UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Flavona e análogos como radioligantes para imageamento cerebral.

Síntese, marcação com radioiodo e estudos *in vivo*

frente a sítios receptores benzodiazepínicos

Sibila Roberta Marques Grallert

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo

2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012677

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G744f	Grallert, Sibila Roberta Marques Flavona e análogos como radioligantes para imageamento cerebral. Síntese, marcação com radioiodo e estudos <i>in vivo</i> frente a sítios receptores benzodiazepínicos / Sibila Roberta Marques Grallert. -- São Paulo, 2006. 174p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico -Farmacêutica. Orientador: Tavares, Leoberto Costa 1. Relações estrutura-atividade (SAR) : Química farmacêutica 2. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 3. Radioisótopo: Medicina I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador. 615.19 CDD

Sibila Roberta Marques Grallert

Flavona e análogos como radioligantes para imageamento cerebral.

Síntese, marcação com radioiodo e estudos *in vivo*

frente a sítios receptores benzodiazepínicos

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares
Orientador/presidente

Prof. Dr. Elaine Bortoleti de Araújo

Prof. Dr. Carlos Henrique de Mesquita

Prof. Dr. Chung Man Chin

Prof. Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo, 12 de dezembro de 2006

*“Busque. Mas busque acreditando.
Então receberá sem falta.
Aquele que busca avidamente,
descobrirá finalmente a fonte
da água da Vida.”*

Masaharu Taniguchi

Agradecimentos

✓ Agradeço ao Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares pela orientação e, principalmente, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho tão gratificante e pelos bons anos de convivência;

✓ Ao meu marido Markus, pelo amor e apoio incondicional nos meus projetos de vida e a minha filha Sophia, por entender e aceitar minhas ausências;

✓ Aos meus pais, Maria José e Roberto, exemplos de dignidade, por dedicarem suas vidas a formação da minha;

✓ Aos meus sogros, Ellen e Reiner, pelo incentivo e reconhecimento;

✓ Aos meus amigos de laboratório, Ana Cláudia, André, Andrea, Fábio, Hélio, Ieda, Leonardo, Márcia, Marcos, Patrícia, Salomão, cuja convivência foi de extrema importância para minha formação acadêmica e pessoal;

✓ Agradeço especialmente ao Vanderson, pela sua indiscutível bondade e amizade para “quebrar todos os meus galhos” e ao Fávero, pela sua amizade e indispensável ajuda científica;

✓ Ao Luis Fernando e ao Leonardo, que a despeito das brincadeiras, foram os melhores parceiros de bancada que eu poderia ter tido;

✓ *A Prof. Elaine Bortoleti de Araújo pela imprescindível orientação quanto a radiofarmácia e pela disponibilização das instalações do Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP para a realização dos ensaios biológicos;*

✓ *À todos os pesquisadores do Centro de Radiofarmácia que de alguma forma contribuíram para a consolidação deste trabalho. Agradeço, em especial, meu parceiro de pesquisa José Caldeira pelo companheirismo e contribuição científica;*

✓ *À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela oportunidade de realização deste trabalho;*

✓ *A minha amiga Jeanine, pela nossa conversa sobre os flavonóides, e a Carlota e Karine, pelos bons momentos de convívio e pelos laços de amizade estabelecidos;*

✓ *Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Moreno pela orientação inicial sobre os flavonóides;*

✓ *À Miriam do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas pela solicitude em realizar os ensaios de imageamento em coelho;*

✓ *À Maria das Graças Baptista dos Santos pelos bons anos de convivência;*

✓ *À Elaine e Jorge da secretaria de pós-graduação pela solicitude;*

✓ *À Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear;*

✓ À Miriam, Elza e Juarez da secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela solicitude;

✓ A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior, pelo suporte financeiro essencial para a execução deste trabalho;

✓ À Maria Luíza pela elaboração da ficha catalográfica;

✓ A todos os colegas de laboratório e da FCF-USP que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. JUSTIFICATIVA	5
REVISÃO DA LITERATURA	6
1. Neurotransmissores, neuroreceptores e sinapses	7
2. GABA e receptores GABAérgicos	8
3. Radiotraçadores cerebrais	11
3.1. PET e SPECT	11
3.2. Interação de radiotraçadores com neuroreceptores	13
3.3. Radiotraçadores utilizados para investigação cerebral	15
4. Desenvolvimento de radioligantes	17
4.1. A partir de produtos naturais	21
4.2. Relações estrutura-atividade de flavonóides	26
5. Desenvolvimento de novos radiotraçadores	32
5.1. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de novos radioligantes cerebrais .	33
5.2. Relações quantitativas estrutura-atividade	36
6. Radiotraçadores cerebrais para acesso a sítios receptores benzodiazepínicos	38
MATERIAIS E MÉTODOS	44
1. Plano de Trabalho	45
2. Materiais	48
2.1. Reagentes e solventes	48
2.2. Equipamentos	49
2.3. Animais	49
2.4. Outros	49
3. Métodos	50
3.1. Escolha dos grupos substituintes	50
3.2. Modelagem molecular	51
3.3. Síntese e identificação da flavona e análogos	52

3.4. Análises físico-químicas	54
3.4.1. Faixa de fusão	54
3.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho, IV	54
3.4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN	54
3.5. Marcação da flavona e análogos com radioiodo	54
3.5.1. Cloramina – T	54
3.5.2. Iodogen	55
3.6. Controle de qualidade radioquímico	55
3.7. Estudos de biodistribuição	55
3.8. Estudos de imageamento cintilográfico	56
MODELAGEM MOLECULAR	58
1. Introdução	59
2. Resultados e discussão	61
2.1. Reatividade da molécula de flavona frente à substituição por radioiodo	63
2.2. Propriedades estereoeletrônicas	69
3. Conclusões	79
SÍNTESE DA FLAVONA E ANÁLOGOS	81
1. Introdução	82
2. Resultados e discussão	86
2.1. Obtenção da flavona e análogos	88
2.2. Identificação da flavona e análogos	96
2.2.1. Análise espectrométrica de ligações e grupamentos específicos	100
2.2.1.1. Flavona	100
2.2.1.2. 3'-NO ₂ -flavona	101
2.2.1.3. 3'-F-flavona	101
2.2.1.4. 4'-F-flavona	101
3. Conclusões	102
MARCAÇÃO COM RADIOIODO E CONTROLE RADIOQUÍMICO DA FLAVONA E ANÁLOGOS	103
1. Introdução	104
2. Resultados e discussão	109
3. Conclusões	115
ESTUDOS BIOLÓGICOS	116

1. Introdução	117
2. Resultados e discussão	119
2.1. Estudos de biodistribuição da flavona em camundongos <i>Swiss</i>	119
2.2. Estudos de imageamento cerebral em coelho <i>New Zeland</i>	127
2.3. Estudos de imageamento em ratos <i>Wistar</i>	129
3. Conclusões	137
 CONCLUSÕES FINAIS	 138
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 141
 ANEXO 1	 155
 ANEXO 2	 156

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: flavona e análogos (R= -H; NO ₂ , F, e R'= F)	3
FIGURA 2: Modelo do complexo receptor GABA-benzodiazepínico	9
FIGURA 3: Imagens cerebrais obtidas com iomazenil- ¹²³ I em SPECT captadas em câmara com três cabeças, em indivíduo controle sadio (A) e em indivíduo sob investigação (B) da densidade de receptores GABA _A no cérebro. Cores luminosas indicam alta densidade e cores escuras baixa densidade desses receptores. As setas indicam diminuição de ligação do radiotraçador aos receptores GABA _A no indivíduo em investigação comparado ao controle.....	13
FIGURA 4: Esquema de desenvolvimento de radiotraçador para acesso a neuroreceptor com aplicações em PET ou SPECT	20
FIGURA 5: flavona (2-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona)	22
FIGURA 6: Rota biossintética dos flavonóides	22
FIGURA 7: Valores de K _i e razão de ligação de flavonas testadas frente a sítios receptores GABA com ³ H-flumazenil em membranas corticais de ratos	25

FIGURA 8: Apresentação do diazepam em modelo de farmacóforo desenvolvido por Cook e colaboradores	27
FIGURA 9: 6-metil-flavona construída sobre o farmacóforo proposto por Dekermendjian e colaboradores (1999) por sobreposição com o ligante CGS-9896	28
FIGURA 10: Sobreposição da flavona com o diazepam	29
FIGURA 11: Núcleo fundamental flavona	30
FIGURA 12: Contribuições estéricas para interação de flavonóides com sítio receptor ...	31
FIGURA 13: Contribuições eletrostáticas para interação de flavonóides com sítio receptor BZ	31
FIGURA 14: iomazenil	39
FIGURA 15: NNC 13-8241	40
FIGURA 16: Ligantes para sítios receptores BZ: flumazenil e análogos	42
FIGURA 17: Estruturas químicas do (<i>S</i>)-bretazenil e (<i>R</i>)-bretazenil (X= bromo-76 ou iodo-123, para aplicação em PET ou SPECT, respectivamente)	43
FIGURA 18: flavona marcada com iodo radioativo na posição 6	45
FIGURA 19: Rota de síntese para obtenção de flavona e análogos	46
FIGURA 20: Diagrama de Craig	50
FIGURA 21: Mecanismo esquemático de substituição eletrofílica aromática direta	65
FIGURA 22: Mapas topográficos de distribuição de cargas moleculares e superfícies de densidade eletrônica da flavona	67
FIGURA 23: Mapas topográficos de distribuição de cargas moleculares para a molécula de 6- ¹³¹ I-flavona	67

FIGURA 24: Representação esquemática de possível modelo de interações de flavonóides nos sítios receptores GABA _A	68
FIGURA 25: Representação tri-dimensional dos modelos da flavona radiomarcada calculados por AM1 e <i>ab initio</i> HF 3.21G* em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).....	70
FIGURA 26: Representação tri-dimensional dos modelos da 3'-NO ₂ -flavona radiomarcada calculados por AM1 e <i>ab initio</i> HF 3.21G* em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).....	71
FIGURA 27: Representação tri-dimensional dos modelos da 3'-F-flavona radiomarcada calculados por AM1 e <i>ab initio</i> HF 3.21G* em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).....	72
FIGURA 28: Representação tri-dimensional dos modelos da 4'-F-flavona radiomarcada calculados por AM1 e <i>ab initio</i> HF 3.21G* em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).....	73
FIGURA 29: Retrossíntese para obtenção de núcleo cromona	83
FIGURA 30: Degradação para sistema cromona	84
FIGURA 31: Síntese de 6-metil-NO ₂ -flavonas substituídas	85
FIGURA 32: Síntese de flavonas a partir de chalconas	85
FIGURA 33: Rota de síntese para obtenção da flavona e derivados	87
FIGURA 34: Mecanismo de ataque nucleofílico envolvido na obtenção de 2-benzoil-acetofenona	93
FIGURA 35: Mecanismo de reação envolvido no rearranjo de Baker-Venkataraman ...	94
FIGURA 36: Mecanismo envolvido na obtenção da flavona e análogos	95

FIGURA 37: Mecanismo geral de substituição eletrofílica	106
FIGURA 38: Obtenção de 6-iodo-131-flavona ou análogos	111
FIGURA 39: Marcação de derivado de flavona pelo método de iododestanição	112
FIGURA 40: Porcentagem de atividade da flavona marcada com iodo-131 acumulada no tecido cerebral de camundongos Swiss, nos primeiros 30 minutos após a administração	121
FIGURA 41: Porcentagem de atividade da flavona marcada com iodo-131 acumulada no tecido cerebral de camundongos Swiss, em função do tempo de administração	125
FIGURA 42: Atividade da flavona marcada com iodo-131 administrada em camundongos Swiss acumulada no tecido sanguíneo, em função do tempo de administração	125
FIGURA 43: Atividade da flavona marcada com iodo-131 administrada em camundongos Swiss acumulada na tireóide, em função do tempo de administração	127
FIGURA 44: Imagens dinâmicas da cabeça do coelho evidenciando a captação cerebral durante 30 minutos com atualização de imagem a cada 60 segundos. Imagens realizadas em gama câmara analógica Siemens LEM+ portátil, 300.000 cpg/s com magnificação de 1,75 para a cabeça e com utilização de colimador paralelo.....	128
FIGURA 45: Imagens estáticas tardias em coelho (A) da cabeça evidenciando a captação cerebral após 35 minutos da injeção e (B) de corpo inteiro após 40 minutos da injeção, demonstrando alta concentração cerebral e início de clareamento do radioligante, indicado pela concentração em órgãos como rins e bexiga. Imagens realizadas com 300.000 cpg/s sem magnificação para o corpo inteiro e com utilização de colimador divergente.	129
FIGURA 46: Imagens cintilográficas em gama câmara analógica Siemens LEM+ portátil realizadas em coelho New Zeland enfatizando cérebro. Em (A) imagem cerebral utilizando como traçador flavona-iodo-123 sendo 300.000 cpg/s com magnificação de 1,75 e com colimador paralelo e em (B) ECD-Tc99 ^m sendo 300.000 cpg/s com magnificação de 1,75 e com colimador paralelo	130

FIGURA 47: Representação tri-dimensional dos modelos dos flavonóides radiomarcados calculados por AM1.....	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores das cargas moleculares da flavona	63
TABELA 2: Propriedades físico-químicas calculadas pelo método AM1 e <i>ab initio</i> HF/3-21 *G para a flavona e análogos	77
TABELA 3: Registro de RMN (CDCl ₃) de 4H-piran-4-ona	82
TABELA 4: Condições experimentais envolvidas no preparo da flavona	89
TABELA 5: Condições experimentais envolvidas no preparo da 3'-NO ₂ -flavona	90
TABELA 6: Condições experimentais envolvidas no preparo da 3'-F-flavona	91
TABELA 7: Condições experimentais envolvidas no preparo da 4'-F-flavona	92
TABELA 8: Principais bandas de absorção (cm ⁻¹) na região do infravermelho da flavona e análogos	97
TABELA 9: Principais sinais de RMN- ¹ H (ppm) flavona e análogos	98
TABELA 10: Principais sinais de RMN- ¹³ C (ppm) flavona e análogos	99
TABELA 11: Resultados experimentais envolvidos na obtenção da flavona e análogos ...	102
TABELA 12: Pureza radioquímica obtida para os compostos marcados com iodo-131 com atividade de 1,7 mCi cada	110
TABELA 13: Estabilidade dos compostos radiomarcados com iodo-131 com atividade de 1,7 mCi cada, os valores correspondem a porcentagem de incorporação do radioiodo em função do tempo	110

TABELA 14: Captação no tecido cerebral de 6-iodo-131-flavona em camundongos <i>Swiss</i>	120
TABELA 15: Biodistribuição de ¹³¹ I-6-flavona em camundongos <i>Swiss</i> expressos como % dose/g (média ± desvio) n=5	123
TABELA 16: Valores de σ de Hammett, π de Hansch e ClogP* dos grupos substituintes.....	132

LISTA DE ABREVIações

AM1: Austim model 1
BHE: Barreira hematoencefálica
BZ: Benzodiazepínico
CADD: Computer-assisted drug design
CCDI: Cromatografia em camada delgada instantânea
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
CT: Cloramina-T
DI: Diazepam insensíveis
FDG: fluordeoxiglicose
GABA: <i>gama</i> aminobutiric acid
HOMO: Highest occupied molecular orbital
ITLC-SG: Instant tin layer chromatography- silic gel
IV: Infravermelho
Ki: Constante de inibição
logP: Coeficiente de partição
LUMO: Lowest unoccupied molecular orbital
MEP: Molecular electrostatic potential
PET: Pósitron emission tomography
PM3: Parametric model 3
QSAR: Quantitative structure activity relationships
REA: Relações estrutura-atividade

RM: Ressonância magnética

RMN: Ressonância magnética nuclear

SAR: Structure activity relationships

SNC: Sistema nervoso central

SPECT: Single photon emission computer tomography

TC: Tomografia computadorizada

RESUMO

- BIBLIOTECA -
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

O desenvolvimento de radioligantes para o sistema nervoso central (SNC) com características radiotraçadoras que justifiquem seu uso em diagnóstico por geração de imagens é esperado pela comunidade médica nuclear. Os benzodiazepínicos flumazenil- ^{11}C e iomazenil- ^{123}I são utilizados, com limitações, para investigações clínicas de densidade de sítios receptores benzodiazepínicos no cérebro em patologias como Alzheimer, epilepsia e depressão, entre outras. No Brasil, entretanto, estes traçadores ainda não estão disponíveis para uso clínico.

Neste sentido, os flavonóides têm despertado interesses como perspectiva de nova classe de compostos com atividade no SNC podendo originar radiotraçadores com perspectivas para aplicação em imageamento cerebral.

Baseado no exposto, a proposta deste estudo envolve o planejamento, a síntese e a marcação com radioiodo (^{131}I e ^{123}I) de flavona e análogos, o controle de qualidade radioquímico, os estudos de biodistribuição e o imageamento, para a avaliação do perfil de captação desses compostos e potencial aplicação em estudos cerebrais, frente a sítios receptores benzodiazepínicos.

Os compostos estudados neste trabalho foram obtidos empregando-se a transformação de Baker-Venkatarman. A flavona e análogos foram identificados através de espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e IV. O grau de pureza das substâncias obtidas foi confirmado através da medição da faixa de fusão.

Os compostos radiomarcados foram obtidos com alta pureza radioquímica por substituição eletrofílica aromática direta. Esta marcação propiciou estabilidade *in vitro* após 24 horas e, para a flavona radiomarcada estabilidade *in vivo*, uma vez que a tireóide não apresentou captação significativa em tempos menores que 1 hora e excreção favorável no tempo de 24 horas.

Os estudos de biodistribuição foram realizados em camundongos *Swiss*, verificando-se alta concentração de flavona-iodo-131 no cérebro, principalmente até 30 minutos após a injeção intravenosa e eliminação favorável após 24 horas de estudo. As imagens cerebrais foram realizadas em coelho *New Zeland* e em ratos *Wistar* adquiridas em gama câmara analógica sugerindo que a captação desse ligante no cérebro em tempos curtos, até 30 minutos, viabiliza a aquisição de imagens cintilográficas.

Adicionalmente, foram desenvolvidos estudos de modelagem molecular da flavona e da flavona radiomarcada, utilizando-se mecânica quântica AM1 semi-empírico, corroborando a reatividade química desse composto frente à marcação com radioiodo por substituição eletrofílica, processo controlado predominantemente por interações eletrostáticas.

Foram calculados os valores individuais de cargas para cada carbono da estrutura da flavona, incluindo cargas de Mulliken, Natural e Eletrostática, e foram gerados os mapas topográficos de distribuição de cargas de ambas as moléculas, evidenciando que as posições 6 e 8, na molécula de flavona, são as mais prováveis para a substituição por rádioiodo.

ABSTRACT

The development of radioligands for the Central Nervous System (CNS) with adequate radiotracer characteristics for the use in imaging diagnostic has been long expected by the medical community. Benzodiazepines flumazenil- ^{11}C and iomazenil- ^{123}I are employed with limitations in clinical investigations of the density of receptor sites in the brain in pathologies such as Alzheimer, epilepsy, and depression. Nevertheless, in Brazil these radiotracers are not available in market, yet.

In this respect, flavonoids has drawing attention as a perspective of a new class of compounds wit CNS activity and potential of originating radiotracers to be employed in brain imaging.

Therefore, the goal of this work consisted in the planning, synthesis, and labeling with radioiodine (^{131}I and ^{123}I) of flavone and analogs, as well as to perform radiochemical quality control, biodistribution, and imaging studies of the radiotracers obtained in order to evaluate the uptake profile and potential for use in cerebral studies of benzodiazepinic receptors sites.

To obtain the compounds, we utilized the Baker-Venkataraman transformation, and NMR- ^1H , NMR- ^{13}C , and IR spectroscopy were employed for identification of the molecules. The purity of the compounds obtained was assessed by means of melting point determinations.

The radiolabeled compounds were obtained by aromatic electrophilic substitution with a high degree of radiochemical purity. The labeling allowed *in vitro* stability after 24 hours and *in vivo* stability of the radiolabeled flavone, provided that the thyroid did not presented significant uptake in less than one hour and favorable excretion in 24 hours.

Biodistribution studies were carried out employing Swiss mice. The results indicated high concentrations of flavone- ^{131}I in the brain, especially in the first 30 minutes after intravenous injection, as well as favorable elimination after 24 hours.

Brain images were obtained from *New Zeland* rabbit and *Wistar* rats in analogical gamma camera, suggesting that short-time brain uptake of the radioligand (up to 30 minutes) allows the acquisition of cynthilographic images.

Additionally, molecular modeling studies of the flavone were performed employing the semi-empiric method of AM1. The results corroborate the chemical reactivity of the compound for labeling with radioiodine by aromatic electrophilic substitution, process that is governed mainly by electrostatic interactions.

The individual values of Mulliken, Natural, and Electrostatic charges of each carbon atom in flavone structure were calculated and topographic maps of charge distribution were then generated. The analysis of the maps indicates that positions 6 and 8 in the flavone molecule are most likely to present the radioiodine substitution.

1. INTRODUÇÃO

Radioligantes cerebrais são moléculas marcadas com isótopos emissores de pósitron ou emissores de fótons, *gama* emissores, que se ligam seletivamente a sítios receptores específicos no SNC. Para utilização *in vivo* esses radioligantes não devem apresentar toxicidade e também não devem apresentar atividade farmacológica na dose administrada (Katsifis, Kassiou, 2004; Mitterhauser *et al.*, 2004; Wong, Pomper, 2003; Grallert, Tavares e Araújo, 2003).

Utilizando-se ligantes marcados com nuclídeos radioativos, em técnicas como tomografia por emissão de pósitron (PET) e tomografia por emissão de fóton único (SPECT), é possível gerar imagens que auxiliam eficazmente no diagnóstico de doenças neuropsiquiátricas, tanto pela visualização da distribuição e função dos inúmeros tipos de neuroreceptores, como pela investigação de anormalidades neuroquímicas. Salienta-se que a utilização dessas técnicas constitui-se em ferramenta de fundamental importância para a exploração funcional do SNC (Adam, Wilbur, 2005; Katsifis *et al.*, 2003; Costa, Oliveira, Bressan, 2001; Foged *et al.*, 1996).

O desafio relacionado à obtenção de imagens de receptores cerebrais com PET e SPECT tem se multiplicado nos últimos anos. Estudos de biologia molecular descobrem novos subtipos de receptores para muitos sistemas neurotransmissores com propriedades e, possivelmente, com papel específico em condições neuropsiquiátricas (Katsifis *et al.*, 2003; Mazière e Mazière, 1990).

Isso aumenta a necessidade do desenvolvimento de novos radioligantes com alta especificidade por estes subtipos de receptores sem, contudo, perder os padrões de excelência na geração de imagens observadas para a maioria dos radiotraçadores empregados rotineiramente.

Os flavonóides têm despertado interesses como perspectiva de nova classe de compostos com seletividade frente a sítios receptores benzodiazepínicos no SNC, podendo originar radiotraçadores (Fernández *et al.*, 2005; Marder *et al.*, 2001; Viola *et al.*, 2000; Paladini *et al.*, 1998).

As características farmacológicas aliadas à baixa toxicidade fazem dos flavonóides alvo importante para o desenvolvimento de radioligantes com alta afinidade por esses receptores e com perfil adequado para diagnóstico por imagem, comparado ao flumazenil- ^{11}C e iomazenil- ^{123}I , resultando em contribuição de suma importância (Huand *et al.*, 2001; Dekermendjian *et al.*, 1999).

Neste sentido, este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de radioligantes cerebrais, baseados na estrutura da flavona, incluindo síntese dos ligantes, desenvolvimento radioquímico, estudos de biodistribuição e avaliação do perfil cintilográfico dos compostos por imageamento em câmara gama.

2. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de potencial radiotraçador cerebral com afinidade/especificidade de ligação a sítios receptores benzodiazepínicos, baseado na estrutura química da flavona. Para tanto, foram planejadas e introduzidas alterações moleculares na posição 3' e 4' do anel B do núcleo da flavona (figura 1).

FIGURA 1: flavona e análogos (R= -H; NO₂, F, e R'= F)

Com o objetivo de alterar as propriedades físico-químicas, com conseqüente modificação na biodisponibilidade deste no SNC e na afinidade pelo respectivo sítio receptor, assim, estabeleceu-se como metas os seguintes aspectos:

- Planejamento, em nível molecular, de radioligantes com característica antagonista frente aos sítios receptores benzodiazepínicos no SNC, sendo a escolha dos grupos substituintes baseada em dados da literatura (Fernández *et al*, 2005; Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Dekermendjian *et al*, 1999; Marder *et al*, 1998; Paladini *et al*, 1998; Marder *et al*, 1997) e no Diagrama de intercorrelação proposto por Craig (Craig, 1971);
- Estudos de reatividade química da flavona frente à substituição eletrofilica com radioiodo, pela aplicação de modelagem molecular;

- Síntese e identificação da flavona e análogos, sendo R= -H; -3'NO₂, -3'F, e R'= -4'F (figura 1);
- Estabelecimento de metodologia de marcação da flavona e análogos com iodo-131 e com iodo-123 pelo método de substituição eletrofilica aromática direta;
- Avaliação da aplicabilidade dos compostos radiomarcados in vivo, através de estudos de biodistribuição da 6-¹³¹I-flavona em camundongos *Swiss* e de imageamento da 6-¹²³I-flavona em coelhos *New Zeland*, bem como estudos de imageamento em ratos Wistars da 6-¹³¹I-flavona e análogos radiomarcados.

Ressalta-se que o entendimento, em nível molecular, das modificações estruturais do protótipo selecionado, apresenta a função de possibilitar não apenas o planejamento de séries futuras, como também de fornecer subsídios para a elucidação das principais propriedades físico-químicas envolvidas no estabelecimento da resposta biológica de derivados flavonóides.

3. JUSTIFICATIVA

Diante da necessidade de desenvolvimento de radioligantes para o SNC com características radiotraçadoras que justifiquem seu uso em diagnóstico por geração de imagem, observa-se que os flavonóides tem despertado grande interesse como nova classe química com atividade no SNC (Fernández *et al*, 2005; Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Marder *et al*, 1998; Paladini *et al*, 1998; Dekermendjian *et al*, 1999; Marder *et al*, 1997) e que podem originar radiotraçadores possíveis de serem absorvidos na clínica médica nuclear diagnóstica.

O planejamento de ligantes baseado na estrutura da flavona poderia resultar em análogos com melhor perfil para diagnóstico por imagem comparado ao flumazenil- ^{11}C e iomazenil- ^{123}I .

Assim, realizou-se modificações na posição 3' e 4' do anel B do núcleo da flavona (figura 1), pela introdução de grupos estrategicamente planejados, com o objetivo de alterar as propriedades eletrônicas e farmacocinéticas do composto líder.

Neste sentido, o estudo aprofundado das relações estrutura-atividade, SAR, na série de compostos estudada poderá fornecer informações acerca da hidrofobicidade ótima, subsidiando, com isso, o planejamento e/ou identificação de análogos com características otimizadas para a geração de imagem aplicada em medicina nuclear diagnóstica com potencial de reserva patentária.

REVISÃO DA LITERATURA

---

1. Neurotransmissores, neuroreceptores e sinapses**2. GABA e receptores GABAérgicos****3. Radiotraçadores cerebrais**

3.1. PET e SPECT

3.2. Interação de radiotraçadores com neuroreceptores

3.3. Radiotraçadores utilizados para investigação cerebral

4. Desenvolvimento de radioligantes

4.1 A partir de produtos naturais

4.2. Relações estrutura-atividade de flavonóides

5. Desenvolvimento de novos radiotraçadores5.1. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de novos
cerebrais

5.2. Relações quantitativas estrutura-atividade

**6. Radiotraçadores cerebrais para acesso a sítios receptores
benzodiazepínicos**

1. NEUROTRANSMISSORES, NEURORECEPTORES E SINAPSES

A comunicação entre células do SNC ocorre através de junções neuronais ou sinapses que podem ser mediadas química ou eletricamente. Quase todas as sinapses utilizadas para a transmissão de sinais no SNC, no organismo humano, são quimicamente mediadas. Nas junções neuronais, o primeiro neurônio secreta, na fenda sináptica, o neurotransmissor, que nada mais é do que uma substância química, que atuando sobre proteínas receptoras localizadas na membrana do neurônio seguinte o excita, inibe ou muda sua sensibilidade de alguma maneira (Sieghart, Ernst, 2005; Trevor, 1998; Bloom, 1996). Cada neurotransmissor é secretado por diferentes tipos de células e funcionam em áreas distintas, porém específicas do cérebro, resultando em efeito que depende do local de interação com o tecido neuronal (Korpi *et al.*, 2002).

A atividade de fármacos resulta da interação destes com macromoléculas específicas de forma a alterar sua atividade bioquímica ou biofísica. Semelhantemente, após ser liberado, o neurotransmissor se liga a receptores específicos na superfície da célula pós-sináptica, já tendo sido demonstrada, inclusive, a existência de inúmeros subtipos de receptores para cada neurotransmissor específico (Marder *et al.*, 2001; Trevor, 1998; Bloom, 1996; Wong, Skolnick, 1992).

Os neuroreceptores estão presentes tanto nos neurônios pós-sinápticos como nos pré-sinápticos, sendo que nestes últimos funcionam como inibidores da liberação adicional de neurotransmissor na fenda sináptica (Sieghart, Ernst, 2005; Baulieu e Guilleau, 1998).

Os neurotransmissores são secretados por diferentes tipos de células e são moléculas relativamente simples e pequenas. Cerca de 60 dessas substâncias já foram identificadas, podendo ser classificadas em quatro categorias, a saber:

- (1) colinas – sendo a acetilcolina a mais importante;

- (2) aminas biogênicas - serotonina, histamina e catecolaminas como a dopamina e norepinefrina;
- (3) aminoácidos - o glutamato e o aspartato são transmissores excitatórios bem conhecidos, enquanto que o ácido γ -aminobutírico (GABA), a glicina e a taurina são neurotransmissores inibidores;
- (4) neuropeptídeos – esses são formados por cadeias mais longas de aminoácidos.

