



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Luiz Antonio Escorteganha Pollo

Síntese de substâncias com potencial canabinomimético

Florianópolis

2022

Luiz Antonio Escorteganha Pollo

Síntese de substâncias com potencial canabinomimético

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti
Coorientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Escorteganha Pollo, Luiz Antonio
Síntese de substâncias com potencial canabinomimético /
Luiz Antonio Escorteganha Pollo ; orientadora, Maique
Weber Biavatti, coorientador, Louis Pergaud Sandjo, 2022.
180 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Canabinóides. 3. Síntese orgânica. 4.
Isoindolinonas. 5. Ciclohexanonas. I. Weber Biavatti,
Maique. II. Pergaud Sandjo, Louis. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. IV. Título.

Luiz Antonio Escorteganha Pollo

“Síntese de substâncias com potencial canabinomimético”

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Marcus Cesar Mandolesi Sá (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Márcia Maria de Souza (UNIVALI – Membro Titular)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Profa. Dra. Maique Weber Biavatti - Orientadora

Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo - Coorientador

Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Farmácia

Florianópolis, 25 de abril de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, que pouco tiveram, mas muito me deram para que pudesse estar aqui.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Farmácia pela oportunidade de realização deste trabalho;

A CAPES pela bolsa de estudos concedida e pelo apoio financeiro;

À minha orientadora e eterna amiga, a Profa. Dra. Maique W. Biavatti pela orientação, confiança, incentivo e suporte acadêmico e emocional, que foram necessários não somente para a execução deste doutorado, mas durante todos os meus onze anos de formação acadêmica na UFSC;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo, pelo apoio e discussões engajadas visando sempre o avanço científico na nossa área;

Aos membros da banca por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho;

Agradeço a minha mãe, que mesmo muitas vezes passando por dificuldades fez de tudo pra que tivéssemos condições de estudar;

Agradeço a meu pai, pelas lições e por me mostrar que sempre existe um jeitinho pra fazer algo dar certo, mesmo que fique um pouco estranho, sinto a sua falta;

Ao meu querido Guilherme por estar sempre ao meu lado, construir uma vida comigo;

Aos meus amigos do antigo CEFET-SC, em especial Gaby, Krissie, Helton e Lenon;

E por fim, mas não menos importante, aos meus grandes amigos de laboratório, que durante esses onze anos foram muitos, mas que fizeram o tempo passar tão rápido pois me senti em casa, em especial, Layzon, Larissa G., Larissa F., Amanda, Ingrid, Erlon e Solomon.

*“a jack of all trades is a master of none,
but oftentimes better than a master of one.”*

William Shakespeare.

RESUMO

O sistema canabinoide em sua essência é composto principalmente por dois receptores celulares acoplados à proteína G, uma enzima e os seus ligantes endógenos. O presente trabalho teve como objetivo fazer uso do potencial terapêutico do sistema canabinoide, no manejo da dor e inflamação, através da produção e substâncias ativas neste sistema. Esta tese compreende uma revisão da literatura a respeito do sistema canabinoide, os estudos que viabilizaram a produção de aril-ciclohexanonas e aril-ciclohexenonas com algumas similaridades estruturais a canabinoides bicíclicos, isoquinolinonas e isoindolinonas baseadas em estruturas de aminoalquilindóis, dando ênfase as isoindolinonas pela possibilidade deste heterociclo de atuar como bioisómero do sistema indólico. Foram obtidas neste trabalho, através de reações multicomponentes, onze aril-ciclohexanonas com diferentes substituintes aromáticos, e onze aril-ciclohexenonas (também conhecidas como ésteres de Hagemann), dentre estas, cinco são consideradas inéditas. Também foram produzidas duas isoquinolinonas, três isoindolinonas com cadeias laterais alifáticas e uma isoindolinona unida a um anel tetrahidropirano por um carbono spiro **85**, todas estas consideradas inéditas, fazendo uso das metodologias de Castro-Stephens e Sonogshira. Dentre as substâncias produzidas, foi possível obter resultados promissores a respeito do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da *p*-metoxi aril-ciclohexanona **35**, que apresentou baixa citotoxicidade e potencial de modificar o balanço de polarização de macrófagos RAW 264.7, convertendo-os de M1 (pró-inflamatórios) para M2 (anti-inflamatórios), em concentrações sete vezes mais baixas que a dexametasona. Os estudos *in vivo*, ainda que preliminares demonstraram um potencial de atuação no manejo da nocicepção em doses de 1 e 10 mg/kg, sem efeitos adversos de sedação, compatível com a ativação de receptores canabinoides tipo 2 (CB2), preferência esta que foi evidenciada por estudos *in silico* de ancoramento molecular realizados nesta tese.

Palavras-chave: Canabinoides sintéticos, Aril-ciclohexanonas, Aril-ciclohexenonas, Isoindolinonas, Isoquinolinonas.

ABSTRACT

The endocannabinoid system is essentially comprised mainly of two cell receptors coupled with G protein, one enzyme and its endogenous ligands. The present work had the objective of making use of the therapeutic potential of the cannabinoid system, in pain and inflammation management, through the production of active substances in this system. This thesis is including a literature revision about the endocannabinoid system, and about the studies that made viable the production of aryl-cyclohexanones and aryl-cyclohexenones with some similarities with known bicyclic cannabinoids, isoquinolinones and isoindolinones based on aminoalkylindole structures, giving emphasis on the isoindolinones because of the possibility of this heterocycle to act as a bioisostere to the indolic system. It was possible to obtain eleven aryl-cyclohexanones with different aromatic substituents and eleven aryl-cyclohexenones also known as Hagemann esters, five substances amongst them are newly reported. Also, it was possible to obtain two isoquinolinones, and three isoindolinones with side chains, and an isoindolinone fused to a tetrahydropirane ring by a spiro carbon **85**, all of them are new substances, making use of Castro-Stephens and Sonogashira methodologies. Amongst these substances it was possible to obtain promising results about the anti-inflammatory and anti-nociceptive of the *p*-methoxy aryl-cyclohexanone **35**, which presented low cytotoxicity and potential to change the polarization balance of RAW 264.7 macrophages, from M1 (pro-inflammatory) to M2 (anti-inflammatory), in concentrations seven times lower than Dexamethasone. The preliminary *in vivo* studies, have shown a potential of actuation on nociception at the doses of 1 and 10 mg/kg, without sedation side effects, compatible with cannabinoid type 2 receptor (CB2) activation, this preference was evidenced by *in silico* molecular docking studies shown in this thesis.

Keywords: Synthetic cannabinoids. Aryl-cyclohexanone. Aryl-cyclohexenone. Isoindolinones. Isoquinolinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas dos principais canabinoides Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD), respectivamente.....	22
Figura 2- Estruturas dos endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonilglicerol (2-AG).....	24
Figura 3- Comparação entre as sequências dos receptores CB1 e CB2, onde Query se refere a CB2 e Sbjct a CB1 e a linha entre Sbjct e Query se refere ao resultado da comparação das sequências de aminoácidos.	25
Figura 4- Sequência canônica do receptor CB1 em sua totalidade com 472 resíduos de aminoácidos na forma de códigos de uma letra, representadas em preto as regiões extracelulares, na ordem N-terminal, LE1, LE2 e LE3, em vermelho as sete alfa-hélices da região transmembrana, e em azul as regiões intracelulares, na ordem LI1, LI2 e LI3 e C-terminal.....	28
Figura 5- Estrutura dos agonistas sintéticos AM-11542 (5) e AM-841 (6).....	28
Figura 6- Representação tridimensional do receptor CB1 humano (PDB:5XRA) e suas regiões correlatas, em verde na posição superior o domínio extracelular, em vermelho a região transmembrana, e em azul o domínio intracelular exposto ao citosol.....	29
Figura 7- Representação do agonista AM11542 inserido no sítio ativo do receptor CB1 (PDB:5XRA) com os resíduos de aminoácidos próximos, em destaque os resíduos de fenilalanina F200 e triptofano W356, responsáveis pela mudança conformacional do receptor quando afastados pelas duas metilas do agonista.....	30
Figura 8- Complexos CB1 – agonista, demonstrando a amplitude de movimento das alfa-hélices indicadas, em laranja complexo CB1-AM11542 (agonista) e em azul complexo CB1-AM6538 (antagonista) com a face extracelular a esquerda e intracelular a direita.	30
Figura 9- Sequência canônica do receptor CB2 representando em preto as porções do domínio extracelular, N-Terminal, LE1, LE2 e LE3, em vermelhos as sete alfa-hélices da região transmembrana, e em azul o domínio intracelular LI1, LI2, LI3 e C-Terminal..	32
Figura 10- Representação do receptor CB2 com suas porções detalhadas: em verde o domínio extracelular, em vermelho a região transmembrana e em azul o domínio intracelular passivo de interação com proteína G.....	33

Figura 11– Esqueletos alternativos de fitocanabinoides, com R sendo o radical alifático n-pentil presente em todos os análogos.	38
Figura 12– Comparação das estruturas de THC, THCP e CP55,940 e seus valores de K_i	39
Figura 13 - Exemplo da estrutura de um canabinoide não clássico JWH-018 e as regiões marcadas com exemplos de possibilidades para modificação estrutural, O análogo em questão apresenta uma baixa seletividade quando comparado o K_i dos dois alvos, e possui um perfil de agonista confirmado por ensaios de acúmulo de AMPc.	40
Figura 14– Comparação entre estruturas de canabinoides sintéticos e o impacto dos substituintes na afinidade com os receptores.	41
Figura 15– Agonista inverso CB1 Rimonabanto com as regiões demarcadas salientando a similaridade com os outros canabinoides de perfil agonista.	42
Figura 16– Estereoquímica atribuída às aril-ciclohexanonas e aril-ciclohexenonas e a comparação com a estereoquímica do CBD, reforçando a similaridade entre as geometrias moleculares das estruturas.	46
Figura 17– Comparação do distanciamento relativo entre os grupamentos de interesse identificados na pravadolina (WIN 48,098) e a substância produzida, (a) posicionamento da carbonila, (b) posicionamento do anel aromático, (c) disposição dos sistemas bicíclicos indol / isoindol, (d) disposição da cadeia com rotação livre com o mesmo espaçamento entre o sistema bicíclico e o aceptor de ligações de hidrogênio. A direita a representação da sobreposição das estruturas bidimensionais de ambas as substâncias (WIN 48,098) em vermelho e substância 83 em azul.	51
Figura 18– Representação tridimensional da substância 38 com a identificação dos hidrogênios H-1 (azul), H-2 (vermelho) e H-3 (verde) a esquerda. A direita é representada a curva de Karplus e as linhas referentes as constantes de acoplamento de H-1 e H-3 com H-2, e o ângulo da projeção resultante destas constantes.	57
Figura 19– Espectro de hidrogênio da substância 46 (CDCl ₃ , 300 MHz).	60
Figura 20– Detalhamento dos sinais de ¹ H referentes ao anel ciclohexenona da substância 46.	60
Figura 21– Comparação dos sinais diagnósticos utilizados para a diferenciação entre as isoquinolinonas e as isoindolinonas.	73
Figura 22– Espectro de massas de alta resolução da substância 85.	76

Figura 23– – Sobreposição das poses de melhor RMSD obtidas no processo de validação do ancoramento molecular, A representa o ligante AM-11542 em CB1 e B representa o ligante WIN 55,212-2, em ambos os casos o ligante na pose nativa extraído é representado em magenta, o ligante nativo re-ancorado é representado em ciano, e o ligante com a geometria otimizada e posteriormente ancorado é representado na cor verde.....	79
Figura 24– Sobreposição das poses dos ligantes teste A) Ciclohexanonas em CB1. B) Ciclohexanonas em CB2. C) Ciclohexenonas em CB1. D) Ciclohexenonas em CB2. E) Isoindolinonas em CB1. F) Isoindolinonas em CB2.....	81
Figura 25– Gráfico apresentando os valores da função de scoring goldscore para as substâncias produzidas nesta tese, em azul os valores obtidos para CB1 (5XRA) e em laranja os valores obtidos para CB2 (6PT0).....	83
Figura 26- representação do volume interno dos sítios de ligação ocupados pelos ligantes, a esquerda CB1 (5XRA) e a direita CB2 (6PT0), as setas indicam os pontos de acesso ao sítio de ligação. A) Substância 57 em complexo com CB1. B) Substância 37 em complexo com CB2. C) Substância 81 em complexo com CB1 e CB2.....	85
Figura 27– Representação dos resíduos de AA nos sítios de ligação, à esquerda CB1 (5XRA) e a direita CB2 (6PT0), as linhas tracejadas representam os pontos de interação. A) Substância 57 em complexo com CB1. B) Substância 37 em complexo com CB2. C) Substância 81 em complexo com CB1 e CB2.....	87
Figura 28– Tempos de avaliação dos parâmetros da tétrade canabinoide.....	92
Figura 29– Gráficos representando os parâmetros de locomoção dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.	93
Figura 30– Gráfico representando os parâmetros de catalepsia dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.	94
Figura 31– Gráfico representando o parâmetro de analgesia dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.	95
Figura 32– – Gráfico representando o parâmetro de temperatura corporal, aferida por temperatura auricular, dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.....	96

Figura 33– Gráficos representando os parâmetros de nocicepção dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo), no modelo dor induzido por formalina. 97

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1– Mecanismo de hidrólise de amidas desempenhado por FAAH.	35
Esquema 2– Biossíntese dos fitocanabinoides com seus intermediários, subprodutos da rota a direita e enzimas responsáveis pelos processos em negrito.	37
Esquema 3– Proposta de mecanismo de formação das aril-ciclohexanonas compreendido por condensação de Knoevenagel, e adição de Michael.	44
Esquema 4– Proposta de mecanismo de degradação em meio básico (descarboxilação e eliminação da hidroxila) proposto por Kingsbury e colaboradores.	45
Esquema 5 – Rota sintética exemplificando a produção de isoindolinonas tricíclicas. .	48
Esquema 6– (A) Proposta de mecanismo da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira relativo à formação de uma ligação sigma carbono-carbono entre um haleto de arila e um alcino terminal. (B) Proposta de mecanismo de ciclização resultando nos dois possíveis produtos teóricos isoindolinona e isoquinolinona.	49
Esquema 7– (A) Proposta de mecanismo da reação de acoplamento cruzado de Castro-Stephens relativo à formação de uma ligação sigma carbono-carbono entre um haleto de arila e um alcino terminal. (B) proposta de mecanismo de ciclização resultando nos dois possíveis produtos teóricos isoindolinona e isoquinolinona.	50
Esquema 8– Primeira condição para produção de aril-ciclohexanonas e rendimentos obtidos.	54
Esquema 9– Segunda condição de produção de aril-ciclohexanonas e seus rendimentos	55
Esquema 10– Condição reacional para a produção da substância 46.	58
Esquema 11- Primeira condição para a produção de aril-ciclohexenonas e seus rendimentos obtidos.	61
Esquema 12– Proposta de mecanismo de oxidação das posições 3 e 5 e posterior degradação dos produtos formados.	62
Esquema 13– Segunda condição de produção de aril-ciclohexenonas e seus rendimentos.	63
Esquema 14– Proposta de condição para a produção da isoindolinona tricíclica (33). .	65
Esquema 15- Confôrmeros do substituinte aromático com a rotação em torno do grupamento espaçador (carbonila) e K_i associado e comparação com a forma com a restrição conformacional.	66

Esquema 16– Reações partindo do anidrido ftálico.	67
Esquema 17– Rota sintética proposta como alternativa na utilização da L-Ornitina como diamina.	68
Esquema 18– Rota sintética visando a incorporação da uréia para formação da triazepinona.	68
Esquema 19– Rota sintética visando a incorporação da uréia para formação da triazepinotriona.	69
Esquema 20– Estudo das reações de Sonogashira e Castro-Stephens.	70
Esquema 21– Obtenção das isoindolinonas 84 e 85.	71
Esquema 22– Obtenção da isoindolinona 87 e o subproduto 89.	72
Esquema 23– Hipótese do mecanismo de formação do anel tetrahidropirano na substância 85.	74
Esquema 24– Proposta de mecanismo de fragmentação da substância 85.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Dados de RMN (300 MHz, CDCl ₃) da substância 38.	56
Tabela 2- Dados de RMN (300 MHz, CDCl ₃) da substância 46.	59
Tabela 3- Dados de RMN (300 MHz, CDCl ₃) da substância 50.	63
Tabela 4– Tabela contendo os sinais de RMN das substâncias 81 e 84 com os sinais diagnósticos realçados em vermelho.	74
Tabela 55– Tabela contendo os sinais de RMN da substância 85.	75
Tabela 6– Tabela dos scores obtidos e do valor de RMSD em relação a pose do complexo cristalográfico.	78
Tabela 7– Tabela dos scores (Goldscore) obtidos para cada um dos ligantes avaliados em CB1 (5XRA) e CB2 (6PT0).	82
Tabela 8 – Distâncias observadas das interações dos ligantes com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação em angstroms (Å), os resíduos chave para a atividade nos receptores estão destacados.	86
Tabela 9– Valores observados da função de pontuação nos dois receptores e a distância em angstroms da fenilalanina 200 em CB1 e 177 em CB2.	88
Tabela 10– Valores de concentração citotóxica para 10% (CC10) em macrófagos RAW 264.7	90
Tabela 11– Valores de porcentagem de redução ou aumento de interleucinas em relação ao controle negativo estimulado por LPS.	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 2-AG – 2-Araquidonil Glicerol
- 2-AG – 2-Araquidonilglicerol
- A.A. - Aminoácido
- A.C. – Antes de Cristo
- ACN – Acetonitrila
- AEA – Anandamida
- AEA – Anandamida (Araquidonil Etanolamina)
- AMPc – Monofosfato Cíclico de Adenosina
- CB1 – Receptor Canabinoide 1
- CB1 – Receptor Canabinoide tipo 1
- CB2 – Receptor Canabinoide 2
- CB2 – Receptor Canabinoide tipo 2
- CBD – Canabidiol
- CBD – Canabidiol
- CBDA – Ácido Canabidiólico
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CoA – Coenzima A
- d – duplete
- D.C. – Depois de cristo
- dd - duplo duplete
- FAAH – *Fatty Acid Amide Hydrolase*
- FAAH – Hidrolase de Amida de Ácidos Graxos
- GIRKs – Canais de Potássio Retificadores Associados a Proteína G
- HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*
- J – Constante de acoplamento
- MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitogênio
- OAC – Ácido Olivetólico
- ONU – Organização das Nações Unidas
- PDB – *Protein Data Bank*
- Phe ou F – Fenilalanina
- pKa – Constante de Acidez

PKA – Proteína Quinase A

q – Quarteto

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – simpleto

sl – simpleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

t – Tripleto

THC – Tetrahydrocannabinol

THC – Tetrahydrocannabinol

THCA – Ácido Tetrahydrocannabinólico

THCP – Tetrahydrocannabiforol

THF – Tetrahydrofurano

TMS - Tetrametilsilano

Trp ou W - triptofano

U.V. – Luz Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 ALVOS MOLECULARES DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE.....	24
1.1.1 RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 1 (CB1).....	27
1.1.2 RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 2 (CB2).....	32
1.1.3 HIDROLASE DE AMIDA DE ÁCIDOS GRAXOS (FAAH)	34
1.2 MOLÉCULAS QUE ATUAM NO SISTEMA ENDOCANABINOIDE	36
1.2.1 ENDOCANABINOIDES	36
1.2.2 FITOCANABINOIDES	36
1.2.3 CANABINOIDES SINTÉTICOS	39
1.3 ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE SUBSTÂNCIAS COM ALTA AFINIDADE PELO SISTEMA CANABINOIDE	43
1.3.1 ARIL-CICLOHEXANONAS E CICLOHEXENONAS.....	43
1.3.2 ISOINDOLINONAS	46
1.4 ESTRATÉGIAS <i>IN SILICO</i> PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAL CANABINOMIMÉTICO.....	52
2 OBJETIVOS	53
2.1 OBJETIVO GERAL.....	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 ARIL-CICLOHEXANONAS	53
3.2 ARIL-CICLOHEXENONAS E DERIVADOS.....	58
3.3 ISOINDOLINONAS	65
3.4 ANCORAMENTO MOLECULAR	77
3.4.1 VALIDAÇÃO DO MODELO.....	77

3.4.2 AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS	80
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICA EXECUTADA EM PARCERIA.....	89
3.5.1 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA IN VITRO.....	89
3.5.2 ATIVIDADES IN VIVO.....	92
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	98
4.1 CONCLUSÕES	98
4.2 PERSPECTIVAS	99
5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	100
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	100
5.2 ARIL CICLOHEXANONAS	101
5.3 ARIL-CICLOHEXENONAS E DERIVADOS	108
5.4 ISOINDOLINONAS	117
5.5 ANCORAMENTO MOLECULAR	132
5.5.1 PREPARO DO SITIO DE LIGAÇÃO CB1 / CB2.....	132
5.5.2 OTIMIZAÇÃO DE GEOMETRIA DOS LIGANTES	132
5.5.3 SIMULAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ANCORAMENTO MOLECULAR	132
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
7 APÊNDICE	142

1 INTRODUÇÃO

Desde o período pré-histórico, plantas do gênero *Cannabis*, popularmente conhecidas como cânhamo, têm sido cultivadas para a elaboração de fibras têxteis, existindo relatos arqueológicos datados de aproximadamente 6.000 anos no nordeste da China, sendo também seus frutos e sementes utilizados na alimentação (ZUARDI, 2006). O impacto cultural desta planta é tão grande que o caractere para cânhamo 麻 (*má*), data por volta de 3.000 anos (RUBIN, 2011) e o ideograma simboliza duas plantas sob o teto de uma casa, reforçando a característica da importância do cultivo desta planta na sociedade chinesa em especial para o domicílio.

Os primeiros relatos escritos de preparações com fins medicinais utilizando plantas do gênero *Cannabis* datam de 1500 A.C. no texto religioso *Atharvaveda* (KUDDUS; GINAWI; AL-HAZIMI, 2013), posteriormente por volta dos anos 206-220 A.C. no compendio de tradições orais *pen-ts'ao ching*, considerada a mais antiga farmacopeia (ZUARDI, 2006), e por volta dos anos 131-201 D.C. nos trabalhos de Cláudio Galeno na Grécia (BARON, 2015). Desde então, *Cannabis sativa* e *Cannabis indica*, as principais espécies representantes do gênero, vêm sendo utilizadas para o tratamento de diversas condições, como dores crônicas, fibromialgia, artrite reumatoide, dores de cabeça e enxaquecas, epilepsia, inflamação, falta de apetite, câimbras, insônia e muitas outras (ISAAC; SAINI; CHAAR, 2016).

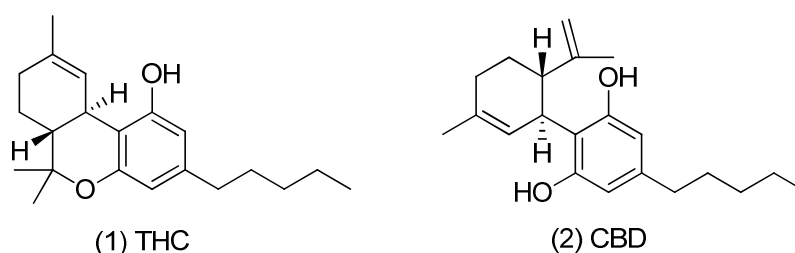
Seu relato escrito de contexto medicinal oficial no continente americano aparece primeiramente como registro na farmacopeia estadunidense a partir de 1850. Porém, foi removida em 1942 pela incerteza sobre sua segurança e contexto sócio-político da época (NEWTON-HOWES; MCBRIDE, 2016), seguindo as definições da Segunda Convenção do Ópio, realizada em Genebra, em 19 de fevereiro de 1925 (WRIGHT, 1925), que abordou a manufatura, transporte e venda de substâncias consideradas perigosas, devido preocupações a respeito do uso recreativo, pressões comerciais e o surgimento de alternativas sintéticas mais potentes (ROBSON, 1996).

A Segunda Convenção do Ópio foi ratificada em 10 de junho de 1932 no Brasil, iniciando a era da repressão ao uso da *Cannabis* e suas preparações, tendo essa postura perdurado por três décadas antes de ser reforçada pela Convenção Única de Entorpecentes, realizada pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 1961, da qual o Brasil é signatário (LANDE, 1962).

Os reflexos destas convenções no Brasil aparecem no formato das legislações de controle em 1938, com o decreto-lei n° 841 que prevê a proibição do cultivo, colheita, beneficiamento, e exploração da *Cannabis* em todo o território nacional. Posteriormente, a Lei Federal n° 6.368 de 1976, no governo militar ditatorial de Ernesto Geisel, previa a detenção de indivíduo portador de qualquer quantidade de *Cannabis*, independente da intenção de uso. Esta lei foi vetada pela lei n° 11.343 de 2006 no governo de Luiz Inácio Lula da Silva, abrindo precedentes para a mudança do paradigma de abordagem e amparo social relacionado ao uso abusivo de entorpecentes.

Mesmo não sendo autorizado o uso recreativo no Brasil, aumentou-se a tolerância a respeito da penalização do uso recreativo pessoal, com a lei n.º 11.343/2006 de 23 de agosto de 2006, onde cabe ao juiz decidir se a quantidade encontrada é compatível com o uso individual ou considera-se tráfico, recebendo então a devida punição legal.

Figura 1- Estruturas dos principais canabinoides Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD), respectivamente.



Fonte: O autor

Nas duas últimas décadas, a cannabis vem ressurgindo como alternativa terapêutica em consonância com o levantamento de proibições do uso medicinal em diversos países, mediante prescrição, e até mesmo de uso recreativo (CHOO; EWING; LOVEJOY, 2016).

No Brasil, em maio de 2017, *Cannabis sativa* foi reconhecida como planta medicinal na resolução n°156 de 5 de maio de 2017, seguido pelo registo do medicamento à base de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD) Figura 1., Mevatyl[®], (Registro n° 1.6977.0003). Este foi o primeiro medicamento a base de cannabis autorizado no Brasil elaborado a partir dos componentes isolados e dispostos na proporção de 1:1 (CBD:THC).

Em dezembro de 2019 foi aprovada a resolução da ANVISA (RDC – nº 327, de 9 de dezembro de 2019), que autoriza e estabelece os procedimentos para o registro, produção e venda de produtos à base de cannabis. Isso possibilitou o registro para comercialização de produtos adicionais: atualmente existem seis formulações com canabidiol em sua forma isolada e duas formulações a base do extrato bruto de *Cannabis sativa* (Resolução RE nº 4.134, de 29 de outubro de 2021). No entanto, o cultivo da planta não foi autorizado, conduzindo as indústrias nacionais que queiram empreender na produção de medicamentos à base de canabinoides à dependência da importação de matéria-prima.

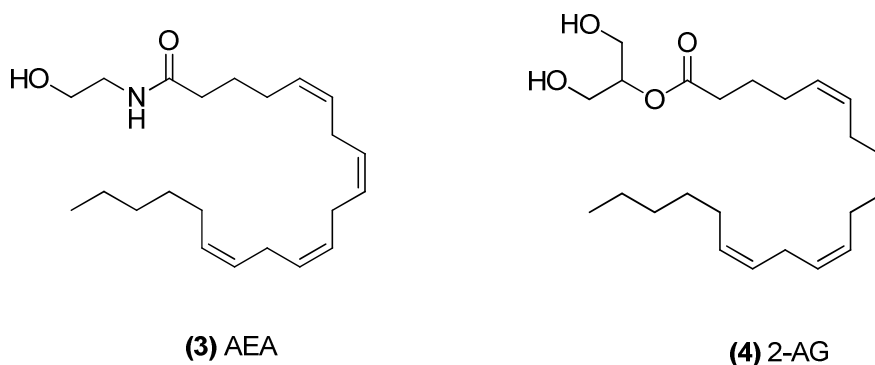
A discussão sobre o cultivo de *Cannabis sativa* para uso medicinal tramita no congresso nacional sob o projeto de lei PL 399/15 do ano de 2015 protocolado pelo então deputado Fábio Cruz Mitidieri (PSD – Sergipe), que pretende viabilizar o cultivo e o beneficiamento por pessoas jurídicas, incluindo associações, instituições sociais e empresas. No dia 8 de junho de 2021, após uma decisão favorável da comissão responsável pela votação do relatório deste projeto de lei, foram interpolados recursos e o projeto continua sob avaliação.

Vislumbrando a possibilidade de grande crescimento econômico e tecnológico, a pesquisa e o desenvolvimento de produtos comercializáveis à base de cannabis, ou até mesmo de substâncias sintéticas e semissintéticas com perfil de atividade similar, vêm fomentando pesquisas com este escopo desde a década de 60. Desta maneira, trazem contribuições com benefícios inegáveis à ciência e à terapêutica, como com a elucidação dos componentes ativos dos extratos e a descrição da atividade farmacológica destas substâncias.

Os primeiros canabinoides isolados foram o canabidiol e o canabinol, provenientes da planta *Cannabis sativa* em Israel em 1963 (MECHOULAM; SHVO, 1963), e o Δ^9 -tetrahydrocannabinol foi isolado e caracterizado pelo mesmo grupo em 1970 (GAONI et al., 1971). A obtenção com alta pureza destas substâncias, às quais é atribuída a atividade dos extratos por serem componentes majoritários, possibilitou a descoberta de uma proteína transmembranar acoplada à proteína G. Essa proteína foi o primeiro receptor canabinoide (CB1) descoberto na superfície da membrana celular de neurônios murinos em 1988, (DEVANE et al., 1988), sendo que o segundo receptor foi descoberto somente em 1993 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993).

Até o momento, determina-se que o sistema canabinoide (também descrito como sistema endocanabinoide) é composto por dois receptores, CB1 e CB2, cujos ligantes endógenos anandamida (AEA) **3** e 2-araquidonilglicerol (2-AG) **4**, Figura 2, são derivados de eicosanoides (DEVANE et al., 1992; DI MARZO; FONTANA, 1995) e há uma enzima responsável pela degradação da anandamida: a hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH)(SCHLOSBERG; KINSEY; LICHTMAN, 2009).

Figura 2- Estruturas dos endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonilglicerol (2-AG)



Fonte: o autor

1.1 ALVOS MOLECULARES DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE

A literatura a respeito deste tema tem evoluído rapidamente a ponto de definir os principais alvos moleculares para a ativação do sistema canabinoide, as sequências de aminoácidos dos receptores e as enzimas de degradação, a estrutura tridimensional destes alvos bem como a conformação e a localização dos sítios ativos, sendo que os principais alvos moleculares do sistema endocanabinoide são os receptores canabinoides tipo 1 (CB1), tipo 2 (CB2) e a enzima hidrolase da amida de ácidos graxos (FAAH), descritos em mais detalhe nas próximas seções.

Comparativamente, os receptores canabinoides CB1 e CB2 humanos têm uma homologia estrutural de 45% (CB1 *versus* CB2), e são demonstrados na Figura 3. Nesta mesma figura, as sequências das proteínas são apresentadas na forma de códigos de aminoácidos de uma letra e foram alinhadas utilizando o método de ajuste de matriz composicional, pela ferramenta Protein BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Na figura 3, quando as sequências são representadas por traços, simbolizam um espaçamento entre as regiões das sequencias comparadas. Na linha entre as duas sequências, quando representadas por espaços vazios, indicam a não semelhança entre as características dos

resíduos de aminoácidos. As sequências representadas pela respectiva letra simbolizam a similaridade absoluta entre os resíduos de aminoácidos. Por fim, as sequências representadas por cruces indicam uma correlação positiva pela similaridade entre as características dos resíduos, considerados aminoácidos intercambiáveis, Ex: Valina, leucina e isoleucina, serina e treonina, entre outros.

Figura 3– Comparação entre as sequências dos receptores CB1 e CB2, onde Query se refere a CB2 e Sbjct a CB1 e a linha entre Sbjct e Query se refere ao resultado da comparação das sequências de aminoácidos.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
265 bits(678)	1e-89	Compositional matrix adjust.	148/332(45%)	207/332(62%)	26/332(7%)
Query 2		EECWTEIANGSKDGLDLSNP-----MKDYMILSGPQKTAVAVLCTLLGLLSALE			50
Sbjct 74		DQVNITEFYNKSLSSFKENEENIQCGENFMDIECFMVLNPSQQLAIAVLSLTLTGTFVLE			133
Query 51		NVAVLYLILSSHQLRRKPSYLFIGSLAGADFLASVVFACSFVNFHVFHGVDSKAVFLLKI			110
Sbjct 134		NLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFHFVHRKDSRNVFLFKL			193
Query 111		GSVTMTFTASVGSLLLTAIDRYLCLRYPPSYKALLTRGRALVTLGIMWVLSALVSYLPLM			170
Sbjct 194		GGVTASFASVGSFLTAIDRYISIHRPLAYKRIVTRPKAVVAFCLMWTIAIVIAVLP			253
Query 171		GWTC--CPRPCSELPFLIPNDYLLSWLLFIAFLFSGIITYGHVLWKAHQHVASL--SGH			226
Sbjct 254		GWNCLEKQSVCSDFPHIDETYLMFWIGVTSVLLLLIVYAYMYILWKAHSHAVRMIQRGT			313
Query 227		QDR-----QVPGMARMRLDVRLAKTLGLVLAVLLICWFPVLALMAHSLATTLSD			275
Sbjct 314		QKSIIIHTSEDKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLILVVLIIICWGPELLAIMVYDVF			373
Query 276		QVKKAFAFCSMLCLINSMVNPVIYALRSGEIR	307		
Sbjct 374		LIKTVFAFCSMLCLLNSTVNPPIYALRSKDLR	405		

Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

CB1 e CB2 são proteínas transmembrana da mesma família da rodopsina bovina, e como a estrutura tridimensional de CB2 só foi determinada por cristalografia de raio X recentemente em 2019 (LI et al., 2019b), boa parte do desenvolvimento de protótipos de agonistas foi baseado na estrutura tridimensional de CB2 produzida por estudos de homologia com a rodopsina bovina, que apresenta alta similaridade de sequência com CB2 (XIE; CHEN; BILLINGS, 2003). Nesses estudos, uma sequência linear de aminoácidos é moldada na mesma estrutura tridimensional já determinada de uma proteína com alta similaridade de sequência, o que eventualmente causa problemas na definição de *loops* e do sítio ativo. Isso acontece porque muita informação é comprometida com as aproximações do posicionamento das cadeias laterais dos aminoácidos durante a modelagem da estrutura tridimensional da proteína nos modelos

de homologia (XIANG, 2006), principalmente em casos com baixa similaridade de sequência como vistas entre CB1 e CB2.

Ambos os receptores canabinoides foram descritos como sendo receptores acoplados à proteína G, ou seja, compostos de três regiões distintas, um domínio extracelular (ao qual pertence o sítio ativo), uma região transmembrana e um domínio intracelular associado à proteína G como pode ser observado nas figuras 6 e 10 a diante. A maior parte da variabilidade estrutural dos receptores em questão no domínio extracelular impacta diretamente a geometria e volume interno do sítio ativo, permitindo que exista a ativação seletiva de um em relação ao outro (LI et al., 2019a).

Outra grande diferença entre estes dois receptores se dá no nível de expressão em diferentes células no organismo. Em humanos, CB1 é mais expresso em células do sistema nervoso central (SNC) e neurônios periféricos, principalmente na porção do axônio próximo à fenda sináptica em neurônios gabaérgicos, e de forma transiente em neurônios dopaminérgicos (MACKIE, 2005). Já o receptor CB2 é mais expresso em células do sistema imune, como leucócitos, células do baço e timo. No SNC, CB2 é expresso em células da glia (ATWOOD; STRAIKER; MACKIE, 2012), células responsáveis pela mediação de processos inflamatórios e fagocitose de corpos estranhos. Portanto esta diferença em nível de expressão faz com que mesmo que a cascata de sinalização intracelular seja em essência a mesma, o perfil farmacológico da ativação seletiva destes receptores pode modular atividades distintas.

Alternativamente, a enzima conhecida como FAAH, a hidrolase de amida de ácidos graxos, responsável pela degradação do endocanabinoide anandamida, é considerada um alvo promissor, devido sua localização, sempre expressa nas imediações de receptores canabinoides (MACKIE, 2005). Ou seja, a inibição desta enzima causaria um aumento da concentração local de endocanabinoides, que atuariam de forma mais prolongada.

Nas próximas seções serão descritas as principais características dos alvos moleculares do sistema endocanabinoide.

1.1.1 RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 1 (CB1)

Em 1988, o receptor canabinoide tipo 1 (CB1) foi identificado na membrana de neurônios de cérebros de ratos Sprague-Dawley machos, com o auxílio do deslocamento de um canabinoide sintético radiomarcado (CP-55,940, Pfizer) pelo THC, confirmando a interação entre o principal componente ativo da cannabis com um receptor no SNC (DEVANE et al., 1988). Na mesma publicação, há a confirmação de que a proteína não se tratava de uma enzima ou não fazia parte de uma interação secundária a outro processo pois não houve metabolização do composto radiomarcado.

Na década de 80 o gene do receptor CB1 foi descoberto em humanos (PERTWEE, 2006) e em 2016 houve a determinação da estrutura cristalina por técnicas de raio-x de monocristal (SHAO et al., 2016), e em 2017, de forma complementar, pela co-cristalização com antagonistas e agonistas foi possível determinar informações cruciais a respeito do sítio de ligação e das interações necessárias que levam a ativação do receptor, trazendo informações essenciais para o desenvolvimento racional de novos protótipos canabinomiméticos.

O receptor CB1, classificado como receptor associado à proteína G classe A1 (semelhante à rodopsina) subfamília A13, possui uma sequência de 472 aminoácidos, totalizando uma massa de 58.858 Da e sua sequência pode ser vista na figura 4. Vale ressaltar que foram descritas duas outras isoformas (variantes decorrentes de mutação genética) do mesmo receptor: a primeira constando uma mutação e a segunda um encurtamento na sequência apresentada na região N-terminal extracelular. No entanto, o nível de evidência destas duas isoformas continua muito baixo, sendo canônica (apresentação mais comum da sequência de aminoácidos) a forma da sequência apresentada. Sua estrutura terciária apresenta três regiões: um domínio extracelular, composto pela extremidade N-terminal, e três *loops* extracelulares (LE), LE1, LE2 e LE3, um domínio transmembrana, composto por sete alfa hélices, e finalmente o domínio intracelular, composto por três *loops* intracelulares (LI), LI1, LI2 e LI3 e pela extremidade C-terminal. A representação tridimensional com as regiões destacadas pode ser vista na figura 6.

Figura 4- Sequência canônica do receptor CB1 em sua totalidade com 472 resíduos de aminoácidos na forma de códigos de uma letra, representadas em preto as regiões extracelulares, na ordem N-terminal, LE1, LE2 e LE3, em vermelho as sete alfa-hélices da região transmembrana, e em azul as regiões intracelulares, na ordem LI1, LI2 e LI3 e C-terminal.

```

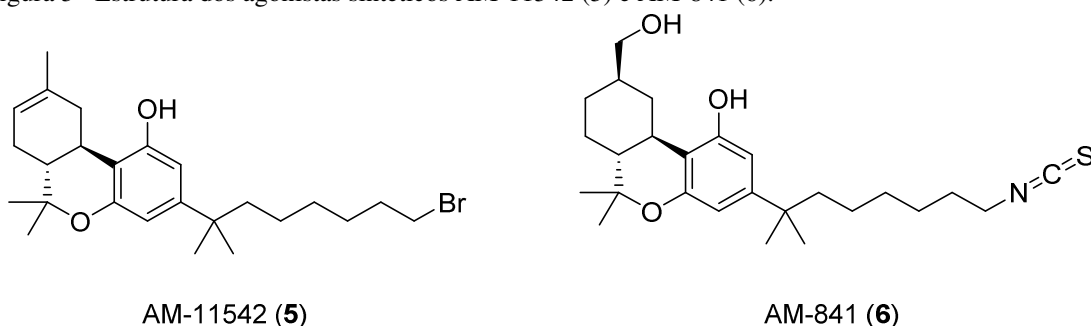
MKSILDGLADTTFRITITDALLYVGSNDIQYEDIKGDMS
KLGYPQKFPLTSFRGSPFQEKMTAGDNPQLVPADQVN
ITFYNKSLSSFKEENEIQCGENFMDIECFMVLNPSQQ
LAIAVLSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCRPSYHFIGS
LAVADLLGSVIFVYSFIDFHVHFRKDSRNVFLFKLGGVTA
SFTASVGSFLTAIDRYISIHRLAYKRIVTRPKAVVAFCL
MWTIAIVIAVLP LLGW NCEKLQSVCS DIFPHIDET YLMF
WIGVTSVLLL FIVYAYMYILWKAHSHAVRMIQRGTQKSII
IHTSEDGKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLILVVLICWGP
LLAIMVYDVF GKMNKLIKTVFAFC SMLCLLNSTVNPIIYA
LRSKDLRHAFRSMFPSCGTAQPLDNSMGDSDCLHKH
ANNAASVHRAAESCIKSTVKIAKVTMSVSTDTSAEAL

```

Fonte: Uniprot P21554

A ativação do receptor foi detalhada em 2017, devido à co-cristalização com dois agonistas seletivos para CB1, AM-11542 (5) e AM-841 (6) (HUA et al., 2016, 2017), dois canabinoides sintéticos com estruturas análogas ao THC (figura 5). Foi evidenciada a importância das metilas da ramificação alifática do agonista AM11542 no mecanismo de ativação de CB1 (Figura 5) e as interações com o gatilho do receptor, composto pelos resíduos de aminoácido Phe200 e Trp356 (Figura 7).

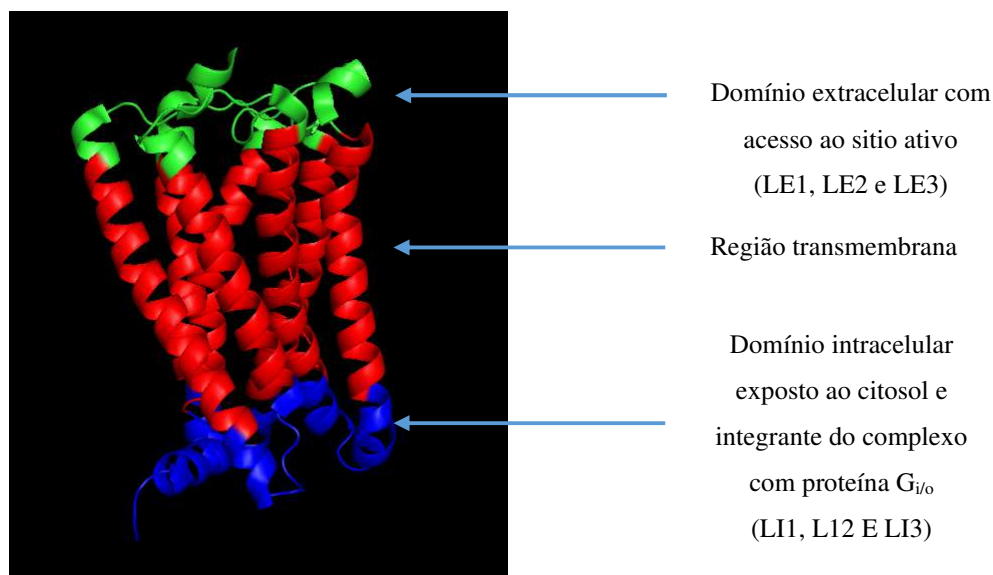
Figura 5- Estrutura dos agonistas sintéticos AM-11542 (5) e AM-841 (6).



O agonista AM11542 está representado na figura 7 com os resíduos de aminoácidos próximos no sítio de ligação. O choque espacial entre a posição das cadeias laterais dos aminoácidos com as metilas causa uma mudança conformacional, resultando no deslocamento das alfa-hélices 1 e 2 na face extracelular e alfa-hélices 1, 4 e 6 sofrem deslocamentos significativo na face intracelular (Figura 8), desfazendo o complexo com

a proteína G associada, dando início a cascata de sinalização intracelular (HUA et al., 2017).

Figura 6– Representação tridimensional do receptor CB1 humano (PDB:5XRA) e suas regiões correlatas, em verde na posição superior o domínio extracelular, em vermelho a região transmembrana, e em azul o domínio intracelular exposto ao citosol.



Fonte: PDB (5XRA)

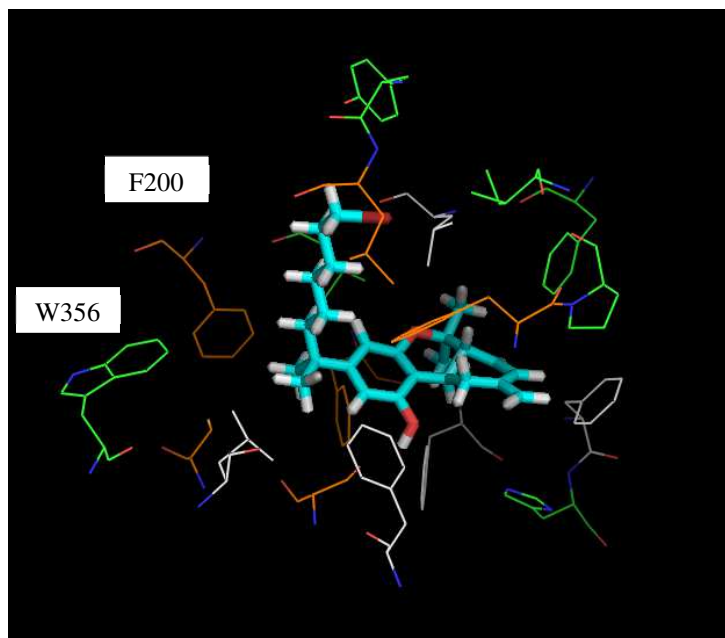
O perfil de atividade farmacológica perante a ativação de CB1, que é associado principalmente à proteína $G_{i/o}$, tem a subunidade α atuando diretamente na inibição da adenilato ciclase. Então, pela redução dos níveis plasmáticos de AMP cíclico, ativa a proteína quinase A (PKA), ativando a cascata de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPK), que resulta na via ERK1/2 responsável pela decisão sobre sobrevivência celular (BOSIER et al., 2010).

Com a redução de AMPc, devido à ativação da subunidade $G\alpha_{i/o}$, ocorre a abertura de canais de potássio retificadores associados à proteína G (GIRKs), causando uma hiperpolarização do neurônio, inibindo a transmissão do sinal, e inibindo a atividade de canais de Ca^{2+} voltagem dependente do tipo N e P/Q, responsáveis pela externalização e fusão de vesículas contendo neurotransmissores na membrana do axônio na fenda sináptica (NIMMICH; GROSS, 2012).

De forma simples, o feixe de neurônios cessa a transmissão do sinal, contrabalanceando a despolarização proveniente da ativação por outros neurônios com o

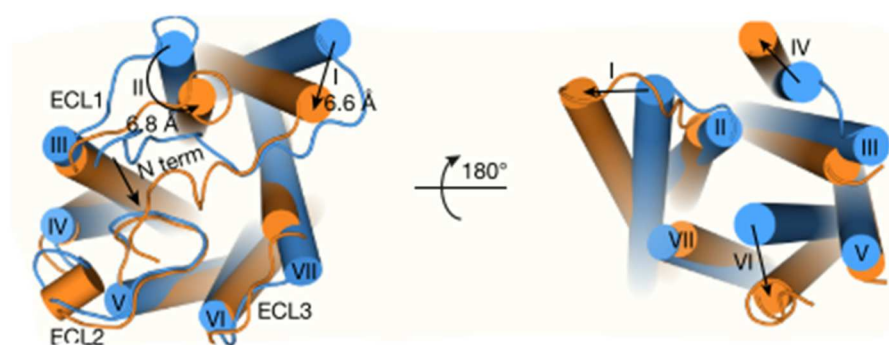
influxo rápido de potássio, e bloqueando a passagem do sinal adiante pela inapetência do neurônio de estimular a próxima célula no feixe com neurotransmissores.

Figura 7– Representação do agonista AM11542 inserido no sítio ativo do receptor CB1 (PDB:5XRA) com os resíduos de aminoácidos próximos, em destaque os resíduos de fenilalanina F200 e triptofano W356, responsáveis pela mudança conformacional do receptor quando afastados pelas duas metilas do agonista.



Fonte: Adaptado de PDB: 5XRA

Figura 8– Complexos CB1 – agonista, demonstrando a amplitude de movimento das alfa-hélices indicadas, em laranja complexo CB1-AM11542 (agonista) e em azul complexo CB1-AM6538 (antagonista) com a face extracelular a esquerda e intracelular a direita.



Fonte: Reprodução de (HUA et al., 2017)

Portanto, em cenários onde uma transmissão de sinal é necessária para a apresentação da interpretação de uma condição, como no caso da dor, onde estruturas nociceptoras estimulam fibras aferentes que executam o processo de transmissão do sinal

até o SNC, onde o sinal é interpretado como estímulo doloroso (ALVES et al., 2017), a ativação de CB1 atenuaria ou bloquearia a transmissão do sinal fazendo com que não houvesse interpretação, mudando o estado de percepção da dor, causando analgesia.

Outro cenário onde a ativação de CB1 seria benéfica é na epilepsia, condição crônica onde há disparos rápidos e sucessivos de diversos grupos de neurônios no SNC. Essa patologia causa convulsões, que podem variar de simples lapsos de atenção, a movimentos involuntários a episódios convulsivos prolongados (GALANOPOULOU et al., 2012). Neste caso, a diminuição nos números de disparos destes neurônios (principalmente neurônios glutamatérgicos) é crucial para cessar a convulsão. No entanto, como se trata de uma atividade inerente ao SNC, a substância ativa deve ser capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica para exercer sua atividade, para que seja garantida a chegada da desta à localidade do receptor.

1.1.2 RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 2 (CB2)

O receptor canabinoide tipo 2 (CB2) foi descoberto em 1993 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Em humanos, ele é composto por 360 resíduos de aminoácidos totalizando uma massa de 39.681 Da. Este receptor não possui isoformas relacionadas, no entanto, duas variantes foram encontradas: uma em correlação com casos de depressão (ONAIVI et al., 2008) onde foi identificada a mutação da glutamina 63 para uma arginina, e outra mutação da histidina 316 para uma tirosina. Na figura 9 encontra-se a sequência canônica do receptor em questão.

Figura 9– Sequência canônica do receptor CB2 representando em preto as porções do domínio extracelular, N-Terminal, LE1, LE2 e LE3, em vermelhos as sete alfa-hélices da região transmembrana, e em azul o domínio intracelular LI1, LI2, LI3 e C-Terminal.

```

MEECWVTEIANGSKDGLDSNPMKDYMILSGPQKTAVA
VLCTLLGLLSALENVAVLYLILSSHQLRRKPSYLFISLAG
ADFLASVVFACSFVNFHVHFGVDSKAVFLLKIGSVTMTF
TASVGSLLLTAIDRYLCLRYPPSYKALLTRGRALVTLGIM
WVLSALVSYLPLMGWTCPRPCSELPPLIPNDYLLSWLL
FIAFLFSGIITYGHVWLKHAHQHVASLSGHQDRQVPGM
ARMRLDVRLAKTLGLVLAVLLICWFPVLALMAHSLATTL
SDQVKKAFAFCSMLCLINSMVNPVIYALRSGEIRSSAHH
CLAHWKKCVRGLGSEAKEEAPRSSVTETeadgKITPWP
DSRDLDLSDC

```

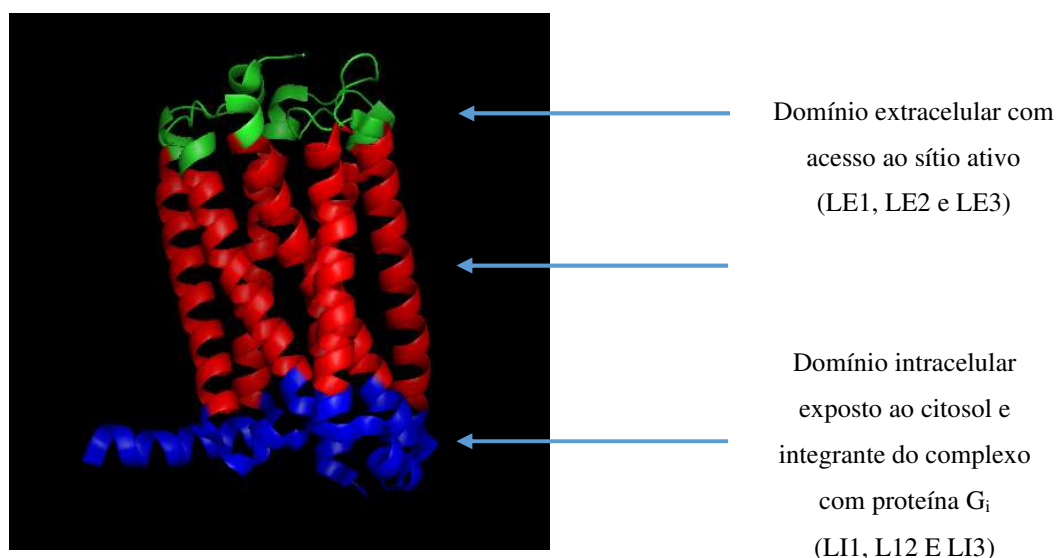
Fonte: Uniprot P34972

A estrutura tridimensional do receptor CB2 foi descrita em 2019 (LI et al., 2019b), onde ele é complexado com o antagonista AM10257 (PDB:5ZTY). Mesmo tendo uma sequência menor e somente 45% de similaridade com CB1, as geometrias dos receptores são similares por ambos serem receptores acoplados à proteína G e possuírem o mesmo número de passagens pela membrana celular com segmentos em alfa-hélice, como pode ser visto na figura 10.

O nível de expressão de CB2 difere de CB1 em alguns aspectos. O CB1 é vastamente expresso na porção de axônios pré-sinápticos gabaérgicos e de forma transiente em dopaminérgicos. Já o CB2 é vastamente expresso em células do sistema imune, principalmente em linfócitos B e macrófagos, e no SNC é expresso em células da micróglia e restritos a células piramidais CA3 e CA2 no hipocampo, correlacionado com um mecanismo de plasticidade neuronal (MACKIE, 2005).

Vale ressaltar que o nível de expressão deste receptor em células do sistema imune varia dependendo do nível de ativação das mesmas, já que ele é responsável por mediação de mecanismos de migração e diferenciação celular em processos inflamatórios, sendo muito expresso em macrófagos. (BASU; DITTEL, 2011).

Figura 10– Representação do receptor CB2 com suas porções detalhadas: em verde o domínio extracelular, em vermelho a região transmembrana e em azul o domínio intracelular passivo de interação com proteína G.



Fonte: PDB (5ZTY)

O mecanismo de ativação para o receptor CB1 é descrito com a mudança conformacional da fenilalanina F200, que causa a repulsão do triptofano W356. Quando é feita a sobreposição de CB1 complexado ao agonista CB1 AM11542 com CB2 complexado ao antagonista CB1 AM10257, observa-se que a geometria, tanto da conformação das alfa-hélices quanto o posicionamento da cadeia lateral dos aminoácidos compondo o sítio de ligação, incluindo o gatilho F117 - W258 em CB2, se assemelham, inferindo uma relação de que substâncias com perfil antagonístico ou de agonismo inverso em CB1 possam se apresentar como agonistas quando avaliadas em CB2 (LI et al., 2019a). No entanto estes resultados são preliminares e precisam de mais evidências para fortalecer essa correlação.

1.1.3 HIDROLASE DE AMIDA DE ÁCIDOS GRAXOS (FAAH)

Com a descoberta de ligantes endógenos dos receptores canabinoides, anandamida (**3**) e 2-araquidonilglicerol (**4**), foi evidenciada a existência de uma enzima responsável pela degradação da anandamida (**3**), a hidrolase de amida de ácidos graxos, comparativamente, os fitocanabinoides e canabinoides sintéticos são degradados por enzimas hepáticas pertencentes ao citocromo P450 (PERTWEE, 2006). A enzima FAAH degrada preferencialmente os endocanabinoides, possuindo menor seletividade entre os ligantes, abrangendo boa parte de amidas de eicosanoides e amidas de ácidos graxos não canabinoides. Seu papel na degradação de 2-araquidonilglicerol é bastante irrelevante, já que este ligante é metabolizado principalmente pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (SCHLOSBERG; KINSEY; LICHTMAN, 2009).

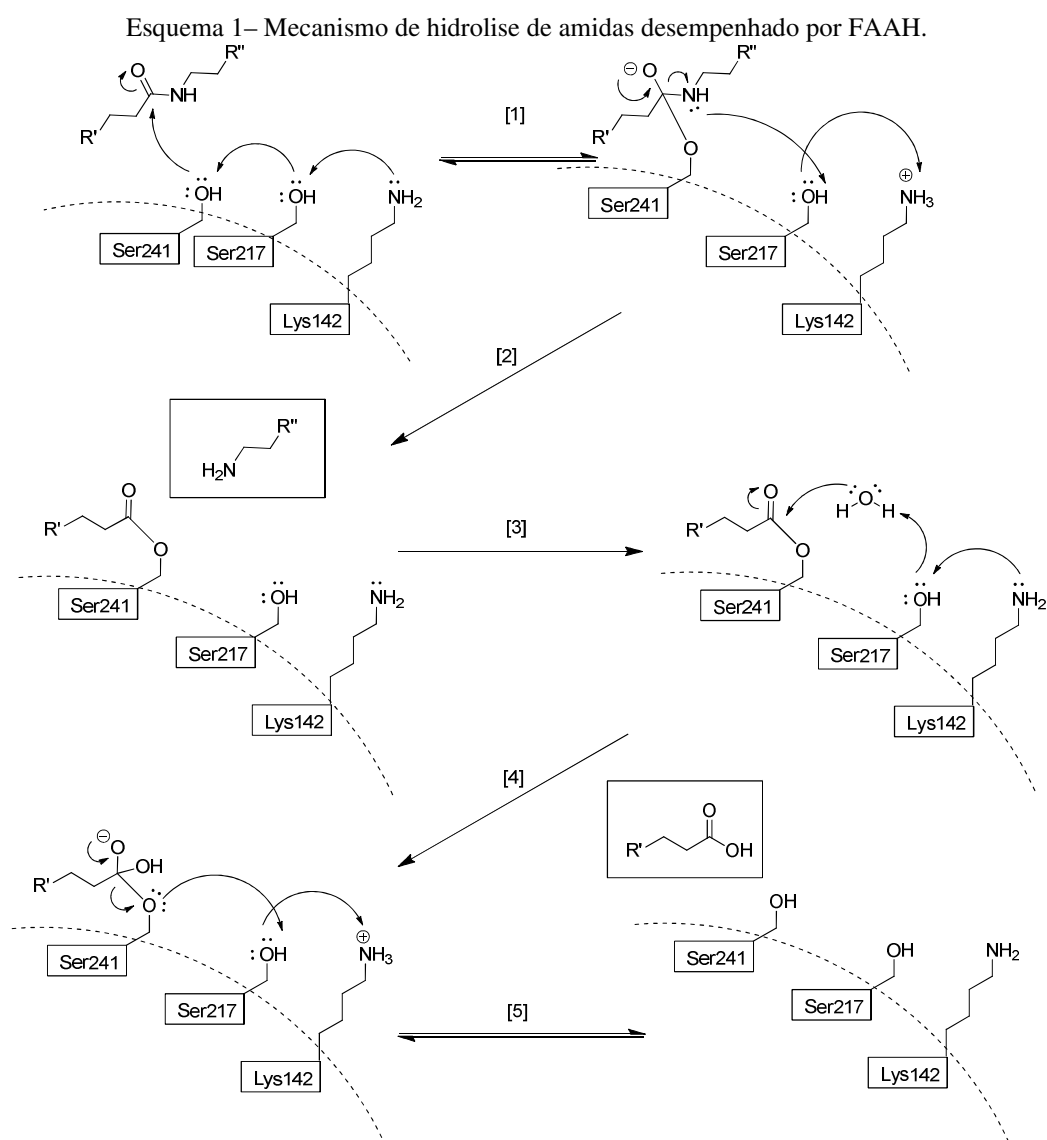
Esta enzima possui uma sequência de 579 aminoácidos, com uma massa de 63.066 Da. A sequência identificada em humanos não possui sua estrutura cristalográfica definida até o momento, sendo possível encontrar somente a estrutura da sequência humanizada de FAAH murina, onde a sequência de A.A. de FAAH murina foi editada para que houvesse maior similaridade com a sequência humana, antes de ser inserida em um vetor de clonagem e expressão.

