

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese e Avaliação Farmacológica de Kavalactonas e Análogos, Candidatos a
Protótipos de Fármacos Ansiolíticos**

Thiago de Souza Claudino

Porto Alegre, Setembro de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese e Avaliação Farmacológica de Kavalactonas e Análogos, Candidatos a
Protótipos de Fármacos Ansiolíticos**

Dissertação apresentada por Thiago
de Souza Claudino para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Eifler-Lima

Co-Orientadora: Profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, Setembro de 2009.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.09.09 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Ionara Rodrigues Siqueira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Flavia De Toni Uchôa
Universidade Federal de Pernambuco

C615s Claudino, Thiago de Souza
Síntese e avaliação farmacológica de kavalactonas e análogos, candidatos a protótipos de fármacos ansiolíticos / Thiago de Souza Claudino – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xiv, 109 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Kavalactonas. 2. Kava-kava. 3. Piper methysticum. 4. Ansiolíticos. 5. Síntese orgânica. I. Lima, Vera Lucia Eifler. II. Rates, Stela Maris Kuze. III. Título.

CDU: 547.05

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Agradecimentos a CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios de Síntese Orgânica Medicinal e de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia dessa Universidade, aonde este trabalho foi executado.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vera Lucia Eifler-Lima, orientadora deste trabalho, pela supervisão e ensinamentos desde o meu início na pesquisa em síntese orgânica, durante a iniciação científica.

À Profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates, co-orientadora deste trabalho, pelos ensinamentos e pelo incentivo a um sintético para que ele compreenda cada vez mais o mundo da Farmacologia.

Ao Prof. Dr. François Noël, pela colaboração ao disponibilizar o Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para a realização dos ensaios de radioligação. Ao Prof. Eduardo Rolim de Oliveira, por disponibilizar o Laboratório de Síntese Orgânica e Controle Estereoquímico, desta Universidade, para a realização de experimentos necessários a este trabalho.

Aos colegas, ex-colegas e amigos do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal: Cedric, Guilherme, Madson, Mônica, Patrícia, Rômulo, Stela e Taciana, pelo coleguismo, troca de experiências e de conhecimentos. Em especial, agradeço à Daiane, minha “escrava preferida”, cuja competência foi essencial para este trabalho e com certeza fará dela uma excelente profissional na área em que abraçar.

Aos colegas, ex-colegas e amigos do Laboratório de Psicofarmacologia: Ana Cristina, Andressa, Diego, Eveline, Fernanda, Gilda, Gustavo, Luisa G. e Luisa W., pelo companheirismo, apoio, ajuda e ensinamentos em uma área nova para mim. Agradecimentos especiais à Andresa, que arranhou tempo entre seus experimentos para realizar os ensaios de radioligação, e à Luisa Salles, por se disponibilizar a ensinar os ensaios farmacológicos e pelo companheirismo nas nossas longas conversas sobre os problemas que apareciam com as kavalactonas e com os extratos de valeriana no *plus maze*.

Às técnicas Rose e Maristela, cuja dedicação aos seus trabalhos foi muito importante para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, por torcerem pelo meu sucesso. Em especial, aos amigos da AFARGS, por utilizarem dos laços de amizade em prol de uma causa maior.

A minha família, em especial, meus pais, pelo apoio e torcida pelo meu sucesso profissional.

RESUMO

A diversidade química dos produtos naturais é utilizada atualmente no planejamento de fármacos. A kava-kava (*Piper methysticum* Forst) é uma planta que possui diversos efeitos farmacológicos, principalmente ansiolíticos, sendo estes atribuídos à presença de kavalactonas. O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese de kavalactonas e análogos e submetê-los a uma triagem farmacológica para identificação de candidatos a protótipos de fármacos ansiolíticos. Através de uma reação de condensação aldólica foram obtidos três análogos do tipo 4-hidroxi- δ -valerolactona, com rendimentos de 70 a 90%. Estes foram submetidos a uma reação de *O*-metilação, gerando duas kavalactonas e um análogo do tipo aril- α -pirona, com rendimentos de 68 a 86%. Estudos para a obtenção de análogos substituídos do cinamaldeído, para posterior emprego na síntese de análogos da kavaína, foram realizados, sem sucesso, empregando-se condensação aldólica e reações de redução e oxidação. Das substâncias sintetizadas, quatro delas foram submetidas ao modelo do labirinto em cruz elevado, na dose de 30 mg/kg i.p.: LaSOM 1 (análogo não *O*-metilado da kavaína), LaSOM 29 (kavaína), LaSOM 40 (análogo da kavaína sem grupo etileno unindo os anéis) e LaSOM 76 (diidro-kavaína). LaSOM 76 aumentou o número de entradas e tempo de permanência no braço aberto, enquanto LaSOM 1 reduziu o número de entradas no braço fechado e aumentou o tempo de permanência no braço aberto. LaSOM 1 e LaSOM 76 não alteraram a atividade locomotora espontânea. LaSOM 76 não alterou a latência e duração do sono induzidos por pentobarbital, enquanto dados anteriores do laboratório demonstraram que LaSOM 1 reduziu a latência. Nenhum das quatro substâncias (10 – 100 μ M) inibiu a ligação de [³H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. Concluiu-se que os métodos empregados para a síntese das lactonas planejadas foi adequado, porém não foi possível realizar a síntese de análogos do cinamaldeído. LaSOM 76 apresentou efeito do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, sem apresentar efeito hipnótico-sedativo. LaSOM 1 parece ter um efeito ansiolítico menos evidente. Os efeitos observados não são mediados pela ligação ao sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A.

Palavras-chave: kavalactonas, kavaína, diidro-kavaína, síntese orgânica, labirinto em cruz elevado, ansiolíticos.

ABSTRACT

Synthesis and Pharmacological Evaluation of Kavalactones and Analogous, the Candidate Prototype Anxiolytic Drugs

The chemical diversity of natural products is currently used in drug design. Kava-kava (*Piper methysticum* Forst) has several pharmacological effects, especially anxiolytic-like effects, which are attributed to the presence of kavalactones. The aim of this work was the synthesis and pharmacological evaluation of kavalactones and analogues in order to identify new candidates to prototypes of anxiolytic drugs. Three similar type 4-hydroxy-d-valerolactones were obtained, through an aldol condensation reaction, with yields of 70 to 90%. These lactones were subjected to a reaction of O-methylation, with yields of 68 to 86%. Studies to obtain analogues of substituted cinnamaldehyde, for later use in the synthesis of kavain were made, without success, using the aldol condensation and reduction reactions and oxidation. LaSOM 1, LaSOM 29, LaSOM 40 and LaSOM 76 (30 mg/kg, i.p.) were evaluated in the elevated plus-maze, an animal model of anxiety. LaSOM 1 reduce the number of entry in the closed arms and increased the permanence time in the open arms. LaSOM 76 increased the number of entry and permanence time in the open arms. Both molecules did not alter spontaneous locomotor activity. LaSOM 76 did not alter the latency and duration of sleep induced by pentobarbital while previous studies from our group demonstrated that LaSOM 1 induce a latency reduction. None of the four substances (10 – 100 μ M) inhibited the binding of [³H]-flunitrazepam in rats cortex synaptosomal membranes. In conclusion, the methods employed for the synthesis of lactones planned was adequate, but could not perform the synthesis of analogues of cinnamaldehyde. LaSOM 76 (dihydrokawain) showed an anxiolytic effect without inducing hypnotic-sedative effects. LaSOM 1 seems to have a discrete anxiolytic effect. These effects are not mediated by action on the benzodiazepine site of GABA_A receptor.

Keywords: kavalactones, kawain, dihydrokawain, organic synthesis, elevated plus maze, anxiolytics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Esqueleto básico presente na estrutura das kavalactonas.	5
Figura 1.2: Kavalactonas majoritárias em <i>Piper methysticum</i> Forst.	5
Figura 1.3: 4-oxo- δ -valerolactonas sintéticas.	6
Figura 1.4: δ -valerolactonas sintéticas análogas à molécula 8.	7
Figura 1.5: Estrutura química dos análogos aril-etileno- α -pirona 21 e 22.	7
Figura 1.6: Derivados kavaína-like sintéticos.	8
Figura 2.1: Estrutura química da diidrokaivaín-5-ol.	33
Figura 2.2: Possibilidades de locais para modificação estrutural nas kavalactonas.	34
Figura 2.3: Planejamento das kavalactonas e análogos.	35
Figura 3.2: Moléculas selecionadas para avaliação farmacológica.	65
Figura 3.3: Labirinto em Cruz Elevado.	67
Figura 3.4: Esquema empregado para avaliação do efeito ansiolítico através do labirinto em cruz elevado.	68
Figura 3.5: Esquema empregado para avaliação do efeito sedativo através do teste de potenciação do sono barbitúrico.	69
Figura 3.6: Teste de Exposição ao Campo Aberto.	70
Figura 3.7: Esquema empregado para avaliação do efeito sobre a atividade locomotora através do teste de exposição ao campo aberto.	71
Figura 3.8: Efeito de LaSOM 1 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos.	73
Figura 3.9: Efeito de LaSOM 1 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais.	74
Figura 3.10: Efeito de LaSOM 29 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos.	74
Figura 3.11: Efeito de LaSOM 29 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais.	75
Figura 3.12: Efeito de LaSOM 40 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos.	75
Figura 3.13: Efeito de LaSOM 40 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais.	76

Figura 3.14: Efeito de LaSOM 76 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos.	77
Figura 3.15: Efeito de LaSOM 76 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais.	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	9
1.2. REFERÊNCIAS.....	10
2. CAPÍTULO I: SÍNTESE DE KAVALACTONAS E ANÁLOGOS.....	13
2.1. INTRODUÇÃO	15
2.1.1. Síntese de kavalactonas	15
2.1.1.1. Síntese de kavalactonas por reação de Reformatski.....	15
2.1.1.2. Síntese de kavalactonas a partir de 4-hidroxi-2-pironas	17
2.1.1.3. Síntese de kavalactonas por reação de hetero Diels Alder	27
2.1.1.4. Síntese por redução catalítica a partir de kavalactonas	29
2.1.1.5. Métodos diversos para síntese de kavalactonas	30
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.2.1. Gênese das kavalactonas e análogos	34
2.2.1. Síntese das lactonas para avaliação farmacológica	36
2.2.2. Obtenção de análogos do cinamaldeído.....	41
2.2.3. Obtenção de bioisómeros das kavalactonas.....	45
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.3.1. Equipamentos e Técnicas.....	46
2.3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	46
2.3.1.2. Espectroscopia no infravermelho.....	46
2.3.2. Procedimento geral para aldolização/lactonização	47
2.3.3. Procedimento geral para O-metilação.....	49
2.3.4. Gerenciamento de resíduos.....	50
2.4. CONCLUSÕES.....	52
2.5. REFERÊNCIAS.....	53
3. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANSIOLÍTICA E HIPNÓTICO-SEDATIVA DE KAVALACTONAS E ANÁLOGOS	59
3.1. INTRODUÇÃO	59
3.1.1. Atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa da kava-kava e das kavalactonas	59
3.1.1.1. Kava-kava, kavalactonas e neurotransmissão GABAérgica	60

3.1.1.2. Kava-kava, kavalactonas e neurotransmissão monoaminérgica.....	62
3.1.1.3. Atividade ansiolítica de outras estirilpironas e diidroestirilpironas	63
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.2.1. Substâncias-teste	65
3.2.2. Ensaio comportamentais	66
3.2.2.1. Animais.....	66
3.2.2.2. Tratamentos	66
3.2.2.3. Labirinto em cruz elevado	67
3.2.2.4. Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	69
3.2.2.5. Avaliação da atividade locomotora espontânea (teste de exposição ao campo aberto)	70
3.2.3. Ensaio de radioligação.....	71
3.2.4. Considerações éticas	72
3.3. RESULTADOS	73
3.3.1. Avaliação da atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa das lactonas sintetizadas.....	73
3.3.1.1. Labirinto em cruz elevado	73
3.3.1.2. Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	78
3.3.1.3. Avaliação da atividade locomotora espontânea (teste de exposição ao campo aberto)	79
3.3.2. Ensaio de radioligação	79
3.4. DISCUSSÃO	81
3.5. CONCLUSÕES	85
3.6. REFERÊNCIAS.....	86
4. CONCLUSÕES	93
5. ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e indígenas foi fundamental na descoberta de substâncias ativas, já que a convivência e o aprendizado com diferentes grupos étnicos trouxeram contribuições para a pesquisa de produtos naturais. A partir do conhecimento da relação entre estrutura química de um composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/insetos-planta, a natureza forneceu modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação entre estrutura química e atividade biológica (REA) e inspiraram a síntese orgânica clássica¹.

A partir de produtos naturais, além de substâncias isoladas por extração, como por exemplo, a morfina, a emetina e a quinina, foram obtidos muitos protótipos úteis para o planejamento de diversos fármacos empregados na terapêutica: ácido acetilsalicílico, anestésicos locais, antimaláricos amino-quinolínicos. Alguns anos após o surgimento do ácido acetilsalicílico, a síntese orgânica passou a ser o método de escolha na busca por substâncias ativas, em detrimento à pesquisa com plantas medicinais^{1,2}.

O processo de descobrimento de fármacos através da síntese ao acaso mostrou uma série de problemas, já que as chances de encontrar um novo fármaco após *screening* diminuía progressivamente. Nas últimas décadas, os químicos medicinais retornaram às pesquisas com produtos naturais, levando à descoberta de muitos fármacos, tanto obtidos por extração a partir de fontes naturais (ciclosporina A, artemisinina, lovastatina, acarbose, paclitaxel) quanto análogos sintéticos de produtos naturais (fluvastatina, docetaxel, topotecan e irinotecan, miglitol)^{1,2}.

Os metabólitos secundários, produzidos como mecanismo de defesa às condições ambientais, adaptativas e regulatórias, caracterizaram as plantas como um enorme laboratório de síntese orgânica, capaz de produzir substâncias com estruturas complexas e/ou enantiomericamente puras³. A diversidade de estruturas moleculares, fundamental na pesquisa por ações em diferentes alvos biológicos, justifica o interesse pela pesquisa em produtos naturais, considerando que a seleção natural, fruto de milhões de anos de evolução biológica, realizou um processo de química combinatória inigualável². Neste contexto, as plantas medicinais podem se tornar uma fonte inesgotável de moléculas inovadoras, cuja diversidade estrutural pode permitir a ação em diferentes alvos biológicos, levando inclusive à descoberta

de novos mecanismos de ação e à obtenção de novos fármacos ou protótipos de fármacos².

Um produto natural utilizado para a obtenção de medicamentos é a espécie vegetal *Piper methysticum* Forst, do gênero *Piperaceae*, típica das ilhas tropicais do Oceano Pacífico (principalmente Indonésia, Melanésia e Polinésia). Conhecida popularmente como kava ou kava-kava, é tradicionalmente utilizada naquela região para o preparo de uma bebida intoxicante, consumida em cerimônias e rituais sociais. Na Austrália, teve seu uso disseminado na década de oitenta, tornando-se droga de abuso devido à ausência de controle ritualístico de seu consumo⁴.

As culturas indígenas da Oceania atribuem à kava-kava um grande poder de cura, utilizando-a para uma série de problemas: gonorréia, lepra, asma, tuberculose, dor de cabeça, enxaqueca, reumatismo, fraqueza física, problemas menstruais e dificuldades de lactação⁴. Embora muitas destas aplicações tenham um caráter folclórico, as propriedades atribuídas à kava-kava instigaram a comunidade científica na pesquisa sobre suas atividades farmacológicas.

Atualmente, atribuem-se à kava-kava diversas atividades farmacológicas: ansiolítica⁵⁻⁸, sedativa^{9,10}, miorelaxante¹¹, anestésica¹², anticonvulsivante^{12,13}, analgésica¹⁴, , espasmolítica¹⁵ e neuroprotetora¹⁶. No Brasil, vinte e oito fitoterápicos a base de kava-kava são registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), indicados para o tratamento da ansiedade¹⁷.

A kava-kava possui uma constituição química bastante diversificada, sendo identificadas mais de quarenta substâncias: kavalactonas, alcalóides, esteróides, chalconas, ácidos e alcoóis de cadeia longa¹⁸. As kavalactonas¹ (também chamadas de kavapironas) são os constituintes majoritários da kava-kava, sendo a elas atribuídas as diferentes atividades biológicas da planta.

As kavalactonas apresentam uma estrutura do tipo aril-etileno- α -pirona (Figura 1.1), sendo as majoritárias do tipo 4-metóxi-2-pirona, com o grupo aril-etileno

¹ Em nosso laboratório, denominam-se kavalactonas (ou kavapironas) as estirilpironas extraídas da kava-kava. Esta denominação é estendida àquelas sintetizadas e serão assim chamadas em todo o manuscrito.

ligado ao carbono da posição 6. Algumas delas apresentam insaturação entre C7 e C8, o que confere isomeria geométrica a estas substâncias. Outro aspecto estrutural a considerar refere-se ao carbono C6, quiral em alguns casos¹⁹.

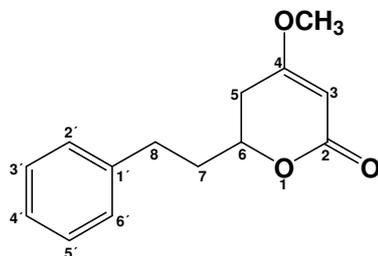


Figura 1.1: Esqueleto básico presente na estrutura das kavalactonas.

Já foram identificadas dezoito kavalactonas na kava-kava²⁰⁻²², sendo consideradas relevantes as seis moléculas presentes em maiores concentrações (Figura 1.2): kavaína (1), diidro-kavaína (2), metisticina (3), diidrometisticina (4), yangonina (5) e desmetoxyyangonina (6).

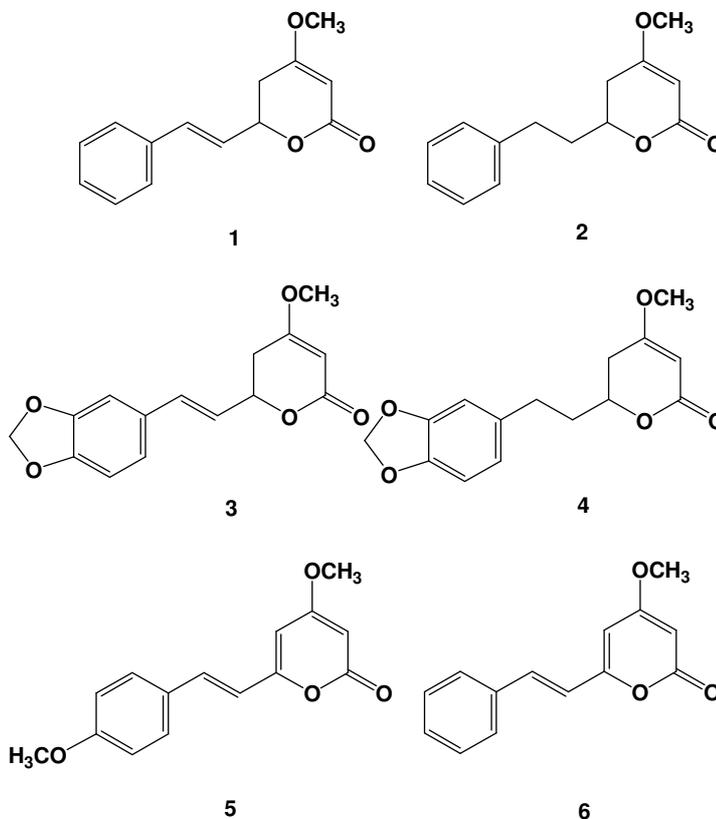


Figura 1.2: Kavalactonas majoritárias em *Piper methysticum* Forst.

Em trabalho realizado em nosso laboratório, foram sintetizadas 4-oxo- δ -valerolactonas estruturalmente semelhantes às kavalactonas (Figura 1.3). Estas mostraram atividade antinociceptiva *in vivo*, no modelo de contorções induzidas por ácido acético em camundongos, superior ao ácido acetilsalicílico e ao paracetamol, na mesma dose, sendo mais potentes aquelas com anel aromático ligado diretamente ao anel lactônico (moléculas **8** e **9**)^{23,24}.

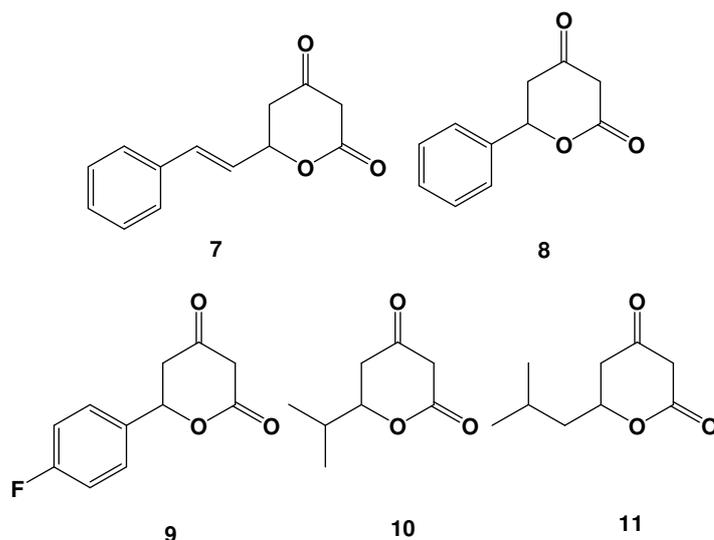


Figura 1.3: 4-oxo- δ -valerolactonas sintéticas.

Estes estudos foram ampliados, avaliando-se a atividade analgésica da kavaína **1** e diversos análogos substituídos da molécula **8** (Figura 1.4), também com o modelo de contorções induzidas por ácido acético. Todas as moléculas testadas apresentaram atividade antinociceptiva, sendo que a molécula **17** mostrou um efeito quatro vezes superior aos observados para o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, e três vezes maior do que para a dipirona²⁵.

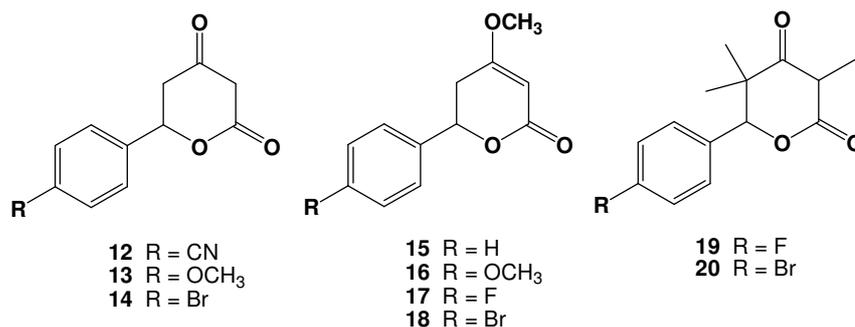


Figura 1.4: δ -valerolactonas sintéticas análogas à molécula **8**.

Visando a investigar uma possível atividade antiinflamatória *in vitro*, a inibição da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) dos análogos aril- α -pirona **8**, **9**, **12**, **13**, **17** e aril-etileno- α -pirona **1**, **3**, **7**, **21** e **22** foi avaliada. As moléculas **3**, **7**, **13** e **22** mostraram uma atividade inibitória, sendo mais pronunciada para **7**²⁵.

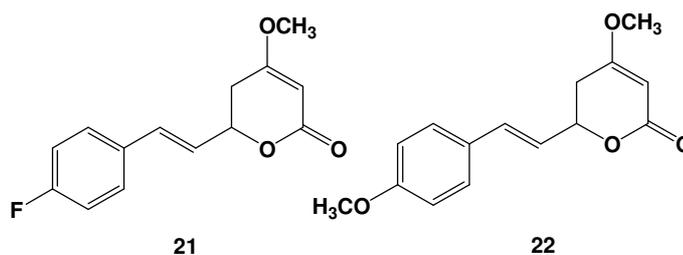


Figura 1.5: Estrutura química dos análogos aril-etileno- α -pirona **21** e **22**.

Continuando nossas investigações, mais recentemente, nosso grupo de pesquisa empregou as reações de Heck e Suzuki-Miyara para a síntese da kavaína **1**, yangonina **5**, desmetoxiyangonina **6** e análogos. Além disto, foram sintetizados derivados kavaína-*like* contendo substituintes em diferentes posições do anel lactônico (Figura 1.6), que foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica *in vitro*. As moléculas **14**, **15**, **22**, **25** e **28** exibiram uma fraca atividade citotóxica frente a duas linhagens celulares tumorais (A375 e B16-F1) e uma linhagem não-tumoral (HaCaT), sendo a molécula **15** a mais ativa²⁶.

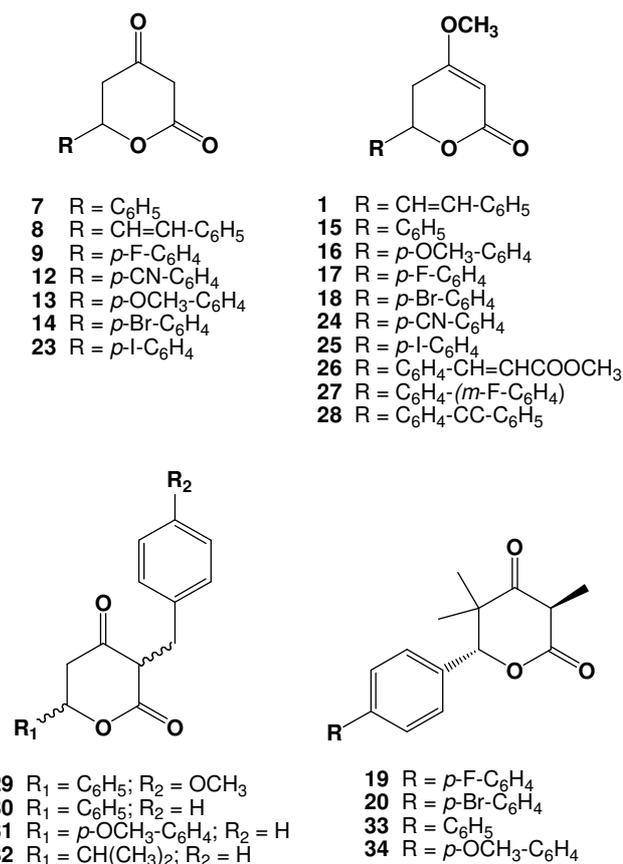


Figura 1.6: Derivados kavaína-like sintéticos.

Testes preliminares mostraram uma possível ação depressora do sistema nervoso central, sendo que o composto **7**, de maior semelhança às kavalactonas, diminuiu significativamente o tempo de latência e apresentou uma forte tendência em aumentar a duração do sono barbitúrico²³.

As atividades farmacológicas relacionadas a esse tipo de compostos justificam, então, a síntese de análogos para obtenção de maiores informações sobre seus efeitos biológicos, ou até mesmo a descoberta de efeitos não relatados.

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo dar continuidade aos estudos de nosso grupo de pesquisa, com a realização da síntese de kavalactonas e análogos, por condensação aldólica, e avaliação farmacológica *in vivo* e *in vitro* para uma triagem de moléculas com efeito ansiolítico, visando à identificação de novos *hits*.

1.2. REFERÊNCIAS

1. VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
2. YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. Cap. 2, p. 19-46.
3. MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
4. SINGH, Y. N. Kava: an overview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 13-45, 1992.
5. SMITH, K. K.; DHARMARATNE, R. W.; FELTENSTEIN, M. W.; BROOM, S. L.; ROACH, J. T.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic Effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 86-90, 2001.
6. FELTENSTEIN, M. W.; LAMBDIN, L. C.; GANZERA, M.; DHARMARATNE, H. R. W.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic properties of *Piper methysticum* extract samples and fractions in the chick social-separation-stress procedure. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 210-216, 2003.
7. REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test – a comparison with diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 855-860, 2002.
8. GARRET, K. M.; BASMADJIAN, G.; KHAN, I. A.; SCHANEBERG, B. T.; SEALE, T. W. Extracts of kava (*Piper methysticum*) induce acute anxiolytic-like behavioral changes in mice. **Psychopharmacology**, v. 170, p. 33-41, 2003.
9. SHINOMIYA, K.; INOUE, T.; UTSU, Y.; TOKUNAGA, S.; MASUOKA, T.; OHMORI, A.; KAMEI, C. Effects of kava-kava extract on the sleep-wake cycle in sleep-disturbed rats. **Psychopharmacology**, v. 180, n. 3, p. 564-569, 2005.

10. CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of kava kava and passiflora extracts combination. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 39-45, 2005.
11. SINGH, Y. N. Effects of kava on neuromuscular transmission and muscle contractility. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 7, p. 267-276, 1983.
12. MEYER, V. H. J.; KRETZSCHMAR, R. Untersuchungen über beziehungen zwischen molekularstruktur und pharmakologischer wirkung C₆-aryls substituierter 4-methoxy- α -pyrone vom typ der kawa-pyrone. **Arzneimittel Forschung**, v.19, n. 4, p. 617-623, 1969.
13. JAMIESON, D. D.; DUFFIELD, P. H. The antinociceptive actions of kava components in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 17, p. 495-508, 1990.
14. KRETZSCHMAR, R.; MEYER, H. J.; TESCHENDORF, H. J.; ZÖLLNER, B. Spasmolytische wirksamkeit von aryl-substituirten α -pyron und wässrigem extraktten auws *Piper methysticum* Forst. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 180, n. 2, p. 475-491, 1969.
15. GLEITZ, J.; FRIESE, J.; BEILE, A.; AMERI, A.; PETERS, T. Anticonvulsive action of (+/-)-kavain estimated from its properties on stimulated synaptosomes and Na⁺ channel receptor sites. **European Journal of Pharmacology**, v. 315, n. 1, p. 89-97, 1996.
16. SCHIMDT, N.; FERGER, B. Neuroprotective effects of (+/-)-kavain in the MPTP mouse of Parkinson´s disease. **Synapse**, v. 40, n. 1, p. 47-54, 2001.
17. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta a Bancos de Dados – Produtos Registrados das Empresas de Medicamentos e Hemoderivados. Disponível em: www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco_med.htm. Acesso em: 01 de outubro de 2009.
18. PARMAR, V. S.; JALH, S. C.; BISHT, K. S.; JALH, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; ENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 597-673, 1997.
19. LOUZADA, C. S. **A química medicinal aplicada ao estudo da kava-kava**. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

20. LECHTENBERG, M.; QUANDT, B.; KOHLENBERG, F. J.; NAHRSTEDT, A. Qualitative and quantitative micellar eletrokinetic chromatography ok kavalactones from dry extracts of *Piper methysticum* Forst. and commercial drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 848, p. 457-464, 1999.
21. HE, X. G.; LIN, L. Z.; LIAN, L. Z. Electrospray high performance liquid chromatography-mass spectrometry in phytochemical analysis of kava (*Piper methysticum*) extract. **Planta Medica**, v. 63, p. 70-74, 1997.
22. SMITH, R. M.; THAKRAR, H.; AROWOLO, T. A.; SHAFI, A. A. High-performance liquid chromatography of kava lactones from *Piper methysticum*. **Journal of Chromatography**, v. 283, p. 303-308, 1984.
23. AMARAL, P. A. **Síntese de derivados de kavalactonas**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.
24. AMARAL, P. A.; BERGOLD, A. M.; EIFLER-LIMA, V. L.; SANTOS, E. M.; OLIVEIRA, E. R.; CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of some synthetic δ -valerolactones. **Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 69-75, 2005.
25. AMARAL, P. A. **Síntese de δ -valerolactonas e avaliação biológica: citotóxica, analgésica e antiinflamatória**. Tese de Doutorado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS/Universidade de Rennes1, 2008.
26. AMARAL, P. A.; PETRIGNET, J.; GOUAULT, N.; AGUSTINI, T.; LOHÉZIC, LEDÉVÉHAT, F.; GRÉE, R.; EIFLER-LIMA, V. L.; DAVID, M. Synthesis of novel kavain-like derivatives and evaluation of their cytotoxic activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, *in press*.

