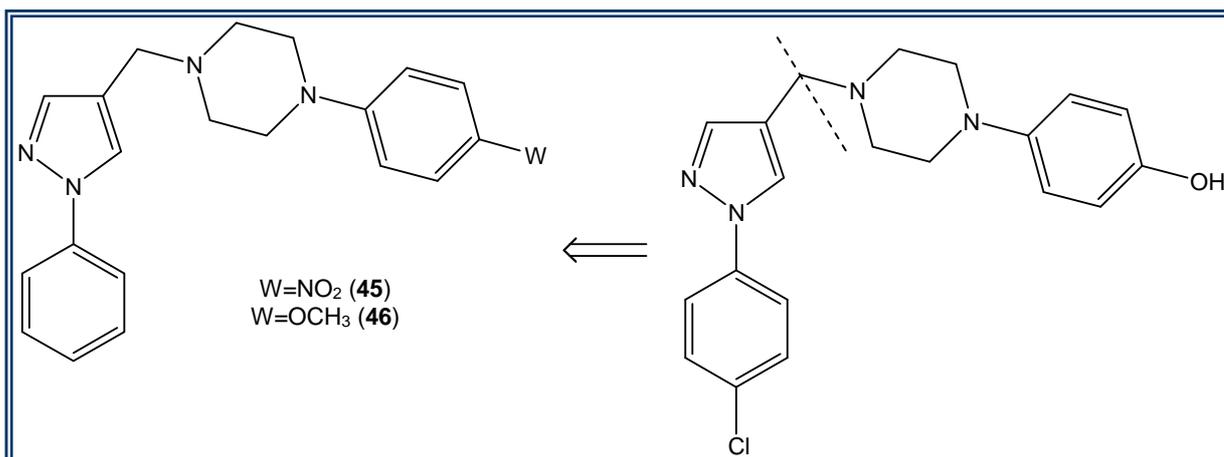


Figura 21 – Candidatos a protótipos de fármacos (**45**) e (**46**) originalmente planejados a partir do protótipo (**44**).

3.2 Objetivos específicos

- Planejar protótipos de fármacos antipsicóticos derivados *N*-fenilpiperazínicos.
- Sintetizar candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos derivados *N*-fenilpiperazínicos;
- Isolar os compostos sintetizados;
- Identificar os compostos sintetizados através de CCD, IV, RMN ¹H e ¹³C;
- Realizar ensaios eletroquímicos aos compostos sintetizados;
- Elucidar a estrutura do composto 1-(4-metoxifenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-yl)metil)piperazina por Difração de raios X;

- Biotransformar os compostos sintetizados utilizando fungos filamentosos;
- Isolar e identificar os metabólitos obtidos;
- Avaliar a atividade farmacológica *in vitro*;
- Proteger o anel D através do uso de grupamentos;
- Metabolizar o anel A.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parte experimental

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás no aparelho BRUKER Advance III 500 Hz. As amostras foram solubilizadas em CDCl_3 , contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (LCQM/UFG) no aparelho Perkin-Elmer Spectrum BXII FT-IR System.

Os espectros na região do ultravioleta (UV) foram obtidos no Laboratório de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (LCQM/UFG) no aparelho UV / vis Varian, modelo Cary 50 Bio. Foram solubilizados 5 mg do LQFM004 (**45**) e LQFM005 (**46**) em 10 mL de MeOH grau HPLC. Após a solubilização, 50 μL da solução anteriormente obtida foram adicionados à cubeta contendo 3 mL de MeOH.

A análise por cristalografia de raios-X foi realizada no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG) utilizando cristalógrafo multipolo de modelo Hansen-Coppens e a densidade eletrônica calculada pelo complexo $\text{Cu(II)-L-alanyl-Lvaline}$.

A análise de massas foi realizada utilizando como gás o nitrogênio (4×10^{-3} mbar) com energias de colisão entre 30 e 60 eV em espectrômetro de massa modelo Q TRAP® 4000 (Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) no Laboratório de Toxicologia da UFG.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Gehaka Modelo PF1500, no LCQM/UFG.

Foram usadas placas de alumínio da marca Whatman® F 254, 0,2 mm de espessura utilizando como fase móvel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$) 95:5 para o monitoramento das reações em cromatografia em camada delgada (CCD). As cromatoplasmas foram visualizadas em câmara de lâmpada ultravioleta nos comprimentos de 254 e 365 nm.

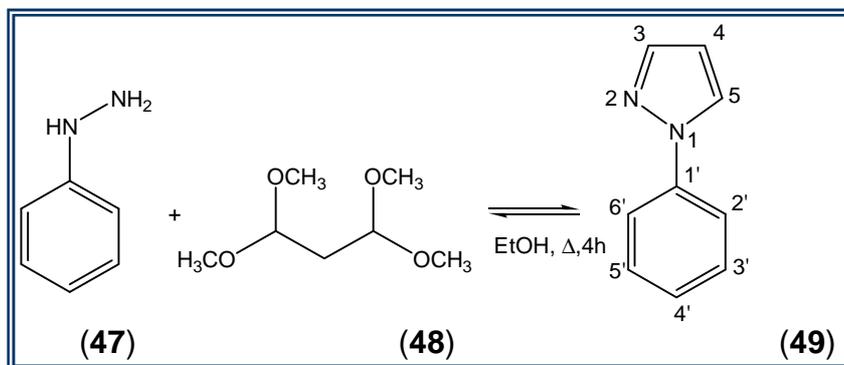
Para cromatografia de adsorção em coluna foi utilizado a Sílica Gel 60 da VETEC QUÍMICA FINA LTDA 70-230 mesh como fase estacionária e *n*-hexano:acetato de etila como fase móvel.

A acidificação e neutralização, quando necessárias, foram realizadas através do emprego de solução de HCl 10% (v/v) e solução de NaHCO₃ 10% (p/v), respectivamente. A neutralização foi monitorada com papel indicador de pH da marca Merck.

A fase orgânica das reações foi tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida.

4.2 Metodologia sintética

4.2.1 Procedimento para a síntese de fenil-1*H*-pirazol (49) (FINAR e HURLOCK, 1957; FREITAS et al, 1991).



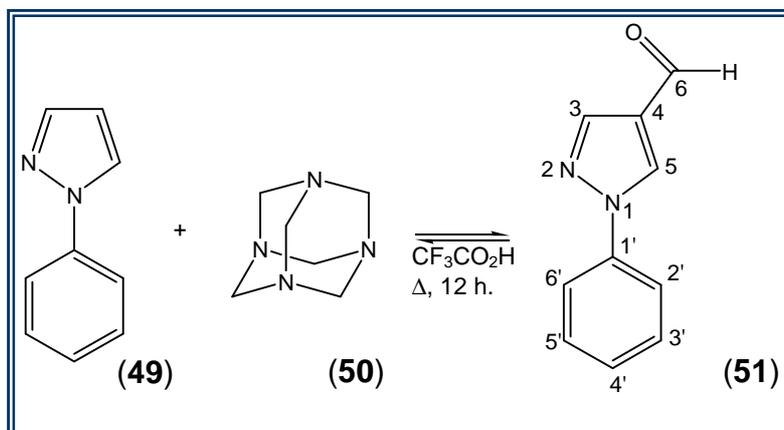
Foram adicionados em um balão de 50 mL, acoplado a um condensador, 15,51 mmol de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (48) e 15,51 mmol de 1-fenilhidrazina (47), em 15,5 mL de etanol como solvente e 0,78 mL de HCl concentrado. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por uma hora e, após, resfriada à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi neutralizada com solução de NaHCO₃ 10% e extraída com quatro alíquotas de 15 mL de CH₂Cl₂. Após a fase orgânica ser tratada com Na₂SO₄, filtrada e evaporada à pressão reduzida, o produto obtido foi submetido à purificação em cromatografia de adsorção em coluna. Foram obtidos 2,11g (94%) de 1-fenil-1*H*-pirazol (49), como um óleo vermelho, R_f= 0,68 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5).

RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (ppm): 7,73 (1H, d, J=1,5Hz, H-3 e 5); 7,69 (2H,dd, J=1,2 e 9,5Hz, H-2' e 6'); 7,45 (2H, dd, J=7,6 e 9,5Hz, H-3' e 5'); 7,28 (1H,dd, J=1,2 e 9,5Hz, H-4'); 6,46 (1H, dd, J=1,5 e 2,3Hz, H-4);

RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (ppm): 140,9 (1C, C-3); 140,1 (1C, C-1'); 129,4 (2C, C-3' e 5'); 126,8 (1C, C-5); 126,4 (1C, C-4'); 119,2 (2C, C-2' e 6'); 107,6 (1C, C-4).

I.V Máx.(KBr) cm⁻¹ : 1615-1700 (C=C e C=N); 700-750 (benzeno).

4.2.2 Procedimento para a formilação de 1-fenil-1*H*-pirazol-4-carbaldeído (52) (BLAZEVIC *et al*, 1979)



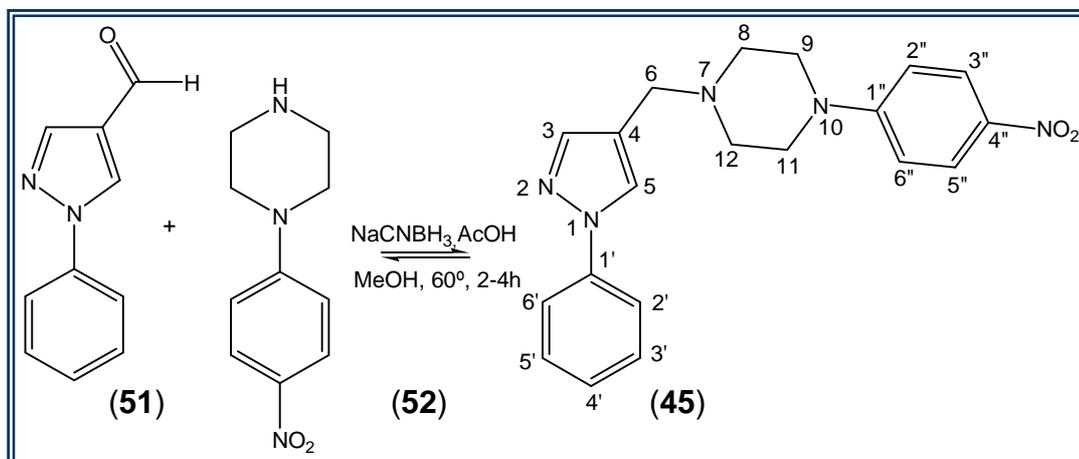
Em um balão de 50 mL, acoplado a um condensador, foram adicionados 4,0 mmol de (49), 6,0 mmol de hexametilenotetramina (50) e 5,0 mL de ácido trifluoracético. A mistura reacional permaneceu sob agitação e refluxo por 12 horas. Ao termino da reação, a mistura reacional foi vertida em um béquer de 100 mL contendo gelo moído e neutralizada através da adição de NaHCO₃ 10%, lentamente. O produto precipitado foi filtrado a vácuo e seco à temperatura ambiente. Foram obtidos 2,31g (97%) do intermediário 1-fenil-1*H*-pirazol-4-carbaldeído (51), como um pó marrom, P.F.= 61-68°C, Rf= 0,64 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5).

RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (ppm): 8,18 (1H, s, H-3); 8,15 (1H, s, H-5); 7,74-7,70 (2H, m, H-3' e 5'); 7,54-7,49 (2H, m, H-2' e 6'); 7,42-7,38 (1H, m, H-4'); 10,3 (1H, s, H6).

RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (ppm): 184,1 (1C, C-6); 141,7 (1C, C-3); 139,0 (1C, C-1'); 129,7 (2C, C-2' e 6'); 128,0 (1C, C-4'); 125,5 (1C, C-4); 120,0 (1C, C-5); 119,7 (2C, C-3' e 5');

I.V Max.(KBr) cm⁻¹ : 2720, 2820 (aldeído); 1546-1507 (C=C e C=N).

4.2.3 Procedimento para a síntese do 1-(4-nitrofenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-il)metil)piperazina (45).



Em um balão de fundo redondo de 10 mL, acoplado a um condensador, foram adicionados 0,70 mmol de aldeído (51) e 0,70 mmol de 1-(4-nitrofenil)piperazina (52), 3,0 mL de metanol e o pH da solução ajustado ~ 6,00 pela adição de ácido acético. Na sequência, foram adicionados 4,07 mmol de NaCNBH₃ e a temperatura elevada a 60-65°C, pelo tempo de duas horas. Após o término da reação, a mistura reacional foi resfriada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto concentrado foi neutralizado empregando 40,0 mL de solução de NaHCO₃ 10% e extraído com três alíquotas de 10 mL de CH₂Cl₂. O produto obtido foi solubilizado a quente em etanol, vertido em gelo picado e filtrado a vácuo. O composto (45) foi submetido à purificação através de cromatografia de adsorção em coluna. Foram obtidos 0,187g (87%) de 1-(4-nitrofenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-yl)metil)piperazina (45), como um sólido amarelo, P.F.=134°C, R_f=0,67 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5)

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ (ppm): 8,05-8,20 (2H, m, H-3'' e 5''); 7,90 (1H, s, H-2); 7,60-7,80 (3H, m, H-4, 2' e 6'); 7,40-7,55 (2H, m, H-3' e 5'); 7,22-7,35 (1H, m, H-4'); 6,75-6,90 (2H, m, H-2'' e 6''); 3,60 (2H, s, H-6a e 6b); 3,35-3,45 (4H, m, H-9a, 9b, 11a e 11b); 2,55-2,70 (4H, m, H-8a, 8b, 12a e 12b);

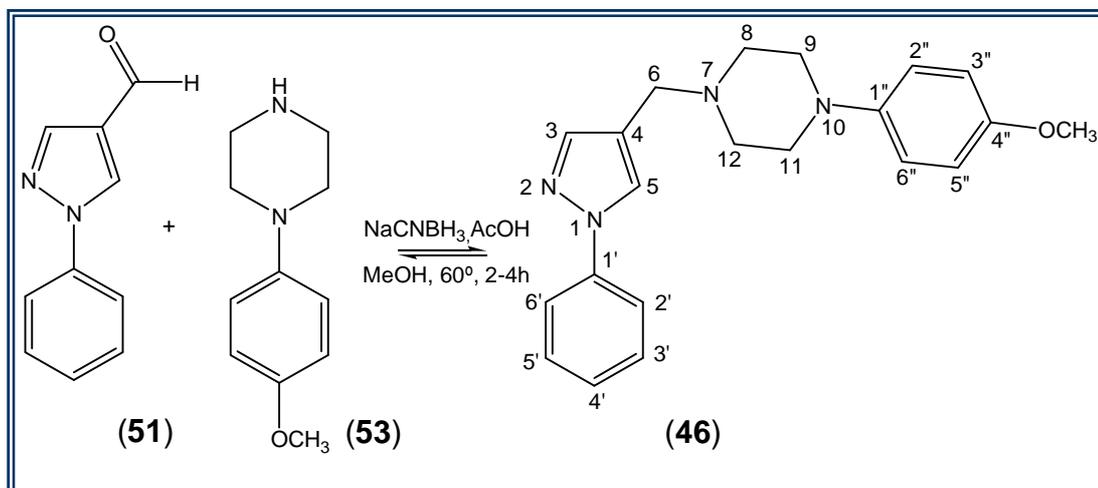
RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (ppm): 129,7 (C-3'); 126,7 (C-5); 126,2 (C-4'); 119,3 (C-3); 119,1 (C-2'); 112,8 (C-2'' e 6''); 52,7 (C-8 e 12); 52,5 (C-6); 47,7 (C-9 e 11).

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹:1523 (C=C e C=N); 1300 (C-NO₂); 850 (C-H);760 (C-H)

UVλ^{MeOH} max nm (log ε): 378,0 (0,649); ε_{MAX}= 28.427

UVλ^{MeOH} max nm (log ε): 250,0 (0,729); ε_{MAX}= 31.93

4.2.4 Procedimento para a síntese do 1-(4-metoxifenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-il)metil)piperazina (46)



Em um balão de 10 mL, acoplado a um condensador, foram adicionados 0,70 mmol de aldeído (51) e 0,70 mmol de 1-(4-metoxifenil)piperazina (53), 3,0 mL de metanol e o pH da solução ajustado ~ 6,00 pela adição de ácido acético. Na sequência, foram adicionados 4,07 mmol de NaCNBH₃ e a temperatura elevada a 60-65°C, pelo tempo de duas horas. Após o termino da reação, a mistura reacional foi resfriada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto concentrado foi neutralizado empregando 40,0 mL de solução de NaHCO₃ 10% e extraído com três alíquotas de 10 mL de CH₂Cl₂. O produto obtido foi solubilizado a quente em etanol, vertido em gelo picado e filtrado a vácuo. O composto (45) foi submetido à purificação através de cromatografia de adsorção em coluna. Foram obtidos 0,194g (90%) de 1-(4-metoxifenil)-4-((1-fenil-1H-pirazol-4-yl)metil)piperazina (45), como um sólido bege, P.F.=129°C, R_f=0,55 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5)

RMN - ¹H (500 MHz) CDCl₃ (ppm): 7,90 (1H, s, H-2); 7,65-7,75 (3H, m, H-4, 2' e 6'); 7,40-7,50 (2H, m, H-3' e 5'); 7,25-7,30 (1H, m, H-4'); 6,85-6,90 (2H, d, H-3'', e 5''); 6,75-6,80 (2H, d, H-2'' e 6''); 3,75 (3H, s, H-14); 3,55 (2H, s, H-6a e 6b); 3,05-3,15 (4H, m, H-9a, 9b, 11a e 11b); 2,65-2,75 (4H, m, H-8a, 8b, 12a e 12b).

RMN - ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (ppm): 153,6 (C-4''); 145,6 (C-1''); 141,8 (C- 3); 139,9 (C-1'); 129,4 (C-3' e 5'); 126,6 (C-5); 126,3 (C-4'); 119,3 (C-4); 118,9 (C-2' e 6'); 116,3 (C-3'' e 5''); 114,4 (C-2'' e 6''); 55,5 (C-14); 53,0 (C-8 e 12); 52,5 (C-6); 50,6 (C-9 e 11)

I.V. Máx. (KBr) cm⁻¹: 1595-1498 (C=C e C=N); 1245 (C-O-C); 1036 (C-O-C);

UVλ^{MeOH} max nm (log ε): 256,0 (0,650); ε_{MAX}= 27.310

4.3 Bioconversão

4.3.1 Técnica cromatográfica

A Cromatografia em camada delgada (CCD) foi a metodologia analítica empregada no monitoramento das reações de bioconversão para determinação de derivados funcionalizados a partir dos compostos (45) e (46).

Na CCD foram utilizados cromatofolhas de alumínio TLC 20X20 cm sílica gel 60 F₂₅₄, espessura da camada de sílica de 0,25 cm (placa analítica) Merck® e as fases móveis acetato de etila/metanol 20:80, acetato de etila/metanol 60:40, acetato de etila/metanol 95:05. As placas cromatográficas foram visualizadas em luz UV a 254 nm e 365 nm e os diferentes valores de R_f foram determinados.

O composto (45) foi solubilizado em dimetilformamida e o composto (46) foi solubilizado em etanol P.A. obtendo soluções de concentração 10 mg/mL para triagem e 50 mg/mL para ensaio em escala semipreparativa.

4.3.2 Técnicas microbiológicas

4.3.2.1 Microrganismos

Para a realização da triagem foram selecionados quatorze microrganismos procedentes de duas coleções diferentes. Uma das coleções era a “American Type Culture Collection”, Rockville, Md, USA – ATCC. Da mesma utilizamos os seguintes microrganismos:

- *Absidia blaskeleana* ATCC 26617
- *Absidia blaskeleana* ATCC 10148b
- *Aspergillus candidus* ATCC 2023
- *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009
- *Beauveria bassiana* ATCC 7149
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245
- *Cunninghamella elegans* ATCC 36112
- *Cunninghamella elegans* ATCC 26169
- *Fusarium roseum* ATCC 14717

- *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a
- *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145

Dois microrganismos foram selecionados da coleção “Northern Utilisations Research and Development Division”, Peoria-Illions, USA –NRRL:

- *Curvularia lunata* NRRL 2380
- *Mortierella isabelina* NRRL1757

O agar batata foi o meio de cultura escolhido para manutenção dos microrganismos.

4.3.3. Meio de cultura

Para a obtenção do meio de cultura agar batata, 39 gramas de produto foram solubilizados em um litro de água destilada, sob radiação microondas. Distribuiu-se 7 mL em cada tubo de ensaio.

Para o meio líquido “Potato Dextrose Soy Médium” (PDSM), os seguintes produtos foram utilizados:

Peptona bacteriológica	(Synth®)	5g
D-glicose anidra (Dextrose)	(Synth®)	20g
Cloreto de sódio	(Vetec®)	5g
Fosfato de sódio monobásico	(Synth®)	5g
Extrato de levedura	(Vetec®)	3g
Lecitina de soja	(INLAB®)	5g
Água destilada		1000mL

Os produtos foram pesados separadamente e solubilizados em 1000 mL de água. Porções de 100 mL de meio foram distribuídas em Erlenmeyers de 250 mL de boca larga.

Ambos os meios foram esterilizados antes do uso em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.3.4. Manutenção das cepas

Todas as cepas utilizadas foram mantidas em tubos contendo agar batata e armazenados a 4°C em refrigerador. Utilizou-se glicerol (Merck®) 25% como veículo de transporte dos esporos para tubos de ensaio contendo meio sólido agar batata

inclinado e incubados por sete dias a 25°C em câmara germinativa BOD (Modelo TE 401, TECNAL®) para o crescimento da cultura. Ao final desse período, observaram-se as características macroscópicas de cada uma das colônias e procedeu-se a inoculação das mesmas nos meios de cultura utilizados.

4.3.5. Triagem

A triagem foi realizada para avaliar a capacidade das cepas de bioconverter os compostos **(45)** e **(46)** em uma maior variedade de derivados ou a produção de algum deles em maior quantidade.

Treze microrganismos foram inicialmente cultivados em meio agar batata inclinado, mantidos por sete dias a 25°C em câmara climática para crescimento. Após esse período, inoculou-se uma gota da suspensão de esporos em glicerol 25% em Erlenmeyers de 250 mL de boca larga, contendo 100 mL de meio líquido PDSM que foram mantidos em incubador rotativo (TE 420, TECNAL®) a 27° C, 200 rpm.

O composto **(45)** foi pesado e solubilizado em etanol para obtenção de uma solução de concentração 10 mg/mL enquanto que o composto **(46)** foi solubilizado em dimetilformamida e após 65 horas de incubação e crescimento, os Erlenmeyers foram retirados da incubadora, onde adicionou-se 1mL de solução de 10 mg/mL do composto em cada um dos erlenmeyers inoculado com cada uma das cepas, resultando em uma concentração final do substrato de 0,1 gL⁻¹.