Sabe-se que mais de 50 deles ocorrem no cérebro e muitos deles estão implicados na modulação ou na transmissão de informação neural (Korpi et al., 2002; Baulieu e Guilloteau, 1998).

Um conceito importante na farmacologia de receptores é a atividade ou a eficácia intrínseca, uma medida da capacidade do ligante em ativar receptor específico. Se a interação ligante-receptor aumentar a resposta celular, inibitória ou excitatória, este possui eficácia intrínseca positiva e é classificado como agonista. Se, no entanto, esta interação diminuir a associação entre receptor e transdutor, o ligante possui eficácia negativa e é referido como agonista inverso. Assim, antagonistas passam a ser ligantes que se unem a um receptor específico sem afetar a associação entre o receptor e o transdutor (Patrick, 2001; Foye et. al., 1997; Bloom, 1996).

2. GABA E RECEPTORES GABAÉRGICOS

Sistemas neurotransmissores e neuroreceptores tem sido foco de intensiva pesquisa nos últimos anos (Schlicker, Boller, Schmidt, 2004; Katsifis *et al.*, 2004; Sánchez, 2001; Mitterhauser *et al.*, 2001). Entre esses sistemas cita-se o receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) tipo A, mediando a maioria das sinapses inibitórias rápidas no sistema nervoso central. Inibição é um processo de fundamental importância na atividade cerebral e grande parte das células neuronais apresenta o receptor GABA_A em suas membranas celulares (Whitting, 2003; Biagi *et al.*, 2002; Korpi *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2001).

Este receptor pertence à superfamília de ligantes de canal iônico de cloreto e é caracterizado por apresentar estrutura pentamérica (Whiting, 2003; Korpi *et al.*, 2002). Há 20 anos, pesquisas com purificação de receptor GABA_A bovino sugeriam a existência de apenas duas proteínas envolvidas na formação deste canal iônico. Sabe-se hoje, porém, que o receptor GABA_A pode ser composto por subunidades polipeptídicas variadas (α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ρ 1-2, π e θ) todas elas produtos de genes separados (Whiting, 2003; Korpi *et al.*, 2002), sendo que estas subunidades podem estar combinadas em diversas proporções.

Protótipos de receptores GABA_A, em pesquisas, são seletivamente ativados por muscinol, antagonizados competitivamente por bicuculina e não-competitivamente por picrotoxina (Korpi *et al.*, 2002; Bloom, 1998).

Existem vários sítios de ligação a fármacos neste receptor e os mais importantes estão representados na figura 2.

FIGURA 2: Modelo do complexo receptor GABAérgico e seus vários sítios de ligação

Mecanismos GABAérgicos estão envolvidos diretamente em todos os processos fisiológicos e, indiretamente, em muitas disfunções neuropsiquiátricas. No entanto, fármacos com ação no receptor GABA_A, largamente prescritos na clínica médica para tratamento de ansiedade, distúrbios do sono, epilepsia, Alzheimer e outras disfunções, apresentam diversos problemas a serem solucionados (Whiting, 2003; Katsifis *et al.*, 2003; Korpi *et al.*, 2002), os principais deles relacionados aos efeitos colaterais intrínsecos, por exemplo, o desenvolvimento de dependência química ao fármaco (Paronis, 2006).

Na tentativa de solucionar os problemas relacionados ao uso de agonistas de sítios receptores GABA_A foram testados compostos com atividade agonista parcial. Estudos em modelos animais obtiveram resultados satisfatórios, porém, em triagem clínica, não foram suficientemente convincentes, tanto em relação à eficácia quanto aos efeitos colaterais inerentes a agonistas de sítios receptores GABA_A-benzodiazepinas (Paroni, 2006; Whiting, 2003; Korpi *et al.*, 2002).

Oportunidade para o desenvolvimento de novos fármacos surgiu com a elucidação da biologia molecular do receptor GABA_A-benzodiazepina. A diversidade desse receptor excedeu as expectativas dos pesquisadores enquanto se clonavam as primeiras subunidades (Whiting, 2003; Korpi *et al.*, 2002). Acredita-se que essas subunidades existam em aproximadamente 13 combinações funcionais *in vivo* e, em princípio, essas subunidades podem se arranjar, formando infinitas combinações funcionais nos sítios receptores GABA_A no SNC (Fang *et al.*, 2005; Harris, Loew, 2000).

Como exemplo cita-se os sítios receptores GABA_A contendo subunidades protéicas $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ ou $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ que se ligam fortemente ao agonista parcial inverso bretazenil, com afinidade reduzida pelo antagonista benzodiazepínico flumazenil e não apresentam afinidade por agonistas como diazepam ou triazolam (Paroni, 2006; Fang *et al.*, 2005; Katsifis *et al.*, 2004).

Esses receptores são encontrados predominantemente no cerebelo, no hipocampo e em áreas corticais (Paroni, 2006; Fang *et al.*, 2005; Katsifis *et al.*, 2004; Whiting, 2003; Katsifis *et al.*, 1999).

3. RADIOTRAÇADORES CEREBRAIS

No início dos anos 70 a geração de imagens cerebrais foi revolucionada pela associação de computadores a vários sistemas de detecção externos. Tal associação deu origem aos métodos de imagens tridimensionais atualmente utilizados como PET e SPECT (Blankenberg, 2004; Lammertsma, 2004; Kowalsky, Falen, 2004; Grallert, Tavares e Bortoleti, 2003; Galan e Tavares, 2003; Turkington, 2001).

3.1. PET e SPECT

As técnicas de PET e SPECT possibilitam a monitoração, em função do tempo, da concentração do radiotraçador no tecido regional após administração de uma molécula marcada com radionuclídeo emissor de pósitron ou de fóton de média energia, respectivamente (Turkington, 2001; Groch e Erwin, 2001).

As técnicas de imagens funcionais envolvem a conversão da energia do fóton emitido em mapas tomográficos da atividade cerebral regional. Isto se dá pela administração de moléculas marcadas com elementos radioativos, possibilitando o mapeamento da captação cerebral com detectores de radiação externos. Dependendo do radioligante utilizado, podem-se obter índices gerais da função cerebral, como fluxo sanguíneo regional ou metabolismo de glicose, ou ainda da medida da funcionalidade dos receptores (Kowalsky, Falen, 2004; Lammertsma, 2004; Grallert, Tavares e Bortoleti, 2003; Slifstein, Laruelle, 2001).

As imagens geradas em estudos de PET resultam de um conjunto de detetores que, circulando órgãos de interesse do paciente, registram a chegada simultânea de pares de fótons emitidos em sentidos opostos, após a interação dos pósitrons emitidos pelo radiotraçador com elétrons do tecido (Kowalsky, Falen, 2004)

Imagens tridimensionais, de alta resolução e precisão, são adquiridas e quando se coletam amostras de sangue, quantificação absoluta da atividade regional pode ser obtida. A complexidade da tecnologia e necessidade de um ciclotron local, contudo, para produzir os radiotraçadores emissores de pósitron com tempo de meia-vida físico curto, tornam a técnica recurso dispendioso e de aplicabilidade limitada (Oliveira *et al.*, 2006; Kowalsky, Fallen, 2004; Grallert, Tavares e Bortoleti, 2003; Turkington, 2001; Sánchez, 2001; Saha, 1997).

Em SPECT, os detetores são posicionados ao redor do órgão de interesse do paciente e registram a radioatividade após a administração de radiotraçadores que são eles próprios, emissores de fótons. Apesar da sensibilidade e resolução menores, quando comparado ao PET, a simplicidade relativa e o baixo custo dos radiotraçadores e dos equipamentos geradores de imagem tornam o SPECT ferramenta mais apropriada para o uso rotineiro, resultando em alto potencial para aplicabilidade clínica (Blankenberg, 2004; Kowalsky, Fallen, 2004; Galan, Tavares, 2003; Grallert, Tavares e Bortoleti, 2003, Saha, 1997).

O desenvolvimento recente na área de instrumentação médica nuclear resultou em melhora significativa da qualidade das imagens geradas por SPECT aproximando, em termos de resolução de imagem, à técnica de PET. A técnica de SPECT é utilizada, inclusive, para tomocintilografia convencional de cérebro e medida do fluxo sanguíneo cerebral, sendo promissora na investigação clínica de receptores cerebrais (Wong, Brasic, 2001).

Vários ligantes para receptores marcados com iodo-123 e, mais recentemente, ^{99m}Tc , encontram-se disponíveis (Groch e Erwin, 2001). Apresenta-se, abaixo, exemplo de imagem cerebral de paciente com diminuição na densidade de receptores GABA_A , decorrente de depressão profunda, obtida com a utilização de iomazenil-iodo-123, figura 3.

FIGURA 3: Imagens cerebrais obtidas com iomazenil-¹²³I em SPECT captadas em câmara com três cabeças, em indivíduo controle sadio (A) e em indivíduo sob investigação (B) da densidade de receptores GABA_A no cérebro. Cores luminosas indicam alta concentração e cores escuras baixa concentração desses receptores. As setas indicam diminuição de ligação do radiotraçador aos receptores GABA_A no indivíduo em investigação comparado ao controle.

FONTE: *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 347-350, 2004.

3.2. INTERAÇÃO DE RADIOTRAÇADORES COM NEURORECEPTORES

Os inúmeros avanços técnico-científicos das últimas décadas possibilitaram identificar e caracterizar a estrutura de variedade de neurotransmissores e de seus receptores no cérebro, bem como o estudo de suas interações pelo uso de radioligantes cerebrais (Löscher, Potschka, 2005; Katsifis *et al.*, 2004; Blankenberg, 2004; Kowalsky, Fallen, 2004; Wong, Pomper, 2003; Grallert, Tavares, Bortoleti, 2003).

Utilizando-se núclídeos radioativos, em técnicas como PET e SPECT, é possível gerar imagens que auxiliam eficazmente no diagnóstico de doenças neuropsiquiátricas, tanto pela visualização da distribuição e função dos inúmeros tipos de neuroreceptores como pela avaliação de anormalidades neuroquímicas (Grallert, Tavares, Bortoleti, 2003; Katsifis *et al.*, 2003; Mazière e Mazière, 1990).

Assim, a obtenção de imagens de neuroreceptores, em estudos *in vivo*, é aplicada, basicamente, em três grandes frentes, a saber (Löscher, Potschka, 2005; Blankenberg, 2004; Kowalsky, Fallen, 2004; Katsifis *et al.*, 2003; Wong, Brasic, 2001; Mazière e Mazière, 1990):

- Para determinar o papel do sistema receptor específico na fisiopatologia das disfunções neuropsiquiátricas como esquizofrenia, epilepsia, demência do tipo Alzheimer, ansiedade e depressão, entre outras, bem como nos casos de uso de drogas de abuso;
- Para avaliar a interação de agentes farmacológicos com sistemas receptores, visando o esclarecimento do mecanismo de ação de agentes psicotrópicos, bem como assistir o desenvolvimento de tratamentos alternativos de doenças neuropsiquiátricas e;
- Auxiliar o desenvolvimento de novos fármacos para utilização em diagnóstico ou terapia.

A imagem de neuroreceptores consiste no registro da distribuição espacial da radioatividade, após injeção de radioligante na corrente sanguínea, que atravessa a barreira hematoencefálica e se liga a um neuroreceptor por uma fração de tempo. Para ser utilizado *in vivo*, o radioligante não deve apresentar atividade toxicológica nem farmacológica na dose utilizada (Mozley, 2005; Kowalsky, Fallen, 2004; Baulieu e Guilloteau, 1998).

Além disso, devem apresentar algumas características, destacando-se, entre elas, as seguintes (Oliveira *et al.*, 2006; Wong, Pomper, 2003; Busato *et al.*, 1995):

- Alta seletividade, concentrando sua radioatividade no receptor alvo;
- Lipofilicidade adequada para atravessar a barreira hematencefálica de forma fácil e rápida;
- Estabilidade metabólica, com baixo acúmulo de metabólitos ativos;
- Rápida saída dos sítios de ligação não específicos;
- Rápida eliminação sanguínea;

- Ausência de efeitos clínicos em doses de saturação do receptor e;
- Processo de síntese economicamente viável.

3.3. RADIOTRAÇADORES UTILIZADOS PARA INVESTIGAÇÃO CEREBRAL

Os radiotraçadores aplicados na investigação do SNC podem ser divididos em cinco grupos principais, sendo eles (1) traçadores não perfusórios, (2) traçadores perfusórios, (3) marcadores metabólicos, (4) agentes para o fluido cérebro-espinhal e (5) agentes para imagem de receptores (Kowalsky, Fallen, 2004).

Os traçadores não perfusórios foram os primeiros agentes utilizados para realização de imagens de cérebro. Geralmente são compostos hidrofílicos ionizáveis apresentando mecanismo não-específico de localização de lesões cerebrais. Devido as suas características físico-químicas não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) em situações em que o cérebro está intacto.

Sob condições na qual a BHE apresenta lesões como conseqüências de patologias cerebrais, entretanto, esses traçadores deixam o espaço vascular e se concentram nas lesões (Kowalsky, Fallen, 2004). Em lesões originadas de patologias como tumores, hematomas sub-dural e malformações arteriovenosas as imagens realizadas com esses agentes conseguem identificar áreas com acentuada captação de radioatividade, comparativamente ao cérebro sadio. Estão incluídos neste grupo traçadores como ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio, ^{99m}Tc -pentetato (^{99m}Tc -DTPA) e o agente utilizado em PET ^{82}Rb (cloreto de rubídio) (Kowalsky, Fallen, 2004).

Os traçadores perfusórios, ao contrário dos não-perfusórios, conseguem penetrar no cérebro através da BHE intacta. Este fenômeno ocorre porque esses agentes apresentam-se como complexos lipofílicos neutros, podendo se difundir passivamente através das células endoteliais dos capilares cerebrais. Os representantes deste grupo são o ^{99m}Tc -hexametazina (^{99m}Tc -HMPAO) e o ^{99m}Tc -bicisato (^{99m}Tc -ECD) (Kowalsky, Fallen, 2004; Araújo, 1995).

Esses complexos atingem os tecidos cerebrais proporcionalmente ao fluxo sanguíneo cerebral regional. Em regiões com fluxo cerebral normal a perfusão está adequada e, conseqüentemente, ocorre captação da radioatividade na mesma proporção do fluxo. Por outro lado, em regiões com lesão cerebral como as que ocorrem em conseqüência de isquemia, o fluxo sanguíneo está diminuído ou ausente e nessas áreas há menor captação de radioatividade.

O desenvolvimento dos traçadores por perfusão revitalizou as imagens cerebrais contribuindo para a clínica médica nuclear com informações funcionais valiosas, que vieram para complementar os diagnósticos gerados por tomografia computadorizada (TC) e por ressonância magnética (RM).

Os marcadores metabólicos são agentes que conseguem se localizar em regiões do cérebro com atividade metabólica e hipo/hipermetabólicas.

O principal marcador utilizado para imageamento em PET é a 2-deoxi-2-[^{18}F]-fluoro-D-glicose, ^{18}F -FDG. Sendo um análogo da glicose, a ^{18}F -FDG se localiza em tecidos que utilizam glicose como substrato energético. Lesões cerebrais, como tumores, necessitam elevada demanda de energia e demonstram aumento na captação de ^{18}F -FDG relativamente ao tecido normal. A vantagem da utilização de ^{18}F -FDG, em comparação a glicose radiomarcada, é que a ^{18}F -FDG só é parcialmente metabolizada pela enzima glicose-6-fosfato ficando retida nas células, e o acúmulo do radiotraçador permite imagem adequada da região cerebral (Kowalsky, Fallen, 2004; Nutt, 2002; Sánchez, 2001).

Já os radiotraçadores para imagem de receptores foram primeiramente desenvolvidos como ferramenta para pesquisa de novos fármacos (Mozley, 2005; Blankenberg, 2004), mas atualmente estão sendo largamente empregados na clínica médica (Katsifis *et al.*, 2004). A imagem realizada com um traçador receptor-específico permite a determinação de doses ótimas de fármacos psicoativos tradicionais ou novos e, assim, consegue-se alcançar o máximo benefício com o mínimo de efeitos adversos (Kowalsky, Fallen, 2004; Wong, Brasic, 2001).

Além disso, os traçadores receptor-específico permitem identificar, através da imagem, disfunções na recaptação e transporte de neurosubstâncias, como os sistemas de segundo-mensageiro, em indivíduos com disfunções neurológicas e mentais, facilitando a aplicação de intervenção efetiva para a correção do distúrbio.

A possibilidade de imageamento *in vivo* de sistemas neurotransmissores com radiotraçadores para neuroreceptores favorece de maneira singular o diagnóstico de disfunções mentais e nervosas (Kowalsky, Fallen, 2004; Wong, Brasic, 2001).

4. DESENVOLVIMENTO DE RADIOLIGANTES

A obtenção de imagens de neuroreceptores e neurotransmissores foi possível a partir de 1970, seguida especialmente do advento da autoradiografia *in vivo* (Wong, Brasic, 2001).

O desenvolvimento de radiotraçadores com aplicações clínicas em PET incluindo o ^{18}F -FDG em oncologia, e em SPECT, incluindo agentes de perfusão cerebral como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD, surgiu apenas em meados de 1980, e certamente foi decisivo para o início da utilização bem-sucedida de radiotraçadores na realização de imagens de neuroreceptores em humanos (Kowalsky *et al.*, 2004; Wong, Pomper, 2003; Wong, Brasic, 2001).

Exemplos típicos da aplicação de imagens de neurotransmissores incluem fisiologia normal, patofisiologia, monitoração de disfunções (progresso ou regressão) e planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, sendo que este último inclui desenvolvimento de doses racionais (por exemplo, estudos de ocupação de receptores) ou mecanismo de ação de fármacos (Kowalsky *et al.*, 2004; Slifstein, Laruelle, 2001; Wong, Brasic, 2001).

Para o planejamento de um novo radioligante é fundamental que sejam observados alguns fatores, entre eles citam-se (Ono *et al.*, 2005; Katsifis *et al.*, 2004; Wong, Pomper, 2003; Wong, Brasic, 2001):

- Determinação de alvo biológico apropriado;

- Considerações radiosintéticas;
- Características *in vitro* / *in vivo* do ligante a ser radiomarcado (incluindo lipofilicidade, afinidade pelo receptor, ligação a proteínas plasmáticas, metabolismo, etc.);
- Toxicidade do radioligante e;
- Dosimetria da radiação.

O processo envolvido no desenvolvimento de um radioligante, tanto para PET quanto para SPECT, é complexo e multidisciplinar, figura 4. Depois de se identificar o possível ligante a ser marcado, presumidamente baseado nos fatores descritos anteriormente, o primeiro obstáculo encontrado é o desenvolvimento radioquímico, utilizando-se núclídeos produzidos em ciclotrons como ^{18}F ou ^{11}C , ou núclídeos obtidos em reatores nucleares como ^{123}I ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Lammertsma, 2004).

A próxima etapa inclui o desenvolvimento pré-clínico, sendo realizados estudos de imageamento *in vivo* em ratos ou estudos de biodistribuição em camundongos, seguido por ensaios dosimétricos de radiação em animais de pequeno porte e, subsequentemente, estudos toxicológicos com carbono-11 (Nutt, 2002).

Os estudos toxicológicos são realizados em duas espécies diferentes de animais nas quais são administradas, múltiplas vezes, quantidade cem a mil vezes maiores da massa de radioligante que se espera administrar em humanos (Wong, Pomper, 2003).

O imageamento em primatas é primeiramente realizado em macacos, pelo registro de uma seqüência dinâmica de imagens, necessárias para capturar todo o processo fisiológico. Este estudo é comumente associado à medida de metabólitos radiomarcados utilizando-se CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) (Wong, Pomper, 2003).

Uma vez que os estudos de imageamento em humanos e o começo dos estudos da fase I foram iniciados, aumenta-se o controle referente a testes de dosimetria em humanos sendo estes, conseqüentemente, requisito para o progresso das aplicações futuras na clínica médica (Kowalsky, Fallen, 2004; Wong, Pomper, 2003).

Além das etapas descritas, fazem-se necessários estudos extensivos de modelos matemáticos para o radioligante em desenvolvimento, determinando-se, com isso, parâmetros biológicos importantes como densidade e afinidade pelo receptor (Wong, Pomper, 2003).

FIGURA 4: Esquema de desenvolvimento de radiotraçador para acesso a neuroreceptor com aplicações em PET ou SPECT

Adaptado de: *Mol. Imag. Biol.*, v.8, n.6, p. 350-362, 2003

4.1. A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais vegetais foram utilizados durante muito tempo como única fonte de alívio e cura de enfermidades (Barreiro, Fraga, Araújo, 2004; Wermuth, 2000; Foye *et al.*, 1997). A humanidade, a princípio foi guiada pelo instinto, seguido pela experiência e mais recentemente pelo pensamento científico. Nos tempos atuais, tem-se como meta examinar as maneiras pelas quais as doenças podem ser tratadas mais racionalmente (Viegas, Bolzani, Barreiro, 2006). Neste contexto, os flavonóides parecem ter papel importante nas diferentes formas de tratamento médico desde a Antigüidade, e seu uso, para este propósito, vem sendo conservado até hoje (Havsteen, 2002).

Neste contexto, os flavonóides vêm despertando considerável interesse na comunidade científica, sendo este impulsionado, principalmente, pela possibilidade de introdução de novos fármacos originados da flora, e a funcionalidade química dos compostos dessa classe é favorável para o desenvolvimento de derivados com atividade ótima (Cushnie, 2005; Abreu, Branco, 2003; Havsteen, 2002). São moléculas polifenólicas contendo 15 átomos de carbono, constituídas de 2 anéis benzênicos unidos por cadeia de 3 átomos entre elas. Um dos carbonos desta cadeia está sempre conectado a outro carbono de um dos anéis benzênicos, podendo estar diretamente ligado ou se ligar através de ligação de oxigênio, formando um terceiro anel de 5 ou 6 membros entre os 2 anéis já existentes (Havsteen, 2002).

Os flavonóides estão distribuídos em 13 grandes subgrupos, entre eles estão chalconas, flavonas, flavononas, antocianinas e isoflavonas. Estes, assim como os carotenos, são responsáveis pela cor e odor em plantas, frutas e vegetais e invariavelmente todas as plantas que contém células verdes são capazes de sintetizar flavonóides.

Especialmente o subgrupo das flavonas, ocorre naturalmente em grande variedade de espécies, diversas delas da flora brasileira como *Luxemburgia octandra* (Carvalho *et al.*, 2004), *Egletes viscosa* (Pessoa *et al.*, 2000) e *Pothomorphe umbellata* (Isobe, Ohsaki, Nagata, 2002). A figura 5 mostra o núcleo de flavona, também conhecido por γ -benzopirano, precursor fundamental na biossíntese de todos os flavonóides (Havsteen, 2002).

FIGURA 5: flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona)

Os flavonóides representam um dos grupos de compostos fenólicos de maior importância entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal. A biossíntese dos flavonóides nos vegetais está esquematizada na figura 6 (Dewick, 1997):

FIGURA 6: Rota biossintética dos flavonóides

Os flavonóides exercem atividades biológicas importantes (Cody *et al.*, 1998) sendo utilizados em medicina devido as suas características antibacterianas (Linuma *et al.*, 1994), espasmódicas (Ertan, 1987), hepatoprotetora (Velenzuela *et al.*, 1988), e inibidora de enzimas (xantina-oxidase, NADH-oxidase) (Rastelli *et al.*, 1997; Bohmont *et al.*, 1987), sendo que recentemente pesquisas indicam atividade ansiolítica no SNC (Fernández *et al.*, 2005; Huen *et al.*, 2003; Bovicelli *et al.*, 2002; Huand *et al.*, 2001; Dekermendjian *et al.*, 1999; Marder *et al.*, 1998).

Embora a presença de flavonóides na dieta humana seja evidente, ainda existem poucos estudos sobre a capacidade dos mesmos serem absorvidos e alcançarem seu sítio de ação (Zuannazi e Montana, 2004).

Estudos sobre a biodisponibilidade e a metabolização da quercetina, em animais de experimentação, indicaram que após a administração oral a absorção no intestino delgado ocorre, principalmente, na forma de glicuronídeos e, apesar do emprego de altas doses, as concentrações plasmáticas encontradas são baixas, sendo que a conjugação com o ácido glicurônico ocorre preferencialmente na parede intestinal (Zuannazi e Montana, 2004; Ader *et al.*, 2000).

Quanto ao metabolismo, estudos em ratos que receberam dieta com 0,25% de quercetina e 0,25% de catequina, indicaram que os metabólitos destas substâncias ocorrem no plasma na forma conjugada, sendo que a catequina ocorre principalmente na forma de glicuronídeo e a quercetina na forma sulfo- e glico-sulfo-conjugado (Manach *et al.*, 1999). Outros estudos, entretanto, indicaram que os flavonóides quercetina, isoquercitina e rutina, administrados por via oral em ratos não são eliminados como tal pela urina, nem os seus metabólitos na forma de glicuronídeo (Choudhhury *et al.*, 1999). Também foi observado, em humanos, que a quercetina se liga extensivamente às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, e somente 2% ou menos se apresenta na forma livre (Boulton *et al.*, 1998).

Os flavonóides normalmente não são considerados substâncias tóxicas, e várias especialidades farmacêuticas os descrevem como isento de toxicidade. Na literatura atual, todavia, não há respaldo para isentá-los de toxicidade (Zuannazi e Montana, 2004; Trueba e Sanchez, 2001).

Isto mostra que, embora os flavonóides constituam um dos grupos de metabólitos secundários com grande potencial terapêutico curativo e preventivo de diversas enfermidades, ainda são necessários estudos clínicos e toxicológicos que permitam o emprego destas substâncias com maior segurança (Zuannazi e Montana, 2004).

Pouco se conhecia até 1989 sobre os efeitos dessa classe de compostos no SNC, e o primeiro monoflavonóide descrito na literatura como ligante específico para sítios receptores BZ foi a 5,7-dihidroxi-flanona (crisina), isolado da *Passiflora coerulea* (Nielsen *et. al*, 1998). Em seguida, Medina e col. (1997) isolaram a 5,7,4'-trihidroxi-flavona (apigenina) a partir da *Matricaria recutita* L., uma planta utilizada largamente na medicina folclórica para o preparo de infusões tranqüilizantes.

Os flavonóides descritos acima e alguns outros com afinidade e seletividade por sítios receptores BZ estão listados na figura 7, alguns deles extraídos de plantas utilizadas na medicina folclórica.

Flavonóides	Ki* (nM)	Taxa de ocupação de sítios GABA**
flavona	4.200 ± 30	1,05 ± 0,03
5-hidroxi flavona	1.100 ± 34	1,03 ± 0,07
5,7-dihidroxi flavona	920 ± 80	0,90 ± 0,11
5,7,4'-trihidroxi flavona	770 ± 40	1,03 ± 0,12
6-hidroxi flavona	400 ± 60	1,06 ± 0,10
6-metil flavona	125 ± 8	0,98 ± 0,08
6-bromo flavona	70 ± 9	1,80
3'-6-dimetil flavona	29 ± 2	1,63 ± 0,27
6-metil-3'-nitro flavona	5,6 ± 7	0,72 ± 0,05
flumazenil	1,2 ± 0,4	1,05 ± 0,11

*: Ki: Constante de inibição;

**: Referência de literatura baseada em teste de ligação ^3H -flunitrazepam (Dekermendjian *et al.*, 1999)

FIGURA 7: Valores de Ki e razão de ligação de flavonas testadas frente a sítios receptores GABA com ^3H -flumazenil em membranas corticais de ratos

Estes compostos, entretanto, estão relativamente dispersos nas plantas (Paladini *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1997) e, nestas condições, não permitem a determinação de suas propriedades terapêuticas ou farmacológicas, uma vez que estão presentes somente em concentrações traços. Sendo assim, a identificação destes compostos como protótipo líder no processo de desenvolvimento de novos fármacos só é possível com a utilização de métodos de fracionamento apropriados e ensaios bioquímicos específicos (Medina *et al.*, 1997). No entanto, a obtenção de flavonas por via sintética é alternativa extremamente favorável, uma vez que possibilita a obtenção de grandes quantidades do composto desejado e de modificações moleculares racionalmente planejadas resultando em propriedades físico-químicas otimizadas frente a sítios receptores BZ.

4.2. RELAÇÕES ESTRUTURA-ATIVIDADE DE FLAVONÓIDES

Diversas classes de fármacos com aplicações terapêuticas importantes no SNC, como benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides, alguns anticonvulsivantes e anestésicos gerais interagem com os receptores GABA_A. Esses receptores constituem o principal sistema inibitório operante no cérebro, regulando a excitabilidade cerebral (Cook *et al.*, 2001; Trevor, 1998; Foye *et al.*, 1997).

Receptores GABA_A são constituídos por estrutura pentamérica apresentando diversas subunidades. O sítio de ligação benzodiazepínico (SBD) está localizado na interface das subunidades α e γ no receptor GABA_A. Os benzodiazepínicos agem potencializando GABA pela indução da corrente de cloreto (Korpi *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2001; Foye *et al.*, 1997).

A presença das subunidades α , γ_1 e γ_2 é requisito absoluto para a funcionalidade de ligação dos BZ com o receptor e modulação ótima da corrente de cloreto exercida por esses compostos (Katsifis *et al.*, 2004; Korpi *et al.*, 2002).

A extensa diversidade molecular do sítio receptor GABA_A/BZ, resultado da existência dessas subunidades implica em múltiplas propriedades farmacológicas, elucidadas por fármacos como diazepam, o qual se liga seletivamente a uma subunidade específica.

Os estudos de relações estrutura-atividade disponíveis, baseados em investigações de diferentes classes de ligantes, resultaram na formulação de modelos de farmacóforos para interação com sítios receptores BZ.

O objetivo desses modelos é explicar a eficácia do ligante em ativar a corrente de cloreto em nível molecular (Cook *et al.*, 2001; Marder *et al.*, 2001; Dekermendjian *et al.*, 1999).