2. CAPÍTULO I: SÍNTESE DE KAVALACTONAS E ANÁLOGOS

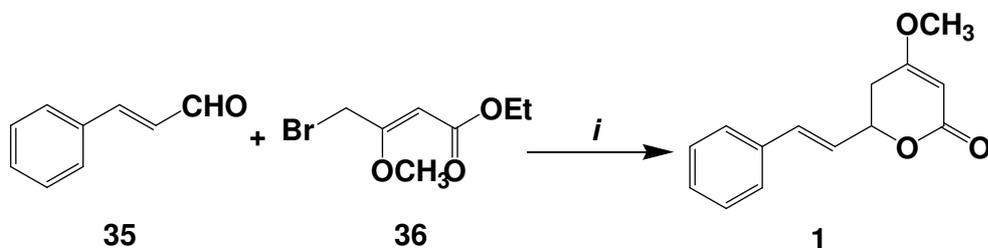
2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Síntese de kavalactonas

As kavalactonas podem ser obtidas por métodos extrativos ou sintéticos. Diferentes rotas de síntese já foram desenvolvidas para a síntese destas substâncias¹⁻³⁴, algumas delas permitindo a obtenção de produtos enantiomericamente puros^{12-19,21-23,25,27,30-34}. Para fins didáticos, neste trabalho apresentamos as diferentes metodologias em classes: 1) reação modificada de Reformatsky, 2) a partir de 4-hidroxi-6-estiril-2-pironas, 3) reação de hetero Diels Alder, 4) redução catalítica e 5) métodos diversos.

2.1.1.1. Síntese de kavalactonas por reação de Reformatski

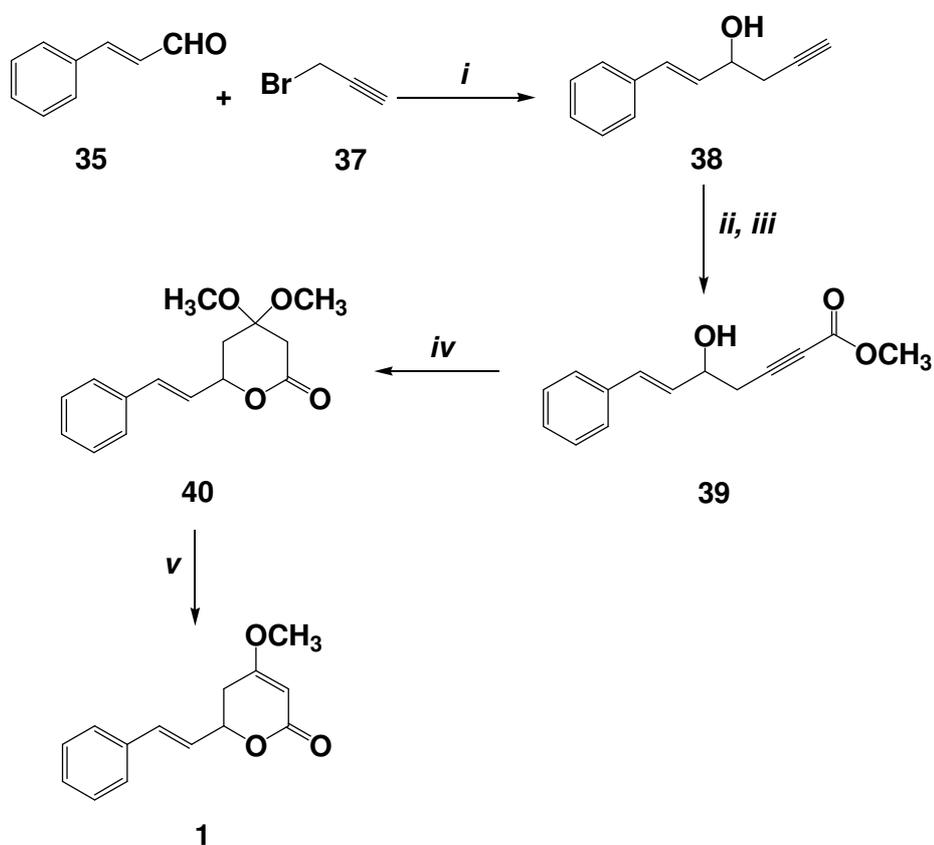
A primeira síntese da kavaína **1** foi publicada em 1950 e consistia na obtenção da molécula por reação de Reformatski entre o cinamaldeído **35** e o γ -bromo- β -metoxicrotonato de etila **36** (Esquema 2.1), obtendo-se um rendimento de 12%^{1,2}. Com o uso dos aldeídos apropriados, foi possível utilizar este método para a síntese das kavalactonas diidro-kavaína **2**³ e metisticina **3**⁴, com rendimentos de 9 e 38%, respectivamente.



i: Zn⁰, benzeno, refluxo.

Esquema 2.1

A partir dessa reação empregada por Kostermans^{1,2} para a obtenção do anel lactônico da kavaína, vários outros pesquisadores a utilizaram e alguns fizeram pequenas modificações com o intuito de aumentar o rendimento ou ampliar à síntese de outras kavalactonas. Em 1964, obtiveram-se diversas δ -lactonas α,β -insaturadas β,δ -disubstituídas, incluindo a kavaína (17% de rendimento na reação de Reformatski)⁵. O protocolo também foi modificado em 1976, utilizando uma mistura de cobre e zinco, obtendo-se a kavaína **1** e diidro-kavaína **2**, com rendimentos de 80 e 50%, respectivamente⁶.



i: Zn⁰, éter etílico, THF, ácido acético; *ii:* CO₂, benzeno, 43 atm;
iii: CH₃OH, H⁺; *iv:* BF₃, HgO, CH₃OH; *v:* aquecimento 150 °C.

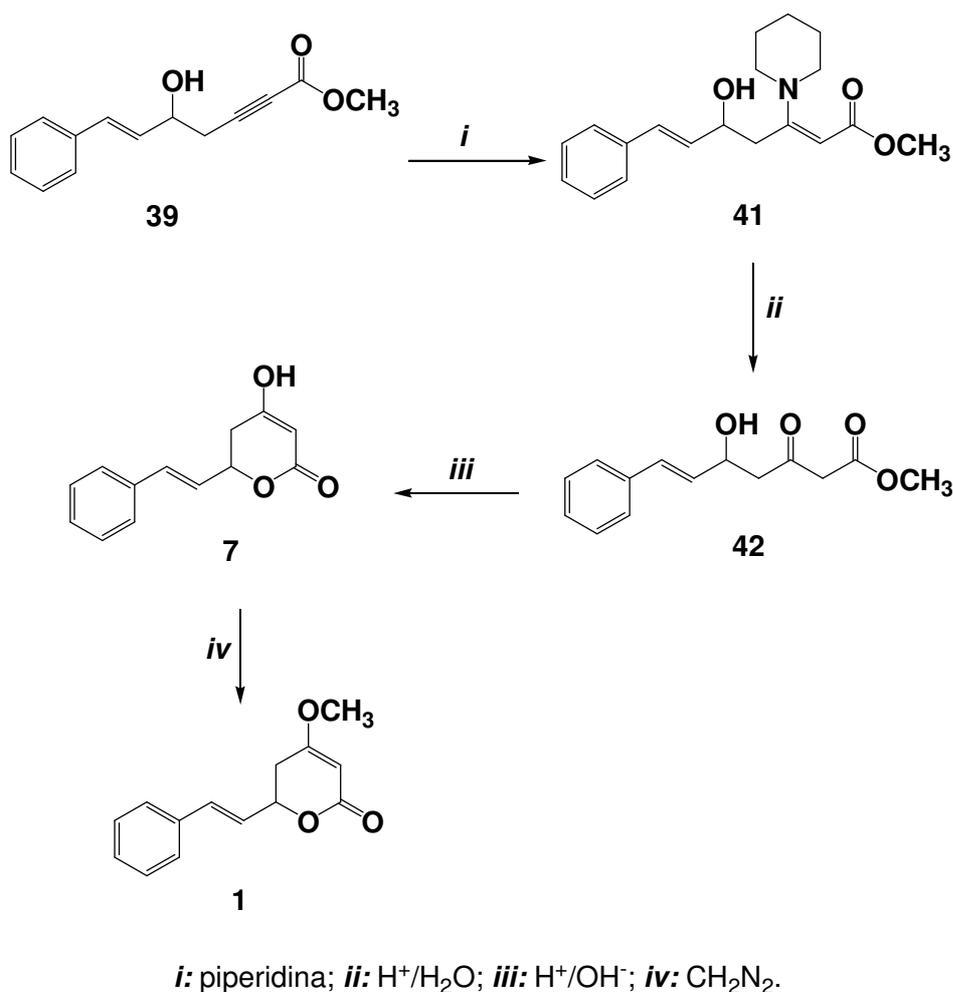
Esquema 2.2

Outra síntese baseada na reação de Reformatski inicia com a reação entre o cinamaldeído **35** e o brometo de propargila **37**, na presença de zinco, obtendo-se o carbinol **38**. O composto **38**, em presença de dióxido de carbono, sofre carboxilação seguida de esterificação em meio ácido, gerando o éster acetilênico **39**. A reação

com óxido de mercúrio e trifluoreto de boro leva à formação da dimetoxilactona **40**, convertida na kavaína **1**, com 3-5% de rendimento (Esquema 2.2)⁷.

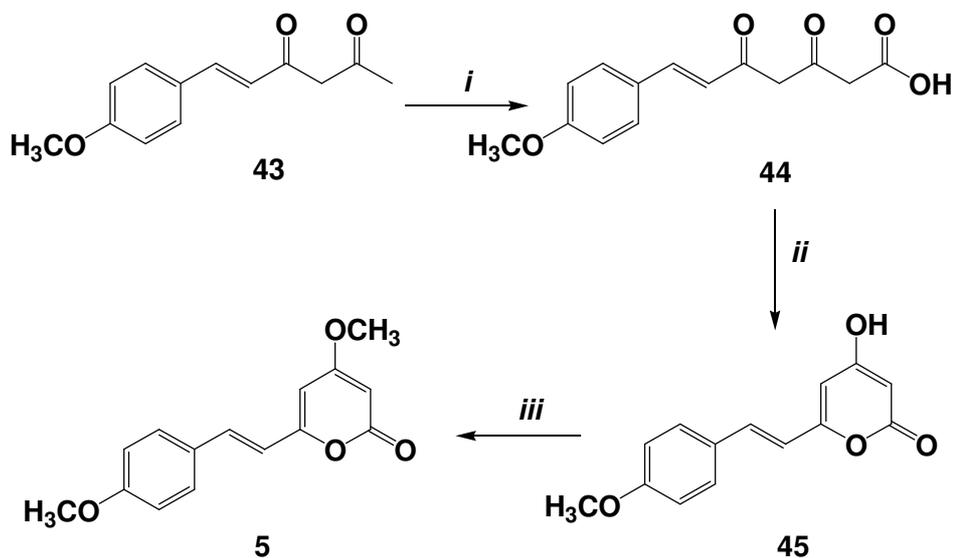
2.1.1.2. Síntese de kavalactonas a partir de 4-hidroxi-2-pironas

São numerosos os estudos objetivando a síntese de 4-hidroxi-6-estiril-2-pironas, para posterior *O*-metilação. A partir do éster acetilênico **39**, foi possível obter a 5,6-diidro-4-hidroxi-6-estiril-2-pirona **7**, que tratada com diazometano, gera a kavaína **1** com rendimentos de 5 e 30%, após recristalização com dioxano e metanol, respectivamente (Esquema 2.3)⁷.



Esquema 2.3

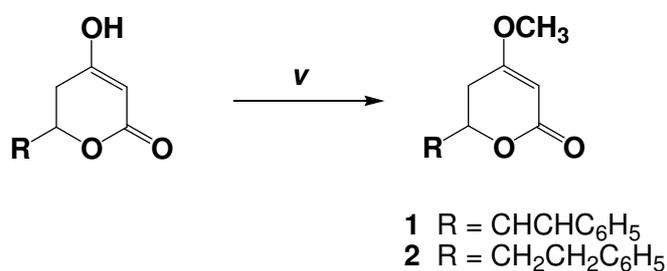
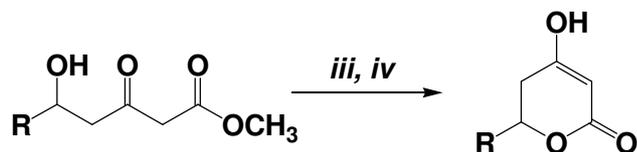
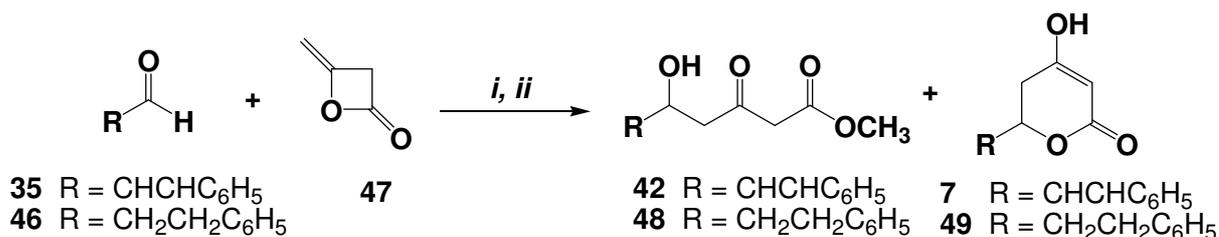
A partir de β -dicetonas, foram sintetizadas 4-hidroxi-2-pironas, que tratadas com dimetilsulfato e carbonato de potássio, levaram às 4-metoxi-2-pironas. A síntese da yangonina **5**, por este método, apresentou rendimentos de 63% na etapa de ciclização e 89% na *O*-metilação (Esquema 2.4)⁸.



i: NaNH_2 , CO_2 , éter etílico; *ii*: anidrido acético; *iii*: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 , acetona.

Esquema 2.4

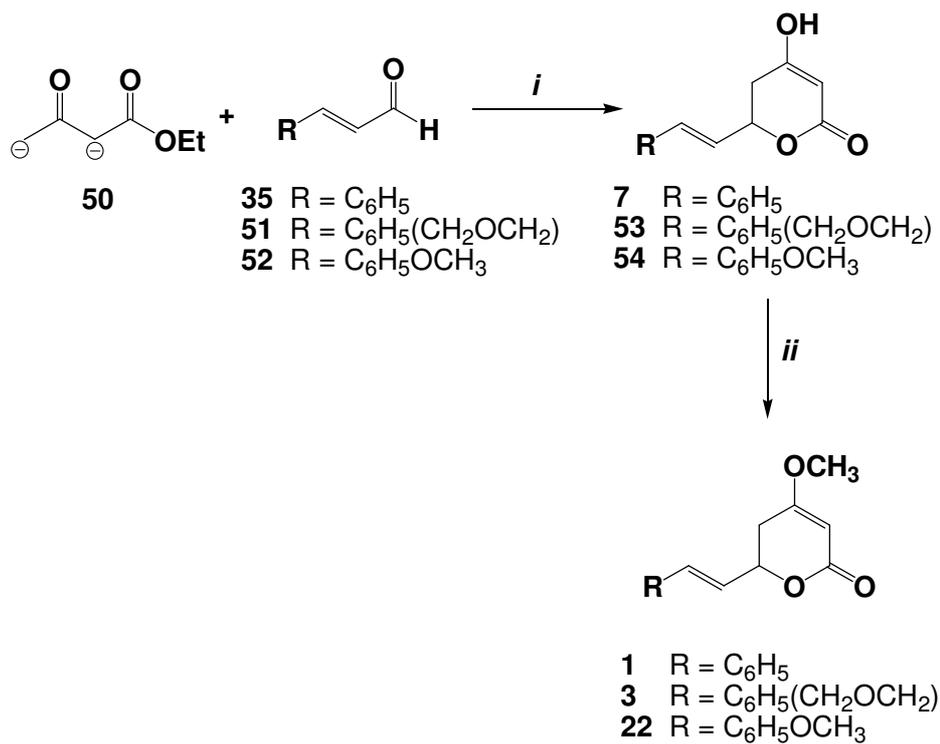
Realizou-se a síntese da kavaína **1** e diidro-kavaína **2** iniciando com a reação entre o diceteno **47** e os aldeídos apropriados, na presença de cloreto de titânio, com posterior *O*-metilação. Para a kavaína, os rendimentos intermediários foram de 7% (reação com diceteno), 47% (ciclização do δ -hidroxi- β -cetoéster) e 69% (*O*-metilação). Para a diidro-kavaína, nas mesmas etapas, obtiveram-se os rendimentos de 14, 95 e 84% (Esquema 2.5)⁹.



i: TiCl₄, CH₂Cl₂; *ii*: CH₃OH; *iii*: NaOH, t.a.; *iv*: HCl; *v*: (CH₃)₂SO₄, K₂CO₃, acetona.

Esquema 2.5

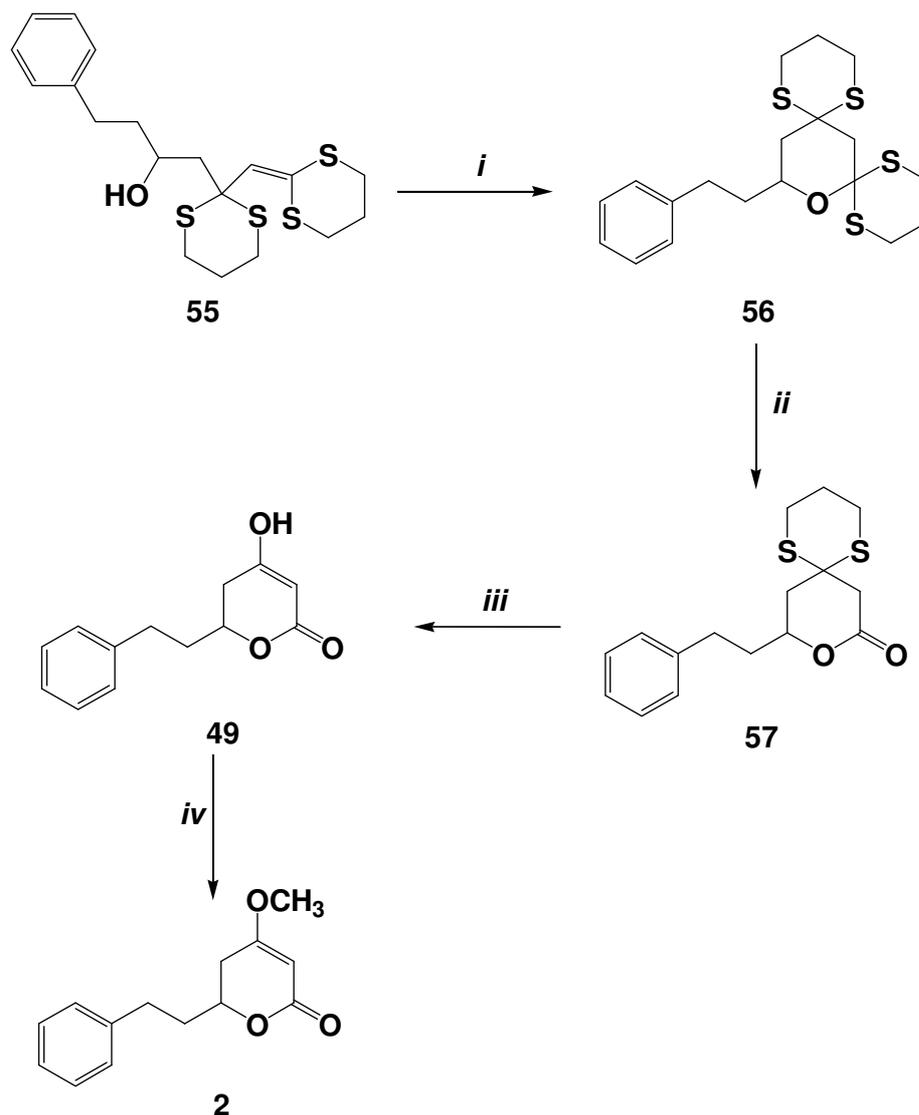
As 4-hidroxi-5,6-diidro-2-pironas também foram obtidas a partir do acetoacetato de etila, e posteriormente *O*-metiladas, com dimetilssulfato para obtenção da kavaína **1**, enquanto que para obtenção da metisticina **3** e diidroyangonina **22** empregou-se diazometano. Os rendimentos das etapas de condensação e *O*-metilação foram: 85 e 65% para a kavaína, 74 e 38% para a metisticina e 74 e 14% para a diidroyangonina (Esquema 2.6)¹⁰.



i: H_2O, H^+ ; *ii*: $(CH_3)_2SO_4, K_2CO_3$, acetona (**1**);
 $CH_2N_2, CH_3OH/\acute{e}ter\ etílico$ (**3** e **22**).

Esquema 2.6

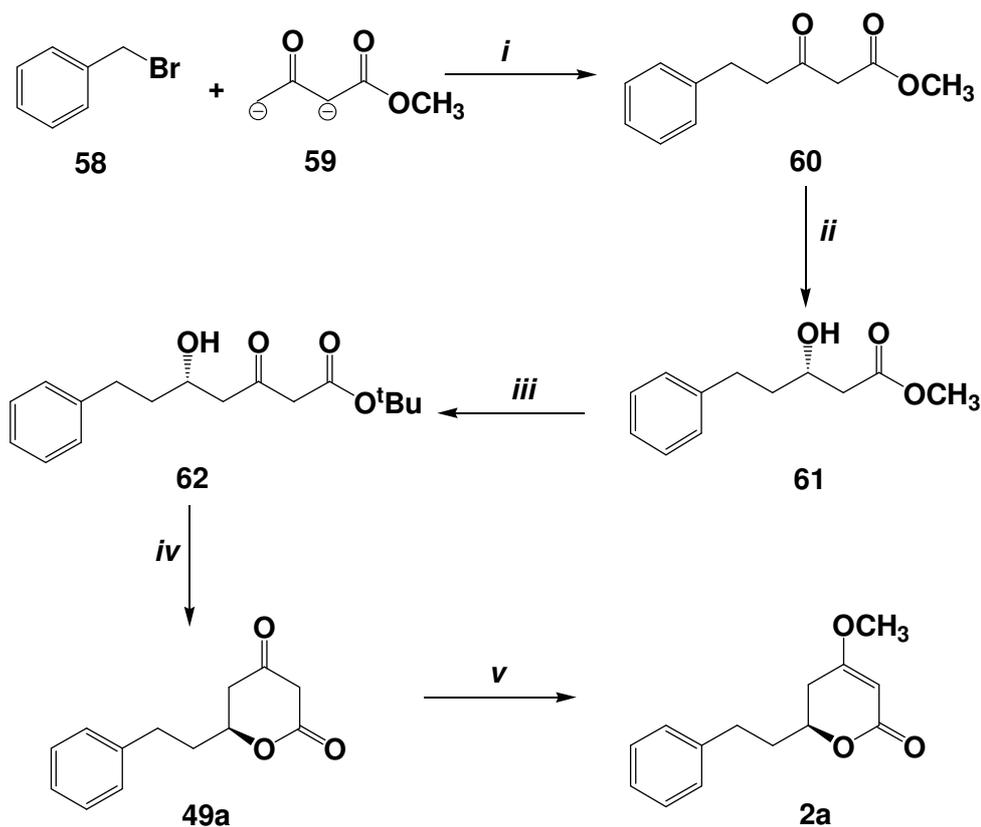
Estudando a preparação de uma série de cetenos ditioacetais, pesquisadores obtiveram o composto **55**. O mesmo foi empregado para a obtenção da diidrokaína **2**, através de uma clivagem oxidativa com NBS seguida de uma *O*-metilação, com 30% de rendimento a partir do intermediário **57** (Esquema 2.7)¹¹.



i: TFA, CH₂Cl₂; *ii*: HgCl₂, CaCO₃, CH₃CN; *iii*: NBS, acetona;
iv: (CH₃)₂SO₄, K₂CO₃, acetona.

Esquema 2.7

Objetivando a síntese enantiosseletiva das kavalactonas, uma vez que a kava-kava produz o enantiômero (+), diversos pesquisadores obtiveram os isômeros das kavalactonas por síntese assimétrica. A primeira kavalactona obtida desta maneira foi a (+)-diidrokaivaína **2a**, na qual a etapa enantiosseletiva de redução da cetona **60** ao álcool **61** foi empregado Ru-(*S*)-BINAP, fornecendo 12% de rendimento, com 93% de excesso enantiomérico (*ee*). Para as etapas de ciclização (estereosseletiva) e *O*-metilação, os rendimentos foram de 79 e 80%, respectivamente (Esquema 2.8)¹².



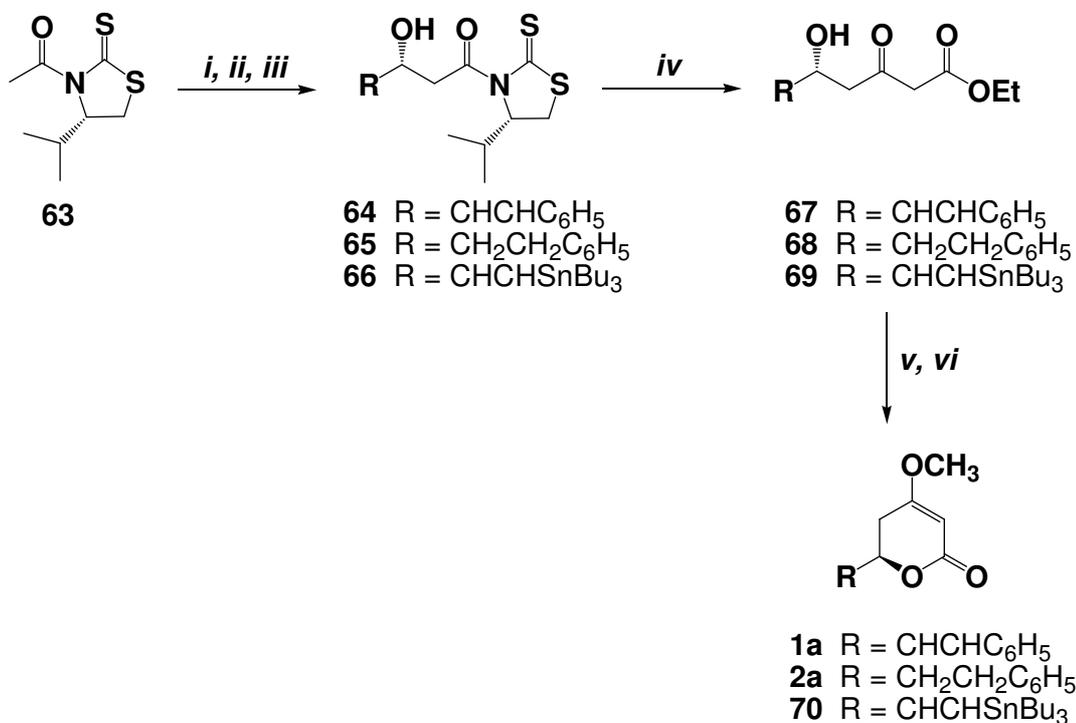
i: THF, 0 °C; *ii*: Ru⁻(S)-BINAP, CH₃OH, 50 psi H₂; *iii*: CH₃COO^tBu, LDA, THF; *iv*: TFA, CH₂Cl₂; *v*: (CH₃)₂SO₄, K₂CO₃, acetona.

Esquema 2.8

Os enantiômeros (+) e (-) da diidrokaivaína **2** foram obtidos empregando-se protocolo com as mesmas etapas da reação anterior, porém substituindo-se o Ru-(S)-BINAP na formação do centro estereogênico por uma transesterificação quimioenzimática. Os autores empregaram diversas enzimas e os melhores resultados foram obtidos com lípases de *Pseudomonas cepacia* usando éter diisopropílico como solvente. Os autores chegaram muitas vezes a excessos enantioméricos superiores a 99%. O processo quimioenzimático também foi utilizado para a síntese da (+)-kaivaína **1a**¹³.

Com uma tiazolidinotona como auxiliar quiral, foi realizada a síntese da (+)-kaivaína **1a** e da (+)-diidrokaivaína **2a**. Na primeira etapa, a reação com cinamaldeído ocorreu com rendimento de 84% para o diastereoisômero majoritário (excesso enantiomérico de 90%), enquanto que para o diidrocinamaldeído, este rendimento foi de 54% (*ee* de 76%). As etapas de lactonização/metilação apresentaram

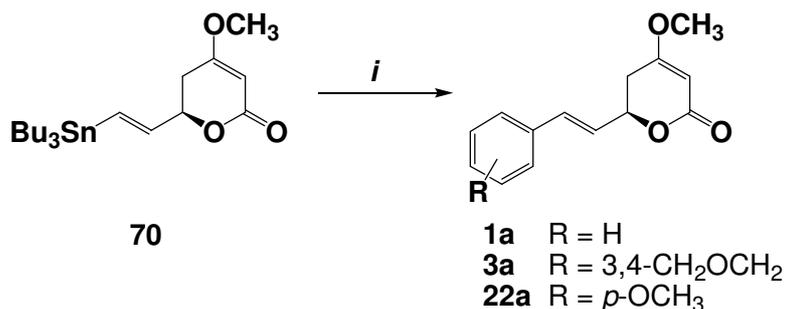
rendimentos de 87 e 83%, para a (+)-kavaína **1a** e (+)-diidrokaína **2a**, respectivamente (Esquema 2.9)¹⁴.



i: ácido de Lewis; *ii*: base, -40 °C; *iii*: RCHO, CH₂Cl₂, -78 °C;
iv: sal potássico do malonato de etila, MgCl₂, imidazol, THF, t.a.;
v: K₂CO₃, CH₃OH, t.a.; *vi*: (CH₃)₂SO₄, acetona.

Esquema 2.9

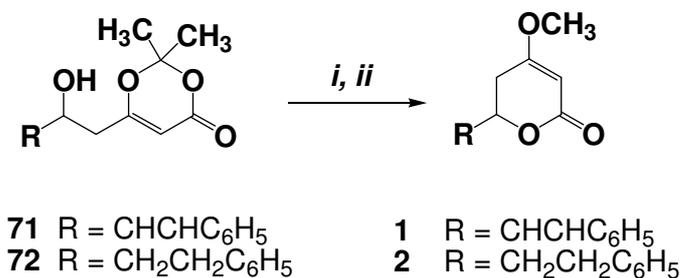
O composto **69**, obtido com rendimento global de 54% no processo acima, foi empregado, *via* acoplamento de Stille, para a síntese da (+)-kavaína **1a**, (+)-metisticina **3a** e (+)-diidroyangonina **22a**, com rendimentos de 44-75% (Esquema 2.10)¹⁴.



i: ArI, Pd(dba)₃, fosfina.