Os erlenmeyers retornaram à incubadora rotativa à 27°C, 200 rotações/minuto, após 24, 48, 72, 96 horas de incubação, alíquotas foram retiradas do meio reacional, utilizando pipetas de Pasteur e transferidas para erpendorfs. Esses erpendorfs contendo as amostras foram centrifugados em micro centrífuga FANEM® modelo 243 para obtenção do sobrenadante de incubação. Os sobrenadantes de incubação obtidos para uma análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram saturados com cloreto de sódio, extraídos com acetato de etila e aplicados e cromatofolhas de alumínio TLC 20X20 cm sílica gel 60 F₂₅₄.

4.3.6 Incubação em escala Semipreparativa

Após análises dos sobrenadantes de incubação de todas as cepas por CCD, o procedimento descrito para a triagem foi repetido em uma escala semi-preparativa

utilizando 500 mg dos compostos (45) e (46), utilizando erlenmeyers inoculados com *A. candidus*.

4.3.6.1. Filtração e extração

Ao término do tempo de incubação, a biomassa contida nos erlenmeyers foi separada por filtração em funil de Buchner com gase sob vácuo. O filtrado foi saturado com cloreto de sódio (Vetec®) e novamente filtrado em funil de Buchner contendo celite sob vácuo. Após essa filtração a solução denominada “Fração aquosa antes da extração” foi transferida para um funil de separação e extraída com três partes (250 mL) de acetato de etila para obtenção de duas frações: uma fração aquosa após extração (fração aquosa I) e uma fração acetato de etila. À fração acetato de etila adicionou-se sulfato de magnésio anidro. Filtrou-se em funil de vidro sinterizado e o solvente foi evaporado sob vácuo resultando em um extrato bruto para posterior separação e purificação dos produtos formados (Figura 22).

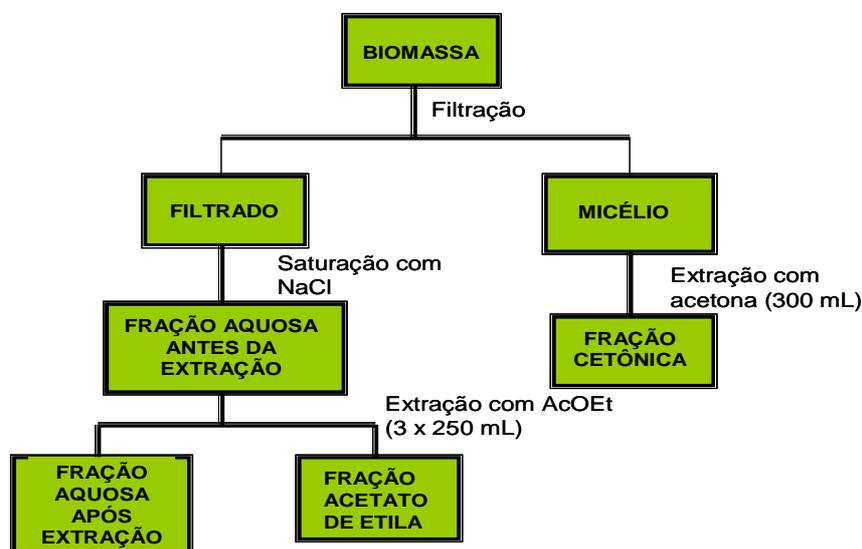


Figura 22 – Processo de extração dos derivados após incubação.

O micélio separado durante a filtração da biomassa foi extraído com acetona (300 mL) sob agitação constante em agitador magnético, por cerca de três horas, sendo posteriormente filtrado em papel de filtro e a solução obtida foi evaporada sob vácuo, resultando em uma fração cetônica .

4.3.6.2. Purificação e isolamento

Inicialmente, foi colocada à coluna cromatográfica uma pequena camada de lã de vidro e sobre esta uma camada de areia. A sílica gel 60, Vetec[®], 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) foi suspensa na fase móvel (acetato de etila/metanol 95:05) e transferida, com auxílio de um funil, toda essa fase estacionária para a coluna de vidro. Posteriormente, fez-se a compactação dessa sílica com vácuo até formação de uma coluna com 22 cm. O extrato bruto compactado com sílica gel foi aplicado na coluna e a fase móvel adicionada lentamente e de maneira contínua. Volumes de 5 mL foram coletados em tubos de ensaio e aplicadas em cromatoplasmas para o acompanhamento. Os tubos contendo as frações de mesmo R_f foram agrupados e evaporados.

Solventes de diferentes polaridades como diclorometano, hexano, acetato de etila, metanol e água foram utilizados para a separação dos produtos que foram acompanhados por CCD. A recristalização foi empregada na purificação dos derivados como método adicional à cromatografia em coluna.

Uma vez purificados os três compostos foram enviados para análises de EM, RMN de ¹H.

4.4. Ensaio eletroquímico

Todas as curvas voltamétricas foram obtidas utilizando-se um potenciostato μ Autolab (Utrecht, Holanda) integrado ao software Gpes 4.9 (Eco Chemie). Os ensaios eletroquímicos foram realizados em célula convencional (10mL) de três eletrodos: um eletrodo de calomelano (ESC) foi usado como eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

Os eletrólitos utilizados foram soluções aquosas de acetato de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio e cloreto de sódio, todos à 0,1 mol/L, em pHs 5, 7 e 9.

Foram adicionadas alíquotas de 250 μ L de soluções alcólicas de **(45)** e **(46)**.

4.5 Ensaio farmacológico

4.5.1. Ensaio de binding

A afinidade dos compostos pelos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos foi determinada pelos ensaios de ligação ou binding. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo professor Dr. François Noel.

O tecido utilizado para o ensaio de afinidade pelos receptores 5-HT₂ foi o córtex do cérebro de ratos. A [3H]-ketanserina foi utilizada na concentração de 1nM como antagonista, ketanserina 1mM como ligante não-específico e como controle positivo ketanserina (CI₅₀: 2 nM – Ki = 0,8 nM).

O hipocampo foi o tecido cerebral utilizado para o ensaio de afinidade pelos receptores 5-HT_{1A}. [3H]-8-OH-DPAT (1 nM) foi o ligante agonista escolhido, 5-HT (10 µM) o ligante não-específico e como controle positivo 8-OH-DPAT (IC₅₀: 1.4 nM; Ki = 0,8 nM). Os receptores 5-HT_{1A} são expressos como auto-receptores pelos neurônios 5-HT nos núcleos da rafe e são também amplamente distribuídos no sistema límbico onde seriam os alvos principais dos fármacos usados para tratar ansiedade e depressão (agonistas 5-HT_{1A} tem efeito ansiolítico e antidepressivo). Alguns antipsicóticos atípicos (aripirazol) possuem um efeito agonista parcial nestes receptores (NOEL, 2010).

Para o ensaio de afinidade pelos receptores dopaminérgicos do tipo D₂ foi escolhido como tecido estriatum de cérebro de rato homogeneizado com o ligante [3H]-YM-09151-2 (0,1 nM) que é antagonista. Como ligante não específico foi utilizado Sulpirida (30 µM) e aripirazol (IC₅₀: 3 nM) controle positivo.

Esse método permite caracterizar a capacidade de modular a atividade intrínseca como agonista ou antagonista, em função da manipulação da estrutura química. Este perfil de propriedades indicou que além da atividade antipsicótica, decorrente do antagonismo de receptores dopaminérgicos D₂, seria possível explorar ações terapêuticas decorrentes do agonismo desse subtipo de receptores, como para o tratamento da disfunção erétil (MENEGATTI, 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Análise retrossintética

Como podemos observar através da Figura 23, as moléculas objeto de estudo (45) e (46), podem ser obtidas através da desconexão C-N, a partir dos intermediários (51) e (52) e (53). O intermediário aldeídico (51) pode ser obtido, pela desconexão da ligação C-C, a partir do intermediário (49). Por sua vez, o intermediário (49) pode ser obtido a partir da desconexão consecutiva de duas ligações C-N, a partir do material de partida (47).

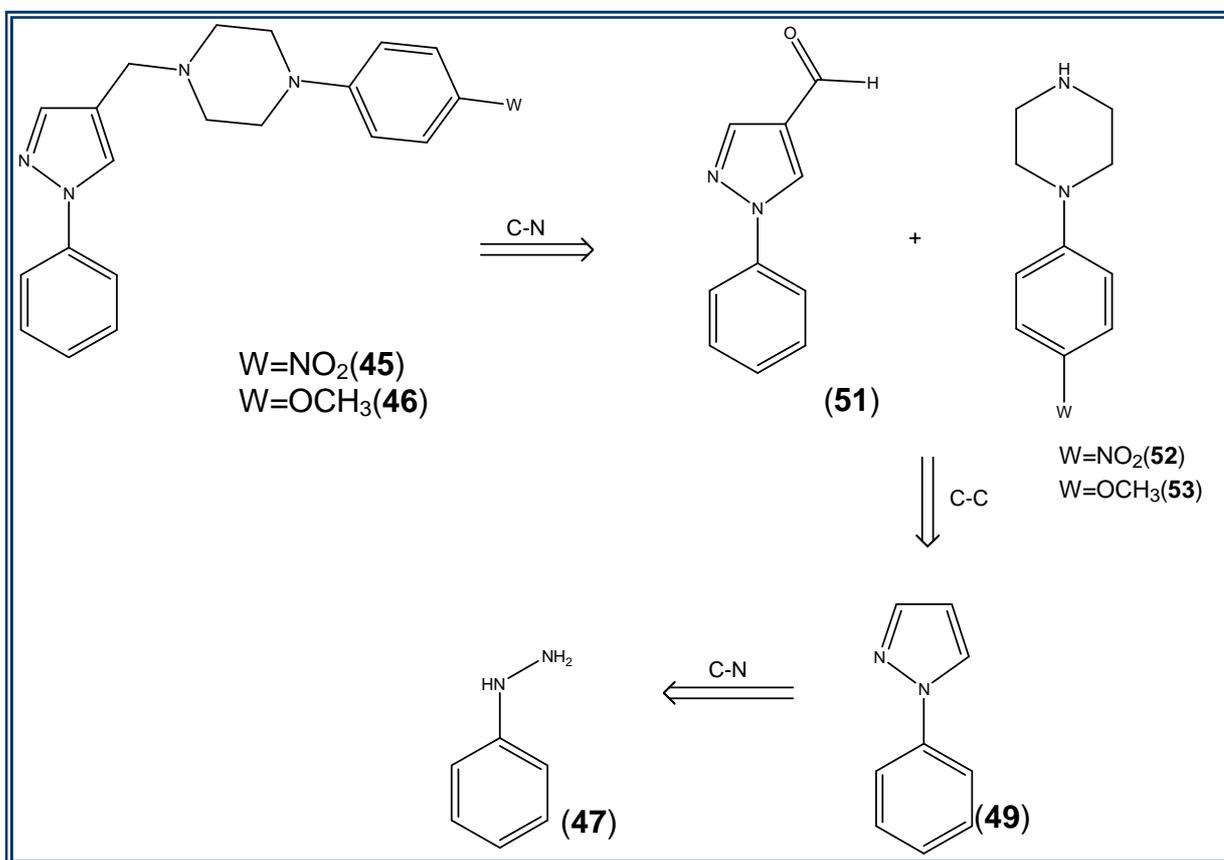
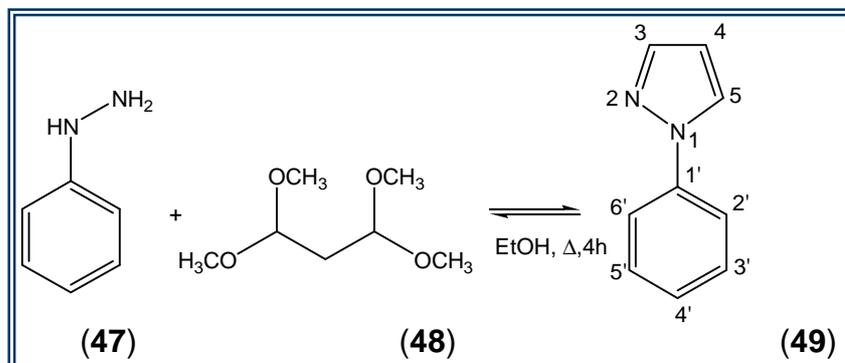


Figura 23 – Análise retrossintética dos compostos (45) e (46).

5.1.1 – Intermediário chave 1-fenil-1H-pirazol (49)

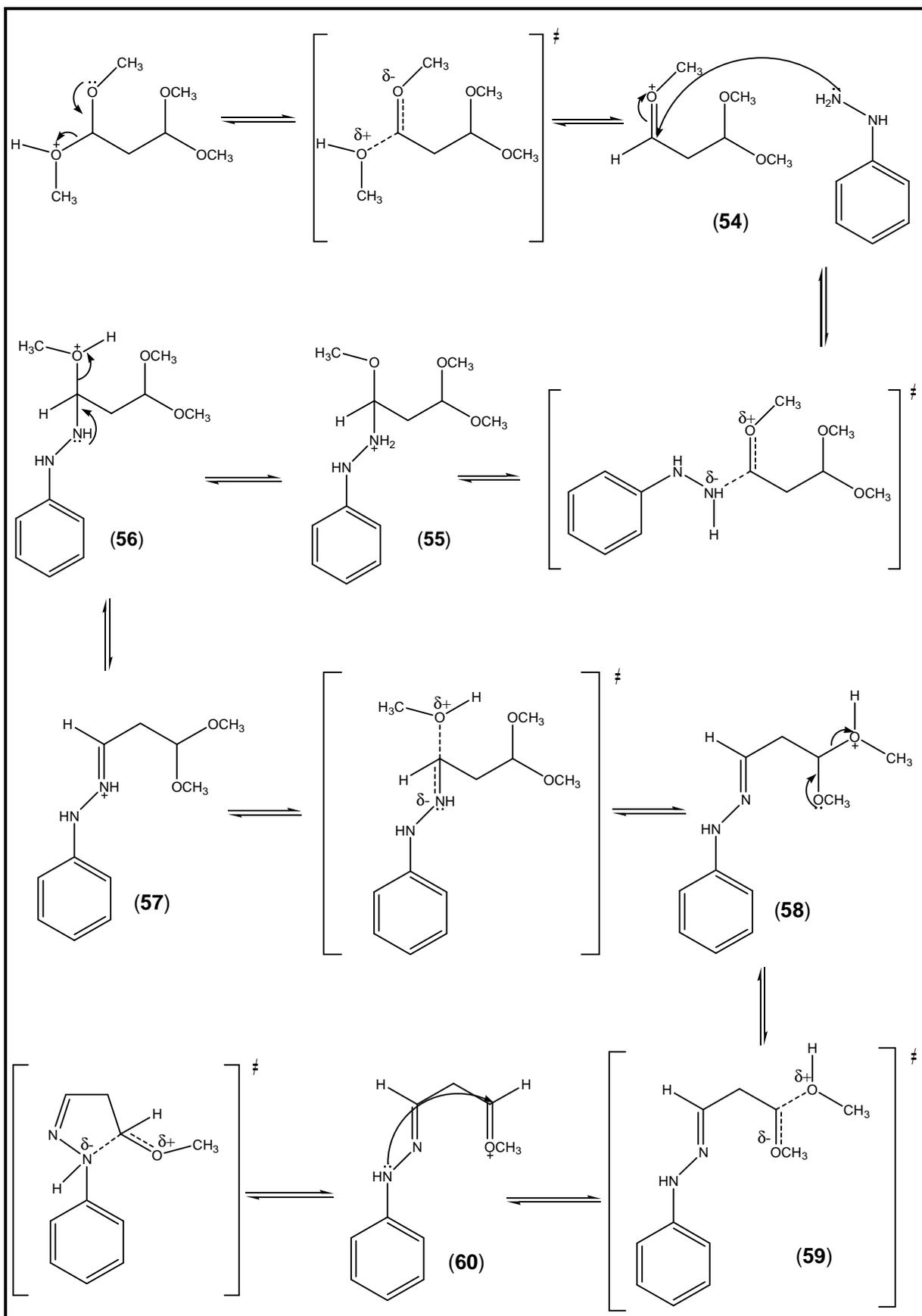
A Figura 13 ilustra a rota sintética empregada na obtenção do intermediário-chave 1-fenil-1H-pirazol (49). Como se observa, o reagente (47) é condensado com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (48), em etanol, sob catálise ácida, levando à obtenção

do intermediário (**49**), em rendimento de 94%, baseado no procedimento empregado por Finar e Hurlock em 1957.



A reação de condensação entre amina (**47**) e acetais (**48**) catalisada por ácido, é constituída pela formação do íon oxônio (**54**), seguida das etapas de adição e de eliminação. Devido ao fato da hidrazina (**47**) ser uma diamina e (**48**) ser um diacetal, a formação do composto *N*-fenilpiperazínico (**49**) ocorre através de dois processos consecutivos. O meio ácido, é necessário para promover a formação do íon oxônio (**54**), que na etapa subsequente irá sofrer ataque da amina (**47**), levando à formação do intermediário de adição (**55**), que se caracteriza como etapa lenta. Sucessivas transferências de prótons tornarão a metoxila protonada (**56**) um melhor grupo abandonador na etapa de eliminação, culminando com a formação do intermediário (**57**) (Figura 24).

Novas transferências de prótons levarão à formação de outro intermediário oxônio (**58**), que na sequência sofre ataque do outro átomo de nitrogênio presente na *N*-fenilidrazina na etapa de adição, logrando na formação do intermediário tetraédrico (**59**), que também caracteriza a etapa lenta. Por fim, sucessivas transferências de prótons tornarão a metoxila protonada (**60**) um melhor grupo abandonador na etapa de eliminação, culminando com a formação do intermediário (**61**) (Esquema 1). A aromatização do anel pirazólico (**62**), é obtida pela abstração de um dos átomos de hidrogênio da posição 4, por ação de uma base do meio, restituindo o par de elétrons do átomo de nitrogênio que participou da etapa de eliminação anterior (WARREN *et al*, 2001).



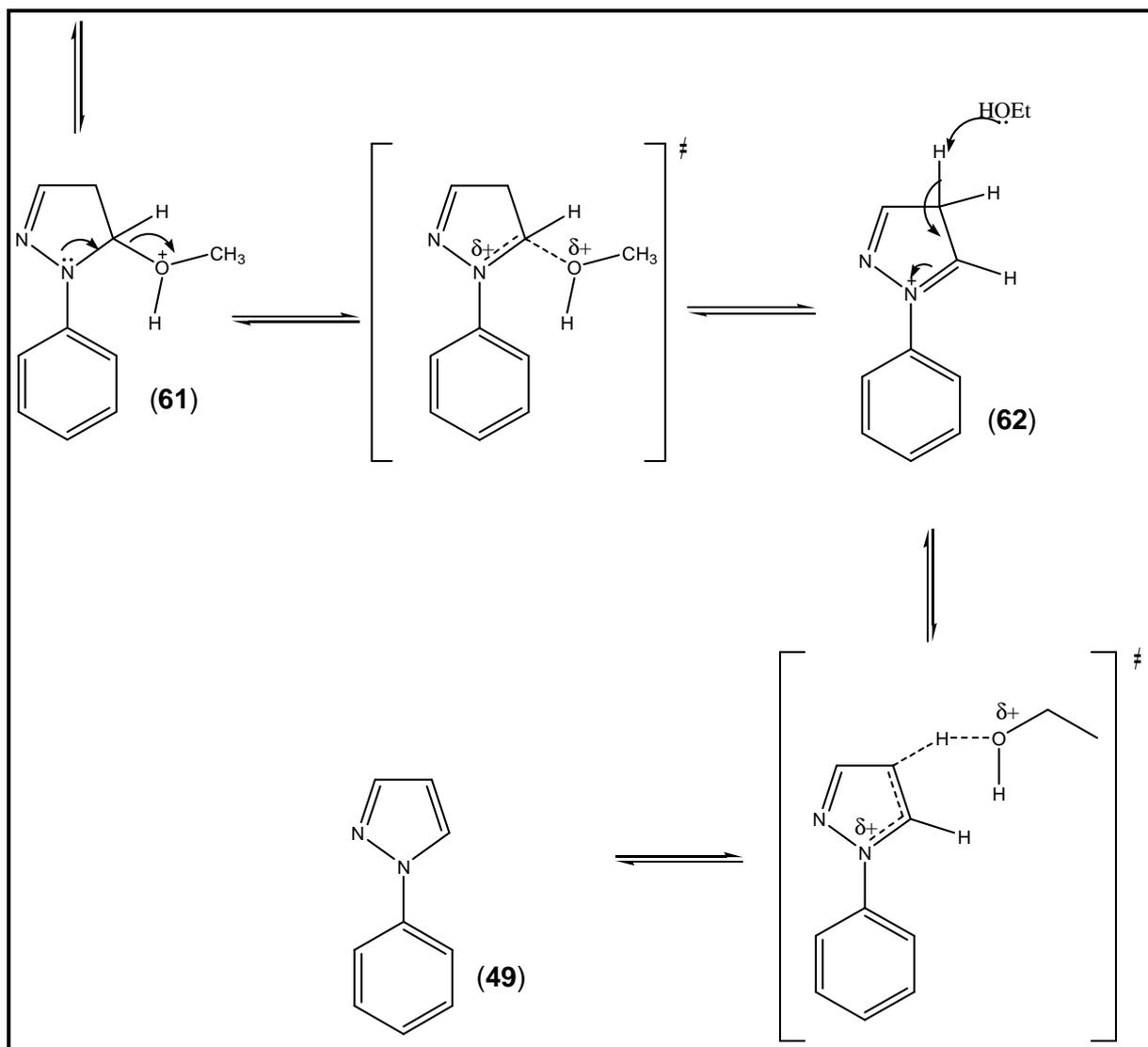
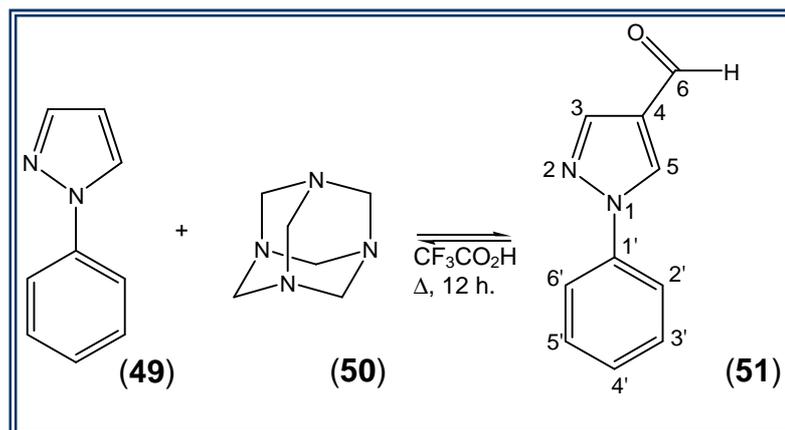


Figura 24 – Mecanismo de reação de condensação para obtenção do intermediário (49), adaptado de Warren *et al*, 2001.

