



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES ANSIOLÍTICAS DO COMPLEXO DE  
PALÁDIO(II) DERIVADO DO BROMAZEPAM**

Allysson Haide Queiroz da Silva

**Universidade Federal de Alagoas**

Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL

**Allysson Haide Queiroz da Silva**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ANSIOLÍTICAS DO COMPLEXO DE PALÁDIO(II) DERIVADO DO BROMAZEPAM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti

**Maceió – Alagoas  
2018**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

S586s Silva, Allysson Haide Queiroz da.  
Síntese, caracterização e avaliação das propriedades ansiolíticas do complexo de paládio(II) derivado do Bromazepam / Allysson Haide Queiroz da Silva. – 2019.  
89 f. : il.

Orientador: Mario Roberto Meneghetti.  
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografias: f. 75-85.  
Apêndices: f. 86-89.

1. Complexo de paládio(II). 2. Bromazepam. 3. Transtorno de ansiedade.  
I. Título.

CDU: 542.9:546.98



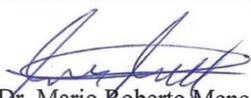
**PPGQB**  
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

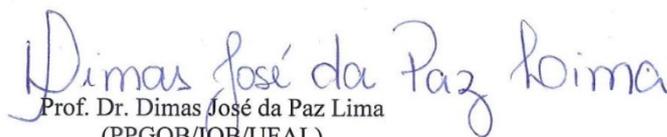


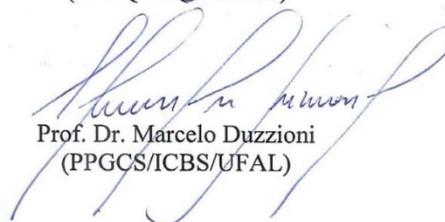
### FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **ALYSSON HAIDE QUEIROZ DA SILVA** intitulada: **“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANSIOLÍTICAS DE COMPLEXO DE PALÁDIO(II) DERIVADO DO BROMAZEPAM”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 31 de agosto de 2018, às 9:30h, na sala de aulas do PPGQB.

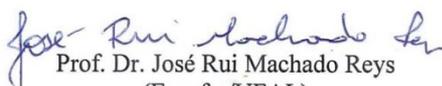
COMISSÃO JULGADORA:

  
Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti  
(Orientador - PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Marcelo Duzzioni  
(PPGCS/ICBS/UFAL)

  
Dra. Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia  
(ICBS/UFAL)

  
Prof. Dr. José Rui Machado Reys  
(Esenfar/UFAL)

## **Agradecimentos**

À Deus, Todo Poderoso, Manso, Misericordioso, que sempre me conduziu em todos os momentos deste sonho, sonhado primeiramente por ele.

À minha esposa, Ízala Soares, pelo total apoio durante esses anos e minha grande incentivadora.

Ao meu amadíssimo filho, Miguel Haide, tão pequeno e tão cheio de vida, definitivamente o maior presente na minha vida (na verdade, na nossa amor).

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti, inicialmente, pela oportunidade dada para me orientar, mas também e, não menos importante, pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. José Rui Machado Reys e à Profa. Dra. Ana Soraya, grandes amigos, que foram a ponte até o Prof. Mario.

Ao Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, do Laboratório Neurofarmacologia e Fisiologia Integrada da Universidade Federal de Alagoas (LNFI/UFAL), pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho por meio da avaliação da atividade ansiolítica do complexo sintetizado e por suas contribuições na Banca Examinadora de qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima do IQB/UFAL, pelas contribuições na Banca Examinadora de qualificação deste trabalho.

À Dra. Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia, colega de laboratório, que me ensinou muito do que foi feito neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson de Souza Bento e aos componentes do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFAL por contribuírem com a caracterização dos nossos complexos.

Ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (PPGQB/IQB/UFAL), pela oportunidade de realização do doutorado;

Aos professores do PPGQB/IQB/UFAL por contribuírem com minha formação acadêmica.

A todos que fizeram ou fazem parte do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) com quem tive o prazer de conviver, especialmente: Ábner, Anne Deyse, Daniele Barros, Rafael e Daniele Padilha.

A CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Os transtornos de ansiedade (TAs) configuram como um dos transtornos mentais mais comum, sendo caracterizados por uma ansiedade, que é uma condição psicológica fundamental a vida, patológica. Os TAs afetam negativamente a vida de um indivíduo e das pessoas com quem ele convive, trazendo prejuízos na execução das atividades do dia-a-dia e nos relacionamentos sociais. Mesmo existindo algumas classes de ansiolíticos na clínica, muito pacientes são recidivados ou não responsivos. Neste cenário suscitou o desenvolvimento deste trabalho que tem como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar as propriedades ansiolíticas do  $[[2-(7\text{-Bromo-2-oxo-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin-5-il)piridinil-}\kappa^2\text{-N,N}] \text{cloropaládio(II)}]$ ,  $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$ . Neste sentido, a síntese do complexo de paládio(II) derivado do bromazepam foi realizada com rendimento satisfatório, 75%. Para compreender a química do ligante, bem como do complexo obtido, foram utilizadas duas técnicas de caracterização, no qual o ligante e o complexo foram submetidos à análises por RMN de  $^{13}\text{C}$ , de  $^1\text{H}$  e HSQC. Além disso, o complexo também foi caracterizado pela técnica do infravermelho (IV) e por espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (CG-EM). Os resultados obtidos da RMN possibilitaram inferir que o complexo apresentou estrutura monomérica; o  $\text{N}_4$  e o  $\text{N}_{13}$  piridínico do ligante são os átomos que coordenam com o Pd(II). O IV possibilitou a detecção de frequências de estiramentos características do ligante encontradas também no complexo. Já a EM revelou os fragmentos referentes ao complexo. Em relação à atividade do tipo ansiolítica, foi observado que o complexo na menor dose ( $0,5 \mu\text{g/kg}$ ) apresentou uma redução significativa na ansiedade dos camundongos sujeitos ao teste do labirinto em cruz elevado em relação ao grupo controle (grupo salina), sem causar alteração da atividade locomotora, sendo que a análise da atividade motora também foi confirmada pelo teste do campo aberto. Da mesma forma, foi possível determinar que a ação ansiolítica do complexo acontece via receptor  $\text{GABA}_A$ , pois os animais que receberam pré-tratamento com flumazenil e foram tratados com o complexo não apresentaram atividade ansiolítica. Assim, o presente estudo demonstrou que o complexo  $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$  se mostrou promissor à ação ansiolítica, motivando assim aos que fazem parte do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) a buscar o melhor entendimento deste complexo e de prováveis análogos no tratamento dos transtornos de ansiedade.

**Palavras-chave:** Complexo de paládio(II). Bromazepam. Transtornos de Ansiedade.

## ABSTRACT

Anxiety disorders (ADs) constitute one of the most common mental disorders and are characterized by anxiety, which is a fundamental psychological condition of life, pathological. TAs negatively affect the life of an individual and of the people with whom he lives, damaging the performance of everyday activities and social relationships. Even though there are some classes of anxiolytics in the clinic, many patients are relapsed or nonresponsive. In this scenario, the aim of this work was to synthesize, characterize and evaluate the anxiolytic properties of [2- (7-Bromo-2-oxo-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-5-yl) 2-N, N-chloropalladium(II)], [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>]. In this sense, the synthesis of the palladium (II) complex derived from bromazepam was performed with satisfactory yield, 75%. To understand the chemistry of the ligand as well as the complex obtained, two characterization techniques were used in which the ligand and the complex were subjected to NMR of <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H and HSQC analyzes. In addition, the complex was also characterized by the infrared (IR) technique and mass spectrometry coupled to gas chromatography (GC-MS). The results obtained from the NMR allowed to infer that the complex presented monomeric structure; the N<sub>4</sub> and the pyridine N<sub>13</sub> of the linker are the atoms that coordinate with the Pd(II). The IR allowed the detection of frequencies of stretches characteristic of the binder found also in the complex. The MS revealed the fragments of the complex. Regarding the anxiolytic activity, it was observed that the complex at the lowest dose (0.5 µg/kg) presented a significant reduction in the anxiety of the mice subjected to the plus maze test in relation to the control group (saline group), without causing alteration of the locomotor activity, and the analysis of the motor activity was also confirmed by the open field test. Likewise, it was possible to determine that the anxiolytic action of the complex occurs via GABA<sub>A</sub> receptor, since the animals that received pre-treatment with flumazenil and were treated with the complex did not present anxiolytic activity. Thus, the present study demonstrated that the [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] complex proved promising to the anxiolytic action, thus motivating those in the Catalysis and Chemical Reactivity Group (GCaR, Grupo de Catálise e Reatividade Química, em português) to seek a better understanding of this complex and probable analogs in the treatment of anxiety disorders.

**Keywords:** Palladium(II) complex. Bromazepam. Anxiety disorders.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Principais regiões cerebrais envolvidas na geração e na regulação das emoções e na detecção do medo.....	20
<b>Figura 2</b> – Estrutura química do clordiazepóxido.....	35
<b>Figura 3</b> – Ilustração da composição estrutural do receptor GABA <sub>A</sub> . Vista superior mostrando a montagem pentamérica das subunidades $\alpha_1$ , $\beta_2$ e $\gamma_2$ e a localização para os sítios de ligação para o GABA e os BZDs.....	36
<b>Figura 4</b> – Transmissão do sinal GABA através do receptor GABA <sub>A</sub> . O GABA é liberado na fenda sináptica, onde se liga ao receptor GABA <sub>A</sub> presente na membrana do neurônio pós-sináptico, consistindo de cinco subunidades(...)......	37
<b>Figura 5</b> – Análogos equivalentes da série do BZDs.....	40
<b>Figura 6</b> – Estrutura química de alguns complexos de platina com atividade antitumoral.....	42
<b>Figura 7</b> – Estrutura química básica dos 1,4- e 1,5-benzodiazepínicos, respectivamente.....	45
<b>Figura 8</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] em DMSO-d <sub>6</sub> .....	57
<b>Figura 9</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] em DMSO-d <sub>6</sub> .....	58
<b>Figura 10</b> – Mapa do contorno gerado a partir do experimento HSQC ( <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H) do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] em DMSO-d <sub>6</sub> .....	59
<b>Figura 11</b> – Espectro na região do Infravermelho do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ].....	61
<b>Figura 12</b> – Espectro de massas do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] por CG-EM e a rota de fragmentação proposta.....	63
<b>Figura 13</b> – Efeito da salina (NaCl 0,9%), do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ], 0,5, 5 e 50 µg/kg ou do Bromazepam (BMz) 0,1 mg/kg, administrados I.P. 30 minutos antes da sessão experimental sobre o comportamento exploratório de camundongos submetidos ao teste LCE <sup>a</sup> .....	65
<b>Figura 14</b> – Efeito da salina (NaCl 0,9%) e do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] na dose de 0,5 µg/kg sobre o comportamento exploratório de camundongos, pré-tratados ou não com Flumazenil (2 mg/kg), submetidos ao teste do LCE <sup>a</sup> .....	68
<b>Figura 15</b> – Efeito da salina (NaCl 0,9%), do [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ], 0,5, 5 e 50 µg/kg ou do Bromazepam (BMz) 0,1 mg/kg sobre o comportamento locomotor/exploratório de camundongos submetidos ao teste de CA (A e B) com subsequente avaliação da via GABAérgica no modo de ação do complexo (C e D) <sup>a</sup> .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Recomendações de tratamento farmacológico para transtornos de ansiedade em adultos (Nota. Nem todos os medicamentos são licenciados para essas indicações em todos os países).....	30
<b>Tabela 2</b> – Alguns benzodiazepínicos e seus respectivos substituintes.....	38
<b>Tabela 3</b> – Concentração inibitória mínima das tetraciclina livres e dos seus respectivos complexos com paládio(II) em linhagens de <i>E. coli</i> sensível (HB101) e resistente aos agentes (HB101/pBR322).....	43
<b>Tabela 4</b> – Complexos metálicos derivados do bromazepam descritos na literatura.....	46
<b>Tabela 5</b> – Locais de realização das atividades experimentais.....	47
<b>Tabela 6</b> – Procedência e fórmula molecular dos reagentes e solventes.....	47
<b>Tabela 7</b> – $[\{2-(7\text{-Bromo-2-oxo-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin5-il})\text{piridinil-}\kappa^2\text{-N,N}\}\text{cloropaládio(II)}], [(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$ , em DMSO- $d_6$ .....	53

## LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

<b>[(BMZ)PdCl<sub>2</sub>]</b>	[[{(7-bromo-1,3-dihidro-5-(2-piridinil)-2 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2-ona)}fenil-κ <sup>2</sup> - <i>N,N</i> }cloropaládio(II)]
<b>ACTH</b>	Hormônio Adrenocorticotrófico
<b>ADT</b>	Antidepressivo Tricíclico
<b>Ag</b>	Agorafobia
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BDZ</b>	Benzodiazepínico
<b>BMZ</b>	Bromazepam
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>GABA</b>	Ácido γ-aminobutírico
<b>GCaR</b>	Grupo de Catálise e Reatividade Química
<b>HSQC</b>	Coerência Quântica Única Heteronuclear ( <i>Heteronuclear single-quantum correlation</i> )
<b>I.P.</b>	Intraperitoneal
<b>IQB</b>	Instituto de Química e Biotecnologia
<b>IRSN</b>	Inibidor da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
<b>ISRS</b>	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>KBr</b>	Brometo de Potássio
<b>LCE</b>	Labirinto em Cruz Elevado
<b>Li<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub></b>	Tetracloropaladato II de lítio
<b><i>m/z</i></b>	Razão massa sobre a carga
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio

<b>OAc</b>	Acetato
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>Pd</b>	Paládio
<b>PdCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de paládio(II)
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TA</b>	Transtorno de Ansiedade
<b>TAG</b>	Transtorno de Ansiedade Generalizada
<b>TAS</b>	Transtorno de Ansiedade Social
<b>TCC</b>	Terapia Cognitiva-Comportamental
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TP</b>	Transtorno do Pânico
<b>UFAL</b>	Universidade Federal de Alagoas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Transtornos de ansiedade.....</b>	<b>18</b>
3.1.1	Considerações gerais.....	18
3.1.2	Fisiopatologia.....	19
3.1.3	Classificação.....	21
3.1.4	Tratamento.....	24
3.1.4.1	Tratamento psicológico como medida não medicamentosa.....	25
3.1.4.2	Tratamento medicamentoso.....	26
<b>3.2</b>	<b>Benzodiazepínicos: da descoberta à aplicabilidade clínica.....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Contexto histórico do surgimento dos BZDs.....	32
3.2.2	Receptor GABA <sub>A</sub> e mecanismo de ação dos BZDs.....	35
3.2.3	Os efeitos dos grupos substituintes nos aspectos da relação estrutura-atividade dos BZDs.....	38
3.2.4	Uso dos BZDs nos transtornos de ansiedade.....	40
<b>3.3</b>	<b>Química inorgânica medicinal.....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Contexto histórico e aplicabilidade dos compostos inorgânicos medicinais.....	41

3.3.2	Química do paládio.....	44
<b>3.4</b>	<b>Compostos medicinais derivados de benzodiazepínicos.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Atividades desenvolvidas e locais de realização.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes e Solventes.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Instrumentação para caracterização.....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	48
4.3.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho médio (IV).....	48
4.3.3	Espectrometria de massas.....	48
<b>4.4</b>	<b>Procedimentos de síntese do [2-(7-Bromo-2-oxo-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin5-il)piridinil-κ2-N,N]cloropaládio(II), [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>].....</b>	<b>48</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da atividade ansiolítica.....</b>	<b>49</b>
4.5.1	Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....	50
4.5.2	Teste do campo aberto (CA).....	51
4.5.3	Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito do tipo ansiolítico.....	51
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>].....</b>	<b>53</b>
5.1.1	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (RMN de <sup>1</sup> H).....	54
5.1.2	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (RMN de <sup>13</sup> C).....	55

5.1.3	Mapa do contorno gerado a partir do experimento HSQC ( <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H) em DMSO-d <sub>6</sub> .....	55
5.1.4	Espectroscopia no Infravermelho Médio (IV).....	60
5.1.5	Espectrometria de massas (EM).....	62
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da atividade biológica do complexo de paládio(II)....</b>	<b>64</b>
5.2.1	Avaliação da atividade ansiolítica do composto [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] através do teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) mediada pela via GABAérgica.....	64
5.2.2	Avaliação da atividade locomotora/exploratória do composto [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] através do teste do Campo Aberto (CA) mediada pela via GABAérgica.....	69
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O medo consiste em uma resposta adaptativa a algum tipo de ameaça concreta e iminente que, geralmente, apresenta um caráter transitório. Ele é caracterizado por uma inter-relação entre as respostas cognitiva, psicológica, comportamental e subjetiva (esta última observada em seres humanos) desencadeadas frente a tal ameaça. Já a ansiedade consiste em uma resposta comportamental e fisiológica relevante, de longa duração, a estímulos ameaçadores que podem ser indicados por situações de perigo imediato ou por indicações incertas de eventos mal definidos; eventos esses que o indivíduo julga que trarão consequências negativas a si (HYMAN; COHEN, 2014; SCHMIDT et al., 2018).

Em algumas situações, muitas vezes devido à ausência de sinais claros de segurança, a ansiedade pode persistir além do período da ameaça iminente ou, ainda, pode gerar uma solução acentuada, incontrolável e inapropriada frente a um estímulo ameaçador, prejudicando a qualidade de vida de alguns indivíduos; caracterizando os *transtornos de ansiedade* (APARECIDA GELFUSO et al., 2014). De acordo com a OMS (2017), em 2015, aproximadamente 264 milhões de pessoas vivem com algum tipo de transtorno de ansiedade no mundo. Segundo a mesma entidade, houve um aumento de 14,9% do total de pessoas com transtorno de ansiedade avaliado no ano de 2015 em relação à análise realizada no ano de 2005, sendo creditado esse aumento ao crescimento e envelhecimento populacional.

Atualmente há um amplo arsenal de fármacos usados no tratamento dos transtornos de ansiedade, dentre os quais os inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS's), os inibidores da receptação de serotonina-noradrenalina (IRSN's) e os benzodiazepínicos (BZDs) são os mais usados clinicamente (SCHMIDT et al., 2018). Entretanto, ensaios clínicos apresentaram taxas de resposta aos agentes farmacológicos e de remissão dos transtornos de ansiedade em torno de 40 a 70% e de 20 a 47%, respectivamente, ou seja, esses agentes apresentam uma porcentagem de resposta ao tratamento menor que a ideal, no qual cerca de um em cada três pacientes são resistentes ao esse tipo de tratamento (DE MENEZES et al., 2007; PATTERSON; VAN AMERINGEN, 2016).

Em relação aos BDZs, seus principais efeitos no SNC são a sedação, a redução da ansiedade, a atividade anticonvulsivante, a amnésia retrógrada e o relaxamento muscular (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). Diferenças estruturais e farmacocinéticas influenciam a potência, o início e a duração do efeito terapêutico e o tipo dos efeitos colaterais dos BDZs (GRAEFF, 2012). Dentre os efeitos adversos da administração dos fármacos dessa classe, e.g., sonolência, incoordenação motora e perda de memória (efeito amnésico anterógrado) são frequentemente incapacitantes (GRAEFF, 2012). A síntese e a semi-síntese de novos benzodiazepínicos, propostas pela química medicinal, têm demonstrado avanços no que diz respeito à melhor atividade e efetividade terapêutica e à redução dos efeitos adversos dessa classe de fármacos (BARROS et al., 2016).

Após a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina por Barnett Rosenberg em 1965, a Química Inorgânica Medicinal ganhou mais destaque no cenário das ciências da saúde e, estudos seguintes ajudaram a fornecer as bases teóricas e práticas necessárias para o planejamento de fármacos coordenados a metais (BERALDO, 2004). A coordenação de fármacos a cátions metálicos é capaz de alterar, em alguns casos, de modo marcante o perfil da atividade desses fármacos. Essa alteração pode ocorrer principalmente através: de alterações farmacocinéticas, como o aumento da lipofilia observada pelo complexo fármaco-metal em relação ao fármaco livre; e de parâmetros farmacodinâmicos relacionados à capacidade do metal de alterar a estereoquímica e as características eletrônicas do ligante bioativo (fármaco) - essas mudanças têm como objetivos principais gerar complexos com maior potência e/ou menores efeitos colaterais do que o fármaco livre (FARRELL, 2002; BERALDO, 2005; CORREIA, 2017).

Tem sido dada certa atenção ao desenvolvimento de metalofármacos tendo o paládio(II) como metal. Por apresentar semelhança química com a platina, alguns compostos de paládio possuem boa atividade antitumoral e anti-infecciosa. No entanto, apenas o isótopo radioativo de  $^{103}\text{Pd}$  é utilizado clinicamente em casos de câncer de próstata em estágio avançado (SINGH et al., 2010; SILVA; GUERRA, 2011). Vale ressaltar o estudo recente de Barros et al. (2016), com complexos de paládio(II) tendo como ligante o diazepam, que demonstrou, nos resultados iniciais, que os complexos diméricos  $[(\text{DZP})\text{PdOAc}]_2$  e  $[(\text{DZP})\text{PdCl}]_2$  desempenharam atividade anticonvulsivante significativa em camundongos.

Até o presente momento, não foram estudados os efeitos da administração intraperitoneal (I.P.) de complexos de paládio(II) contendo como ligante o benzodiazepínico bromazepam nos comportamentos de ansiedade e memória em roedores. Diante do supracitado, fica evidente a importância da realização deste trabalho que tem como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade biológica de um complexo de paládio(II) contendo bromazepam como ligante, com o intuito de obter novas propostas terapêuticas para o tratamento dos transtornos de ansiedade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a síntese e a caracterização, além de avaliar a atividade ansiolítica do complexo de paládio(II) contendo bromazepam como ligante.

### 2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar complexo de paládio(II) derivado do bromazepam proveniente do sal de PdCl<sub>2</sub>;
- Caracterizar estruturalmente o complexo sintetizado por meio das técnicas de RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), IV e CG-EM;
- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (I.P.) do complexo de paládio(II) derivado do bromazepam nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado;
- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (I.P.) do complexo de paládio(II) derivado do bromazepam na atividade locomotora espontânea de camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do campo aberto;
- Avaliar se o efeito do tipo ansiolítico do complexo de paládio(II) derivado do bromazepam em camundongos Swiss fêmeas ocorre via receptores GABA<sub>A</sub>, através do pré-tratamento com flumazenil (2 mg/kg, I.P.; antagonista competitivo do sítio BDZ do receptor GABA<sub>A</sub>).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Transtornos de ansiedade

##### 3.1.1 Considerações gerais

Correspondendo ao maior grupo de transtornos mentais na maior parte da sociedade ocidental, além de estarem entre as principais causas de incapacidade aos seus portadores, os transtornos de ansiedade (TAs) são fundamentalmente caracterizados por um medo excessivo e contínuo, ansiedade e/ou comportamentos constantes de esquiva de ameaças persistentes. Essas ameaças podem estar relacionadas desde situações sociais como a apresentação de relatório de produtividade a uma equipe no ambiente de trabalho (sendo considerado um fator ambiental externo), assim como a sensações corporais tais como “frio na barriga”, “nó na garganta”, “coração apertado”, “mãos suadas”, dentre outros (nesse caso, caracterizando um fator ambiental interno) (ZAMIGNANI; BANACO, 2005; CRASKE et al., 2017).

