

MARCELO LUIZ QUINT

SÍNTESE E ESTUDO DE CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE N-FENILCITRACONIMIDAS, E MONOANILIDAS DOS ÁCIDOS SUCCÍNICO, MALÊICO, CITRACÔNICO, ITACÔNICO E FTÁLICO SEGUNDO O MÉTODO MANUAL DE TOPLISS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em química. Curso de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Orientada pelo Professor Doutor Ricardo José Nunes.

Florianópolis

2003

MARCELO LUIZ QUINT

**SÍNTESE E ESTUDO DE CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE
DE N-FENILCITRACONIMIDAS, E MONOANILIDAS DOS ÁCIDOS
SUCCÍNICO, MALÊICO, CITRACÔNICO, ITACÔNICO E FTÁLICO
SEGUNDO O MÉTODO MANUAL DE TOPLISS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em química no Curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Coordenador: Prof. Dr. Faruk Nome

Banca examinadora: Prof. Dr. César Zucco

Prof. Dr. Miguel S. B. Caro

Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares

Florianópolis, 6 de junho de 2003

***“O primeiro passo na busca da
felicidade é o aprendizado”***

Bstan-'dzin-rgya-mtsho, sua santidade o

Dalai Lama XIV, 1935

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Departamento de Química;

Ao professor Carlos Rogério Tonussi (Farmacologia / UFSC) pela realização dos ensaios farmacológicos;

Aos professores Ivana Eunice Baptista e Carlos Henrique Lemos Soares (Bioquímica / UFSC) pela realização dos ensaios toxicológicos;

À técnica de laboratório Solange (Ciências Farmacêuticas / UFSC) pelo preparo de tampões para testes de dissolução dos ácidos âmicos;

Aos funcionários da Central de Análises (Química / UFSC) pela paciência e presteza apresentadas nas análises dos compostos sintetizados

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Ricardo José Nunes, por ter acreditado na minha capacidade e pelo apoio no desenvolvimento do trabalho;

Ao colega Emerson Meyer (Alemão) pelas valiosas “aulas gratuitas” ao longo de anos de laboratório;

Aos colegas Cristiano Mora (Italiano), Luciano Fernandes (Gaúcho), Evilazio da Silva Andrade (Villa) pelas valiosas e intermináveis discussões pelo mundo da química;

Aos professores César Zucco, Antônio Carlos Joussef e Miguel Caro pelas valorosas aulas ministradas ao longo do curso;

Ao professores Antônio Carlos Joussef e Marcos Mandolesi Sá pelos ensinamentos da prática de laboratório e síntese orgânica;

Às colegas Luca e Denicce pelo auxílio no trabalho de bancada, inclusive síntese de alguns compostos;

Às colegas Carol e Kely e Natasha pelo convívio no laboratório;

À companheira Ghe pelo carinho e paciência enquanto eu escrevia esta dissertação;

À minha mãe Alaide, por anos de dedicação em meu favor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 IMIDAS MONOCÍCLICAS E SUA UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS	1
1.2 UTILIZAÇÃO DE MONOAMIDAS DOS ÁCIDOS SUCCÍNICOS, CITRACÔNICOS E ITACÔNICOS COMO INTERFERENTES DE SISTEMAS BIOLÓGICOS	4
1.3 MÉTODO MANUAL DE TOPLISS	6
2 OBJETIVOS	9
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
3.1 SÍNTESE DOS ÁCIDOS N-FENILSUCCINÂMICOS	10
3.2 SÍNTESE DOS ÁCIDOS N-FENILMALEÂMICOS	10
3.3 SÍNTESE DOS ÁCIDOS N-FENILCITRACONÂMICOS	11
3.3.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO ÁCIDO N-FENILCITRACONÂMICO.....	12
3.3.2 ESTUDO DA ISOMERIZAÇÃO ENTRE ÁCIDOS CITRACONÂMICOS.....	13
3.4 SÍNTESE DOS ÁCIDOS N-FENILITACONÂMICOS	22
3.4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS ÁCIDOS N-FENILITACONÂMICOS.....	23
3.5 SÍNTESE DOS ÁCIDOS N-FENILFTALÂMICOS	28
3.6 SÍNTESE DE N-FENILCITRACONIMIDAS	28
3.7 TOXICIDADE AGUDA FRENTE À <i>Artemia salina</i>	29
3.8 TESTE DE FORMALINA EM RATOS	36
3.9 TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS	41
3.10 TESTE DE CARRAGENINA EM RATOS	48
4 SEÇÃO EXPERIMENTAL	49
4.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO	49
4.2 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS N-FENILSSUCCINÂMICOS	50
4.2.1 SÍNTESE DO ÁCIDO N-FENILSUCCINÂMICO.....	50
4.2.2 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(<i>p</i> -CLOROFENIL)SUCCINÂMICO.....	51
4.2.3 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(3,4-DICLOROFENIL)SUCCINÂMICO.....	51
4.2.4 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METILFENIL)SUCCINÂMICO.....	52
4.2.5 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METOXIFENIL)SUCCINÂMICO.....	52

4.3 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS N-FENILMALEÂMICOS	52
4.3.1 SÍNTESE DO ÁCIDO N-FENILMALEÂMICO	52
4.3.2 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(<i>p</i> -CLOROFENIL)MALEÂMICO	53
4.3.3 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(3,4-DICLOROFENIL)MALEÂMICO	53
4.3.4 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METILFENIL)MALEÂMICO	54
4.3.5 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METOXIFENIL)MALEÂMICO	54
4.4 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS N-FENILCITRACONÂMICOS	55
4.4.1 SÍNTESE DO ÁCIDO N-FENILCITRACONÂMICO.....	55
4.4.2 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(<i>p</i> -CLOROFENIL)CITRACONÂMICO	56
4.4.3 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(3,4-DICLOROFENIL)CITRACONÂMICO	56
4.4.4 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METILFENIL)CITRACONÂMICO.....	57
4.4.5 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METOXIFENIL)CITRACONÂMICO	57
4.5 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS N-FENILITACONÂMICOS	58
4.5.1 SÍNTESE DO ÁCIDO N-FENILITACONÂMICO.....	58
4.5.2 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(<i>p</i> -CLOROFENIL)ITACONÂMICO.....	59
4.5.3 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(3,4-DICLOROFENIL)ITACONÂMICO	59
4.5.4 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METILFENIL)ITACONÂMICO.....	60
4.5.5 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METOXIFENIL)ITACONÂMICO	60
4.6 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS N-FENILFTALÂMICOS	61
4.6.1 SÍNTESE DO ÁCIDO N-FENILFTALÂMICO	61
4.6.2 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(<i>p</i> -CLOROFENIL)FTALÂMICO.....	62
4.6.3 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(3,4-DICLOROFENIL)FTALÂMICO	62
4.6.4 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METILFENIL)FTALÂMICO	62
4.6.5 SÍNTESE DO ÁCIDO N-(4-METOXIFENIL)FTALÂMICO	63
4.7 SÍNTESE DA SÉRIE DE N-FENILCITRACONIMIDAS	63
4.7.1 SÍNTESE DA SÉRIE DE N-FENILCITRACONIMIDAS POR DESIDRATAÇÃO DE ÁCIDOS N-FENILCITRACONÂMICOS SUBSTITUÍDOS (MÉTODO A).....	63
4.7.1.1 SÍNTESE DA N-FENILCITRACONIMIDA.....	63
4.7.1.2 SÍNTESE DA N-(<i>p</i> -CLOROFENIL)CITRACONIMIDA	64
4.7.1.3 SÍNTESE DA N-(3,4-DICLOROFENIL)CITRACONIMIDA.....	65
4.7.1.4 SÍNTESE DA N-(4-METILFENIL)CITRACONIMIDA	65
4.7.1.5 SÍNTESE DA N-(4-METOXIFENIL)CITRACONIMIDA	66

4.7.2 SÍNTESE DA SÉRIE DE <i>N</i> -FENILCITRACONIMIDAS POR IMIDIZAÇÃO DIRETA DO ANDRIDO CITRACÔNICO COM ANILINAS SUBSTITUÍDAS EM ÁCIDO ACÉTICO(MÉTODO B)	66
4.7.2.1 SÍNTESE DA <i>N</i> -FENILCITRACONIMIDA.....	66
4.7.2.2 SÍNTESE DA <i>N</i> -(<i>p</i> -CLOROFENIL)CITRACONIMIDA	67
4.7.2.3 SÍNTESE DA <i>N</i> -(3,4-DICLOROFENIL)CITRACONIMIDA.....	67
4.7.2.4 SÍNTESE DA <i>N</i> -(4-METILFENIL)CITRACONIMIDA	67
4.7.2.5 SÍNTESE DA <i>N</i> -(4-METOXIFENIL)CITRACONIMIDA	68
4.8 ANÁLISE DA ISOMERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS <i>N</i>-FENILCITRACONÂMICOS VIA ESPECTROMETRIA DE RMN ¹H	68
4.9 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA FRENTE À <i>Artemia salina</i>.....	69
4.9.1 SOLUÇÕES INICIAIS	69
4.9.2 BIOENSAIOS COM <i>Artemia salina</i>	69
4.9.3 TESTES DE SENSIBILIDADE	70
4.9.4 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM AS DROGAS	71
4.9.5 CÁLCULOS PARA A CL ₅₀	71
4.10 TESTE DE FORMALINA EM RATOS	72
4.10.1 ANIMAIS	72
4.10.2 DROGAS	72
4.10.3 TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR FORMALINA	72
4.10.3.1 SISTEMA DE REGISTRO DE NOCICEPÇÃO ARTICULAR.....	72
4.10.3.2 INJEÇÃO E DILUIÇÃO DE DROGAS.....	74
4.10.4 TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA	74
4.11 TESTE DE CARRAGENINA EM RATOS	74
4.12 TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS	75
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES FARMACOLÓGICOS	75
5 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Síntese dos ácidos <i>N</i> -fenilsuccinâmicos substituídos	10
Esquema 2 Síntese dos ácidos <i>N</i> -fenilmaleâmicos substituídos	11
Esquema 3 Síntese dos ácidos <i>N</i> -fenilcitraconâmicos substituídos	11
Esquema 4 Síntese dos ácidos <i>N</i> -fenilitaconâmicos substituídos	23
Esquema 5 Síntese dos ácidos <i>N</i> -fenilftalâmicos substituídos	28
Esquema 6 Síntese das <i>N</i> -fenilcitraconimidias substituídas (método A)	29
Esquema 7 Síntese das <i>N</i> -fenilcitraconimidias substituídas (método B)	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-anilino-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-anilino-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....15
- Figura 2** Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....16
- Figura 3** Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....17
- Figura 4** Composição relativa entre o ácido (2Z)-3-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....18
- Figura 5** Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....19
- Figura 6** Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-anilino-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-anilino-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....20
- Figura 7** Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....20
- Figura 8** Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....21
- Figura 9** Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-3-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....21
- Figura 10** Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8).....22
- Figura 11** espectros de RMN ¹H do ácido *N*-fenilitaconâmico como isolado (a) e do seu sal sódico (b)24
- Figura 12** Partes do espectro de RMN ¹³C acoplado do ácido *N*-fenilitaconâmico isolado (carbono metilênico à direita e carbonos carbonílicos à esquerda)25
- Figura 13** Partes do espectro de RMN ¹³C parcialmente acoplado (irradiados os hidrogênios do carbono secundário) do ácido *N*-fenilitaconâmico isolado (região do carbono secundário à direita e carbonos carbonílicos à esquerda)26
- Figura 14** Partes do espectro de RMN ¹³C acoplado do sal sódico do ácido *N*-fenilitaconâmico isolado, onde a carbonila que no ácido ressoava em 168,4 ppm passou, no sal, a

- ressoar em 172,2 ppm ($\Delta\delta = 3,8$ ppm) e a que apresentava $\delta = 169,2$ no ácido, no sal passou a apresentar $\delta = 170,5$ ($\Delta\delta = 1,3$ ppm).....27
- Figura 15** Curvas tempo-resposta da *N*-fenilcitraconimida nas doses de 134 $\mu\text{mol/kg}$, 267 $\mu\text{mol/kg}$, 534 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina37
- Figura 16** Curvas tempo-resposta da *N*-(*p*-clorofenil)citraconimida nas doses de 27 $\mu\text{mol/kg}$, 54 $\mu\text{mol/kg}$, 108 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina38
- Figura 17** Curvas tempo-resposta da *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida nas doses de 23 $\mu\text{mol/kg}$, 47 $\mu\text{mol/kg}$, 98 $\mu\text{mol/kg}$, 195 $\mu\text{mol/kg}$, 390 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina39
- Figura 18** Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metilfenil)citraconimida nas doses de 60 $\mu\text{mol/kg}$, 124 $\mu\text{mol/kg}$, 248 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina40
- Figura 19** Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metoxifenil)citraconimida nas doses de 14 $\mu\text{mol/kg}$, 28 $\mu\text{mol/kg}$, 55 $\mu\text{mol/kg}$, 115 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina41
- Figura 20** Curvas tempo-resposta do ácido (2*Z*)-4-anilino-2-metil-4-oxobut-2-enóico, (**36**) na dose de 54,8 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina43
- Figura 21** Curvas tempo-resposta da *N*-fenilcitraconimida, (**51**), na dose de 50 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina43
- Figura 22** Curvas tempo-resposta do ácido (2*Z*)-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico, (**37**) na dose de 13 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina44
- Figura 23** Curvas tempo-resposta da *N*-(*p*-clorofenil)citraconimida, (**52**), na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os

- dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina44
- Figura 24** Curvas tempo-resposta do ácido (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico, **(38)** na dose de 12,85 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina45
- Figura 25** Curvas tempo-resposta da *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida, **(53)**, na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina45
- Figura 26** Curvas tempo-resposta do ácido (2Z)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico, **(39)**, na dose de 13 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina46
- Figura 27** Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metilfenil)citraconimida, **(54)**, na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina46
- Figura 28** Curvas tempo-resposta do ácido (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico, **(40)**, na dose de 13 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina47
- Figura 29** Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metoxifenil)citraconimida, **(55)**, na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina47
- Figura 30** Curvas tempo-resposta (aumento no volume da pata) do teste de carragenina em ratos (esquerda) e Inibição do edema calculada a partir da redução da área sob o gráfico do controle (direita) para as *N*-fenilcitraconimidias48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores dos parâmetros ^a	7
Tabela 2 Ordem de Potência para Várias Dependências Paramétricas	8
Tabela 3 Seleção de Novos Substituintes	8
Tabela 4 Proporções dos ácidos citraconâmicos II e I nas misturas reacionais obtidas a partir de aminas e anidrido citracônico [resíduo da mistura reacional]	12
Tabela 5 Resultado dos testes de toxicidade aguda (<i>Artemia salina</i>) para os ácidos <i>N</i> -fenilmaleâmicos substituídos	30
Tabela 6 Resultado dos testes de toxicidade aguda (<i>Artemia salina</i>) para os ácidos <i>N</i> -fenilcitraconâmicos substituídos	31
Tabela 7 Resultado dos testes de toxicidade aguda (<i>Artemia salina</i>) para os ácidos <i>N</i> -fenilitaconâmicos substituídos	33
Tabela 8 Resultado dos testes de toxicidade aguda (<i>Artemia salina</i>) para os ácidos <i>N</i> -fenilsuccinâmicos substituídos	34
Tabela 9 Resultado dos testes de toxicidade aguda (<i>Artemia salina</i>) para os ácidos <i>N</i> -fenilftalâmicos substituídos	35
Tabela 10 Cronograma das leituras de RMN ¹ H com as respectivas temperaturas	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SINAIS

AINE	Antiinflamatório não esteroideal;
c.c.d.	Cromatografia em camada delgada;
CL ₅₀	Concentração letal a 50 % da população exposta;
d	Dubleto;
DMSO	Dimetilsulfóxido
e. m. p.	Erro médio padrão;
IA	Intra-articular;
IP	Intraperitoneal;
m	Multipleteo;
ppm	Partes por milhão;
RMN	Ressonância magnética nuclear;
rpm	Rotação por minuto;
s	Singleto;
sl	Singleto largo;
T _{amb}	Temperatura ambiente;
THF	Tetrahidrofurano;
TMS	Tetrametilsilano;
v. g.	<i>Verbi gratia</i> (Por exemplo)

RESUMO

Na busca do desenvolvimento de fármacos com interesse terapêutico foram sintetizadas séries de ácidos *N*-fenilsuccinâmicos, *N*-fenilmaleâmicos, *N*-fenilcitraconâmicos, *N*-fenilitaconâmicos, *N*-fenilftalâmicos e *N*-fenilcitraconimidas. Esses compostos foram submetidos a ensaios toxicológicos frente às larvas de *Artemia salina*, determinando-se a correlação entre estrutura e atividade segundo o método manual de Topliss.⁵⁷ Estudou-se o potencial analgésico das citraconimidas, trabalhando-se com a hipótese de que estas sejam pró-fármacos. Por isso, foram realizados testes de formalina das *N*-fenilcitraconimidas, dos ácidos *N*-fenilcitraconâmicos, comparando-se o efeito entre as duas classes de compostos. Estudou-se também a estereosseletividade da reação entre o anidrido citracônico e o anidrido itacônico com anilinas, caracterizando-se os produtos formados.

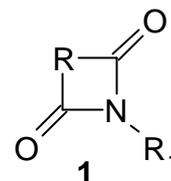
ABSTRACT

In order to prepare compounds with terapeutical interest, a series of *N*-phenylsuccinamic, *N*-phenylmaleamic, *N*-phenylcitraconamic, *N*-phenylitaconamic, *N*-phenilphthalamic acids and *N*-phenylcitraconimides was prepared. These compounds have been submitted towards the brine shrimp *Artemia salina* toxicological bioassay, determined it structure activity relationships according to Topliss manual method. The analgesic potential of citraconimidas derivatives was evaluated based on the hypothesis that these compounds act as pro-drugs. With this on mind, the *N*-phenylcitraconimides were compared with *N*-citraconamic acids on the Formalin test in mice. The stereo selectivity of the reaction of citraconic and itaconic anhydride with anilines was also studied, with the formed products fully characterized.

1 INTRODUÇÃO

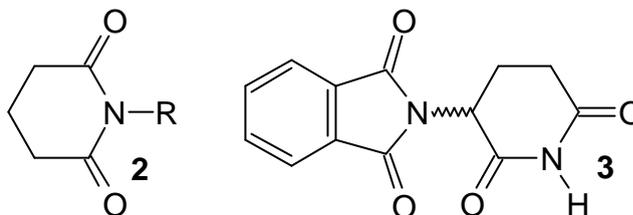
1.1 IMIDAS MONOCÍCLICAS E SUA UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

As imidas monocíclicas (1) são compostos derivados de um ácido dicarboxílico com a amônia ou outra amina primária pela eliminação de água.¹



As glutarimidas (2) possuem numerosas atividades biológicas, v.g., a talidomida ((±)-ftalimidoglutarimida)

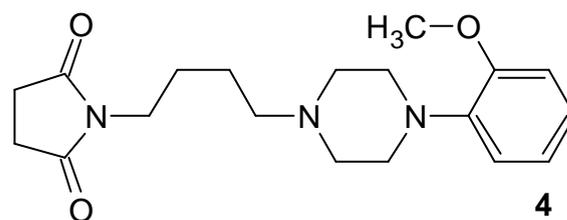
(3) teve, recentemente, atividade comprovada no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência



Adquirida (SIDA),^{2,3} de doenças auto-imunes como artrite reumatóide e doença de Crohn, de alguns tipos de câncer como o mieloma múltiplo e da tuberculose.³

Derivados glutarimídicos são usados contra cânceres estrogenodependentes, possuindo efeitos muscarínicos,

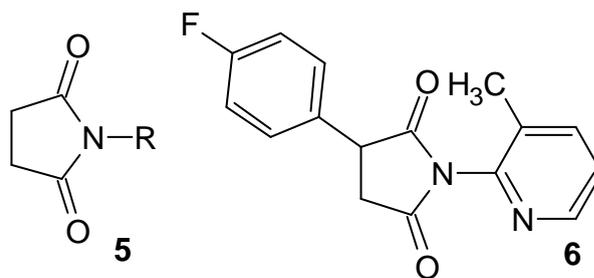
atividades anticonvulsivantes,² e antagonistas serotoninérgicos, como é



o caso da succinimidobutilpiperazina

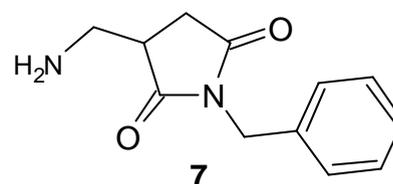
(4).⁴

As succinimidas (5) demonstraram possuir atividades anticonvulsivantes, como se pode

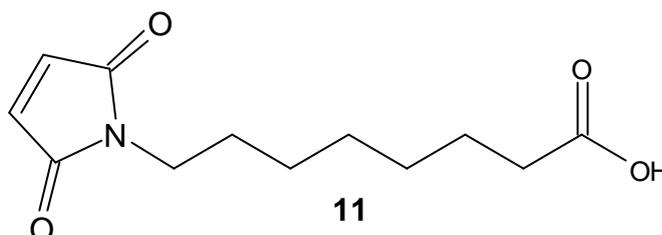
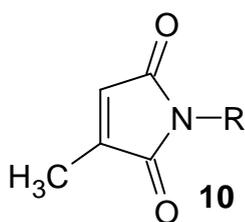
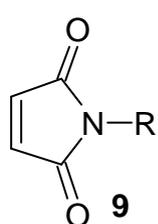
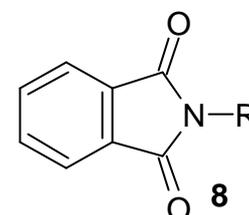


exemplificar com uma 3-fenilsuccinimida (**6**) sintetizada e testada por pesquisadores poloneses⁵ e uma aminometilsuccinimida desenvolvida por estadunidenses (**7**).⁶

Succinimidas (**5**) e ftalimidas (**8**) entre outras imidas cíclicas, demonstraram potente atividade hipolipidêmica em camundongos.⁷

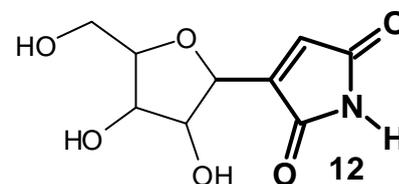


As maleimidas (**9**) especialmente a *N*-carboxiheptilmaleimida (**11**) tiveram recentemente comprovados efeitos como inibidores da Prostaglandina Endoperóxido Sintetase (PGHS, EC 1.14.99.1), podendo vir a ser futuros analgésicos ou antiinflamatórios.⁸



Demonstrou-se que maleimidas (**9**) e citraconimidas (**10**) com substituintes de baixo peso molecular possuem potente atividade repelente de roedores.⁹

As citraconimidas constituem uma porção (demonstrada aqui em **negrito**) do antibiótico nucleosídico de ocorrência natural showdomicina (**12**).¹⁰



As imidas cíclicas (**1**) são assimiladas por microorganismos, que possuem sistemas enzimáticos que as degradam, podendo até servir como única fonte de carbono. Parece que o papel fisiológico da atividade de transformação

das imidas cíclicas é o de degradação de xenobióticos, uma vez que existem poucas imidas de ocorrência natural.¹¹

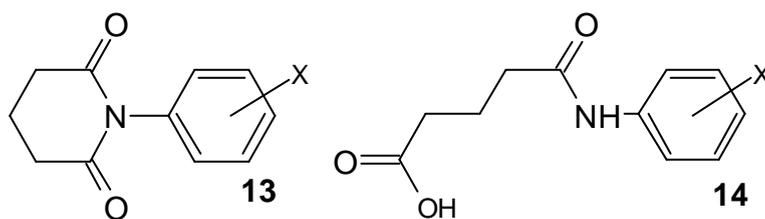
As imidas cíclicas e seus derivados continuam sendo alvo promissor como busca de novos fármacos, como se evidencia em recente revisão na literatura.¹²

A *N*-etilmaleimida produz efeito diurético, porém maleimidohipouratos e maleimidobenzoatos não modificam a função renal em cães.¹³

Algumas 3,4-dicloromaleimidas, maleimidas e succinimidas foram efetivas no modelo de contração abdominal induzida por ácido acético.¹⁴

Recentemente demonstrou-se alta atividade analgésica entre as *N*-arilglutarimidas (**13**). Constatou-se, porém, que o produto da hidrólise destes compostos, os ácidos *N*-arilglutarâmicos (**14**) provocaram efeitos da mesma ordem de potência em relação às imidas às quais são relacionados.¹⁵ Esta constatação reforça a hipótese de que, em alguns casos, as imidas funcionariam na prática como pró-fármacos, sendo metabolizadas aos respectivos metabólitos

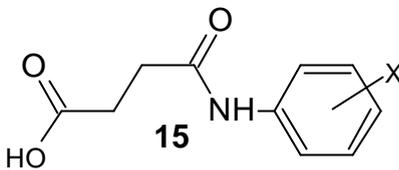
ativos. A seguir são arrolados alguns papéis desempenhados por ácidos ânicos objetos de



estudo desta dissertação em sistemas vivos a partir de uma breve revisão na literatura.

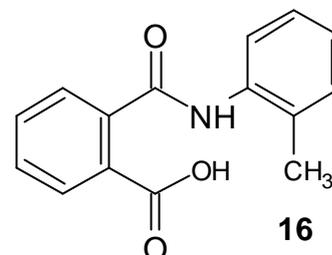
1.2 UTILIZAÇÃO DE MONOAMIDAS DOS ÁCIDOS SUCCÍNICOS, CITRACÔNICOS E ITACÔNICOS COMO INTERFERENTES DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os ácidos *N*-fenilsuccinâmicos (15) (ácidos 4-anilino-4-oxobutanóicos) e compostos quimicamente relacionados possuem atividade biológica variada. Testaram-se suas propriedades edulcorantes (adoçantes),¹⁶ foram patenteados para tratamento da doença de Alzheimer,^{17,18} pesquisados como potenciais pesticidas,¹⁹ viricidas²⁰ e antimicrobianos,²¹ especialmente para bactérias Gram negativas.²² Os ácidos succinâmicos são sintetizados em organismos vivos, sendo reconhecidos como os principais metabólitos da 3,4-dicloroanilina em cultura de fungos,²³ bem como em ratos.²⁴ Testou-se o potencial mutagênico de ácidos succinâmicos clorados com resultados negativos.²⁵ Derivados glicídicos foram testados como anti-hipertensivos.²⁶ Os ácidos *N*-fenilftalâmicos foram patenteados na França²⁷ e na Alemanha²⁸ como antiinflamatórios. Seus complexos com metais como Pd(II), Co(II), Ni(II) e Cu(II) tiveram comprovada atividade fungistática contra patógenos.²⁹ Derivados (amidas) do ácido 6-aminopenicilânico com ácidos *N*-fenilftalâmicos demonstraram atividade bactericida *in vitro* contra organismos produtores de penicilinase.³⁰ Foram estudados por suas atividades hiperlipidêmicas e aumento de peso corporal em camundongos.³¹ Na agricultura foram estudados como potenciais inseticidas³² e pesticidas,³³ estimulantes do amadurecimento³⁴ e do rendimento^{35,36} da produção de tomates, reguladores de crescimento na produção de sementes de trevo branco (*Trifolium repens*),³⁷ trevo vermelho,³⁸ trigo, arroz³⁹ e milho,⁴⁰ aumento na produção de sementes e capacidade de germinação da



beterraba,⁴¹ aumento na produção de sementes de girassol. O ácido *N*-(*m*-tolil)ftalâmico (**16**) é comercializado nos E.U.A. com o nome Duraset para incremento no rendimento das culturas de feijão-de-Lima e tomates.⁴²

Recentes estudos demonstram que o ácido *N*-etilmaleâmico não é tóxico à *E. coli*, mesmo a altas concentrações.⁴³ O ácido *o*-nitrofenilmaleâmico demonstrou aumentar a radiosensibilidade da *E.*



coli.⁴⁴ Já os ácidos *N*-fenilmaleâmicos tiveram comprovados seus efeitos antibacterianos e antifúngicos.⁴⁵ Foram patenteados como inibidores do crescimento de algas em redes de pesca.⁴⁶ Complexos de ácidos *N*-fenilmaleâmicos com Pd(II) exibiram atividade fungistática contra patógenos,²⁹ bem como antibolor para tintas a base de látex. Derivados (amidas) do ácido 6-aminopenicilânico com ácidos *N*-fenilmaleâmicos demonstraram atividade bactericida *in vitro* seletivamente contra organismos gram-positivos⁴⁷ e atividade viricida.⁴⁸ Os ácidos *N*-fenilmaleâmicos inibem a catecol-*o*-metiltransferase.⁴⁹ Demonstrou-se que reduzem o nível de colesterol,⁵⁰ triglicérides e fosfolipídios plasmáticos em ratos.⁵¹ Os ácidos *N*-fenilmaleâmicos, quando aplicados ao sorgo, são antídotos eficientes aos danos causados pelo herbicida Alachlor[®] (2-Cl-2',6'-dietil-*N*-(metoximetil)acetanilida).⁵² Foram patenteados como reguladores de crescimento vegetal.⁵³

Não há relatos de testes de efeitos biológicos dos ácidos *N*-fenilcitraconâmicos.