5.1.2 Intermediário chave 1-fenil-1H-pirazol-4-carbaldeído (51)

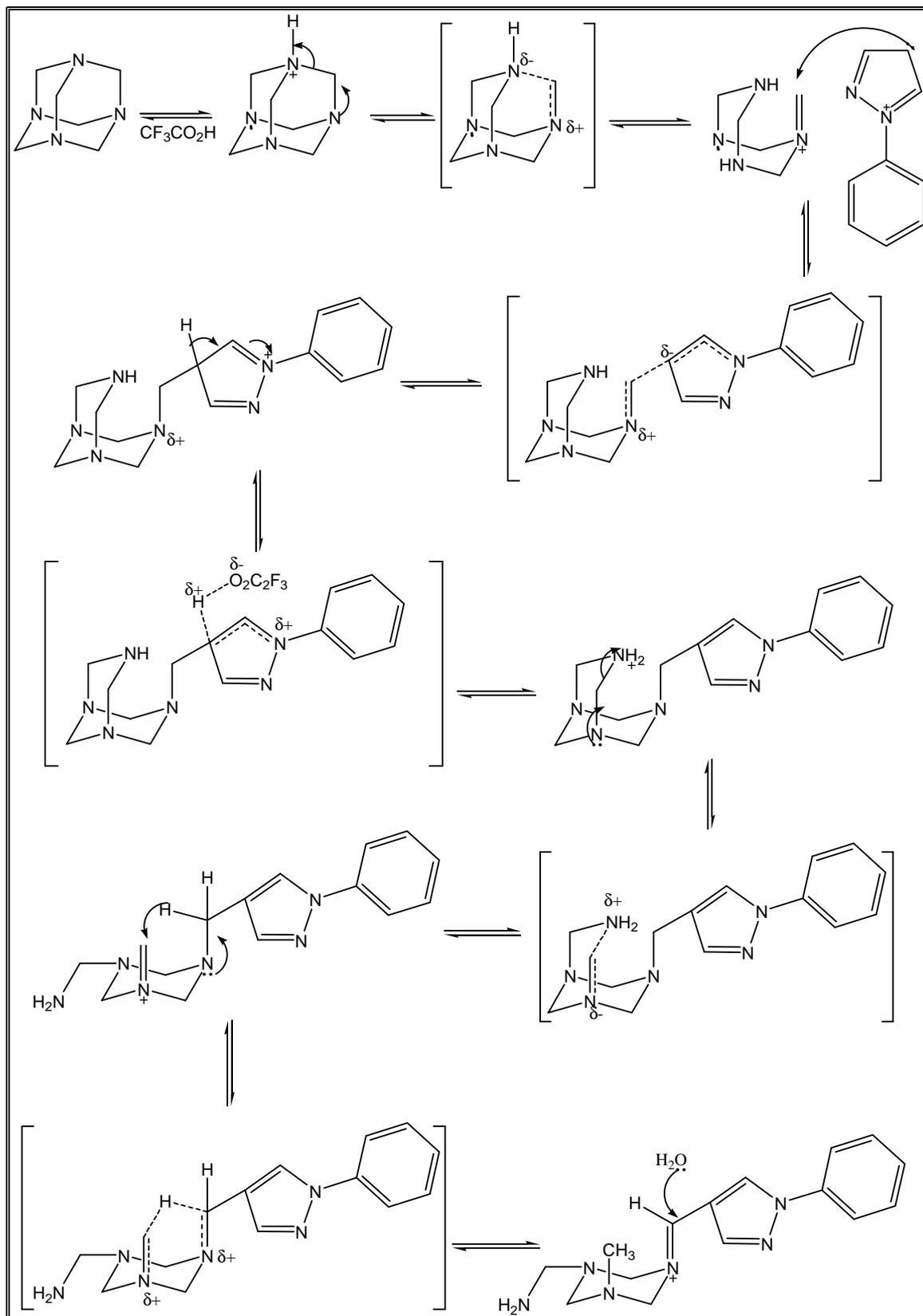
Após a condensação, o intermediário (49) foi submetido à reação de formilação através das condições da reação de Duff, que emprega hexametenotetramina (50) e ácido trifluoroacético, sob temperatura de refluxo por 12 horas, logrando na obtenção do intermediário aldeídico (51), em 97% de rendimento, segundo empregado por Blazevic e colaboradores, 1979.



Classicamente, a formilação de *N*-fenilpirazóis é efetuada através do emprego das condições de Vilsmeier-Haack, que faz uso de oxiclreto de fósforo (POCl₃) e dimetilformamida, sob condições de refluxo, por 12 horas (FINAR & LORD, 1957). O principal inconveniente desta técnica é que o POCl₃ é um reagente corrosivo, tóxico por inalação, além de ser controlado pelo exército e polícia federal, uma vez que o mesmo é empregado para a produção de explosivos. Neste sentido, o emprego das condições da reação de Duff para obtermos o *N*-fenilpirazol formilado é uma estratégia inovadora. Em relação ao custo dos reagentes, não houve grandes variações, no entanto, os reagentes empregados são de fácil acesso e mais seguros, além de não serem controlados pelo exército e polícia federal.

O mecanismo proposto para a reação de Duff se inicia pela protonação da hexametenotetramina pelo ácido trifluoracético. Através do deslocamento de elétrons de um dos nitrogênios do azacetal, haverá a formação de um intermediário imínico (63), o qual sofrerá ataque do átomo de carbono C4 do anel pirazólico, mimetizado o comportamento da reação de Mannich, na etapa de adição, caracterizando a etapa lenta do processo. A abstração do átomo de hidrogênio da posição C4 do anel pirazólico de (64) por uma base, restitui a aromaticidade do sistema. Na sequência, ocorre nova protonação de um dos nitrogênios azacetais e formação do novo intermediário imínico (65). Através de um processo concertado, quando o par de elétrons do átomo de nitrogênio metilênico migra para formar novo intermediário imínico, ocorre a transferência do hidreto metilênico para o átomo de carbono do segundo intermediário imínico formado, levando à formação do intermediário (66). Por fim, uma molécula de água se adiciona ao terceiro intermediário imínico (67) formado e elimina o nitrogênio quaternário, levando à

formação do *N*-formilpirazol protonado (**68**). Subsequentemente, o 1-fenil-4*H*-formilpirazol protonado na presença de uma base, é neutralizado ao correspondente intermediário (**51**) (Figura 25).



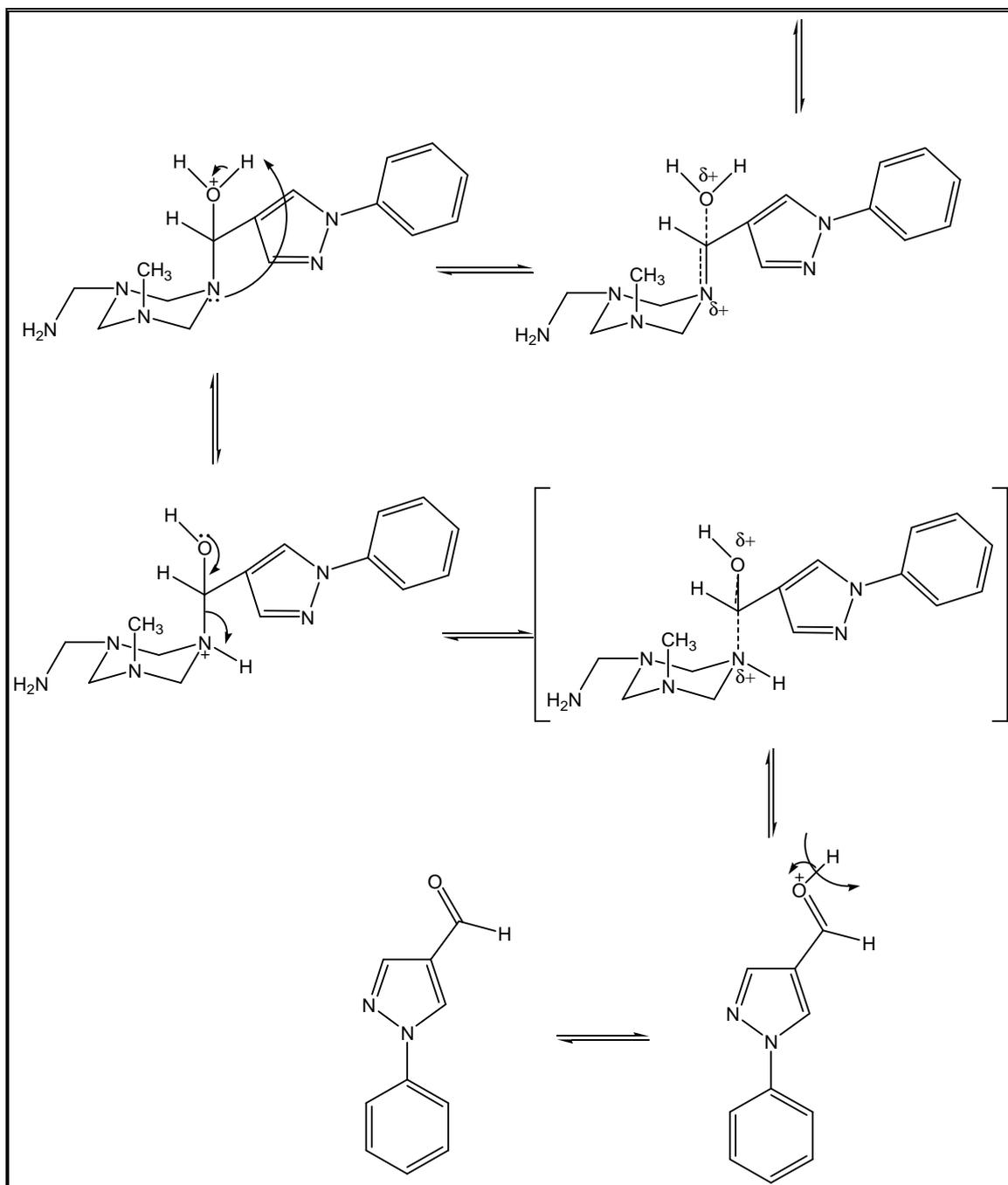
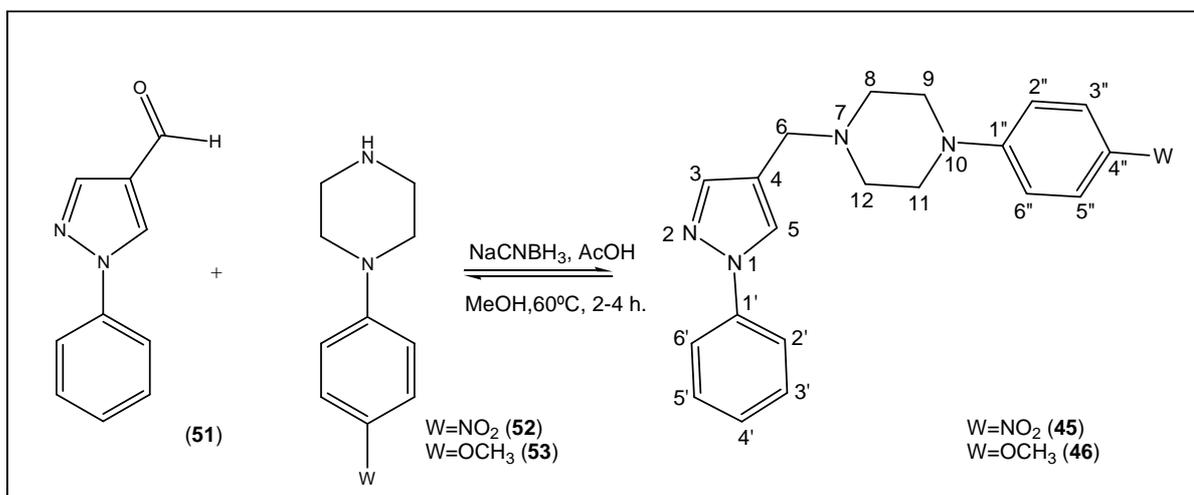


Figura 25 – Mecanismo de reação para formação do intermediário (51), adaptado de Warren *et al*,2001.

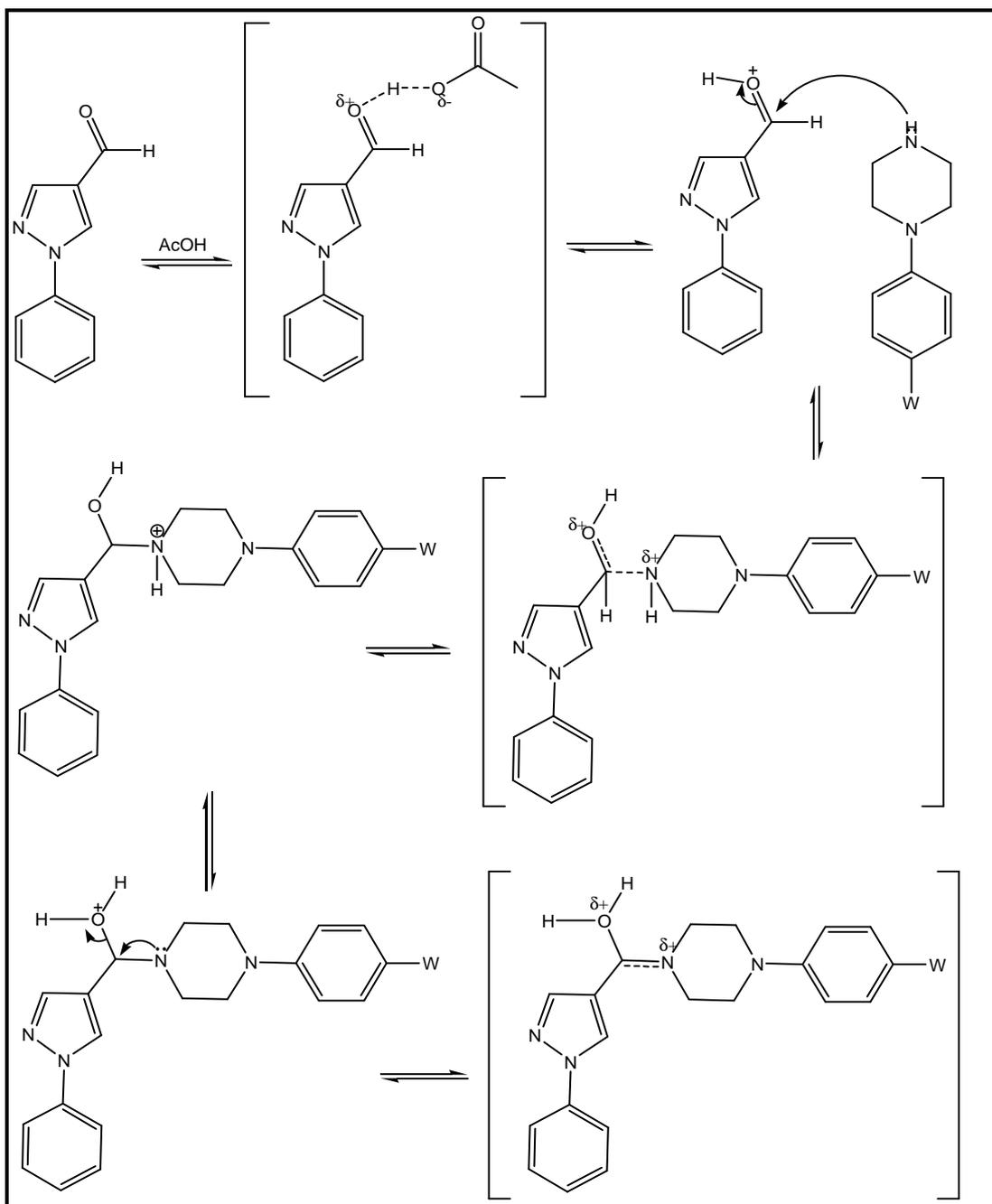
5.1.3 Aminoação redutiva: etapa chave da rota sintética

Por fim, as moléculas objeto de estudo (45) e (46), foram obtidas a partir da reação de aminoação redutiva, através do emprego do intermediário aldeídico (51), *N*-

fenilpiperazinas substituídas (**52**) e (**53**), cianoborohidreto de sódio, em meio de metanol, catalisada por ácido acético, levando à obtenção dos compostos (**45**) e (**46**), em rendimentos 87 e 90 %, respectivamente.



Como podemos observar na Figura 26 , a reação de aminação redutiva se dá pela redução do intermediário imínium (**72**), formado previamente, através da etapa de adição, seguida de eliminação. Inicialmente, os intermediários *N*-fenilpiperazínicos (**52**) e (**53**) se adicionam à carbonila (**69**), previamente ativada pelo ácido acético, levando à formação do intermediário de adição tetrahédrico (**70**), na etapa lenta. Sucessivas transferências de prótons tornam o átomo de oxigênio carbonílico (**71**) um melhor grupo abandonador na etapa de eliminação, levando à formação do intermediário imínium (**72**). Na sequência, o cianoborohidreto de sódio transfere um hidreto para o átomo de carbono imínium, formado previamente, levando à obtenção do produto desejado (**45**) e (**46**) (WARREN *et al*, 2001).



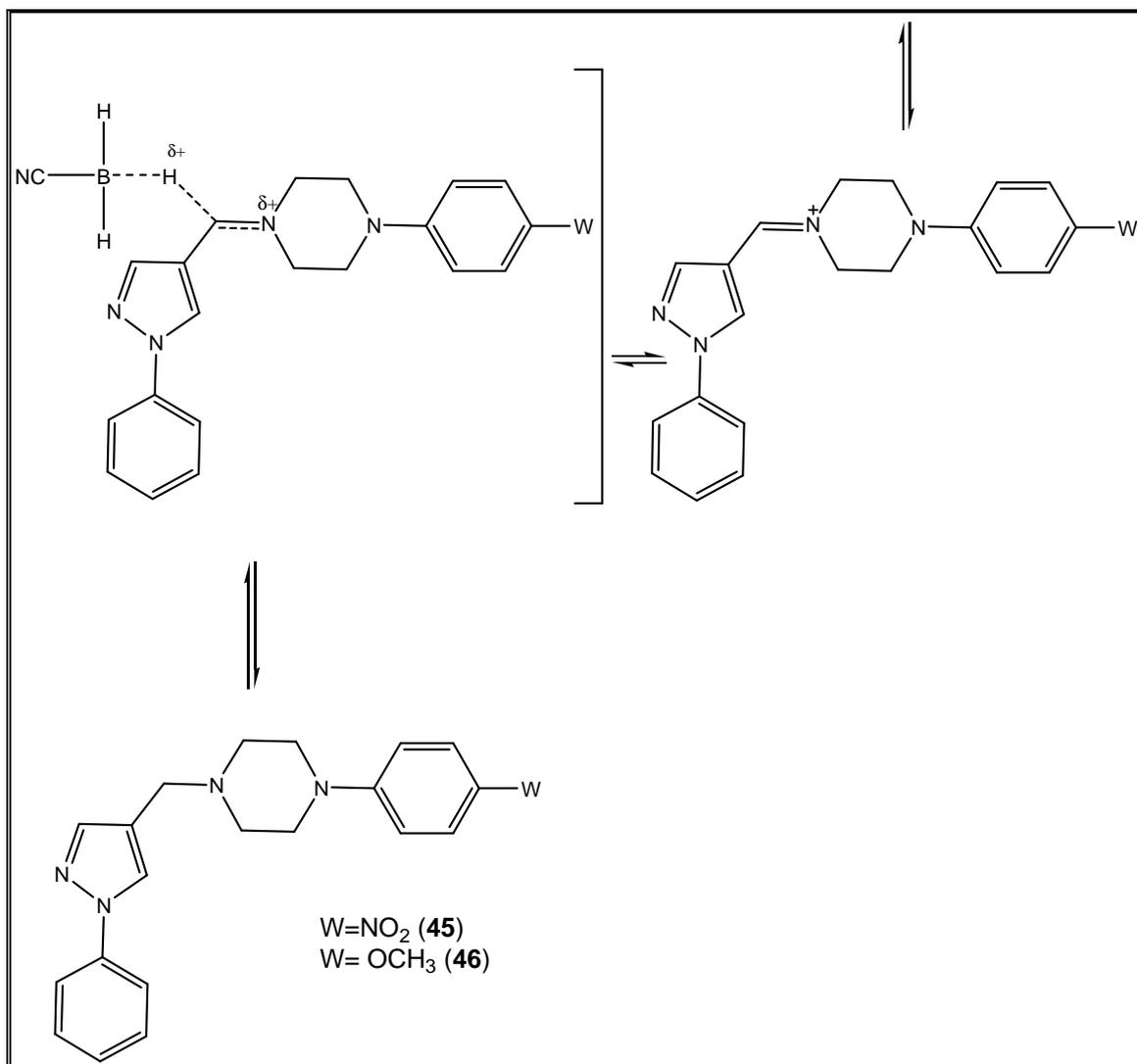


Figura 26 – Mecanismo de aminação redutiva para obtenção dos compostos (45) e (46).