De acordo com dados de Steel et al. (2014), os transtornos de ansiedade apresentam uma estimativa mundial de prevalência ao longo da vida em torno de 11,3% a 14,7%. A cultura, o gênero e o período da vida nos quais se deram início os TAs consistem os principais fatores que influenciam a prevalência dessas patologias (SCHMIDT et al., 2018).

No que diz respeito ao país e/ou à cidade, a taxa de prevalência para 12 meses dos TAs mostraram valores bastante variados; a Itália com taxa de 2,4%, o México com 29,8%, já os EUA e o Japão com valores de 19,3% e 4,8%, respectivamente (BAXTER et al., 2013; SHIMADA-SUGIMOTO; OTAWA; HETTEMA, 2015). Recentemente, um estudo demonstrou que a prevalência para 12 meses da ansiedade em moradores das cidades de São Paulo e do Rio de Janeiro estava com taxas de 12,7% e 12,1%, nessa ordem, sendo que as mesmas foram associadas à maior predisposição à violência urbana (BLAY et al., 2018).

Assim como foi observada diferença na prevalência dos TAs de acordo com o local, essa diferença também pode ser observada em relação ao gênero. No qual as

mulheres apresentam uma predisposição média a esses transtornos, ao longo da vida, na casa dos 18,2%, enquanto que os homens com valor médio de 10,1% (STEEL et al., 2014).

Por fim, e talvez o mais importante fator que influencia os transtornos de ansiedade, estudos retrospectivos e prospectivos apontam que muitos desses transtornos se iniciam cedo na vida, geralmente nas populações infantil e da adolescência. Ainda, os transtornos exibem um perfil de cronicidade, pois os pacientes podem sofrer de seus transtornos por anos ou décadas. No caso dos transtornos de ansiedade de separação e de fobias específicas, foi observado um início desses tipos de TAs em pacientes com idades entre 6 a 17 anos (KESSLER et al., 2007; BANDELOW; MICHAELIS, 2015).

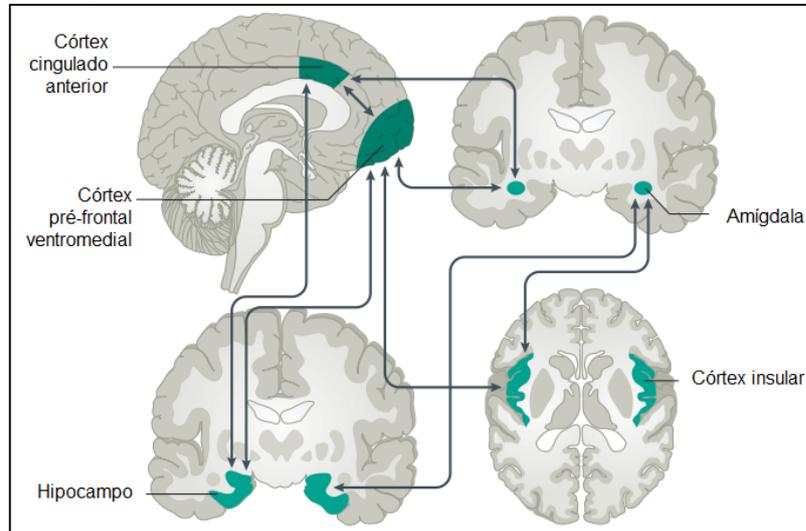
Muitos estudos demonstram a correlação entre os transtornos de ansiedade e a maior predisposição ao desenvolvimento ou ao agravamento de outras patologias, como: transtorno bipolar (ESER et al., 2018), apneia do sono (WIERSEMA; VAN ZELST; OUDE VOSHAAR, 2018), depressão maior (ZHOU et al., 2017), enxaqueca crônica, artrite e dor nas costas (CSUPAK et al., 2018), acidente vascular encefálico em pacientes diabéticos (TSAI et al., 2016), aumento significativo de metástases em pacientes com câncer, além de ter aumentado os sinais de boca seca, dormência ou formigamento e de sono perturbado nos mesmos (SHIM et al., 2017). Levando em consideração que todas essas comorbidades ocasionam um prejuízo ainda maior para os pacientes com transtornos de ansiedade no que diz respeito à qualidade de vida.

### 3.1.2 Fisiopatologia

Apesar do circuito neural dos transtornos de ansiedade não estar totalmente elucidados, muitos estudos, em humanos e roedores, sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade possibilitaram a compreensão de algumas sinalizações envolvidas no processamento das emoções. Essas sinalizações envolvem regiões cerebrais da amígdala, do hipocampo e do córtex pré-frontal medial (abrangendo o córtex pré-frontal ventromedial e o córtex cingulado anterior) que estão interconectadas e modulam importantes projeções de saída para ansiedade e respostas à ameaças (Figura 1). Vale acrescentar, ainda, a participação do hipotálamo, do mesencéfalo

(como os núcleos da rafe) e o tronco cerebral nos transtornos de ansiedade (CRASKE et al., 2017).

**Figura 1 – Principais regiões cerebrais envolvidas na geração e na regulação das emoções e na detecção do medo.**



Fonte: CRASKE et al., 2017.

A experiência da emoção é em grande parte desencadeada pela amígdala. Segundo Robinson et al. (2009), esta estrutura apresenta uma função primária na formação e armazenamento da memória associada à eventos emotivos, tais como o medo e a ansiedade. Os primeiros estudos sobre o papel da amígdala no estado emocional mostraram que a área basolateral da amígdala é capaz de receber sinais sensoriais e permitir a associação entre os estímulos conscientes (sentimento de medo quando um indivíduo se depara com um leão a sua frente) e os inconscientes (taquicardia que consiste na resposta autonômica e neuroendócrina ao medo). Esta função desempenhada pela amígdala basolateral regula a atividade de outra região da amígdala, denominada núcleo da amígdala. Este núcleo, por sua vez, está reciprocamente conectado por duas projeções eferentes principais: (1) as projeções dos terminais estriais que chegam ao hipotálamo e (2) a sinalização amigdalofugal ventral que alcança o tronco cerebral (DAVIS, 2000; BLAIR, 2008). Quando a estimulação no hipotálamo, pelos sinais provindos dos neurônios do núcleo amigdalar, se dar na região lateral, observa-se ativação simpática e consequente taquicardia, palidez, dilatação da pupila e elevação da pressão sanguínea. Já a estimulação que tem origem desta região da amígdala quando ocorre no núcleo paraventricular hipotalâmico, há estimulação desta área do hipotálamo que trará como resposta uma

maior liberação de ACTH e, conseqüentemente, uma maior liberação de corticosteroides (IVERSEN, KUPFERMANN, KANDEL, 2000).

Os estímulos sensoriais externos são encaminhados pelo tálamo e pelo córtex sensorial através de vias aferentes excitatórias para a amígdala basolateral, que é composta pelos núcleos amigdaloides lateral, basal e basomedial, e corresponde o principal núcleo de entrada na amígdala para iniciar a interpretação se o estímulo ambiental é ou não ameaçador (CALHOON; TYE, 2015).

O entendimento da rede neural da ansiedade pode possibilitar a descoberta de biomarcadores que trariam uma aplicabilidade clínica incomensurável, pois proporcionaria, por exemplo, prever o risco de transtornos de ansiedade. Esse fato foi levantando pela comunidade científica, após evidências sugerirem que o funcionamento da rede mencionada acima está comprometido, isto é, algumas regiões cerebrais podem estar superativadas (como a amígdala) e/ou sub-ativadas (como partes do córtex pré-frontal ventromedial) devido à exposição à adversidade durante a infância (FONZO et al., 2016; TEICHER et al., 2016).

### 3.1.3 Classificação

Para distinguir os transtornos de ansiedade são analisados fatores relacionados à natureza, à intensidade e ao curso temporal dos sintomas, além do padrão de transmissão entre familiares, da vulnerabilidade e dos fatores precipitantes, da função dos sinais externos responsáveis por deflagrar episódios e da conjunção dos sintomas associados (HYMAN; COHEN, 2014). De acordo com a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*DMS-5, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* em inglês, 2014), os transtornos de ansiedade são classificados como: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social (fobia social), transtorno do pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento, transtorno de ansiedade devido à outra condição médica e outro transtorno de ansiedade especificado.

Além da classificação citada acima, também, para cada transtorno de ansiedade, podem ser adotadas escalas específicas para mensurar a gravidade

(variando de leve a severo) tendo como objetivo principal ter um prognóstico do transtorno ao longo do tempo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; CRASKE et al., 2017).

O transtorno de ansiedade de separação (TASep) apresenta como característica uma resposta incomum a uma separação de um ente bem próximo ou até mesmo de algum lugar e/ou situações (como mudança de lar ou de um novo período na escola), isto é, o indivíduo responde de modo inapropriado a um “sofrimento” adquirido, ou apresenta medos não-reais e exagerado a situações de separação de figuras de apego. O TAS corresponde a um dos transtornos que manifesta-se principalmente em crianças e adolescente, no entanto, não exige o diagnóstico desse tipo de transtorno de ansiedade em adultos (FIGUEROA et al., 2015).

Os indivíduos com mutismo seletivo (MS) apresentam uma incapacidade consistente em falar em algumas situações específicas, como na escola (levando a prejuízos na aprendizagem) e em ambientes sociais (mesmo na presença de amigos próximos) e profissionais, mesmo que tenha uma desenvoltura normal da fala demonstrada em algumas situações como no âmbito familiar (parentes de primeiro grau). Esse transtorno é um tanto raro e acomete com maior frequência crianças menores (entre os 2-5 anos de idade) do que em adolescentes e adultos. A prevalência desse transtorno é subestimada, pois na prática clínica, muitas crianças com mutismo seletivo são diagnosticadas com outro tipo de transtorno de ansiedade – sendo geralmente diagnosticada com fobia social (OERBECK et al., 2016).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DMS-5 (2014) apresenta que indivíduos com fobia específica demonstram sinais de apreensão, ansiedade ou de esquiva de determinados objetos ou situações específicos. A resposta à situação de fobia é praticamente imediata, geralmente apresentando sinais de medo, ansiedade ou esquiva que, por muitas vezes, perduram após o afastamento do estímulo fóbico e/ou mostra uma magnitude exacerbada ao risco efetivo que se apresenta. Esse tipo de transtorno de ansiedade se desenvolve a partir de: experiências traumáticas (p. ex., tomar medicamento por via parenteral ou tomar vacina – fobia à injeção); observação de experiências traumáticas sofridas por outras pessoas (p. e., constatar uma pessoa se afogando); ataque de pânico repentino na

situação a ser temida (como um ataque de pânico no metrô); divulgação de informações (como a extensa cobertura dos meios de comunicação de um acidente aéreo).

Quando o medo e a ansiedade elevada estão relacionados a algumas interações e situações sociais relacionadas a possibilidade de análise de desempenho, tendo como consequência de defesa a esquiva e também a incapacidade significativa, denominamos esse transtorno de transtorno de ansiedade social (também conhecido como fobia social). Os indivíduos com esse transtorno desenvolvem uma concepção cognitiva relacionada a de estarem sendo avaliados de forma negativa pelas outras pessoas, além de ficar embaraçado, ser humilhado ou rejeitado pelos outros (FOX; KALIN, 2014). De acordo com Nobile, Garcia e Bolsoni-Silva (2017, p. 18), no transtorno de ansiedade social, “as situações sociais são evitadas ou suportadas com sofrimento intenso ocasionando prejuízo nos contextos sociais, ocupacionais e outros importantes da vida da pessoa”.

Indivíduos que sofrem do transtorno do pânico vivenciam ataques de pânico recorrentes e abruptos com sintomas de palpitações, taquicardia, vertigem, sensação de asfixia, parestesias, além de sensações de irrealidade (desrealização) e de estar se distanciando de si mesmo (despersonalização), medo de perder o controle ou de morrer. Um ataque de pânico corresponde ao surgimento inesperado de medo ou desconforto intenso que alcança um ápice em minutos e durante o qual são observados quatro ou mais dos 13 sintomas físicos e cognitivos determinados nos critérios diagnósticos desse transtorno no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DMS-5, sendo que alguns desses sintomas foram supracitados neste parágrafo (GEIGER et al., 2014).

Segundo Asmundson, Taylor e Smits (2014), a agorafobia consiste em um transtorno de ansiedade nos quais os indivíduos são excessivamente aflitos e ansiosos devido a exposição real ou antecipada de espaços públicos. A aflição e a ansiedade surgem na maior parte do tempo quando o indivíduo com agorafobia experimenta duas ou mais das situações listadas abaixo:

- a) Usar transporte público;
- b) Estar em espaços abertos;
- c) Estar em lugares fechados;

- d) Ficar em uma fila ou estar no meio de uma multidão;
- e) Estar fora de casa sozinho em outras situações.

Ainda de acordo com o mesmo autor, essas situações, quando não há a presença de um acompanhante, são evitadas por indivíduos com esse transtorno, visto que eles tanto temem ser difícil ou não conseguir fugir das situações, quanto não ter auxílio disponível caso a pessoa venha a apresentar sintomas semelhantes ao pânico ou outros sinais e sintomas incapacitantes ou constrangedores.

O transtorno de ansiedade generalizada é caracterizado principalmente pela ansiedade e pela preocupação crônica e persistente, no qual essa preocupação afeta vários domínios da vida das pessoas afetadas (p. ex., finanças, família, saúde e sobre o futuro), isto é, é uma ansiedade e uma preocupação multifocal, além de ser excessiva e difícil de controlar. Podem ser observados outros sintomas psicológicos e também físicos, como dificuldade em concentrar-se ou sensações de “branco” na mente e fadigabilidade, respectivamente. Vale a pena ressaltar que a intensidade, duração ou frequência da ansiedade e preocupação é desproporcional à probabilidade real ou ao impacto do evento antecipado (STEIN; SAREEN, 2015).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DMS-5 (2014) explica que o transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento está relacionado à ansiedade devido ao uso abusivo ou até mesmo à abstinência de certas substância (p. ex., álcool, cafeína, *Cannabis* e fenciclidina) ou a um tratamento medicamentoso (p. ex., sedativos e estimulantes do SNC). Já no transtorno de ansiedade devido a outra condição médica, os sintomas de ansiedade são consequência fisiológica de outra condição médica, marcadamente observado em pacientes oncológicos (LI; LOKE, 2013).

#### 3.1.4 Tratamento

Os transtornos de ansiedade podem ser tratados por meio de medicamentos, de psicoterapia e/ou outras intervenções, como a atividade física. Estudos de meta-análises, demonstraram que a combinação terapêutica entre farmacoterapia e psicoterapia tem mostrado resultados que permeiam do moderado ao alto; em comparação intragrupo (pré e pós combinação terapêutica) e em comparação

intergrupos (grupo controle vs. grupo sujeito a combinação terapêutica). É importante ressaltar que o índice de resposta para o tratamento inicialmente escolhido dos transtornos de ansiedade apresenta uma proporção de 45% a 65% (BANDELOW et al., 2014).

Segundo Bandelow e colaboradores (2017), dependendo da gravidade dos sintomas do transtorno de ansiedade, não há necessidade de tratamento, isto é, quando os indivíduos apresentam sintomas leves, transitório e sem comprometimento social e ocupacional.

Um grande estudo realizado na Europa verificou que somente 20,6% dos participantes com algum tipo de transtorno de ansiedade procuraram ajuda profissional, sendo que destes 23,2% não receberam nenhum tipo de tratamento, outros 19,6% e 30,8% receberam apenas tratamento psicológico e tratamento medicamentoso, respectivamente, e 26,5% dos participantes receberam tratamento medicamentoso e psicológico. Outro estudo ocorrido na atenção primária holandesa determinou que somente 27,0% dos participantes diagnosticados com transtorno de ansiedade receberam cuidados segundo orientações de diretrizes (ALONSO; DÉPINE, 2007; SMOLDERS et al., 2009).

#### 3.1.4.1 Tratamento psicológico como medida não medicamentosa

Um ponto importante a todos os pacientes com transtornos de ansiedade consiste em solicitar momentos de conversa de apoio e atenção aos problemas emocionais que estão associados aos transtornos. Por isso, muitos pacientes solicitam intervenções psicológicas como forma de tratamento (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEJING, 2017). Dentre as terapias psicológicas, a terapia cognitivo-comportamental (TCC) é a que apresenta a maior eficácia frente às outras, além de talvez ser a abordagem não farmacológica mais reconhecida para os transtornos de ansiedade (METZLER; MAHONEY; FREEDY, 2016).

De acordo com Bahls e Navolar (2004), a TCC engloba definição e práticas de duas outras abordagens teóricas psicológicas: a teoria cognitiva e a teoria comportamental. Os mesmos autores relatam que, a teoria cognitiva objetiva enfatizar o trabalho sobre os aspectos cognitivos de uma determinada psicopatologia através

do estudo da natureza e da função desses aspectos, enquanto a teoria comportamental possibilitou o conhecimento sobre as normas gerais do comportamento tornando-o mais previsível.

A teoria cognitivo-comportamental inclui procedimentos capazes tanto de eliminar o medo condicionado quanto de moldar cognitivamente as emoções, durante os transtornos de ansiedade. No meio desses procedimentos, pode-se destacar o de exposição às situações que estão gerando uma ansiedade patológica, no qual o paciente é instigado a desafiar pensamentos automáticos negativos relacionados a tragédias físicas, psicológicas e/ou sociais, para fazer uma reavaliação do perigo (PORTO et al., 2008).

As diretrizes para a TCC apontam que este tipo de tratamento para os transtornos de ansiedade dure por períodos de 10 a 20 semanas (CRASKE et al. 2017). Entretanto, a situação atual não possibilita uma generalização válida sobre a duração precisa da psicoterapia, pois na maior parte dos ensaios realizados foram utilizadas de 10 a 24 semanas (no caso da fobia específica, estudos demonstraram que o tratamento com exposição pode ocorrer com sucesso em poucas sessões). O que deve ser levado em consideração sobre a duração do tratamento inicialmente é a individualidade do paciente como a severidade da doença, comorbidades e a situação psicossocial geral do mesmo (BANDELOW et al., 2014).

Apesar da TCC ser considerada a melhor abordagem psicoterapêutica para os transtornos de ansiedade, outras intervenções vêm ganhando destaque como a meditação baseada na atenção plena, o relaxamento muscular, os exercícios de respiração, a terapia psicodinâmica e as e-intervenções (tratamentos relacionados à utilização assistida de computadores, baseados na internet e em aplicativos) (CHRISTENSEN; BATTERHAM; CALEAR, 2014; CRASKE et al., 2017).

#### 3.1.4.2 Tratamento medicamentoso

A escolha do tratamento medicamentoso adequado para os transtornos de ansiedade é realizada levando-se em consideração o tipo de transtorno diagnosticado, além da necessidade clínica de efeitos ansiolíticos a curto prazo. Por isso, o tratamento agudo dos transtornos de ansiedade é realizado com o uso de

benzodiazepínicos (também há a indicação para tratamento crônico) e de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Em contrapartida, para a promoção e manutenção dos efeitos ansiolíticos, são usados os fármacos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRSs), os inibidores da receptação de serotonina e noradrenalina (IRSNs) e a buspirona (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015).

Os fármacos antidepressivos, especialmente os ISRSs e o IRSN venlafaxina, são considerados, por muitas autoridades da área da saúde, o tratamento de primeira escolha nos transtornos de ansiedade, exceto nos casos de fobia específica, devido a eficácia que eles demonstraram em diversos ensaios clínicos randomizados (ver a eficácia mostrada em alguns tipos de transtornos de ansiedade em ensaios clínicos randomizados na tabela 1). Entretanto, devido à ação lenta desses fármacos, eles demonstram eficácia restrita nos estados de ansiedade aguda (TREVOR; WAY, 2014; O'DONNELL; SHELTON, 2012).

Grande parte dos ISRSs foram implementados na prática clínica entre os anos de 1984 a 1997, tais como a fluoxetina (principal fármaco prescrito para transtornos depressivos), paroxetina, sertralina, citalopram, escitalopram e fluvoxamina. Esses fármacos apresentam indicações diversas na terapêutica, como antidepressivos, ansiolíticos, para os tratamentos de transtorno obsessivo compulsivo e transtorno disfórico pré-menstrual (O'DONNELL; SHELTON, 2012).

Especificamente para os transtornos de ansiedade, os ISRSs e os IRNSs geralmente começam a apresentar seus efeitos ansiolíticos entre a segunda e a quarta semana de tratamento, sendo que em alguns casos pode chegar até à sexta semana. Por esse motivo, é fundamental orientar os pacientes quanto a esse período de latência para o surgimento de uma melhora nos sintomas para que não haja perda de adesão à farmacoterapia proposta. Além disso, geralmente é observada uma potencialização dos efeitos adversos a esses antidepressivos nas primeiras duas semanas de tratamento, tendo como consequências agitação inicial e um amplificação dos sintomas da ansiedade (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEJING, 2017).

Mesmo sendo agentes que demonstram maior segurança e menos efeitos adversos (ver os efeitos adversos na tabela 1) em relação a outras classes de antidepressivos, os ISRSs e os IRNSs – particularmente a paroxetina e a venlafaxina,

respectivamente – podem causar reações graves aos paciente devido à abstinência, sendo necessária a redução gradual e lenta (STAHL et al., 1997).

Outras classes de agentes que atuam nos transtornos de ansiedade são: os antidepressivos tricíclicos (clomipramina e imipramina) e o inibidor seletivo e reversível da enzima monoamina oxidase (MAO) moclobemida. Os primeiros são indicados nos casos de transtorno do pânico e agorafobia, enquanto a moclobemida para o tratamento da fobia social. A principal desvantagem dos ADTs, em relação aos ISRSs e IRNSs, consiste no perfil de efeitos colaterais, tais como sintomas antiadrenérgicos e anticolinérgicos (como boca seca, constipação, sedação, disfunção sexual e hipotensão ortostática) (RAVINDRAN; STEIN, 2010; BANDELOW; MICHAELIS; WEDEJING, 2017).

A buspirona consiste em um agente ansiolítico seletivo de ação lenta que não causa sedação, nem efeitos hipnóticos e eufóricos marcantes, além de não apresentar características anticonvulsivantes e miorelaxantes; *características marcantes dos benzodiazepínicos*. Esse agente atua em dois sistemas de neurotransmissores excitatórios do SNC: (1) o serotoninérgico, como agonista parcial nos receptores do tipo 5-HT<sub>1A</sub> presentes no cérebro; e (2) o dopaminérgico, através dos receptores D<sub>2</sub> cerebrais. Apesar da buspirona apresentar baixa predisposição a sinais de abstinência com a interrupção brusca da mesma, de não gerar ansiedade de rebote e de demonstrar marcante efetividade no transtorno de ansiedade generalizada em alguns estudos controlados, não é tão efetiva em outros tipos de transtorno de ansiedade como no transtorno do pânico (TREVOR; WAY, 2014).