Esquema 2.10

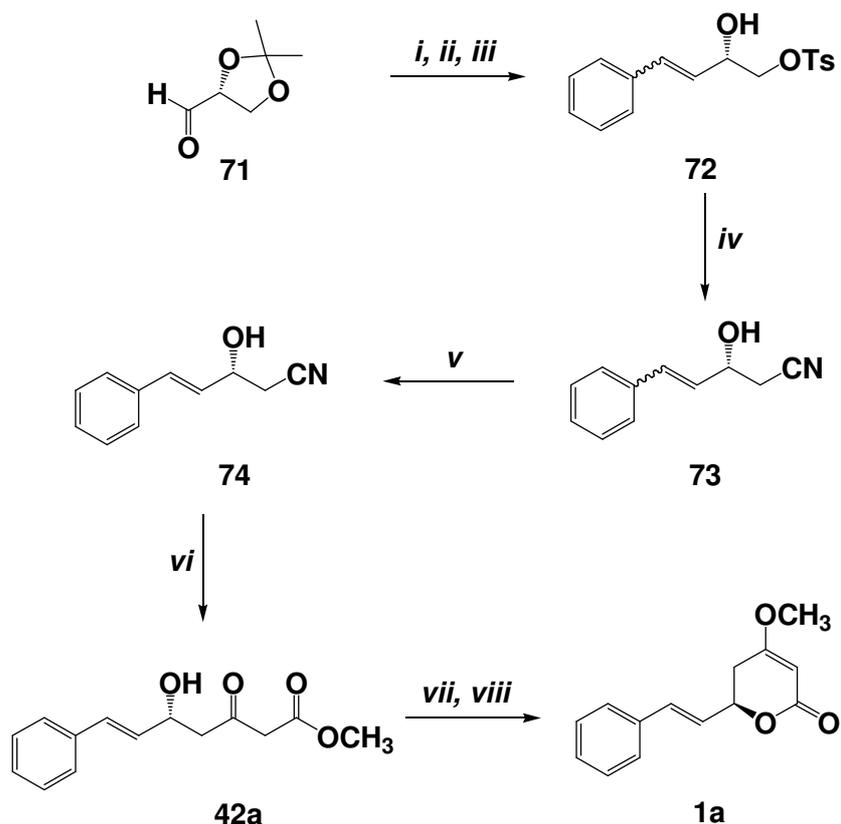
No mesmo trabalho, foi demonstrado que produtos da reação aldólica de Mukaiyama podem ser transformados diretamente em kavalactonas, com rendimentos globais de 62% para a kavaína e 87% para a diidro-kavaína. Na etapa de lactonização/metilação, kavaína e diidro-kavaína apresentaram rendimentos de 71 e 90% (Esquema 2.11)¹⁴.



i: K₂CO₃, CH₃OH, t.a.; *ii*: (CH₃)₂SO₄, acetona, t.a.

Esquema 2.11

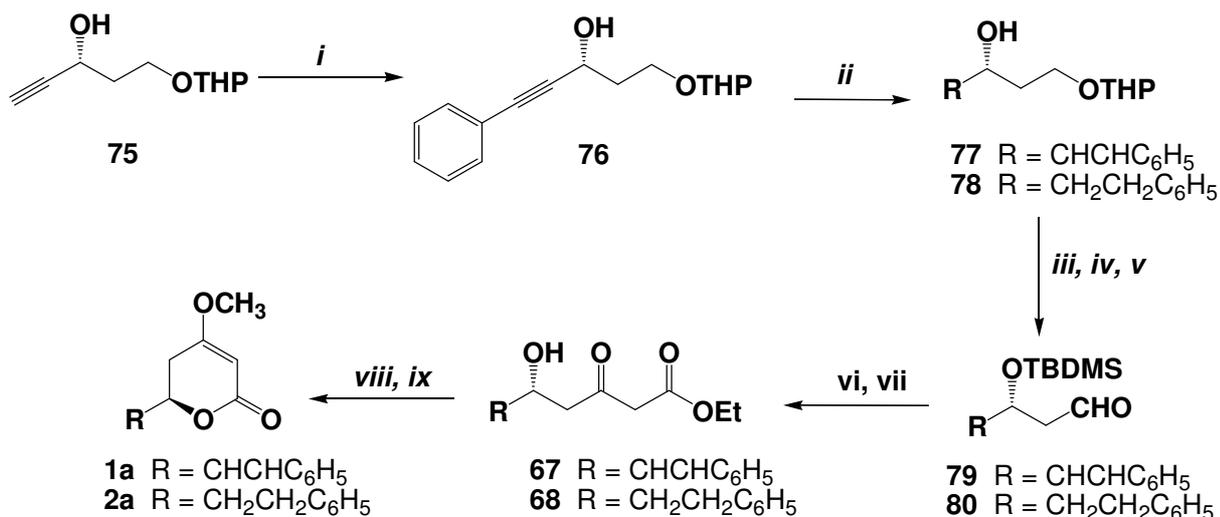
Um aldeído quiral, obtido a partir do D-manitol foi utilizado para a síntese da (+)-kavaína **1a**, possibilitando a síntese da molécula com 25% de rendimento global. Nesta abordagem, o aldeído **71** sofre uma olefinação de Wittig, em meio fortemente alcalino, seguida de uma hidrólise, fornecendo após tosilção o álcool monotiosilado **72**. Uma isomerização catalisada por (CH₃CN)₂PdCl₂ levou à obtenção do isômero *trans*, seguindo-se de uma reação sonoquímica de Blaisen¹⁵. A metodologia empregada também foi adaptada para a síntese da (+)-diidro-kavaína **2a**, com rendimento global de 25% (Esquema 2.12)¹⁶.



i: $\text{Br-PPh}_3\text{CH}_2\text{Ph}^+$, BuLi, THF, 0 °C; *ii*: HCl, THF, t.a.; *iii*: TsCl, piridina, -17 °C a t.a.; *iv*: KCN, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$, 0 °C a t.a.; *v*: $(\text{CH}_3\text{CN})_3\text{PdCl}_2$, benzeno, refluxo; *vi*: $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$, Zn ativado, ultrassom, THF, 50 °C, H^+ ; *vii*: CH_3OH , K_2CO_3 , t.a.; *viii*: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, acetona, t.a.

Esquema 2.12

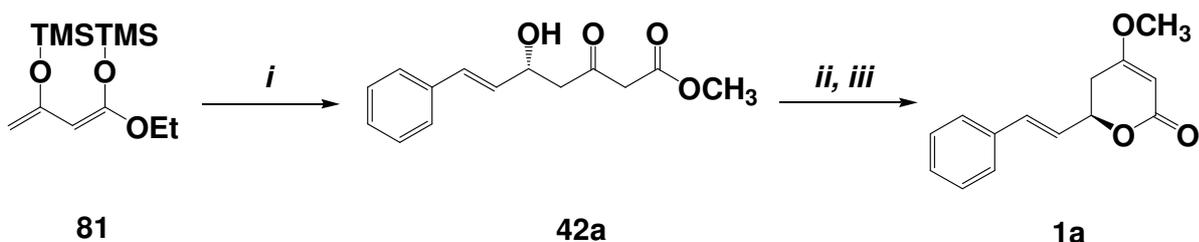
O produto da reação de acoplamento cruzado de Cosford entre o iodobenzeno e o álcool acetilênico permitiu a obtenção, com 90% de rendimento, do intermediário **76**, utilizado para a síntese da (+)-kavaína e da (+)-diidro-kavaína. Para a síntese da (+)-kavaína **1a**, a tripla ligação do composto **76** foi parcialmente reduzida com tetraidreto de alumínio e lítio. No caso da (+)-diidro-kavaína **2a**, a redução total da tripla ligação foi efetuada com paládio/carbono. Ambas as reduções obtiveram 90% de rendimento (Esquema 2.13)¹⁷.



i: iodobenzeno, Pd/C, CuI, Ph₃P, K₂CO₃, H₂O/DME, 80 °C; *ii*: LiAlH₄, THF, 0 °C a t.a. (**77**); Pd/C, AcOEt (**78**); *iii*: TBDMSCl, imidazol, CH₂Cl₂, DMAP; *iv*: PPTS, CH₃OH; *v*: IBX, DMSO, CH₂Cl₂; *vi*: SnCl₂, N₂CHCOOCH₂CH₃, CH₂Cl₂, 0 °C a t.a. (**68**); *vii*: TBAF, THF; *viii*: K₂CO₃, CH₃OH; *ix*: (CH₃)₂SO₄, acetona.

Esquema 2.13

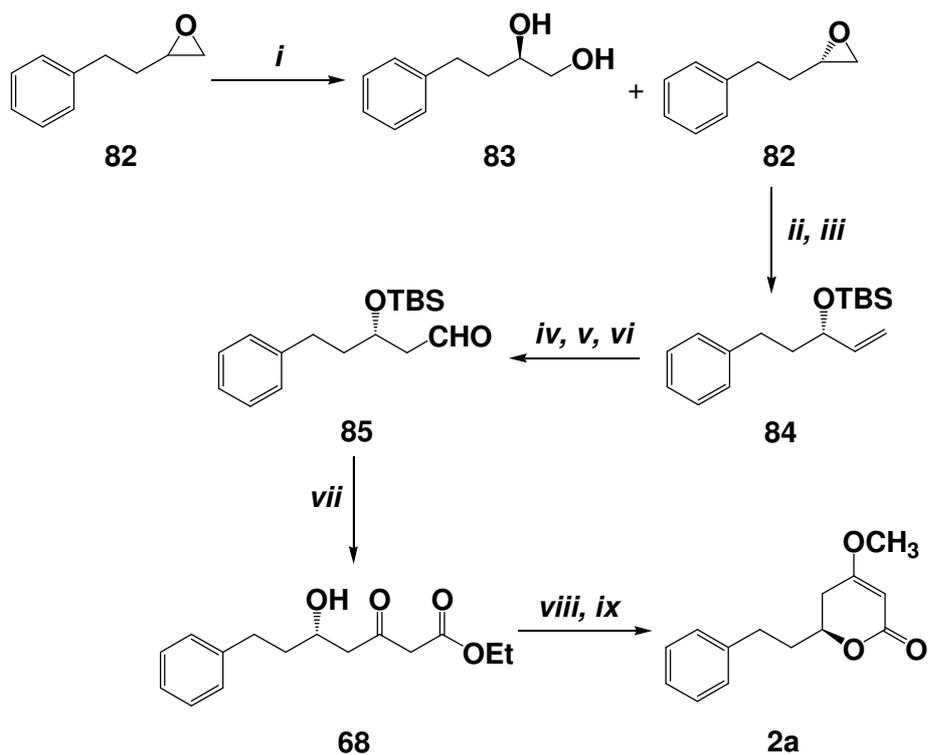
Villano e colaboradores¹⁸, estudaram a reatividade do dieno de Chain **81** frente à reação aldólica, na presença de catalisadores quirais e SiCl₄. Neste estudo, a (+)-kavaína **1a** foi obtido com rendimento de 75% e excesso enantiomérico de 75% (Esquema 2.14).



i: cinamaldeído, SiCl₄/ativador quiral, CH₂Cl₂, DIPEA, -78 °C; *ii*: K₂CO₃, CH₃OH; *iii*: (CH₃)₂SO₄, acetona.

Esquema 2.14

A (+)-diidro-kavaína **2a** foi obtida com rendimento global de 16% a partir de uma rota de cinco etapas que iniciava com a resolução hidrolítica cinética do epóxido racêmico **82**. O epóxido quiral **82** foi obtido com 46% de rendimento e 94% de ee (Esquema 2.15)¹⁹.

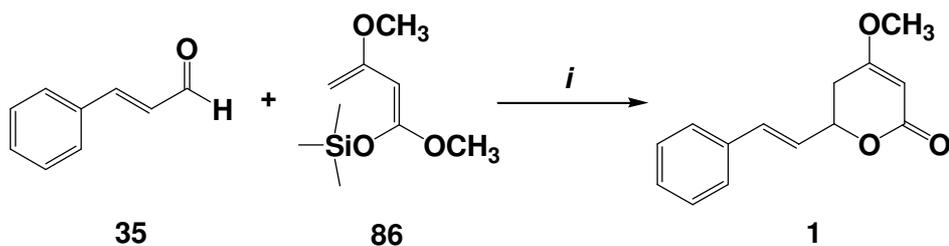


i: (S,S)-Co(III)⁻salen.OAc, H₂O, 25 °C; *ii*: (CH₃)₃S⁺I⁻, n-BuLi, -10 °C; *iii*: TBSCl, imidazol, CH₂Cl₂; *iv*: (CH₃)₂SBH₃, THF; *v*: NaOH, H₂O₂; *vi*: BF₃OEt₂, N₂CHCOOCH₂CH₃, CH₂Cl₂, -10 °C; *vii*: K₂CO₃, CH₃OH; *ix*: (CH₃)₂SO₄, acetona.

Esquema 2.15

2.1.1.3. Síntese de kavalactonas por reação de hetero Diels Alder

Vários pesquisadores utilizaram a reação de Hetero Diels Alder para a formação das kavalactonas, diferenciando muitas vezes apenas no catalisador empregado. No primeiro trabalho publicado com esta metodologia, a reação do dieno com cinamaldeído, na presença de um ácido de Lewis em diclorometano permitiu a obtenção da kavaína, com rendimentos de 75% [Eu(fod)₃], 84% [Yb(fod)₃] e 78% (cloreto de zinco) (Esquema 2.16)²⁰.

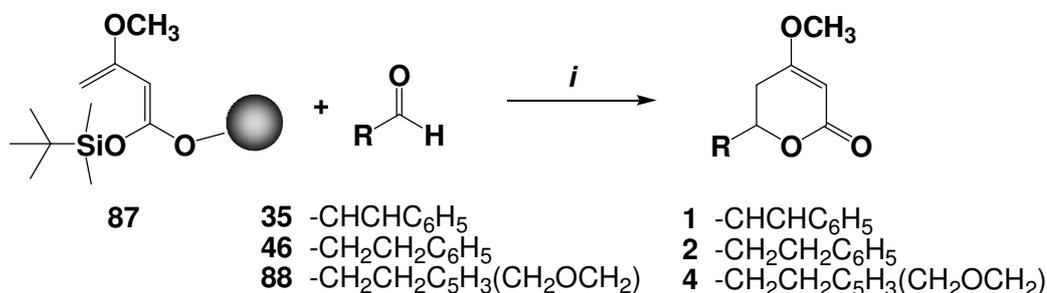


i: ácido de Lewis, CH₂Cl₂.

Esquema 2.16

Utilizando complexos quirais como catalisadores, foi possível a síntese assimétrica de kavalactonas. Catalisada por um complexo de vanádio quiral, a (+)-kavaína **1a** foi obtida com 73% de rendimento e 13% de *ee*²¹. A (+)-diidro-kavaína **2a** foi obtida com 50% de rendimento e 69% de *ee*, quando se empregou um diol quiral como catalisador²². O uso do (*R*)-BINOL em Ti(*i*-PrO)₄ permitiu a obtenção da (+)-kavaína, **1a** (56% de rendimento e 70% de *ee*, sendo este superior a 99% após recristalização) e da diidro-kavaína **2a** (57% de rendimento e 84% de *ee*)²³.

A mesma reação foi adaptada para a síntese orgânica em fase sólida, iniciando com o dieno **87** acoplado à resina Merrifield. Foram obtidas diversas 5,6-diidropironas, entre elas kavaína **1**, diidro-kavaína **2** e diidrometisticina **3**, com rendimentos do produto isolado de 25, 48 e 45%, respectivamente. Os rendimentos foram moderados, porém menores aos obtidos por síntese em solução, pois consideram também as cinco etapas de formação de **87**, não descritas em nosso texto (Esquema 2.17)²⁴.

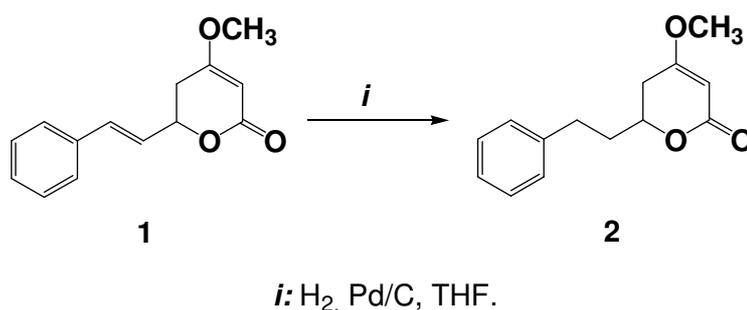


i: (CH₃)₂AlCl, CH₂Cl₂.

Esquema 2.17

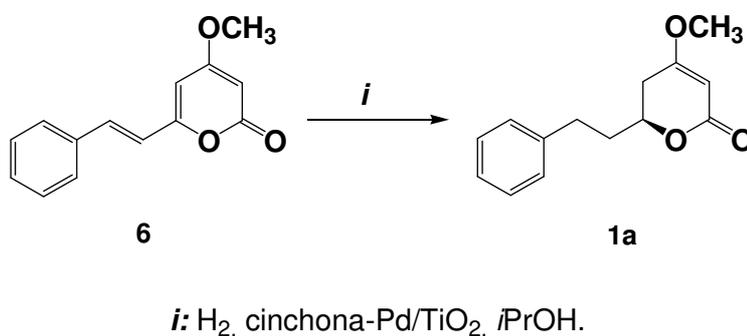
2.1.1.4. Síntese por redução catalítica a partir de kavalatonas

Em dois trabalhos publicados, a kavaína **1** sofreu redução catalítica com paládio para a formação da diidrokaína **2**, com rendimentos de 58% no trabalho de Viswanathan e Swaminathan⁴ e 82% no trabalho de Piantadosi e Skulason⁵ (Esquema 2.18).



Esquema 2.18

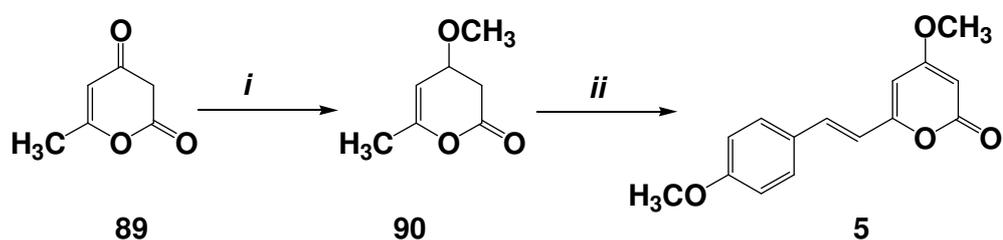
Estudando uma reação de hidrogenação de 2-pironas, catalisada por cinchona-Pd/TiO₂, pesquisadores obtiveram a (+)-kavaína **1a** a partir da desmetoxyangonina **6**. Para a (+)-kavaína **1a**, os rendimentos, dependendo da condição empregada, foram de 60 e 67%, com *ee* de 82 e 89%, respectivamente (Esquema 2.19). Nas mesmas condições, os autores obtiveram o enantiômero (+) da diidrometisticina **4** com rendimentos de 68% (82±2% *ee*) e 75% (90±2% *ee*)²⁵.



Esquema 2.19

2.1.1.5. Métodos diversos para síntese de kavalactonas

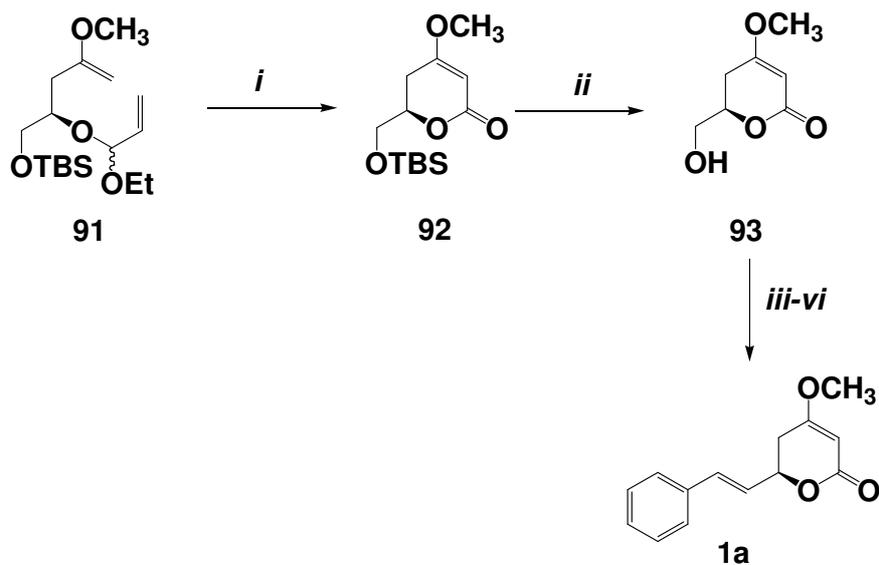
Em 1960, realizou-se a síntese da yangonina **5** a partir da lactona **89**. Empregando dois agentes alquilantes, diazometano ou dimetilssulfato, os autores obtiveram o éter metílico **90**, que após reação com metóxido de magnésio e *p*-metoxibenzaldeído, permitiu a obtenção da yangonina **5** com rendimento de 17% (Esquema 2.20)²⁶.



i: N_2CH_3 , éter etílico, HCl, t.a. ou $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 , MEC, refluxo;
ii: CH_3OMg , *p*-metóxi-benzaldeído, CH_3OH , refluxo.

Esquema 2.20

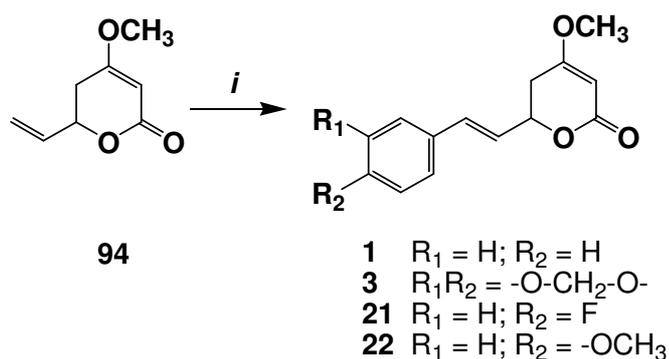
Empregando-se protocolo contendo a reação de metátese, a (+)-kavaína **1a** foi obtida com rendimento global de 8%, com razão *E/Z* superior a 95:1. A etapa de fechamento do anel por metátese foi realizada com 56% de rendimento (Esquema 2.21)²⁷.



i: PCC, CH₂Cl₂, t.a.; *ii*: TBAF, THF, 0 °C; *iii*: oxidação de Swern; *iv*: PhS(O)Bn, LDA, THF, -78 °C; *v*: BzCl, -78 °C a t.a.; *vi*: Sml₂, HMPA, THF, -78 °C.

Esquema 2.21

Recentemente, nosso grupo de pesquisa utilizou a reação de Heck na síntese de kavalactonas e análogos. Empregando-se a lactona **94** em reação com diferentes iodetos de arila, sob condições térmicas ou por irradiação de microondas, foram obtidas as lactonas **1**, **3**, **21** e **22** com rendimentos que variaram de 35 a 46% (Esquema 2.22)²⁸.



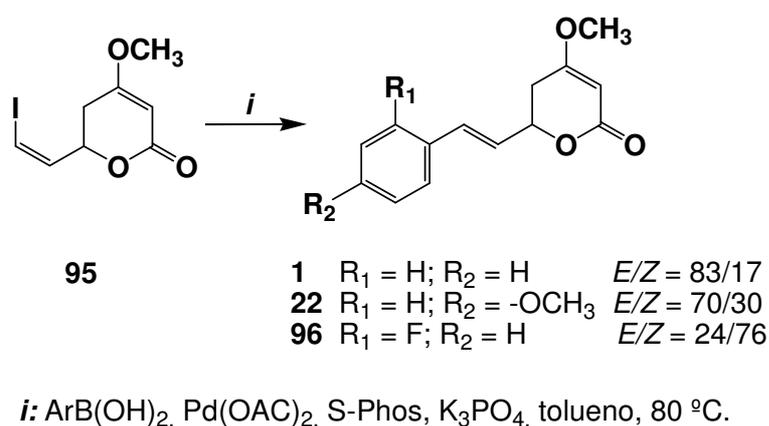
i: ArI, *i*PrNEt₂, Pd(PPh₃)₄, DMF, 16 h.

Esquema 2.22

Trabalho análogo foi realizando empregando-se um arenodiazônio em substituição ao iodoareno, realizando-se uma triagem das melhores condições

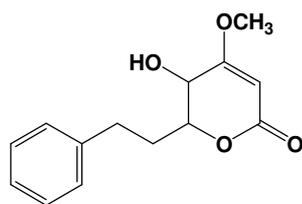
reacionais, por modificação no catalisador de paládio, solvente e empregando aquecimento por microondas, obtendo-se o composto **22** com rendimentos de 20-85% dependendo da condição empregada, sendo a melhor a com aquecimento em microondas, e Pd₂(dba)₃. Este foi convertido a yangonina **5** com 85% de rendimento, empregando DDQ. Nas mesmas condições, mas com maior temperatura, a metisticina **3** foi obtida com 59% de rendimento²⁹.

No trabalho de Amaral e colaboradores²⁸, empregando-se a reação de Suzuki-Miyaura, obtiveram-se os produtos de maneira estereosseletiva, com rendimentos de 7-18%. O emprego de DDQ permitiu, a partir de **1** e **22**, a obtenção da desmetoxyangonina **6** (75%) e da yangonina **5** (80%), respectivamente (Esquema 2.23).



Esquema 2.23

É interessante destacar o número considerável de publicações (não descritas neste trabalho) sobre a síntese enantiosseletiva dos isômeros da diidrokaivaín-5-ol (Figura 2.1). O interesse por esta kavalactona deve-se, não à sua importância biológica, mas à presença de dois centros estereogênicos em sua estrutura, levando à existência de diastereoisômeros³⁰⁻³⁴.



97

Figura 2.1: Estrutura química da diidrokaivaín-5-ol.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. Gênese das kavalactonas e análogos

O interesse de nosso grupo de pesquisa neste tipo de substâncias levou a estudos de modificação molecular, visando à avaliação do perfil farmacológico dos análogos planejados (Figura 2.2). O anel aromático das kavalactonas, circulado em azul na Figura 2.2, pode apresentar grupos funcionais com diferentes características estruturais e eletrônicas, em diferentes padrões de substituição (orientações e número de substituintes). A cadeia etileno existente entre os anéis arila e α -pirona, circulado em vermelho na Figura 2.2, poderá ser insaturada ou não, podendo ser estendida, contraída ou até mesmo suprimida. O grupo 4-metoxila, circulado em verde na Figura 2.2, poderá ser substituído por diversos grupos alcóxi, ou até mesmo por outros grupos funcionais. Além disto, o grupo éster da lactona, circulado em cinza na Figura 2.2, pode ser substituído por bioisósteros. Todas estas modificações poderão fornecer informações sobre os elementos estruturais essenciais para a atividade, bem como indicativos para otimização do *template* (molécula utilizada como modelo para farmacomodulações).

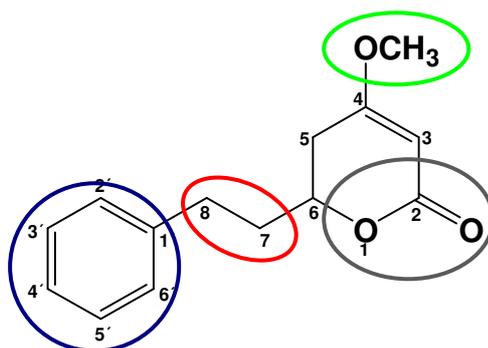


Figura 2.2: Possibilidades de locais para modificação estrutural nas kavalactonas.

O planejamento dos análogos se baseia na modificação estrutural da lactona **7** (Figura 2.3). Em trabalho anterior, **7** diminuiu significativamente o tempo de latência e apresentou uma forte tendência em aumentar a duração do sono barbitúrico, o que pode indicar um efeito depressor do sistema nervoso central³⁵.

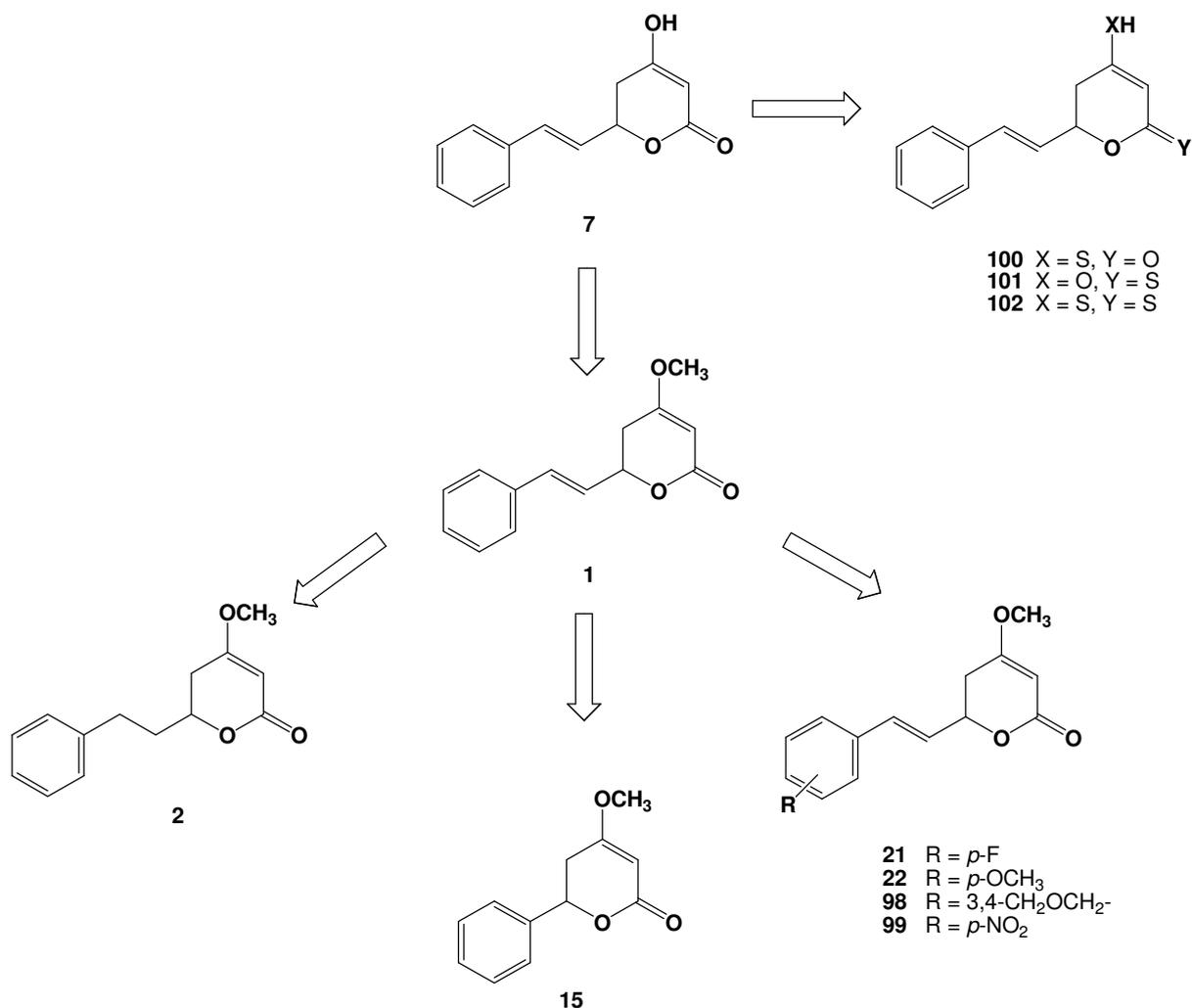


Figura 2.3: Planejamento das kavalactonas e análogos.

Primeiramente, com a introdução de uma metila na posição 4 do anel heterocíclico têm-se a formação de um éter-enólico e a formação da kavaína **1**.(Figura 2.3). A lactona **1** apresenta maior lipofilia do que **7**, podendo assim atravessar mais facilmente a barreira hematoencefálica para exercer sua ação no sistema nervoso central. A lactona **1**, quando na forma enantiomericamente pura, constitui uma das kavalactonas majoritárias do extrato de kava-kava. Comparando-se **1** e **7**, verifica-se que apenas esta última é encontrada em duas formas tautoméricas, sendo a forma enólica estabilizada pela conjugação com o grupo lactona. A existência de equilíbrio ceto-enólico pode influenciar no perfil farmacológico de **7**, já que as duas formas podem apresentar diferentes propriedades farmacológicas.

Modificações no grupo etileno que conecta os anéis lactônico e aromático podem levar ao análogo **2**, por substituição da ligação dupla por uma ligação simples, e ao análogo **15**, por supressão da cadeia. A lactona **2**, também é encontrada no extrato de kava-kava, na forma enantiomericamente pura, e é denominada diidrokaína. A substituição da ligação dupla de **1** por uma ligação simples leva à uma molécula mais flexível, com maior liberdade conformacional, o que pode influenciar principalmente na interação com os receptores farmacológicos. A lactona **15**, não encontrada no extrato de kava-kava, por não apresentar a cadeia interligando os anéis, pode fornecer informações sobre a importância desta para a atividade biológica.