A FAAH é uma enzima integral de membrana, com o sítio catalítico voltado para a porção extracelular, e é expressa em locais adjacentes à expressão principalmente de CB1 (EGERTOVA et al., 1998), onde é possível a captação e metabolização de anandamida, onde o mecanismo de hidrólise desempenhado pela FAAH é demonstrado no esquema 1.

Clinicamente a inibição de FAAH se mostrou efetiva contra a percepção e tolerância à dor, sem causar os efeitos adversos clássicos do THC (SCHLOSBERG; KINSEY; LICHTMAN, 2009). Corroborando com a hipótese de que o sistema endocanabinoide desempenha um papel de proteção à resposta inflamatória e dores crônicas, em modelos de inflamação tanto aguda quanto crônica, observa-se um aumento tanto na expressão de receptores canabinoides, quanto de ligantes endógenos.

O mecanismo de hidrólise de amidas desempenhado por FAAH pode ser visto no esquema 1. Na representação, em [1] a lisina 142 deprotona a serina 217 que por sua vez deprotona a serina 241, que ataca a carbonila da amida a ser hidrolisada e o par de elétrons da dupla da carbonila se desloca e expressa uma carga negativa no oxigênio. Isso

estabelece um equilíbrio com a carga positiva formada na lisina 142. Em [2] a carga negativa no oxigênio reestabelece a ligação dupla formando uma carbonila e a ligação C-N é desfeita com o par de elétrons do nitrogênio deprotonando a serina 217 que por sua vez deprotona a lisina 142, liberando o radical contendo a amina. Em [3] o radical contendo a amina sai do sítio ativo e é substituído por uma molécula de água. Em [4] acontece uma deprotonação da mesma forma de [1], sendo que uma molécula de água é deprotonada e ataca o éster de ácido graxo com a serina 241. Por fim, em [5], a dupla ligação da carbonila é reestabelecida e desfaz a ligação C-O com a serina 241, que por sua vez deprotona a serina 217 que deprotona a lisina 142, podendo assim o ácido graxo deixar o sitio ativo da enzima (MILENI et al., 2010).



Fonte: Adaptado de (MILENI et al., 2010)

1.2 MOLÉCULAS QUE ATUAM NO SISTEMA ENDOCANABINOIDE

1.2.1 ENDOCANABINOIDES

Até hoje, os principais ligantes endógenos do sistema canabinoide conhecidos são: anandamida (AEA) (3) e 2-araquidonilglicerol (2-AG) (4), representados na figura 2. São derivados de eicosanoides e encontrados no SNC (DEVANE et al., 1992) e em locais de inflamação ou irritação devido ao recrutamento de células do sistema imune. Foi observado que em modelos *in vivo*, onde se propôs a inibição ou deleção da proteína responsável pela degradação do principal endocanabinoide AEA, que os animais respondiam melhor à dor e tinham uma região afetada pela inflamação mais delimitada. Além disso, apresentavam menos dano tecidual perante inflamações crônicas (TANAKA et al., 2019), sem dar indício de nenhum dos efeitos adversos comumente observados com ativação por agonistas CB1 seletivos.

1.2.2 FITOCANABINOIDES

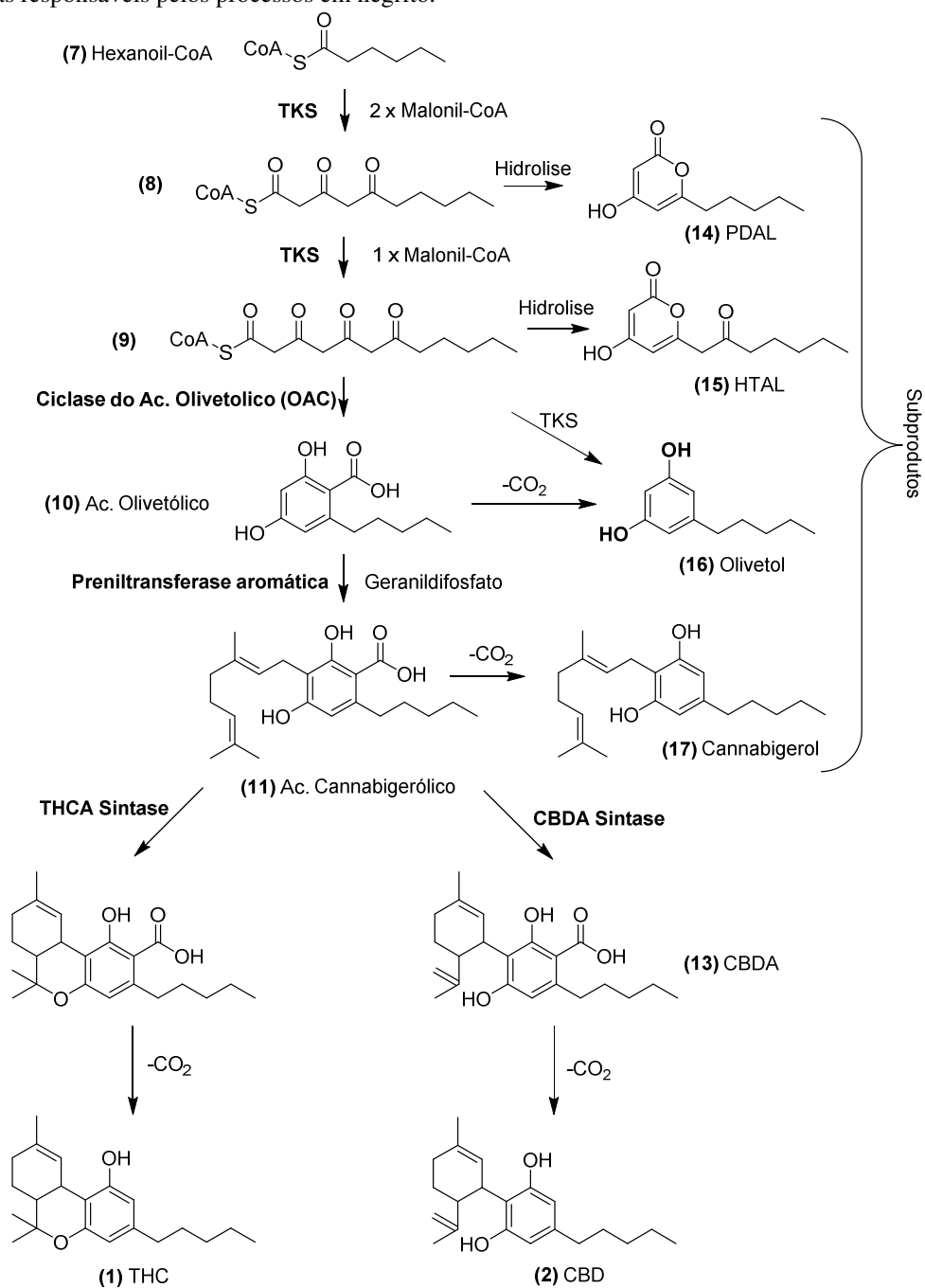
Os fitocanabinoides são substâncias isoladas de plantas do gênero *Cannabis*, essencialmente de *Cannabis sativa*, consideradas responsáveis pela atividade no sistema canabinoide. São substâncias oleosas, extremamente lipofílicas, encontrados na porção de tricomas glandulares encontrados nas flores femininas da espécie vegetal monóica.

Os fitocanabinoides se dividem em dois grupos principais: os bicíclicos e os tricíclicos. Esses dois grupos são representados pelas substâncias canabidiol (2) e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (1) respectivamente (figura 1 e esquema 2), componentes majoritários do óleo de cannabis e responsáveis pelo espectro de atividades biológicas desempenhado pelas preparações a base de cannabis.

A biossíntese de fitocanabinoides já foi extensamente descrita. Partindo do metabólito hexanoil-CoA que é conjugado com três unidades de malonil-CoA da origem a um metabólito tricarbonílico, que é ciclizada pela enzima ciclase do ácido olivetólico (OAC), posteriormente a transferência de dois isoprenos provenientes do geranyl difosfato pela preniltransferase aromática dá a origem ao precursor ácido canabigerólico. Neste ponto a biossíntese diverge: com o auxílio da THCA-sintase, a porção linear de isoprenos forma o sistema tricíclico do ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico e posteriormente com uma

decarboxilação não enzimática é formado o produto final Δ^9 -tetrahydrocannabinol. Com o auxílio da CBDA-sintase é formado o sistema bicíclico do ácido canabidiólico, que passa pela mesma decarboxilação, formando cannabidiol (GAGNE et al., 2012) como pode ser visto no esquema 2.

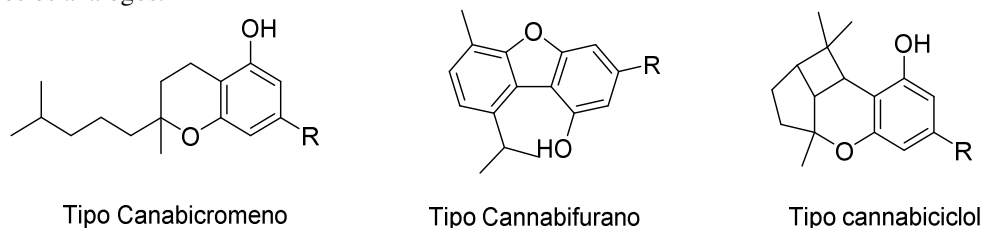
Esquema 2– Biossíntese dos fitocanabinoides com seus intermediários, subprodutos da rota a direita e enzimas responsáveis pelos processos em negrito.



Fonte: adaptado de (GAGNE et al., 2012)

Existem naturalmente diversos análogos de fitocanabinoides. No entanto a maior parte se baseia em modificações estruturais simples dos dois esqueletos acima (esquema 2), como oxidações e aromatizações. Todavia, outros três tipos de esqueletos são observados: cannabicromenos, cannabifuranos e do tipo cannabiciclol (Figura 11).

Figura 11– Esqueletos alternativos de fitocanabinoides, com R sendo o radical alifático n-pentil presente em todos os análogos.



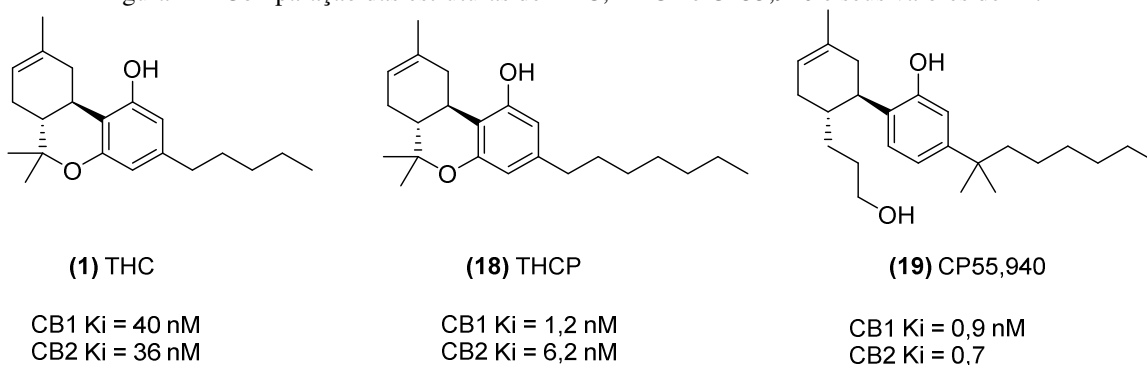
Fonte: o autor

Por suas características estruturais principais entre os dois canabinoides mais prevalentes (THC e CBD), THC é considerado preferencialmente agonista CB1, tendo pouca atividade em CB2, e CBD sendo principal agonista inverso CB2 com pouca atividade em CB1. Uma característica farmacológica importante do CBD que ele diminui substancialmente o efeito psicoativo de THC quando administrado concomitantemente, pois como CBD se liga em CB1 existe a formação de efeito de competição pelo sítio de ligação (MAROON; BOST, 2018).

Pensando nisso, formulações comerciais como Mevatyl[®] utilizam uma combinação 1:1 de THC e CBD com o intuito de manter o potencial de atividade destas substâncias, sem atingir os indesejáveis efeitos adversos de hipotermia, hipolocomoção e efeitos psicoativos geralmente associados com a ativação de CB1 (NIESINK; VAN LAAR, 2013).

Recentemente um novo análogo fitocanabinoide foi isolado de *Cannabis sativa*: o Δ^9 -tetrahydrocannabiforol (Δ^9 -THCP), com estrutura tricíclica análoga ao THC. No entanto, ao invés da cadeia lateral com radical pentila, este possui um radical heptila. Este análogo natural teve um valor de K_i determinado para CB1 de 1,2 nM, sendo considerado o canabinoide de origem natural com maior atividade (CITTI et al., 2019), comparado com o canabinoide sintético não-clássico CP55,940 com K_i de 0,9 nM (figura 12) (ALLEN; FOTSCH; BABIJ, 2010).

Figura 12– Comparação das estruturas de THC, THCP e CP55,940 e seus valores de Ki.



Fonte: Adaptado de (ALLEN; FOTSCH; BABIJ, 2010)

Considerando estas informações, conclui-se que cadeias laterais alifáticas com extensão acima de 5 unidades de carbono são favoráveis para a interação com ambos os receptores, se considerados os valores de Ki tanto para CB1 como para CB2.

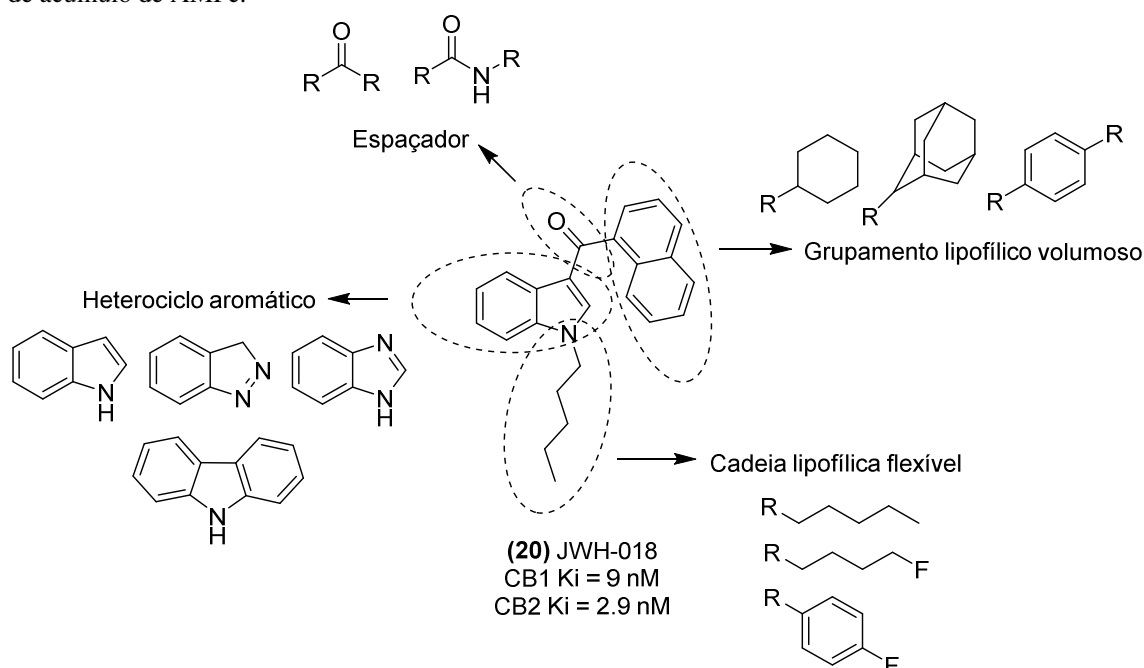
1.2.3 CANABINOIDES SINTÉTICOS

Derivados das estruturas apresentadas nas seções anteriores, em sua maioria substâncias nitrogenadas, com estruturas diversas, vêm apresentando atividade no sistema canabinoide. A síntese de canabinoides tem sido explorada para uso recreativo sobre o nome de maconha sintética, Spice ou K2 (WILEY; MARUSICH; HUFFMAN, 2014). A síntese destes canabinoides surgiu como alternativa ao status de ilegalidade do uso recreativo de cannabis, onde a variabilidade estrutural destes análogos era tão grande que a legislação não conseguia acompanhar para coibir a comercialização. O relatório de 2013 do *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), elencando os principais desafios para o controle de substâncias, constava com 60 substâncias categorizadas no grupo de canabinoides sintéticos, entre eles canabinoides clássicos (relacionados estruturalmente ao THC) e não clássicos (possuem atividade canabinomimética mas não tem similaridade estrutural com o THC) (HAMMOND et al., 2013).

O auge da utilização destas substâncias se deu no Reino Unido entre 2008 e 2010 (ROSENBAUM; CARREIRO; BABU, 2012). Atualmente, o esforço regulatório para inibir a distribuição livre destas substâncias tem se tornado mais efetivo, no entanto a variabilidade estrutural gerada a partir desta “corrida” contra a ilegalidade tem sido benéfica para o desenvolvimento de agonistas mais seletivos tanto para CB1 como para CB2.

Estes canabinoides em geral apresentam núcleos indólicos, indazólicos, benzimidazólicos e carbazólicos ligados por uma amida ou cetona a um grupamento lipofílico volumoso e uma cadeia lipofílica flexível. Diferenças estruturais entre os análogos ditam a seletividade das substâncias entre os receptores CB1 e CB2. Nesse aspecto, as regiões comuns encontradas nestes canabinoides apresentam o padrão visto na figura 13.

Figura 13 - Exemplo da estrutura de um canabinoide não clássico JWH-018 e as regiões marcadas com exemplos de possibilidades para modificação estrutural. O análogo em questão apresenta uma baixa seletividade quando comparado o K_i dos dois alvos, e possui um perfil de agonista confirmado por ensaios de acúmulo de AMPc.



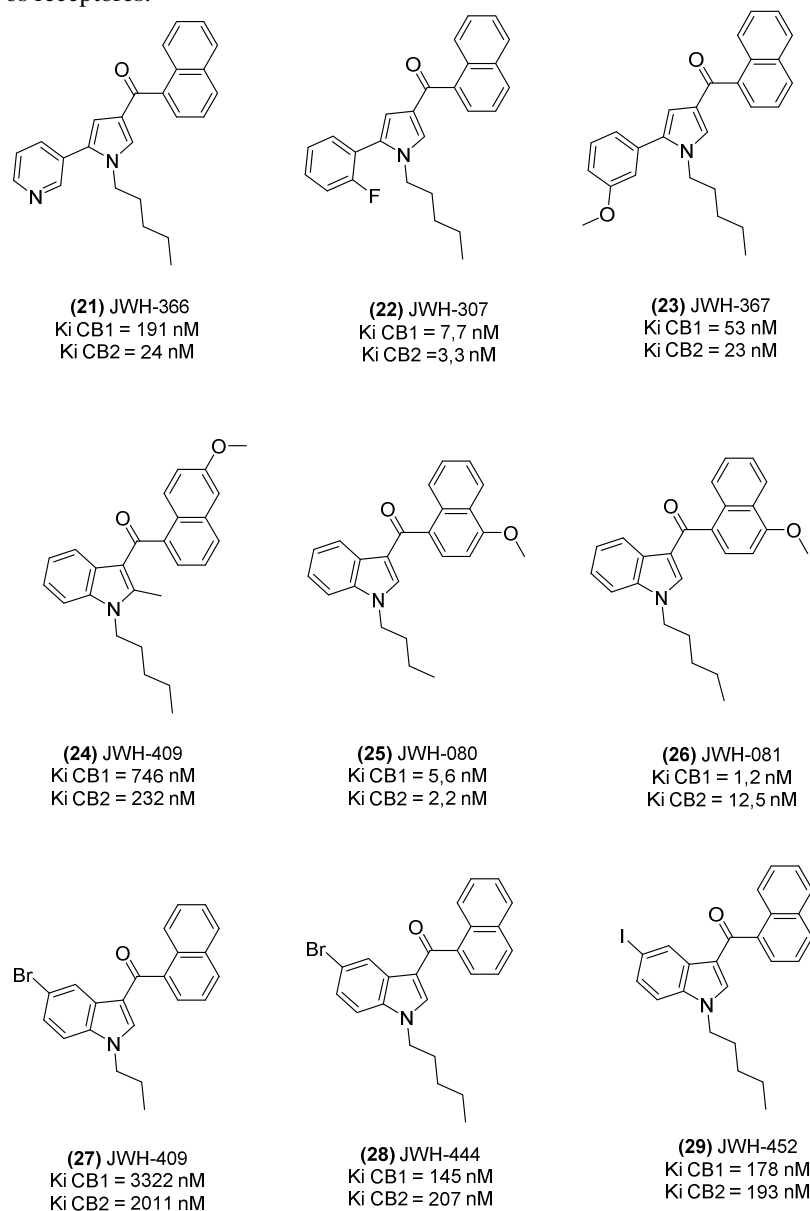
Fonte: Adaptado de (SCHOEDER et al., 2018)

O tamanho da cadeia lipofílica flexível é de importância sumária na afinidade da substância com ambos receptores, independente do perfil de atividade. Desta maneira, uma cadeia alifática com três carbonos demonstra baixa afinidade, e uma de cinco a seis carbonos a aumenta aproximadamente 10x (WILEY; MARUSICH; HUFFMAN, 2014), corroborado pela observação anterior a respeito da cadeia lateral de fitocannabinoides.

Na figura 14 é possível ver a diferença entre os núcleos pirrólico e indólico, os substituintes e o impacto na afinidade com os receptores, destacando a seletividade entre CB1/CB2 causado pela variação de substituintes entre o mesmo núcleo fundamental. Nota-se que o uso de uma cadeia lipofílica curta flexível pode ser compensado pelo

aumento do tamanho do grupamento volumoso adjacente. No entanto, se este grupamento for muito volumoso o uso de uma cadeia lateral como hexil ou heptil pode acarretar na perda de atividade (PETROV et al., 2013).

Figura 14– Comparação entre estruturas de canabinoides sintéticos e o impacto dos substituintes na afinidade com os receptores.

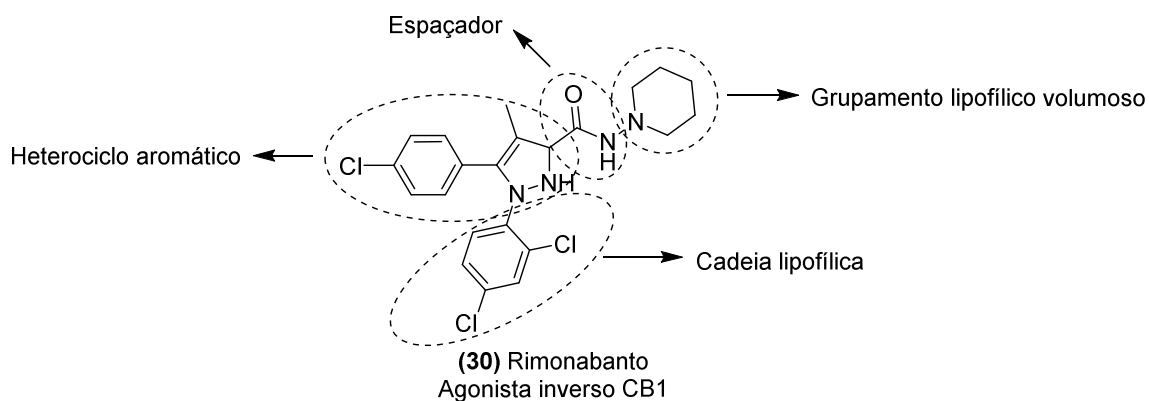


Fonte: adaptado de (WILEY; MARUSICH; HUFFMAN, 2014)

O agonista inverso CB1 rimonabanto (figura 15), chegou ao mercado brasileiro com o nome de Acomplia[®] pela Sanofi-Aventis. Ele compartilha similaridades com o padrão descrito acima (figura 14). Este medicamento foi retirado de circulação em 2008 (RE 4.087/208 ANVISA) pela crescente controvérsia a respeito de seus efeitos adversos. Sua atividade proposta era de atuação como moderador de apetite, e os efeitos observados

eram de agravo de condições psiquiátricas pré-existentes e tendência ao suicídio (SAM; SALEM; GHATEI, 2011).

Figura 15– Agonista inverso CB1 Rimonabanto com as regiões demarcadas salientando a similaridade com os outros canabinoides de perfil agonista.



Fonte: o autor

Mesmo preenchendo boa parte das características de um bom canabinoide, o rimonabanto é um agonista inverso CB1. Isso ressalta que não somente o valor de K_i (que dita a afinidade da substância pelo receptor) deve ser ponderado, mas também a sinalização interna da célula como recrutamento de $\beta 1$ -arrestina e redução dos níveis de AMPc, para a determinação do perfil de atividade como agonista ou antagonista ou agonista inverso, este sendo capaz de se ligar ao mesmo sítio de ligação do agonista, sem desempenhar a função de agonista.

1.3 ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE SUBSTÂNCIAS COM ALTA AFINIDADE PELO SISTEMA CANABINOIDE

Nas seções seguintes, é explicado o raciocínio desenvolvido para a obtenção das substâncias idealizadas e as metodologias abordadas para a produção das substâncias sintéticas com potencial afinidade pelo sistema canabinoide.

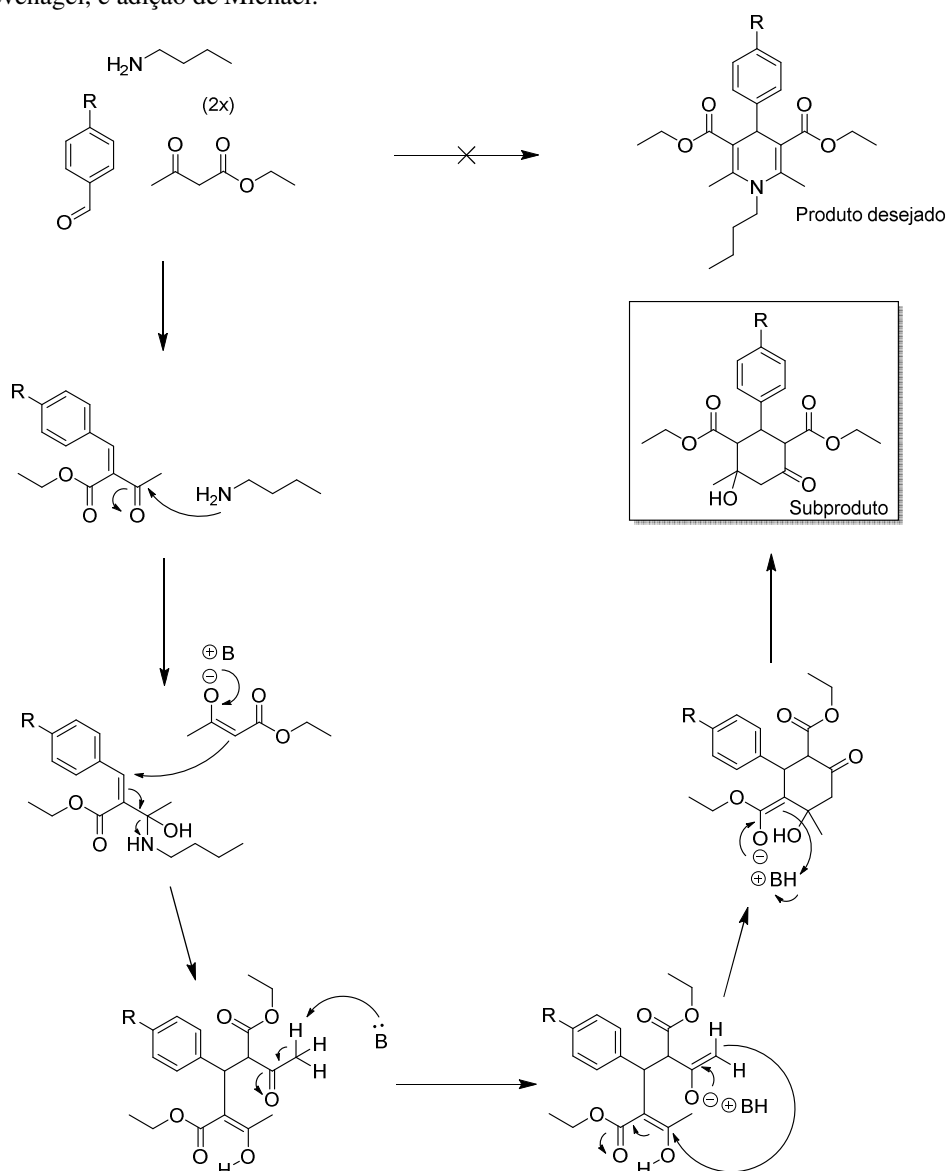
1.3.1 ARIL-CICLOHEXANONAS E CICLOHEXENONAS

A estratégia de reações de condensação de Knoevenagel, utilizando acetoacetato de etila e aldeídos aromáticos para formação de compostos bicíclicos poli funcionalizados, é bem estabelecida. Estes produtos, inicialmente obtidos por Hantzsch (HANTZSCH, 1885), foram classificados como produtos de condensação com uma estrutura acíclica. 85 anos depois, em 1970, Kingsbury e colaboradores (KINGSBURY; EGAN; PERUN, 1970) elucidaram não somente a característica cíclica, como também propuseram a estereoquímica relativa destas substâncias e os principais produtos de degradação.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, publicamos a síntese de 1,4-dihidropiridinas e 1,4-*N*-fenil-dihidropiridinas (POLLO et al., 2017), na expectativa de obtermos os compostos com uma cadeia alifática ao invés do *N*-fenil. Além disso, observando a formação dos subprodutos descritos no esquema 3, decidiu-se investigar melhor o potencial de utilização destes compostos de fácil obtenção no sistema canabinoide, devido à similaridade estrutural dos derivados obtidos com fitocanabinoides bicíclicos como o CBD.

No esquema 3, a *n*-butilamina (posteriormente representada pela letra B) é tida como a base promotora da reação de condensação entre a segunda unidade de acetoacetato de etila e o condensado de Knoevenagel, formado entre a primeira unidade de acetoacetato de etila e o aldeído aromático, e atua na formação e estabilização do enolato que por sua vez ataca o acceptor de Michael formado, realizando a ciclização da ciclohexanona.

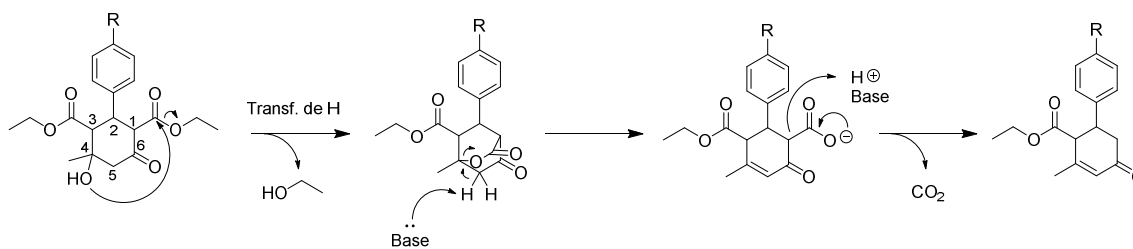
Esquema 3– Proposta de mecanismo de formação das aril-ciclohexanonas compreendido por condensação de Knoevenagel, e adição de Michael.



Fonte: o autor

Na mesma publicação de 1970, Kingsbury e colaboradores propuseram a degradação da ciclohexanona em meio básico, que consiste na formação de uma lactona a partir do ataque promovido pela hidroxila na posição 4 ao éster na posição 1, liberando uma unidade de etanol. Posteriormente, a base remove um dos hidrogênios na posição 5, formando uma dupla ligação entre a posição 4 e 5, por sua vez abrindo o anel lactônico e formando um carboxilato livre, que se torna passível de descarboxilação por efeito térmico. A proposta de mecanismo pode ser vista no esquema 4 a seguir.

Esquema 4– Proposta de mecanismo de degradação em meio básico (descarboxilação e eliminação da hidroxila) proposto por Kingsbury e colaboradores



fonte: adaptado de (KINGSBURY; EGAN; PERUN, 1970)

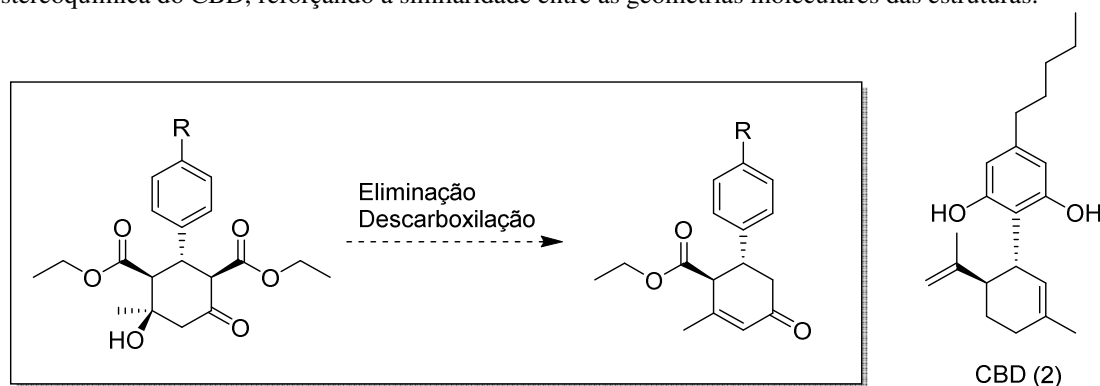
Quando considerada a proposta da formação do intermediário lactônico bicíclico durante o processo de degradação, é importante salientar que esta reação só é possível caso haja proximidade entre os grupamentos hidroxila na posição 4 e o grupamento etil-éster na posição 1, sugerindo que ambos estejam no mesmo plano.

Posteriormente, em 2006, a estereoquímica absoluta destas estruturas foi resolvida por cristalografia de raio-x de monocristal (HEMA et al., 2006) e explorada mais a fundo por Chen e colaboradores (CHEN et al., 2015), confirmando esta hipótese, definindo a estereoquímica de todos os centros assimétricos desta classe de substâncias.

A vantagem da utilização deste esqueleto na produção de substâncias com potencial para atividade no sistema canabinoide se dá pela sua facilidade de produção e pela geometria dos produtos obtidos que são capazes de mimetizar as regiões de contato com o sítio de ligação, como observado na figura 16, que apresenta a similaridade entre a estrutura genérica dos ésteres de Hagemann com CBD, focando no posicionamento dos substituintes e estereoquímica do sistema bicíclico.

Considerando a estereoquímica atribuída anteriormente, o produto de degradação (ciclohexenona) possui uma grande similaridade com o esqueleto bicíclico do CBD. Ambos os centros assimétricos possuem a mesma configuração e a disposição anti-periplanar dos anéis aromáticos e é mantida devido aos substituintes do anel subsequente. A rotação do anel aromático permite que a localização dos oxigênios do etil-éster da ciclohexenona estejam em uma coordenada aproximada dos oxigênios de uma das hidroxilas fenólicas do CBD, comparação apresentada na figura 16.

Figura 16– Estereoquímica atribuída às aril-ciclohexanonas e aril-ciclohexenonas e a comparação com a estereoquímica do CBD, reforçando a similaridade entre as geometrias moleculares das estruturas.



E devido a facilidade de produção, a variabilidade da cadeia lateral pode ser explorada de forma a identificar a correlação entre os diferentes substituintes e a atividade biológica. Por exemplo, utilizando a lógica estabelecida por Hua e colaboradores (HUA et al., 2016), cadeias alifáticas ramificadas, com uma extensão de até 7 unidades de carbono e um aceptor de ligação de hidrogênio na porção final (como visto no agonista AM-11542) correlacionam com a atividade canabinomimética proposta nesta tese.

1.3.2 ISOINDOLINONAS

Os aminoalquilindóis, por possuírem alto potencial canabinomimético, são ótimos modelos quando se pretende desenhar alternativas sintéticas, de fácil produção e com espectro de atividade biológica relevante. Entretanto, devido a sua estrutura derivada do indol, existe a associação a uma plêiade de atividades neurológicas, principalmente alucinógenas, ativando as mesmas vias de sinalização mediadas por substâncias como a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (YANO et al., 2020).

Levando em consideração o grande volume dos sítios de ligação dos receptores do sistema canabinoide e a variabilidade estrutural das moléculas que apresentam interações fortes com estes receptores, foi formulada a hipótese de utilização de isoindolinonas como bio-isósteros do grupamento indólico, para o desenvolvimento de substâncias que continuassem apresentando as mesmas interações fortes com os receptores (SZKATUŁA et al., 2020).

A estratégia para a utilização da isoindolinona como bioisótero do núcleo indólico se dá pela inexistência de substâncias que possuem estas características

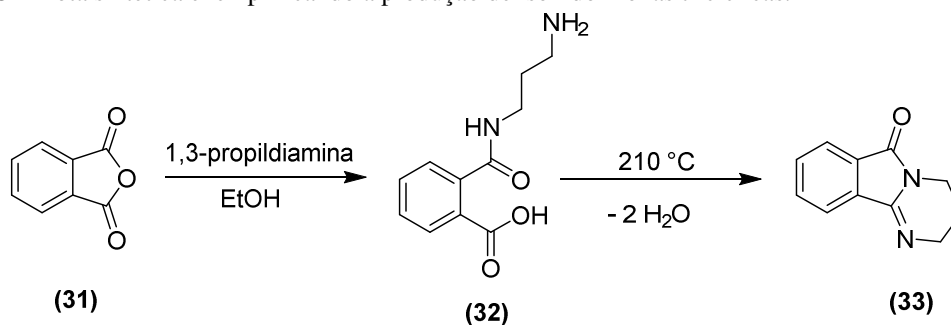
estruturais, já que substâncias indólicas costumam afetar o sistema nervoso central, existindo baixo potencial para a utilização destas substâncias que são desenvolvidas como drogas de abuso.

Foi visado nesta tese o desenvolvimento de substâncias com potencial terapêutico que não exerçam ação no SNC, mas que tenham associação prioritária com o sistema canabinoide, com a utilização da isoindolinona ao invés do classicamente usado indol, resolvendo em boa parte este aspecto por dificultar a interação com outros receptores *off-target* como os receptores de 5-HT.

Interações *off-target* acontecem em casos onde o ligante não possui uma interação forte exclusiva com um único alvo molecular, podendo em muitos casos se comportar como agonista e/ou antagonista em outros alvos. Muitas vezes estas interações são responsáveis por efeitos adversos indesejáveis no desenvolvimento de novos fármacos, impactando fundamentalmente na segurança e eficácia dos protótipos a fármaco (LYNCH et al., 2017).

O preparo de isoindolinonas tricíclicas, quando na configuração com o terceiro anel de seis membros, pode ser realizado facilmente a partir do anidrido ftálico, como visto no esquema 5 (GAOZZA; GRINBERG; LAMDAN, 1972). No entanto, a funcionalização deste esqueleto para posterior modificação é dificultada devido a estabilidade do sistema tricíclico, havendo evidências da facilidade de abertura do anel de 5 membros da isoindolinona em exposição a um nucleófilo, e existindo dificuldade em funcionalizar a estrutura para inserir uma cadeia lateral, dependendo de reações de redução e substituições nucleofílicas que podem acabar degradando as substâncias.

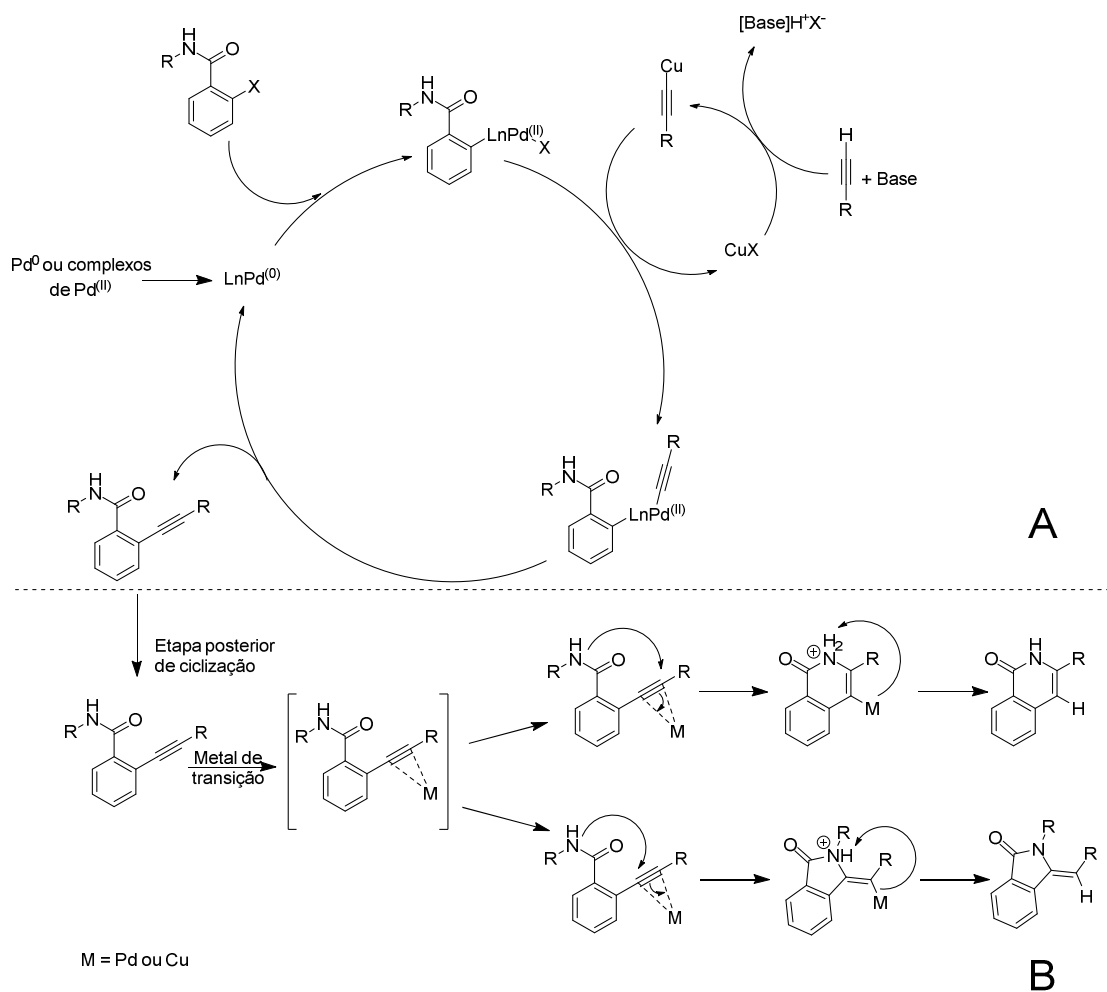
Esquema 5 – Rota sintética exemplificando a produção de isoindolinonas tricíclicas.



Outro método de preparo, que é comumente visto na literatura, é a síntese da isoindolinona com substituintes funcionalizados que podem ser ciclizados posteriormente dependendo da necessidade. Estes métodos usam catálise por metais como paládio e cobre nas reações de acoplamento carbono – carbono entre um haleto de arila, usualmente amidas do ácido 2-iodobenzóico ou e um alcino verdadeiro (SAINI et al., 2017).

Os dois tipos de reação mais vistos na literatura para produção de isoindolinonas desta forma são as reações de Sonogashira e Castro-Stephens (esquema 6 e 7), ambas utilizam cobre. No entanto, a reação de Sonogashira utiliza paládio para mediar o acoplamento, enquanto Castro-Stephens necessita da formação de um acetileno de cobre, que ataca diretamente o haleto de arila formando um intermediário de curta meia-vida, posteriormente formando a ligação sigma entre os carbonos.

Esquema 6– (A) Proposta de mecanismo da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira relativo à formação de uma ligação sigma carbono-carbono entre um haleto de arila e um alcino terminal. (B) Proposta de mecanismo de ciclização resultando nos dois possíveis produtos teóricos isoindolinona e isoquinolinona.

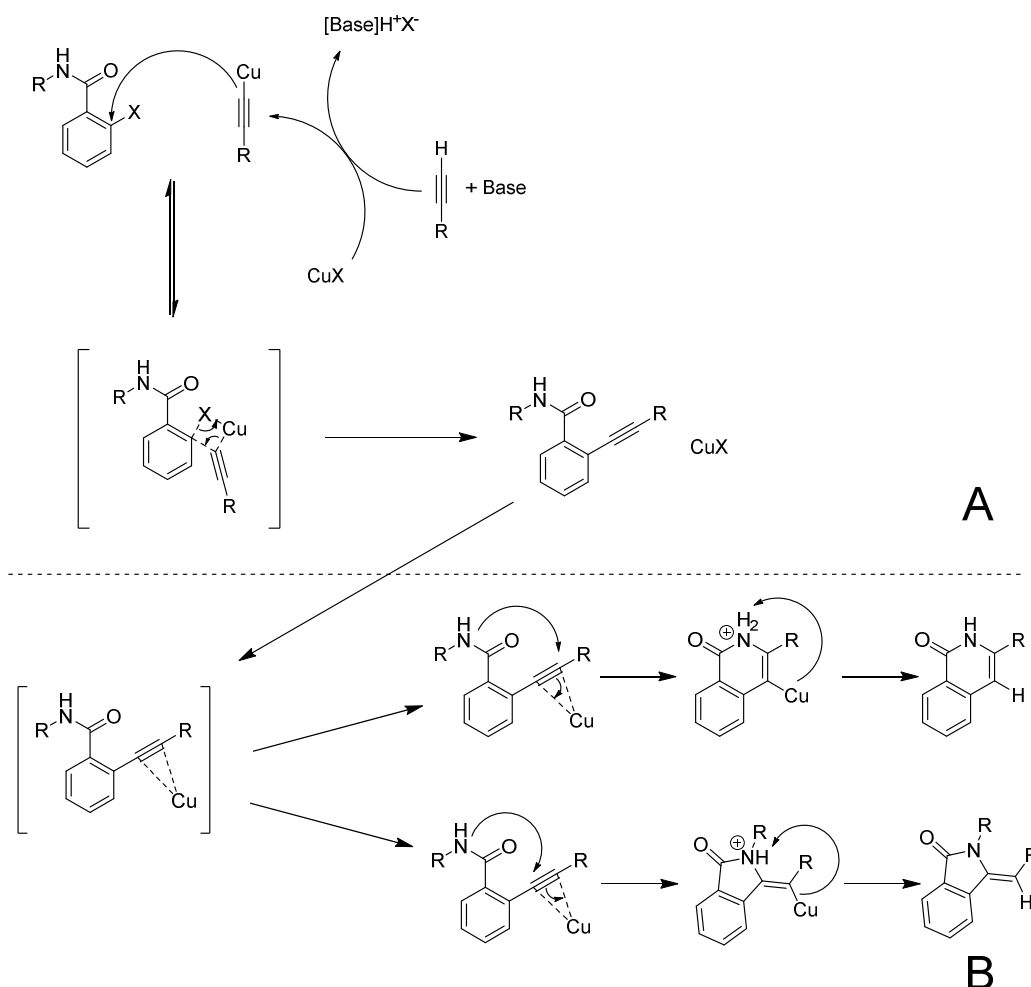


Adaptado de (KÜRTI; CZAKÓ, 2005)

Por se tratar de um ataque de uma amida a uma tripla ligação, fragilizada pela interação com paládio e cobre, há a possibilidade da formação de subprodutos com anéis de seis membros (isoquinolinonas) juntamente com o produto desejado.

Ambas reações, por utilizarem metais de transição (cobre I e paládio II), elevam de forma significativa o custo reacional, principalmente a reação de Sonogashira pelo necessário uso de paládio. Entretanto, a reação de Sonogashira continua sendo mais econômica que a reação de Castro-Stephens pois há uma regeneração do catalizador metálico, fazendo com que a quantidade utilizada por reação possa ser reduzida significativamente.

Esquema 7– (A) Proposta de mecanismo da reação de acoplamento cruzado de Castro-Stephens relativo à formação de uma ligação sigma carbono-carbono entre um haleto de arila e um alcino terminal. (B) proposta de mecanismo de ciclização resultando nos dois possíveis produtos teóricos isoindolinona e isoquinolinona.



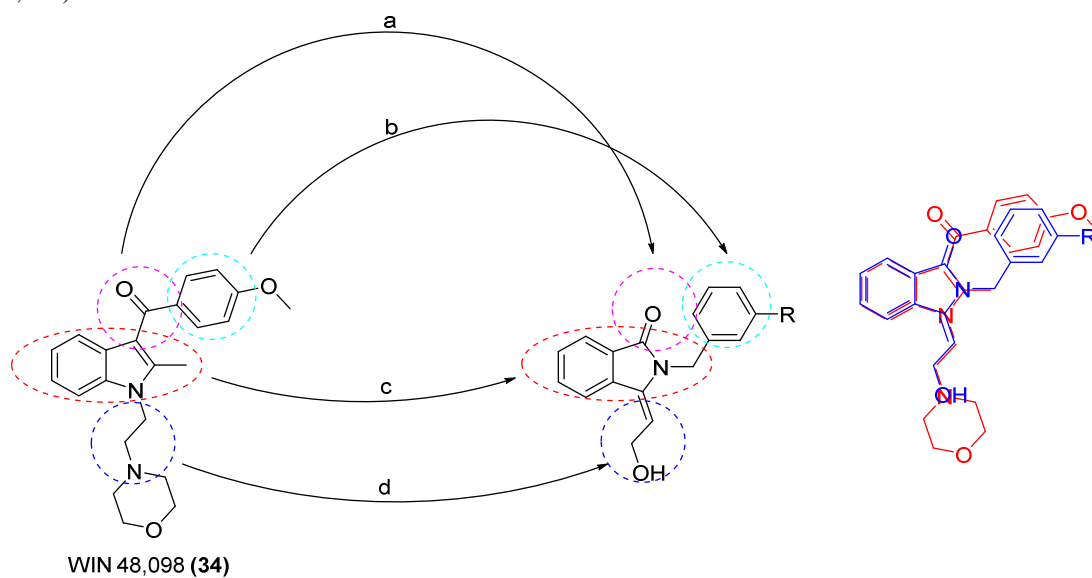
Adaptado de (KÜRTI; CZAKÓ, 2005)

A Reação de Castro-Stephens é descrita utilizando somente sais de cobre (I), para promover o acoplamento cruzado. Porém, Chary e colaboradores (CHARY et al., 2014) realizaram um estudo de otimização reacional priorizando a formação de isoquinolinonas com sais de cobre (II), com destaque para acetato de cobre (II). Comparando a proporção entre produtos e subprodutos e o rendimento global, com a aplicação desta metodologia os únicos produtos isolados foram as isoindolinonas.

A 6-iodopravadolina (AM-630) e o seu análogo não halogenado (WIN 48,098) apresentam um perfil farmacológico com potencial de utilização no tratamento e controle de dor e inflamação, devido ao forte efeito analgésico e afinidade preferencial pelo receptor CB2. Assim, estas estruturas foram utilizadas como modelo para a seleção das características principais a serem priorizadas na produção dos análogos isoindólicos.

A figura 17 a seguir exemplifica o alinhamento dos grupamentos principais entre a pravadolina (WIN 48,098) e uma das isoindolinonas produzidas nesta tese, salientando o posicionamento da carbonila (a), do anel aromático (b), dos sistemas bicíclicos indólico e isoindólico (c) e da cadeia com rotação livre e com distanciamento de duas unidades de carbono entre um aceptor de ligação de hidrogênio e o sistema bicíclico (d). Também é apresentada nessa figura a sobreposição da representação bidimensional das estruturas da pravadolina (WIN 48,098) em vermelho e da substância idealizada em azul.

Figura 17– Comparação do distanciamento relativo entre os grupamentos de interesse identificados na pravadolina (WIN 48,098) e a substância produzida, (a) posicionamento da carbonila, (b) posicionamento do anel aromático, (c) disposição dos sistemas bicíclicos indol / isoindol, (d) disposição da cadeia com rotação livre com o mesmo espaçamento entre o sistema bicíclico e o aceptor de ligações de hidrogênio. A direita a representação da sobreposição das estruturas bidimensionais de ambas as substâncias (WIN 48,098) em vermelho e substância 83 em azul.



1.4 ESTRATÉGIAS *IN SILICO* PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAL CANABINOMIMÉTICO

A principal forma de avaliação de potencial de substâncias rapidamente e com baixo custo agregado é a utilização de estratégias *in silico* para determinar características de comportamento físico-químico, similaridade com substâncias com atividade conhecida, e determinação da complementaridade e interações importantes com os sítios de ligação de alvos moleculares validados.

Esta última estratégia descrita trata-se do ancoramento molecular, que consiste na utilização da estrutura tridimensional obtida *via* cristalografia de raio-x, ressonância magnética nuclear, criomicroscopia eletrônica e modelagens de homologia da macromolécula a qual quer se determinar a interação com a micromolécula.

Determina-se o posicionamento do sítio de ligação e é aplicada uma função de otimização de gradiente energético (função de busca), para determinar o complexo de menor energia (mais estável). A partir do complexo formado é aplicada uma função matemática que avalia a distância entre as interações, tipos de interação, e torção de partes da molécula para gerar um score (função de *scoring*), que é utilizado na comparação da afinidade dos ligantes pelo sítio de ligação (FAN; FU; ZHANG, 2019).

Vale salientar que os resultados obtidos como score são somente representativos da complementaridade entre macro e micro moléculas, não necessariamente são valores preditivos de atividade biológica devido à complexidade dos sistemas biológicos e as interações *off-target* que não são levadas em consideração neste tipo de experimento (CHEN, 2015).

Considerando o exposto acima, e apreciando as estratégias exemplificadas neste trabalho, foi realizada a síntese de aril-ciclohexanonas, aril-ciclohexenonas, isoquinolinonas e isoindolinonas, com potencial para atuação no sistema canabinoide.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar moléculas bioativas inéditas com potencial canabinomimético, em especial isoindolinonas, aril-ciclohexanonas e ciclohexenonas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar aril-ciclohexanonas com diferentes substituintes aromáticos em rendimentos consideráveis para a avaliação da atividade biológica e realização de reações de modificação das substâncias obtidas;
- Sintetizar, purificar e caracterizar aril-ciclohexenonas com diferentes substituintes aromáticos derivadas das aril-ciclohexanonas obtidas previamente;
- Sintetizar, purificar e caracterizar isoindolinonas em rendimentos consideráveis para a avaliação do perfil de atividade biológica;
- Realizar estudos de ancoramento molecular para avaliação da complementaridade ligante-receptor.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

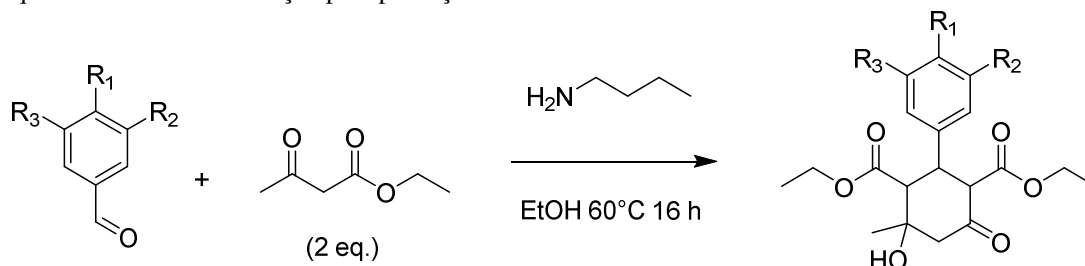
3.1 ARIL-CICLOHEXANONAS

A produção inicial dos análogos aril-ciclohexanona partiu da condição encontrada acidentalmente quando foi proposta a produção de *n*-butil dihidropiridinas, tendo aril-ciclohexanonas como produto majoritário. A condição foi mantida para maioria dos análogos a título de comparação, sendo que para a condição apresentada no esquema 8, os rendimentos obtidos foram satisfatórios (acima de 70%) na maioria dos casos, porém considerados baixos para os análogos com substituinte 4-F (**41**) e 3-Cl (**41**). As reações foram realizadas com sucesso em pequena escala, aproximadamente 200 mg, no entanto, quando escalonadas na tentativa de obter maior quantidade de intermediários para conduzir reações subsequentes, o rendimento foi negativamente impactado, e a etapa de purificação se tornou muito trabalhosa devido a utilização de grandes volumes de solvente

e colunas de sílica-gel calibrosas para realizar a purificação dos produtos de síntese, elevando o custo da produção destes análogos.

Viabilizar a produção destes protótipos de fármacos com baixo custo e facilidade de produção em larga escala é de suma importância quando se é considerada a possibilidade de evolução do projeto a escala pré-clínica, em futuros trabalhos.