Como exemplo, cita-se o trabalho de Cook e colaboradores (2001), que descreve desenvolvimento de modelo de farmacóforo/receptor BZ que pode ser aplicado a grande número de ligantes, entre eles, β -carbonílicos, diíndoles, 1-4-benzodiazepínicos, imidazobenzodiazepínicos, triazolopirimidinas, imidazopirimidinas e pirazoloquinolin-3-onas. Este modelo, mostrado na figura 8, permite identificar arranjo espacial comum dos grupos químicos de agonistas, antagonistas e agonistas inversos que iniciem resposta frente a sítios receptores BZ. Sendo assim, H_1 e A_2 correspondem a sítios doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente, enquanto H_2/A_3 são sítios bifuncionais doadores e aceptores de hidrogênio, L_1 , L_2 e L_3 são sítios lipofílicos e S_1 , S_2 e S_3 são regiões com interações estéricas negativas (Cook *et al.*, 2001).

FIGURA 8: Apresentação do diazepam em modelo de farmacóforo desenvolvido por Cook e colaboradores

FONTE: *Bioorg. Med. Chem.*, v. 9, p.323-335, 2001

Dekermendjian e col. (1999) testaram a validade do modelo desenvolvido por Cook para 21 flavonóides, baseando a análise em técnicas de sobreposição gráfica utilizando como modelo um agonista não-benzodiazepínico, o CGS-9896 (pirazoloquinolina).

Vale salientar, entretanto, que este composto difere de diazepinas na afinidade por certos subtipos de receptores GABA_A (Marder *et al*, 2001; Dekermendjian *et al*, 1999; Zhang *et al.*, 1995).

A figura 9 mostra os pontos de interação entre a flavona e os sítios do modelo de farmacóforo proposto por esses autores. Percebe-se que o grupo carbonila da flavona e o grupo carbonila do ligante CGS-9896 interagem com os sítios doadores de hidrogênio (H₁) essencialmente da mesma maneira. Os anéis benzênicos escolhidos se sobrepõem quase que perfeitamente e a posição do oxigênio etérico da flavona está muito próxima da posição do nitrogênio 4 do ligante, favorecendo a formação da ligação de hidrogênio com o sítio de ligação H₂. O anel fenila da flavona ocupa a região lipofílica L₁ e corresponde ao anel benzênico do ligante. O substituinte 6-metil da flavona ocupa o sítio lipofílico L₂, mas não na mesma extensão que o átomo de cloro do CGS-9896 (Dekermendjian *et al*, 1999).

FIGURA 9: 6-metil-flavona construída sobre o farmacóforo proposto por Dekermendjian e colaboradores (1999) por sobreposição com o ligante CGS-9896

Fonte: *J. Med. Chem.*, v. 42, p. 4343-4350, 1999

Pesquisas realizadas por Paladini e colaboradores, desde 1989, vêm demonstrando que flavonóides, bem como o próprio núcleo da flavona, apresentam média a alta afinidade de ligação por sítios receptores BZ *in vitro* e atividade ansiolítica *in vivo*, com menor incidência de sedação e efeitos miorelaxantes quando comparados com BZ. Além disso, pesquisas indicaram que derivados sintéticos da flavona com átomos ou grupos eletronegativos em seu núcleo podem ser potentes ansiolíticos ou antagonistas (Kahnberg *et al.*, 2002; Dekermendjian *et al.*, 1999). Estes autores desenvolveram modelo de farmacóforo para ligantes flavonóides, baseados no modelo proposto por Cook e col. (Zhang *et al.*, 1995) para interação com sítio BZ, utilizando-se como *training set* todos os flavonóides naturais e sintéticos que ativam sítios BZ e comparando-os com o BZ clássico diazepam.

O resultado da sobreposição da flavona com o diazepam pode ser visto na figura 10, onde o grupo carbonila da flavona se sobrepõe ao grupo cetônico do diazepam em (a) e o nitrogênio 4 do anel diazepínico em (b). H₁ e A₂ são sítios doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente. H₂/A₃ são sítios bifuncionais doadores e aceptores de hidrogênio, L₁, L₂ e L₃ são sítios lipofílicos e S₁, S₂ e S₃ são regiões com interações estéricas. Vale salientar que esses modelos de farmacóforos vêm sendo aplicados, com sucesso, no desenvolvimento de novos ligantes para sítios receptores BZ (Marder *et al.*, 2001).

FIGURA 10: Sobreposição da flavona com o diazepam

FONTE: *Bioorg. Med. Chem.*, 9, p.323-335, 2001

Os flavonóides apresentam estrutura básica, a qual pode ser dividida em três anéis principais, sendo eles, A, B e C, facilitando, dessa forma, os estudos de relações estrutura-atividade. O núcleo fundamental flavona encontra-se representado na figura 11:

FIGURA 11: Núcleo fundamental flavona

Característica importante para atividade ansiolítica de praticamente todos os flavonóides são substituintes eletronegativos, como -NO_2 e halogênio, nas posições 6 e 3'. O aumento efetivo na atividade de acordo com os diferentes substituintes na posição 6 segue a ordem: $\text{Br} > \text{Cl} > \text{NO}_2 > \text{F}$. E a presença do grupo metil especificamente na posição 6 também é favorável para o aumento da afinidade de ligação, não necessariamente atividade agonista (Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Marder *et al*, 1998; Paladini *et al*, 1998; Dekermendjian *et al*, 1999; Marder *et al*, 1997).

Compostos com substituintes na posição 6 têm valor de K_i , constante de inibição, maior que compostos que não apresentam substituintes nessa posição. A explicação para este fenômeno poderia estar relacionada com o aumento do raio de van der Waals e a capacidade do substituinte em elevar a densidade eletrônica do ligante, aumentando a afinidade de ligação (Huang *et al*, 2001).

A adição de grupo volumoso ou presença de hidroxila na posição 7 é desfavorável para a afinidade. Estudos de QSAR-3D realizados por Huang e colaboradores (2001) para derivados da flavona, apresentados na figura 9, indicam que a presença de substituintes volumosos ou –OH na região marcada pelo poliedro amarelo próximo as posições 5, 7 e o anel aromático B é desfavorável para a afinidade de ligação com o receptor, figura 12.

FIGURA 12: Contribuições estéricas para interação de flavonóides com sítio receptor

Fonte: *J. Med. Chem.*, 44, p. 1883-1891, 2001

Na figura 13, o contorno azul próximo às posições 6 e 7 sugere que substituintes carregados negativamente podem favorecer a atividade, e o poliedro vermelho próximo à posição 3' indica baixa densidade de elétrons ou indica que a habilidade em retirar elétrons nessa posição pode ser favorável para a afinidade de ligação (Huang *et al*, 2001). Importante salientar que a introdução de qualquer grupo volumoso nas posições 4', 5' e 6' reduzem drasticamente o valor de K_i dos flavonóides (Huang *et al*, 2001).

FIGURA 13: Contribuições eletrostáticas para interação de flavonóides com sítio receptor

Fonte: *J. Med. Chem.*, 44, p. 1883-1891, 2001

5. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS RADIOTRAÇADORES

O processo de desenvolvimento de um radioligante para utilização em PET ou SPECT é complexo e multidisciplinar. Depois de identificado possível alvo terapêutico, presumidamente baseado e motivado por fatores como hipótese biológica, o primeiro obstáculo a se deparar é o desenvolvimento radioquímico, seja pela utilização de isótopos produzidos em ciclotrons, como carbono-11 ou flúor-18, por exemplo, ou isótopos disponíveis comercialmente como iodo-123 ou tecnécio-99m (Wong, Pomper, 2003; Nutt, 2002). A identificação de possível alvo terapêutico pode ser obtida dos processos de desenvolvimento de novos fármacos. Esta etapa é considerada como o passo mais importante no longo processo de desenvolvimento de um novo radiotraçador (Wong, Pomper, 2003; Nutt, 2002).

Com o advento da biologia molecular, a identificação do alvo terapêutico deixou de ser um problema no processo de desenvolvimento de fármacos. Além disso, modificações realizadas acarretam aumento significativo no número de alvos potenciais. Considerando-se de 5 a 10 mil compostos, alguns alvos devem ser priorizados e somente aqueles clinicamente viáveis devem ser posteriormente validados (Wong, Pomper, 2003). O estágio de validação do alvo é proporcional à elucidação da patofisiologia do mecanismo sob estudo, por exemplo, apoptose durante o desenvolvimento ou terapia de câncer.

O vasto número de novos alvos disponíveis possibilita o desenvolvimento de agentes com especificidade única e para o processo de validação, alguns alvos requerem ensaios funcionais específicos, a maioria deles fisiologicamente relevantes e disponíveis apenas através de imagem molecular (Löscher, Potschka, 2005; Slifstein, Laruelle, 2001).

As indústrias farmacêuticas estão refinando suas buscas pela seleção de ligantes de bibliotecas de compostos relacionados, obtidas pela utilização de ferramentas de química combinatória e CADD (*Computer-assisted drug design*) (Mozley, 2005; Wermuth, 2000). Esses métodos proporcionam a identificação de ligantes com afinidade e seletividade aceitáveis e possibilitam a determinação de suas propriedades físicas, como solubilidade, pKa, logP e passagem através da barreira hematoencefálica (BHE). Cada um desses parâmetros é extremamente importante e podem ser responsáveis pelo fracasso de um candidato a fármaco ou radiotraçador (Mozley, 2005; Wermuth, 2000).

5.1. MODELAGEM MOLECULAR APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS RADIOLIGANTES CEREBRAIS

Os estudos clássicos de relações estrutura-atividade (REA) exigiam a síntese de diversos análogos, estruturalmente relacionados a um composto líder, e a realização de sucessivos testes biológicos. Após décadas de investigações de REA, foi possível estabelecer relações entre a influência de mudanças estruturais específicas sob os efeitos biológicos, incluindo variações no tamanho e formato da cadeia carbônica, a natureza e o grau de substituições e a estereoquímica do composto protótipo. As técnicas tradicionais de modificação molecular e de REA são, ainda, importantes na descoberta de novos fármacos, no entanto, agregam alto custo na fase de pesquisa e requerem extenso período de investigação, eventualmente bem sucedido (Carvalho *et al.*, 2003; Wermuth, 2000; Patrick, 2001).

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados disponíveis são ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de novos fármacos. Estas informações fornecem subsídios para analisar a influência de propriedades físico-químicas sobre a atividade biológica (Verli, Barreiro, 2005; Tavares, 2004; Carvalho *et al.*, 2003; Wermuth, 2000; Cornard, Boudet, Merlin, 1999; Barreiro e Rodrigues, 1997).

Dentro deste contexto, a aplicação teórica de dados de modelagem molecular surgiu como uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos.

As diversas operações realizadas por modelagem molecular envolvem o uso de programas ou algoritmos os quais podem gerar a estrutura e calcular as propriedades relevantes da molécula em estudo. Esses métodos computacionais se diferenciam em duas categorias, a saber: mecânica molecular e mecânica quântica (Cramer, 2002; Young, 2001).

Em mecânica molecular as equações são utilizadas segundo as leis da física clássica e aplicados ao núcleo da molécula sem considerar os elétrons. Em essência, as moléculas são tratadas como esferas (os átomos) conectadas por “molas” com constantes de forças características (as ligações). As equações derivadas dos mecanismos clássicos são úteis para calcular as diferentes interações e energias resultantes das distâncias de ligações entre átomos, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, etc., as quais podem estar associadas às penalidades energéticas para seu afastamento, isto é, as constantes de forças das “molas”. A principal vantagem da mecânica molecular é a rapidez na avaliação de sistemas moleculares complexos (Verli, Barreiro, 2005; Cramer, 2002; Young, 2001).

Um exemplo desse método é o pacote computacional MM2, utilizado preferencialmente para moléculas de baixo peso molecular (Cramer, 2002; Young, 2001; Wermouth, 2000).

A mecânica quântica utiliza a física quântica para calcular as propriedades de uma molécula considerando as interações entre os elétrons e o núcleo da molécula. Diferentemente da mecânica molecular, neste método os átomos não são tratados como esferas sólidas. Esses cálculos permitem maior precisão nos resultados, além de fornecerem dados sobre a estrutura eletrônica, que não pode ser obtida por mecânica molecular. Isto implica em custo computacional (tempo de computação e capacidade de memória necessária) maior (Cramer, 2002; Young, 2001).

Os métodos de química quântica podem ser subdivididos em dois grupos: *ab initio* e semi-empírico. Nos métodos *ab initio* um modelo para uma função particular de onda é definido e os cálculos necessários são realizados sem simplificação. Em tais abordagens, o erro está associado ao conjunto de bases selecionado e ao nível de tratamento da correlação eletrônica. Entre os métodos *ab initio* estão Hartree-Fock 3-21 G* e 6-31 G*, entre outros (Verli, Barreiro, 2005; Menezes *et al.*, 2002).

Os métodos semi-empíricos são baseados no mesmo formalismo dos métodos *ab initio*, mas parte de seus parâmetros são ajustados a dados experimentais. A parametrização dos métodos semi-empíricos com dados experimentais aumenta significativamente a precisão química e a velocidade dos métodos de cálculos de orbitais moleculares. Os métodos semi-empíricos mais recentes são AM1 (*Austin Model 1*) e PM3 (*Parametric Model 3*), contidos nos pacotes AMPAC e MOPAC (Cramer, 2002; Young, 2001).

A escolha do método de cálculo depende da finalidade a que se destina assim como do tamanho da molécula em questão. Os métodos *ab initio* são limitados a moléculas que contêm dezenas de átomos, os cálculos semi-empíricos a moléculas contendo centenas de átomos e os métodos de mecânica molecular são aplicados em moléculas com milhares de átomos.

Os métodos de mecânica molecular são úteis nos seguintes cálculos (Cramer, 2002; Young, 2001):

- minimização de energia;
- identificação de conformação estável;
- cálculos de energia para conformações específicas;
- obtenção de diferentes confôrmeros.

Já os métodos de mecânica quântica são aplicados para os seguintes cálculos:

- orbital de energia molecular e coeficientes;
- energia de formação de conformação específica;
- Cargas atômicas parciais determinadas a partir de coeficientes de orbital molecular;

- potencial eletrostático;
- estado de geometria de transição e energias;
- energia de dissociação de ligações.

Pelo exposto, a modelagem molecular proporciona pela análise conformacional e o cálculo de propriedades e parâmetros estereoelétrônicos e físico-químicos, a interpretação das correlações entre a estrutura química de uma substância e sua atividade farmacológica, extremamente importante no planejamento racional de novos fármacos ou radiofármacos.

5.2. RELAÇÕES QUANTITATIVAS ESTRUTURA-ATIVIDADE

O desenvolvimento de um fármaco com estrutura completamente nova demanda de 10 a 15 anos de esforço de equipes multidisciplinares, envolvendo investimentos em torno de US\$ 500 milhões (Löscher, Potschka, 2005; Wong, Pomper, 2003; Wermuth, 2000).

Em contrapartida, a utilização de ferramentas como CADD, *Computer Aided Drug Design*, considerada como a contribuição mais importante na área da Química Medicinal, com inserção nas áreas de biologia molecular, biofísica, farmacologia, entre outras, pode otimizar a *performance* de fármacos pela aplicação das técnicas de relações estrutura-atividade, QSAR/SAR (Tavares, 2004; Wermouth, 2000). Além disso, pode resultar em fármacos/ligantes passíveis de serem inseridos no mercado com investimento pelo menos 10 vezes menor, tornando os recursos direcionados para esta área indispensáveis, visto que a perspectiva da descoberta de fármacos com estrutura completamente nova é pouco promissora (Mozley, 2005; Tavares, 2004; Wong, Pomper, 2003).

Sabe-se que a atividade terapêutica de fármacos resulta da interação destes com sistemas biológicos e depende, fundamentalmente, de fatores relacionados com as propriedades físico-químicas do fármaco, reflexo de sua estrutura química, como distribuição eletrônica, estereoquímica e hidrofobicidade, que influenciam a distribuição no sistema biológico bem como sua interação com a biofase. Assim sendo, pequenas mudanças na estrutura de fármacos podem gerar alterações quanto às suas propriedades e, conseqüentemente, na atividade biológica de modo qualitativo e quantitativo (Tavares, 2004; Tavares e Ferreira, 2002; Foye *et al.*, 1997; Kubinyi, 1993).

Estudos de QSAR correlacionam, em uma série de compostos congêneres, a afinidades destas moléculas por seus sítios de ligações, constantes de inibições e outros parâmetros biológicos, além de certas características estruturais como, lipofilicidade, polarizabilidade, propriedades estéricas e eletrônicas (Tavares, 2004; Hansch *et al.*, 1995; Ramsden, 1990).

O objetivo de um estudo de QSAR é a determinação das relações quantitativas entre a estrutura química de moléculas, expressa por suas propriedades físico-químicas, e sua atividade biológica, com a finalidade de obter valores ótimos de propriedades físico-químicas para, de posse dessas informações, planejar novos compostos potencialmente aproveitáveis, com características mais favoráveis que seus protótipos (Tavares, 2004; Wermuth, 2000; Patrick, 2001; Hansch *et al.*, 1995; Hansch, Leo, 1995).

Similarmente, um estudo de QSAR pode ser aplicado no desenvolvimento de novos radioligantes, com a finalidade de otimizar as propriedades físico-químicas do ligante protótipo, de maneira que se obtenha radioligante com características apropriadas para aplicação *in vivo*, tanto farmacocinéticas quanto farmacodinâmicas.

6. RADIOTRAÇADORES CEREBRAIS PARA ACESSO A SÍTIOS RECEPTORES BENZODIAZEPÍNICOS

Na regulação da atividade neuronal, o complexo receptor GABA-benzodiazepínico apresenta papel essencial como desencadeador de inibição. Estudos relatam que a densidade deste receptor é alterada em estados como depressão, epilepsia e síndrome do pânico (Korpi *et al.*, 2002; Kuikka *et al.*, 1996).

Investigações dos subtipos de receptores GABA_A-benzodiazepínico quanto à sua composição, densidade e distribuição regional no SNC podem permitir o desenvolvimento de novos ligantes específicos, os quais, por sua vez, auxiliam na elucidação da importância desses subtipos de receptores (Whiting, 2003; Katsifis *et al.*, 1999).

Estudos de PET e SPECT utilizando ¹¹C-flumazenil permitiram mapear a densidade de sítios receptores BZ no cérebro humano, evidenciando alteração na densidade destes receptores em apoplexia experimental, doença de Huntington, doença de Alzheimer, distúrbios de ansiedade, dependência ao etanol, encefalopatia hepática, síndrome de Angelman, esquizofrenia e epilepsia (Ishibashi *et al.*, 1998; Moriwaki *et al.*, 1998; Baulieu e Guilloteau, 1998; Kukichi *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1997; Beer *et al.*, 1996; Hatazawa *et al.*, 1995; Busato *et al.*, 1995; Dargham *et al.*, 1995).

O iomazenil análogo radioiodado do flumazenil, apresenta afinidade subnanomolar por sítios BZ *in vitro*. Este composto é utilizado como radioligante para geração de imagem em SPECT de sítios receptores BZ em primatas (Katsifis *et al.*, 2004; Foged *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1996; Hatazawa *et al.*, 1995; Dey *et al.*, 1994; Pike *et al.*, 1993). As características favoráveis do iomazenil para o acesso *in vivo* aos sítios receptores BZ são alta captação cerebral, pequena ligação não específica, alta afinidade por sítios receptores BZ e por não promover efeitos farmacológicos intrínsecos em doses traço, figura 14 (Foged *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1995).

FIGURA 14: iomazenil

Vários estudos de SPECT têm demonstrado a aplicabilidade clínica do iomazenil-¹²³I para o acesso a sítios receptores BZ no cérebro humano (Ishibashi *et al.*, 1998; Moriwaki *et al.*, 1998; Kukichi *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1997; Onishi *et al.*, 1996; Odano *et al.*, 1996; Busato *et al.*, 1995; Dargham *et al.*, 1995; Onishi *et al.*, 1995; Dey *et al.*, 1994; Beer *et al.*, 1990), sendo desenvolvido para geração de imagem de sítios receptores BZ em SPECT, o iomazenil-¹²³I é extremamente seletivo e apresenta alta afinidade, cerca de dez vezes maior que o flumazenil-¹¹C, por ser mais lipofílico que este último.

Westera e col. (1996), demonstraram que os parâmetros cinéticos e de biodistribuição do ¹¹C-flumazenil são comparáveis aos do ¹²³I-iomazenil, ilustrando, desta forma, que a técnica de SPECT representa alternativa viável ao PET neste caso (Bourguignon *et al.*, 1997).

Dargham e col. (1995) investigaram a reprodutibilidade das medidas de SPECT examinando seis indivíduos duas vezes no intervalo de uma semana. Estes autores observaram que, com base em variabilidade de 10-17% e comparando os resultados do teste e sua comprovação, a medida do acúmulo do ¹²³I-iomazenil regional em SPECT é procedimento reprodutível.

Um inconveniente associado ao uso do ^{11}C -flumazenil e do ^{123}I -iomazenil é a rápida biotransformação destes ligantes no plasma. Estudos realizados com ^{123}I -iomazenil em humanos revelam que menos de 10% da radioatividade do plasma representa o composto não metabolizado 20 minutos após a injeção (Katsifis *et al.*, 2003). A rápida metabolização deste radiotraçador implica baixas taxas de contagem e, conseqüentemente, estatística de contagem de radioatividade pobre (Bohórquez *et al.*, 2000; Baulieu e Guilloteau, 1998; Foged *et al.*, 1997; Foged *et al.*, 1996).

O composto NNC 13-8241 [3'-5-ciclopropil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-7-iodo-5,6-diidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepina], figura 15, é agonista parcial que se liga seletivamente e com afinidade subnanomolar aos sítios receptores BZ em homogenatos de tecidos. Análogos do NNC 13-8241 foram sintetizados observando-se maior eficácia agonista para o 3-oxadiazolil imidazol do que para os ésteres análogos. Estes análogos são potentes anticonvulsivantes e são aplicados em modelos experimentais para estudo de ansiedade apresentando utilização potencial para tratamento de apoplexia e ansiedade, o que não ocorre com os antagonistas de sítios receptores BZ flumazenil e iomazenil (Kuikka *et al.*, 1996; Foged *et al.*, 1996).

FIGURA 15: NNC 13-8241

Com a presença do grupo 5-ciclopropil-1,2,4-oxadiazol na posição 3' do NNC 13-8241 espera-se que a molécula se torne menos sensível ao metabolismo quando comparado ao flumazenil e iomazenil, que apresentam o grupo éster.

Sabe-se que o grupo éster na posição 3 da imidazobenzodiazepina é importante para a ativação de sítios receptores BZ e que a substituição do grupo éster pelo grupo 3'-oxadiazolil é identificada como sendo metabolicamente mais estável mantendo a afinidade pelo sítio receptor BZ (Kuikka *et al.*, 1996; Foged *et al.*, 1996).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* em ratos e em macacos *Cynomolgus* demonstraram a ligação do radioligante a sítios receptores BZ. Estudos realizados em humanos indicaram que o ^{123}I -NNC 13-8241 apresenta cinética favorável e constitui-se em agente específico e promissor para o mapeamento de receptores BZ no cérebro (Kuikka *et al.*, 1996; Foged *et al.*, 1996).

Outros derivados do flumazenil foram propostos (Compostos 1 e 2, figura 16), com modificações no grupamento éster. Os estudos de afinidade de ligação aos receptores cerebrais foram, contudo, inconclusivos (Katsifis *et al.*, 2004; Katsifis *et al.*, 1999).

Receptores GABA_A contendo subunidade proteica $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ e $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ ligam-se fortemente ao agonista inverso parcial Ro 15-4513, figura 16, que apresenta afinidade reduzida ao antagonista flumazenil e não apresentam afinidade para os agonistas BZ como diazepam e triazolam.

Designados como diazepam insensíveis (DI), por sua baixa afinidade micromolar pelo diazepam, estes receptores são encontrados predominantemente no cerebelo e, em menor extensão, no hipocampo de áreas corticais (Katsifis *et al.*, 1999; Korpi *et al.*, 2002).

Exibindo alta afinidade de ligação por receptores benzodiazepínicos o Ro 15-4513, figura 16, um derivado azídico do flumazenil, tem sido utilizado extensivamente como marcador de fotoafinidade para receptores BZ por apresentar alta afinidade farmacológica e estrutural por receptores diferentes dos ligados por benzodiazepinas convencionais (Katsifis *et al.*, 2004; Katsifis *et al.*, 1999).

Composto	R1	R2
flumazenil	F	CH ₂ CH ₃
Ro 15-4513	N3	CH ₂ CH ₃
ZG-63	Cl	C(CH ₃) ₃
Composto 1	I	CH ₂ CH ₃
Composto 2	I	C(CH ₃) ₃

FIGURA 16: Ligantes para sítios receptores BZ: flumazenil e análogos

Investigações com ¹¹C-Ro 15-4513 utilizando autoradiografia *in vitro* de cérebros humanos após morte e de macacos *Cynomolgus* com PET indicaram alta captação da atividade no neocórtex, gânglio basal e córtex cerebelar. Este composto e outros agonistas inversos apresentam propriedades como ansiogênese, proconvulsão e anorexia, que são farmacologicamente opostas àquelas apresentadas pelo diazepam. Também há relatos de ação cognitiva potencializada e capacidade de antagonizar algumas ações neuroquímicas e fisiológicas do etanol (Katsifis *et al.*, 1999).

O enantiômero S do composto bretazenil, figura 17, agonista parcial de sítios receptores BZ, apresenta alta afinidade e seletividade pelo receptor, demonstradas em estudos *in vivo* com animais e humanos. Este apresenta propriedades ansiolíticas e anticonvulsivantes, com acentuada redução de efeitos sedativo-hipnóticos e de potencialização do álcool (Katsifis *et al.*, 2003). Não foram observadas alterações no controle motor e nem desenvolvimento de tolerância ou dependência física.

Em triagens clínicas apresenta forte atividade ansiolítica e antipsicótica, enquanto o enantiômero correspondente *R* não possui atividade frente aos sítios receptores BZ no SNC (Katsifis *et al.*, 2004; Katsifis *et al.*, 2003).

A presença do grupo *tert*-butil éster e do anel pirrol fundido ao núcleo benzodiazepínico no bretazenil melhoram a estabilidade metabólica da molécula, quando comparado ao iomazenil e flumazenil, como também, permite a realização de imagens em SPECT e PET, quando marcado com iodo-123 e bromo-76, respectivamente (Katsifis *et al.*, 2003).

FIGURA 17: Estruturas químicas do (S)-bretazenil e (R)-bretazenil

(X= bromo-76 ou iodo-123, para aplicação em PET ou SPECT, respectivamente)

Tendo-se em vista que mudanças na integridade bioquímica e funcional de sítios receptores benzodiazepínicos estão implicadas em diversas disfunções neurológicas e psiquiátricas, o desenvolvimento de radioligantes específicos para esses sítios receptores não só contribuem na elucidação da função bioquímica do receptor como também provêm informações a respeito de quais alterações governam esses estados de disfunções, pela aplicação de modalidades de imageamento funcionais como PET e SPECT e, neste sentido, o desenvolvimento de novos radioligantes com características adequadas a aplicação *in vivo* constitui-se em contribuição de suma importância.

MATERIAIS E MÉTODOS

---

1. Plano de Trabalho

2. Materiais

2.1. Reagentes e solventes

2.2. Equipamentos

2.3. Animais

2.4. Outros

3. Métodos

3.1. Escolha dos grupos substituintes

3.2. Modelagem molecular

3.3. Síntese e identificação da flavona e análogos

3.4. Análises físico-químicas

3.4.1. Faixa de fusão

3.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho, IV

3.4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN

3.5. Marcação da flavona e análogos com radioiodo

3.5.1. Cloramina – T

3.5.2. Iodogen

3.6. Controle de qualidade radioquímico

3.7. Estudos de biodistribuição

3.8. Estudos de imageamento cintilográfico

1. PLANO DE TRABALHO

Realizou-se, neste trabalho, o planejamento, síntese, marcação com radioiodo e avaliação da aplicação da flavona e análogos como radioligantes cerebrais, com base na afinidade/seletividade desses compostos por sítios receptores BZ (Fernández *et al*, 2005; Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Marder *et al*, 1998; Paladini *et al*, 1998; Dekermendjian *et al*, 1999; Marder *et al*, 1997).

Buscando identificar radioligantes com ótima biodisponibilidade no SNC, objetivou-se, neste trabalho, o estudo de SAR de série de análogos à flavona. Para tal, e baseado em dados da literatura, planejou-se a substituição do hidrogênio presente na posição 6 do anel A do núcleo da flavona por radioiodo, figura 18, visando à obtenção de compostos com características antagonistas frente a sítios receptores benzodiazepínicos.

FIGURA 18: flavona marcada com iodo radioativo na posição 6

Baseado no Diagrama de Craig, figura 20 (Craig, 1971) planejou-se a substituição do hidrogênio presente nas posições 3' e 4' do anel B do núcleo da flavona, por grupos estrategicamente escolhidos visando à identificação qualitativa na variação da distribuição eletrônica, que influencia a afinidade/seletividade por sítios receptores BZ na série estudada.

Para obtenção da flavona e análogos executou-se metodologia de síntese composta por três etapas esquematizada a seguir, figura 19.

FIGURA 19: Rota de síntese para obtenção de flavona e análogos

FONTE: Dekermendjian *et al*, 1999

Para a escolha da série de análogos a serem sintetizados foram realizados estudos de modelagem molecular, utilizando-se os métodos de mecânica quântica AM1 semi-empírico e *ab initio* HF 3.21G* para a geração dos mapas de densidade de potencial eletrostático, dos sítios de potencial eletrostático e distribuição orbital de HOMO e LUMO, na tentativa de corroborar os dados encontrados em literatura.

Sendo assim, além da síntese do próprio núcleo da flavona, foram sintetizados os análogos 3'-F-flavona e 3'-NO₂-flavona, relacionados como altamente seletivos frente a sítios receptores GABA_A por diversos autores (Fernández *et al*, 2005; Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Marder *et al*, 1998; Paladini *et al*, 1998) e com dados confirmados pelos estudos de modelagem molecular, bem como o análogo 4'-F-flavona, descrito em literatura como composto não tão favorável para acesso a esses sítios receptores (Fernández *et al*, 2005; Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Marder *et al*, 1998; Paladini *et al*, 1998).