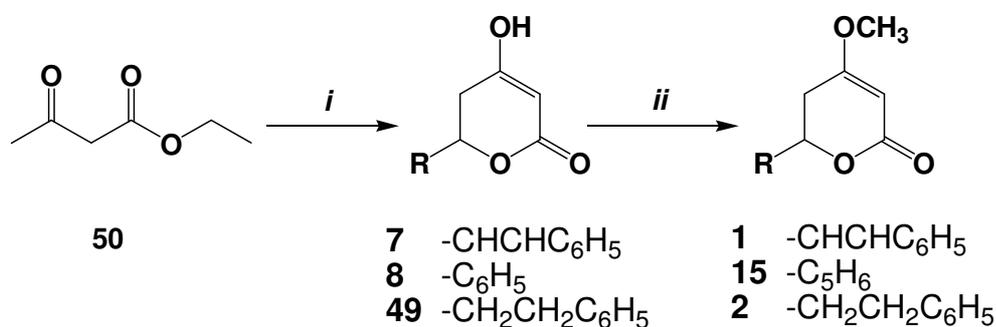
Visando a adotar a estratégia do bioisosterismo clássico, três trocas bioisostéricas foram planejadas, com a troca do oxigênio pelo enxofre. Uma delas foi a troca do oxigênio do grupo hidroxila ligado ao carbono da posição 4 para obtenção de **100**. A outra foi a troca do oxigênio ligado ao carbono na posição 2, para formar **101**. Também foi proposta a troca simultânea destes átomos de oxigênio, a fim de formar **102**. Estas modificações podem levar a análogos com diferentes polaridade e conformações, o que pode conduzir a respostas farmacológicas diferentes ou mesmo semelhantes às do *template 7*.

Finalmente, a introdução de substituintes elétron doadores e elétron retiradores no anel aromático de **7**. Estas modificações levam a análogos com diferentes características eletrônicas e de volume, além de terem seu caráter lipofílico modificado, como, por exemplo, para o composto **21**.

2.2.1. Síntese das lactonas para avaliação farmacológica

Num primeiro momento, foram sintetizados a kavaína **1**, a diidrokaína **2** e o análogo **15**. Com protocolo otimizado pelo nosso grupo de pesquisa, realizou-se a condensação aldólica entre o diânion do acetoacetato de etila (**50**) e os aldeídos: cinamaldeído, diidrocinaldeído e benzaldeído, na presença de LDA. Os produtos

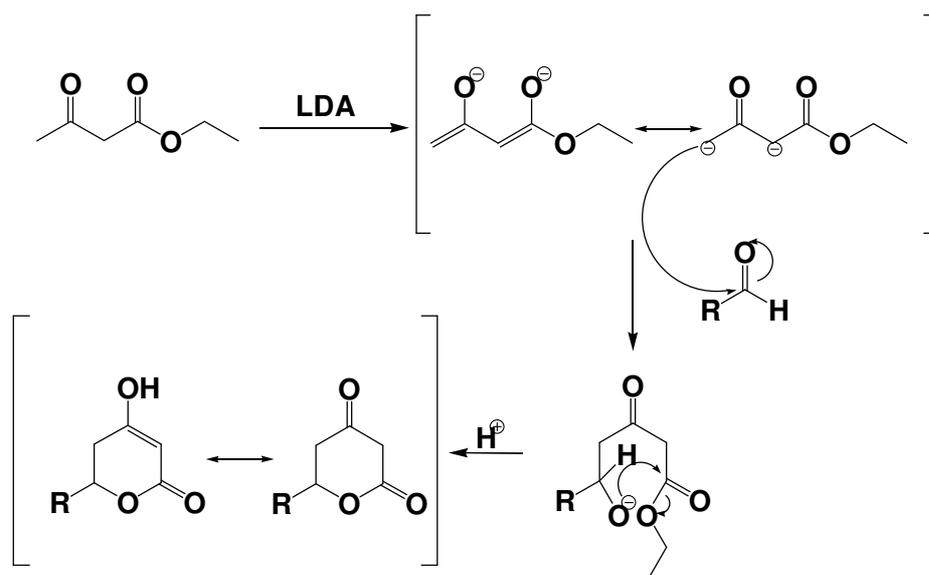
obtidos sofrem então uma *O*-metilação com dimetilsulfato, gerando as lactonas pretendidas, do tipo 4-metóxi-2-pirona (Esquema 2.24).



i: LDA, ArCHO, 0 ° C, THF; *ii*: (CH₃)₂SO₄, K₂CO₃, t.a., acetona.

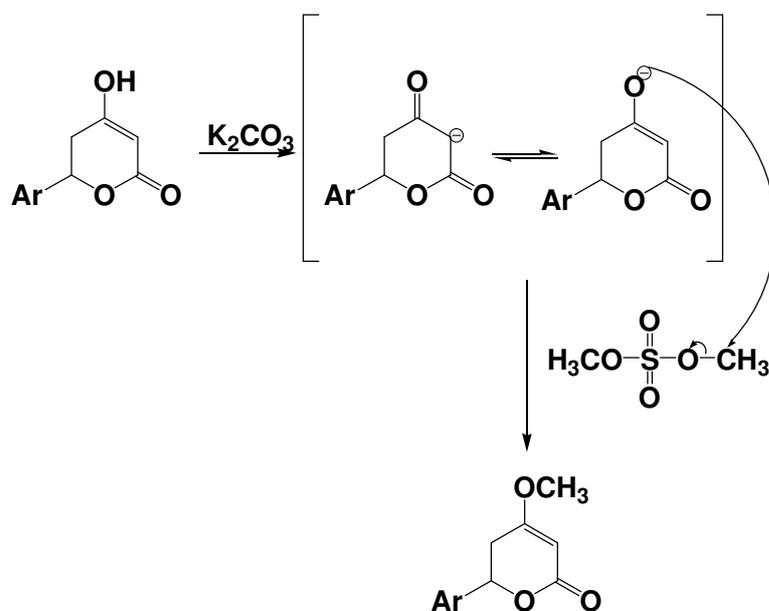
Esquema 2.24

O protocolo inicia com a reação do acetoacetato de etila **50** e uma base forte (LDA), em solvente aprótico (THF), a 0 °C. O enolato realiza um ataque nucleofílico ao carbono do aldeído e, após ciclização intramolecular, ocorre a formação do composto hexacíclico. O produto gerado estabiliza-se através do equilíbrio ceto-enólico, com predomínio da forma enólica devido à conjugação com o grupo carboxila da lactona (Esquema 2.25). As lactonas **7**, **8** e **49** foram obtidas com rendimentos de 90, 80 e 70%, respectivamente.



Esquema 2.25

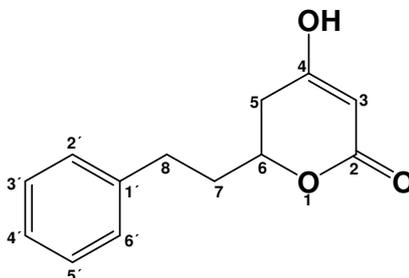
A lactona formada, após purificação, é colocada em meio levemente alcalino com dimetilssulfato, ocorrendo a reação na proporção molar de 2:1 de substrato em relação ao agente alquilante (Esquema 2.26). Os produtos formados foram purificados por cromatografia em coluna, chegando-se a rendimentos de 86, 76 e 68%, respectivamente para os compostos **1**, **15** e **2**.



Esquema 2.26

Os dados para a identificação das substâncias, obtidos por espectroscopia de RMN 1H , estão apresentados na Tabela 2.1 (lactonas obtidas por condensação aldólica) e na Tabela 2.2 (lactonas obtidas após *O*-metilação). Para as seis substâncias sintetizadas, os espectros de RMN 1H caracterizam o anel lactônico, através de três picos com sinais distintos, referentes aos hidrogênios H_3 , H_5 e H_6 . O pico de H_3 aparece como um simpleto em 5,0-5,2 ppm, característico de hidrogênios vinílicos. Para a lactona **49**, quando a análise foi efetuada em outro solvente deuterado ($CDCl_3$), estes sinais aparecem na região de 3,48 ppm, com constante de acoplamento igual a 18,7 Hz. Em $DMSO-d_6$, predomina a forma enólica da substância, devido às interações do tipo ligação de hidrogênio favorecidas pela maior polaridade do solvente, enquanto que em $CDCl_3$, no qual estas interações são desfavorecidas, há predomínio da forma cetônica. Assim, em $CDCl_3$, os sinais de H_3 aparecem com um maior deslocamento devido à ausência dos efeitos da dupla ligação sobre H_3 , observados quando a análise é efetuada em $DMSO-d_6$.

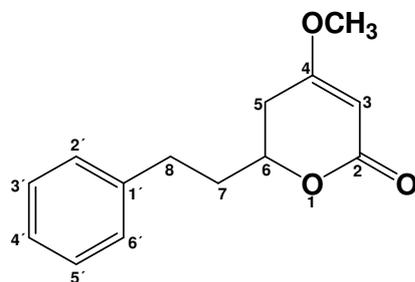
Tabela 2.1: Identificação dos sinais obtidos por RMN ^1H para as lactonas obtidas por condensação aldólica (DMSO- d_6 , 300 MHz).



	H_3	H_5	H_6	H_7	H_8	H_{Ar}
7	5,04 (s)	2,54 (dd) $J_{5a-6} = 4,5$ $J_{5a-5b} = 17,3$	5,07 – 5,10 (m)	6,43 (dd) $J_{7-6} = 6,3$ $J_{7-8} = 16,1$	6,73 (d) $J_{8-7} = 16,1$	7,13 – 7,71 (m)
		2,66 (dd) $J_{5b-6} = 10,6$ $J_{5b-5a} = 17,3$				
8	5,08 (s)	2,58 (dd) $J_{5a-6} = 4,0$ $J_{5a-5b} = 17,2$	5,46 (dd) $J_{6-5} = 4,0$ $J_{6-5b} = 11,8$	-----	-----	7,34 – 7,48 (m)
		2,83 (dd) $J_{5b-6} = 11,8$ $J_{5b-5a} = 17,2$				
49	4,98 (s)	2,37 (dd) $J_{5a-6} = 4,1$ $J_{5a-5b} = 17,3$	4,25 – 4,34 (m)	1,84 – 2,09 (m)	2,60 – 2,81 (m)	7,17 – 7,32 (m)
		2,50 (dd) $J_{5b-6} = 11,7$ $J_{5b-5a} = 17,3$				

* os números indicam o deslocamento dos sinais em ppm.

Tabela 2.2: Identificação dos sinais obtidos por RMN ^1H para as lactonas obtidas após *O*-metilação (CDCl_3 , 300 MHz).



	H_3	4- OCH_3	H_5	H_6	H_7	H_8	H_{Ar}
1	5,19 (s)	3,76 (s)	2,54 (dd) $J_{5a-6} = 4,5$ $J_{5a-5b} = 17,1$ 2,66 (dd) $J_{5b-6} = 10,7$ $J_{5b-5a} = 17,1$	5,02 – 5,09 (m)	6,26 (dd) $J_{7-6} = 6,2$ $J_{7-8} = 16,0$	6,73 (d) $J_{8-7} = 16,0$	7,27 – 7,41 (m)
15	5,24 (s)	3,78 (s)	2,59 (dd) $J_{5a-6} = 4,0$ $J_{5a-5b} = 17,2$ 2,82 (dd) $J_{5b-6} = 12,0$ $J_{5b-5a} = 17,2$	5,42 (dd) $J_{6-5a} = 4,0$ $J_{6-5b} = 12,0$	-----	-----	7,32 – 7,43 (m)
2	5,06 (s)	3,65 (s)	2,22 (dd) $J_{5a-6} = 3,8$ $J_{5a-5b} = 17,0$ 2,43 (dd) $J_{5b-6} = 11,9$ $J_{5b-5a} = 17,0$	4,24 – 4,33 (m)	1,79 – 1,91 (m) 1,99 – 2,12 (m)	2,65 – 2,86 (m)	7,10 – 7,24 (m)

* os números indicam o deslocamento dos sinais em ppm.

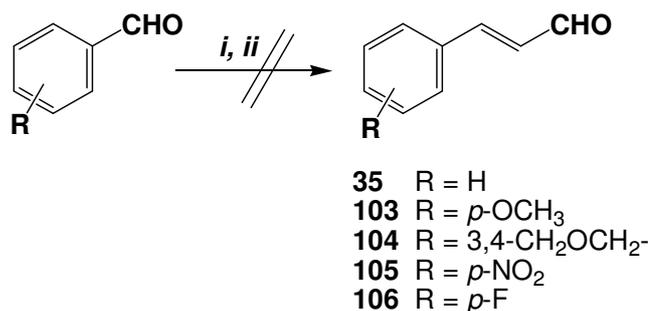
Os sinais dos hidrogênios H₅ aparecem em 2,2-2,8 ppm, na forma de duplos dupletos, devido ao acoplamento entre si e com H₆. Para as lactonas contendo o *spacer* de dois carbonos (**1**, **7**, **8** e **15**), o sinal de H₆ aparece como um multipletto, devido aos diferentes acoplamentos que ocorrem com este átomo. Já no caso das lactonas **8** e **15**, sem a presença de cadeia entre os anéis, o hidrogênio H₆ apresenta-se como um duplo duplo, com constantes de acoplamento que indicam a interação com os dois hidrogênios H₅.

A cadeia que liga os anéis lactônico e aromático, quando insaturada, apresenta os sinais de H₇ e H₈ em 6,3-6,7 ppm, característicos de hidrogênios vinílicos, com constantes de acoplamento em 16,0-16,1 Hz, demonstrando a interação em *trans* entre estes hidrogênios. Para **2** e **49**, com cadeia saturada, os sinais aparecem na região de 1,8-2,1 ppm para H₇ e 2,6-2,9 ppm para H₈. Na região de 7,1-7,7 ppm aparecem os sinais dos hidrogênios aromáticos. Para as lactonas *O*-metiladas, adicionalmente aparecem os sinais em 3,7-3,8 ppm referentes aos hidrogênios do grupo metoxila na posição 4.

2.2.2. Obtenção de análogos do cinamaldeído

Para obtenção de lactonas estruturalmente semelhantes à kavaína, foi proposta a síntese, a partir de derivados do benzaldeído, de análogos substituídos do cinamaldeído para posterior emprego na obtenção das lactonas. Em todas as reações foram empregados o benzaldeído, dois aldeídos com grupos doadores de elétron (3,4-metilenodioxicinamaldeído e 4-metoxibenzaldeído) e dois aldeídos com grupos retiradores de elétron (4-nitrobenzaldeído e 4-fluorbenzaldeído).

A primeira técnica empregada foi condensação aldólica clássica. A técnica consiste na reação de um aldeído não-enolisável (benzaldeído ou análogo) com um aldeído enolisável (acetaldeído), em meio básico (Esquema 2.27).



i: CH₃CHO, KOH; *ii*: HCl.

Esquema 2.27

Inicialmente realizou-se a adição de acetaldeído ao meio com aldeído e hidróxido de potássio. A adição de acetaldeído foi efetuada gota a gota, visando a minimizar reações paralelas, como a condensação entre moléculas de acetaldeído. Com o mesmo objetivo, outras estratégias foram empregadas, como a adição gota a gota do acetaldeído diluído em etanol e a adição do aldeído diluído ao meio contendo acetaldeído e base.

Outro problema que poderia prejudicar a reação seria a volatilidade do acetaldeído, o que foi contornado pela adição deste reagente com o meio resfriado a 0 °C. Como base, empregou-se hidróxido de potássio, testando-se três situações: pastilhas em meio etanólico, solução aquosa e solução etanólica. Alternativamente, empregou-se também a solução aquosa de hidróxido de sódio.

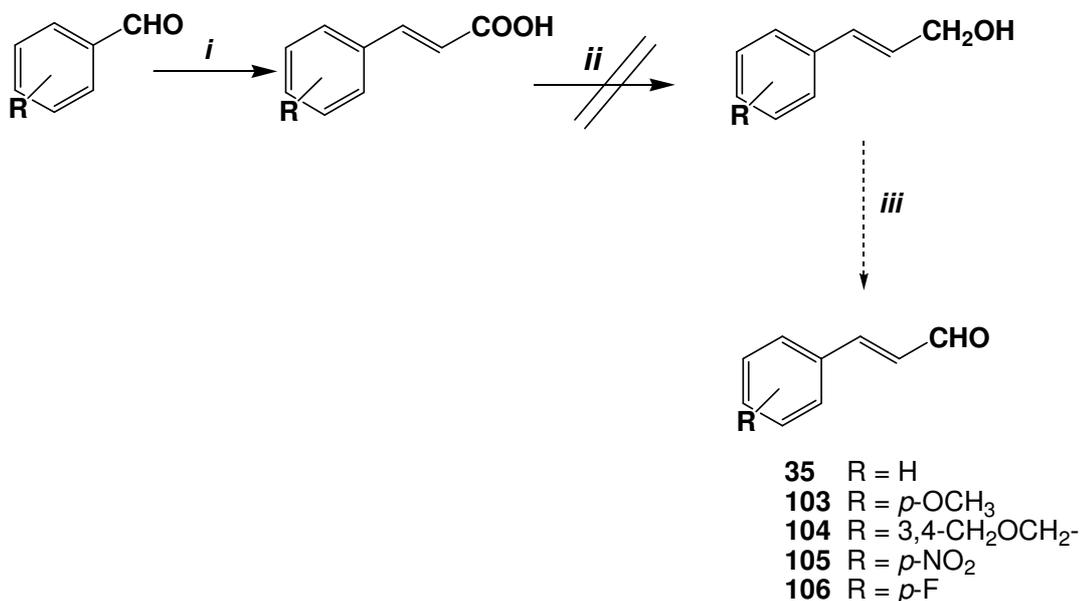
Estas condições foram realizadas com proporções equimolares ou duplicou-se a proporção molar de aldeído em relação ao acetaldeído e à base, a fim de deslocar o equilíbrio. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada, observando-se que os aldeídos contendo grupos desativadores diminuía o tempo da reação, por tornarem o carbono da carbonila mais eletrofílico.

Em nenhuma das condições empregadas permitiram a obtenção de quantidades de produtos que possibilitassem a identificação das moléculas e o cálculo dos rendimentos da reação. Quando foram obtidas quantidades razoáveis dos produtos brutos, diversas técnicas foram empregadas para purificação (centrifugação, extração, cromatografia em coluna, cristalização, precipitação forçada), sem sucesso. Assim, nas condições empregadas, a técnica de

condensação aldólica não se mostrou adequada para a síntese dos análogos do cinamaldeído, não permitindo a obtenção dos produtos com quantidade e pureza suficientes para fins de identificação e emprego na sequência de reações planejada.

Devido aos problemas apresentados com a condensação aldólica e os aldeídos acima citados, decidiu-se empregar a síntese dos aldeídos a partir de análogos substituídos do ácido cinâmico. A partir de análogos substituídos do benzaldeído, foram obtidos análogos do ácido cinâmico, por condensação de Knoevenagel, reação clássica e realizada com êxito.

Para obtenção do aldeído a partir do álcool, a primeira técnica empregada foi a redução dos ácidos para formação de alcoóis, empregando-se tetraidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4), em THF, para posterior oxidação do produto obtido com bióxido de manganês (MnO_2), em acetato de etila (Esquema 2.28)³⁶.



i: ácido malônico, dietilamina, piridina, refluxo, 1h;

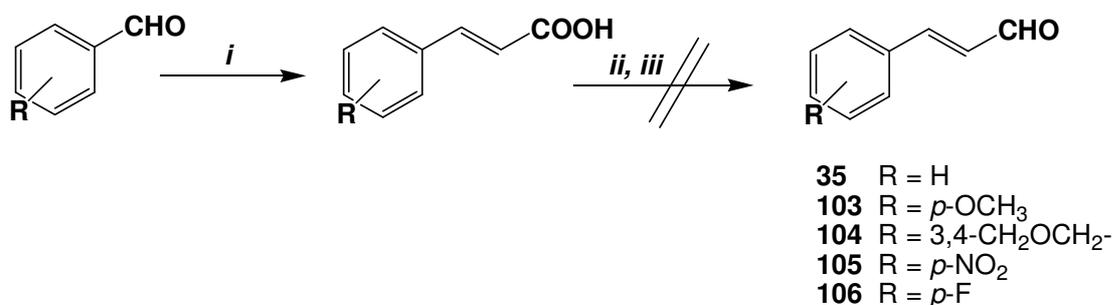
ii: LiAlH_4 , THF, 0 ° C, 1 h; *iii*: MnO_2 , acetato de etila, t.a.

Esquema 2.28

Para os ácidos utilizados, o acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada mostrou a ocorrência da mesma. Entretanto, a quantidade de produto foi insuficiente para a realização de isolamento e identificação.

Adicionalmente, foi observado na literatura que, para o ácido cinâmico, a reação com LiAlH_4 pode levar à redução da ligação α,β -insaturada, formando o álcool diidrocinâmico³⁷.

Decidiu-se empregar o protocolo desenvolvido por Cha e colaboradores³⁸, que consiste na redução oxidativa do ácido. O método inicia com a redução do ácido por NaBH_4 , seguindo-se tratamento com um ácido de Lewis $[(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4]$, gerando um aciloxiborano, que por sua vez converte-se em um trialcoxiborano. Este é oxidado a aldeído com piridiniumclorocromato (PCC), sem chegar à etapa de formação do álcool (Esquema 2.29).



i: ácido malônico, dietilamina, piridina, refluxo, 1h; *ii*: NaBH_4 , THF, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, T.A., over night; *iii*: PCC, diclorometano, refluxo, 6 h.

Esquema 2.29

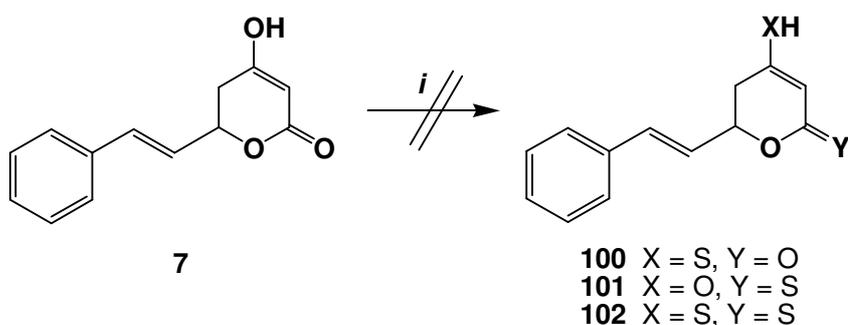
Como variáveis a serem analisadas, foram selecionadas as quantidades de NaBH_4 (1,0; 1,5 e 2,0 equivalentes), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ (1,0; 1,1 e 1,5 equivalentes) e PCC (1,1; 1,5 e 2,0 equivalentes). Depois de testadas as condições e combinações possíveis, foi observada a influência destes fatores no tempo de reação e no perfil de impurezas do produto bruto, observados por cromatografia em camada delgada, fixando-se a proporção 1,0:1,0:1,1 de NaBH_4 , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ e PCC. O PCC foi triturado em sílica, alumina ou silicato de magnésio, o que aumentaria sua superfície de contato, proporcionando melhores resultados e facilitando a purificação, conforme recomendação da literatura³⁹.

Na etapa final da oxidação, realiza-se uma adição de solvente no meio reacional, com posterior filtração por uma camada de sílica ou alumina. Foram

empregados como solvente éter etílico, acetato de etila e diclorometano. Os melhores resultados foram obtidos com diclorometano, que, por ser de menor polaridade, consegue filtrar primeiramente o produto menos polar, deixando retido na sílica ou alumina, as impurezas mais polares, que eram arrastadas anteriormente pelos outros dois solventes. Entretanto, como ocorrido com os experimentos para condensação aldólica, a dificuldade para purificação dos produtos impossibilitou o isolamento dos produtos para identificação.

2.2.3. Obtenção de bioisósteros das kavalactonas

Com a finalidade de obter um análogo tioenólico do composto **1**, tentou-se desenvolver protocolo com reagente de Lawesson, segundo método publicado em nosso laboratório⁴⁰ (Esquema 2.30). É importante ressaltar que, embora tenha sido planejada a tionação da hidroxila enólica na posição 4, dependendo das condições empregadas pode ocorrer a tionação do heteroátomo na posição 1 e do oxigênio da ligação C=O em 2.



i: reagente de Lawesson, refluxo, tolueno.

Esquema 2.30

Esta reação foi realizada com diferentes equivalentes molares do reagente de Lawesson (0,5; 1,0 e 1,5 equivalentes), sendo conduzida à temperatura ambiente durante uma noite. Entretanto, não foi possível a purificação do produto pela técnica empregada (cromatografia em coluna), possivelmente pela reversão da reação, obtendo-se um produto com perfil cromatográfico semelhante ao produto de partida.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Equipamentos e Técnicas

2.3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros foram analisados pelos deslocamentos químicos expressos em parte por milhão (ppm), sendo utilizado como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados foram CDCl_3 e DMSO-d_6 . As constantes de acoplamento estão representadas pela letra *J* e expressas em hertz (Hz). A análise das amostras foi realizada pelos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear Varian Inova[®] e Varian VNMR[®], ambos operando a 300 MHz, pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

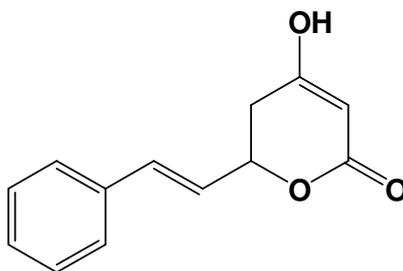
Em RMN de ^1H , as notações utilizadas para a multiplicidade dos picos foram as seguintes: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete). Para os sistemas AB, o hidrogênio mais desblindado foi representado por H_a e o mais blindado por H_b .

2.3.1.2. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros foram realizados no Espectrofotômetro de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) modelo Spectrum BXII marca Perkin Elmer, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As vibrações axiais e angulares foram expressas em cm^{-1} . As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr (2%).

2.3.2. Procedimento geral para aldolização/lactonização* :

A uma solução gelada (0 °C) de diisopropilamina (2,64 mL, 2,4 Eq.) em THF (30 mL), sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado *n*-butil-lítio (14,5 mL de uma solução 1,3 mol/L, 2,4 Eq.) a mistura reacional foi mantida sob agitação por 45 minutos a 0 °C. Acetato de etila (1 mL, 1 Eq.) foi adicionado gota a gota a 0 °C e, após 20 minutos, foi adicionado o aldeído correspondente (1,1 Eq.). Após 20 minutos de agitação a 0 °C, foi adicionada água gelada (30 mL), e a mistura foi levada à temperatura ambiente e mantida sob agitação por 3 horas. Efetuou-se uma extração com éter etílico (2 x 30 mL) e a fração aquosa foi acidificada até pH 1 com ácido clorídrico fumegante. Após cristalização a temperatura de 0 °C, o produto foi filtrado, lavado com água e seco em dessecador à vácuo.



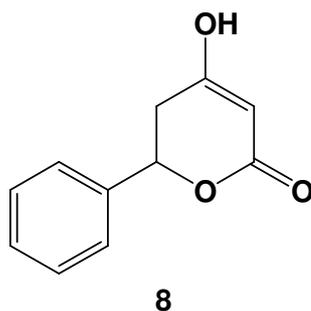
7

PF (°C): 98-106

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz, δ ppm): 2,54 (dd, 1H₅, *J* = 4,5; 17,3 Hz), 2,66 (dd, 1H₅, *J* = 10,6; 17,3 Hz), 5,04 (s, 1H₃), 5,07-5,10 (m, 1H₆), 6,43 (dd, 1H₇, *J* = 6,3; 16,1 Hz), 6,73 (d, 1H₈, *J* = 16,1 Hz), 7,13-7,71 (m, 5H_{Ar}).

IV (KBr, ν cm⁻¹): 1682, 1577, 1224 744, 690.

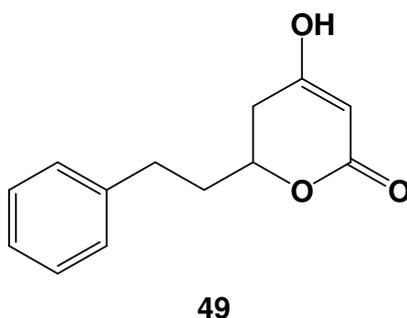
* Os solventes utilizados neste trabalho foram previamente purificados e destilados conforme PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L. Purification of Laboratory Chemicals, 3^a Ed., New York, pergamon Press, 1988, 391 p.



PF (°C): 122-132

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz, δ ppm): 2,58 (dd, 1H₅, *J* = 4,0; 17,2 Hz), 2,83 (dd, 1H₅, *J* = 5,1; 11,8 Hz), 5,08 (s, 1H₃), 5,46 (dd, 1H₆, *J* = 4,0; 11,8 Hz), 7,34-7,48 (m, 5H_{Ar}).

IV (KBr, ν cm⁻¹): 1577, 1284, 761, 698.



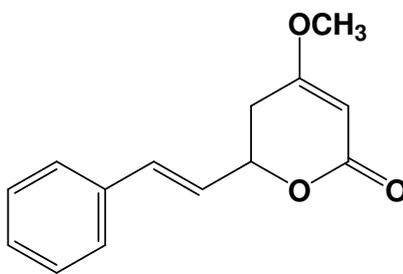
PF (°C): 92-98

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz, δ ppm): 1,84-2,09 (m, 2H₇), 2,60-2,81 (m, 2H₈), 2,37 (dd, 1H₅, *J* = 4,1; 17,3 Hz), 2,50 (dd, 1H₅, *J* = 11,7; 17,3 Hz), 4,25-4,34 (m, 1H₆), 4,98 (s, 1H₃), 7,17-7,32 (m, 5H_{Ar}).

IV (KBr, ν cm⁻¹): 1679, 1580, 1281, 747, 700.

2.3.3. Procedimento geral para O-metilação:

Em um balão contendo acetona, foram adicionados 200 mg da 4-hidroxi- δ -valerolactona (**7**, **8** ou **49**). Bicarbonato de potássio anidro (2 Eq.) e dimetilssulfato (2 Eq.) foi adicionados e a suspensão foi agitada a temperatura ambiente por uma noite. A mistura foi filtrada e lavada com acetato de etila, sendo o filtrado concentrado em evaporador rotatório. O produto filtrado foi purificado por cromatografia em coluna (Acetato de Etila/Hexano 50:50).

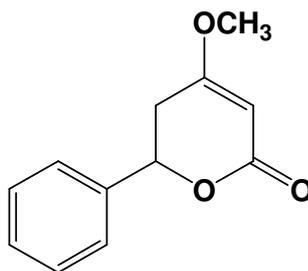


1

PF (°C): 141-143

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 2,54 (dd, 1H₅, $J = 4,5; 17,1$ Hz), 2,66 (dd, 1H₅, $J = 10,7; 17,1$ Hz), 3,76 (s, 3H_{4-OCH₃}), 5,02-5,09 (m, 1H₆), 5,19 (s, 1H₃), 6,26 (dd, 1H₇, $J = 6,2; 16,0$ Hz), 6,73 (d, 1H₈, $J = 16,0$ Hz), 7,27-7,41 (m, 5H_{Ar}).

IV (KBr, ν cm⁻¹): 1695, 1621, 1227, 748, 694.

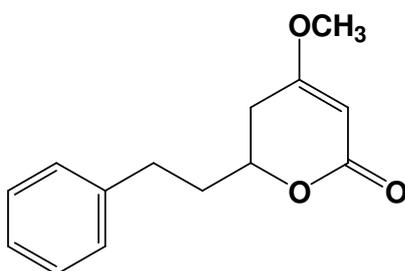


15

PF (°C): 143-145

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 2,59 (dd, 1H₅, *J*= 4,0; 17,2 Hz), 2,82 (dd, 1H₅, *J*= 12,0; 17,2 Hz), 3,78 (s, 3H_{4-OCH₃}), 5,24 (s, 1H₃), 5,42 (dd, 1H₆, *J*= 4,0; 12,0 Hz), 7,32-7,43 (m, 5H_{Ar}).

IV (KBr, ν cm⁻¹): 1706, 1618, 1229, 757, 677.