A pregabalina corresponde a um análogo do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) – principal neurotransmissor inibitório – que é indicada para os casos de transtorno de ansiedade generalizada, além de ser usada no tratamento adjunto das crises epiléticas focais (anteriormente denominadas de crises parciais), da dor neuropática diabética, da neuralgia pós-herpética e da fibromialgia. Ainda que seja estruturalmente semelhante ao GABA, seus efeitos não acontecem mediante os receptores para o GABA, mas sim através da sua ligação à subunidade  $\alpha_2\text{-}\delta$  dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, presentes nas terminações pré-sinápticas de neurônios do sistema nervoso central e periférico (WENSEL; POWE; CATES, 2012; STAHL et al., 2013). Em um estudo realizado por Frampton (2014), a pregabelina se mostrou tão

eficiente quanto lorazepam ou venlafaxina quando usada como monoterapia de curta duração no tratamento de transtorno de ansiedade generalizada.

**Tabela 1 – Recomendações de tratamento farmacológico para transtornos de ansiedade em adultos (Nota. Nem todos os medicamentos são licenciados para essas indicações em todos os países).**

Medicamentos

Classe	Fármacos	Eficácia mostrada em ECR para			Dose diária	Efeitos adversos
		TP/Ag	TAG	TAS		
ISRSs	Citalopram	x		x	20-40 mg	Nervosismo, náusea, inquietação, dor de cabeça, fadiga, aumento ou diminuição do apetite, ganho ou perda de peso, tremor, sudorese, prolongamento do QT <sub>c</sub> (observado no eletrocardiograma), disfunção sexual, diarreia, constipação e outros efeitos colaterais.
	Escitalopram	x	x	x	10-20 mg	
	Fluoxetina	x			20 mg	
	Fluvoxamina	x		x	50-100 mg	
	Paroxetina	x	x	x	20-50 mg	
	Sertralina	x	x	x	50-150 mg	
IRNSs	Duloxetina		x		60-120 mg	Nervosismo, náusea, inquietação, dor de cabeça, fadiga, aumento ou diminuição do apetite, ganho de peso, perda de peso, tremor, sudorese, disfunção sexual, diarreia, constipação, problemas de micção e outros efeitos colaterais.
	Venlafaxina	x	x	x	75-225 mg	
ADT	Clomipramina	x			75-250 mg	Efeitos anticolinérgicos, sonolência, tontura, efeitos colaterais cardiovasculares, ganho de peso, náusea, dor de cabeça, disfunção sexual e outros efeitos colaterais.

*Continua*

Classe	Fármacos	Eficácia mostrada em ECR para			Dose diária	Efeitos adversos
		TP/Ag	TAG	TAS		
Modulador do Ca <sup>2+</sup>	Pregabalina		x	x	150-600 mg	Tonturas, sonolência, boca seca, edema, visão embaçada, ganho de peso, constipação, humor eufórico, distúrbio de equilíbrio, aumento do apetite, dificuldade de concentração/atenção, sintomas de abstinência após interrupção abrupta e outros efeitos colaterais.
Azapirona	Bupirona		x		15-60 mg	Tontura, náusea, dor de cabeça, nervosismo, excitação, insônia e outros efeitos colaterais.
IRMA	Moclobemida			x	300-600 mg	Inquietude, insônia, boca seca, dor de cabeça, tontura, sintomas gastrointestinais, náusea e outros efeitos colaterais.

ISRSs, Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina; IRNS, Inibidores da Recaptação de Noradrenalina e Serotonina; ADT, Antidepressivo Tricíclico; IRMA, Inibidor Reversível da MAO<sub>A</sub>; ECR, Ensaio Clínico Randomizado; TP/Ag, Transtorno do Pânico/Agorafobia; TAG, Transtorno de Ansiedade Generalizada; TAS, Transtorno de Ansiedade Social.

Fonte: Modificado de BANDELOW; MICHAELIS; WEDEJING, 2017.

## 3.2 Benzodiazepínicos: da descoberta à aplicabilidade clínica

### 3.2.1 Contexto histórico do surgimento dos BZDs

O uso de substâncias com finalidades de reduzir a ansiedade e as tensões do dia-a-dia, de provocar o sono e os efeitos sedativos parece caminhar sinergicamente com a história da humanidade. Entretanto, o surgimento de compostos químicos produzidos para tais finalidades foi possível devido ao aprofundamento dos conhecimentos sobre a Medicina e a Química Orgânica. Apesar do etanol (na forma de vinhos e cervejas, por exemplo), do paraldeído e do hidrato de cloral serem usados como substâncias depressoras do SNC, os sais de brometo foram introduzidos na prática clínica especificamente como substâncias ansiolíticas no final do século XIX (BERNIK; SOARES; SOARES, 1990).

Apesar do ácido barbitúrico ter sido sintetizado no ano de 1862, sua aplicabilidade clínica só veio a acontecer nos primeiros anos do século XX. No ano de 1912, o fenobarbital foi introduzido na prática clínica. Importante ressaltar que, os barbitúricos ganharam maior expressão na clínica dos transtornos de ansiedade devido, nos anos de 1930, a dados robustos sobre a alta toxicidade causada pelos sais de brometos: transtornos neurológicos e gastrointestinais, sinais de irritabilidade, alucinações, delírio e letargia. A toxicidade se dava pelo efeito cumulativo tecidual dos brometos que apresentavam meia-vida média longa, em torno de 12 dias (BALME, 1976; LÓPEZ-MUNOZ; ÁLAMO; GARCÍA-GARCÍA, 2011).

Entre os anos de 1920 até a metade da década de 1950, os barbitúricos eram a única intervenção farmacológica com propriedades ansiolíticas e hipnóticas. Em 1950, foi sintetizado o meprobamato (dicarbamato de 2-metil-2-n-propil-1,3-propanediol) pelo farmacologista e microbiologista Frank M. Berger. No entanto, a aprovação, pela FDA (*Food and Drug Administration*), para a utilização na clínica como relaxante muscular, anticonvulsivante e ansiolítico ocorreu cinco anos após a sua descoberta. O meprobamato demonstrou menor capacidade de causar dependência em relação aos barbitúricos, além de demonstrar efeito ansiolítico causando alterações muito pequenas no desempenho físico e na competência

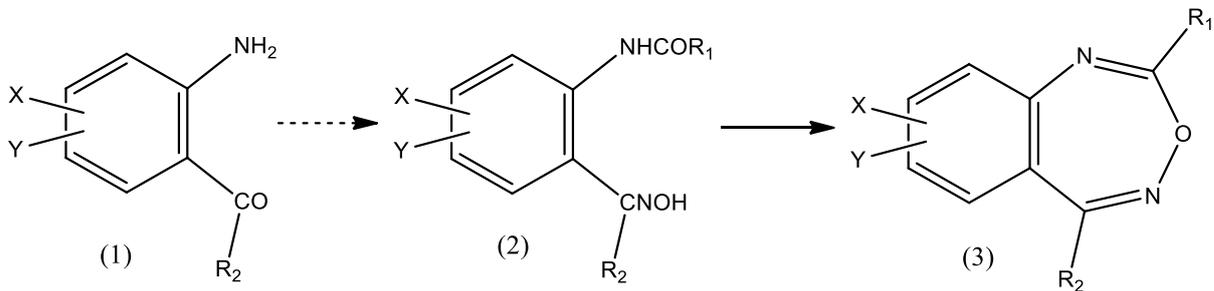
intelectual dos usuários; foi considerado o primeiro medicamento notadamente comercializado como ansiolítico (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2005; RAMCHANDANI; LÓPEZ-MUNOZ; ÁLAMO, 2006).

Porém, o tempo de uso clínico do meprobamato como agente ansiolítico não chegou a uma década nos EUA, pois foi observado que mesmo em doses terapêuticas ele causava sonolência e, assim, foi retirado do mercado farmacêutico norte-americano. Somada à sonolência, também contribuíram para a saída deste fármaco do mercado evidentes complicações de tolerância, uso abusivo, overdoses letais e dependência (LÓPEZ-MUNOZ; ÁLAMO; GARCÍA-GARCÍA, 2011).

A era dos benzodiazepínicos está diretamente relacionada a pessoa de Leo Henryk Sternbach (1908-2005), pesquisador polonês que durante a Segunda Guerra Mundial fugiu para os EUA devido a perseguição antissemita imposta pelos nazistas e, neste país, começou a trabalhar como químico na sede da empresa de laboratórios suíça Hoffmann-LaRoche Inc. Com a descoberta da clorpromazina (na França em 1952), que quimicamente apresenta estrutura tricíclica, Sternbach começou a planejar algumas modificações nas cadeias laterais em moléculas que ele tinha trabalhado há duas décadas atrás com a finalidade de obter novos compostos com propriedades antipsicóticas similares à clorpromazina (STERNBACH, 1979).

Inicialmente, Sternbach e colaboradores decidiram sintetizar compostos aminocetônicos do tipo 1 (esquema 1) relativamente acessíveis apresentando diversos substituintes no anel benzênico e, em seguida, acilar suas oximas para gerar produtos do tipo 2 (esquema 1). Após, os compostos do tipo 2 foram combinados com uma variedade de aminocetonas e ácidos produzindo um grande número dos compostos do tipo 3 (esquema 1), sendo que os pesquisadores esperavam que esses últimos fossem obtidos por meio de reações com um mínimo de dificuldades e de forma rápida (STERNBACH, 1979).

**Esquema 1 – Sequência de transformações de compostos para a obtenção do composto base dos benzodiazepínicos; o composto 3, no qual  $R_1 = \text{CH}_2\text{Cl}$  e  $R_2 = \text{fenila}$ ;  $\text{C}_6\text{H}_5$ .**



Fonte: STERNBACH, 1976.

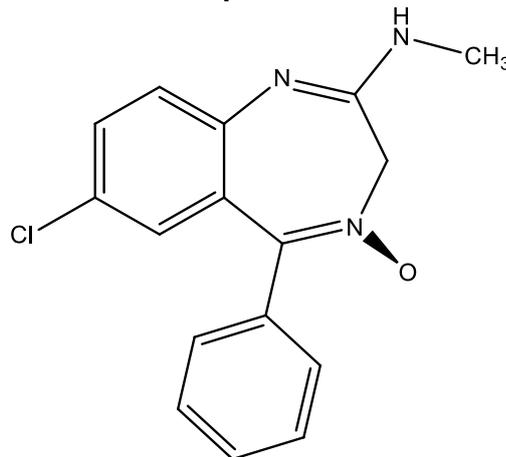
A partir desse composto base 3 aproximadamente 40 novos compostos foram desenvolvidos pelo grupo de Sternbach e encaminhados para Lowell Orland Randall, na época o diretor de pesquisas farmacêuticas na Roche, para realizar ensaios biológicos. Para o desânimo de Sternbach e sua equipe, os compostos apresentaram respostas negativas nos estudos de sedação, anticonvulsivante e de relaxamento muscular. Esse fato determinou a parada nos trabalhos com essas moléculas, no segundo semestre do ano de 1955. Houve a necessidade de trabalhar com outros projetos envolvendo antibióticos, porém, mesmo com a doação de toda equipe, os resultados práticos desses novos projetos foram insignificantes, levando o laboratório, em 1957, a uma situação de desespero (STERNBACH; REEDER, 1961; STERNBACH, 1972).

Durante uma atividade de limpeza do laboratório, Earl Reeder percebeu que o último composto sintetizado por Sternbach (de código Ro 5-0690) não tinha sido estudado anteriormente e, ambos, encaminharam o composto para Randall (STERNBACH, 1972). Nos dias seguintes, Randall e colaboradores (1960) confirmaram que esse composto demonstrou:

- Propriedades ansiolíticas e de relaxante muscular central superior ao meprobamato;
- Propriedade sedativa semelhante à clorpromazina, sem apresentar efeitos adversos significativos; e
- Propriedade anticonvulsivante superior ao fenobarbital em teste com pentilenotetrazol e inferior no teste de eletrochoque.

Para elucidação do composto Ro 5-0690 foram utilizadas técnicas de caracterização por infravermelho e ultravioleta, além de estudos de análise elementar e de degradação. Chegando à estrutura do primeiro benzodiazepínico – o clordiazepóxido (Figura 2) – que foi patenteado no mês de maio de 1958 e foi implementado para comercialização em 1960 com o nome Librium® (BERNIK; SOARES; SOARES, 1990).

**Figura 2– Estrutura química do clordiazepóxido.**



Fonte: LÓPEZ-MUNOZ; ÁLAMO; GARCÍA-GARCÍA, 2011.

Modificações estruturais no clordiazepóxido originaram inúmeros derivados benzodiazepínicos, sendo que, em 1963, foi lançado no mercado o diazepam com nome comercial de Valium®. O nitrazepam (Sonebron®) e o oxazepam (Serax®) foram incorporados no mercado em 1965, já o lorazepam (Lorax®) e o flurazepam (Dalmadorm®) em 1970 (BERNIK; SOARES; SOARES, 1990).

### 3.2.2 Receptor GABA<sub>A</sub> e mecanismo de ação dos BZDs

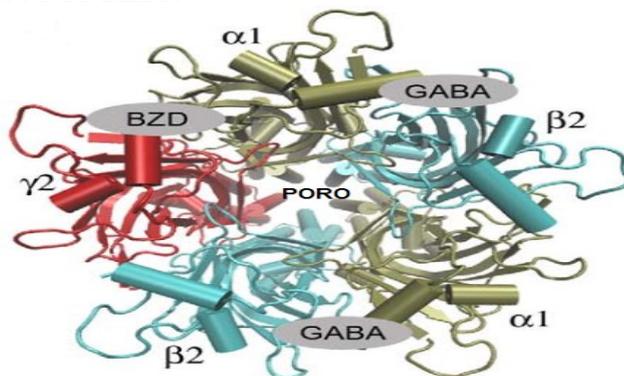
Os receptores GABA são considerados os receptores inibitórios de maior importância no cérebro, sendo ativados pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (principal neurotransmissor inibitório no SNC desenvolvido dos mamíferos). Esses receptores podem ser divididos em dois tipos principais: receptores ionotrópicos, que correspondem a proteínas de membranas com múltiplas subunidades, onde o GABA se liga e abrem um canal iônico de cloreto (receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>); e receptores metabotrópicos, que consistem em receptores heterodiméricos acoplados à proteína

G, que influenciam a condutância iônica neural através de segundos mensageiros (receptores GABA<sub>B</sub>) (JOHNSTON, 2005). Devido à sua ampla distribuição, os receptores GABA atuam em muitos circuitos e funções neurais. Sendo um importante alvo de fármacos que podem modular as atividades destes receptores e influenciar, por exemplo, a reatividade neuronal, a atenção, a formação da memória, a ansiedade, o sono, o tônus muscular, além de amenizar a hiperatividade neuronal nos casos de epilepsia (FORMAN et al., 2012).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são os mais abundantes no SNC e fazem parte da superfamília de canais iônicos regulados por ligante rápidos. A ligação do substrato ao receptor GABA<sub>A</sub> regula funções importantíssimas no que diz respeito à vigília, à ansiedade, à tensão muscular, à atividade epileptogênica e à memória. É importante correlacionar a regulação das inúmeras funções citadas acima com a maior densidade destes receptores principalmente no córtex cerebral, além de ser encontrados no hipotálamo, cerebelo, hipocampo e estriado (BATESON, 2004).

Uma maior compreensão da estrutura do receptor GABA<sub>A</sub> foi descrita inicialmente em estudos com cérebro bovino, o qual foi possível isolar um complexo proteico com duas subunidades denominadas  $\alpha$  e  $\beta$  e, posteriormente, foi feita a confirmação destas subunidades através de estudos de clonagem e expressão. Adiante foi possível reconhecer a existência de múltiplas isoformas de subunidades em mamíferos, denominadas  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\rho_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  e  $\pi$ . A isoforma mais abundante no SNC de humanos é a  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  (Figura 3), organizada da seguinte forma  $\alpha_1\gamma_2\beta_2\alpha_1\beta_2$  no sentido anti-horário, observada do lado de fora da célula (SIGEL; ERNST, 2018).

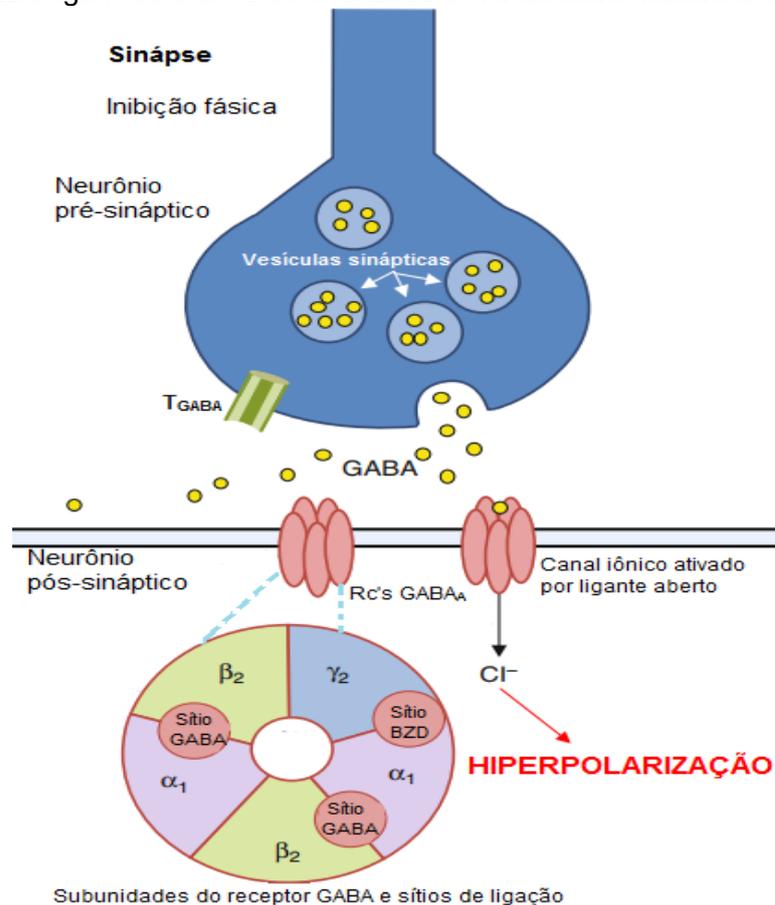
**Figura 3 – Ilustração da composição estrutural do receptor GABA<sub>A</sub>.** Vista superior mostrando a montagem pentamérica das subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  e  $\gamma_2$  e a localização para os sítios de ligação para o GABA e os BZDs.



Fonte: Modificado de BERGMANN et al., 2012 (BZD = benzodiazepínico; GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico).

A ligação do GABA ao receptor  $GABA_A$  abrirá o poro do canal que é permeável ao cloreto ( $Cl^-$ ). Como o  $Cl^-$  está mais concentrado no meio extracelular, haverá influxo deste íon no neurônio pós-sináptico mediando, assim, a hiperpolarização da membrana. A hiperpolarização da membrana pós-sináptica gera um potencial pós-sináptico inibitório que diminui a probabilidade dos disparos desse neurônio – ver *figura 4* (D'HULST; ATACK; KOOY, 2009).

**Figura 4 – Transmissão do sinal GABA através do receptor  $GABA_A$ .** O GABA é liberado na fenda sináptica, onde se liga ao receptor  $GABA_A$  presente na membrana do neurônio pós-sináptico, consistindo de cinco subunidades. O GABA liga-se a dois sítios de ligação localizados entre uma subunidade  $\alpha$  uma subunidade  $\beta$ . Após ligação ao receptor, o canal para o cloreto ativado por ligante é aberto. Isso permite o influxo de íons cloreto para o citoplasma do neurônio pós-sináptico, resultando em hiperpolarização e inibição fásica destes neurônio. Os BZDs ligam-se a um sítio localizado entre as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$ .



Fonte: Modificado de SANKAR, 2012 (BZD = benzodiazepínico;  $T_{GABA}$  = transportador do GABA.).

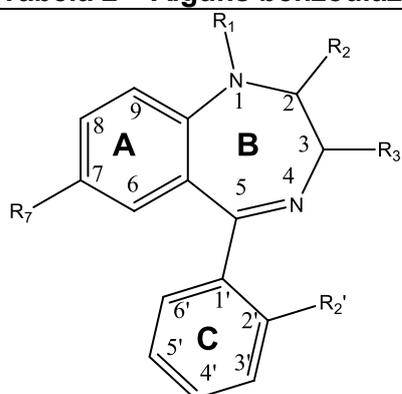
Os fármacos BZDs são moduladores alostéricos positivos do neurotransmissor inibitório GABA via receptor  $GABA_A$ , ou seja, agem abrandando a ansiedade sentida pelos pacientes, além de aumentar a ação inibitória dos neurônios durante a

excitabilidade excessiva que ocorrem em certos grupos neuronais durante as crises epilépticas (WHITING, 2003).

### 3.2.3 Os efeitos dos grupos substituintes nos aspectos da relação estrutura-atividade dos BZDs

Os fármacos da classe dos benzodiazepínicos (Tabela 2) receberam esse denominação devido às suas estruturas compostas de um anel benzeno (A) fundido a um anel diazepínico de sete membros (B). A presença do grupo arila na posição 5 e um anel 1,4-benzodiazepina caracterizam os compostos desta classe considerados importantes, sendo chamados comumente de 5-arilas-1,4-benzodiazepinas. Entretanto, várias alterações na estrutura do sistema de anéis possibilitaram o surgimento de análogos com atividades semelhantes, abrangendo as 1,5-benzodiazepinas (como o clobazam) e o análogo apresentando o grupo 2-pirindil na posição 5 (p. ex., bromazepam) ao invés da arila (STERNBACH, 1979; MIHIC; HARRIS, 2012).

**Tabela 2 – Alguns benzodiazepínicos e seus respectivos substituintes.**



Legenda:

**A** – Anel aromático

**B** – Anel diazepina (ciclo-heptano substituído)

**C** – Anel aromático<sup>5-arila</sup>

**Grupos de R<sub>1</sub>-R<sub>7</sub>** – Substituintes variados

<b>Benzodiazepínico</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>2</sub>'</b>
Alprazolam	[Anel triazol fusionado]		–H	–Cl	–H
Bromazepam*	–H	=O	–H	–Br	–H
Clonazepam	–H	=O	–H	–NO <sub>2</sub>	–Cl
Diazepam	–CH <sub>3</sub>	=O	–H	–Cl	–H
Estazolam	[Anel triazol fusionado]		–H	–Cl	–H
Funitrazepam	–CH <sub>3</sub>	=O	–H	–NO <sub>2</sub>	–F

*Continua*

<b>Benzodiazepínico</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>2</sub>'</b>
Lorazepam	–H	=O	–OH	–Cl	–Cl
Midazolam	[Anel imidazol fusionado]		–H	–Cl	–F
Oxazepam	–H	=O	–OH	–Cl	–H
Temazepam	–CH <sub>3</sub>	=O	–OH	–Cl	–H

\* No bromazepam, na posição 2' há um nitrogênio e não um carbono.