Os ácidos *N*-fenilitaconâmicos foram patenteados como fungicidas.⁵⁴ Demonstrou-se atividade herbicida⁵⁵ e reguladora do crescimento vegetal.⁵⁶

1.3 MÉTODO MANUAL DE TOPLISS

O método manual de Topliss⁵⁷ para o desenvolvimento de drogas não envolve metodologia estatística pelo qual um grupo análogo com diferentes padrões de substituição é sintetizado inicialmente. O grupo inicial consiste em compostos com os primeiros 5 substituintes da Tabela 1, que possuem valores diferenciados dos parâmetros π (constante de hidrofobicidade do substituinte) e σ (constante eletrônica do substituinte, ou σ de Hammett). Tais compostos devem ser prontamente acessíveis do ponto de vista sintético. Estes 5 compostos têm sua potência testada e são, deste modo, ordenados segundo essa. A ordem de potência é comparada com uma tabela que ordena os parâmetros π e σ entre os 5 substituintes, bem como algumas combinações matemáticas entre esses (v. **Tabela 2**). Essas representam diferentes pesos paramétricos que possam estar influenciando o efeito testado. Incluem-se também efeitos estereoquímicos na posição 4 do anel (E_4). Contando com a similaridade de algumas dependências paramétricas e com variações da resposta dos sistemas biológicos envolvidos, podem-se esperar discrepâncias na comparação da ordem de potência testada com a teórica. Por este motivo, quanto maior for a faixa de possível variação do efeito biológico testado, melhores resultados poderão ser alcançados.

Após a determinação dos parâmetros envolvidos sintetiza-se a nova série de compostos, utilizando-se substituintes que possuam como característica um valor incrementado desses parâmetros ou da combinação ponderada envolvida lançando mão de uma tabela que classifica vários substituintes de acordo com sua similaridade de efeitos eletrônicos ou estereoquímicos (v. **Tabela 3**).

Tabela 1 Valores dos parâmetros^a

Substituintes	ρ	s	$\pi - \sigma$	$2\pi - \sigma$	$\pi - 2\sigma$	$\pi - 3\sigma$	$-\sigma$	$\pi + \sigma$	$2\pi - \pi^2$
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-Cl	0,71	0,23	0,48	1,19	0,25	0,02	-0,23	0,94	0,92
3,4-Cl ₂	1,25	0,52	0,73	1,98	0,21	-0,31	-0,52	1,77	0,94
4-CH ₃	0,56	-0,17	0,73	1,29	0,90	1,07	0,17	0,39	0,81
4-OCH ₃	-0,02	-0,27	0,25	0,23	0,52	0,79	0,27	-0,29	-0,04
3-CF ₃ ,4-Cl	1,59	0,66	0,93	2,52	2,91	-0,39	-0,66	2,25	0,65
3-CF ₃ ,4-NO ₂	0,60	1,21	-0,61	-0,01	-1,82	-2,97	-1,21	1,81	0,84
4-CF ₃	0,88	0,54	0,34	1,22	-0,20	-0,74	-0,54	1,42	0,99
2,4-Cl ₂	1,42	0,46	0,96	2,38	0,50	0,04	-0,46	1,88	0,82
c-C ₅ H ₉	2,14	-0,02	2,16	4,30	2,18	2,20	0,02	2,12	-0,30
c-C ₆ H ₁₁	2,51	-0,22	2,73	5,24	2,95	3,17	0,22	2,29	-1,28
4-CH(CH ₃) ₂	1,53	-0,05	1,58	3,11	1,63	1,68	0,05	1,48	0,72
4-C(CH ₃) ₃	1,98	-0,20	2,18	4,16	2,38	2,58	0,20	1,78	0,04
3,4-(CH ₃) ₂	0,99	-0,30	1,29	2,28	1,59	1,89	0,30	0,69	1,00
4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	1,55 ^b	-0,32	1,87	3,42	2,19	2,51	0,32	1,23	0,70
4-OCH ₂ Ph	2,13 ^b	-0,42	2,55	4,68	2,97	3,39	0,42	1,71	-0,28
4-N(C ₂ H ₅) ₂	1,18	-0,83	2,01	3,19	3,84	4,67	0,83	0,35	0,97
4-N(CH ₃) ₂	0,18	-0,83	1,01	1,19	1,84	2,67	0,83	-0,65	0,33
4-NH ₂	-1,23	-0,66	-0,57	-1,80	0,09	0,75	0,66	-1,89	-3,97
4-NHC ₄ H ₉	1,45	-0,51	1,96	2,39	2,47	2,98	0,51	0,94	0,80
4-OCH(CH ₃) ₂	1,03 ^b	-0,45	1,48	2,51	1,93	2,38	0,45	0,58	1,00
3-CH ₃ ,4-OCH ₃	0,54	-0,26	0,80	1,34	1,06	1,32	0,26	0,28	0,79
4-Br	0,86	0,23	0,57	1,49	0,40	1,55	-0,23	1,09	0,98
3-CF ₃	0,88	0,43	0,45	1,43	0,02	2,17	-0,43	1,31	0,99
4-C ₂ H ₅	1,02	-0,15	1,17	2,19	1,32	1,47	0,15	0,87	1,00
4-O(CH ₂) ₂ CH ₃	1,05	-0,25	1,30	2,35	1,55	1,80	0,25	0,80	1,00
3-CH ₃ ,4-Cl	1,29	0,17	1,12	2,41	0,95	0,78	-0,17	1,46	0,92
3-Cl	0,71	0,37	0,34	1,05	-0,03	-0,30	-0,37	1,08	0,92
3-CH ₃	0,56	-0,07	0,63	1,19	0,70	0,77	0,07	0,49	0,81
3-OCH ₃	-0,02	0,12	-0,14	-0,16	-0,26	-0,38	-0,12	0,10	-0,04
3-N(CH ₃) ₂	0,18	-0,15	0,33	0,51	0,48	0,63	0,15	0,03	0,33
3,5-Cl ₂	1,25	0,75	0,50	1,75	-0,25	-1,00	-0,75	2,20	0,94
2-Cl	0,71	0,23	0,48	1,19	0,25	0,02	-0,23	0,94	0,92
2-CH ₃	0,56	-0,17	0,73	1,29	0,90	1,07	0,17	0,39	0,81
2-OCH ₃	-0,02	-0,27	0,25	0,23	0,52	0,79	0,27	-0,29	-0,04
2-F	0,14	0,06	0,08	0,22	0,02	-0,04	-0,06	0,20	0,28
4-F	0,14	0,06	0,08	0,22	0,02	-0,04	-0,06	0,20	0,28
4-NHCOCH ₃	-0,97	0,00	-0,97	-1,94	-0,97	-0,97	0,00	-0,97	-2,88
4-NHSO ₂ CH ₃	-1,18	0,03	-1,21	-2,39	-1,24	-1,27	-0,03	-1,15	-3,75
4-NO ₂	-0,28	0,78	-1,06	-1,34	-1,84	-2,62	-0,78	0,50	-0,64
4-COCH ₃	-0,55	0,50	-1,05	-1,60	-1,55	-2,05	-0,50	-0,05	-1,40
4-SO ₂ CH ₃	-1,63	0,72	-2,35	-3,98	-3,07	-3,79	-0,72	-0,72	-5,92
4-CONH ₂	-1,49	0,36	-1,85	-3,34	-2,21	-2,57	-0,36	-1,13	-5,20
4-SO ₂ NH ₂	-1,82	0,57	-2,39	-4,21	-3,01	-3,53	-0,57	-1,25	-6,95

^a C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani, e E. J. Lien, *J. Med. Chem.*, **16**, 1207 (1973). ^b Valor estimado.

(Tabela traduzida de Topliss, J. G.⁵⁷)

Tabela 2 Ordem de Potência para Várias Dependências Paramétricas

Substituintes	Parâmetros									E_4^a
	p	2p - p ²	s	-s	p+s	2p-s	p-s	p-2s	p-3s	
3,4-Cl ₂	1	1-2	1	5	1	1	1-2	3-4	5	2-5
4-Cl	2	1-2	2	4	2	2-3	3	3-4	3-4	2-5
4-CH ₃	3	3	4	2	3	2-3	1-2	1	1	2-5
4-OCH ₃	4-5	4-5	5	1	5	4	4	2	2	2-5
H	4-5	4-5	3	3	4	5	5	5	3-4	1

(Tabela traduzida de Topliss, J. G.⁵⁷)

Tabela 3 Seleção de Novos Substituintes

Prováveis parâmetros operativos	Seleção do novo substituinte
p, p + s, s	3-CF ₃ , 4-Cl; 3-CF ₃ , 4-NO ₂ ; 4-CF ₃ ; 2,4-C-C ₅ H ₉ ; 4-C-C ₆ H ₁₁
p, 2p - s, p - s	4-CH(CH ₃) ₂ ; 4-C(CH ₃) ₃ ; 3,4-(CH ₃) ₂ ; 4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ ; 4-OCH ₂ Ph; 4-N(C ₂ H ₅) ₂
p-2s, p-3s, -s	4-N(C ₂ H ₅) ₂ ; 4-N(CH ₃) ₂ ; 4-NH ₂ ; 4-NHC ₄ H ₉ ; 4-OH; 4-OCH(CH ₃) ₂ ; 3-CH ₃ , 4-OCH ₃
2p - p ²	4-Br; 3-CF ₃ ; 3,4-(CH ₃) ₂ ; 4-C ₂ H ₅ ; 4-O(CH ₂) ₂ CH ₃ ; 3-CH ₃ , 4-Cl
E_4^a	3-Cl; 3-CH ₃ ; 3-OCH ₃ ; 3-N(CH ₃) ₂ ; 3-CF ₃ ; 3,5-Cl ₂
Efeito orto	2-Cl; 2-CH; 2-OCH ₃ ; 2-F
Outros	4-F; 4-NHCOCH ₃ ; 4-NHSO ₂ CH ₃ ; 4-NO ₂ ; 4-COCH ₃ ; 4-SO ₂ CH ₃ ; 4-CONH ₂ ; 4-SO ₂ NH ₂

(Tabela traduzida de Topliss, J. G.⁵⁷; ^a não consta no artigo originalmente publicado por erro de impressão, conforme contato com o autor via correio eletrônico)

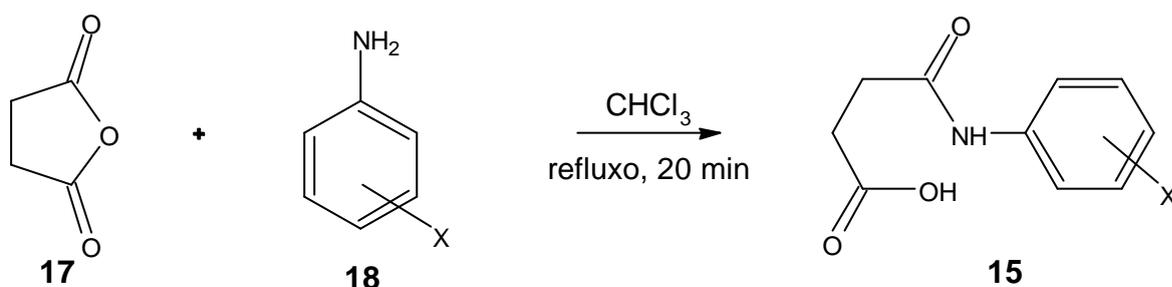
2 OBJETIVOS

1. Síntese e caracterização de séries de 5 ácidos *N*-fenilsuccinâmicos, *N*-fenilmaleâmicos, *N*-fenilcitraconâmicos, *N*-fenilitaconâmicos, *N*-fenilftalâmicos e *N*-fenilcitraconimidas;
2. Realização de ensaios toxicológicos frente às larvas de *Artemia salina* e determinar correlação entre estrutura e atividade segundo o método manual de Topliss dos compostos supracitados ;
3. Realização de ensaios farmacológicos de antinociceptividade das *N*-fenilcitraconimidas;
4. Realização de ensaios farmacológicos de antinociceptividade dos ácidos *N*-fenilcitraconâmicos e comparação com o efeito das respectivas *N*-fenilcitraconimidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE DOS ÁCIDOS *N*-FENILSUCCINÂMICOS

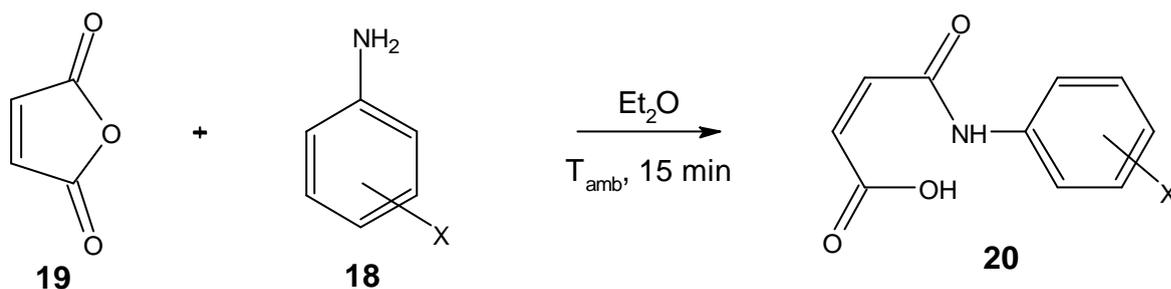
Sintetizou-se uma série de 5 ácidos *N*-fenilsuccinâmicos conforme técnica descrita por Liwshitz *et al.*⁵⁸ para a síntese de ácidos *N*-alquilmaleâmicos, utilizando-se como solvente CHCl_3 e aquecimento, uma vez que o anidrido succínico não tem boa solubilidade em éter etílico como no método original (**Esquema 1**). Os rendimentos obtidos foram de 83 a 90 % (**item 4.2**).



Esquema 1 Síntese dos ácidos *N*-fenilsuccinâmicos substituídos, onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.

3.2 SÍNTESE DOS ÁCIDOS *N*-FENILMALEÂMICOS

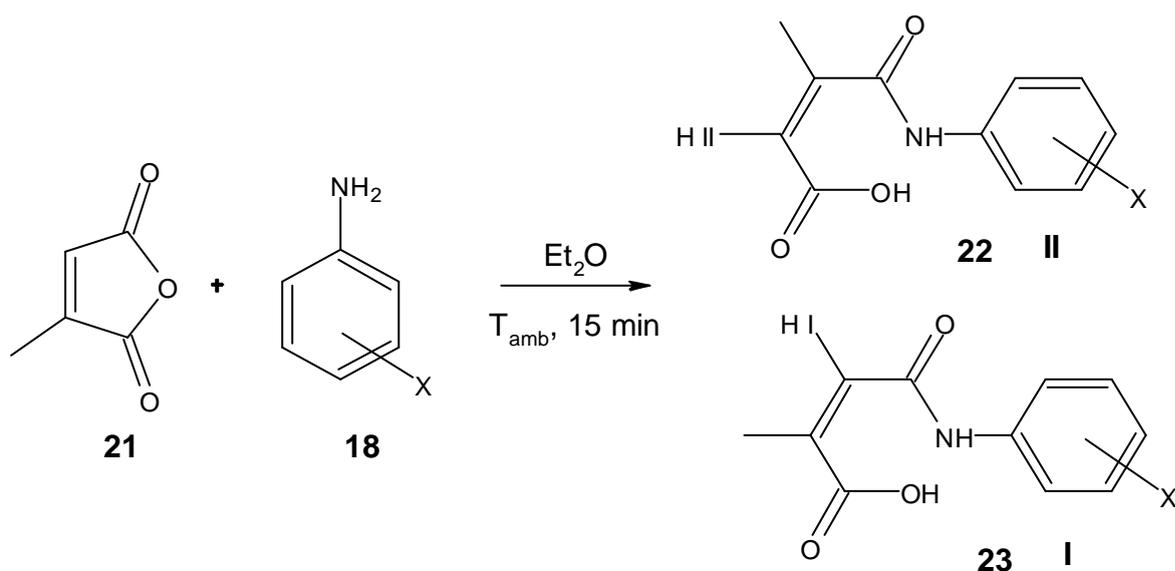
Sintetizou-se uma série de 5 ácidos *N*-fenilmaleâmicos conforme técnica descrita por Liwshitz *et al.*⁵⁸ (**Esquema 2**) para a síntese de ácidos *N*-alquilmaleâmicos, obtendo-se rendimentos entre 89 e 95 % (**item 4.3**).



Esquema 2 Síntese dos ácidos *N*-fenilmaleâmicos substituídos, onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.

3.3 SÍNTESE DOS ÁCIDOS *N*-FENILCITRACONÂMICOS

Sintetizou-se uma série de 5 ácidos *N*-fenilcitraconâmicos por aminólise do anidrido citracônico em éter etílico (**Esquema 3**), conforme método descrito por Liwschitz *et al.*⁵⁸ para a síntese de ácidos *N*-alquilmaleâmicos, posteriormente utilizado por Mehta *et al.*⁵⁹, Kirby e Lancaster⁶⁰ bem como por Baydar e Boyd⁶¹ para a síntese de ácidos *N*-fenilcitraconâmicos. Os rendimentos ficaram entre 86 e 94 % (**item 4.4**).



Esquema 3 Síntese dos ácidos *N*-fenilcitraconâmicos substituídos, onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.

3.3.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO ÁCIDO *N*-FENILCITRACONÂMICO

Das reações entre anilinas (anilina, *p*-cloroanilina, 3,4-dicloroanilina, *p*-toluidina e *p*-anisidina) e o anidrido citracônico percebeu-se, por c.c.d., a formação de dois produtos em cada caso, conseguindo-se, porém, isolar apenas um. Através da comparação do padrão de deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos obtido (δ RMN ^1H em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ entre 6,08 e 6,17 ppm) com o da literatura⁶¹ (**Tabela 4**), assumiu-se que as estruturas isoladas são do tipo I.

Tabela 4 Proporções dos ácidos citraconâmicos **II** e **I** nas misturas reacionais obtidas a partir de aminas e anidrido citracônico [resíduo da mistura reacional]

Amina	d[(CD_3) $_2\text{SO}$]		Razão (II) : (I)
	II	HI	
n-Propilamina	5.83	5.98	65 : 35
Isopropilamina	5.82	6.01	50 : 50
n-Butilamina	5.77	6.18	50 : 50
s-Butilamina	5.65	5.95	60 : 40
t-Butilamina	5.65	6.15	60 : 40
Ciclohexilamina	5.68	6.27	60 : 40
Benzilamina	5.89	6.01	60 : 40
Anilina	5.83	6.18	60 : 40
<i>p</i>-Anisidina	5.81	6.16	65 : 35
<i>p</i>-Cloroanilina	5.85	6.15	65 : 35
<i>p</i>-Nitroanilina	5.93	6.20	57 : 43
Dietilamina	5.79	6.28	70 : 30
Piperidina	5.79	6.16	78 : 22
Morfolina	5.78	6.23	75 : 25
Pirrolidina	5.78	6.23	70 : 30

Fonte: Baydar e Boyd,⁶¹ 1981 (traduzida)

3.3.2 ESTUDO DA ISOMERIZAÇÃO ENTRE ÁCIDOS CITRACONÂMICOS

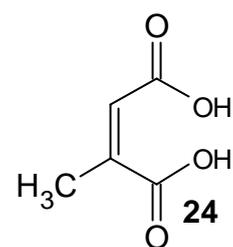
Mehta *et al.*⁵⁹ concluíram que as reações entre o anidrido citracônico e aminas primárias produzem, invariavelmente, uma mistura de dois ácidos âmicos isoméricos que podem ser separados por sua diferença de solubilidade em solventes apropriados. Kirby e Lancaster⁶⁰ detectaram, por c.c.d., uma segunda mancha que sugeriram representar um segundo isômero que, entretanto, não pôde ser separado por c.c.d., cromatografia em papel, eletroforese, nem por cromatografia em coluna convencional ou de troca iônica. Concluíram, então, tratar-se de um único composto (sem isômeros). Já Baydar e Boyd⁶¹ detectaram dois isômeros e realizaram um estudo cinético por RMN ¹H e chegaram à conclusão que se forma, inicialmente, o ácido (2Z)-4-anilino-**3-metil**-4-oxobut-2-enóico, (**22**), (produto de controle cinético) que, dependendo do solvente e temperatura, isomeriza-se no ácido (2Z)-4-anilino-**2-metil**-4-oxobut-2-enóico, (**23**) (produto de controle termodinâmico).

Em nossos experimentos, na síntese da série de 5 ácidos *N*-fenilcitraconâmicos detectou-se, também por c.c.d., a presença de dois produtos (possivelmente os dois isômeros previstos). A massa reacional, quando purificada por recristalização, apresentou-se, porém, com ponto de fusão definido e com uma única mancha em c.c.d.

Com o intuito de esclarecer a formação dos produtos e possível isomerização, repetiu-se o experimento realizado por Baydar e Boyd⁶¹, conforme descrito na seção experimental (**item 4.8**). Os resultados demonstram inicialmente a formação majoritária do ácido (2Z)-4-anilino-**3-metil**-4-oxobut-2-enóico, (**22**), com a conseqüente formação do ácido (2Z)-4-anilino-**2-metil**-4-

oxobut-2-enóico, **(23)**, em menor proporção. Essa proporção inverteu-se com o aumento do tempo e temperatura, estabilizando-se em seguida em cerca de 1:1 (**Figuras 1-5**), resultado que não reproduziria os achados de Baydar e Boyd⁶¹ (a isomerização, em dimetilsulfóxido, ocorreria até que restassem 33 % do produto cinético **(II)** em proporção ao termodinâmico, após 110 minutos, a 95 °C) .

Observou-se, porém, nos cinco casos, que houve uma progressiva formação de ácido citracônico, **(24)**, no meio (detectado por deslocamento característico no espectro de RMN ¹H), resultante da hidrólise (os solventes utilizados não foram



secos) dos dois isômeros. Tal hidrólise, por acontecer em grande proporção (63 a 80 %), possivelmente, prejudicou a análise da concentração relativa dos isômeros a partir da terceira leitura (**Figuras 6-10**).

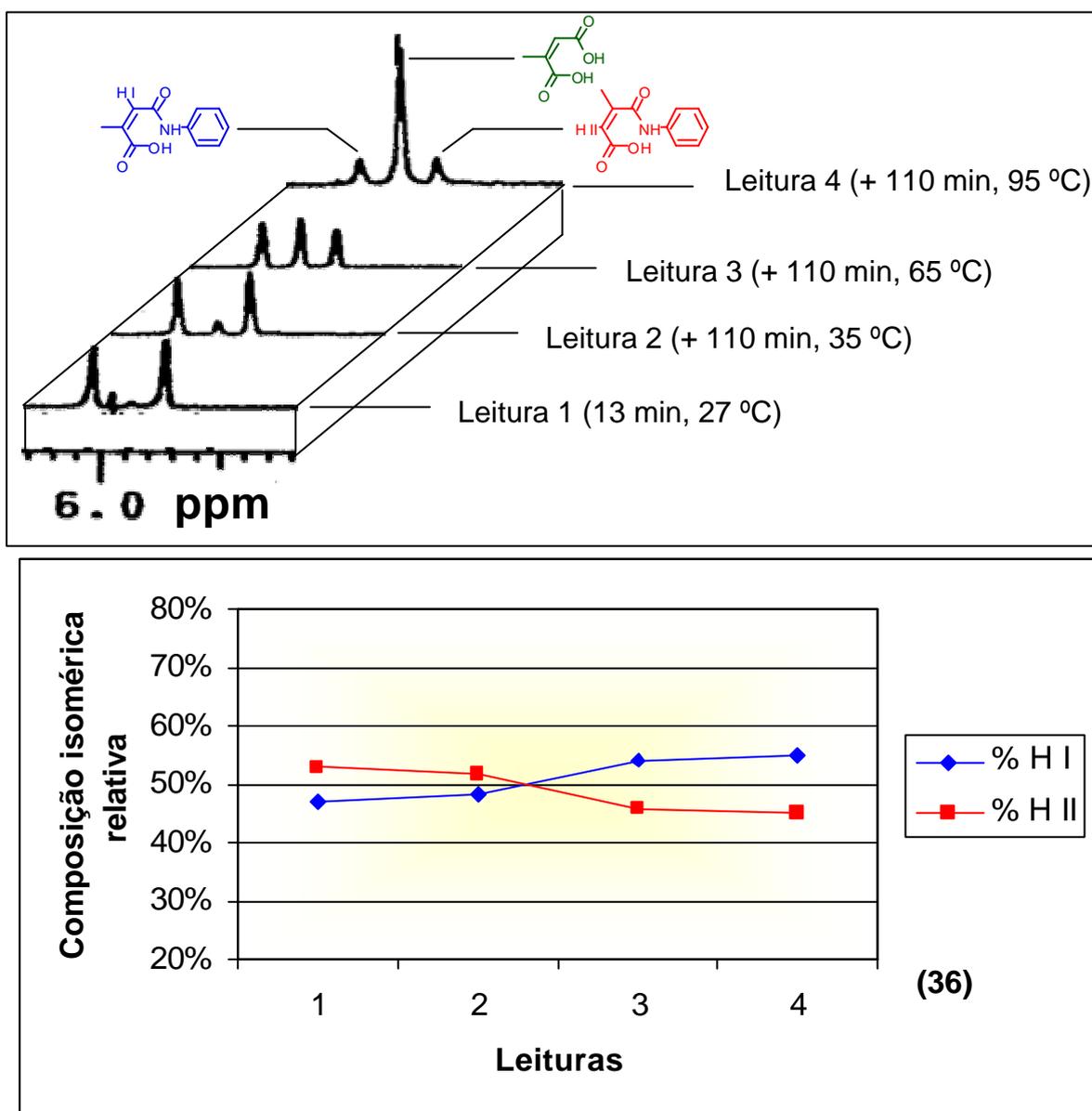


Figura 1 Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-anilino-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-anilino-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

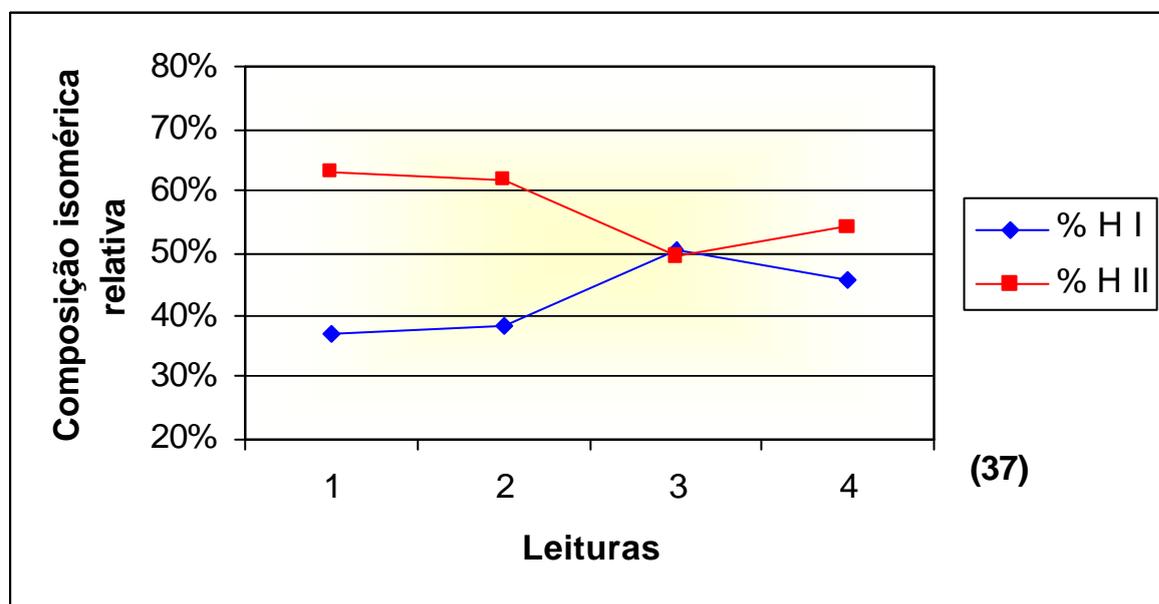
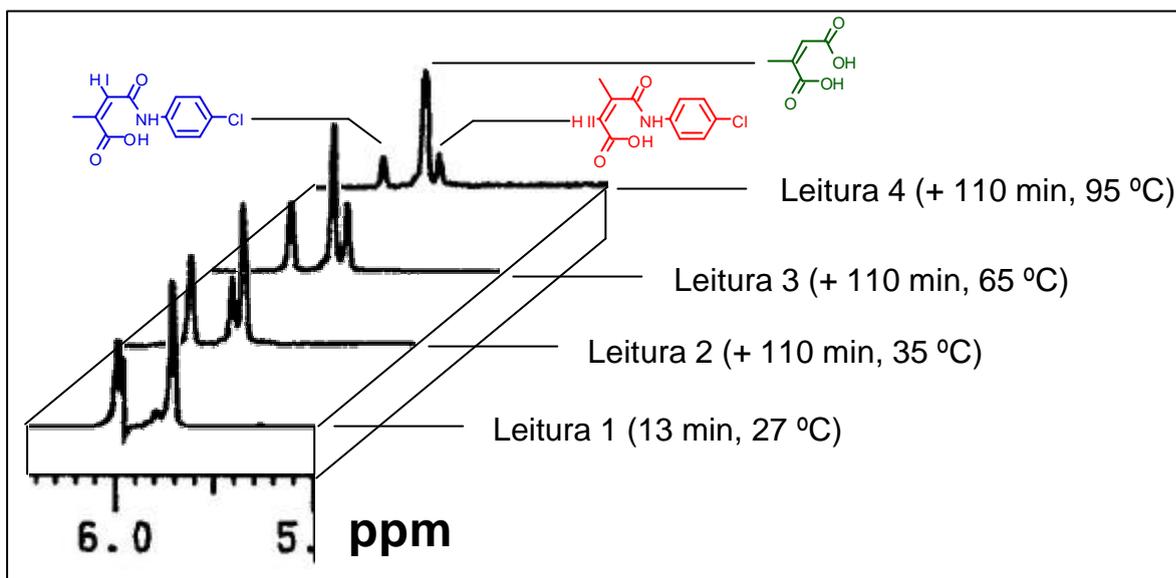