Esquema 8– Primeira condição para produção de aril-ciclohexanonas e rendimentos obtidos.

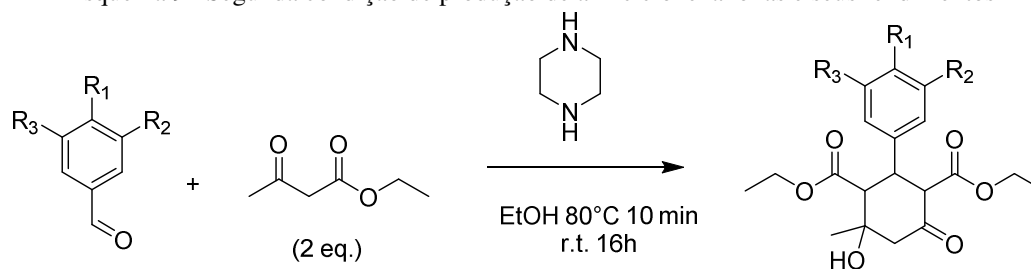


	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)		R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
35	OMe	H	H	90	40	F	H	H	5
36	OMe	OMe	H	91	41	H	Cl	H	5
37	OMe	OMe	OMe	94	42	H	F	H	12
38	Cl	H	H	84	43	H	NO ₂	H	86
39	Br	H	H	46	44	NO ₂	H	H	50

Desta forma, foi necessária a adaptação das condições reacionais para um escalonamento mais efetivo das reações. Neste caso foi considerada uma metodologia que utiliza amina secundária (piperazina) ao invés de amina primária, com o aquecimento sendo realizado somente na primeira etapa da reação, e a purificação do produto obtido sendo realizada por precipitação e recristalização (KOCHAROV et al., 2020a).

Assim, foi realizada a síntese de aril-ciclohexanonas em escalas de 2 a 5 g do aldeído de partida, utilizando piperazina como base promotora. O esquema reacional e os rendimentos podem ser acompanhados no esquema 9 a seguir.

Esquema 9– Segunda condição de produção de aril-ciclohexanonas e seus rendimentos



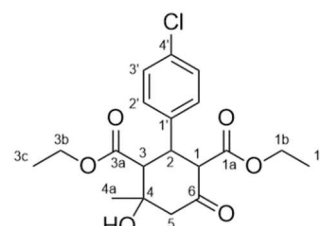
	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)		R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
35	OMe	H	H	47	42	H	F	H	42
37	OMe	OMe	OMe	51	43	H	NO ₂	H	13
38	Cl	H	H	42	44	NO ₂	H	H	55
40	F	H	H	31	45	H	H	H	14
41	H	Cl	H	28					

Não foi possível realizar a reação na condição descrita acima para os análogos 3,4 dimetoxi (**36**) e 4-Br (**39**), devido a indisponibilidade de material de partida (aldeído). Como visto nos esquemas anteriores (esquema 8 e 9), houve um comprometimento notável do rendimento dos produtos. Entretanto a facilidade de produção em larga escala e a purificação simplificada estabeleceu a segunda metodologia como preferencial para a produção das aril-ciclohexanonas neste trabalho, pois o processo tornou-se mais rápido e barato por excluir do processo produtivo o uso de colunas cromatográficas de sílica-gel e solventes orgânicos, sendo o tempo de aquecimento reduzido de 16 h para 10 min.

A identidade das substâncias obtidas foi confirmada utilizando RMN de ¹H, ¹³C, e os mapas de correlação HMBC e HSQC. Como técnica complementar, obteve-se o valor de massa de alta resolução para auxiliar na confirmação da identidade das estruturas. Seguindo este roteiro os dados físico-químicos relacionados a cada estrutura encontram-se na seção de metodologia experimental. A seguir, é exemplificada a elucidação do análogo *p*-cloro (**38**), escolhido como principal representante desta classe neste trabalho.

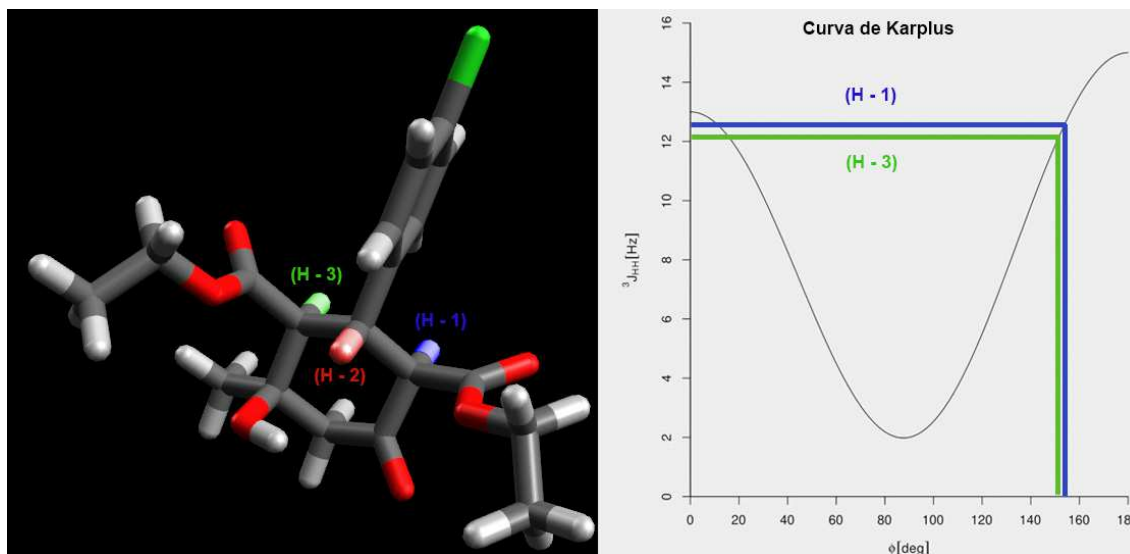
Tabela 1– Dados de RMN (300 MHz, CDCl₃) da substância 38.*1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(4-clorofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (38)*

POSIÇÃO	¹³ C	¹ H	HMBC
1	62,3	3,62 (d, <i>J</i> 12,4 Hz, 1H)	44,5, 136,8, 167,5, 200,9
2	44,5	4,00 a 3,98 (m, 1H)	
3	56,8	3,02 (d, <i>J</i> 12,2 Hz, 1H)	44,5, 62,3, 136,8, 167,5, 173,6
4	73,0		
5	52,7	2,51 (d, <i>J</i> 14,3 Hz, 1H) 2,71 (d, <i>J</i> 14,3 Hz, 1H)	56,8, 73,0, 200,9 28,6, 56,8, 62,3, 73,9, 173,6, 200,9
6	200,9		
1a	173,6		
1b	61,2	3,89 (ddd, <i>J</i> 2,3/7,2/14,3 Hz 2H)	14,0, 173,6
1c	14,0	1,08 (t, <i>J</i> 7,1 Hz, 3H)	61,2
3a	167,5		
3b	61,2	4,13 a 3,95 (m, 2H)	44,5, 56,8, 136,8, 167,5, 200,9
3c	13,7	0,87 (t, <i>J</i> 7,2 Hz, 3H)	61,2
4a	28,6	1,34 (s, 3H)	52,7, 56,8, 72,8, 200,9
1'	136,8		
2'	129,5	7,22 a 7,17 (m, 2H)	129,5, 133,6, 136,8
3'	128,8	7,31 a 7,25 (m, 2H)	44,5, 128,8, 129,5, 133,6
4'	133,6		



Voltando a atenção para os dados de RMN de hidrogênio que consigam diagnosticar de forma mais simples a disposição dos sinais observados referente ao anel ciclohexanona, observou-se H-1 e H-3 como dupletos com constantes vicinais de 12,4 e 12,2 Hz respectivamente, que podem ser consideradas constantes diaxiais que de acordo com a curva de Karplus apresenta um ângulo entre 150 e 160°, inferindo que o hidrogênio H-2 não esteja no mesmo plano que H-1 e H-3, demonstrado na figura 18 abaixo. O sinal referente a H-2, neste caso, apresentou-se como multipletos pois haviam sobreposições de sinal que dificultaram a leitura das constantes, e por fim os hidrogênios do metileno da posição C-5, H-5a e H-5b apresentam somente uma constante de acoplamento geminal de 14,3 Hz por estarem vicinais a dois carbonos quaternários.

Figura 18– Representação tridimensional da substância 38 com a identificação dos hidrogênios H-1 (azul), H-2 (vermelho) e H-3 (verde) a esquerda. A direita é representada a curva de Karplus e as linhas referentes as constantes de acoplamento de H-1 e H-3 com H-2, e o ângulo da projeção resultante destas constantes.



Os dados de RMN apresentados e discutidos acima estão em concordância com estudos publicados anteriormente (PANDIARAJAN et al., 2005), haja visto que esta classe de substâncias foi descrita há muito tempo (1885), e quase todos os análogos produzidos das aril-ciclohexanonas (com diferenças no padrão de substituição aromático) estão descritos na literatura. Pandiarajan e colaboradores, além do análogo *p*-cloro **38**, descreveram em detalhes dos análogos *p*-metoxi **35**, *p*-nitro **43**, *m*-nitro **44** e fenil **45**, focando principalmente nos dados de RMN. O análogo *p*-bromo **39** foi relatado por Kocharov e colaboradores (KOCHAROV et al., 2020b) e os análogos *p*-fluor **40** e *m*-cloro **41** foram relatados por Gootjes e colaboradores em 1965, este contendo uma descrição preliminar dos dados de RMN em baixa resolução em 60 MHz (GOOTJES; NAUTA, 2010).

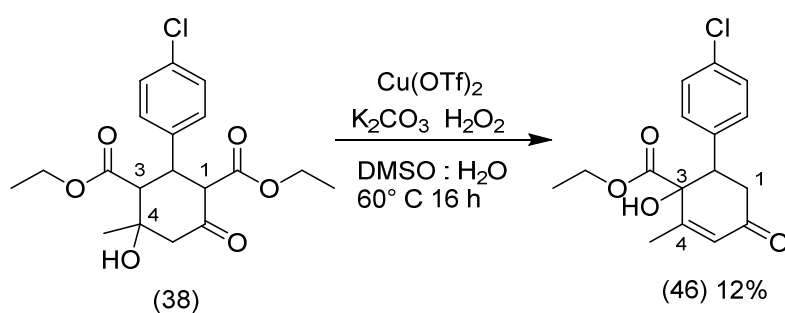
O análogo dimetoxi **36** foi descrito por Gordon N. Walker em 1955, constando apenas com caracterização por composição elementar. Quando inquerido na base de dados Sci-Finder[®], o análogo trimetoxi **37** consta em apenas uma publicação, para a qual não foi possível o acesso devido a revista não ter repositório *online* e não estar mais em funcionamento (DESAI et al., 2014). Por fim, o análogo *m*-fluor **42** consta apenas em uma patente, na qual não foram encontrados os dados de caracterização da substância em questão (NAGARAJAN et al., 2005).

3.2 ARIL-CICLOHEXENONAS E DERIVADOS

Após a produção das aril-ciclohexanonas **35** a **45**, foram delineados experimentos para a produção de derivados utilizando-as como material de partida para as reações. Inicialmente, foi proposta uma condição de descarboxilação oxidativa baseada em um mecanismo dependente de cobre (II), na expectativa da produção de análogos com uma maior variabilidade estrutural, como nas condições propostas por Patra e colaboradores (PATRA et al., 2016), propondo um papel duplo do cobre na mediação da reação de descarboxilação e acoplamento aromático com ativação C-H sob condições oxidantes.

Foi então proposta a reação de **38** utilizando o triflato de cobre (II) como fonte de cobre, peróxido de hidrogênio 35% como agente oxidante e carbonato de potássio como base. Para garantir a solubilidade de todos os componentes, DMSO foi escolhido como solvente. No entanto, o produto isolado não foi o produto do acoplamento concomitante a descarboxilação, mas o produto (**46**) foi resultante da descarboxilação na posição C-1, eliminação da hidroxila em C-4 e α -hidroxilação na posição C-3.

Esquema 10– Condição reacional para a produção da substância 46.

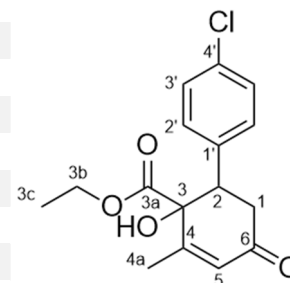


A identidade deste produto inesperado foi atribuída com a elucidação dos espectros de RMN e a confirmação da massa de alta resolução, e seus dados de RMN contendo a descrição dos sinais de ^1H e os sinais de ^{13}C associados diretamente pelo HSQC e pelas correlações de longa distância encontradas via HMBC estão descritos na tabela 2.

Tabela 2- Dados de RMN (300 MHz, CDCl₃) da substância 46.

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4-metil-6-ona-3-carboxílico (46)

POSICÃO	¹³ C	¹ H	HMBC
1	39,7	2,63 (dd, <i>J</i> 4,6/16,6 Hz, 1H)	197,5, 129,2, 78,6, 49,2
		3,32 (dd, <i>J</i> 14,7/16,6 Hz, 1H)	197,5, 135,5, 78,6, 49,2
2	49,2	3,62 (dd, <i>J</i> 4,6/14,7 Hz, 1H)	197,5, 171,6, 158,9, 135,5, 129,8, 78,6, 39,7
3	78,6		
4	158,9		
5	129,2	6,09 (sl, 1H)	78,6, 39,7, 18,8
6	197,5		
3a	171,7		
3b	63,5	4,22 (q, <i>J</i> 7,1 Hz, 2H)	171,7, 14,1
3c	14,1	1,29 (t, <i>J</i> 7,1 Hz, 3H)	63,5
4a	18,8	1,93 (sl, 3H)	197,5, 171,8, 158,9, 129,2, 78,6
1'	135,5		
2'	129,8	7,19 a 7,14 (m, 2H)	133,9, 129,8, 49,2
3'	128,6	7,33 a 7,27 (m, 2H)	133,9, 135,5, 129,2
4'	133,9		
OH		3,73 (sl, 1H)	171,7, 158,9, 78,7, 49,2



Destaca-se que o espectro de ¹H RMN está apresentado na figura 19 e a expansão dos sinais de ¹H que compõe o anel ciclohexenona estão na figura 20, a qual apresenta a ampliação das regiões específicas do espectro referente aos sinais que justificam o posicionamento da hidroxila em C-3.

O sinal de hidrogênio em 6,09 ppm (H-5) é referente ao hidrogênio da posição α à carbonila, se assemelha a um singleto largo. O sinal de hidrogênio em 3,62 ppm (H-2) é referente ao hidrogênio na posição C-2, que se apresenta como um duplo-duplete com uma constante de acoplamento de 4,6 Hz referente ao acoplamento axial-equatorial com um dos hidrogênios do metileno na posição C-1, e a outra constante apresentada no sinal é de 14,7 Hz referente ao acoplamento diaxial em ângulo aproximado a 180° com o outro hidrogênio do metileno na posição C-1. A inexistência de outra constante de acoplamento reforça a ideia de que a posição C-3 consiste em um carbono quaternário.

Os hidrogênios do metileno da posição C-1 foram atribuídos como dois duplos-dupletos (*J*= 16,6 e 4,6 e *J*=16,6 e 14,7), o sinal em 2,63 ppm (H-1a) apresentou constantes de acoplamento de 4,6 Hz referente ao acoplamento vicinal com H-2 e de 16,6 Hz referente ao acoplamento geminal (H-1b). O hidrogênio em 3,32 ppm (H-1b) mostrou constantes de acoplamento de 14,7 Hz referente ao acoplamento diaxial com H-2 e o mesmo acoplamento geminal com constante de 16,6 Hz (H-1a) mencionado anteriormente.

Figura 19– Espectro de hidrogênio da substância 46 (CDCl₃, 300 MHz).

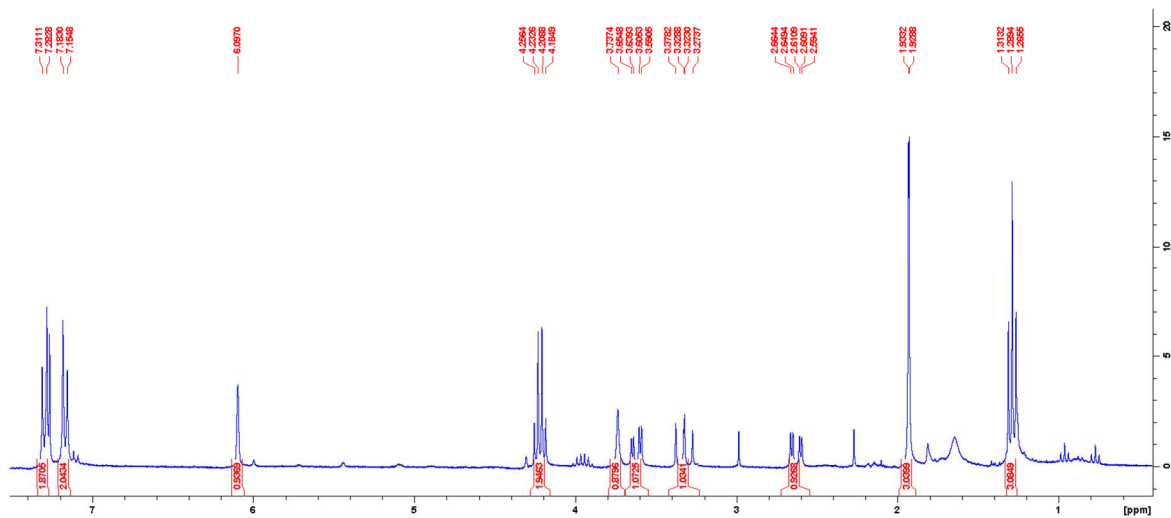
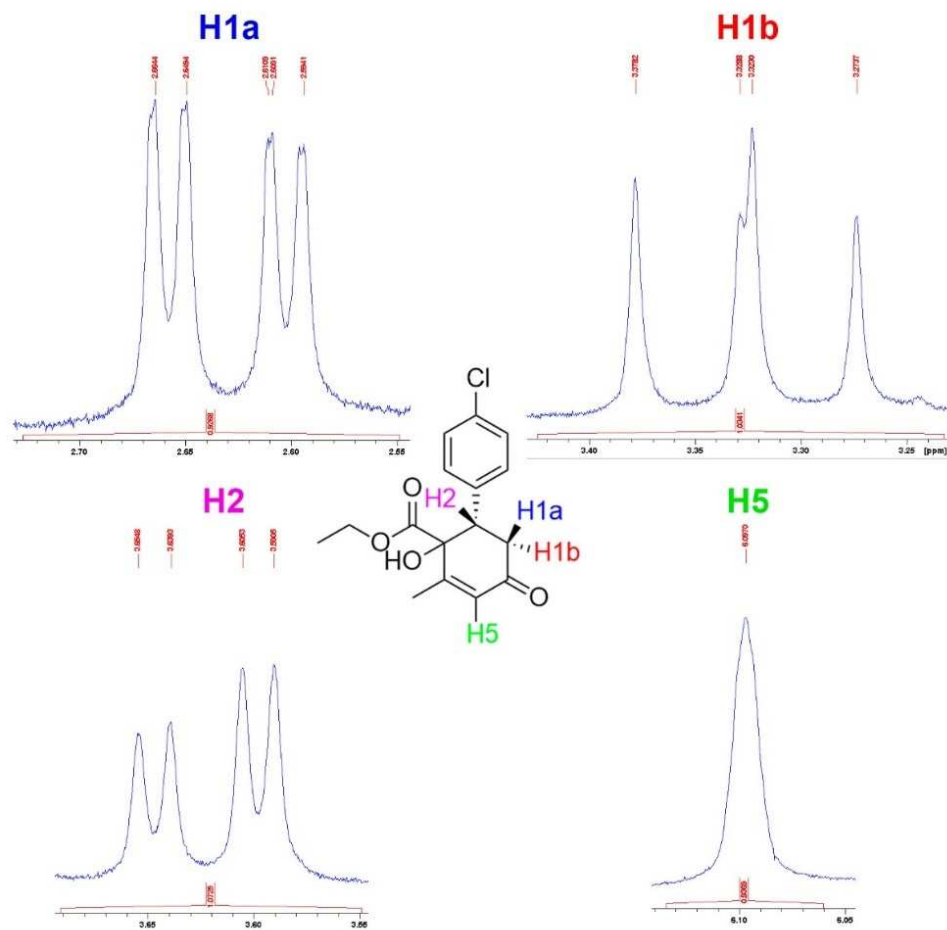
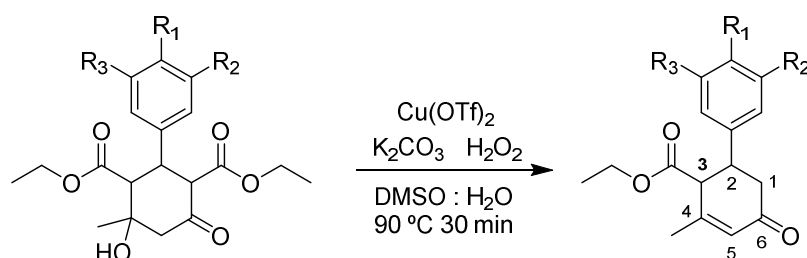


Figura 20– Detalhamento dos sinais de 1H referentes ao anel ciclohexenona da substância 46.



A substância **46**, foi caracterizada com sucesso e o único relato existente na literatura é de substâncias análogas consistindo do metil éster ao invés do etil éster (KIM et al., 2011). Na expectativa de obter mais análogos de ciclohexenonas hidroxilados na posição C-3, as aril-ciclohexenonas produzidas anteriormente foram submetidas à mesma condição reacional utilizada para a produção da substância **46**, entretanto, não foi observada a formação de produtos condizentes com o esperado (3-OH), logo levantou-se a hipótese de que o produto hidroxilado desejado estivesse sendo formado e posteriormente degradado. Assim, alterou-se a condição reacional, mantendo a reação por um período de tempo menor, até o desaparecimento do material de partida, totalizando em média 30 minutos.

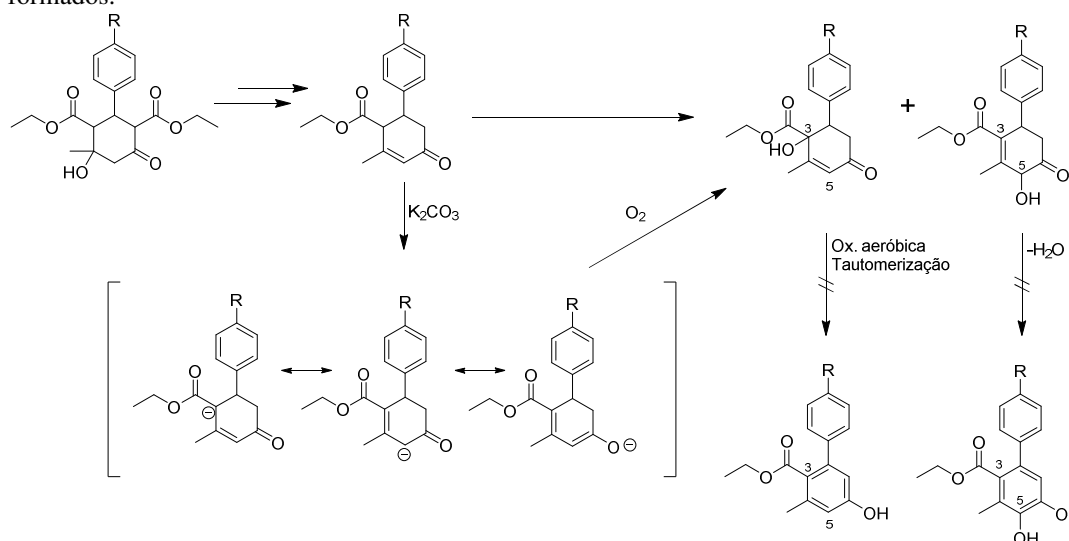
Esquema 11- Primeira condição para a produção de aril-ciclohexenonas e seus rendimentos obtidos



	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)		R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
47	OMe	H	H	3	51	Br	H	H	2
48	OMe	OMe	H	2	52	F	H	H	2
49	OMe	OMe	OMe	4	53	H	Cl	H	7
50	Cl	H	H	2	54	H	F	H	4

Esta hipótese de degradação foi considerada devido ao mecanismo proposto na literatura (Esquema 12) para a formação dos análogos hidroxilados em C-3, que são formados a partir do éster de Hagemann (ciclohexenona). Para evitar a degradação do intermediário hidroxilado e possibilitar um controle reacional maior, buscou-se produzir os ésteres de Hagemann para utilização em reações posteriores, que possam conter menos componentes evitando reações paralelas. No entanto devido ao tempo disponível as reações posteriores de hidroxilação da posição C-3 não foram realizadas, podendo ser exploradas em trabalhos subsequentes.

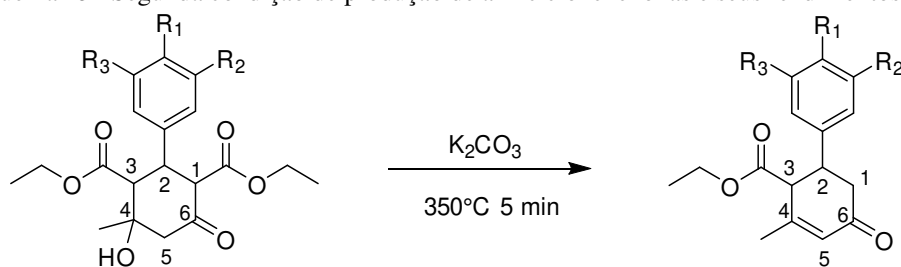
Esquema 12– Proposta de mecanismo de oxidação das posições 3 e 5 e posterior degradação dos produtos formados.



Adaptado de (KIM et al., 2011)

A proposta de formação dos ésteres de Hagemann com o mínimo de interferentes possível, foi realizada somente com o material de partida (aril-ciclohexanona) e carbonato de potássio como base, sem solvente e sem fonte de cobre para a promoção da descarboxilação, para obtenção do produto descarboxilado. No entanto, foi necessário elevar a temperatura até a fusão do material de partida para promover a descarboxilação, com o aquecimento promovido por uma pistola térmica, com temperatura máxima de 350 °C aquecendo o material sólido em um frasco de *headspace* compatível com altas temperaturas, e com fluxo de argônio constante para evitar a carbonização do material, mantendo o aquecimento até o material parar de borbulhar, o que foi em média 5 minutos.

Esquema 13– Segunda condição de produção de aril-ciclohexenonas e seus rendimentos.



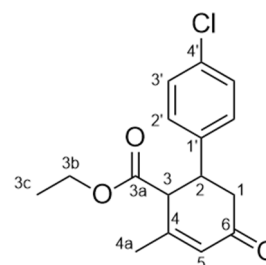
	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)		R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
47	OMe	H	H	32	54	H	F	H	23
50	Cl	H	H	6	55	H	H	H	52
52	F	H	H	17	56	H	NO ₂	H	50
53	H	Cl	H	47	57	NO ₂	H	H	54

Com esta condição reacional, descrita acima (esquema 13), incrementou-se substancialmente o rendimento dos ésteres de Hagemann produzidos, devido principalmente à redução de componentes da reação que possivelmente causavam interferências na separação, como o DMSO. A caracterização destes análogos segue o mesmo modelo das substâncias anteriores, e como representante, utilizou-se o análogo *p*-substituído com cloro, cujos dados de RMN encontram-se na tabela 3 a seguir.

Tabela 3- Dados de RMN (300 MHz, CDCl₃) da substância 50.

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-clorofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (50)

posição	¹³ C	¹ H	HMBC
1	42,7	2,60 (dd, <i>J</i> 4,8/16,3 Hz, 1H) 2,72 (dd, <i>J</i> 11,3/16,3 Hz, 1H)	43,4, 54,2, 128,4, 139,4, 196,8
2	43,4	3,66 (ddd, <i>J</i> 4,8/9,6/16,3 Hz, 1H)	128,4, 128,6
3	54,2	3,54 (d, <i>J</i> 9,6 Hz, 1H)	156,1
4	156,1		
5	128,4	6,07 (sl, 1H)	22,4
6	196,8		
3a	171,1		
3b	61,3	4,08 (q, <i>J</i> 7,1 Hz, 2H)	14,0, 171,1
3c	14,0	1,13 (t, <i>J</i> 7,1 Hz, 3H)	61,3
4a	22,4	2,00 (sl, 3H)	54,2, 128,4, 156,1
1'	139,4		
2'	129,0	7,33 a 7,29 (m, 2H)	133,2, 139,4
3'	128,6	7,20 a 7,15 (m, 2H)	43,4, 133,2, 129,0
4'	133,2		



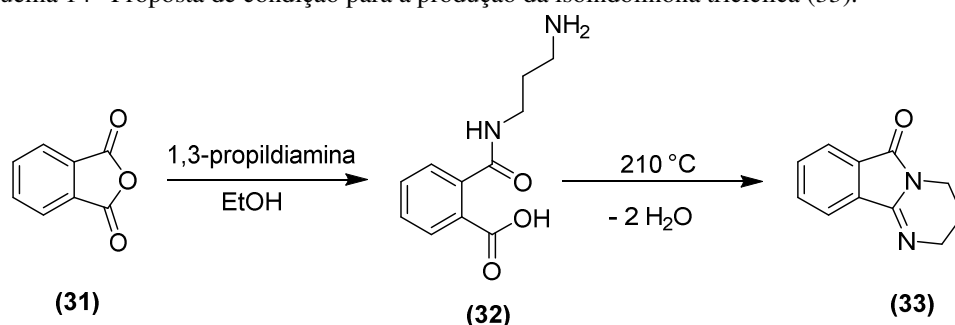
Quando o análogo *p*-cloro descarboxilado **50** foi comparado ao análogo hidroxilado **46**, notou-se a presença do hidrogênio (H-3) em 3,54 ppm se apresentando como duplete ($J= 9,6$ Hz), que foi atribuído à posição C-3. Sua única constante de acoplamento é encontrada no sinal referente ao hidrogênio (H-2) da posição C-2, que se apresenta como um duplo-duplo-duplete ($J=16,3 /9,6/4,8\text{Hz}$). Considerando que a constante de 9,6 Hz está em um intervalo referente a constantes de acoplamento diaxiais, é possível inferir que ambos os grupamentos ligados às posições C-2 e C-3 (fenil e carboxietil respectivamente) são antiplanares. No entanto, a confirmação absoluta da estereoquímica destas substâncias é de difícil atribuição devido as características morfológicas dos produtos, que se apresentam como óleos, impedindo o uso de técnicas como cristalografia de raio-X de monocristal.

As substâncias mono-descarboxiladas **48** (dimetoxi), **49** (trimetoxi), **53** (*m*-cloro), **54** (*m*-fluor), e **56** (*m*-nitro), não possuem descrição na literatura, sendo estas descritas pela primeira vez nesta tese. As que possuem relatos na literatura são: a substância *p*-metoxi **47**, que foi descrita por Horning e Field em 1946, e posteriormente por Kang e colaboradores, juntamente com a substância **51** *p*-bromo (HORNING; FIELD, 2002; KANG et al., 2017). As substâncias **50** (*p*-cloro), **55** (fenil) e **57** (*p*-nitro) foram descritas por Ramachary e colaboradores (RAMACHARY; RAMAKUMAR; NARAYANA, 2007), e a substância *p*-fluor **52** por Song e colaboradores (SONG et al., 2021).

3.3 ISOINDOLINONAS

Inicialmente, tentou-se reproduzir o experimento de obtenção da isoindolinona **33**, proposto por Gaozza e colaboradores (GAOZZA; GRINBERG; LAMDAN, 1972), como prova de conceito para a ciclização térmica de um sistema tricíclico partindo da condensação do anidrido ftálico e uma diamina, condição teste apresentada no esquema 14.

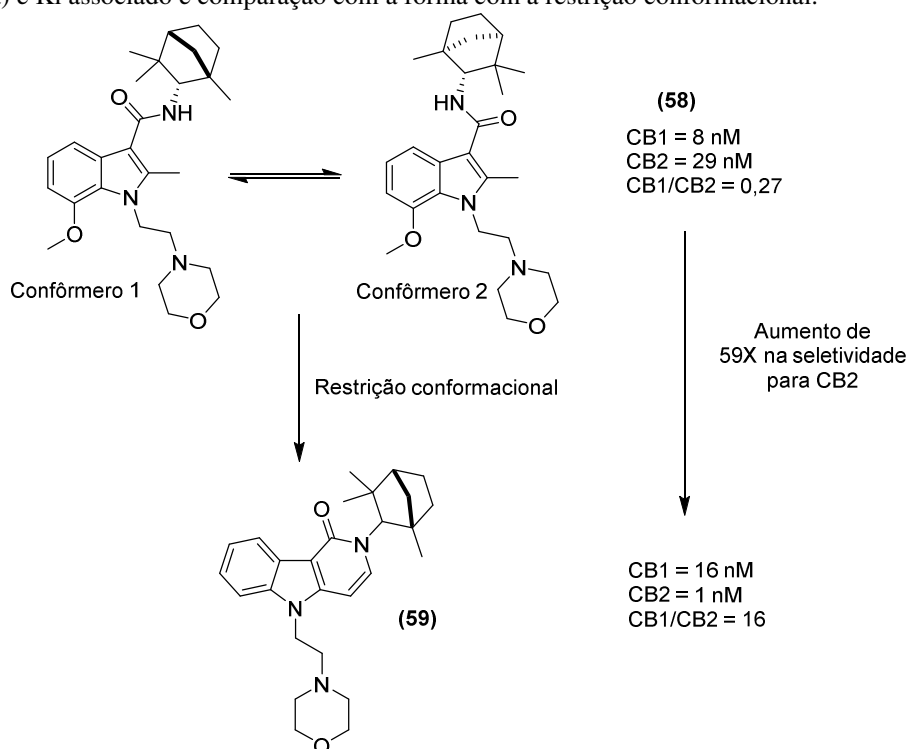
Esquema 14– Proposta de condição para a produção da isoindolinona tricíclica (**33**).



A produção de isoindolinonas tricíclicas visando a atividade canabinoide é reforçada pela hipótese defendida por Wroblewski e colaboradores (WROBLESKI et al., 2003). Esta hipótese infere que as estruturas de aminoalquilindóis utilizadas como agonistas canabinomiméticos (vide item 1.3.2), quando tornadas mais rígidas pelo fechamento de um novo anel entre o anel indólico e o espaçador carbonila, evitariam a formação de conformeros estáveis que possam interferir na seletividade entre os receptores CB1 e CB2.

O esquema 15 apresenta esta hipótese de forma gráfica, mostrando o impacto na seletividade quando a estrutura modelo é tornada mais rígida.

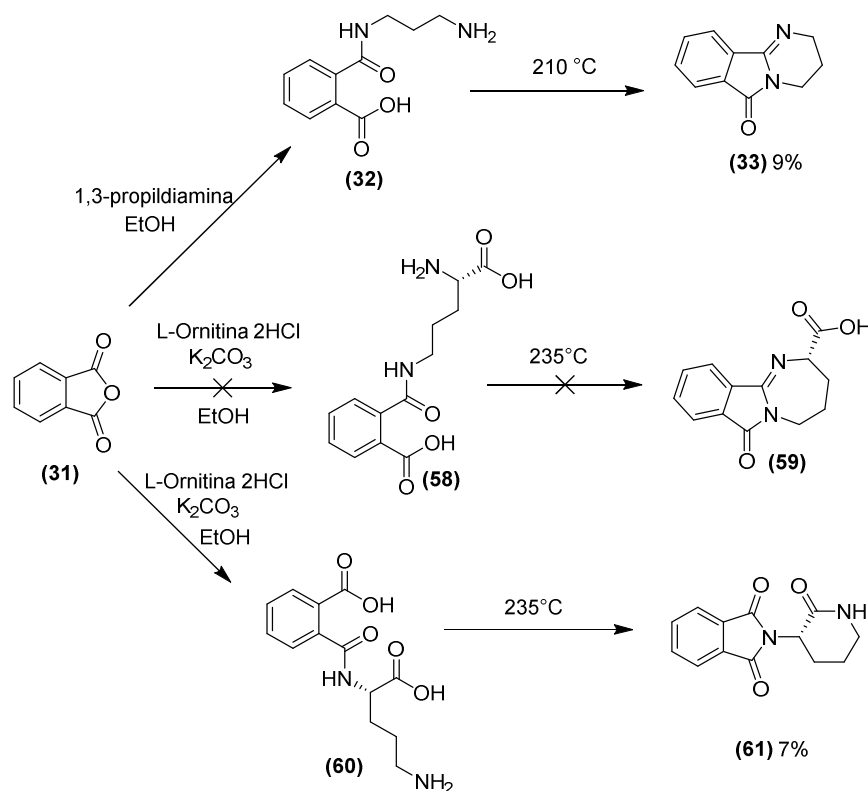
Esquema 15- Confômeros do substituinte aromático com a rotação em torno do grupamento espaçador (carbonila) e K_i associado e comparação com a forma com a restrição conformacional.



Fonte: adaptado de (WROBLESKI et al., 2003)

Quando esta estratégia foi empregada visando obter um sistema tricíclico contendo a isoindolinona fundida a um anel de sete membros (isoindolo-diazepina) utilizando a *L*-ornitina como diamina disponível, não foi possível a formação do produto desejado **62**. O produto encontrado consistia da formação da ftalimida ligada a uma lactama de 6 membros, semelhante a talidomida **64**, como visto no esquema 16.

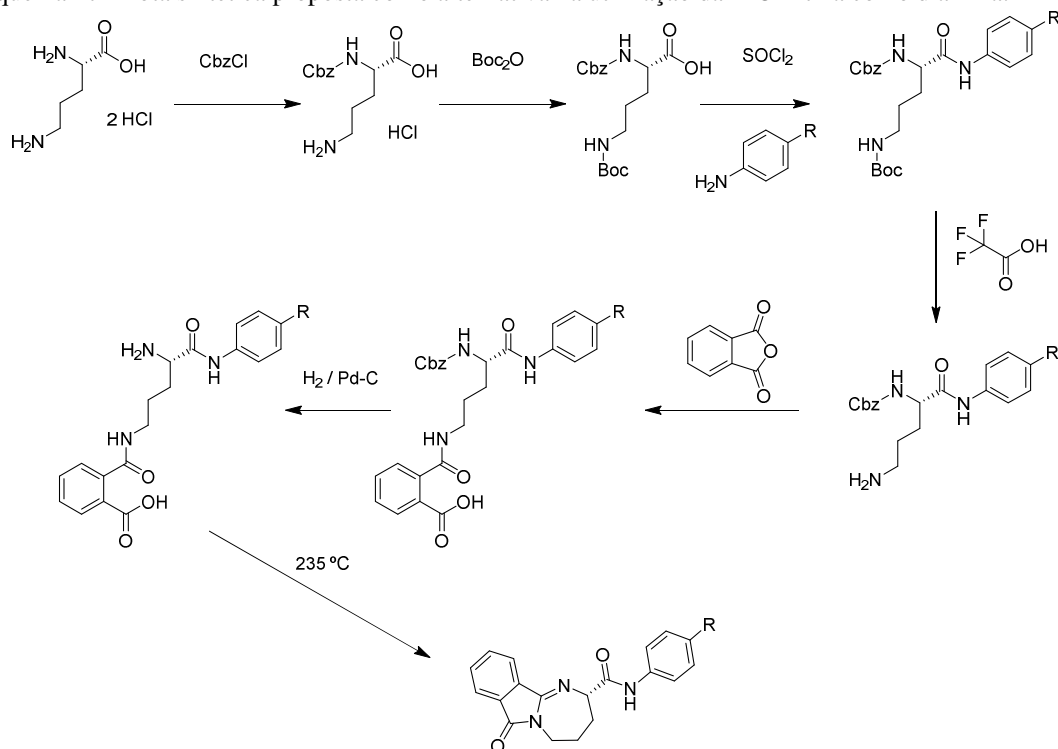
Esquema 16– Reações partindo do anidrido ftálico.



Assumiu-se que isso ocorreu devido a diferença do pKa entre os nitrogênios protonados da *L*-ornitina dicloridrato e o nitrogênio ligado ao carbono α do aminoácido, que possui pKa menor (8,65) em comparação ao nitrogênio ao final da cadeia lateral pKa 10,73. O nitrogênio de pKa menor sofre deprotonação mais rapidamente, quando exposto à base no meio reacional, conseguindo promover o ataque ao anidrido ftálico de forma mais eficaz, resultando no intermediário **60**. Este intermediário, por sua vez, quando exposto à temperatura necessária para a pirolise, formou o produto **61** com a eliminação de dois equivalentes de água.

Foi idealizada uma rota alternativa para a produção do análogo diazepina, que consistia na utilização de grupos protetores diferentes como Boc (*t*-butiloxicarbonila) e Cbz (Carboxibenzila) na diamina da *L*-ornitina, e desproteção seletiva dos nitrogênios, para induzir a quimiosseletividade da reação de condensação do anidrido ftálico.

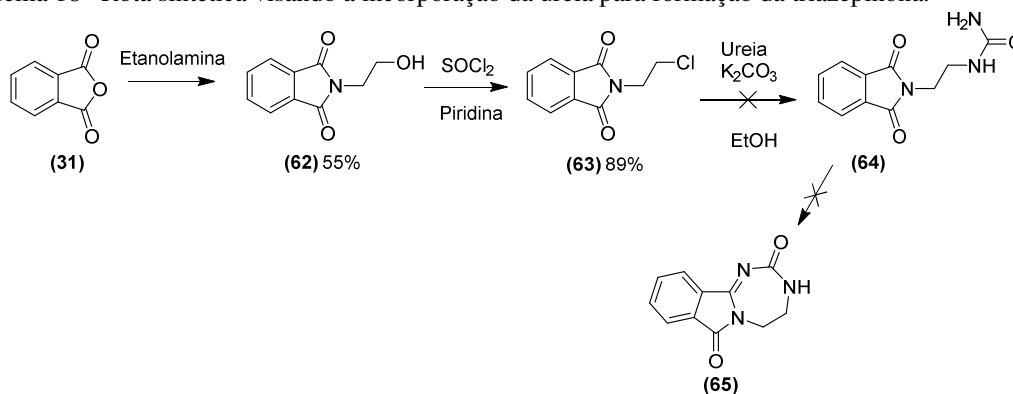
Esquema 17– Rota sintética proposta como alternativa na utilização da L-Ornitina como diamina.



Contudo, devido à falta de alguns reagentes e disponibilidade de tempo para a realização das reações propostas, esta rota sintética foi elencada para projetos futuros.

Ainda utilizando o anidrido ftálico como material de partida para a obtenção de isoindolinonas, foi proposta a formação de uma diamina utilizando ureia (esquema 18). No entanto, a incorporação na ureia na estrutura não ocorreu devido à baixa eficiência do nitrogênio da ureia em realizar um ataque nucleofílico no metileno ligado ao cloro do intermediário **63**.

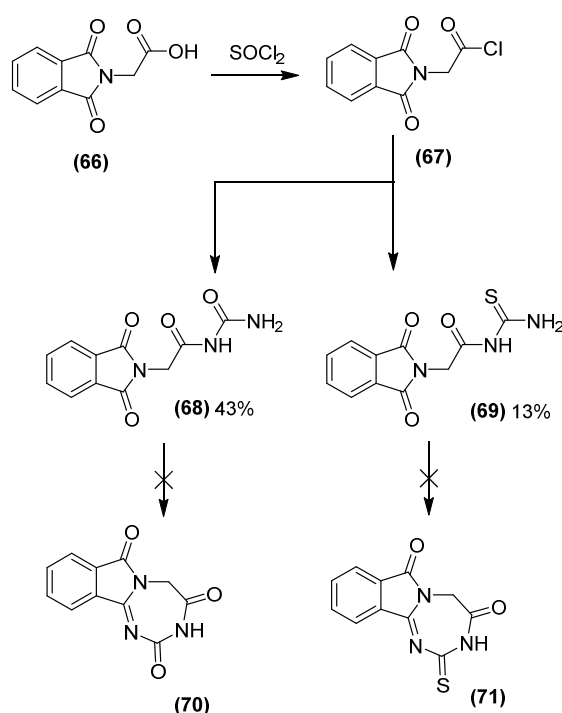
Esquema 18– Rota sintética visando a incorporação da ureia para formação da triazepinona.



Fonte: o autor

Outra alternativa testada foi a formação do cloreto de ácido para facilitar a formação do condensado com a ureia (esquema 19). Neste caso foi utilizada a ftalil glicina (**66**), que foi convertida ao cloreto de ácido em refluxo com cloreto de tionila. O cloreto de ácido por fim não foi isolado, e foi submetido a reação posterior da condensação da ureia. A tioureia também foi utilizada no lugar da ureia devido a possibilidade de formação de um análogo de sete membros contendo enxofre e pela ampla disponibilidade no laboratório.

Esquema 19– Rota sintética visando a incorporação da ureia para formação da triazepinotriona.



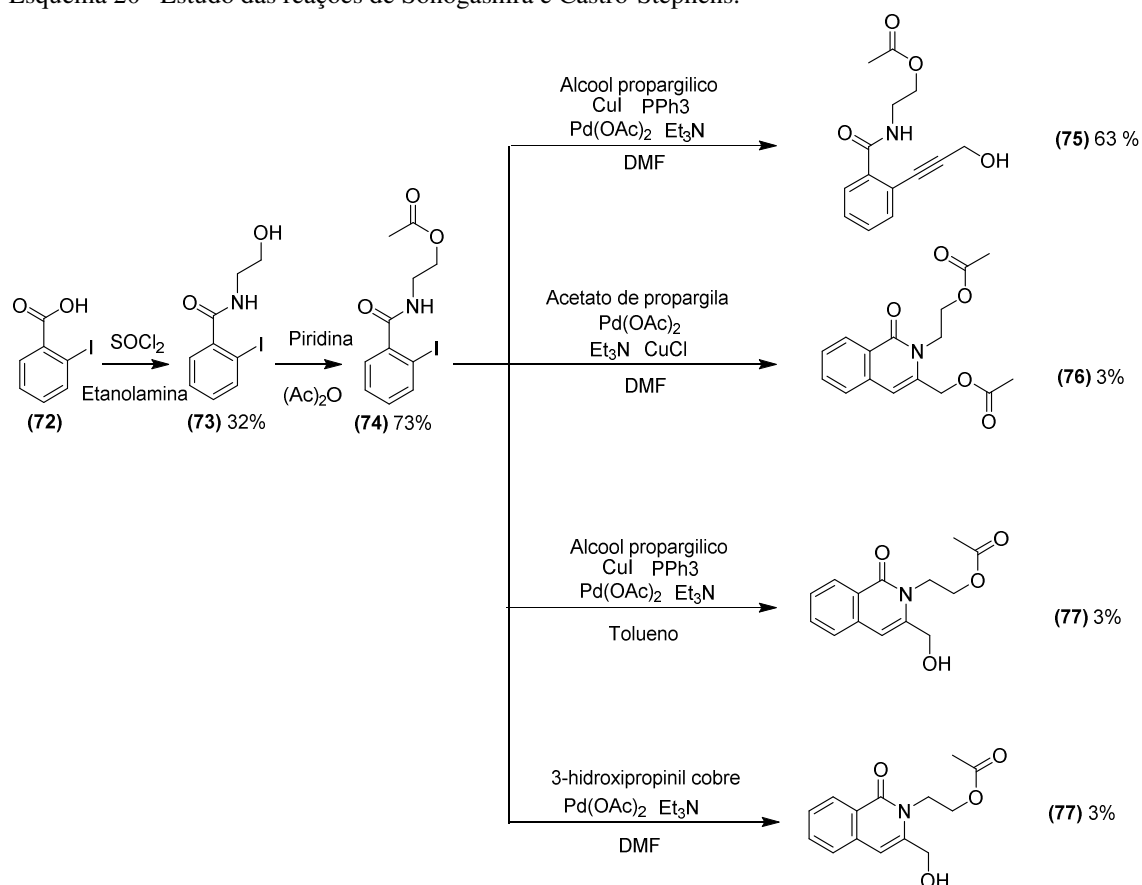
Devido às dificuldades encontradas na elaboração do sistema tricíclico, buscou-se uma abordagem que não fizesse uso do anidrido ftálico como material de partida e que pudesse disponibilizar uma ramificação na estrutura, compreendendo a geometria encontrada nos agonistas canabinóides sintéticos. Assim utilizou-se o ácido 2-iodobenzóico como material de partida de baixo custo para a reação de Sonogashira.

A reação de Sonogashira é utilizada para a formação de ligações sigma carbono-carbono entre um haleto de alquila ou arila e um alcino (KÜRTI; CZAKÓ,

2005). No caso do ácido 2-iodobenzóico, caso o ácido carboxílico não seja protegido na forma de éster, o produto formado será uma lactona de 6 membros; e no caso da utilização da 2-iodobenzamida, os produtos formados podem ser tanto a isoquinolinona quanto a isoindolinona, dependendo das condições reacionais. No esquema 20 demonstra-se a utilização da reação de Sonogashira.

Na literatura encontra-se a evidência de que grupamentos com hidrogênios ácidos na porção da molécula referente ao haleto impactam na obtenção do produto e os rendimentos tendem a ser baixos, portanto, foi realizada a proteção da hidroxila no intermediário **73** com um grupamento acetato.

Esquema 20– Estudo das reações de Sonogashira e Castro-Stephens.



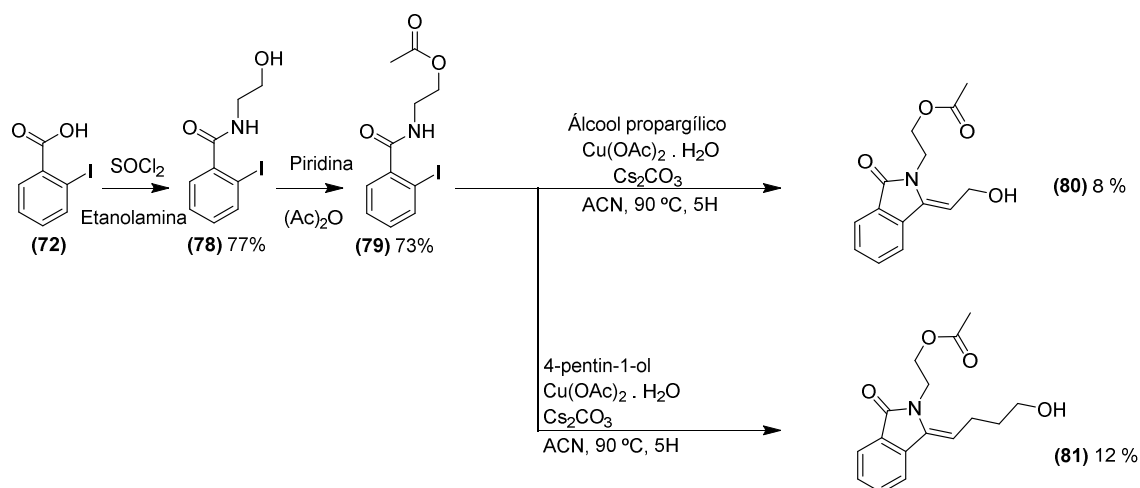
Como a reação de Sonogashira consiste primeiramente na formação *in situ* do acetileto metálico com o cobre (I) para a posterior transmetalção com o complexo de paládio, aproximando as duas partes da molécula (esquema 6), tentou-se utilizar o acetileto metálico preparado previamente para formar a substância **77**, fazendo com que o cobre desempenhe tanto a função para a formação do acetileto como para o acoplamento

cruzado (o que caracteriza esta reação como Castro-Stephens). Todavia, em todas as condições dispostas no esquema 20, não foi obtida a isoindolinona, somente a isoquinolinona.

Percebendo esta tendência para a formação preferencial das isoquinolinonas, propôs-se a otimização das condições da reação retirando o paládio e trietilamina do meio reacional. Seguindo as metodologias encontradas na literatura (CHARY et al., 2014; LIU et al., 2019), determinou-se que o carbonato de céσιο seria uma base adequada, juntamente com o acetato de cobre (II) monohidratado que é o metal de transição capaz de proporcionar o acoplamento cruzado. A acetonitrila foi utilizada como solvente por facilitar a precipitação de resíduos de cobre e carbonato de céσιο após o término da reação, simplificando assim o isolamento.

Contudo, o resultado obtido novamente não foi o esperado, sendo que desta vez foi possível observar a formação da isoindolinona **80** (esquema 21). O mesmo processo foi repetido para produzir a substância **81** em escalas maiores, apesar do baixo rendimento (12 %).

Esquema 21– Obtenção das isoindolinonas 84 e 85.

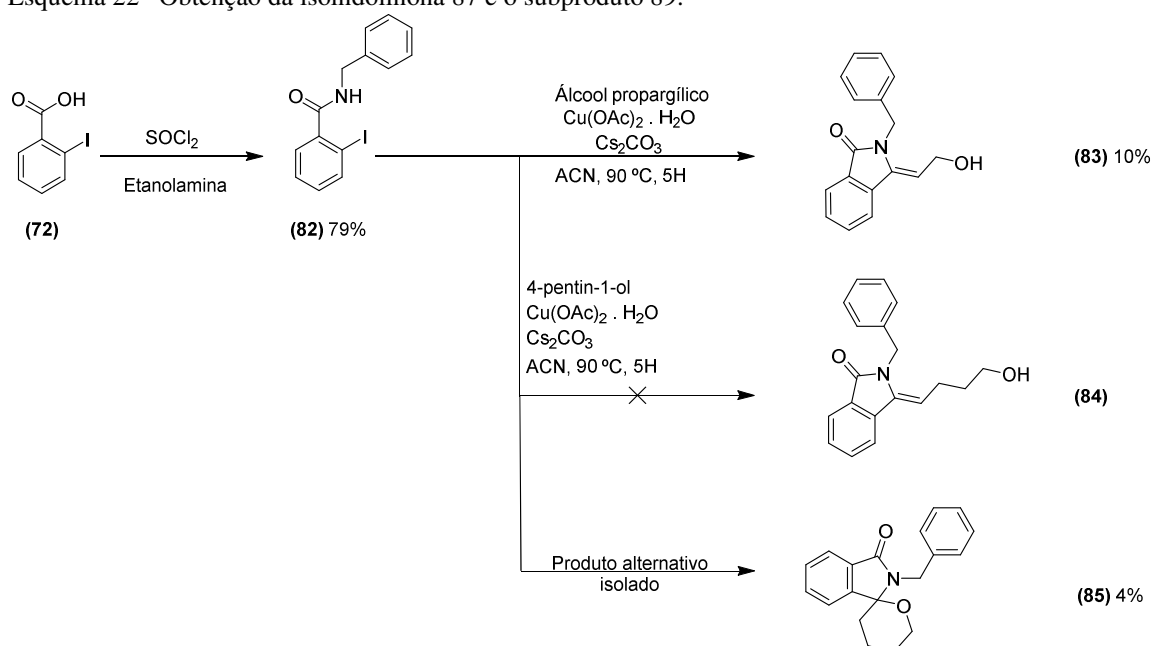


Posteriormente, foi utilizada a mesma estratégia para a produção dos análogos vistos no esquema 22, onde foi substituída a etanolamina pela benzilamina. Inicialmente as reações de formação da isoindolinona (partindo da benzamida **82**) não resultaram na formação dos produtos desejados, e pela avaliação das reações anteriores percebeu-se que o intermediário **79** tinha uma leve contaminação de piridina, perceptível principalmente pelo odor característico.

Quando a piridina foi adicionada em quantidades catalíticas (0,01 equiv.) ao meio reacional e o produto **83** foi obtido em um rendimento de 10%. Já o análogo **84** não foi obtido como descrito no esquema 22; e neste caso o produto majoritário isolado **85** foi resultado de uma ciclização do álcool da cadeia lateral, formando um tetrahidropirano fundido a isoindolinona por um carbono spiro.

Reações adicionais para a obtenção de maior variabilidade estrutural dos análogos não puderam ser realizadas devido à falta de tempo hábil para realizar as reações, o isolamento e a caracterização dos produtos.

Esquema 22– Obtenção da isoindolinona 87 e o subproduto 89.

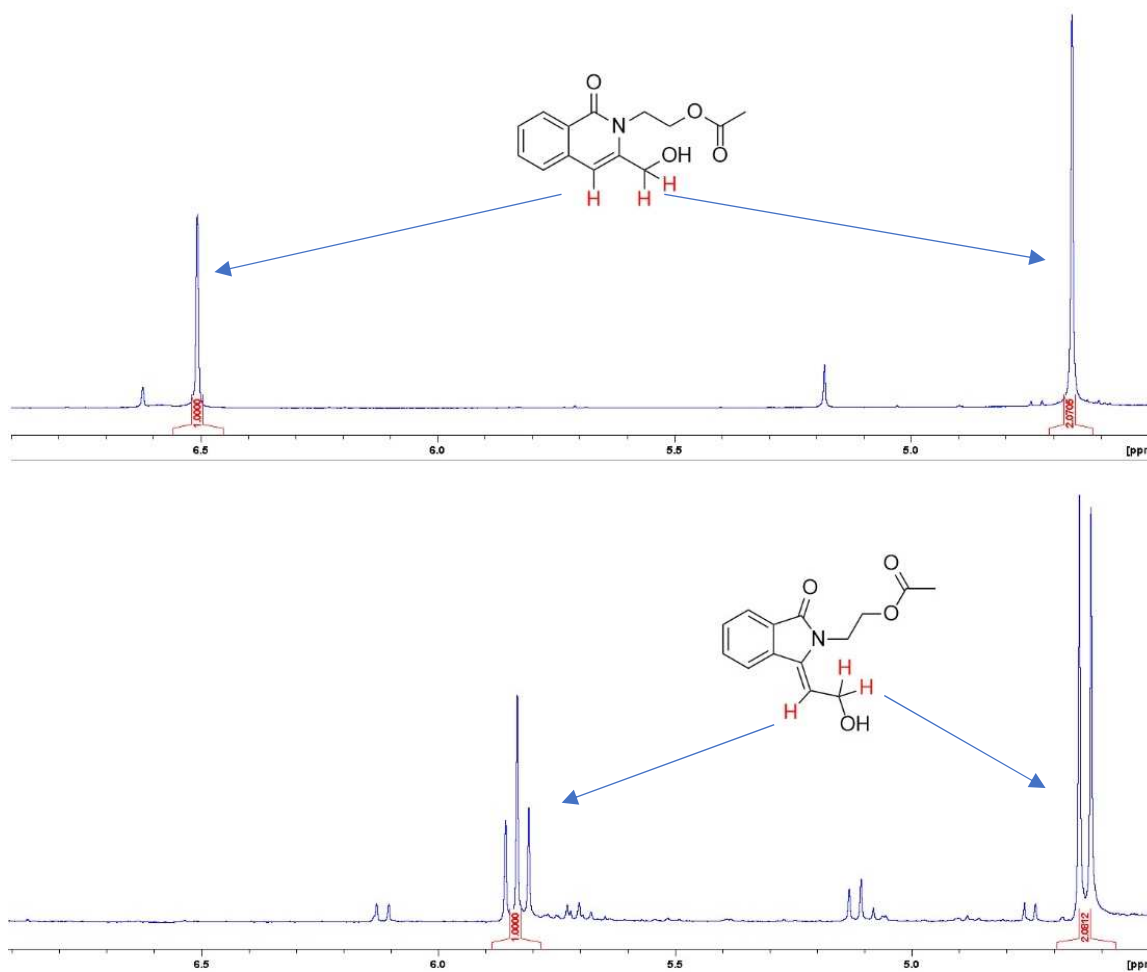


Pela comparação destas reações foi possível compreender que a presença de sais ou complexos de paládio (II) tende a orientar a formação de um anel de seis membros (isoquinolinonas), e quando sais de cobre (II) são utilizados nas condições apresentadas, é observada a formação preferencial do anel de cinco membros (isoindolinonas).