Fonte: Modificado de MIHIC; HARRIS, 2012.

Segundo Melo (2014), o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos está relacionado com algumas características de seus substituintes:

- Grupo metila (–CH<sub>3</sub>) ligado ao átomo de nitrogênio da posição 1;
- A presença de um grupo retirador de elétrons na posição 7, tal qual o –Cl, –NO<sub>2</sub> ou CF<sub>3</sub>;
- Um grupo fenila (ou grupo fenila com um substituinte eletronegativo como o flúor, na posição *orto*) na posição 5.

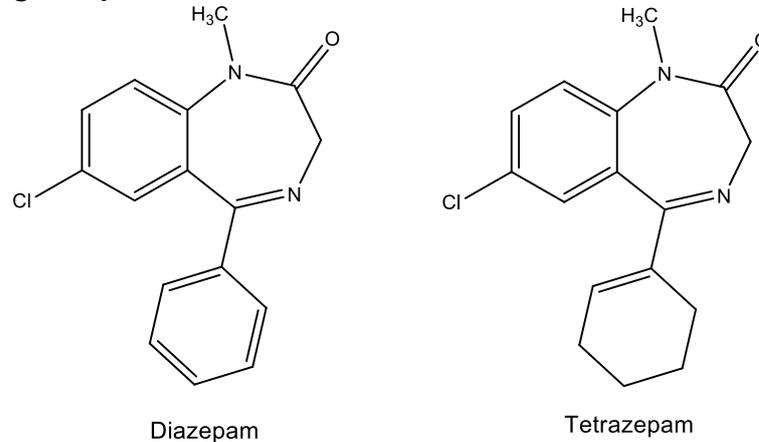
Além disso, Sternbach, em seu artigo sobre a história dos benzodiazepínicos publicado em 1979, explicou que as características de cada fármaco BZD está relacionada com as modificações realizadas em sua estrutura, sendo que algumas modificações são listadas abaixo:

- Grupos aceptores de elétrons na posição 7 do anel A acentuam a atividade;
- É observada a redução da atividade pela presença de grupos doadores de elétrons ou de grupos volumosos na posição 7, além de outras substituições em outras posições deste anel;
- Grupos aceptores de elétrons nas posições 2' ou 6' (*orto/di-orto*) do anel C estão relacionados com o aumento da atividade, no entanto, estes grupos em outras posições no mesmo anel diminuem a atividade;
- No anel B o aumento da atividade está relacionada a presença da metila na posição 1, enquanto que esta atividade é reduzida quando se tem um grupo volumoso (grupos triazol e imidazol).

Um exemplo sobre a alteração do substituinte nos benzodiazepínicos e a consequente redução da atividade pode ser observado entre o diazepam e o

tetrazepam (Figura 5). O grupo arila na posição 5 do diazepam, ausente no tetrazepam, confere a este maior perfil sedativo, hipnótico e anticonvulsivante.

**Figura 5 – Análogos equivalentes da série do BZDs.**



Fonte: Modificado de MELO, 2014.

### 3.2.4 Uso dos BZDs nos transtornos de ansiedade

Nos EUA, a indicação dos BZDs para o tratamento dos transtornos de ansiedade chega a apresentar uma frequência de 55% a 95% em relação às outras classes de ansiolíticos. Essa preferência pelos BZDs pode se dar por, pelo menos, dois fatores: (1) o rápido efeito ansiolítico observado logo após a administração por via oral ou parenteral; e (2) a não observância, inicialmente, do aumento da agitação e insônia, que são características dos antidepressivos (STAHL, 2002; STARCEVIC, 2014). Mesmo assim, o uso dessa classe de fármaco não isenta o surgimento de efeitos adversos, sendo que os principais creditados no tratamento dos transtornos de ansiedade incluem sonolência, tontura e aumento do risco de quedas, este último tendo uma particularidade em idosos (CRASKE et al., 2017).

A eficácia dos benzodiazepínicos foi comprovada no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, do transtorno do pânico e do transtorno de ansiedade social, mediada pelo alprazolam, clordiazepóxido, clonazepam, clorazepato, diazepam, lorazepam e oxazepam (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). Apesar dos BZDs demonstrarem eficácia nos tratamentos agudo e crônico de alguns tipos de transtorno de ansiedade, ainda são considerados agentes de segunda ou terceira linha pela maioria das diretrizes de especialistas. De acordo com Metzler, Mahoney e

Freedy (2016), o cuidado ao prescrever os BZDs como ansiolítico se deve à possibilidade do uso abusivo e da dependência, além de demonstrarem frequentemente sintomas de abstinência e de rebote quando descontinuados subitamente. Entretanto, as recomendações das diretrizes quanto a preferência dos antidepressivos mais recentes em relação aos benzodiazepínicos não se baseiam em estudos comparativos diretos entre essas duas classes, mas sim nos riscos bem conhecidos dos benzodiazepínicos citados logo acima (BERNEY et al., 2008).

### **3.3 Química inorgânica medicinal**

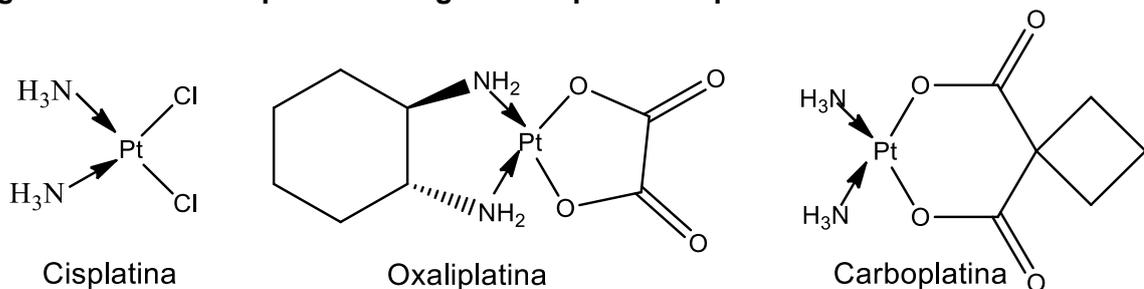
#### **3.3.1 Contexto histórico e aplicabilidade dos compostos inorgânicos medicinais**

A utilização de metais nas práticas médicas acontece há cerca de 5000 anos, no qual os egípcios foram os primeiros povos documentados a usar o cobre para esterilizar a água há 3000 anos a.C. Já os árabes e os chineses usavam ouro na fabricação de medicamentos, acreditando que por ser um metal precioso, haveria de trazer benefícios ao organismo para inúmeras enfermidades (BERALDO, 2005). Entretanto, somente há pouco mais de cem anos foi que a Química Inorgânica começou a ganhar destaque nas áreas médicas devido ao planejamento racional de novos compostos, como a descoberta do  $K[Au(CN)_2]$  (dicianoaurato de potássio) com propriedades bactericidas contra o bacilo da tuberculose por Robert Koch em 1890 (GIELEN; TIEKINK, 2005), de compostos de antimônio para o tratamento da leishmaniose e uma variedade de sais de ouro com atividades antibacterianas (ORVIG; ABRAMS, 1999).

Os precursores da Química Inorgânica Medicinal moderna foram Paul Ehrlich (laureado com o prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1908) e Alfred Werner (laureado com o prêmio Nobel em Química em 1913). Ehrlich demonstrou a eficácia de complexos metálicos de arsênio no tratamento da sífilis, além de ser o primeiro pesquisador a adotar o termo relação estrutura-atividade e de conceituar o termo índice terapêutico. Enquanto Werner, de acordo com Beraldo (2005, p. 5), “é considerado o pai da Química de Coordenação pelo desenvolvimento de sua teoria para explicar a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos”.

Mesmo com as importantes descobertas de Ehrlich e Werner, a grande atenção da Química Medicinal era dada às pesquisas com compostos orgânicos e produtos naturais. Esse panorama, a favor da Química Inorgânica Medicinal, foi mudado com a descoberta, em 1965, do *cis*[(diaminodicloro)platina(II)] ou *cis*[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], chamado de cisplatina por Barnett Rosenberg. A cisplatina foi lançada no mercado dos Estados Unidos no ano de 1978, e até esse ano, o câncer de testículo apresentava uma taxa de mortalidade em torno de 80%. Com a implementação da cisplatina na quimioterapia desse tipo de câncer, os pacientes passaram a apresentar taxa de cura de 95%. A cisplatina e seus análogos que foram obtidos ao longo dos anos, como carboplatina e oxaliplatina (Figura 6), até hoje são usados nos protocolos quimioterápicos para diversos tipos de câncer (BERALDO, 2011).

**Figura 6 – Estrutura química de alguns complexos de platina com atividade antitumoral.**



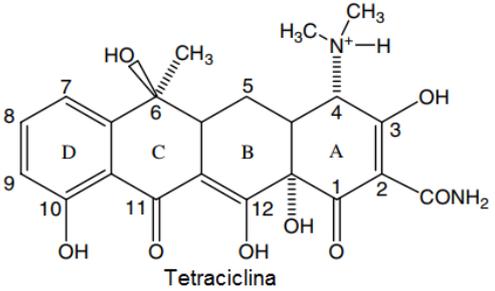
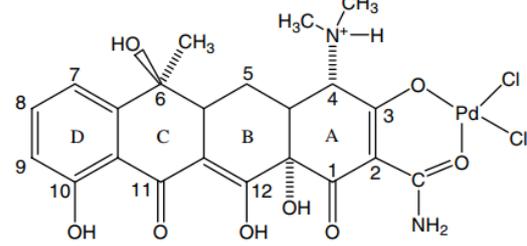
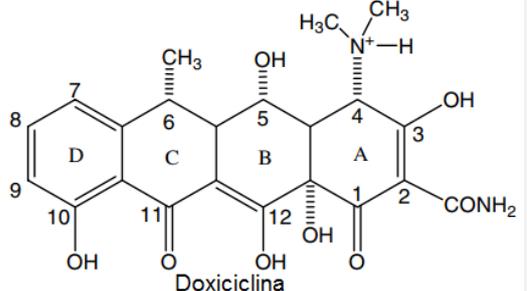
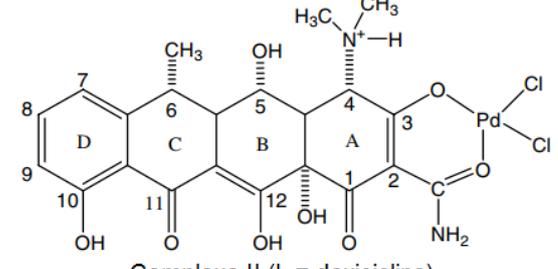
Fonte: CORREIA, 2017.

Nesta perspectiva, um forte concorrente aos estudos de novos fármacos contendo metais – metalofármacos – é o paládio(II), metal da mesma família da platina (II) e, por isso, apresenta significativa analogia na estequiometria de coordenação com este último. A escolha do paládio (Pd) como centro metálico de novos candidatos a metalofármacos ao invés da platina (Pt) também tem relação a maior solubilidade do Pd em água, sendo mais favoráveis seus complexos em meio fisiológico, além de ser mais barato que a Pt, favorecendo o custo-benefício e, ainda, é menos tóxico e apresenta maior reatividade às proteínas plasmáticas (GORBACHEVA et al., 2008; KASHANIAN et al., 2008).

Complexos de paládio(II) coordenados à tetraciclina e à doxiciclina (Tabela 3) demonstraram maior atividade antibacteriana quando comparados com seus respectivos fármacos livres em linhagem resistente de *Escherichia coli* (HB101/pBR322). O complexo de paládio tendo como ligante a tetraciclina é

dezesseis vezes mais potente do que do fármaco livre, enquanto o complexo de paládio coordenado com a doxiciclina demonstrou-se duas vezes mais potente do que o ligante livre. No mesmo estudo, não houve diferença quando comparadas a concentração inibitória mínima (CIM) dos mesmos complexos e dos seus respectivos ligantes livre na linhagem sensível de *E. coli* HB101 (GUERRA et al., 2005).

**Tabela 3 – Concentração inibitória mínima das tetraciclinas livres e dos seus respectivos complexos com paládio(II) em linhagens de *E. coli* sensível (HB101) e resistente aos agentes (HB101/pBR322).**

Agentes antibacterianos	CIM ( $\mu\text{M}$ )	
	Linhagem HB101	Linhagem HB101/pBR322
 <p>Tetraciclina</p>	2,08	266,20
 <p>Complexo I (L = tetraciclina)</p>	2,08	16,60
 <p>Doxiciclina</p>	2,08	66,50
 <p>Complexo II (L = doxiciclina)</p>	2,08	33,30

Fonte: Modificado de GUERRA et al., 2005 (L = ligante).

Outra classe de compostos que merecem atenção são os complexos de paládio(II) com tiossemicarbazonas, como os complexos de fenilacetaldéido de tiossemicarbazona do tipo  $[Pd(HL)Cl_2]$ , têm se demonstrado ativos em células tumorais resistentes à cisplatina (QUIROGA et al., 1998). Há relatos que esses complexos vêm mostrando:

- Citotoxicidade para uma diversidade de linhagens tumorais resistentes à cisplatina;
- Bom índice terapêutico e concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) menor para células resistentes à cisplatina do que para as células normais; e
- Citotoxicidade superior à dos fármacos etoposídeo e adriamicina clinicamente usados.

### 3.3.2 Química do paládio

O paládio foi descoberto por William Hyde Wollaston, em 1803, do minério bruto de platina e é um metal de coloração branco-prateada de número atômico 46 e de massa atômica igual a  $106,42 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , é um metal de transição que faz parte do grupo 10, no 5º período, bloco *d* da tabela periódica. Quando combinado com outros elementos, o paládio exibe seu estado de oxidação 0, +1, +2 e +4, sendo o +2 o mais estável; e recentemente, foram sintetizados compostos no qual o paládio exibia estado de oxidação +6 (IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2011).

Faz parte da série dos elementos do grupo da platina (EGPs), juntamente com irídio (Ir), platina (Pt), ródio (Rh), rutênio (Ru) e ósmio (Os). Sendo o metal mais reativo entre EGPs, o menos denso ( $d = 12,02 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) e o de menor ponto de fusão ( $T_f = 1.554 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Há seis isótopos de ocorrência natural do paládio:  $^{102}\text{Pd}$  (1,02%),  $^{104}\text{Pd}$  (11,14%),  $^{105}\text{Pd}$  (22,33%),  $^{106}\text{Pd}$  (27,33%),  $^{108}\text{Pd}$  (26,46%) e  $^{110}\text{Pd}$  (11,72%) (LEE et al., 1999; SILVA; GUERRA, 2011).

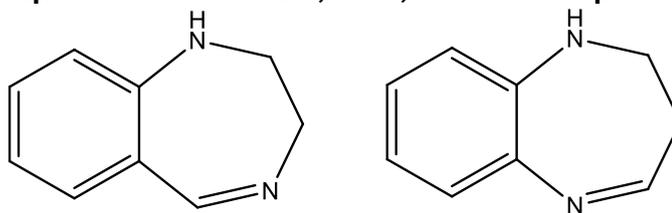
Em consequência de sua semelhança química com a platina, muitos estudos têm sido realizados com complexos de paládio com atividade antitumoral, anti-infecciosa e, ainda, promissores agentes anticonvulsivantes, entretanto ainda que

intensas pesquisas, estes complexos ainda não são usados clinicamente (SILVA; GUERRA, 2011; CORREIA, 2017).

### 3.4 Compostos metálicos derivados de benzodiazepínicos

Na literatura há diversos complexos metálicos derivados de 1,4-benzodiazepínicos e dos 1,5-benzodiazepínicos (Figura 7), sendo empregados como candidatos a novos tratamentos para uma gama de patologias. Os estudos com essa classe de compostos são bem conhecidos devido seu perfil complexante (SRINIVAS et al., 2008).

**Figura 7 – Estrutura química básica dos 1,4- e 1,5-benzodiazepínicos, respectivamente.**

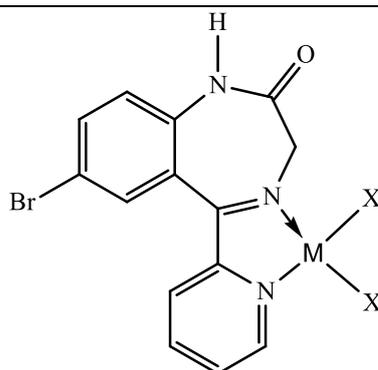


Fonte: CORREIA, 2017.

Na literatura são relatados diversos estudos de complexos metálicos derivados de 1,4-benzodiazepinas, com diferentes metais. Dentre eles, Spencer e colaboradores descrevem complexos de paládio(II) com esses derivados sendo usados para a avaliação da ação citotóxicas em testes *in vitro* para determinada linhagem de células tumorais e, também, sendo usados como inibidores das Catepsinas B que, dentre várias consequências exercidas, estão envolvidas na progressão do tumor (SPENCER et al., 2009). Vale ressaltar o estudo realizado por nosso grupo de pesquisa que avaliou o efeito anticonvulsivante de complexos de metálicos derivados do diazepam, um 1,4-benzodiazepínico, de sais de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  e  $\text{PdCl}_2$ , nas suas formas diméricas e monoméricas (BARROS et al., 2016).

Alguns complexos derivados do bromazepam encontrados na literatura podem ser observados na tabela 4.

**Tabela 4 – Complexos metálicos derivados do bromazepam descritos na literatura.**



Autor (es), ano de publicação	Metal Ligante tipo-X	Descrição do estudo
Benedetti et al., 1987.	M = Pt(II) X = Cl	Estudar a estrutura e do espectro do complexo.
Antolini et al., 1991.	M = Pt(II) e Pd(II) X = Cl	Estudar as propriedades dos complexos nas suas formas sólidas e em solução.
Antolini et al., 1992.	M = Pd(II) X = Cl	Sintetizar e caracterizar o complexo, por análise de Raios-X no estado sólido, e estudar a reatividade do mesmo em DMSO.
Cusumano; Giannetto, 1994.	M = Pt(II) e Pd(II) X = Cl	Estudar as propriedades cinéticas dos complexos.
Hernández-Méndez; González-Pérez; González-Martín, 1985.	M = Ni(III)	Estudar a espectrofotometria do complexo, além de determinar a estequiometria e constante de dissociação.
Sultan; Hassan; Ibrahim, 1999.	M = Fe(II)	Estudar a espectrofotometria do complexo.
Franchini et al., 1995. M(1,4-BDZ) <sub>x</sub> Cl <sub>3</sub>	M = La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III) ou Eu(III) X = Cl	Sintetizar, caracterizar e avaliar <i>in vitro</i> atividade citostática e antiviral dos complexos.

Fonte: AUTOR, 2018.

Dos estudos citados na tabela acima, o único que avalia atividade biológica é o de Franchini e colaboradores (1995): avalia a atividade citostática e antiviral de complexos de lantânio(III), cério (III), praseodímio(III), neodímio(III) e de európio(III) derivados de BZDs, inclusive do bromazepam.

## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 Atividades desenvolvidas e locais de realização

As atividades desenvolvidas neste trabalho e seus locais de realização encontram-se na tabela abaixo.

**Tabela 5 – Locais de realização das atividades experimentais.**

Atividades	Locais de realização
Síntese do complexo [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ] e Análise por espectrometria de massas	Laboratório do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB/UFAL)
Análises de espectrometria de ressonância magnética nuclear	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do IQB/UFAL
Análises por espectrometria na região do infravermelho médio	Laboratório da Central Analítica do IQB/UFAL
Avaliação da atividade ansiolítica do complexo [(BMZ)PdCl <sub>2</sub> ]	Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrada - LNFI/ICBS/UFAL

Fonte: AUTOR, 2018.

### 4.2 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solvente utilizados na síntese do complexo estão presente na tabela abaixo, com sua procedência e a fórmula molecular.

**Tabela 6 – Procedência e fórmula molecular dos reagentes e solventes.**

Reagentes e Solventes	Fórmula Molecular	Origem
Cloreto de lítio	LiCl	Acros Organics
Cloreto de paládio (II)	PdCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Bromazepam	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> O	Doação da farmácia de manipulação A Fórmula
Metanol P.A.	CH <sub>4</sub> O	Dinâmica

Fonte: AUTOR, 2018.

### 4.3 Instrumentação para caracterização

#### 4.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras foram preparadas em tubos para RMN e solubilizadas em solvente deuterado apropriado (DMSO- $d_6$ , Sigma-Aldrich). As amostras foram analisadas por colaboradores do laboratório de RMN/IQB/UFAL, sob a coordenação do Prof. Dr. Edson de Souza Bento. O equipamento utilizado para as análises foi o Espectrômetro Bruker Avance 600. Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente e operando na frequência de 600,09 MHz para os núcleos de  $^1\text{H}$  e de 150,89 MHz para os núcleos de  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram medidos usando-se como padrão interno o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0$ ).

#### 4.3.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho médio (IV)

As análises por espectroscopia na região do infravermelho médio foram realizadas no Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, modelo IRPrestige-21, utilizando pastilhas de KBr contendo cerca de 1% da amostra. Os espectros abrangeram as regiões de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Espectrometria de massas

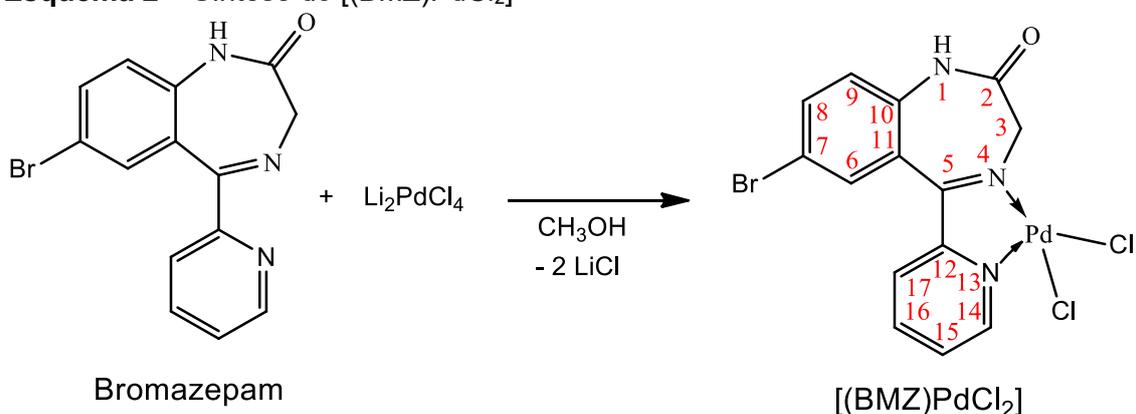
A análise de espectrometria de massas (com método de ionização por impacto de elétrons) foi realizada junto ao Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR), UFAL, Maceió/AL. A análise da amostra foi feita por injeção direta, utilizando-se um Espectrômetro de Massas GCMS-QP2010 Plus/Shimadzu.