5.2 Elucidação estrutural

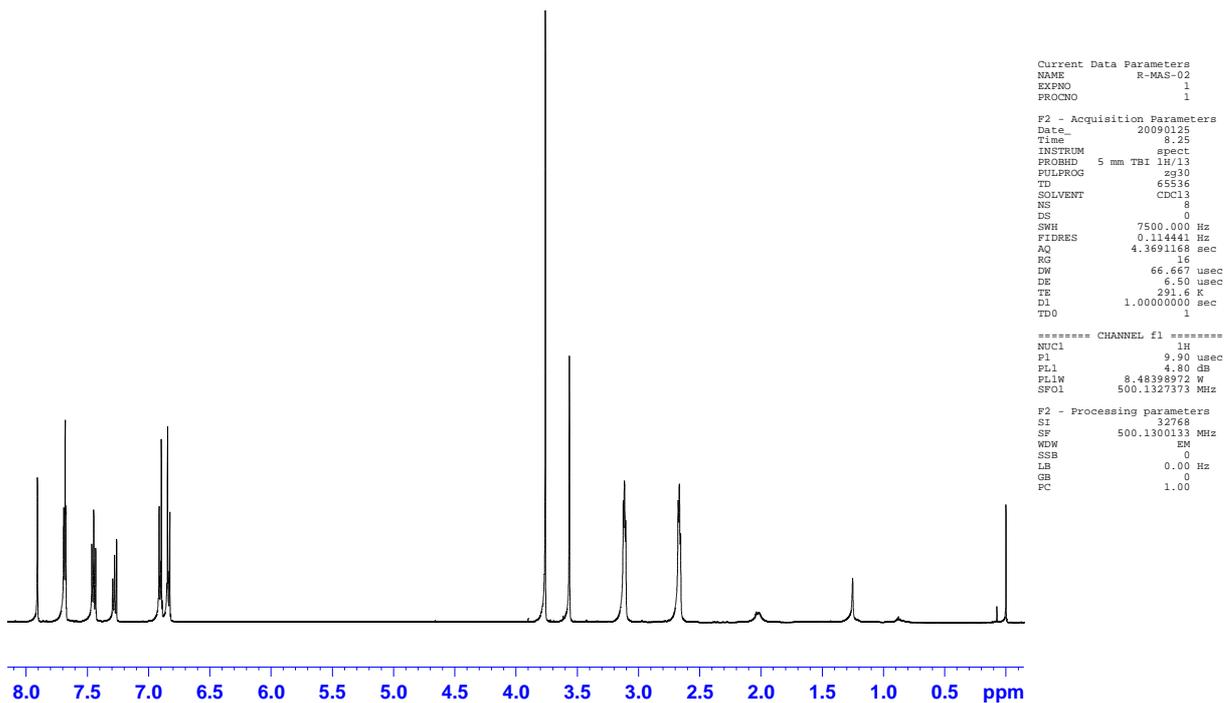
Todos os compostos sintetizados no decorrer deste trabalho foram caracterizados pelos métodos físicos usuais, como Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e bidimensionais HSQC e HMBC, Espectroscopia de infravermelho e ultravioleta, no entanto iremos nos ater apenas à discussão dos compostos finais (**45**) e (**46**), objeto de estudo.

5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

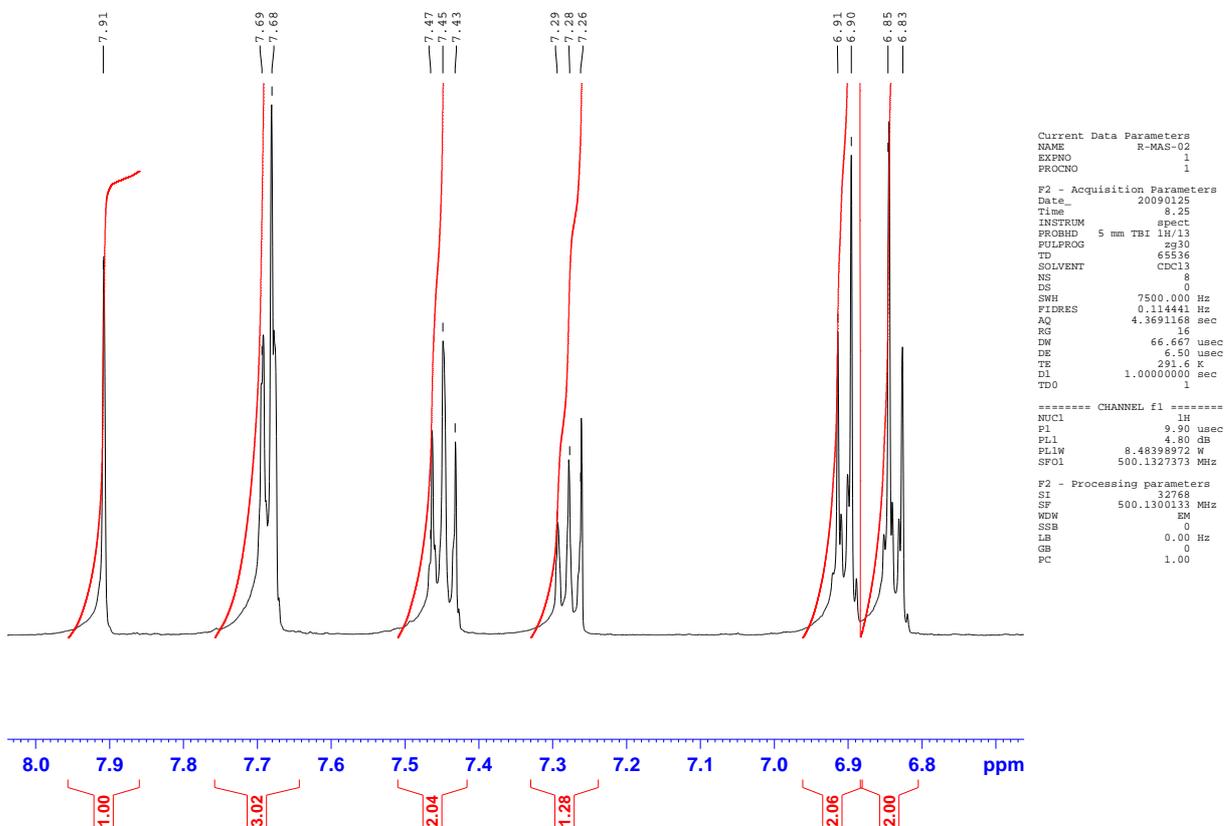
A partir dos valores de integração nos espectros de RMN de ^1H , foram contados 11 átomos de hidrogênio na região relativa aos núcleos aromáticos, entre 6

e 8 ppm, bem como 10 átomos de hidrogênio na região relativa as subunidades alifática, entre 4 e 2 ppm, para o composto (45) . Enquanto para o composto (46) encontramos a mesma quantidade de hidrogênios na região de aromáticos, e 13 hidrogênios na região de alifáticos (Espectro 1).

Devido as características estruturais do anel aromático pirazólico, o composto (46) pode apresentar dois singletos aromáticos, ambos com valor de integração igual a um. Ao analisarmos o espectro do composto (46) observamos um singlete em 7,91 ppm, com valor de integral relativo a um hidrogênio referente ao H5, o mais desblindado devido maior proximidade do anel fenila sofrendo interferência da anisotropia diamagnética. O próximo pico após o singlete, é um multiplete, entre 7,60 – 7,80 ppm, com valor de integração de três átomos de hidrogênio (Espectro 2). Como não há na estrutura, uma subunidade aromática que apresente três átomos de hidrogênios aromáticos equivalente, provavelmente se trata da sobreposição do singlete relativo ao átomo de hidrogênio 3, juntamente com o multiplete 2' e 6' do anel A. O multiplete 2' e 6' se encontra mais desblindado, quando comparado ao 3' e 5', por sofrer interferência da anisotropia diamagnética do anel pirazólico vizinho. O próximo pico mostra um multiplete na região entre 7,40 – 7,50 ppm com valor de integração igual a dois hidrogênios referente ao 3' e 5' que é menos desblindado pelo motivo acima citado. Na sequência, observamos uma multiplete entre 7,20 – 7,30 ppm, com integral relativa ao valor de um hidrogênio correspondendo ao hidrogênio 4' do anel A. Os próximos dois sinais estão entre 6,80 – 7,00 ppm. O primeiro deles, tem valor de integral igual a dois hidrogênios e refere-se aos hidrogênios 3'' e 5'' que se encontram mais desblindados em relação aos hidrogênios 2'' e 6'' devido à maior proximidade do último do substituinte OCH₃. Portanto, o último sinal na região dos aromáticos, menos desblindado e com valor de integral igual a dois hidrogênios refere-se aos hidrogênios 2'' e 6'' pelo motivo citado acima.

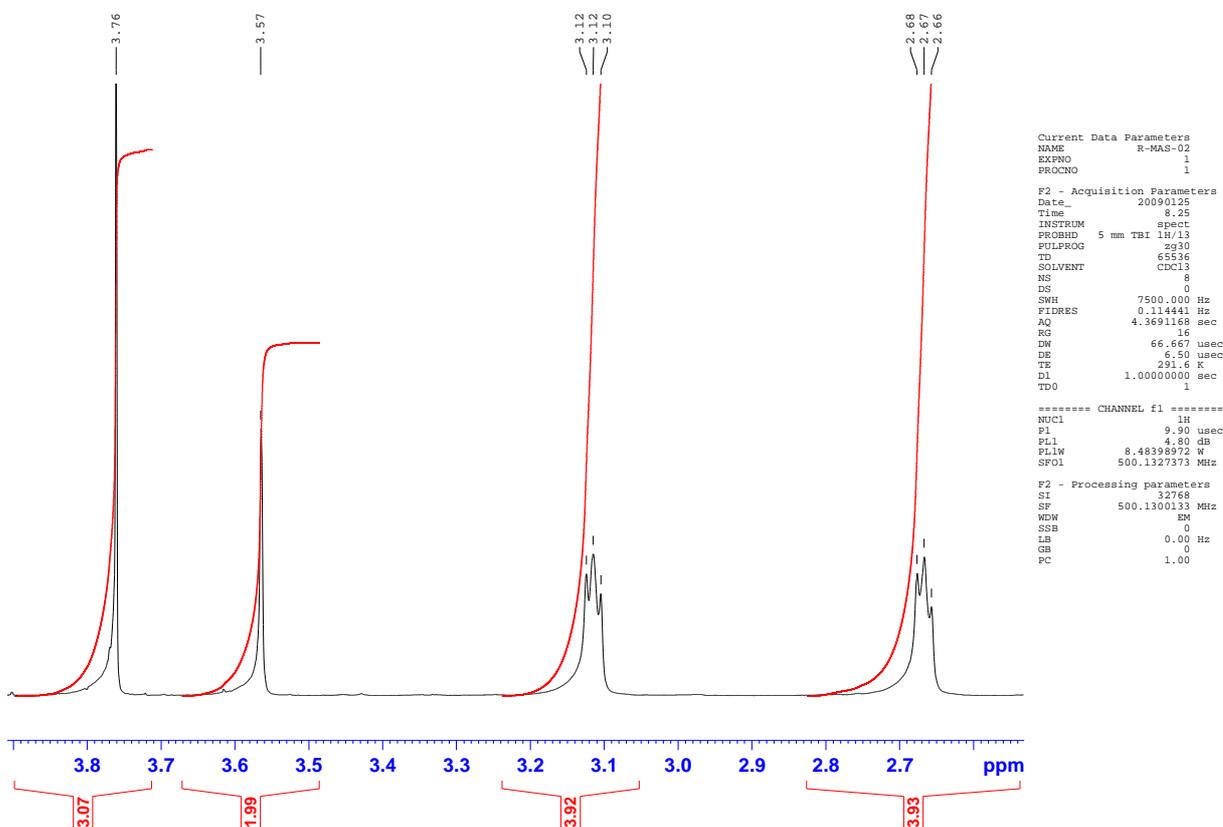


Espectro 1 – Espectro de RMN de ^1H do composto (46).



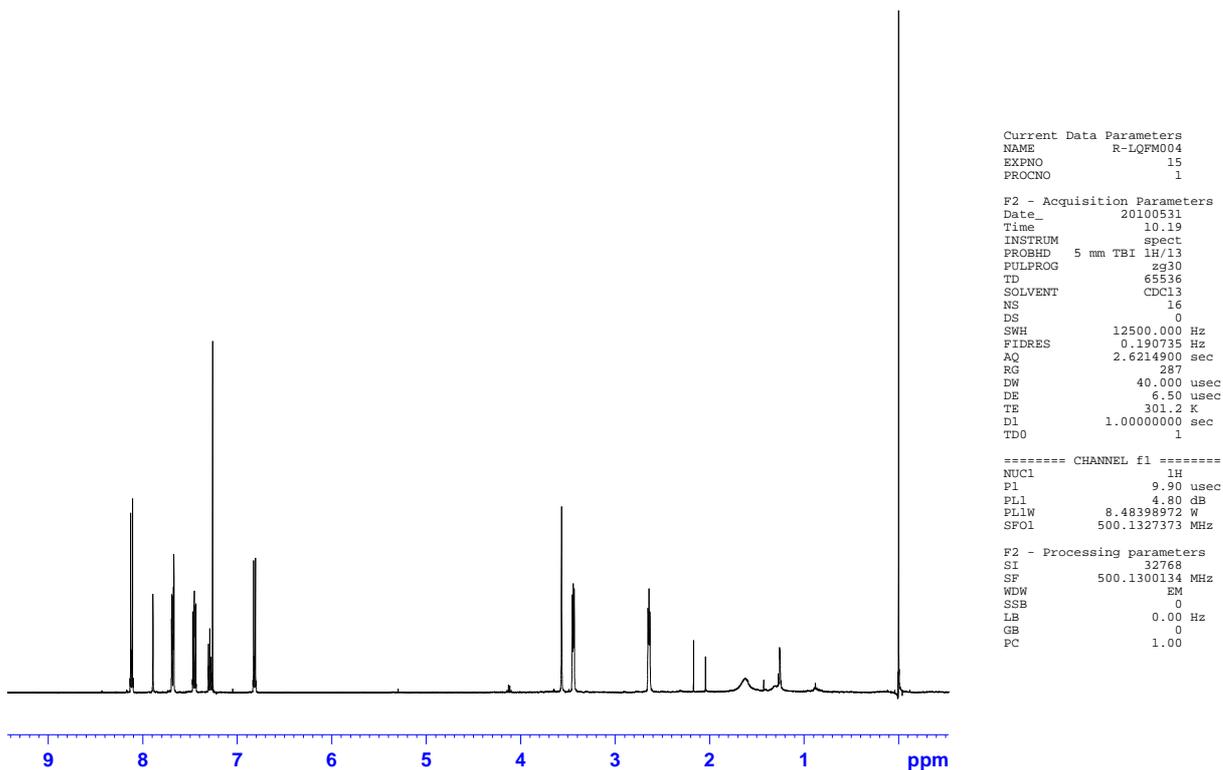
Espectro 2 – Expansão da região dos aromáticos do espectro de RMN de ^1H do composto (46).

Dando sequência à interpretação dos átomos de hidrogênios alifáticos (Espectro 3), observamos quatro picos, apresentando multiplicidades de dois singletos e dois multipletos, respectivamente. O singlete, em 3,76 ppm, com valor de integração de três átomos de hidrogênio corresponde aos hidrogênios da metoxila da posição 4". O próximo singlete com valor de integral igual a 2 hidrogênios refere-se aos hidrogênios metilênicos da posição 6 em 3,57 ppm. Os dois multipletos observados dizem respeito aos quatro CH₂ do anel piperazínico, que se subdividem em dois conjuntos de quatro átomos de hidrogênios equivalentes. Novamente, o multipletto mais desblindado é aquele que se encontra mais próximo à subunidade fenila, pois estes hidrogênios sofrem interferência da anisotropia diamagnética do anel aromático.

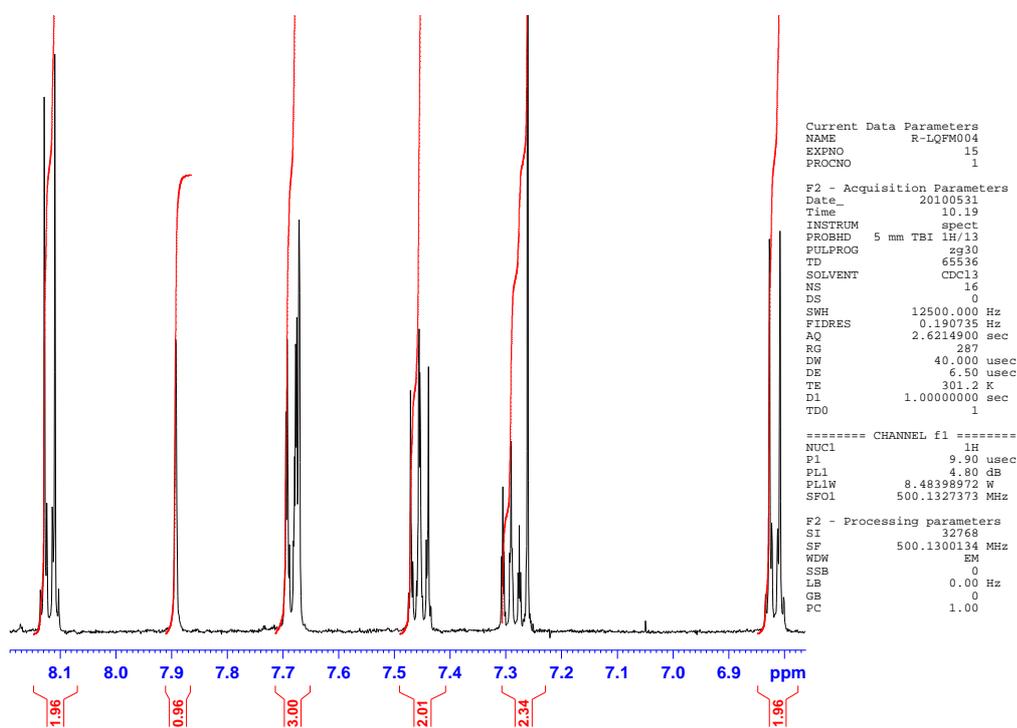


Espectro 3 – Expansão da região dos alifáticos do espectro de RMN de ¹H do composto (46).

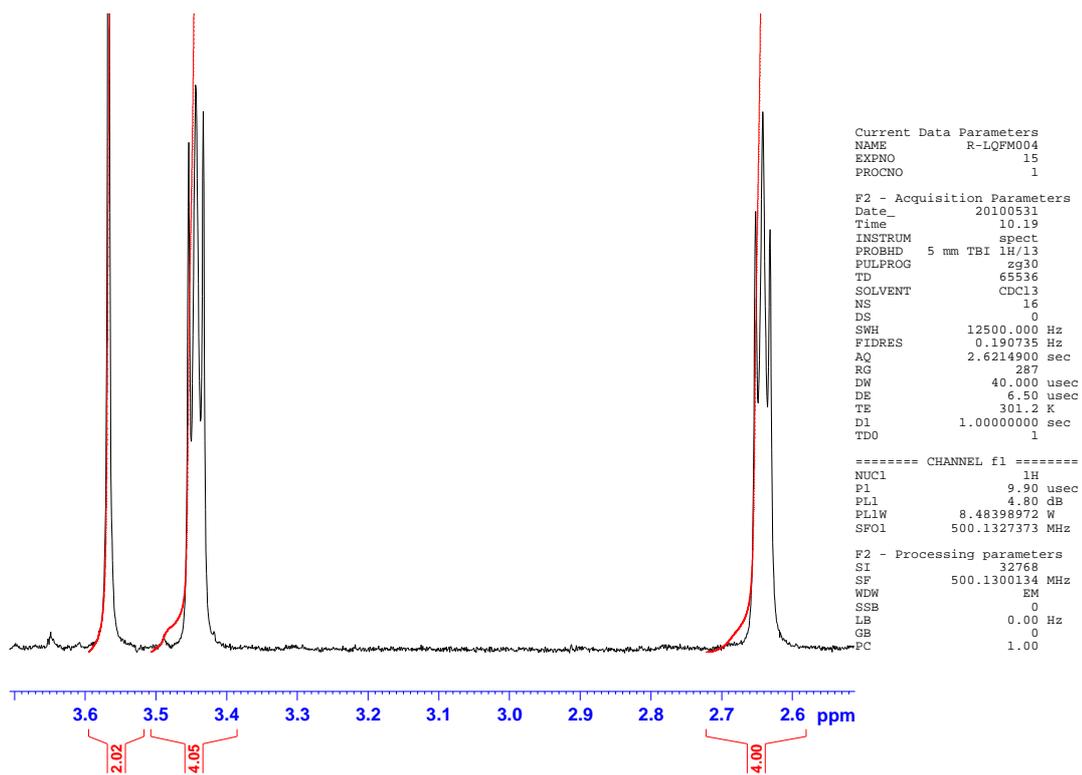
Em relação ao espectro de RMN de ¹H do composto (45) o mesmo mostrou multiplicidade semelhante ao espectro do composto (46) variando basicamente os deslocamentos químicos. A variação dos deslocamentos se deve à presença da subunidade NO₂, que comparativamente a subunidade OCH₃, promove diminuição da densidade eletrônica do anel aromático ao qual se encontra ligado, portanto os hidrogênios próximos a ele vão se encontrar mais desblindados.



Espectro 4 – Espectro de RMN de ^1H do composto (45).



Espectro 5 – Expansão da região dos aromáticos do espectro de RMN de ^1H do composto (45).



Espectro 6 – Expansão da região dos alifáticos do espectro de RMN de ¹H do composto (45).

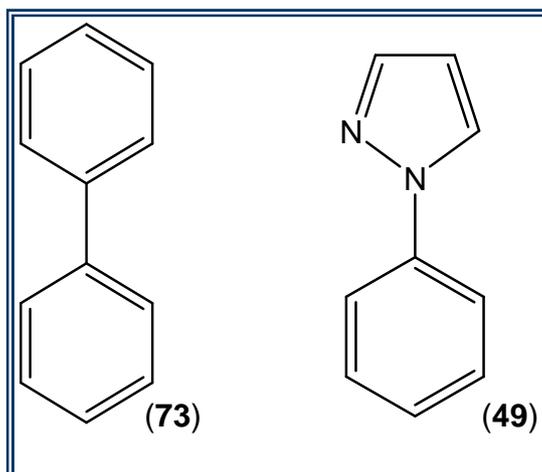
Tabela 2 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (à esquerda) e RMN de ^{13}C (à direita) dos compostos **(45)** e **(46)**

	W = NO ₂ (45)	W = OCH ₃ (46)		W = NO ₂ (45)	W = OCH ₃ (46)
H8a e 8b H12a e 12b	2,61-2,65 ppm (4H, m)	2,66 ppm (4H, m)	9 e 11	$\delta = 47,1$ ppm	$\delta = 50,6$ ppm
H9a e 9b H11a e 11b	3,42-3,46 ppm (4H, m)	3,11 ppm (4H, m)	6	$\delta = 52,5$ ppm	$\delta = 52,5$ ppm
H6a e 6b	3,56 ppm (2H, s)	3,56 ppm (2H, s)	8 e 12	$\delta = 52,7$ ppm	$\delta = 53,0$ ppm
H2'' e 6''	6,78-6,84 ppm (2H, m)	6,83 ppm (2H, m)	2'' e 6''	$\delta = 112,8$ ppm	$\delta = 114,4$ ppm
H4'	7,26-7,32 ppm (1H, m)	7,27 ppm (1H, m)	3' e 5'	$\delta = 119,1$ ppm	$\delta = 118,9$ ppm
H3' e 5'	7,42-7,48 ppm (2H, m)	7,45 ppm (2H, m)	1	$\delta = 119,4$ ppm	$\delta = 119,3$ ppm
H3	7,68 ppm (1H, s)	7,68 ppm (1H, m)	4'	$\delta = 126,2$ ppm	$\delta = 126,3$ ppm
H2' e 6'	7,69-7,71 ppm (2H, m)	7,68 ppm (3H, m)	2	$\delta = 126,7$ ppm	$\delta = 126,6$ ppm
H5	7,90 ppm (1H, s)	7,91 ppm (1H, s)	2' e 6'	$\delta = 129,7$ ppm	$\delta = 129,4$ ppm
H3'' e 5''	8,09-8,15 ppm (2H, m)	6,90 ppm (2H, m)	1'	$\delta = 138,6$ ppm	$\delta = 139,9$ ppm
			1''	$\delta = 140,2$ ppm	$\delta = 145,6$ ppm
			5	$\delta = 141,9$ ppm	$\delta = 141,8$ ppm
			4''	$\delta = 155,0$ ppm	$\delta = 153,6$ ppm
			3'' e 5''	$\delta = 155,6$ ppm	$\delta = 116,3$ ppm

5.2.2 Ultravioleta (UV)

Os espectros na região ultravioleta foram obtidos apenas para os produtos finais (45) e (46) nas concentrações de $1,4 \times 10^{-4}$ e $1,3 \times 10^{-4}$, respectivamente, com intuito de avaliar os efeitos eletrônicos dos substituintes sobre seus sistemas aromáticos.