2

PF (°C): 75-78

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 1,79-1,91 (m, 1H₇), 1,99-2,12 (m, 1H₇), 2,22 (dd, 1H₅, *J* = 3,8; 17,0 Hz), 2,43 (dd, 1H₅, *J* = 11,9; 17,0 Hz), 2,65-2,86 (m, 2H₈), 3,65 (s, 3H_{4-OCH₃}), 4,24-4,33 (m, 1H₆), 5,06 (s, 1H₃), 7,10-7,24 (m, 5H_{Ar}).

IV (KBr, ν cm⁻¹): 1702, 1624, 1253, 747, 698.

2.3.4. Gerenciamento de resíduos

Os resíduos químicos líquidos foram coletados em frascos de 1 litro de bocal largo, distribuídos pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT). No começo da utilização, os mesmos foram rotulados, sendo preenchidas informações sobre o tipo de resíduo, a sala, o telefone, a data do início do envase, o responsável, a possibilidade ou não de purificação e o pH da solução. Os resíduos químicos sólidos foram armazenados em sacos plásticos transparentes e rotulados e enviados para aterro. As vidrarias de laboratório quebradas foram acondicionadas em caixa

de papelão resistentes a ruptura. As vidrarias limpas foram encaminhadas para reciclagem e as contaminadas para aterro como resíduo sólido. Os frascos foram preenchidos até oitenta por cento da capacidade, sendo armazenados e recolhidos periodicamente pela COSAT e encaminhados para destinação final conforme legislação vigente.

2.4. CONCLUSÕES

A literatura existente é rica em métodos para síntese de kavalactonas, sendo bastante diversificados os rendimentos obtidos em função da técnica empregada. Utilizando protocolo do nosso grupo de pesquisa, foi possível a obtenção da kavaína, da diidro-kavaína e de um análogo, através de técnicas rápidas e de fácil execução, obtendo-se bons rendimentos.

Os estudos visando à obtenção de análogos do cinamaldeído, para futuro emprego na obtenção de lactonas por condensação aldólica, não foram satisfatórios, devido à pouca pureza dos produtos. Novas alternativas deverão ser estudadas para que seja possível a síntese de análogos da kavaína contendo substituintes no anel aromático.

Embora a estratégia de bioisosterismo seja interessante do ponto de vista químico-medicinal, com o protocolo empregado não foi possível a obtenção dos análogos contendo enxofre. Desta forma, novos reagentes ou procedimentos experimentais devem ser estudados para que sejam viabilizados os tiocompostos análogos às kavalactonas, já que a maior lipofilia dos mesmos pode facilitar o acesso ao sistema nervoso central.

2.5. REFERÊNCIAS

1. KOSTERMANS, D. Synthesis of kawain. **Nature**, v. 166, p. 788-789, 1950.
2. KOSTERMANS, D. G. F. R. The synthesis of kawain. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 70, p. 79-82, 1951.
3. VISWANATHAN, K.; SWAMINATHAN, S. dl-Marindinin (Dihydrokawain) and some related 6-aryl-5,6-dihydro-4-methoxy-2-pyrones. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section A**, v. 52, p. 63-68, 1960.
4. KLOHS, M. W.; KELLER, F.; WILLIAMS, R. E. *Pyper methystium* Forst. II. The synthesis of dl-methysticin and dl-dihydromethysticin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 1829-1830, 1959.
5. PIANTADOSI, C.; SKULASON, V. Synthesis of some α,β -unsaturated β,δ -disubstituted δ -lactones. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 8, p. 902-905, 1964.
6. ISRAILI, H.; SMISSMAN, E. E. Synthesis of kavain, dihydrokavain, and analogues. **Journal of Organic Chemistry**, v. 41, n. 26, p. 4070-4074, 1976.
7. FOWLER, E. M. F.; HENBEST, H. B. Researches on acetylenic compounds. Part XXV. Synthesis of (\pm)-kawain. **Journal of the Chemical Society**, p. 3642-3645, 1950.
8. HARRIS, T. M.; COMBS, C. S. Synthesis of certain naturally occurring 2-pyrones via 3,5-diketo acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 2399-2402, 1968.
9. IZAWA, T.; MUKAIYAMA, T. A convenient method for the preparation of d-hydroxy- β -ketoesters and 6-alkyl-5,6-dihydro-2-pyrones. Application to the synthesis of kawain and dihydrokawain. **Chemistry Letters**, p. 161-164, 1975.
10. REFFSTRUP, T.; BOLL, P. M. The preparations of 4-hydroxy-5,6-dihydro-2-pyrones and their conversion to kava-lactones as well as to other precursors of naturally occurring 2-Pyrones. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 30, p. 613-618, 1976.

11. DZIADULEWICZ, E.; GILES, M.; MOSS, W. O.; GALLAGHER, T.; HARMAN, M. HURSTHOUSE, M. B. Synthesis and lithiation of γ,γ -difunctionalised ketene dithioacetals. Access to a new synthetic equivalent of $\alpha\beta$ -hydroxy- β -lithioacrylate. X-ray molecular structure of 2-(1,3-dithian-2-ylidenemethyl)-1,3-dithiane. **Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions I**, p. 1793-1798, 1989.
12. SPINO, C.; MAYES, N.; DESFOSSÉS, H. Enantioselective synthesis of (+)- and (-)-dihydrokavain. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 36, p. 6503-6506, 1996.
13. KAMAL, A.; KRISHNAJI, T.; KHANNA, G. B. R. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched kavalactones. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 8657-8660, 2006.
14. SMITH, T. E.; DJANG, M.; VELANDER, A. J.; DOWNEY, W.; CARROLL, K. A.; VAN ALPHEN, S. Versatile asymmetric synthesis of the kavalactones: First synthesis of (+)-kavain. **Organic Letters**, v. 6, n. 14, p. 2317-2320, 2004.
15. WANG, F. D.; YUE, J. M. Total synthesis of (*R*)-(+)-kavain via (MeCN)₂PdCl₂-catalyzed isomerization of a *cis* double bond and sonochemical Blaise reaction. **Synlett**, n. 13, p. 2077-2079, 2005.
16. WANG, F. D.; YUE, J. M. A total synthesis of (+)- and (-)-dihydrokavain with a sonochemical Blaise reactions as the key step. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 2575-2579, 2005.
17. SABITHA, G.; SUDHAKAR, K.; YADAV, J. S. Application of the Cosford cross-coupling protocol for the stereoselective synthesis of (*R*)-(+)-goniothalamine, (*R*)-(+)-kavain and (*S*)-(+)-7,8-dihydrokavain. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 8599-8602, 2006.
18. VILLANO, R.; ACOCELLA, M. R.; MASSA, A.; PALOMBI, L.; SCETTRI, A. A new procedure for the enantioselective vinylogous aldol reaction of Chan's diene. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 3332-3334, 2006.
19. RAJ, I. V. P.; SUDALAI, A. Asymmetric synthesis of (*S*)-vigabatrin[®] and (*S*)-dihydrokavain via cobalt catalyzed hydrolytic kinetic resolution of epoxides. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 2646-2648, 2008.
20. CASTELLINO, S.; SIMS, J. J. The total synthesis of (\pm)-kawain via a Hetero-Diels-Alder cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 37, p. 4059-4062, 1984.

21. TOGNI, A. Asymmetric Hetero Diels-Alder Reactions catalyzed by novel chiral vanadium(IV) bis(1,3-diketonato) complexes. **Organometallics**, v. 9, p. 3106-3113, 1990.
22. DU, H.; ZHAO, D.; DING, K. Enantioselective catalysis of the Hetero-Diels-Alder reaction between Brassard's diene and aldehydes by hydrogen-bonding activation: A one-step synthesis of (*S*)-(+)-dihydrokawain. **Chemistry – A European Journal**, v. 10, p. 5964-5970, 2004.
23. LIN, L.; CHEN, Z.; YANG, X.; LIU, X.; FENG, X. Efficient enantioselective Hetero Diels-Alder reaction of Brassard's diene with aliphatic aldehydes: a one-step synthesis of (*R*)-(+)-kavain and (*S*)-(+)-dihydrokawain. **Organic Letters**, v. 10, n. 6, p. 1311-1314, 2008.
24. PIERRES, C.; GEORGE, P.; VAN HIJFTE, L.; DUCEP, J. B.; HIBERT, M.; MANN, A. Polymer-supported electron-rich diene for Hetero Diels-Alder reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3645-3647, 2003.
25. HUCK, W. R.; MALLAT, T.; BAIKER, A. Heterogeneous enantioselective hydrogenation of 2-pyrones over cinchona-modified palladium. **New Journal of Chemistry**, v. 26, p. 6-8, 2002.
26. BU'LOCK, J. D.; SMITH, H. G. Pyrones. Part I. Methyl ethers of tautomeric hydroxy-pyrones and the structure of yangonin. **Journal of the Chemical Society**, p. 502-506, 1960.
27. POSPÍŠIL, J.; MARKÓ, I. E. Metathesis-based synthesis of 3-methoxy α,β -unsaturated lactones: Total synthesis of (*R*)-kawain and of the C1-C6 fragment of jerangolid D. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 1523-1526, 2008.
28. AMARAL, P. A.; GOUAULT, N.; LE ROCHE, M.; EIFLER-LIMA, V. L.; DAVID, M. Towards synthesis of kavalactone derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 6607-6609, 2008.
29. MORO, A. V.; CARDOSO, F. S. P.; CORREIA, C. R. D. Highly regio- and stereoselective Heck reaction of allylic esters with arenediazonium salts: application to the synthesis of kavalactones. **Organic Letters**, in press.
30. ACHENBACH, H.; HUTH, H. Synthese von dihydrokawain-5-ol. **Tetrahedron Letters**, v. 15, n. 1, p. 119-120, 1974.

31. FRIESEN, R. W.; VANDERWAL, C. Total synthesis of (\pm)-dihydrokawain-5-ol. Regioselective monoprotection of vicinal *syn*-diols derived from the iodocyclofunctionalization of α -allenic alcohols. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 9103-9110, 1996.
32. ARAI, Y.; MASUDA, T.; YONEDA, S.; MASAKI, Y.; SHIRO, M. Asymmetric synthesis of (+)-dihydrokawain-5-ol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 258-262, 2000.
33. SINGH, R. P.; SINGH, V. K. Facile one-step synthesis of β -alkoxy lactone via sequential lactonization and 1,4-addition of alkoxide group: total synthesis of all stereoisomers of dihydrokawain-5-ol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 3425-3430, 2004.
34. KAMAL, A.; KRISHNAJI, T.; REDDY, P. V. Enantioselective total synthesis of both the stereoisomers of dihydrokawain-5-ol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1775-1779, 2007.
35. AMARAL, P. A. **Síntese de derivados de kavalactonas**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.
36. ZHAO, Y.; HAO, X.; LU, W.; CAI, J.; YU, H.; SEVÉNET, T.; GUÉRITTE, F. Synthesis for Two Cytotoxic Synapyl Alcohol Derivatives and Isolation of Four New related Compounds from *Ligularia nelumbifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 6, p. 902-908, 2002.
37. The Reduction of specific Types of Organic Compounds. Em: **Reductions in Organic Chemistry**. p. 140-141, Ed. Ellis Horwood Limited, England, 1984.
38. CHA, J. S.; LEE, D. Y.; KIM, J. M. Reductive Oxidation of carboxylic Acids to Aldehydes with Sodium Borohydride and Pyridinium Chlorochromate. **Oppi Briefs**, v. 31, n. 6, p. 694-697, 1999.
39. Chromium-Based Reagents. Em: TOJO, G.; FERNANDEZ, M. **Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones**. p. 46-83.
40. EIFLER-LIMA, V. L.; URIAC, P.; HUET, J.; JENKINS, T. C.; THURSTON, D. Relationship between cytotoxicity and DNA-binding affinity of amidine derivatives of tetrahydroquino[4,3-*b*][1]benzazepines and tetrahydrobenzo[*k*]haphthyridines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 3003-3006, 1995.

**3. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO
DA AÇÃO ANSIOLÍTICA E
HIPNÓTICO-SEDATIVA DE
KAVALACTONAS E
ANÁLOGOS**

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa da kava-kava e das kavalactonas

Os estudos farmacológicos relativos à kava-kava vêm sendo realizados com a resina obtida das raízes da planta ou com as kavalactonas isoladas, incluindo testes *in vivo*^{1-8,17-19}, *in vitro*^{9-16,21} e ensaios clínicos²²⁻²⁴. Muitos destes estudos visam à elucidação do mecanismo de ação do extrato de kava-kava e das kavalactonas, sendo que alguns serão relatados a seguir.

Furguele e colaboradores¹ demonstraram que, em camundongos, os extratos aquosos de kava-kava reduziram a atividade locomotora espontânea em doses que não exerceram efeito na atividade locomotora forçada, avaliada em aparelho de rotarod. Os extratos reduziram a irritabilidade em ratos com lesões no septo bilateral e inibiram a resposta à esquivada condicionada. Os resultados encontrados sugerem que os efeitos observados podem ser atribuídos a outros componentes presentes na kava-kava, já que os extratos aquosos possuem baixo ou nenhum teor de kavalactonas.

Por outro lado, foi observado o efeito sedativo do extrato lipídico da kava-kava através do teste de potenciação do sono barbitúrico²⁻⁴. Klohs e colaboradores verificaram que o extrato de kava-kava e as kavalactonas isoladas aumentaram o tempo de sono induzido por pentobarbital, sendo este efeito mais marcante para a diidrometistina². Em outros estudos, a kava-kava diminuiu a latência e aumentou o tempo de duração do sono induzido por hexabarbital^{3,4}.

Dois estudos realizados em aves com o extrato de kava-kava empregaram o ensaio de estresse por separação para avaliar o efeito ansiolítico da kava-kava. No primeiro, o extrato atenuou a vocalização induzida por separação e a analgesia induzida por estresse, enquanto que das kavalactonas, somente a diidrokaína **2** exerceu alguma atividade, atenuando o primeiro parâmetro⁵. No outro estudo,

reforçou-se que o extrato de kava-kava não afeta a recumbência ventral, indicativo de propriedades sedativas. As amostras de extrato de kava-kava produziram um decréscimo na vocalização induzida por separação, sem afetar o estresse induzido por analgesia, sendo mais ativas aquelas contendo maior concentração de diidrokaivaína ²⁶.

Empregando-se o labirinto em cruz elevado com camundongos, observou-se um efeito agudo, do tipo ansiolítico, do extrato de kava-kava LI 150, com uma curva dose-resposta em forma de U invertido, o que é observado em ansiolíticos⁷. Em outro estudo, também com camundongos, o extrato de kava-kava apresentou propriedades do tipo ansiolíticas no labirinto em cruz elevado e na esquiiva condicionada, apresentando um efeito dose dependente. A potência nos dois ensaios foi semelhante, o que reforça a hipótese de que efeitos não se devem a uma ação única, mas foi significativamente menor que a do diazepam⁸. No mesmo estudo, os resultados obtidos no ensaio de atividade locomotora mostraram que a kava-kava causou uma ansiólise inicial, seguida da ação inibitória, com profunda depressão em altas doses. Adicionalmente, o extrato de kava-kava apresentou uma razão entre as potências sedativa/ansiolítica menor do que a do diazepam, o que pode sugerir que o extrato tenha um pequeno valor no tratamento da ansiedade, quando a sedação é desejável⁸.

3.1.1.1. Kava-kava, kavalactonas e neurotransmissão GABAérgica

Davies e colaboradores⁹ estudaram a interação das kavalactonas isoladas e do extrato com os receptores GABA_A, GABA_B e com o sítio benzodiazepínico. Neste estudo, não foi possível verificar uma interação significativa com estes receptores, ou a mesma não estava correlacionada com dados obtidos em experimentos *in vivo*, sendo atribuída à kava-kava uma ação não específica mediada pela membrana lipídica, proporcionada pela alta lipofilia das kavalactonas. Estudos com flumazenil, um antagonista benzodiazepínico, também ressaltaram a não ocorrência de interação da kava-kava com o sítio benzodiazepínico⁸.

Por outro lado, estudos com espectroscopia de correlação fluorescente evidenciaram a existência de uma ligação específica da (+)-kavaína **1a** com algum receptor do córtex cerebral, em mais de um sítio de ligação¹⁰. Jussofie e colaboradores¹¹ demonstraram que o extrato de kava-kava aumentou, de maneira dose-dependente, a ligação do agonista [³H]muscimol ao receptor GABA_A em diferentes regiões cerebrais de ratos, sem alteração na afinidade, sugerindo que as kavalactonas aumentam o número dos sítios de ligação deste receptor.

Boonen e Häberlein¹² verificaram um aumento da ligação da [³H]metocloreto de bicuculina ([³H]BMC) ao receptor GABA_A, após a administração de (+)-kavalactonas isoladas. A observação de que a atividade relaciona-se à estrutura química das moléculas permitiu concluir que ocorre uma interação específica destas moléculas com algum sítio de ligação. Novamente, a interação com o sítio benzodiazepínico foi descartada pelos pesquisadores.

Também foi observada uma ação inibitória do extrato de kava-kava e da (±)-diidro-kavaína **2**, parcialmente reversível por bicuculina, sobre a atividade tônica do núcleo trato solitário, mediada por GABA_A. No estudo, foi demonstrado que o sacoflen, um antagonista seletivo do receptor GABA_B, não antagonizou os efeitos inibitórios das kavalactonas sobre os neurônios cerebrais, reforçando a hipótese de não haver interação das moléculas com este receptor. O pré-tratamento com o extrato de kava-kava reduziu significativamente os efeitos inibitórios induzidos por GABA_A no núcleo trato solitário, indicando interações das kavalactonas com este receptor¹³.

Extratos de raízes e folhas de diferentes cultivares de kava-kava, com conteúdo variável de kavalactonas, foram testados em ensaios de radioligação e diferentes receptores cerebrais. Mostrou-se importante a interação com o sítio de ligação do GABA ao receptor GABA_A, com inibição da ligação do [³H]muscimol¹⁴.

A análise dos efeitos das kavalactonas na transmissão neuronal, permitiu observar uma estabilidade no potencial de membrana, após adição de (±)-kavaína **1**, reforçada por modificações no potencial inibitório pós-sináptico após estimulação do estriado, fatores que podem ser atribuídos a um forte componente GABAérgico¹⁵.

3.1.1.2. Kava-kava, kavalactonas e neurotransmissão monoaminérgica

Além dos receptores GABA_A e GABA_B, foi investigada a ação da kava-kava e das kavalactonas sobre outros neurotransmissores. Seitz e colaboradores¹⁶ observaram que, em altas concentrações, as kavalactonas inibiram significativamente a recaptação neuronal de noradrenalina, mas não tiveram ação sobre a recaptação de serotonina. Os estudos também demonstraram uma melhor ação da (+)-kavaína **1a** e (±)-kavaína **1** em relação à (+)-metisticina **3a** sugerindo também que não há influência da estereoquímica sobre a atividade das moléculas.

Boonen e colaboradores¹⁷ avaliaram os efeitos da (±)-kavaína **1** e (+)-diidrometisticina **3** nos níveis de dopamina, serotonina, e seus metabólitos (inclusive taxa de renovação), nas regiões estriatais e corticais do cérebro de ratos. Administrando-se (+)-diidrometisticina **3** em altas doses (100 mg/kg v.o.) e (±)-kavaína **1** em uso crônico, não ocorreram mudanças significativas.

Estudos avaliaram a ação do extrato de kava-kava e das kavalactonas sobre os níveis extraneuronais de neurotransmissores no núcleo acumbens de ratos. A administração do extrato em altas doses (220 mg/kg i.p.) causou decréscimo nos níveis de dopamina com aumento nas concentrações de DOPAC em alguns ratos, enquanto outros reagiram com aumento na dopamina sem alterações de DOPAC, possivelmente existindo um limiar para que ocorram as diferentes sensibilidades. Das kavalactonas isoladas, somente (±)-kavaína **1** (30 mg/kg i.p.) e yangonina **5** (120 mg/kg i.p.) exerceram algum efeito, diminuindo os níveis de dopamina. No caso da serotonina, kavaína **1** causou decréscimo nos níveis, enquanto desmetoxyangonina **6** causou diminuição ou aumento nos níveis deste neurotransmissor¹⁸.

O'Hara, Kinnard e Buckley¹⁹ demonstraram, em úteros de ratas, um antagonismo serotoninérgico por diidrometisticina **4** e desmetoxyangonina **6**, porém o extrato de kava-kava não alterou as concentrações cerebrais deste neurotransmissor. Schelosky e colaboradores²⁰ observaram um possível antagonismo dopaminérgico que justificaria o efeito sedativo do extrato de kava-kava.

Estudos utilizando a kavaína **1** e a diidrometisticina **4** demonstraram que as mesmas reduziram a frequência da ocorrência de alterações no potencial de campo induzida por omissão do íon magnésio extracelular, no hipocampo, de modo dose-dependente, além de apresentarem efeitos aditivos com a ipsapirona, um agonista 5-HT_{1A} que exerce efeitos ansiolíticos²¹.

3.1.1.3. Atividade ansiolítica de outras estirilpironas e diidroestirilpironas

A espécie *Polygala sabulosa* Bennett, do gênero *Polygalaceae*, apresentou em sua constituição a presença de diidroestirilpironas e estirilpironas com estrutura muito semelhante às kavalactonas (Figura 3.1): DST 1 (**103**), DST 2 (**104**), DST 3 (**105**), STY 4 (**106**), STY 5 (**107**), STY 6 (**108**) e STY 7 (**109**).

Estudos com modelos animais avaliaram os efeitos psicofarmacológicos de *P. sabulosa* de **103**, **104**, **105**, **106**, **107** e **109**. No labirinto em cruz elevado, o efeito do tipo ansiolítico foi observado para o extrato bruto, para a fração acetato de etila (rica em estirilpironas e diidroestirilpironas) e para **103**, **105**, **106** e **109**. Nos testes de potenciação do sono barbitúrico e de indução de sono por éter etílico, foi observado um efeito depressor do sistema nervoso central, também devido à presença das estirilpironas e diidroestirilpironas. Os resultados obtidos no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol e na avaliação da temperatura retal evidenciaram um efeito anticonvulsivante do extrato e da fração acetato de etila²⁵.

Foi demonstrado que as ações de *P. sabulosa* envolvem, pelo menos parcialmente, a participação do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Desta maneira, observou-se que o flumazenil promoveu um bloqueio parcial dos efeitos de **105**, **106** e **109** no labirinto em cruz elevado. No ensaio de radioligação, todas as estirilpironas e diidroestirilpironas foram capazes de deslocar a ligação do [³H]flunitrazepam em diferentes magnitudes, sendo que **104**, **105**, **106**, **107** e **109** exibiram uma moderada afinidade ao sítio benzodiazepínico na ordem de micromolar²⁶.

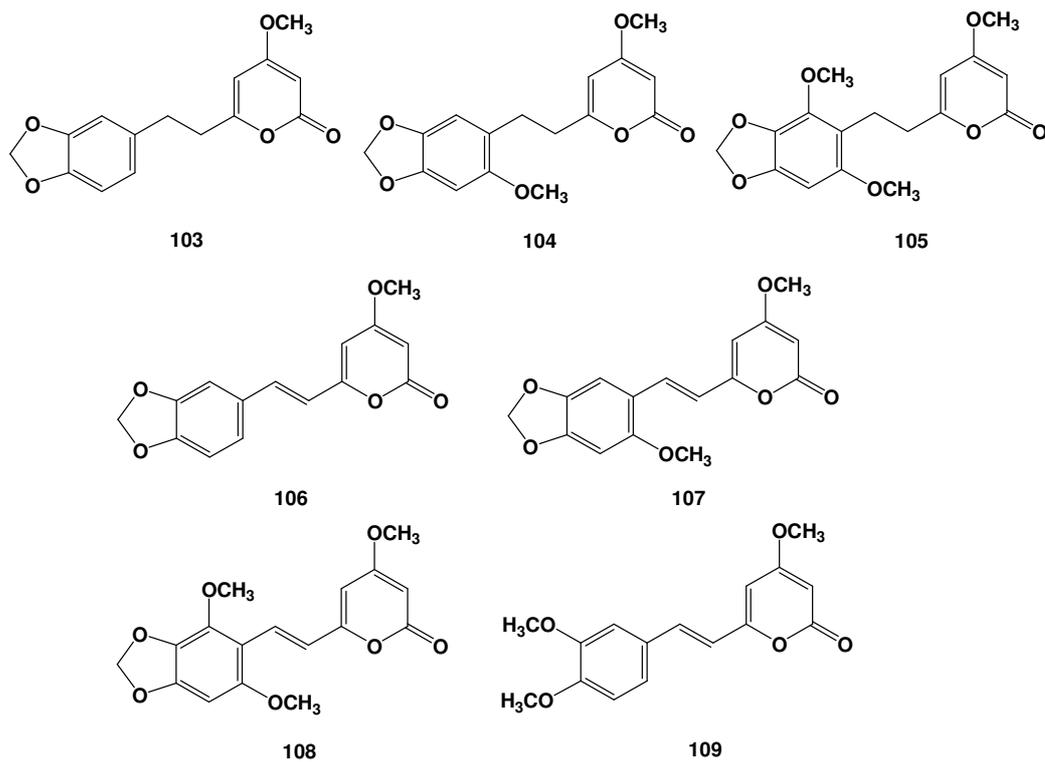


Figura 3.1: Estirilpironas de *Polygala sabulosa*.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Substâncias-teste

Para os ensaios de avaliação farmacológica, foram selecionadas quatro das seis lactonas sintetizadas^{*}: **7**, kavaína **1**, **15** e diidro-kavaína **2**, doravante chamadas pelos seus códigos em nosso laboratório de LaSOM 1, LaSOM 29, LaSOM 40 e LaSOM 76, respectivamente (Figura 3.2). A seleção foi baseada em ensaios preliminares de nosso grupo de pesquisa e dados da literatura, conforme discutidos anteriormente. Os análogos foram obtidos por síntese química, através de metodologia descrita no capítulo anterior.

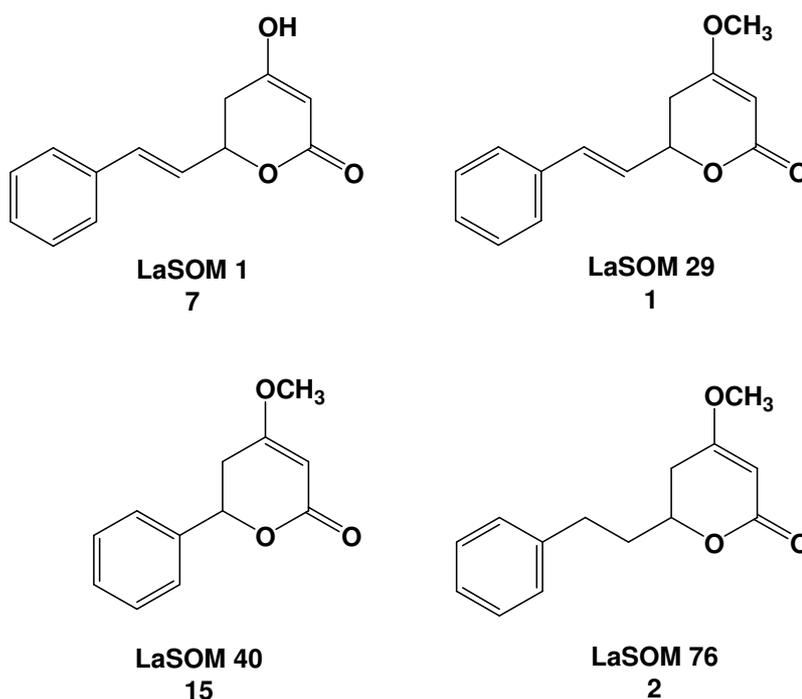


Figura 3.2: Lactonas selecionadas para avaliação farmacológica.

* As moléculas sintetizadas em nosso laboratório e submetidas à avaliação farmacológica são codificadas como LaSOM seguida de um número (previamente determinado). Esta é a nomenclatura doravante empregada nesta parte do manuscrito.

3.2.2. Ensaios comportamentais

3.2.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos, CF1, machos e adultos (20-30 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Antes dos experimentos, os animais passaram por uma adaptação de no mínimo 72 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS, em caixas plásticas de 17x28x13 cm, com no máximo 10 animais em cada caixa. Os camundongos foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante (23 ± 1 ° C), sob sistema de exaustão e umidade monitoradas, com acesso livre à água e alimento. Os experimentos foram realizados no período das 12 às 16 horas, ocorrendo uma adaptação dos animais, de no mínimo uma hora, à sala de experimentação.

3.2.2.2. Tratamentos

Os animais receberam os tratamentos por via intraperitoneal, sendo o volume de administração igual a 1 mL/100 g. A dose utilizada corresponde a 30 mg/kg da substância testada, escolhida com base em dados de literatura e em dados para análogos pelo nosso grupo de pesquisa²⁷. As substâncias foram suspensas com 5% de polissorbato 80 (Tween 80[®]), sendo que para LaSOM 1 a suspensão mostrou-se heterogênea, enquanto que as demais suspensões foram homogêneas. A droga empregada como controle positivo foi diazepam (1mg/kg), também suspenso com 5% de polissorbato 80 em solução salina. O controle negativo utilizado foi solução salina contendo 5% de polissorbato 80. Para auxiliar na preparação das amostras, utilizou-se o auxílio de aparelho de ultra-som. Foram empregados de 8 a 12 animais por experimento, baseando-se em trabalhos já realizados pelo grupo de pesquisa^{28,29}.

3.2.2.3. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado³⁰⁻³² foi o modelo escolhido para identificação de substâncias com potencial atividade ansiolítica. Consiste de dois braços abertos (30x10 cm com borda de proteção de 1 cm) e de dois braços fechados (30x10x15 cm) dispostos perpendicularmente aos braços abertos, em forma de cruz grega, elevado a uma altura aproximada de 50 cm do chão (Figura 3.3).



Figura 3.3: Labirinto em cruz elevado.

Os diferentes tratamentos (salina, diazepam e kavalactonas/análogos) foram administrados aos animais pela via intraperitoneal e, 30 minutos após, os animais foram posicionados no centro do labirinto, voltados para o braço aberto e observados durante 5 minutos, por dois observadores independentes (Figura 3.4). Foram determinados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (BA) e fechados (BF), o número de *rearings* (episódios em que os animais se encontram apoiados apenas pelas patas traseiras) e o número de comportamentos de avaliação de risco (quando o animal encontra-se no braço fechado, mas estica o corpo e direciona a cabeça em direção ao braço aberto do labirinto, podendo colocar uma, duas ou até três patas no braço aberto e voltando à

posição original). O aparato foi limpo com álcool (96 °GL) após a avaliação de cada animal e todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra.

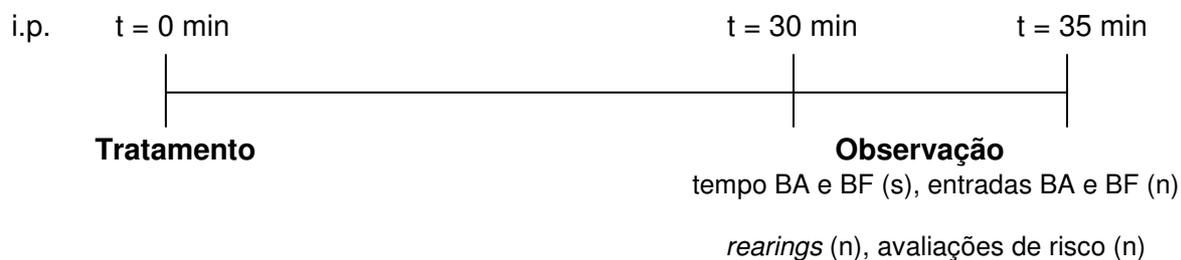


Figura 3.4: Esquema empregado para avaliação do efeito ansiolítico através do labirinto em cruz elevado.