### 4.4 Procedimentos de síntese do $[\{2-(7\text{-Bromo-2-oxo-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin-5-il)piridinil-}\kappa^2\text{-N,N}\}\text{cloropaládio(II)}], [(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$

Inicialmente, preparou-se uma solução metanólica de  $\text{Li}_2\text{PdCl}_4$  a partir do seguinte procedimento: solubilizou-se o cloreto de lítio (0,1060 g; 2,50 mmol) em

metanol (10 mL) e essa solução foi adicionada a um segundo frasco contendo cloreto de paládio(II) (0,1773 g; 1,00 mmol) que ficou sob agitação e aquecimento ( $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 10 min. Logo após, filtrou-se o material, recuperando-se a solução de coloração castanho-escura de  $\text{Li}_2\text{PdCl}_4$ . A essa solução foi adicionado o pré-ligante Bromazepam, (7-Bromo-2-oxo-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepin-5-il)-2-piridinil (0,3162 g; 1,00 mmol) sob agitação, seguido de aquecimento sob refluxo ( $T = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 1 hora e 30 minutos, Esquema 2.1. Após esse tempo, separou-se o precipitado do sobrenadante por filtração. O sólido obtido foi lavado com metanol até que o filtrado ficasse incolor. Por fim, secou-se o material em uma bomba de alto vácuo, obtendo-se assim um sólido amarelo (0,3701 g; 0,75 mmol) em 75% de rendimento.

#### Esquema 2 – Síntese do $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$



Fonte: AUTOR, 2018.

Fórmula molecular:  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrCl}_2\text{N}_3\text{OPd}$

Massa molar:  $493,84\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Faixa de decomposição:  $310 - 320\text{ }^{\circ}\text{C}$

Solubilidade (1 mg/mL): Solúvel em dimetilsulfóxido;

Parcialmente solúvel em água, metanol, diclorometano, clorofórmio e tolueno;

Insolúvel em hexano.

#### 4.5 Avaliação da atividade ansiolítica

A avaliação da atividade ansiolítica foi realizada por colaboradores do LNFI/ICBS/UFAL, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, através dos seguintes

métodos: (1) teste do labirinto em cruz elevado e (2) Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito do tipo ansiolítico.

Foram utilizados cento e quarenta (140) camundongos Swiss fêmeas adultos (aproximadamente 35 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas – BIOCEN/UFAL. Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 h (7 h início do período claro), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos com os animais foram realizados segundo a legislação em vigor, cumprindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasília-DF, 3 de fevereiro de 2016) e mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA-UFAL), com o Parecer nº 22/2017.

#### 4.5.1 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Os animais foram tratados via I.P. com: salina (NaCl 0,9%; Grupo controle); bromazepam (0,1 mg/kg; Grupo controle positivo); ou complexo metálico derivado do bromazepam [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] (0,5, 5 e 50 µg/kg). Passados 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais foram colocados na plataforma central do aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e o seu comportamento foi avaliado durante 5 min. Foram registradas as seguintes medidas comportamentais: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados (considera-se a entrada em um dos braços quando a maior parte do corpo do animal está dentro do respectivo braço), medidas etológicas de avaliação de risco tais como imersões de cabeça (*head-dipping*), estiramentos corporais (*stretch-attend postures*) e comportamento de levantar (*rearing*). Ao final do teste com cada animal, o LCE foi limpo com álcool etílico 10%. Todo o procedimento foi filmado com uma câmera posicionada aproximadamente 1 m acima do centro do LCE.

O número de animais por grupo ou dose/tratamento foi de 10. Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos

pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a porcentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Para os demais parâmetros observados foi feita a soma simples das frequências obtidas.

#### 4.5.2 Teste do campo aberto (CA)

Imediatamente após passarem pelo LCE, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (CA) para avaliação da atividade locomotora espontânea. Foi registrado o número de cruzamentos e de levantar (*rearing*) de cada animal durante 5 min. Dessa forma, este experimento utilizou os mesmos animais/tratamentos do teste do labirinto em cruz elevado.

Com isso, o planejamento estatístico deste experimento não se aplica, uma vez que os mesmos animais/tratamentos do teste do labirinto em cruz elevado foram utilizados para a execução deste experimento.

#### 4.5.3 Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito do tipo ansiolítico

Os animais foram pré-tratados via I.P. com salina (NaCl 0,9%) ou flumazenil (2 mg/kg). Passados 15 minutos, os animais foram tratados com salina ou [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] (na melhor dose ansiolítica observada no experimento do LCE) formando os seguintes grupos experimentais: salina+salina (grupo controle); salina+[(BMZ)PdCl<sub>2</sub>]; Flumazenil+salina; e Flumazenil+[(BMZ)PdCl<sub>2</sub>]. Após 30 minutos do último tratamento, os animais foram submetidos ao LCE para avaliação dos comportamentos relacionados com medo e ansiedade durante 5 min.

### 4.6 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram inicialmente organizados em tabelas no Microsoft Office Excel® Version 2013. Estes dados foram plotados no programa GraphPad Prism® Version 7 para obtenção dos gráficos. Para a realização das

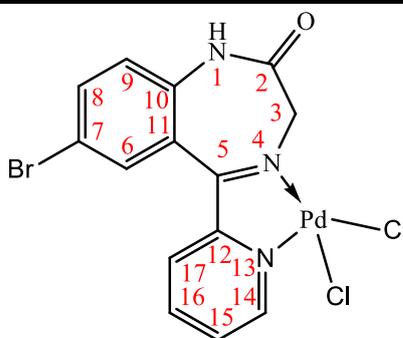
análises estatísticas dos dados, foi utilizado o teste ANOVA de um fator assumindo um valor de  $p < 0,05$ . Quando os dados apresentaram significância estatística utilizou-se o pós-teste de Bonferroni.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>]

A completa atribuição dos hidrogênio e carbonos para o complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] se encontra na Tabela 7 e nas figuras 8, 9 e 10. Para maior entendimento sobre a caracterização da referida estrutura, segue após a tabela abaixo a discussão sobre como a atribuição dos mesmos foi realizada.

**Tabela 7 – Sinais de RMN para <sup>1</sup>H e para <sup>13</sup>C do [{2-(7-Bromo-2-oxo-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin5-il)piridinil-κ<sup>2</sup>-N,N}cloropaládio(II)], [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], em DMSO-d<sub>6</sub>.**



nº	<sup>1</sup> H Deslocamento em ppm* (integral e multiplicidade)	<sup>13</sup> C Deslocamento em ppm
1	11,14 (1H, s)	—
2	—	174,7
3	3,98 e 5,33 (2H, dois d)	56,2
5	—	168,7
6	8,04 (1H, d)	133,3
7	—	115,9
8	7,95 (1H, dd)	137,1
9	7,28 (1H, d)	124,5
10	—	139,8
11	—	123,2
12	—	156,2

*Continua*

**Tabela 7 – Sinais de RMN para  $^1\text{H}$  e para  $^{13}\text{C}$  do  $[\{2-(7\text{-Bromo-2-oxo-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin-5-il)piridinil-}\kappa^2\text{-N,N}\}\text{cloropaládio(II)}], [(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$ , em  $\text{DMSO-d}_6$  (continuação)**

nº	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
	Deslocamento em ppm* (integral e multiplicidade)	Deslocamento em ppm
14	9,16 (1H, dd)	151,2
15	7,91 (1H, m)	129,4
16	8,31 (1H, td)	141,8
17	7,77 (1H, d)	130,7

\* ppm = partes por milhão

Fonte: AUTOR, 2018.

### 5.1.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ (RMN de $^1\text{H}$ )

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto  $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$  (Figura 8), observam-se um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  11,14 relacionado ao NH diazepínico e dois dubletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  3,98 e outro em  $\delta_{\text{H}}$  5,33 referentes aos dois hidrogênios ligados ao carbono 3. Diferentemente do que é observado no ligante livre, nos quais os dois prótons  $\text{H}_3$  ressoam com apenas um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,21 (ver Apêndice A), no complexo os hidrogênios ligados à  $\text{C}_3$  são não equivalentes, ou seja, aparecem tal qual um característico dubleto AB, sugerindo que o ligante coordenado ao paládio(II) é congelado em uma conformação limitante (CUSUMANO; GIANNETTO, 1994). Essa não equivalência também pôde ser observada por Aversa et al. (1991) com complexos de platina(II) com o mesmo ligante.

Foi possível observar também os sinais típicos atribuídos aos hidrogênios aromáticos do fragmento piridinil-benzodiazepínico com deslocamentos químicos entre  $\delta_{\text{H}}$  9,16-7,28 (ver tabela 7). O sinal referente ao  $\text{H}_{17}$  desloca para um valor de campo alto ( $\delta_{\text{H}}$  7,77) quando comparado ao valor de  $\delta_{\text{H}}$  8,03 referente ao mesmo hidrogênio no ligante livre. Além disso, as outras ressonâncias da piridina também são afetadas de modo que os sinais atribuídos aos hidrogênios  $\text{H}_{14}$  ( $\delta_{\text{H}14}$  9,16),  $\text{H}_{15}$  ( $\delta_{\text{H}}$  7,91) e  $\text{H}_{16}$  ( $\delta_{\text{H}}$  8,31) foram deslocados para campo baixo no complexo, quando comparado aos sinais atribuídos aos mesmos hidrogênios no ligante livre (ver dados de deslocamento no Apêndice A). Esses resultados estão de acordo com o relato de Cusumano e Giannetto (1994), sendo atribuídos esses deslocamentos para campo

inferior a distância do hidrogênio piridínico em relação ao paládio coordenado ao ligante. Essas informações revelam robustamente que a coordenação do bromazepam ao paládio(II) por meio do N<sub>4</sub> e do N<sub>13</sub> é preservada na solução de dimetilsulfóxido.

### 5.1.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C (RMN de <sup>13</sup>C)

A figura 9 mostra o espectro de RMN de <sup>13</sup>C do complexo em questão. Podem ser observados os deslocamentos químicos indicados nos seguintes sinais: em  $\delta_C$  174,7 atribuído ao carbono carbonílico, em  $\delta_C$  168,7 relacionado ao carbono da imina (C<sub>5</sub>) e sinais entre  $\delta_C$  156,2-115,9 referentes aos carbonos em aromáticos.

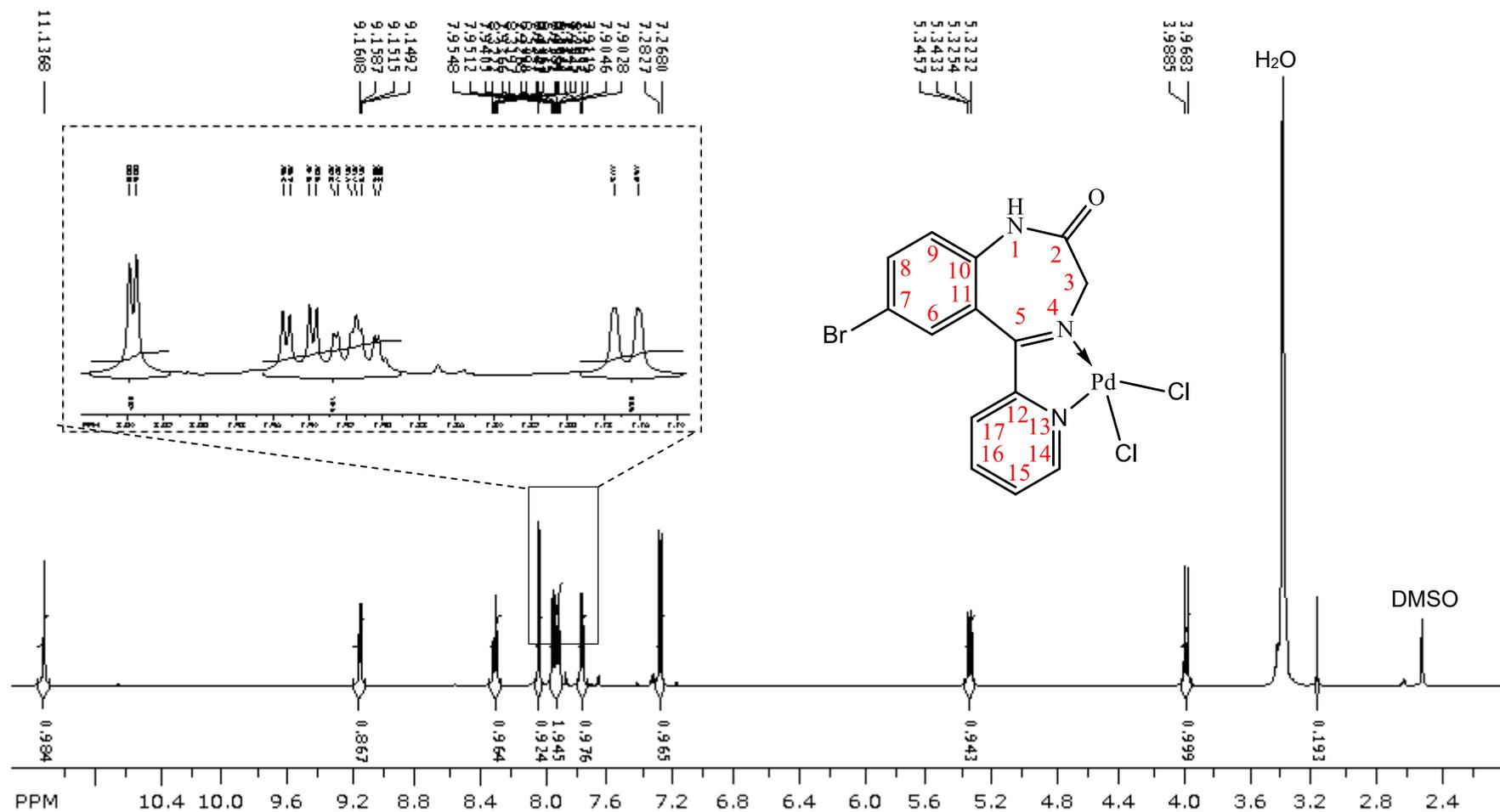
Os sinais observados mostram similaridade em relação aos observados com o ligante livre (ver Apêndice B), além de apresentarem similaridade dos valores de deslocamento para complexo de platina(II) derivados do bromazepam estudado por Aversa e cols. (1991). Os sinais atribuídos aos carbonos da carbonila amídica e aos presentes nos anéis aromáticos no composto [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] estão de acordo com a literatura, a qual mostra o deslocamento do <sup>13</sup>C no intervalo de  $\delta$  185-155 e  $\delta$  110-175, respectivamente.

### 5.1.3 Mapa do contorno gerado a partir do experimento HSQC (<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H) em DMSO-d<sub>6</sub>.

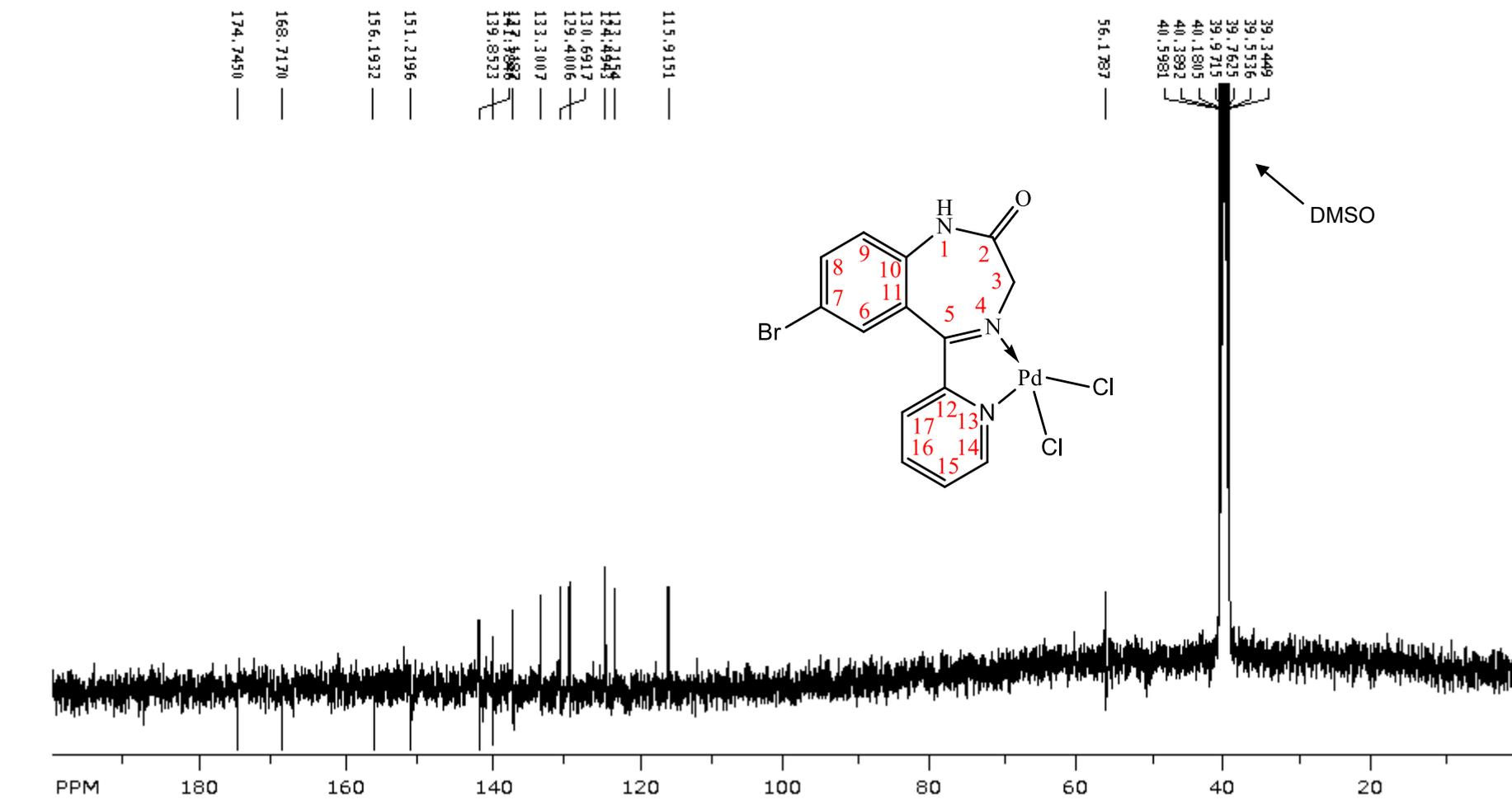
Através do experimento HSQC (Figura 10) foi possível, até por não conter sobreposição de sinais na região aromática, estabelecer correlações que possibilitaram estabelecer o padrão de conectividade dos sinais, principalmente na região aromática, entre <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H que puderam ser evidenciados: um sinal em  $\delta_C$  56,2 mostrou correlação com dois dubletos, sendo um em  $\delta_H$  3,98 e outro em  $\delta_H$  5,33, confirmando a presença de unidade metilênica na posição 3 da estrutura do complexo; outros sinais em  $\delta_C$  130,7; 141,8 e 129,4 correlacionados aos  $\delta_H$  7,77 (dubleto); 8,31 (triplo dubleto) e 7,91 (multiplete), confirmando as correlações C-H do grupo piridinil referente às posições 17, 16 e 15, respectivamente. Um sinal em  $\delta_C$  137,1

correlacionado com o duplo dubleto em  $\delta_H$  7,95, outro em  $\delta_C$  133,3 correlacionado ao dubleto em  $\delta_H$  8,04 e ainda um sinal em  $\delta_C$  124,5 correlacionado ao dubleto em  $\delta_H$  7,28 confirma as posições 8, 6 e 9 do anel benzênico. O resultado obtido via experimento HSQC permitiu estabelecer, juntamente com as outras técnicas de caracterização deste estudo, o deslocamento químico dos átomos de carbono e hidrogênio que auxiliou à propor a estrutura do complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>].

Figura 8 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do  $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$  em  $\text{DMSO-d}_6$ .

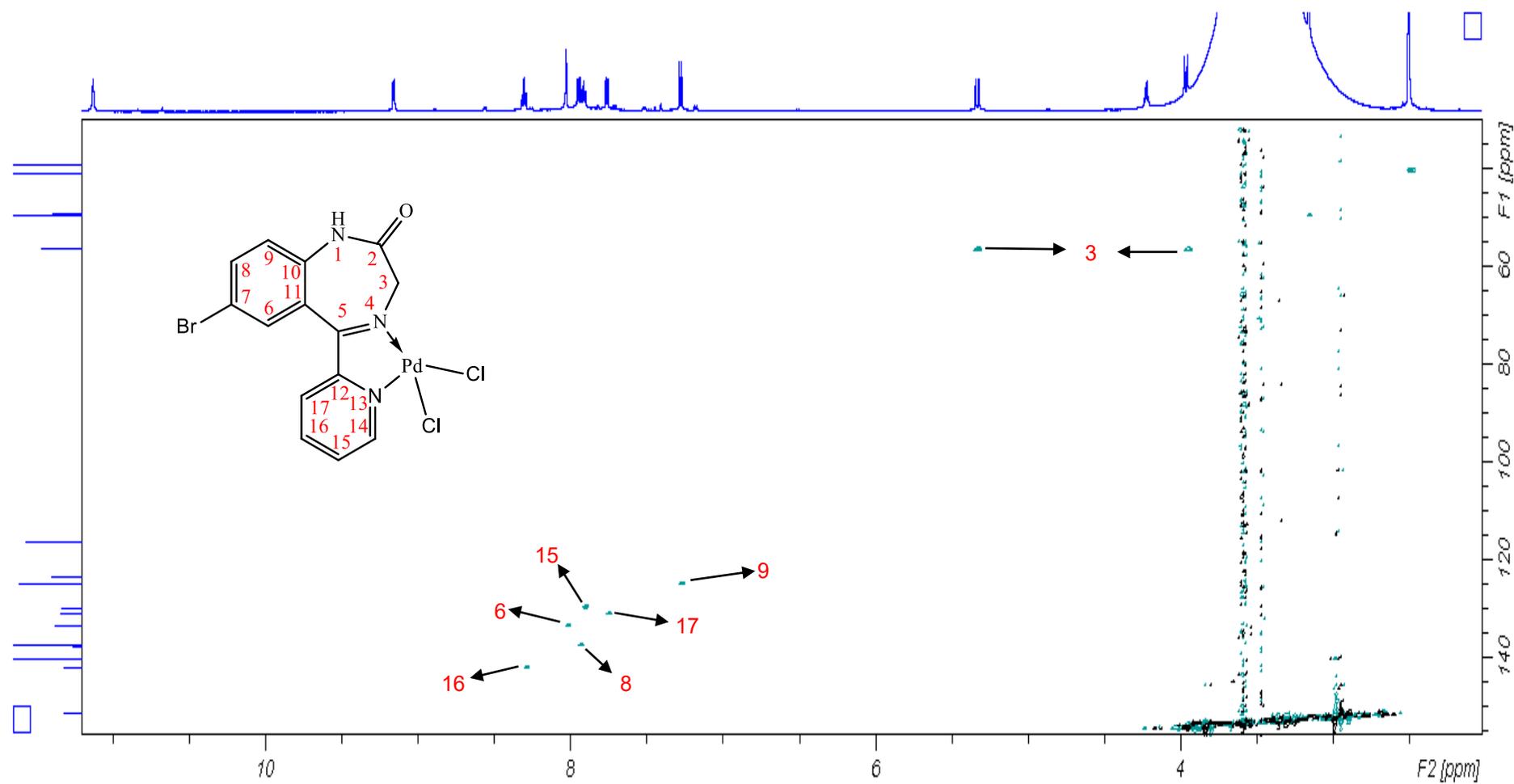


Fonte: AUTOR, 2018.