A absorvidade molar (ϵ_{\max}), uma constante característica do soluto, pode fornecer valiosas informações a respeito da conjugação entre os sistemas aromáticos, uma vez que mesma é proporcional à coplanaridade dos mesmos. Observamos que o intermediário (49) possui comportamento semelhante à bifenila (73) que tem $\lambda_{\max} = 246$ nm e $\epsilon_{\max} = 16.300$.



Neste sentido, a introdução de substituintes na molécula como um todo pode afetar o ângulo diedro entre os anéis aromáticos, afetando a coplanaridade. Quando um grupo auxocrômico, *i.e.*, OCH_3 aparece no mesmo anel do cromóforo contendo NO_2 , ambos os grupos influenciam na intensidade da absorção e no comprimento de onda. A influência é mais pronunciada quando um grupo doador de elétrons e um grupo receptor de elétrons estão na posição *para* (SILVERSTEIN *et al*, 1991).

Para o composto (45) podemos perceber nitidamente as duas bandas de absorção, mostrando a contribuição dos dois grupos separadamente. Para o núcleo *N*-fenilpirazólico (49) o λ_{\max} foi de 250nm e $\epsilon_{\max} = 31.931$. Para a subunidade contendo o cromóforo NO_2 houve um aumento no comprimento de onda de absorção máxima para 378 nm e $\epsilon_{\max} = 28.427$. Para o composto (46) observamos

apenas uma banda de absorção máxima em 256 nm referente ao núcleo *N*-fenilpirazólico (**49**) e $\Sigma_{\max}=27.310$. (Figuras 27 e 28).

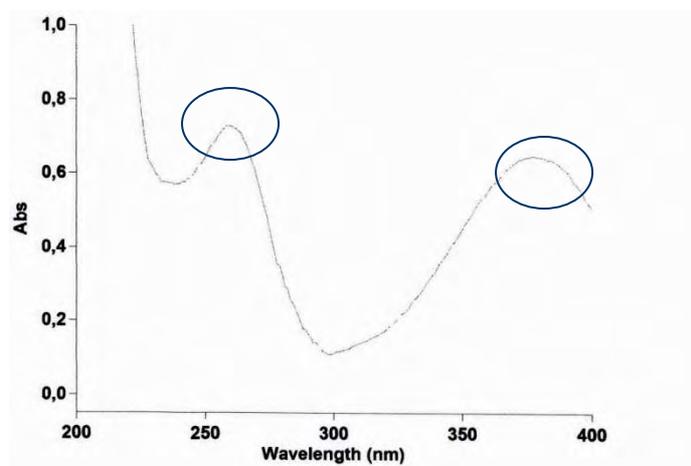


Figura 27 – Espectro de ultravioleta do composto (45).

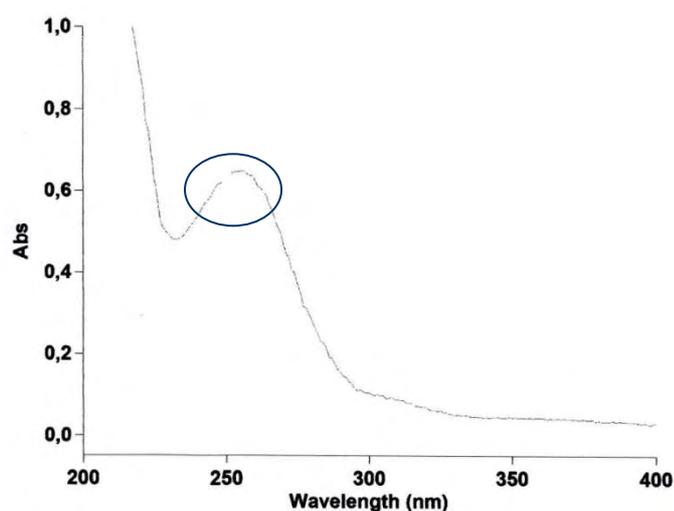


Figura 28 – Espectro de ultravioleta do composto (46).

Através da Figura 29, podemos observar certa correlação em termos de ϵ para o protótipo LASSBio 579 (**41**), previamente calculada, e os derivados (**45**) e (**46**). Os valores de ϵ relativamente semelhantes dos compostos (**41**) e (**45**), podem traduzir um ângulo diedro semelhantes para a subunidade *N*-fenilpirazólica (**49**), entre os dois compostos.

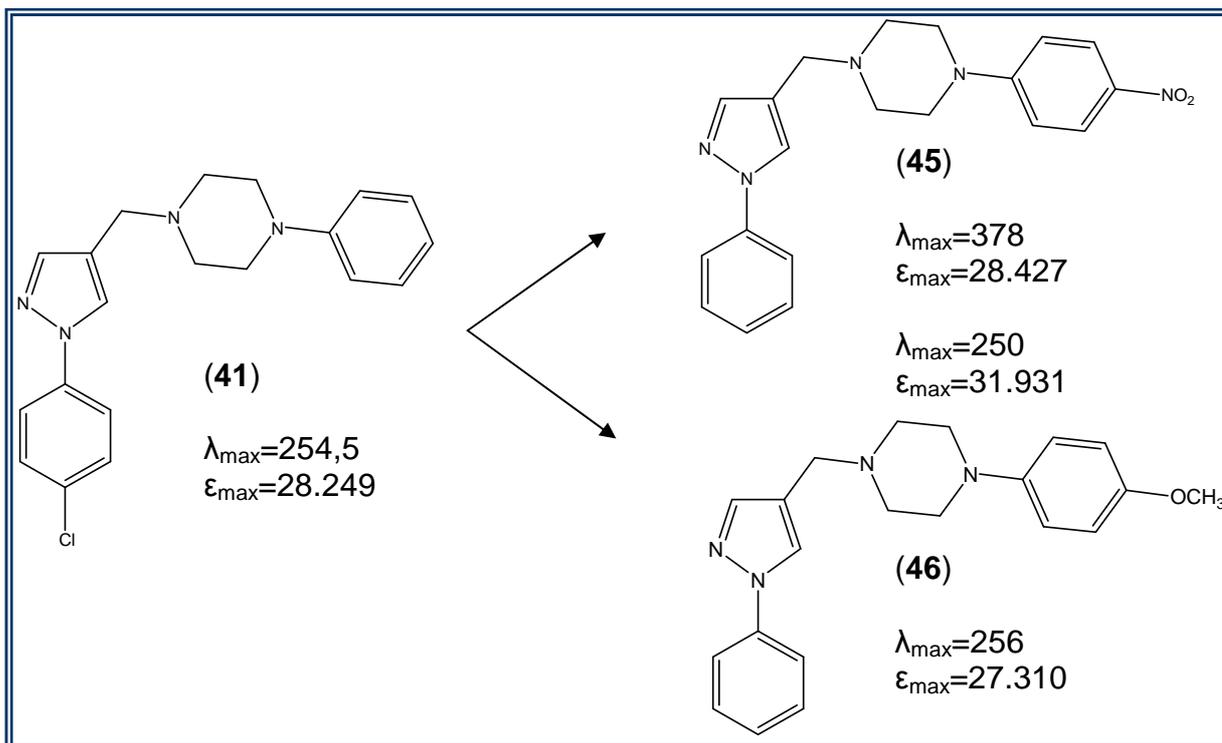


Figura 29 – Dados de ultravioleta produtivos finais (45) e (46) comparativamente ao composto (41).

5.3 Bioconversão

5.3.1 Composição dos meios de cultura

Para a seleção do meio de cultura que proporcionasse um melhor crescimento das cepas durante as incubações, foi escolhido o meio líquido “Potato Dextrose Sacarose Medium” (PDSM). A seleção do meio de cultura adequado a melhor adaptação das cepas foi baseada nas seguintes características: menor custo; maior facilidade de preparo e conservação; menor probabilidade de contaminação por culturas secundárias; facilidade de extração dos produtos formados; cinética de formação dos derivados em períodos de tempos compatíveis com a rotina laboratorial e com a possibilidade de transposição para escala industrial; melhor expressão das enzimas bioconversoras; ausência de lise e consequentemente de morte celular; conservação das características do substrato, não causando degradação; capacidade de promover crescimento uniforme.

5.3.2 Solventes

Para adição do substrato (45) foi utilizada mistura de etanol/dimetilformamida 1:1. Etanol foi inicialmente o solvente de escolha na tentativa de solubilização, tendo sua utilização já demonstrada por Gomes 2007 para o composto (41). Como (45) não foi totalmente solúvel em etanol à temperatura ambiente, testes de solubilidade foram realizados, tendo sido identificado etanol/dimetilformamida 1:1 como solvente adequado para solubilização do substrato. O composto (46) não apresentou problemas quanto à solubilização em etanol, portanto o mesmo foi o solvente de escolha.

5.3.3 Screenig para escolha da melhor cepa

Dentre as cepas testadas, *Aspergillus candidus* ATCC 2023 foi selecionado para ensaio em escala semipreparativa devido obtenção de um número maior dos metabólitos. Os metabólitos obtidos podem ser vistos na Tabela 4.

Na tabela mencionada podemos observar que os fungos filamentosos produziram três metabólitos diferentes a partir dos substratos utilizados (45) e (46).

O metabólito I foi detectado por CCD para o composto (45) e os metabólitos II e III foram detectados por CCD para o composto (46).

O objetivo da metabolização desses compostos foi verificar se o número de metabólitos seria diminuído com a proteção do anel D.

Acredita-se que o grupamento substituinte no anel D influencie na metabolização, visto que quando protegemos esse anel com um grupo retirador de elétrons há uma diminuição de metabólitos, como visto para o composto (45). No entanto, quando utilizamos um substituinte com efeito doador de elétrons (46) houve a produção de dois metabólitos diferentes, ou seja, um maior número de metabólitos em relação ao composto (45).

Tabela 3 – Metabólitos identificados por CCD para os compostos (45) e (46) utilizando diversas cepas.

Microrganismos	Metabólitos (Rf)			Substrato
	I 0,28	II 0,26	III 0,7	
1-Absídia blaskeleana ATCC 26617	-	+	-	+++
2-Absídia blaskeleana ATCC 10148b	-	+	-	+++
3-Aspergillus candidus ATCC 2023	+++	+++	-	+
4-Aspergillus ochraceus ATCC 1009	+	-	-	+++
5-Beauveria bassiana ATCC 7149	-	+	+	++
6-Cunninghamella echinulata ATCC 9244	+	+	+	++
7-Cunninghamella echinulata ATCC 9245	+	+	-	+++
8-Cunninghamella elegans ATCC 36112	+	+	-	++
9-Cunninghamella elegans ATCC 26169	+	+	-	++
10-Curvularia lunata NRRL 2380	-	-	-	++++
11-Fusarium roseum ATCC 14717	-	-	-	++++
12-Mortierela isabelina NRRL1757	-	+	+	+++
13-Mucor griseocyanus ATCC 1207a	-	-	-	++++
14-Rhizopus arrhizus ATCC 11145	+	+	+	++

Legenda: Quantidade relativa dos metabólito I, II e III e do substrato não consumido em 48 horas de incubação C=0,10 g/L. (-) ausência; (+) 1 a 24%; (++) 25 a 50%; (+++) 26 a 75%; (++++)76 a 100%.

Comparativamente ao composto (41) que foi estudado no LaBioCon, podemos detectar por esse método que os compostos (45) e (46) produziram menor quantidade de metabólitos, mostrando que o objetivo de proteção do anel D foi alcançado. O Gráfico 3 mostra a diferença no número de metabólitos produzidos.

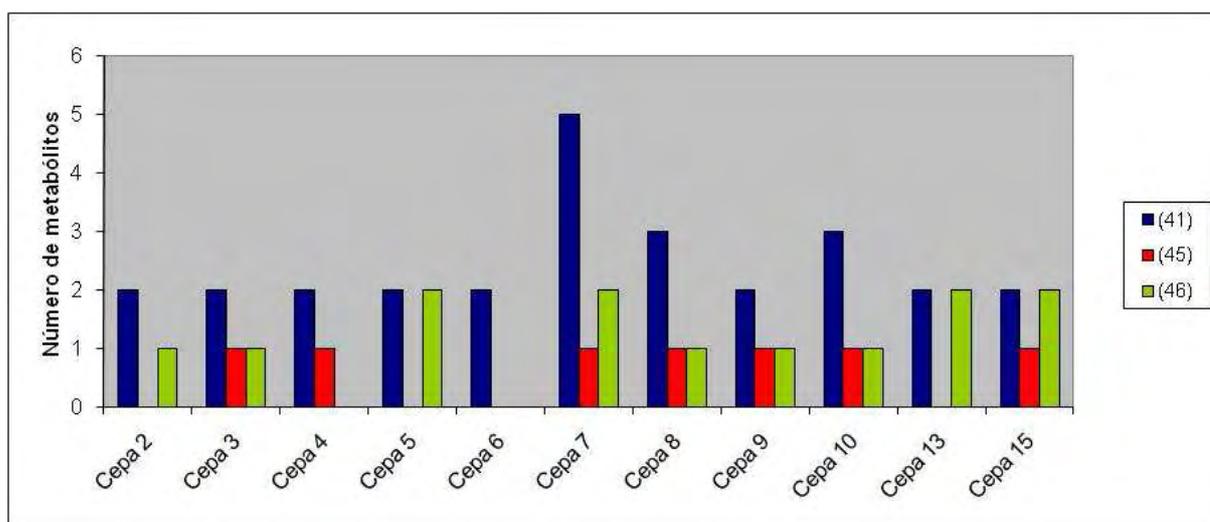
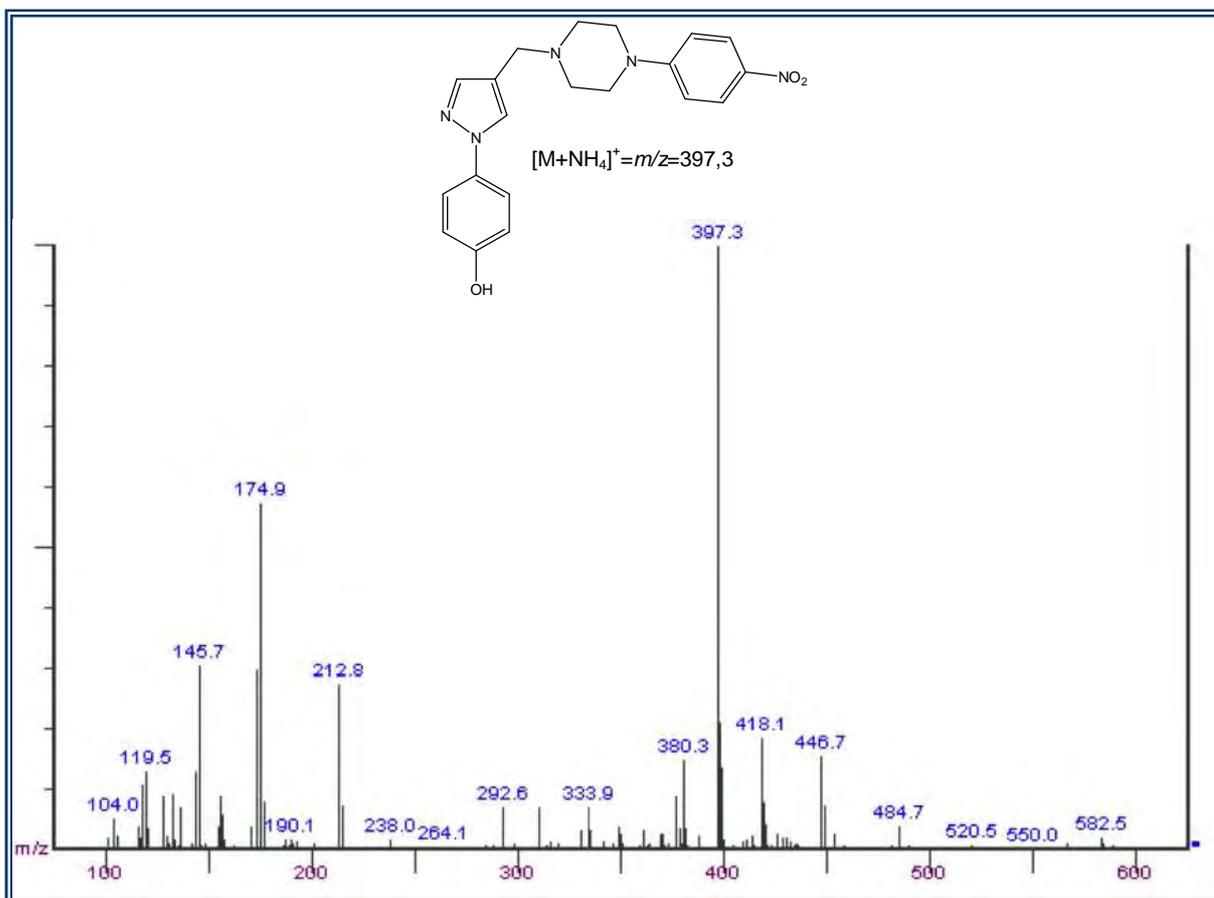


Gráfico 3 – Comparativo entre metabólitos obtidos no LaBioCon por bioconversão utilizando diferentes cepas para os compostos (41), (45) e (46).

5.3.4 Análise estrutural dos compostos obtidos em escala semi preparativa

A cepa que apresentou maior número de metabólitos por CCD foi utilizada para realizar um ensaio em escala semi preparativa (500 mg). Após o procedimento de extração e purificação mencionados na metodologia, as amostras foram enviadas para RMN de ^1H e EM. A partir da análise de RMN de ^1H não pudemos visualizar de forma clara devida as impurezas da amostra.

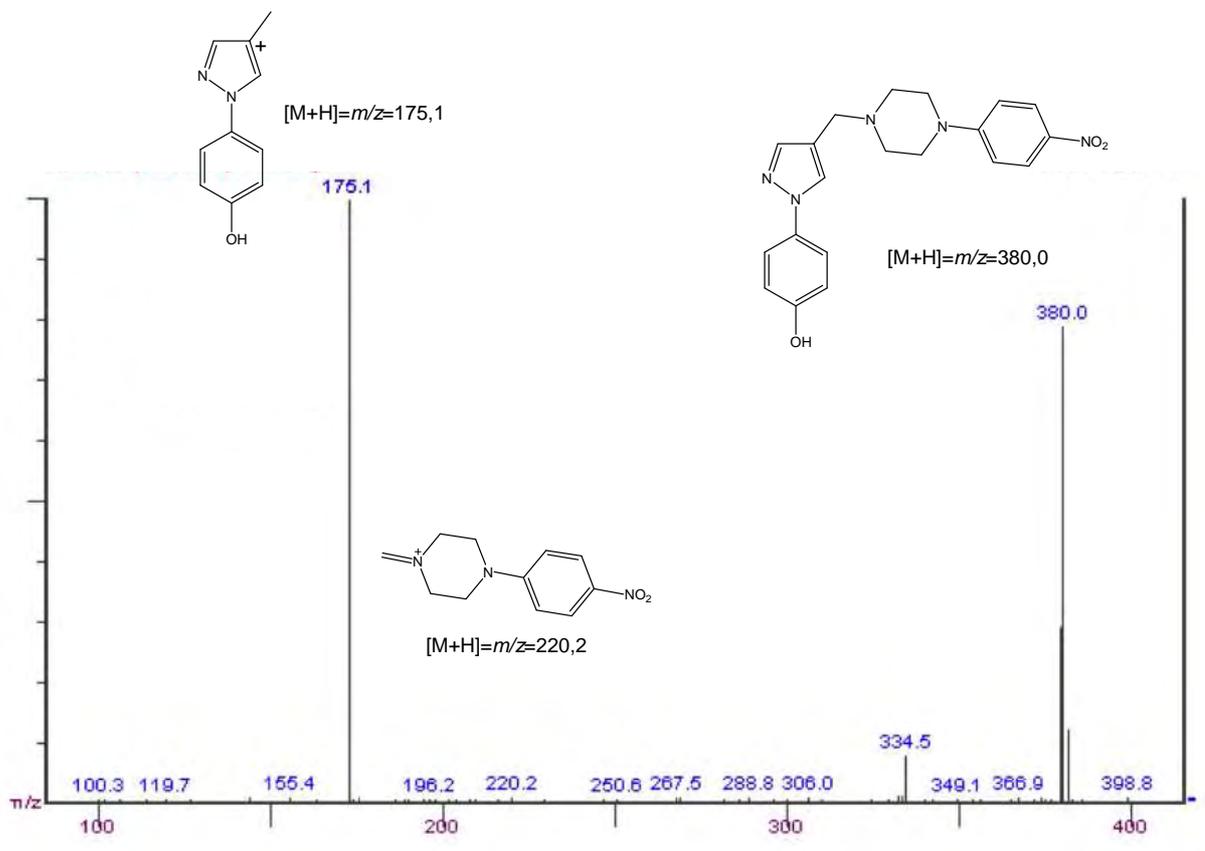
Após análise por espectroscopia de massas do metabólito 4-(4-((4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)metil-1*H*-pirazol-1-il)fenol obtido após biotransformação denominado de composto (**74**), podemos observar o pico do íon molecular de $m/z=397,3$ que corresponde ao aduto de amônio, i.e. $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (Espectro 7).



Espectro 7 – Espectro de massas mostrando o pico do íon molecular do composto (**45**) formando um aduto com o amônio.