Adicionalmente, utilizando-se de mesma metodologia, foram gerados os mapas de densidade de potencial eletrostático, dos sítios de potencial eletrostático e os valores das cargas de Mulliken, cargas Derivadas do Potencial Eletrostático e carga Natural dos carbonos da molécula de flavona, na tentativa de confirmar a reatividade química desses compostos frente à marcação com radioiodo.

A etapa seguinte que envolveu marcação dos análogos obtidos com iodo radioativo foi realizada com a ajuda e supervisão da Prof^a.Dr^a. Elaine Bortoleti de Araújo, responsável pela Garantia da Qualidade do Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nuclear (IPEN/CNEN-SP), bem como os estudos subseqüentes, *in vivo*, para avaliação qualitativa e quantitativa da resposta biológica dos compostos planejados frente a sítios receptores benzodiazepínicos, por meio de estudos de distribuição biológica (Ono *et al.*, 2005; Araújo, 1995; Dey *et al.*, 1994). Acrescenta-se que não são conhecidos relatos em literatura da obtenção e aplicação destes compostos, devidamente radiomarcados com radioiodo, como radiotraçadores.

A metodologia escolhida para a marcação dos compostos com radioiodo foi a substituição eletrofílica aromática direta possibilitando, assim, a contagem da radioatividade total presente nos compostos em estudo. O controle radioquímico foi realizado em cromatografia em camada delgada instantânea, CCDI, e utilizando-se como eluente mistura de solvente adequada.

Em continuidade aos estudos para investigação do perfil de captação do radioligante protótipo (flavona radiomarcada) *in vivo* foram realizadas imagens cintilográficas em coelhos *New Zeland*, verificando o potencial favorável do composto testado para a aquisição de imagens cintilográficas e estudos de imageamento em ratos *Wistars* da 6-iodo-131-flavona e análogos radiomarcados.

2. MATERIAIS

2.1. REAGENTES E SOLVENTES

- ácido acético glacial – Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- ácido clorídrico - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- ácido benzóico 99% - Aldrich Chemical Company, Inc.
- ácido sulfúrico concentrado - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- cloreto de cálcio - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- cloreto de tionila;
- clorofórmio-d₆ 99,5% - Aldrich Chemical Company, Inc.
- éter de petróleo - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- etanol - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- fosfato de sódio monohidratado, grau p.a. – Nuclear
- fosfato di-sódico anidro, grau p.a. – Carlo Erba
- 2-hidróxi-acetofenona - Aldrich Chemical Company, Inc.
- hidróxido de potássio - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- metanol - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- metabissulfito de sódio - Aldrich Chemical Company, Inc.
- piridina - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório
- 1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenilglicouril (Iodogen) – Sigma Company, Inc.
- sal sódico de N-clorotoluenosulfonamida (Cloramina-T)
- solução de Na¹³¹I, processado no Centro de Radiofarmácia IPEN/CNEN/SP – MS Nordion

2.2. EQUIPAMENTOS

- agitador de tubos tipo *Vortex*, VWR-Scientific
- aparelho digital de ponto de fusão Micro-química modelo MQAFPF-301
- aparelho para eletroforese com fonte de alta tensão estabilizada, modelo Amersham-Pharmacia
- balança digital Marte
- bomba de hidrovácuo - Quimis
- espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu IR-470
- espectrofotômetro Bruker, modelo Advanced DPX-300 MHz
- micropipeta de 0-20, 0,5-10, 10-100 e 200-1000 μL - Gilson
- rotevaporador Fisatom
- contador automático tipo poço, cristal NaI(Tl), modelo E5002, cobra II, auto-gama - A. Packard
- câmara gama Siemens LEM+ portátil, analógica
- gama câmara Nucline^{TM} TH 22 Digital Camara

2.3. ANIMAIS

- Camundongos *Swiss* machos, cedidos pelo biotério do IPEN-CNEN/SP.
- Ratos *Wistar* machos, cedidos pelo biotério do IPEN-CNEN/SP.
- Coelho *New Zeland* macho, cedido pelo biotério do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas – SP.

2.4. OUTROS

- fitas de ITLC – Merck
- caixa com luvas, *Glove Box*, IPEN/CNEN

3. MÉTODOS

3.1. ESCOLHA DOS GRUPOS SUBSTITUINTES

Considera-se como primeira contribuição realmente significativa para a escolha planejada de grupos substituintes para estudos de SAR/QSAR o diagrama de intercorrelação proposto por Craig em 1971 (Craig, 1971), figura 20, que introduziu o conceito racional de correlação de variáveis, como por exemplo, σ de Hammett e π de Hansch (Tavares, 2004; Kubiniy 1993), em distribuição bidimensional. Este método passou a propiciar, desde então, a seleção racional de grupos substituintes na definição de séries de compostos análogos para estudos de QSAR.

A correlação de parâmetros físico-químicos com a atividade biológica possibilita a identificação da influência de propriedades físico-químicas de compostos com perfil farmacológico definido. Nesta proposta de estudo, priorizou-se a distribuição eletrônica, expressa por σ (Hammett, 1954) em função do π de Hansch (Hansch, 1956), no Diagrama de Craig.

FIGURA 20: Diagrama de Craig

FONTE: *J. Med. Chem.*, v.14, n.8, p. 680-684, 1971

Visando o estudo de SAR, os substituintes foram escolhidos buscando propiciar uma variação crescente na distribuição eletrônica, sendo eles *m*-NO₂, *m*-F, *p*-F e -H (flavona), que se situam nas proximidades de uma linha imaginária paralela ao eixo de efeitos eletrônicos, de forma a propiciar considerável variação nos valores de σ de Hammett e, ao mesmo tempo, mínima variação na hidrofobicidade expressa por π de Hansch, figura 20.

3.2. MODELAGEM MOLECULAR

Para a determinação das propriedades eletrônicas da flavona, flavona radiomarcada e análogos foi utilizado o “Programa Spartan O2 para Linux e Spartan O4 para Windows (versão Demo)” Wavefunction, Inc. CA, USA (Hehre *et al.*, 2004). Os mapas dos compostos em três dimensões (3D) foram construídos no editor estrutural usando os átomos e fragmentos moleculares inseridos no pacote computacional.

Foram empregados os métodos de mecânica molecular MMFF94 na obtenção de geometria de energia mínima, e o método de mecânica quântica semi-empírico AM1 (*Austin Model 1*) Hamiltoniano (Dewar *et al.*, 1985) na otimização de energia estrutural. A otimização de geometria estrutural dos compostos investigados no estado fundamental foi também efetuada por métodos *ab initio* Hartree-Fock 3-21 G* para melhor avaliação das conformações e configurações obtidas por AM1.

A partir desta análise computacional alguns compostos foram selecionados para serem sintetizados, que corroborando dados de literatura originariam análogos interessantes para início das investigações de novos radioligantes para acesso a sítios receptores benzodiazepínicos cerebrais.

3.3. SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DA FLAVONA E ANÁLOGOS

A flavona e análogos foram caracterizados por análises físico-químicas de faixa de fusão, determinada em lamínulas de vidro utilizando-se aparelho digital, espectroscopia de infravermelho, IV, utilizando-se dispersão em KBr, e ressonância magnética nuclear, RMN, sendo utilizado clorofórmio- d_6 com trimetilsilano como padrão de referência interna, para obtenção dos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C .

Os procedimentos de obtenção da flavona e análogos envolvem 3 etapas de síntese, a saber:

Etapa 1: Obtenção de 2-benzoil-acetofenona

Dissolveram-se 20 mmols de 2-hidróxi-acetofenona em 5 mL de piridina em balão de fundo redondo. Adicionaram-se 30 mmols de cloreto de benzoíla (ou cloreto de benzoíla substituído com o grupo adequado) e agitou-se o frasco para garantir a mistura dos reagentes. A temperatura da mistura reacional aumentou espontaneamente. A reação transcorreu durante cerca de 20 minutos e, ao final, verteu-se a solução em béquer contendo 120 mL de ácido clorídrico (3%) e 40 g de gelo picado, sob agitação.

Coletou-se o produto formado por filtração sob pressão reduzida, lavou-se com 4 mL de metanol gelado e, em uma segunda etapa, com 5 mL de água. O produto foi filtrado e recristalizado de 5 mL de metanol quente.

Etapa 2: Preparação de 2-hidroxi-dibenzoil-metano

Dissolveram-se 10 mmol de 2-benzoil-acetofenona em 8 mL de piridina e aqueceu-se a solução até 50 °C. Adicionaram-se 0,015 mols de hidróxido de potássio finamente pulverizado e agitou-se a mistura por 15 minutos. Durante este período houve a formação de precipitado amarelo correspondente a sais de potássio. Resfriou-se a mistura até temperatura ambiente e adicionaram-se 15 mL de solução 10% de ácido acético. O produto formado foi coletado e seco.

Etapa 3: Síntese da flavona e análogos

Dissolveram-se 5 mmol de 2-hidroxi-dibenzoil-metano em 7 mL de ácido acético glacial, a solução foi homogeneizada e então adicionados 0,25 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi mantida sob aquecimento entre 40 e 65 °C, por 1 hora, sob agitação. Verteu-se a mistura reacional sobre 40 g de gelo picado, com agitação manual. Quando todo o gelo fundiu, recolheu-se o produto por filtração à sob pressão reduzida. Recristalizou-se a flavona (ou análogo obtido) bruta de 40 mL de éter de petróleo. O produto foi mantido em dessecador em presença de pentóxido de fósforo.

3.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.4.1. FAIXA DE FUSÃO

As faixas de fusão dos compostos obtidos foram determinadas em lâminulas de vidro utilizando-se aparelho digital de marca Micro Química modelo MQAPF-301.

3.4.2. ESPECTROMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO, IV

Os espectros de IV foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu IR-470, com as amostras no estado sólido, utilizando dispersão em KBr.

3.4.3. ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, RMN

Os espectros de RMN-¹H foram obtidos utilizando-se clorofórmio-d₆ com trimetilsilano como padrão de referência interna.

3.5. MARCAÇÃO DA FLAVONA E ANÁLOGOS COM RADIOIODO

Os experimentos de marcação foram desenvolvidos no Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN/CNEN, que possui instalações apropriadas para manipulação de amostras radioativas não seladas.

3.5.1. CLORAMINA-T

A flavona e análogos foram preparados dissolvendo-se 1 mg do composto a ser marcado em 50 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5, e marcada com Na¹³¹I (1 mCi/10 µL água destilada) em presença de 50 µL de solução de cloramina-T, incubados por 20 min à temperatura ambiente, sob agitação. Após este tempo, foram adicionados à mistura 50 µL de solução de metabissulfito de sódio. A marcação da flavona com Na¹²³I seguiu o mesmo procedimento descrito para a marcação com iodo-131.

3.5.2. IODOGEN

O Iodogen foi utilizado na forma de filme fino (película), impregnado ao frasco de reação. Para preparo destes tubos o Iodogen foi dissolvido em diclorometano (1mg/mL) e 10 µL desta solução, correspondente a 10 µg de Iodogen, foi transferido para tubos de fundo cônico tipo *ependorf* e evaporados até secar com nitrogênio gasoso, depois conservados à -10 a -25 °C.

Para a marcação propriamente dita, adicionou-se 1mg flavona /100 µL etanol (co-solvente) /100 µL de tampão fosfato de sódio ao tubo contendo 10 µg de Iodogen e, em seguida 1,5 mCi de Na¹³¹I /10 µL de água destilada. A reação de iodação foi conduzida por 30 min sob agitação em *Vortex* à temperatura ambiente e, após este tempo, foi interrompida pela retirada da solução do tubo contendo o Iodogen.

3.6. CONTROLE DE QUALIDADE RADIOQUÍMICO

O controle radioquímico foi realizado utilizando-se cromatografia em camada delgada instantânea com fitas de sílica gel (ITLC_SG) e como eluente utilizou-se hexano:acetato de etila (1:1). Determinou-se o R_f do iodo reativo (¹³¹I⁻ ou ¹²³I⁻) utilizando-se solução de Na¹³¹I e de Na¹²³I, dependendo do radioisótopo escolhido para o ensaio, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico descrito.

3.7. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO

A biodistribuição da flavona radiomarcada foi realizada em camundongos *Swiss* machos, com peso variando entre 33-44 g. O estudo foi realizado utilizando-se método invasivo.

Foram injetados na veia caudal de cada animal 25-30 mCi do composto marcado com iodo-131 em volume de 0,05 mL. Os animais foram sacrificados por toracotomia em tempos de 5, 10, 15, 30, 60 minutos e 24 horas após a injeção e os órgãos de interesse foram retirados, pesados e avaliou-se a radioatividade em contador automático com cintilador NaI(Tl) calibrado para o nuclídeo iodo-131. Para cada tempo do estudo foram utilizados de 3 a 5 animais.

Além de amostra sanguínea, foram retirados cérebro, tireóide, pulmão, estômago, fígado, rins, coração, músculo, glândulas supra-renais, pâncreas, intestinos delgado e grosso. A porcentagem de captação da atividade administrada nos diferentes tecidos foi calculada em função da atividade radioquímica administrada (equações 1 e 2).

$$\% \text{ atividade/tecido} = \frac{\text{cpm tecido}}{\text{cpm padrão}} \cdot 100 \quad \text{equação 1}$$

Onde,

- cpm: contagem por minuto;

$$\% \text{ atividade/grama tecido} = \frac{\% \text{ dose/ tecido}}{\text{peso tecido}} \quad \text{equação 2}$$

3.8. ESTUDOS DE IMAGEAMENTO CINTILOGRÁFICO

Os ensaios de imageamento cintilográfico da flavona radiomarcada, realizados no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da USP, desenvolveram-se em coelho *New Zeland*, adulto (5 anos), peso de 3,150 kg. Injetou-se na veia marginal da orelha do coelho 1,6 mCi de flavona-iodo-123 em volume de 2,0 mL.

As imagens foram adquiridas em intervalos de 60 segundos durante 30 minutos em gama câmara Siemens LEM+ portátil, analógica, com campo de visão circular pequeno, analisador multicanal, espectro entre 15 KeV e 510 KeV e até 2 janelas de energia simultânea.

Colimadores para baixa energia até 200 KeV para imagens em projeção planar real convergente, divergente e convergente invertida. Computador de aquisição de imagens compatível IBM/PC Intel Pentium 133, sistema operacional Windows 98, software de aquisição de imagens PIP, placa de aquisição de dados IMAGAMMA. Equipado com software IMAGE para processamento de imagens.

Os ensaios de imageamento cintilográfico dos análogos à flavona radiomarcada, realizados no Centro de Radiofarmácia do IPEN, desenvolveram-se em ratos *Wistar*. Injetou-se na veia peniana do rato 1,1 mCi do análogo correspondente marcado com iodo-131 em volume de 0,5 mL. As imagens foram adquiridas em intervalos de 60 segundos durante 30 minutos em gama câmara Nucline™ TH 22 Digital Camara, com campo de visão circular pequeno, analisador multicanal, espectro entre 15 KeV e 510 KeV. Computador de aquisição de imagens compatível IBM/PC Intel Pentium 133, sistema operacional Windows 98. Equipado com software MEDISO-Medical Imaging System para processamento de imagens.

MODELAGEM MOLECULAR

---

1. Introdução**2. Resultados e discussão**

2.1. Reatividade da molécula de flavona frente à substituição por radioiodo

2.2. Propriedades estereoeletrônicas

3. Conclusões

1. INTRODUÇÃO

O conceito de que as interações entre uma enzima e seu substrato seriam complementares foi proposto por Emil Fischer, em 1894, e é conhecido como o famoso modelo “chave-fechadura”. Neste modelo, as “fechaduras” ou receptores celulares são biomacromoléculas de extrema sensibilidade responsáveis pelo reconhecimento molecular de espécies endógenas ou exógenas capazes de apresentar uma resposta biológica (Verli, Barreiro, 2005; Barreiro *et al.*, 1997; Patrick, 2001).

A propriedade de reconhecimento molecular depende essencialmente da estrutura química e, em última análise, determina a atividade farmacológica da substância. A caracterização de uma estrutura molecular a nível experimental, entretanto, não é tarefa simples. Existem alguns métodos capazes de permitir a descrição precisa da estrutura molecular e, entre eles, a cristalografia de raio-X ainda é a técnica experimental mais eficiente para obtenção destes dados (Verli, Barreiro, 2005; Wermuth, 2000; Foye *et al.*, 1997; Barreiro *et al.*, 1997; Patrick, 2001).

O modelo de interação entre ligantes e receptores segundo esta abordagem rígida, entretanto, retira ao menos uma variável importante associada ao reconhecimento molecular de ambas as moléculas, ligante e receptor. Certamente, a omissão da variável flexibilidade do sistema reduz o espectro de informações que podem ser obtidas acerca do complexo ligante-receptor. A flexibilidade de proteínas e enzimas é bem conhecida, assim como as escalas de tempo nas quais ocorrem (Barreiro *et al.*, 1997).

Além desta variabilidade conformacional intrínseca de estruturas protéicas, diversas teorias referem-se à ocorrência de mudanças conformacionais em enzimas, induzidas pelo substrato, dentre as quais destaca-se a teoria do encaixe induzido (Verli, Barreiro, 2005; Wermuth, 2000; Foye *et al.*, 1997).

Esta teoria considera a capacidade do ligante de selecionar ou induzir a modificação da estrutura tridimensional de seu receptor biológico, ao mesmo tempo que o receptor tem a propriedade de reconhecer uma ou um conjunto de conformações do ligante (Verli, Barreiro, 2005).

Neste contexto, a utilização de modelagem molecular como ferramenta para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas complexos surgiu como uma alternativa, permitindo que sejam precisamente calculadas diversas propriedades de estruturas tridimensionais, como distâncias e ângulos de ligação, ângulos de torção, interações dipolo-dipolo, energia de formação, potencial eletrostático, entre outras.

A modelagem molecular de compostos bioativos, como os flavonóides, pode auxiliar na compreensão de fatores estruturais de uma molécula, do seu mecanismo de ação e fornecer subsídios e informações necessárias para o entendimento das relações estrutura-atividade (Verli, Barreiro, 2005; Silva *et al.*, 2004; Wermuth, 2000; Carvalho *et al.*, 2003; Foye *et al.*, 1997).

Algumas funções determinantes da modelagem molecular envolvem o estudo de características eletrônicas de compostos bioativos potenciais, e abrangem a densidade eletrônica, carga dos átomos, valores termodinâmicos de energia livre e valores de energia de HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*, e LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, da molécula.

Os valores de energia, em módulo, para as propriedades eletrônicas são importantes para a compreensão dos processos que envolvem e regem a interação fármaco-receptor (Patrick, 2001; Barreiro, Rodrigues, 1997).

Os valores de orbitais moleculares de um composto podem ser calculados por mecânica quântica. A análise dos valores de energia desses orbitais (HOMO e LUMO) possibilita a obtenção de informações importantes a respeito da reatividade da molécula e, além disso, desempenho biológico de flavonóides.

Um exemplo do uso dos orbitais HOMO e LUMO para explicar a interação fármaco-receptor foi demonstrado para flavonóides por Huang e col. (2001). Estes autores concluíram que a interação orbitalar entre os flavonóides e resíduos aromáticos ou outras cadeias laterais no sítio receptor GABA_A é regida por interações hidrofóbicas ou π - π , entre o HOMO dos flavonóides e o LUMO desses resíduos (Patrick, 2001; Silva *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2001).

A determinação das cargas dos átomos e a determinação do potencial eletrostático, por outro lado, podem identificar áreas na molécula com maior ou menor densidade eletrônica e contribuir para o entendimento de possível interação eletrostática entre os flavonóides e os sítios receptores BZ, assim como racionalizar a reatividade química de moléculas frente a processos controlados predominantemente por interações eletrostáticas (Patrick, 2001; Silva *et al.*, 2004; Guadagnini, Bruns, 1996).

Em virtude da necessidade de determinar o padrão de substituição apresentado pelo núcleo da flavona frente à substituição por radioiodo e da obtenção de propriedades físico-químicas que possam auxiliar o desenvolvimento de flavonóides como potenciais radioligantes, foram realizados estudos de modelagem molecular dos quatro compostos propostos inicialmente, quanto as suas propriedades conformacionais e eletrônicas, uma vez que estas são as características que mais influenciam a interação entre os flavonóides e os sítios receptores BZ (Fernández *et al.*, 2005; Marder *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Viola *et al.*, 2000; Marder *et al.*, 1998; Paladini *et al.*, 1998) (Marder *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001)

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estereoeletrônica é ferramenta importante no estudo de relações entre a estrutura química de flavonóides e a interação com o receptor GABA_A (Lameira *et al.*, 2006; Monastérios *et al.*, 2005; Erkoç, Erkoç, 2002).

A partir desta análise é possível determinar com precisão as regiões envolvidas em interações eletrostáticas e em mecanismo de transferência de carga entre os compostos estudados e os receptores biológicos (Patrick, 2001; Foye *et al.*, 1997).

Considerando a relevância destes dados foram obtidas informações eletrônicas, em nível molecular, utilizando o método de cálculo semi-empírico AM1 a partir do conformero de menor energia calculado em vácuo e submetido à análise de energia de ponto único.

Nesse processo, foram calculadas também as propriedades físico-químicas de densidade eletrônica, energia de orbitais moleculares, HOMO e LUMO, momento dipolo, cargas eletrônicas de potencial eletrostático e análise populacional de Mulliken. Os mapas de isosuperfície de HOMO e LUMO, e de potencial eletrostático estão ilustrados nas figuras 6 a 10 em item subsequente.

A estrutura molecular de cada composto foi previamente otimizada pelo método de mecânica molecular MMFF94 na obtenção da geometria de energia mínima e método de mecânica quântica semi-empírico AM1 (*Austim Model*), garantindo que a geometria obtida para cada composto estudado corresponda à conformação de equilíbrio (Dewar *et al.*, 1985). A otimização da geometria estrutural dos flavonóides no estado fundamental foi efetuada também pelo método *ab initio* Hartree-Fock 3-21 G* para confirmação da avaliação das conformações obtidas por AM1.

A seguir serão apresentados os resultados encontrados para a análise populacional de Mulliken bem como os valores de cargas obtidos (tabela 1). Este estudo foi realizado com a finalidade de corroborar a reatividade química dos flavonóides, utilizando-se como protótipo a flavona, frente à substituição por radioiodo.

2.1. REATIVIDADE DA MOLÉCULA DE FLAVONA FRENTE À SUBSTITUIÇÃO POR RADIOIODO

Os resultados dos estudos que incluem os mapas topográficos de distribuição de cargas moleculares, bem como os valores individuais de cargas para cada carbono da molécula de flavona estão representados nas figuras 22 e 23 e na tabela 1.

TABELA 1: Valores das cargas moleculares da flavona

Nº carbono	Cargas (kcal)		
	Natural	Mulliken	Eletrostática
2	0,13	0,13	0,36
3	-0,29	-0,29	-0,54
5	0,16	0,16	0,54
6	-0,26	-0,26	-0,43
7	-0,04	-0,04	0,08
8	-0,20	-0,20	-0,40
9	0,13	0,13	0,54
10	-0,22	-0,22	-0,58
1'	-0,06	-0,06	-0,03
2'	-0,09	-0,09	-0,08
3'	-0,14	-0,14	-0,12
4'	-0,11	-0,11	-0,06
5'	-0,14	-0,14	-0,12
6'	-0,10	-0,10	-0,10

Estudos que envolvem o uso de cálculos de cargas e densidade eletrônica geralmente fazem uso de diagramas de contorno a um determinado plano na molécula, ou de superfície de isovalores.

A utilização desses diagramas permite a obtenção de informações úteis a respeito da estrutura eletrônica da molécula. É necessário, contudo, parâmetros que representem a densidade de carga de maneira mais simples e concisa. Nesse sentido, o conceito químico de cargas atômicas parciais é muito útil e de grande significância (Silva *et al.*, 2004; Guadagnini, Bruns, 1996).

Neste estudo, foram calculadas as cargas individuais dos carbonos das moléculas de flavona e 6-¹³¹I-flavona e determinados os mapas eletrônicos de distribuição de cargas, com o objetivo de prever e racionalizar a reatividade química da molécula de flavona frente à substituição eletrofílica aromática direta por radioiodo, processo que é controlado, predominantemente, por interações eletrostáticas.

As cargas foram calculadas pelo método AM1 e os valores obtidos por Análise Populacional de Mulliken, cálculos de Carga Natural e de Cargas Atômicas Derivadas do Potencial Eletrostático, sendo que a comparação dos valores das cargas calculada por diferentes métodos fornece resultados confiáveis, uma vez que os métodos se complementam. As cargas derivadas do Potencial Eletrostático, entretanto, apresentam a vantagem de serem fisicamente mais satisfatórias que as de Mulliken, especialmente quando são empregadas para compostos biologicamente ativos (Sila *et al.*, 2004; Guadagnani, Bruns, 1996).

A distribuição de cargas calculadas pelo método de Análise Populacional de Mulliken é um parâmetro químico importante na quantificação ou medida de interações moleculares fracas, as quais estão envolvidas nos processos de interações eletrostáticas (Galeazzi *et al.*, 2003). Este método, porém, têm a tendência de concentrar as cargas próximas aos átomos de oxigênio. Neste trabalho, entretanto, não foram observadas discrepâncias entre as cargas calculadas pela Análise Populacional de Mulliken e a carga Natural, considerada como uma correção aplicada ao primeiro método (tabela 1) (Becker, Guimarães, Verli, 2005).

Assim, os carbonos de número 3, 6, 8 e 10 são os mais eletronegativos. Os carbonos de número 3 e 10 (anel C), porém, estão estericamente impedidos pela presença do oxigênio carbonílico, não sendo possível a substituição nestas posições pelo átomo de iodo-131.

As posições 6 e 8 (anel A), *orto* e *para*, respectivamente, são os pontos passíveis de substituição eletrofílica. O mecanismo da reação de substituição eletrofílica aromática está esquematizado abaixo, na figura 21:

FIGURA 21: Mecanismo esquemático de substituição eletrofílica

aromática direta (CT: cloramina T, agente oxidante)

Os perfis dos mapas de potencial eletrostático molecular, MEPs, foram obtidos para todos os confôrmeros de menor energia dos compostos estudados. Os MEPs foram calculados através do procedimento de energia de ponto único empregando o método semi-empírico AM1. Os contornos de energia dos MEPs foram gerados em superfície de van der Waals na faixa de 45 a -75 kcal/mol e obtidas em tamanhos pré-determinados de 0,002 e/au³. Esta superfície representa o potencial eletrostático sobreposto à superfície de densidade eletrônica e provêm medidas do tamanho real de determinado fragmento ou da estrutura química completa do flavonóide.

Os mapas de potenciais eletrostáticos gerados das moléculas de flavona e 6-iodoflavona, figuras 22-B e 23-B respectivamente, mostram que a região mais eletronegativa (cor vermelha) está nas proximidades do oxigênio carbonílico do anel C, para ambos compostos.

A região interna da molécula de flavona apresenta região com distribuição eletrônica (cor verde) correspondente à ressonância de elétrons entre os anéis bicíclicos (A e C), transmitindo-se ao anel B.

Na molécula de 6-¹³¹I-flavona, porém, a região com distribuição eletrônica (verde) pode ser notada nos anéis A e C, mas a transmissão da ressonância eletrônica ao anel B é fraca, provavelmente isso ocorra em função do efeito indutivo exercido pelo átomo de iodo substituído na posição meta do anel A, ou pela posição que se encontra o anel B, posicionado levemente fora do plano em relação aos anéis bicíclicos.

A região externa (azul) é a menos eletronegativa em ambas as moléculas, área hidrofílica onde estão localizados os hidrogênios, com exceção da região da flavona substituída com radioiodo (verde), que está localizada na face externa da molécula, apresentando eletronegatividade média (cor verde).

Os MEP's, figuras 22-C e 23-C, representam áreas nas moléculas com concentração eletrônica. As moléculas de flavona e 6-I-flavona apresentam região com grande concentração de elétrons em torno do oxigênio carbonílico do anel C, entretanto, essa região é menos pronunciada na 6-¹³¹I-flavona e não se transmite ao anel A, como ocorre na molécula de flavona. Além disso, apresenta área de concentração eletrônica em torno do C₆ substituído com iodo e do próprio iodo, provavelmente em função da substituição em *meta* com o iodo resultar em estabilização da ressonância do anel por efeito indutivo.

Considerando-se tanto os valores de cargas moleculares obtidos quanto os mapas de topologia de potencial eletrostático molecular conclui-se que as interações por transferência de cargas envolvidas nos orbitais investigados exercem um papel importante no modelo de interação ligante-receptor BZ.

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); O (vermelho).

** Mapas 3D de densidade de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal da flavona radiomarcada. Escala de cor nível 11: vermelha -65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

*** Mapas 3D característicos para os sítios de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado flavona.

FIGURA 22: Mapas topográficos de distribuição de cargas moleculares e superfícies de densidade eletrônica da flavona

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); I (laranja); O (vermelho).

** Mapas 3D de densidade de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal da flavona radiomarcada. Escala de cor nível 11: vermelha -65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

*** Mapas 3D característicos para os sítios de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 6-iodoflavona.

FIGURA 23: Mapas topográficos de distribuição de cargas moleculares e superfícies de densidade eletrônica da 6-iodoflavona

A partir destas informações, pode-se sugerir o caráter antagonista adotado pela molécula de 6-iodoflavona frente a receptores GABA_A, baseado em modelo de possível interação entre flavonóides e o sítio de ligação benzodiazepínico nos receptores GABA_A, proposto por Huang e col. (2001), figura 24.

FIGURA 24: Representação esquemática de possível modelo de interações de ligantes flavonóides aos sítios receptores GABA_A

Considerando a alta sensibilidade das posições 6 e 7 por substituições, principalmente as que promovem interações eletrostáticas e hidrofóbicas, espera-se que a flavona substituída possa interagir com esses sítios receptores, sem apresentar, no entanto, efeito farmacológico. Alguns resíduos aromáticos desse sítio receptor podem, inclusive, interagir com flavonóides por ligações π - π e por interações hidrofóbicas. Essas regiões podem apresentar orientação geométrica restrita, fazendo com que o sítio receptor fique muito sensível às propriedades estruturais provenientes de substituintes nos anéis aromáticos A e B dos flavonóides (Huang *et al.*, 2001).