Figura 9 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do  $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$  em  $\text{DMSO-d}_6$ .

Fonte: AUTOR, 2018.

Figura 10 – Mapa do contorno gerado a partir do experimento HSQC ( $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ) do  $[(\text{BMZ})\text{PdCl}_2]$  em  $\text{DMSO-d}_6$ .



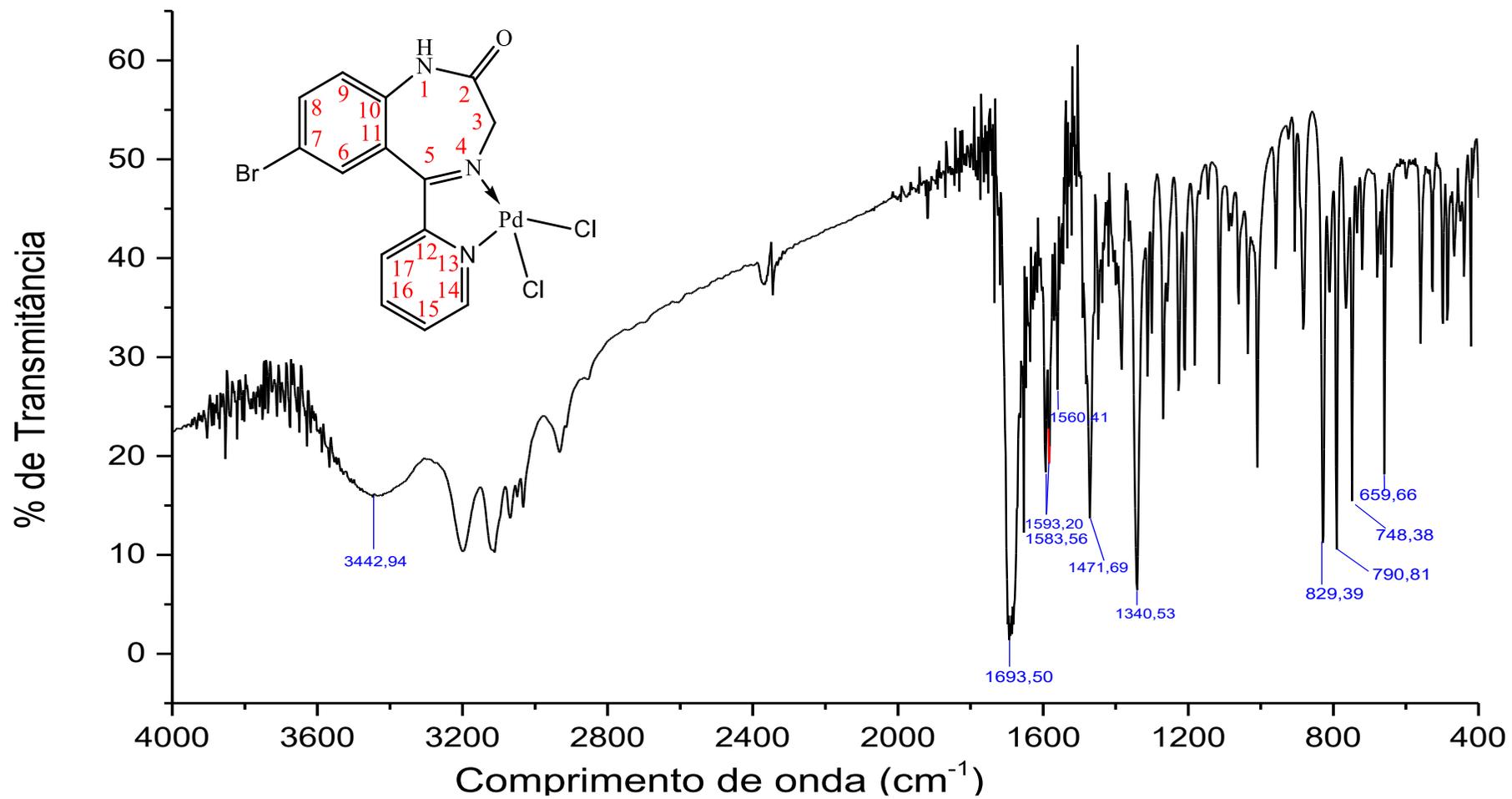
Fonte: AUTOR, 2018.

#### 5.1.4 Espectroscopia no Infravermelho Médio (IV)

A partir da análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 11), foi possível observar algumas frequências para o complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], comparando-as com as do ligante livre disponível no estudo de Mansour (2017). Dentre as frequências, foi possível aferir (em valores absolutos) a(s):

- Frequência de estiramento referente à ligação N—H em 3443 cm<sup>-1</sup>;
- Frequência de estiramento referente à subunidade carbonila ( $\nu$  C=O) em 1694 cm<sup>-1</sup>;
- Frequências de estiramento 1593, 1584 e 1560 cm<sup>-1</sup> possivelmente relacionada à ligação C=C do anel;
- Frequência de estiramento possivelmente relacionada à ligação C—N em 1341 cm<sup>-1</sup>;
- Frequências de dobramento 829, 791, 748 e 660 cm<sup>-1</sup> possivelmente relacionadas às ligações C—H aromáticas fora do plano.

Mesmo o espectro de absorção na região do IV mostrar outras frequências (Figura 11), as que foram citadas acima são características para o composto [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>].

Figura 11 – Espectro na região do Infravermelho do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>].

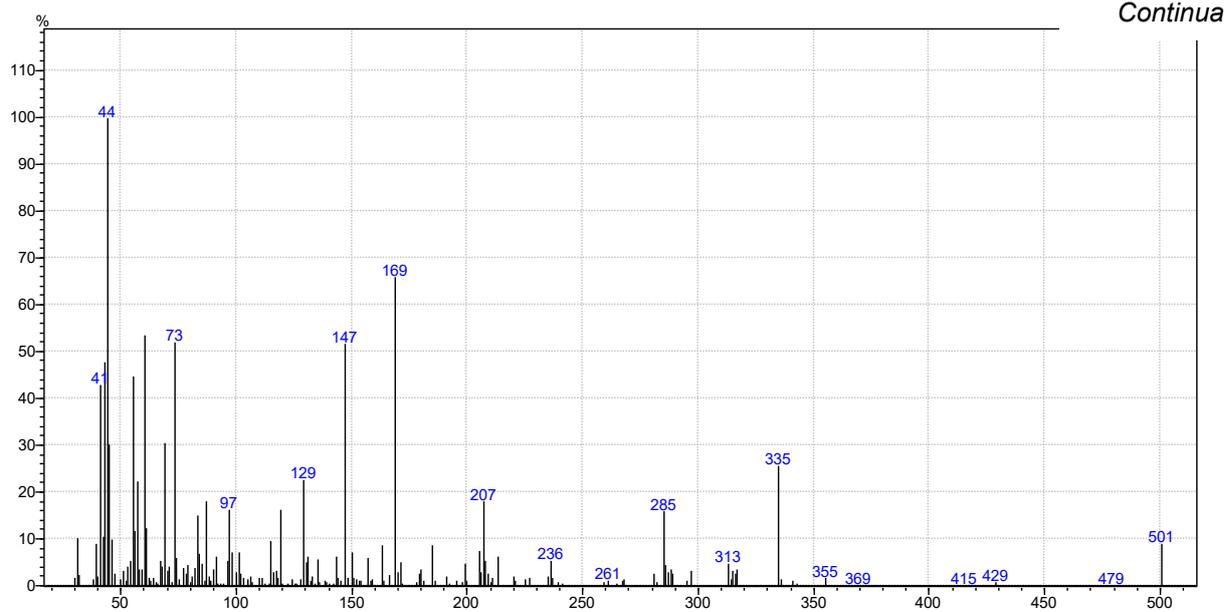
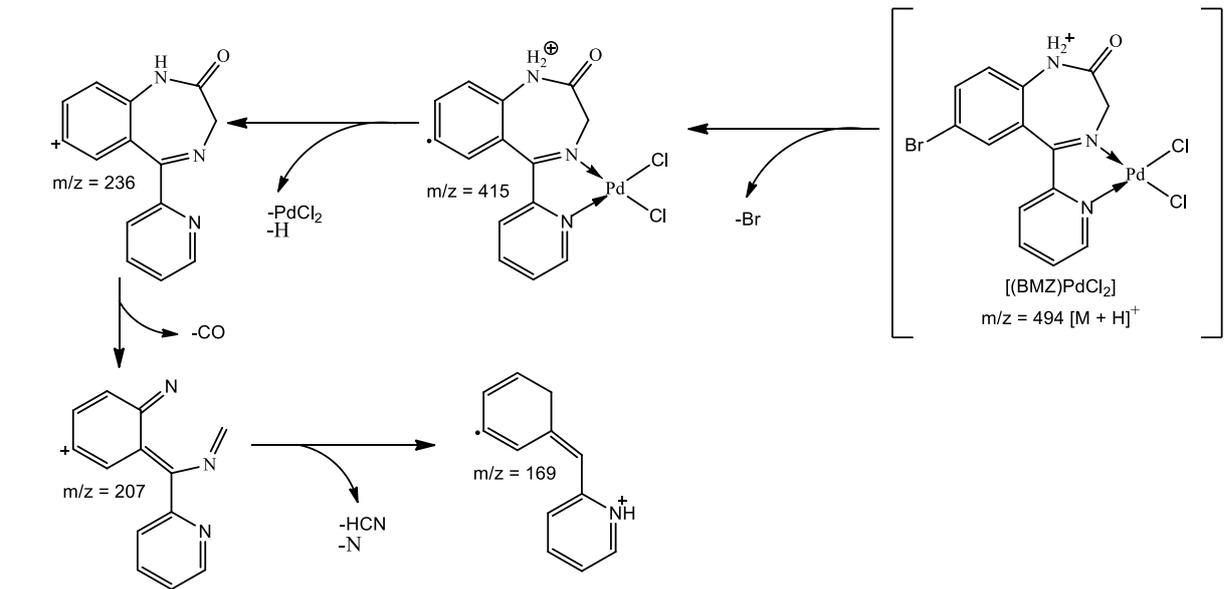
Fonte: AUTOR, 2018.

#### 5.1.4 Espectrometria de massas (EM)

A espectrometria de massas possibilita a obtenção da informação estrutural, da massa molar e alta seletividade do analito. No espectro de massas não foi possível obter o pico do íon molecular referente ao [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] protonado. Esse fato pode ser justificado por um dos maiores problemas observados na aplicação do método de ionização por impacto de elétrons na EM. Durante esse método de ionização, o analito é inicialmente bombardeado com energia geralmente de 10 eV para a detecção do íon molecular, na fase gasosa, e o restante da energia (aproximadamente 60 eV) gera rapidamente fragmentação do analito. Uma vez o analito sendo fragmentado de forma bastante rápida, pode ocorrer a não observação do íon molecular no espectro (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A ionização em modo positivo e a fragmentação, produzida pela energia do gás de colisão (Hélio), além do espectro de massas do complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] estão apresentados na figura 12. O espectro forma um íon precursor de  $m/z = 494$  (pico não presente no espectro, obtido teoricamente no ChemDraw), que é provavelmente da ionização da massa 494 Da (daltons), acrescida de hidrogênio ionizável  $[M + H]^+$ . É observada a fragmentação da perda do átomo de Br (formando o  $m/z = 415$ ), seguida da quebra da espécie neutra PdCl<sub>2</sub>, resultando o cátion de  $m/z = 236$ . Outra quebra ocorre devido à perda da espécie neutra CO (formando o  $m/z = 207$ ) resultando na perda do anel de sete membros para uma estrutura de seis membros ressonante estabilizada. Ainda pode ser vista outra fragmentação, devido à perda da espécie neutra HCN, além do N, formando a espécie protonada de  $m/z = 169$ .

Figura 12 – Espectro de massas do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] por CG-EM e a rota de fragmentação proposta.



Fonte: AUTOR, 2018.

O primeiro fragmento observado no espectro do complexo apresentou  $m/z = 415$ , correspondendo à quebra da ligação entre o benzeno e o átomo de bromo do complexo. A ausência do bromo neste fragmento e nos seguintes é demonstrada pela presença de picos individuais, visto que sua presença nesses fragmentos seria caracterizada pela presença de pares de picos (algumas vezes chamados de dubletos), pois o bromo existe naturalmente em duas formas isotópicas (a abundância natural do bromo de massa 81 é 98,0% da do <sup>79</sup>Br) (PAVIA et al., 2015).

O perfil de fragmentação referente à perda das espécies neutras CO e HCN no complexo, gerando os cátions com  $m/z = 207$  e  $169$ , respectivamente, é semelhante ao observado com a do ligante bromazepam realizado neste trabalho (ver apêndice D) e por outros trabalhos de Chèze; Villain; Pépin (2004), de Sampaio (2007) e de Almeida (2012). A via de fragmentação do bromazepam foi confirmada por: Laurito et al. (2004); Villain et al. (2005); e Kim et al. (2011).

## 5.2 Avaliação da atividade biológica do complexo de paládio(II)

### 5.2.1 Avaliação da atividade ansiolítica do composto [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] através do teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) mediada pela via GABAérgica

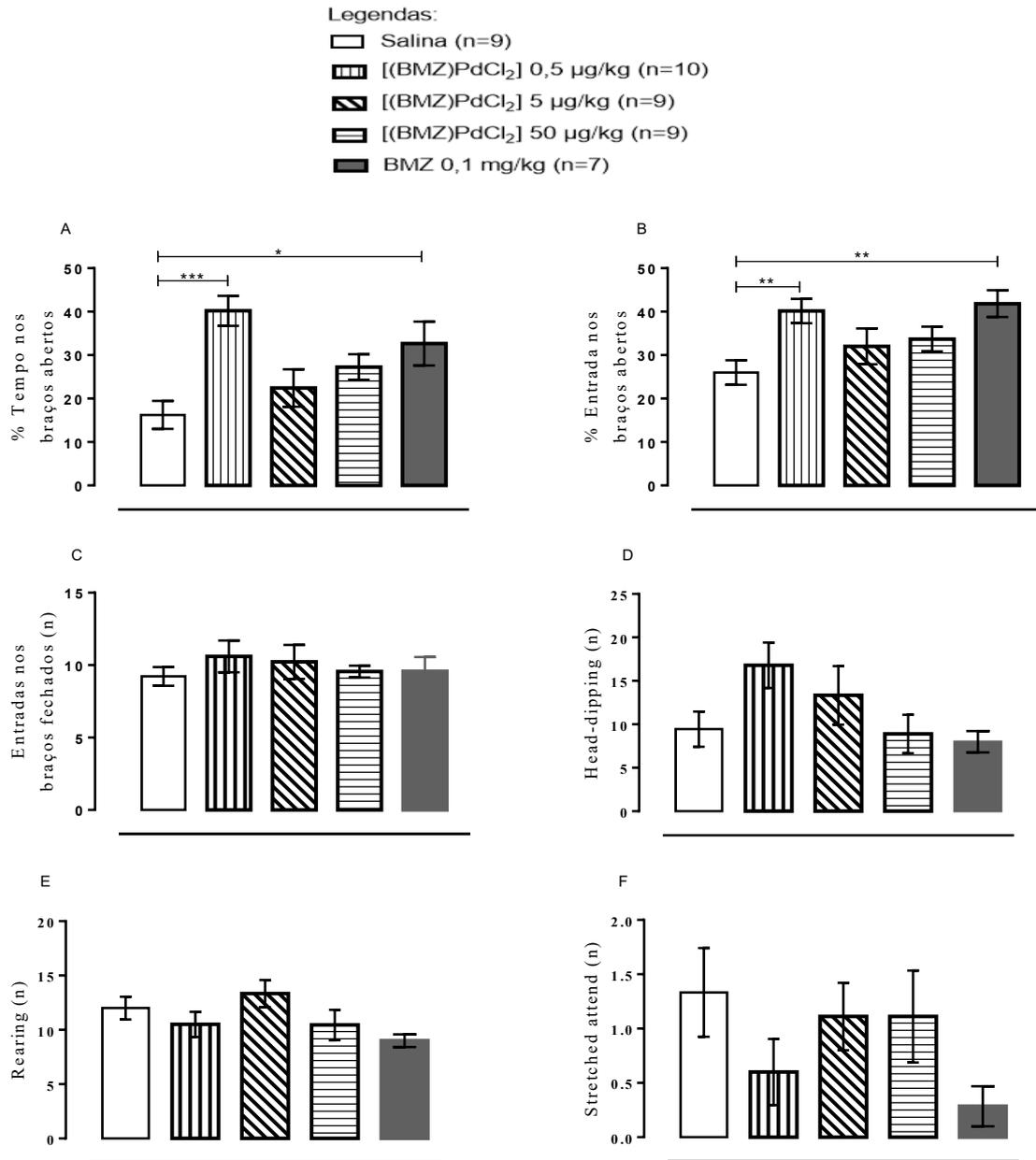
A figura 13 ilustra o efeito do tratamento com [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], nas doses de 0,5, 5 ou 50 µg/kg, em alguns parâmetros no teste do LCE correlacionados tanto com a atividade tipo ansiolítica quanto com a atividade locomotora e explanatória.

A ANOVA de um fator mostrou que há um aumento significativa na frequência do tempo de permanência (Figura 13A) e de entradas (Figura 13B) dos camundongos nos braços abertos do labirinto quando submetidos à dose de 0,5 µg/kg do complexo ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) em relação ao grupo salina. Esses parâmetros também estavam estatisticamente aumentados no grupo tratado com bromazepam 0,1 mg/kg (controle positivo,  $p < 0,05$ ).

Nenhuma das doses testadas neste estudo interferiu nos demais parâmetros do LCE:

- O número de entradas nos braços fechados (Figura 13C,  $p = 0,8127$ );
- O número de *head-dipping* (“imersão de cabeça”, Figura 13D,  $p = 0,0811$ );
- O número de *rearing* (“comportamento de levantar”, Figura 13E,  $p = 0,1331$ );
- O número de *stretched attend* (“comportamento de estiramento corporal”, Figura 13F,  $p = 0,2477$ ).

**Figura 13 – Efeito da salina (NaCl 0,9%), do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], 0,5, 5 e 50 µg/kg ou do Bromazepam (BMZ) 0,1 mg/kg, administrados I.P. 30 minutos antes da sessão experimental sobre o comportamento exploratório de camundongos submetidos ao teste LCE<sup>a</sup>.**



<sup>a</sup> As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle (Salina), utilizando ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni (BMZ = Bromazepam e [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] = complexo de paládio(II) com Bromazepam).

Fonte: AUTOR, 2018.

O teste do labirinto em cruz elevado consiste em um dos modelos mais amplamente usado em pesquisas de ansiedade em ratos e camundongo, que tem como fundamento as respostas incondicionadas a ambientes eventualmente perigosos. Sendo um dos testes de maior validade e bem documentado para a avaliação da resposta ansiolítica e ansiogênica de agentes farmacológicos, drogas de

abuso e hormônios (PELLOW; FILE, 1986; LISTER, 1987; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O LCE é amplamente usado para estudar os efeitos ansiolíticos de compostos relacionados aos benzodiazepínicos, além de ser amplamente usado para ensaios comportamentais com o objetivo de entender regiões e mecanismos cerebrais associados ao comportamento da ansiedade (WALF; FRYE, 2007). Agentes ansiolíticos levam a uma ação exploratória dos braços abertos do labirinto, observada tanto pelo aumento do tempo de permanência dos animais nesses braços, quanto pelo aumento da frequência de exploração nos mesmos (DE-SOUZA et al., 2006).

A partir desse contexto, o presente estudo mostra que o tratamento com [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] na dose de 0,5 µg/kg proporcionou um aumento ( $p < 0,001$ ) do tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos (Figura 13A). Ainda, na mesma dose, o [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], assim como com o bromazepam 0,1 mg/kg (controle positivo), demonstrou um aumento ( $p < 0,01$ ) na frequência de entradas nos braços abertos (Figura 13B); configurando um potencial efeito tipo ansiolítico desempenhado pelo complexo de paládio(II) derivado do bromazepam na menor dose apresentada neste estudo. A atividade tipo ansiolítica observada está de acordo com estudos de Rodgers e colaboradores (1997), que consideram a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos os principais parâmetros no LCE relacionados à ansiedade.

Com base nesses resultados apresentados, quando se compara o grupo de animais que recebeu tratamento com a menor dose do complexo de paládio(II) com o grupo que recebeu somente a salina, os animais do primeiro grupo passaram mais tempo nos braços abertos do labirinto, sugerindo uma redução no conflito entre aproximar ou evitar esse estímulo aversivo. Vale a pena destacar ainda que a atividade ansiolítica decorrente do tratamento com o [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] se deu com uma dose muito menor que a do composto benzodiazepínico usado como controle positivo (bromazepam); sendo a relação molar da dose do complexo e do bromazepam na ordem de  $1,01 \cdot 10^{-3}$  mol para  $3,16 \cdot 10^{-3}$  mol, respectivamente.

Os resultados obtidos do tratamento com o complexo, nas doses testadas, sobre outros parâmetros no LCE mostra, por exemplo, que este composto não modificou o padrão de entradas nos braços fechados do labirinto (Figura 13C) em relação ao grupo controle, dando suporte à ideia que o [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] não prejudica a

locomoção dos animais neste aparelho. Fato que pode ser correlacionado com a ausência de interferência por parte do complexo no comportamento de levantar (*rearing*) do animal observado na figura 13E, a qual não há diferença entre todos os grupos de animais nesse parâmetro; levando a inferir o perfil de atividade tipo ansiolítica do complexo sem efeitos sedativos. Outras medidas etológicas relacionadas aos comportamentos de imersão de cabeça e estiramento corporal (Figuras 13D e 13F, respectivamente) não foram alteradas devido o tratamento com o complexo. Esses dados estão de acordo com a literatura e possibilitam inferir a importância da integridade do sistema motor na realização dos comportamentos de levantar, de mergulho de cabeça e de estiramento corporal interligados com a atividade exploratória (ESPEJO, 1997; RODGERS et al., 1997; LIMA 2010).