Para análise dos resultados foram considerados os valores absolutos (tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados), bem como os respectivos valores percentuais individuais, descontando-se o tempo gasto no centro do labirinto³³, conforme equações abaixo:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| (1) $\%TBA = (TBA \times 100) / TT$ | (3) $\%EBA = (EBA \times 100) / ET$ |
| (2) $\%TBF = (TBF \times 100) / TT$ | (4) $\%EBF = (EBF \times 100) / ET$ |

Onde: %TBA = percentual de tempo de permanência nos braços abertos; %TBF = percentual de tempo de permanência nos braços fechados; TBA = tempo de permanência nos braços abertos; TBF = tempo de permanência nos braços fechados; TT = tempo total de exploração dos braços (TBA+TBF); %EBA = percentual de entradas nos braços abertos; %EBF = percentual de entradas nos braços fechados; EBA = número de entradas nos braços abertos; EBF = número de entradas nos braços fechados; ET = número total de entradas (EBA+EBF).

Para a análise dos valores absolutos de tempo de permanência, entradas, rearings e avaliações de risco, empregou-se ANOVA de uma via utilizando-se o teste *post hoc* de Student Newman Keulls. Quando os dados não apresentaram distribuição normal e/ou as variâncias entre os grupos não forem homogêneas, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação *post hoc* de Dunn. Para análise dos valores percentuais (tempo de permanência e entradas), realizou-se a comparação das medianas através do teste

de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação *post hoc* de Dunn. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

3.2.2.4. Teste de potenciação do sono barbitúrico

A fim de avaliar um possível efeito sedativo, que poderia estar acompanhando o efeito ansiolítico, as substâncias que apresentaram alterações estatisticamente significativas no labirinto em cruz elevado foram submetidas ao teste de potenciação do sono barbitúrico³⁴.

Os animais receberam os diferentes tratamentos (salina, diazepam e kavalactonas/análogos) pela via intraperitoneal e, após 30 minutos, receberam uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg). Foram então observados e avaliados os parâmetros latência e duração do sono, determinados pela perda e retomada do reflexo postural, estabelecendo-se um *cut off* de 240 minutos como valor máximo de tempo sono (Figura 3.5).

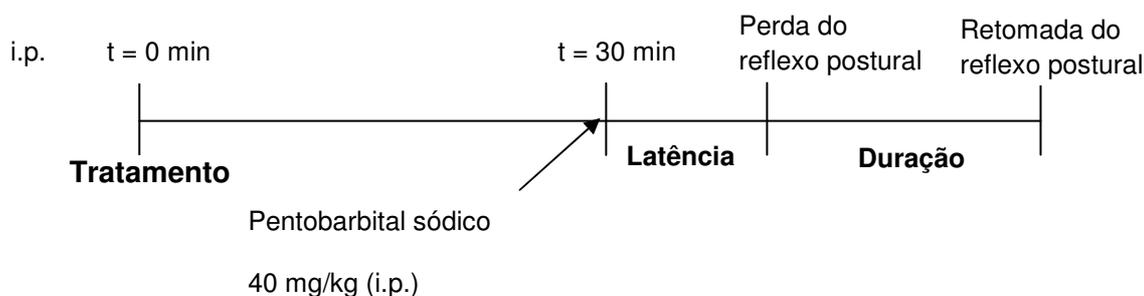


Figura 3.5: Esquema empregado para avaliação do efeito sedativo através do teste de potenciação do sono barbitúrico.

Os parâmetros latência e duração foram expressos em minutos. Para a análise utilizou-se ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Student-Newmann-Keulls. Quando os dados não apresentaram distribuição normal e/ou as variâncias entre os grupos não foram homogêneas, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação *post hoc* de Dunn.

3.2.2.5. Avaliação da atividade locomotora espontânea (teste de exposição ao campo aberto)

Para as substâncias que ocasionaram modificações nos parâmetros de comportamento exploratório, quando avaliadas no labirinto em cruz elevado, realizou-se teste de exposição ao campo aberto³⁴. Utilizou-se uma caixa de acrílico transparente, medindo 40x 30x30 cm, com o fundo dividido em 24 quadrantes iguais, com observação e contagem manual (Figura 3.6).

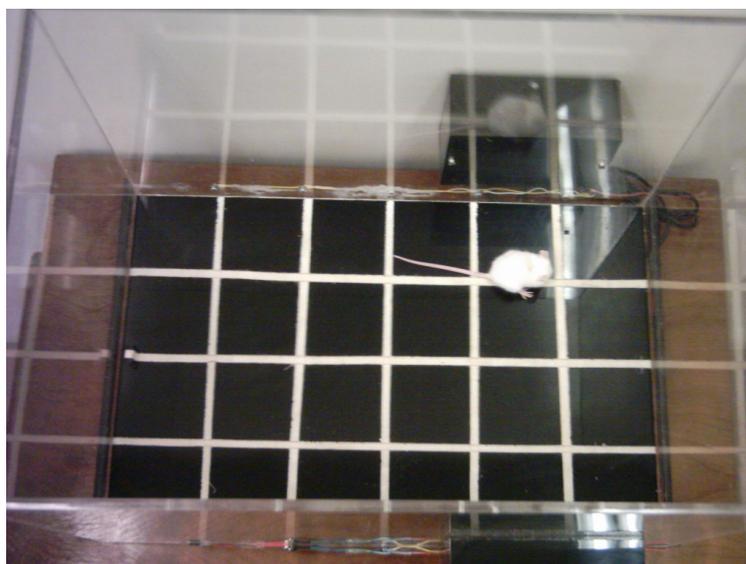


Figura 3.6: Teste de exposição ao campo aberto.

Os camundongos receberam os diferentes tratamentos (salina e kavalactonas/análogos) por via intraperitoneal e, 30 minutos após, foram colocados no centro do aparato. Após um período de 5 minutos para ambientação no aparato, os animais foram observados por 5 minutos. Neste período, foram registrados os parâmetros: *crossings* (cruzamentos entre os quadrantes delimitados no fundo do aparato); *rearings* (episódios em que os animais levantam o corpo apoiando-se apenas pelas patas traseiras); *groomings* (comportamentos de auto-limpeza); número de bolos fecais (Figura 3.7). O aparato foi limpo com etanol 96 °GL entre um animal e outro.

Os resultados foram expressos como número absoluto. Para análise da contagem total de cada parâmetro, utilizou-se ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* Student-Newmann-Keulls. Também foi utilizado Kruskall-Wallis, quando falharam a normalidade, a variância entre os grupos ou, especialmente, para avaliação do número de *rearings* e *groomings*.

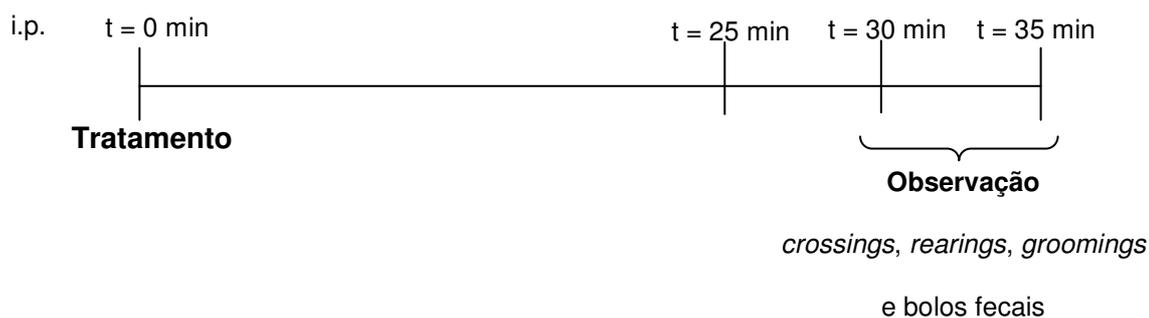


Figura 3.7: Esquema empregado para avaliação do efeito sobre a atividade locomotora através do teste de exposição ao campo aberto.

3.2.3. Ensaios de radioligação

As mesmas substâncias que foram avaliadas em ensaios comportamentais (LaSOM 1, LaSOM 29, LaSOM 40 e LaSOM 76) foram submetidas a ensaios de radioligação, através do deslocamento da ligação de [³H]flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, coordenado pelo Prof. Dr. François G. Noël.

Após decapitação, o cérebro de cada rato foi removido e homogeneizado em aparelho de Potter a 4 °C em quinze volumes de uma solução gelada de sacarose 0,32 M (pH 7,4). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 100.000 g por dez minutos, sendo o sobrenadante posteriormente a 48.000 g por vinte minutos. Os sinaptossomas crus obtidos foram ressuspensos em 50 mM de tampão Tris-HCl 25

mM (pH = 7,4 a 4 °C) tampão Krebs e armazenados a -80 °C até o momento da sua utilização. A concentração de proteínas da suspensão final foi determinada pelo método de Bradford.

Os sinaptossomas (15,21 mg/mL de proteína) foram incubados a 4 °C por noventa minutos em uma solução de tampão Krebs contendo 0,25 nM de [³H]-flunitrazepam (84,5 Ci/mmol). Após a incubação, as amostras foram rapidamente diluídas com 3 ml de uma solução gelada de tampão Krebs e imediatamente filtradas em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak, Alemanha), sob vácuo. Os filtros foram lavados três vezes com 3 ml de tampão, secos, imersos em líquido de cintilação (0,1 g/L de 1,4-bis [2-(5-feniloxazol)]-benzeno [POPOP] e 4,0 g/L de 2,5-difeniloxazol [PPO] em tolueno) e a radioatividade retida nos filtros foi medida em cintilômetro Packard Tri-Carb 1600 TR. Os experimentos foram realizados em triplicata, nas concentrações de 5 e 50 µM para as substâncias-teste e a ligação não-específica foi determinada utilizando-se uma solução 50 µM de flunitrazepam.

3.2.4. Considerações éticas

A manipulação animal foi realizada segundo os princípios éticos relatados por Goldim³⁵ e as normas do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS)³⁶, do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC)³⁷, da Resolução 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV)³⁸ e da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008³⁹. Após o término dos experimentos, o sacrifício dos camundongos foi efetuado por deslocamento cervical. A carcaça animal, acondicionada em embalagem plástica adequada e conservada em freezer a -20 °C, foi recolhida pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Porto Alegre. Os protocolos experimentais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (processo nº 2007939, aprovado na reunião nº 34, ata nº 114, de 4/9/2008).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Avaliação da atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa das lactonas sintetizadas

3.3.1.1. Labirinto em cruz elevado

Durante a avaliação pelo labirinto em cruz elevado, LaSOM 1 (7), um análogo da kavaína sem o grupo *O*-metil na posição 4, não apresentou uma redução significativa do número de entradas nos braços fechados ($F_{2,35} = 6,958$, $p < 0,05$) acompanhada de um aumento no tempo de permanência nos braços abertos ($F_{2,35} = 3,401$, $p < 0,05$) (Figura 3.8). Quando a análise estatística é feita com valores percentuais, não se observa alterações na exploração e tempo de permanência de nenhum dos braços por parte de LaSOM 1 (Figura 3.9).

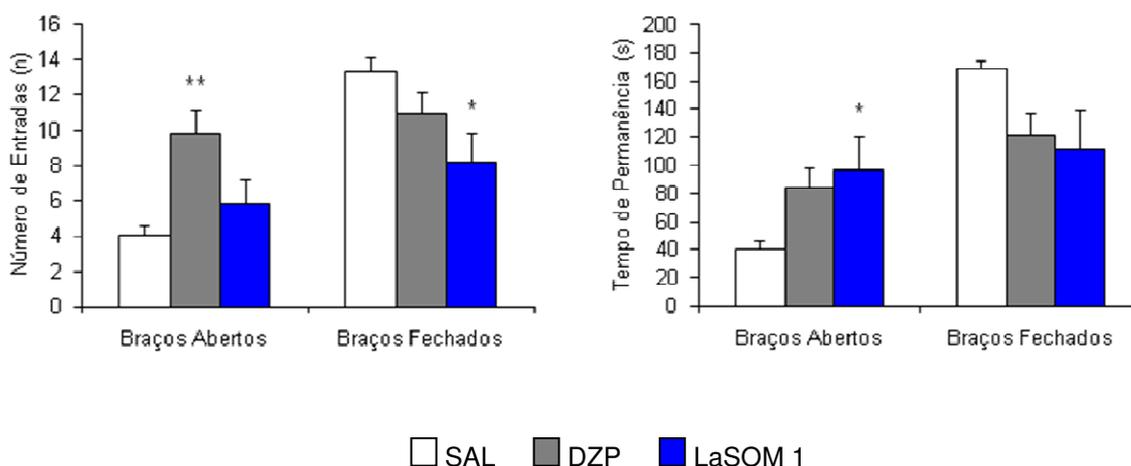


Figura 3.8: Efeito de LaSOM 1 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 1 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como médias + desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por ANOVA, seguida de Student Newmann Keuls. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

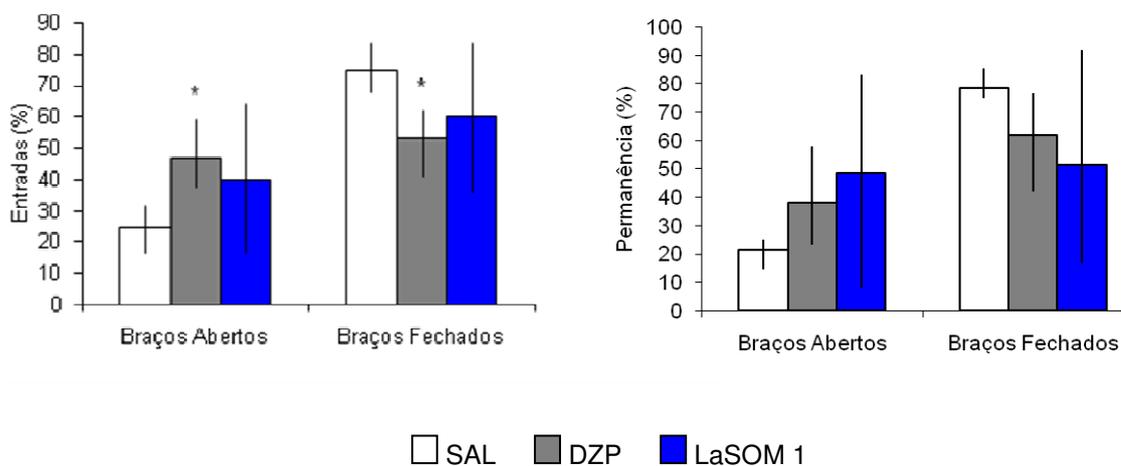


Figura 3.9: Efeito de LaSOM 1 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 1 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como mediana e intervalos quartis. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn. * $p < 0,05$.

Para a kavaína, aqui denominada LaSOM 29 (1), não foram observadas mudanças nos parâmetros avaliados, tanto em valores absolutos quanto em valores percentuais (Figuras 3.10 e 3.11).

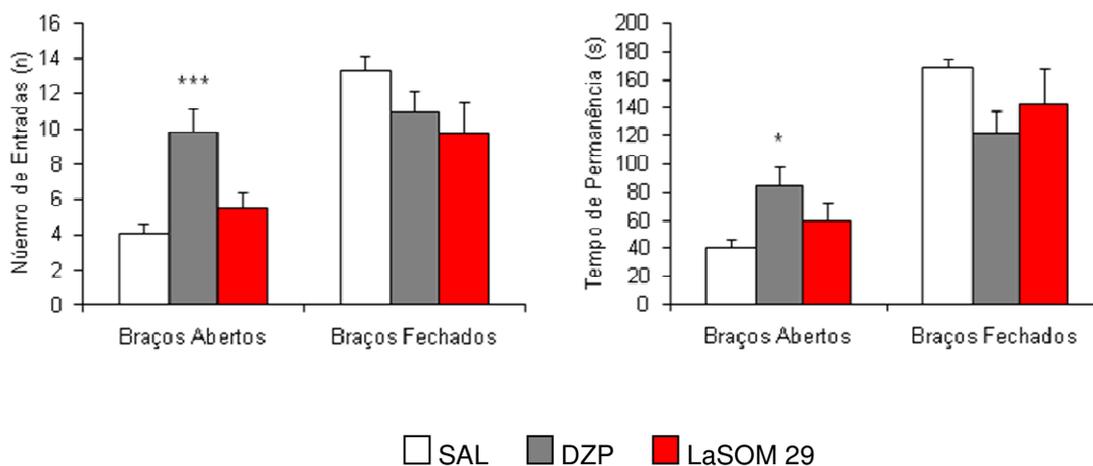


Figura 3.10: Efeito de LaSOM 29 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 29 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como médias + desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por ANOVA, seguida de Student Newman Keuls. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

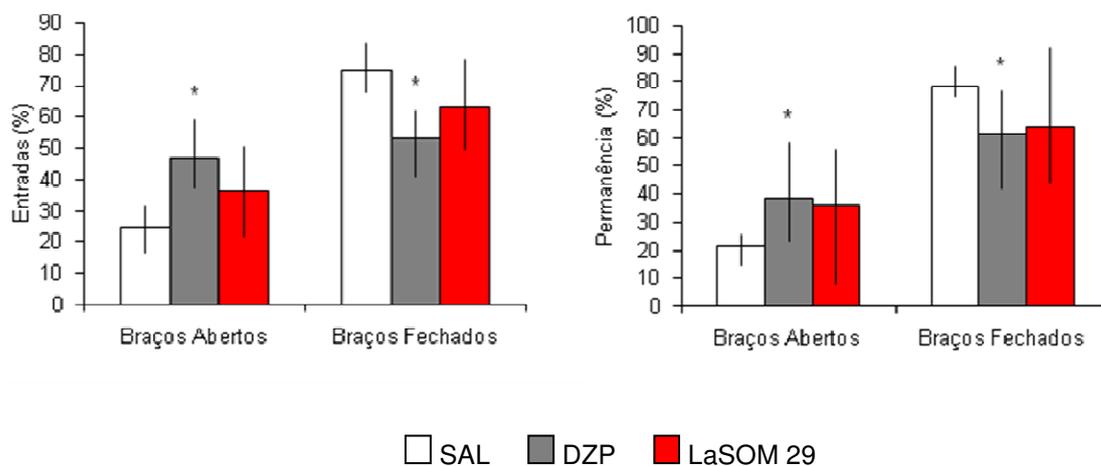


Figura 3.11: Efeito de LaSOM 29 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 29 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como mediana e intervalos quartis. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn. *p<0,05.

A administração de LaSOM 40 (15), que não contém o grupo etileno unindo os dois anéis, não ocasionou mudanças significativas nos parâmetros avaliados, tanto em valores absolutos quanto em valores percentuais (Figuras 3.12 e 3.13).

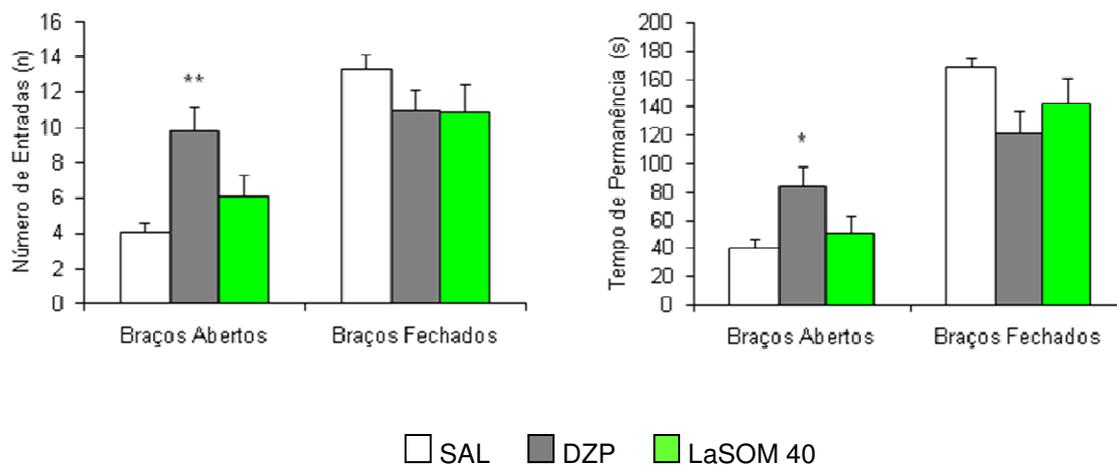


Figura 3.12: Efeito de LaSOM 40 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 40 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados

expressos como médias + desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por ANOVA, seguida de Student Newman Keuls. **p<0,01; *p<0,05.

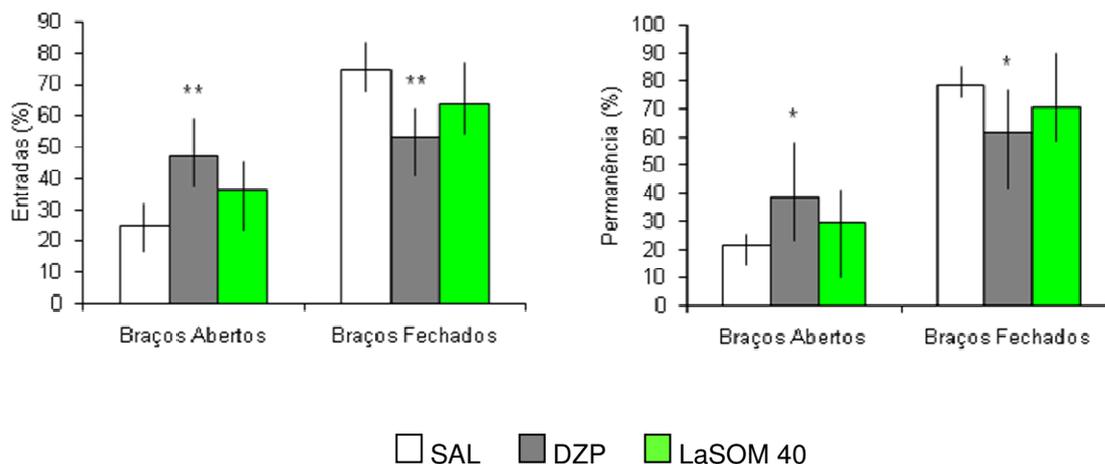


Figura 3.13: Efeito de LaSOM 40 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 40 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como mediana e intervalos quartis. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn. *p<0,05.

A diidrokaína, aqui denominada LaSOM 76 (2), causou um aumento significativo no número de entradas ($F_{2,35} = 7,66$, $p<0,05$) e no tempo de permanência ($F_{2,35} = 5,154$, $p<0,05$) nos braços abertos, acompanhados de redução significativa no tempo de permanência nos braços fechados ($F_{2,35} = 5,842$, $p<0,01$) (Figura 3.14).

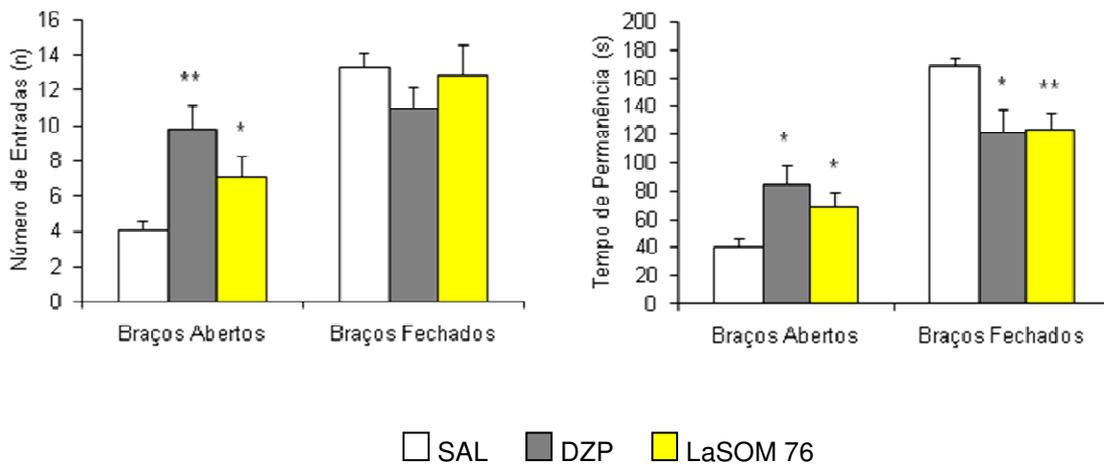


Figura 3.14: Efeito de LaSOM 76 no labirinto em cruz elevado, em valores absolutos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 76 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como médias + desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por ANOVA, seguida de Student Newmann Keuls. **p<0,01; *p<0,05.

Em valores percentuais, ocorreu um aumento significativo no percentual de permanência nos braços abertos ($H_{5,35} = 9,924$, $p < 0,01$), sem alteração nos outros parâmetros (Figura 3.15).

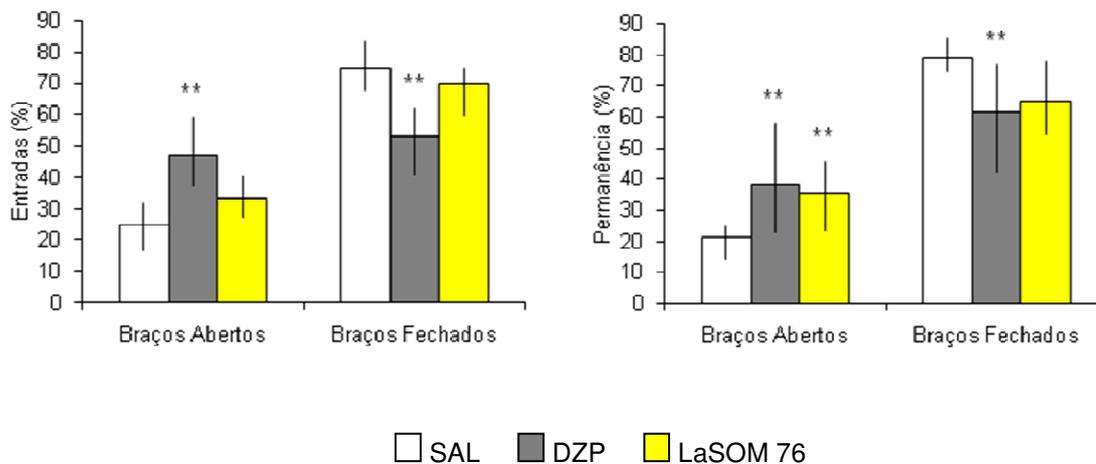


Figura 3.15: Efeito de LaSOM 76 no labirinto em cruz elevado, em valores percentuais. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 76 (30 mg/kg i.p., n = 12). Resultados expressos como mediana e intervalos quartis. Diferenças estatisticamente

significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn. ** $p < 0,01$.

Para nenhuma das substâncias avaliadas foram observadas alterações significativas nos parâmetros comportamento exploratório total (número total de entradas), *rearings* e avaliação de risco.

3.3.1.2. Teste de potenciação do sono barbitúrico

A fim de avaliar o perfil depressor do sistema nervoso central, na mesma dose utilizada no ensaio para avaliação da atividade ansiolítica, submeteu-se LaSOM 76 (2) ao teste de potenciação do sono barbitúrico. Conforme pode ser observado na Tabela 3.1, não ocorreram modificações significativas nos parâmetros latência e duração do sono.

Tabela 3.1: Efeito de LaSOM 76 na latência e duração do sono, induzido por pentobarbital (40 mg/kg i.p.). Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 76 (30 mg/kg i.p., n = 12).

	Latência (min) ^a	Duração do Sono (min) ^b
SAL (n = 11)	6,0 (4,0-6,0)	29,2 ± 14,8
DZP (n = 10)	2,5 (2,0-3,0) ^{***}	131,0 ± 15,8 ^{###}
LaSOM 76 (n = 9)	7,0 (5,0-7,2)	27,0 ± 9,3

^aResultados expressos como mediana (intervalos quartis). Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn. *** $p < 0,001$.

^bResultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle (SAL), determinadas por ANOVA, seguida de Student Newmann Keuls. ### $p < 0,001$.

Em nossos experimentos, LaSOM 76 (2), quando administrado na mesma dose que proporciona um perfil do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, não apresentou alterações na latência e duração do sono induzidos por pentobarbital.

3.3.1.3. Avaliação da atividade locomotora espontânea (teste de exposição ao campo aberto)

Considerando que os parâmetros no labirinto em cruz elevado poderiam ter sido alterados por influência na atividade locomotora, avaliou-se LaSOM 1 (7) e LaSOM 76 (2) no teste de exposição ao campo aberto. Os resultados mostram que as duas substâncias não alteraram significativamente nenhum dos parâmetros observados (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Efeito de LaSOM 1 e LaSOM 76 nos parâmetros de atividade locomotora). Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100 g i.p., n = 13), DZP (diazepam 1 mg/kg i.p., n = 11) e LaSOM 76 (30 mg/kg i.p., n = 12).

	Crossings ^a	Rearings ^a	Groomings ^a	Bolos Fecais ^b
SAL (n = 9)	66,1 ± 33,2	13,3 ± 10,6	7,4 ± 5,0	4 (0,8-4,2)
LaSOM 1 (n = 10)	69,5 ± 21,4	14,6 ± 7,5	9,1 ± 2,9	2 (0,0-3,0)
LaSOM 76 (n = 10)	89,7 ± 25,7	18,6 ± 12,1	7,2 ± 3,3	2 (0,0-3,0)

^aResultados expressos como média ± desvio padrão.

^bResultados expressos como como mediana (intervalos quartis).

3.3.2. Ensaio de radioligação

Realizou-se também os ensaios de radioligação, para verificar a ligação das moléculas sintetizadas 1, 2, 7 e 15 ao sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A,

observada através do deslocamento do ligante [³H]-flunitrazepam. Nenhuma das quatro moléculas avaliadas causou deslocamento do radioligante no ensaio de radioligação.

3.4. DISCUSSÃO

O labirinto em cruz elevado provavelmente seja o modelo animal de ansiedade mais conhecido e utilizado atualmente, sendo validado para ratos e camundongos. Ele se baseia em respostas não condicionadas do animal diante de situações aversivas, já que os espaços abertos do aparato são considerados uma potencial ameaça para os roedores. Substâncias com perfil do tipo ansiolítico ocasionariam um aumento na exploração dos braços abertos do labirinto, podendo causar alterações em outros parâmetros etológicos, observados a fim de aumentar a sensibilidade do experimento³⁰⁻³².

Nesta dissertação de mestrado, empregamos o labirinto em cruz elevado para identificar, dentro de um grupo contendo duas kavalactonas e dois análogos, a fim de verificar uma potencial atividade ansiolítica. Embora o extrato de kava-kava tenha mostrado um perfil ansiolítico no labirinto em cruz elevado^{7,8}, nenhum estudo contendo kavalactonas isoladas havia sido realizado empregando este modelo animal.

Em nosso estudo, apenas LaSOM 1 e LaSOM 76 alteraram de maneira significativa os parâmetros observados no labirinto em cruz elevado, na dose de 30 mg/kg i.p. LaSOM 1 reduziu o número de entradas nos braços fechados e aumentou o tempo de permanência nos braços abertos. Este comportamento poderia ser devido a um possível efeito sedativo de LaSOM 1, observado em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, no qual a molécula reduziu significativamente a latência e apresentou um forte tendência em aumentar a duração do sono induzido por pentobarbital²⁷. Entretanto, não foram observadas alterações significativas do comportamento exploratório total (número total de entradas nos braços) no labirinto em cruz elevado e da locomoção espontânea no teste de exposição ao campo aberto.

LaSOM 76 (diidrokaína) aumentou o número de entradas, o tempo de permanência e o percentual de permanência nos braços abertos, característicos de moléculas com efeito do tipo ansiolítico. Este efeito do tipo ansiolítico observado no labirinto em cruz elevado condiz com os resultados obtidos em estudos empregando

o modelo do isolamento social em aves, que sugerem uma relação direta entre a diidrokaína **2** e os efeitos ansiolíticos da kava-kava^{5,6}.

LaSOM 29 (kavaína) não apresentou um perfil do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado. Em outro modelo animal, de separação social em aves, foi observado que a kavaína **1** também não alterou parâmetros indicativos de um potencial ansiolítico^{5,8}. LaSOM 40 também não alterou os parâmetros do labirinto em cruz elevado e não possui resultados na literatura que possam ser comparados com os obtidos neste trabalho, visto que ela não se encontra no extrato de kava-kava, sendo a primeira vez que é realizada sua avaliação em modelos animais de ansiedade.