Observamos ainda dois picos base, um de $m/z=175,1$ referente ao grupamento fenilpirazólico (**75**) e um de $m/z=220,2$ que se refere ao grupamento 4-nitrofenilpiperazínico (**76**). Esses picos podem ser explicados pela rota de

fragmentação proposta, quando um feixe de elétrons remove um elétron do anel pirazólico quebrando a ligação C-N, obtendo íons estáveis (Espectro 8).



Espectro 8 – Espectro de massas do composto (74) mostrando os picos dos íons base e o pico do íon molecular.

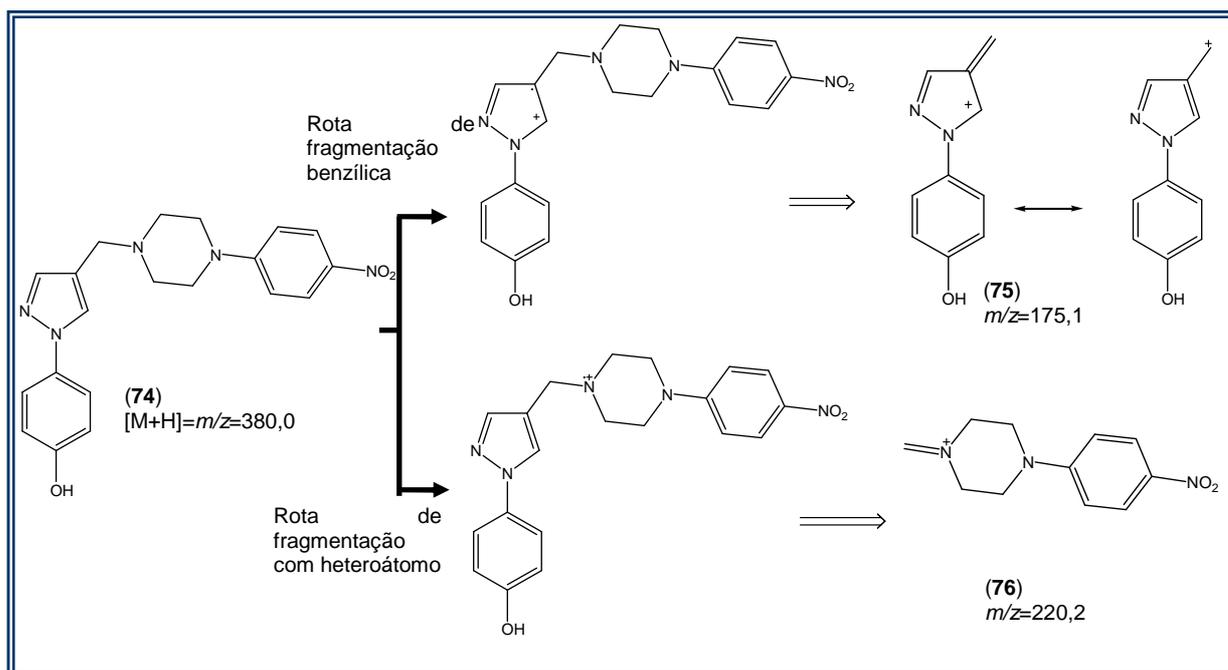
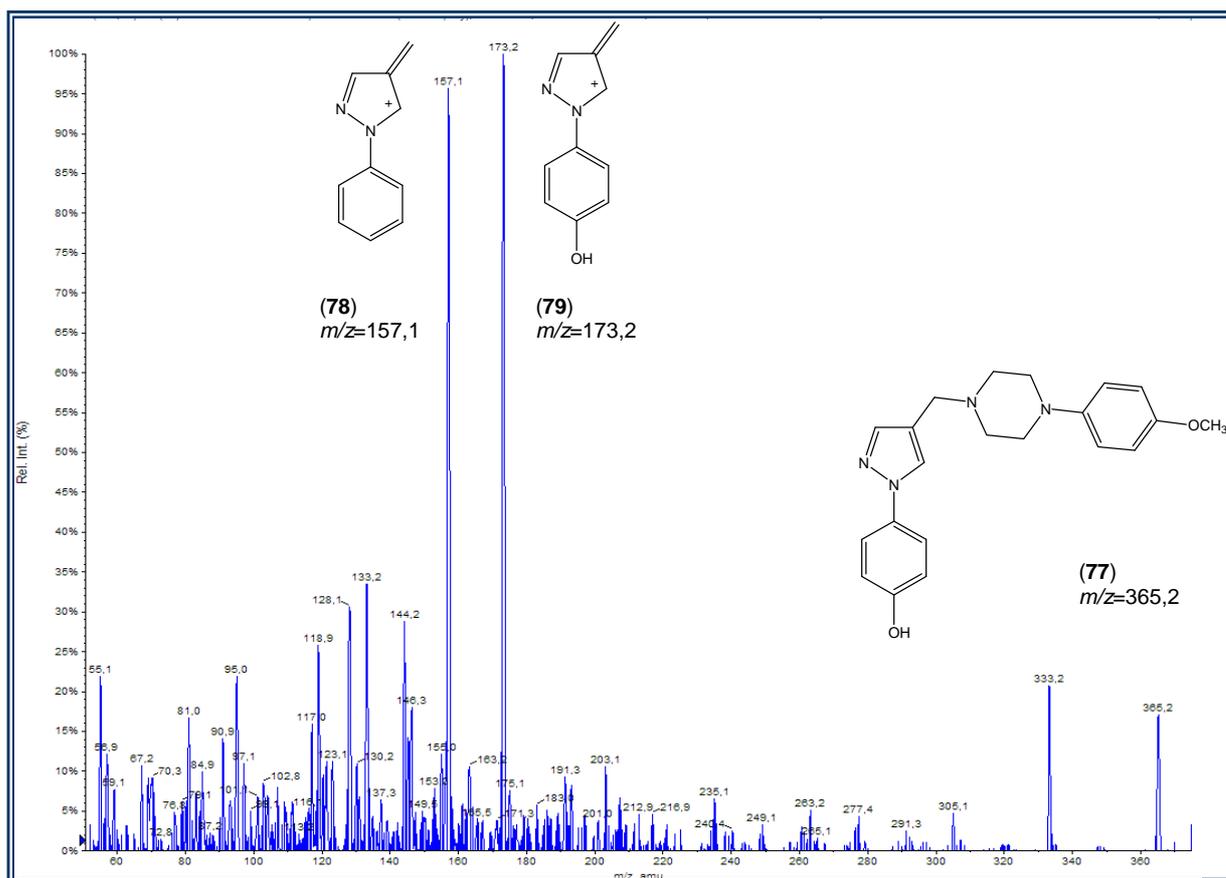


Figura 30– Rota de fragmentação proposta para o composto (45).

A espectroscopia de massas permitiu caracterizar outro composto. Este foi obtido por biotransformação do composto (46) utilizando *A.candidus*, denominado metabólito II (77). Pode-se observar dois picos de íons moleculares, *i.e.* $m/z=365,2$ relativo ao (77) e (46). No Espectro 9, também podemos observar dois picos bases, um de $m/z=157,1$ e outro de $m/z=173,2$.



Espectro 9 – Espectro de massas do composto (77) obtido através da biotransformação do composto (46).

Ao analisar a rota de fragmentação benzílica para os compostos (46) e (77), observamos que um elétron do anel pirazólico é removido pelo feixe de elétrons, para se estabilizar o cátion radical formado reage com um elétron da ligação benzílica C-N, se fragmentando. Com a fragmentação são originados os cátions *N*-fenilpirazólicos de $m/z=157,1$ (78) e $m/z=173,2$ (79), bem como o radical metileno-*N*-(4-nitro)-*N*-fenilpiperazínico (76). O fato do fragmento de $m/z=173,2$ (79) ser um pouco mais intenso quando comparado, ao $m/z=157,1$ (78), corrobora com a hipótese do metabólito *p*-hidroxilado 4-(4-((4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)metil-1*H*-pirazol-1-il)fenol (74), uma vez que a subunidade auxilia na estabilidade do cátion benzílico formado, através da deslocalização de carga.

Ao analisar a hipótese da fragmentação a partir da remoção do elétron do átomo de nitrogênio terciário básico, podemos observar que após a formação do cátion radical, para se estabilizar o mesmo reage com um elétron da ligação C-C vizinha ao anel pirazólico, logrando na formação de dois fragmentos. Os radicais *N*-fenilpirazólicos, além do fragmento metileno-*N*-(4-metoxi)-fenilpiperazínico de $m/z=203,1$, comum tanto o (46), quanto ao (77). Em face de sua baixa intensidade no espectro, podemos concluir que o mesmo apresenta baixa estabilidade (Figura 31).

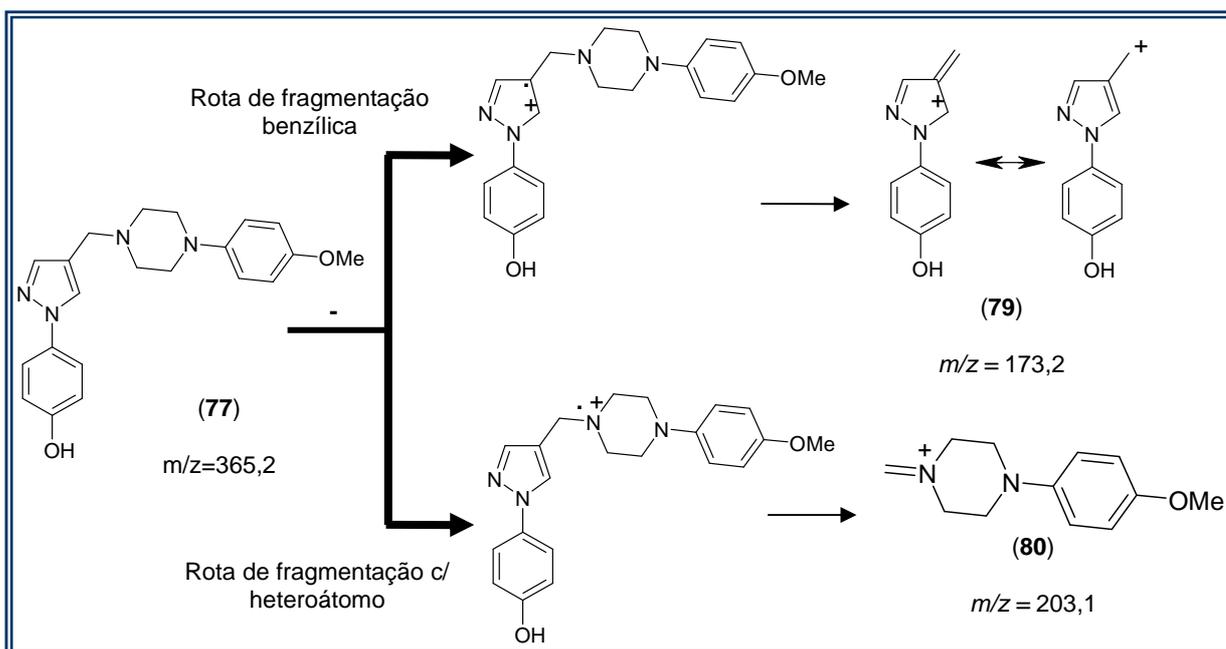


Figura 31 - Rota de fragmentação proposta para o composto (77).

5.4 Estudos eletroquímicos

Os compostos **(45)** e **(46)** foram submetidos a ensaios eletroquímicos para avaliarmos seus perfis oxi-redutivos. A compreensão deste fato é relevante, uma vez que moléculas que apresentam perfil antioxidante podem apresentar um efeito sinérgico frente a doenças que acometem o SNC, devido seu caráter neuroprotetivo.

Os perfis eletroquímicos das moléculas **(45)** e **(46)** mostram-se distintos, apresentando para a maioria dos eletrólitos estudados picos anódicos em 0,68 e 0,91 V para **(45)** e **(46)**, respectivamente, ambas demonstrando oxidação irreversível (Figura 32).

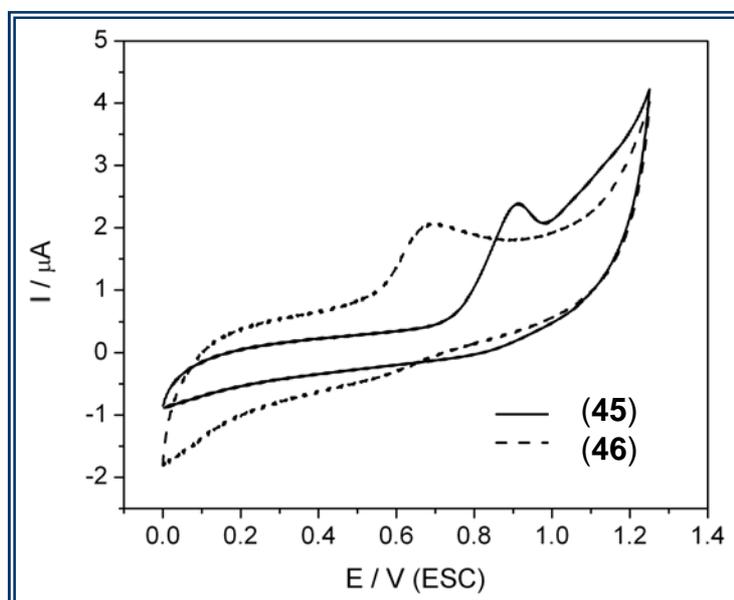


Figura 32 - Voltamogramas cíclicos das moléculas **(45)** e **(46)** em NaCl 0,1 M, pH 7,0.

O efeito do pH sobre a oxidação de ambas as moléculas mostrou-se pouco relevante, destacando-se apenas uma leve queda no potencial anódico em pH alcalino.

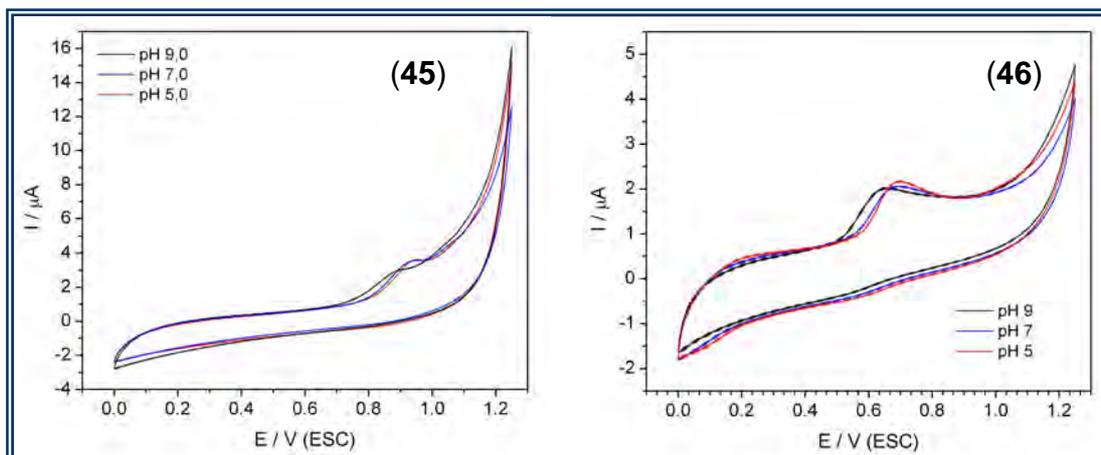


Figura 33 – Efeito do pH sobre os compostos (45) e (46) em NaCl, 0,1 M, 0 a 1,25 V; 100 mVs⁻¹

A partir dos estudos eletroquímicos e de metabolismo, observamos uma correlação em termos qualitativos. O composto (46) que apresentou menor potencial oxidativo, também apresentou a formação de maior número de metabólitos nos modelos microbianos de biotransformação quando comparado ao composto (45), que apresentou maior potencial oxidativo e menor número de metabólitos formados.

Porém, estes compostos não apresentaram perfil antioxidante, através da análise dos voltagramas, o que seria benéfico devido sua ação sinérgica no SNC. Não observamos esse fato, visto que ambos compostos (45) e (46) apresentaram apenas uma curva no sentido oxidativo, não apresentando a curva de retorno, no sentido de redução.

5.5 Difração de raios-X

De posse do monocristal do composto **(46)**, o mesmo teve sua estrutura elucidada inequivocamente, através da técnica de difração de raios X.

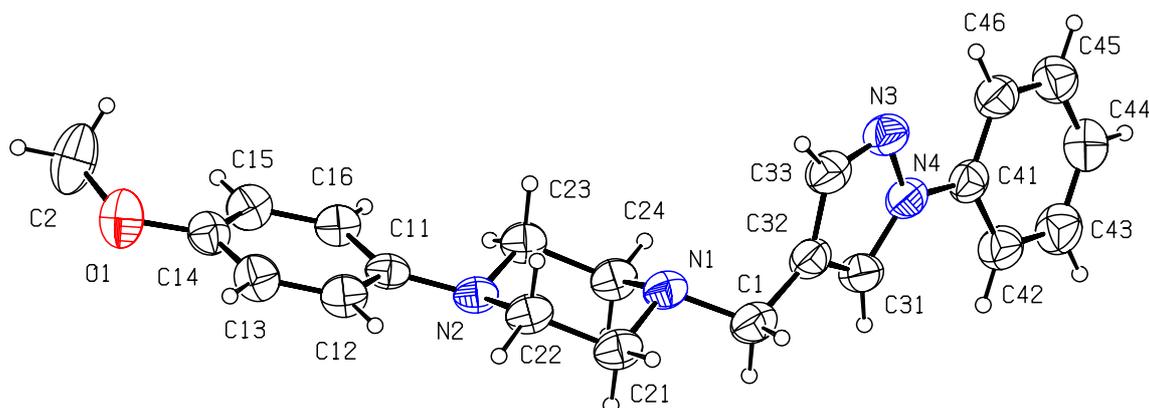


Figura 34 – Difração de raio-X do composto (46).

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente) (KLUG e ALEXANDER, 1994). Neste trabalho, a técnica foi utilizada como ferramenta complementar na caracterização do composto **(46)** visto que outras técnicas foram utilizadas.

5.6 Ensaios farmacológicos

5.6.1 Ensaio de binding

Este ensaio permite caracterizar a seletividade dos compostos (45) e (46) como ligantes de receptores dopaminérgicos (D_2) e serotoninérgicos ($5HT_{1A}$ e $5-HT_{2A}$) conforme antecipado no planejamento estrutural.

Como podemos observar no Gráfico 4, o candidato a protótipo de fármaco (45) foi testado em diferentes concentrações a fim de determinar qual seria melhor para inibir os receptores $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ e D_2 .

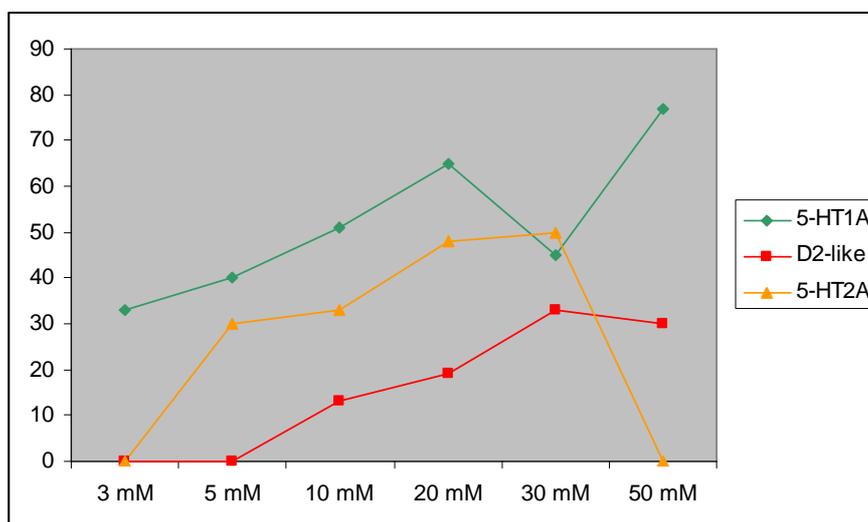


Gráfico 4 – Ensaio de ligação do composto (45) em diferentes concentrações frente aos receptores $5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$ e D_2 .

Este ensaio mostrou que o composto (45) não apresentou afinidade pelos receptores testados. Mostrando ainda que a dificuldade de solubilização do (45) promoveu a precipitação do mesmo durante o ensaio em concentrações de $30\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$ para receptores do tipo $5-HT_{2A}$.

Foram feitos ainda ensaio de concentração inibitória para medir a inibição de 50% dos receptores (CI_{50} nM) e observamos que o candidato a protótipo (45) necessita de grande concentração para causar inibição dos receptores (Tabela 4).

Tabela 4 – CI_{50} (nM) para inibição dos receptores comparativamente aos antipsicóticos atípicos de referência.

Substância	5-HT_{1A}	5-HT_{2A}	D₂
(45)	33.000	22000	9.000
8-OH-DPAT	1	-	-
Clozapina (23)	850	440	-
Aripiprazol (3)	1	4	-

Como observado, a concentração necessária para inibir 50% (CI_{50}) dos receptores para o composto **(45)** foi de 33.000, 22.000 e 9.000 respectivamente para os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e D₂. A substância denominada de 8-OH-DPAT foi o radioligante utilizado para testes de afinidade pelos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}) em hipocampo de cérebro de ratos. Comparativamente ao antipsicótico clozapina **(28)**, o composto precisa de uma quantidade 35 vezes maior para promover o mesmo efeito inibitório. O composto **(3)** é um agonista parcial de receptores D₂, antagonista de receptores 5-HT₂ e agonista parcial de receptores 5-HT_{1A} e foi utilizado como padrão nesse experimento.

6. CONCLUSÕES

Ao término deste trabalho foi possível concluir todos os objetivos propostos.

A metodologia sintética empregada na obtenção dos compostos **(45)** e **(46)** se mostrou adequada, uma vez que a mesma permitiu a obtenção das moléculas objeto de estudo em rendimentos globais de 87 e 90%.

Os compostos foram isolados e identificados por CCD, IV, RMN.

A partir do “screening” realizado para escolha da cepa capaz de produzir o maior número de metabólitos, foi possível observar que todas as cepas foram capazes de biotransformar os compostos **(45)** e **(46)**. Neste sentido, o fungo *Aspergillus candidus* produziu maior número de metabólitos, foi eleito para os ensaios semipreparativos. Através destes ensaios o composto **(45)** produziu o metabólito 4-(4-((4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)metil-1*H*-pirazol-1-il)fenol **(74)** e o composto **(45)** produziu dois prováveis metabólitos, sendo apenas o composto 4-(4-((4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)metil-1*H*-pirazol-1-il)fenol **(77)** identificado através de espectrometria de massas, número de prováveis metabólitos menor, quando comparados ao protótipo LASSBio 579 **(41)**, que produziu cinco metabólitos. A partir dos ensaios de voltametria cíclica para os compostos **(45)** e **(46)**, observamos que o composto que apresentou menor potencial oxidativo, foi o que apresentou a produção de maior número de metabólitos.