A diferenciação dos dois sistemas (isoquinolinona e isoindolinona) foi feita por RMN (figura 21). Ambos conjuntos de sinais diagnósticos no espectro de hidrogênio são referentes a condensação do álcool propargílico, que no caso da isoquinolinona aparecem como um simpleto em 6,50 ppm (H-4, 1H) referente ao hidrogênio da dupla ligação endocíclica e outro simpleto em 4,66 ppm (H-9, 2H) referente ao metileno.

Já no caso da isoindolinona, o sinal referente ao hidrogênio da dupla exocíclica se localiza em 5,83 ppm (H-8, 1H) e é apresentado como um tripleto ($J = 7,4$ Hz), que acopla como duplete referente ao metileno em 4,63 ppm (H-9, 2H) ($J = 7,4$ Hz).

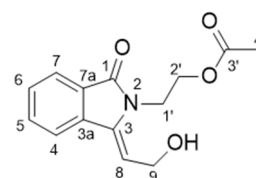
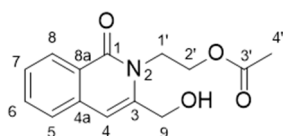
Figura 21– Comparação dos sinais diagnósticos utilizados para a diferenciação entre as isoquinolinonas e as isoindolinonas.



A comparação completa das duas substâncias encontra-se na tabela 4, que descreve os sinais de RMN de hidrogênio, carbono e as correlações vistas nos mapas de correlação HMBC e HSQC, representando os sinais diagnósticos em vermelho. Os demais derivados produzidos com o substituinte benzílico pelo acoplamento com o 5-pentanol foram elucidados da mesma forma, seguindo a mesma lógica de elucidação estrutural.

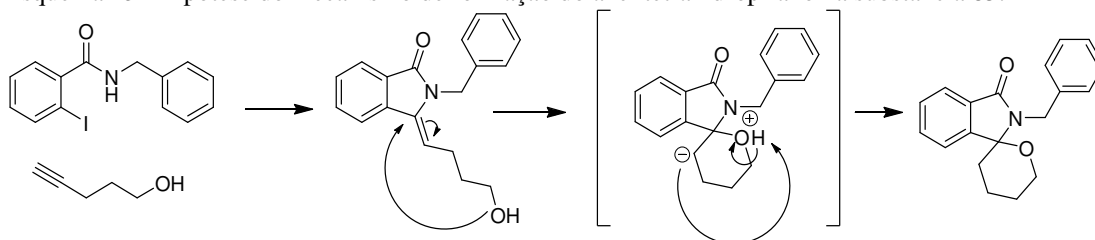
Tabela 4– Tabela contendo os sinais de RMN das substâncias 81 e 84 com os sinais diagnósticos realçados em vermelho.

2-(3-(hidroximetil)-1-oxoisoquinolin-2(1H)-il)etil acetato (77)				(Z)-2-(3-(2-hidroxiethylideno)-isoindolin-1-ona)-etil acetato (80)			
POSIÇÃO	¹³ C	¹ H	HMBC	POSIÇÃO	¹³ C	¹ H	HMBC
1	163,4			1	168,4		
3	141,3			3	137,8		
4	107,3	6,50 (s, 1H)	62,1 / 125,0 / 141,3	4	119,3	7,59 (ddd, <i>J</i> 7,7/1,0/0,9 Hz, 1H)	127,8 / 135,2
5	127,1	7,41 (dd, <i>J</i> 7,2/1,3 Hz, 1H)	107,3 / 125,0 / 127,6	5	132,2	7,53 (ddd, <i>J</i> 7,7/7,2/1,1 Hz, 1H)	123,1 / 137,8
6	132,6	7,56 (ddd, <i>J</i> 8,2/8,1/1,4 Hz, 1H)	127,1 / 136,4	6	129,1	7,42 (ddd, <i>J</i> 7,5/7,2/1,1 Hz, 1H)	119,3 / 127,8
7	127,7	8,27 (m, 1H)	132,6 / 136,4 / 163,4	7	123,1	7,77 (ddd, <i>J</i> 7,5/0,9/0,8 Hz, 1H)	132,2 / 137,8 / 168,4
8	126,1	7,37 (m, 1H)	107,3 / 125,0 / 127,6 / 136,4	8	105,9	5,83 (t, <i>J</i> 7,4 Hz, 1H)	135,2 / 137,8
9	62,6	4,66 (s, 2H)	107,3 / 141,3	9	56,8	4,63 (d, <i>J</i> 7,4 Hz, 2H)	105,9 / 135,2
4a	136,4			3a	135,2		
8a	125,0			7a	127,8		
1'	42,6	4,41 (m, 2H)	62,6 / 141,3 / 163,4	1'	40,2	4,19 (m, 2H)	61,9 / 135,2 / 168,4
2'	62,1	4,36 (m, 2H)	42,6 / 171,0	2'	61,9	4,28 (m, 2H)	40,2 / 170,9
3'	171,0			3'	170,9		
4'	20,9	1,98(s, 3H)	171,0	4'	20,6	1,99 (s, 3H)	170,9



Os dados de caracterização referente as substâncias **81** e **83** estão apresentados na seção experimental com a devida descrição dos sinais de RMN e massas de alta resolução. No caso da substância **85**, a sua formação pode ser explicada pela reação intramolecular de ataque nucleofílico da hidroxila ao final da cadeia lateral no primeiro carbono da dupla ligação exocíclica obtida da formação da isoindolinona, com a posterior transferência prototrópica [1,4] para satisfazer a valência do carbono do metileno recém-formado.

Esquema 23– Hipótese do mecanismo de formação do anel tetrahidropirano na substância 85.



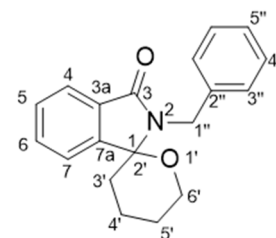
O sinal diagnóstico mais claro observado é o metileno (H-1'') proveniente da benzilamina. Neste sistema ele se apresenta como dupletos em 5,05 (H-1''a) e 4,53 (H-1''b) ppm, com constante geminal de 16,5 Hz. Isto se deve ao impedimento estérico causado pelo anel tetrahidropirano, que ao assumir a configuração não-coplanar, impede o giro livre do grupamento benzil. A correlação de longa distância (HMBC) deste sinal de hidrogênio (H-1'') com os sinais de carbono quaternário em 167,5 e 90,0 ppm referentes respectivamente à carbonila da isoindolinona (C-3) e ao carbono spiro (C-1 / 2'), confirmam a entre a posição 1'' do radical benzil e as posições 3 e 1 / 2' da isoindolinona.

Os dados de RMN que levaram a elucidação da estrutura estão compreendidos na tabela 5, a seguir.

Tabela 55– Tabela contendo os sinais de RMN da substância 85.

2-benzil-3',4',5',6'-tetrahidrospiro[isoindolin-1,2'-piran]-3-ona (85)

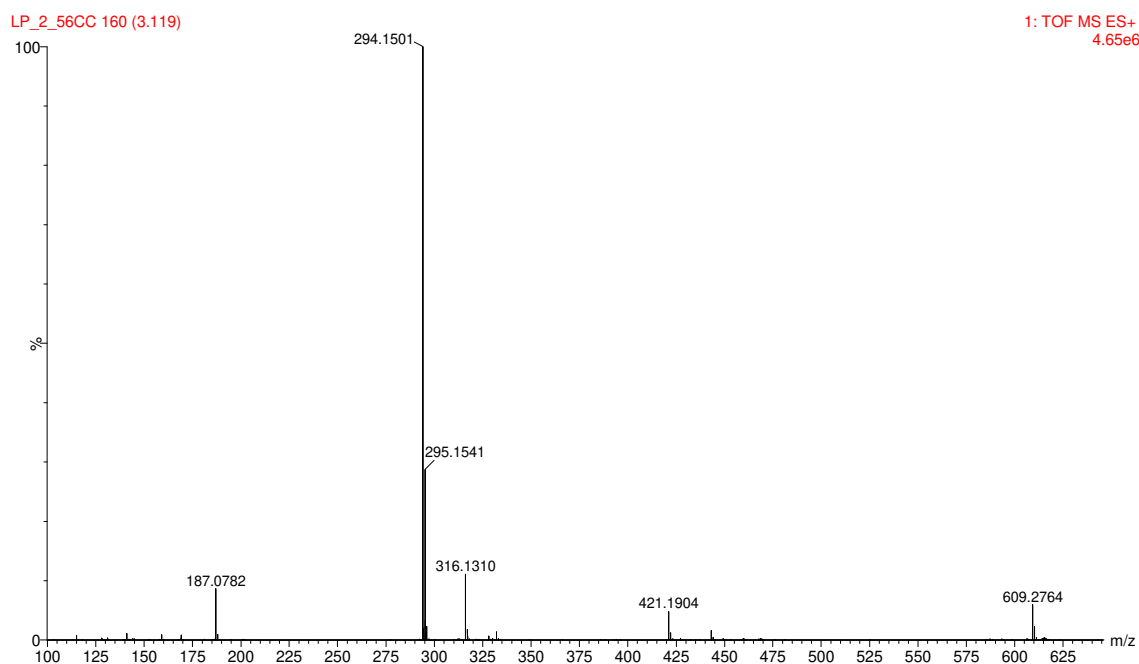
POSIÇÃO	¹³ C	¹ H	HMBC
1 / 2'	90,0		
3	167,5		
4	124,2	7,92 (ddd, <i>J</i> 4,8/4,6/0,6 Hz, 1H)	123,3 / 131,4 / 146,4 / 167,5
5	129,3	7,54 (m, 1H)	129,3 / 131,3 / 146,4
6	131,4	7,55 (m, 1H)	131,4 / 131,3 / 146,4
7	123,3	7,85 (m, 1H)	90,0 / 129,3 / 146,4 / 167,5
3a	131,3		
7a	146,4		
3'	32,0	2,00 (dd, <i>J</i> 13,2/4,2 Hz, 1H)	24,6 / 90,0 / 146,4
		1,66 (dd, <i>J</i> 8,0/4,2 Hz, 1H)	20,1 / 24,6 / 90,0 / 146,4
4'	20,1	2,14 (m, 1H)	32,0 / 64,6
		1,90 (m, 1H)	32,0 / 90,0 / 146,4
5'	24,6	1,76 (m, 1H)	20,1 / 32,0 / 64,6 /
6'	64,6	4,13 (dd, <i>J</i> 15,0/12,1 Hz, 1H)	20,2 / 90,0
		4,01 (m, 1H)	20,2 / 24,6 / 90,0
1''	42,3	5,05 (d, <i>J</i> 16,1 Hz, 1H)	90,0 / 126,9 / 127,3 / 138,9 /
		4,53 (d, <i>J</i> 16,1 Hz, 1H)	167,5
2''	138,9		
3''	127,3	7,36 (d, <i>J</i> 7,5 Hz, 2H)	42,3 / 126,9
4''	128,9	7,30 (ddd, <i>J</i> 7,5/7,1/1,2 Hz, 2H)	138,9
5''	126,9	7,23 (d, <i>J</i> 7,12 Hz, 1H)	127,3 / 42,3



De forma complementar, a análise de massas de alta resolução da substância **85** (representada no espectro da figura 21), demonstra os adutos com sódio e o fragmento utilizado para propor uma rota de fragmentação (esquema 24). A maior massa é referente ao pico $[2M+Na]^+$ com um valor prático de m/z 609,2764, posteriormente, com somente uma unidade da molécula e continuando com o aduto de sódio $[M+Na]^+$, foi observado o

pico de m/z 316,1310. Já o íon molecular protonado $[M+H]^+$ foi observado com o valor de m/z 294,1501. Finalmente o único fragmento obtido na fonte foi observado com valor de m/z 187,0782.

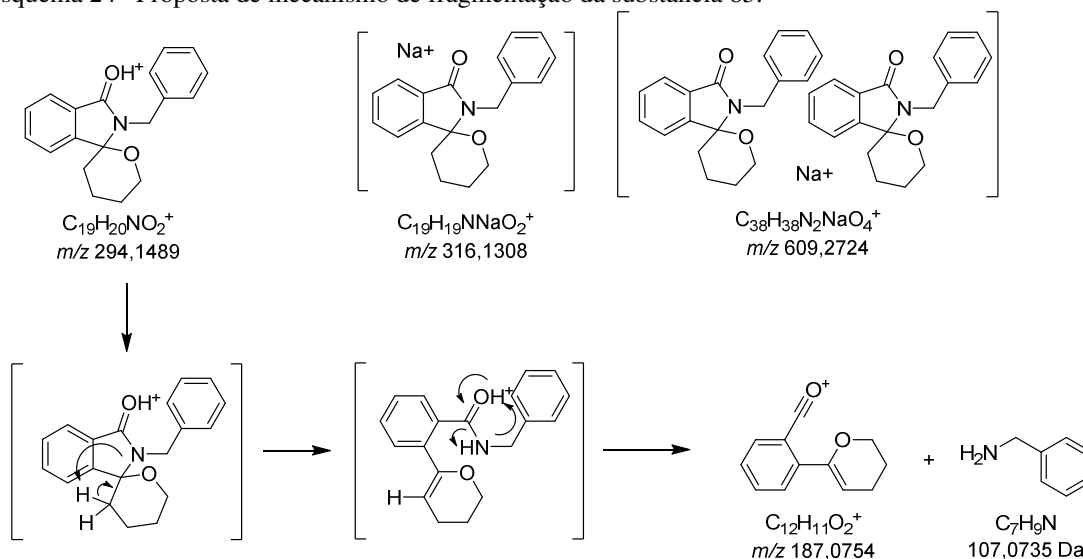
Figura 22– Espectro de massas de alta resolução da substância 85.



No esquema 24 abaixo, é demonstrada a interpretação dos picos de massa obtidos no espectro da figura 22. A proposta de fragmentação se inicia pelo pico $[M+H]^+$ m/z 294,1489, sendo proposto um rearranjo prototrópico [1,4], que dá origem a uma dupla ligação no anel tetrahidropirano e abre a isoindolinona; seguido de mais um rearranjo prototrópico [1,4] com o nitrogênio suprimindo a carbonila da amida protonada pelo hidrogênio, que resulta na quebra da ligação da amida com uma perda neutra de benzilamina e a formação de um cátion oxonium de m/z 187,0754.

Verificando a literatura científica, as substâncias **76**, **77**, **80**, **81**, **83** e **85** descritas nesta sessão desta tese não possuem relatos prévios, sendo consideradas inéditas.

Esquema 24– Proposta de mecanismo de fragmentação da substância 85.



3.4 ANCORAMENTO MOLECULAR

3.4.1 VALIDAÇÃO DO MODELO

Para determinar a validade de um modelo de ancoramento molecular, o mesmo precisa ter a habilidade de obter consistentemente a configuração do complexo entre a proteína e o ligante, que em sua pose de menor energia, se aproxima o máximo possível da geometria do ligante obtido por cristalografia de raio-x. E essa habilidade é avaliada estatisticamente pelo valor de *residual mean square deviation* (RMSD), que compara átomo a átomo da posição relativa entre o ligante ancorado e o ligante de referência.

Neste processo de validação foram utilizadas as estruturas tridimensionais dos dois receptores canabinoides, o CB1 (obtido pelo código do *Protein data Bank* PDB: 5XRA) (HUA et al., 2017) e o CB2 (obtido pelo código do *Protein data Bank* PDB: 6PT0) (XING et al., 2020), dos sítios de ligação identificados pela presença de uma agonista em cada estrutura observado em complexo, estes agonistas foram extraídos, juntamente com todas as moléculas de água. No caso de CB1, o ligante utilizado foi o AM11542 e no caso de CB2, o ligante foi o WIN 55,212-2. Ambos, além de serem extraídos, tiveram a sua geometria otimizada da mesma forma que os ligantes teste; e para avaliar a função de busca do programa (função matemática que avalia a energia do complexo formado para

a determinação do mínimo local ou global no gradiente energético), comparou-se o RMSD de ambas formas.

A tabela 6 a seguir, demonstra os valores de ranqueamento obtido pela função de *scoring* (função matemática que atribui um valor arbitrário, utilizado para a comparação dos complexos, baseado nos tipos de interação observadas), e o valor de RMSD da geometria obtida pelo ancoramento, comparada à geometria do ligante nativo. Vale salientar que valores de RMSD abaixo do limiar de 2,0 Å são aceitáveis pois não apresentam desvio considerável da pose de referência.

Tabela 6– Tabela dos scores obtidos e do valor de RMSD em relação a pose do complexo cristalográfico.

VALIDAÇÃO CB1 (5XRA)	GOLDScore	RMSD (Å)
AM-11542 Nativo	81,3976	0,3633
AM-11542 CALC	86,5119	0,7943
VALIDAÇÃO CB2 (6PT0)	GOLDScore	RMSD
CB2-WIN55,212-2 Nativo	67,3174	0,8397
CB2-WIN55,212-2 CALC	67,9525	0,747

O valor da função de *scoring* Goldscore é obtido através do resultado da utilização da função de busca *Piecewise Linear Potential* (PLP) (PEARLMAN; CHARIFSON, 1999), a qual avalia a característica dos átomos tanto do sítio de ligação quanto do ligante, e são descritos em 5 categorias: doador, aceptor, doador/aceptor, apolar e metal. Através de uma matriz, a combinação destas cinco categorias resulta em 5 tipos de interação: repulsiva, ligação de hidrogênio, enterrada, apolar, e metálica respectivamente, e dependendo da proximidade e do tipo de interação, a força de repulsão ou atração pode ser calculada de acordo com os dados empíricos obtidos, submetidos à equação 1 abaixo, onde:

$$fitness_{PLP} = -(w_{PLP} \cdot f_{PLP} + w_{lig-clash} \cdot f_{lig-clash} + w_{lig-tors} \cdot f_{lig-tors} + f_{chem-cov} + w_{prot} \cdot f_{chem-prot} + w_{cons} \cdot f_{cons})$$

A função de *scoring* final é composta de quatro termos, obtidos a partir do complexo obtido pela otimização recursiva da função PLP descrita anteriormente:

- Energia da ligação de hidrogênio proteína-ligante (*external H-bond*)
- Energia da interação de van der Waals (vdW) proteína-ligante (*external vdW*)
- Energia de interação vdW interna do ligante (*internal vdW*)

- Energia da tensão torsional do ligante (*internal torsion*)

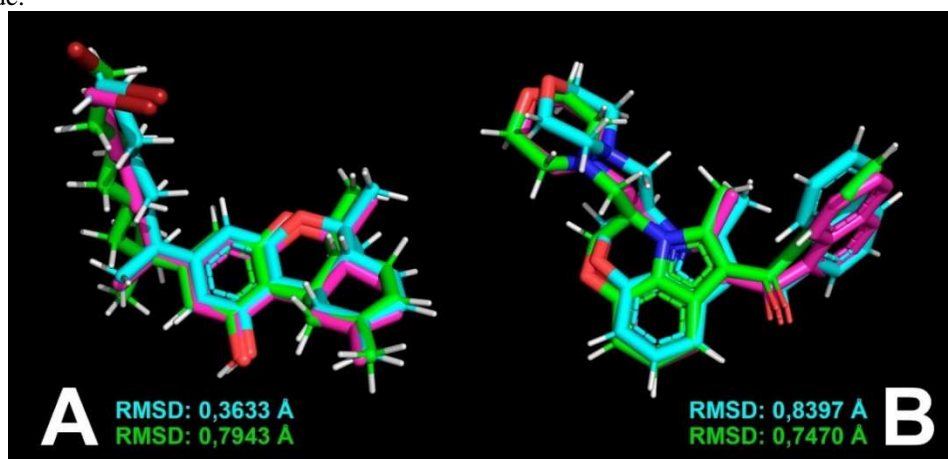
Estes valores obtidos são associados de acordo com a equação 2 abaixo, onde:

$$\text{Goldscore} = -([\text{external } h - \text{bond}] + ([\text{external } vdW] \cdot 1,375) + [\text{internal } vdW] + [\text{internal } torsion])$$

Neste caso, como os valores das energias calculadas para o complexo formado entre a proteína e o ligante são representados por ΔG , os valores resultantes são normalmente obtidos no módulo negativo. Após a correção e a somatória dos valores na equação, estes são convertidos para o módulo positivo. Portanto, o valor de Goldscore é diretamente proporcional à interação entre os dois componentes do complexo: quanto maior for o valor, maior a interação.

Na figura 23 abaixo, demonstra-se graficamente a sobreposição das poses obtidas pela função de busca, e apenas as poses com melhor RMSD foram consideradas. A representa o cálculo realizado em CB1 (5XRA) e B representa o cálculo realizado em CB2 (6PT0).

Figura 23– Sobreposição das poses de melhor RMSD obtidas no processo de validação do ancoramento molecular, A representa o ligante AM-11542 em CB1 e B representa o ligante WIN 55,212-2, em ambos os casos o ligante na pose nativa extraído é representado em magenta, o ligante nativo re-ancorado é representado em ciano, e o ligante com a geometria otimizada e posteriormente ancorado é representado na cor verde.



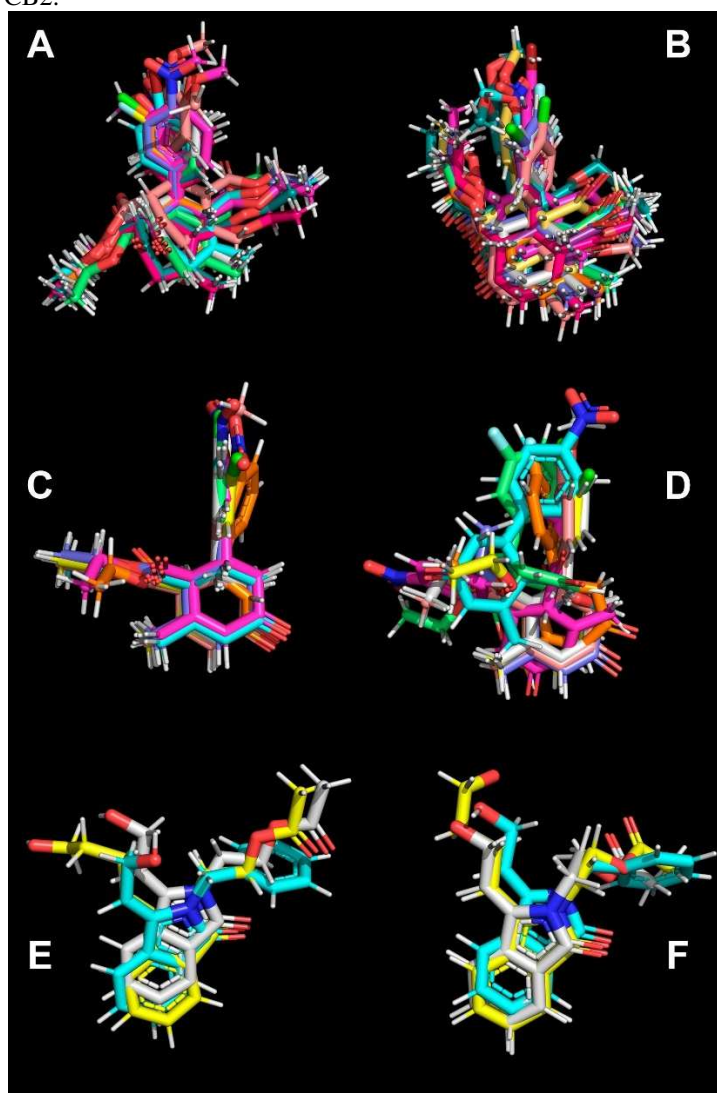
3.4.2 AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS

A partir da determinação de que os modelos de ancoramento foram considerados válidos, pois conseguiram obter a orientação preferencial dos ligantes nativos das estruturas cristalográficas, deu-se início à avaliação do posicionamento dos ligantes teste, que neste caso foram as ciclohexanonas, ciclohexenonas e isoindolinonas obtidas nesta tese, além de alguns agonistas e antagonistas seletivos utilizados para comparação da afinidade pelo sítio de ligação através do valor da função de *scoring* Goldscore.

As poses de cada substância foram selecionadas pela habilidade de assumir uma orientação preferencial global de cada uma das classes de substâncias, e descartou-se as poses que não se ajustavam de acordo com esta conformação preferencial ou que se distanciavam do sítio de ligação e das interações chave observadas.

As sobreposições de poses para a avaliação da orientação preferencial tanto para CB1 quanto para CB2 podem ser encontradas na figura 24 a seguir.

Figura 24– Sobreposição das poses dos ligantes teste A) Ciclohexanonas em CB1. B) Ciclohexanonas em CB2. C) Ciclohexanonas em CB1. D) Ciclohexanonas em CB2. E) Isoindolinonas em CB1. F) Isoindolinonas em CB2.



Notou-se que a conformação preferencial obtida foi muito mais consistente em CB1 do que CB2. Isto se deve a diferença de volume e geometria do sítio de ligação, sendo que CB1 tem um sítio de ligação com volume interno menor que CB2, o que causa as inconsistências vistas na figura 24 em B e D, sendo que em B as ciclohexanonas mantêm a mesma orientação. Entretanto, estas sofrem derivações graduais que resultam na mudança de posição dos ligantes no eixo y da figura 24. Já em D, alguns ligantes foram observados invertidos no sítio de ligação devido ao volume das ciclohexanonas ser menor que as ciclohexanonas, combinado ao maior volume do sítio de ligação, causando uma derivação do posicionamento. Este efeito não foi observado quando as isoindolinonas foram avaliadas, não havendo diferenças significativas na orientação preferencial das poses selecionadas.

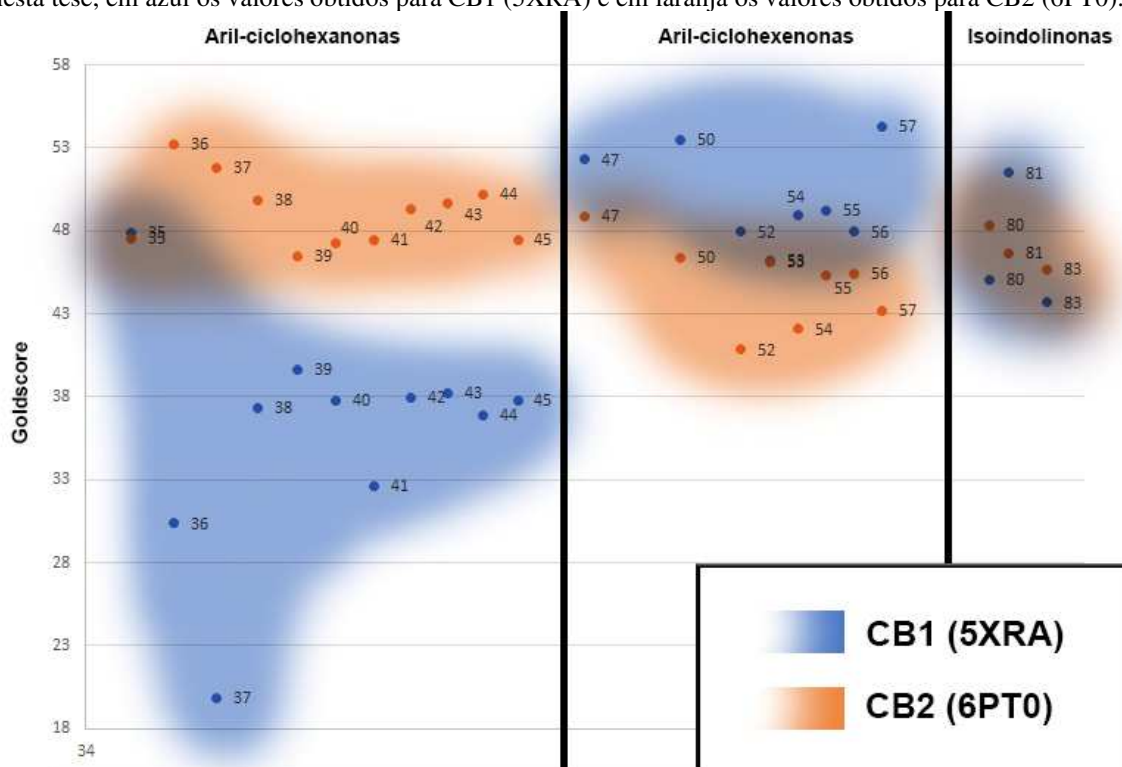
Foram aferidos os valores da função de pontuação goldscore de cada pose e estes valores encontram-se na tabela 7. Este procedimento foi realizado para que fosse possível determinar qual das substâncias de cada classe possuía uma afinidade maior ao sítio de ligação para que as distancias das possíveis interações com os resíduos de aminoácidos de interesse fossem medidas.

Tabela 7– Tabela dos scores (Goldscore) obtidos para cada um dos ligantes avaliados em CB1 (5XRA) e CB2 (6PT0).

Aril-ciclohexanonas			Aril-ciclohexenonas			Isoindolinonas		
Subst.	Score CB1	Score CB2	Subst.	Score CB1	Score CB2	Subst.	Score CB1	Score CB2
35	47,8846	47,5239	47	52,2945	48,8465	80	45,0589	48,3516
36	30,3665	53,2222	50	53,4908	46,4159	81	51,4947	46,6443
37	19,8544	51,8415	52	47,9526	40,8348	83	43,6755	45,6736
38	37,3562	49,8454	53	46,1788	46,1091			
39	39,6074	46,4942	54	48,9355	42,0753			
40	37,7981	47,2570	55	49,2190	45,3371			
41	32,6428	47,4268	56	47,9420	45,4432			
42	37,9784	49,3443	57	54,2903	43,2148			
43	38,2220	49,6771						
44	36,8802	50,2093						
45	37,7824	47,4898						

A representação gráfica dos valores na tabela 7, facilita a visualização tanto da escala em que a afinidade é apresentada e a separação das classes de substâncias pela afinidade em CB1 versus CB2. Na figura 24 é possível visualizar estes parâmetros.

Figura 25– Gráfico apresentando os valores da função de scoring goldscore para as substâncias produzidas nesta tese, em azul os valores obtidos para CB1 (5XRA) e em laranja os valores obtidos para CB2 (6PT0).



Analisando a tabela 7 e a figura 25, observa-se que os valores obtidos em sua grande maioria não se distanciam muito da média geral dos pontos ($44,9 \pm 6,7$). No entanto, o grau de separação entre os pontos relativos à cada substância indica a seletividade. É possível observar nas zonas de influência do gráfico da figura 25 que as aril-ciclohexanonas possuem uma afinidade maior com CB2 do que CB1, sendo a substância **37** a que demonstra maior seletividade ($CB2-CB1 = 31,98$) devido ao grau de separação entre os valores no eixo y.

Apesar de não obter um grau de separação tão grande comparado com as aril-ciclohexanonas, as aril-ciclohexenonas mostraram uma tendência inversa de agrupamento dos pontos, mostrando maior afinidade com o receptor CB1, sendo a substância **55** a substância que demonstra maior afinidade no geral, e melhor seletividade para CB1, o que pode ser proveitoso em modelos de dor neuropática, devido a correlação do controle da sinalização da dor por CB1.

As isoindolinonas, apesar de apresentarem afinidade alta com os sítios de ligação em comparação com os outros ligantes, não demonstraram o mesmo perfil de diferenciação da afinidade entre os receptores CB1 e CB2. A explicação mais provável para esse fenômeno se deve ao volume dos dois grupos de substâncias e a compatibilidade

espacial com o volume do sítio de ligação, sendo o sítio de ligação em CB2 maior que CB1 e o volume molecular das aril-ciclohexanonas maior que as aril-ciclohexenonas. Portanto, as aril-ciclohexanonas são mais compatíveis com o volume do sítio de ligação em CB2 e as aril-ciclohexenonas mais compatíveis com o volume do sítio de ligação em CB1.

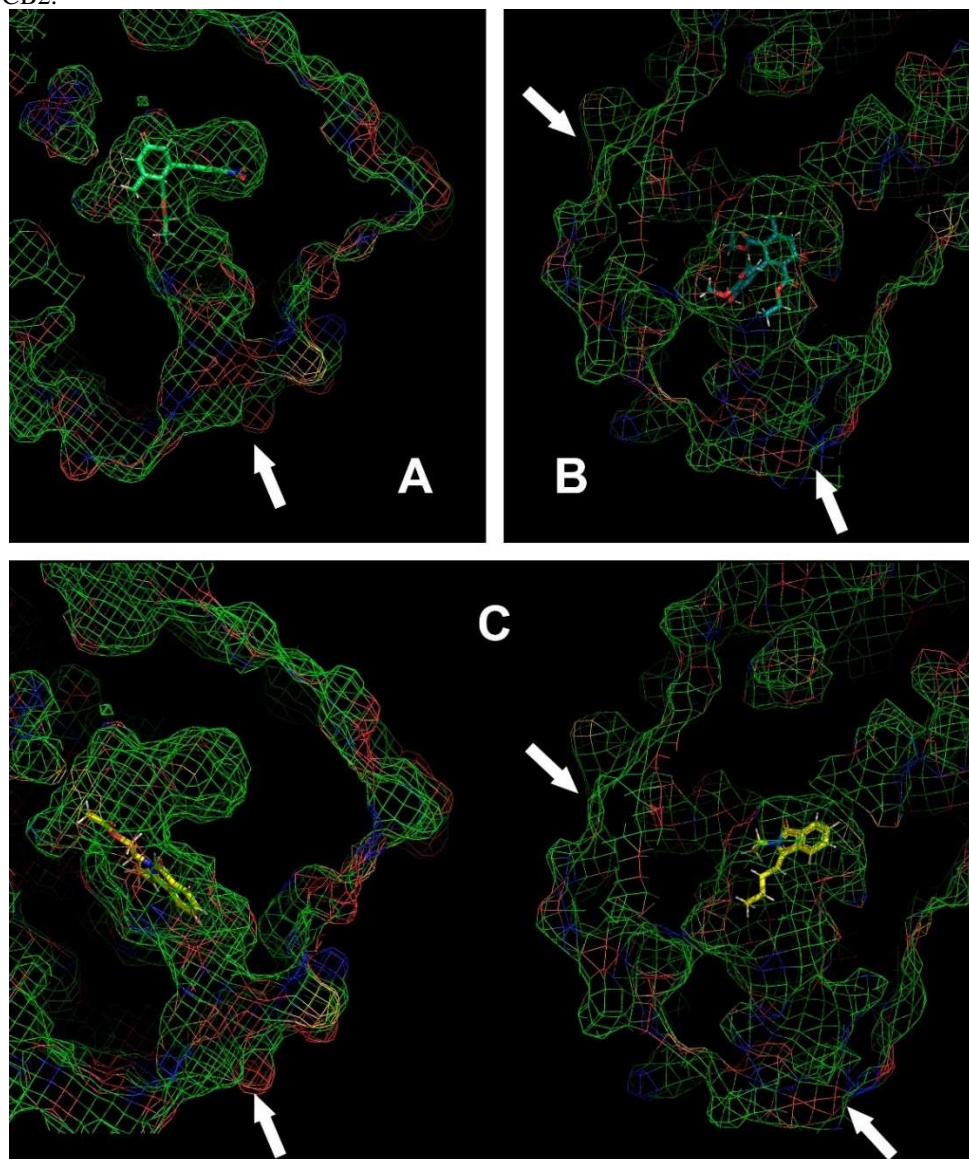
No caso das isoindolinonas, o número elevado de ligações rotacionáveis faz com que elas se adaptem bem a ambos sítios de ligação e o volume molecular menor reduziu a chance do impedimento espacial causado nas aril-ciclohexanonas.

Foram escolhidas as substâncias **37**, **57** e **81** para o detalhamento das interações com o sítio de ligação, e na figura 26 é possível observar o posicionamento destas substâncias nos receptores, visto que devido à seletividade das substâncias **37** e **57** somente estas serão apresentadas nos receptores de maior afinidade, CB2 e CB1 respectivamente.

Na figura 26, também pode ser observado que em A as aril-ciclohexenonas conseguem acessar um bolsão mais profundo com o anel aromático do que as outras substâncias, considerando o volume total ocupado no sítio de ligação e a orientação dos ligantes, o que contribui para a seletividade. Já em B, as aril-ciclohexanonas conseguem ocupar o volume do sítio de ligação em sua totalidade e a configuração da pose orienta o anel aromático para a porção distal extracelular do receptor, sendo a ciclohexanona orientada para a porção mais profunda do sítio de ligação.

As isoindolinonas por sua vez, devido ao seu volume molecular reduzido, não são capazes de ocupar de forma substancial o volume do sítio de ligação, interagindo com uma das laterais, principalmente em CB2 onde isso é mais evidente, e mesmo tendo ramificações mais flexíveis estes ligantes falham em interagir com as porções mais profundas e o bolsão lateral do sítio de ligação de CB1, responsável por interações que poderiam aumentar a afinidade com o sítio de ligação em questão.

Figura 26- representação do volume interno dos sítios de ligação ocupados pelos ligantes, a esquerda CB1 (5XRA) e a direita CB2 (6PT0), as setas indicam os pontos de acesso ao sítio de ligação. A) Substância 57 em complexo com CB1. B) Substância 37 em complexo com CB2. C) Substância 81 em complexo com CB1 e CB2.



A medição das interações entre os receptores e os ligantes observou ligações de pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações de elétrons π , π -dipolo e dipolo-dipolo com resíduos de aminoácidos selecionados, que representam interações chave correlacionadas com o mecanismo de ativação do receptor (ZHOU et al., 2019).

Os resíduos de aminoácidos avaliados e as distâncias das interações em Å estão compiladas na tabela 8, destacando-se as interações correlacionadas com o mecanismo de ativação dos receptores.

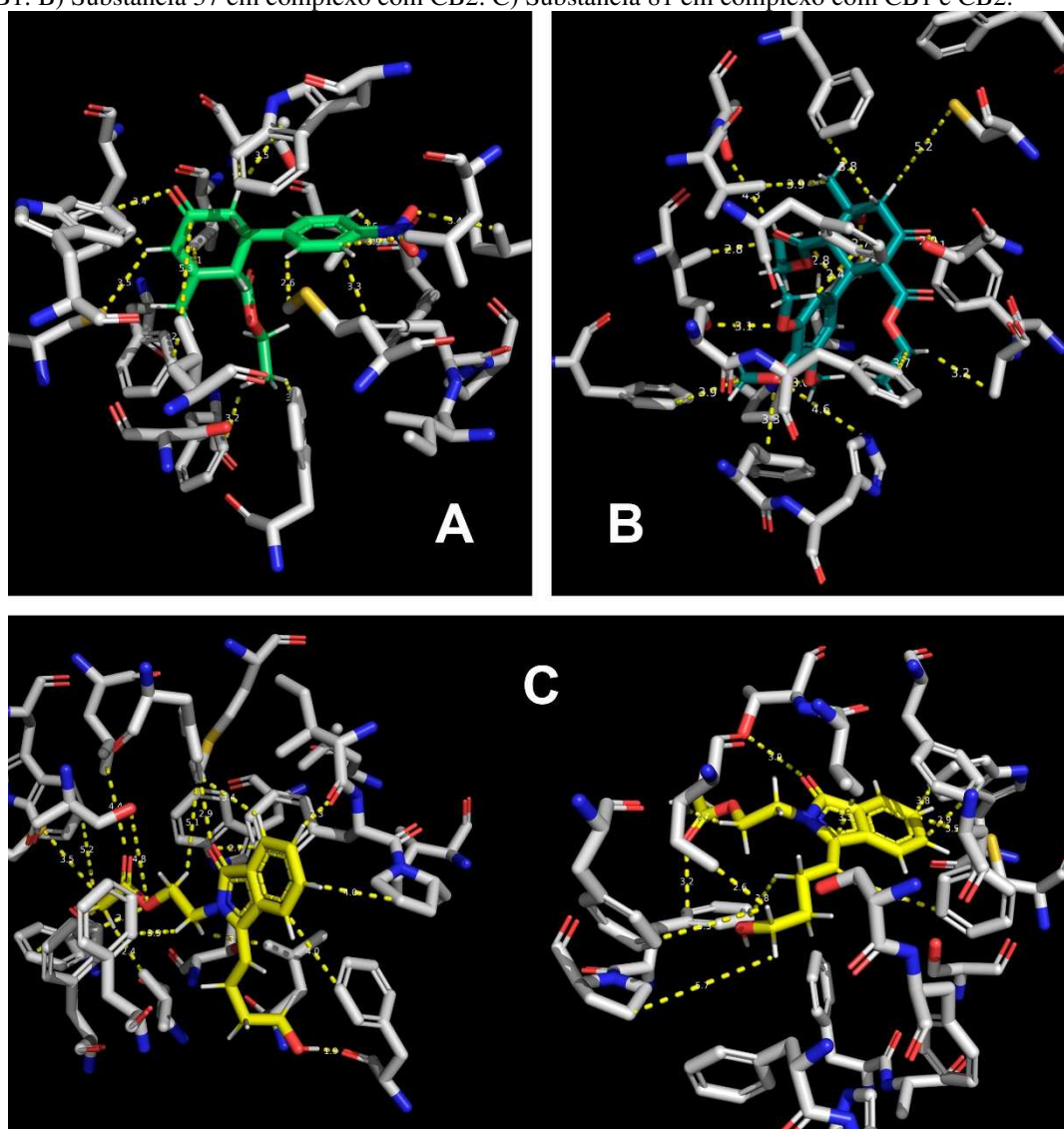
Tabela 8 – Distâncias observadas das interações dos ligantes com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação em angstroms (Å), os resíduos chave para a atividade nos receptores estão destacados.

A.A. CB1	Tipo de int. (55/85)	57 – CB1 (Å)	81 – CB1 (Å)	A.A. CB2	Tipo de int. (35/85)	37 – CB2 (Å)	81 - CB2 (Å)
Phe170	π -alquil / π -dipolo	2,9	2,9	Phe87	π -alquil	2,4	3,5
Phe174	π -alquil	3,2	3,5	Ser90	ponte de H / -	3,1	-
Phe189	- / π - π	-	1,9	Phe91	π -alquil / -	3,7	-
Leu193	VdW	2,5	3,2	Phe94	π -dipolo / -	3,3	-
Val196	VdW	4,1	2,4	His95	ponte de H / -	4,6	-
Thr197	VdW / -	3,5	-	Phe106	π -alquil	3,9	5,3
Phe200	π -alquil	3,0	4,1	Ile110	VdW	2,8	2,6
Ile267	- / π -dipolo	-	2,3	Val113	VdW	3,9	3,3
Phe268	π - π / π -dipolo	3,3	2,7	Thr114	Ponte de H	4,3	3,9
Pro269	- / π -alquil	-	4,0	Phe117	π -alquil / π - π	3,8	2,9
Ile271	VdW / -	3,4	-	Phe183	π -dipolo	2,7	3,2
Leu276	π -alquil / -	3,9	-	Pro184	VdW	3,0	5,7
Trp279	π -alquil / -	2,4	-	Trp258	- / π - π	-	3,8
Trp356	π -dipolo / π -alquil	3,4	5,2	Phe281	π -dipolo / -	3,1	-
Leu359	VdW / σ - π	5,3	4,4	Ala282	VdW / -	3,2	-
Met363	π -enxofre / VdW	2,6	5,1	Ser285	ponte de H / -	2,9	-
Phe379	π -alquil/ π -dipolo	3,4	2,9	Cys288	- / π -enxofre	-	3,5
Ser383	- / ponte de H	-	4,8				

As interações destacadas são referentes ao sistema gatilho Phe-Trp, comumente encontrado em receptores desta classe (GPCRs). No caso dos receptores canabinoides, a interação mais crítica é com o resíduo Phe200 em CB1 e Phe117 em CB2 (HUA et al., 2017), já que a mudança conformacional destes resíduos, decorrente da interação com o ligante, altera a interação subsequente das fenilalaninas com os resíduos de Trp356 em CB1 e Trp258 em CB2 (XING et al., 2020), causando por sua vez a modificação conformacional necessária no receptor para que haja a dissociação do complexo do receptor com a proteína $G_{i/o}$ intracelular.

As interações medidas e apresentadas na tabela 8 estão demonstradas espacialmente na figura 27, em linhas tracejadas juntamente com o valor da distância entre os dois pontos, nesta figura os resíduos de AA estão representados na conformação de agonista (*agonist bound*).

Figura 27– Representação dos resíduos de AA nos sítios de ligação, à esquerda CB1 (5XRA) e a direita CB2 (6PT0), as linhas tracejadas representam os pontos de interação. A) Substância 57 em complexo com CB1. B) Substância 37 em complexo com CB2. C) Substância 81 em complexo com CB1 e CB2.



Observando a necessidade de comparação com ligantes de referência, conhecidos por desempenharem atividade agonística nestes receptores, a mesma metodologia foi empregada e de forma simplificada a observação das interações foram focadas na distância entre os ligantes e os resíduos de Phe200 e Phe117, e estes dados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9– Valores observados da função de pontuação nos dois receptores e a distância em angstroms da fenilalanina 200 em CB1 e 177 em CB2.

Substância	Goldscore CB1	Dist. Phe 200 CB1 (Å)	Goldscore CB2	Dist. Phe 177 CB2 (Å)
WIN55,212-2	54,1296	5,3	67,9525	5,7
UR-144	55,2221	5,6	56,1618	3,5
THC	47,0312	5,6	50,7179	6,5
SR-147778	70,9893	2,2	56,1285	3,2
SR-144528	85,2081	2,8	70,8608	2,9
MK-0364	66,0202	4,8	59,7278	2,9
CBD	45,2355	4,5	58,7943	2,4
AM-11542	86,5119	3,9	67,1029	3
AM-4030	84,1713	4,1	64,7083	2,4
AM-630	65,7637	3,8	65,7605	3,4
AM-251	65,1836	4	66,894	3,9
81	51,4947	4,1	46,6443	2,9
57	54,2903	3	43,2148	2,9
37	19,8544	3,9	51,8415	3,8

Observando os dados acima, não foi possível estabelecer uma correlação entre os dois valores indicando que o valor de Goldscore, apesar de ser um bom indicador da complementaridade micro - macromolécula em nível de sítio de ligação, não é um valor preditivo de atividade; caso fosse, existiria uma proporcionalidade inversa entre os valores observados, pois a medida que o valor de Goldscore aumenta, a distância entre a molécula e o resíduo de fenilalanina do gatilho do receptor deveria ser cada vez menor.

Após estes estudos, as substâncias selecionadas que foram produzidas em quantidade suficiente para serem estudadas em modelos de avaliação biológica *in-vitro* e *in-vivo* foram encaminhadas para as parcerias firmadas, na expectativa de obter resultados para realizar a comparação com os resultados do modelo de ancoramento molecular acima e assim descrever as características de bioatividade destas substâncias.

No entanto vale salientar que este estudo de ancoramento molecular não foi realizado na expectativa de obter uma correlação direta da atividade, somente como seleção de substâncias que pudessem ter mais chances de sucesso nos modelos *in-vitro* e *in-vivo*. O modelo de ancoramento apresentado não faz uso de parâmetros fisiológicos, características de ADMET e da disponibilidade de outros alvos moleculares vista em um modelo *in-vivo*, sendo este de crucial importância para a avaliação do perfil de atividade das substâncias em questão.

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICA

As atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* exploradas até o momento foram focadas nas aril-ciclohexanonas (11 substâncias) e derivados aril-ciclohexenonas (8 substâncias) devido a sua disponibilidade em laboratório em quantidade suficiente, à facilidade para o preparo e o potencial de maior seletividade, devido às inferências resultantes do estudo *in silico*. As atividades determinadas *in vitro* foram executadas pelo grupo do professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, e por sua então aluna de mestrado Tainá Larissa Lubschinski, com dissertação defendida em 2021 no Programa de Pós Graduação em Farmácia (PGFar) disponível pelo link do repositório UFSC (<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/230967>), e publicada recentemente em colaboração (LUBSCHINSKI et al., 2022). Neste trabalho, ambos primeiros autores contribuíram de forma equivalente para a sua realização.

As atividades preliminares *in vivo* foram executadas pelo grupo da professora Dra. Morgana Duarte Silva do departamento de fisiologia da UFSC, pela Dra. Cristiane Carvalho.

3.5.1 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA *IN VITRO*

Preliminarmente, avaliou-se a citotoxicidade das substâncias produzidas neste estudo de modo a investigar se estas substâncias impactariam substancialmente no funcionamento celular a ponto destas células não produzirem a resposta inflamatória por um mecanismo seletivo. A determinação utilizada foi a do CC_{10} que avalia a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 10%, a metodologia empregada para a avaliação da viabilidade celular foi a técnica de MTT.

A tabela 10 expõe os valores de CC_{10} em células RAW264.7 (linhagem de macrófago murino) para cada substância empregada nesta avaliação, sendo considerado que quanto maior o valor de CC_{10} , mais adequada a substância é para o estudo, ou seja: não impacta na viabilidade celular.

Tabela 10– Valores de concentração citotóxica para 10% (CC10) em macrófagos RAW 264.7

Subst.	CC ₁₀ (µM)	Desfecho
35	114	<u>Selecionado</u>
36	106	<u>Selecionado</u>
37	231	<u>Selecionado</u>
38	30	Não selecionado
39	38	Não selecionado
40	18	Não selecionado
41	161	<u>Selecionado</u>
42	45	Não selecionado
43	80	Não selecionado
44	156	<u>Selecionado</u>
45	110	<u>Selecionado</u>
47	15	Não selecionado
50	5	Não selecionado
52	31	Não selecionado
53	18	Não selecionado
54	31	Não selecionado
55	58	Não selecionado
56	43	Não selecionado
57	35	Não selecionado

Das substâncias testadas somente seis apresentaram um CC₁₀ acima de 100 µM (valor de corte escolhido para o método) e foram selecionadas para os próximos testes. Esta necessidade de utilizar compostos com baixa toxicidade se dá pela natureza dos ensaios *in vitro* seguintes, os quais avaliam a produção de citocinas pró-inflamatórias: se a viabilidade celular for reduzida, esta pode causar uma falsa interpretação da atividade anti-inflamatória.

O potencial de redução da produção de óxido nítrico (NO_x) foi avaliado e o determinado para as substâncias selecionadas. Os compostos **35**, **36** e **41** obtiveram valores de IC₅₀ menor que 1 µM, a substância **44** apresentou IC₅₀ de 4 µM, a substância **45** apresentou IC₅₀ de 36 µM, e a substância **37** apresentou IC₅₀ de 59 µM. Assim, as substâncias **35**, **36** e **41** foram selecionadas e seguiram para as próximas análises, por possuírem potencial efeito anti-inflamatório.

Nos testes de inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e expressão de citocinas anti-inflamatórias, a substância **35** demonstrou ser a mais promissora, logo serão descritos aqui somente os dados relativos a esta substância. Mais detalhes podem ser encontrados na dissertação de mestrado referenciada anteriormente.

Na concentração de 1 µM a substância **35** obteve efeito tão potente quanto a dexametasona na concentração de 7 µM, e os valores abaixo estão representados em %

de inibição para IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6 e % de aumento para IL-4, IL-10 e IL-13.

Tabela 11– Valores de porcentagem de redução ou aumento de interleucinas em relação ao controle negativo estimulado por LPS.

	CITOCINAS	COMPOSTO 35 (1 μ M)	DEXAMETASONA (7 μ M)
PRÓ-INFLAMATÓRIAS (VALORES EXPRESSADOS EM % DE REDUÇÃO COMPARADO AO CONTROLE)	IL-12p70	36,0 \pm 2,6%	47,6 \pm 1,5%
	TNF- α	63,2 \pm 3,3%	90,5 \pm 0,7%
	IFN- γ	23,8 \pm 3,0%	28,2 \pm 5,5
	MCP-1	97,1 \pm 0,12%	97,4 \pm 0,2%
	IL-6	38,0 \pm 3,2%	67,8 \pm 9,8%
	IL-1 β	85,8 \pm 1,5%	76,6 \pm 2,8%
ANTI-INFLAMATÓRIAS (VALORES EXPRESSADOS EM % DE AUMENTO COMPARADO AO CONTROLE)	IL-4	65,6 \pm 8,1%	34,0 \pm 6,5%
	IL-10	72,2 \pm 2,5%	58,0 \pm 2,6%
	IL-13	100 \pm 4,7%	96,6 \pm 3,3%

Posteriormente, determinou-se a avaliação da atividade fagocítica comparando-se ao controle negativo (veículo), sendo que o controle positivo (dexametasona 7 μ M) apresentou um aumento de 388 \pm 6,7% e a substância **35** a 1 μ M apresentou um aumento de 482,2 \pm 32,6% compatível com a polarização de macrófagos do fenótipo M1 para M2.

Foram também avaliados os dados referentes a expressão dos receptores de manose (CD206) e TLR4 (CD284/MD-2) na superfície dos macrófagos e posteriormente a fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B.

A substância **35** foi capaz de aumentar a expressão de CD206 em 75,0 \pm 15,3% assim como a dexametasona, já o receptor TLR4 sofreu uma redução de sua expressão em 48,0 \pm 5,2% quando comparado à dexametasona, que causou uma redução de 47,3 \pm 6,0%. A substância **35** causou uma inibição da fosforilação da subunidade p65 da via NF- κ B de 66,3 \pm 2,0% enquanto a dexametasona causou uma redução de 64,3 \pm 2,1%.

As informações obtidas não sugerem uma correlação direta com a atividade canabinomimética, pois esta possibilidade não foi testada devido a indisponibilidade momentânea de agonistas e antagonistas do sistema canabinoide para realizar testes de reversão da atividade observada com antagonistas e comparação do perfil de atividade com os agonistas. Há trabalhos específicos que demonstram a correlação entre a ativação

de CB2 e a alteração dos valores de interleucinas como: IL-12p70 (CORREA et al., 2009), TNF- α , IL-6, IL-1 β (GERTSCH, 2008), MCP-1 (PETRELLA et al., 2010), IL-10 (CORREA et al., 2005) e INF- γ , IL-4 (LOU et al., 2011).

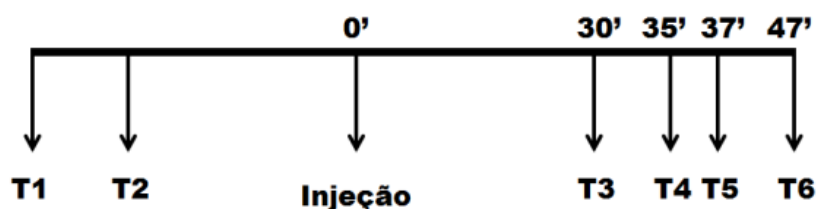
Os resultados encontrados apontam que a substância **35**, da mesma forma que a dexametasona, não somente possui um perfil de atividade anti-inflamatória, mas também imunomoduladora, capaz de atenuar a polarização de macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e aumentar a polarização de macrófagos M2 (anti-inflamatórios), verificada pela alteração na expressão das interleucinas e principalmente dos receptores de manose CD206 e TLR4 (FITZPATRICK; DOWNER, 2017). Há evidências na literatura que a ativação CB2 pode alterar a polarização destes macrófagos, (KOMOROWSKA-MÜLLER; SCHMÖLE, 2020; TOMAR et al., 2015), sendo este o aspecto mais importante desta descoberta, já que o desbalanço na polarização M1/M2 está associado com diversas doenças de cunho inflamatório crônico (ZHOU et al., 2017).

3.5.2 ATIVIDADES *IN VIVO*

Existindo evidências que apontam que a substância **35** pode ser um bom candidato para demonstrar atividade *in vivo*, esta substância foi selecionada para os testes preliminares de avaliação da tétrede canabinoide, que consiste na determinação da analgesia, catalepsia, hipotermia e hipolocomoção, associadas com o efeito central de canabinoides principalmente agonistas CB1.

Foram utilizados 40 camundongos C57bl6 dispostos em 4 grupos: controle positivo (WIN 55,212-2, 5mg/kg), controle negativo, e a substância **35** em duas doses: 1 mg/kg e 10 mg/kg administradas por via intraperitoneal.

Figura 28– Tempos de avaliação dos parâmetros da tétrede canabinoide.