2.2. PROPRIEDADES ESTEREOELETRÔNICAS

Serão apresentados a seguir os mapas de densidade eletrônica, HOMO e LUMO obtidos a partir de estudos de modelagem molecular que visaram à identificação de série de compostos promissores como novo radioligante cerebral, baseados na estrutura da flavona.

Os perfis dos mapas de potencial eletrostático molecular, MEPs, foram obtidos para todos os confôrmeros de menor energia dos compostos estudados. Estes mapas de topologia foram calculados através do procedimento de energia de ponto único empregando o método semi-empírico AM1. Os contornos de energia dos MEPs foram gerados em superfície de van der Waals na faixa de 45 a -75 kcal/mol e obtidas em tamanhos pré-determinados de 0,002 e/au³.

Todas as cores empregadas na ilustração das superfícies dos compostos representam regiões que demonstram a intensidade variável dos valores de carga eletrostática, sendo que a maior intensidade de cargas negativa e positiva são delineadas pela cor vermelha e azul, respectivamente.

A partir desta etapa foram obtidos os valores das propriedades físico-químicas de efeito eletrônico, tais como valores termodinâmicos de energia livre em meio vácuo, valores de energia de HOMO e LUMO da molécula, potencial químico e *bandgap* ($\Delta E = \text{HOMO} - \text{LUMO}$).

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); I (laranja); O (vermelho).

** Mapas 3D de densidade de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal da 6-iodoflavona. Escala de cor nível 11: vermelha - 65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

*** Mapas 3D característicos para os sítios de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 6-iodoflavona.

FIGURA 25: Representação tri-dimensional dos modelos da 6-iodoflavona calculados por AM1 em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); I (laranja); O (vermelho); N (azul).

** Mapas 3D de densidade de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 3'-NO₂-6-iodoflavona. Escala de cor nível 11: vermelha -65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

*** Mapas 3D característicos para os sítios de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 3'-NO₂-6-iodoflavona.

FIGURA 26: Representação tri-dimensional dos modelos da 3'-NO₂-6-iodoflavona calculados por AM1 em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); I (laranja); O (vermelho); F (verde).

** Mapas 3D de densidade de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 3'-F-6-iodoflavona. Escala de cor nível 11: vermelha -65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

*** Mapas 3D característicos para os sítios de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 3'-F-6-iodoflavona.

FIGURA 27: Representação tri-dimensional dos modelos da 3'-F-6-iodoflavona calculados por AM1 em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); I (laranja); O (vermelho); F (verde).

** Mapas 3D de densidade de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 4'-F-6-iodoflavona. Escala de cor nível 11: vermelha -65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

*** Mapas 3D característicos para os sítios de potencial eletrostático demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do derivado 4'-F-6-iodoflavona.

FIGURA 28: Representação tri-dimensional dos modelos da 4'-F-6-iodoflavona calculados por AM1 em forma de tubo (A), dos mapas de densidade de potencial eletrostático (B), e distribuição orbitalar de HOMO (C) e LUMO (D).

Os mapas de potencial eletrostático dos compostos apresentados foram gerados utilizando-se os métodos AM1 para a obtenção de cálculos de energia mínima e *ab initio* Hartree-Fock com a base HF/3-21 G* visando à confirmação dos resultados obtidos por AM1 assim como realizar a otimização de geometria por base de cálculo mais precisa.

As estruturas otimizadas dos sistemas avaliados estão apresentadas nas figuras 25-A a 28-A. A otimização de geometria pelo método AM1 originou estruturas não-planares como conformação estável para todos os compostos. Observa-se nessas moléculas pequena deformação angular entre a dupla ligação do anel hexagonal C e o anel B, sendo esta deformação mais pronunciada no composto 3'-NO₂-flavona.

Estes resultados são compatíveis com os dados apresentados por Erkoç e Erkoç (2001) sobre os flavonóides naringenin e genistein. Os autores empregaram o método AM1 na otimização de geometria e obtiveram como estruturas otimizadas das duas moléculas empregadas no estudo conformação não-planar.

A partir dos estudos de otimização de geometria por HF/3-21 G* foi observada a ocorrência de planaridade para os quatro compostos estudados. Provavelmente, a planaridade para todas as estruturas foi conseguida porque essa base de dados utilizada mecanismos mais precisos para o cálculo de suas propriedades (Becker, Guimarães, Verli, 2005; Bhattacharjee, Karle, 1996).

O arranjo coplanar ou muito próximo a planaridade entre os dois sistemas aromáticos nas flavonas é requisito importante para a ligação ao receptor GABA_A (Kahnberg *et al.*, 2002).

O potencial eletrostático molecular, MEP, para a série estudada foi obtido pelo método AM1 e *ab initio* HF/3-21 G*. Os cálculos foram realizados a partir da metodologia de ponto único realizada nos confôrmeros de menor energia obtidos na análise conformacional.

Os mapas de isosuperfície de MEP em três dimensões, sobrepostos a densidade eletrônica total dos flavonóides, obtidos pelos mesmos métodos de cálculo, estão ilustrados nas figuras 25-B a 28-B.

Para os perfis observados percebe-se que a porção do oxigênio carbonílico é rica em elétrons nos quatro compostos estudados, efeito observado em coloração vermelha nas moléculas. Somente o composto 3'-NO₂-flavona apresentou outra porção com alta densidade eletrônica, próxima aos oxigênios do grupo nitro, se comparado à molécula de flavona. Este efeito era esperado em função da característica fortemente aceptora de elétrons do grupo nitro.

A visão frontal das moléculas de flavonóides indica que o efeito eletrônico se transmite fracamente através da estrutura química, na série obtida pelo método AM1.

A introdução de grupos substituintes tanto na posição 3' quanto na posição 4' do anel B dos flavonóides da série estudada não produziu modificações significativas nos perfis de densidade de potencial eletrostático. A maior coloração azul ou vermelha registrada no grupo substituinte é devido à característica intrínseca do grupo ligado ao C_{3'} ou C_{4'}.

A propriedade eletrônica de HOMO indica a capacidade de determinada molécula de doar um elétron em dada reação (Barreiro *et al.*, 1997; Foye *et al.*, 1997; Marshall, 1995), a qual está diretamente relacionada ao potencial de ionização e pode ser relevante na interação hipotética entre fármaco-receptor resultando, também, em influência direta sobre a atividade biológica destes compostos.

Os valores calculados de HOMO por AM1 para os compostos em estudo não apresentaram grande variação entre eles, sendo o valor mínimo de -9,42 eV para o flavona e máximo de -9,70 eV para o 3'-NO₂-flavona. Estes valores podem ser observados na tabela 2.

Os mapas de distribuição orbital de HOMO para os flavonóides estão ilustrados nas figuras 25-C a 28-C. Esses mapas demonstram haver vários sítios difundidos pelos anéis bicíclicos A e C e pelo anel B. Pode ser observada, entretanto, uma grande mudança no perfil orbital de HOMO do composto 3'-NO₂-flavona, comparada a flavona, obviamente causado pela introdução do grupo NO₂ na posição 3' do anel B. O HOMO do composto 3'-NO₂-flavona está presente apenas em pequenos sítios de energia no anel B, enquanto o HOMO da flavona está distribuído por toda a extensão da molécula. A distribuição orbital de LUMO para os quatro compostos, por outro lado, é similar e estão apresentadas nas figuras 25-D a 28-D. Ao contrário da propriedade de HOMO, esta indica a capacidade de determinada molécula em aceitar um elétron em dada reação, e pode representar também interação hipotética entre fármaco-receptor (Barreiro *et al.*, 1997; Foye *et al.*, 1997; Marshall, 1995).

TABELA 2: Propriedades físico-químicas calculadas pelos métodos AM1 e *ab initio* HF/3-21 *G para a flavona e análogos

AM1						
Análogo	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Dipolo (dB)	Área cm ²	Volume cm ³	Bandgap (eV)
flavona	-9,42	-0,92	4,42	269,25	257,12	8,50
3'-nitro	-9,70	-1,55	2,94	295,20	278,83	8,15
3'-flúor	-9,52	-1,10	2,95	275,26	262,02	8,42
4-flúor	-9,47	-1,10	3,15	275,21	262,00	8,37
HF 3-21 *G						
Análogo	HOMO	LUMO	Dipolo (dB)	Área cm ²	Volume cm ³	Bandgap (eV)
flavona	-8,85	0,77	4,03	269,26	257,13	8,08
3'-nitro	-9,03	0,68	2,14	292,33	276,59	8,35
3'-flúor	-8,93	1,31	3,08	272,71	259,78	7,62
4-flúor	-8,92	1,44	3,35	272,73	259,77	7,48

Os valores de LUMO calculados para a série por AM1 não apresentaram grande variação, sendo o valor mínimo encontrado de -0,92 eV para a flavona e o valor máximo de -1,55 eV para a 3'-NO₂-flavona e estes valores estão relacionados na tabela 2. Os resultados encontrados neste trabalho para a distribuição orbitalar de HOMO e LUMO são compatíveis com os resultados apresentados por Huang e col. (2001). Estes autores, baseados na alta afinidade apresentada pelo composto 6-metil-3'-NO₂ substituído pelos sítios receptores BZ comparado a flavona, sugerem a importância do HOMO na ligação π - π ou interação hidrofóbica. Isto implica na afirmação de que a interação orbitalar entre flavonóides e resíduos aromáticos dos sítios receptores GABA_A é dominada pela interação π - π ou hidrofóbica entre o HOMO dos flavonóides e o LUMO dos resíduos. Adicionalmente, baseando-se em resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a interação eletrônica próxima a posição 3' também seja importante para a ligação com os sítios receptores BZ.

A diferença entre os valores de HOMO e LUMO, em intervalo de energia chamado *bandgap*, provém informações sobre a reatividade química além de se constituir em importante indício da estabilidade da molécula (Galezzi *et al.*, 2003; Patrick, 2001). Um intervalo grande de *bandgap* implica alta estabilidade e baixa reatividade em reações químicas, enquanto o contrário ocorre quando o intervalo de energia *bandgap* é pequeno. Entre os compostos estudados, os valores de *bandgap* encontrados são invariavelmente baixos, sendo o menor valor encontrado da 3'-NO₂-flavona, de 8,15 e o maior valor foi apresentado pela flavona, 8,50, tabela 2.

Isso significa que em qualquer processo de excitação o composto 3'-NO₂-flavona necessita de menos energia para uma reação ocorrer (Erkoç, Erkoç, 2002), seguido do 3'-F-flavona, 4'-F-flavona e flavona. Os valores dos momentos dipolos calculados também estão relacionados na tabela 2. A flavona apresenta momento dipolo de 4,42 dB e é o maior valor entre os quatro sistemas estudados. Isso significa que esse composto, sendo o mais polar da série, tem a característica de reagir mais facilmente com outras moléculas polares. E o composto 3'-NO₂-flavona, por sua vez, apresenta o menor valor de momento dipolo, 2,94 dB, e é o mais apolar da série, apresentando a característica de, em um sistema biológico, reagir mais facilmente com lipídeos (Erkoç, Erkoç, 2002; Vermouth, 2000).

3. CONCLUSÕES

A partir dos experimentos de otimização de geometria estrutural realizada neste trabalho foi observada a ocorrência de estrutura praticamente planar para os quatro compostos da série. Esta planaridade é de fundamental importância para a interação destes compostos com os sítios receptores BZ.

A partir da análise dos dados obtidos para o cálculo de cargas conclui-se que a molécula de flavona é passível de sofrer substituição eletrofílica por radioiodo nas posições 6 em maior proporção e, provavelmente, em menor proporção na posição 8. O resultado está em concordância com o padrão de substituição esperado em reações de substituição eletrofílica. Analogamente à molécula de flavona, os derivados propostos provavelmente serão passíveis de substituição eletrofílica nas mesmas posições.

A análise dos mapas de MEP forneceu informações acerca das propriedades eletrônicas de interesse da série estudada face aos sítios receptores BZ e está de acordo com dados de literatura, os quais descrevem o derivado 3'-NO₂ substituído apresentando conjunto favoráveis de características para interação com esses sítios receptores.

Além disso, as informações obtidas sugerem que os efeitos eletrônicos de grupos substituintes na posição 3' possam interferir de forma favorável na ligação entre ligante-receptor.

SÍNTESE DA FLAVONA E ANÁLOGOS

---

1. Introdução

2. Resultados e discussão

2.1. Obtenção da flavona e análogos

2.2. Identificação da flavona e análogos

2.2.1. Análise espectrométrica de ligações e grupamentos específicos

2.2.1.1. Flavona

2.2.1.2. 3'-NO₂-flavona

2.2.1.3. 3'-F-flavona

2.2.1.4. 4'-F-flavona

3. Conclusões

1. INTRODUÇÃO

Estão disponíveis na literatura diversos métodos para a síntese de flavonas, os quais incluem a síntese de Allan-Robinson (Allan, Robinson, 1924), o método de Baker-Venkataraman (Baker, 1933; Gupta, Venkataraman, 1934), síntese a partir de chalconas (Mavel *et al.*, 2006) e síntese via estratégia intramolecular de Wittig. A síntese a partir da transformação de Baker-Venkataraman é o mais comumente aplicado para a obtenção de flavonas.

O sistema 4H-cromen-4-ona, figura 29, é conhecido pelo nome comum de cromona (Havsteen, 2002; March, 1992) e apresenta o seguinte registro de RMN (4H-piran-4-ona), tabela 3:

¹ H δ (ppm)	¹³ C δ (ppm)
H2: 7,88	C2: 154,9
H3: 6,34	C3: 112,4
H5: 8,21	C4: 176,9
H6: 7,42	C5a: 124
H7: 7,68	C8a: 156
H8: 7,47	

TABELA 3: Registro de RMN (CDCl₃) de 4H-piran-4-ona

As cromonas diferem das cumarinas ($\nu_{\text{C=O}} \sim 1.710 \text{ cm}^{-1}$) pela posição da banda de absorção da carbonila no IV ($\nu_{\text{C=O}} \sim 1.660 \text{ cm}^{-1}$). Cromonas, especialmente as flavonas, são caracterizadas por duas bandas de absorção na região de 240-285 e 300-400 nm (March, 1992).

As flavonas são sintetizadas a partir do 4H-piran-4-ona e se comportam como um sistema 1,3 dicarbonil. A protonação e alquilação ocorrem no oxigênio. O ataque eletrofílico ocorre no anel piran-4-ona desativado na posição 3. Frente à nucleófilos, o sistema cromona comporta-se como aceptor de Michael. Normalmente, o ataque ocorre no C-2, e em menor proporção no C-4, sendo que após a adição ocorre a transformação no anel (Fernández *et al*, 2005; Kahnberg *et al.*, 2002; Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Viola *et al*, 2000; Paladini *et al*, 1998; March, 1992; Jain, Makrandi, Grover, 1982).

Em meio aquoso alcalino, o anel 4H-piran-4-ona se abre, pela adição de H₂O em **1**, formando a espécie o-hidroxifenil-1,3-dicetonas (**2**). O tratamento subsequente com ácido produz o-hidroxifenilcetonas e ácidos carboxílicos ou ácidos salicílicos e cetonas, figura 29.

FIGURA 29: Retrossíntese para obtenção de núcleo cromona

Pela clivagem do anel as aminas primárias e secundárias geram enaminonas, as quais sob tratamento ácido retornam ao sistema cromona:

FIGURA 30: Degradação para sistema cromona

No presente trabalho, os flavonóides foram obtidos pela aplicação da transformação de Baker-Venkataraman convencional, figura 33. Neste processo, uma hidroxiaacetofenona (1) é primeiramente convertida em benzoil éster (2), e a espécie formada é tratada com base, formando uma 1,3-dicetona (3). O tratamento desta dicetona com ácido origina a flavona desejada (4) (Ono *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005; Kahnberg *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Viola *et al.*, 2000; Paladini *et al.*, 1998; Jain, Makrandi, Grover, 1982).

Em 1958, a reação de Baker-Venkataraman foi modificada por Seshadri e colaboradores (Jain, Makrandi, Grover, 1982), e a proposta destes autores consiste em manter sob refluxo *o*-hidroxiaacetofenona e cloreto de arila em presença de acetona e carbonato de potássio anidro, os quais originam diretamente a espécie *o*-hidroxidibenzoilmetano necessária para ciclização à flavona. Este procedimento simplificado, no entanto, apresentou algumas limitações. Os materiais de partida 2-hidroxi-4,6-dimetoxi e 2-hidroxi-3-metil-4,6-dimetoxiacetofenonas não se converteram aos correspondentes dibenzoilmetanos. A inatividade dessas acetofenonas foi atribuída ao efeito de ressonância dos grupos metoxila (Jain, Makrandi, Grover, 1982).

Para a obtenção de 6-metil-2'-nitroflavona e outros análogos nitro substituídos Dekermendjian e col. (1999) utilizaram a metodologia sintética esquematizada na figura 31, que inclui acetilação, seguida de rearranjo de Fries (Morrison, Boyd, 1997), reação de Schotten-Baumann modificada (Morrison, Boyd, 1997) e rearranjo de Baker-Venkataraman, na qual os produtos desejados são obtidos após ciclização ácida.

FIGURA 31: Síntese de 6-metil-NO₂-flavonas substituídas

Mavel e col. (2006) descreveram a obtenção de flavonas hidroxi-substituídas no anel A, a partir de chalconas, segundo a figura 32:

FIGURA 32: Síntese de flavonas a partir de chalconas

Nesta reação, as hidroxilas da acetofenona (material de partida) foram protegidas com derivados de éter MOM. A metoximetilação regioseletiva nas $-OH$ presentes nas posições 2 e 4 foi realizada com adição de base fraca (K_2CO_3) originando o éter *bis*-MOM, enquanto a obtenção do éter *tris*-MOM requer a adição de base forte (NaOH) e cloreto de tetrabutylamônio como catalisador para transferência de fase (Mavel *et al.*, 2006).

As chalconas (c) foram preparadas a partir de condensação com benzaldeídos substituídos, catalisada por base, para proteção da acetofenona. A hidrólise dos grupos protetores MOM com HCl, seguido pela ciclização com acetato de sódio originou os derivados di-OH-flavonóides (Mavel *et al.*, 2006).

A oxidação dos derivados com iodeto em presença de piridina originou as flavonas planejadas com altos rendimentos (Mavel *et al.*, 2006).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram sintetizados e identificados quatro derivados flavonóides. A síntese total de cada composto foi realizada em três etapas. Na primeira etapa obtiveram-se a 2-benzoil-acetofenona e análogos, na segunda etapa obtiveram-se a 2-hidroxi-dibenzoil-metano e análogos e na etapa final obtiveram-se a flavona e análogos (figura 33).

Figura 33: Rota de síntese para obtenção da flavona e derivados

A identificação dos compostos intermediários foi realizada mediante comparação da faixa de fusão experimental com a descrita em literatura. A identificação da flavona e derivados foi feita pela leitura dos seus espectros de IV, RMN-¹H e de RMN-¹³C. O grau de pureza dos compostos foi avaliado por determinação da faixa de fusão. Todos os espectros dos compostos finais encontram-se no item *Anexo 2* dessa tese.

Com a finalidade de facilitar a interpretação dos dados experimentais obtidos na síntese dos análogos, serão apresentados, a seguir, nas tabelas 4 a 10, os resultados obtidos tanto no preparo dos intermediários quanto dos produtos finais.

Vale acrescentar, que os procedimentos para a síntese da flavona e análogos concentraram-se nos aspectos necessários para a obtenção dos produtos com pureza e rendimentos satisfatórios, uma vez que promover modificações ou melhorias na síntese dos compostos não era objetivo deste trabalho.

2.1. OBTENÇÃO DA FLAVONA E ANÁLOGOS

Apresenta-se, a seguir, nas tabelas 4 a 10 os resultados referentes à síntese e identificação, assim como as propriedades físicas e químicas da flavona, 3'-NO₂-flavona, 3'-F-flavona e 4'-F-flavona, incluindo todas as etapas intermediárias para a obtenção dos compostos.

TABELA 4: Condições experimentais e resultados envolvidos no preparo da flavona

			Faixa de Fusão (°C)	
Reagentes		Exp.	Lit	
Etapa 1 - obtenção de 2-benzoi-acetofenona η =82,2%				
2-hidróxi-acetofenona (g) (mmol)	cloreto de benzoíla g (mmol)	82-83	82-83	
1,0 g (7,3)	1,5 (11,1)			
Etapa 2 - obtenção de 2-hidroxi-dibenzoi-metano η =96,5%				
2-benzoi-acetofenona g (mmol)	hidróxido de potássio g (mmol) piridina (ml)	117-118	120-121	
1,43 (6,0)	0,51 (9,1) 4,8			
Etapa 3 - obtenção da flavona η =96,5%				
2-hidróxi-benzoi-metano g (mmol)	ácido sulfúrico (ml) + ácido acético (ml)	93-95	98-99	
1,40 (5,8)	0,3 9			

TABELA 5: Condições experimentais e resultados envolvidos no preparo da 3'-NO₂-flavona

			Faixa de Fusão (°C)	
Reagentes			Exp.	Lit
Etapa 1 - obtenção de 2-benzoi-acetofenona substituída η =80,2%				
2-hidróxi-acetofenona (mL) (mmol)	1,0 g (7,3)	cloreto de benzoi-la substituído g (mmol)	1,7 (9,0)	74 -
Etapa 2 - obtenção de 2-hidroxi-dibenzoi-metano substituída η =96,0%				
2-benzoi-acetofenona g (mmol)	1,40 (6,0)	hidroxido de potássio g (mmol)	piridina (ml)	155 154-156
		0,51 (9,1)	4,8	
Etapa 3 - obtenção da 3'-NO ₂ -flavona η =99%				
2-hidróxi-benzoi-metano g (mmol)	0,62 (2,17)	ácido sulfúrico (ml) + ácido acético (ml)	0,12 3,2	164-166

TABELA 6: Condições experimentais e resultados envolvidos no preparo da 3'-F -flavona

Reagentes			Faixa de Fusão (°C)
			Exp. Lit
<i>Etapa 1 - obtenção de 2-benzoi-acetofenona substituída η =82,0 %</i>			
2-hidróxi-acetofenona (mL) (mmol)	cloreto de benzoi-la substituído g (mmol)	50	-
0,50 (6,0)	0,70 (6,0)		
<i>Etapa 2 - obtenção de 2-hidroxi-díbenzoi-metano substituída η =95,5%</i>			
2-benzoi-acetofenona g (mmol)	hidróxido de potássio g (mmol) piridina (ml)	121-122	120-121
1,12 (0,44)	0,43 (7,6) 3,5		
<i>Etapa 3 - obtenção da 3'-F-flavona η =93%</i>			
2-hidróxi-benzoi-metano g (mmol)	ácido sulfúrico (ml) + ácido acético (ml)	98-99	98-99
0,62 (2,17)	0,12 3,3		

TABELA 7: Condições experimentais e resultados envolvidos no preparo da 4'-F-flavona

Reagentes				Faixa de Fusão (°C)		
Etapa 1 - obtenção de 2-benzoi-acetofenona substituída η =81,0 %						
2-hidróxi-acetofenona (mL) (mmol)	cloreto de benzoi-la substituído g (mmol)		36-37	-		
0,48 (4,0)	0,70 (6,0)					
Etapa 2 - obtenção de 2-hidroxi-dibenzoi-metano substituída η =93,5%						
2-benzoi-acetofenona g (mmol)	hidróxido de potássio g (mmol)		116-119	120-121		
0,80 (0,30)	0,30 (5,3)		2,4			
Etapa 3 - obtenção da 4'-F-flavona η =95%						
2-hidróxi-benzoi-metano g (mmol)	ácido sulfúrico (ml) + ácido acético (ml)		139-140	138-139		
0,05 (2,34)	0,10 0,30					

Prepararam-se e identificaram-se quatro derivados flavonóides, incluindo-se o núcleo da flavona, o qual foi substituído na posição 3' com os grupos -H, -NO₂ e F, e na posição 4' com -F. Os compostos foram preparados, em três etapas, a partir de seus correspondentes cloretos de ácido benzóico e hidroxiacetofenona, figura 33.

Na primeira etapa obteve-se a 2-benzoil-acetofenona e derivados a partir de 2-hidroxi-acetofenona. Esta reação ocorre via ataque nucleofílico, mediante transferência de elétrons do átomo de oxigênio presente no grupo hidroxila para o carbono carbonílico do cloreto de benzoíla, sendo favorecida pelos átomos de maior eletronegatividade, oxigênio e cloro, próximos ao carbono carbonílico. O átomo de cloro, sendo um bom grupo de saída, proporciona a obtenção de produtos com altos rendimentos, figura 34.

FIGURA 34: Mecanismo de ataque nucleofílico envolvido na obtenção de 2-benzoil-acetofenona

A obtenção da 2-benzoil-acetofenona e derivados foi confirmada por análise de faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados de literatura. O rendimento médio desta etapa ficou em torno de 81%.

Na segunda etapa obteve-se 2-hidroxi-dibenzoil-metano e derivados, a partir de reação de substituição nucleofílica e inclui o rearranjo de Baker-Venkataraman, esquematizado na figura 35 (Viola *et al*, 2000; Marder *et al*, 1999). Esta etapa envolveu adição da 2-benzoil-acetofenona ou derivados mediante ativação com uma base (KOH). O mecanismo consiste no ataque nucleofílico, em presença de base, sobre o carbono carbonílico.

O produto formado possui duas estruturas de ressonância, sendo elas um enolato e um carbânio. A densidade eletrônica deslocada entre o oxigênio e o carbono α reage com o carbono carbonílico, causando rearranjo intramolecular (Schmid, Banholzer, 1954), resultado do deslocamento do par de elétrons da carbonila para o oxigênio com conseqüente formação de anel de seis membros. O par de elétrons que migrou, porém, volta para a ligação de origem e rompe a ligação entre o oxigênio que restou e o carbono, formando assim, um sal dicarbonílico (Vollhardt *et al*, 2004).

A obtenção 2-hidroxi-dibenzoil-metano e derivados foi confirmada por análise de faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados de literatura. O rendimento médio desta etapa ficou em torno de 95%.

FIGURA 35: Mecanismo de reação envolvido no rearranjo de Baker-Venkataraman

Na última etapa ocorre a formação de flavona e análogos. Esta reação ocorre por mecanismo similar ao de epoxidação, onde a hidroxila fenólica do anel aromático reage primeiramente com o ácido sulfúrico concentrado, formando um carbocátion. Em uma segunda etapa, ocorre ataque nucleofílico intramolecular do enol gerado, sobre o carbocátion formado na reação anterior, obtendo-se a flavona e análogos por reação de ciclização, figura 36.

É importante salientar que nesta reação a cinética de formação dos produtos é extremamente dependente da concentração de ácido sulfúrico e temperatura utilizada na reação, que favorecem o deslocamento da reação no sentido de formação do produto.

FIGURA 36: Mecanismo envolvido na obtenção da flavona e análogos

A obtenção da flavona e análogos foi confirmada por análise de faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados de literatura. O rendimento médio desta etapa ficou em torno de 96%.

Os quatro compostos propostos foram sintetizados com altos rendimentos e grau de pureza satisfatória. A transformação de Baker-Venkataraman foi escolhida para a síntese dos compostos porque esta metodologia apresenta algumas vantagens.

Entre elas citam-se, reagentes disponíveis comercialmente, envolve poucas etapas intermediárias, as reações são seletivas e não originam produtos secundários (Pedro, Branco, 2003).

2.2. IDENTIFICAÇÃO DA FLAVONA E ANÁLOGOS

A identificação dos compostos foi realizada mediante comparação da faixa de fusão experimental com a descrita em literatura e pela leitura dos espectros de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C (Pavia, 1996; Silverstein, 1994). Nas tabelas de 8 a 10 serão apresentados os sinais de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C comuns a flavona e análogos.

TABELA 8: Principais bandas de absorção na região do infravermelho da flavona e análogos*

Estrutura (R e R')						
	ν C=O (carbonila)	ν C=C (anel aromático)	δ C-H (anel aromático)	ν C-O (éter)	ν C-F	ν C-H (assimétrico) ν N=O (assimétrico e simétrico conjugado)
flavona	1645	1605-1465	850	905	-	-
3'-NO ₂	1652	1607-1466	836	1134	-	1466-1380
3'-F	1646	1607-1458	816	1127	1016	-
4'-F	1661	1603-1466	836	1133	1014	-

*: ν (cm⁻¹): estiramento; δ (cm⁻¹): deformação

TABELA 9: Principais sinais de RMN-¹H (ppm) da flavona e análogos*

Estrutura (R e R')								
	H5	H6	H7	H8	H3	H2'e H6'	H3'e H5'	H4'
flavona	8,15 (J= 2,0 Hz, d, 1H)	7,33 (J= 15 Hz, d, 1H)	7,60 (J= 2,0 Hz, d, 1H)	7,45 (J= 18,0 Hz, m, 1H)	6,76 (s, 1H)	7,85 (J= 9,0Hz, m, 2H)	7,45 (J= 8,0 Hz, m, 2H)	7,51 (J= 18,0 Hz, m, 1H)
3'-NO ₂	8,74 (s, 1H)	7,18 (s, 1H)	8,14 (J= 14,04 Hz, d, 1H)	7,64 (J= 16,02 Hz, m, 1H)	6,83 (s, 1H)	8,31 (J= 8,16 Hz, m, 2H)	7,37 (J= 14,91 Hz, t, 1H)	7,55 (J= 8,58 Hz, d, 1H)
3'-F	8,15 (J= 7,92 Hz, d, 1H)	7,12 (J= 14,7 Hz, m, 1H)	7,53 (J= 5,1 Hz, t, 1H)	7,47 (J= 1,14 Hz, d, 1H)	6,72 (s, 1H)	7,56 (J= 19,05 Hz, d, 2H)	7,39 (J= 7,89 Hz, m, 1H)	7,42 (J= 8,07 Hz, d, 1H)
4'-F	8,14 (J= 9,21Hz, d, 1H)	7,73 (J= 14,4 Hz, t, 1H)	7,63 (J= 8,52 Hz, t, 1H)	7,47 (J= 8,19 Hz, d, 1H)	6,69 (s, 1H)	7,83 (J= 14,04 Hz, m, 2H)	7,11 (J= 19,95 Hz, m, 2H)	-

Nota: s: singleto; d: duplete; m: multiplete; J: acoplamento

* RMN: Cloroformio-d₆ (300 MHz)

TABELA 10: Principais sinais de RMN-¹³C (ppm) da flavona e análogos*

Estrutura													
(R e R')	2	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'		
flavona	162,4	107,4	128,5	116,4	133,8	116,1	123,8	125,7	125,3	125,7	123,8		
3'-F	164,6	108,1	130,7	123,9	134,0	118,3	113,2	161,9	118,6	130,7	122,0		
4'-F	178,5	107,6	131,8	126,3	133,8	125,6	129,0	156,3	118,1	131,6	125,7		

* RMN: Clorofórmio-d₆ (300 MHz)

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu IR-470, em dispersão de KBr. A flavona e seus análogos apresentam ligações em comum, diferenciando-se apenas quanto ao substituinte em posição *meta* ou *para* no anel benzênico. As principais bandas de absorção estão apresentadas na tabela 8. As bandas específicas de cada composto serão discutidas a seguir.

Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio, RMN- ^1H e de carbono, RMN- ^{13}C , foram registrados em espectrofotômetro Bruker modelo ADPX Advanced 300 MHz, utilizando-se clorofórmio- d_6 como solvente.

Assim como na identificação dos compostos através de espectros no infravermelho, os compostos apresentam sinais comuns referentes à análise de hidrogênio, tabela 9. Os espectros de ressonância magnética de carbono foram atribuídos de acordo com a numeração apresentada na tabela 10, onde estão também os sinais referentes aos átomos de carbono em comum. Os sinais específicos para cada composto serão discutidos a seguir.

2.2.1. ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE LIGAÇÕES E GRUPAMENTOS ESPECÍFICOS

2.2.1.1. FLAVONA

O espectro de IV apresentou banda em 1645 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O.

O composto apresentou no espectro de RMN- ^1H multiplete com integração para quatro prótons centrados em 7,51 ppm referentes a três hidrogênios do anel B e um hidrogênio do anel A.

2.2.1.2. 3'-NO₂-FLAVONA

O espectro de IV apresentou banda acima de 3000 cm⁻¹ (~3300) referente ao estiramento assimétrico da ligação C-H e banda entre 1466 e 1380 referente ao estiramento simétrico e assimétrico conjugado da ligação N=O do grupo nitro. Apresentou banda referente ao estiramento da ligação C=O levemente deslocada em relação ao composto não substituído, em 1652 cm⁻¹, devido a presença do grupo substituinte nitro.

O espectro de RMN-¹H apresentou sinal em 8,74 ppm com integração para um próton referente ao hidrogênio na posição 5, com deslocamento em relação ao sinal em 8,18 ppm do composto não-substituído. Não foi apresentado o espectro de RMN-¹³C, porque não foi possível a solubilização do composto em quantidade suficiente para ser detectado pelo equipamento.

2.2.1.3. 3'-F-FLAVONA

O espectro de IV apresentou banda assimétrica em 1016 cm⁻¹ referente à ligação C-F.

O espectro de RMN-¹H apresentou tripleto entre 7,42 e 7,37 ppm com integração para um próton referente ao hidrogênio na posição 5'.

2.2.1.4. 4'-F-FLAVONA

O espectro de IV apresentou banda assimétrica em 1014 cm⁻¹ referente à ligação C-F. Apresentou banda referente ao estiramento da ligação C=O levemente deslocada em relação ao composto não-substituído, em 1661 cm⁻¹, devido a presença do grupo substituinte flúor.

3. CONCLUSÕES

Os flavonóides planejados neste trabalho foram sintetizados de acordo com os procedimentos descritos em literatura. Os rendimentos encontrados foram satisfatórios e também compatíveis com os encontrados em literatura.

Os compostos foram devidamente identificados e caracterizados pela leitura de espectros de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C. Todos os compostos correspondem as estruturas planejadas. Obteve-se alto grau de pureza para os quatro compostos comprovados pela determinação da faixa de fusão.

A tabela 11 sintetiza os dados obtidos para os quatro compostos.

TABELA 11: Resultados experimentais envolvidos na obtenção da flavona e análogos

Estrutura	Massa obtida (g)	Rendimento % (η)	Faixa de fusão (°C)
flavona	1,2	96,5	98-99
3'-NO ₂ -flavona	0,62	99	164-166
3'-F-flavona	0,20	93	98-99
4'-F-flavona	0,34	99	139-140

**MARCAÇÃO COM RADIOIODO E CONTROLE RADIOQUÍMICO DA FLAVONA E
ANÁLOGOS**

---

1. Introdução

2. Resultados e discussão

3. Conclusões

1. INTRODUÇÃO

A utilização de ligantes para sítios receptores benzodiazepínicos marcados com iodo radioativo em estudos de SPECT prevê a utilização do iodo-123, radioisótopo que reúne características físicas apropriadas para utilização diagnóstica, tais como monoemissão gama de baixa energia (159 keV), ausência de emissões particuladas e tempo de meia-vida físico de 13 horas, considerado relativamente curto. Tais características, em conjunto, possibilitam a aquisição de imagens de excelente resolução utilizando os sistemas detetores disponíveis e minimizam a dose de radiação absorvida pelo paciente (Adam, Wilbur, 2005; Kowalsky, Fallen, 2004; Saha, 1997).

Devido ao custo de produção deste radionuclídeo bem como o tempo de meia-vida físico relativamente curto, os estudos de marcação de ligantes em desenvolvimento são, geralmente, realizados com um outro radioisótopo de iodo, o iodo-131 (Kowalsky, Fallen, 2004; Grallert, Tavares, Bortoleti, 2003; Saha, 1997).

O iodo-131 foi usado quase exclusivamente, por duas décadas, para geração de imagem e quantificação da captação da glândula tireóide (Finn, 2003). Possui tempo de meia-vida físico de cerca de 8 dias, apresenta emissão *gama* principal detectável de 364 keV e possui emissão particulada do tipo *beta menos* associada com energia alta, de máximo de 660 keV. As propriedades nucleares deste radioisótopo o tornam útil para aplicações terapêuticas (Adam, Wilbur, 2005; Kowalsky, Fallen, 2004).

A emissão gama de 364 keV é relativamente alta para interação com os cristais de cintilação das câmaras-gama e sistemas colimadores mais usuais, apropriados para uso com radioisótopos de baixa energia. O tempo de meia-vida relativamente longo resulta em altas doses de radiação absorvida pelo paciente em comparação com o iodo-123. Fótons de alta energia (637, 722 keV) acompanham 12% das desintegrações e impedem, em parte, a resolução espacial e contraste dos processos de imagem (Adam, Wilbur, 2005; Kowalsky, Fallen, 2004; Lever, 1995).

As características físicas do iodo-131 não são as ideais para uso em estudos diagnósticos. Este radioisótopo, porém, é empregado rotineiramente na fase de investigação devido ao baixo custo comparado ao iodo-123.

O método escolhido para a marcação com radioiodo foi a substituição eletrofílica aromática direta e, prevalecendo-se do padrão de reatividade do anel aromático, esperava-se que a substituição ocorresse nas posições 6 e 8, com maior e menor intensidade, respectivamente, pelo radioiodo.

A substituição do radioiodo preferencialmente na posição 6 na flavona e análogos foi necessária para obtenção de ligantes com características antagonistas frente aos sítios receptores BZ no SNC, visto que relatos anteriores em literatura (Huang *et al.*, 2001; Marder *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 1997) confirmam a característica da substância 6-metil-flavona como antagonista destes sítios receptores. A substituição nesta posição, portanto, pelo átomo de iodo deve fornecer aos compostos o mesmo caráter antagonista verificado para a 6-metilflavona.

Considerando-se as características físico-químicas do iodo, sabe-se que este forma ligação covalente com o carbono. A eletronegatividade do iodo (2,66) e do carbono (2,55) são semelhantes na escala de Pauling, assim como a polarização das ligações carbono-iodo e carbono-carbono. O raio de van der Waals do iodo (2,15 Å) é próxima ao do grupamento metila (2,00 Å), assim, o iodo pode substituir este grupo alquila sem distorções excessivas do meio estereoeletrônico (Lever, 1995).

Por outro lado, a contribuição do iodo, $\pi_I = 1,12$ (Hansch, Leo, 1995) e de grupamentos alquila, $\pi_{CH_3} = 0,56$ (Hansch, Leo, 1995) na lipofilicidade de pequenas moléculas são bastante diferentes (Lever, 1995; Craig, 1971). A substituição de grupo metila ou etila por iodo promove grande aumento na lipofilicidade. A lipofilicidade relativa pode ser determinante crítico na atividade biológica, particularmente *in vivo*, e seu aumento pode ser favorável ou desfavorável para a interação dos compostos com seus sítios receptores.

Um outro fator relacionado à estereoquímica, também pode exercer grande influência para a atividade biológica, uma vez que a entrada do radioiodo em posição relacionada com a interação ao receptor pode acarretar mudanças na interação do radiotraçador com o receptor (Lever, 1995).

Existem várias metodologias para a radioiodação, entre elas, a troca isotópica, a substituição nucleofílica, a substituição eletrofílica aromática, a adição a duplas ligações, a desmetalização e a conjugação (Kowalsky, Fallen, 2004; Saha, 1997).

Com exceção de reações de substituições nucleofílicas que envolvem a substituição do I^- por um grupo de saída, como o $-Br$, a maioria das radioiodações envolve a substituição eletrofílica do íon I^+ por um átomo de hidrogênio de composto aromático rico em elétrons. A reação de substituição é facilitada pela presença de grupos doadores de elétrons (como $-OH$ ou $-NH_2$) no anel aromático. O grupo $p-OH$ na molécula de tirosina é um bom exemplo. A iodação direta de anticorpos ou proteínas ocorre por esse mecanismo, com substituição na tirosina. A reação geral de substituição está representada na figura 37, com o asterisco indicando o isótopo radioativo:

FIGURA 37: Mecanismo geral de substituição eletrofílica

Esse método de radioiodação envolve a utilização de agente oxidante para promover a oxidação do iodeto. Os agentes oxidantes mais utilizados são os clorados, como monoclóreto de iodo, cloramina T, lactoperoxidase, Iodogen, *Iodobeads* e o reagente de Bolton-Hunter, sendo que todos eles promovem a ligação covalente do iodo catiônico ao núcleo aromático (Lever, 1995; Kowalsky *et al*, 2004).

A radioiodação de anéis benzênicos pode ser considerada análoga a técnica de radioiodação em proteínas. Uma das técnicas mais utilizadas para a radioiodação de proteínas foi desenvolvida por Greenwood e col. (Greenwood, Hunter, Glover, 1992).

Esta emprega a cloramina T (sal sódico de N-clorotoluenosulfonamida) com agente oxidante do iodeto. A cloramina-T é um agente oxidante forte apresentando, portanto, como desvantagem, a exposição do composto a ser marcado às condições drásticas de oxidação, o que possibilita a ocorrência de reações indesejáveis como cloração, oxidação de grupos tiol, tioéster e quebra de ligação triptofanil de peptídeos. A técnica do *Iodobeads* é uma versão em fase sólida da técnica da cloramina T (Kowalsky, Fallen, 2004; Saha, 1997; Lever, 1995)

A cloramina T sofre hidrólise em faixa de pH 7-8, liberando hipoclorito de sódio que, por sua vez, oxida o radioiodo para ácido iodoso. Após o período de reação, adiciona-se um agente redutor, por exemplo, metabissulfito de sódio, para interromper a reação (Kowalsky, Fallen, 2004; Saha, 1997).

Esta técnica apresenta algumas vantagens, a saber: fácil execução, baixo custo, altos rendimentos de marcação e, como inconveniente, apresenta-se o fato da cloramina T ser um forte agente oxidante e exigir controle cuidadoso na marcação para não provocar danos ao composto a ser marcado (Lever, 1995).

Outro agente oxidante da família da cloramina T também empregado na radioiodação é o Iodogen (*1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenilglicoluril*). Comparada à cloramina T e ao monoclreto de iodo (ICI), esta técnica demonstrou-se similar quanto ao rendimento radioquímico, porém gera menores danos oxidativos. O Iodogen é insolúvel em água e pode ser utilizado como filme impregnado na parede do frasco de reação, permitindo a marcação com mínimo contato entre o composto orgânico e o agente oxidante (Kowalsky, Fallen, 2004; Wilbur, 1992)

A reação com Iodogen ocorre com a adição do composto tamponado e radioiodo ao tubo contendo este oxidante na forma de película, levando à oxidação do iodo pelo Iodogen presente e conseqüente substituição eletrofílica do iodo radioativo ao composto. O término da reação ocorre pela remoção do produto marcado do tubo de reação (Krummeich *et al*, 1996).

As preparações radiofarmacêuticas podem ser de diversos tipos, e para cada um existe um processo de controle de qualidade em função da sua própria natureza (Oliveira *et al.*, 2006; Kowalsky, Falen, 2004).

Entre os aspectos a serem considerados para o controle de qualidade dos radiotraçadores estão aqueles comuns a todos os fármacos, como ensaios da forma farmacêutica, físico-químicos (características físicas, pH e força iônica, isotonicidade para injetáveis, pureza química) e controle microbiológico (esterilidade, apirogenicidade) (Oliveira *et al.*, 2006; Kowalsky, Falen, 2004; Saha, 1997).

Além destes aspectos, devem ser considerados os ensaios específicos para radiotraçadores, que incluem parâmetros relacionados à natureza radioativa da preparação. Entre eles destacam-se os seguintes (Oliveira *et al.*, 2006; Kowalsky, Falen, 2004; Saha, 1997):

- Atividade total, que é a quantidade de isótopo radioativo existente no radiotraçador;
- Atividade específica, relacionada como a atividade por unidade de massa do composto marcado;
- Concentração radioativa, atividade por unidade de volume;
- Pureza radionuclídica, considerada como a porcentagem do radionuclídeo relativamente à atividade total presente na preparação;
- Pureza radioquímica, expressa pela porcentagem de atividade de um dado radionuclídeo na forma química de interesse, relativamente à atividade total.

As impurezas radioquímicas têm origem na decomposição do radiotraçador devido à ação do solvente, da temperatura, do pH, da luz, da presença de agentes oxidantes ou redutores e da radiólise. Estas podem aumentar a dose de radiação administrada ao paciente e interferir na qualidade das imagens geradas (Oliveira *et al.*, 2006; Kowalsky, Falen, 2004; Saha, 1997).

Em uma preparação radiofarmacêutica, as impurezas radioquímicas são determinadas por métodos analíticos como cromatografia, em papel ou em camada delgada, gel ou troca iônica, eletroforese ou extração com solventes e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Oliveira *et al.*, 2006; Farmacopéia Européia, 2005). A Farmacopéia Européia (2005) estipula que mais de 95% da atividade deverá corresponder à forma química desejada na preparação.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcação da flavona e análogos com radioiodo

Todos os procedimentos de marcação foram realizados em *glove box*, ambiente adequado para utilização de radiação e após cada marcação foram realizados os controles radioquímicos através de cromatografia em camada delgada instantânea (CCDI), em duplicata, utilizando-se mistura de solventes adequada, previamente definida levando-se em consideração o R_f da flavona não marcada e o R_f do iodeto (iodo livre) nesta mesma mistura.

Na tabela 12 apresentam-se os dados referentes à pureza radioquímica da flavona e análogos e na tabela 13 os dados referentes aos estudos de estabilidade dos compostos radiomarcados.

Tabela 12: Pureza radioquímica obtida para os compostos marcados com iodo-131 com atividade de 1,7 mCi cada (média $\pm$ desvio padrão, n=5)

Composto radiomarcado	Pureza Radioquímica (%)
Flavona-iodo*	99,3 $\pm$ 0,01
3'-NO ₂ -flavona-iodo*	98,5 $\pm$ 0,02
3'-F-flavona-iodo*	98,3 $\pm$ 0,01
4'-F-flavona-iodo*	97,1 $\pm$ 0,03

TABELA 13: Estabilidade dos compostos radiomarcados com iodo-131 com atividade de 1,7 mCi cada (média $\pm$ desvio padrão, n=5)

Análogo \ Tempo**			
	0	12	24
Flavona-iodo*	99,3 % $\pm$ 0,01	98,1 % $\pm$ 0,01	98,0 % $\pm$ 0,03
3'-NO ₂ -flavona-iodo*	98,5 % $\pm$ 0,02	98,0 % $\pm$ 0,02	97,5 % $\pm$ 0,05
3'-F-flavona-iodo*	98,3 % $\pm$ 0,01	98,2 % $\pm$ 0,01	97,5 % $\pm$ 0,02
4'-F-flavona-iodo*	97,1 % $\pm$ 0,03	95,0 % $\pm$ 0,01	94,1 % $\pm$ 0,03

*: Esses compostos foram marcados com iodo-131

** : Os valores correspondem a porcentagem de incorporação do radioiodo em função do tempo (horas)

Todos os flavonóides radiomarcados foram obtidos pelo método de substituição eletrofílica aromática direta, ocorrendo substituição de um hidrogênio de anel aromático, rico em elétrons, utilizando-se cloramina-T como agente oxidante, em tempo reacional relativamente curto (20 min) e com alta pureza radioquímica.

A flavona não-substituída foi marcada com iodo-131 e com iodo-123, enquanto seus análogos foram marcados somente com iodo-131. Vale salientar, no entanto, que a técnica de marcação desenvolvida com um isótopo específico de iodo pode ser aplicada a outro isótopo, analogamente, respeitando-se as mesmas condições reacionais utilizadas para o primeiro ensaio e considerada a atividade específica do isótopo.

Os compostos 6-iodo-131-flavona e a 6-iodo-123-flavona foram obtidos com rendimentos radioquímicos satisfatórios, em torno de 99%, e alta pureza radioquímica verificada por CCDI. A marcação da flavona tanto com Na^{131}I como com Na^{123}I envolveu o método de substituição eletrofílica aromática direta, utilizando-se cloramina-T como agente oxidante, e atividade de iodo-131 e de iodo-123 de 1,7 e 1,6 mCi, respectivamente. A reação envolvida na marcação da flavona e análogos está representada na figura 38:

FIGURA 38: Obtenção de 6-iodo-131-flavona ou análogos

Acrescenta-se que a posição de marcação, neste caso, é governada pelo perfil ativante e de substituição do anel aromático (March, 1985). A presença de substituintes fortemente doadores de elétrons no anel ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) favorecem reações rápidas e incorporação direta do radioiodo nas posições *orto* e *para*. Anéis aromáticos com grupos ativantes moderados ($-\text{OR}$, $-\text{NHCOR}$, $-\text{SR}$) podem ser facilmente marcados, dependendo das outras funcionalidades do anel. Grupos alquila simples são ativantes fracos e substituintes que retiram elétrons do anel aromático ($-\text{NO}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CONH}_2$) são desativantes e dificultam a radiomarcação (Lever, 1995).

Este tipo de substituição nos flavonóides não forneceu regioespecificidade de marcação, porém, este resultado já era esperado. A introdução do átomo de iodo na molécula a ser marcada pode favorecer o aporte cerebral pelo aumento na hidrofobicidade das moléculas, e mesmo existindo a presença de isômeros de posição, a molécula marcada com o átomo de iodo na posição 8 não interfere, de forma significativa, em termos de interação com o sítio receptor, conforme descrito por Marder e col. (2001) e outros trabalhos, em estudos de afinidade com diversos flavonóides substituídos na posição 8, frente a sítios receptores BZ, na procura por novo fármaco com afinidade ótima frente a estes sítios receptores. Estes autores descrevem a posição 8 como não significativa, em termos de interação com o receptor, se substituída por halogênios (Marder *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001).

Recentemente, Ono e col. (2005) descreveram a obtenção de flavonas radiomarcadas com iodo-125 e iodo-123 para visualização de placas β -amilóides no cérebro, responsáveis pelo diagnóstico precoce do Mal de Alzheimer. Estes autores realizaram a marcação regioespecífica da flavona e análogos na posição 6 do anel A do núcleo flavona, a partir do método de iododestanição, figura 39.

FIGURA 39: Marcação de derivado de flavona pelo método de iododestanição

O átomo de bromo presente na posição 6 do núcleo flavonóide foi substituído por tributilestanho, em presença de paládio, originando o derivado estanana. Este derivado foi tratado com iodo radioativo originando o flavonóide radiomarcado com pureza radioquímica na faixa entre 55-70% e rendimento radioquímico de 95%, após purificação em CLAE.

Os análogos 6-iodo-131-3'-NO₂-flavona e 6-iodo-131-3'-F-flavona obtidos neste trabalho apresentaram rendimentos radioquímicos superiores a 98,5%, os quais são considerados satisfatórios, assim como da própria flavona radiomarcada. O análogo 6-iodo-131-4'-F-flavona apresentou rendimento radioquímico ligeiramente inferior aos outros compostos, cerca de 97 %. Conseqüentemente, todos os análogos foram obtidos com alto grau de pureza radioquímica.

A diminuição gradativa no rendimento das marcações verificada para os análogos radiomarcados pode ter ocorrido em consequência da dificuldade de solubilização destes na mistura de co-solventes utilizada, resultado da variação na distribuição eletrônica gerada pela introdução de grupos substituintes à molécula. Assim, para solubilização eficiente dos análogos foi necessária agitação vigorosa, e para os análogos 3'-NO₂-flavona e 4'-F-flavona não foi possível a obtenção de dissolução total, como observado para a solução de flavona e 3'-F-flavona.

Em reações que envolvem esse tipo de substituição por radioiodo deve-se respeitar a ordem de adição dos reagentes, na tentativa de obter altos rendimentos de marcação. Assim, no caso dos flavonóides radiomarcados, a molécula a ser marcada foi solubilizada em solução salina e na mistura de co-solventes inerte, seguida do radioiodo (NaI) e do agente oxidante (1:2 - molar). Para interromper a reação adicionou-se metabissulfito de sódio.

Deve ser considerado também o pH da mistura reacional. O iodo na forma molecular (I₂) assume a estrutura (I⁻ - I⁺). O intermediário I⁺ não se mantém estável se formar complexos com espécies nucleofílicas em soluções aquosas. Dessa forma, a ocorrência das seguintes espécies é possível:

Em virtude da possibilidade da presença dessas espécies reativas no meio reacional deve-se atentar para o pK das moléculas e para o pH do meio de reação. Sob pH ácido os flavonóides estariam protonados e os rendimentos de marcação seriam baixos. O pH alcalino, entretanto, promove a hidrólise do I_2 conforme a reação descrita acima. Soluções apresentando pH 7-9, portanto, são as mais indicadas para estas reações de radiomarkação.

Os compostos flavona, 3'-NO₂-flavona e 3'-F-flavona apresentaram-se estáveis *in vitro* até pelo menos 24 horas após a marcação (98-97% de incorporação do radioiodo), armazenados em temperatura ambiente.

O análogo 4'-F-flavona apresentou cerca de 94 % de incorporação do radioiodo pelo menos até 24 horas após a marcação, sendo satisfatório para triagens em animais. Para utilização em humanos, entretanto, há a necessidade de purificação do composto marcado para retirada do iodo livre (I_2).

A flavona não-substituída foi marcada também utilizando-se Iodogen como agente oxidante, mas devido a insolubilidade do flavonóide no tubo de reação contendo o reagente, a pureza radioquímica encontrada foi de 75%, insatisfatória para triagens em animais sem a purificação prévia em CLAE.

A identificação dos compostos e a verificação da pureza radioquímica foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD). O sistema cromatográfico que apresentou melhor separação entre o iodo livre e a 6-iodo-131-flavona (ou 6-iodo-123-flavona) foi o que utilizou como solvente mistura hexano:acetato de etila (1:1). Neste eluente, a flavona marcada apresentou R_f de 0,1-0,2 enquanto o iodo livre (iodeto) apresentou R_f de 0,9-1,0.

Este sistema cromatográfico foi utilizado sem alterações para a identificação dos outros análogos. Estes, entretanto, apresentaram R_f entre 0,1 a 0,3 para os flavonóides radiomarcados enquanto o iodo livre (iodeto) apresentou o mesmo R_f verificado para a flavona marcada, entre 0,9 a 1,0.

3. CONCLUSÕES

Foram realizados neste trabalho o planejamento e desenvolvimento radioquímico de derivados flavonóides como radioligantes. Para tanto, as moléculas foram substituídas com radioiodo (iodo-131 e iodo-123) através do método de substituição eletrofílica aromática direta e foi determinada a pureza radioquímica dos compostos.

A pureza radioquímica envolvida na obtenção da flavona radiomarcada e análogos mostrou-se satisfatória e compatível com a continuidade dos testes para avaliação do perfil dos radioligantes *in vivo*, sem a necessidade de purificação dos ligantes em CLAE.

Diante desta avaliação, definem-se como parâmetros ótimos para marcação, a faixa de pH entre 7-8, o tempo de reação de 20 minutos e a concentração de flavonóides de 50 μmol .

A estabilidade *in vitro* acima de 97% para os compostos radiomarcados flavona, 3'-NO₂-flavona e 3'-F- flavona até 24 horas após a marcação são satisfatórios, assim como os 94% apresentado para o análogo 4'-F-flavona radiomarcado, e são compatíveis para utilização em triagens com animais de experimentação.

ESTUDOS BIOLÓGICOS

---

1. Introdução**2. Resultados e discussão**

2.1. Estudos de biodistribuição da flavona em camundongos *Swiss*

2.2. Estudos de imageamento cerebral em coelho *New Zeland*

2.3. Estudos de imageamento em ratos *Wistar*

3. Conclusões

1. INTRODUÇÃO

Como já discutido em sessões anteriores, o desenvolvimento de novos fármacos é processo longo e envolve altos custos. Normalmente leva-se de 13 a 15 anos para um fármaco novo ser introduzido no mercado (Lammertsma, 2004; DiMasi, Hansen, Grabowski, 2003). Salienta-se ainda, que o longo período de desenvolvimento não é garantia de sucesso (Mozley, 2005).

Muitos candidatos a fármacos fracassam nos últimos estágios, por exemplo, em estudos pré-clínicos com animais ou até mesmo nas fases 1 e 2 de estudos em humanos, em razão, na grande maioria das vezes, de suas propriedades farmacocinéticas. Similarmente, os radiotraçadores podem ser descartados do processo de desenvolvimento por mudanças na farmacocinética do fármaco ou molécula de partida, em virtude, por exemplo, da introdução do átomo radioativo na molécula original, que certamente resulta em alterações significativas nas propriedades físico-químicas da molécula original, com conseqüências importantes no perfil farmacocinético do radiofármaco relativamente ao fármaco de partida (Mozley, 2005; Kowalsky, Fallen, 2004).

Para que um radiotraçador em potencial não seja descartado do processo de desenvolvimento por razões equivocadas são necessárias ferramentas que possibilitem a medida adequada do comportamento do radioligante *in vivo*, distinguindo entre o candidato a radiotraçador que não se mostra adequado ou entre falhas no estudo para testar o candidato a radiotraçador (Mozley, 2005).

Se o ligante age pela ligação a receptores específicos, por exemplo, deve-se determinar o grau de ocupação do receptor e o clareamento do tecido. A medida da radioatividade no plasma é utilizada rotineiramente como marcador do clareamento do tecido. Se, no entanto, o clareamento no plasma acontecer muito rápido, o ligante é frequentemente descartado, pois seria impraticável estabelecer um esquema posológico na prática médica (Lammertsma, 2004; Wong e Pomper, 2003).

Uma segunda razão para o fracasso de um candidato a radiotraçador é a ocorrência de efeitos colaterais durante a triagem clínica, pela utilização de doses que em triagem em animais de experimentação não apresentaram nenhuma ou mínima atividade farmacológica. Como essas doses são extrapoladas de triagem clínica utilizando-se animais, muitas vezes realizada com espécies diferentes, elas podem embutir erros consideráveis (Mozley, 2005; Kowalsky, Fallen, 2004). Assim, fica claro que a utilização de técnicas que permitam medidas da radioatividade *in vivo* presente nos tecidos é uma das ferramentas mais importantes nos programas de desenvolvimento de novos radiotraçadores.

Neste sentido, podem ser utilizados procedimentos invasivos ou não-invasivos. Entre os métodos invasivos incluem os ensaios de distribuição biológica, estudos de ligação ao receptor, de saturação do receptor, de autoradiografia *in vitro* e *ex-vivo*, de bloqueio farmacológico, e de metabólitos *in vivo*. Os procedimentos de imageamento representam o método não-invasivo de investigação do traçador *in vivo*.

O desenvolvimento de estudos cintilográficos em animais de pequeno porte são extremamente promissores (Blankenberg, 2004). Diversos trabalhos convergem para a afirmação da aplicabilidade técnica desses modelos (Mozley, 2005; Acton *et al.*, 2002). Frequentemente consegue-se obter resolução espacial menor que 5 mm (Weber, Ivanovic, 1999) e em alguns sistemas já estão disponíveis resoluções de até 1 mm (Wirrwar *et al.*, 2001)). As câmaras gama existentes podem ser adaptadas de forma econômica a sistemas computacionais disponíveis comercialmente e apresentar campo de visão pequeno, com alta resolução, utilizando-se colimadores do tipo *pin hole* que são comuns em imageamento em pediatria e em exames da glândula tireóide, tornando as imagens cintilográficas com pequenos animais absolutamente confiáveis (Mozler, 2005).

A realização de imagens em medicina nuclear fornece informações baseadas na distribuição da radioatividade no organismo. Os procedimentos podem ser dinâmicos ou estáticos. Os estudos dinâmicos fornecem informações funcionais pela quantificação da razão da acumulação e excreção do radiotraçador pelo organismo. Os estudos estáticos, por sua vez, fornecem informações morfológicas sobre o tamanho, forma e posição dos órgãos, presença e extensão de lesões e, em alguns casos, função relativa ao órgão ou tecido (Kowalsky, Falen, 2004; Wagoner, 2000).