Os ensaios farmacológicos de “binding” realizados para o composto **(45)** mostraram que o mesmo não é reconhecido satisfatoriamente pelos receptores ensaiados, *i.e.* serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}) e dopaminérgicos (D₂).

Por fim, a partir das informações mencionadas acima, podemos concluir que o planejamento empregado no desenho dos novos candidatos a protótipos de fármacos **(45)** e **(46)** foi parcialmente validado, uma vez que as mesmas foram reconhecidas pelos receptores testados com baixa afinidade. Por outro lado, as compostos **(45)** e **(46)** apresentaram maior estabilidade frente ao metabolismo.

7. PERSPECTIVAS

Obtenção dos metabólitos em maior quantidade e melhor grau de pureza, para dar prosseguimento aos estudos adicionais listados abaixo.

Avaliar o perfil toxicológico dos compostos **(45)**, **(46)** e de seus metabólitos, através colaboração com o Laboratório de Toxicologia coordenado, pela professora Dr^a. Marize Campos Valadares.

Avaliar o perfil de “binding” dos compostos **(45)** e dos metabólitos, através colaboração com o Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo professor Dr. François Noël.

Elucidação estrutural através do emprego de difração de raios x dos compostos **(45)** dos metabólitos, através colaboração com o Laboratório de Cristalografia, coordenado pelo Prof. Dr José Ricardo Sabino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2008 REPORT Medicines in Development for Mental Illness. Disponível em: <<http://www.phrma.org/files/Mental%202008.pdf> >. Acesso em: 19 set. 2009

2009 NEW Drug in Approvals in 2009. Disponível em: <<http://www.phrma.org/media/NDA2008.pdf> >. Acesso em: 8 out. 2009.

ALEXANDER, F. ; SELESNICK, S. The history of psychiatry: an evaluation of psychiatric thought and practice from prehistoric times to the present. New York: Harper & Row. 1966.

ADITYANJEE, D.; ADERBIGBE, Y.; THEODORIDIS, D.; VIEWEG, V. Dementia praecox to schizophrenia: The first 100 years. Psychiatry and Clinical Neuroscience, 1999, 53, 437- 448.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella – A microbial model for drug metabolism studies – A review. BIOTECHNOLOGY ADVANCES 27 (2009) 16–29

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In Advances Biochemical Engineering/Biotechnology (Biotransformations), ed. K. Faber,169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

AZERAD,R.; ALEXANDRE,V.; LADRIL,S.; MAURS, M. Microbial models of animal drug metabolism Part 5. Microbial preparation of human hydroxylated metabolites of irbesartan. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC 29 (2004) 173–179

BAUMEISTER, A. A; FRANCIS, J. L. **Historical development of the dopamine hypothesis of schizophrenia.** Journal of the history of the neurosciences(2002), 11(3), 265-77.

BEEBE, L. Theory-based research in schizophrenia. Perspectives in Psychiatric Care, 2003; 39(2), 67-74.

BILDER, R. M.; VOLAVKA, J.; LACHMAN, H.M.; GRACE, A. A. The Catechol-O-Methyltransferase Polymorphism: Relations to the Tonic-Phasic Dopamine Hypothesis and Neuropsychiatric Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* (2004), 29(11), 1943-1961.

BLATT, C.R.;FARIAS, M.R. Diagnóstico do Programa de Medicamentos Excepcionais do Estado de Santa Catarina - Brasil. *Lat Am J Pharm.* 2007;26(5):776-83.

BORGIO, J. G. F.; BRESSAN, R. A.; BARBOSA, N. J. B.; DALTIO, C.S. Refractory schizophrenia: a neglected clinical problem. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)* (2007), 29(3), 292-3.

BRENNEMAN, D. E.; HAUSER, J.; NEALE, E.; RUBINRAUT, S.; FRIDKIN, M.; DAVIDSON, A.; GOZES, I. Activity-dependent neurotrophic factor: structure-activity relationships of femtomolar-acting peptides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1998), 285(2), 619-627.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Hipótese Glutamatérgica da Esquizofrenia, *Revista Brasileira de Psiquiatria*, vol.25 n°3 São P aulo, setembro 2003.

CANNON, L. E.; JONES, S. D. Phage display and pharmaceutical discovery. *Innovations in Pharmaceutical Technology* (1998), 1(1), 54-62.

CARLSSON, L. Schizophrenia throughout the ages: The prehistoric times. *Hubin Brain Informatics: Your portal to schizophrenia*. Disponível em: http://www.hubin.org/facts/history/history_schizophrenia_en.html .2005. Acesso em 24 de jan.2010.

CERNIGLIA, C.E.; ZHANG, D.; FREEMAN, J. P., SUTHERLAND, J.B., WALKER, A.E.; YANG, Y. Biotransformation of Chlorpromazine and Methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Applied and environmental microbiology*, Mar. 1996, p. 798–803 Vol. 62, No. 3

CHAVES, R.G., LAMOUNIER, J. A. Uso de medicamentos durante a lactação: Aleitamento materno, lactação, medicamentos. *J Pediatr (Rio J)*; 2004 ;(80);189-198.

CLINTON, S. M.; IBRAHIM, H. M.; FREY, K. A.; DAVIS, K. L.; HAROUTUNIAN, V.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Dopaminergic abnormalities in select thalamic nuclei in schizophrenia: involvement of the intracellular signal integrating proteins calcyon and spinophilin. *The American journal of psychiatry* (2005), 162(10), 1859-71.

DALTIO, C.S.; MARI, J.J.; FERRAZ, M. B. Estudos farmacoeconômicos e carga da doença em esquizofrenia (2007). *Revista de Psiquiatria Clínica. Rev. psiquiatr. clín.* vol.34 suppl.2 São Paulo 2007.

DEUTSCH, S. I.; MASTROPAOLO, J; SCHWARTZ, B. L.; ROSSE, R. B.; MORIHISA, J. M. A "Glutamatergic Hypothesis" of Schizophrenia: Rationale for Pharmacotherapy with Glycine *Clinical Neuropharmacology*: 1989 – 12 (1) - 1-13.

EVANS, K.; MCGRATH, J.; MILNS, R. Searching for schizophrenia in ancient Greek and Roman literature: A systemic review. *Acta Psychiatrica Scandinavia*, 2003,107, 323-330.

FRAGA, C.A.M.; MENEGATTI, R.; RATES, S.M.K.; BARREIRO, E.J.; NEVES, G.; BETTI, A.H.; KLIEMANN, M.; TASSO, L.; CONRADO, D.J.; DALLA COSTA, T.; DE OLIVEIRA, V.; NOËL, F. Descoberta de novos protótipos *N*-fenilpiperazínicos heteroarilazólicos candidatos a fármacos antipsicóticos atípicos. *Rev. Virtual Quim.*, 2009, 1 (4), no prelo.

FURA, A.; SHU, Y.Z.; ZHU, M.; HANSON, R. L.; ROONGTA, V.; HUMPHREYS, W. G. Discovering Drugs through Biological Transformation: Role of Pharmacologically Active Metabolites in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* (2004), 47(18), 4339-4351.

GERSHELL, L.J.; AKINS, J.H. A brief history of novel drug discovery technologies. *Nature reviews. Drug discovery* (2003), 2(4), 321-7.

GILMAN, S. *et al.*; **Manter and Gat'z Essential of Clinical Neuroanatomy and Neurophysiology**. 9. ed., Filadélfia: F. A. Davis Company, 1996.

GLOBAL Pharmaceutical Market Size & Growth by Region, 2009. Disponível em: <http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/Global_Pharm_Market_by_Region.pdf>. Acesso em: junho de 2010.

GOMES, T.C. Bioconversão do derivado N-fenilpiperazínico LASSBio 579, um potencial candidato a protótipo de fármacos. 2007. 119. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

HU, C.P., LI Y.J. Research progress in pharmacological actions of evodiamine and rutaecarpine. *Chin Pharm Bull* 2003;10:1084–7.

KALKMAN, H. O., FEUERBACH, D., LÖTSCHER, E. AND SCHOEFFTER, P. Functional characterization of the novel antipsychotic iloperidone at human D₂, D₃, α_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT_{1A} receptors; Novartis Pharma AG, Research Nervous System, Building S-360-405 CH-4002, 2003;

KANE J, HONIGFELD G, SINGER J, MELTZER HY. The Clozaril Collaborative Study Group. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 1988;45:789-96.

KAPUR, S.; MAMO, D.; PAPTODOROU, G.; MANN, S.; THERRIEN, F.; REMINGTON, G. A PET Study of Dopamine D2 and Serotonin 5-HT2 Receptor Occupancy in Patients With Schizophrenia Treated With Therapeutic Doses of Ziprasidone. *Am J Psychiatry* 2004; 161:818–825.

KNAPP M., SIMON J., PERCUDANI M., Almond S. Economics of schizophrenia: a review. In: Maj M, Sartorius N (editors). *WPA Series in Evidence-Based Psychiatry: Schizophrenia*. 2. ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2002. p.413-60.

KRUPP P, BARNES P. Leponex®-associated granulocytopenia: a review of the situation. *Psychopharmacol* 1989;99(Suppl):S118-S21.

LARUELLE, M. ET AL. - Single Photon Emission Comupterized Tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9235-9240, 1996.

LEE, C; MCGLASHAN, T. H; WOODS, S. W. **Prevention of schizophrenia: can it be achieved?** *CNS drugs* (2005), 19(3), 193-206.

LI L.; LIU R.; YE M.; HUA X.;WANG Q.; BI K.; GUOA D. Microbial metabolism of evodiamine by *Penicillium janthinellum* and its application for metabolite identification in rat urine, 2005.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. **Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design.** *Current Medicinal Chemistry* (2005), 12(1), 23-49.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E.J. **The rebirth of a drug: thalidomide.** *Quimica Nova* (2001), 24(5), 683-688.

LINDNER, L. M; MARASCIULO, A. C; FARIAS, M. R; GROHS, G. E. M. **Economic evaluation of antipsychotic drugs for schizophrenia treatment within the Brazilian Healthcare System.** *Revista de saude publica* (2009), 43 Suppl 1 62-9.

LYDON, N.B.; DRUKER, B.J. **Lessons learned from the development of imatinib.** *Leukemia Research* (2004), 28(Suppl. 1), S29-S38.

MAEHARA, S., HIKICHI, H, SATOW, A, OKUDA, S, OHTA, H. Antipsychotic property of a muscarinic receptor agonist in animal models for schizophrenia.; *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 91 (2008) 140–149

MENEGATTI, R.; CUNHA, A. C.; FERREIRA, V. F.; PEREIRA, E. F. R.; EL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A. T.; ALBUQUERQUE, E. X.; NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. *Desing, Synthesis and Pharmacological Profile*

of Novel Dopamine D2 Receptor Ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p. 4807-4813, 2003.

MENEGATTI,R; FRAGA, C.A.M; BARREIRO,E.J; LIMA, V.L.E; RATES, E.M.K; COSTA, T.D; Esquizofrenia: quarenta anos da hipótese dopaminérgica sob a ótica da química medicinal, *Química Nova*, Vol. 27, N°3, 447 – 455, 2004.

MENEGATTI, Ricardo. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de agentes anti-psicóticos**. 2001. 175 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

MICALE, M., & PORTER, R. *Discovering the history of psychiatry*. New York: Oxford University Press.1994.

MORPHY,R.; RANKOVIC, Z. **Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm**. *Journal of medicinal chemistry* (2005), 48(21), 6523-43.

NETO, A.G.A.A; BRESSAN, R.A; FILHO, G.B.; Fisiopatologia da Esquizofrenia: aspectos atuais, *Revista de Psiquiatria Clínica*, vol.34, supl2, São Paulo, 2007.

PEARCE C. M.; LUSHNIKOVA M.V. Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*, 2006.

PODUST, L.M., POULOS, T.L., WATERMAN, M.R. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Journal: (2001) Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 98. 3068

ROCCATAGLIATA, G. Classical concepts of schizophrenia. In J. Howells , *The concept of schizophrenia: Historical perspectives*. American Psychiatric Press. 1991.1-27.

SILVERSTEIN, R.; BASSLER, G.; MORRILL, T.; **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. ed., Filadelfia: F. A. Davis Company, 1996.

SHITIJ, K; IVES, L. Dopamine in the Pathophysiology and Treatment of Schizophrenia: New Findings. Am J Psychiatry 162:2204-a-2205, November 2005

STONE, J.M.; MORRISON, P.D.; PILOWSKY, L.S. - Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia: a synthesis and selective review. J Psychopharmacol, 2007

TANAKA, H; KAMIKUBO, T; YOSHIDA, N; SAKAGAMI, H; TANIGUCHI, T; OGASAWARA, K. **Enantio- and Diastereocontrolled Synthesis of (-)-Iridolactone and (+)-Pedicularis-lactone.** Organic Letters (2001), 3(5), 679-681.

TOP 15 Global Products, 2008. Disponível em: <http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/Global_Top_15_Products.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2009.

VAN ELST, L. T; VALERIUS, G; BUCHERT, M; THIEL, T; RUSCH, N; BUBL, E; HENNIG, J; EBERT, D; OLBRICH, H.M. **Increased prefrontal and hippocampal glutamate concentration in schizophrenia: evidence from a magnetic resonance spectroscopy study.** Biological psychiatry (2005), 58(9), 724-30.

VOLAVKA J; BILDER, R. M; LACHMAN, H. M. **Genetic linkage for schizophrenia?** The American journal of psychiatry (2004), 161(6), 1134-5; author reply 1135-6.

WALTERS, R.; Schizophrenia: A cyclical and heterogeneous dysfunction of cognitive and sensory processing. <http://www.cellscience.com/shdss2.html>. Acesso em [17/09/2009](#).

WARREN, S, CLAYDEN, J., GREEVES, N., and WOTHERS, P. – **Organic Chemistry**, 1 st ed. New York: Oxford University Press, Inc., 2001.

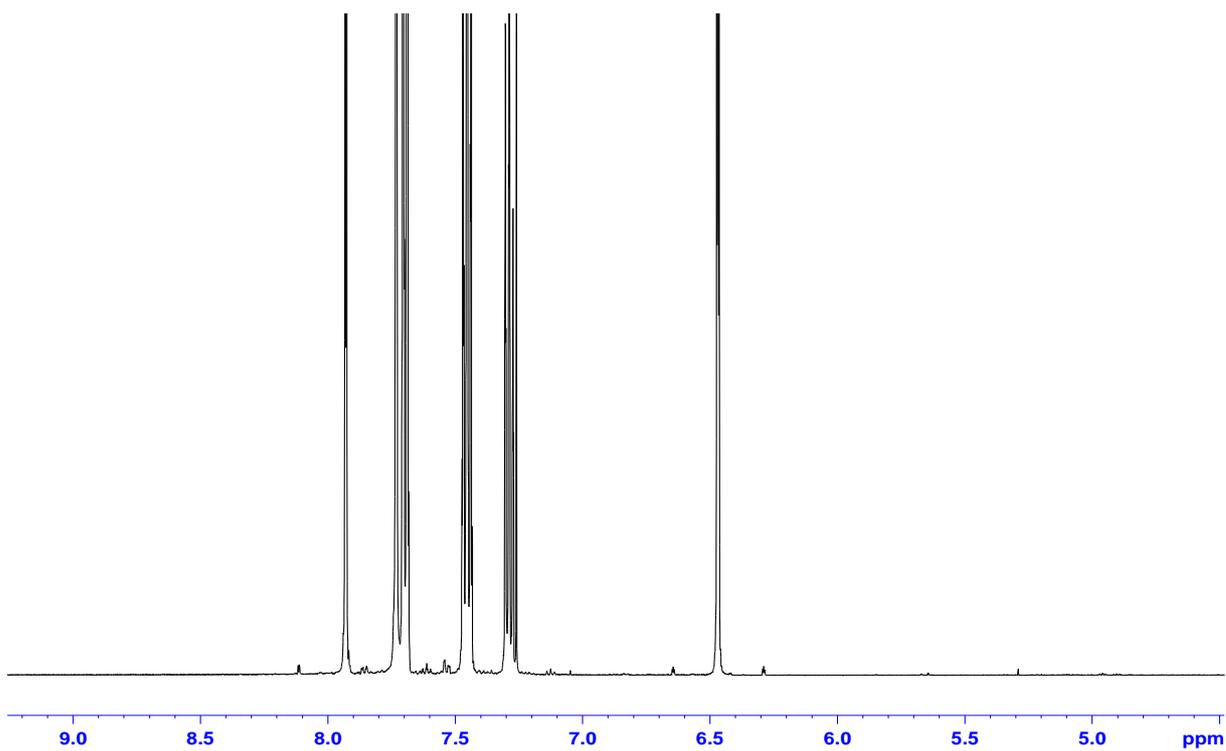
WERMUTH, C. Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, (6), p. 1303-14, 2004.

WODE-HELGODT, B; ALFREDSSON, G. Concentrations of chlorpromazine and two of its active metabolites in plasma and cerebrospinal fluid of psychotic patients treated with fixed drug doses. *Journal of Psychopharmacology*. Vol. 73. nº 1. 1981. 55-62.

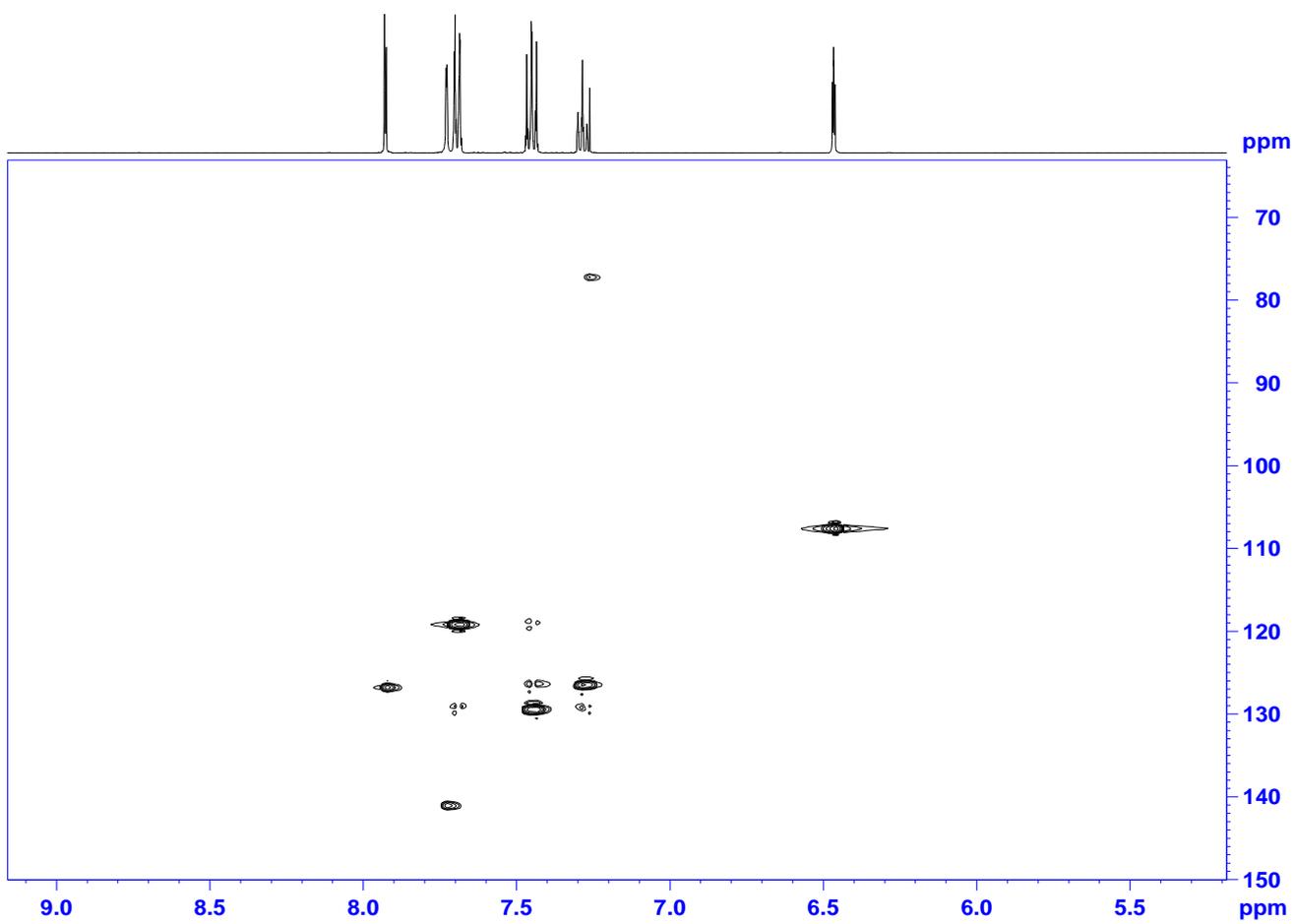
WONG, A. H. C.; VAN T. H.; *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003, 27, 269.

WU, E. Q; BIRNBAUM, H. G; SHI, L; BALL, D. E; KESSLER, R. C; MOULIS, M; AGGARWAL, J. **The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002.** *The Journal of clinical psychiatry* (2005), 66(9), 1122-9.