Apesar de não haver dados na literatura sobre o efeito ansiolítico do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], alguns estudos mostram a efetividade desse efeito produzido por fármacos benzodiazepínicos, como o bromazepam (FEMENÍA et al., 2011), utilizando como metodologia do teste de transição claro-escuro, o clonazepam (NIN et al., 2012), o alprazolam (CÁRDENAS et al., 2017) e, principalmente, o diazepam (ROMANINI et al., 2006; DE-SOUZA et al., 2006; BOMYANI et al., 2018), empregados com agentes controle-positivo na pesquisa de novos compostos com atividade do tipo ansiolítica.

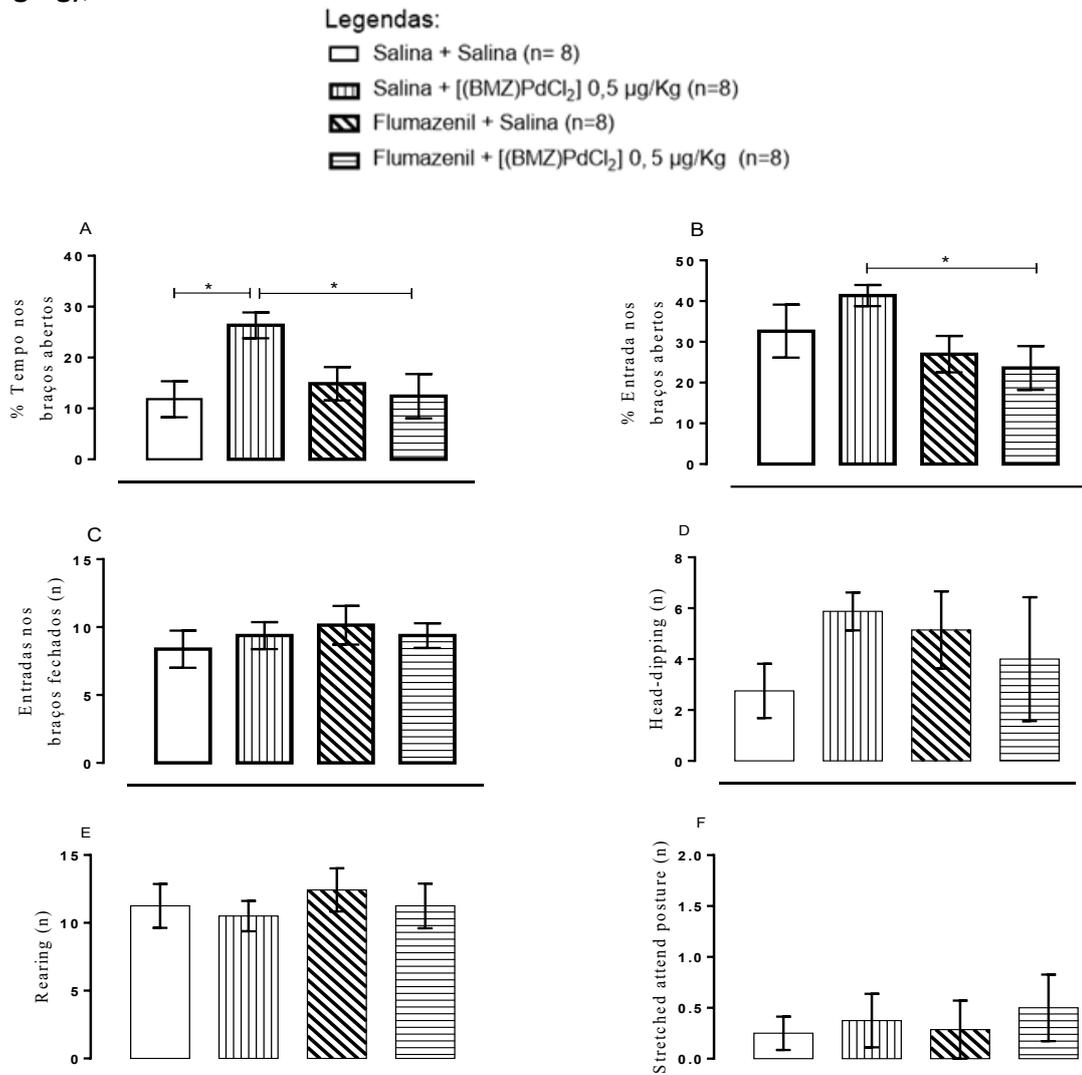
A figura 14 ilustra o envolvimento da ação do complexo de paládio(II) derivado do bromazepam na dose de 0,5 µg/kg mediada pelo receptor GABA<sub>A</sub>, através da administração prévia da dose de 2 mg/kg de flumazenil.

A análise de variância de um fator demonstrou que o flumazenil (2 mg/kg) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) os parâmetros das frequências do tempo de permanência (Figura 14A) e de entrada (Figura 14B) dos camundongos nos braços abertos do LCE quando administrado previamente à dose de 0,5 µg/kg do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], com uma média de redução de 13,93% e 17,76%, respectivamente. Também a ANOVA de um fator ratifica o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) médio do tempo de permanência nos braços abertos na dose de 0,5 µg/kg do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] observado também na figura 14A quando comparado com o grupo controle (salina + salina).

O tratamento com [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], na dose de 0,5 µg/kg em camundongos pré-tratados ou não com o Flumazenil não alterou estatisticamente outros parâmetros avaliados no LCE, tais como:

- O número de entrada nos braços fechados (Figura 14C,  $p = 0,7761$ );
- O número de *head-dipping* (“imersão de cabeça”, Figura 14D,  $p = 0,5251$ );
- O número de *rearing* (“comportamento de levantar”, Figura 14E,  $p = 0,8481$ );
- O número de *stretched attend* (“comportamento de estiramento corporal”, Figura 14F,  $p = 0,9102$ ).

**Figura 14 – Efeito da salina (NaCl 0,9%) e do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] na dose de 0,5 µg/kg sobre o comportamento exploratório de camundongos, pré-tratados ou não com Flumazenil (2 mg/kg), submetidos ao teste do LCE<sup>a</sup>.**



<sup>a</sup> As colunas e barras verticais representam a média ± EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Salina + [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] 0,5 µg/kg, utilizando ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni (BMZ = Bromazepam e [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] = complexo de paládio(II) + Bromazepam).

Para avaliar a provável interação do complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] com o receptor GABA<sub>A</sub>, foi administrado no pré-tratamento o flumazenil, um antagonista seletivo e competitivo benzodiazepínico desse subtipo de receptor, que tem sido usado para estudar a ação de substâncias sobre a sinalização GABAérgica (MIHIC; HARRIS, 2012). Esperava-se que, com o uso do flumazenil, houvesse o bloqueio da atividade tipo ansiolítica exercida pelo referido complexo, caso o receptor GABA estivesse realmente envolvido no seu mecanismo de ação.

O estudo mostra o bloqueio do flumazenil sobre o efeito do complexo na dose de 0,5 µg/kg, observado devido à redução significativa do tempo de permanência e de entrada nos braços abertos do LCE (Figuras 14A e 14B), trazendo assim prejuízo do efeito ansiolítico. Esses resultados estão de acordo com os dados publicados por Barros et al. (2016), que demonstraram o bloqueio, exercido pelo flumazenil, da atividade anticonvulsivante de complexos de paládio(II) coordenados ao diazepam produzidos com sais de PdCl<sub>2</sub> e Pd(OAc)<sub>2</sub>.

Não há dados na literatura a respeito da influência do flumazenil sobre a atividade ansiolítica do complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>]. Esta situação dificulta a comparação do presente estudo com o de outros autores, entretanto, valoriza e credita a este estudo um perfil de ineditismo.

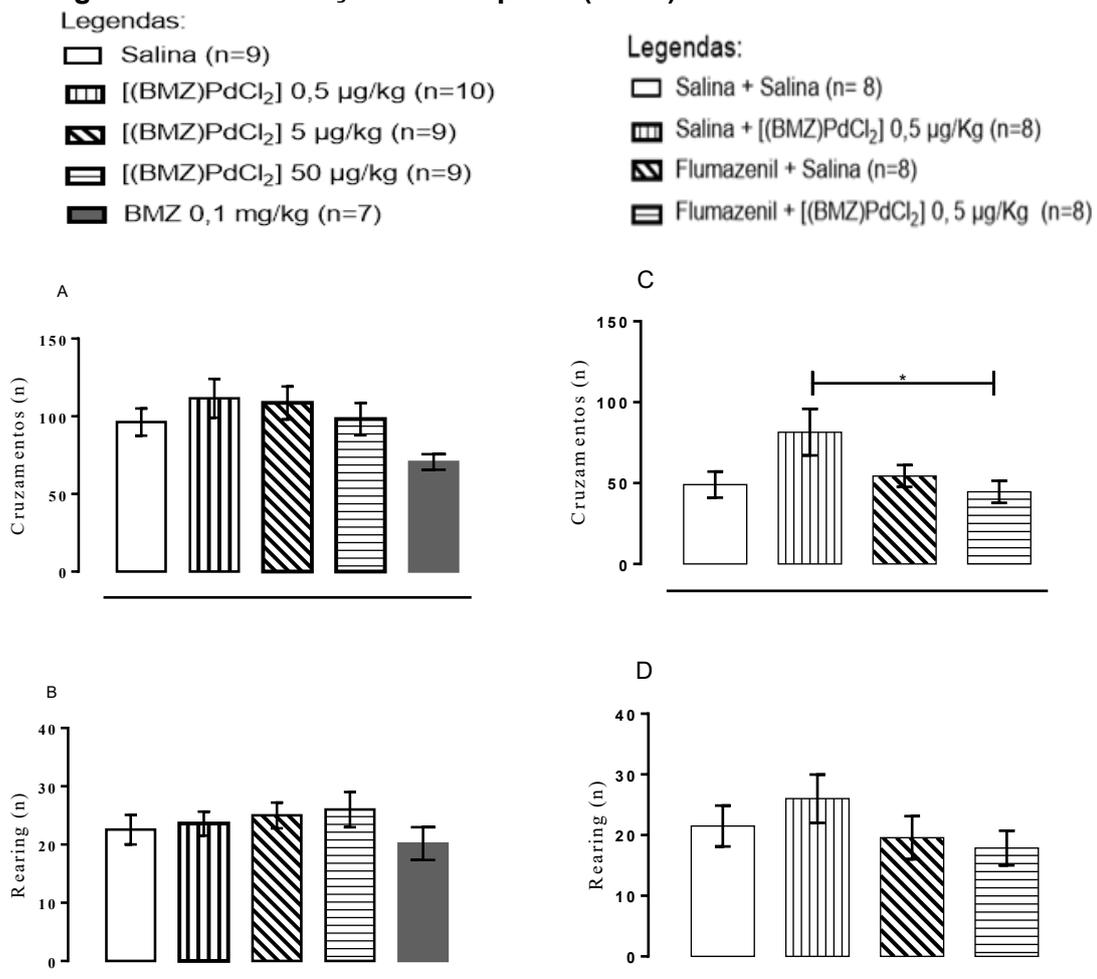
### 5.2.2 Avaliação da atividade locomotora/exploratória do composto [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] através do teste do Campo Aberto (CA) mediada pela via GABAérgica

A figura 15 ilustra o efeito do tratamento com o complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] nos parâmetros cruzamento e comportamento de levantar no teste do CA correlacionados com possível efeito deste complexo sobre a atividade locomotora/explanatória.

Os dados apresentados mostram que a análise de variância de um fator para o tratamento com o complexo, nas doses testadas, não alterou a movimentação espontânea dos animais nos parâmetros referentes aos números de cruzamentos (Figura 15A,  $p = 0,1266$ ) e de levantamentos (Figura 15B,  $p = 0,6073$ ). Características também observadas durante o tratamento dos animais com o bromazepam (0,1 mg/kg).

A figura 15 também ilustra as medidas etológicas, números de cruzamentos e de levantamentos, para a avaliação da participação da sinalização GABAérgica na ação do complexo de paládio(II) coordenado ao bromazepam. A ANOVA de um fator revelou efeitos significativos sobre o número de cruzamentos (Figura 15C,  $p < 0,05$ ) quando comparados os animais tratados com salina com o [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] com os tratados com flumazenil com o [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], mostrando que o pré-tratamento com flumazenil reduziu a atividade locomotora espontânea entre os quadrantes durante o teste. No entanto, não houve diferença entre grupos sobre a medida referente ao número de levantamentos dos animais (Figura 15D,  $p = 0,3868$ ).

**Figura 15 – Efeito da salina (NaCl 0,9%), do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>], 0,5, 5 e 50 µg/kg ou do Bromazepam (BMZ) 0,1 mg/kg sobre o comportamento locomotor/exploratório de camundongos submetidos ao teste de CA (A e B) com subsequente avaliação da via GABAérgica no modo de ação do complexo (C e D) <sup>a</sup>.**



<sup>a</sup> As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Salina + [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] 0,5 µg/kg, utilizando ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni (BMZ = Bromazepam e [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] = complexo de paládio(II) com Bromazepam).

Fonte: AUTOR, 2018.

O teste do campo aberto foi desenvolvido por Hall, em 1936, e anos após foi validado por Archer (1973), e possibilita, além da avaliação da atividade estimulante ou depressora do SNC de compostos, indicar atividades tipo ansiolíticas, por meio de mensurações sobre o comportamento locomotor e exploratório de animais (GUARNIERI, 2013).

O presente estudo mostra que o tratamento com o complexo de paládio(II) coordenado ao bromazepam não modifica os parâmetros de locomoção no teste do CA. Exceto, na redução significativa do número de quadrantes percorridos pelo grupo de animais tratados inicialmente com flumazenil e, em seguida, com o complexo na dose de 0,5 µg/kg como observada na figura 15C, ratificando, assim como no LCE, que a ação deste complexo se dá via sistema GABAérgico. A partir desses dados do teste do CA, podemos sugerir, juntamente com os dados do LCE, que este composto na menor dose, relatada acima, demonstra um perfil de ação ansiolítica sem comprometimento motor.

## 6 CONCLUSÕES

O complexo [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] foi obtido com o rendimento satisfatório (75 %) a partir da reação do Li<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> com o ligante bromazepam, uma vez que foi possível confirmar a formação do referido complexo por meio das técnicas de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC (<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H) do IV e da CG-EM adotadas neste trabalho, além de dados corroborativos da literatura sobre a caracterização do mesmo.

No que diz respeito à avaliação da atividade ansiolítica *in vivo*, o [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] se mostrou ativo no Sistema Nervoso Central. No teste do labirinto em cruz elevado, o tratamento com o referido complexo na menor dose testada (0,5 µg/kg) demonstrou atividade do tipo ansiolítica do mesmo, aliada à não alteração da atividade locomotora/exploratória confirmada também pelo teste do campo aberto. Esse perfil gera um grande interesse para o planejamento de novos protótipos, visto que o tratamento com alguns fármacos da classe dos benzodiazepínicos causam sedação, incapacitando muitas vezes os usuários.

Ainda neste estudo foi possível estabelecer que a via de sinalização pela qual o complexo atua é a GABAérgica. O pré-tratamento com flumazenil, nos camundongos antes da administração I.P. do [(BMZ)PdCl<sub>2</sub>] na menor dose testada, constatou que a ação do complexo, assim como do bromazepam, foi reduzida em parâmetros fundamentais relativos à atividade tipo ansiolítica no teste labirinto em cruz elevado, caracterizando que a sinalização é mediada via receptor GABA<sub>A</sub>.

# REFERÊNCIAS

---

---

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Carlos Alberto Araujo. **Identificação e determinação de fármacos ansiolíticos e antiepilépticos e seus metabólitos em efluente hospitalar**. 2012. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- ALONSO, Jordi; LÉPINE, Jean-Pierre. Overview of key data from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD). **The Journal of clinical psychiatry**, 2007.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014.
- ANTOLINI, L. et al. Properties in solid and solution of platinum (II) and palladium (II) complexes of bromazepam. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 43, n. 2-3, p. 612, 1991.
- ANTOLINI, Luciano et al. Palladium (II) complexes of 1, 4-benzodiazepines. Crystal structure and reactivity in dimethylsulphoxide of [Pd (bromazepam) Cl 2]. **Polyhedron**, v. 11, n. 21, p. 2795-2801, 1992.
- APARECIDA GELFUSO, Erica et al. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 13, n. 1, p. 150-165, 2014.
- ARCHER, John. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ASMUNDSON, Gordon JG; TAYLOR, Steven; AJ SMITS, Jasper. PANIC DISORDER AND AGORAPHOBIA: AN OVERVIEW AND COMMENTARY ON DSM-5 CHANGES. **Depression and anxiety**, v. 31, n. 6, p. 480-486, 2014.
- AVERSA, Maria C. et al. Metal complexes of benzodiazepines. Part 3. Synthesis and characterization of organometallic complexes of platinum (II). **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 12, p. 3431-3434, 1991.
- BAHLS, Saint-Clair; NAVOLAR, Ariana Bassetti Borba. Terapia cognitivo-comportamentais: conceitos e pressupostos teóricos. **Psico UTP online Revista Eletrônica de Psicologia, Curitiba**, n. 04, 2004.
- BALME, R. H. Early medicinal use of bromides (Sir Charles Locock). **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 10, n. 2, p. 205, 1976.
- BANDELOW, Borwin et al. The diagnosis of and treatment recommendations for anxiety disorders. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 111, n. 27-28, p. 473, 2014.

- BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327-335, 2015.
- BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie; WEDEKIND, Dirk. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93, 2017.
- BARROS, Walleska Bismaida Zacarias Galvão et al. Palladium–benzodiazepine derivatives as promising metallodrugs for the development of antiepileptic therapies. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 155, p. 129-135, 2016.
- BAXTER, A. J. et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological medicine**, v. 43, n. 5, p. 897-910, 2013.
- BATESON, Alan N. The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential?. **Sleep medicine**, v. 5, p. S9-S15, 2004.
- BENEDETTI, Adriano et al. Structural and spectral study of 7-bromo-1, 3-dihydro-5-(2-pyridyl)-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one (bromazepam) platinum (II) dichloride bisdimethylsulfoxide. **Journal of crystallographic and spectroscopic research**, v. 17, n. 6, p. 771-781, 1987.
- BERALDO, Heloisa et al. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.
- BERALDO, Heloisa. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 6, p. 4-6, 2005.
- BERALDO, Heloisa. Tendências atuais e as perspectivas futuras da química inorgânica. **Ciência e cultura**, v. 63, n. 1, p. 29-32, 2011.
- BERGMANN, Rikke et al. A unified model of the GABAA receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e52323, 2013.
- BERNEY, Patricia et al. A major change of prescribing pattern in absence of adequate evidence: benzodiazepines versus newer antidepressants in anxiety disorders. **Psychopharmacology bulletin**, v. 41, n. 3, p. 39-47, 2008.
- BERNIK, Márcio Antonini; SOARES, Márcia B.; SOARES, Cláudio de Novaes. Benzodiazepinics: patterns of use, tolerance and dependence. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 48, n. 1, p. 131-137, 1990.
- BLAY, Sergio L. et al. 12-month prevalence and concomitants of DSM-IV depression and anxiety disorders in two violence-prone cities in Brazil. **Journal of affective disorders**, v. 232, p. 204-211, 2018.
- BONYANI, Atousa; SAJJADI, Seyed Ebrahim; RABBANI, Mohammad. Anxiolytic effects of *Lippia citriodora* in a mouse model of anxiety. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 3, p. 205, 2018.
- CALHOON, Gwendolyn G.; TYE, Kay M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394, 2015.

CÁRDENAS, Jorge et al. Anxiolytic-and antidepressant-like effects of an aqueous extract of *Tanacetum parthenium* L. Schultz-Bip (Asteraceae) in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 200, p. 22-30, 2017.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CHÈZE, Marjorie; VILLAIN, Marion; PÉPIN, Gilbert. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. **Forensic Science International**, v. 145, n. 2-3, p. 123-130, 2004.

CHIARADIA, MARIZA C. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 2008.

CHRISTENSEN, Helen; BATTERHAM, Philip; CALEAR, Alison. Online interventions for anxiety disorders. **Current opinion in psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 7-13, 2014.

CORREIA, Walleska Bismaida Galvão Barros. **Síntese, caracterização e avaliação das propriedades antiepilépticas de complexos de paládio(II) derivados do diazepam**. 2017. 95 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

CRASKE, Michelle G. et al. Correction: Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17024, p. 1-19, 2017.

CSUPAK, Brian et al. A population-based examination of the co-occurrence and functional correlates of chronic pain and generalized anxiety disorder. **Journal of anxiety disorders**, v. 56, p. 74-80, 2018.

CUSUMANO, Matteo; GIANNETTO, Antonino; MINNITI, Domenico. Metal complexes of benzodiazepines. Kinetic properties of bromazepam toward square planar dimethyl sulfoxide complexes of platinum (II) and palladium (II). **Inorganica chimica acta**, v. 215, n. 1-2, p. 41-45, 1994.

D'HULST, Charlotte; ATTACK, John R.; KOOY, R. Frank. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. **Drug discovery today**, v. 14, n. 17-18, p. 866-875, 2009.

DE MENEZES, Gabriela Bezerra et al. Resistência ao tratamento nos transtornos de ansiedade: fobia social, transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 29, 2007.

DE-SOUZA, Márcia M. et al. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. **Rev bras farmacogn**, v. 16, n. 3, p. 365-371, 2006.

ESPEJO, Emilio Fdez. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 86, n. 1, p. 105-112, 1997.

ESER, Hale Yapici et al. Prevalence and Associated Features of Anxiety Disorder Comorbidity in Bipolar Disorder: A Meta-Analysis and Meta-Regression Study. **Frontiers in psychiatry**, v. 9, p. 1-15, 2018.

FARRELL, Nicholas. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1-2, p. 1-4, 2002.

FEMENÍA, Teresa et al. Prodynorphin gene deletion increased anxiety-like behaviours, impaired the anxiolytic effect of bromazepam and altered GABAA receptor subunits gene expression in the amygdala. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 87-96, 2011.

FIGUEROA, Ana et al. ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO. p. 1-25, 2015.

FONZO, Gregory A. et al. Early life stress and the anxious brain: evidence for a neural mechanism linking childhood emotional maltreatment to anxiety in adulthood. **Psychological medicine**, v. 46, n. 5, p. 1037-1054, 2016.

FOX, Andrew S.; KALIN, Ned H. A translational neuroscience approach to understanding the development of social anxiety disorder and its pathophysiology. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 11, p. 1162-1173, 2014.

FRAMPTON, James E. Pregabalin: a review of its use in adults with generalized anxiety disorder. **CNS drugs**, v. 28, n. 9, p. 835-854, 2014.

FRANCHINI, G. C. et al. Block [ldquo] f [rdquo] metal complexes with benzodiazepines. Cytostatic and antiviral biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 59, n. 2-3, p. 204-204, 1995.

GEIGER, Maximilian J. et al. Arousal and the attentional network in panic disorder. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 29, n. 6, p. 599-603, 2014.