Neste trabalho, os experimentos com animais foram desenvolvidos com autorização e está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob protocolo de número 40 e ofício CEEa 28/2004, constante no *Anexo 1* desta tese.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DA FLAVONA EM CAMUNDONGOS SWISS

Os estudos de distribuição biológica indicaram que os tecidos com maior captação foram pulmões ($3,58 \pm 0,59$ %D/g, 5 min), rins ($3,16 \pm 0,39$ %D/g, 5 min), sangue ($4,27 \pm 1,07$ %D/g, 60 min), baço ($2,07 \pm 0,42$ %D/g, 5 min), fígado ($3,03 \pm 0,68$ %D/g, 60 min) e coração ($1,97 \pm 0,39$ %D/g, 5 min). Já os tecidos com menor captação foram cérebro ($0,40 \pm 0,05$ %D/g, 5 min) e glândulas suprarrenais ($0,27 \pm 0,19$ %D/g, 5 min) (tabela 15).

A tabela 14 relaciona a distribuição biológica verificada nos tecidos de interesse após a injeção intravenosa de 6-iodo-131-flavona e sacrifício dos animais nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60 minutos e 24 horas, com ênfase para a captação cerebral, expressas em percentual da dose administrada em relação ao tecido (cpm/g). Os resultados são expressos pela média das contagens obtidas com a utilização de pelo menos 4 animais para cada tempo analisado.

TABELA 14: Captação no tecido cerebral de 6-iodo-131-flavona em camundongos Swiss

Tempo	n	Tecido cerebral*
5 min	4	0,40 ± 0,06
10 min	4	0,23 ± 0,05
15 min	4	0,21 ± 0,05
30 min	3	0,18 ± 0,01
60 min	3	0,15 ± 0,01
24 h	4	0,08 ± 0,02

*: % dose/g (média ± desvio) n=5

Como pode ser notado na tabela acima, o radioligante apresentou máximo de captação cerebral em 5 minutos da injeção, na ordem de 0,40 %, da dose administrada. A taxa de captação decai pela metade em 10 minutos e permanece relativamente estável durante 30 minutos, figura 40, e aumenta a velocidade de eliminação a partir de 1 hora da injeção, figura 41.

Estudos de biodistribuição fornecem informações críticas a respeito da captação cerebral. Geralmente, um composto apresentando difusão passiva pela BHE com valor logP entre 2 e 3 deveria ter início de captação cerebral por volta de 2 a 3 minutos após a injeção, e captação em torno de 2-3% considerando todo o cérebro. Estes valores foram definidos considerando-se ratos como modelo animal (Ono *et al*, 2005).

Neste trabalho utilizou-se camundongos como modelo animal, porque esse modelo apresenta mais semelhança com o modelo em humanos que o encontrado em ratos, uma vez que os ratos não possuem vesícula biliar e, assim, o metabolismo destes é diferente do metabolismo encontrado em humanos. Além disso, o trabalho experimental com camundongos é facilitado em virtude do tamanho dos animais e da facilidade de administração do radioligante, se comparado aos ratos.

A flavona radiomarcada apresenta alta lipofilicidade, apresentando ClogP 4,3, calculado pelo programa ChemOffice® Ultra (CambridgeSoft), com expectativa de alto nível de captação cerebral. Em nossos experimentos encontrou-se 0,40 % D/g de captação até 5 min após a injeção do radioligante, indicando nível excelente de radioatividade para geração de imagens, apresentando pico de captação com tempo adequado para realização/geração de imagens úteis para diagnóstico. Além disso, apresentou rápido clareamento cerebral, figura 40.

OBS: % dose/g (média +/- desvio) n=5

FIGURA 40: Porcentagem de atividade da flavona marcada com iodo-131 acumulada no tecido cerebral de camundongos *Swiss*

A figura 40 mostra a cinética de captação da flavona radiomarcada, com pico de captação em 5 minutos. Esta cinética é considerada rápida e pode ser comparada à cinética do radioligante ^{18}F -FFMZ (^{18}F -fluoroflumazenil), apresentado em trabalho de Mitterhauser e col. (2004).

Katsifis e col (1999) encontraram resultados de concentração cerebral variando de 0,67 a 0,35 % D/g após 5 minutos da injeção em ratos, para o radiotraçador iomazenil-iodo-123, o qual apresenta cinética favorável de captação. Por outro lado, este traçador apresenta clareamento no cérebro desfavorável, mantendo a concentração de somente $0,03 \pm 0,002$ % D/g de captação cerebral em 30 minutos.

Na tabela 15 encontram-se os resultados do ensaio de biodistribuição para todos os órgãos de interesse, realizado com a flavona marcada com iodo-131.

TABELA 15: Biodistribuição de ^{131}I -6-flavona em camundongos Swiss
expresso como % dose/g (média $\pm$ desvio) n=5

Tecido	5min	10 min	15 min	30 min	60 min	24 horas
Cérebro	0,40 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
Pulmão	3,58 $\pm$ 0,59	1,97 $\pm$ 0,25	1,97 $\pm$ 0,25	1,98 $\pm$ 0,68	1,18 $\pm$ 0,04	1,98 $\pm$ 0,67
Coração	1,97 $\pm$ 0,39	1,42 $\pm$ 0,20	0,98 $\pm$ 0,20	1,08 $\pm$ 0,21	0,7 $\pm$ 0,69	0,06 $\pm$ 0,02
Baço	2,07 $\pm$ 0,42	1,10 $\pm$ 0,79	1,13 $\pm$ 0,68	1,33 $\pm$ 0,69	0,5 $\pm$ 0,18	0,04 $\pm$ 0,03
Fígado	1,97 $\pm$ 0,24	1,25 $\pm$ 0,20	1,14 $\pm$ 0,48	1,46 $\pm$ 0,40	3,03 $\pm$ 0,68	0,26 $\pm$ 0,02
Estômago	7,51 $\pm$ 2,12	7,95 $\pm$ 2,51	16,41 $\pm$ 4,22	16,21 $\pm$ 7,94	8,65 $\pm$ 7,39	0,33 $\pm$ 0,02
Músculo	0,57 $\pm$ 0,30	0,39 $\pm$ 0,10	0,64 $\pm$ 0,45	2,21 $\pm$ 0,05	-	0,08 $\pm$ 0,02
Rins	3,16 $\pm$ 0,39	1,78 $\pm$ 0,32	2,00 $\pm$ 0,42	1,69 $\pm$ 0,16	0,9 $\pm$ 0,14	0,19 $\pm$ 0,07
I. delgado	1,71 $\pm$ 0,21	1,22 $\pm$ 0,13	1,33 $\pm$ 0,61	1,18 $\pm$ 0,27	15,21 $\pm$ 9,6	0,16 $\pm$ 0,02
I. grosso	1,09 $\pm$ 0,20	0,76 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,38	0,80 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,11	0,16 $\pm$ 0,03
Adrenais	0,27 $\pm$ 0,19	-	-	-	0,71 $\pm$ 0,30	0,11 $\pm$ 0,01
Pâncreas	0,89 $\pm$ 0,81	1,09 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,97	1,77 $\pm$ 0,33	0,71 $\pm$ 0,30	0,10 $\pm$ 0,02
Tireóide	0,77 $\pm$ 0,20	0,62 $\pm$ 0,22	0,93 $\pm$ 0,26	-	2,77 $\pm$ 1,16	9,19 $\pm$ 0,76
Sangue total	3,12 $\pm$ 0,32	1,82 $\pm$ 0,33	2,81 $\pm$ 0,59	2,69 $\pm$ 0,18	4,27 $\pm$ 1,07	0,18 $\pm$ 0,08

O aumento na captação no fígado em 60 min da injeção pode ter ocorrido em função do sistema microsomal hepático do citocromo P₄₅₀, responsável pelo metabolismo e excreção hepato-biliar. Os valores de captação para fígado encontrados neste trabalho estão compatíveis com os apresentados por Ono e col. (2005) para derivados de flavona radiomarcadas com ¹²⁵I.

A rota de eliminação da flavona radiomarcada, porém, é preferencialmente renal. Houve captação renal inicial moderada (máximo de $3,16 \pm 0,39$ % D/g, 5 min) e decrescente com o tempo, supondo-se que não houve decomposição significativa do radioligante ou de eventual metabólito.

A captação acentuada no estômago pode ser em função de esvaziamento gástrico inadequado, uma vez que os resultados obtidos estão extremamente elevados se comparados com os resultados obtidos por Ono e col. (2005) para flavonas radiomarcadas.

O clareamento sanguíneo encontrado foi adequado, figura 41, não apresentando captação significativa nos tempos estudados e os valores estão compatíveis com os encontrados em literatura (Ono *et al.*, 2005). Houve acumulação inicial do radioligante, com taxa de $3,12 \pm 0,32$ % D/g no tecido sanguíneo, decorrente da aplicação endovenosa até 5 minutos após a injeção, verificando-se, após esse tempo, declínio na acumulação sanguínea em decorrência da redistribuição para outros tecidos. A partir de 15 minutos verificou-se aumento na acumulação do radioligante no tecido sanguíneo, evidenciando os processos de biotransformação e excreção.

A estabilidade *in vivo* do composto marcado foi evidenciada pela captação não significativa na tireóide em tempos menores (até 1 hora) e captação moderada em 24 horas, uma vez que a captação na tireóide tem relação direta com a desalogenação deste, figura 42.

A captação de $9,19 \pm 0,76$ % D/g na tireóide em 24 horas pode ser resultante da ação do metabolismo, especificamente da enzima deiodinase. Comparativamente aos resultados de estabilidade encontrados *in vitro* para a flavona radiomarcada, de 98%, houve decréscimo significativo no resultado de estabilidade encontrado, de cerca de 91 %, indicativo de maior desalogenação *in vivo* que *in vitro*.

OBS: % dose/g (média ± desvio) n=5

FIGURA 41: Atividade da flavona marcada com iodo-131 administrada em camundongos *Swiss* acumulada no tecido sanguíneo, em função do tempo de administração

OBS: % dose/g (média ± desvio) n=5

FIGURA 42: Atividade da flavona marcada com iodo-131 administrada em camundongos *Swiss* acumulada na tireóide, em função do tempo de administração

Os estudos de distribuição biológica da flavona radiomarcada não demonstraram a existência de captação significativa do radioligante nos órgãos essenciais nem no sistema renal excretório, de onde uma quantidade considerável é preferencialmente eliminada em poucos minutos.

Em comparação com os resultados de biodistribuição cerebral (média de 0,19 % D/g e 1,09 - 4,1 % D/g) em ratos após 5 minutos da injeção, obtidos em estudos realizados por Katsifis e col. (2003), para o composto (S)-8-¹²³I-iodobretanezil e (R)-8-¹²³I-iodobretanezil respectivamente, os quais apresentaram clareamento cerebral relativamente lento, ainda com captação de 3% D/g após 6 horas da injeção, acredita-se que o ligante proposto neste trabalho apresenta perfil adequado para estudos de receptores cerebrais.

Acrescenta-se que os compostos obtidos neste trabalho são inéditos e, até o momento, desconhecem-se relatos em literatura da aplicação de flavonóides como radiofármacos para acesso a sítios receptores BZ. Portanto, devem ser considerados estudos subseqüentes, para comprovar se a captação cerebral da flavona radiomarcada ocorreu por processo meramente vascular, ou por processo de especificidade, como pode ser esperado com base em relatos de literatura que relacionam o desenvolvimento de diversos flavonóides como agonistas ou antagonistas potentes e seletivos, assim como agonistas parciais de sítios receptores benzodiazepínicos (Fernández *et al.*, 2005; Marder *et al.*, 2001; Huand *et al.*, 2001; Viola *et al.*, 2000; Dekermendjian *et al.*, 1999; Paladini *et al.*, 1998).

2.2. ESTUDOS DE IMAGEAMENTO CEREBRAL EM COELHO *NEW ZELAND*

Em continuidade aos estudos de investigação da viabilidade da flavona radiomarcada como radioligante, foram realizadas imagens dinâmicas em coelho, iniciando-se imediatamente após a injeção do radioligante no animal, focando a região cerebral, com atualização de imagem a cada 60 segundos e, posteriormente, ao término de 30 minutos, foram realizadas imagens estáticas para visualização da biodistribuição do radioligante em todo o corpo do animal e possivelmente o início da excreção. As imagens cintilográficas obtidas no estudo dinâmico apresentam-se na figura 43.

FIGURA 43: Imagens dinâmicas da cabeça do coelho evidenciando a captação cerebral durante 30 minutos com atualização de imagem a cada 60 segundos. Imagens realizadas em gama câmara analógica Siemens LEM+ portátil, 300.000 contagens/s com magnificação de 1,75 para a cabeça e com utilização de colimador paralelo.

Os resultados obtidos sugerem que a captação desse ligante no cérebro em tempos curtos (até 30 minutos) viabiliza a aquisição de imagens cintilográficas, como pode ser verificado na figura 43. Após 5 min da injeção pode ser notada concentração favorável do radioligante no cérebro, permanecendo durante 30 minutos.

As imagens tardias, figura 44, demonstram que o radioligante apresentou excreção a partir de 35 minutos sem se concentrar em tecidos específicos, característica importante para radiotracadores.

FIGURA 44: Imagens estáticas tardias em coelho (A) da cabeça evidenciando a captação cerebral após 35 minutos da injeção e (B) de corpo inteiro após 40 minutos da injeção, demonstrando alta concentração cerebral e início de clareamento do radioligante, indicado pela concentração em órgãos como rins e bexiga. Imagens realizadas com 300.000 contagens sem magnificação para o corpo inteiro e com utilização de colimador divergente.

Comparativamente ao ECD-Tc-99^m, principal agente utilizado na clínica médica nuclear brasileira para cintilografia de perfusão cerebral, a flavona-iodo-123 apresenta captação cerebral intensa e contornos cerebrais definidos, em cintilografia realizada em cérebro de coelho nas mesmas condições para ambos traçadores, figura 45.

FIGURA 45: Imagens cintilográficas em gama câmara analógica Siemens LEM+ portátil realizadas em coelho New Zeland enfatizando cérebro. Em (A) imagem cerebral utilizando como traçador flavona-iodo-123 e em (B) ECD-Tc99^m sendo 300.000 contagens com magnificação de 1,75 e com colimador paralelo.

2.3. ESTUDOS DE IMAGEAMENTO EM RATOS *WISTAR*

Para avaliação qualitativa do aporte cerebral dos análogos 3'-F-flavona, 3'-NO₂-flavona e 4'-F-flavona sintetizados neste trabalho foram realizados estudos de imageamento em cérebro de ratos, e os resultados encontram-se na figura 46.

Acrescenta-se que regiões com alta intensidade de captação aparecem com coloração intensa variando de laranja a vermelho e as áreas com menor intensidade de captação de radioatividade apresentam-se em coloração verde a azul.

FIGURA 46: Imagens cintilográficas estáticas tardias (60 min)* em câmara gama Nuclide™ realizadas em ratos *Wistar* enfatizando o cérebro. As imagens para os três análogos foram realizadas nas mesmas condições, sendo 295.000 contagens sem magnificação e colimador paralelo. Em (A) imagem cerebral utilizando como traçador 4'-F-flavona-iodo-131, em (B) imagem cerebral utilizando como traçador 3'-NO₂-flavona-iodo-131 e em (C) imagem cerebral utilizando como traçador 3'-F-flavona-iodo-131. *: A imagem tardia do ligante 3'-NO₂-flavona-iodo-131 foi realizada 72 min após a injeção.

Com base na imagem cerebral da flavona radiomarcada, supõem-se que os compostos apresentam lipofilicidade ótima para atravessar a BHE e permanecer na região cerebral tempo suficiente para a aquisição de imagens. Todos os compostos da série penetraram a BHE, reflexo de seus altos valores de coeficiente de partição.

Comparativamente, aos seus análogos, o composto 4'-F-flavona radiomarcado, figura 46-A, não se concentra de forma efetiva no tecido cerebral, situação evidenciada pela imagem estática apresentando fraca intensidade de coloração laranja concentrada na região do cérebro. Além disso, a radioatividade se distribuiu por toda a cabeça do animal.

O análogo 3'-NO₂-flavona, figura 46-B, como esperado, atravessou a BHE e penetrou o tecido cerebral, apresentando concentração adequada na região do cérebro do rato. Mesmo após 72 minutos após a injeção pode ser verificada presença do traçador no tecido.

Uma particularidade desse análogo é sua característica física coloidal, o que resultou em alta captação no fígado durante todo o intervalo de captação de imagens (dados não apresentados).

O análogo 3'-F-flavona radiomarcado apresentou captação intensa no tecido cerebral evidenciado pela imagem estática, figura 46-C, com forte contraste vermelho no centro do órgão.

Baseando-se nos resultados dos ensaios cintilográficos é possível avaliar qualitativamente a influência dos substituintes introduzidos no anel B do núcleo da flavona sob o ponto-de-vista do aporte cerebral, e supor possível afinidade destes compostos pelos sítios receptores BZ. Para tanto, devem ser considerados os seguintes dados, tabela16:

TABELA 16: Valores de σ de Hammett, π de Hansch e ClogP* dos grupos substituintes

Substituinte	σ_I	σ_R	σ_p	σ_m	π	ClogP*
H	0	0	0	0	0	4,6
NO ₂	0,64	0,14	0,78	0,71	-0,28	4,3
F	0,52	-0,46	0,06	0,34	0,14	4,7

*: ClogP calculado pelo Programa ChemOffice® Ultra

A hidrofobicidade de um fármaco, ou de um radiotraçador, é reconhecidamente, a determinante da extensão e velocidade de sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção, assim como contribui para a sua capacidade de ligação ao receptor (Tavares, 2004; Wermuth, 2000).

Especificamente, substituições de átomos de hidrogênio por halogênios (neste caso em posições *meta* ou *para*) apresentam correlação direta entre a atividade biológica e o parâmetro físico-químico relacionado à hidrofobicidade, o coeficiente de partição (Wermuth, 2000).

Neste trabalho, observou-se que ambos os análogos, *meta* ou *para* substituídos, têm capacidade para atravessar a BHE e alcançar o cérebro, resultado do coeficiente de partição, ClogP, tabela 16, dessas espécies, que possuem hidrofobicidade adequada para tal.

Todos os compostos atendem ao princípio de solubilidade e permeabilidade que determina a passagem de compostos bioativos através da BHE, postulada por Lipinski e col. (2001), conhecido por “Regra dos 5” (*Rule of 5*). Com base neste princípio, para um composto formulado para administração oral, o que causa baixa permeabilidade ou absorção no SNC são os seguintes aspectos:

- presença de mais de cinco sítios doadores de hidrogênio no ligante;
- ligante com mais de 10 sítios aceptores de hidrogênio;
- peso molecular acima de 500;
- valor de logP (ou ClogP) maior que 5;

Sendo que esse mesmo princípio pode ser aplicado para compostos que se apresentem em outras formas farmacêuticas, com grande probabilidade de sucesso (Lipinski *et al.*, 2001).

O análogo 3'-NO₂ substituído também acessa o tecido cerebral como reflexo de hidrofobicidade (ClogP= 4,3). Kanhberg e col. (2002), em estudos de QSAR, encontraram excelentes correlações entre os valores de π de Hansch (parâmetro de hidrofobicidade) e a constante de afinidade, log*K_i*, resultando na seguinte equação:

$$\text{Log}k_i = -0,960\pi + 1,984, R^2 = 0,97$$

Estes autores relataram estas correlações especificamente para os compostos que apresentavam substituintes pequenos na posição 3' do núcleo da flavona, sendo os análogos mais ativos os que possuíam como substituintes -NO₂, -CH₃ ou -Br.

Estes resultados indicaram que a alta afinidade destes compostos pelos sítios receptores BZ pode ser entendida em termos de transferência favorável da fase aquosa para a fase do receptor, com propriedades semelhantes as do 1-octanol. Adicionalmente, estes autores verificaram que a 6-metil-3'-nitro-flavona apresentou-se 30 vezes mais ativa que o predito pela equação de regressão ($K_i = 5,6$ nM), indicando que possam ocorrer interações adicionais, como p. ex. interações de hidrogênio, favorecidas pela presença do substituinte fortemente polar.

A presença de ambiente favorável para interações de hidrogênio próximo a região 3' é suportada, também, pelos mapas topológicos de MEP apresentados anteriormente (figuras 25-B a 28-B) e pelos mapas de sítios de potenciais eletrostáticos, obtidos por método semi-empírico AM1, figura 47.

* Mapas 3D em modelo tubo: Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); I (laranja); O (vermelho); F (verde); N (azul), demonstrados em isosuperfície de 0,002 eV para a visão frontal do flavonóide radiomarcado. Escala de cor nível 11: vermelha -65.000 até azul 41.000 Kcal/mol.

FIGURA 47: Representação tri-dimensional dos modelos dos flavonóides calculados por AM1

Os mapas de potenciais eletrostáticos na figura 47 evidenciam áreas com concentração acentuada de elétrons em torno do oxigênio carbonílico em todas as moléculas. Além de apresentar concentração eletrônica, também nas quatro moléculas, em torno do oxigênio etéreo. Observam-se sítios de potencial eletrostático em torno dos átomos de flúor, tanto para o átomo presente em posição *meta* quanto para o átomo presente em posição *para*. A região que apresenta maior concentração de elétrons é a próxima ao grupo -NO_2 , no análogo 3'- NO_2 substituído, em razão de sua característica fortemente aceptora de elétrons.

Analizando cuidadosamente as imagens cintilográficas obtidas (figura 46) não podem ser ignoradas as diferenças obtidas no perfil de captação apresentados pelos análogos 3'-F e 4'-F substituídos. Em discussões anteriores, esclareceu-se a importância que o átomo de flúor substituído na posição 3', *meta*, no anel C do núcleo flavona apresenta para a afinidade de ligação por sítios receptores BZ, principalmente quando comparado com o análogo substituído na posição 4', *para*, do mesmo anel do núcleo da flavona.

Devem-se considerar, ademais, as características particulares do flúor como substituinte, que certamente são importantes para a atividade biológica, uma vez que influenciam o equilíbrio ácido-base, interações por ligação de hidrogênio, a lipofilicidade, entre outras propriedades, afetando diretamente a absorção e distribuição dos compostos (Smart, 2001; Kubinyi, 1993).

As particularidades do flúor, combinação única de características físicas, o diferem dos outros átomos de halogênio e originam efeitos próprios, alguns deles relacionados a seguir (Smart, 2001):

- apresenta alta eletronegatividade;
- tamanho molecular relativamente pequeno;
- apresenta baixa polarizabilidade;

- apresenta pequeno raio de van der Waals, implicando em maior proximidade dos elétrons com o núcleo do átomo, diminuindo a possibilidade de compartilhamento eletrônico com outras moléculas.

O parâmetro σ de Hammett (Hammett, 1937), responsáveis pela predição de efeitos eletrônicos, para o átomo de flúor, estão listados na tabela 16. Não surpreende que este átomo apresente característica aceptora de elétrons por efeito indutivo, em função da extrema eletronegatividade do átomo de flúor, enquanto apresenta efeito mesomérico, doando elétrons por ressonância ao anel benzênico, fator atribuído ao único par de elétrons do flúor que pode ser compartilhado. Assim, o grupamento flúor sempre será fortemente acceptor de elétrons por efeito indutivo e fortemente doador de elétrons por efeito de ressonância (Smart, 2001; Yagupolskii, Yagupolskii, 1995; Arnaud, Subra, 1990).

Nesse caso, o análogo substituído pelo átomo de flúor em posição *para*, 4'-F-flavona, apresenta predominantemente efeito mesomérico, aumentando a lipofilicidade da molécula, pois não favorece a formação de pólos, sugerindo maior inespecificidade frente a marcação de tecido cerebral, comparada ao análogo 3'-F-flavona, cujo átomo de flúor substituído em posição *meta*, exerce predominantemente efeito indutivo, favorecendo a formação de pólos e a interação do análogo com os resíduos de aminoácidos dos sítios receptores BZ.

Assim, o maior contraste observado nos ensaios cintilográficos para a acumulação cerebral do análogo 3'-F-flavona pode ser explicado em função de propriedades físico-químicas favoráveis para acesso ao tecido cerebral, incluindo efeitos eletrônicos que possam interferir em termos de afinidade frente aos sítios receptores e lipofilicidade adequada para aporte cerebral, favorecendo a concentração no órgão em estudo.

3. CONCLUSÕES

A flavona radiomarcada apresentou máximo de captação cerebral, após 5 minutos da administração em camundongos *Swiss*, de 0,40% %D/g. A taxa de captação cerebral permaneceu em níveis adequados até 30 minutos após a injeção, viabilizando a captação de imagens cintilográficas. A captação em órgãos como pulmão, coração, fígado e tireóide não apresentaram níveis significativos.

A excreção do radioligante parece ocorrer pelas duas vias de eliminação, urinária e fecal. Na primeira hora, provavelmente na forma de iodeto (iodo-131) derivado da desalogenação do composto radiomarcado e das impurezas presentes na solução administrada. Esse mecanismo corrobora, de certa forma, com a cinética do radionuclídeo.

Os análogos 3'-NO₂-flavona e 3'-F-flavona apresentam especificidade aparente pelo tecido cerebral, enquanto o análogo 4'-F-flavona apresenta capacidade para atravessar a BHE porém manteve-se difuso por toda a cabeça do animal. Para os análogos 3'-NO₂-flavona e 3'-F-flavona são necessários estudos de biodistribuição para identificar qual apresenta o melhor perfil de captação cerebral, além da análise de distribuição sistêmica associada.

CONCLUSÕES FINAIS

Em razão da estrutura apresentada nesta tese, todas as conclusões cabíveis já foram relacionadas em seus respectivos capítulos. Serão apresentadas a seguir uma compilação das conclusões apresentadas anteriormente.

A partir dos experimentos de otimização de geometria estrutural realizada neste trabalho foi observada a ocorrência de estrutura praticamente planar para os quatro compostos da série. Esta planaridade é de fundamental importância para a interação destes compostos com os sítios receptores BZ.

A partir da análise dos dados obtidos para o cálculo de cargas conclui-se que a molécula de flavona é passível de sofrer substituição eletrofílica por radioiodo nas posições 6 em maior proporção e, provavelmente, em menor proporção na posição 8. O resultado está em concordância com o padrão de substituição esperado em reações de substituição eletrofílica. Analogamente à molécula de flavona, os derivados propostos provavelmente serão passíveis de substituição eletrofílica nas mesmas posições.

A análise dos mapas de MEP forneceu informações acerca das propriedades eletrônicas de interesse da série estudada face aos sítios receptores BZ e está de acordo com dados de literatura, os quais descrevem o derivado 3'-NO₂ substituído apresentando conjunto favorável de características para interação com esses sítios receptores.

Além disso, as informações obtidas sugerem que os efeitos eletrônicos de grupos substituintes na posição 3' possam interferir de forma favorável na ligação entre ligante-receptor.

Os flavonóides planejados neste trabalho foram sintetizados de acordo com os procedimentos descritos em literatura. Os rendimentos encontrados foram satisfatórios e também compatíveis com os encontrados em literatura.

Os compostos foram devidamente identificados e caracterizados pela leitura de espectros de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C. Todos os compostos correspondem às estruturas planejadas. Obteve-se alto grau de pureza para os quatro compostos comprovados pela determinação da faixa de fusão.

Foram realizados neste trabalho o planejamento e desenvolvimento radioquímico de derivados flavonóides como radioligantes. Para tanto, as moléculas foram substituídas com radioiodo (iodo-131 e iodo-123) através do método de substituição eletrofílica aromática direta e foi determinada a pureza radioquímica dos compostos.

A pureza radioquímica envolvida na obtenção da flavona radiomarcada e análogos mostrou-se satisfatória e compatível com a continuidade dos testes para avaliação do perfil dos radioligantes *in vivo*, sem a necessidade de purificação dos ligantes em CLAE.

Diante desta avaliação, definem-se como parâmetros ótimos para marcação, a faixa de pH entre 7-8, o tempo de reação de 20 minutos e a concentração de flavonóides de 50 µmol.

A estabilidade *in vitro* acima de 97% para os compostos radiomarcados flavona, 3'-NO₂-flavona e 3'-F- flavona até 24 horas após a marcação são satisfatórios, assim como os 94% apresentado para o análogo 4'-F-flavona radiomarcado, e são compatíveis para utilização em triagens com animais de experimentação.

A flavona radiomarcada apresentou máximo de captação cerebral, após 5 minutos da administração em camundongos *Swiss*, de 0,40% %D/g. A taxa de captação cerebral permaneceu em níveis adequados até 30 minutos após a injeção, viabilizando a captação de imagens cintilográficas. A captação em órgãos como pulmão, coração, fígado e tireóide não apresentaram níveis significativos.

A excreção do radioligante parece ocorrer pelas duas vias de eliminação, urinária e fecal. Na primeira hora, provavelmente na forma de iodeto (iodo-131) derivado da desalogenação do composto radiomarcado e das impurezas presentes na solução administrada. Esse mecanismo corrobora, de certa forma, com a cinética do radionuclídeo.