O efeito hipnótico-sedativo de uma substância, quando não evidente *per se*, pode ser investigado pelo teste de potenciação do sono barbitúrico, através da interação inibitória sinérgica entre pentobarbital e a substância investigada, sobre o sistema nervoso central⁴⁰. Adicionalmente, a razão entre efeitos ansiolítico e sedativo tem grande valor terapêutico para um potencial agente ansiolítico, já que uma das maiores limitações do uso de benzodiazepínicos na ansiedade são seus efeitos sedativos.

O teste de potenciação do sono barbitúrico foi realizado, pois o efeito sedativo da kava-kava já foi observado em outros estudos^{2-4,19}. Foi verificado que o extrato de kava-kava e as kavalactonas causaram um aumento no tempo de sono induzido por barbitúricos²⁻⁴. Em nosso estudo, LaSOM 76, quando administrado na mesma dose que proporciona um perfil do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, não apresentou efeitos hipnóticos e sedativos.

Também deve ser dada atenção aos efeitos locomotores, que podem confundir as mudanças comportamentais usadas como indicativos de redução da ansiedade^{41,42}. O teste de exposição ao campo aberto consiste na observação do comportamento do animal em um ambiente desconhecido, do qual é impedida a fuga pelas paredes⁴³.

Em um estudo preliminar sobre os efeitos dos extratos aquoso e lipídico no sistema nervoso central, foi observado que ambos os extratos reduziram a atividade locomotora espontânea em uma dose sub-letal⁴². Outros resultados evidenciaram

um efeito sedativo do extrato de kava-kava sobre a atividade locomotora, com uma razão entre as potências sedativa/ansiolítica menor do que a do diazepam, o que limitaria seu uso no tratamento da ansiedade⁸. Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que LaSOM 76 não exerce efeitos sobre a locomoção espontânea, em doses que causam efeitos do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado.

A interação dos análogos com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A foi estudada por ensaios de radioligação. Em trabalhos publicados, estirilpironas e diidroestirilpironas de *P. sabulosa*, análogas às kavalactonas e com efeitos do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, foram capazes de deslocar a ligação do [³H]-flunitrazepam, exibindo uma moderada afinidade ao sítio benzodiazepínico na ordem de micromolar²⁶. Entretanto, outros resultados da literatura descartam a interação da kava-kava e das kavalactonas com este sítio de ligação^{8,9,14}. Nossos resultados do ensaio de radioligação descartam a interação das lactonas sintetizadas com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Assim, LaSOM 76 pode agir por mecanismos distintos dos benzodiazepínicos, como por exemplo, através da interação com o sítio de ligação do GABA ou com o sítio de ligação da picrotoxina, ambos no receptor GABA_A. Esta interação pode ser estudada futuramente, verificando a interação direta com este sítio, por ensaios de radioligação, ou verificando modificações na entrada de íon cloreto nas células nervosas, por métodos eletrofisiológicos (*patch clamp*).

Os resultados caracterizam LaSOM 76 como um bom candidato para a continuação das investigações na busca por protótipos de fármacos ansiolíticos. LaSOM 76 apresentou um efeito do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, possivelmente não mediado pela interação com o sítio benzodiazepínico, em dose que não apresentou efeito hipnótico-sedativo.

A liberdade conformacional promovida pela ligação simples entre os anéis aromático e lactônico poderia justificar a atividade de LaSOM 76 quando comparada aos resultados obtidos com os outros análogos testados. Entretanto, resultados encontrados na literatura demonstraram um efeito do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado por parte de estirilpironas e diidroestirilpironas (com e sem a insaturação entre C₇ e C₈, respectivamente). Comparando-se LaSOM 1 e LaSOM

29, pode-se propor que a metilação da hidroxila em C₄ pode reduzir o efeito sedativo.

Deve-se ressaltar que os estudos deverão ser aprofundados e ampliados. O uso de apenas uma dose é usual para a triagem de substâncias ativas, mas pode também gerar resultados falso negativos, levando ao descarte daqueles que poderiam apresentar atividade em outras doses. No caso de LaSOM 1, a diminuição da dose pode levar a uma redução do efeito sedativo e a observação de um efeito ansiolítico. O mesmo pode ser avaliado para LaSOM 29 e LaSOM 40, que podem apresentar atividade em doses diferentes daquela testada neste trabalho.

3.5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi investigado pela primeira vez o efeito ansiolítico das kavalactonas **1** e **2** (kavaína e diidro-kavaína) usando o método do labirinto em cruz elevado. Os trabalhos encontrados na literatura demonstram que embora diversos estudos tivessem sido realizados para investigar o efeito ansiolítico da kava-kava e das kavalactonas isoladas, em nenhum desses o labirinto em cruz elevado foi empregado.

Em nosso estudo empregando análogos obtidos por síntese orgânica, sendo dois delas já encontradas na kava-kava, somente LaSOM 76 (diidro-kavaína) apresentou um perfil do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado. Este perfil foi observado em uma dose que não afetou a atividade locomotora espontânea e não exerceu efeitos hipnótico-sedativos.

Nossas investigações evidenciam que os efeitos observados para LaSOM 76 (diidro-kavaína) não se devem a sua interação com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, o que já foi observado em estudos semelhantes realizados para as kavalactonas.

LaSOM 1 apresentou um efeito ansiolítico discreto, no labirinto em cruz elevado, o qual pode estar mascarado por um efeito sedativo. Este efeito também não é mediado pela interação direta com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A.

3.6. REFERÊNCIAS

1. FURGIUELE, A. R.; KINNARD, W. J.; ACETO, M. D.; BUCKLEY, J. P. Central activity of aqueous extracts *Piper methysticum* (Kava). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2, p. 247-252, 1965.
2. KLOHS, M. W.; KELLER, F.; WILLIAMS, R. E.; TOEKES, M. I.; CRONHEIM, G. E. A chemical and pharmacological investigation of *Piper methysticum*, Forst. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 1, p. 95-103, 1959.
3. MEYER, H. J. Pharmakologie der wirsamen prinzipies des kava-rhizoms (*Piper methysticum* Forst). **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 138, p. 505-536, 1962.
4. JAMIESON, D.; DUFFIELD, P.; CHENG, D.; DUFFIELD, A. M. Comparison of the central nervous system activity of the aqueous and lipid extract of kava (*Piper methysticum*). **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 301, p. 66-80, 1989.
5. SMITH, K. K.; DHARMARATNE, R. W.; FELTENSTEIN, M. W.; BROOM, S. L.; ROACH, J. T.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic Effects ok kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 86-90, 2001.
6. FELTENSTEIN, M. W.; LAMBDIN, L.C.; GANZERA, M.; DHARMARATNE, H. R. W.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic properties of *Piper methysticum* extract samples and fractions in the chick social-separation-stress procedure. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 210-216, 2003.
7. REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. Anxyolitic-like effects ok kava-kava in the elevated plus maze test – a comparision with diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 855-860, 2002.
8. GARRET, K. M.; BASMADJIAN, G.; KHAN, I. A.; SCHANEBERG, B. T.; SEALE, T. W. Extracts of kava (*Piper methysticum*) induce acute anxiolytic-like behavioral changes in mice. **Psychopharmacology**, v. 170, p. 33-41, 2003.
9. DAVIES, L. P.; DREW, C. A.; DUFFIELD, P.; JOHNSTON, G. A. R.; JAMIESON, D. D. Kava pyrones and resin: studies on GABA_A, GABA_B and benzodiazepine

binding sites in rodent brain. **Pharmacology and Toxicology**, v. 71, p. 120-126, 1992.

10. BOONEN, G.; PRAMANIK, A.; RIGLER, R.; HÄBERLEIN, H. Evidence for specific interactions between kavain and human cortical neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy. **Planta Medica**, v. 66, p. 7-10, 2000.

11. JUSSOFIE, A.; SCHMIZ, A.; HIEMKE, C. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. **Psychopharmacology-Berl.**, v. 116, n. 4, p. 469-474, 1994.

12. BOONEN, G.; HÄBERLEIN, H. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA_A binding site. **Planta Medica**, v. 64, p. 504-506, 1998.

13. YUAN, C. S.; DEY, L.; WANG, A.; MEHENDALE, S.; XIE, J. T.; AUNG, H. H.; ANG-LEE, M. K. Kavalactones and dihydrokavain modulate GABAergic activity in a rat gastric-brainstem preparation. **Planta Medica**, v. 68, p. 1092-1096, 2002.

14. DINH, L. D.; SIMMEN, U.; BUETER, K. B.; BUETER, B.; LUNDSTROM, K.; SCHAFFNER, W. Interaction of various *Piper methysticum* cultivars with CNS receptors in vitro. **Planta Medica**, v. 67, p. 306-311, 2001.

15. GRUNZE, H.; LANGOSCH, J.; SCHIRRMACHER, K.; BINGMANN, D.; WEGERER, J. V.; WALDEN, J. Kava pyrones exert effects on neuronal transmission and transmembraneous cation currents similar to established mood stabilizers – a review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, p. 1555-1570, 2001.

16. SEITZ, U.; SCHÜLE, A.; GLEITZ, J. [³H]-Monoamine uptake inhibition properties of kava pyrones. **Planta Medica**, v. 63, p. 548-549, 1997.

17. BOONEN, G.; FERGER, B.; KUSCHINSKY, K.; HÄBERLEIN, H. In vivo effects of the kavapyrones (+)-dihydromethysticin and (±)-kavain on dopamine, 3,4-dihydrophenylacetic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in striatal and cortical brain regions. **Planta Medica**, v. 64, p. 507-510, 1998.

18. BAUM, S. S.; HILL, R.; ROMMELSPACHER, H. Effect of kava extract and individual kavapyrones on neurotransmitter levels in the nucleus accumbens of rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 22, p. 1105-1120, 1998.

19. O'HARA, M. J.; KINNARD, W. J.; BUCKLEY, J. P. Preliminary characterization of aqueous extracts of *Piper methysticum* (kava, kawa-kawa). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 7, p. 1021-1025, 1965.
20. SCHELOSKY, L.; RAFFAUF, C.; JENDROSKA, K.; POEWE, W. Kava and dopamine antagonism. **Journal Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 58, n. 5, p. 639-640, 1995.
21. WALDEN, J.; WEGERER, J. V.; WINTER, U.; BERGER, M.; GRUNZE, H. Effects of kawain and dihydromethysticin on field potential changes in the hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 21, p. 697-706, 1997.
22. KIESER, M. W.; MALSCH, U. Efficacy of kava-kava in the treatment of non-psychotic anxiety, following pretreatment with benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 157, p. 277-283, 2001.
23. PITTLER M. H.; ERNST, E. Kava extract for treating anxiety. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, (1):CD003383, 2003.
24. WITTE, S.; LOEW, D.; GAUS, W. Meta-analysis of the efficacy of the acetonic kava-kava extract WS[®]1490 in patients with non-psychotic anxiety disorders. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 183-188, 2005.
25. DUARTE, F. S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; LIMA, T. C. M. Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicinal topical anesthetic. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 86, p. 150-161, 2007.
26. DUARTE, F. S.; MARDER, M.; HOELLER, A. A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, G.; LIMA, T. C. M. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology**, v. 197, p. 351-360, 2008.
27. AMARAL, P. A. **Síntese de derivados de kavalactonas**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.

28. FENNER, R. **Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.
29. PROVENSI, G. **Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2007.
30. RODGERS, R. J. e DALVI, A. Anxiety, Defense and the Elevated Plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.
31. PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
32. LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.
33. PARK, J. H.; CHA, W. Y.; SEO, J. J.; HONG, J. T.; HAN, K.; OH, K. W. Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: Comparison of red ginseng and sun ginseng. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 895-900, 2005.
34. WILLIANSO, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F. J. **Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. Chichester: John Wiley & Sons, 1996.
35. GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.
36. COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Geneva: 1985.
37. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Disponível em: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Guidelis.htm. Acesso em: 28 de agosto de 2009.

38. CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 714, de 26 de agosto de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 118, 21/06/2002. Seção I, p. 201.
39. BRASIL. Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 196, 09/10/2008. Seção I, p. 1-2.
40. LANCEL, M. Role of GABA_A receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. **Sleep**, v. 22, n. 1, p. 33-42, 1999.
41. CAO, W.; BURKHOLDER, T.; WILKINS, L.; COLLINS, A. C. A genetic comparison of behavioral actions of ethanol and nicotine in the mirrored chamber. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 45, p. 803-809, 1993.
42. GARRET, K. M.; NIEKRASZ, I.; HAQUE, D.; PARKER, K. M.; SEALE, T. W. Genotypic differences between C57BL/6 and A inbred mice in anxiolytic and sedative actions of diazepam. **Behaviors Genetics**, v. 28, p. 125-136, 1998.
43. PRUT, L.; BELZUNG, C. The open-field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível realizar a síntese de kavalactonas e análogos, com posterior avaliação de uma possível atividade ansiolítica para quatro destes compostos.

O protocolo empregando as reações de condensação aldólica entre o diânion do acetato de etila e aldeídos apropriados, seguida de uma reação de *O*-metilação, mostrou ser adequada para a síntese das lactonas desejadas.

A síntese empregada foi de fácil execução e obteve bons rendimentos, principalmente quando comparada a outros métodos para síntese de kavalactonas já existentes na literatura. Embora os produtos obtidos por esta técnica estejam na forma racêmica, ainda não existem estudos que comprovem a influência da estereoquímica sobre a atividade ansiolítica das kavalactonas.

As reações para obtenção de análogos substituídos do cinamaldeído não foram efetuadas com êxito. Assim, é necessário o estudo de novos métodos para a síntese de análogos da kavaína com anel aromático substituído, a fim de verificar a influência da substituição na atividade biológica.

LaSOM 1 apresentou indicativos de um possível efeito sedativo. LaSOM 76 (2 – diidrokaína) apresentou atividade do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, não apresentando efeitos, na mesma dose, sobre o sono e sobre a locomoção espontânea. Estes resultados são importantes do ponto de vista terapêutico, tendo em vista que estes efeitos indesejados são usualmente encontrados em ansiolíticos. Nenhum dos efeitos observados é mediado pela interação com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A.

Desta forma, LaSOM 76 mostrou ser um excelente candidato a protótipo de fármacos ansiolíticos. Estudos futuros devem ser realizados objetivando à síntese de análogos da diidrokaína e de seus isômeros, possibilitando se aprofundar a investigação de sua atividade ansiolítica, chegando-se também a otimização da molécula.

O conjunto desses resultados fornece valiosas informações sobre o perfil das kavalactonas sintetizadas e de seus análogos, relacionadas aos efeitos no sistema

nervoso central. Estes resultados poderão servir de guia a farmacomodulações futuras objetivando aprofundar estes estudos.

5. ANEXOS

Std proton

File: Proton

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: dmsd

Temp. 22.0 C / 295.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 4799.3 Hz

64 repetitions

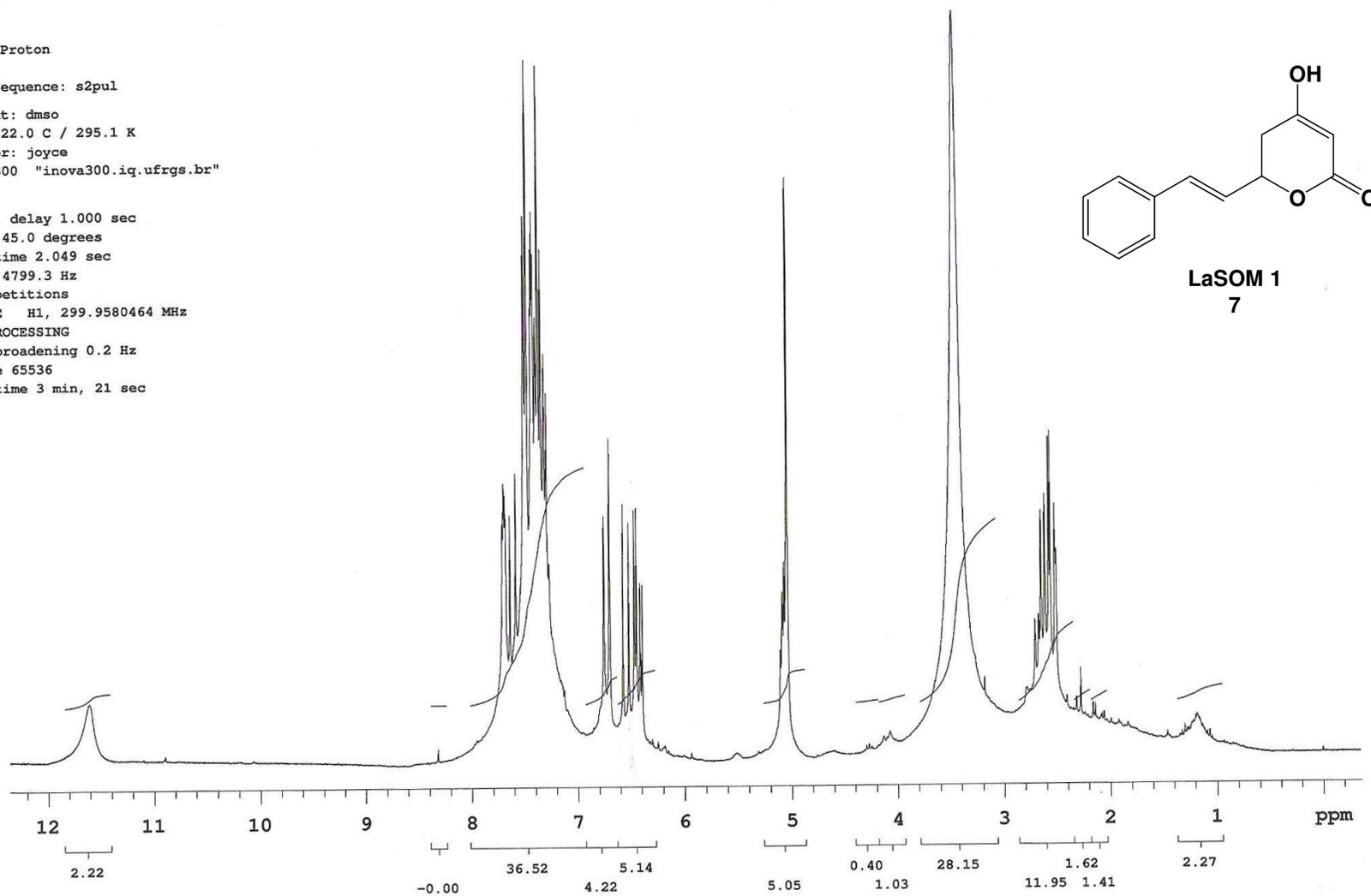
OBSERVE H1, 299.9580464 MHz

DATA PROCESSING

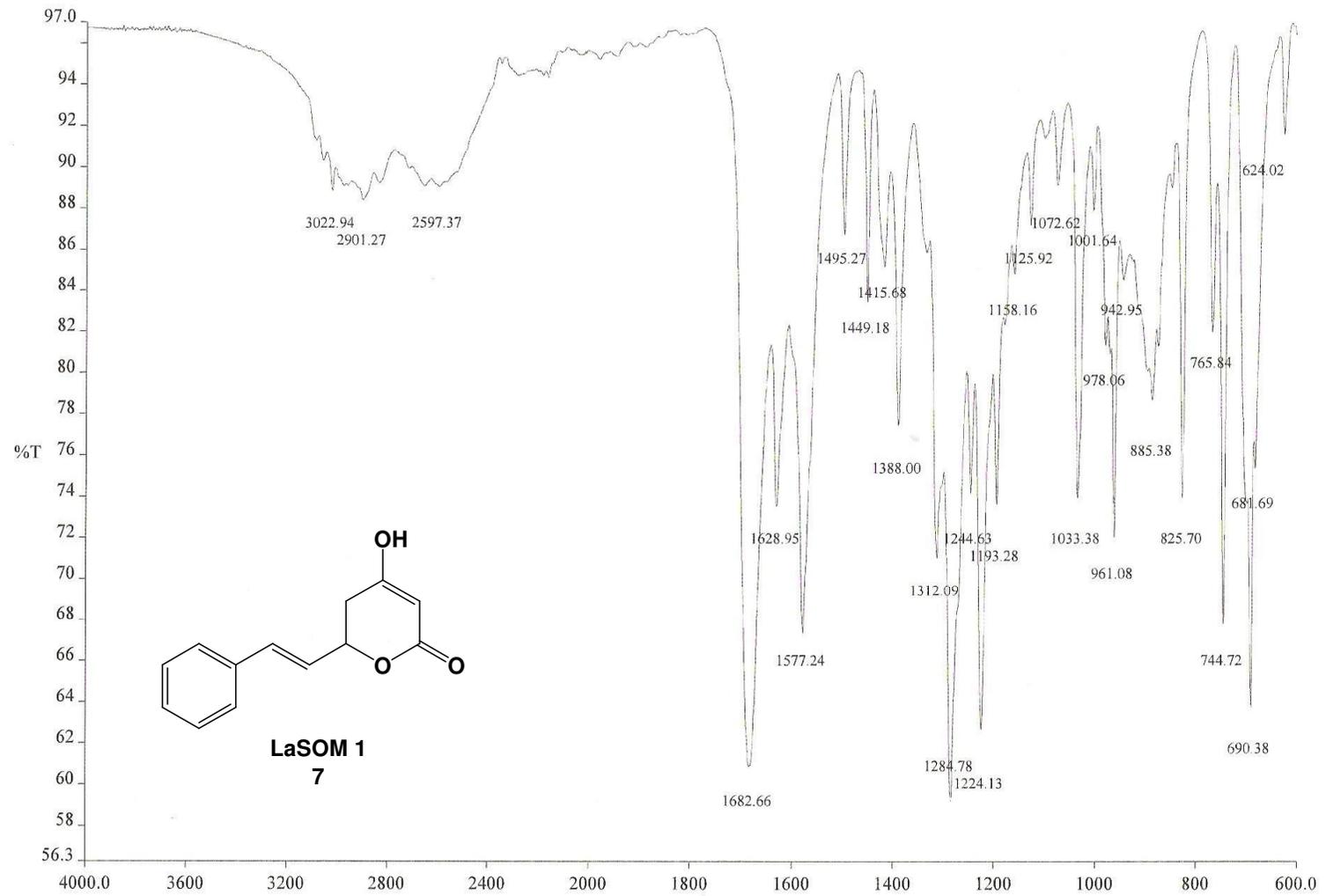
Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

Total time 3 min, 21 sec



Anexo 1: Espectro de ¹H RMN da molécula 7.



Anexo 2: Espectro de IV da molécula 7.

Std proton

File: Proton

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: dmsd

Temp. 22.0 C / 295.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 4799.3 Hz

32 repetitions

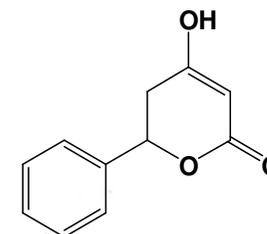
OBSERVE H1, 299.9580504 MHz

DATA PROCESSING

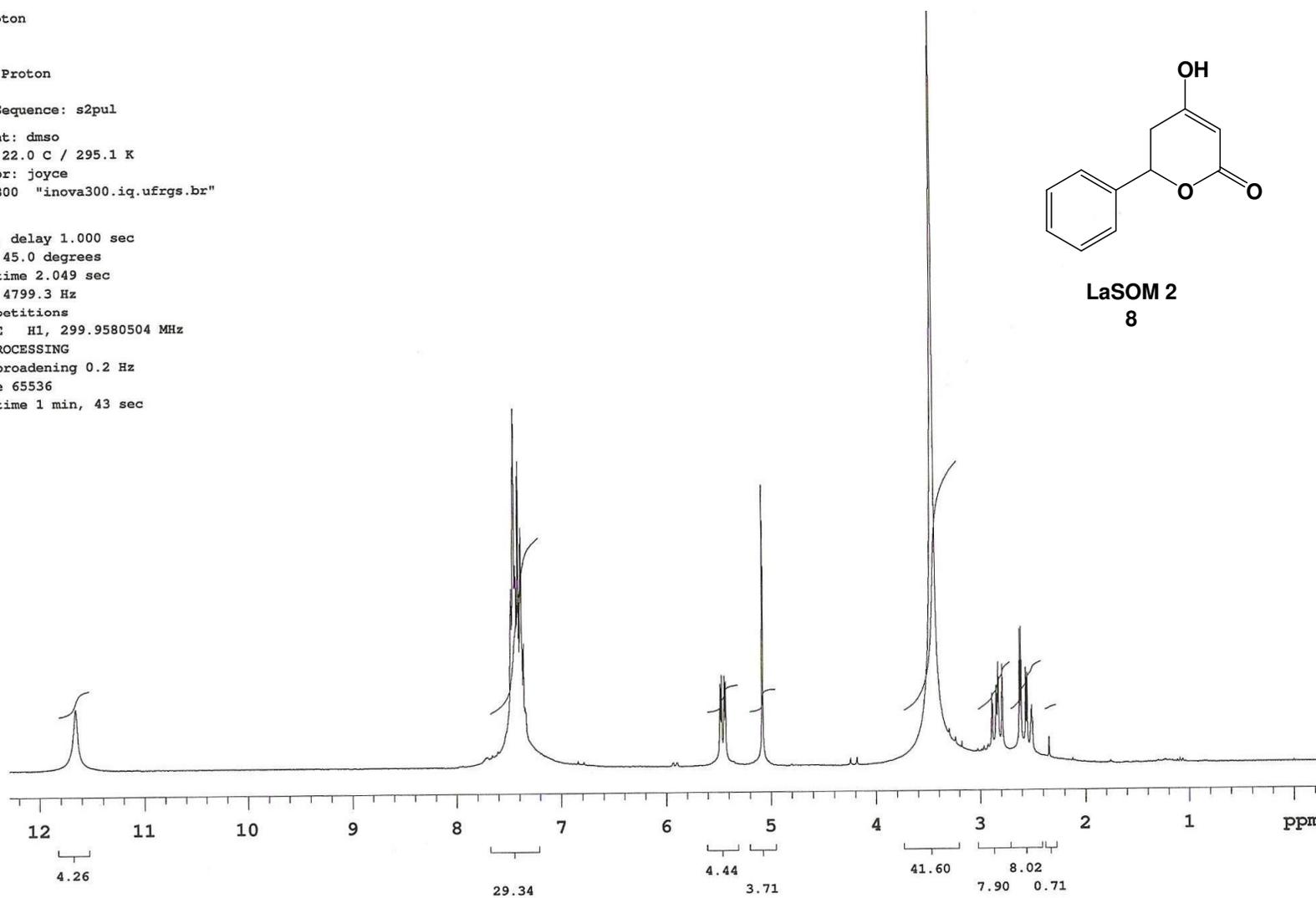
Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

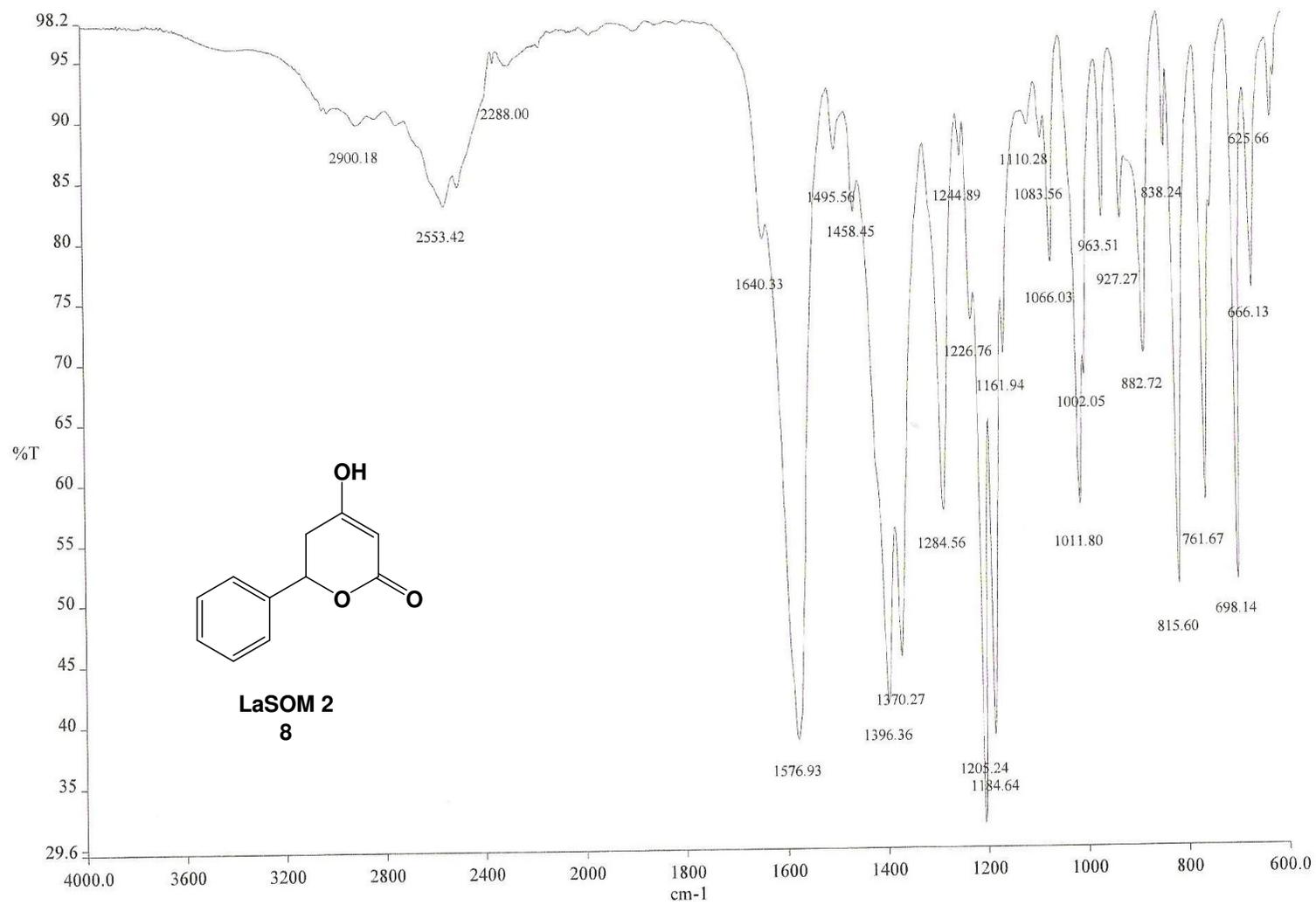
Total time 1 min, 43 sec



LaSOM 2
8



Anexo 3: Espectro de ^1H RMN da molécula 8.



Anexo 4: Espectro de IV da molécula 8.