GIELEN, Marcel; TIEKINK, Edward R.T. **Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine**. Editora John Wiley e Sons Ltd, England, 2005.

GIELEN, Marcel; TIEKINK, Edward RT (Ed.). **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine**. John Wiley & Sons, 2005.

GORBACHEVA, P. B. et al. Molecular-biological questions in the creation of therapeutic agents and studies of their mechanisms of action the new antitumor agent morfozol: intracellular distribution and effects on dna synthesis. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 2, p. 53-55, 2008.

GRAEFF, F. G. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 366-375, 2012.

GUARNIERI, Leonardo de Oliveira et al. **Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina**. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GUERRA, Wendell et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium (II) complexes of tetracyclines. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 99, n. 12, p. 2348-2354, 2005.

HERNANDEZ-MENDEZ, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; GONZÁLEZ-MARTIN, M. I. Metal complexes of 1, 4-benzodiazepines: I. Spectrophotometric study of the nickel (II)-bromazepam complex. **Microchemical journal**, v. 31, n. 1, p. 94-101, 1985.

HILAL-DANDAN, Randa; BRUNTON, Laurence. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. AMGH Editora, 2015, p. 238-250.

HYMAN, Steven E.; COHEN, Jonathan D. In: KANDEL, Eric et al. **Princípios de Neurociências-5**. AMGH Editora, 2014, p. 1222-1241.

Iavicoli, I.; Fontana, L.; Bergamaschi, A. Palladium: Exposure, uses, and human health effects. 2011.

IVERSEN, S.; KUPFERMANN, I.; KANDEL, Eric R. In: KANDEL, Eric R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. **Principles of Neural Science**. 4<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2000.

JOHNSTON, Graham AR. GABAA receptor channel pharmacology. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 15, p. 1867-1885, 2005.

KASHANIAN, S. et al. DNA binding studies of PdCl<sub>2</sub>(LL)(LL= chelating diamine ligand: N, N-dimethyltrimethylenediamine) complex. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 8, p. 929-936, 2008.

KESSLER, Ronald C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. **World psychiatry**, v. 6, n. 3, p. 168, 2007.

KIM, Jihyun et al. Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC–MS/MS and its application to human and rat hair. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 13-14, p. 878-886, 2011.

LAURITO, Tiago L. et al. Bromazepam determination in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: a highly sensitive and specific tool for bioequivalence studies. **Journal of mass spectrometry**, v. 39, n. 2, p. 168-176, 2004.

LEE, John David et al. **Química inorgânica não tão concisa**. Edgard Blucher, 1999, p. 328-340.

LI, Qiuping; LOKE, Alice Yuen. A spectrum of hidden morbidities among spousal caregivers for patients with cancer, and differences between the genders: A review of the literature. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 17, n. 5, p. 578-587, 2013.

LIMA, Valéria Martins de. Avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 2010.

LISTER, Richard G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco et al. Aproximación histórica al descubrimiento del meprobamato y su introducción en psiquiatría: medio siglo de terapéutica ansiolítica. **Arch. psiquiatr**, p. 103-121, 2005.

LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco; ÁLAMO, Cecilio; GARCÍA-GARCÍA, Pilar. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. **Journal of anxiety disorders**, v. 25, n. 4, p. 554-562, 2011.

MANSOUR, Ahmed M. Bromazepam: Crystal structure, spectroscopic and quantum chemical calculations. **Chemical Data Collections**, v. 11, p. 11-24, 2017.

MELO, AÍDA DOMITHILLA DA FONSÊCA. **Avaliação de propriedades químico-estruturais de fármacos benzodiazepínicos por modelagem computacional**. 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

METZLER, Danielle H.; MAHONEY, David; FREEDY, John R. Anxiety disorders in primary care. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 43, n. 2, p. 245-261, 2016.

MIHIC, S. JOHN; HARRIS, R. ADRON. Hipnóticos e sedativos. In: BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012, p. 457-480.

NIN, Maurício S. et al. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European journal of pharmacology**, v. 684, n. 1-3, p. 95-101, 2012.

NOBILE, Glauca Fernanda Galeazzi; GARCIA, Vagner Angelo; SILVA, Alessandra Turini Bolsoni. Análise sequencial dos comportamentos do terapeuta em psicoterapia com universitários com transtorno de ansiedade social. **Perspectivas em análise do comportamento**, v. 8, n. 1, p. 16-31, 2017.

O'DONNELL, James M.; SHELTON, Richard C. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: BRUNTON, Laurence L.; CHABNER,

Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012, p. 398-415.

OERBECK, B. et al. Selective mutism: a challenge to assess and treat. long-term follow-up results of a psychosocial intervention and a review of pharmacological treatment. In: **EUROPEAN CHILD & ADOLESCENT PSYCHIATRY**. 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA: SPRINGER, 2015. p. S41-S42.

ORVIG, Chris; ABRAMS, Michael J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 1999.

PATTERSON, Beth; VAN AMERINGEN, Michael. augmentation strategies for treatment-resistant anxiety disorders: a systematic review and meta-analysis. **Depression and anxiety**, v. 33, n. 8, p. 728-736, 2016.

PAVIA, DONALD L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2015.

PELLOW, Sharon; FILE, Sandra E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PORTO, Patrícia et al. Evidências científicas das neurociências para a terapia cognitivo-comportamental. **Paidéia (Ribeirão Preto)**, 2008.

QUIROGA, Adoración G. et al. Palladated and platinated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA interstrand cross-links by these complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 117-123, 1998.

RAMCHANDANI, Dilip; LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco; ALAMO, Cecilio. Meprobamate—Tranquilizer or Anxiolytic? A Historical Perspective. **Psychiatric quarterly**, v. 77, n. 1, p. 43-53, 2006.

RANDALL, Lowell O. et al. The psychosedative properties of methaminodiazepoxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 129, n. 2, p. 163-171, 1960.

RAVINDRAN, Lakshmi N.; STEIN, Murray B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 839-854, 2010.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

SAMPAIO, MAURÍCIO ROCHA DE MAGALHÃES. **Avaliação da bioequivalência de formulações contendo lorazepam através de método bioanalítico utilizando a cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por espectrometria de massas**. 2008. 182f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANKAR, Raman. GABA A receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1, 5-benzodiazepine clobazam. **CNS drugs**, v. 26, n. 3, p. 229-244, 2012.

SCHMIDT, Cameron K. et al. Neuroanatomy of Anxiety: A Brief Review. **Cureus**, v. 10, n. 1, 2018.

SHIM, Eun-Jung et al. Prevalence, correlates, and impact of depressive and anxiety disorder in cancer: Findings from a multicenter study. **Palliative & supportive care**, p. 1-14, 2017.

SHIMADA-SUGIMOTO, Mihoko; OTOWA, Takeshi; HETTEMA, John M. Genetics of anxiety disorders: genetic epidemiological and molecular studies in humans. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 69, n. 7, p. 388-401, 2015.

SIGEL, Erwin; ERNST, Margot. The Benzodiazepine Binding Sites of GABA A Receptors. **Trends in pharmacological sciences**, 2018.

SILVA, Priscila.Pereira; GUERRA, Wendell. Paládio. **Química Nova na Escola**, v. 33, n. 1, p. 65-66, 2011.

SINGH, Harjit et al. Antidepressant/anxiolytic and anti-Nociceptive effects of novel 2-substituted 1, 4-benzodiazepine-2-ones. **Scientia pharmaceutica**, v. 78, n. 2, p. 155, 2010.

SMOLDERS, Mirrian et al. Adherence to evidence-based guidelines for depression and anxiety disorders is associated with recording of the diagnosis. **General Hospital Psychiatry**, v. 31, n. 5, p. 460-469, 2009.

SPENCER, John et al. Excellent correlation between cathepsin B inhibition and cytotoxicity for a series of palladacycles. **Dalton transactions**, n. 48, p. 10731-10735, 2009.

SRINIVAS, Padaki et al. Synthetic, spectral and thermal studies of tin (IV) complexes of 1, 5-benzodiazepines. **Journal of Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 627-633, 2008.

STAHL, M. M. S. et al. Withdrawal reactions with selective serotonin re-uptake inhibitors as reported to the WHO system. **European journal of clinical pharmacology**, v. 53, n. 3-4, p. 163-169, 1997.

STAHL, Stephen M. Don't ask, don't tell, but benzodiazepines are still the leading treatments for anxiety disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 63, n. 9, p. 756-757, 2002.

STAHL, Stephen M. et al. The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 6, p. 332-339, 2013.

STARCEVIC, Vladan. The reappraisal of benzodiazepines in the treatment of anxiety and related disorders. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 14, n. 11, p. 1275-1286, 2014.

STEEL, Zachary et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013. **International journal of epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 476-493, 2014.

STEIN, Murray B.; SAREEN, Jitender. Generalized anxiety disorder. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 21, p. 2059-2068, 2015.

STERNBACH, L. H.; REEDER, E. Quinazolines and 1, 4-benzodiazepines. II. 1 The rearrangement of 6-chloro-2-chloromethyl-4-phenylquinazoline 3-oxide into 2-amino derivatives of 7-chloro-5-phenyl-3H-1, 4-benzodiazepine 4-oxide. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 1111-1118, 1961.

STERNBACH, Leo H. The benzodiazepine story. **Journal of medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1979.

STERNBACH, Leo H. The discovery of librium. **Agents and actions**, v. 2, n. 4, p. 193-196, 1972.

SULTAN, Salah M.; HASSAN, Yousif AM; IBRAHIM, Kamal EE. Sequential injection spectrophotometric assay of bromazepam complexed with iron (II) in hydrochloric acid with chemometric optimization. **Talanta**, v. 50, n. 4, p. 841-849, 1999.

TEICHER, Martin H. et al. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 652-666, 2016.

TREVOR, Anthony J.; WAY, M.D. Fármacos sedativo-hipnóticos In: KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia Básica e Clínica-13**. McGraw Hill Brasil, 2017, p. 373-388.

TSAI, Meng-Ting et al. The association between comorbid anxiety disorders and the risk of stroke among patients with diabetes: An 11-year population-based retrospective cohort study. **Journal of affective disorders**, v. 202, p. 178-186, 2016.

VALÉRIO ROMANINI, Cássia et al. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 28, n. 2, 2006.

VILLAIN, Marion et al. Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 825, n. 1, p. 72-78, 2005

WALF, Alicia A.; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 322, 2007.

WENSEL, Terri M.; POWE, Krystal W.; CATES, Marshall E. Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 3, p. 424-429, 2012.

WHITING, Paul J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery?. **Drug discovery today**, v. 8, n. 10, p. 445-450, 2003.

WIERSEMA, Carlijn; VAN ZELST, Willeke; VOSHAAR, Richard Oude. Case Report: When a patient with depression is feeling sleepy, be aware of sleep apnoea. **BMJ case reports**, v. 2018, p. 1-4, 2018.

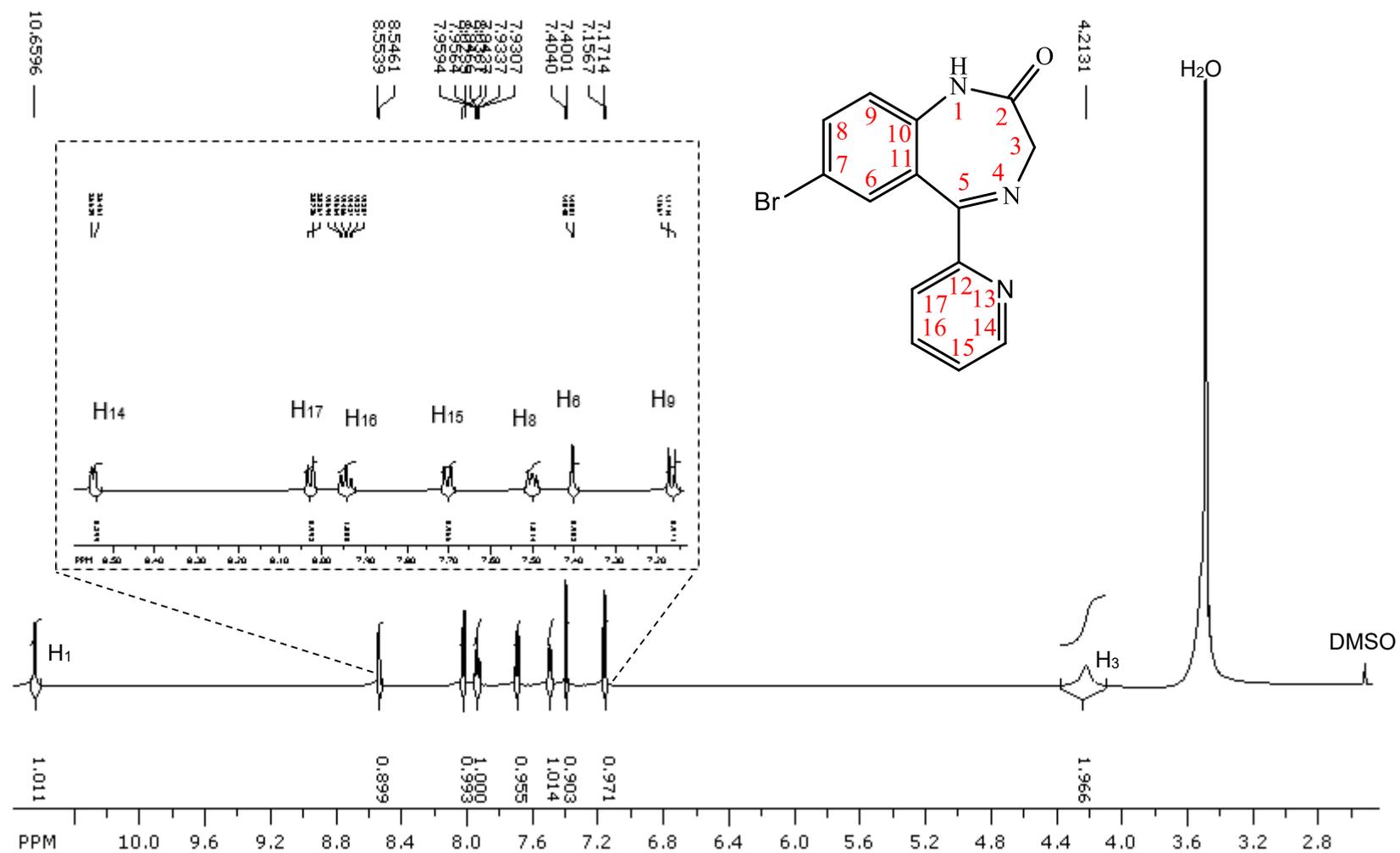
WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Depression and other common mental disorders: global health estimates. 2017.

ZAMIGNANI, Denis Roberto; BANACO, Roberto Alves. Um panorama analítico-comportamental sobre os transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 7, n. 1, p. 77-92, 2005.

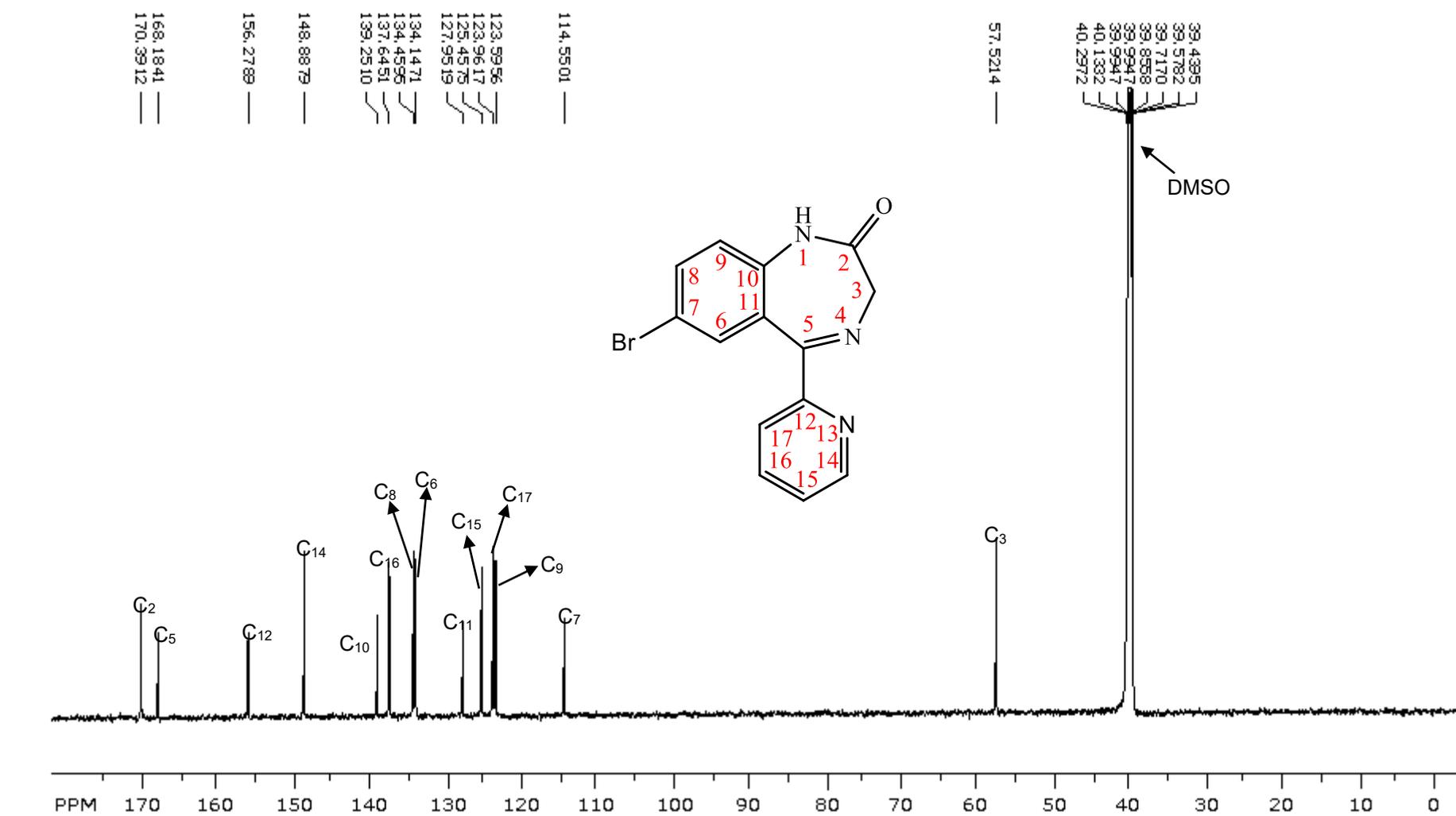
ZHOU, Yongjie et al. Comorbid generalized anxiety disorder and its association with quality of life in patients with major depressive disorder. **Scientific reports**, v. 7, p. 40511, 2017.

**APÊNDICES**

Apêndice A – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Bromazepam (BMZ) em  $\text{DMSO-d}_6$ .

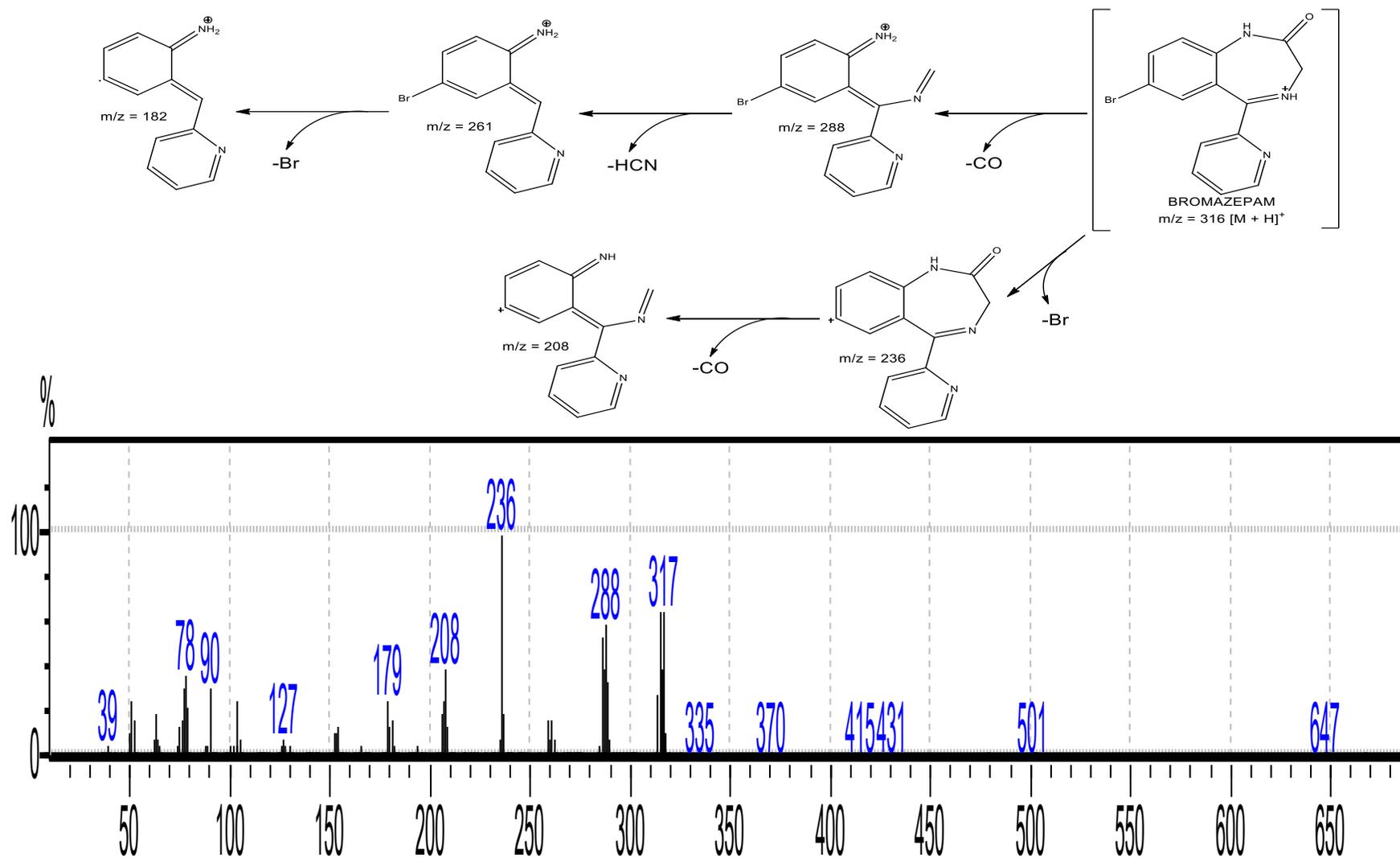


Fonte: AUTOR, 2018.

Apêndice B – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Bromazepam (BMZ) em  $\text{DMSO-d}_6$ .

Fonte: AUTOR, 2018.

Apêndice C – Espectro de massas do (BMZ) por CG-EM e a rota de fragmentação proposta.



Fonte: AUTOR, 2018.