Figura 2 Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

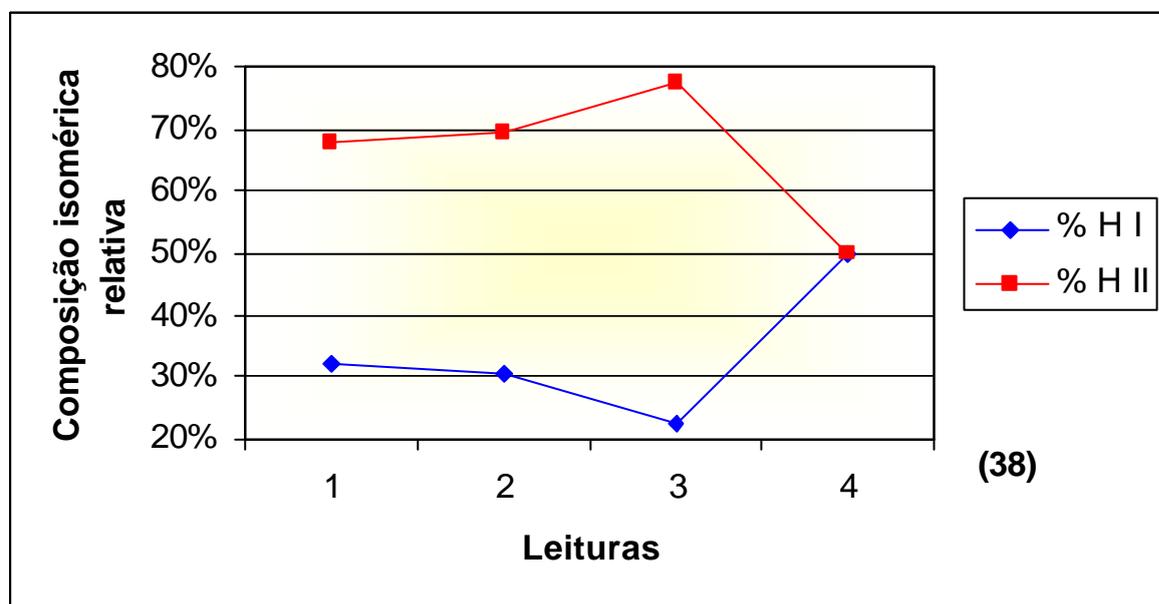
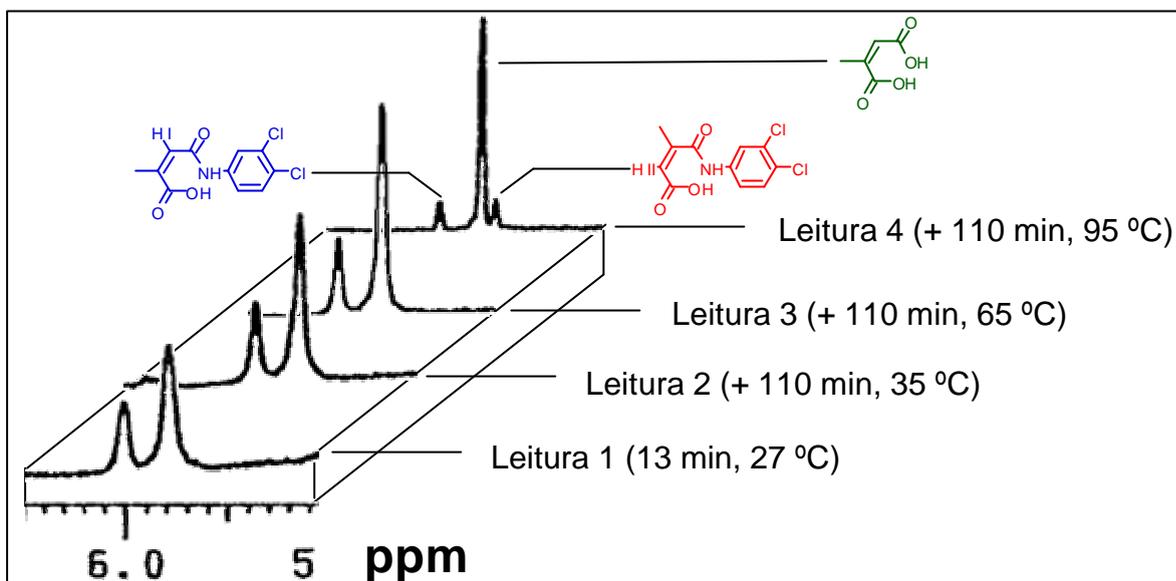


Figura 3 Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em (CD₃)₂SO acompanhada por RMN ¹H (item 4.8)

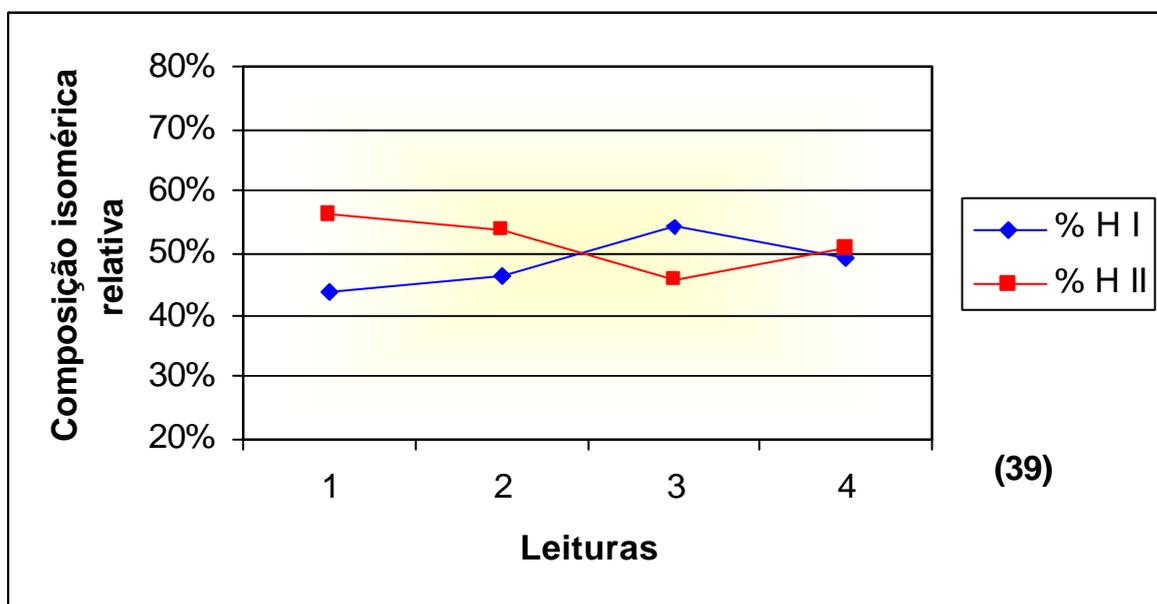
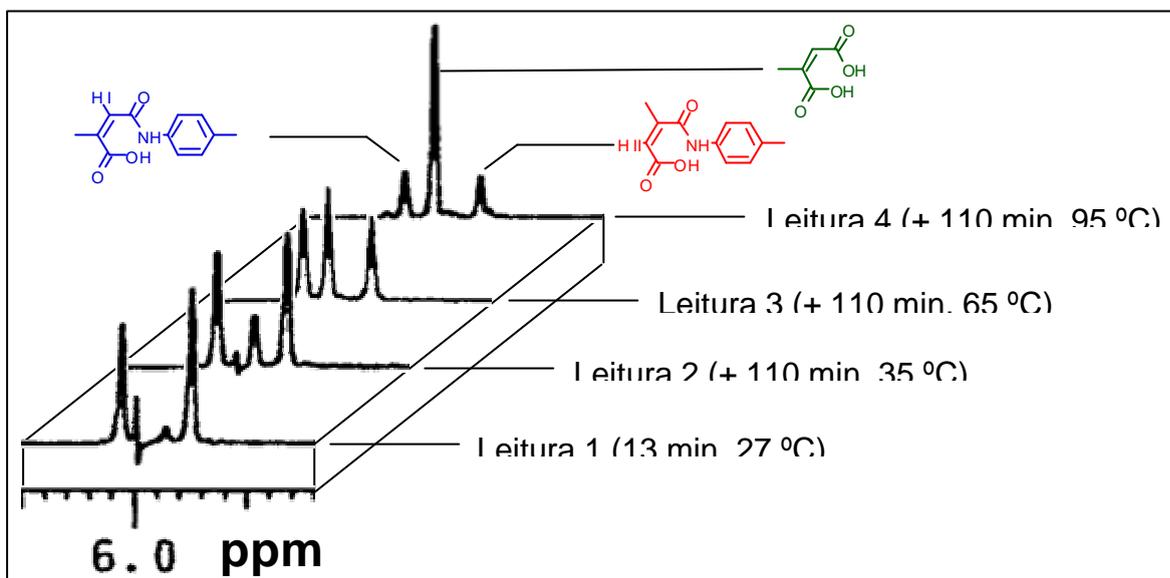


Figura 4 Composição relativa entre o ácido (2Z)-3-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

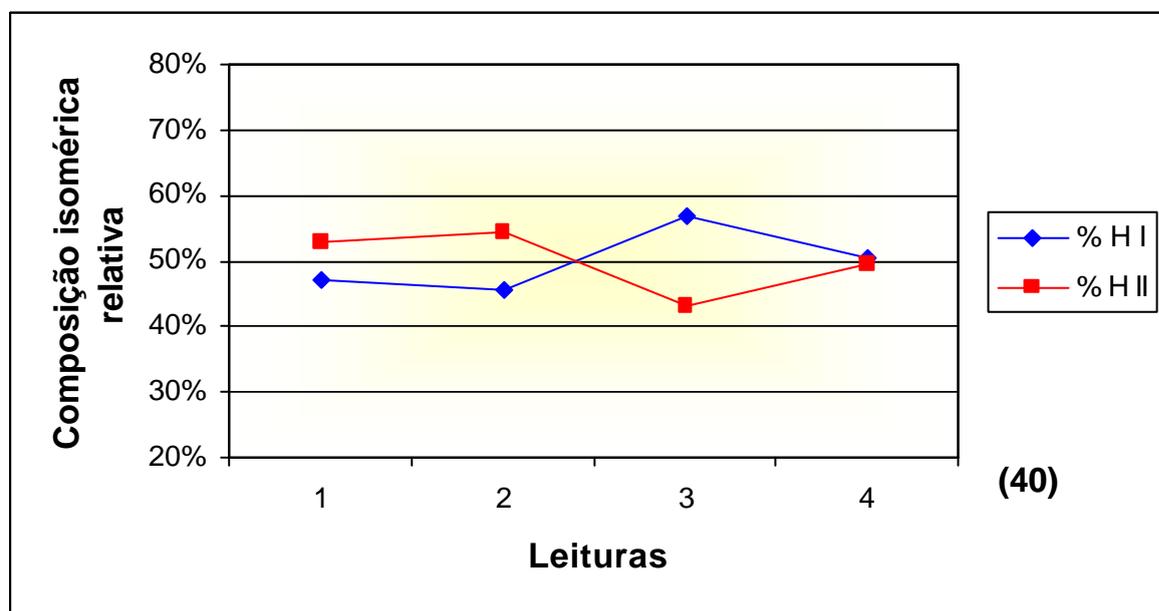
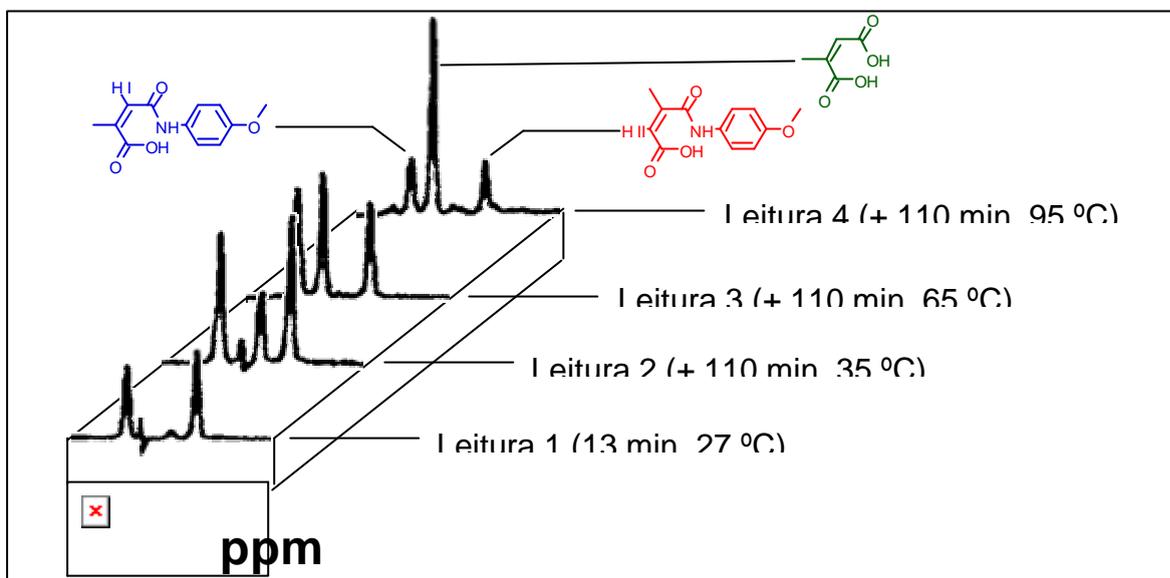


Figura 5 Composição relativa entre o ácido (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e o ácido (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

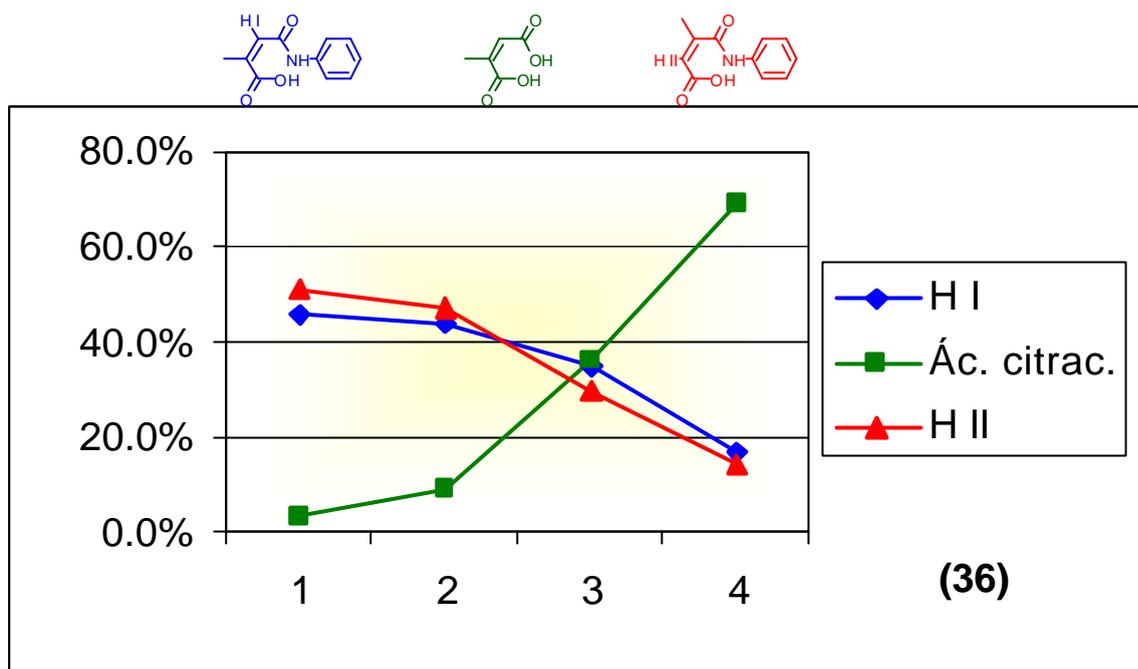


Figura 6 Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-anilino-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-anilino-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(CD_3)_2SO$ acompanhada por RMN 1H (item 4.8)

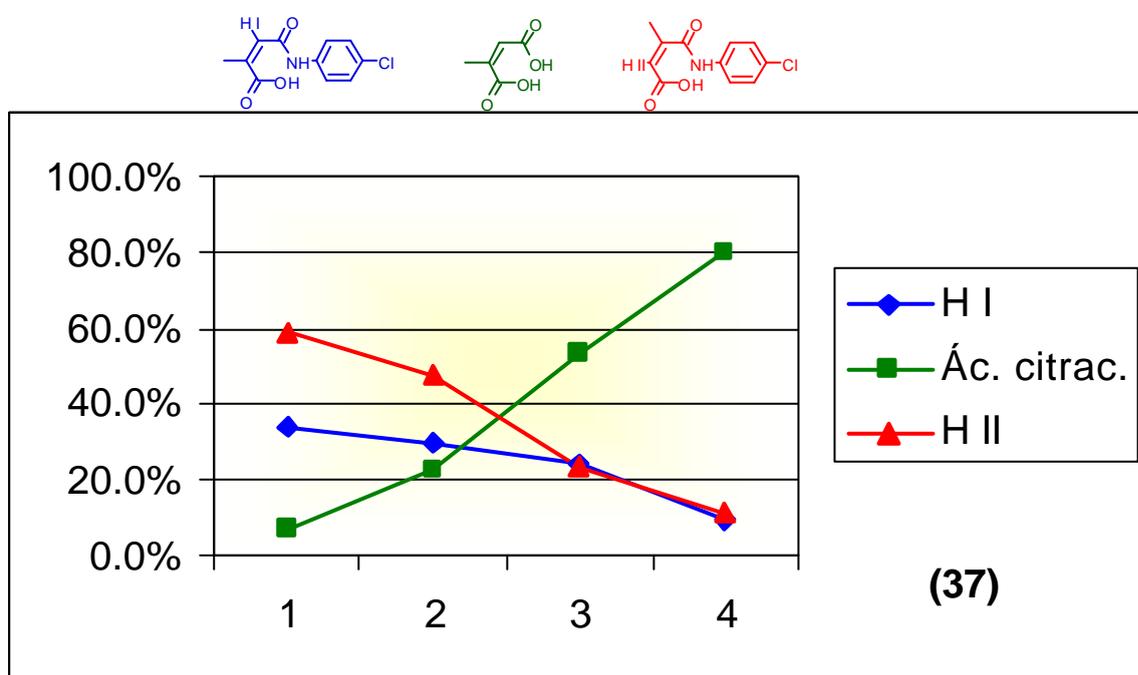


Figura 7 Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(CD_3)_2SO$ acompanhada por RMN 1H (item 4.8)

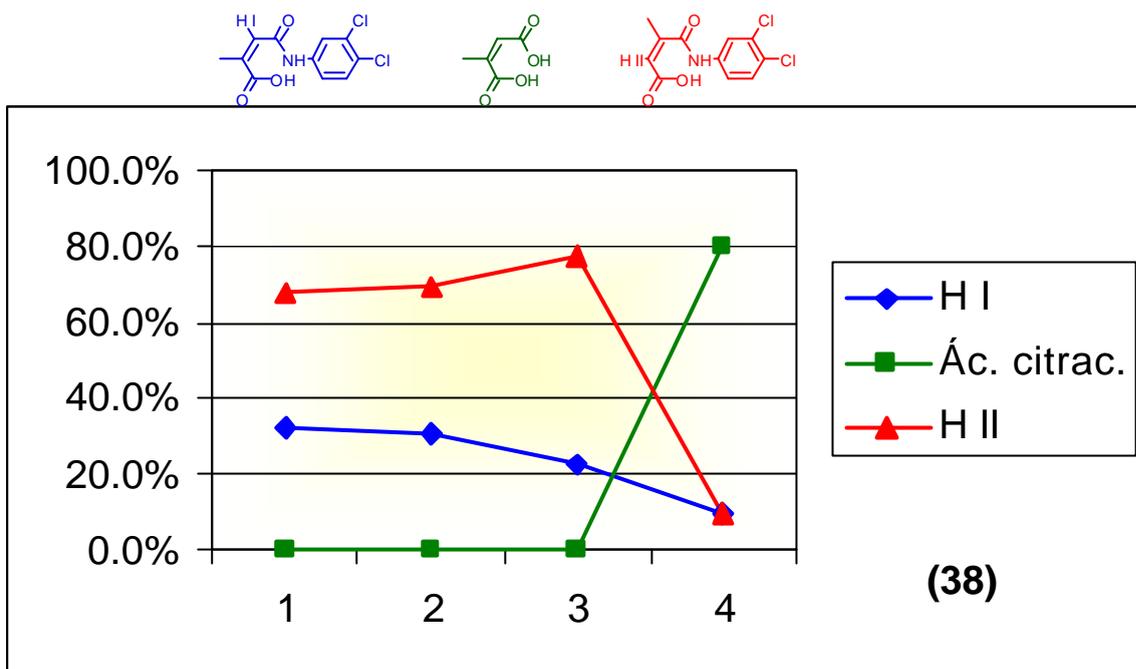


Figura 8 Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

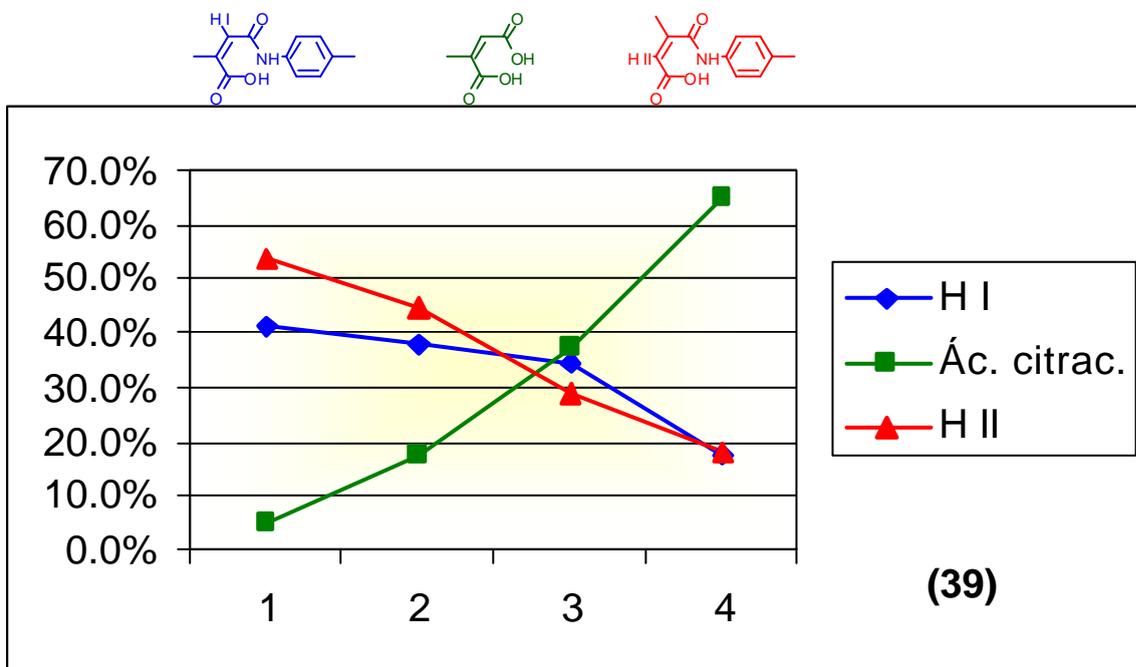


Figura 9 Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-3-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

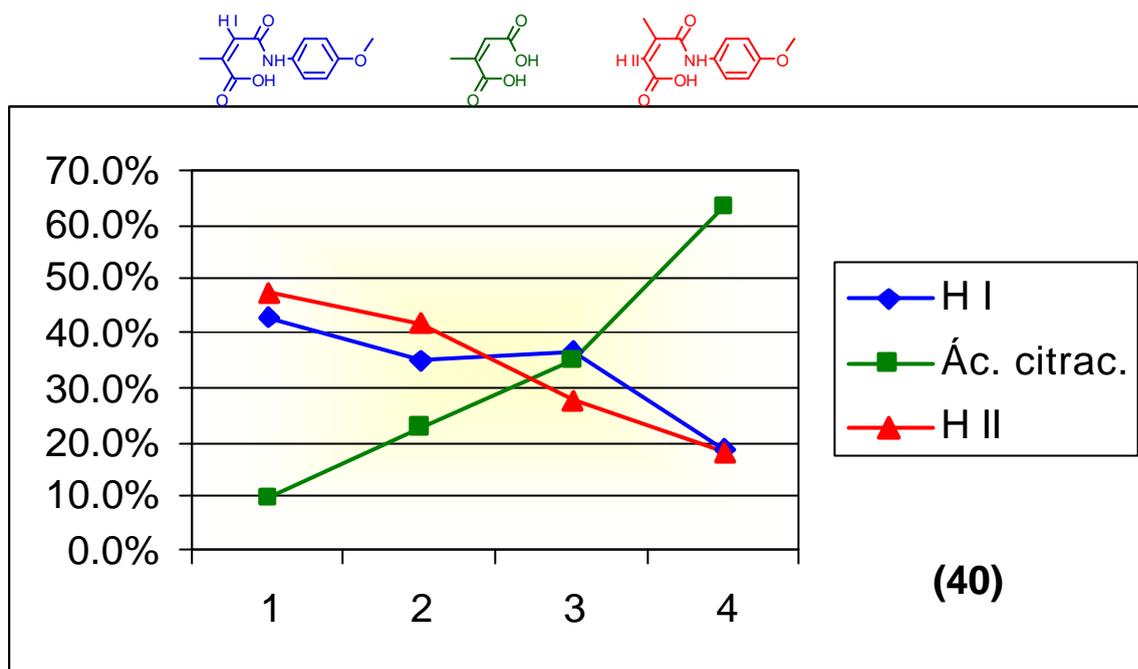


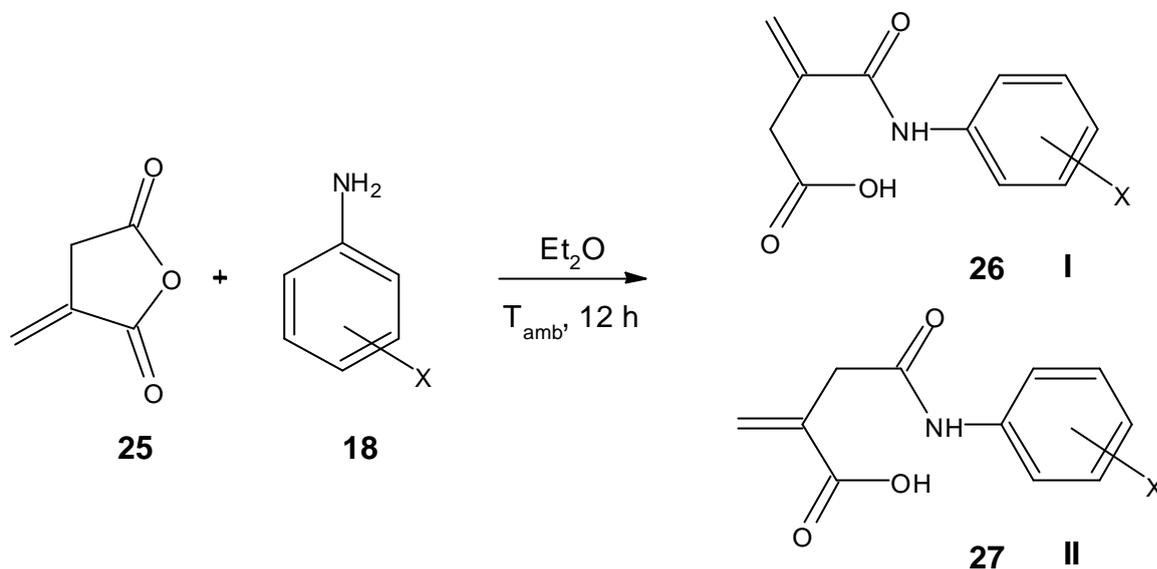
Figura 10 Hidrólise dos ácidos isoméricos (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-3-metil-4-oxobut-2-enóico (HA) e (2Z)-4-[(4-metoxifenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico (HB) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ acompanhada por RMN ^1H (item 4.8)

3.4 SÍNTESE DOS ÁCIDOS *N*-FENILITACONÂMICOS

A síntese de uma série de 5 ácidos *N*-fenilitaconâmicos realizou-se por aminólise do anidrido itacônico em éter etílico (**Esquema 4**), conforme método descrito por Liwschitz *et al.*⁵⁸ para a síntese de ácidos *N*-alquilmaleâmicos e posteriormente utilizado por Pyriadi e Fraih⁶², que utilizaram THF como solvente e não caracterizaram estruturalmente qual isômero foi formado. Obteve-se, no presente trabalho, rendimentos entre 66 e 98 % (**item 4.5**).

No final da década de 80, pesquisadores bascos⁶³ prepararam mono e diésteres do ácido itacônico e tampouco realizaram a sua determinação estrutural. Já na década de 90, pesquisadores japoneses^{64,65,66} sintetizaram ácidos *N*-

fenilitaconâmicos e, novamente, não determinaram os possíveis isômeros formados.



Esquema 4 Síntese dos ácidos *N*-fenilitaconâmicos substituídos, onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.

3.4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS ÁCIDOS *N*-FENILITACONÂMICOS

Nas reações das anilinas substituídas com o anidrido itacônico existe a possibilidade da formação de dois isômeros (**Esquema 4**, estruturas **I** e **II**). Neste caso, mais uma vez observou-se a formação de dois produtos (verificados por c.c.d.), sendo recuperado apenas um deles. Até o presente, conforme exemplos anteriormente citados, não se encontraram na literatura argumentos para a atribuição das estruturas **I** ou **II** ao ácido *N*-fenilitaconâmico isolado da reação. O espectro de RMN ^1H do produto obtido (**Figura 11a**) foi compatível com ambas as estruturas.

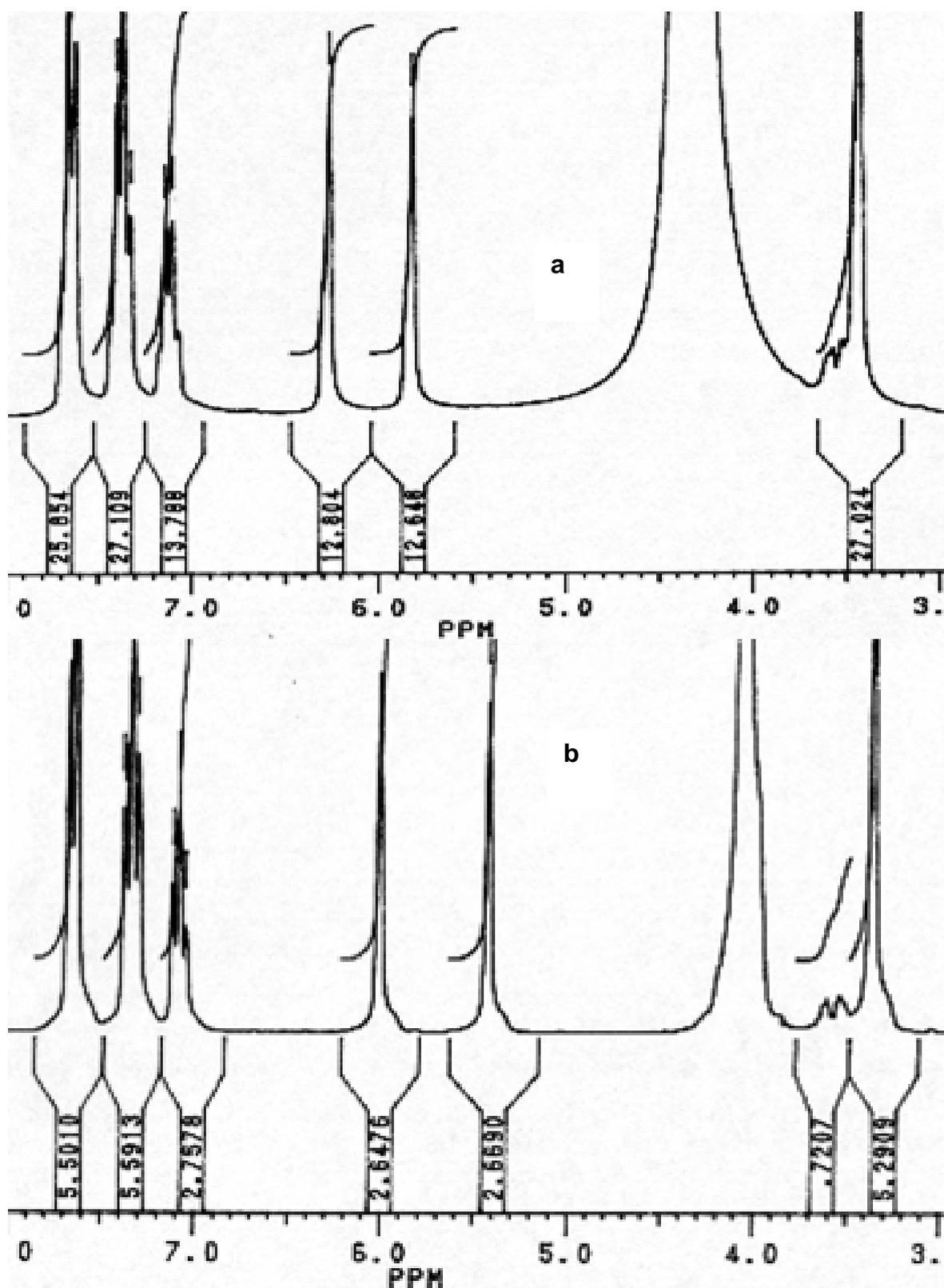


Figura 11 Espectros de RMN ^1H do ácido *N*-fenilitaconâmico como isolado (a) e do seu sal sódico (b).

O espectro de RMN ^{13}C acoplado em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ apresenta, em campo baixo, dois sinais relativos aos dois carbonos carbonílicos, com δ 168,4 ppm e 169,2 ppm (**Figura 12a**) e um tripleto em campo alto relativo ao carbono metilênico (**Figura 12b**).

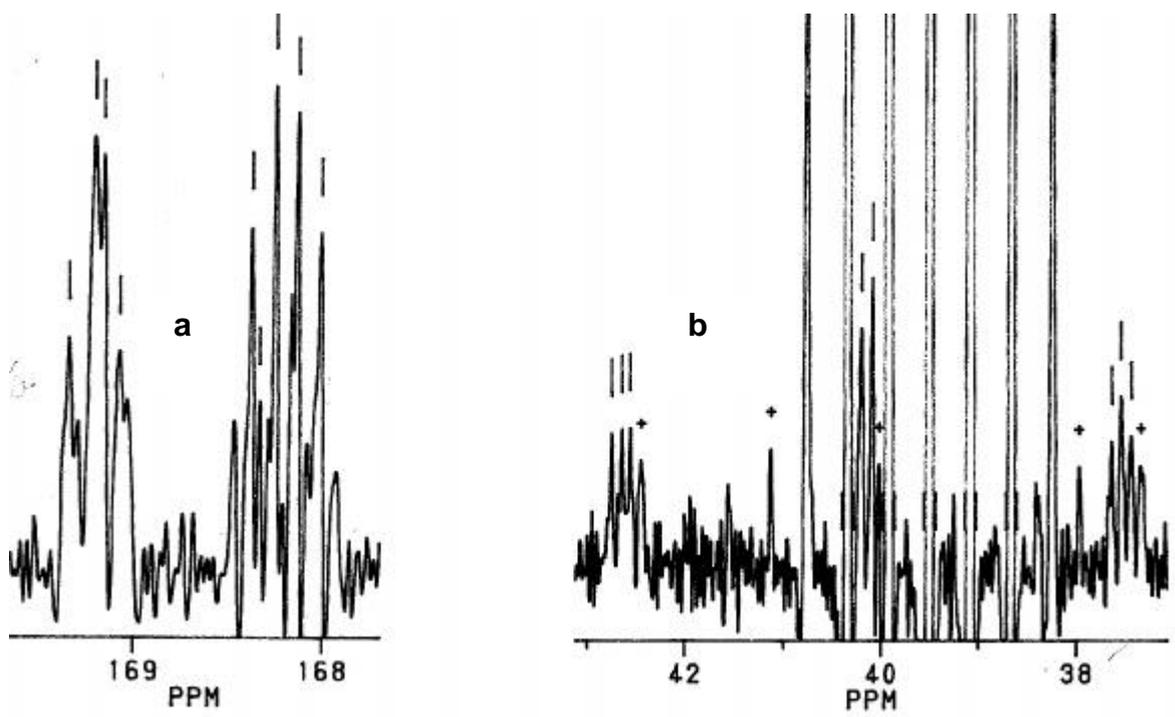


Figura 12 Partes do espectro de RMN ^{13}C acoplado do ácido *N*-fenilitaconâmico isolado (carbono metilênico à direita e carbonos carbonílicos à esquerda)

Diante do exposto, atribuiu-se a estrutura através de técnicas espectrais, seguindo-se as estratégias que seguem:

1ª Estratégia

Para definir qual carbono carbonílico estava próximo ao carbono quaternário e qual ao carbono metilênico, compararam-se o espectro de RMN ^{13}C acoplado (**Figura 12**) com o parcialmente acoplado (com irradiação nos hidrogênios do carbono secundário [δ 40,1]) (**Figura 13**).

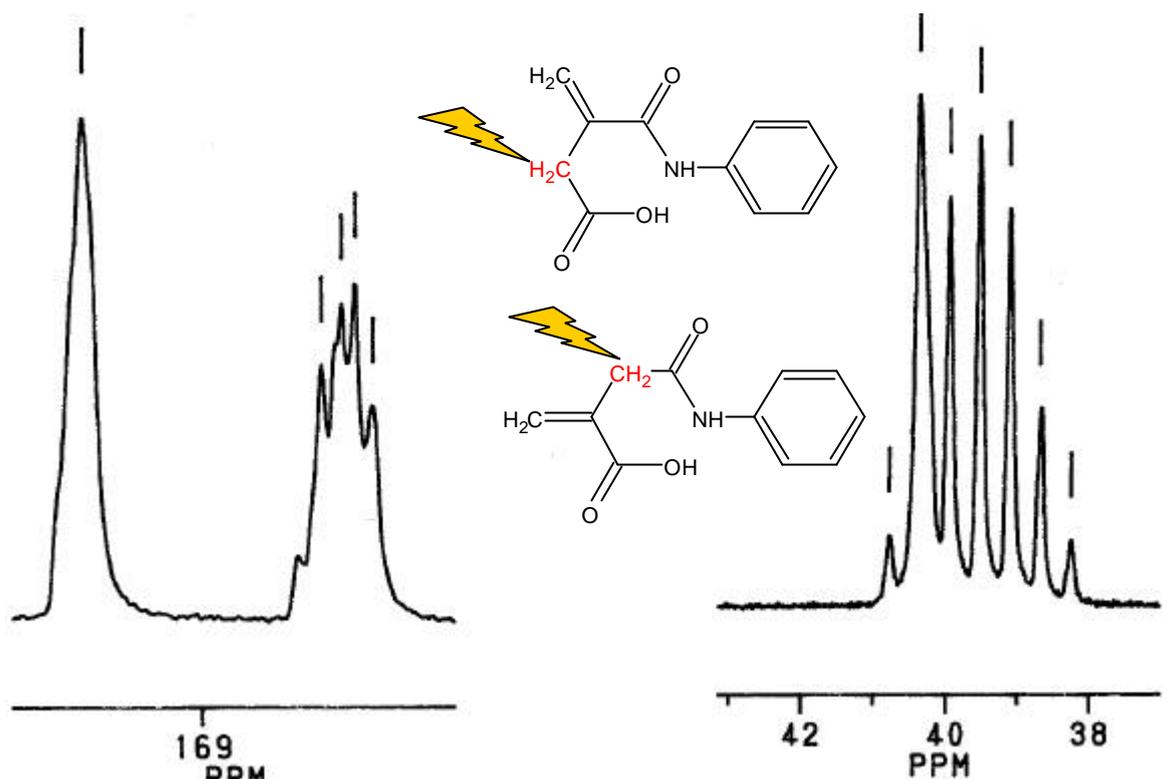
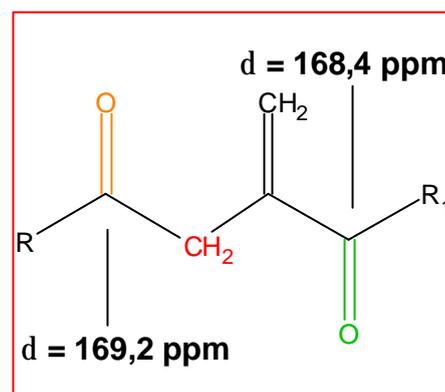


Figura 13 Partes do espectro de RMN ^{13}C parcialmente acoplado (irradiados os hidrogênios do carbono secundário) do ácido *N*-fenilitaconâmico isolado (região do carbono secundário à direita e carbonos carbonílicos à esquerda)

Verificou-se que, ao se irradiar os hidrogênios do carbono secundário, o carbono carbonílico de δ 169,2 ppm perdeu o acoplamento. Desta forma demonstrou-se que ligado ao carbono metilênico encontrava-se o carbono carbonílico de δ 169,2 ppm e, conseqüentemente, o de δ 168,4 ppm era vizinho do carbono quaternário.



2ª Estratégia

Mesmo com o conhecimento acerca da vizinhança de um dos lados de cada carbonila, restava ainda a dúvida a respeito do grupo ligado ao outro lado

das mesmas ($\text{-NHC}_6\text{H}_5$ ou -OH). Em busca desta resposta, tirando proveito da presença do grupo ácido carboxílico, sintetizou-se o sal sódico da molécula problema (**Figura 11b**) e observou-se qual carbono carbonílico passou a integrar o grupo carboxilato (**Figura 14**).

O espectro de RMN ^{13}C acoplado do derivado sódico demonstrou que a carbonila que apresentava δ 168,4 ppm (mais próxima do cátion sódio) deslocou-se no espectro para δ 172,2 ppm ($\Delta\delta = 3,8$ ppm), enquanto que a de δ 169,2 ppm (mais longe do cátion sódio) passou a apresentar δ 170,5 ppm ($\Delta\delta = 1,3$ ppm).

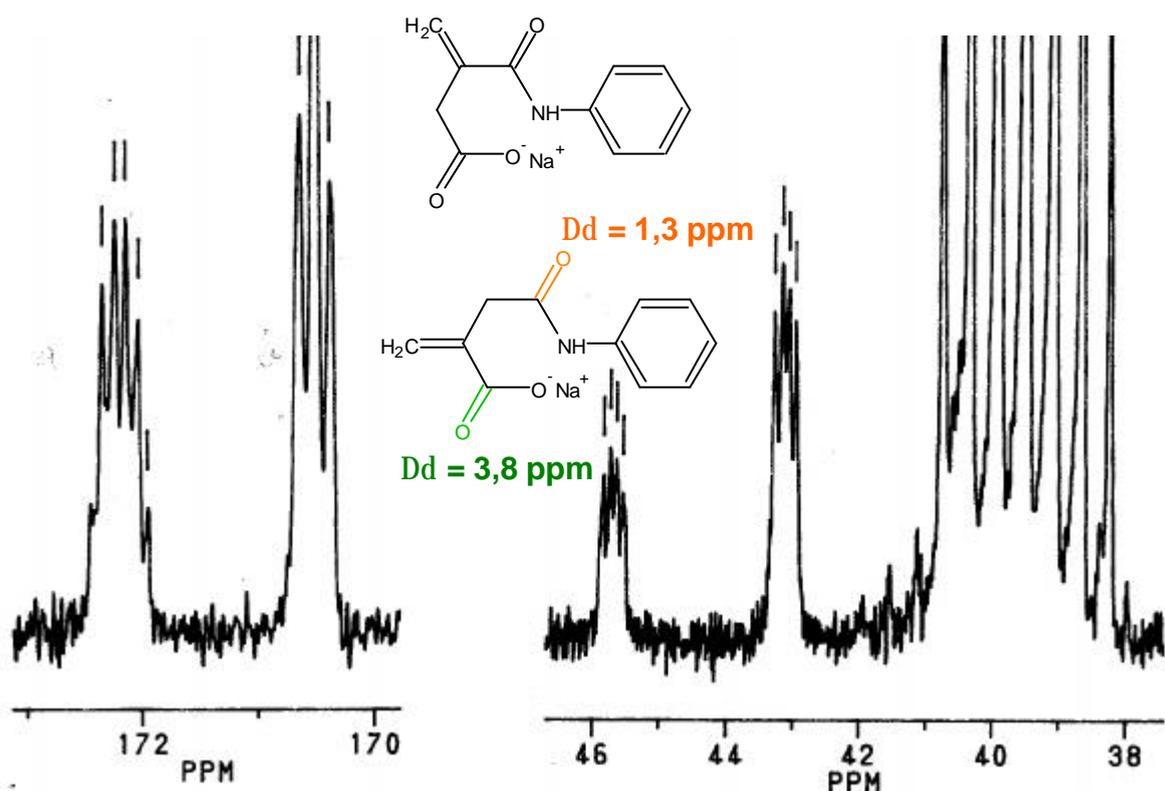
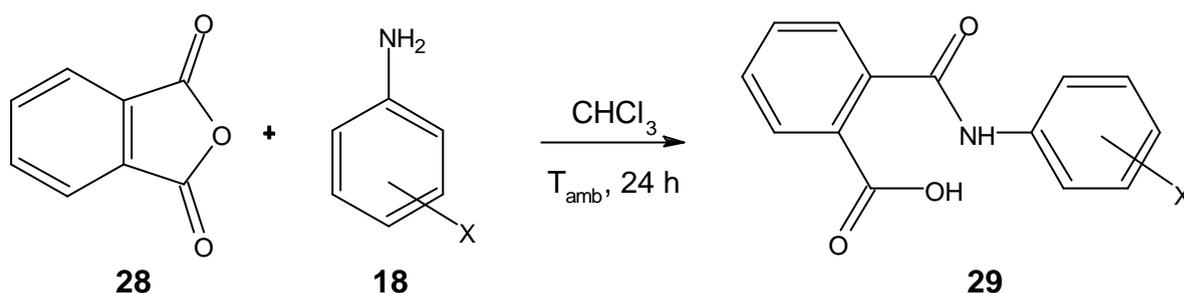


Figura 14 Partes do espectro de RMN ^{13}C acoplado do sal sódico do ácido *N*-fenilitaconâmico isolado, onde a carbonila que no ácido ressoava em 168,4 ppm passou, no sal, a ressoar em 172,2 ppm ($\Delta\delta = 3,8$ ppm) e a que apresentava $\delta = 169,2$ no ácido, no sal passou a apresentar $\delta = 170,5$ ($\Delta\delta = 1,3$ ppm).

Concluiu-se que a estrutura do composto isolado foi a do ácido **2**-(2-anilino-2-oxoetil)acrílico, (**27**)(**Esquema 4**, estrutura **II**).

3.5 SÍNTESE DOS ÁCIDOS *N*-FENILFTALÂMICOS

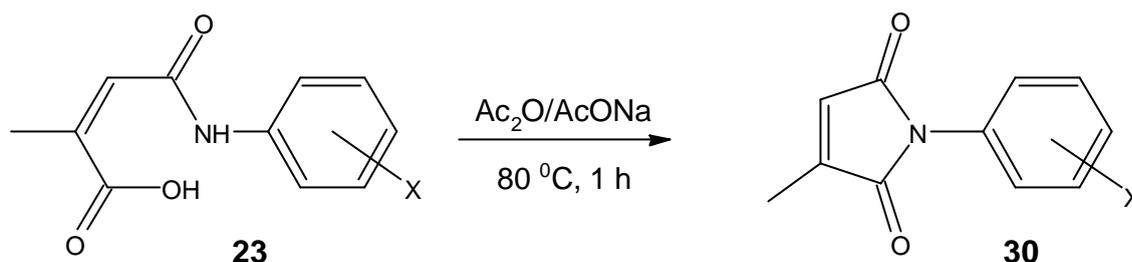
Sintetizou-se uma série de 5 ácidos *N*-fenilftalâmicos por método descrito por Liwshitz *et al.*⁵⁸ para a síntese de ácidos *N*-alquilmaleâmicos, utilizando-se CHCl_3 como solvente, obtendo-se rendimentos entre 70 e 95 % (item 4.6)



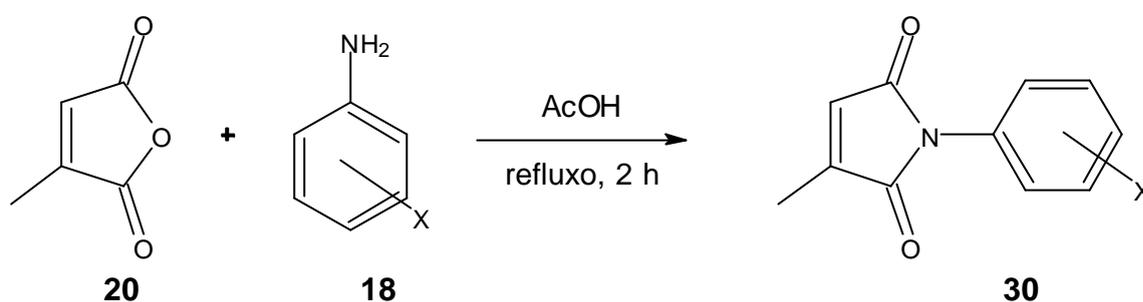
Esquema 5 Síntese dos ácidos *N*-fenilftalâmicos substituídos, onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.

3.6 SÍNTESE DE *N*-FENILCITRACONIMIDAS

Sintetizou-se uma série de 5 citraconimidas por desidratação do respectivo ácido *N*-fenilcitraconâmico⁵⁹ e, também, por reação direta do anidrido citracônico com a anilina devidamente substituída, em ácido acético⁶⁷ (item 4.7), obtendo-se, em ambos os casos, os mesmos produtos com rendimentos entre 78 e 90 % no primeiro método e entre 78 e 92 no segundo.



Esquema 6 Síntese das *N*-fenilcitraconimidias substituídas (método A), onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.



Esquema 7 Síntese das *N*-fenilcitraconimidias substituídas (método B), onde X = H, 4-Cl, 3,4-dicloro, 4-Me e 4-OMe.

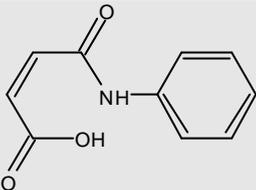
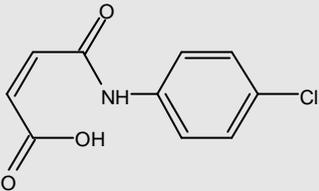
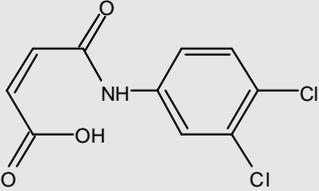
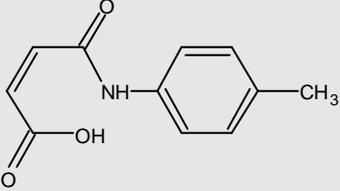
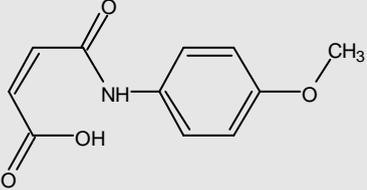
3.7 TOXICIDADE AGUDA FRENTE À *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, um crustáceo do Mediterrâneo, tem sido utilizado para determinar a toxicidade não específica de compostos orgânicos,^{68,69,70,71} toxicidade de microorganismos,⁷² de plantas⁷³ bem como associado a outros efeitos mais específicos como fototoxicidade,⁷⁴ balneabilidade de praias,⁷⁵ hepatotoxicidade a camundongos,⁷⁶ toxicidade a organismos patógenos ao homem, como o *T. cruzi* (causador da doença de Chagas)⁷⁷ e protozoários do gênero *Plasmodium* (causadores da malária),⁷⁸ atividade inseticida inespecífica⁷⁹ e toxicidade a vetores de doenças como o mosquito *Aedes aegypt* (vetor da febre amarela e dengue, entre outras

doenças).⁸⁰ Este teste tem sido também utilizado na triagem de possíveis agentes antineoplásicos (anticâncer).^{81,82,83,84,85}

Os resultados para uma série de ácidos *N*-fenilmaleâmicos estão mostrados na **Tabela 5**.

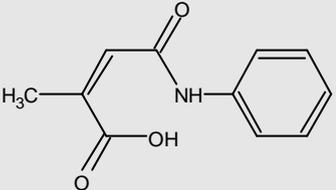
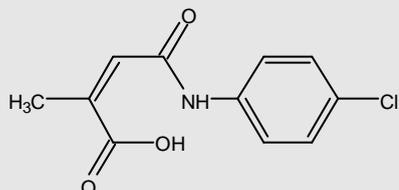
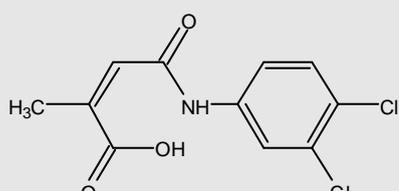
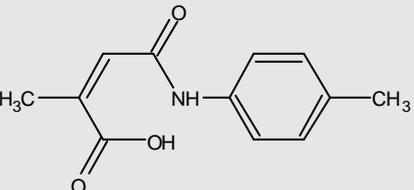
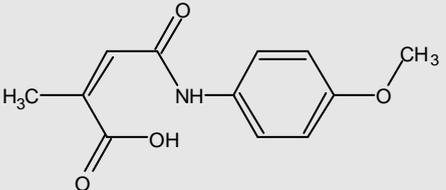
Tabela 5 Resultado dos testes de toxicidade aguda (*Artemia salina*) para os ácidos *N*-fenilmaleâmicos substituídos.

Composto	CL ₅₀ 48 h (mg / 100 mL)	CL ₅₀ 48 h (μM)	Ordem potência	Calc. E ₄
31 	0,0421	2,2	1	1
32 	>100	>4432	2-5	2-5
33 	>100	>3835	2-5	2-5
34 	>100	>4873	2-5	2-5
35 	>100	>4521	2-5	2-5

Seguindo o método manual de Topliss, foram ordenados os compostos por ordem de potência no teste de *A. salina* (quarta coluna). De posse dessa informação, consultou-se a **Tabela 2**, constatando-se que esta coincide com a do

parâmetro E₄. Este resultado sugere que substituições na posição 4 do anel anilídico inviabilizam o efeito testado, indicando um impedimento estereoquímico nesta posição. De posse do possível parâmetro interferente no efeito, consultou-se a **Tabela 3**, que sugere que o novo grupo de compostos sintetizados possua substituintes eletrorretiradores e eletrodoadores nas posições 3 e ou 5 do anel (3-Cl, 3-CH₃, 3-OCH₃, 3-N(CH₃)₂, 3-CF₃, 3,5-Cl₂).

Tabela 6 Resultado dos testes de toxicidade aguda (*Artemia salina*) para os ácidos *N*-fenilcitraconâmicos substituídos.

Composto	CL ₅₀ 48 h (mg / 100 mL)	CL ₅₀ 48 h (µM)	Ordem potência	Calc. E ₄
36 	0,00640	0,31	1	1
37 	0,01715	0,72	3	2-5
38 	0,02300	0,84	4-5	2-5
39 	0,00875	0,40	2	2-5
40 	0,02000	0,85	4-5	2-5

Os resultados para a série de ácidos *N*-fenilcitraconâmicos estão demonstrados na **Tabela 6**. Seguindo, novamente, o método manual de Topliss, os compostos foram ordenados por ordem de potência no teste de *Artemia salina* (quarta coluna), verificando-se que a ordem de potência dos cinco compostos, assim como no caso dos ácidos *N*-fenilmaleâmicos, coincide com a ordem do parâmetro E_4 , indicando que substituições na posição 4 do anel benzênico diminuem o efeito sobre a letalidade às larvas de *Artemia salina*. O próximo passo seria a síntese de novos compostos conforme sugestão da **Tabela 3** para sistemas que não possuam demanda estereoquímica na posição 4 do anel, ou seja, utilizando-se substituintes nas posições 3 e ou 5 do anel (3-Cl, 3-CH₃, 3-OCH₃, 3-N(CH₃)₂, 3-CF₃, 3,5-Cl₂).

Os resultados de toxicidade frente à *Artemia salina* para a série de 5 ácidos *N*-fenilitaconâmicos (**Tabela 7**) sugerem que estes não são tóxicos à larva do crustáceo, mesmo quando expostos a concentrações aproximadamente de 3500 a 5000 μM . O método manual de Topliss, obviamente, não se aplica nesse caso.