Std proton

File: Proton

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: dmsd

Temp. 22.0 C / 295.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 4799.3 Hz

64 repetitions

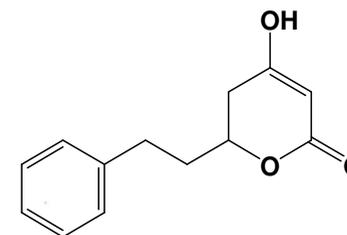
OBSERVE H1, 299.9580477 MHz

DATA PROCESSING

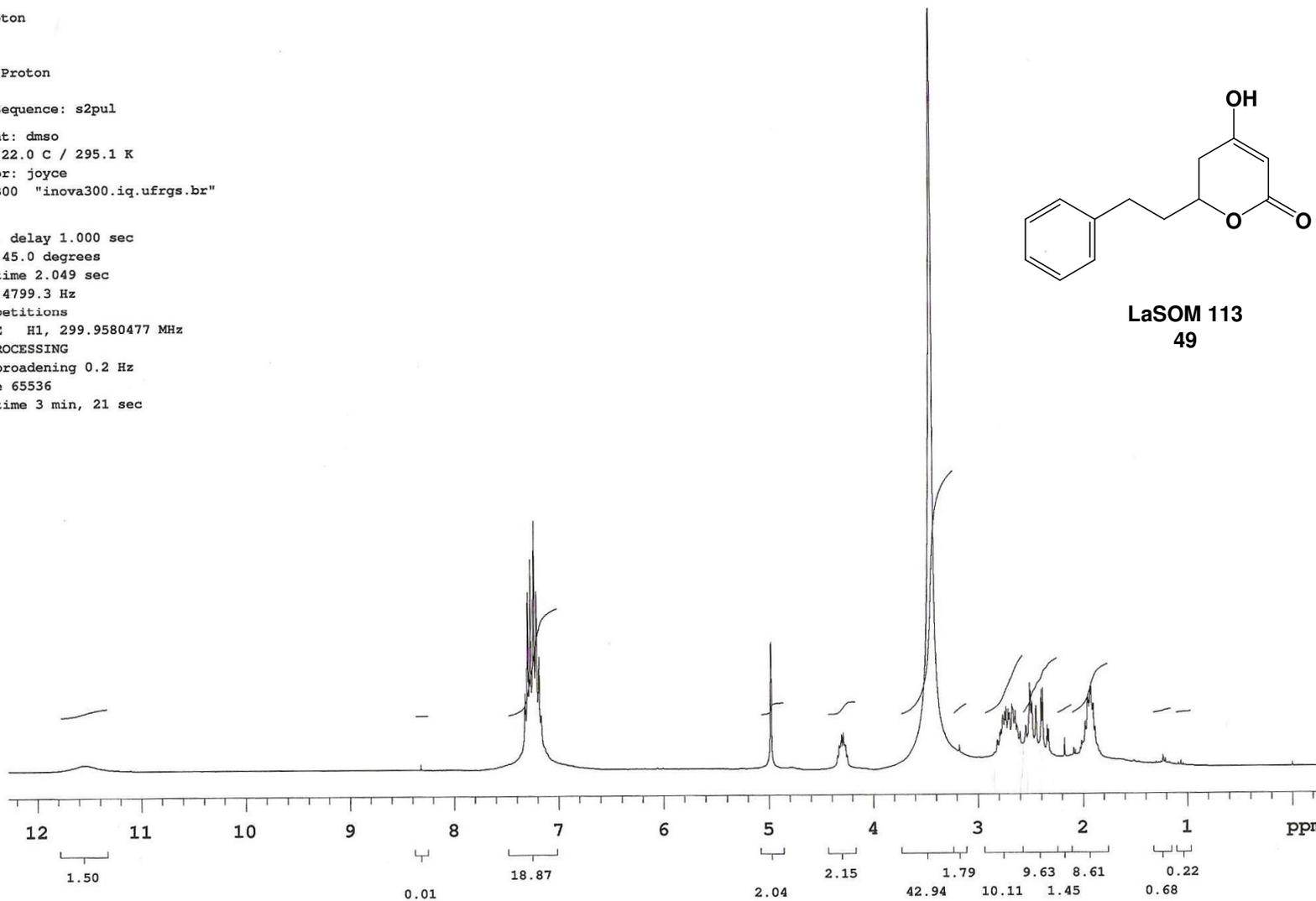
Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

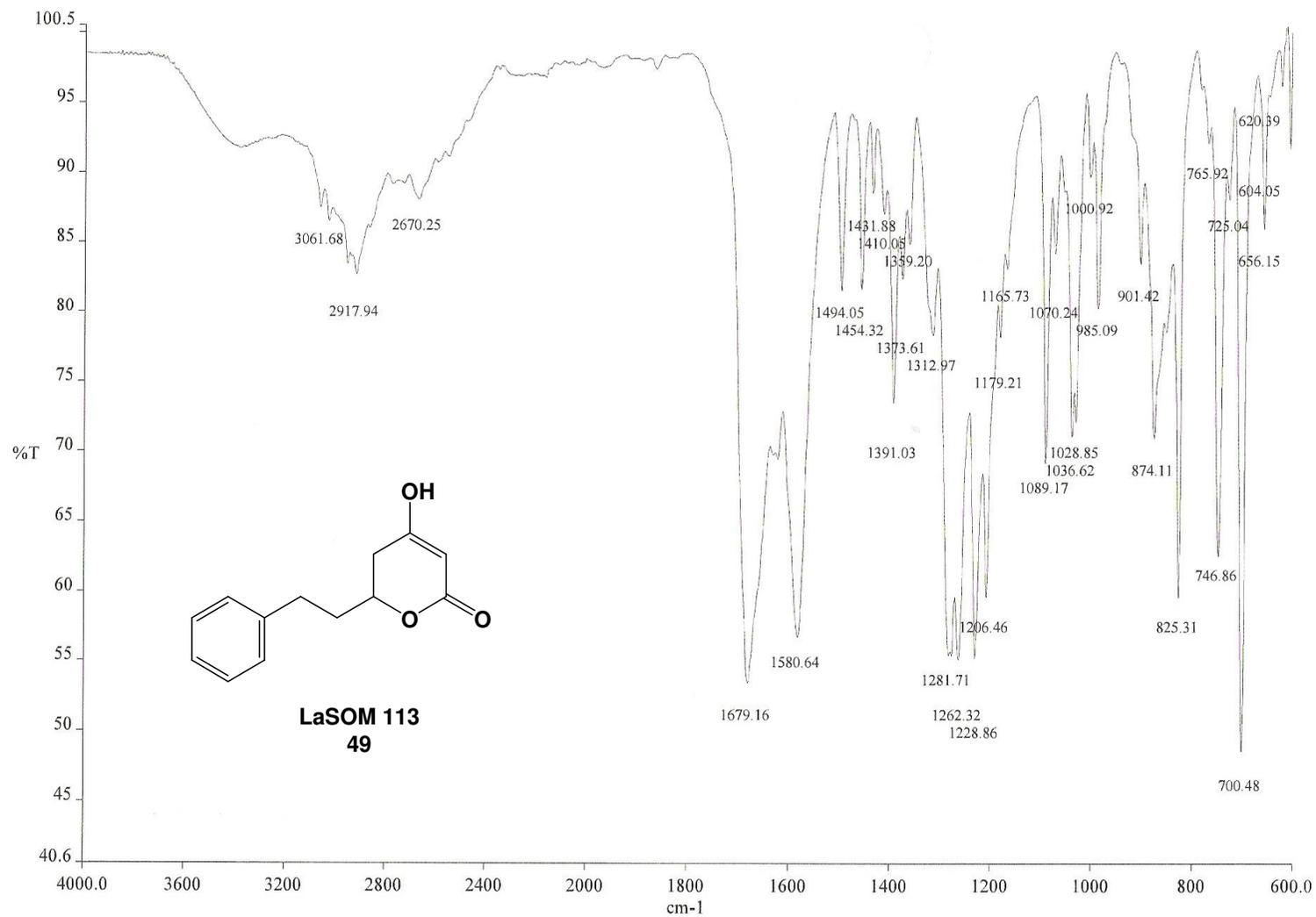
Total time 3 min, 21 sec



LaSOM 113
49



Anexo 5: Espectro de ^1H RMN da molécula 49.



Anexo 6: Espectro de IV da molécula 49.

Std proton

File: Proton

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3

Temp. 100.0 C / 373.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 4799.3 Hz

32 repetitions

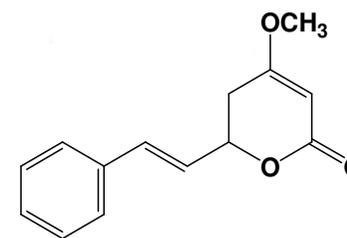
OBSERVE H1, 299.9566299 MHz

DATA PROCESSING

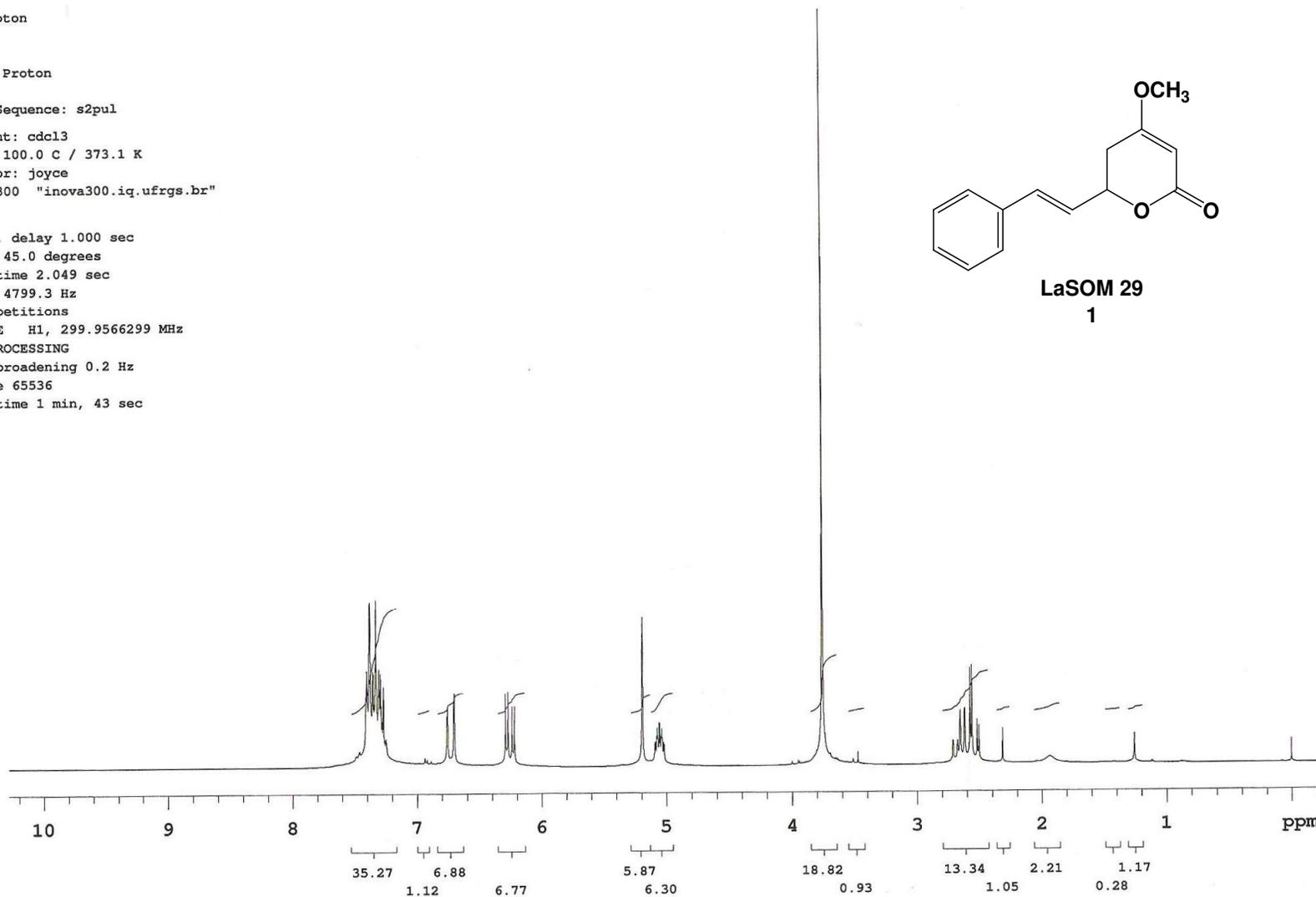
Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

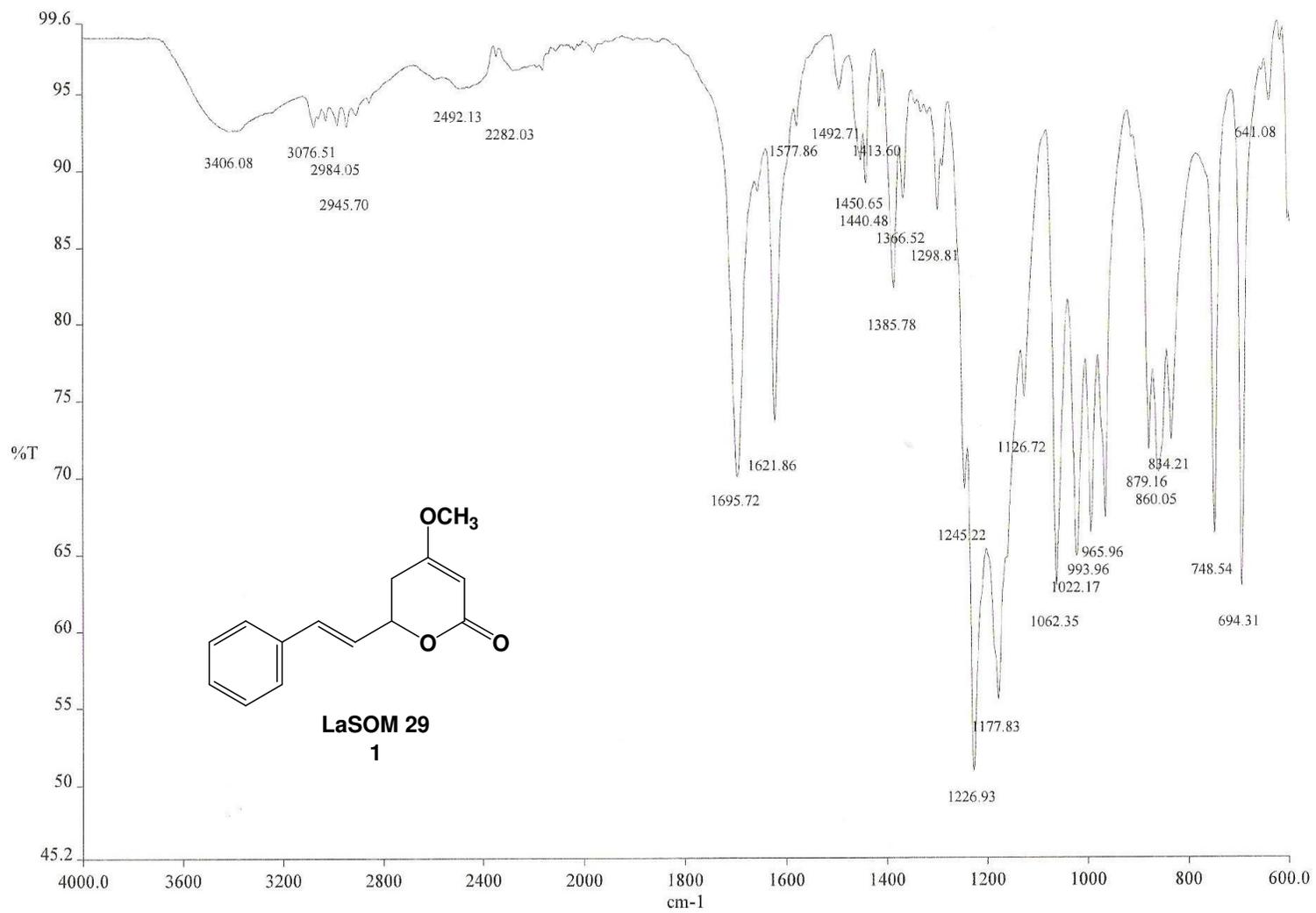
Total time 1 min, 43 sec



LaSOM 29
1



Anexo 7: Espectro de ¹H RMN da molécula 1.



Anexo 8: Espectro de IV da molécula 1.

Std proton

File: Proton

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3

Temp. 100.0 C / 373.1 K

Operator: joyce

INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 4799.3 Hz

64 repetitions

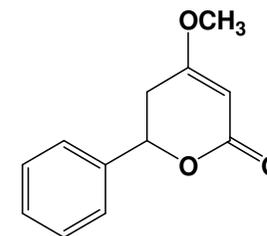
OBSERVE H1, 299.9566289 MHz

DATA PROCESSING

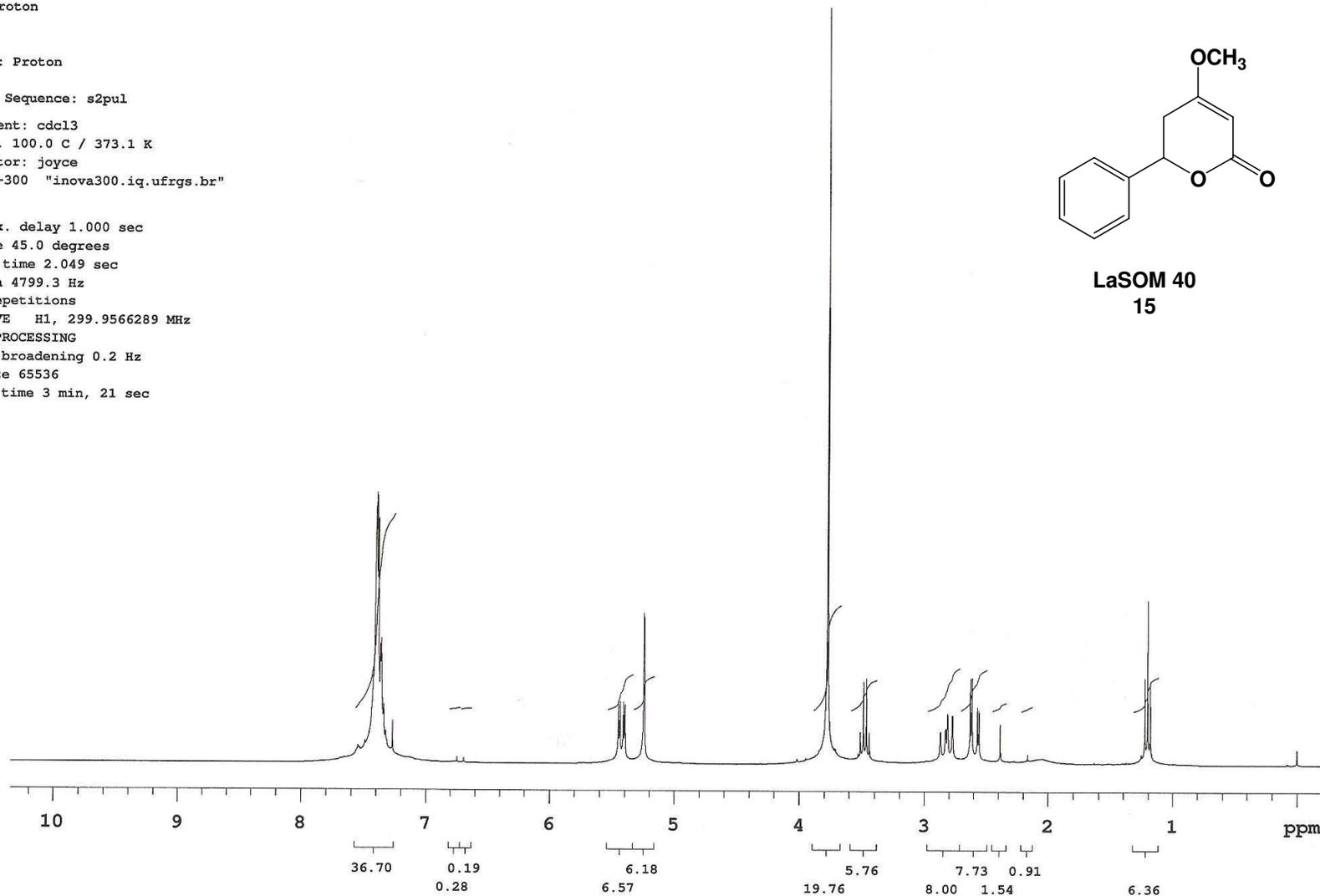
Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

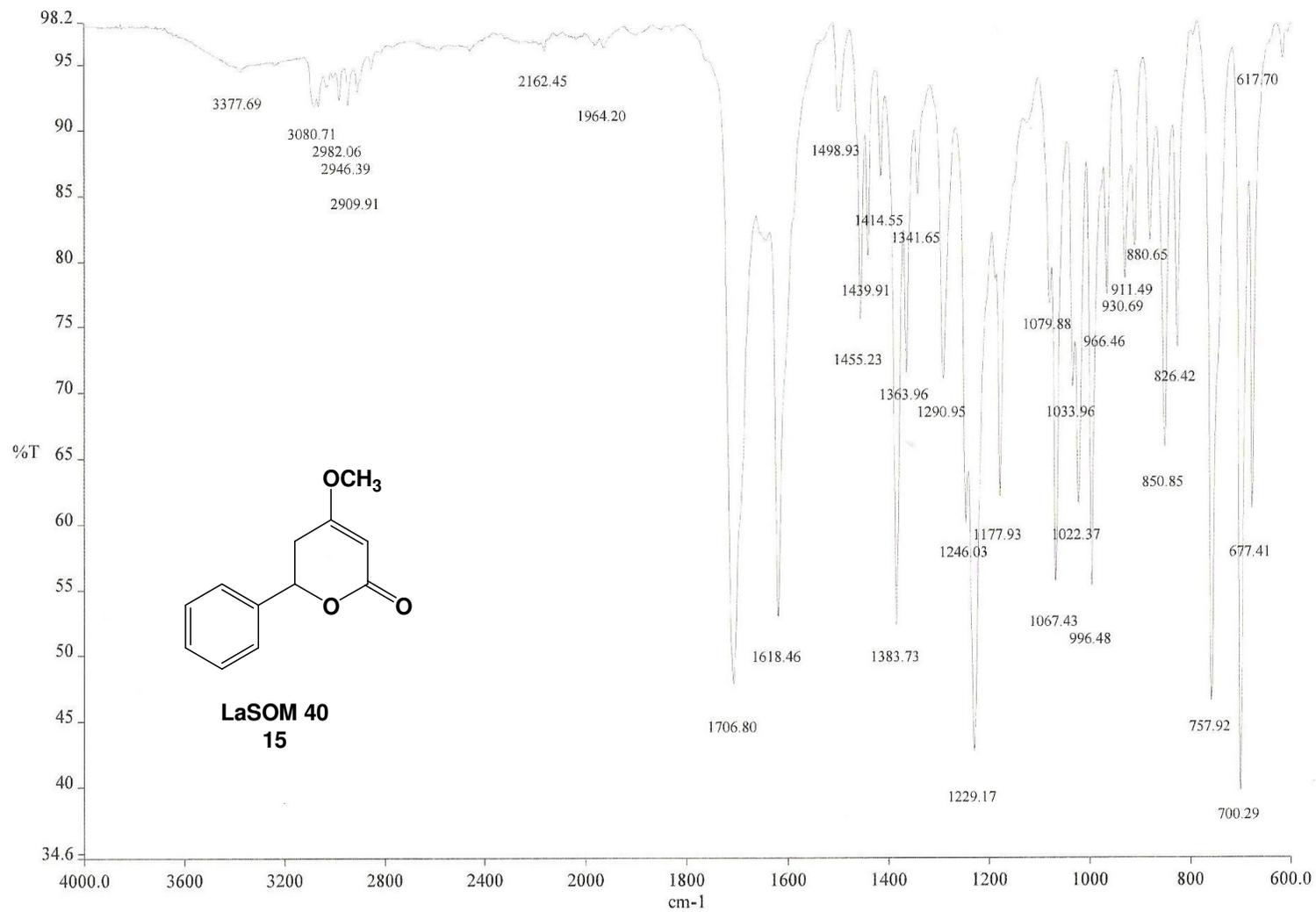
Total time 3 min, 21 sec



LaSOM 40
15



Anexo 9: Espectro de ^1H RMN da molécula 15.

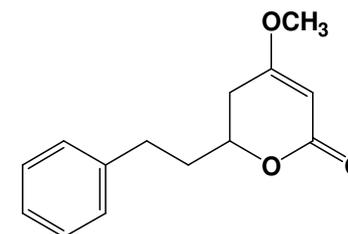


Anexo10: Espectro de IV da molécula 15.

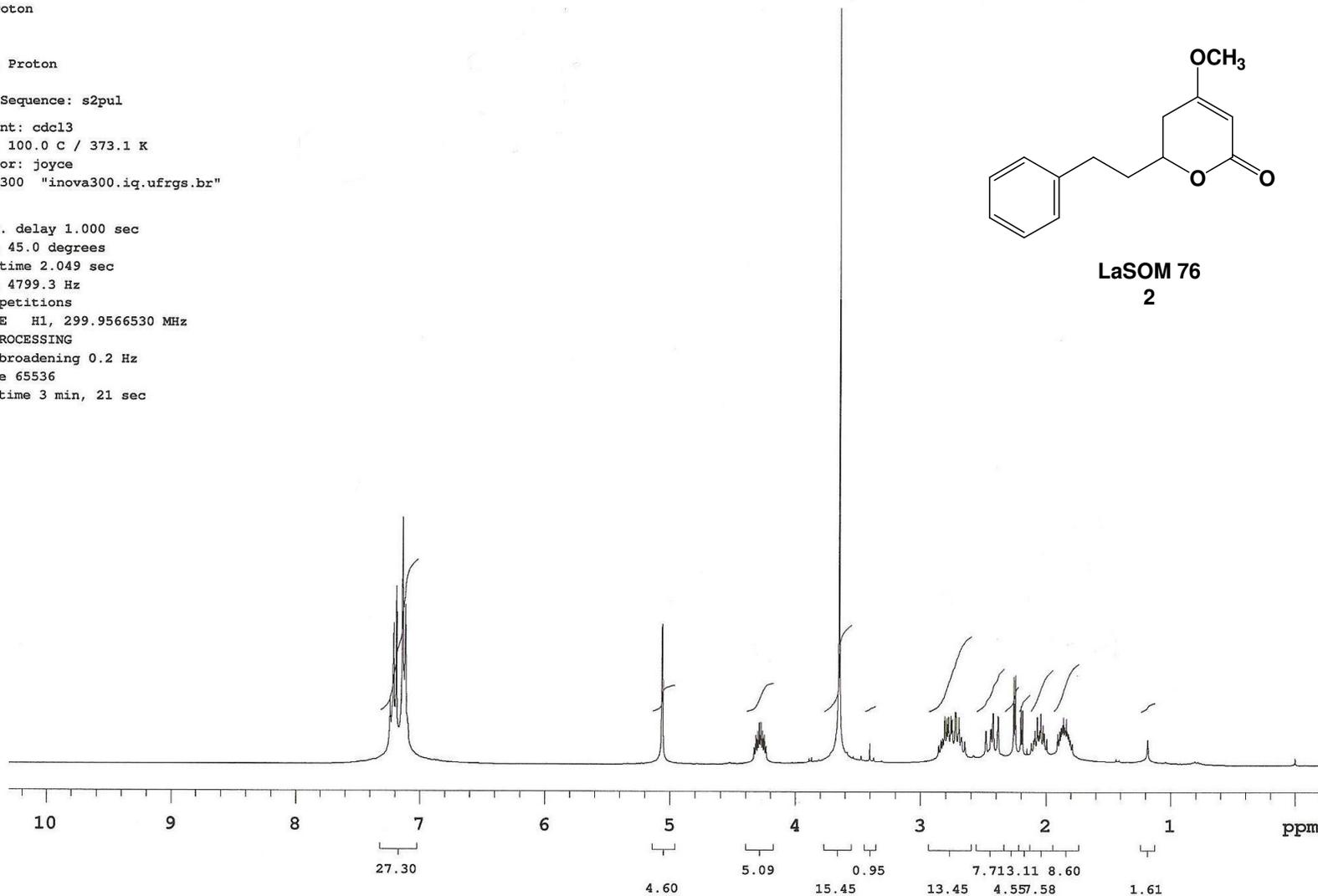
Std proton

File: Proton
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Temp. 100.0 C / 373.1 K
Operator: joyce
INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

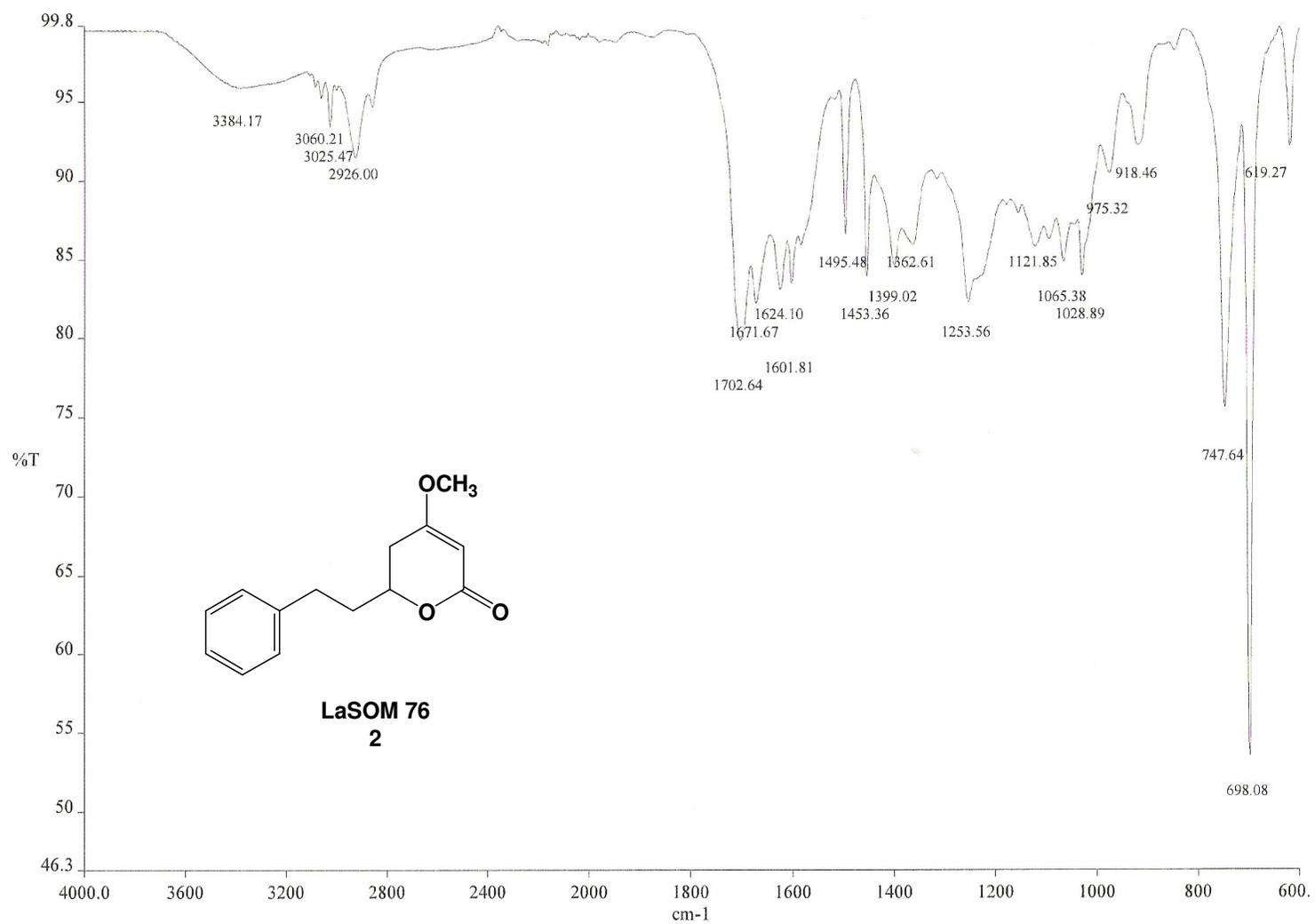
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.049 sec
Width 4799.3 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1, 299.9566530 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 65536
Total time 3 min, 21 sec



LaSOM 76
2



Anexo 11: Espectro de ^1H RMN da molécula 2.



Anexo 12: espectro de IV da molécula 2.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007939

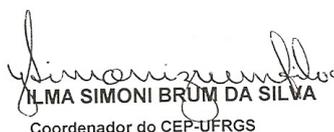
Título : síntese e avaliação farmacológica de kavalactonas, candidatas a protótipos de fármacos ansiolíticos

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
VERA LUCIA EIFLER LIMA	PESQ RESPONSÁVEL	eifler@farmacia.ufrgs.br	33085313
STELA MARIS KUZE RATES	PESQUISADOR	00008026@ufrgs.br	33085313
THIAGO DE SOUZA CLAUDINO	PESQUISADOR	thiago_claudino@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 34 , ata nº 114 , de 4/9/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, sexta-feira, 5 de setembro de 2008



LIMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS