

Universidade Federal de Alfenas-MG

Flávia Pereira Dias Viegas

**Síntese e estudo farmacológico de novos
candidatos a protótipos de fármacos de ação
dupla úteis ao tratamento da doença de
Alzheimer**

2013

Flávia Pereira Dias Viegas

**Síntese e estudo farmacológico de novos candidatos a
protótipos de fármacos de ação dupla úteis ao tratamento
da doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Paranho Veloso

Alfenas, 2013

Viegas, Flávia Pereira Dias.

Síntese e estudo farmacológico de novos candidatos a protótipos de fármacos de ação dupla úteis ao tratamento da doença de Alzheimer / Flávia Pereira Dias Viegas. - 2013.

154 f. -

Orientadora: Márcia Paranho Veloso

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Doença de Alzheimer. 2. Inibidores da Colinesterase. 3. Fármacos do Sistema Nervoso Central. I. Veloso, Márcia Paranho. II. Título.

CDD: 615.1

Flávia Pereira Dias Viegas

**Síntese e estudo farmacológico de novos candidatos a
protótipos de fármacos de ação dupla úteis ao tratamento
da doença de Alzheimer**

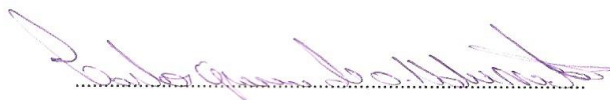
A banca examinadora abaixo assinada aprova o manuscrito apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em 01/02/ 2013



Profa. Dra. Aline Guerra Manssour Fraga

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

*Dedico esta dissertação à minha família,
que com muito amor e compreensão esteve sempre ao meu lado.
Em especial, dedico ao meu esposo, que me apresentou a este mundo da ciência,
me ajudou a enfrentar os obstáculos e me ensinou os princípios de uma boa conduta
científica... Amor, você será sempre o meu referencial...
o meu exemplo a ser seguido!
Jamais poderia deixar de dedicar aos meus filhos... Lucca e ao meu segundo(a)
filho(a) que carrego em meu ventre. Amo vocês!*

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado nessa jornada tão exigente e difícil, em especial, aos meus queridos alunos de iniciação científica: Matheus de Freitas Silva e Mariana Máximo Riquiel, que junto a mim, suaram a camisa para que atingíssemos nossas metas. Matheuzão e Mari será impossível me lembrar do meu mestrado e não me lembrar de vocês... A vocês, eu deixo os meus sinceros votos de sucesso e felicidades!

Agradeço ao INCT-INOVAR pelo financiamento do trabalho e à Capes pela bolsa concedida.

Agradeço à UNIFAL-MG pela oportunidade oferecida.

Agradeço aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-UNIFAL-MG) que se dedicam tanto a dar aos seus alunos uma formação sólida e estão sempre dispostos a contribuir.

Agradeço a Deus por me permitir trabalhar com o que eu gosto e em um grupo de pesquisa tão especial. Aos meus contemporâneos do LFQM, obrigada pelas risadas e pelo delicioso ambiente de trabalho.

Por fim, agradeço a todos os colaboradores que fazem parte da concretização deste trabalho.

A todos estes, deixo o meu sincero MUITO OBRIGADA!!!

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Resumo

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, incapacitante e sem cura, caracterizada pela diminuição progressiva da memória e declínio severo da cognição, associados com a degradação de neurônios colinérgicos em muitas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC). Fisiologicamente, a evolução da doença está relacionada com a deposição de placas amiloides extracelulares e de emaranhados neurofibrilares intracelulares, com dramática redução de neurotransmissores, principalmente da acetilcolina (ACh) e da instalação de um complexo processo neuro-inflamatório. Diante da recente caracterização do aspecto multifatorial associado à instalação e evolução da DA, uma nova estratégia de planejamento e busca por novos fármacos tem considerado a ação múltipla, e não mais em um único alvo, como uma forma mais eficiente de tentar-se obter novas entidades químicas eficientes e seguras. A busca por novas entidades químicas capazes de interferir no avanço da DA, inibindo a atividade da enzima AChE, podendo ainda atuar em outras vias terapêuticas, levou ao planejamento de uma nova série de híbridos moleculares com ação dupla: anticolinesterásicos e anti-inflamatórios, desenhados por hibridação molecular entre as estruturas do donepezil, uma série de arilidrazonas piperidínicas semi-sintéticas com propriedades anti-inflamatórias e o LASSBio-767, um alcaloide semi-sintético inibidor seletivo de AChE. Neste novo projeto, visamos à síntese de uma série de novos híbridos análogos ao donepezil e sua caracterização como possíveis inibidores de AChE e anti-inflamatórios. Os resultados obtidos até o momento, levaram à identificação das substâncias **LFQM-56** e **LFQM-67**, como possíveis candidatos a fármacos com atividade dupla, tendo demonstrado tanto propriedades anticolinesterásicas, como anti-inflamatórias. Por outro lado, a substância **LFQM-73** apresentou excelente propriedade anti-inflamatória e **LFQM-57**, **LFQM-75** e **LFQM-88** demonstraram alta atividade inibitória da acetilcolinesterase.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Inibidores da Colinesterase. Fármacos do Sistema Nervoso Central.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive lack of memory and severe loss in cognition, associated with the degradation of cholinergic neurons in many areas of the central nervous system (CNS). Physiologically, the evolution of the disease is related to the extracellular deposition of amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles, with severe reduction in concentration of neurotransmitters, mainly acetylcholine (ACh) and installation of a complex neuroinflammatory process. Recently, the onset and progress of DA have been well characterized as a multifactorial process, associated to abnormal metabolism of A β , hyperphosphorylation of tau protein, oxidative stress and generation of reactive oxygen species, affecting neuronal and mitochondrial function, and a complex inflammatory process of neuronal tissue. This modern overview of DA has been decisive for changes in the design and search for new drugs, considering that multiple directed ligands could be more effective than molecules targeting specific and single targets. In this context, we proposed a new series of donepezil derivatives, designed as novel dual prototype drug candidates, acting as anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitors. These new series, with innovative structural patterns, was planned by molecular hybridization among structural subunits from donepezil, a new series of anti-inflammatory semi-synthetic aryl-hydrazones derived from natural (-)-cassine, and LASSBio-767, a semi-synthetic selective inhibitor of AChE. The results obtained up to the moment, led us to identify **LFQM-56** and **LFQM-67**, as possible candidates to drugs with dual activity, showing both anticholinesterase and anti-inflammatory properties. On the other hand, **LFQM-73** showed excellent anti-inflammatory profile and **LFQM-57**, **LFQM-75** and **LFQM-88** showed promising acetylcholinesterase inhibitory activities.

Keywords: Alzheimer Disease. Cholinesterase Inhibitors. Central Nervous System Agents.

Lista de abreviaturas e siglas

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AINEs - Anti-inflamatorios Não Esteroidais

APOE - Apolipoproteína E

APP - Proteína Precursora Amilóide

BuChE – Butirilcolinesterase

CC50 - Concentração citotóxica para 50% das células

COX - Ciclooxigenase

DA - Doença de Alzheimer

FDA - Food and Drug Administration

IACHe - Inibidores de Acetilcolinesterase

IC50 – Concentração inibitória para 50% das enzimas

ID50 – Dose inibitória para 50% do edema

IV – Infravermelho

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NEQs - Novas Entidades Químicas

NMDA - *N*-metil-*D*-aspartato

RMN - Ressonancia Magnética Nuclear

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

β -A - β -amilóide

QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1.1 | A DOENÇA DE ALZHEIMER E SUAS IMPLICAÇÕES SOCIAIS | 12 |
| 1.2 | ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E FORMAS DE TRATAMENTO DA DA | 13 |
| 1.3 | INIBIDORES DE ACHE E O ARSENAL TERAPÊUTICO DISPONÍVEL AO TRATAMENTO DA DA..... | 16 |
| 1.4 | AS ENZIMAS BUTIRILCOLINESTERASE (BUCHE) E ACETILCOLINESTERASE (ACHE) COMO ALVOS CONTRA A DA | 19 |
| 1.5 | INFLUÊNCIAS DO PROCESSO NEUROINFLAMATÓRIO NA INSTALAÇÃO E PROGRESSO DA DA | 22 |
| 1.6 | FÁRMACOS MULTI-FUNCIONAIS NO TRATAMENTO DA DA | 23 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| 3 | OBJETIVOS | 26 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 26 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 26 |
| 3.2.1 | QUÍMICA: | 26 |
| 3.2.2 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA:..... | 27 |
| 3.2.3 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA: | 27 |
| 3.2.4 | AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS <i>IN SILICO</i> E FARMACOCINÉTICAS. | 27 |
| 4 | PLANEJAMENTO MOLECULAR E ANÁLISE RETROSSINTÉTICA..... | 28 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS N-BENZILPIPERIDINILACILIDRAZONAS DAS SÉRIES-ALVO 7 E 8..... | 52 |
| 5.1.1 | N-BENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8B (LFQM-54) | 52 |

| | |
|--|----|
| 5.1.2 N- (4-BROMOBENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8A (LFQM-55) | 57 |
| 5.1.3 N- (4-CLOROBENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8C (LFQM-56) | 59 |
| 5.1.4 N- (4-NITROBENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8F (LFQM-57). | 64 |
| 5.1.5 N- (4-METOXIBENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8E (LFQM-65). | 66 |
| 5.1.6 N- (4-(PIRROLIDIN-1-ILA)BENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8I (LFQM-66)..... | 71 |
| 5.1.7 N- (4-FLUORBENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8D (LFQM-67)..... | 73 |
| 5.1.8 N- (4-AMINOBENZILIDENO-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8K (LFQM-72) | 78 |
| 5.1.9 N- ((4-PIPERIDI-1-ILA)BENZILIDENO)-4-((3-HIDROXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8H (LFQM-75) | 83 |
| 5.1.10. N- ((1-H-IMIDAZOL-4-ILA)METILENO)-4-((3-HIDRÓXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOIDRAZIDA: 8H (LFQM-76) | 88 |
| 5.1.11 N- (4-(METILTIO)BENZILIDENO)-4-((3-HIDRÓXIPIPERIDIN-1-ILA)METIL)BENZOHIDRAZIDA: 8G (LFQM-88) | 90 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS N-BENZILPIPERIDINILACILIDRAZONAS O-ACETILADAS | 95 |
| 5.2.1 N-(4-NITROBENZILIDENO)-4-[(3-O-ACETILPIPERIDIN-1-IL)METIL)BENZOIDRAZIDA: 7A (LFQM-58)..... | 95 |
| 5.2.2 N-(4-BROMOBENZILIDENO)-4-[(3-O-ACETILPIPERIDIN-1-IL)METIL)BENZOIDRAZIDA: 7B (LFQM-68)..... | 97 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.3 <i>N</i> -(4-AMINOENZILIDENO)-4-[(3- <i>O</i> -ACETILPIPERIDIN-1-IL)METIL)ENZOIDRAZIDA: 7C (LFQM-73) | 100 |
| 5.2.4 <i>N</i> -(4-CLOROBENZILIDENO)-4-[(3- <i>O</i> -ACETILPIPERIDIN-1-IL)METIL)ENZOIDRAZIDA: 7E (LFQM-84)..... | 105 |
| 5.2.5 <i>N</i> -(4- <i>O</i> -ACETILENZILIDENO)-4-[(3- <i>O</i> -ACETILPIPERIDIN-1-IL)METIL)ENZOIDRAZIDA: 7F (LFQM-87)..... | 110 |
| 6 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA..... | 112 |
| 6.1 ENSAIOS DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ACETILCOLINESTERASE | 112 |
| 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA | 116 |
| 6.2.1 TESTE DE PRESSÃO NA PATA DE CAMUNDONGOS (VON FREY ELETRÔNICO)..... | 117 |
| 6.2.2 ENSAIO DE HIPERALGESIA INDUZIDA POR FORMALINA | 120 |
| 6.2.3 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA..... | 122 |
| 6.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO | 125 |
| 7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (VIABILIDADE CELULAR) EM MACRÓFAGOS HUMANOS | 127 |
| 8 ESTIMATIVAS <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS QUÍMICOS, FÍSICO-QUÍMICOS E ADME | 129 |
| 9 PARTE EXPERIMENTAL..... | 133 |
| 9.1 QUÍMICA..... | 133 |
| 9.1.1 GENERALIDADES | 133 |
| 9.1.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO 4-CARBOXIBENZALDEÍDO COM SOCL ₂ | 134 |
| 9.1.3 REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA ENTRE O 4-FORMILBENZOATO DE METILA (13) E 3-HIDROXIPIPERIDINA (12)..... | 135 |

| | |
|--|-----|
| 9.1.4 REAÇÃO DE HIDRAZINÓLISE ENTRE O 4[(3-HIDROXIPIPERIDIN-1-IL)METIL]BENZOATO DE METILA (11) E MONOÍDRATO DE HIDRAZINA | 135 |
| 9.1.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DAS N-ACILIDRAZONAS-ALVO..... | 136 |
| 9.1.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DAS O-ACETIL-PIPERIDINIL-N-ACILIDRAZONAS..... | 136 |
| 9.1.7 REAÇÃO DE REDUÇÃO COM METAL EM SOLUÇÃO PARA OBTENÇÃO DA LFQM-72 | 137 |
| 9.1.8 REAÇÃO DE REDUÇÃO COM METAL EM SOLUÇÃO PARA OBTENÇÃO DA LFQM-73 | 137 |
| 9.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA..... | 137 |
| 9.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA..... | 138 |
| 9.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA | 139 |
| 9.2.2.1 TESTE DE PRESSÃO NA PATA DE CAMUNDONGOS (VON FREY ELETRÔNICO)..... | 140 |
| 9.2.2.2 ENSAIO DE HIPERALGESIA INDUZIDA POR FORMALINA | 140 |
| 9.2.2.3. TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA E ID50... 141 | |
| 9.2.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO | 141 |
| 9.2.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 142 |
| 9.2.2.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS HUMANOS | 142 |
| 10 CONCLUSÕES | 145 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 147 |