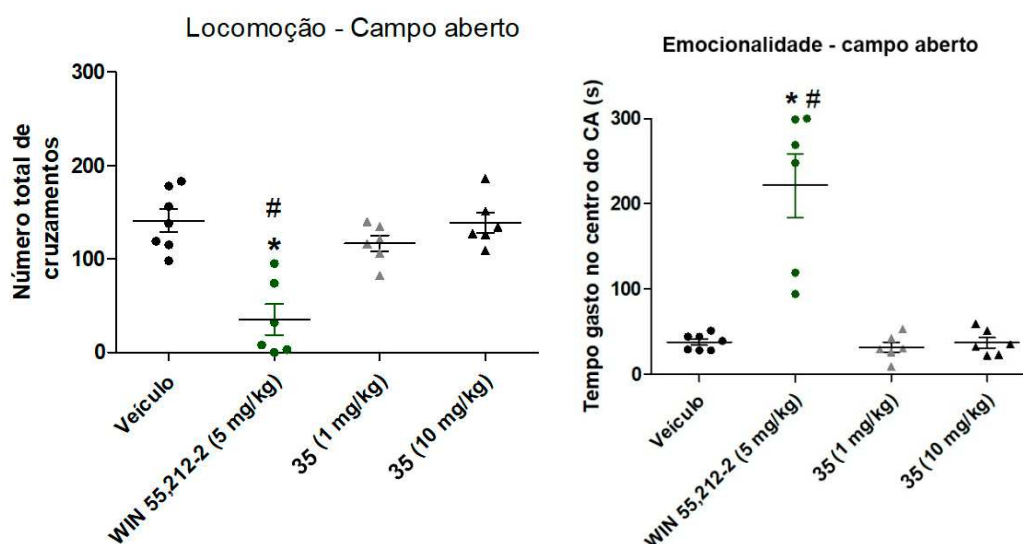


As avaliações da bateria de testes da tétrede seguiram o esquema da figura 28 sendo T1 = tempo de avaliação da medida basal do teste da placa quente (2h antes do

tratamento farmacológico), T2 = medida basal da temperatura auricular, T3 = determinação da atividade locomotora em campo aberto por 5 min, T4 = avaliação da catalepsia (3 tentativas), T5 = avaliação da analgesia central em teste de placa aquecida e T6 = medida final da temperatura auricular.

As medidas de locomoção e emocionalidade foram determinadas concomitantemente, sendo que a locomoção é relativa ao número de cruzamentos no campo aberto no tempo de 5 minutos e a emocionalidade é o tempo que o indivíduo permanece na região central do campo aberto. Anova de 1 via teste de Kruskal-Wallis, demonstrou a diferença significativa entre o grupo do controle positivo (WIN 55,212-2) e os demais grupos.

Figura 29– Gráficos representando os parâmetros de locomoção dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.

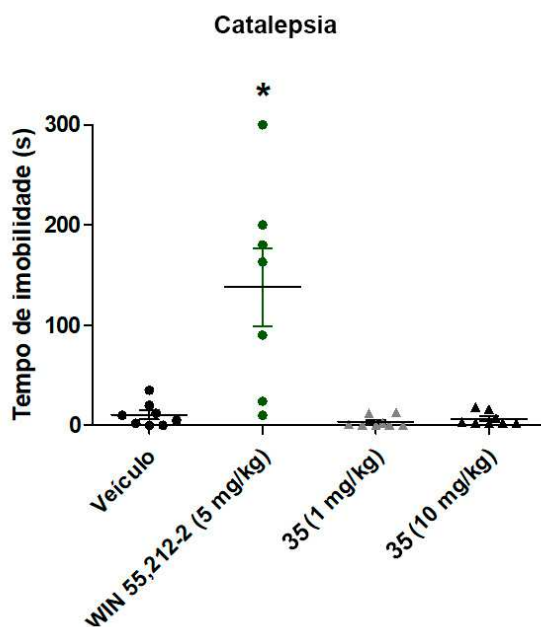


Em comparação com o agonista WIN 55,212-2, a substância **35** não apresentou atividade e seus valores ficaram muito próximos da média observada para o controle negativo. Portanto, é seguro determinar que a substância **35** não causou hipolocomoção.

Posteriormente a catalepsia foi avaliada com o teste de imobilidade em barra suspensa. Os camundongos do grupo referente ao controle positivo apresentaram tempo de permanência na barra muito superior aos outros grupos, e até mesmo os camundongos que tiveram baixo tempo de imobilidade apresentaram sinais característicos de sedação,

que não foram observados nos grupos referentes ao veículo e a substância **35** nas duas doses.

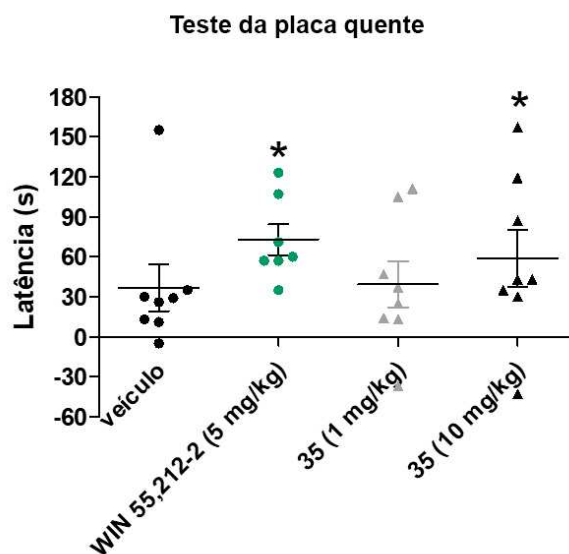
Figura 30– Gráfico representando os parâmetros de catalepsia dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.



Seguramente podemos afirmar que a substância **35** não causou sedação ou depressão do sistema nervoso central (SNC) nas condições testadas.

Posteriormente foi testado o potencial desta substância causar analgesia por efeito central utilizando o teste da placa aquecida. Neste teste, os camundongos são colocados em uma superfície quente e é avaliada a resposta ao estímulo de dor. Quando o camundongo executa o reflexo de lamber ou morder a pata, mede-se o tempo entre o contato com a superfície e a apresentação do reflexo de dor.

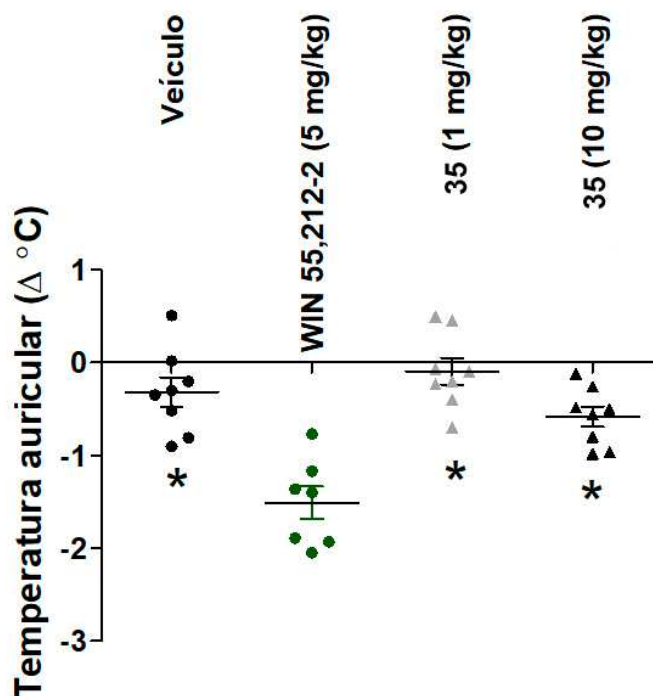
Figura 31– Gráfico representando o parâmetro de analgesia dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.



Sendo o resultado deste teste uma variável não paramétrica, foi possível determinar através da análise estatística por Anova de 2 vias com pós-teste de Kruskal-Wallis, a similaridade entre os grupos do controle positivo (WIN 55,212-2) e o grupo tratado com a substância **35** na concentração de 10 mg/kg. Portanto inferindo que a substância exerce efeito sobre a nocicepção por mecanismo central, a dose de 1 mg/kg não demonstrou significância estatística quando comparada ao veículo.

Por fim, a diferença da temperatura auricular foi aferida no final do curso de testes da tétrede canabinoide.

Figura 32 – Gráfico representando o parâmetro de temperatura corporal, aferida por temperatura auricular, dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo) e o controle positivo, o agonista canabinoide WIN 55,212-2.



Neste teste foi possível observar que em comparação com o controle positivo todos os outros grupos apresentaram diferença significativa, portanto não houve diferença entre os grupos tratados e o grupo do controle negativo (veículo), afirmando seguramente que a substância **35** não causou hipotermia nas doses testadas.

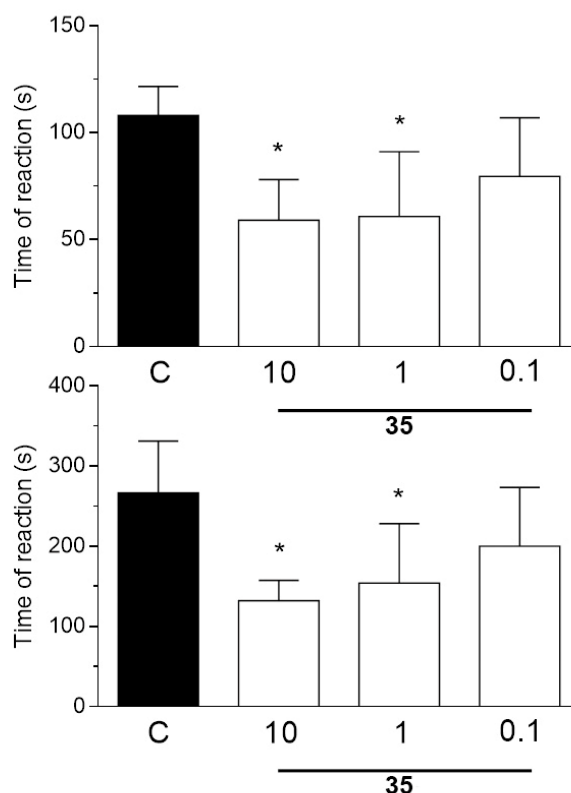
Avaliando em conjunto os resultados da tétrede canabinoide, somente um dos quatro parâmetros citados, mostrou resultado positivo: o parâmetro de analgesia central. Devido a tétrede canabinoide avaliar principalmente parâmetros compatíveis com ativação de receptores CB1, levantam-se duas hipóteses: 1) a substância em questão não possui atividade em receptores CB1 em condições fisiológicas e nas doses avaliadas, 2) devido a características estruturais e de estabilidade da substância podem haver a formação de metabólitos ácidos pela ação de esterases séricas e leucocitárias. Estes metabólitos por sua vez não teriam características adequadas para a permeação da barreira hemato-encefálica, pois os efeitos de hipolocomoção e hipotermia e catalepsia não foram observados, podendo exercer efeito impedindo a dor neurogênica interferindo no processo de nocicepção periférica.

Contribuindo para a determinação do potencial antinociceptivo, foi executado o teste da formalina, utilizando 18 camundongos Swiss fêmeas com aproximadamente 40g e em torno de 3 a 4 meses de idade provenientes do Biotério Central da UFSC. Neste

teste, os camundongos foram habituados previamente por 1h e receberam o tratamento por via intra peritoneal (IP) nas doses de 10, 1 e 0,1 mg/kg. Após 30 minutos, receberam uma injeção de 20 μ L de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído) na região plantar da pata posterior direita.

Este modelo evidencia duas fases da nocicepção. A primeira sendo a dor neurogênica que se dá por volta de 5 minutos após a aplicação da formalina, e a inflamatória que ocorre em um período de 15 a 30 minutos após a aplicação, existindo um período de quiescência entre estas duas fases. Os camundongos foram observados por 30 minutos e o tempo que estes passaram lambendo ou mordendo a pata foi cronometrado, sendo este tempo referente ao evento de nocicepção.

Figura 33– Gráficos representando os parâmetros de nocicepção dos camundongos tratados com as doses de 1 e 10 mg/kg em comparação com o controle negativo (veículo), no modelo dor induzido por formalina.



Foi observado neste teste que a dose de 0,1 mg/kg da substância **35** não apresentou efeito pois não teve diferença significativa do controle negativo (veículo), porém as doses de 1 e 10 mg/kg apresentaram efeito nas duas fases do ensaio,

evidenciando não somente a atividade no processo inflamatório, já observado no modelo *in vitro*, mas também no processo de nocicepção, pois foi ativo na fase neurogênica.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSÕES

Nesta tese foram produzidas 11 aril-ciclohexanonas com variações na substituição aromática, por duas metodologias diferentes, focando no escalonamento da produção e incremento dos rendimentos. Dos 11 exemplos apresentados, 5 tiveram seus dados de caracterização por RMN e espectrometria de massas de alta resolução apresentados pela primeira vez, são estas as substâncias: **36**, **37**, **40**, **41** e **42**.

A substância **44**, também inédita, foi sintetizada por uma metodologia diferenciada, que consiste na produção de espécies reativas de oxigênio *in situ*, pela degradação de peróxido de hidrogênio na presença de cobre, possibilitando a oxidação da posição C-3.

As aril-ciclohexenonas (ésteres de Hagemann) foram produzidas por duas metodologias diferentes, visando simplicidade na produção e incremento dos rendimentos. Foram produzidas 11 substâncias, dentre estas 5 sem relato prévio na literatura (**48**, **49**, **53**, **54**, **56**).

Visando a produção de substâncias canabinomiméticas nitrogenadas, a partir do anidrido ftálico, foi produzida uma isoindolinona tricíclica (**33**), um análogo da talidomida (**61**) e duas ureídas produtos da condensação de ureia e tioureia com o cloreto de ácido da ftalil-glicina, **68** e **69** respectivamente.

Foram sintetizadas duas isoquinolinonas por metodologia de Sonogashira e acoplamento de Castro-Stephens, **76** e **77**. Com a aplicação de uma metodologia livre de paládio foi possível produzir 3 isoindolinonas ramificadas (**80**, **81** e **83**) e um subproduto identificado contendo um anel tetrahidropirano ligado a isoindolinona por um carbono spiro (**85**), nenhuma destas 6 substâncias possuem relatos na literatura.

Nesta tese foi realizado um estudo de ancoramento molecular, que de forma comparativa foi capaz de determinar uma melhor complementaridade das aril-ciclohexanonas com CB2 e das aril-ciclohexenonas com CB1.

Os estudos *in vitro* realizados em parceria conseguiram determinar baixa toxicidade e um forte potencial anti-inflamatório da substância **35** em células RAW 264.7, na expressão de citocinas anti-inflamatórias e exercendo controle sobre o grau de polarização M1/M2 dos macrófagos estudados.

Os estudos *in vivo* em fase preliminar conseguiram determinar a inatividade da substância **35** na tétrede canabinoide. No entanto, a substância foi capaz de induzir efeito antinociceptivo central observado no teste de chapa aquecida e edema de pata induzido por formalina (na fase neurogênica e inflamatória).

4.2 PERSPECTIVAS

Produção de análogos hidroxilados em C-3 das aril-ciclohexenonas para comparação da atividade *in-vitro* observada nos análogos não hidroxilados.

A substância **35** continua tendo muito potencial anti-inflamatório e antinociceptivo, e será avaliada frente ao seu potencial anti-inflamatório *in vivo*, na expectativa de elucidar o seu mecanismo principal de ação que resulta no controle do balanço de polarização de macrófagos M1/M2.

A avaliação da substância **35** *in vivo*, será continuada para determinar se o resultado observado nos modelos de nocicepção, são relacionados a ativação de receptores canabinoides, com a utilização de agonistas e antagonistas seletivos para os diferentes alvos moleculares (CB1, CB2 e FAAH).

As substâncias produzidas nesta tese foram encaminhadas para testes biológicos *in vitro* de diferentes escopos na expectativa de elucidar possíveis atividades não levadas em consideração anteriormente, dentre estas atividades constam:

- Antimicrobiana (contra *Mycobacterium tuberculosis*);
- Antitumoral (com atividade voltada a interação com enzimas quinases);
- Inibição da proteína Mpro de SARS-CoV-2.

5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

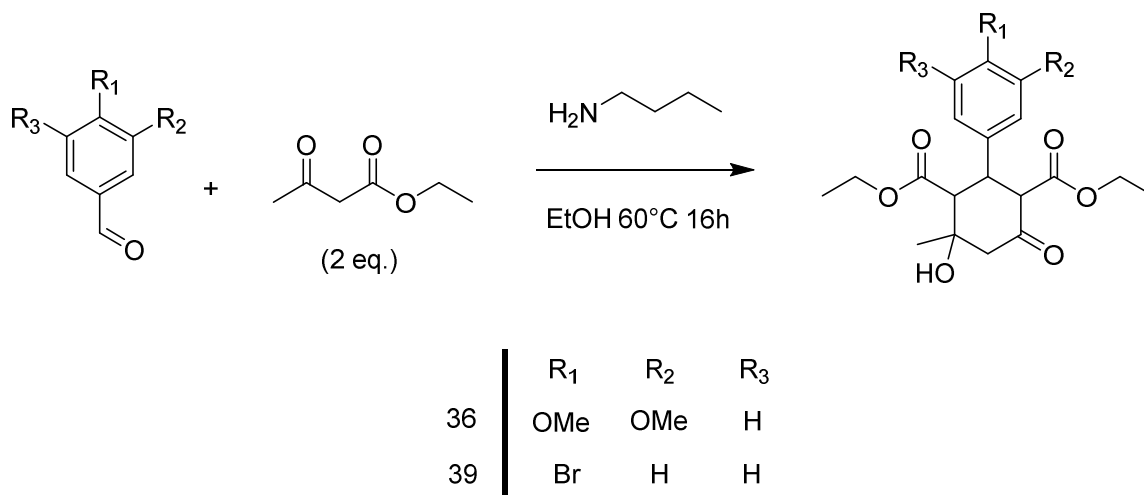
Os espectros de RMN e mapas de correlação foram obtidos em um equipamento Bruker Fourier 300 nas frequências de 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para o carbono, e, a não ser que seja indicado, todas as análises foram conduzidas a 25 °C. Os espectros de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos no equipamento Xevo G2-S QToF MS (Waters) operando em modo positivo em arranjo de massas de 100 a 1200 Da.

Para as cromatografias de camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 com indicador fluorescente F-254 com suporte de alumínio e placas de fase reversa C-18 com o mesmo indicador e suporte. A revelação das cromatoplasmas foi feita por avaliação sob luz UV em 254 nm e 365 nm, e quando necessário revelado por anisaldeído sulfúrico ou solução de KMnO_4 .

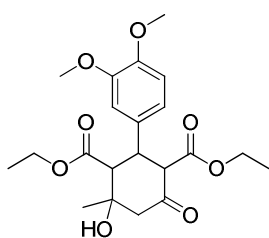
As cromatografias em coluna de gel de sílica quando indicado utilizaram como suporte sílica gel 60 (230-400 mesh) para condições de fluxo de solvente por gravidade. Para condições de fluxo de solvente auxiliado por pressão positiva foi utilizado um sistema cromatográfico BÜCHI Sepacore, com duas bombas de solvente, detector UV em 254 e coletor automático de frações, neste caso foi utilizada Silica G (Sílica 60 (230-400 mesh com 11% de sulfato de cálcio).

5.2 ARIL CICLOHEXANONAS

Procedimento geral para a produção dos análogos (36 e 39)



A um balão de fundo redondo equipado com barra magnética, foi adicionado a temperatura ambiente, 1 equiv. do benzaldeído (0,2 g) com o respectivo substituinte aromático e etanol suficiente para a obtenção de uma solução a 0,9 mol/L, acetoacetato de etila 2 equiv. (calculado em relação a molaridade do benzaldeído), foi adicionado e posteriormente a total mistura dos materiais de partida foi adicionada *n*-butilamina (1 equiv.). A mistura foi mantida sob agitação e aquecida a 60 °C por 16 h. Após o arrefecimento da mistura, o solvente foi removido em rota-evaporador e a mistura seca foi suspensa em hexanos, o precipitado formado foi filtrado e submetido a uma coluna de sílica-gel em gradiente de 0 a 80% acetato de etila em hexanos.



1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(3,4-dimetoxi)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (36)

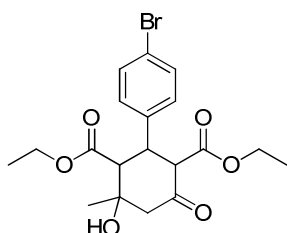
Rendimento: 0,4474 g (91%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,79 (s, 2H), 6,72 (s, 1H), 4,12 a 3,97 (m, 3H), 9,94 (d, *J* 6,2 Hz, 1H), 3,90 (d, *J* 3,9 Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,62 (d, *J* 12,6

Hz, 1H), 3,00 (d, J 12,1 Hz, 1H), 2,71 (d, J 14,3 Hz, 1H), 2,48 (d, J 14,3 Hz, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,08 (t, J 7,1 Hz, 3H), 0,89 (t, J 7,1 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 201,3, 173,9, 167,7, 148,8, 148,5, 130,7, 120,2, 111,3, 111,2, 72,9, 62,8, 61,1, 57,2, 56,0, 55,9, 52,7, 44,8, 28,6, 14,0, 13,8.

HRMS calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 409,1857, encontrado m/z 409,1875.



1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(4-bromofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (39)

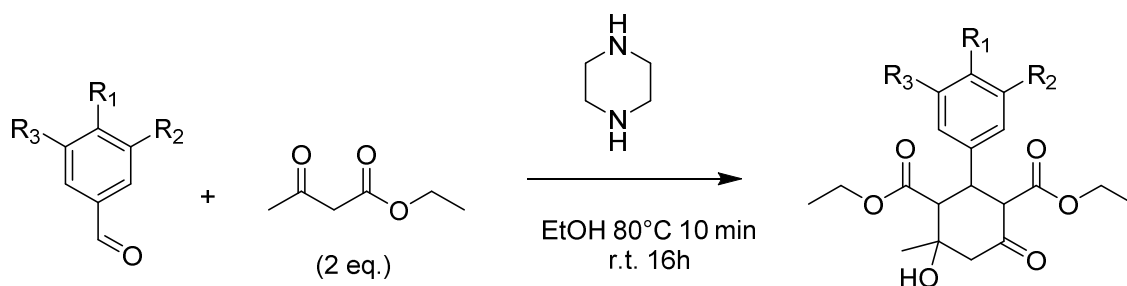
Rendimento: 0,2125 g (46%)

^1H RMN (300 MHz, Acetona- D_6) δ 7,49 (d, J 8,4 Hz, 2H), 7,33 (d, J 8,4 Hz, 2H), 4,03 a 3,94 (m, 4H), 3,91 (q, J 7,2 Hz, 2H), 3,42 (dd, J , 1,7/10,2 Hz, 1H), 2,91 (dd, J 1,9/14,0 Hz, 1H), 2,49 (d, J 14,0 Hz, 1H), 1,35 (s, 3H), 1,04 (t, J 7,15 Hz, 3H), 0,9 (t, J , 7,1 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75 MHz, Acetone- D_6) δ 201,5, 172,3, 167,7, 139,2, 131,3, 130,6, 120,7, 72,9, 72,8, 61,9, 60,3, 60,1, 56,3, 53,1, 44,5, 13,5, 13,2.

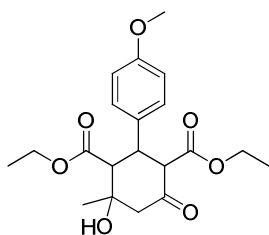
HRMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{BrO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 427,0751, encontrado m/z 427,0765.

Procedimento geral para a produção dos análogos (35 a 45)



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
35	OMe	H	H	42	H	F	H
37	OMe	OMe	OMe	43	H	NO ₂	H
38	Cl	H	H	44	NO ₂	H	H
40	F	H	H	45	H	H	H
41	H	Cl	H				

A um balão de fundo redondo equipado com barra magnética, foi adicionado a temperatura ambiente, 1 equiv. do benzaldeído com o respectivo substituinte aromático e etanol suficiente para a obtenção de uma solução a 0,7 mol/L, acetoacetato de etila (2 equiv.) foi adicionado e posteriormente a total mistura dos materiais de partida foi adicionada piperazina (1 equiv.). A mistura foi mantida sob agitação e aquecida até o refluxo por 10 minutos. Após o arrefecimento, a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 16 h. Foi observada a formação de um precipitado branco, que foi filtrado e recristalizado em etanol diversas vezes até que a pureza fosse constatada por RMN.



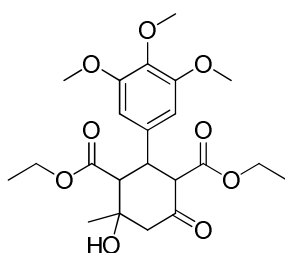
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(4-metoxi)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (35)

Rendimento: 4,70 g (47%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,16 (d, *J* 8,7 Hz, 2H), 6,83 (d, *J* 8,7 Hz, 2H), 4,10 a 3,97 (m, 3H), 3,97 a 3,91 (m, 1H), 3,89 (dd, *J* 2,7/7,3 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,62 (d, *J* 12,5 Hz, 1H), 3,01 (d, *J* 12,2 Hz, 1H), 2,71 (d, *J* 14,2 Hz, 1H), 2,49 (d, *J* 14,2 Hz, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,01 (t, *J* 7,1 Hz, 3H), 0,87 (t, *J* 7,2 Hz, 3H)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 201,4, 173,9, 167,7, 159,0, 130,1, 129,1, 114,0, 72,9, 62,8, 61,0, 57,2, 55,3, 52,7, 44,5, 28,7, 14,0, 13,7.

HRMS calculado para C₂₀H₂₇O₇ [M+H]⁺ *m/z* 379.1751, encontrado *m/z* 379.1748.



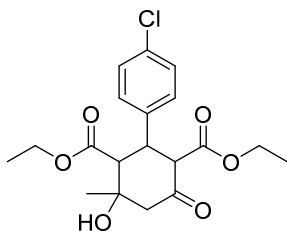
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(3,4,5-trimetoxi)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (37)

Rendimento: 3,42 (51%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,67 (s, 2H), 6,50 (s, 1H), 4,04 a 3,95 (m, 4H), 3,81 (s, 6H), 3,68 (s, 3H), 3,44 (d, *J* 11,4 Hz, 1H), 2,84 (s, 2H), 2,80 (d, *J* 7,4 Hz, 1H), 2,47 (d, *J* 14,4 Hz, 1H), 1,33 (s, 3H), 1,06 (t, *J* 7,1 Hz, 3H), 0,92 (t, *J* 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 201,3, 173,8, 167,3, 153,2, 137,4, 133,9, 105,1, 72,9, 68,8, 62,4, 61,1, 60,8, 56,9, 56,2, 52,7, 45,4, 28,6, 14,0, 13,7.

HRMS calculado para C₂₂H₃₁O₉ [M+H]⁺ *m/z* 439,1963, encontrado *m/z* 439,2023.



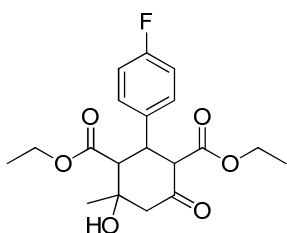
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(4-clorofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (38)

Rendimento: 5,08 g (42%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (d, *J* 8,3 Hz, 2H), 7,19 (d, *J* 8,3 Hz, 2H), 4,13 a 4,00 (m, 2H), 4,00 a 3,93 (m, 1H), 3,89 (ddd, *J*, 2,4/7,1/9,5 Hz, 2H), 3,02 (d, *J* 12,2 Hz, 1H), 2,72 (d, *J* 14,4 Hz, 1H), 2,51 (d, *J* 14,4 Hz, 1H), 1,35 (s, 3H), 1,08 (t, *J*, 7,2 Hz, 3H), 0,87 (t, *J*, 7,1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 200,9, 173,6, 167,5, 136,8, 133,6, 129,5, 128,8, 73,0, 62,3, 56,8, 52,7, 44,5, 28,6, 14,0, 13,7.

HRMS calculado para C₁₉H₂₄ClO₆ [M+H]⁺ *m/z* 383,1256, encontrado *m/z* 383,1276



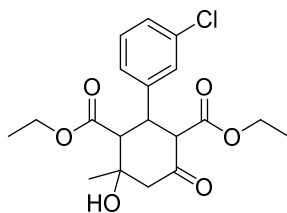
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(4-fluorofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (40)

Rendimento: 3,23 g (31%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,27 a 7,21 (m, 2H), 7,05 a 6,95 (m, 2H), 4,11 a 3,96 (m, 4H), 3,90 (ddd, *J* 2,5/7,3/9,6 Hz, 2H), 3,63 (d, *J*, 12,6 Hz, 1H), 3,02 (d, *J* 12,1 Hz, 1H), 2,73 (d, *J* 14,4 Hz, 1H), 2,51 (d, *J* 14,4 Hz, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,07 (t, *J*, 7,1 Hz, 3H), 0,87 (t, *J*, 7,1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 200,9, 173,6, 167,5, 133,9, 133,6, 129,7 (d, *J* 8,13 Hz), 128,9, 115,7, 115,4, 73,0, 62,6, 61,1, 57,9, 57,0, 52,7, 44,4, 28,6, 13,9, 13,7.

HRMS calculado para C₁₉H₂₄FO₆ [M+H]⁺ *m/z* 367.1551, encontrado *m/z* 367.1574.



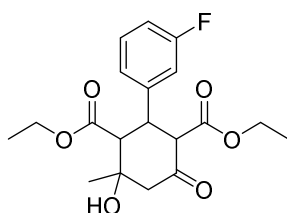
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(3-clorofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (41)

Rendimento: 3,85 g (28%).

¹H RMN (300 MHz, Acetone-D6) δ 7,33 (dd, *J* 0,6/6,4 Hz, 1H), 7,31 (dd, *J* 2,1/7,1 Hz, 1H), 7,27 (dd, *J* 1,9/4,8 Hz, 1H), 4,04 a 3,95 (m, 4H), 3,91 (ddd, *J* 0,8/7,1/14,1 Hz, 2H), 3,45 (dd, *J* 3,4/8,6 Hz, 1H), 2,91 (dd, *J* 1,8/14,1 Hz, 1H), 2,84 (s, 1H), 2,80 (sl, 1H), 2,50 (d, *J* 14,0 Hz, 1H), 1,36, (s, 3H), 1,04 (t, *J* 7,1 Hz, 3H), 0,90 (t, *J* 7,1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, Acetone-D6) δ 201,4, 167,7, 142,2, 133,5, 129,9, 128,5, 127,3, 127,2, 72,9, 61,8, 60,2, 60,1, 56,2, 53,1, 44,7, 13,5, 13,2.

HRMS calculado para C₁₆H₁₈ClO₃ [M+H]⁺ *m/z* 293,0939, encontrado *m/z* 293,0992.



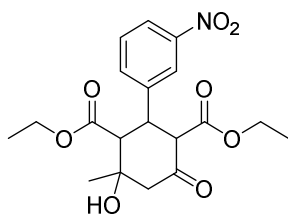
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(3-fluorofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (42)

Rendimento: 5,82 g (42%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,26 a 7,21 (m, 3H), 7,18 a 7,11 (m, 1H), 4,16 a 3,80 (m, 5H), 3,62 (d, *J* 12,6 Hz, 1H), 3,01 (d, *J* 12,2 Hz, 1H), 2,72 (d, *J* 12,3 Hz, 1H), 2,50 (d, *J* 14,4 Hz, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,08 (t, *J* 7,3 Hz, 3H), 0,86 (t, *J* 7,05 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 200,7, 173,5, 167,4, 140,3, 134,5, 129,9, 128,3, 128,0, 126,4, 73,0, 62,2, 61,2, 56,7, 52,7, 44,8, 28,6, 14,0, 13,7.

HRMS calculado para C₁₉H₂₄FO₆ [M+H]⁺ *m/z* 367,1551, encontrado *m/z* 367,1147.



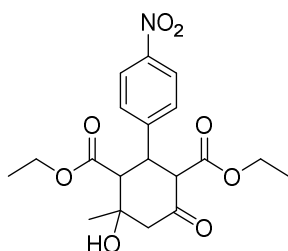
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(3-nitrofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (43)

Rendimento: 1,69 g (13%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,20 (s, 1H), 8,14 (d, *J* 8,1 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* 7,6 Hz, 1H), 7,50 (t, *J* 7,7 Hz, 1H), 4,18 (t, *J* 12,4 Hz, 1H), 4,12 a 3,92 (m, 2H), 3,88 (q, *J* 7,16 Hz, 2H), 3,69 (d, *J* 12,5 Hz, 1H), 3,13 (d, *J* 12,2 Hz, 1H), 2,76 (d, *J* 14,3 Hz, 1H), 2,57 (d, *J* 14,3 Hz, 1H), 1,37 (s, 3H), 1,08 (t, *J* 7,1 Hz, 3H), 0,83 (t, *J* 7,1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 200,1, 173,1, 167,2, 148,4, 140,7, 135,0, 129,7, 122,9, 122,7, 73,1, 62,0, 61,4, 61,3, 56,5, 52,7, 44,7, 28,5, 14,0, 13,7.

HRMS calculado para C₁₉H₂₄NO₈ [M+H]⁺ *m/z* 394,1496, encontrado *m/z* 394,1499.



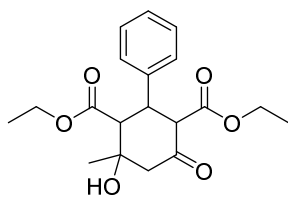
1,3-dietil éster do ácido ciclohexan-2-(4-nitrofenil)-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (44)

Rendimento: 4,29 g (55%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,19 (d, *J* 8,6 Hz, 2H), 7,47 (d, *J* 8,6 Hz, 2H), 4,20 (dd, *J* 2,8/11,0 Hz, 1H), 4,15 a 3,95 (m, 3H), 3,89 (ddd, *J* 3,3/7,2/14,3 Hz, 2H), 3,09 (d, *J* 12,1 Hz, 1H), 2,76 (d, *J* 14,3 Hz, 1H), 2,57 (d, *J* 14,1 Hz, 1H), 1,37 (s, 3H), 1,09 (t, *J* 7,1 Hz, 3H), 0,87 (t, *J* 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 200,1, 173,1, 170,5, 147,5, 145,9, 129,3, 123,9, 73,1, 61,8, 61,4, 61,3, 56,4, 52,8, 44,8, 28,5, 14,0, 13,8.

HRMS calculado para C₁₉H₂₄NO₈ [M+H]⁺ *m/z* 394,1496, encontrado *m/z* 394,1581.



1,3-diethyl éster do ácido ciclohexan-2-fenil-4-hidroxi-4-metil-6-ona-1,3-dicarboxílico (45)

Rendimento: 2,46 g (14%).

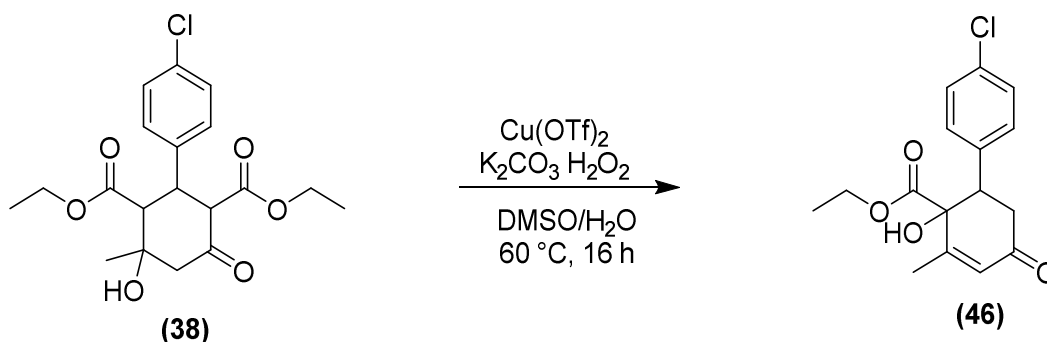
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,32 a 7,19 (m, 5H), 4,09 a 3,94 (m, 2H), 4,00 (dd, *J* 12,6/12,2 Hz, 1H), 3,91 a 3,79 (m, 2H), 3,69 (d, *J* 12,6 Hz, 1H), 3,04 (d, *J* 12,2 Hz, 1H), 2,71 (d, *J* 14,3 Hz, 1H), 2,51 (d, *J* 14,3 Hz, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,03 (t, *J* 7,1 Hz, 3H), 0,79 (t, *J* 7,1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 201,4, 173,9, 167,7, 138,1, 128,6, 128,1, 127,8, 73,1, 62,5, 61,0, 57,0, 52,7, 45,3, 28,6, 13,9, 13,6.

HRMS calculado para C₁₉H₂₄O₆ [M+H]⁺ *m/z* 349,1646, encontrado *m/z* 349,1657.

5.3 ARIL-CICLOHEXENONAS E DERIVADOS

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4-metil-6-ona-3-carboxílico (46)



Em um balão de fundo redondo de 25 mL foi adicionado 0,1 g de **(38)** (0,26 mmol), juntamente com 1,5 equivalentes de K₂CO₃ 0,054 g (0,39 mmol) e 0,2 equivalentes de Cu(OTf)₂ 0,019g (0,055 mmol). Esta mistura foi diluída em 2 mL de DMSO, e 1 mL de água destilada foi adicionada até ocorrer a turvação e espessamento do líquido, com a dissolução completa dos componentes sólidos. A mistura foi submetida a aquecimento de 90 °C sob agitação e 0,2 mL de H₂O₂ 35% foi adicionado à mistura reacional. A cor da

reação mudou instantaneamente de verde claro para marrom. A reação foi mantida sob aquecimento por 16 horas e depois foi arrefecida, submetida à partição líquido: líquido com água: EtOAc. A fase orgânica foi lavada três vezes com 20 ml de água e seca em sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rota-evaporador. A mistura obtida foi submetida a sistema cromatográfico Sepacore com uma coluna de 10 cm com sílica G, em um gradiente de 100% CH₂Cl₂ a 10% MeOH em CH₂Cl₂ o produto obtido um óleo amarelado com:

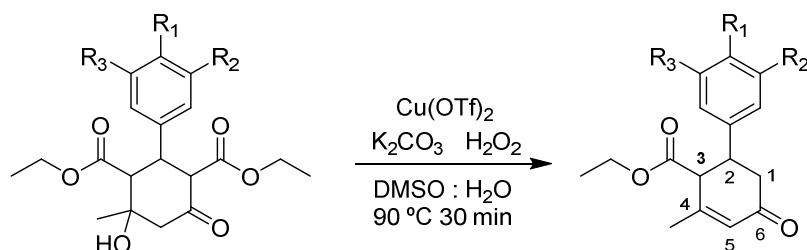
Rendimento: 9,6 mg (12%)

¹H RMN: (300 MHz, CDCl₃) 7,29 (d, J 8,6 Hz, 2H), 7,17 (d, J 8,5 Hz, 2H), 6,09 (sl, 1H), 4,22 (q, J 7,2 Hz, 2H), 3,74 (sl, 1H), 3,62 (dd, J 4,5/14,8 Hz, 1H), 3,32 (dd, J 14,8/16,6 Hz, 1H), 2,63 (dd, J 0,6/4,6/16,6 Hz, 1H), 1,93 (d, J 1,3 Hz, 3H), 1,29 (t, J 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN: (75 MHz, CDCl₃) δ 197,5, 171,7, 158,9, 135,5, 133,9, 129,8, 129,2, 128,6, 78,6, 63,5, 49,2, 39,8, 18,8, 14,1.

HRMS calculado para C₁₆H₁₈ClO₄ [M+H]⁺ *m/z* 309,0888, encontrado *m/z* 309,0880.

Procedimento geral para a produção dos análogos (48 a 51)



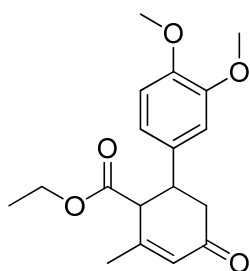
	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
48	OMe	OMe	H	2
49	OMe	OMe	OMe	4
51	Br	H	H	2

Em um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com barra magnética foi adicionado a aril-ciclohexanona com o substituinte aromático respectivo de cada caso (1 equiv.), juntamente com 1,5 equivalentes de K₂CO₃ e 0,2 equivalentes de Cu(OTf)₂. Esta mistura foi diluída em 2 mL de DMSO, e 1 mL de água destilada foi adicionada até ocorrer a turvação e espessamento do líquido, com a dissolução completa dos componentes sólidos. A mistura foi submetida a aquecimento de 90 °C sob agitação e 0,2

mL de H₂O₂ 35% foram adicionados à mistura reacional. A cor da reação mudou instantaneamente de verde claro para marrom. A reação foi mantida sob aquecimento por 30 minutos e depois foi arrefecida e submetida a partição líquido: líquido com água: AcOEt. A fase orgânica foi lavada três vezes com 20 ml de água, depois seca em sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rota-evaporador. A mistura obtida foi submetida a sistema cromatográfico Sepacore com uma coluna de 10 cm com sílica G, em um gradiente de 100% CH₂Cl₂ a 10% MeOH em CH₂Cl₂. O produto obtido, um óleo amarelado, foi posteriormente submetido a uma análise de HPLC semi-preparativo para o isolamento final em uma coluna de 30 cm de fase reversa C-18 com um gradiente de 30% ACN em água até 98% ACN em água. Obtendo os produtos descritos a seguir como óleos amarelados.

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(3,4-dimetoxifenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico

(48)



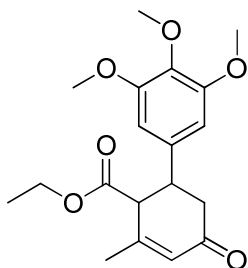
Rendimento: 1,6 mg, (2%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,82 (d, *J* 8,1 Hz, 1H), 6,80 a 6,76 (m, 1H), 6,76 a 6,72 (m, 1H), 6,06 (t, *J* 1,45 Hz, 1H), 4,09 (dq, *J* 1,1/7,2/7,2 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,64 (dd, *J* 4,8/9,7 Hz, 1H), 3,57 (sl, 1H), 2,73 (dd, *J* 3,9/16,3 Hz, 1H), 2,65 (dd, *J* 1,3/10,5 Hz, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,37 (t, *J* 7,2 Hz, 3H)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 197,5, 171,4, 156,4, 149,0, 148,2, 141,4, 133,5, 128,3, 119,2, 111,3, 110,5, 61,2, 55,9, 54,6, 43,7, 43,1, 22,4, 14,1.

HRMS calculado para C₁₈H₂₃O₅ [M+H]⁺ *m/z* 319,1540, encontrado *m/z* 319,1533.

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (49)



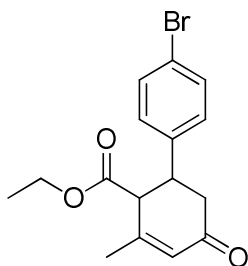
Rendimento: 1,2 mg, (4%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,45 (s, 2H), 6,11 (sl, 1H), 4,31 a 4,18 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,85 (s, 6H), 3,58 (dd, *J* 4,4/14,4 Hz, 1H), 2,67 (ddd, *J* 0,6/4,6/16,6 Hz, 1H), 1,96 (d, *J* 1,3 Hz, 3H), 1,31 (t, *J* 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 197,8, 171,4, 159,0, 153,0, 129,2, 105,7, 63,2, 60,8, 56,1, 50,3, 40,2, 18,8, 14,1.

HRMS calculado para C₁₉H₂₅O₆ [M+H]⁺ *m/z* 349,1646, encontrado *m/z* 349,1693.

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-bromofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (51)



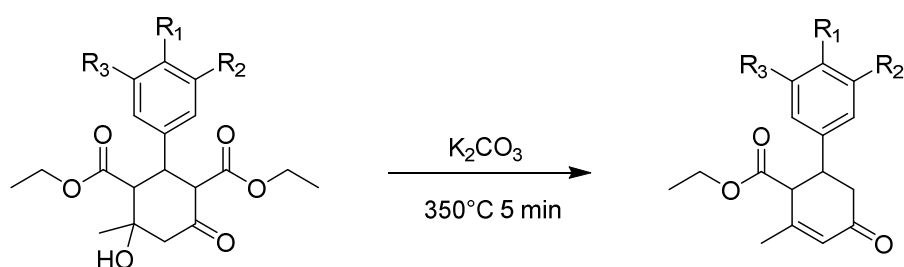
Rendimento: 2,3 mg, (2%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,46 (d, *J* 8,4 Hz, 2H), 7,11 (d, *J* 8,4 Hz, 2H), 6,07 (t, *J* 1,4 Hz, 1H), 4,09 (q, *J* 7,2 Hz, 2H), 3,65 (ddd, *J* 4,7/9,4/11,3 Hz, 1H), 3,54 (d, *J* 9,9 Hz, 1H), 2,71 (dd, *J* 4,7/16,7 Hz, 1H), 2,60 (dd, *J* 11,3/16,7 Hz, 1H), 2,00 (t, *J* 1,2 Hz, 3H), 1,13 (t, *J* 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 196,7, 171,1, 156,1, 139,9, 132,0, 131,7, 129,0, 128,4, 61,4, 54,1, 43,5, 42,6, 22,4, 14,0.

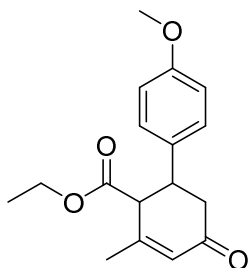
HRMS calculado para C₁₆H₁₈BrO₃ [M+H]⁺ *m/z* 337,0434, encontrado *m/z* 337,0513.

Procedimento geral para a produção dos análogos (47 a 57)



	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)		R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
47	OMe	H	H	32	54	H	F	H	23
50	Cl	H	H	6	55	H	H	H	52
52	F	H	H	17	56	H	NO ₂	H	50
53	H	Cl	H	47	57	NO ₂	H	H	54

A um frasco de *headspace* de 10 mL resistente a altas temperaturas, equipado com uma barra magnética, foi adicionada a aril-ciclohexanona com o substituinte aromático respectivo de cada caso na escala de 500 mg (1 equiv.) e carbonato de potássio (1 equiv.), o frasco após ser selado foi purgado com um fluxo constante de argônio e os sólidos foram mantidos sob agitação constante. O frasco foi aquecido a uma temperatura de 350 °C em um curto intervalo com auxílio de uma pistola térmica, e mantido nesta temperatura por 5 minutos, ou até o borbulhamento cessar. O material resultante foi diluído com 2 mL de acetato de etila e submetido a uma coluna de sílica-gel em um gradiente de 10 a 20 % acetona em hexanos, rendendo produtos oleosos com coloração levemente amarelada.



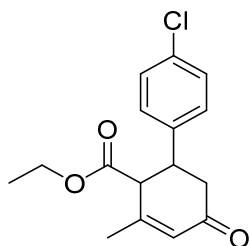
Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-metoxifenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (**47**)

Rendimento: 123,6 mg (32%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,15 (d, *J* 8,6 Hz, 2H), 6,85 (d, *J* 8,6 Hz, 2H), 6,06 (t, *J* 1,5 Hz, 1H), 7,07 (q, *J* 7,2 Hz, 2H), 2,71 (dd, *J* 4,6/16,6 Hz, 1H), 2,64 (d, *J* 10,9 Hz, 1H), 1,99 (t, *J* 1,1 Hz, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,12 (t, *J* 7,2 Hz, 3H),

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 197,5, 171,4, 158,8, 156,4, 133,0, 128,4, 128,3, 114,1, 61,2, 55,3, 54,7, 43,1, 22,4, 14,0.

HRMS calculado para C₁₇H₂₁O₄ [M+H]⁺ *m/z* 289,1434, encontrado *m/z* 289,1457.



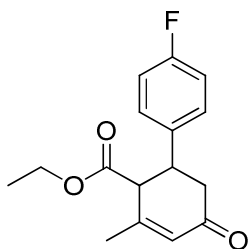
Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-clorofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (**50**)

Rendimento: 22,0 mg (6%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,1 (d, *J* 8,4 Hz, 2H), 7,17 (d, *J* 8,4 Hz, 2H), 6,07 (t, *J* 1,3 Hz, 1H), 4,08 (q, *J* 7,2 Hz, 2H), 3,66 (ddd, *J* 4,8/9,6/11,4 Hz, 1H), 3,54 (d, *J* 9,6 Hz, 1H), 2,72 (dd, *J* 4,8/16,6 Hz, 1H), 2,60 (dd, *J* 11,4/16,6 Hz, 1H), 2,00 (t, *J* 1,1 Hz, 3H), 1,31 (t, *J* 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 196,8, 171,1, 156,1, 139,4, 133,2, 129,0, 128,6, 128,4, 61,4, 54,2, 43,4, 42,7, 22,4, 14,0.

HRMS calculado para C₁₆H₁₈ClO₃ [M+H]⁺ *m/z* 293,0939, encontrado *m/z* 293,0992.

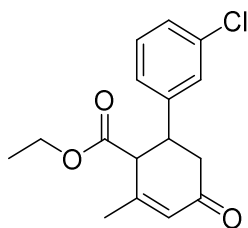


Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-fluorofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (**52**)

Rendimento: 69,7 mg (17%).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,18 (dd, J 8,5/5,4 Hz, 2H), 7,95 a 6,94 (m, 3H), 6,03 (sl, 1H), 4,04, (q, J 7,1 Hz, 2H), 3,68 a 3,53 (m, 1H), 3,52 (d, J 9,5 Hz, 1H), 2,68 (dd, J 4,8/16,6 Hz, 1H), 2,61 (dd, J 5,4/16,6 Hz, 1H), 1,96 (sl, 3H), 1,07 (t, J 7,1 Hz, 3H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 197,0, 171,2, 156,3, 136,6 (d, J 3,2 Hz), 128,8 (d, J 8,15 Hz), 115,7, 115,5, 61,2, 54,4, 43,4, 42,9, 22,3, 14,0.

HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 277,1234, encontrado m/z 277,1228.



Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(3-clorofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (**53**)

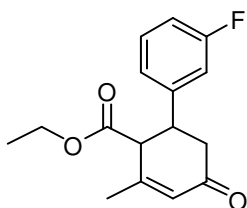
Rendimento: 171,6 mg (47%).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,26 a 7,20 (m, 3H), 7,14 a 7,01 (m, 1H), 6,07 (t, J 1,3 Hz, 1H), 4,09 (q, J 7,2 Hz, 2H), 3,65 (ddd, J 4,8/9,4/11,4 Hz, 1H), 3,54 (d, J 9,6 Hz, 1H), 2,72 (dd, J 4,7/16,6 Hz, 1H), 2,61 (dd, J 11,2/16,5 Hz, 1H). 1,99 (t, J 1,1 Hz, 3H), 1,12 (t, J 7,1 Hz, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 196,7, 171,0, 156,0, 134,6, 130,1, 128,4, 127,7, 127,6, 125,5, 61,4, 54,1, 43,7, 42,5, 22,4, 14,0.

HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 293,0939, encontrado m/z 293,0957.

Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(3-fluorofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (54)

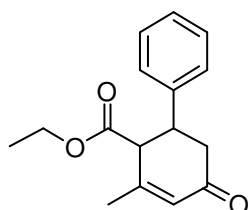


Rendimento: 94,4 mg (23%).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,26 (dd, J 7,8/14,6 Hz, 1H), 6,98 (d, J 7,8 Hz, 1H), 6,95 a 6,88 (m, 2H), 6,03 (sl, 1H), 4,05 (q, J 7,1 Hz, 2H), 3,69 a 3,58 (m, 1H), 3,54 (d, J 9,4 Hz, 1H), 2,69 (dd, J 4,7/16,7 Hz, 1H), 2,58 (dd, J 11,1/16,7 Hz, 1H), 1,96 (s, 3H), 1,07 (t, J 7,1 Hz, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 196,7, 171,1, 156,1, 143,5, 143,4, 130,3 (d, J 8,2 Hz), 128,4, 122,9 (d, J 2,7 Hz), 114,4 (d, J 10,1 Hz), 114,1 (d, J 10,1 Hz), 61,3, 54,0, 43,7, 42,5, 22,3, 13,9.

HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 299,1054, encontrado m/z 299,1050.



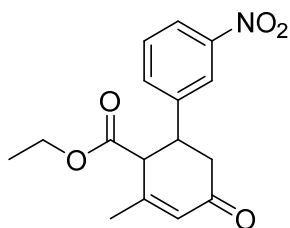
Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-fenil-4-metil-6-ona-3-carboxílico (55)

Rendimento: 193,9 mg (52%).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,28 a 7,16 (m, 5H), 5,99 (t, J 1,4 Hz, 1H), 3,97 (q, J 7,1 Hz, 2H), 3,58 (dd, J 5,5/9,7 Hz, 1H), 3,54 (d, J 9,0 Hz, 1H), 2,62 (d, J 5,5 Hz, 1H), 2,60 (dd, J 1,7/9,0 Hz, 1H), 1,91 (sl, 3H), 0,99 (t, J 7,1 Hz, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 197,2, 171,3, 156,4, 140,9, 128,7, 127,4, 127,2, 127,1, 61,1, 54,2, 44,1, 42,8, 22,3, 13,9.

HRMS calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 259,1329, encontrado m/z 259,1338.



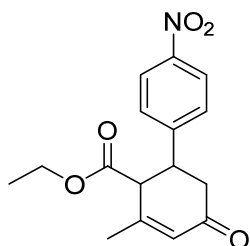
Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(3-nitrofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (56)

Rendimento: 193,6 mg (50%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,17 a 8,12 (m, 2H), 7,6 a 7,5 (m, 2H), 6,09 (t, *J* 1,5 Hz, 1H), 4,09 (q, *J* 7,2 Hz, 2H), 3,81 (dd, *J* 5,6/10,1 Hz, 1H), 3,67 (d, *J* 9,3 Hz, 1H), 2,76 (dd, *J* 5,6/16,6 Hz, 1H), 2,69 (dd, *J* 10,1/16,6 Hz, 1H), 2,02 (t, *J* 1,2 Hz, 3H), 1,12 (t, *J* 7,2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 196,1, 170,8, 155,9, 148,4, 143,0, 133,7, 129,9, 128,4, 122,6, 122,2, 61,5, 53,7, 43,5, 42,3, 22,3, 13,9.

HRMS calculado para C₁₆H₁₇NO₅ [M+H]⁺ *m/z* 304,1179, encontrado *m/z* 304,1205.



Etil éster do ácido 4-ciclohexen-2-(4-nitrofenil)-4-metil-6-ona-3-carboxílico (57)

Rendimento: 207,4 mg (54%).

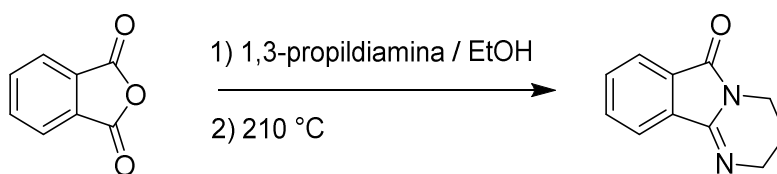
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,12 (d, *J* 8,8 Hz, 2H), 7,39 (d, *J* 7,39 Hz, 2H), 6,01 (t, *J* 1,7 Hz, 1H), 4,02 (dq, *J* 2,5/7,1 Hz, 2H), 3,80 a 3,72 (m, 1H), 3,59 (d, *J* 9,3 Hz, 1H), 2,68 (dd, *J* 5,4/16,7 Hz, 1H), 2,60 (dd, *J* 10,6/16,7 Hz, 1H), 1,95 (t, *J* 1,2 Hz, 3H), 1,05 (t, *J* 7,1 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 196,0, 170,7, 155,9, 148,3, 147,2, 128,4, 124,0, 123,7, 61,5, 53,5, 43,7, 42,1, 22,3, 13,9.

HRMS calculado para C₁₆H₁₇NO₅ [M+H]⁺ *m/z* 304,1179, encontrado *m/z* 304,1205

5.4 ISOINDOLINONAS

3,4-dihidropirimido[2,1-a]isoindol-6(2H)-ona (33)



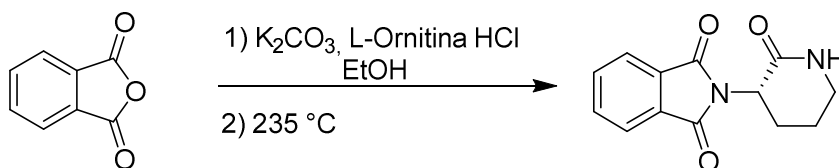
Em um balão de fundo redondo de 100 mL, 10 g de anidrido ftálico (67,5 mmol) foi suspenso em 40 mL de etanol, sob agitação vigorosa, foi adicionado 5,97 mL de 1,3-propildiamina (70,9 mmol) gota a gota. Após 45 minutos do final da adição da diamina, um precipitado branco começou a se formar. A mistura foi então refrigerada e o produto foi filtrado e lavado com CH₂Cl₂. O sólido branco obtido foi condicionado em um béquer de 50 mL com um vidro de relógio sobre a boca do béquer, e aquecido a 210 °C. A partir do aquecimento foi observada a liberação de vapor de água e o aquecimento foi mantido até que não houvesse mais liberação de vapor de água e a deposição de um sólido branco no vidro de relógio. O material fundido no fundo do béquer foi extraído com heptano a quente (quatro vezes de 50 mL). O extrato foi evaporado à temperatura ambiente. O produto foi precipitado, resultando em um sólido amarelado com:

Rendimento: de 1,23 g (9%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,91 a 7,80 (m, 2H), 7,68 a 7,52 (m, 2H), 3,82 (dd, *J* 0,95/5,8 Hz, 2H), 3,80 (dd, *J* 1,96/5,8 Hz, 2H), 2,00 (ddd, *J* 5,9/11,3/5,4 Hz, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 166,7, 150,7, 134,7, 132,9, 131,6, 131,1, 123,0, 121,3, 45,9, 37,2, 20,4.

HRMS calculado para C₁₁H₁₁N₂O [M+H]⁺ *m/z* 187,0866, encontrado *m/z* 187,0886.

(S)-2-(2-oxopiperidin-3-il)isoindolin-1,3-diona (**61**)

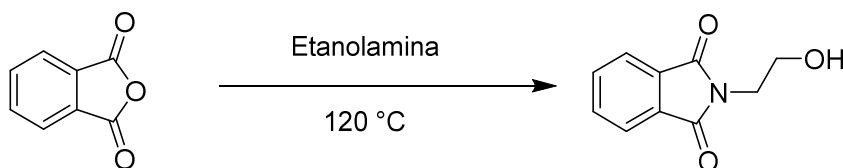
Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1,7 g de L-ornitina HCl (10,1 mmol), seguido por 5 mL de Etanol e 0,466 g de K_2CO_3 (3,37 mmol). A mistura foi posta em agitação e a ela foi adicionado 1 g de anidrido ftálico. O material foi agitado a temperatura ambiente por 16 horas, e o precipitado branco formado foi filtrado e lavado com CH_2Cl_2 . O sólido foi condicionado em um béquer de 50 mL e aquecido a $235\text{ }^\circ\text{C}$. O sólido começou a fundir e apresentou uma coloração amarelada com o desenvolvimento de vapor de água. Depois de 10 minutos a coloração começou a mudar para marrom escuro. A reação foi arrefecida e foi submetida à uma partição líquido : líquido, com CH_2Cl_2 e água. As frações orgânicas foram reunidas e secas em sulfato de sódio, evaporada em rota-evaporador e submetida à uma coluna de sílica gel em gradiente de 70% CH_2Cl_2 em hexanos até 100% CH_2Cl_2 , posteriormente até 4% MeOH em CH_2Cl_2 . Foi obtido um sólido cristalino amarelo com:

Rendimento: 0,1208 g (7%)

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 (dd, J 3,9/5,5 Hz, 2H), 7,71 (dd, J 3,9/5,5 Hz, 2H), 6,47 (s, 1H), 4,76 (dd, J 6,1/11,9 Hz, 1H), 3,52 (ddd, J 4,37/11,9/16,4 Hz, 1H), 3,4 a 3,3 (m, 1H), 2,47 a 2,31 (m, 1H), 2,8 a 1,9 (m, 2H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168,2, 167,7, 134,0, 133,9, 132,1, 123,5, 49,2, 42,4, 26,3, 22,3.

HRMS calculado para $C_{13}H_{13}N_2O_3$ $[M+H]^+$ m/z 245,0921, encontrado m/z 248,0928.

2-(2-hidroxietil)isoindolin-1,3-diona (**62**)

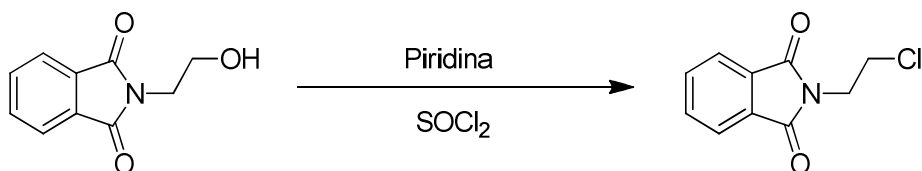
Em um erlenmeyer de 100 mL foi adicionado 10 g de anidrido ftálico (67,5 mmol). Prontamente foi vertido 4,89 mL de etanolamina (81,0 mmol). A mistura aqueceu imediatamente e foi mantida sob agitação a 120 °C por 5 horas. Ao material fundido foi adicionado lentamente 60 mL de água a temperatura ambiente. Após o arrefecimento formou-se um precipitado branco, que foi filtrado e após recristalizado em água.

Rendimento: 7,45 g (57%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,88 a 7,77 (m, 4H), 3,84 a 3,73 (m, 4H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 168,5, 133,9, 132,0, 122,6, 58,7, 39,9.

HRMS calculado para C₁₀H₁₀NO₃ [M+H]⁺ *m/z* 192,0655, encontrado *m/z* 192,0669.

2-(2-cloroetil)isoindolin-1,3-diona (**63**)

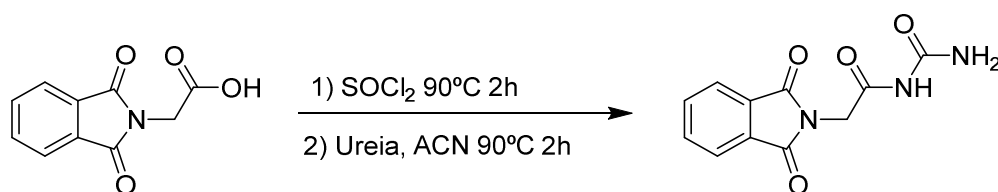
Em um balão foi adicionado 7g de (62) (36,6 mmol), a ela foi adicionada 3,53 mL de piridina (43,9 mmol) e resfriada a 5 °C e posteriormente adicionada 18,0 mL de cloreto de tionila. A mistura foi agitada e mantida sob refluxo por 5 horas. Após o arrefecimento a mistura foi vertida em um funil de separação com água e CH₂Cl₂. A fase orgânica foi lavada 3 vezes com água e posteriormente seca com sulfato de sódio e o solvente removido em rota-evaporador, rendendo um sólido bege com:

Rendimento: 6,84g (89%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,88 (dd, *J* 3,1/5,6 Hz, 2H), 7,75 (dd, *J* 3,1/5,6 Hz, 2H), 4,05 (t, *J* 6,4 Hz, 2H), 3,78 (t, *J* 6,4 Hz, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 167,9, 134,2, 131,8, 123,5, 40,8, 39,4.

HRMS calculado para C₁₀H₉ClNO₂ [M+H]⁺ *m/z* 210,0316, encontrado *m/z* 210,0324.

N-carbamoil-2-(1,3-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)acetamida (**68**)

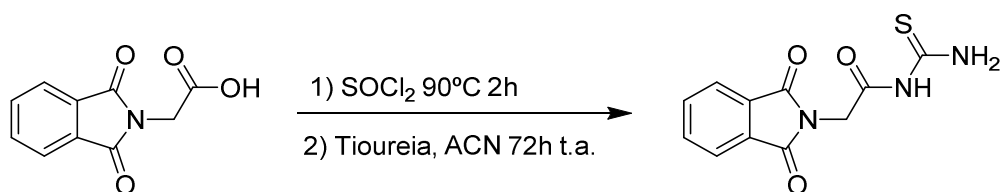
Em um balão de fundo cônico, 200 mg da substância **66** (ftalil-glicina) (0,947 mmol) foram adicionadas e dissolvidas em 1 mL de SOCl_2 (13,7 mmol, 14,1 equiv.), a mistura foi aquecida a 90 °C por 2 horas. Após este tempo o SOCl_2 foi evaporado e o material restante foi diluído em CH_2Cl_2 . E outro balão 64,2 mg de ureia (1,07 mmol, 1,1 equiv.) foram dissolvidos em 1 mL de acetonitrila. Posteriormente o cloreto de ácido foi transferido gota-a-gota para o balão com a ureia. Após a transferência o material foi refluxado por 2h, e o precipitado branco formado foi separado por filtração e recristalizado rendendo:

Rendimento: 0,1036 g (43%)

^1H RMN (300 MHz, DMSO- D_6) 10,55 (s, 1H), 7,96 a 7,85 (m, 4H), 4,42 (s, 2H).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- D_6) 168,9, 167,8, 153,6, 135,2, 132,0, 123,8.

HRMS calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 248,0666, encontrado m/z 248,0665.

N-carbamoil-2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)acetamida (**69**)

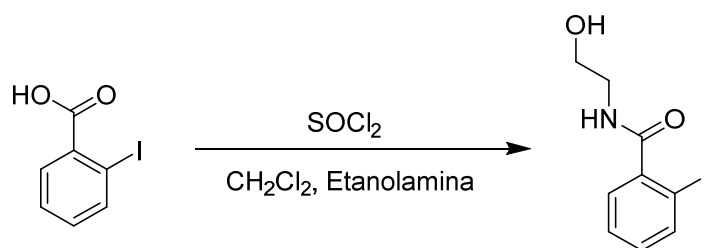
Em um balão de fundo cônico, 1,00 g da substância **66** (ftalil-glicina) (4,87 mmol) foram adicionadas e dissolvidas em 2,1 mL de SOCl₂ (29,2 mmol, 6 equiv.). A mistura foi aquecida a 90 °C por 2 horas. Após este tempo o SOCl₂ foi evaporado e o material restante foi diluído em CH₂Cl₂. E outro balão 0,741 g de tioureia (9,74 mmol, 2 equiv.) foram dissolvidos em 5 mL de acetonitrila. Posteriormente o cloreto de ácido foi transferido gota-a-gota para o balão com a ureia. Após a transferência o material foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 72h. O precipitado branco formado foi separado por filtração e recristalizado rendendo:

Rendimento: 0,1643 g (13%)

¹H RMN (300 MHz, DMSO-D₆) 11,53 (s, 1H), 9,51 (s, 1H), 9,32 (s, 1H), 7,92 (s, 2H), 7,90 (s, 2H), 4,49 (s, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-D₆) 181,5, 168,2, 167,7, 135,3, 131,9, 123,9, 40,9,

HRMS calculado para C₁₁H₁₀N₃O₃S [M+H]⁺ *m/z* 264,0437, encontrado *m/z* 264,0443.

N-(2-hidroxi-etil)-2-iodobenzamida (**73**)

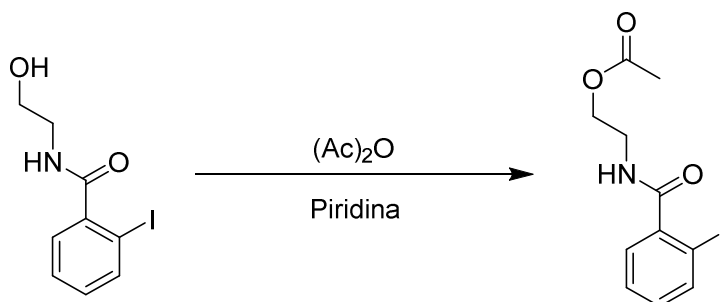
Em um balão de fundo redondo foi adicionado 6,0 g de ácido 2-iodobenzoico (24,2 mmol) e a ele foi adicionado 6 mL de cloreto de tionila. A mistura foi refluxada por 2 horas. Depois, o cloreto de tionila foi evaporado em rota-evaporador e o cloreto de ácido formado foi diluído com 10 mL de CH₂Cl₂ e refrigerado a -10 °C. Esta solução foi então transferida gota a gota a uma solução de etanolamina 2,1 mL em 30 mL de CH₂Cl₂ (34,8 mmol). Após 10 minutos sob agitação, o precipitado branco formado foi filtrado e lavado com CH₂Cl₂, rendendo um sólido branco perolado:

Rendimento: 5,43 g (77%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (d, *J* 7,9 Hz, 1H), 7,29 a 7,27 (m, 2H), 7,03 (ddd, *J* 2,8/6,2/7,9 Hz, 1H), 3,66 (t, *J* 5,2 Hz, 2H), 3,42 (t, *J* 5,2 Hz, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 170,6, 141,8, 139,6, 131,1, 128,1, 128,0, 92,6, 61,0, 42,6.

HRMS calculado para C₉H₁₀INO₂ [M+H]⁺ *m/z* 290,9756, encontrado *m/z* 291,9833.

2-(2-iodobenzamido)etil acetato (**74**)

Em um balão de fundo redondo com 2 ml de piridina previamente seca com peneira molecular 3Å, foi adicionado (71) 0,4 g (1,37 mmol). Após foi adicionado 0,52 mL de anidrido acético (5,48 mmol). A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente a mistura foi submetida a uma partição líquido: líquido com AcOEt água, a fração orgânica foi lavada três vezes com água, seca com sulfato de sódio e o solvente removido em rota-evaporador. Rendendo um sólido branco perolado com odor aromático:

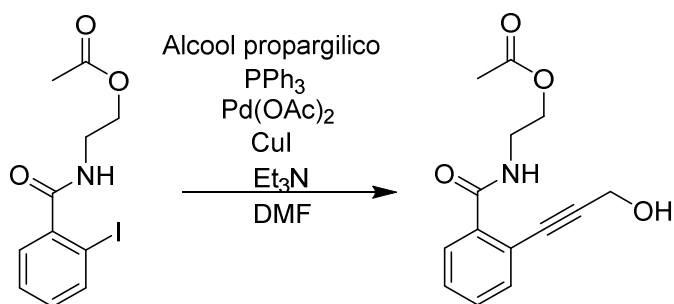
Rendimento: 0,33 g (73%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,86 (d, *J* 8,01 Hz, 1H), 7,38 (d, *J* 4,30 Hz, 2H), 7,11 (m, 1H), 4,29 (t, *J* 5,1 Hz, 2H), 3,72 (q, *J* 5,6 Hz, 2H), 2,09 (s, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 171,1, 169,5, 141,9, 139,9, 131,3, 128,3, 128,2, 92,4, 63,1, 39,2, 21,0.

HRMS calculado para C₁₁H₁₃INO₃ [M+H]⁺ *m/z* 333,9953, encontrado *m/z* 333,9946.

2-(2-(3-hidroxiprop-1-in-1-il)benzamido)etil acetato (75)

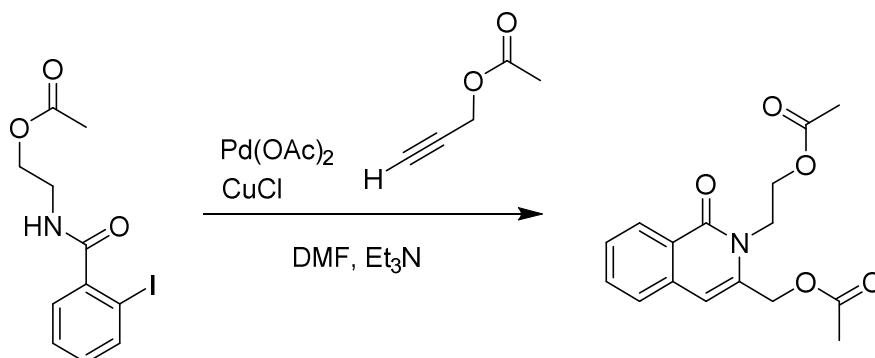


A um balão de fundo redondo sob atmosfera de argônio e equipado com uma barra magnética, foi adicionado o acetato de paládio (II) 3,3 mg (0,015 mmol) a trifetilfosfina 9,38 mg (0,037 mmol), DMF 5 ml e trietilamina 1 ml (7,5 mmol). A mistura foi mantida sob agitação por 5 min. Após isso, foi adicionada a iodo-benzamida (74) 0,5g (1,5 mmol) e a mistura foi agitada até a total dissolução do material de partida. Posteriormente foi adicionado o iodeto de cobre (I) 5,71 mg (0,03 mmol), e finalmente o álcool propargílico 0,126 mL (2,25 mmol) gota a gota, e a reação foi aquecida a 120 °C e mantida nesta temperatura por 1,5 h. Após o arrefecimento foi adicionada água à reação e o conteúdo foi particionado com AcOEt. As frações orgânicas combinadas foram secas em Na₂SO₄ e o solvente foi removido em rota-evaporador. A fração obtida foi aplicada a uma coluna de sílica-gel em um gradiente de 30 a 90% acetona em hexanos, resultando em um produto levemente amarelado na forma de gel:

Rendimento: 0,247 mg (63%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,83 (dd, *J* 3,6/5,7 Hz, 1H), 7,44 (dd, *J* 2,4/6,7 Hz, 1H), 7,38 a 7,34 (m, 2H), 4,47 (s, 1H), 4,26 (t, *J* 5,4 Hz, 2H), 3,70 (q, *J* 5,6 Hz, 2H), 2,93 (s, 2H), 2,84 (s, 2H), 2,06 (s, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 171,5, 167,3, 135,8, 133,4, 130,5, 129,2, 128,7, 119,5, 94,3, 83,0, 63,1, 51,0, 39,2, 20,8.

(2-(2-acetoxietil)-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-3-il)metil acetato (76)

Em um balão seco e em atmosfera de argônio foi adicionada a benzamida 74 0,2g (0,6 mmol), juntamente com o acetato de paládio (II) 4,7 mg (0,21 mmol) e o cloreto de cobre (I) 0,237 g (2,4 mmol). 3 mL de dimetilformamida foram adicionados e posteriormente 0,335 mL de trietilamina (2,4 mmol). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 15 minutos, e então foi adicionado o acetato de propargila 0,116 mL (1,2 mmol). A mistura foi mantida sob agitação a 100 °C por 16 horas. Após o arrefecimento a mistura foi submetida à partição líquido : líquido com AcOEt e água, a fração orgânica foi seca em sulfato de sódio e o solvente removido em rota-evaporador. A mistura foi submetida à uma coluna de sílica gel em um gradiente de 0 a 100% de AcOEt em hexano, resultando em um sólido amarelado:

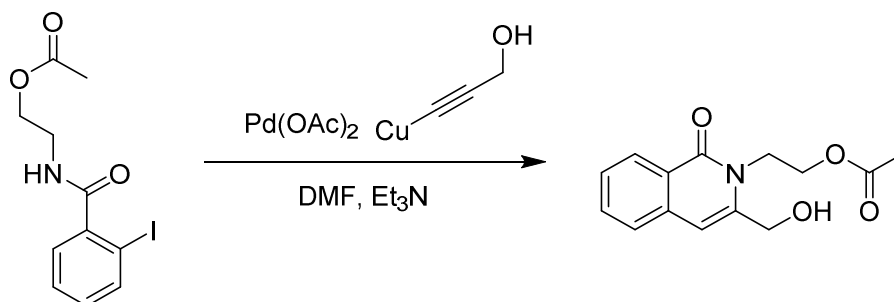
Rendimento: 5 mg (3%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,43 a 8,38 (m, 1H), 7,67 (ddd, *J* 1,4/7,0/8,1 Hz, 1H), 7,56 a 7,49 (m, 2H) 6,65 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,25 (t, *J* 4,3 Hz, 2H), 4,08 (t, *J* 4,3 Hz, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,06 (s, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 170,6, 170,2, 162,9, 136,3, 135,8, 135,7, 127,9, 127,6, 126,2, 125,6, 109,5, 77,2, 63,3, 62,0, 42,9, 20,9, 20,8.

HRMS calculado para C₁₆H₁₇NO₅ [M+H]⁺ *m/z* 304,1179, encontrado *m/z* 304,1177.

2-(3-(hidroximetil)-1-oxoisoquinolin-2(1H)-il)etil acetato (77)



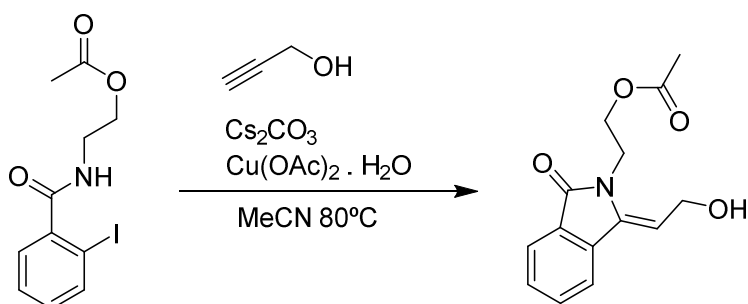
Em um balão seco em atmosfera de argônio foi adicionada a benzamida (72) 0,15 g (0,45 mmol), 3 mL de dimetilformamida previamente seca, acetato de paládio II (10 mol%) e trietilamina 63 μ L (0,45 mmol). A mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos e após foi adicionado o recém produzido acetileto de cobre 0,0641 g (54,0 mmol). A mistura foi aquecida a 100 °C por 72 horas. Após o arrefecimento o solvente foi evaporado e feita uma partição líquido: líquido com AcOEt e água. A fração orgânica foi seca em sulfato de sódio e submetida a uma coluna de sílica gel em gradiente de 0 a 100% de AcOEt em hexano, rendendo um óleo amarelado:

Rendimento: 11,3 mg (9%).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,36 (d, J 8,1 Hz, 1H), 7,63 (t, J 7,1 Hz, 1H), 7,51 a 7,43 (m, 2H), 6,56 (s, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,45 (t, J 4,1 Hz, 2H), 4,44 (t, J 4,1 Hz, 2H), 2,04 (s, 3H).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 171,0, 141,0, 132,6, 127,8, 127,1, 126,0, 125,2, 107,4, 62,8, 62,1, 42,5, 29,7, 20,8.

HRMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 262,1074, encontrado m/z 262,1071.

(Z)-2-(3-(2-hidroxiethylideno)-isoindolin-1-ona)-etil acetato (**80**)

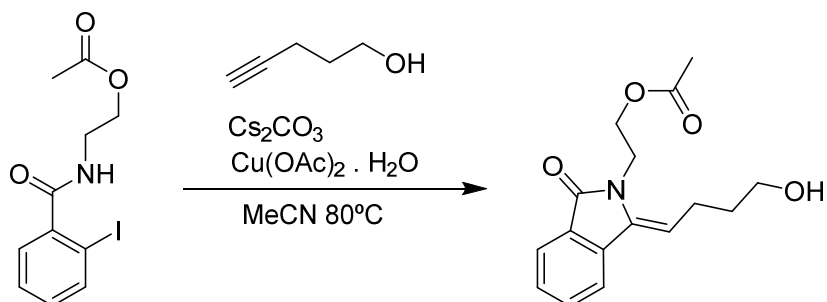
Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de argônio e equipado com uma barra magnética foi adicionado 2g da benzamida 74 (6,0 mmol), 3,91g de carbonato de céσιο (12,0 mmol) e 0,59 g de acetato de cobre(II) monohidratado (3 mmol). Os sólidos foram misturados e dissolvidos em 50 mL de acetonitrila previamente seca em peneira molecular de 3 Å. Após a dissolução dos materiais de partida sólidos o álcool propargílico foi adicionado gota a gota e a reação (0,51 mL, 9 mmol) foi aquecida a 80°C por 6 h. Após o arrefecimento o sólido foi filtrado e lavado com acetonitrila, o sobrenadante obtido foi concentrado em rota-evaporador e particionado com água: CH_2Cl_2 . A fração orgânica foi submetida a uma coluna de sílica-gel em gradiente de 50 a 100% AcOEt em hexanos resultando em um produto sólido levemente amarelado:

Rendimento: 0,131 g (8%)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,77 (ddd, J 0,8/0,9/7,4 Hz, 1H), 7,59 (ddd, J 0,8/0,9/7,8 Hz, 1H), 7,52 (ddd, J 1,2/7,3/7,7 Hz, 1H), 7,42 (ddd, J 1,2/7,3/7,4 Hz, 1H), 5,83 (t, J 7,4 Hz, 1H), 4,63 (d, J 7,4 Hz, 1H), 4,31 a 4,26 (m, 2H), 4,21 a 4,15 (m, 2H), 1,99 (s, 3H).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 171,0, 168,4, 137,8, 135,2, 132,16, 129,1, 127,8, 123,1, 119,3, 106,0, 62,0, 56,8, 40,1, 20,7.

HRMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 262,1079 encontrado m/z 262,1071.

(Z)-2-(3-(2-hidroxitilideno)-isoindolin-1-ona)-etil acetato (**81**)

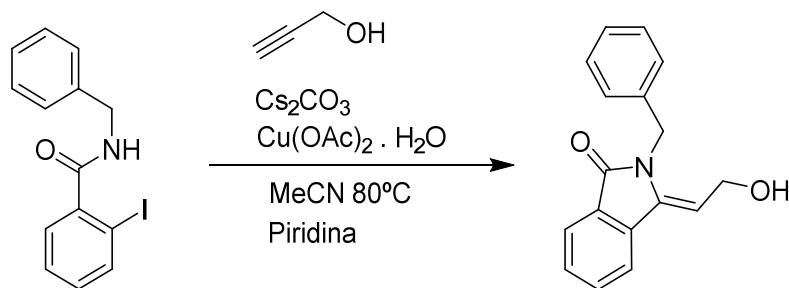
Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de argônio e equipado com uma barra magnética foi adicionado 1g da benzamida 74 (3,0 mmol), 1,91g de carbonato de céscio (6,0 mmol) e 0,30 g de acetato de cobre(II) monohidratado (1,5 mmol). Os sólidos foram misturados e dissolvidos em 25 mL de acetonitrila previamente seca em peneira molecular de 3 Å. Após a dissolução dos materiais de partida sólidos o 4-pentín-1-ol foi adicionado gota a gota e a reação (0,41 mL, 4,5 mmol) foi aquecida a 80 °C por 5 h. Após o arrefecimento o sólido foi filtrado e lavado com acetonitrila, o sobrenadante obtido foi concentrado em rota-evaporador e particionado com água:CH₂Cl₂. A fração orgânica foi submetida a uma coluna de sílica-gel em gradiente de 30 a 100% AcOEt em hexanos resultando em um produto sólido levemente amarelado:

Rendimento: 0,111 g (12%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (ddd *J* 0,8/1,1/7,5 Hz, 1H), 7,59 (dd, *J* 0,8/0,9/7,7 Hz, 1H), 7,51 (ddd, *J* 1,2/7,7/7,3 Hz, 1H), 7,39 (ddd, *J* 1,1/7,3/7,5 Hz, 1H), 5,58 (t, *J* 7,8 Hz, 1H), 4,19 a 4,09 (m, 4H), 3,86 (t, *J* 6,0 Hz, 2H), 2,66 (q, *J* 7,6 Hz, 2H), 2,05 (s, 3H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 171,3, 169,1, 137,9, 134,4, 131,8, 128,4, 127,5, 122,8, 118,8, 107,6 63,5, 61,1, 43,8, 29,4, 23,2, 20,9.

HRMS calculado para C₁₆H₁₉NO₄ [M+H]⁺ *m/z* 290,1387 encontrado *m/z* 290,1407.

(Z)-2-benzil-3-(2-hidroxietilideno)-isoindolin-1-ona (**83**)

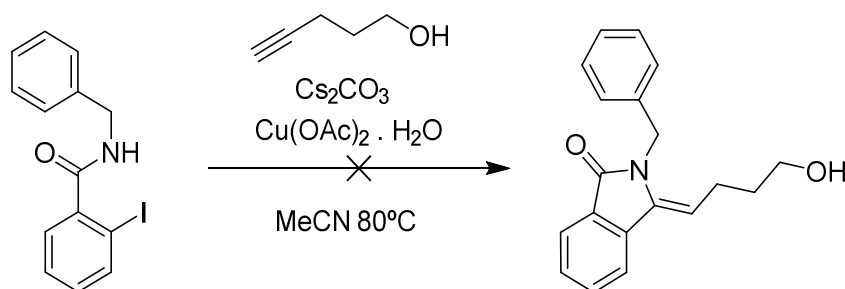
Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de argônio e equipado com uma barra magnética foi adicionado 1g da benzamida **82** (2,9 mmol), 1,93 g de carbonato de céscio (5,9 mmol) e 0,29 g de acetato de cobre(II) monohidratado (1,5 mmol). Os sólidos foram misturados e dissolvidos em 25 mL de acetonitrila previamente seca em peneira molecular de 3 Å. Após a dissolução dos materiais de partida sólidos foi adicionado 0,05 mL de piridina (0,6 mmol), o álcool propargílico foi adicionado gota a gota (0,26 mL, 4,4 mmol) e a reação foi aquecida a 80 °C por 6 h. Após o arrefecimento o sólido foi filtrado e lavado com acetonitrila, o sobrenadante obtido foi concentrado em rota-evaporador e particionado com água:CH₂Cl₂. A fração orgânica foi submetida a uma coluna de sílica-gel em gradiente de 20 a 100% AcOEt em hexanos resultando em um produto sólido levemente amarelado

Rendimento: 0,082 g (10%)

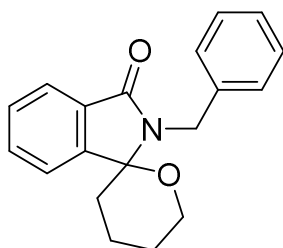
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,86 a 7,77 (m, 2 H), 7,63 (ddd, *J* 1,0/7,4/7,6 Hz, 1H), 7,52 (ddd, 0,8/7,4/ 7,5 Hz, 1H), 7,34 a 7,27 (m, 2H), 7,25 a 7,21 (m, 1H), 7,11 (d, *J* 7,6 Hz, 2H), 5,91 (t, *J* 7,0 Hz, 1H), 5,19 (s, 2H), 4,26 (d, *J* 7,0 Hz, 2H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 168,8, 137,83, 137,5, 134,4, 132,4, 128,9, 128,6, 127,5, 126,9, 125,2, 122,6, 119,4, 108,4, 56,2, 44,2.

HRMS calculado para C₁₇H₁₅NO₂ [M+H]⁺ *m/z* 266,1176 encontrado *m/z* 266,1186.

(Z)-2-benzil-3-(2-hidroxibutilideno)-isoindolin-1-ona (**84**)

Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de argônio e equipado com uma barra magnética foi adicionado 1g da benzamida **82** (2,9 mmol), 1,93 g de carbonato de céσιο (5,9 mmol) e 0,29 g de acetato de cobre(II) monohidratado (1,5 mmol). Os sólidos foram misturados e dissolvidos em 25 mL de acetonitrila previamente seca em peneira molecular de 3 Å. Após a dissolução dos materiais de partida sólidos foi adicionado 0,05 mL de piridina (0,6 mmol), o 4-pentin-1-ol foi adicionado gota a gota (0,41 mL, 4,4 mmol) e a reação foi aquecida a 80 °C por 6 h. Após o arrefecimento o sólido foi filtrado e lavado com acetonitrila, o sobrenadante obtido foi concentrado em rota-evaporador e particionado com água:CH₂Cl₂. A fração orgânica foi submetida a uma coluna de sílica-gel em gradiente de 20 a 100% AcOEt em hexanos resultando em um produto sólido branco, após a elucidação estrutural o produto obtido foi identificado sendo subproduto da reação:

2-benzil-3',4',5',6'-tetrahidrospiro[isoindolin-1,2'-piran]-3-ona (**85**)

Rendimento: 0,0308 g (4%)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (ddd, *J* 0,64/4,6/4,8 Hz, 1H), 7,85 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,54 (m, 1H), 7,36 (d, *J* 7,5 Hz, 2H), 7,30 (ddd, *J* 7,5/7,1/1,2 Hz, 2H), 7,23 (d, *J* 7,12 Hz, 1H) 5,05 (d, *J* 16,1 Hz, 1H), 4,53 (d, *J* 16,1 Hz, 1H), 4,13 (dd, *J* 12,1/15,0 Hz, 1H), 4,01 (m, 1H), 2,14 (m, 1H), 2,00 (dd, *J* 4,2/13,2 Hz, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,66 (dd, *J* 4,2/ 8,0 Hz, 1H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 167,5, 146,4, 138,9, 131,4, 131,3, 129,3, 128,9, 127,3, 126,9, 124,2, 123,3, 90,0, 64,6, 42,3, 32,0, 24,6, 20,1.

HRMS calculado para C₁₉H₁₉NO₂ [M+H]⁺ *m/z* 294,1489 encontrado *m/z* 294,1501.

5.5 ANCORAMENTO MOLECULAR

5.5.1 PREPARO DO SITIO DE LIGAÇÃO CB1 / CB2

A estruturas cristalinas utilizadas para a simulação de ancoramento molecular foram para CB1 (PDB: 5XRA) Estrutura do receptor canabinoide tipo 1 em complexo com o agonista AM11542 (HUA et al., 2017) e para CB2 (PDB: 6PT0) Estrutura do receptor canabinoide tipo 2 em complexo com o agonista WIN55,212-2 (XING et al., 2020). O preparo dos sítios de ligação foi feito usando o software GOLD 2020.0.2.0 (CCDC) (COLE; NISSINK; TAYLOR, 2005; JONES et al., 1997). O preparo consistiu na adição dos hidrogênios, remoção de moléculas de água e os ligantes presentes no sítio de ligação, os ligantes de interesse foram salvos separadamente para a validação do modelo de ancoramento molecular. O sítio de ligação foi definido com o posicionamento dos ligantes de interesse na estrutura cristalina com a adição de um raio de tolerância de 7 Å.

5.5.2 OTIMIZAÇÃO DE GEOMETRIA DOS LIGANTES

Todas as estruturas submetidas a simulação de ancoramento molecular foram desenhadas utilizando o software Avogadro (Version 1.2.0) (HANWELL et al., 2012) para a determinação das coordenadas cartesianas iniciais de cada átomo, a geometria das moléculas foi então submetida a relaxamento e minimização energética utilizando o método semiempírico AM1 com o software ORCA (version 4.2.0) (NEESE, 2012, 2018), utilizando as palavras chave: ! AM1 def2-SVP OPT FREQ. O cálculo de frequências realizado após a otimização da geometria no mínimo energético foi feito para avaliar possíveis frequências imaginárias que seriam relacionadas com inconsistências no cálculo ou estados de transição.

5.5.3 SIMULAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ANCORAMENTO MOLECULAR

Os parâmetros de simulação foram definidos após uma breve comparação entre os resultados obtidos com as outras funções de *scoring* disponibilizadas pelo programa,

escolheu-se a função Goldscore, os ligantes com máxima flexibilidade e o algoritmo de busca definido com eficiência de 200% na expectativa de obter o maior número de poses possíveis, com 10 GA runs e grid de 8 Å.

A validação do modelo consistiu no re-ancoramento dos ligantes cristalográficos nativos de cada proteína, juntamente com a inspeção visual do posicionamento da estrutura dos ligantes nativos que passaram pela otimização de geometria. A avaliação do método se deu pela comparação da pose encontrada para cada ligante de referência e o valor de RMSD encontrado quando a geometria do ligante calculado foi comparada com a geometria do ligante nativo.

Os dados obtidos da validação podem ser vistos na tabela 6 apresentada na seção de resultados e discussão.

Os valores de RMSD obtidos abaixo de 1Å, indicam que o modelo conseguiu encontrar efetivamente a conformação preferencial dos ligantes nativos, garantindo assim a validade do modelo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. G.; FOTSCH, C.; BABIJ, P. Emerging targets in osteoporosis disease modification. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4332–4353, 2010.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.

ALVES, J. E. D. O. et al. Mecanismos Fisiopatológicos Da Nocicepção E Bases Da Analgesia Perioperatória Em Pequenos Animais. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 56, 2017.

ATWOOD, B. K.; STRAIKER, A.; MACKIE, K. CB2: Therapeutic target-in-waiting. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 16–20, jul. 2012.

BARON, E. P. Comprehensive Review of Medicinal Marijuana, Cannabinoids, and Therapeutic Implications in Medicine and Headache: What a Long Strange Trip It's Been **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 55, n. 6, p. 885–916, 2015.

BASU, S.; DITTEL, B. N. Unraveling the Complexities of Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Immune Regulation in Health and Disease Sreemanti. **Immunologic Research**, v. 51, n. 1, p. 26–38, 2011.

BOSIER, B. et al. **Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities** **Biochemical Pharmacology**, jul. 2010.

CHARY, R. G. et al. A simple access to N-(un)substituted isoquinolin-1(2H)-ones: unusual formation of regioisomeric isoquinolin-1(4H)-ones. **Chemical Communications**, v. 50, n. 51, p. 6797–6800, 30 maio 2014.

CHEN, C. Y. et al. Investigation of condensation products of aldehydes with acetoacetic ester catalyzed by organic bases: Absolute configuration determination by X-ray crystallography and tautomeric equilibria studies by NMR spectroscopy. **Research on Chemical Intermediates**, v. 41, n. 8, p. 5769–5780, 2 ago. 2015.

CHEN, Y. C. Beware of docking! **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 78–95, 2015.

CHOO, E. K.; EWING, S. W. F.; LOVEJOY, T. I. Opioids Out, Cannabis in negotiating the unknowns in patient care for chronic pain. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 316, n. 17, p. 1763–1764, 2016.

CITTI, C. et al. A novel phytocannabinoid isolated from *Cannabis sativa* L. with an in vivo cannabimimetic activity higher than Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Δ^9 -Tetrahydrocannabiphorol. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

COLE, J.; NISSINK, J.; TAYLOR, R. Protein-ligand docking and virtual screening with GOLD. **Virtual Screening in Drug Discovery**, p. 379–415, 1 jan. 2005.

CORREA, F. et al. Activation of cannabinoid CB 2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: Role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 441–448, jun. 2005.

CORREA, F. et al. A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 1, p. 86–100, 1 jan. 2009.

DESAI, N. H. P. et al. Antifungal activity and synergy studies of polysubstituted alicyclic analogues. **International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science**, v. 3, n. 4, p. 14–31, 2014.

DEVANE, W. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 18 dez. 1992.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605–613, 1988.

DI MARZO, V.; FONTANA, A. **Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: “Killing two birds with one stone”** Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1995.

EGERTOVA, M. et al. A new perspective on cannabinoid signalling: Complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1410, p. 2081–2085, 1998.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology** 2019 7:2, v. 7, n. 2, p. 83–89, 4 jun. 2019.

FITZPATRICK, J. M. K.; DOWNER, E. J. Toll-like receptor signalling as a cannabinoid target in Multiple Sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 618–626, 1 fev. 2017.

GAGNE, S. J. et al. Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 31, p. 12811–12816, 2012.

GALANOPOULOU, A. S. et al. Identification of new epilepsy treatments: Issues in preclinical methodology. **Epilepsia**, v. 53, n. 3, p. 571–582, 2012.

GAONI, Y. et al. The Isolation and Structure of Δ -Tetrahydrocannabinol and Other Neutral Cannabinoids from Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 1, p. 217–224, 1971.

GAOZZA, C. H.; GRINBERG, H.; LAMDAN, S. Heterocycles derived from the condensation of 1,3-propanediamine with phthalic acid derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 883–886, ago. 1972.

GERTSCH, J. Antiinflammatory cannabinoids in diet – towards a better understanding of CB2 receptor action? <http://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?journalCode=kcib20&page=instructions>, v. 1, n. 1, p. 26–28, jul. 2008.

GOOTJES, J.; NAUTA, W. TH. Derivatives of benzo- and indolo-quinolizines: I Synthesis of 2-substituted hexahydro-2H-benzo[a]quinolizines and octahydroindolo[2,3-a]quinolizines from substituted glutaric acids. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 84, n. 9, p. 1183–1199, 2 set. 2010.

HAMMOND, B. et al. The Challenge of New Psychoactive Substances. **UNODC Global SMART Programme**, 2013.

HANTZSCH, A. Versuche zur Constitutionsbestimmung der synthetischen Hydropyridinderivate. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 18, n. 2, p. 2579–2586, 1 jul. 1885.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, p. 1–17, 13 ago. 2012.

HEMA, R. et al. *c*-5-Hydroxy-*r*-2, *c*-4-bis(isopropoxycarbonyl)-*t*-5-methyl-*t*-3-phenylcyclohexanone. **Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online**, v. 62, n. 2, p. o703–o705, 15 fev. 2006.

HORNING, E. C.; FIELD, R. E. Synthesis of 3-Methyl-5-(*p*-methoxyphenyl)-4-carbethoxy-2-cyclohexen-1-one. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 3, p. 387–389, 1 mar. 2002.

HUA, T. et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB 1. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 750- 762.e14, 2016.

HUA, T. et al. Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB 1. **Nature**, v. 547, n. 7664, p. 468–471, 2017.

ISAAC, S.; SAINI, B.; CHAAR, B. B. The role of medicinal cannabis in clinical therapy: Pharmacists' perspectives. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 4 abr. 1997.

KANG, S. et al. Efficient preparation method of 4-hydroxybenzoic esters – Oxidation of substituted Hagemman's ester. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 23, p. 2264–2266, 7 jun. 2017.

KIM, S. H. et al. Base-Mediated Aerobic Oxidation of Hagemann's Ester: Competitive Hydroxylation at C-1 and C-3 Positions. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 5, p. 1725–1728, 20 maio 2011.

KINGSBURY, C. A.; EGAN, R. A.; PERUN, T. J. Structures and reactions of condensation products of benzaldehyde and acetoacetic ester. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 2913–2918, 1970.

KOCHAROV, S. L. et al. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some Cyclohexanone Derivatives – Knoevenagel Condensation Products. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 9, p. 897–903, 1 dez. 2020a.

KOCHAROV, S. L. et al. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some Cyclohexanone Derivatives – Knoevenagel Condensation Products. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 9, p. 897–903, 1 dez. 2020b.

KOMOROWSKA-MÜLLER, J. A.; SCHMÖLE, A. C. CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. **International Journal of Molecular Sciences** **2021, Vol. 22, Page 19**, v. 22, n. 1, p. 19, 22 dez. 2020.

KUDDUS, M.; GINAWI, I. A. M.; AL-HAZIMI, A. Cannabis sativa: An ancient wild edible plant of India. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 10, p. 736–745, 2013.

KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis - Negishi Cross Coupling. **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis**, p. 310, 2005.

LANDE, A. The Single Convention on Narcotic Drugs, 1961. **International Organization**, v. 16, n. 4, p. 776–797, 22 maio 1962.

LI, X. et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 459–467.e13, 2019a.

LI, X. et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 459–467.e13, 24 jan. 2019b.

LIU, R. et al. Tunable Synthesis of 3-Hydroxyisoquinolin-1,4-dione and Isoquinolin-1-one Enabled by Copper-Catalyzed Radical 6- *endo* Aza-cyclization of 2-Alkynylbenzamide. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, n. 18, p. 11763–11773, 20 set. 2019.

LOU, Z. Y. et al. Targeting CB2 receptor as a neuroinflammatory modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Molecular Immunology**, v. 49, n. 3, p. 453–461, 1 dez. 2011.

LUBSCHINSKI, T. L. et al. Effect of Aryl-Cyclohexanones and their Derivatives on Macrophage Polarization In Vitro. **Inflammation 2022**, p. 1–19, 5 mar. 2022.

LYNCH, J. J. et al. Potential functional and pathological side effects related to off-target pharmacological activity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 87, p. 108–126, 1 set. 2017.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 299–325, 2005.

MAROON, J.; BOST, J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. **Surgical Neurology International**, v. 9, n. 1, p. 91, 2018.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish-I. The structure of Cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073–2078, 1963.

MILENI, M. et al. Crystal structure of fatty acid amide hydrolase bound to the carbamate inhibitor URB597: Discovery of a deacylating water molecule and insight into enzyme inactivation. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 4, p. 743–754, 2010.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NAGARAJAN, S. R. et al. **Heteroarylalkanoic acids as integrin receptor antagonists** Google Patents, , 23 ago. 2005.

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, jan. 2012.

NEESE, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2018.

NEWTON-HOWES, G.; MCBRIDE, S. Medicinal cannabis: Moving the debate forward. **New Zealand Medical Journal**, v. 129, n. 1445, p. 103–109, 2016.

NIESINK, R. J. M.; VAN LAAR, M. W. Does Cannabidiol Protect Against Adverse Psychological Effects of THC? **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, n. October, p. 1–8, 2013.

NIMMRICH, V.; GROSS, G. P/Q-type calcium channel modulators. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 4, p. 741–759, 2012.

ONAIWI, E. S. et al. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: From mice to human subjects. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, 2008.

PANDIARAJAN, K. et al. Synthesis and NMR spectral study of some t(3)-aryl-r(2),c(4)- bisethoxycarbonyl-t(5)-hydroxy-c(5)-methylcyclohexanones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 430–434, maio 2005.

PATRA, T. et al. Copper mediated decarboxylative direct C–H arylation of heteroarenes with benzoic acids. **Chemical Communications**, v. 52, n. 7, p. 1432–1435, 14 jan. 2016.

PEARLMAN, D. A.; CHARIFSON, P. S. Expedited Articles Improved Scoring of Ligand-Protein Interactions Using OWFEG Free Energy Grids. **J. Med. Chem**, v. 42, p. 4313, 1999.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. Suppl 1, p. S163, jan. 2006.

PETRELLA, C. et al. Cannabinoid agonist WIN55,212 in vitro inhibits interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) release by rat pancreatic acini and in vivo induces dual effects on the course of acute pancreatitis. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 11, p. 1248–e323, 1 nov. 2010.

PETROV, R. R. et al. Mastering tricyclic ring systems for desirable functional cannabinoid activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 881–907, 2013.

POLLO, L. A. E. et al. Synthesis and in vitro evaluation of Ca²⁺ channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*: SAR analysis. **Parasitology International**, v. 66, n. 6, p. 789–797, 2017.

RAMACHARY, D. B.; RAMAKUMAR, K.; NARAYANA, V. V. Organocatalytic cascade reactions based on push-pull dienamine platform: Synthesis of highly substituted anilines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 1458–1463, 16 fev. 2007.

ROBSON, P. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids was appointed Medical Director of. **The British Journal of Psychiatry**, v. 178, p. 107–115, 1996.

ROSENBAUM, C. D.; CARREIRO, S. P.; BABU, K. M. Here Today, Gone Tomorrow. and Back Again? A Review of Herbal Marijuana Alternatives (K2, Spice), Synthetic Cathinones (Bath Salts), Kratom, *Salvia divinorum*, Methoxetamine, and Piperazines. **Journal of Medical Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 15–32, 2012.

RUBIN, V. **Cannabis and culture**. [s.l.] Walter de Gruyter, 2011.

SAINI, H. K. et al. Sequential Copper-Catalyzed Sonogashira Coupling, Hydroamination and Palladium-Catalyzed Intramolecular Direct Arylation: Synthesis of Azepino-Fused Isoindolinones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2017, n. 48, p. 7277–7282, 29 dez. 2017.

SAM, A. H.; SALEM, V.; GHATEI, M. A. Rimonabant: From RIO to Ban. **Journal of Obesity**, v. 2011, 2011.

SCHLOSBERG, J. E.; KINSEY, S. G.; LICHTMAN, A. H. Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. **AAPS Journal**, v. 11, n. 1, p. 39–44, 2009.

SCHOEDER, C. T. et al. Pharmacological evaluation of new constituents of “Spice”: synthetic cannabinoids based on indole, indazole, benzimidazole and carbazole scaffolds. **Forensic Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 385–403, 2018.

SHAO, Z. et al. High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 602–606, 2016.

SONG, Y. K. et al. Palladium-Catalyzed Tandem γ -Arylation/Aromatization of Cyclohex-2-En-1-One Derivatives: A Route to 3,4-Dihydroanthracen-1(2H)-Ones. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 363, n. 12, p. 3001–3005, 21 jun. 2021.

SZKATUŁA, D. et al. Bioresearch of New 1H-pyrrolo[3,4-c]pyridine-1,3(2H)-diones. **Molecules** 2020, Vol. 25, Page 5883, v. 25, n. 24, p. 5883, 12 dez. 2020.

TANAKA, M. et al. Anti-Inflammatory Effects by Pharmacological Inhibition or Knockdown of Fatty Acid Amide Hydrolase in BV2 Microglial Cells. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 491, 22 maio 2019.

TOMAR, S. et al. Protective Role of Cannabinoid Receptor 2 Activation in Galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Failure through Regulation of Macrophage Polarization and MicroRNAs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 353, n. 2, p. 369–379, 1 maio 2015.

WILEY, J. L.; MARUSICH, J. A.; HUFFMAN, J. W. Moving around the molecule: Relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. **Life Sciences**, v. 97, n. 1, p. 55–63, 2014.

WRIGHT, Q. The Opium Conferences. **The American Journal of International Law**, v. 19, n. 3, p. 559, jul. 1925.

WROBLESKI, S. T. et al. Rational design and synthesis of an orally active indolopyridone as a novel conformationally constrained cannabinoid ligand possessing antiinflammatory properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 2110–2116, 2003.

XIANG, Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, n. 3, p. 217–227, 2006.

XIE, X. Q.; CHEN, J. Z.; BILLINGS, E. M. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 53, n. 2, p. 307–319, 1 nov. 2003.

XING, C. et al. Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2-Gi Signaling Complex. **Cell**, p. 1–10, 2020.

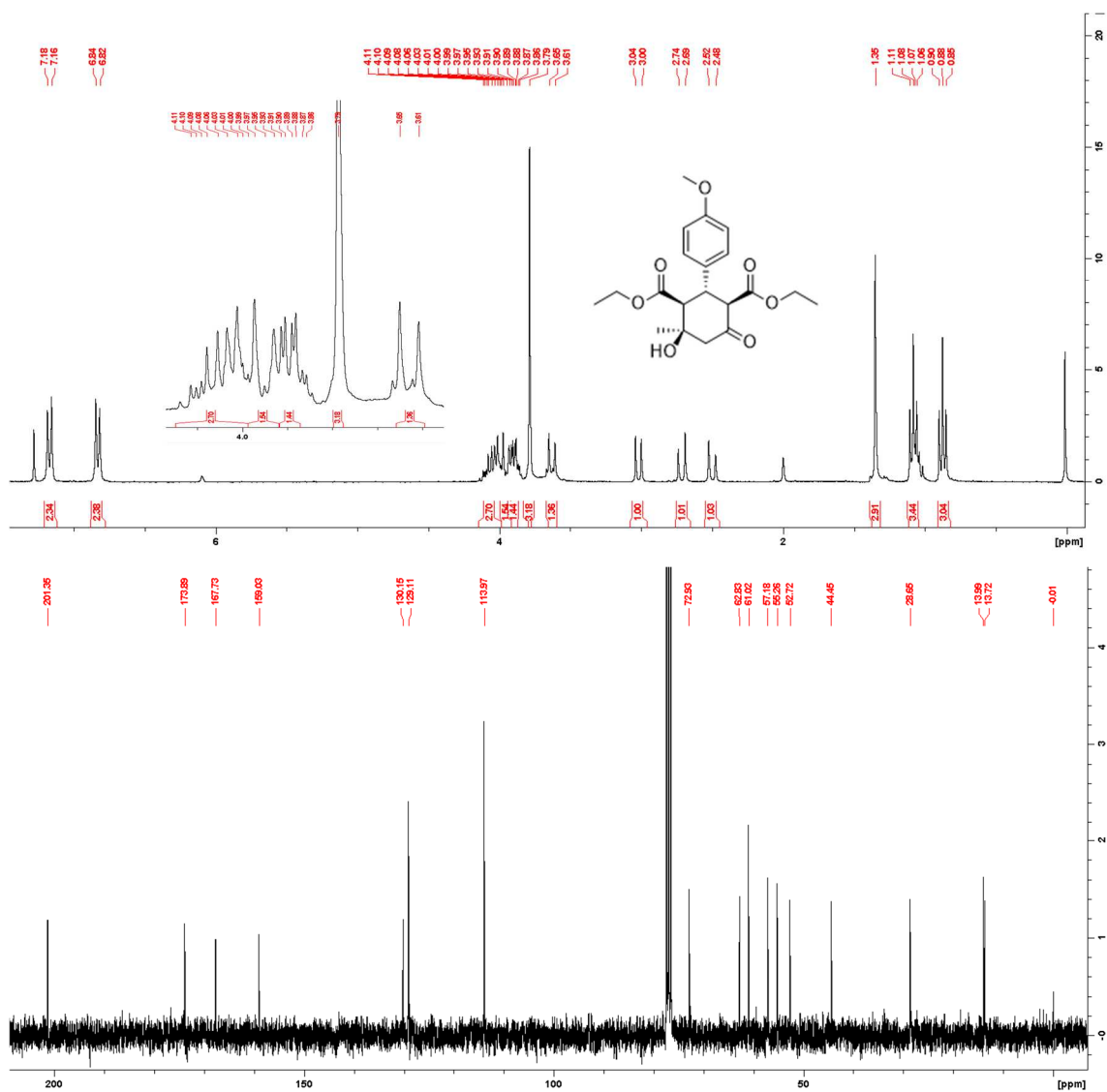
YANO, H. et al. Positive Allosteric Modulation of the 5-HT1A Receptor by Indole-Based Synthetic Cannabinoids Abused by Humans. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 1400–1405, 20 maio 2020.

ZHOU, D. et al. Macrophage polarization and function: new prospects for fibrotic disease. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n. 10, p. 864–869, 1 nov. 2017.

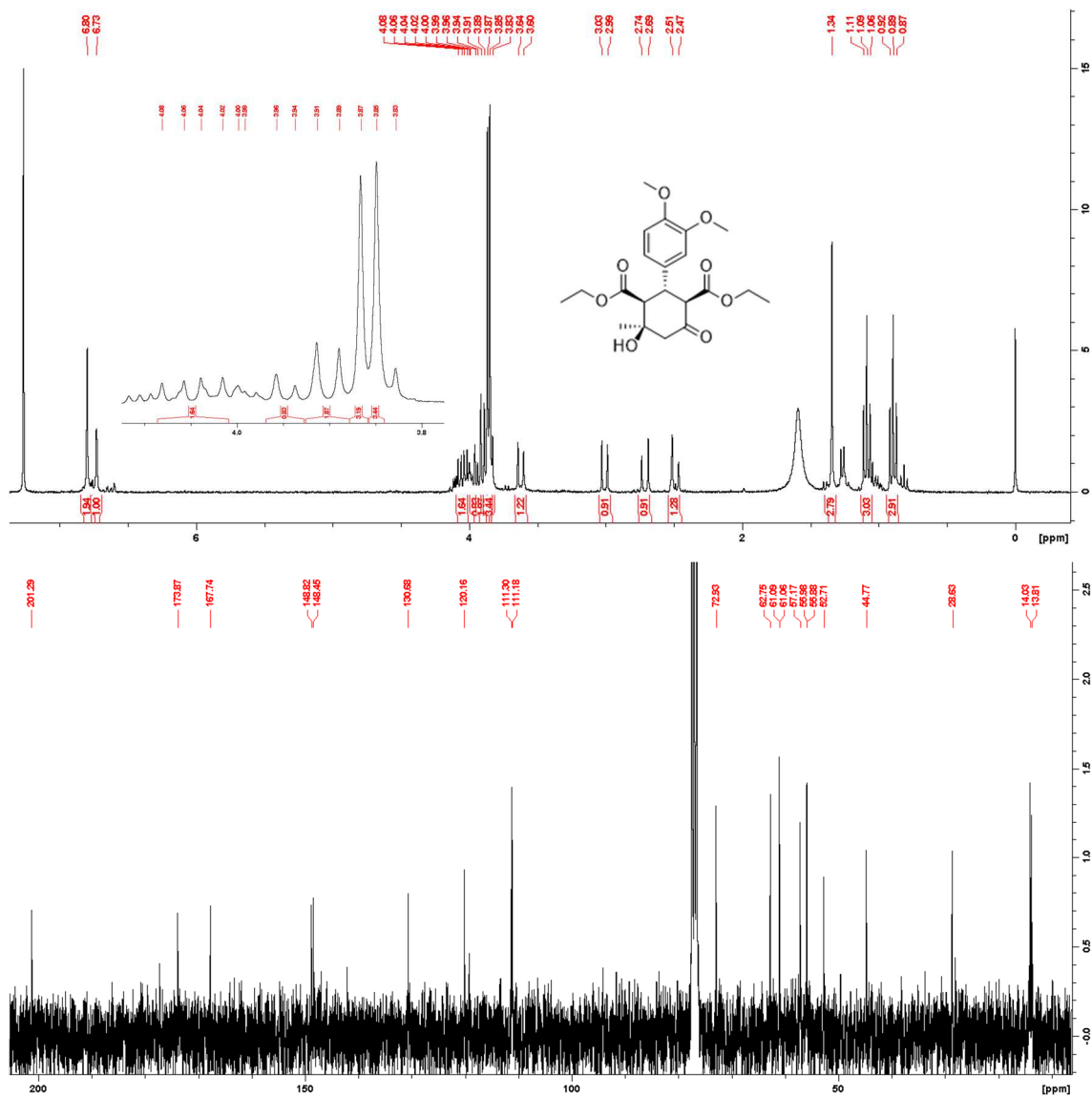
ZHOU, Q. et al. Common activation mechanism of class a GPCRs. **eLife**, v. 8, 1 dez. 2019.

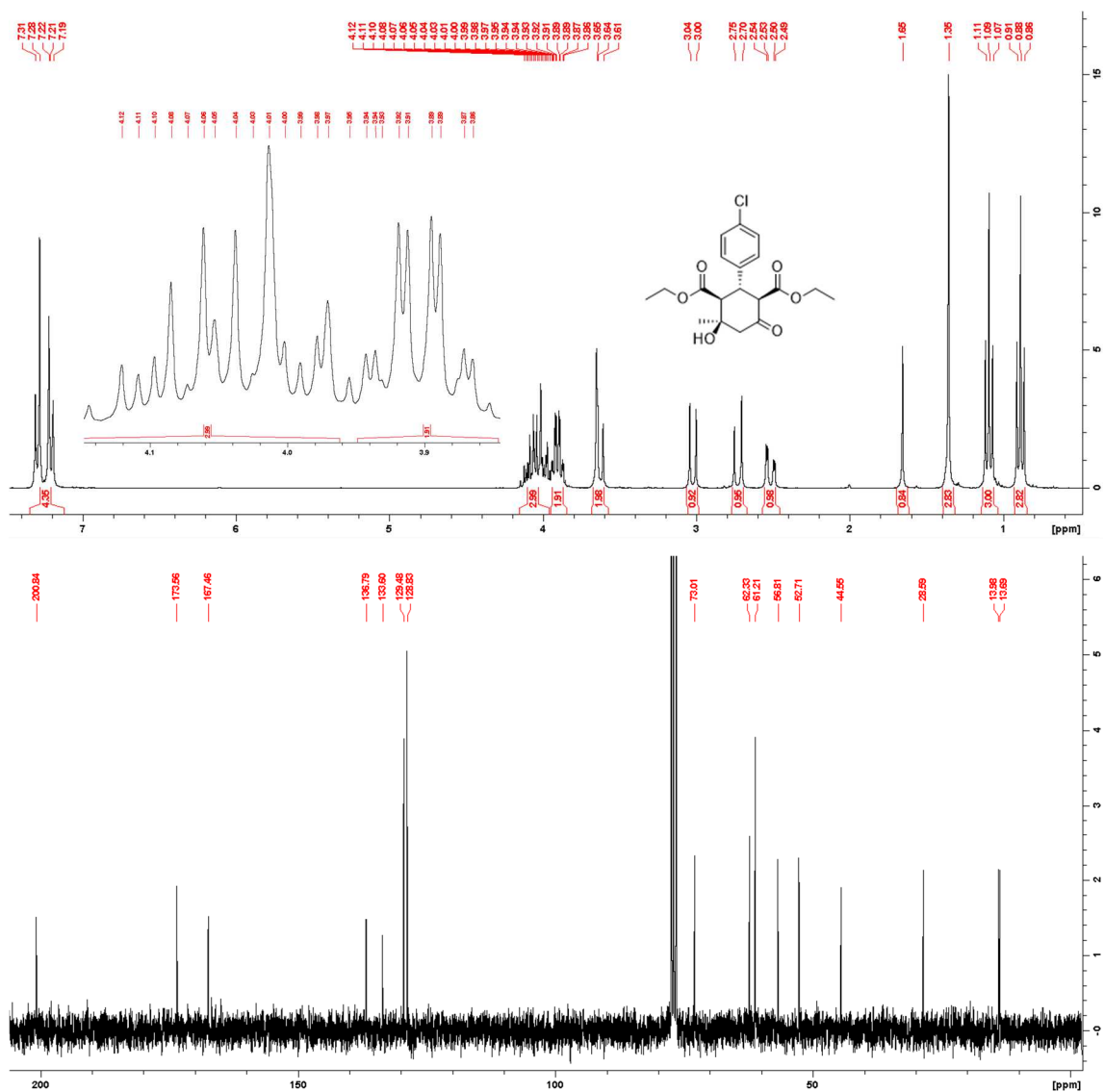
ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 153–157, jun. 2006.

Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância **35**

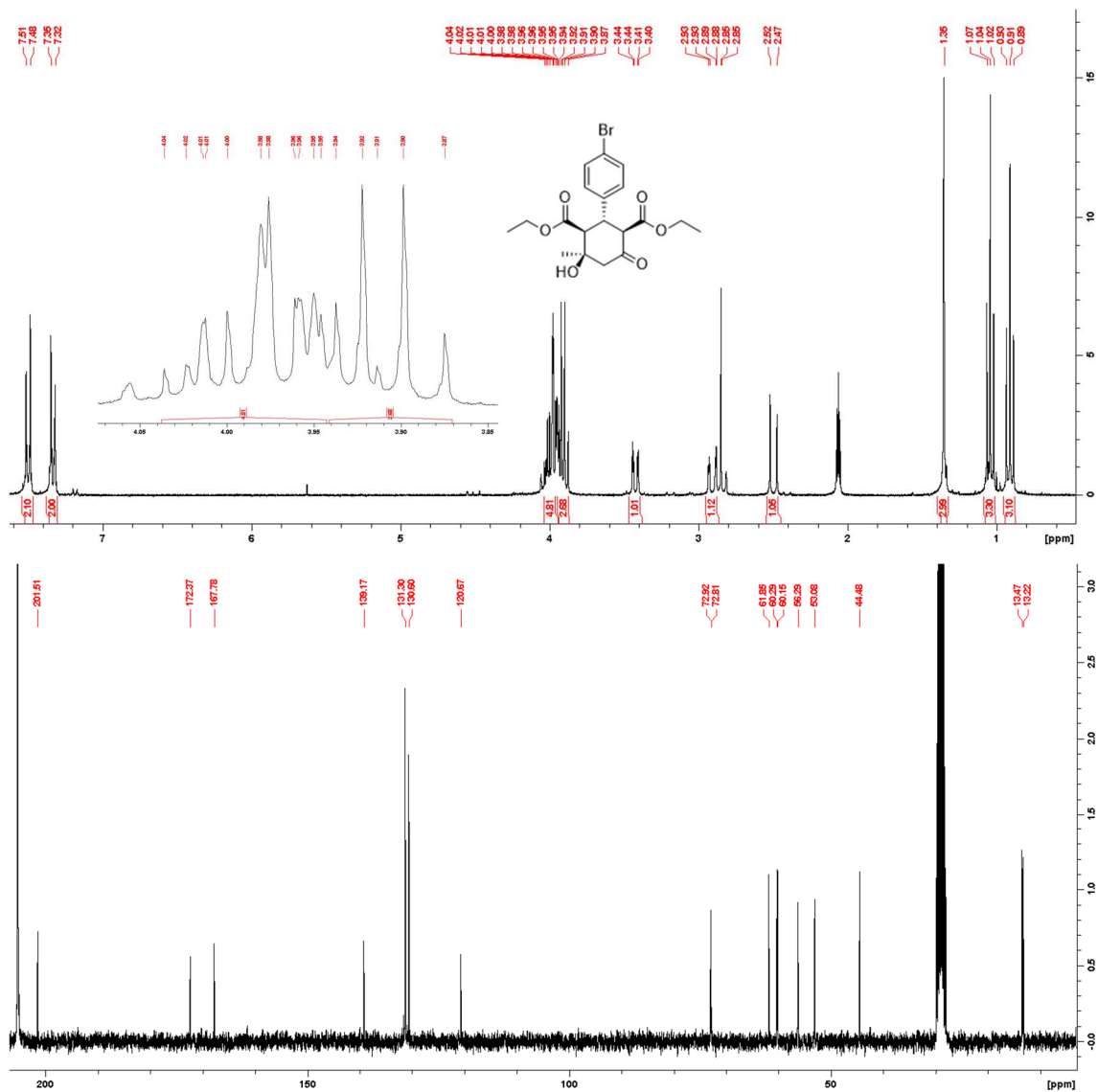


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância **36**

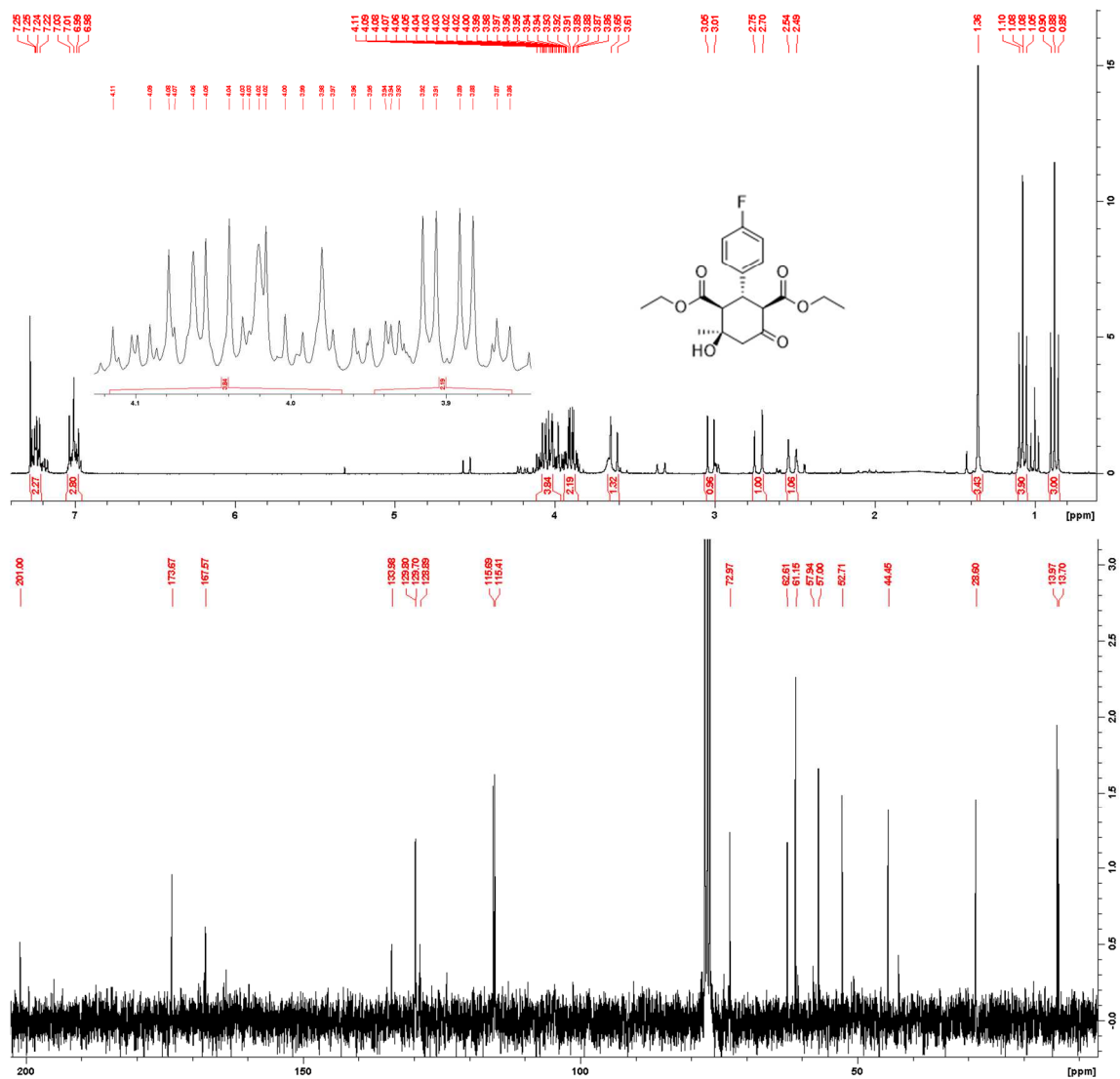


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância **38**

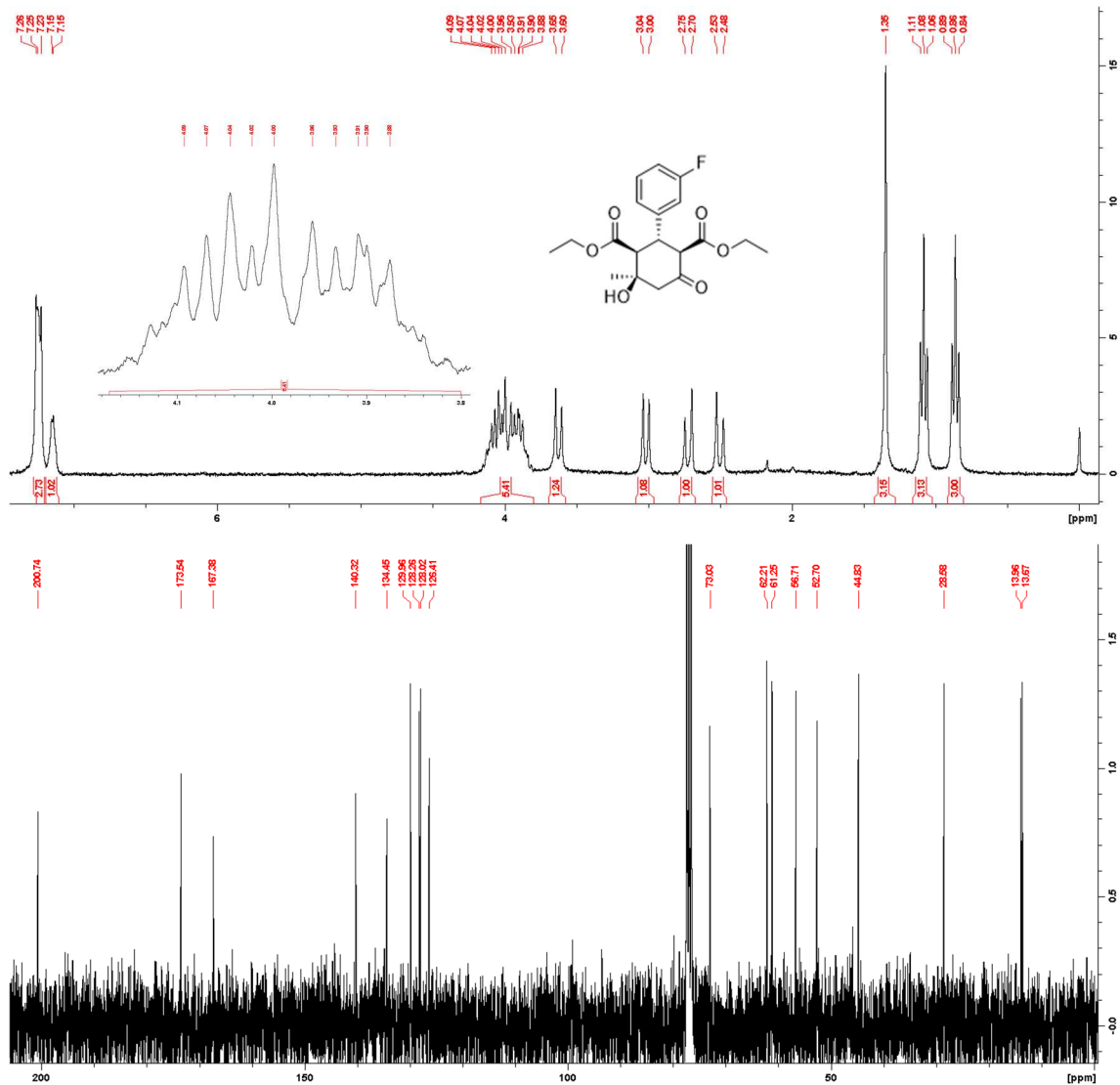
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 39



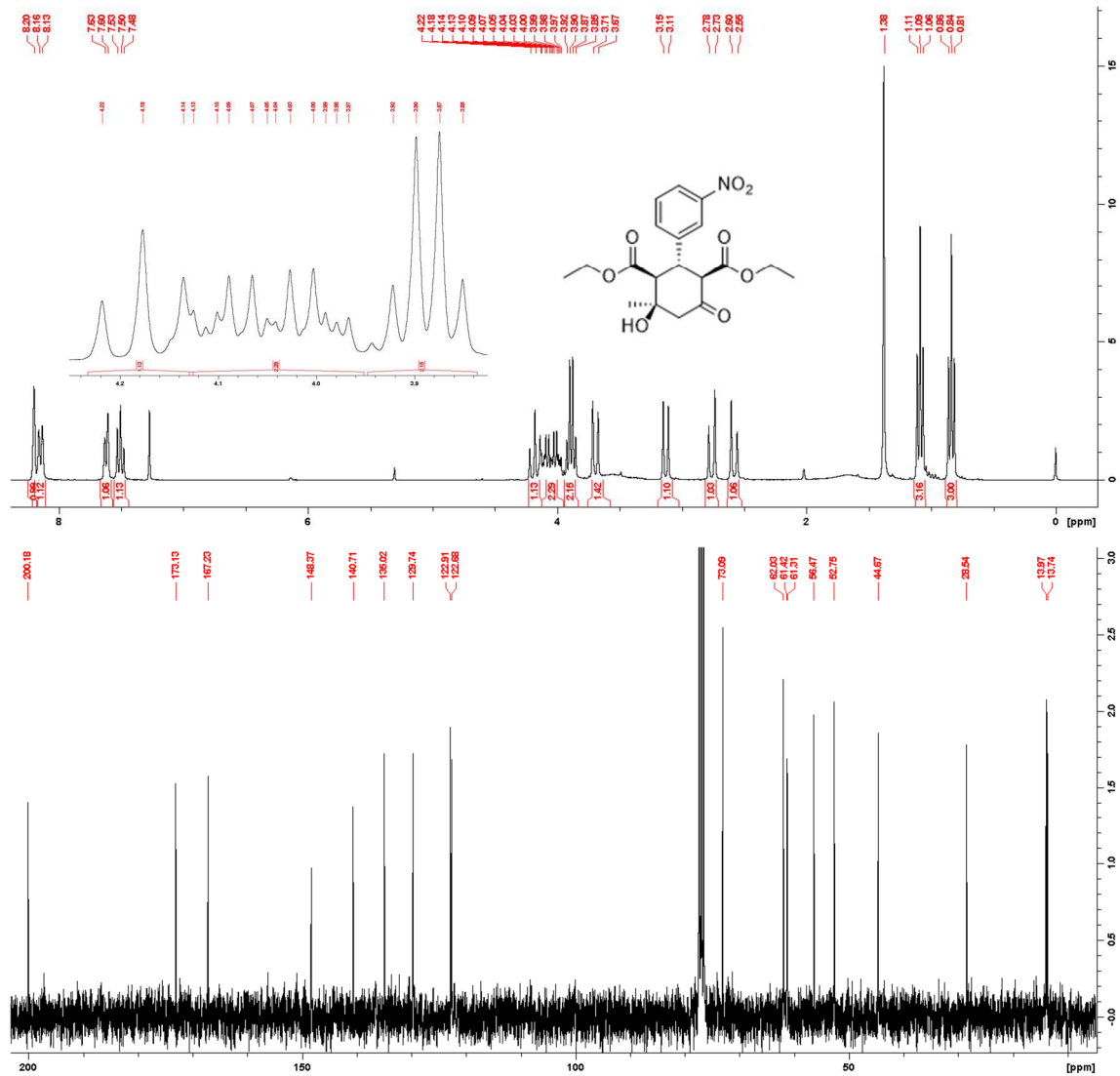
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 40



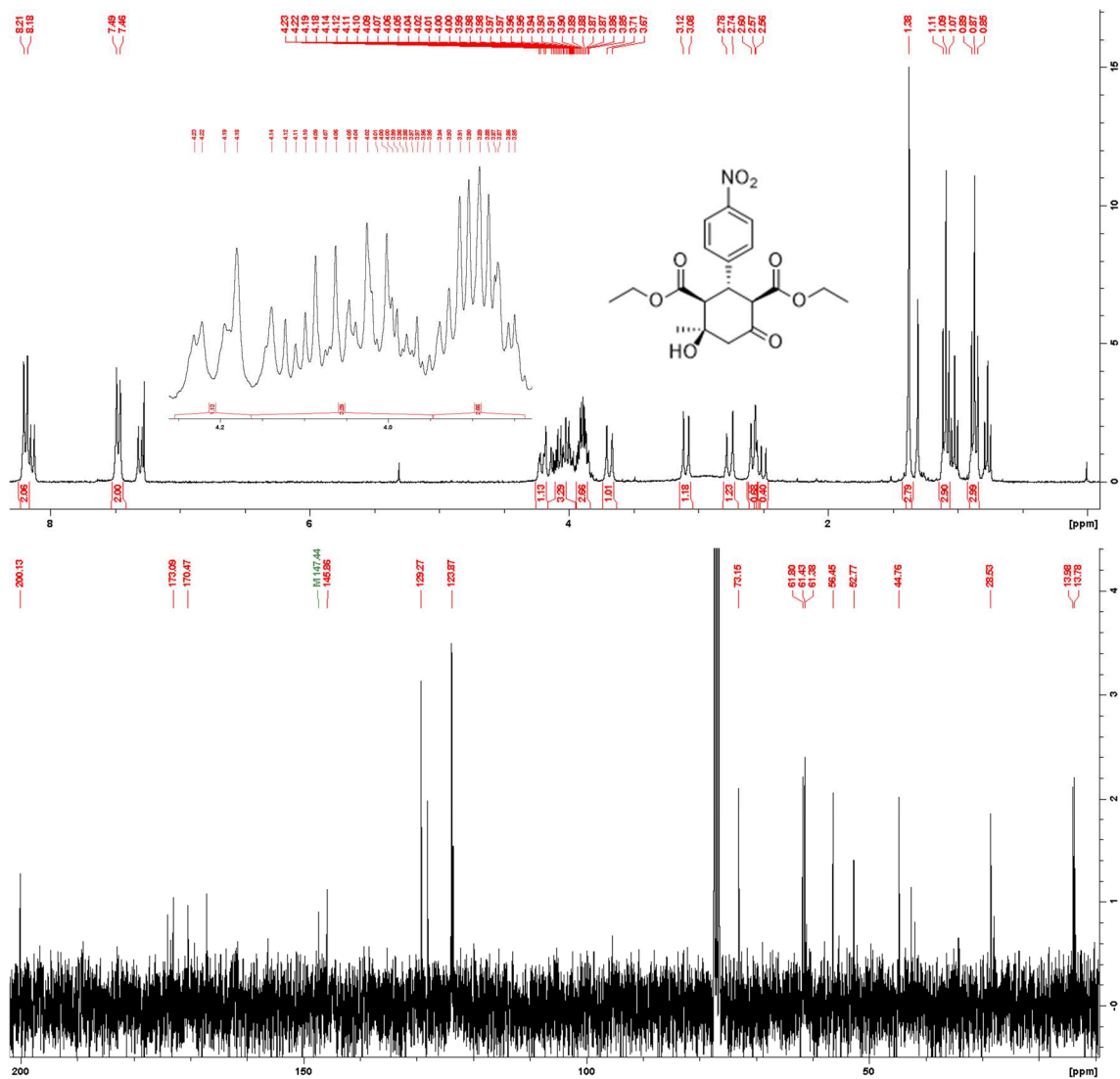
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 42



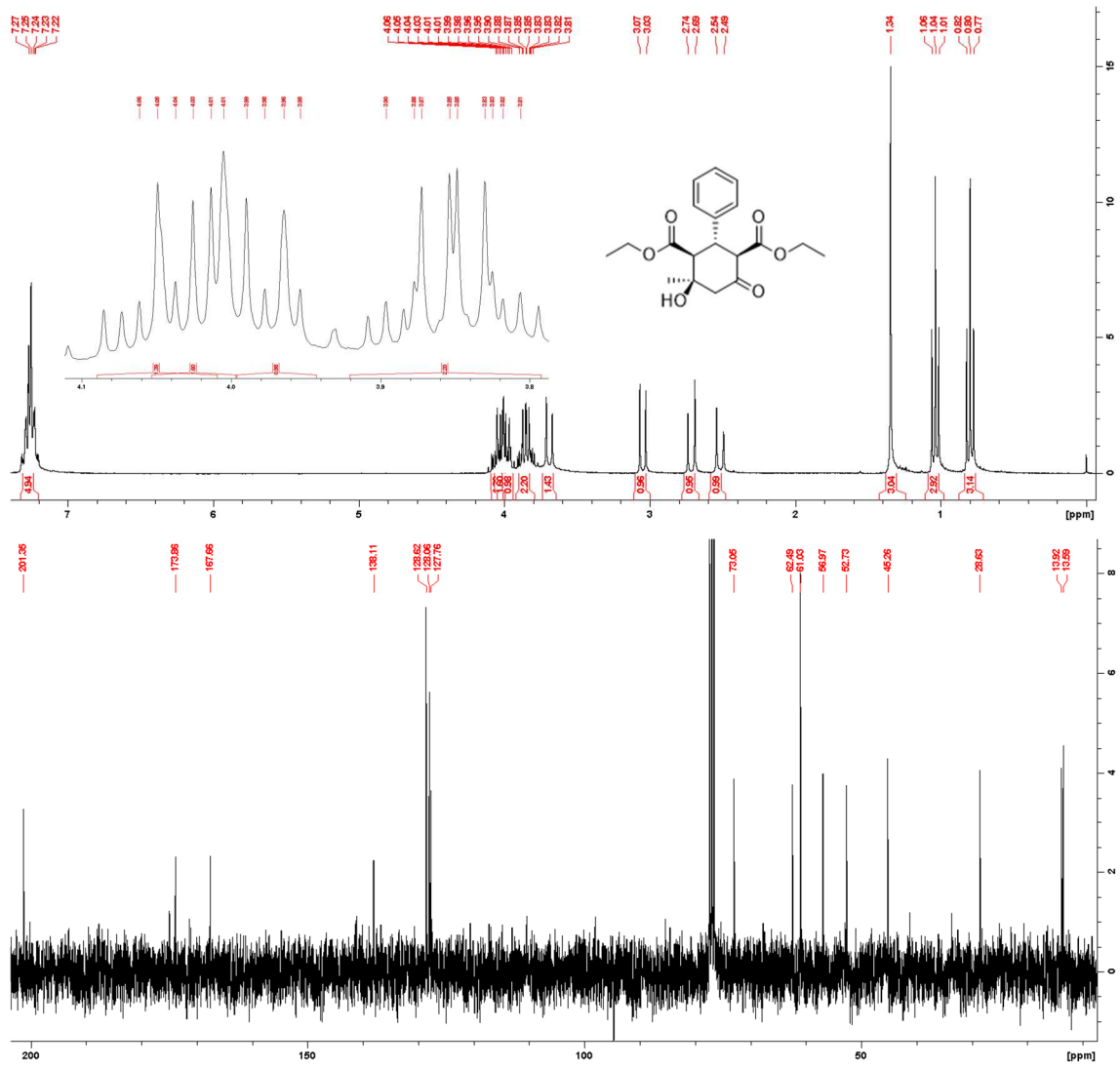
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 43



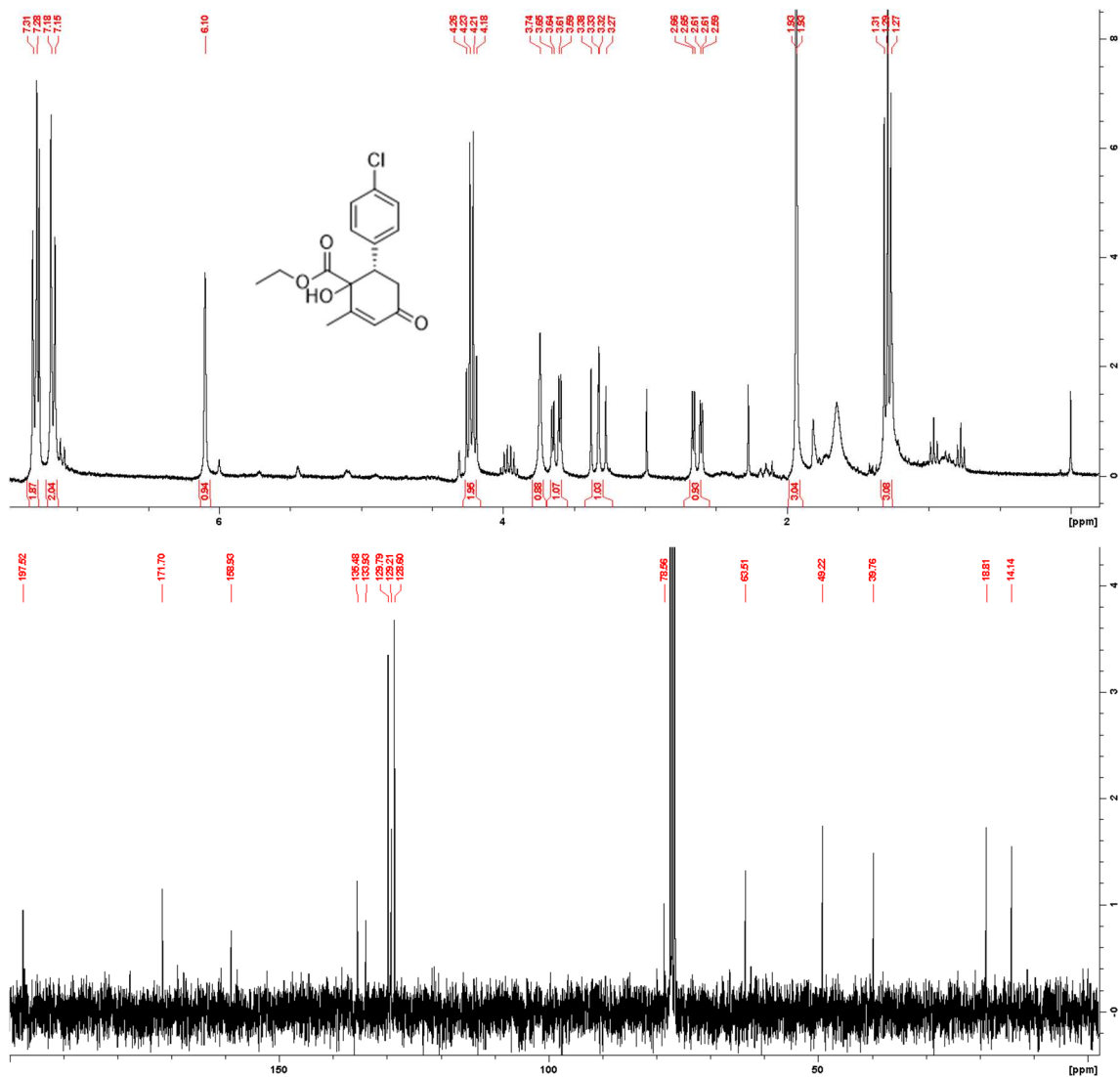
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 44



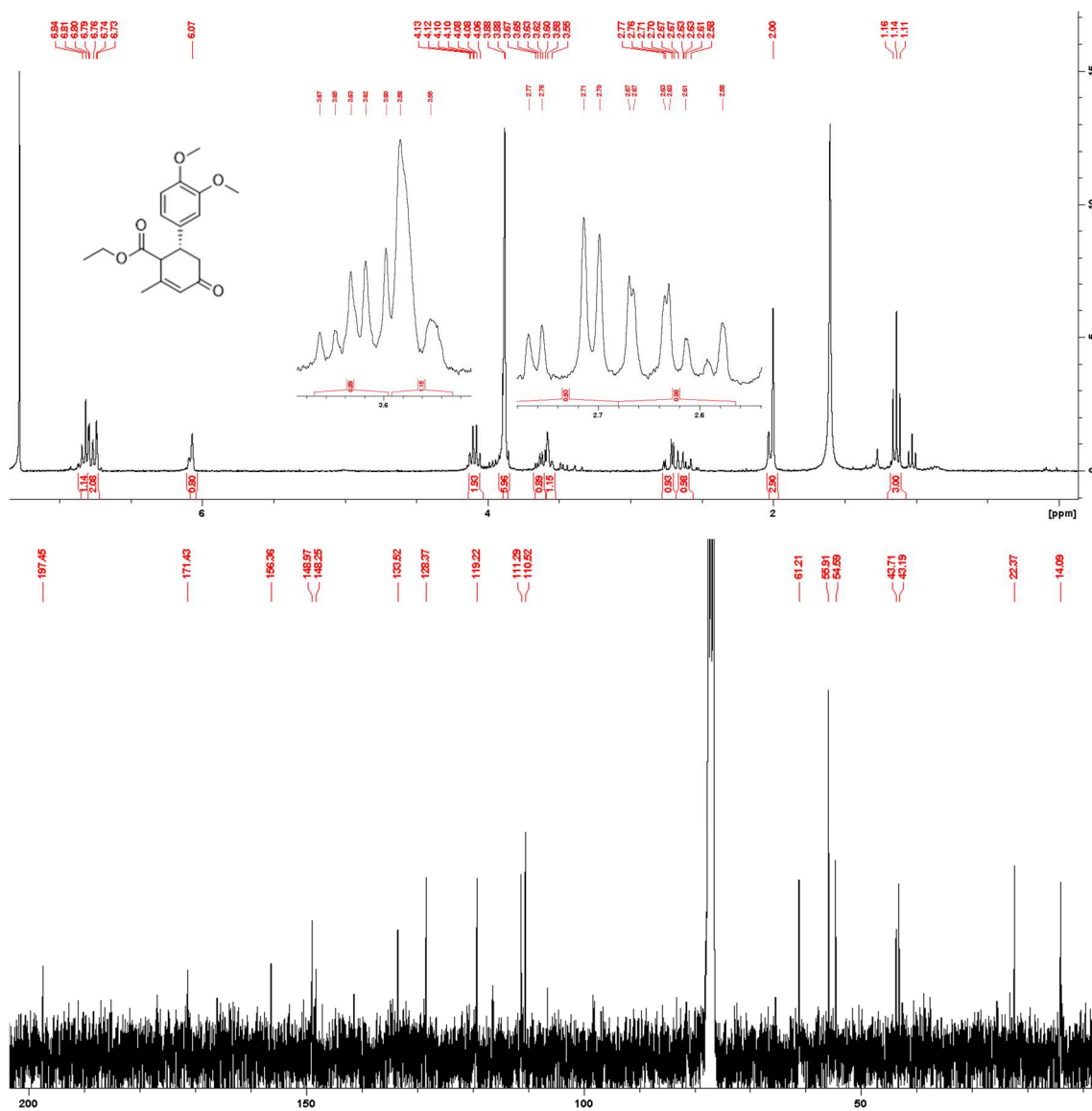
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 45



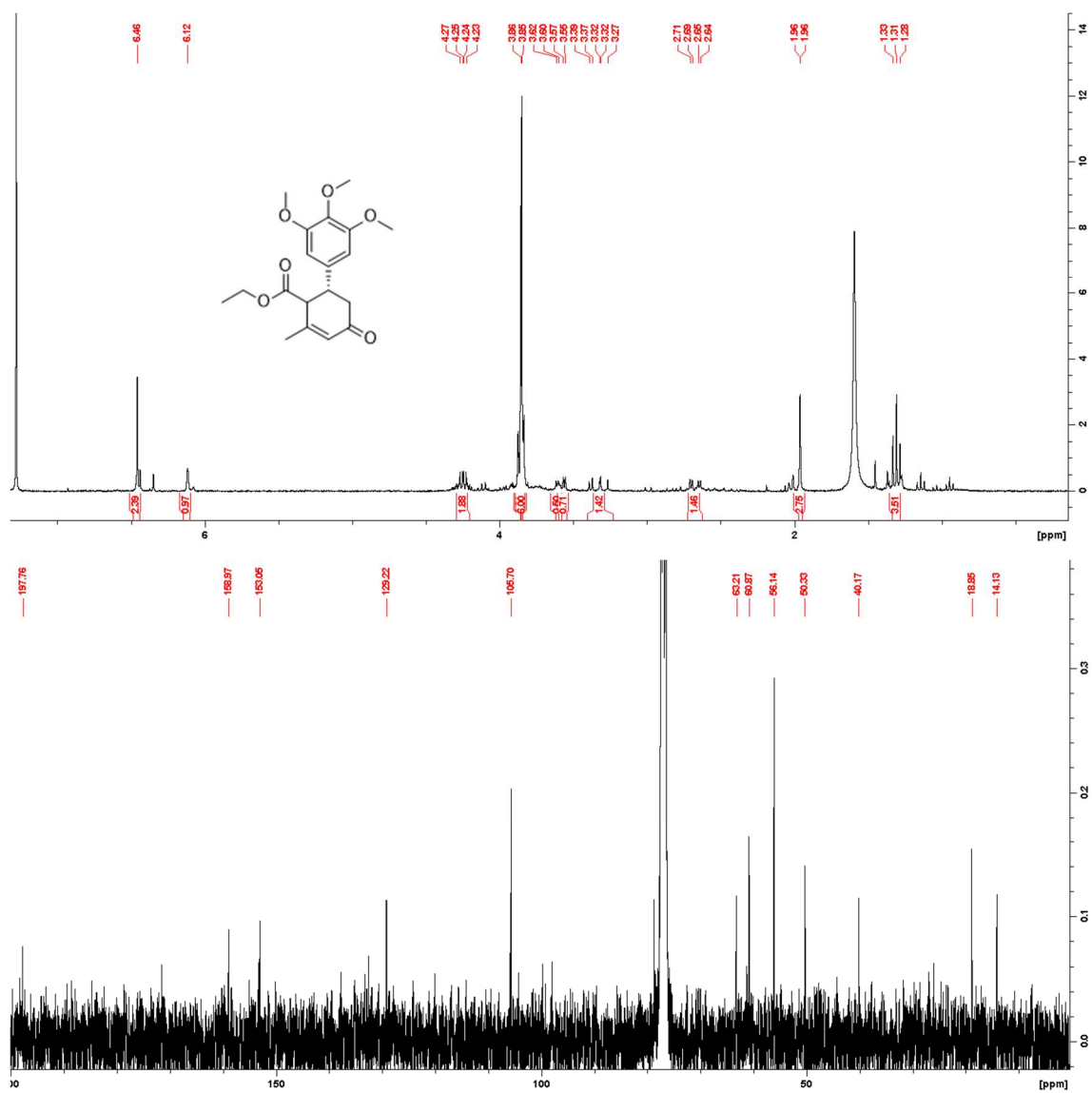
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 46



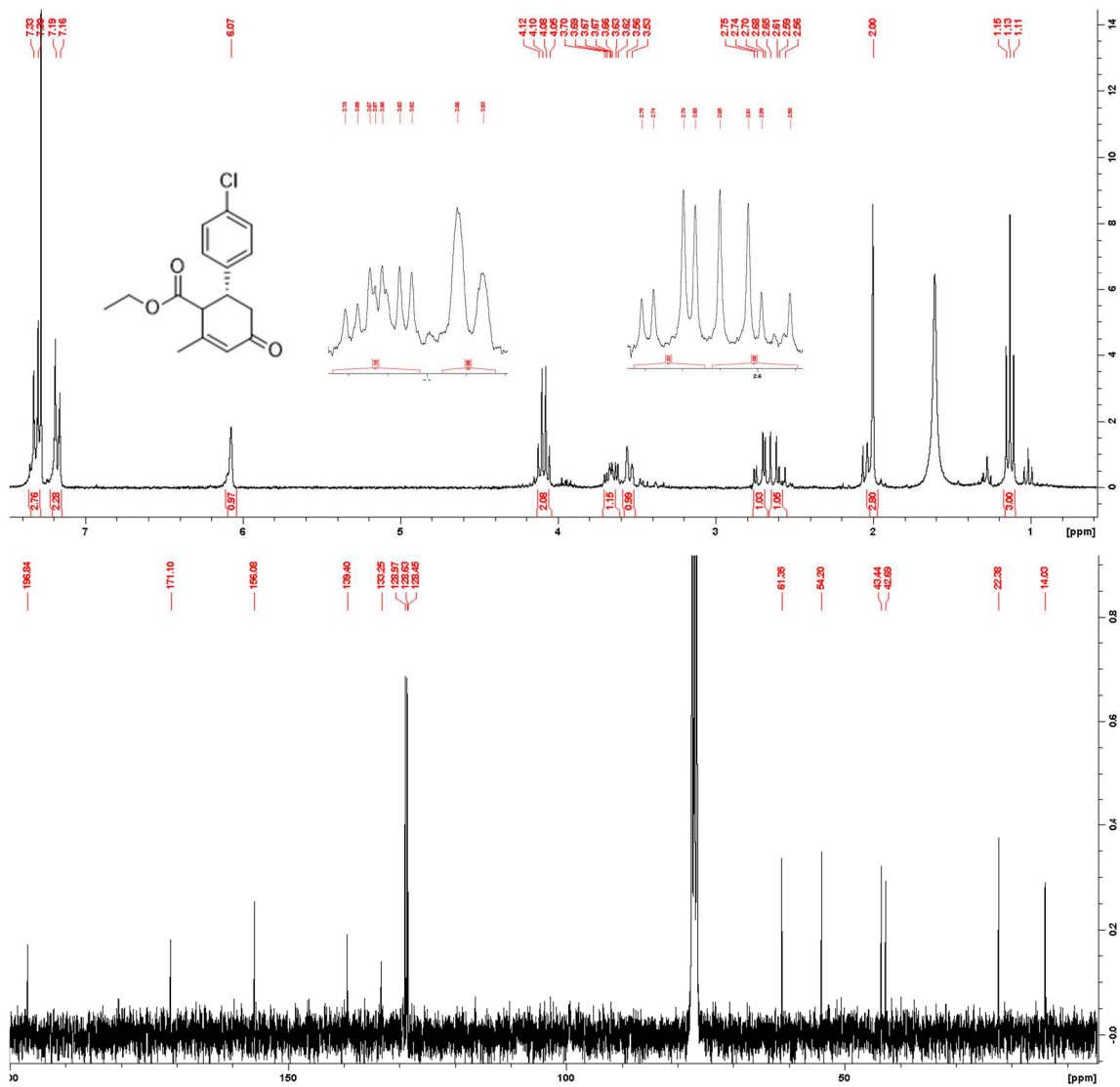
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 48



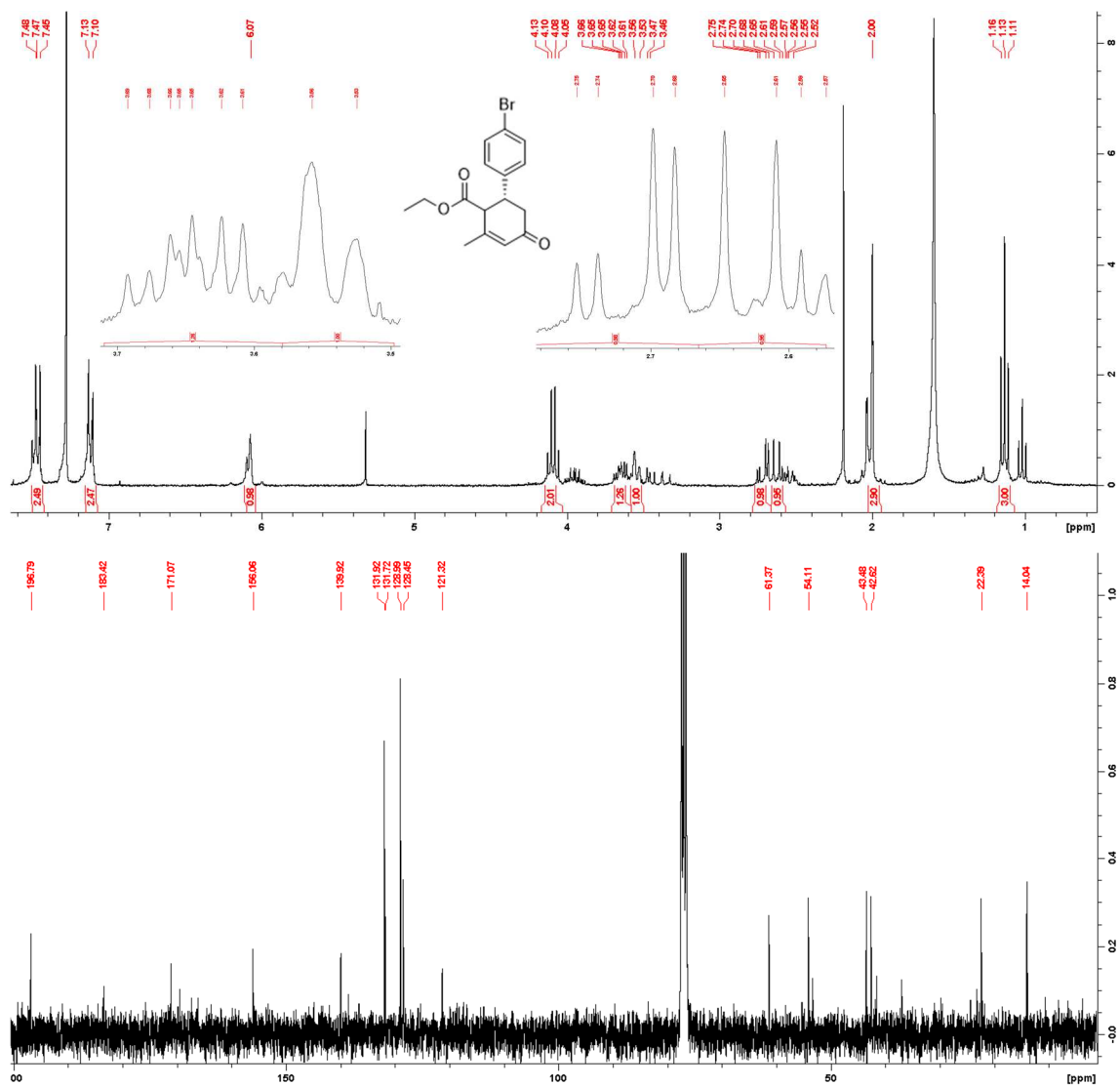
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 49

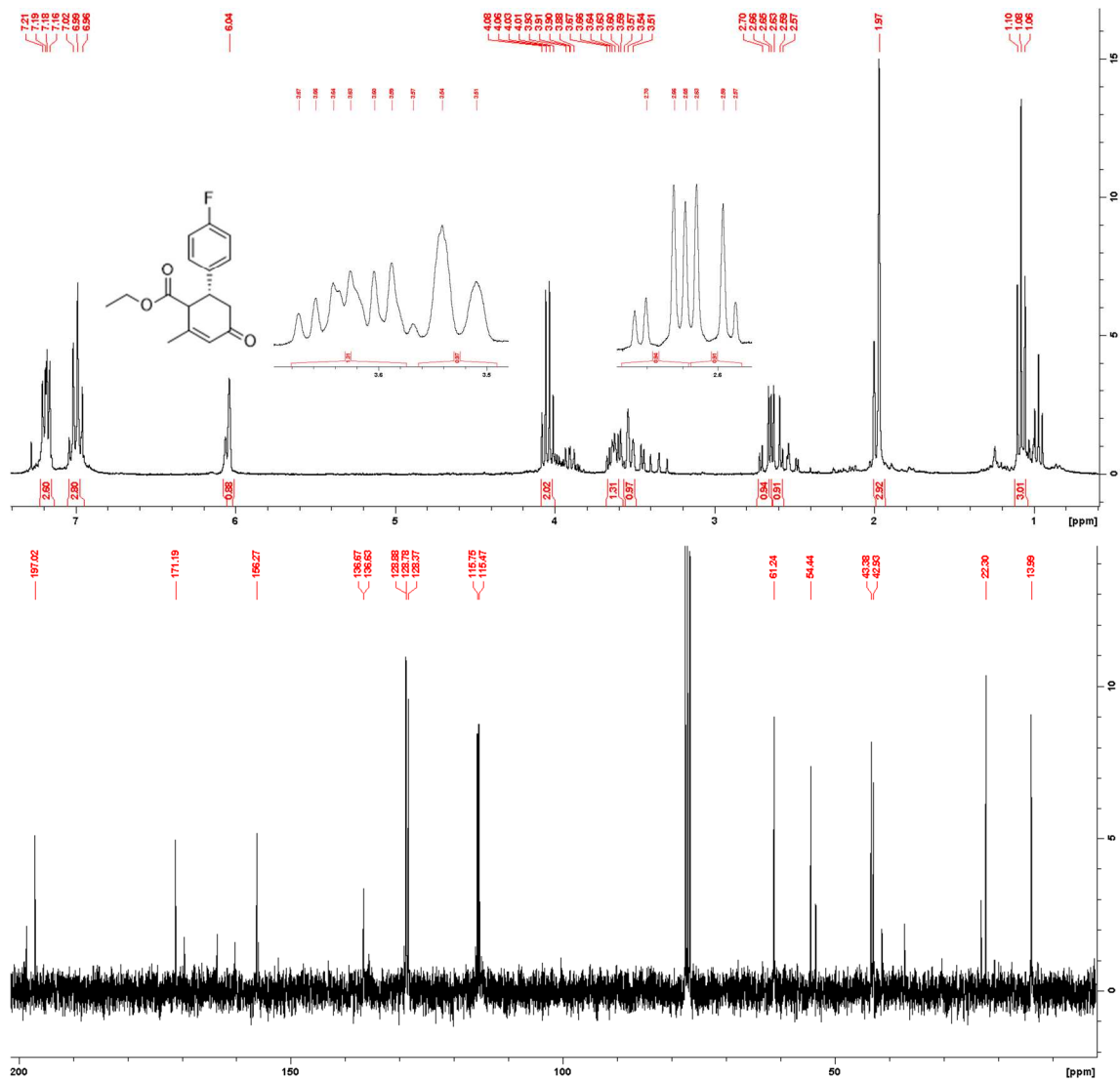


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 50

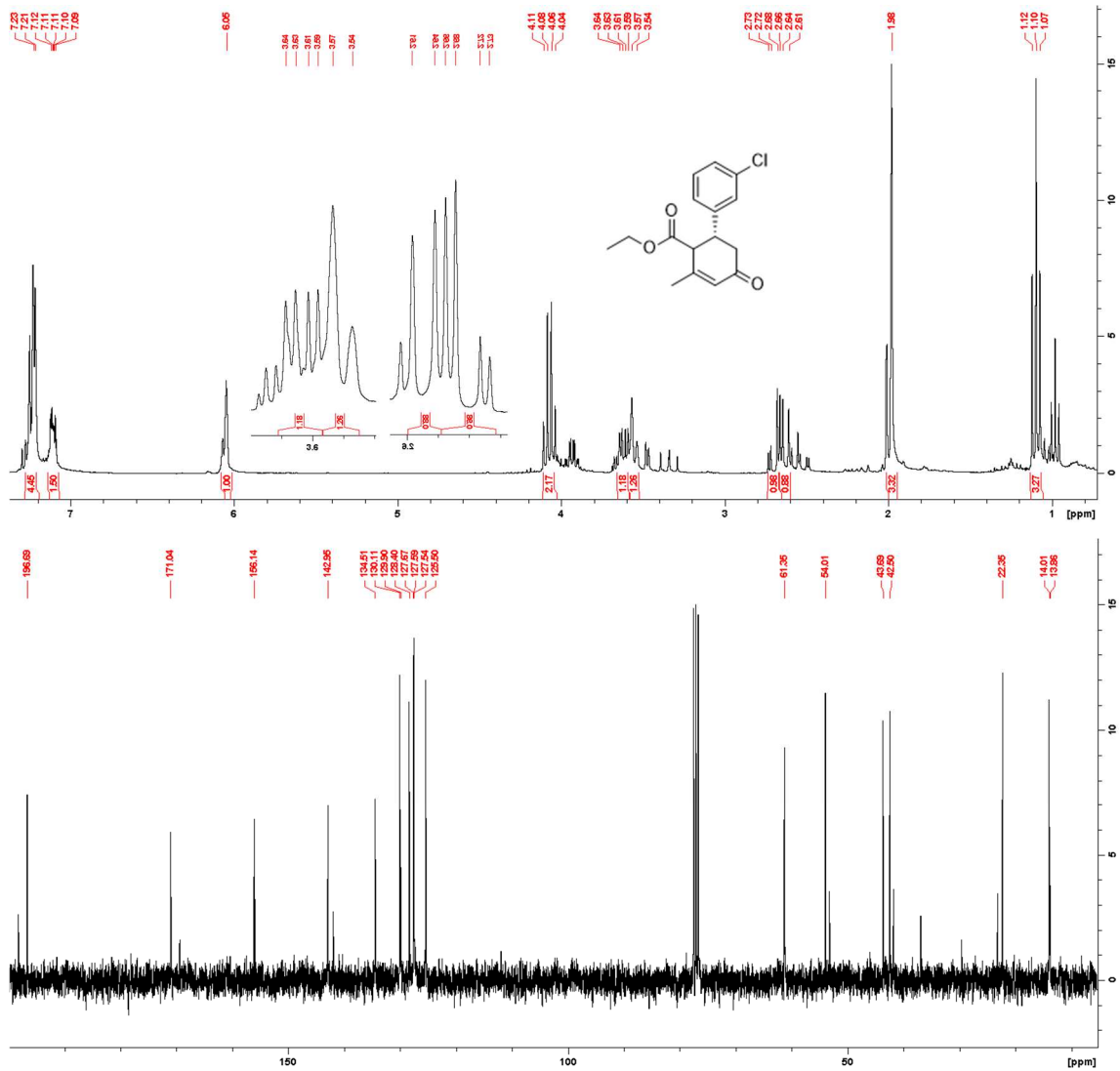


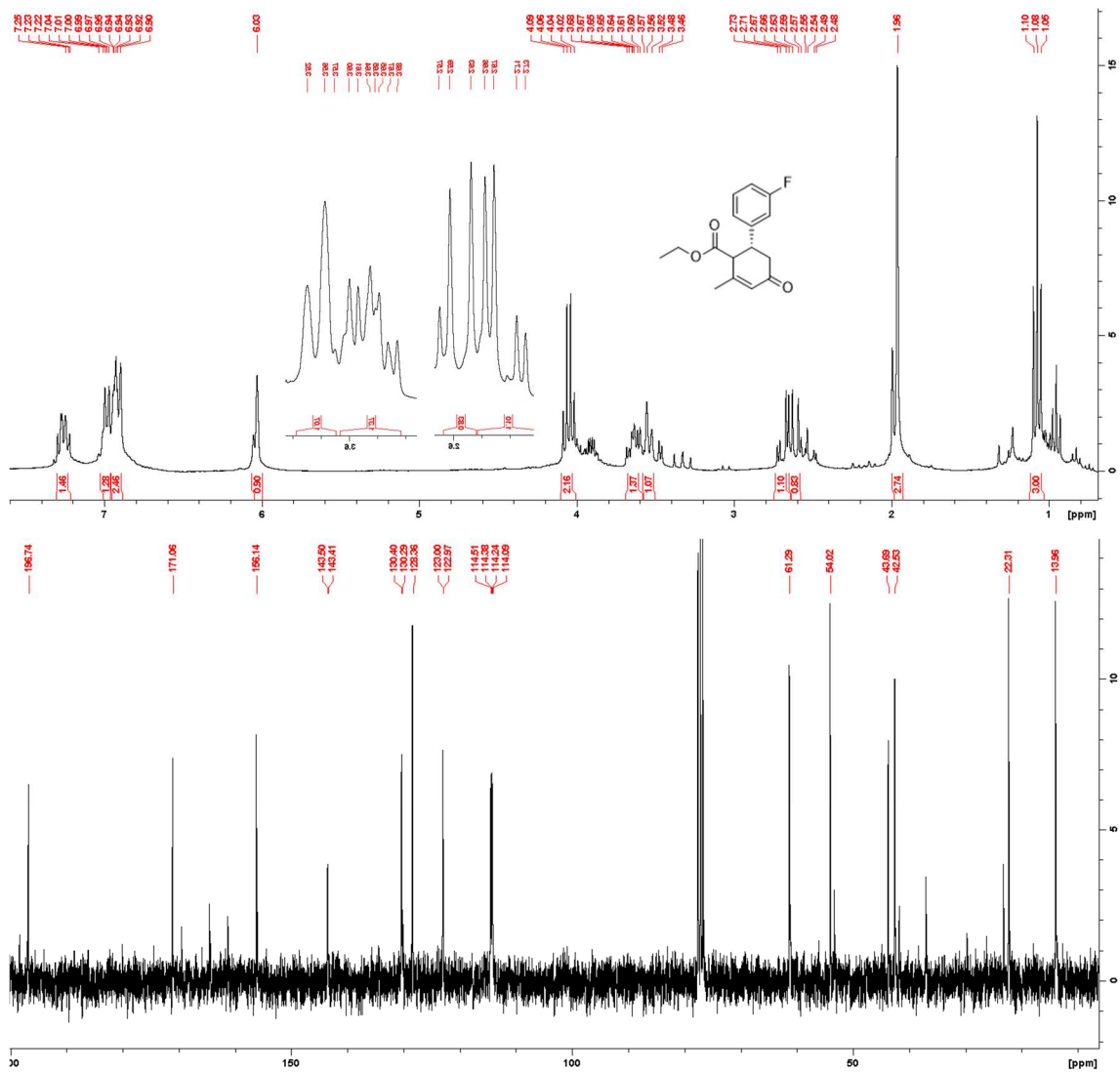
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 51



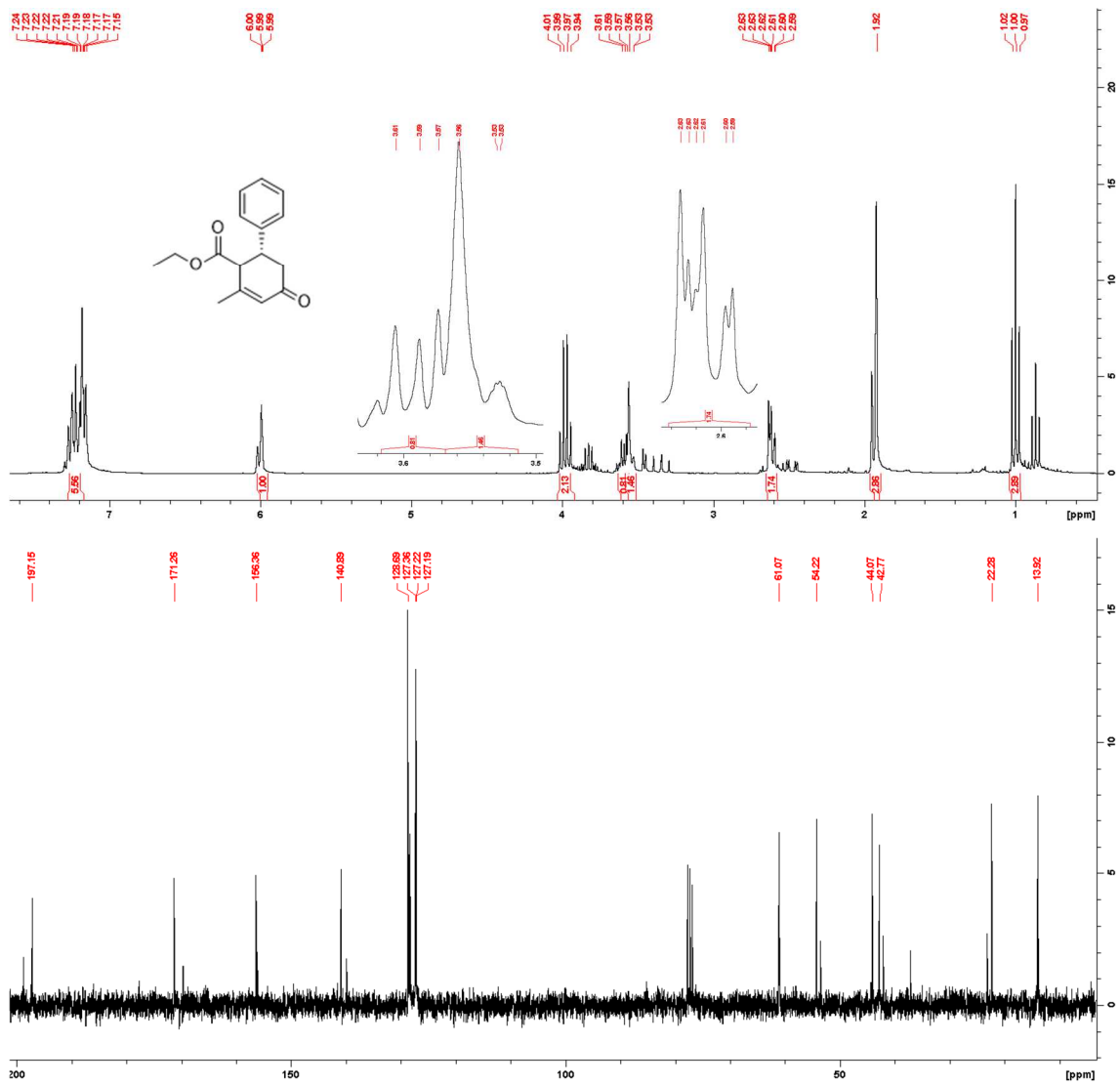
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 52

Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 53

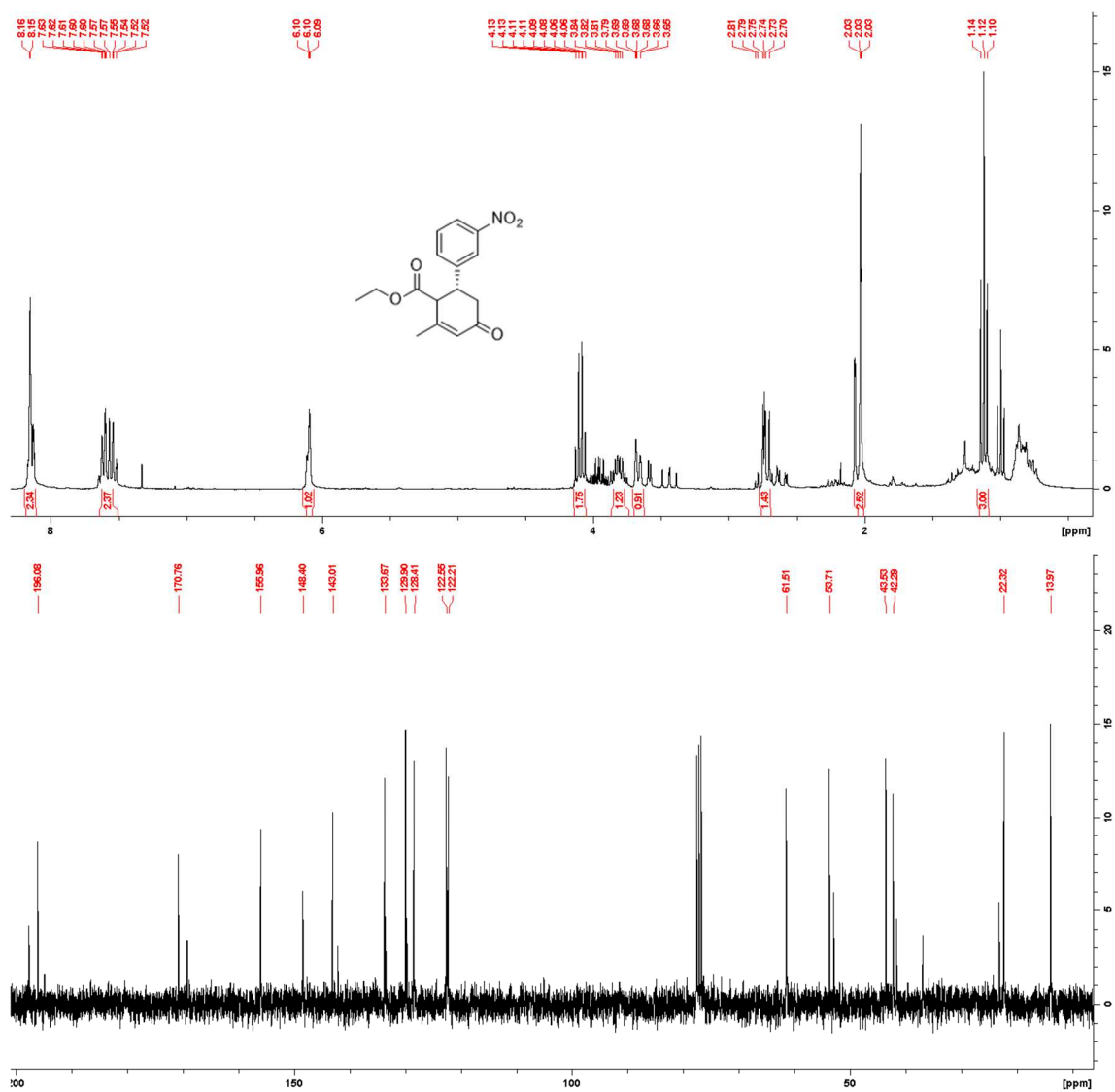


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 54

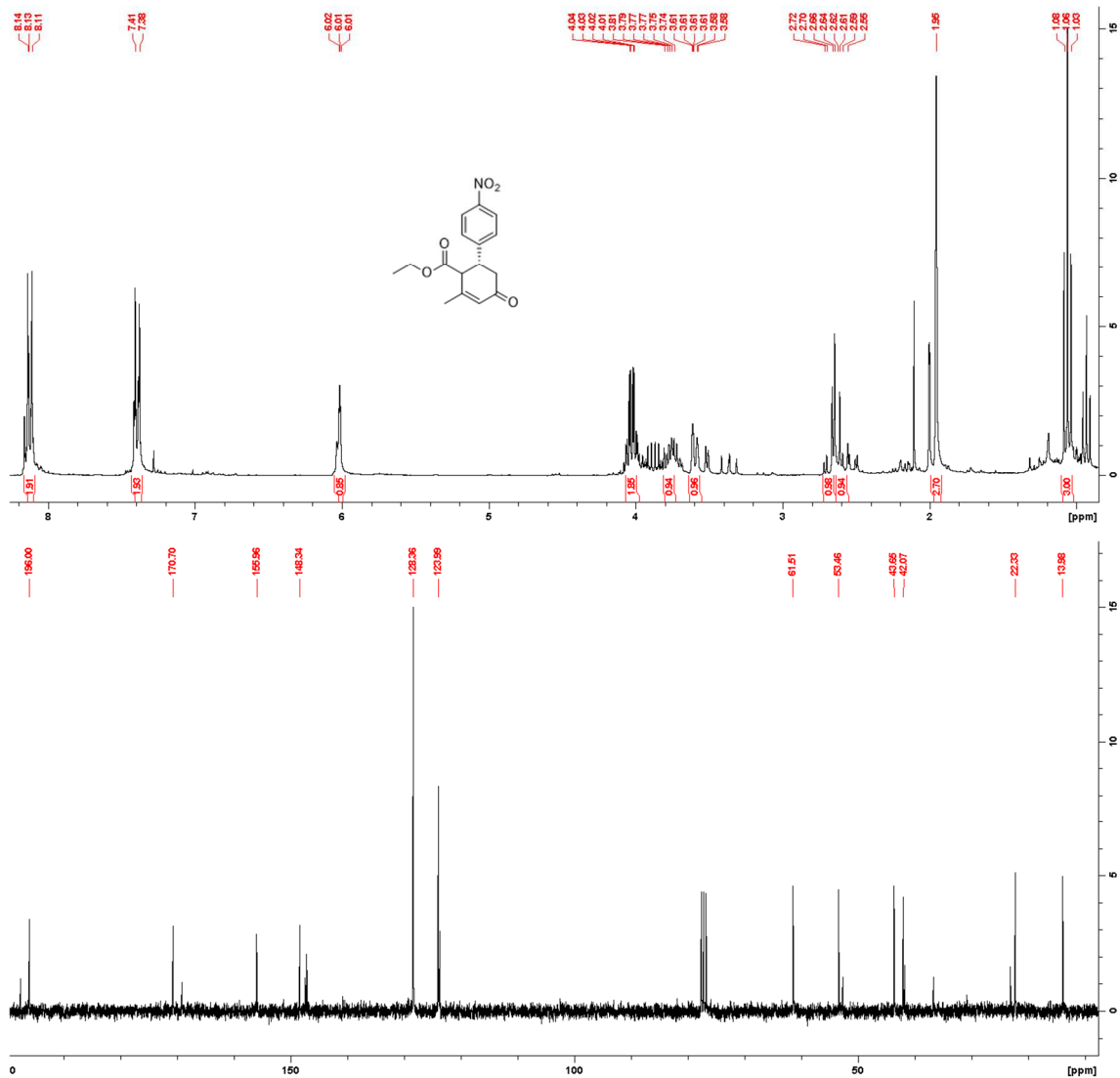
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 55



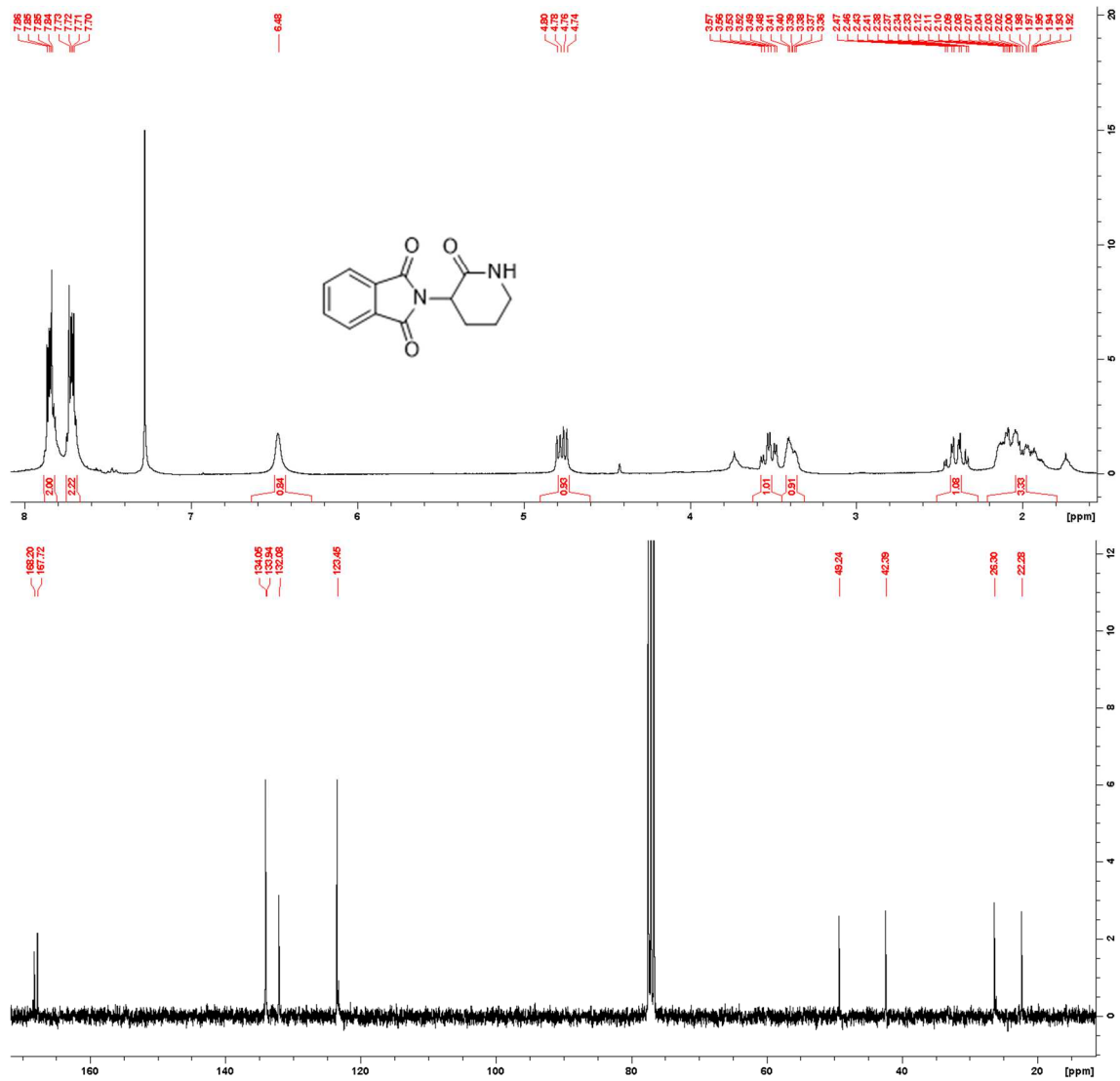
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 56



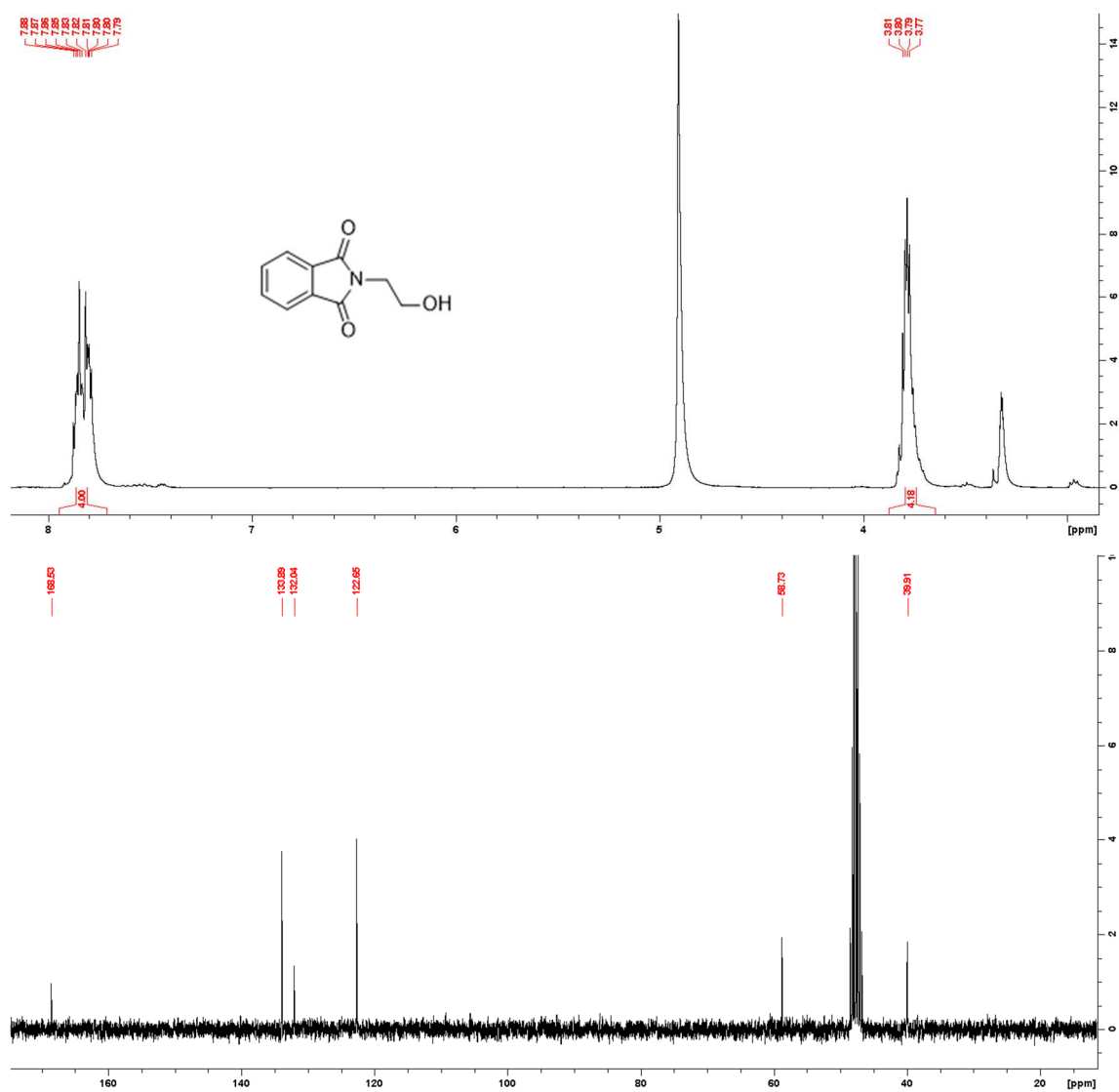
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 57



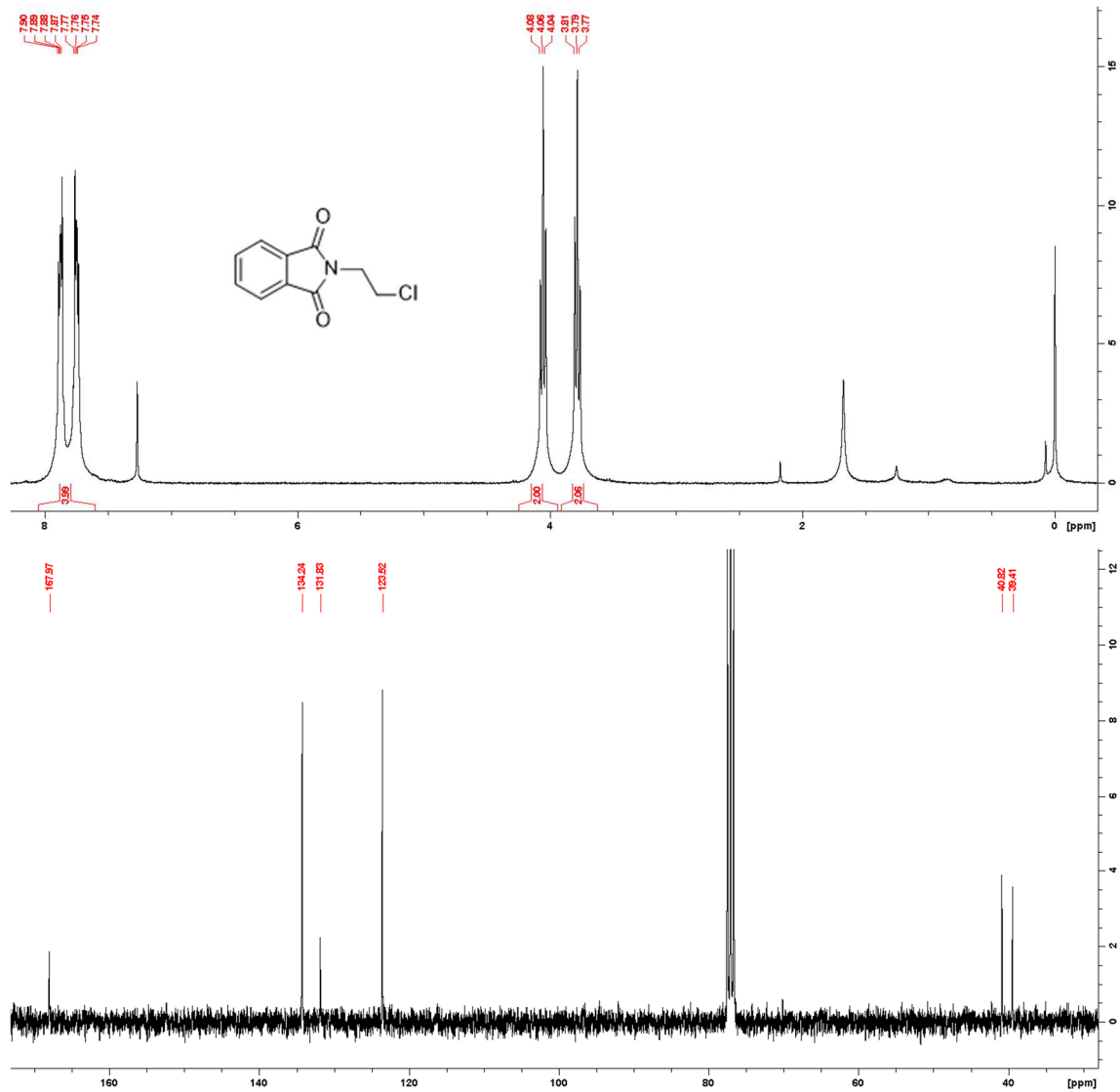
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 61



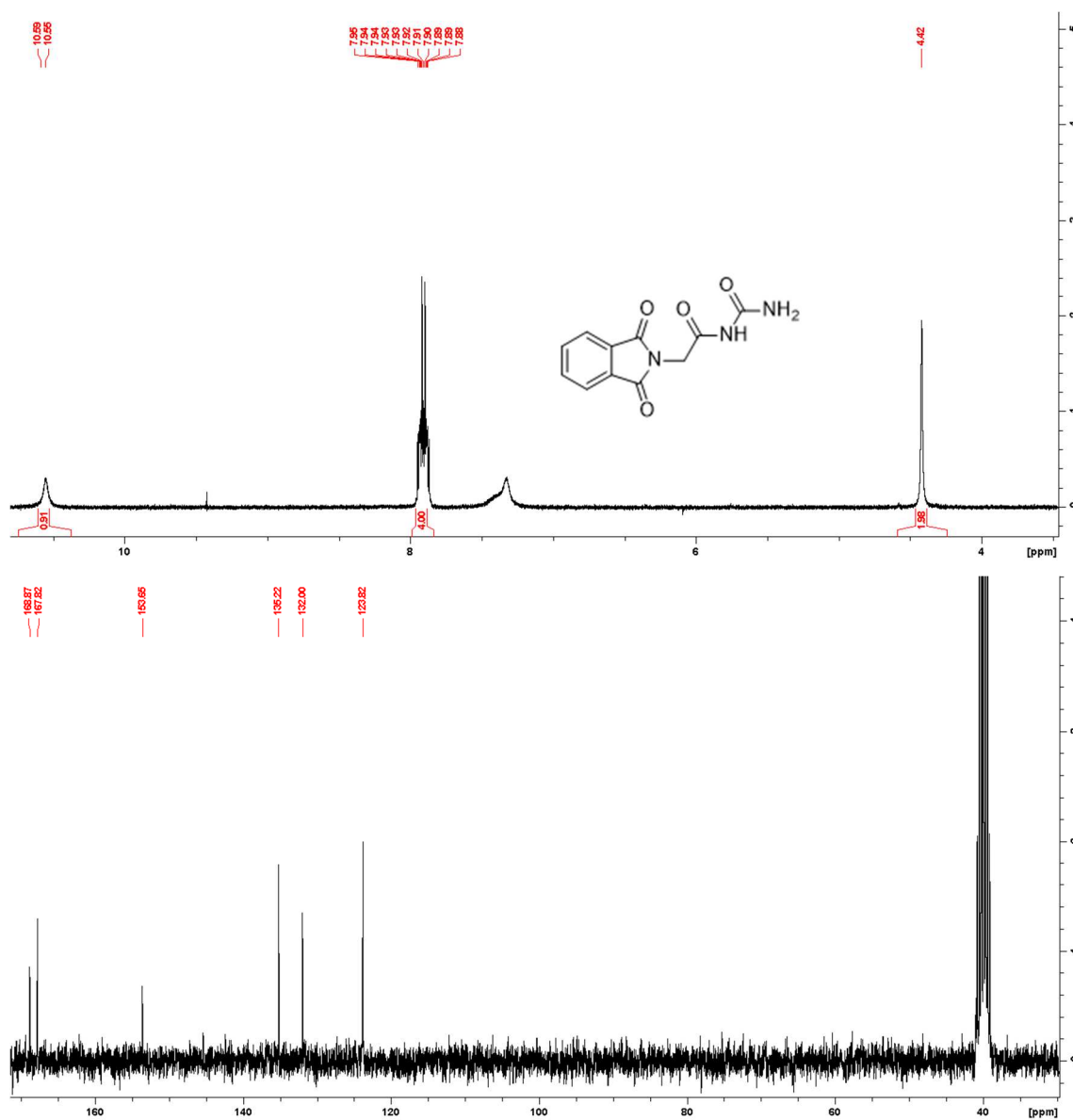
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 62



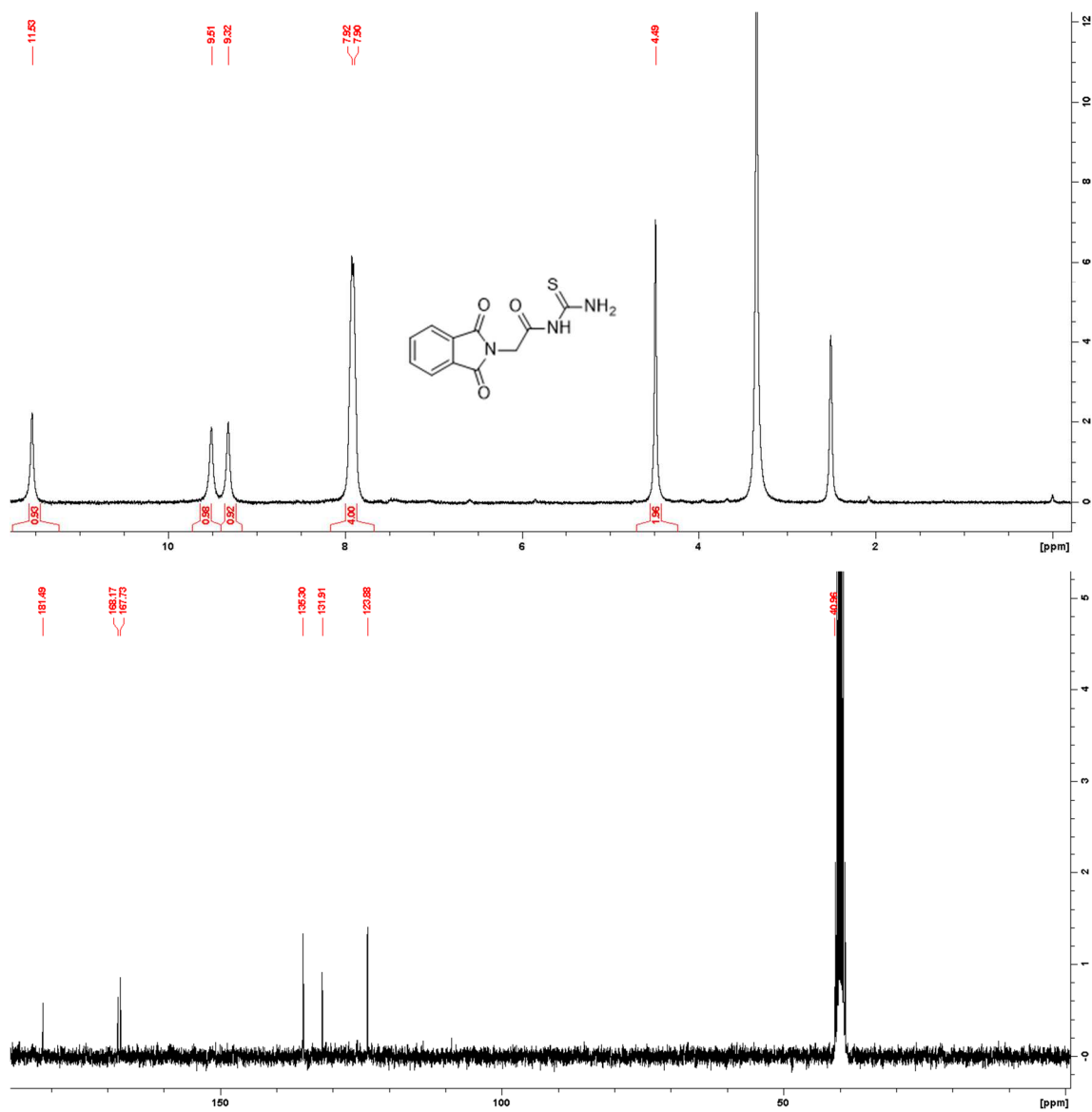
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 63



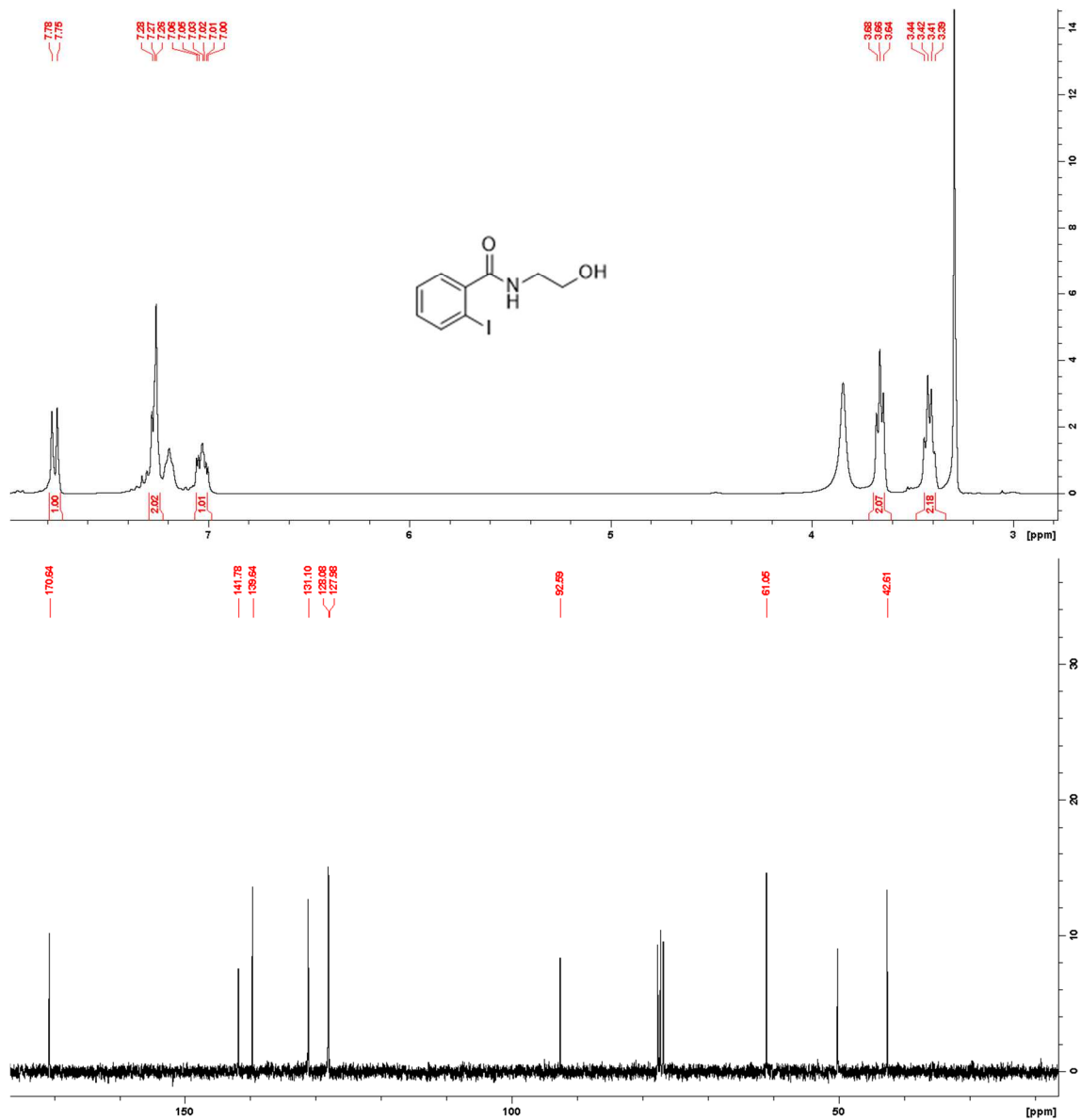
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 68



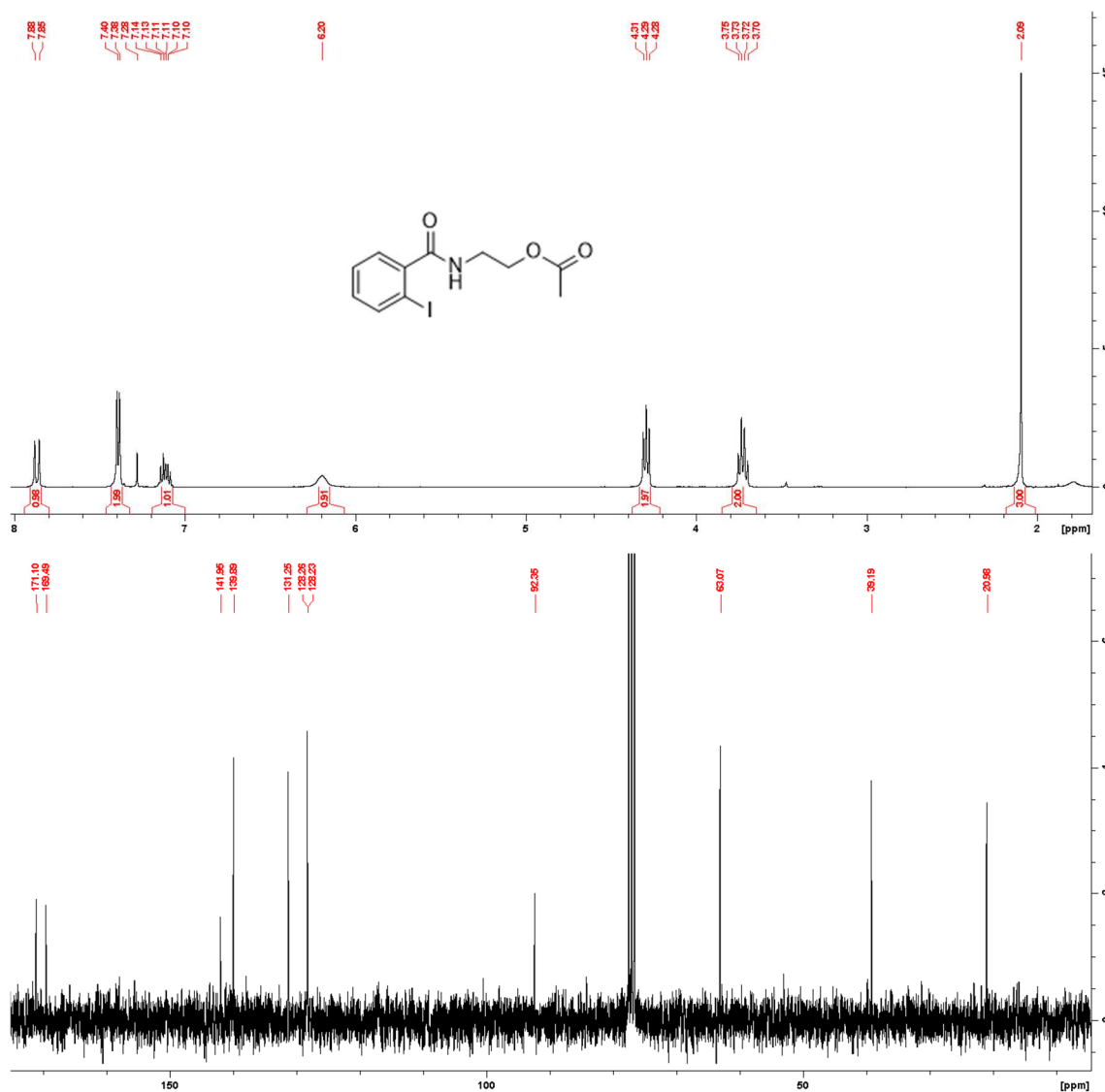
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 69



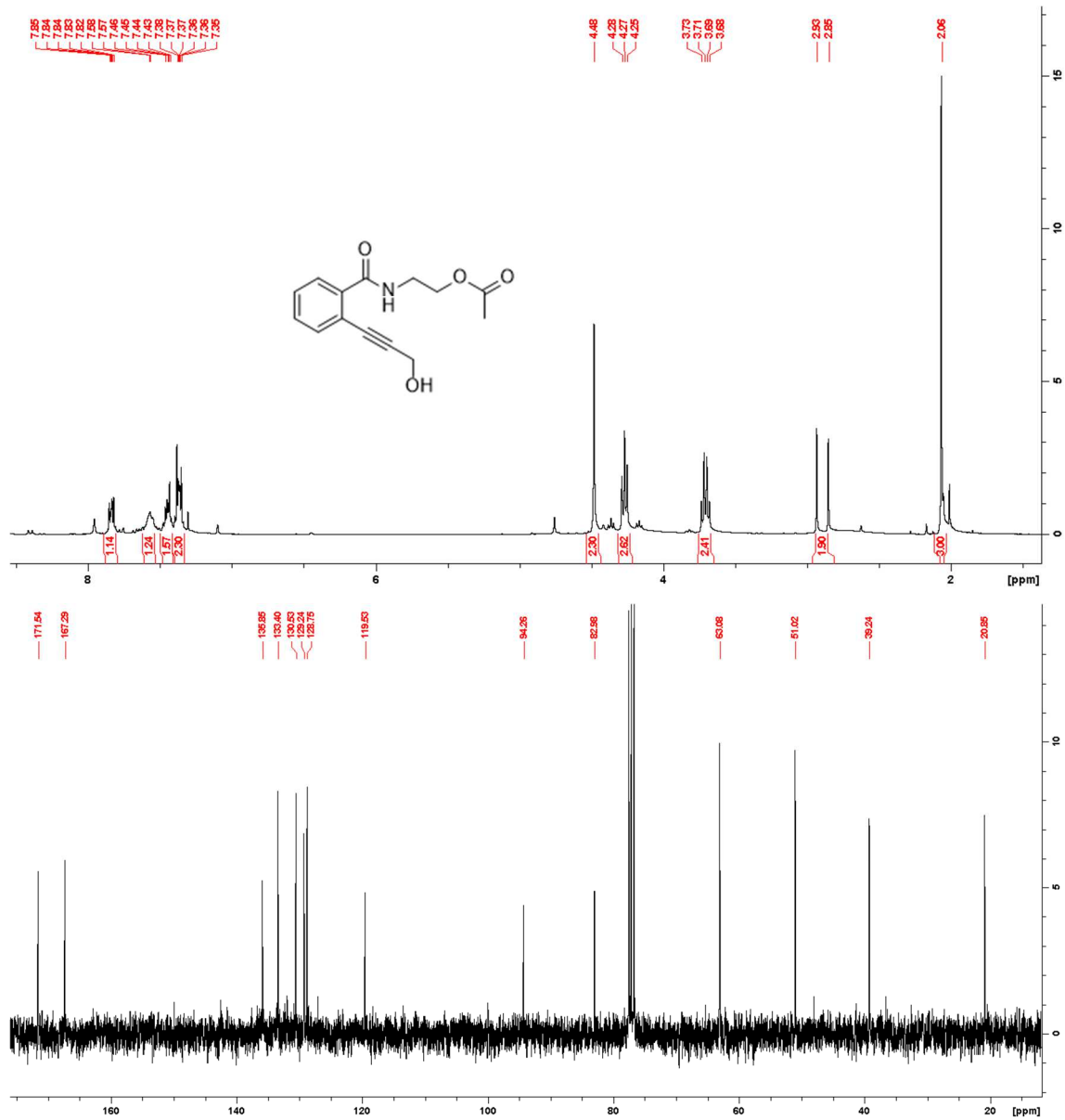
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 73



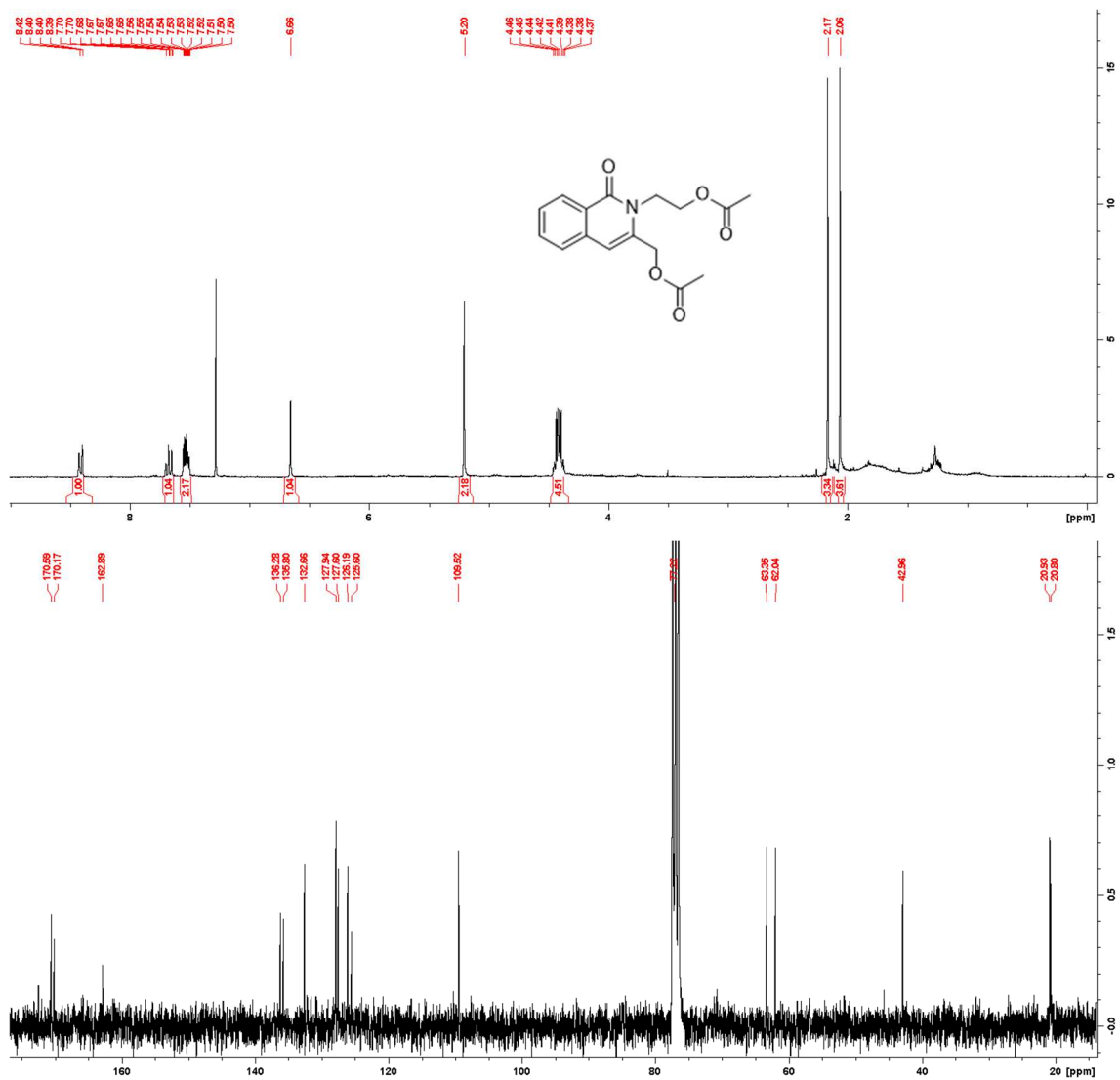
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 74



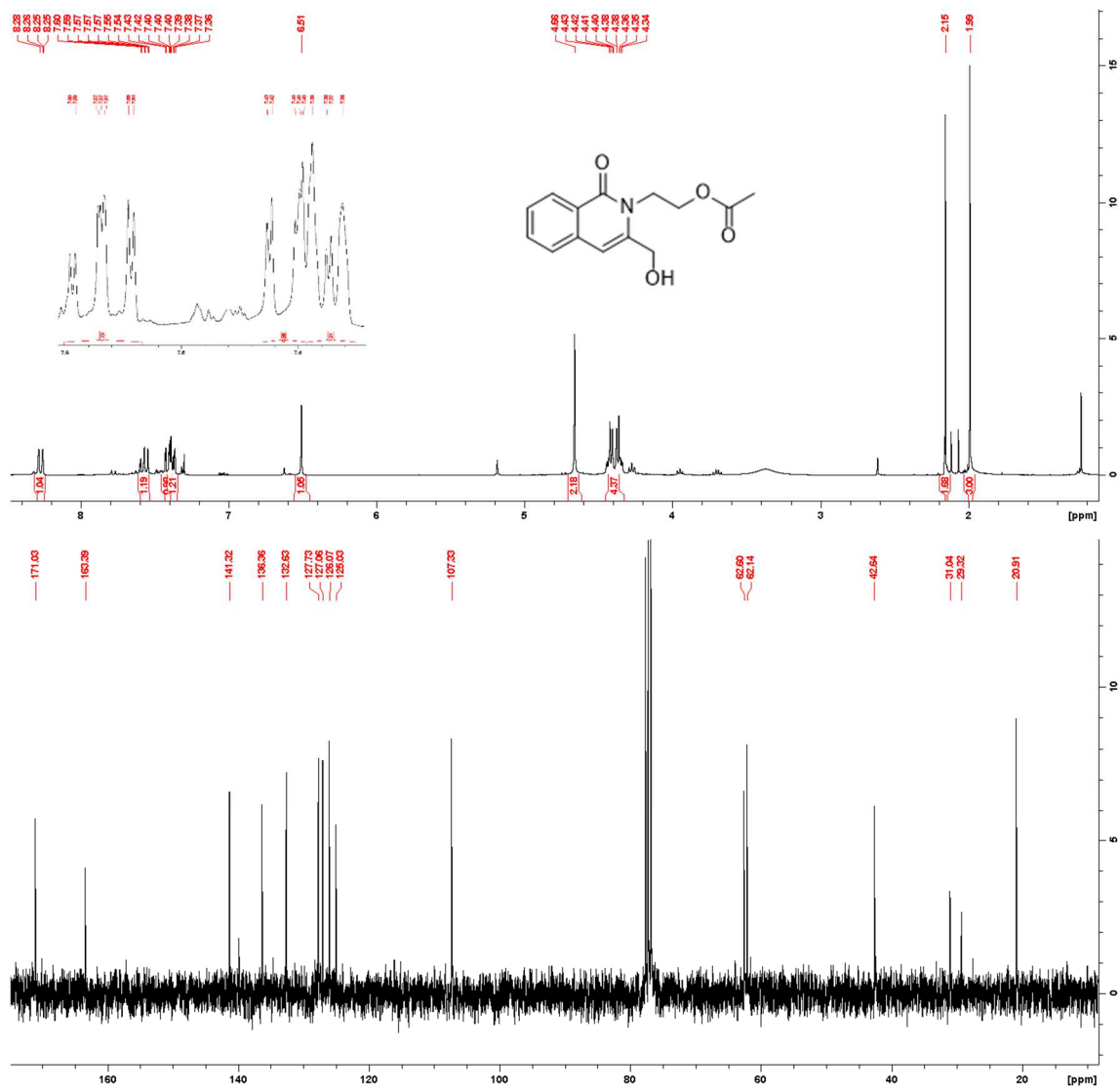
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 75



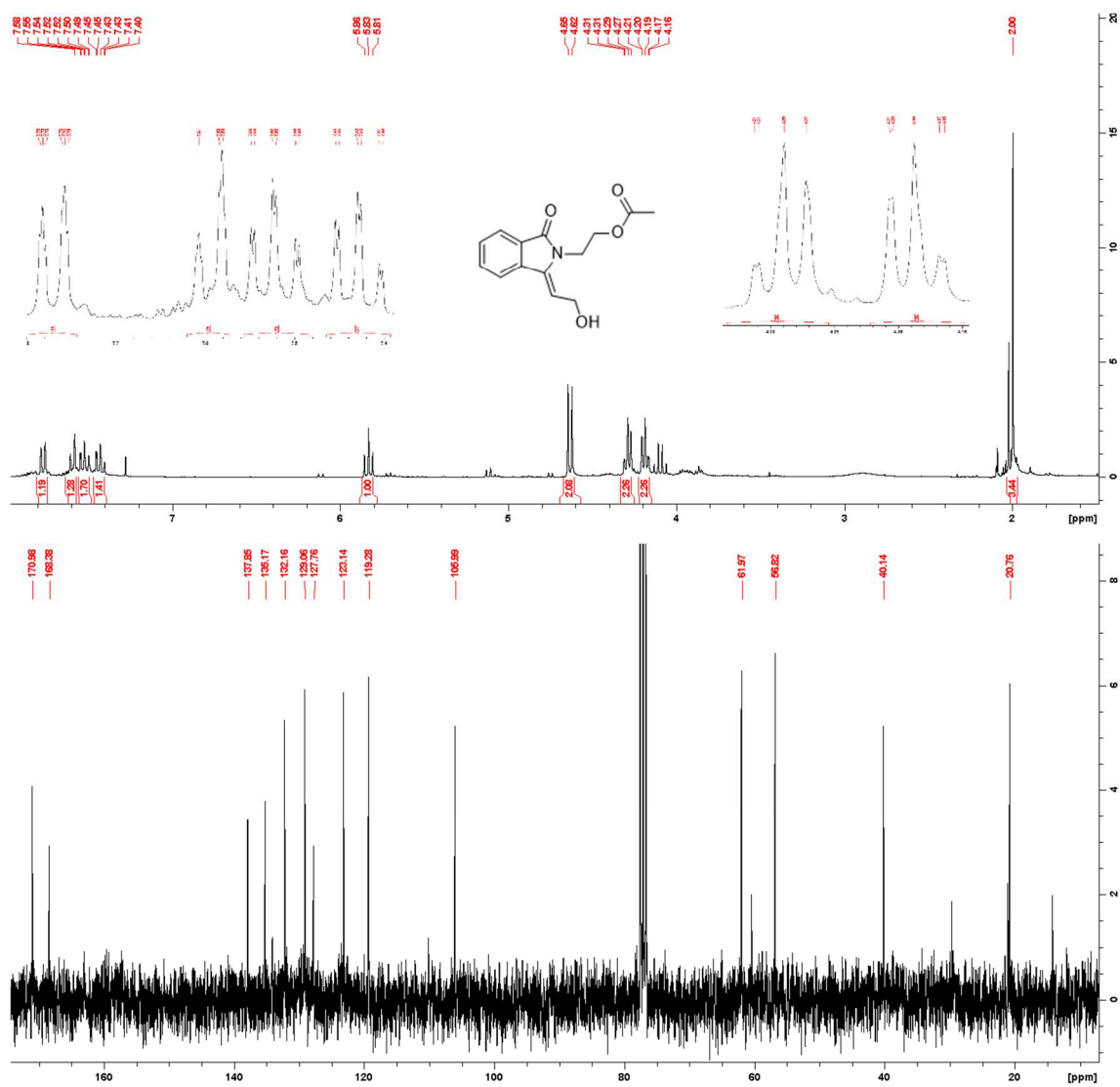
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 76



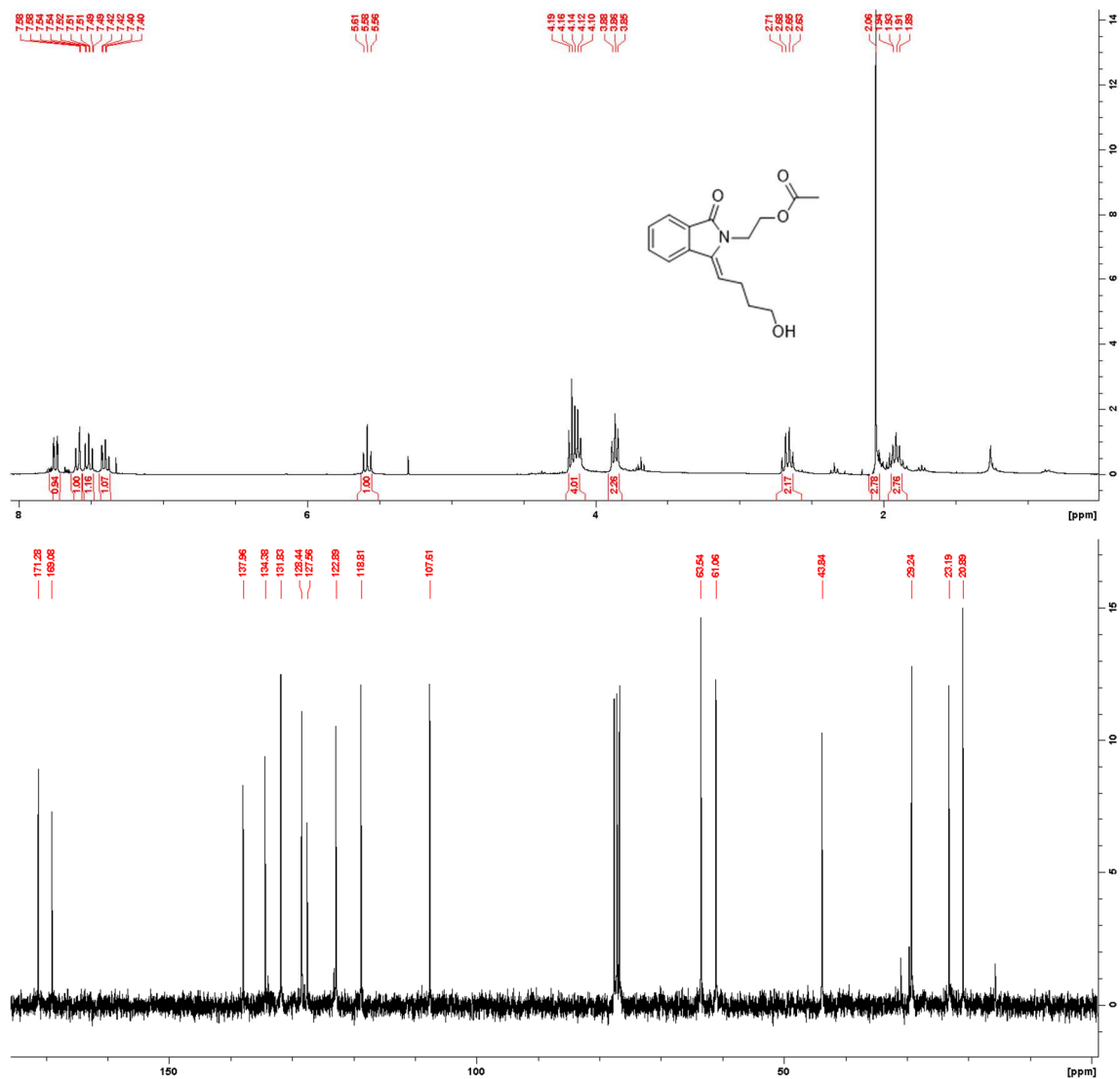
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 77



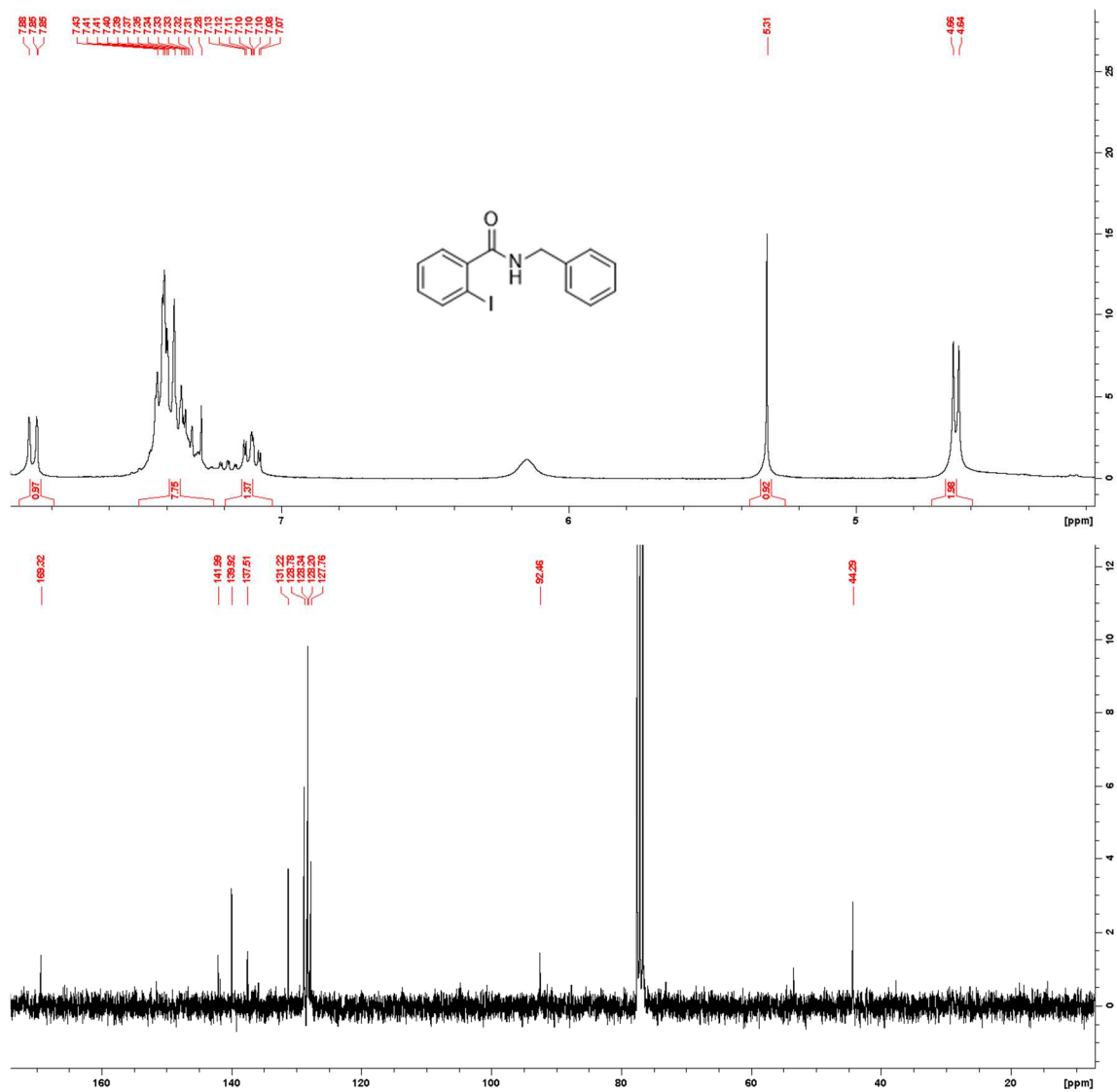
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 80



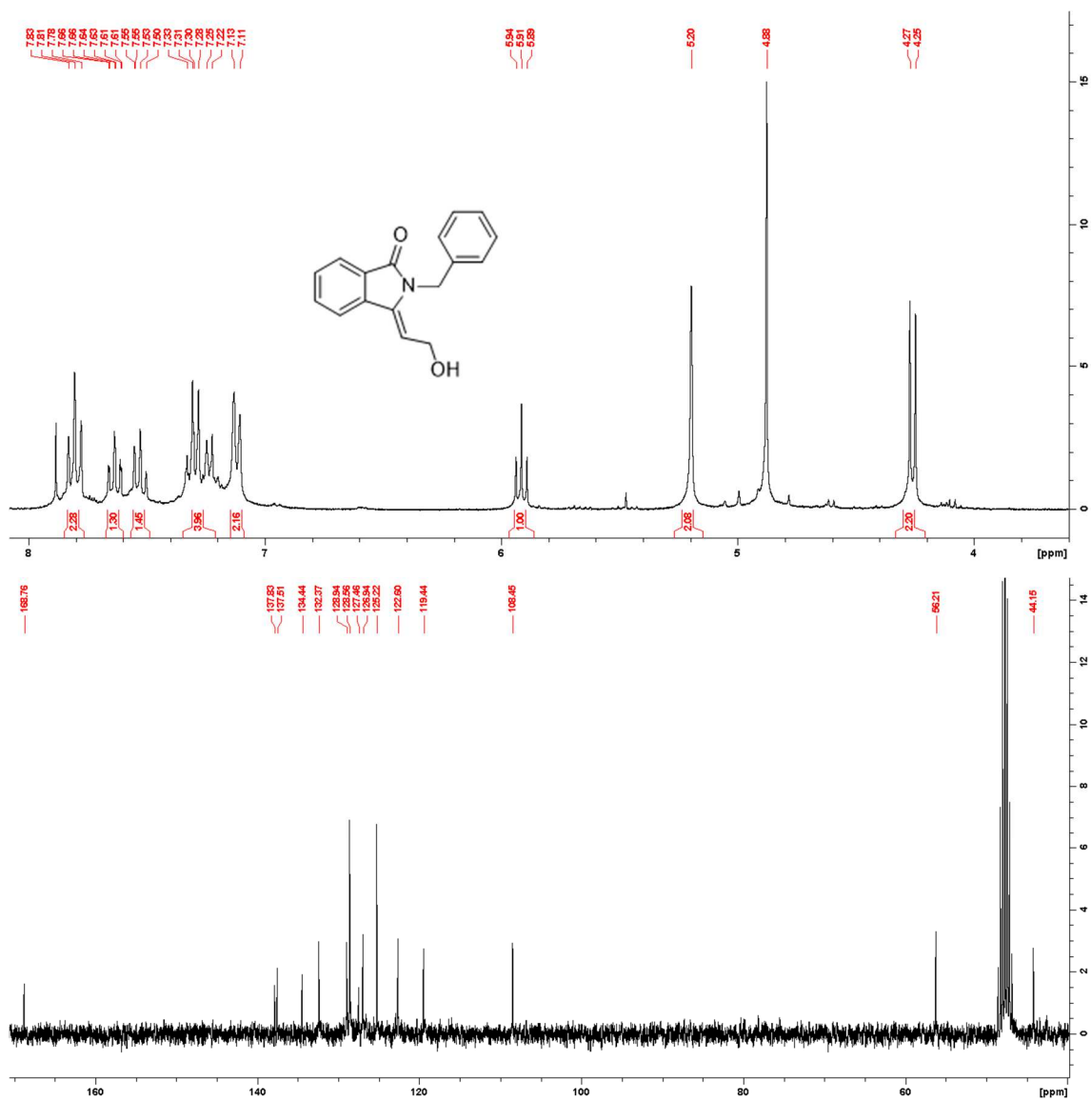
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 81



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 82



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 83



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 85