Os análogos 3'-NO₂-flavona e 3'-F-flavona apresentam especificidade aparente pelo tecido cerebral, enquanto o análogo 4'-F-flavona apresenta capacidade para atravessar a BHE porém manteve-se difuso por toda a cabeça do animal. Para os análogos 3'-NO₂-flavona e 3'-F-flavona ainda são necessários estudos de biodistribuição para identificar qual apresenta o melhor perfil de captação cerebral, além da análise de distribuição sistêmica associada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. M.; BRANCO, P. S. Natural Product-Like Combinatorial Libraries. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, p. 675-712, 2003.
- ADAM, M. J.; WILBUR, D. S. Radiohalogens for imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, v. 34, p. 153-163, 2005.
- ADER, P.; WESSMANN, A.; WOLFRAM, S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetina in the pig. *Free Rad. Biol.Med.*, v. 28, p.1056-1067, 2000.
- ARAÚJO, E. B. Conjuntos de reativos liofilizados de compostos diaminoditiólicos para marcação com tecnécio-99m. Estudo farmacocinético e elaboração de modelos compartimentalizados dos respectivos complexos. São Paulo, 1995, p. 57-58 (Dissertação – IPEN/CNEM - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- ARES, J. J., OUTT, P. E., KAKODKAR, S. V., BUSS, R. C., GEIGER, J. C. A convenient large-scale synthesis of 5-methoxy flavone and its application to analog preparation. *J. Org. Chem.*, v. 58, p. 7903-7905, 1993.
- BAKER, W. Molecular rearrangement of some o-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones. *J. Chem. Soc.*, p. 1381, 1933.
- BALDWIN, R. M., LIN, T. H. Chlorination as a side reaction in radioiodination with chloramine-T. *J. Radioiod. Compoun.*, v.65, n. 1, p. 163-165, 1981.
- BARREIRO, E. J., RODRIGUES, C. R., ALBUQUERQUE, M. G., SANT'ANNA, C. M. R., ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Quím. Nova*, v. 20, n. 3, p. 300-303, 1997.
- BHATTACHARJEE, A. K. Electrostatic potential profiles may guide cation- π interaction in antimalarials chloroquine and mefloquine: an ab initio quantum chemical study. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v. 529, p. 191-203, 2000.
- BAULIEU J. L., GUILLOTEAU D. Les récepteurs des neurotransmetteurs. In: *Radiopharmaceutiques - chimie des radiotraceurs et applications biologiques*, Comet and Vidal, Presses Universitaires de Grenoble, p.575-591, 1998.

- BEER, H.F., BLÄUENSTEIN, P.A., HASLER, P.H., DELALOYE, B., RICCABONA G., BANGERL I., HUNKELER W., BONETTI E.P., PIERE L., RICHARDS J.G., SCHUBIGER P.A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of iodine-123-Ro 16-0154: a new imaging agent for SPECT investigations of benzodiazepine receptors. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 31, p.1007-1014, 1996.
- BECKER, C. F., GUIMARÃES, J. A., VERLI, H. Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carb. Res.*, v. 340, p. 1499- 1507, 2005.
- BLANKENBERG, F. G. Molecular imaging with single photon emission computed tomography. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, v. 4, p. 51-57, 2004.
- BOHÓRQUEZ S.M.S., LABAR D., LEVÊQUE P., BOL A., VOLDER A. G., MICHEL C., VERAART C. [11C] Flumazenil metabolite measurement in plasma is not necessary for accurate brain benzodiazepine receptor quantification. *Eur. J. Nucl. Med.*, Berlin, v. 27, p. 1674-1683, 2000.
- BOHMONT, C.; AARONSON, L. M.; MANN, K.; PARDINI, R. S. J. Inhibition of mitochondrial NADH oxidase, succinoxidase, and Atpase by naturally occurring flavonoids. *J. Nat. Products.*, v. 50, p. 427- 433, 1987.
- BOULTON, D. W.; KRISTINA, U.; WALLE, T. Extensive binding of bioflavonoid quercetina to human plasma proteins. *J. Pharmac. Pharmacol.*, v. 50, p. 243-249, 1998.
- BOURGUIGNON, M. H., PAUWELS, E. K. J., LOC'H, C., MAZIÈRE, B., Iodine-123 labelled radiopharmaceuticals and single-photon emission tomography: a natural liasion. *Eur. J. Nucl. Med.*, Berlin, v. 24, p. 331-344, 1997.
- BOVICELLI, P., BERNINI, R., ANTONIOLETTI, R., MINCIONE, E. Selective halogenation of flavanones. *Tetrah. Let.*, v. 43, p. 5563-5567, 2002.
- BREMNER, J. D., BALDWIN, R., HORTI, A., STAIB, L. H., NG, C. K., TAN, P.-Z., ZEA-PONCE, Y., ZOGHBI, S., SEIBYL, J. P., SOUFER, R., CHARNEY, D. S., INNIS, R. B. Quantitation of benzodiazepine receptor binding with PET [¹¹C]iomazenil and SPECT [¹²³I]iomazenil: preliminary results of a direct comparison in healthy human subjects. *Psych. Res. Neur.*, Berlin, v. 91, p. 79-91, 1999.

- BUSATO G. F, PILOWSKY L. S., COSTA D. C. C., ELL P.J., LINGGORD-HUGHES A., KERWIN R.W. In vivo imaging of GABAA receptors using sequential whole-volume iodine-123 iomazenil single-photon emission tomography *Eur. J. Nucl. Med.*, Berlin, v. 22, n.1, p.12-16, 1995.
- CAREY, F. A. Organic Chemistry. Mc-Graw-Hill Book Company, London, p. 1092-1094, 1997.
- CARVALHO, I., PUPO, M. T., BORGES, A. D. L., BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quím. Nova*, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.
- CARVALHO, M. G., ALVES, C. C. F., SILVA, K. G. S., EBERLIN, M. N., WERLE, A. A. Luxenchalcone, a New Bichalcone and other Constituents from *Luxemburgia octandra*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, p. 146-149, 2004.
- CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J. B.; BERETZ, A. *Plant flavonoids in biology and medicine*. II: biochemical cellular and medicinal properties, New York: Progress in Clinical and Biological Research, 1988.
- COLEMAN, R. L., TEMO J. Benzodiazepínicos. In: William & Wilkins, *Tratado de anestesia venosa*, Artmed, p. 91-105, 2001.
- CORNARD, J. P., BOUDET, A. C., MERLIN, J. C. Theoretical investigation of the molecular structure of the isoquercitrin molecule. *J. Mol. Struct.*, v. 508, p. 37-49, 1999.
- COSTA, D. C., OLIVEIRA, J. M. AP., BRESSAN, R. A. PET e SPECT em neurologia e psiquiatria: do básico às aplicações clínicas. *Ver. Brás. Psiquiatr.*, v. 23, p. 4-5, 2001.
- CRAIG, P. N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent group for correlation studies. *J. Med. Chem.* Washington. v.14. n 8., p. 680-684, 1971.
- CRAMER, C. J. *Essentials of computational chemistry. Theories and models*. Wiley-Interscience, 2002.
- CUSHNIE, T. P. T., HAMILTON, V. E. S., LAMB, A. J. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.*, v. 158, p. 281-289, 2003.

- DARGHAM A. A., GANDELMAN M., ZOGHBI S. S., LARUELLE M., BALDWIN R. M., RANDALL P., ZEA-PONCE Y., CHARNEY D. S., HOFFER P. B., INNIS R. B. Reproducibility of SPECT measurement of benzodiazepine receptors in human brain with iodine-123-iomazenil. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 36, n. 2, p. 167-175, 1995.
- DAVE, R.H., HOSANGADI, B.D. A simple and efficient diastereoselective Strecker synthesis of optically pure α -arylglicines. *Tetrahedron*, v.55, n. 37, p. 11295-11308, 1999.
- DEKERMENDJIAN, K., KAHNBERG, P., WITT, M.-R., STERNER, O., NIELSEN, M. LILJEFORS, T. Structure-Activity Relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA_A receptor complex. *J. Med. Chem.*, v. 42, p. 4343-4350, 1999.
- DEY, H. M., SEIBYL J. P., STUBBS J. B., ZOGHBI S. S., BALDWIN R. M., SMITH E. O., ZUBAL I.G.; ZEA-PONCE Y.; OLSON C.; CHARNEY D.S. Human biodistribution and dosimetry of the SPECT benzodiazepine receptor radioligand iodine-123-iomazenil. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 35, p. 399-404, 1994.
- DIMASI, J.A., HANSEN, R.W., GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.*, v. 22, p.151-185, 2003.
- ERKOÇ, F., ERKOÇ, S. Theoretical investigation of flavonoids naringenin and genistein. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v. 583, p. 163-167, 2002.
- ERTAN, M. Studies on the synthesis of some flavonoids derivatives possessing spasmolytic activity. *Arch. Pharm.*, v. 320, p. 1132-1138, 1987.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA, 5th Ed., Council of Europe. Strasbourg: EDQM, p.578, 2005.
- FERNÁNDEZ, S. P., WASOWSKI, C., PALADINI, A. C., MARDER, M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *Eur. J. Pharm.*, v. 512, p. 189-198, 2005.
- FOGED C. B., HALLDIN, C., HILTUNEN, J., BRAESTRUP C., THOMSEN C., HANSEN H. C., SUHARA T., PAULI S., SWAHN C., KARLSSON, P., LARSSON S., FARDE L. Development of 123I-labelled NNC 113-8241 as a radioligand for SPECT visualization of benzodiazepine receptor binding. *Nucl. Med. Biol.*, New York, v. 23, p. 201-209, 1996.

- FOYE, W. O., LEMKE, T. L., WILLIAMS, D.A. *Principles of Medicinal Chemistry*. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, p. 995.
- GALAN, V., TAVARES, L.C. Radiotraçadores cerebrais: propriedades, aplicações e relações estrutura-afinidade por receptores benzodiazepínicos. *Farm. Quím.*, p. 31-42, 2003.
- GALEAZZI, R., MARUCCHINI, C., ORENA, M., ZADRA, C. Stereoelectronic properties and activity of some imidazolinone herbicides: a computational approach. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v. 640, p. 191-200, 2003.
- GHAFOURIAN, T., DEARDEN, J. C. The use of molecular electrostatic potentials as hydrogen-bonding-donor parameters for QSAR studies. *II Farm.*, v.59, p.473-479, 2004.
- GRALLERT, S. R. M., TAVARES, L. C., BORTOLETI, E. A. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, v. 39, n.3, p. 243-257, 2003.
- GROCH M. W., ERWIN W. D. Single-photon emission computed tomography in the year 2001: instrumentation and quality control. *J. Nucl. Med. Technol.*, New York, v. 29, p. 9-15, 2001.
- GU, ZI-QIANG; COSTA, BRIAN DE R.; WONG, GARRY; RICE, KENNER C.; SKOLNICK, PHIL. Synthesis of [3H]tert-butyl 8-chloro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine 3-carboxylate, a selective, high affinity ligand for the diazepam insensitive (DI) subtype of the benzodiazepine receptor. *J. Labell. Comp. Radiop.*, v. 31, n. 12, 1049-1056, 1992.
- GUADAGNINI, P. H., BRUNS, R. E. Cargas atômicas em moléculas. *Quím. Nova*, v. 19, n.2, p.148-155, 1996.
- HANSCH, C., LEO, A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology, Wiley, New York, 1976. Apud: Kubinyi, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*. New York: VCH, p.35, 1995.
- HANSCH, C., SAMMES, P.G., TAYLOR, J.B. *Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds*. Oxford: Pergamon Press, 1990.

- HARRIS, D. L., LOEW, G. Development and assessment of a 3D pharmacophore for ligand recognition of BDZR/GABAA receptors initiating the anxiolytic response. *Bioorg. Med. Chem.*, v.8, p. 2527-2538, 2000.
- HATAZAWA J., SATOH T., SHIMOSEGAWA E., OKUDERA T., INUGAMI A., OGAWA T., FUJITA H., NOGUCHI, K., KANNO I, MIURA S. Evaluation of cerebral infarction with iodine 123- iomazenil SPECT *J. Nucl. Med.*, New York, v. 36, p. 2154-2161, 1995.
- HAVSTEEN, B. H. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. *Pharmac. Ther.*, v. 96, p. 67-202, 2002.
- HOBBS, W. R., RALL, T. W., VERDOORN, T. A. Hipnóticos e sedativos: etanol. In: GOODMAN GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica* , 9ª ed., McGraaw-Hill Interamericana Editores, p. 264-275, 1996.
- HUANG, X., LIU, T., GU, J., LUO, X., JI, R., CAO, Y., XUE, H., WONG, J. T.-F., WONG, B. L., PEI, G., JIANG, H., CHEN, K. 3D-QSAR model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA_A Receptors. *J. Med. Chem.*, v. 44, p. 1883-1891, 2001.
- HUEN, M. S. Y., LEUNG, J. W. C., NG, W., LUI, W. S., CHAN, M. N. S., WONG, J. T.-F., XUE, H. 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi, with selective antagonistic properties. *Biochem. Pharmac.*, v. 66, p. 125-132, 2003.
- ISHIBASHI M.; MATSUSHI T. YONEKURA Y.; YAMASHITA Y.; ABE T.; OHNISHI Y.; HAYABUCHI N. Decreased benzodiazepine receptor binding in Machado-Joseph disease. *J. Nucl. Med.*, New York, v.39, p. 1518-1520, 1998.
- ISHIKI, H. M., DONATE, P. M., GALEMBECK, S. E. Electronic structure of chromone and its hydroxylated derivatives on positions 2 and 3. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v. 423, p. 235-243, 1998.
- JAIN, P. K., MAKRANDI, J. K., GROVER, S. K. A facile Baker-Venkataraman synthesis of flavones using phase transfer catalysis. *Synthesis*, New York, v , p. 221-222, 1982.

- KALININ, A. V., SILVA, A. J. M., LOPES, C. C., LOPES, R. S. C., SNIECKUS, V. directed *ortho* metalation- cross coupling links. Carbamoyl rendition of the Baker-Venkataraman rearrangement. Regiospecific route to substituted 4-hydroxycoumarins. *Tetrah. Let.*, v. 39, p. 4995-4998, 1998.
- KAHNBERG, P., LAGER, E., ROSENBERG, C., SCHOUGAARD, J., CAMET, L., STERNER, O., NIELSEN, E. O., NIELSEN, M., LILJEFORS, T. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA_A receptor. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 4188-4201, 2002.
- KATSIFIS, A., KASSIOU, M. Development of radioligands for *in vivo* imaging of GABA_A-benzodiazepine receptors. *Mini-Reviews in Med. Chem.*, v. 4, p. 909-921, 2004.
- KATSIFIS, A., MARDON, K., MATTNER, F., LOC'H, C., MCPHEE, M.E., DIKIC, B., KASSIOU, M., RIDKEY, D. Pharmacological evaluation of (S)-8-[123I]iodobretanezil: a radioligand for *in vivo* studies of central benzodiazepine receptors. *Nucl. Med. Biol.*, v. 30, p. 191-198, 2003.
- KATSIFIS A, MARDON K., MCPHEE M., MATTNER F., DIKIC B., RIDLEY D. Synthesis and evaluation of [123I]labelled analogues of the partial inverse agonist Ro 15-4513 for the study of diazepam-insensitive benzodiazepine receptors. *Nucl. Med. Biol.*, New York, v. 26, p. 641-649, 1999.
- KATSIFIS, A., MATTNER, F., MCPHEE, M., KASSIOU, M., NAJDOVISKI, L., DIKIC, B. Synthesis of iodine-123 labelled analogues of the partial agonist (S) and (R)-bretazenil for the study of CNS benzodiazepine receptors using SPECT. *J. Lab. Comp. Radiopharm.*, v. 38, n. 9, p. 865-845, 1996.
- KORPI, E. R., GRÜNDER, G., LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog. Neurob.*, Oxford, n. 67, p. 113-159, 2002.
- KOWALSKY, J. R., FALEN, S. W. *Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine*. 2 ed., Ed. Nancy Tarleton Landis. Washington, 825 p., 2004.
- KUBINYI, HUGO. *Qsar: hansch analysis and related approaches*. New York. VCH. p 1-54, 1993.

- KUKICHI K., HASHIKAWA K., SEIKE Y., MORIWAKI H., OKU N., ISHIDA M., FUJITA M., UEHARA T., TANABE H., KUSUOKA H., NISHIMURA T. Comparison of iodine-123-iomazenil SPECT and technetium-99m-HMPAO_SPECT in Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 3, p. 467-470, 1997.
- KUIKKA J. T., HILTUNEN, J., FOGED C., BERGSTRÖN K A., HALLDIN C., AKERMAN K., TIHONEN J., FARDE L. Initial human studies with single-photon emission tomography using iodine-123 labelled 3-(5-cyclopropyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-7-iodo-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]-benzodiazepine (NNC 13-8241). *Eur. J. Nucl. Med.*, Berlin, v. 23, p. 798-803, 1996.
- LAMEIRA, J., ALVES, C. N., MOLINER, V., SILLA, E. A density functional study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Europ. J. Med. Chem.*, v. 41, p. 616-623, 2006.
- LAMMERTSMA, A. A. Role of human and animal PET studies in drug development.
- LEVER, J. R. Radioiodinated Compounds. In: WAGNER, J. H. N., SZABO, Z., BUCHANAN, J., editors. *Principles of nuclear medicine*. 2 ed., Philadelphia, PA: Saunders, p. 199-213, 1995.
- LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanc. Drug Del. Rev.*, v. 46, p. 3-26, 2001.
- LINUMA, M.; TSUCHIYA, H.; SATO, M.; YOKOYAMA, J.; OHYAMA, M.; OHKAWA, Y.; TANAKA, T.; FUJUWARA, S.; FUJII, T. Flavanones with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 46, p. 892-895, 1994.
- LUURTSEMA, G., LANGE, E. C. M., LAMMERTSMA, A. A., FRANSSEN, E. J. F. Transport across the blood-brain barrier: stereoselectivity and PET-tracers. *Mol. Imag. Biol.*, v. 6, n. 5, p. 306-318, 2004.
- LÖSCHER, W., POTSCHKA, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiol.*, v. 76, p. 22-76, 2005.
- MARCH, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structures*. 4 ed.. New York: John Wiley, 1992.

- MANNACH, C.; TEIXER, O.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; RÉGÉRAT, F.; DEMINGUÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparison of the bioavailability of quercetina and cathechin in rats. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 27, p.1259- 1266, 1999.
- MARDER, M., ESTIÚ, G., BLANCH, L. B., VIOLA, H., WASOWSKI, C., MEDINA, J. H., PALADINI, A. C. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivates with the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor complex. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 9, p. 323-335, 2001.
- MARDER, M., VIOLA, H., BACIGALUPPO, J. A., COLOMBO, M. I., WASOWSKI, C., WOLFMAN, C., MEDINA, J. H., RÚVEDA, E. A., PALADINI, A. C. Detection of benzodiazepine receptor ligands in small libraries of flavone derivates synthesized by solution phase combinatorial chemistry. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, v. 249, p. 481-485, 1998.
- MARDER, M., ZINCZUK, J., COLOMBO, M. I., WASOWSKI, C., VIOLA, H., WOLFMAN, C., MEDINA, J. H., RÚVEDA, E. A., PALADINI, A. C. Synthesis of halogenated/nitrated flavone derivates and evaluation of their affinity for the central benzodiazepine receptor. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, v. 7, n. 15, p. 2003-2008, 1997.
- MAVEL, S.; DIKIC, B.; PALAKAS, S.; EMOND, P.; GREGURIC, I.; GRACIA, A. G.; MATTNER, F.; GARRIGOS, M.; GUILLOTEAU, D.; KATSIFIS, A. Synthesis and biological evaluation of a series of flavone derivatives as potencial radioligands for imaging the multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1/MRP1), *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, p. 1599-1607, 2006.
- MAZIÈRE B. AND MAZIÈRE M. Where have we got to with neuroreceptor mapping of the human brain? *Eur. J. Nucl. Med.*, Berlin, v. 16, p. 817-835, 1990.
- MEDINA, J. H., VIOLA, H., WOLFMAN, C., MARDER, M., WASOWSKI, C., CALVO, D., PALADINI, A. C. Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem. Res.*, v. 22, n. 4, p. 419-423, 1997.
- MICKLE, T., NAIR, V. Correlation of anti-HIV activity with structure: use of electrostatic potencial and conformational analysis. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, v.9, p. 1963-1968, 1999.

- MITTERHAUSER, M., WADSAK, W., WABNEGGER, L., MIEN, L-K., TÖGEL, S., LANGER, O., SIEGHART, W., VIERSTEIN, H., KLETTER, K., DUDCZAK, R. Biological evaluation of 2'-[¹⁸F]fluoroflumazenil ([¹⁸F])FFMZ), a potencial GABA receptor ligand for PET. *Nucl. Med. Biol.*, v. 31, p. 291-295, 2004.
- MORRISON, R. T; BOYD, R. N. *Química orgânica*. 5 ed., New York: addison Wesley Iberoamericana, 1997.
- MORIWAKI H.; MATSUMOTO M.; HASHIKAWA K.; OKU N.; ISHIDA M.; SEIKE Y.; FUKUCHI K.; HORI M.; NISHIMURA T. Iodine-123-iomazenil and iodine 123-iodiamphetamine SPECT in major cerebral artery occlusive disease. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 39, p. 1348-1353, 1998.
- MOZLEY, P. D. Weaving single photon imaging into new drug development. *Mol. Imag. Biol.*, v. 7, p.30-36, 2005.
- ODANO I., ANEZAKI T., OHKUBO M., YONEKURA Y., ONISHI Y., INUZUKA T., TAKAHASHI M., TSUJI S. Decrease in benzodiazepine receptor binding in a patient with Angelman syndrome detected by iodine-123 iomazenil and single-photon emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med.*, Berlin, v. 23, p. 598-604, 1996.
- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Rer. Bras. Ciên. Farmac.*, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.
- ONISHI, Y., YONEKURA, Y., MUKAI, T., NISHIZAWA, S., TANAKA, F., OKAZAWA, H., ISHIZU, K., FUJITA, T., SHIBASAKI, H., KONISHI, J. Simple quantification of benzodiazepine receptor binding and ligand transport using iodine-123-iomazenil and two SPECT scans. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 36, p. 1201-1210, 1995.
- ONISHI, Y., YONEKURA, Y., NISHIZAWA, S., TANAKA, F., OKAZAWA, H., ISHIZU, K., FUJITA, T., KONISHI, J., MUKAI, T. Noninvasive quantification of iodine-123-iomazenil SPECT. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 37, p. 374-378, 1996.
- ONO, M.; YOSHIDA, N.; ISHIBASHI, K; HARATAKE, M.; ARANO, Y.; MORI, H.; NAKAYAMA, M. Radioiodinated flavones for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in the brain, *J. Med. Chem.*, v. 48, p. 7253-7260, 2005.

- PALADINI, A. C., MARDER, M., VIOLA, C., WOLFMAN, C., WASOWSKI, C., MEDINA, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 51, p. 519-526, 1998.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 2 ed., Forth Worth: Harcouth Brace College Publishers, 1996, 511p.
- PRASHAD, M., HAR, D., HU, B., KIM, H-Y., REPIC, O., BLACKLOCK, T.J. An efficient and practical N-methylation of amino acids derivatives. *Organic Letters*, v. 5, n.2, p. 125-128, 2003.
- PIKE, V. W., HALLDIN, C., CROUZEL, C., BARRÉ, L., NUTT, D. J., OSMAN, S., SHAH, F., TURTON, D. R., WATERS, S. L. Radioligands for PET studies of central benzodiazepine receptors and PK (Peripheral benzodiazepine) binding sites- Current status. *Nucl. Med. Biol.*, New York, v. 20, n. 4, p. 503-525, 1993.
- RAKIAS, F.; ZOLLE, I. *Handbook of quality control methods of 99m-Tc-radiopharmaceuticals in nuclear medicine*. COSTB3: WG-1, 1996.
- RASTELLI, G.; COSTANTINO, L.; ALBASINI, A. A model of the interaction of substrates and Inhibitors with xanthine oxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 119, p. 3007-3016, 1997.
- RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de Fármacos.
- ROSS, S. A., SEIBYL, J. P. Research applications of selected 123I-labeled neuroreceptor SPECT imaging ligands. *J. Nucl. Med. Technol.*, v. 32, n. 4, p. 209-214, 2004.
- SÀNCHEZ, P. Radiofármacos PET. *Rev. Esp. Med. Nuclear*, v. 20, n. 6, p. 477-498, 2001.
- SASAKI, M., YCHIYA, Y., KUWABARA, Y., YOSHIDA, T., FUKUMURA, T., MASUDA, K. Benzodiazepine receptors in chronic cerebrovascular disease: comparison with blood flow and metabolism. *J. Nucl. Med.*, New York, v. 38, p. 1693-1698, 1997.
- SCHLICKER, K., BOLLER, M., SCHIMDT, M. GABAC receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res. Bul.*, v. 30, p. 1-7, 2004.
- SCHMID, H., BANHOLZER, K. Nachweis der intramolekularen nature der *Baker-Venkataraman*-Umlagerung. *Helv. Chim. Acta*, v.37, n. 198, p. 1706-1713, 1954.

- SCHMIDT, M. E. The future of imaging in drug discovery. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 39, p. 45S-50S, 1999.
- SILVA, S. L., SILVA, A., HONÓRIO, K. M., MARANGONI, S., TOYAMA, M. H., SILVA, A. B. F. The influence of electronic, steric and hydrofobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v. 684, p. 1-7, 2004.
- SLIFSTEIN, M., LARUELLE, M. Models and methods for derivation of *in vivo* neuroreceptor parameters with PET and SPECT reversible radiotracers. *Nucl. Med. Biol.*, v. 28, p. 595-608, 2001.
- SMART, B.E. Fluorine substituent effects (on bioactivity), *J. Fluor. Chem.*, v. 109, p. 3-11, 2001.
- STAHL, S. M. Princípios da neurotransmissão química. In: *Psicofarmacologia- Base neurocientífica e aplicações práticas*, 2ª ed., Rio de Janeiro, Medsi, p.1-33, 2002.
- STAHL, S. M. Ansiolíticos e hipnóticos-sedativos. In: *Psicofarmacologia- Base neurocientífica e aplicações práticas*, 2ª ed., Rio de Janeiro, Medsi, p.289-324, 2002.
- TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch, *Quim. Nova*, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.
- TAVARES, L. C., FERREIRA, E., I. Relações Quantitativas Estrutura-Atividade - Fundamentos e Aplicações da Análise de Hansch. c. 8, p. 36-66. In: *Cyted, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo- Práticas de Química-Farmacéutica y Medicinal*. Ed. Prado, M. A. F., Barreiro, E., 2002.
- TRAPANI, G., FRANCO, M., LATROFA, A., CAROTTI, A., GENCHI, G., SERRA, M., BIGGIO, G., LISO, G. Synthesis and benzodiazepine receptor binding of some imidazo- and pyrimido[2,1-b]benzothiazoles. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 31, p. 575-587, 1996.
- TREVOR, A. J. Drogas Sedativo-Hipnóticas. In: BERTRAM, KATSUNG G. *Farmacologia Básica e Clínica*, 6ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 255-266, 1998.
- TRUEBA, G. P.; SANCHEZ, G. M. Los flavonóides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 20, p. 297-306, 2001.

- TURKINGTON, T. G. Introduction to PET instrumentation. *J. Nucl. Med. Technol.*, v.29, p. 1-8, 2001.
- VALENZUELA, A.; CAMPOS, R.; GARRIDO, A. Estudios sobre el mecanismo bioquímico de acción del flavonoide silybina: Relación con sus propiedades terapéuticas. *Arch. Biol. Med. Exp.*, v.21, p. 75-83, 1998.
- VERLI, H., BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Quím. Nova*, v. 28, n.1, p. 95-102, 2005.
- VIEGAS JR., C., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VIOLA H., MARDER M., WASOWSKI C., GIORGI O., PALADINI A. C., MEDINA J. 6, 3'-dibromoflavone and 6-nitro-3'-bromoflavone: new additions to the 6,3'-disubstituted flavone family of high-affinity ligands of the brain benzodiazepine binding site with agonistic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 273, p. 694-698, 2000.
- WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry. London: Academic Press, 768 p., 2000.
- WHITING, P. J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *D. Disc. Tod.*, v. 8, n. 10, p. 445-450, 2003.
- WONG, D. F.; POMPER, M. Predicting the success of a radiopharmaceutical for *in vivo* imaging of central nervous system neuroreceptor systems. *Mol. Imag. Biol.*, v. 5, n. 6, p. 350-362, 2003.
- WONG, D. F., BRASIC', J. R. In vivo imaging of neurotransmitter system in neuropsychiatry. *Cl. Neur. Res.*, v. 1, p. 35-45, 2001.
- WONG, D. F.; SKOLNICK, P. High affinity ligands for 'diazepam-insensitive' benzodiazepine receptors, *Eur. J. Pharmac.*, v. 225, p. 63-68, 1992.
- YOUNG, D. C. *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real-world problems*. Wiley-Interscience, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: *Farmacognosia da planta ao medicamento*. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. 5 ed., Ed. UFRGS, p. 577- 614, 2004.

ANEXO 1.

Certificação para realização de ensaios biológicos com animais aprovado pela *Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP* sob Ofício número 28/2004.

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas Comissão de Ética em Experimentação Animal
<i>CEEAA nº 28/2004</i>	
<u>CERTIFICADO</u>	
<i>Certificamos que o Projeto “Relações entre a estrutura química e a afinidade por receptores benzodiazepínicos de compostos análogos ao iomazenil” (Protocolo nº40), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Sibila Roberta Marques Grallert e do orientador(a) Leoberto Costa Tavares, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) desta Faculdade, em 02/08/2004.</i>	
<i>São Paulo, 03 de agosto de 2004.</i>	
 Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida Vice-Coordenador da CEEAA	
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 06508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 30913677 / Fax: (11) 3031-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br	

Sibila Roberta Marques Grallert

ANEXO 2.

1. Análise espectrométrica da flavona

1.1 Absorção na região do IV

* Dispersão em KBr

1.2 Espectro de RMN-¹H

* Solvente: Clorofórmio-d6/ Padrão de referência interna: TMS

1.3 Espectro de RMN- ^{13}C

* Solvente: Clorofórmio-d6/ Padrão de referência interna: TMS

2. Análise espectrométrica da 3'-NO₂-flavona

2.1 Absorção na região do IV

* Dispersão em KBr

2.2 Espectro de RMN-¹H

* Solvente: Clorofórmio-d₆/ Padrão de referência interna: TMS

2.3 Espectro de RMN-¹³C

* Solvente: Clorofórmio-d6/ Padrão de referência interna: TMS

3. Análise espectrométrica da 3'-F-flavona

3.1 Absorção na região do IV

* Dispersão em KBr

3.2 Espectro de RMN-¹H

* Solvente: Clorofórmio-d₆/ Padrão de referência interna: TMS

3.3 Espectro de RMN- ^{13}C

* Solvente: Clorofórmio-d6/ Padrão de referência interna: TMS

4. Análise espectrométrica da 4'-F-flavona

4.1 Absorção na região do IV

* Dispersão em KBr

4.2 Espectro de RMN-¹H

* Solvente: Clorofórmio-d6/ Padrão de referência interna: TMS