Os resultados para a série de ácidos *N*-fenilsuccinâmicos estão expostos na **Tabela 8**. Seguindo o método manual de Topliss, ordenaram-se os compostos por ordem de potência no teste de *Artemia salina* (quarta coluna), verificando-se que a ordem de potência destes coincide com a combinação paramétrica $2\pi - \sigma$, sugerindo que compostos com substituintes no anel benzênico eletrodadores e que, ao mesmo tempo, conferem hidrofobicidade à molécula aumentam o efeito sobre a letalidade às larvas de *Artemia salina*, tendo a hidrofobicidade a metade da importância conferida ao efeito eletrodador.

Conforme sugestão da **Tabela 3**, a síntese com substituintes com valor elevado de $2\pi - \sigma$ ($4\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$; $4\text{-C}(\text{CH}_3)_3$; $3,4\text{-(CH}_3)_2$; $4\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $4\text{-OCH}_2\text{Ph}$; $4\text{-N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$) deve gerar compostos mais potentes.

Tabela 7 Resultado dos testes de toxicidade aguda (*Artemia salina*) para os ácidos *N*-fenilitaconâmicos substituídos.

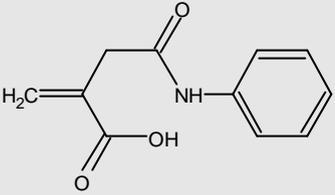
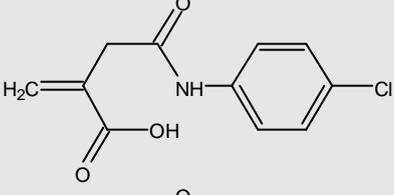
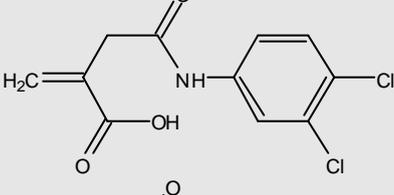
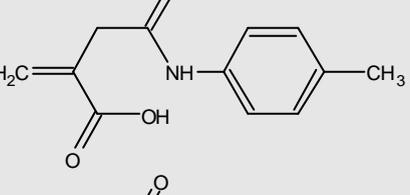
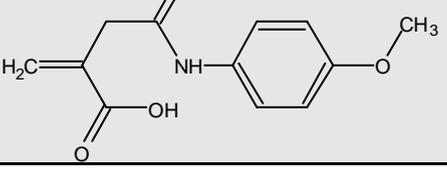
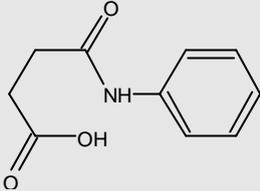
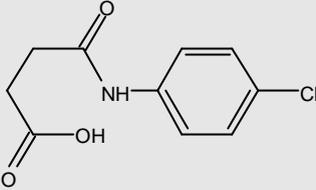
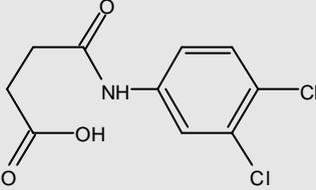
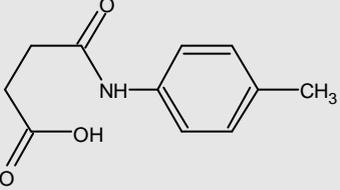
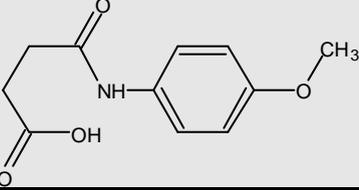
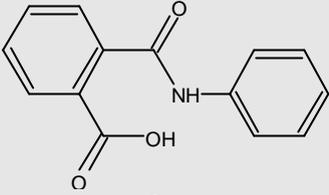
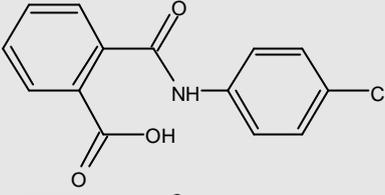
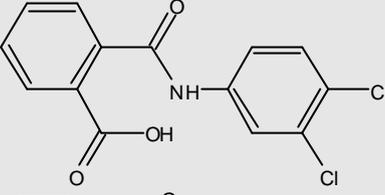
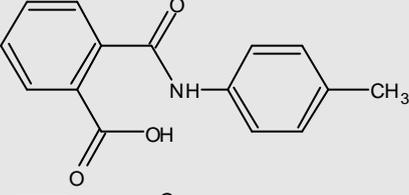
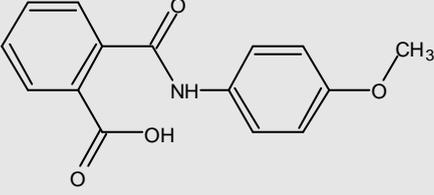
	Composto	CL ₅₀ 48 h (mg / 100 mL)	CL ₅₀ 48 h (μM)
41		>100	>4873
42		>100	>4172
43		>100	>3648
44		>100	>4561
45		>100	>4251

Tabela 8 Resultado dos testes de toxicidade aguda (*Artemia salina*) para os ácidos *N*-fenilsuccinâmicos substituídos.

Composto	CL ₅₀ 48 h (mg / 100 mL)	CL ₅₀ 48 h (μM)
46 	112,73	5835
47 	31,04	1363
48 	29,04	1108
49 	29,50	1423
50 	44,87	2010

Na **Tabela 9** estão os resultados do teste de toxicidade aguda frente às larvas de *Artemia salina* para uma série de ácidos *N*-fenilftalâmicos substituídos, que demonstram a presença de toxicidade com o composto 4-cloro-substituído. Como nesta série não foram testados ainda os compostos **58** e **59**, não se pode fazer a análise de correlação entre estrutura e atividade segundo o método manual de Topliss.

Tabela 9 Resultado dos testes de toxicidade aguda (*Artemia salina*) para os ácidos *N*-fenilftalâmicos substituídos.

	Composto	CL ₅₀ 48 h (mg / 100 mL)	CL ₅₀ 48 h (μM)
56		261	1080
57		144	521
58		--	--
59		--	--
60		282	1041

A análise conjunta dos ácidos *N*-fenilmaleâmicos, *N*-fenilcitraconâmicos, *N*-fenilitaconâmicos, *N*-fenilsuccinâmicos e *N*-fenilftalâmicos leva, ainda, à hipótese de que o sistema R-C=C-CONHR' seja parte fundamental no efeito testado, já que os ácidos itaconâmicos e succinâmicos, que não têm a dupla conjugada com a porção amídica, e ainda os *N*-fenilftalâmicos, cuja ligação dupla conjugada pertence ao sistema fenila, não produziram nenhum efeito.

3.8 TESTE DE FORMALINA EM RATOS

A injeção subcutânea de formalina (solução aquosa 37 % (p/p) de formaldeído) provoca um estímulo tônico composto por duas fases distintas:

primeira fase – inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e dura de 3 a 5 minutos, tendo-se, posteriormente, um intervalo de 10 a 15 minutos onde os animais demonstram um comportamento muito pouco sugestivo de dor;⁸⁶

segunda fase – inicia-se entre 15 e 20 minutos após a injeção e dura de 20 a 40 minutos.⁸⁷

Este estímulo induz uma resposta comportamental com duração da ordem de 1 hora, diferentemente dos testes com estímulos mais efêmeros como os testes *tail-flick*, *tail-pinch* ou *hot-plate*. O estímulo de longa duração facilita a observação da retro-modulação e do papel dos sistemas endógenos de regulação da dor, tais como sistemas opióides^{88,107} e sistemas monoaminérgicos.^{89,90,91} Em roedores, as respostas às duas diferentes fases do teste podem ser utilizadas para direcionar-se a diferentes aspectos da nocicepção, uma vez que a primeira fase parece ser devida à estimulação química direta dos nociceptores, enquanto que a segunda fase é dependente da inflamação periférica e mudanças no processamento central da dor.

Fármacos reconhecidamente analgésicos fracos em humanos geralmente têm efeitos antinociceptivos claros no teste de formalina no camundongo.^{92,93,94,87,91} Antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm efeito somente na segunda fase do teste.^{87,95} Os efeitos dos AINES são melhores reconhecidos usando-se baixas concentrações de formalina, mas, mesmo assim, o AINE indometacina reduz a resposta apenas na segunda fase do teste.⁹⁵ Desta forma, parece que a dor induzida na segunda fase do teste é particularmente útil na avaliação de AINES e analgésicos fracos.

No presente trabalho ensaiou-se uma série de 5 *N*-fenilcitraconimidias (**item 3.6**) como triagem para efeito antinociceptivo.

A *N*-fenilcitraconimida (134, 267 e 534 $\mu\text{mol/kg}$, IP, 1 hora antes) apresentou efeito inibitório dose-dependente sobre as duas fases da incapacitação motora induzida pela formalina, demonstrando um potente efeito analgésico. A dose maior (534 $\mu\text{mol/kg}$) causou incoordenação motora nos animais, o que não ocorreu com as doses de 134 e 267 $\mu\text{mol/kg}$ (**Figura 15**). A eficácia deste composto em inibir também a primeira fase da resposta à formalina sugere um mecanismo de ação central da droga, que pode ser semelhante ao dos opióides. Estudos cinéticos preliminares indicam meia-vida plasmática em torno de 1 hora.

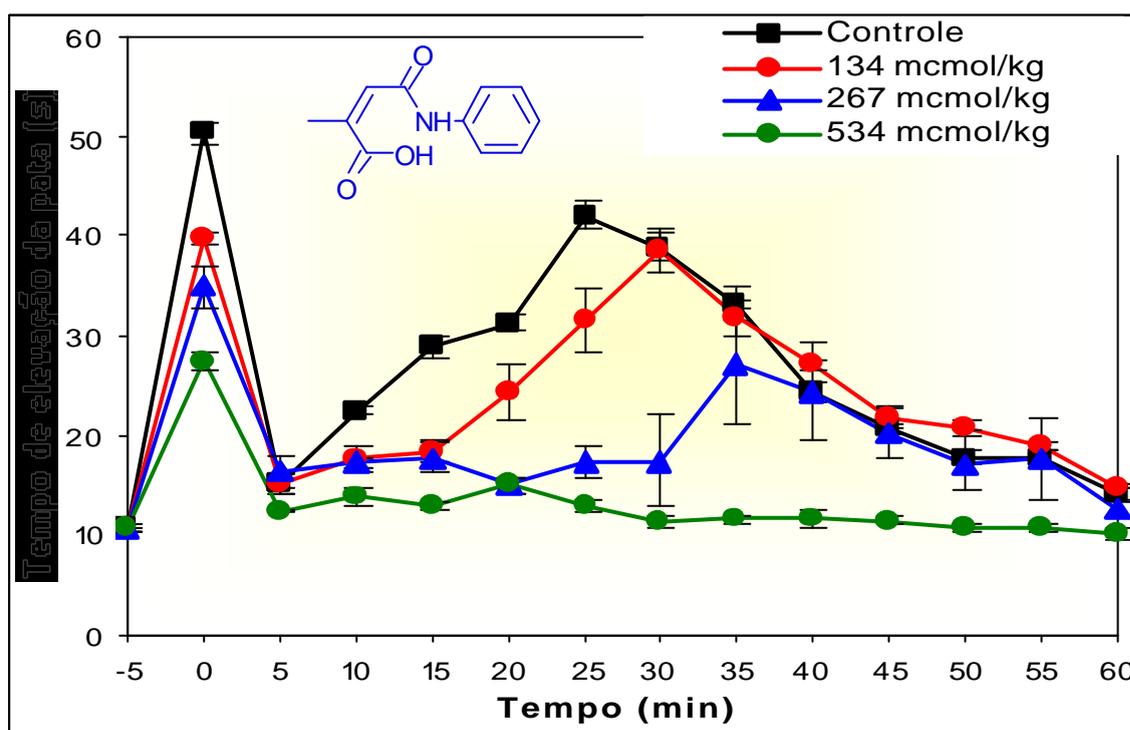


Figura 15 Curvas tempo-resposta da *N*-fenilcitraconimida nas doses de 134 $\mu\text{mol/kg}$, 267 $\mu\text{mol/kg}$, 534 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina.

A *N*-(*p*-clorofenil)citraconimida não apresentou efeito analgésico sobre a primeira fase, mas um potente efeito sobre a segunda (**Figura 16**). Esta observação sugere que o composto apresente mecanismo analgésico diferente da *N*-fenilcitraconimida, possivelmente semelhante a um AINE.

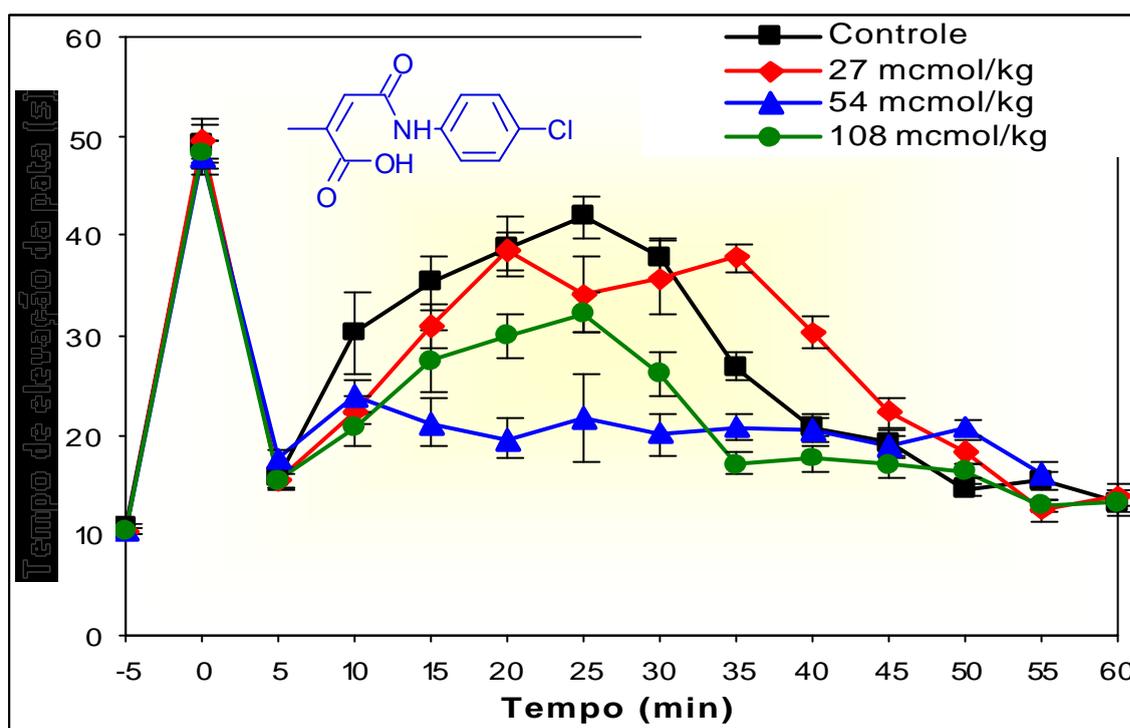


Figura 16 Curvas tempo-resposta da *N*-(*p*-clorofenil)citraconimida nas doses de 27 $\mu\text{mol/kg}$, 54 $\mu\text{mol/kg}$, 108 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina.

Os animais tratados com a *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida na dose de 390 $\mu\text{mol/kg}$ apresentaram contorções abdominais durante os primeiros 15 minutos após a injeção de formalina, o que impossibilitou a avaliação durante a primeira fase da resposta. Essa dose porém causou inibição da resposta nociceptiva na segunda fase. A dose de 195 $\mu\text{mol/kg}$ apresentou apenas intenso efeito inibitório sobre a segunda metade da segunda fase. A *N*-(3,4-

diclorofenil)citraconimida, curiosamente, apresentou um efeito hiperalgésico sobre a primeira metade da segunda fase da resposta à formalina. Este efeito foi claramente registrado para a dose de 98 $\mu\text{mol/kg}$ (**Figura 17**). Não foi possível sugerir mecanismos para este efeito, pois esta resposta dupla (hiperalgésica e analgésica), até o momento, não encontra paralelo em nenhuma substância de nosso conhecimento que tenha sido testada neste modelo e apresentado efeito semelhante. Já a dose de 47 $\mu\text{mol/kg}$ apresentou redução moderada da resposta nociceptiva na primeira fase e acentuada durante toda a segunda fase.

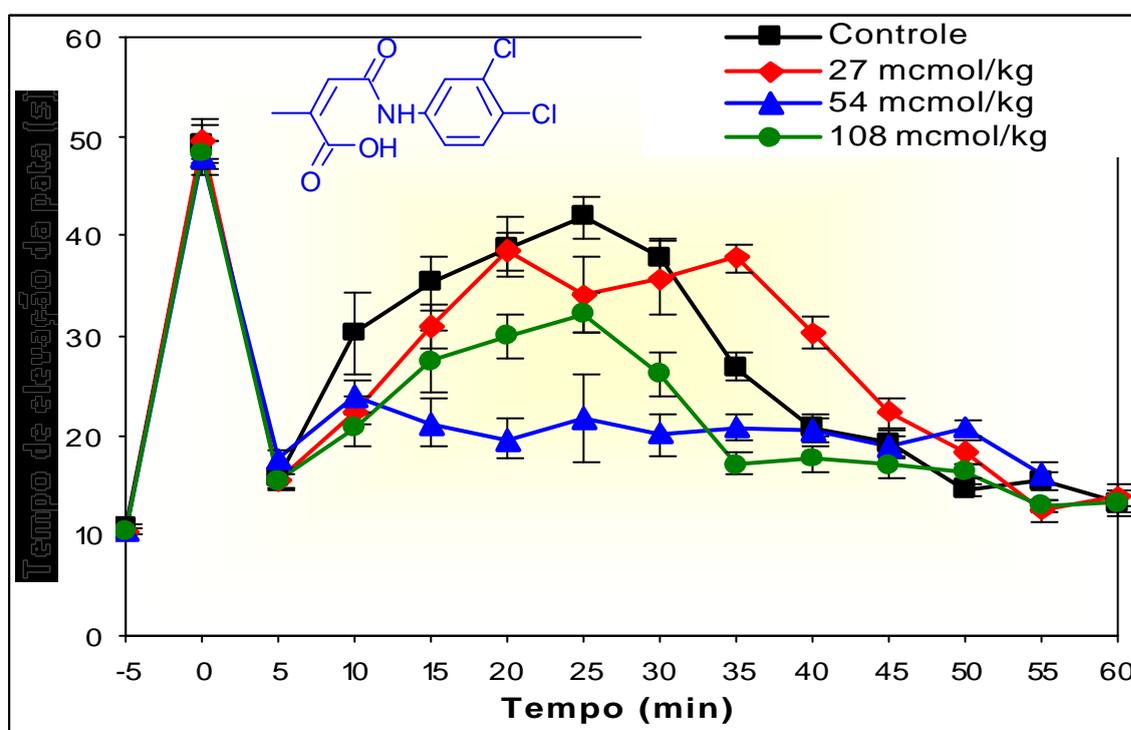


Figura 17 Curvas tempo-resposta da *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida nas doses de 23 $\mu\text{mol/kg}$, 47 $\mu\text{mol/kg}$, 98 $\mu\text{mol/kg}$, 195 $\mu\text{mol/kg}$, 390 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina.

A *N*-(4-metilfenil)citraconimida exibiu o efeito paradoxal semelhante ao da *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida, notadamente para a dose de 124 $\mu\text{mol/kg}$, reforçando a existência de mais que um mecanismo de ação, porém ainda inexplicável (**Figura 18**).

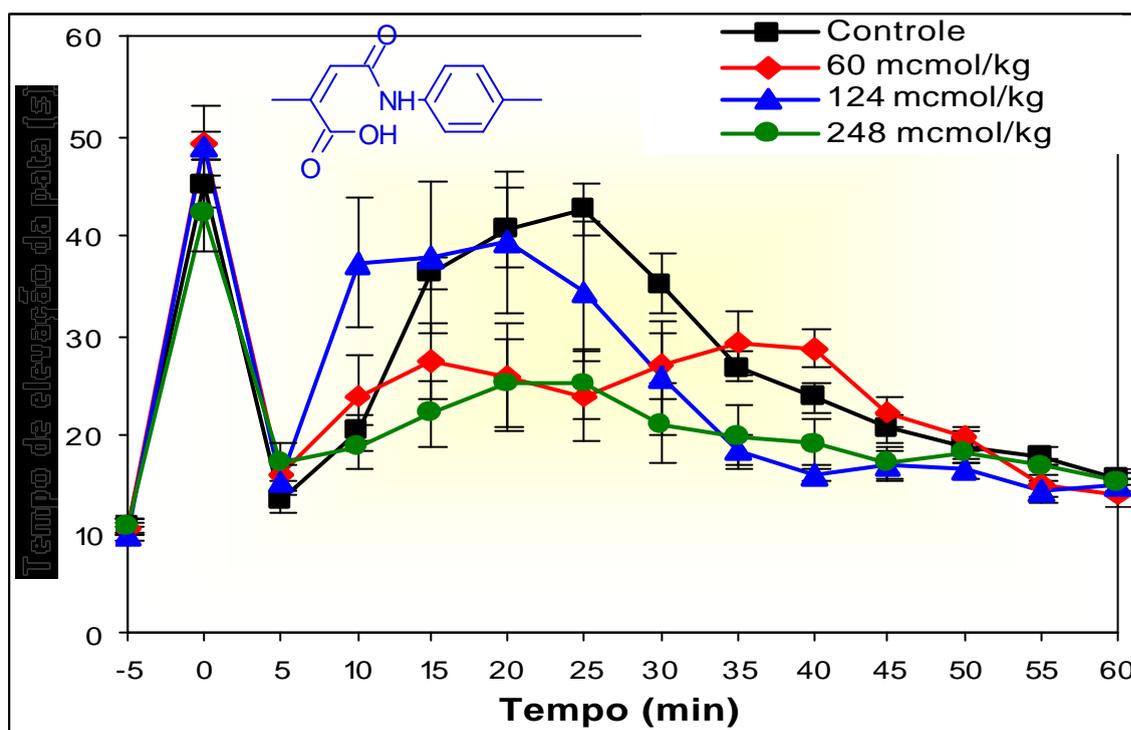


Figura 18 Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metilfenil)citraconimida nas doses de 60 $\mu\text{mol/kg}$, 124 $\mu\text{mol/kg}$, 248 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina.

A *N*-(4-metoxifenil)citraconimida exibiu pouco efeito sobre a primeira fase do teste, porém, um pronunciado efeito sobre a segunda, sendo, assim como a *N*-(*p*-clorofenil)citraconimida, um candidato a fármaco analgésico no que concerne à potência dose-dependente (**Figura 19**).

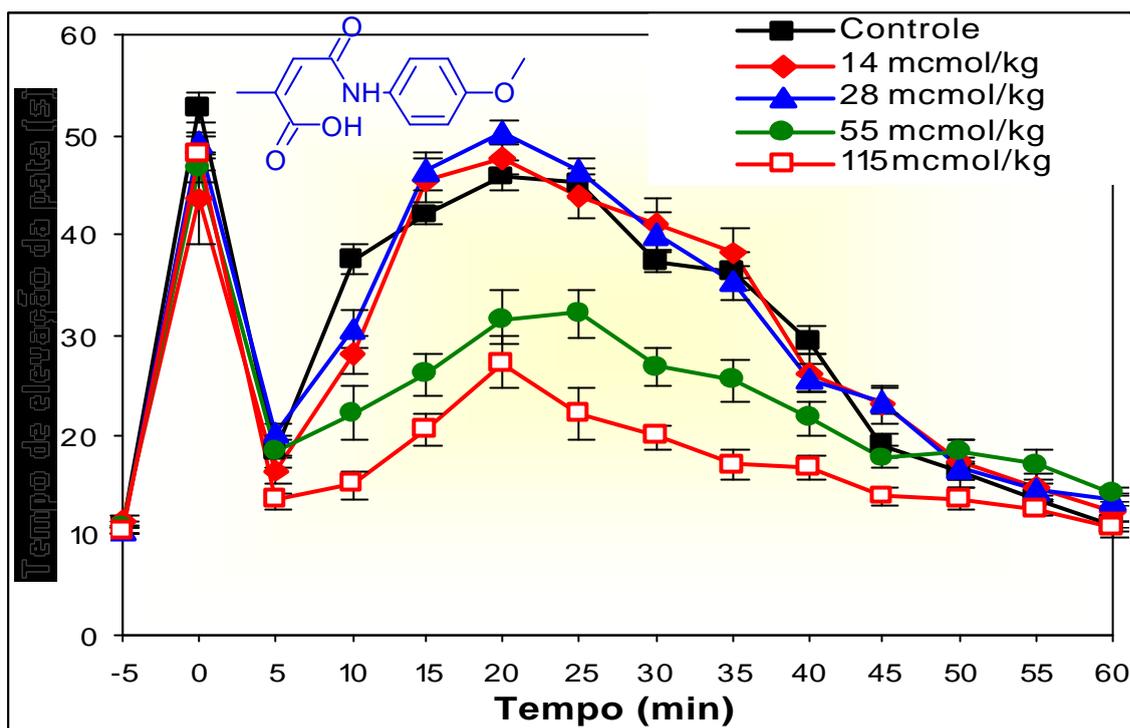


Figura 19 Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metoxifenil)citraconimida nas doses de 14 $\mu\text{mol/kg}$, 28 $\mu\text{mol/kg}$, 55 $\mu\text{mol/kg}$, 115 $\mu\text{mol/kg}$ e óleo de girassol como controle no teste de formalina. Todos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 ratos por linha) do TEP contra o tempo após a injeção de formalina.

3.9 TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS

O teste de formalina em camundongos é semelhante ao efetuado em ratos, porém, menos sensível, mas utilizando-se menor quantidade de droga, dado o baixo peso desses animais. Nesse modelo foi testada uma série de 5 *N*-fenilcitraconimidas e uma série de 5 ácidos *N*-fenilcitraconâmicos (com os mesmos substituintes que as citraconimidas). A escolha baseou-se no fato dos testes em ratos com as *N*-fenilcitraconimidas terem demonstrado grande efeito analgésico e na hipótese de sofrerem metabolização (inicialmente uma hidrólise) depois de administradas no organismo vivo, e que os produtos desta

metabolização sejam as respectivas monoamidas do ácido citracônico (ácidos citraconâmicos). Os possíveis metabólitos foram sintetizados e efetuados os mesmos testes aos quais foram submetidas as *N*-fenilcitraconimidas para testar a hipótese de que os primeiros também sejam ativos. (**Figuras 20, 22, 24, 26 e 28**).

Dos testes realizados com os ácidos *N*-fenilcitraconâmicos, conclui-se que esta classe de compostos também possui efeito analgésico. No caso da hipótese de serem metabólitos diretos das *N*-fenilcitraconimidas, devem desempenhar importante papel no efeito dessas. Em um caso pode-se observar um padrão de efeito semelhante entre a amida e o ácido âmico, como é o caso do par ácido (2*Z*)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-enóico / *N*-(4-metilfenil)citraconimida (**Figuras 26-27**). A análise dos outros quatro exemplos, porém, sugere um padrão de efeito diferenciado em relação às duas fases do teste de formalina (**Figuras 20-25; 28-29**).

A confirmação da existência de distintos mecanismos de analgesia atuando para a imida cíclica e seu respectivo ácido âmico e a relação entre estrutura e atividade analgésica dependem ainda de um estudo mais detalhado com uma ampla variedade de concentrações testadas. Existe, também, a necessidade de um tratamento estatístico adequado para o reconhecimento de aspectos quantitativos envolvidos no fenômeno e, conseqüentemente, desenvolvimento de fármacos baseados nestes modelos.

■ grupo ácido *N*-fenilcitraconâmico, (**36**), (54,8 mg / kg, IP)

▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

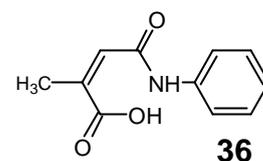
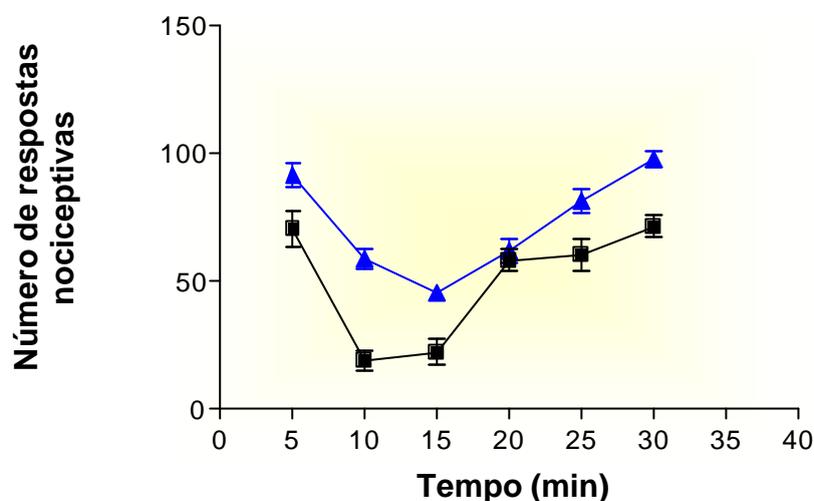


Figura 20 Curvas tempo-resposta do ácido (2Z)-4-anilino-2-metil-4-oxobut-2-enóico, (**36**) na dose de 54,8 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

■ grupo *N*-fenilcitraconimida, (**51**), (50 mg / kg, IP)

▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

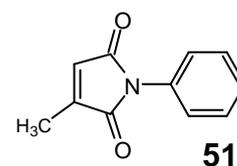
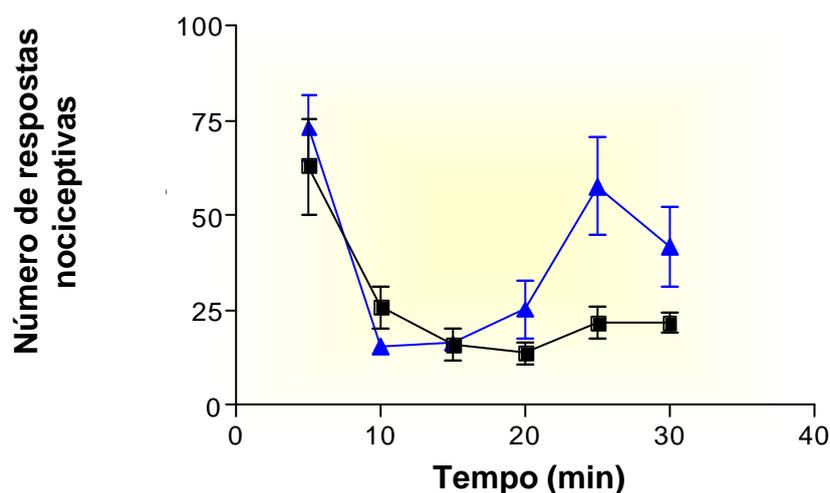


Figura 21 Curvas tempo-resposta da *N*-fenilcitraconimida, (**51**), na dose de 50 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo ácido *N*-(4-clorofenil)citraconâmico, (**37**), (13 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

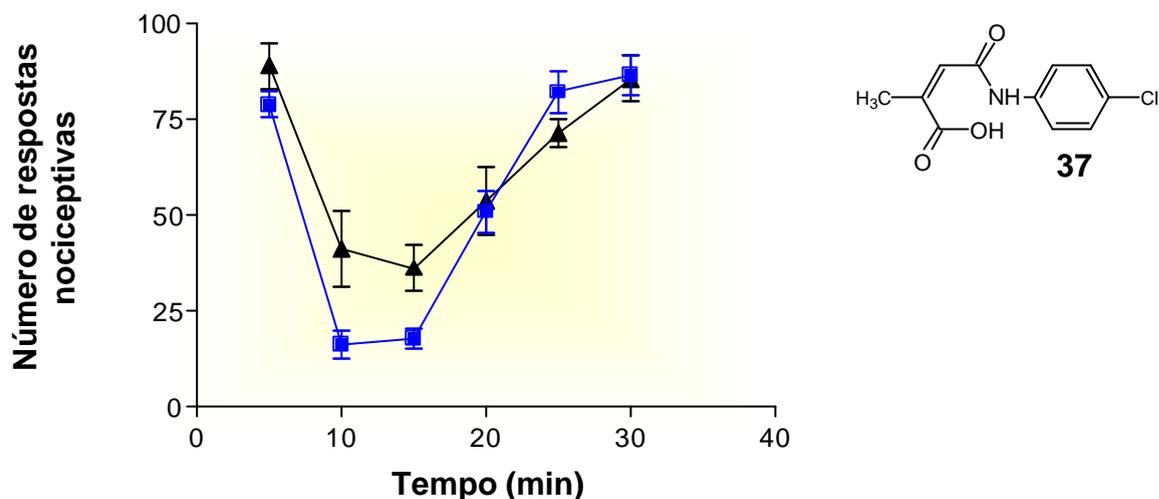


Figura 22 Curvas tempo-resposta do ácido (2*Z*)-4-[(4-clorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico, (**37**) na dose de 13 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo *N*-(4-clorofenil)citraconimida, (**52**), (12 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

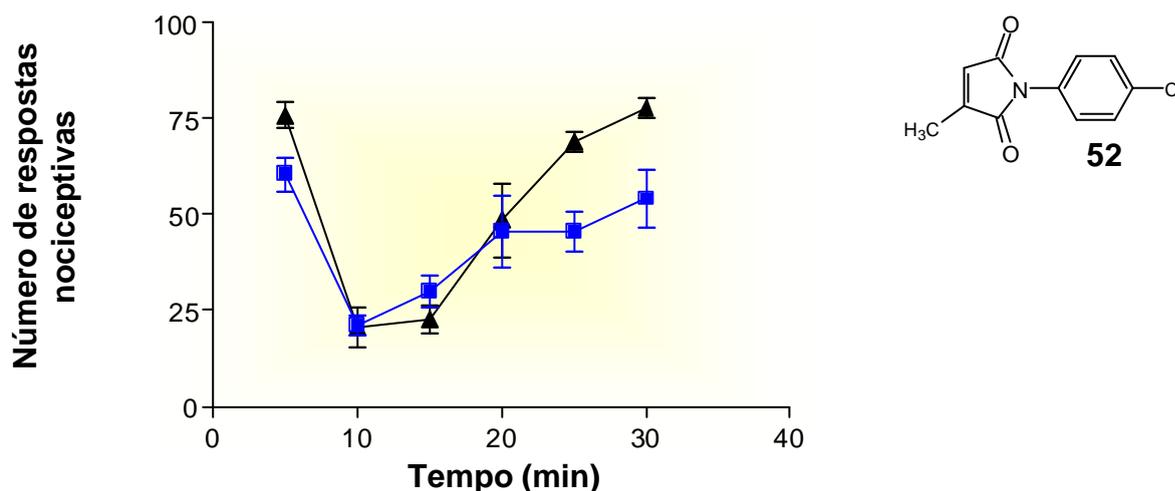


Figura 23 Curvas tempo-resposta da *N*-(*p*-clorofenil)citraconimida, (**52**), na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo ácido *N*-(3,4-diclorofenil)citraconâmico, (**38**), (12,85 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

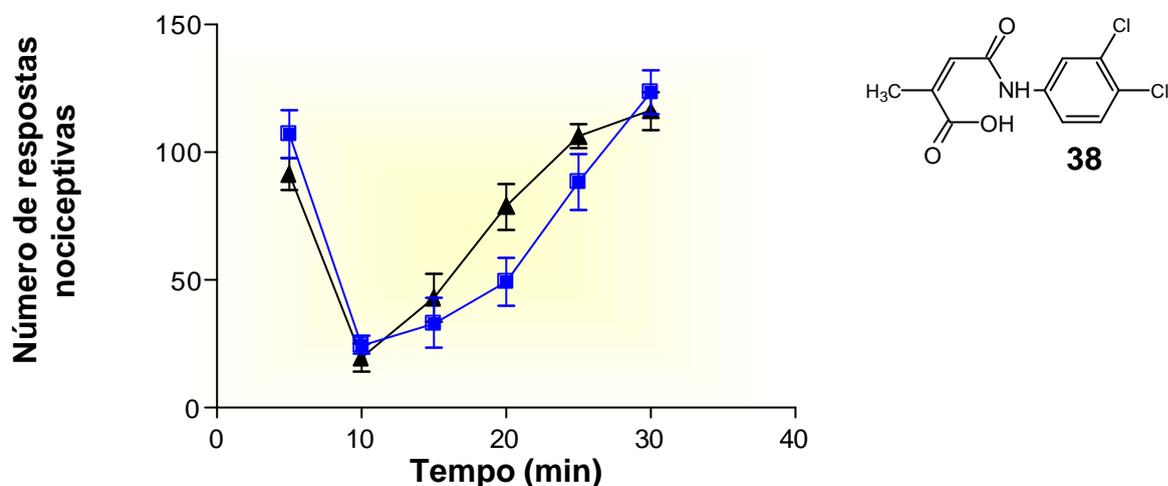


Figura 24 Curvas tempo-resposta do ácido (2Z)-4-[(3,4-diclorofenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico, (**38**) na dose de 12,85 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida, (**53**), (12 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

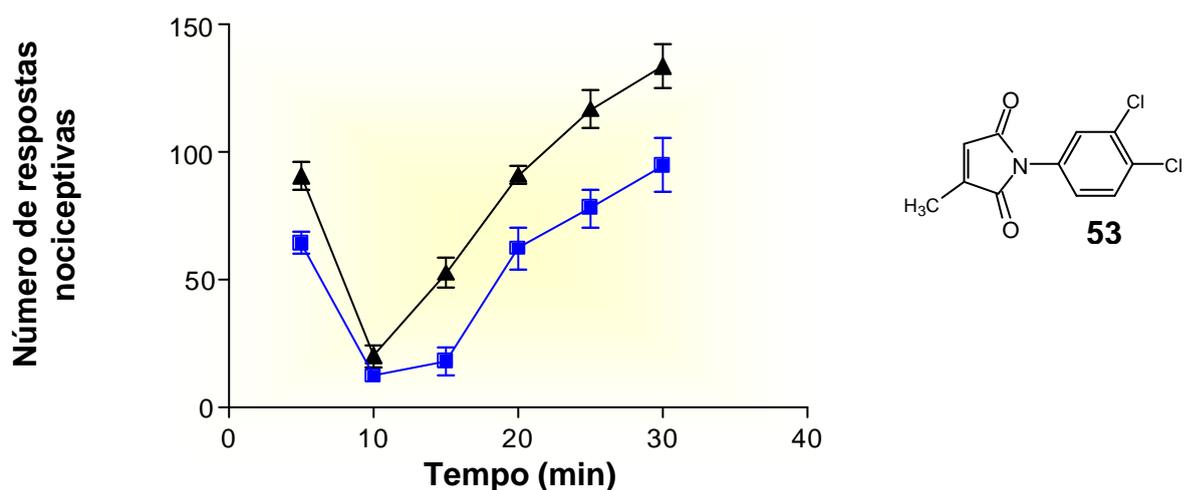


Figura 25 Curvas tempo-resposta da *N*-(3,4-diclorofenil)citraconimida, (**53**), na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo ácido *N*-(4-metilfenil)citraconâmico, **(39)**, (13 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

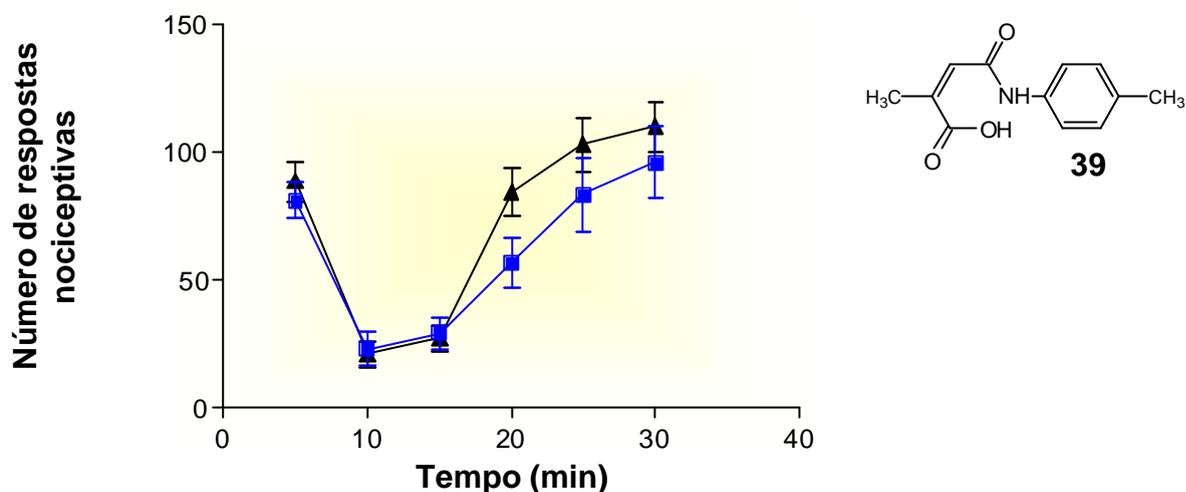


Figura 26 Curvas tempo-resposta do ácido (2Z)-2-metil-4-[(4-metilfenil)amino]-4-oxobut-2-ênico, **(39)**, na dose de 13 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo *N*-(4-metilfenil)citraconimida, **(54)**, (12 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

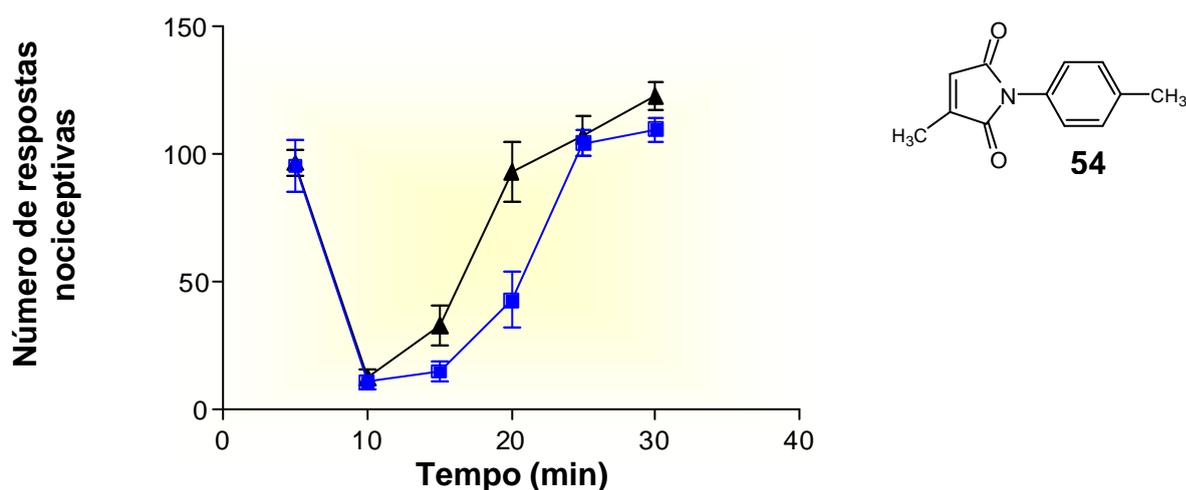


Figura 27 Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metilfenil)citraconimida, **(54)**, na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média \pm e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo ácido *N*-(4-metoxifenil)citraconâmico, (**40**), (13 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

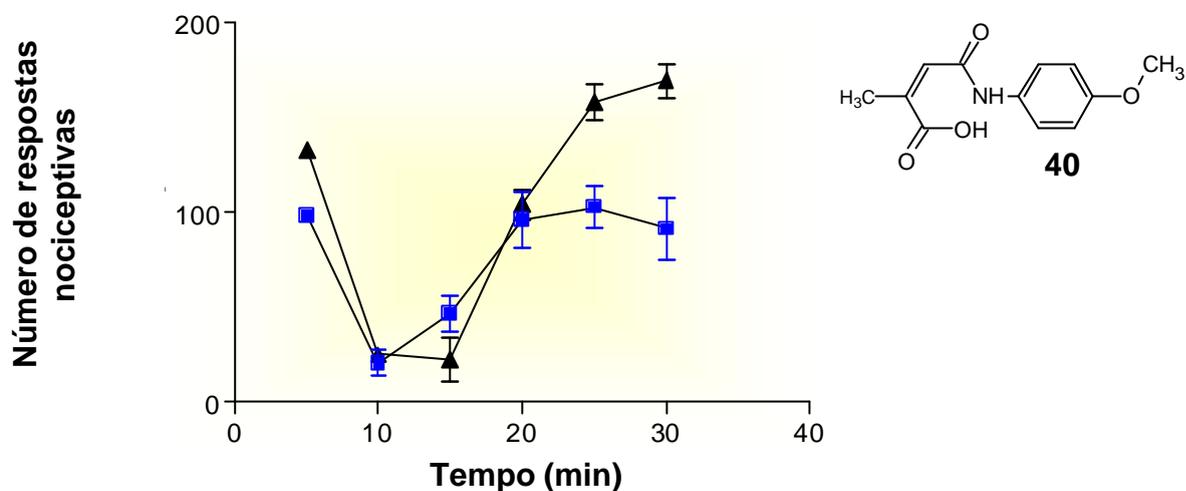


Figura 28 Curvas tempo-resposta do ácido (2*Z*)-4-[(4-metoxifenil)amino]-2-metil-4-oxobut-2-enóico, (**40**), na dose de 13 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média ± e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

- grupo *N*-(4-metoxifenil)citraconimida, (**55**), (12 mg / kg, IP)
- ▲ grupo controle (óleo de girassol + 5 % DMSO)

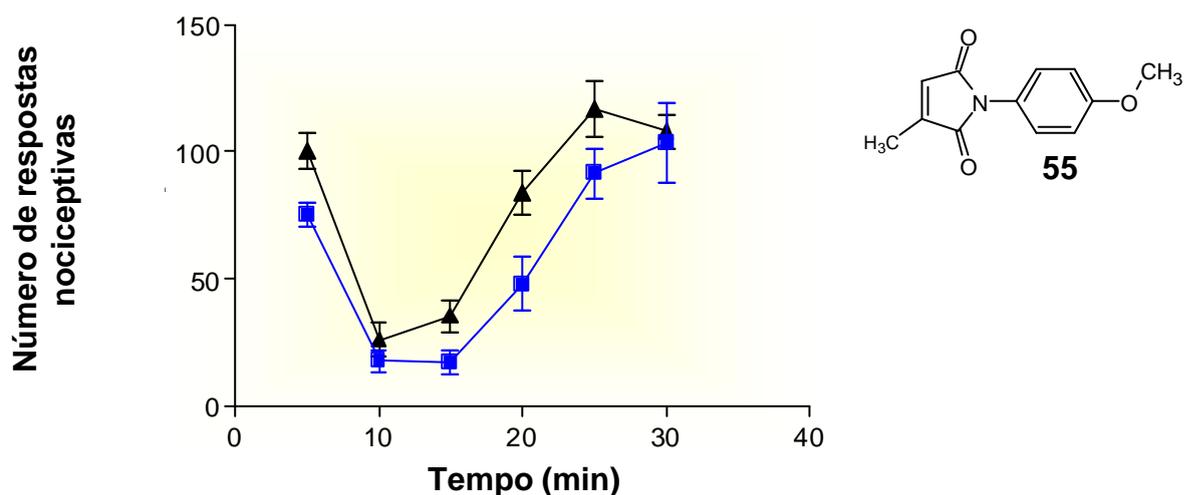


Figura 29 Curvas tempo-resposta da *N*-(4-metoxifenil)citraconimida, (**55**), na dose de 12 mg/kg e óleo de girassol + 5 % DMSO como controle no teste de formalina em camundongos. Ambos os agentes foram injetados IP 30 min antes da injeção IA de formalina. Os dados são apresentados como a média ± e. m. p. (6 camundongos) do número de respostas nociceptivas contra o tempo após a injeção de formalina.

3.10 TESTE DE CARRAGENINA EM RATOS

As *N*-fenilcitraconimidas foram testadas frente ao edema provocado pela injeção de carragenina (**item 4.11**) obtendo-se os resultados mostrados na **Figura 30**.

Todos os cinco compostos testados apresentaram efeito antiinflamatório relevante, sobretudo os compostos **52** e **54**, que inibiram cerca de 40 % da formação de edema e o composto **51** com a surpreendente redução de 75 % da formação de edema, desempenho não alcançado pela indometacina (um dos mais potentes antiinflamatórios não esteroidais). Estes resultados são promissores e encorajam a continuação da investigação do efeito antiinflamatório desta classe de compostos, sendo ainda necessários estudos quantitativos para que se conheçam melhor os fatores envolvidos no efeito que estas moléculas produzem no sistema de nocicepção.

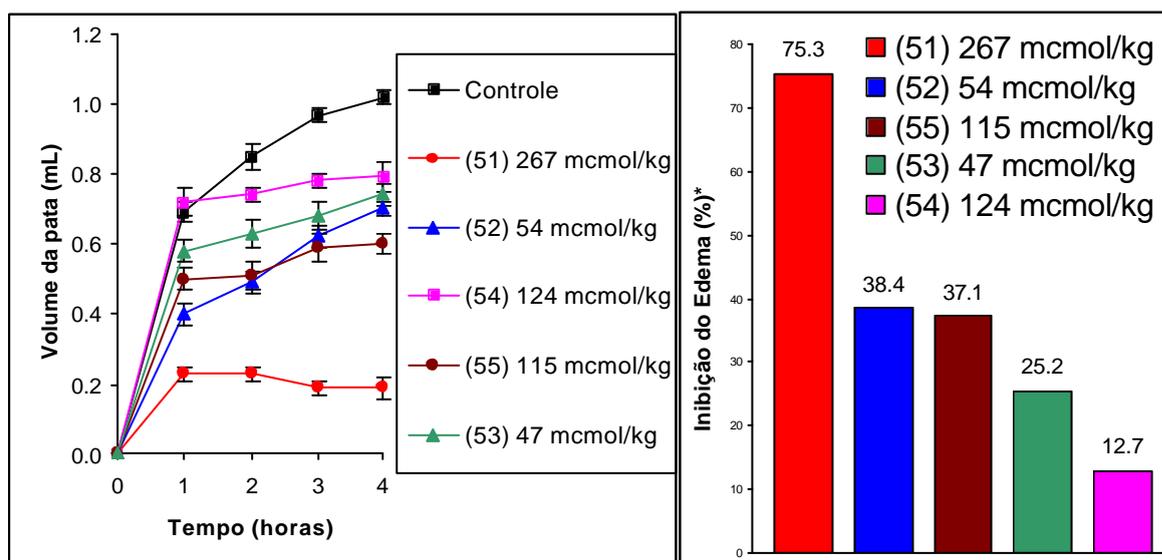


Figura 30 Curvas tempo-resposta (aumento no volume da pata) do teste de carragenina em ratos (esquerda) e Inibição do edema calculada a partir da redução da área sob o gráfico do controle (direita) para as *N*-fenilcitraconimidas.

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO

Utilizaram-se reagentes e solventes de grau de pureza P. A. purificados, quando necessário, conforme métodos de uso corrente.¹⁰⁸

As cromatografias em camada delgada (c. c. d.) foram realizadas utilizando-se placas de alumínio em sílica gel 60 F-254 de 0,2 mm de espessura.

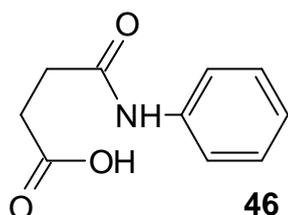
Utilizou-se aparelho Microquímica modelo MQRPF-301 para determinação de ponto de fusão.

As análises de RMN ¹H foram realizadas com um equipamento BRUCKER AC-200F.

Todas as análises foram efetuadas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS *N*-FENILSSUCCINÂMICOS

4.2.1 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-FENILSUCCINÂMICO



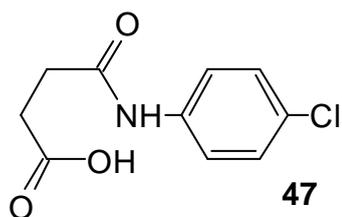
A uma solução de anidrido succínico em clorofórmio ($2 \cdot 10^{-2}$ mols em 100 mL), adicionou-se uma solução de anilina em clorofórmio ($2 \cdot 10^{-2}$ mols em 50 mL), mantendo-se a mistura em refluxo por 20 minutos. Filtrou-se o produto formado (sólido branco) em vácuo, lavando-se com clorofórmio resfriado.

Rendimento 90 %;

P. F. 143,5 – 144,4 °C (acetato de etila / hexano) (Lit.⁹⁶ 143 – 145 °C).

Os compostos abaixo foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado neste item, utilizando-se a anilina devidamente substituída para cada caso (**Esquema 1**).

4.2.2 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(*p*-CLOROFENIL)SUCCINÂMICO

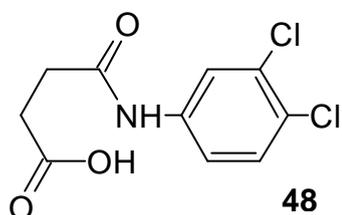


Rendimento 85 %;

P. F. 147,0– 148,1 °C (acetato de etila / hexano);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,17 (sl, 1H, RCOOH);
10,11 (s, 1H, RNH); 7,62 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, Ar-H); 7,34 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, Ar-H);
3,25-3,65 (m, 4H, HOOC-H₂C-CH₂-NHR).

4.2.3 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(3,4-DICLOROFENIL)SUCCINÂMICO

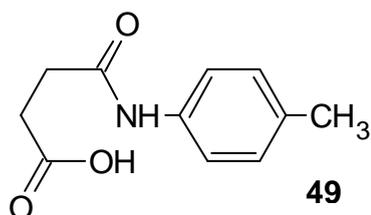


Rendimento 83 %;

P. F. 143,5– 144,0 °C (acetato de etila / hexano);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,20 (sl, 1H, RCOOH);
10,29 (s, 1H, RNH); 8,00 (s, 1H, Ar-H); 7,56 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, Ar-H); 7,47(d, *J* =
8,7 Hz, 1H, Ar-H); 3,25-3,65 (m, 4H, HOOC-H₂C-CH₂-NHR).

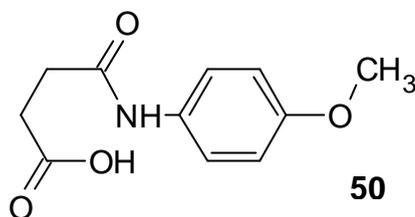
4.2.4 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METILFENIL)SUCCINÂMICO



Rendimento 84 %;

P. F. 152,0– 153,0 °C (acetato de etila / hexano) (Lit.⁹⁷ 150 °C).

4.2.5 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METOXIFENIL)SUCCINÂMICO

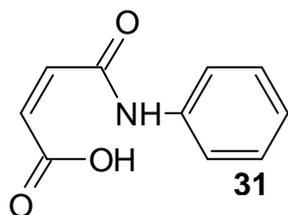


Rendimento 83 %;

P. F. 161,7– 162,8 °C (acetato de etila / hexano) (Lit.⁹⁸ 163 °C).

4.3 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS *N*-FENILMALEÂMICOS

4.3.1 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-FENILMALEÂMICO



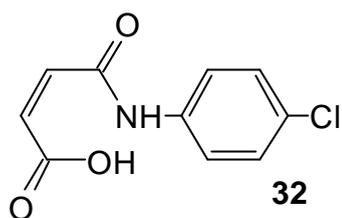
A uma solução de anidrido maléico em éter etílico ($2,04 \cdot 10^{-2}$ mols em 30 mL) adicionou-se uma solução de anilina em éter etílico ($2,14 \cdot 10^{-2}$ mols em 20 mL). Prontamente houve a formação de um precipitado amarelo claro que foi filtrado e lavado com éter etílico resfriado.

Rendimento 95 %;

P. F. 192,2– 192,7 °C (etanol) (Lit.⁹⁶ 194 – 195 °C).

Os compostos a seguir foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado neste item, utilizando-se a anilina devidamente substituída para cada caso (**Esquema 2**).

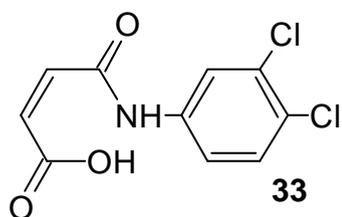
4.3.2 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(*p*-CLOROFENIL)MALEÂMICO



Rendimento 95 %;

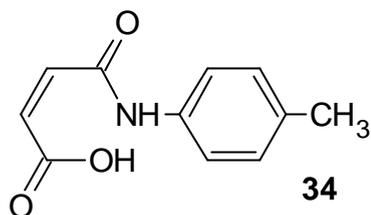
P. F. 189,3 – 190,7 °C (etanol / acetona) (Lit.⁹⁹ 193,8 – 194 °C).

4.3.3 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(3,4-DICLOROFENIL)MALEÂMICO



Rendimento 89 %;

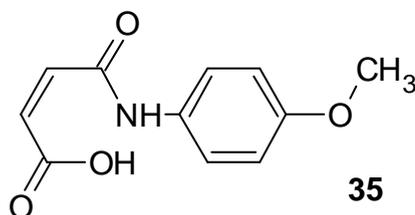
P. F. 196,1 – 196,9 °C (etanol) (Lit.⁹⁹ 200,7 – 202,3 °C).

4.3.4 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METILFENIL)MALEÂMICO

Rendimento 95 %;

P. F. 188,5 – 189,5 °C (etanol / acetona);

RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 13,33 (sl, 1H, RCOOH); 10,40 (s, 1H, RNH); 7,34 (m, 4H, Ar-H); 6,48 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, $\text{RCH=CHR}'$); 6,32 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, $\text{RCH=CHR}'$); 2,27 (s, 3H, Ar-CH_3).

4.3.5 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METOXIFENIL)MALEÂMICO

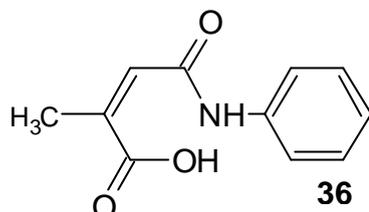
Rendimento 95 %;

P. F. 178,0 – 178,7 °C (etanol / acetona);

RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 13,45 (sl, 1H, RCOOH); 10,40 (s, 1H, RNH); 7,55 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar-H); 6,91 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar-H); 6,47 (d, $J = 12$ Hz, 1H, $\text{RCH=CHR}'$); 6,30 (d, $J = 12$ Hz, 1H, $\text{RCH=CHR}'$); 3,73 (s, 3H, Ar-OCH_3). Concorda com espectro publicado.¹⁰⁰

4.4 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS *N*-FENILCITRACONÂMICOS

4.4.1 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-FENILCITRACONÂMICO



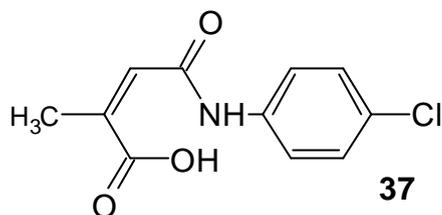
A uma solução de anidrido citracônico em éter etílico ($8,92 \cdot 10^{-3}$ mols em 30 mL) adicionou-se uma solução de anilina em éter etílico ($9,37 \cdot 10^{-3}$ mols em 20 mL). Prontamente houve a formação de um precipitado branco amarelado que foi filtrado e lavado com éter etílico resfriado.

Rendimento 90 %;

P. F. 167,5 °C (hexano / acetona) (Lit.⁶¹ 170 – 172 °C);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,40 (m, 5H, Ar-**H**); 6,17 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, R**H**C=CR'); 2,06 (s, 3H, C**H**₃-CH=CR).

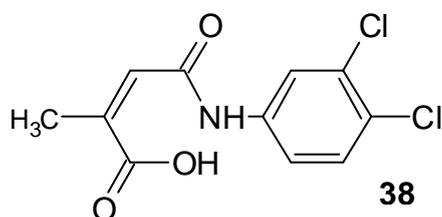
Os compostos abaixo foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado neste item, utilizando-se a anilina devidamente substituída para cada caso (**Esquema 3**).

4.4.2 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(*p*-CLOROFENIL)CITRACONÂMICO

Rendimento 94 %;

P. F. 181,0 – 181,5 °C (hexano / acetona) (Lit.⁶¹ 180 – 181 °C);

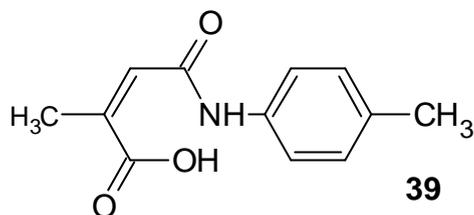
RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 10,38 (s, 1H, RNH); 7,59 (m, 4H, Ar-H); 6,16 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,07 (s, 3H, CH₃-CH=CR).

4.4.3 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(3,4-DICLOROFENIL)CITRACONÂMICO

Rendimento 86 %;

P. F. 160,2 – 160,3 °C (hexano / acetona);

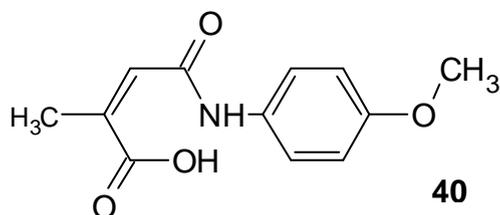
RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,68 (sl, 1H, RCOOH); 10,44 (s, 1H, RNH); 8,03 (s, 1H, Ar-H); 7,57 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, Ar-H); 7,48 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, Ar-H); 6,08 (s, 1H, RHC=CR'); 2,00 (s, 3H, CH₃-CR'=CHR).

4.4.4 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METILFENIL)CITRACONÂMICO

Rendimento 87 %;

P. F. 175,2 – 175,9 °C (etanol / acetona) (Lit.¹⁰¹ 178 – 179 °C);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,72 (sl, 1H, RCOOH); 10,09 (s, 1H, RNH) 7,30 (m, 4H, Ar-H); 6,09 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,24 (s, 3H, CH₃-CH=CR).

4.4.5 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METOXIFENIL)CITRACONÂMICO

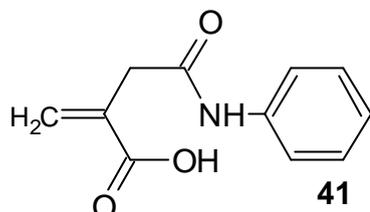
Rendimento 92 %;

P. F. 172,0 – 172,5 °C (etanol / acetona) (Lit.⁶¹ 175 – 176 °C);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,72 (sl, 1H, RCOOH); 10,07 (s, 1H, RNH); 7,20 (m, 4H, Ar-H); 6,08 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H, RHC=CR'); 3,72 (s, 3H, Ar-OCH₃); 1,97 (s, 3H, CH₃-CH=CR).

4.5 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS *N*-FENILITACONÂMICOS

4.5.1 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-FENILITACONÂMICO



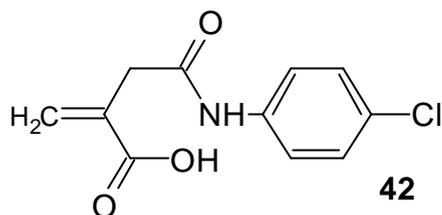
A uma solução de anidrido itacônico em éter etílico ($4,46 \cdot 10^{-3}$ mols em 5 mL), adicionou-se uma solução de anilina em éter etílico ($4,68 \cdot 10^{-3}$ mols em 5 mL). Esta solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 12 h, quando o precipitado branco formado foi filtrado e lavado com éter etílico resfriado.

Rendimento 66 %;

P. F. 160 – 160,1 °C (hexano / acetato de etila / acetona) (Lit.⁶² 160 – 161 °C);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,7 (s.l. 1H, RCOOH); 10,10 (s, 1H, RNH); 7,40 (m, 5H, Ar-H); 6,26 e 5,83 (2 s, 2 H, H₂C=CR').

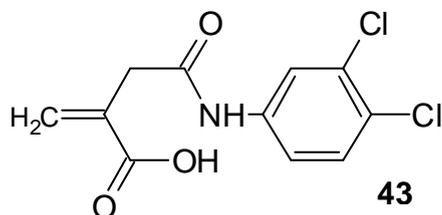
Os compostos abaixo foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado neste item, utilizando-se a anilina devidamente substituída para cada caso (**Esquema 4**).

4.5.2 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(*p*-CLOROFENIL) ITACONÂMICO

Rendimento 89 %;

P. F. 172,5 – 173,5 °C (etanol / acetona) (Lit.⁶² 170 – 171 °C);

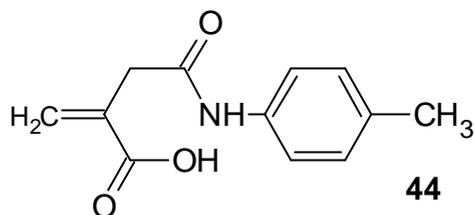
RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,65 (sl, 1H, RCOOH); 10,23 (s, 1H, RNH); 7,63 (m, 4H, Ar-H); 6,27 e 5,84 (2 s, 2H, H₂C=CR'); 3,31 (s, R-CH₂-R').

4.5.3 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(3,4-DICLOROFENIL)ITACONÂMICO

Rendimento 95 %;

P. F. 155,8 – 157,3 °C;

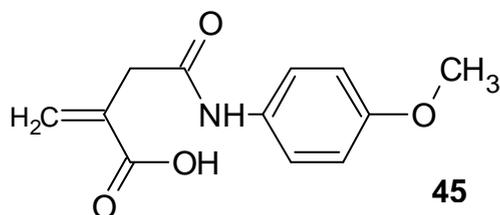
RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,5 (sl, 1H, RCOOH); 10,42 (s, 1H, RNH); 7,81 (m, 3H, Ar-H); 6,28 e 5,86 (2 s, 2H, H₂C=CR'); 3,30 (s, R-CH₂-R').

4.5.4 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METILFENIL)ITACONÂMICO

Rendimento 98 %;

P. F. 175,0 – 175,9 °C (etanol / acetona) (Lit.⁶² 174 – 175 °C);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,35 (sl, 1H, RCOOH); 9,88 (s, 1H, RNH); 7,32 (m, 4H, Ar-H); 6,16 e 5,73 (2s, 2H, H₂C=CR'); 3,21 (s, R-CH₂-R').

4.5.5 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METOXIFENIL)ITACONÂMICO

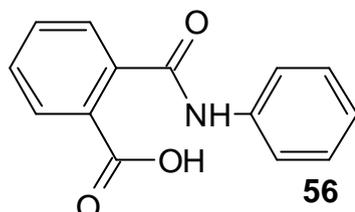
Rendimento 98 %;

P. F. 170,4 – 171,7 °C (hexano / acetato de etila / acetona) (Lit.⁶² 172 – 173 °C);

RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 12,47 (sl, 1H, RCOOH); 9,84 (s, 1H, RNH); 7,17 (m, 4H, Ar-H); 6,16 e 5,73 (2s, 2H, H₂C=CR'); 3,71, (s, 3H, ArOCH₃); 3,21 (s, R-CH₂-R').

4.6 SÍNTESE DA SÉRIE DE ÁCIDOS *N*-FENILFTALÂMICOS

4.6.1 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-FENILFTALÂMICO



A uma solução de anidrido ftálico em clorofórmio ($6,75 \cdot 10^{-3}$ mols em 20 mL), adicionou-se uma solução de anilina em clorofórmio ($6,75 \cdot 10^{-3}$ mols em 20 mL). Esta solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 24 h, quando o precipitado branco formado foi filtrado e lavado em clorofórmio resfriado.

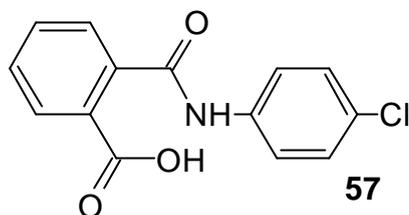
Rendimento 91 %;

P. F. 208,9 – 209,1 °C (etanol / água);

Espectro de massa apresentou íon molecular = 241, conforme descrito na literatura,¹⁰² pico base 93 (anilina), além do pico 223, representando a *N*-fenilftalimida (M - H₂O).

Os compostos abaixo foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado no item 4.6.1, utilizando-se a anilina devidamente substituída para cada caso (**Esquema 5**).

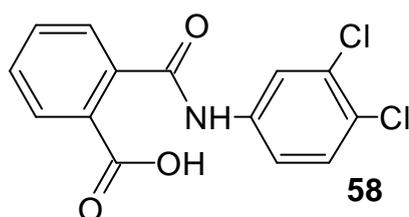
4.6.2 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(*p*-CLOROFENIL)FTALÂMICO



Rendimento 90 %;

P. F. 181,3 – 181,9 °C (etanol / água) (Lit.³² 183,5 °C).

4.6.3 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(3,4-DICLOROFENIL)FTALÂMICO

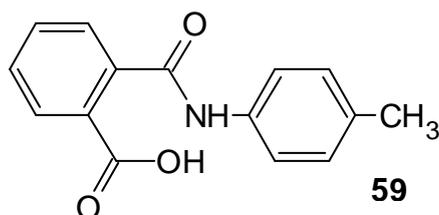


Rendimento 90 %;

P. F. 184,1 – 184,4 °C (etanol / água);

O espectro de massa apresenta dois picos em 291 e 293, representando a $M^+ - H_2O$ dos dois isótopos do cloro.

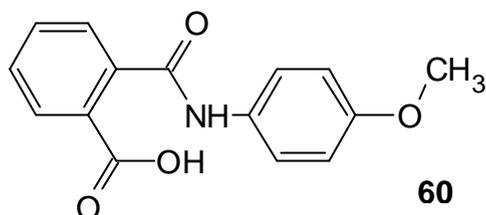
4.6.4 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METILFENIL)FTALÂMICO



Rendimento 70 %;

P. F. 157,4 – 158,2 °C (etanol / água) (Lit.³² 158 – 159 °C);

4.6.5 SÍNTESE DO ÁCIDO *N*-(4-METOXIFENIL)FTALÂMICO



Rendimento 95 %;

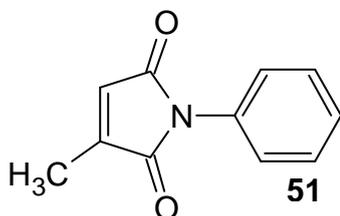
P. F. 204,8 – 205,4 °C (etanol / água);

O espectro de massa apresenta M_z 253, representando a $M^+ - H_2O$.

4.7 SÍNTESE DA SÉRIE DE *N*-FENILCITRACONIMIDAS

4.7.1 SÍNTESE DA SÉRIE DE *N*-FENILCITRACONIMIDAS POR DESIDRATAÇÃO DE ÁCIDOS *N*-FENILCITRACONÂMICOS SUBSTITUÍDOS (MÉTODO A)

4.7.1.1 SÍNTESE DA *N*-FENILCITRACONIMIDA



Em um erlenmeyer de 50 mL, foram adicionados $4,87 \cdot 10^{-3}$ mols de ácido *N*-fenilcitraconâmico, (**36**), $2,44 \cdot 10^{-3}$ mols de acetato de sódio anidro e $1,95 \cdot 10^{-2}$ mols de anidrido acético. Esta solução foi aquecida a 80 °C por 1 h,

quando foi vertida sobre gelo moído sob vigorosa agitação. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água e éter de petróleo.

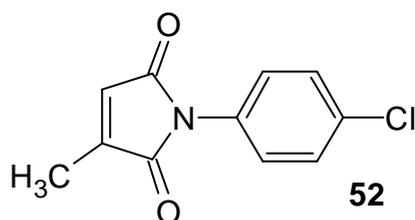
Rendimento 78 %;

P. F. 97,5 – 97,9 °C. (hexano / acetona) (Lit.¹⁰³ 99 °C);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,40 (m, 5H, Ar-**H**); 6,48 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,17 (d, *J* = 1,7 Hz, 3H, CH₃-CH=CR).

Os compostos abaixo foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado neste item, utilizando-se o ácido citraconâmico devidamente substituído para cada caso (**Esquema 6**).

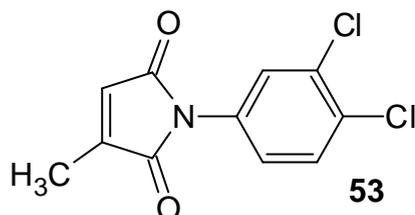
4.7.1.2 SÍNTESE DA *N*-(*p*-CLOROFENIL)CITRACONIMIDA



Rendimento 85 %;

P. F. 118,0 – 118,4 °C (etanol / água) (Lit.¹⁰³ 117 °C);

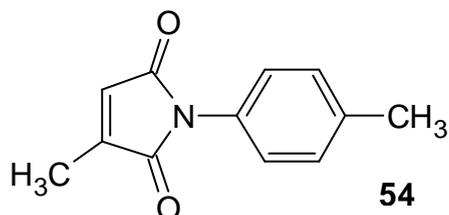
RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,36 (m, 4H, Ar-**H**); 6,48 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,17 (d, *J* = 1,5 Hz, 3H, CH₃-CH=CR).

4.7.1.3 SÍNTESE DA *N*-(3,4-DICLOROFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 90 %;

P. F. 114,0 – 115,0 °C (hexano / acetona) (Lit.¹⁰³ 106 °C);

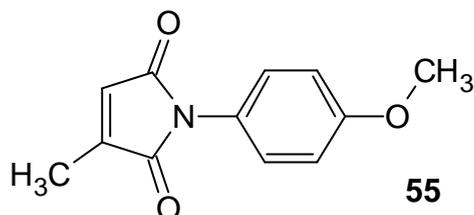
RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,41 (m, 3H, Ar-**H**); 6,50 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,18 (d, *J* = 1,7 Hz, 3H, CH₃-CH=CR).

4.7.1.4 SÍNTESE DA *N*-(4-METILFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 78 %;

P. F. 115,0 °C (hexano) (Lit.¹⁰⁴ 114 – 115 °C);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,26 (m, 4H, Ar-**H**); 6,46 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,17 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H, CH₃-CH=CR).

4.7.1.5 SÍNTESE DA *N*-(4-METOXIFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 73 %;

P. F. 120,5 – 121,5 °C (acetato de etila) (Lit.¹⁰⁵ 121 – 122 °C);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,38 (m, 4H, Ar-**H**); 6,74 (d, *J* = 9 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,07 (d, *J* = 11 Hz, 3H, CH₃-CH=CR).

4.7.2 SÍNTESE DA SÉRIE DE *N*-FENILCITRACONIMIDAS POR IMIDIZAÇÃO DIRETA DO ANDRIDO CITRACÔNICO COM ANILINAS SUBSTITUÍDAS EM ÁCIDO ACÉTICO(MÉTODO B)4.7.2.1 SÍNTESE DA *N*-FENILCITRACONIMIDA

Em um balão de 50 mL, foram adicionados 1,0 g ($1,78 \cdot 10^{-2}$ mols) de anidrido citracônico, 2,28 g ($1,78 \cdot 10^{-2}$ mols) de anilina e 15 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi aquecida refluxada por 2 h, quando foi vertida sobre gelo moído sob vigorosa agitação até a formação de precipitado (aproximadamente 20 min) que foi filtrado, lavado com água e éter de petróleo.

Rendimento 89 %;

P. F. 97,5 – 97,9 °C (hexano);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,40 (m, 5H, Ar-**H**); 6,48 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, RHC=CR'); 2,17 (d, *J* = 1,7 Hz, 3H, CH₃-CH=CR).

Os compostos abaixo foram sintetizados por procedimento semelhante ao empregado neste item, utilizando-se a anilina devidamente substituída para cada caso (**Esquema 7**).

4.7.2.2 SÍNTESE DA *N*-(*P*-CLOROFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 78 %;

P. F. 118,0 – 118,4 °C (etanol / água);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,36 (m, 4H, Ar-**H**); 6,48 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, **RHC=CR'**); 2,17 (d, *J* = 1,5 Hz, 3H, **CH₃-CH=CR**).

4.7.2.3 SÍNTESE DA *N*-(3,4-DICLOROFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 90 %;

P. F. 114,0 – 115,0 °C (hexano / acetona);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,41 (m, 3H, Ar-**H**); 6,50 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, **RHC=CR'**); 2,18 (d, *J* = 1,7 Hz, 3H, **CH₃-CH=CR**).

4.7.2.4 SÍNTESE DA *N*-(4-METILFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 92 %;

P. F. 115,0 °C (hexano);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,26 (m, 4H, Ar-**H**); 6,46 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, **RHC=CR'**); 2,17 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H, **CH₃-CH=CR**).

4.7.2.5 SÍNTESE DA *N*-(4-METOXIFENIL)CITRACONIMIDA

Rendimento 92 %;

P. F. 120,5 – 121,5 °C (acetato de etila);

RMN ¹H (CDCl₃, TMS, 200 MHz) δ (ppm): 7,38 (m, 4H, Ar-**H**); 6,74 (d, *J* = 9 Hz, 1H, **RHC=CR'**); 2,07 (d, *J* = 11 Hz, 3H, **CH₃-CH=CR**).

4.8 ANÁLISE DA ISOMERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS *N*-FENILCITRACONÂMICOS VIA ESPECTROMETRIA DE RMN ¹H

Estudou-se a isomerização entre os ácidos (2*Z*)-4-anilino-**2-metil**-4-oxobut-2-enóicos, (**23**), e (2*Z*)-4-anilino-**3-metil**-4-oxobut-2-enóicos, (**22**), por RMN ¹H ((CD₃)₂SO, TMS, 200 MHz), sendo a primeira leitura realizada no resíduo total da mistura reacional (seco em rota-evaporador) e as subseqüentes a três diferentes tempos e temperaturas conforme sumarizado na **Tabela 10**.

Tabela 10 Cronograma das leituras de RMN ¹H com as respectivas temperaturas

Leitura	Tempo (min)	Temperatura (°C)
01	13	27
02	+ 110	35
03	+ 110	65
04	+ 110	95

Determinou-se o percentual relativo entre os dois isômeros por comparação das integrais dos sinais do H olefínico de cada isômero.

4.9 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA FRENTE À *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade aguda sobre a *Artemia salina* foi executado segundo a metodologia proposta por SOLIS *et al.*⁷⁸ As diluições foram feitas pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa de sal marinho sintético (35 g/L). Utilizou-se o método Probitos para a obtenção das DL₅₀.

4.9.1 SOLUÇÕES INICIAIS

A massa de cada amostra foi medida em 0,5 mmol por conveniência no preparo das soluções iniciais. Os testes de toxicidade aguda foram realizados utilizando-se duas soluções iniciais, que serviram de partida para as diluições utilizadas nos testes (6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 % e 100 %):

a) solução-mãe: transferiu-se a massa de cada amostra (0,5 mmol) para um balão volumétrico de 30 mL contendo tampão fosfato pH 7,2, agitou-se por turbilhonamento e ultra-som. Retirou-se 10 mL dessa solução e acrescentou-se 0,35 g de sal marinho sintético;

b) solução 10 % da solução-mãe: transferiu-se 1 mL da solução-mãe inicial (sem o sal) para um balão volumétrico de 10 mL, acrescentou-se 9 mL de tampão fosfato pH 7,2 e 0,35 g de sal marinho sintético.

4.9.2 BIOENSAIOS COM *Artemia salina*

Os testes de toxicidade aguda com náuplios do crustáceo *Artemia salina* foram realizados no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica – Departamento de Bioquímica – UFSC.

Para a eclosão dos cistos de *Artemia salina* seguiu-se a metodologia da agência estadunidense de proteção ambiental (USEPA).¹⁰⁹

Foram utilizados náuplios de 6 a 8 horas de vida, obtidos cerca de 24 h após o preparo dos cistos para a eclosão, a fim de que fossem utilizados náuplios no estágio II de desenvolvimento.

O meio utilizado para a eclosão dos cistos e para as diluições foi obtido pela dissolução de 35 g de sal marinho sintético em 1 L de água deionizada, ajuste do pH a 6,5 e posterior esterilização por calor úmido (autoclave) a 1 atm por 15 min.

Inoculou-se aproximadamente 150 mg de cistos em 150 mL do meio em erlenmeyer de 500 mL e deixou-se a mistura sob agitação a 30 °C por 30 h. Após este período, separaram-se as larvas que eclodiram dos cistos restantes, preparando-se suspensões contendo aproximadamente 200 larvas / mL.

4.9.3 TESTES DE SENSIBILIDADE

Realizaram-se testes de sensibilidade com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) com o objetivo de avaliarem-se os lotes dos microcrustáceos, qualificando-os ou não, para a realização dos testes de toxicidade aguda com as amostras. Para cada lote de organismos utilizados nos testes de toxicidade aguda foi feito um teste de sensibilidade (em triplicata), com 5 concentrações (100 mg / L, 56 mg / L, 32 mg / L, 18 mg / L e 10 mg / L), com duas repetições cada uma e controles com a solução salina (pH 6,5 e 35 g / L de sal marinho sintético). Os

resultados obtidos estavam dentro do limite de confiança de 95 %, estipulado para 24 h de duração do teste.

4.9.4 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM AS DROGAS

Executaram-se os testes segundo metodologia proposta por SOLIS *et al.*⁷⁸ em placas de teste multi-poços (6x4), com 2 repetições para cada concentração, além dos controles com meio salino. Inocularam-se das diferentes diluições testadas 150 µL de suspensão com os náuplios.

Os ensaios de toxicidade aguda com as drogas tiveram duração de 48 h, sendo que a cada 24 h de exposição, observou-se e anotou-se o número de organismos móveis ou imóveis.

Realizaram-se testes tanto em diluições da solução-mãe de cada droga, quanto em diluições das soluções 10 % da solução-mãe.

4.9.5 CÁLCULOS PARA A CL₅₀

Utilizou-se o método Probitos para a obtenção das CL₅₀, sendo os cálculos efetuados utilizando-se o programa computacional Trimmed Spearman-Kärber Method, da Burlington Research INC, a partir do número de organismos mortos ou imóveis em cada concentração após os períodos de observação de 24 h (testes de sensibilidade) e 48 h (testes de toxicidade aguda com as soluções-teste).

4.10 TESTE DE FORMALINA EM RATOS

4.10.1 ANIMAIS

Utilizaram-se ratos *wistar* fêmeas pesando entre 150 – 200 g, criados no biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, mantidos em ciclo de claro / escuro 12 / 12 horas, com livre acesso à água e ração.

4.10.2 DROGAS

Morfina, Naloxona e Formalina (Merk lab.).

4.10.3 TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR FORMALINA

4.10.3.1 SISTEMA DE REGISTRO DE NOCICEPÇÃO ARTICULAR

O registro de nocicepção foi realizado por método anteriormente publicado¹⁰⁶ que se constitui de um cilindro de aço inox (30cm largura X 30cm diâmetro), coberto com uma tela de trama fina de arame de aço inox, que gira a uma velocidade de 3 rpm. O cilindro, tem sua superfície dividida em 3 trilhas iguais e sua superfície permanece ligada ao fio terra de um microcomputador. O sistema se completa com as polainas metálicas, que são dispositivos de contato elétrico colocados nas patas posteriores do animal e conectados à porta de entrada de dados do microcomputador.

Os registros do estado funcional das articulações foram realizados colocando-se o animal sobre o cilindro em rotação e medindo-se, por meio de um

programa específico no microcomputador, o tempo durante o qual a pata direita posterior do animal deixa de tocar a superfície do cilindro. A deambulação sobre o cilindro obriga as patas posteriores a, alternadamente, deixarem de apoiar o animal. Acumulando-se o tempo em que a pata direita não toca o cilindro durante um período de observação de 60 segundos obtivemos o tempo de elevação da pata (TEP). O TEP de animais com articulação não estimulada varia em torno de 10 segundos. Um aumento do TEP, em relação ao controle, indica desenvolvimento de incapacitação. Os registros de 60 segundos foram repetidos a cada 5 minutos, após a aplicação intra-articular (IA) de 50 µL de formalina 3 % no joelho, durante 60 min.

As injeções IA foram feitas com o animal acordado. Com uma das mãos segurou-se o animal gentilmente em decúbito dorsal e flectiu-se sua perna posterior direita. A injeção na articulação do joelho foi feita com agulha (13 x 3.8), introduzindo-se cerca de 1/3 de seu comprimento, não excedendo o volume de 50 µl de solução.

A resposta típica dos animais frente ao estímulo de formalina constitui-se de um período de resposta intensa com elevados valores de TEP, que se inicia segundos após a injeção e é registrada como tempo 0. Segue-se a esta primeira fase uma acomodação dos animais que se caracteriza pela quase total ausência de resposta, registrada 5 minutos após a estimulação. Após esta fase de "silêncio", chamada quiescência, ocorre um novo período de respostas, que se inicia em torno dos 10 minutos após a injeção e atinge o máximo no tempo 20 e 25 minutos, declinando a seguir. Sessenta minutos após o estímulo inicial os animais já estão deambulando normalmente.

4.10.3.2 INJEÇÃO E DILUIÇÃO DE DROGAS

As drogas em estudo foram administradas por via intraperitoneal (IP) em solução com óleo vegetal puro (girassol), ou com óleo mais 5% de DMSO, 1 hora antes do estímulo nociceptivo intra-articular. O mesmo procedimento aplicou-se para o estudo de seus efeitos sobre o edema inflamatório.

4.10.4 TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA

Possíveis alterações na capacidade motora dos animais tratados podem ser detectadas, com suficiente precisão, durante o teste de deambulação forçada sobre o sistema de registro de nocicepção articular. O sistema exige que os animais procurem o ponto mais alto do cilindro para evitar a queda. Animais sedados ou com problemas de transmissão de placa motora apresentam também nítida dificuldade em caminhar sobre o cilindro.

4.11 TESTE DE CARRAGENINA EM RATOS

A quantificação do edema inflamatório induzido pela aplicação subcutânea de carragenina realizou-se pela imersão das patas injetadas em uma cuba contendo uma solução de 2,5 % de lauril sulfato de sódio em água. A cuba contendo o líquido foi adaptada a uma balança eletrônica rápida e a variação de peso do sistema, quando a pata foi imersa, pôde ser diretamente correlacionada com o volume da pata em questão.

4.12 TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS

Realizou-se este teste segundo método previamente publicado⁸⁷ e idêntico ao descrito na seção 4.10.3.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES FARMACOLÓGICOS

Os dados foram analisados através de análise de variância apropriada seguida de um teste *post-hoc*, quando foi necessário. O nível de significância mínimo foi de 5 %. Os grupos experimentais compuseram-se de 6 animais.

5 CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido leva às seguintes conclusões:

a) a reação entre o anidrido citracônico e uma anilina forma o respectivo ácido (2Z)-4-anilino-**2-metil**-4-oxobut-2-enóico, (**23**);

b) a reação entre o anidrido itacônico e uma anilina forma o respectivo ácido **2**-(2-anilino-2-oxoetil)acrílico, (**27**);

c) os ácidos *N*-fenilmaleâmicos são tóxicos às larvas de *Artemia salina* e, segundo o método manual de Topliss, compostos com substituintes nas posições 3 e ou 5 do anel (3-Cl; 3-CH₃; 3-OCH₃; 3-N(CH₃)₂; 3-CF₃; 3,5-Cl₂) possivelmente devam ser mais tóxicos que a série testada (hipótese que deverá ser comprovada com síntese e ensaios com a nova série);

d) os ácidos *N*-fenilcitraconâmicos são tóxicos às larvas de *Artemia salina* e, segundo o método manual de Topliss, (assim como no caso dos ácidos *N*-fenilmaleâmicos) compostos com substituintes nas posições 3 e ou 5 do anel (3-Cl; 3-CH₃; 3-OCH₃; 3-N(CH₃)₂; 3-CF₃; 3,5-Cl₂) possivelmente devam ser mais tóxicos que a série testada (hipótese que deverá ser comprovada com síntese e ensaios com a nova série);

e) os ácidos *N*-fenilitaconâmicos não são tóxicos às larvas de *Artemia salina*;

f) os ácidos *N*-fenilsuccinâmicos são pouco tóxicos às larvas de *Artemia salina* e, segundo o método manual de Topliss, substituintes com alto valor da combinação paramétrica $2\pi - \sigma$ possivelmente devam ser mais tóxicos

que a série testada (hipótese que deverá ser comprovada com síntese e ensaios com a nova série);

g) os ácidos *N*-fenilftalâmicos possuem toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, porém não se pôde verificar a relação estrutura atividade por falta de dados;

h) a toxicidade às larvas de *Artemia salina* pode depender da presença do sistema alfa-beta insaturado $R-C=C-CONHR'$ na molécula.

i) as *N*-fenilcitraconimidas e os ácidos *N*-fenilcitraconâmicos possuem potente efeito analgésico, provavelmente por diferentes mecanismos de ação;

j) as *N*-fenilcitraconimidas produzem potente efeito antiinflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001 HARGREAVES, M. K.; PRITCHARD, J. G.; DAVE, H. R. Cyclic carboxylic monoimides. **Chemical Reviews**, v. 70, n. 4, p. 439-468, 1970.
- 002 FLAIH, N.; PHAM-HUY, C.; GALONS, H. An Expeditious Synthesis of Cyclic Imides. **Tetrahedron Lett.**, v. 40, p. 3697-3698, 1999.
- 003 LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quím. Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.
- 004 PALUCHOWSKA, M. H.; MOKROSZ, M. J.; BOJARSKI, A.; WESOLOWSKA, A.; BORYCZ, J.; CHARAKCHIEVA-MINOL, S.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E. On the Bioactive Conformation of NAN-190 AND MP3022, 5-HT_{1A} Receptor Antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 4952-4960, 1999.
- 005 OBNISKA, J.; ZEJC, A.; KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J. Synthesis, Physicochemical and Anticonvulsant Properties of New *N*-Pyridyl Derivatives of 3-Phenyl- and 3,3-Diphenyl-succinimides. **II Farmaco**, v. 54, p. 423-429, 1999.
- 006 STRATFORD, E. S.; CURLEY JR, R. W. Synthesis of Aminomethyl-Substituted Cyclic Imide Derivatives for Evaluation as Anticonvulsivants. **J. Med. Chem.**, v. 26, p. 1463-1469, 1983.
- 007 VOORSTAD, P. J.; CHAPMAN, J. M.; COCOLAS, G. H.; WYRICK, S. D.; HALL, I. H. Comparison of the Hypolipidemic Activity of Cyclic vs. Acyclic Imides. **J. Med. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 9-12, 1985.
- 008 KALGUTKAR, A. S.; CREWS, B. C.; MARNETT, L. J. Design, Synthesis, and Biochemical Evaluation of *N*-Substituted Maleimides as Inhibitors of Prostaglandin Endoperoxide Synthases. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 1692-1703, 1996.
- 009 BELLACK, E.; DeWITT, J. B. Rodent Repellents: Preparation and Properties of Thiouronium Compounds and Cyclic Imides. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 2, n. 23, p. 1176-1179, nov., 1954.
- 010 CLOUGH, F. W.; EARL, R. A.; TOWNSEND, L. B. Investigations on the Chemical Reactivity of Citraconimide as a Model Compound for the Nucleoside Antibiotic Showdomycin. **Utah Academy Proceedings**, v. 53, Part 2, p. 55-56, 1976.
- 011 SOONG C.-L.; OGAWA, J. SUKIMAN, H.; PRANA, T.; PRANA, M. S.; SHIMIZU, S. Distribution of cyclic imide-transforming activity in

- microorganisms. *FEMS Microb. Let.*, v. 158, p. 51-55, 1998.
- 012 CECHINEL-FILHO, V.; DE CAMPOS, F.; CORRÊA, R. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Quím. Nova*, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.
- 013 KOECHEL, D. A.; TARLOFF, J. B.; RANKIN, G. O. Acute effects of alkylating agents on canine renal function: specifically designed synthetic maleimidas. *J. Med. Chem.*, v. 26, n. 1, p. 85-90, 1983.
- 014 CECHINEL-FILHO, V.; CORRÊA, R.; VAZ, Z.; CALIXTO, J. B.; NUNES, R. J.; PINHEIRO, T. R.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. *II Farmaco*, v. 53, p. 55-57, 1998.
- 015 STIZ, D. S.; SOUZA, M. M.; GOLIM, V.; NETTO, R. A. E.; CORRÊA, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of *N*-aryl-glutaramic acids and *N*-aryl-glutarimides. *Pharmazie*, v. 55, n. 12, p. 1-3, 2000
- 016 DE NARDO, M.; RUNTI, C.; VIO, L. Studies on chemical structure and sweet taste. Note XIII. L-Acylamidossuccinilic acid derivatives. *Farmaco, Ed. Sci.*, v. 31, n. 12, p.906-916, 1976.
- 017 MAILLAIRD, M.; HOM, C.; GAILUNAS, A.; JAGODZINSKA, B.; FANG, L. Y.; JOHN, V.; FRESKOS, J. N.; PULLEY, S. R.; SHON, R.; BECK, J. P.; TENBRINK, R. E. Elan Pharmaceuticals, Inc., USA; Pharmacia + Upjohn Company. **Preparation of substituted amines to treat Alzheimer's disease.** A2. WO2002002512. 10 jan. 2002, 29 jun. 2001. PCT Int. Appl. 651 pp.
- 018 WU, J.; JAY, S.; THORSETT, E. D.; PLEISS, M. A.; NISSEN, J. S.; NEITZ, J.; LATIMER, L. H.; FREEDMAN, S.; BRITTON, T. C.; AUDIA, J. E.; REEL J. K.; MABRY, T. E.; DRESSMAN, B. A.; CWI, C. L.; DROSTE, J. J.; HENRY, S. S.; MCDANIEL, S. L.; SCOTT, W. L.; STUCKY, R. D.; PORTER, W. J. Athena Neurosciences, Inc., USA; Eli Lilly & Co. **Preparation of cycloalkyl, lactam, lactone and related compounds for inhibiting amyloid peptide release and/or its synthesis.** A2. WO9828268. 02 jul. 1998, 22 dez. 1997. PCT Int. Appl. 889 pp.
- 019 OMUARU, V. O. T. Reactions of cyclic anhydrides with aromatic primary amines: Part 3. Synthesis of novel 3-(*N*-arylcarbamoil)- and 3-(*N*-naphthylcarbamoil)carboxylic acids. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, v. 37B, n. 8, p. 814-816, 1998.
- 020 BURDULIENE, D.; STUMBREVICIUTE, Z.; TALIKITE, Z.; VLADYKO, G. V.; BOREKO, E. I.; KOROBCHENKO, L. V. Synthesis and antiviral activity of *N*-aryl-and *N*-heterylsuccinamino acids and their salts with 2-amino-2-thiazoline. *Khim.-Farm. Zh.*, v. 30, n. 11, p. 17-18, 1996.

- 021 HASSAN, H. M.; KORA, F. A.; EL-NAGGAR, A. M.; ABDEL-MAGGED, T. T. Synthesis of some amino acid and derivatives with expected antimicrobial activity. *Al-Azhar J. Pharm. Sci.*, v. 21, p. 133-141, 1998.
- 022 LINFIELD, W. M.; MICICH, T. J.; MONTVILLE, T. J.; SIMON, J. R.; MURRAY, E. B.; BISTLINE, R. G. Antibacterially active substituted anilides of carboxylic and sulfonic acids. *J. Med. Chem.*, v. 26, n. 12, p. 1741-1746, 1983.
- 023 HALLINGER, S.; ZIEGLER, W.; WALLNOEFER, P. R.; ENGELHARDT, G. Levels of 3,4-dichloroaniline in white rot fungal cultures. *Chemosphere*, v. 17, n. 3, p. 543-550, 1988.
- 024 KLISENKO, M. A.; PAN'SHINA, T. N. Transformation of pesticides in animals – halo-substituted anilides of carboxylic acids. In: Mezhdunar. Simp. Stran-Chlenov SEV, 10th, 1975, Kiev.
- 025 RASHID, K. A.; ARJMAND, M.; SANDERMANN, H.; MUMMA, R. O. Mutagenicity of chloroaniline/lignin metabolites in the Salmonella/microsome assay. *J. Environ. Sci. Health, Part B*, v. B22, n. 6, p. 721-729, 1987.
- 026 WU, Y.; CAI, C. Y.; GONG, K. S. Synthesis of *N*-(4-substituted amino-4-oxobutyryl)-*N*-substituted glycines. *Yaoxue Xuebao*, v. 27, n. 9, p. 717-720, 1992.
- 027 CAHN, J.; WERMUTH, C. G. SOCIBRE. **Antiinflammatory Phthalic acid amides**. A2. FR2102170. 12 maio 1972, 11 ago. 1970. Fr. Demande. 16 pp.
- 028 CAHN, J.; WERMUTH, C. G.; ROTTENBERG, E. Socibre; Nanterre. **Antiinflammatory phthalic acid monoamides**. A. DE 2040578. 25 fev. 1971, 14 ago. 1970. Ger. Offen. 28 pp.
- 029 RAVINDAR, V.; LINGAIAH, P. Effect of amide group ligands and their metal complexes on pathogenic fungi. *Curr. Sci.*, v. 53, n. 19, p. 1032-1034, 1984.
- 030 PERRON, Y. G.; MINOR, W. F.; CRAST, L. B.; GOUREVITCH, A.; LEIN, J. CHENEY, L. C. Derivatives of 6-Aminopenicillanic Acid. III. Reactions with *N*-Substituted Phthalamic Acids. *J. Med. Chem.*, v. 5, n. 5, p. 1016-1025, 1962.
- 031 SENA, V. L. M.; SRIVASTAVA, R. M.; OLIVEIRA, S. P.; LIMA, V. L. M. Microwave assisted synthesis of *N*-Arylphthalamic acids with hyperlipidemic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 20, p. 2671-2674, 2001.
- 032 OMUARU, V. O. T.; BOISA, N.; OBUZOR, G. U. Reaction of Cyclic Anhydrides with Aromatic Amines: Part I – Synthesis of Anilinic Acids from Phthalic Anhydride. *Indian J. Chem.*, v. 37B, p. 704-706, July, 1998.

- 033 PFEIFER, G.; NADASY, M.; TELEKY, A.; SELYEM, J.; GESZTELYI NAGY, A. **Pesticides containing *N*-arylphthalamic acids as active agent.** A2. HU39402. 29 set. 1986, 04 out. 1984. Hung. Teljes. 7 pp.
- 034 VASSILEV, G.; PETKOVA, V.; GENCHEV, S. On the effectivity of some compounds and their combinations on the increasing of the early ripening and yield at hot-house tomatoes. *Rastenievud. Nauki*, v. 37, n. 4, p. 238-243, 2000.
- 035 BESAN, J. Enhancement of fruit set with Nevirol 60 WP, a new regulator for improving yields. *Hung. Agrochemia (Bratislava)*, v. 28, n. 1, p. 24-25, 1988.
- 036 SINHA, A. K.; NIZAMUDDIN, S. Morphanthridines: part II – synthesis of 5,6-dihydro-6,11-dioxomorphanthridine, 1(or 2)-substituted 6,11-dioxo-dihydromorphanthridines and 7H-12,13-dihydro-7,12-dioxobenzo(e)naphtha[1,2]azepine. *Indian J. Chem., Sect. B*, v. 23B, n. 1, p. 85-86, 1984.
- 037 ZUBAL, P.; DROBNY, J. Utilization of growth regulators in seed production of white clover (*Trifolium repens*). *Rostl. Vyroba*, v. 41, n. 4, p. 169-174, 1995.
- 038 VORLICEK, Z. Possibilities of influencing the red clover seed formation by application of morphoregulators and microelements. *Rostl. Vyroba*, v. 38, n. 5, p. 387-393, 1992.
- 039 LEE, S. H.; DO, U. H. Plant-growth-regulating effect of phthalamic acid and its derivatives. *Sikmul Poho*, v. 8, p. 11-18, 1969.
- 040 BOLLINGER, F. G.; D'AMICO, J. J.; HANSEN, D. J. Monsanto Co., U.S. **Use of phthalanilic acids to regulate the growth of corn plants.** A. US4108632. 22 ago. 1978, 22 dez. 1976. U.S. 4 pp.
- 041 BENE, L. Application of regulators to increase the biological value of sugar beet seeds. *Hung. Cukoripar*, v. 44, n. 3, p. 81-83, 1991.
- 042 LANE, J. R.; GULLSTROM, D. K.; NEWELL, J. E. Determination of *N*-*m*-Tolyl Phthalamic Acid Residues in Food Crops. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 6, n. 10, p. 753-754, 1958.
- 043 MCLAGGAN, D.; RUFINO, H.; JASPARS, M.; BOOTH, I. R. Glutathione-dependent conversion of *N*-ethylmaleimide to the maleamic acid by *Escherichia coli*: a intracellular detoxification process. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n. 4, p. 1393-1399, 2000.
- 044 RYABCHENKO, N. I.; PROSKURYAKOV, S. Ya.; PETROVA, K. M.; RYABCHENKO, V. I.; TROFIMOV, F. A. Radiosensitizing activity of maleic acid derivatives. Effect of *o*-nitroanillide, anillide, and diethyl ester of maleic acid on the survival rate of *Escherichia coli* B/r cells. *Radiobiologiya*, v. 25,

- n. 6, p. 795-798, 1985.
- 045 BOBKOVA, T. S.; ZLOCHEVSKAYA, I. V.; CHEKUNOVA, L. N.; ANUFRIEV, E. K.; LL'ICHEV, I. E. Antifungal and antibacterial effect of maleamic acids. ***Biol. Nauki (Moscow)***, v. 20, n. 1, p. 112-115, 1977.
- 046 Mitsui Toatsu Chemicals, Inc., Japan. **Antifouling coating materials for fish nets**. A2. JP57102966. 26 jun. 1982, 18 dez. 1980. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 7 pp.
- 047 SOKOLOV, L. B. *et al.* Synthesis of some derivatives of 6-aminopenicillanic acid based on *N*-substituted maleic acid monoamides. ***Khim.-Farm. Zh.***, v. 10, n. 3, p. 50-53, 1976.
- 048 KOLOTOVA, N. V.; KOZ'MINYKH, V. O.; DOLBILKINA, E. V.; KOZ'MINYKH, E. N.; YUSHKOV, V. V.; YUSHKOVA, T. A. Substituted amides and hydrazides of maleic acid. 5. Synthesis and anti-flavivirus activity of some hydrazides and amides of maleic acid. ***Khim.-Farm. Zh.***, v. 31, n. 11, p. 17-19, 1997.
- 049 ELORRIAGA, C.; FERNANDEZ-ALVAREZ, E.; NIETO LOPEZ, O. Enzymic inhibitors. XXI. Preparation of some *N*-(hydroxyaryl)maleimides and – isomaleimides and related compounds as potential inhibitors of catechol-*o*-methyltransferase. ***An. Quim.***, v. 75, n. 5, p. 317-322, 1979.
- 050 LIU, K. –C.; CHEN, T. –B.; JAN, H. –J.; SHIH, C. –Y. Synthesis on *N*-substituted maleamic acids as potential hypocholesteremics. ***J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)***, v. 20, n. 3, p. 163-169, 1973.
- 051 YEN, M. S.; CHOW, S. Y. Effect of nitrogen-containing derivatives of 1,4-dicarboxylic acids on plasma cholesterol concentration in rats. ***Chung-Hua I Hsueh Chi (Taipei)***, v. 22, n. 4, p. 237-241, 1975.
- 052 RUBIN, B.; KIRINO, O.; CASIDA, J. E. Chemistry and action of *N*-phenylmaleamic acids and their progenitors as selective herbicide antidotes. ***J. Agric. Food Chem.***, v. 33, n. 3, p. 489-494, 1985.
- 053 ROTH, M., Ciba-Geigy A.-G., Switz. **Plant growth regulator**. A1. DE2650557. 12 maio 1977, 04 nov. 1976. Ger. Offen. 20 pp.
- 054 Veverka, Miroslav. (Czech.). **New derivatives of 2-methylenebutanedioic acid, useful as fungicides, and method of their preparation**. B1. CS274008. 11 abr. 1991, 27 jun. 1988. Czech.. 7 pp.
- 055 KARANOV, E.; GRAESER, H.; GAITANDZHIEV, S.; KIRILOVA-ZHELYAZKOVA, Z. **Herbicidal activity and chemical structure of some substituted itaconic acid anilides**. Inst. Plant. Physiol., Sofia, Bulg. Editor(s): Schuette, H. R. Wirkungsmech. Herbiz, Synth. Wachstumsregul., [Ber. Symp. Wiss. Koordinierungskonf.], 12th (1979), 76-83. Publisher: Fischer, Jena, Ger. Dem. Rep CODEN: 43QGA3 Conference written in

German.

- 056 DISDIER, A.; BORROD, G.; TRINH, S. Rhone-Poulenc Agrochimie, Fr.. **Plant-growth regulating containing as an active agent 2-methylene-succinamic acid derivatives and derivatives of this acid useful in these compositions**. A2. EP34556. 26 ago. 1981, 17 fev. 1981. Eur. Pat. Appl. 31 pp.
- 057 TOPLISS, J. G. A Manual Method for Applying the Hansch Approach to Drug Design. **J. Med. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 463-469, 1977.
- 058 LIWSCHITZ, Y.; ZILKHA, A.; AMIEL, Y. Synthesis of Aspartic Acid Derivatives. I. Some *N*-Acetyl-*N*-benzyl Derivatives of *dl*-Aspartic Acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 78, n. 13, p. 3067-3072, July, 1956.
- 059 MEHTA, N. B.; PHILLIPS, A. P.; FLORENCE FU, L.; BROOKS, R. E. Maleamic and Citraconamic Acids, Methyl Esters, and Imides. **J. Org. Chem.**, v. 25, p. 1012-1015, jun., 1960.
- 060 KIRBY, A. J.; LANCASTER, P. W. Structure and Efficiency in Intramolecular and Enzymic Catalysis. Catalysis of Amide Hydrolysis by the Carboxy-group of Substituted Maleamic Acids. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 1206-1214, 1972.
- 061 BAYDAR, A. E.; BOYD, G. V. The Action of Amines on Citraconic Anhydride. X-Ray Crystal Structure of (*Z*)-2-Methyl-3-pyrrolidinocarbonylpropenoic Acid. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 2890-2894, 1981.
- 062 PYRIADI, T. M.; FRAIH, M. Synthesis and Polymerization of *N*-Arylitaconimides: Free Radically and Anionically. **J. Macromol. Sci. Chem.**, v. A18, n. 2, p. 159-172, 1982.
- 063 DOMINGUEZ, E.; LABORRA, C.; LINAZA, A.; MADOZ, A.; KATIME, I. A. A Series of Mono and Diesters of Itaconic Acid: Synthesis and Structural Determination. **Monatsh. Chem.**, v. 120, p. 743-748, 1989.
- 064 OISHI, T.; NAGAI, K.; KAWAMOTO, T. TSUTSUMI, H. Synthesis and polymerization of *N*-[4-(cholesteroxycarbonyl)phenyl]itaconimide. **Polymer**, v. 37, n. 14, p. 3131-3139, 1996.
- 065 OISHI, T.; KAWAMOTO, T. Synthesis and Polymerization of Optically Active *N*-[4-*N'*-(α -Methylbenzyl)aminocarbonylphenyl]itaconimide. **Polym. J.**, v. 26, n. 8, p. 920-929, 1994.
- 066 OISHI, T.; KAWAMOTO, T.; TSUTSUMI, H. Synthesis and Polymerization of Optically Active Itaconamate Bearing an (*R*)- α -Methylbenzyl Group. **Polymer**, v. 37, n. 24, p. 5513-5520, 1996.

- 067 CORRIE, J. E. T.; MOORE, M. H.; WILSON, G. D. Product Diversity in Cyclisations of Maleamic Acids: the Imide-Isoimide Dichotomy. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 777-781, 1996.
- 068 GUNATILLEKA, A. D.; POOLE, C. F. Models for estimating the non-specific toxicity of organic compounds in short-term bioassays. **Analyst**, v. 125, n. 1, p. 127-132, 1999.
- 069 MARTINEZ, J. L.; TORRES, R.; MORALES, M. A. Hypotensive effect of o-methylisothalicberine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from berberis chilensis on normotensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p. 246-248, May, 1997.
- 070 HANSEN, K.; HANSEN, K.; ADSERSEN, A.; CHRISTENSEN, S. B.; JENSEN, S. R.; NYMAN, U.; SMITT, U. W. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ace) inhibitor from olea europaea and olea lancea. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p.319-325, Mar., 1996.
- 071 LABBE, C.; CASTILLO, M.; CONNOLLY, J. D. Mono and sesquiterpenoids from satureja-gilliesii. **Phytochemistry**, v. 34, n. 2, p. 441-444, Sep., 1993.
- 072 SCHMIDT, R.; ZAJKOWSKI, P.; WINK, J. Toxicity of fusarium sambucinum fuckel sensu lato to brine shrimp. **Mycopathologia**, v. 129, n. 3, p. 173-175, 1995.
- 073 DEMIREZER, L. O.; KURUUZUM, A. Determination of the cytotoxicity of rumex crispus during the vegetation period using a brine shrimp bioassay. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 50, n. 5-6, p. 461-462, May-Jun. 1995.
- 074 OJALA, T. VUORELA, P.; KIVIRANTA, J.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. A bioassay using Artemia salina for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 715- 718, Dec., 1999.
- 075 SAMARAS, P.; SAKELLAROPOULOS, G. P.; KUNGOLOS, A.; DERMISSEI, S. Toxicity assessment assays in Greece. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 7, n. 7A-8A , p. 623-630, Nov-Dec., 1998.
- 076 VEZIE, C.; SIVONEN, K.; BRIENT, L.; BERTRU, G.; LEFEUVRE, J. C. Development of toxic cyanobacteria in western france - detection of toxicity with artemia salina tests. **Annales de Limnologie**, v. 32, n. 2, p. 123-128, 1996.
- 077 ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DEOLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-trypanosoma cruzi activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, Jul., 1995.
- 078 SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. A microwell cytotoxicity assay using artemia-salina

- (brine shrimp). *Planta Medica*, v. 59, n. 3, p. 250-252, Jun., 1993.
- 079 KAHLOS, K.; KIVIRANTA, J. L. J.; HILTUNEN, R. V. K. Volatile constituents of wild and in vitro cultivated gloeophyllum odoratum. *Phytochemistry*, v. 36, n. 4, p. 917-922, Jul., 1994.
- 080 KIVIRANTA, J.; ABDELHAMEED, A. Toxicity of the blue-green alga *oscillatoria-agardhii* to the mosquito *aedes-aegypti* and the shrimp *artemia-salina*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 517-520, Sep., 1994.
- 081 SALO, M.; KIVIRANTA, J.; KNUUTILA, V.; KANGAS, L.; VUORELA, H. Biological activity and enzymatic hydrolysis of retinoates in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 2, p. 71-76, Apr., 1995.
- 082 MOUSA, O.; VUORELA, P.; KIVIRANTA, J.; WAHAB, S. A.; HILTUNEN, R.; VUORELA, H. Bioactivity of certain egyptian ficus species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 41, n. 1-2, p. 71-76, Jan., 1994.
- 083 WOO, M. H.; KIM, D. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Asitrilobins A and B: cytotoxic mono-THF annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. *Phytochemistry*, v. 50, n. 6, Mar., 1999.
- 084 CHAVEZ, D.; MATA, R. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*, v. 50, n. 5, p. 823-828, Mar., 1999.
- 085 LIU, X. X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry*, v. 50, n. 5, p. 815-821, Mar., 1999.
- 086 DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, v. 4, p. 161-174, 1977.
- 087 HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, p. 103-114, 1987.
- 088 PORRO C. A.; TASSINARI, G.; FACCHINETTI, F.; PANERAI, A. E.; CARLI, G. Central beta-endorphin system involvement in the reaction to acute tonic pain. *Exp. Brain Res.*, v. 83, p. 549-554, 1991.
- 089 FASMER, O. B.; BERGE, O. -G.; HOLE, K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests. *Neuropharmacology*, v. 24, p. 729-734, 1985.
- 090 FASMER, O. B.; BERGE, O. -G.; TVEITEN, L.; HOLE, K. Changes in nociception after 6-hydroxydopamine lesions of descending catecholaminergic pathways in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v. 24,

- p. 1441-1444, 1986.
- 091 TJØLSEN, A.; LUND, A.; BERG, O. –G.; HOLE, K. Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on the spinal serotonergic systems. **Eur. J. Pharmacol.** v. 193, p. 193-201, 1991.
- 092 HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- 093 HUNSKAAR, S.; BERGE, O. –G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.
- 094 HUNSKAAR, S. BERGE, O. –G.; HOLE, K. Orphenadrine citrate increases and prolongs the antinociceptive effects of paracetamol in mice. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 59, p. 53-59, 1986b.
- 095 ROSLAND J. H.; TJØLSEN, A.; MÆHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice – effects of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.
- 096 LI T.-S.; LI A.-X.; Montmorillonite clay catalysis. Part 10. K-10 and KSF-catalysed acylation of alcohols, phenols, thiols and amines: scope and limitation. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.1**, p. 1913-1917, 1998.
- 097 SINGH, H.; RASTOGI, S. Organic Reactions in Eutetic Melts: Part I – Acylation of Aromatic Amines with Succinic Anhydride & Phthalic Anhydride. **Indian J. Chem.**, v. 14B, p. 809-811, oct., 1976.
- 098 RODERICK, W. R.; BHATIA, P. L. Action of Trifluoroacetic Anhydride on *N*-Substituted Amic Acids. **J. Org. Chem.**, v. 28, p. 2018-2024, aug., 1963.
- 099 ANDRADE, E. S. **Síntese e estudo de correlação estrutura-atividade de benzenossulfonilaziridinas**. 2000. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 100 TRUJILLO-FERRARA, J.; SANTILLAN, R.; BELTRÁN, H. I.; FARFÁN, N.; HÖPFL, H. ¹H and ¹³C NMR spectra for a series of arylmaleamic acids, arylmaleimides, arylsuccinamic acids and arylsuccinimides. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 682-686, 1999.
- 101 ISMAIL, M. F. *et al.* Reaction of *N*-Arylcitraconisoimidium Perchlorates with Aromatic Hydrocarbons Under Friedel-Crafts' Conditions, a New and Convenient One-Step Method for the Synthesis of β-Aroyl-α-arylbutyramides. **Synt. Comm.**, v. 26, n. 6, p. 1223-1231, 1996.
- 102 SELVA, A.; TRADIDI, P.; VENTURA, P.; SERVADIO, V. Íon Chemistry of phthalamic acids. 2. Mass spectral retrosynthesis of phthalamic acids and structure analysis of [C₈H₆NO₂]⁺ ions from *N*-cyclohexylphthalamic acid

- and [MH]⁺ of *N*-cyclohexylphthalimide. **Org. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 7, p. 278-281, 1983.
- 103 HEBENBROCK, K.-F. Herstellung und Reaktionen von 1-Aryl-3-hydroxy-3-methyl-2,5-pyrrolidindionen. **Justus Liebigs Ann. Chem.**, p. 320-336, 1978.
- 104 ANSCHÜTZ, R.; SCHARFENBERG, O.; HAAS, F.; TRUMMEL, P. History of the isomerism of fumaric and maleic acids. **Liebigs Ann. Chem.**, v. 461, p. 155-191, 1928.
- 105 PIUTTI, A. Maleic and Fumaric Derivatives of *p*-Aminophenols. **Gazz. Chim. Ital.**, v. 40, p. 1529, 1910.
- 106 WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 35-44, 1991.
- 107 PORRO, C. A.; FACCHINETTI, F.; POZZO, P.; BENASSI, C.; BRAL, G. P.; GENAZZANI, A. R. Tonic pain time-dependently affects beta-endorphin-like immunoreactivity in the ventral periaqueductal gray matter of the rat brain. **Neurosci. Lett.**, v. 86, p. 89-93, 1988.
- 108 PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 3. ed., São Paulo: Pergamon, 1988, 392 p.
- 109 US Environmental Protection Agency, 1985. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**. W. H. Peltier and C. I. Weber (eds), EPA – 600 / 4-85-013. 216 pp.