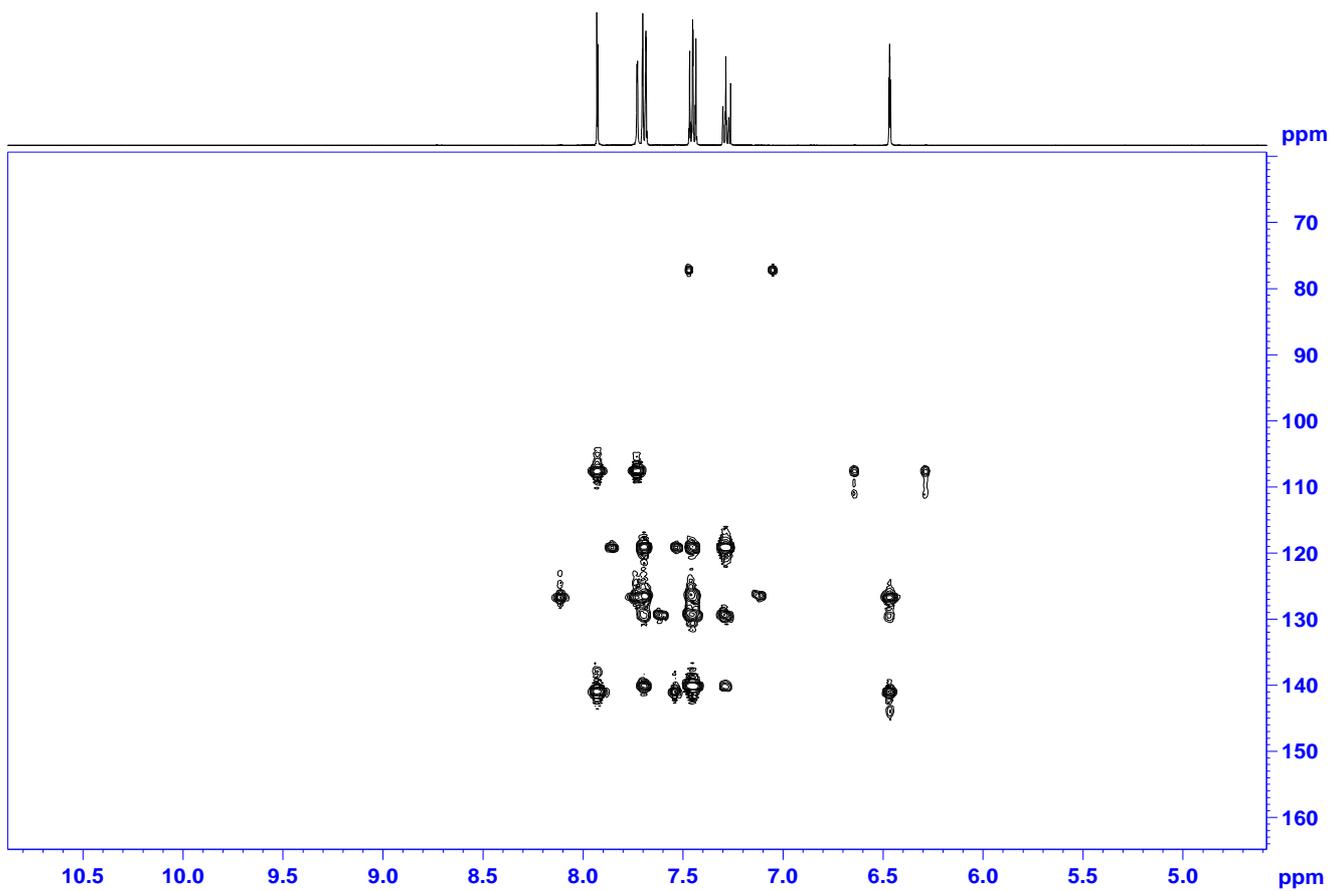
ANEXOS



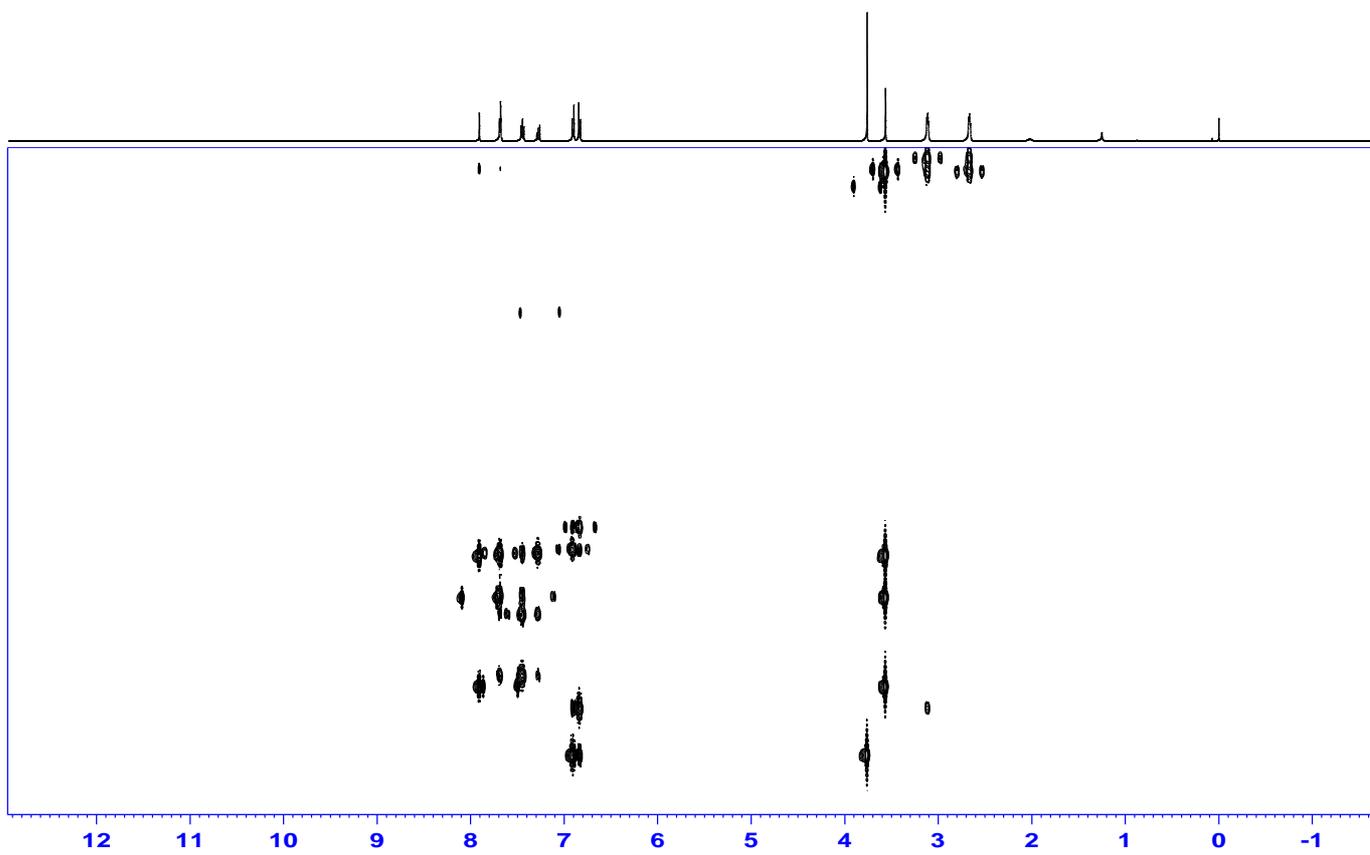
Espectro 10 – Espectro de RMN de 1H do composto (48).

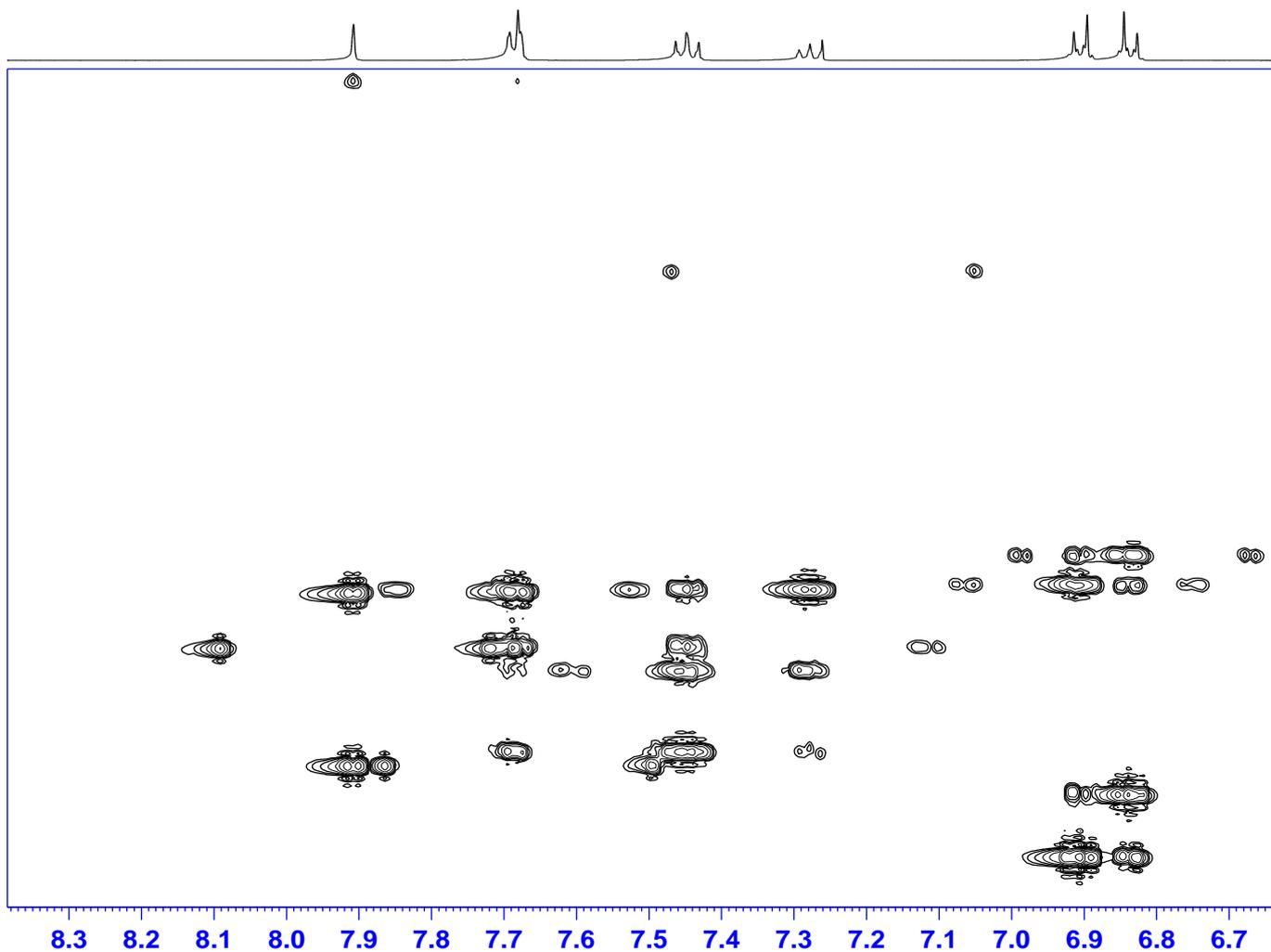


Espectro 11 – Espectro bidimensional HSQC do composto (48).

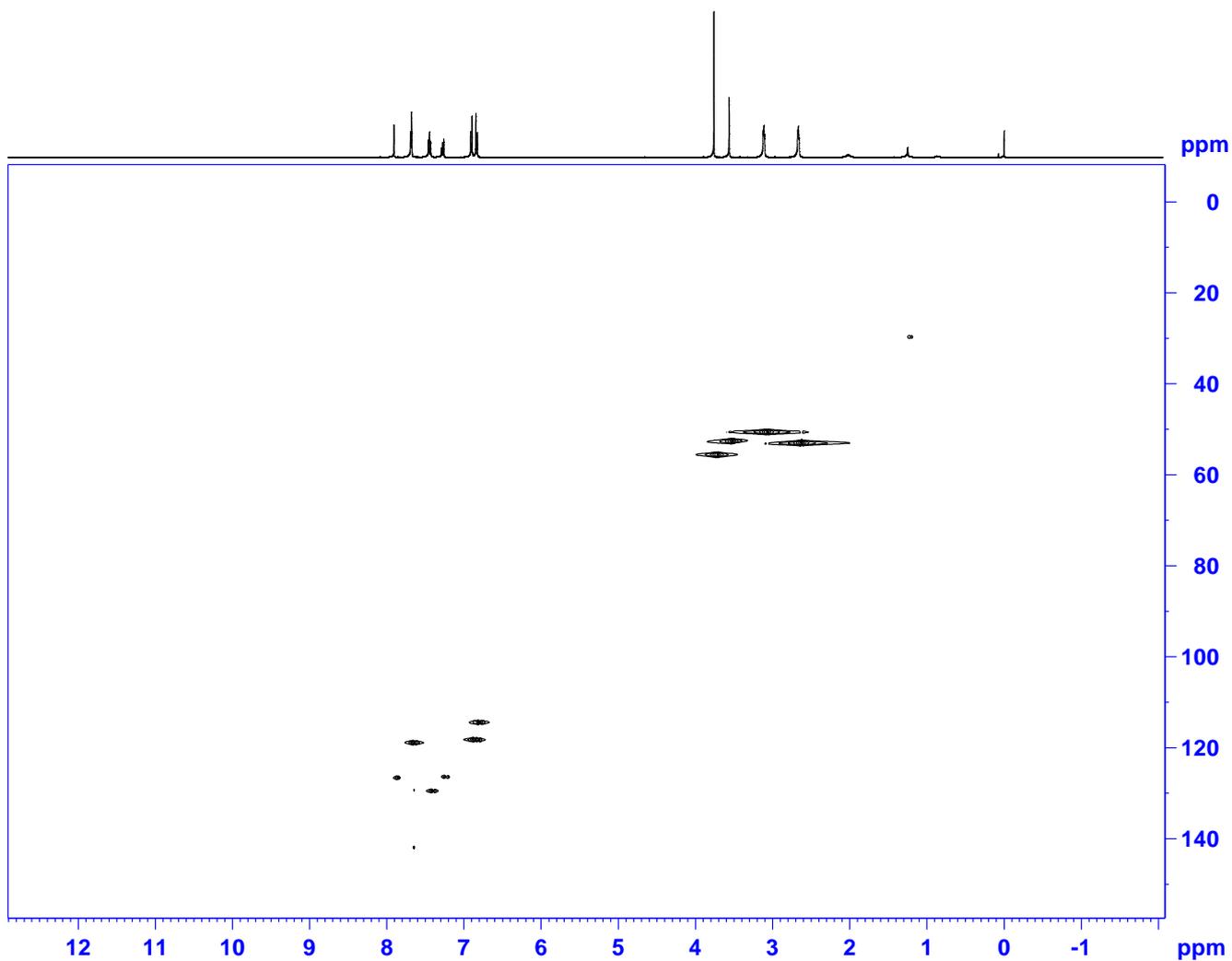


Espectro 12 – Espectro bidimensional de HMQC do composto (48).

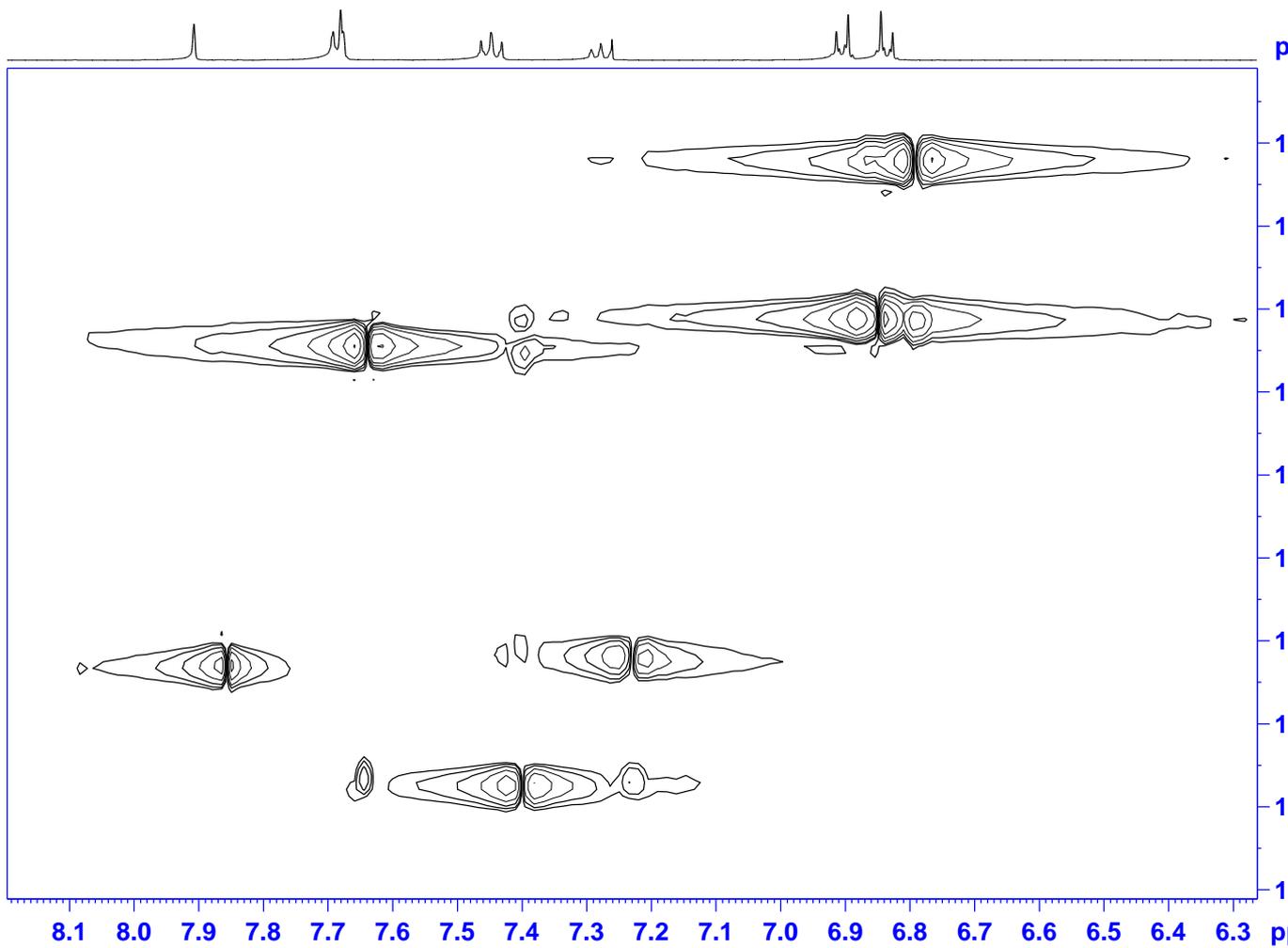




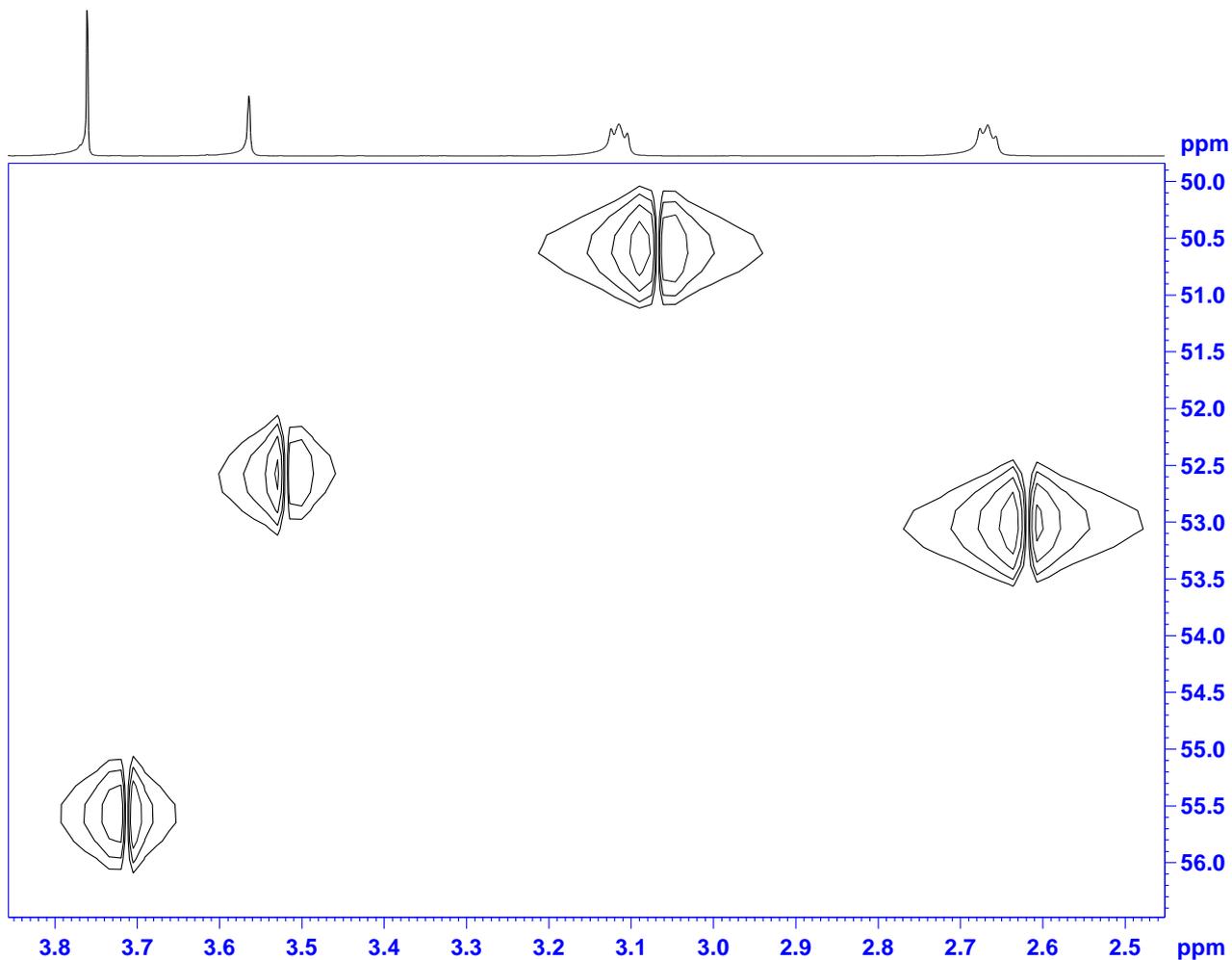
Espectro 14 – Expansão da região dos aromáticos do espectro HMBC do composto (45).



Espectro 16 – Espectro bidimensional de HSQC do composto (45).



Espectro 17 – Expansão da região dos aromáticos do espectro de HMQC do composto (45).



```

Current Det
NAME
EXPNO
PROCNO
F2 - Acquis
Date_
Time
INSTRUM
PROBHD 5
PULPROG
TD
SOLVENT
NS
DS
SWH
FIDRES
AQ
RG
DE
TE
CNS2
D0
D1
D4
D11
D13
D16
IN0
ZGPTNS
===== CH
NUC1
F1
F2
F3
F4
PCPD2
PL1
PL12
PL2W
PL12W
SFO2
===== CH
NUC2
F3
F4
PCPD2
PL1
PL12
PL2W
PL12W
SFO2
===== GRAD
GRNAM1
GRNAM2
GPZ1
GPZ2
F16
F1 - Acquis
ND0
TD
SFO1
FIDRES
SW
FMODE
F2 - Proces
SI
SF
WDW
SSB
LB
GB
PC
F1 - Proces
SI
MC2
SF
WDW
SSB
LB
GB

```

Espectro 18 – Expansão da região dos alifáticos do espectro de HSQC do composto (45).