1 Introdução

1.1 A doença de Alzheimer e suas implicações sociais

A forma de demência mais comum em pessoas acima de 65 anos é a doença de Alzheimer (DA).¹ A DA foi descrita pela primeira vez como “uma doença peculiar dos neurônios do córtex cerebral” em 1906, pelo médico alemão Alois Alzheimer. Naquela época, a DA foi definida como uma patologia neurológica, não reconhecida, que cursava como demência, destacando os sintomas de perda de memória e alterações de comportamento, evoluindo para a incapacidade de realizar as atividades rotineiras.^{2,3}

A DA é um processo neurodegenerativo progressivo e está relacionada com um conjunto de fatores fisiopatológicos tais como a idade, o surgimento de depósitos de placas senis (agregados da proteína β -amiloide) e de emaranhados neurofibrilares no cérebro, perda de neurônios colinérgicos, principalmente da acetilcolina (ACh)⁴ e da instalação de um processo neuro-inflamatório.

O paciente com DA sofre com uma série de sintomas que estão relacionados com a perda de neurônios colinérgicos no sistema nervoso central (SNC), tais como a diminuição progressiva da memória e das habilidades cognitivas, desorientação, falta de atenção, comprometimento da aptidão lingüística e depressão.^{5,6}

Estima-se que 35,6 milhões de pessoas no mundo sofrem da DA e que no Brasil existem cerca de 1,2 milhão de portadores. Devido ao envelhecimento da população global, espera-se que esses números aumentem acentuadamente, sendo estimado que em 2030 sejam 65,7 milhões e, em 2050, 115,4 milhões de portadores da DA. Espera-se também que dois terços dessa população sejam de países em desenvolvimento.⁷

Ao comparar os dados dos censos demográficos de 1960 à 2010, o número de pessoas com idade superior a 60 anos praticamente triplicou ao longo desses 50 anos e, atualmente, representa 10,8 % da população brasileira, totalizando 20,5 milhões de pessoas.⁸ No mundo, segundo o Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA, na sigla em inglês), espera-se que a população de pessoas acima de 60 anos aumente em 200 milhões nos próximos 10 anos e, em 2050, serão 2 bilhões de idosos representando 20% da população mundial.⁹ A idade é o principal fator de risco da DA, uma vez que na maioria das pessoas os sintomas aparecem após os 60 anos. A proporção de idosos entre os 65 e 74 anos de idade com DA é de 5% e, quase a metade das pessoas com 85 anos ou mais são portadoras da doença.¹⁰

1.2 Aspectos fisiopatológicos e formas de tratamento da DA

O envelhecimento cerebral e a perda localizada de neurônios, principalmente do hipocampo e do pró-encéfalo basal, estão diretamente relacionados com a DA.¹¹ Histopatologicamente a DA caracteriza-se pelo depósito extraneuronal de placas senis e depósito intraneuronal de emaranhados neurofibrilares, acompanhada por morte massiva de neurônios.¹² O principal componente das placas senis é o peptídeo β -amiloide (β A)^{13,14} e é o produzido pela ação de endoproteases (secretases) da membrana glicoprotéica, a partir da proteína precursora amiloide (APP), codificada por um gene presente no cromossomo 21.¹⁵⁻¹⁷ Fragmentos do β A formam agregados fibrilares não-covalentes que depositam-se no tecido neuronal e estão relacionados à neurotoxicidade da DA.¹⁸⁻²⁰ As secretases são enzimas responsáveis pelo processo proteolítico normal da APP, levando à formação de fragmentos β A e, dependendo do sítio de proteólise, são classificadas em α -, β - e γ -secretases. As α -secretases são, provavelmente, fixadas na membrana plasmática e clivam a APP entre os resíduos 16 e 17 da sequência do β A, gerando fragmentos

extracelulares solúveis conhecidos como sAPP α , que são normalmente fagocitados pelas micróglias e eliminados. Portanto, a quebra da APP por α -secretases inibe a formação de depósitos de β A e constitui a maior rota fisiológica de quebra da APP.¹⁸⁻²² Por outro lado, quando a proteólise da APP ocorre por ação de β e γ -secretases, entre os resíduos de aminoácidos 596-597 e 637-639, respectivamente, ocorre a liberação de fragmentos insolúveis de β A.^{22,23} A APP pode ser quebrada pelas γ -secretases em quatro posições diferentes, originando peptídeos β A que variam de 39 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo β A₁₋₄₀ formado majoritariamente. Resíduos β A₁₋₄₂ e β A₁₋₄₃ são minoritários, porém são as espécies mais encontradas em placas cerebrais²⁴ e estão relacionados à progressão da DA (Figura 1).²⁵

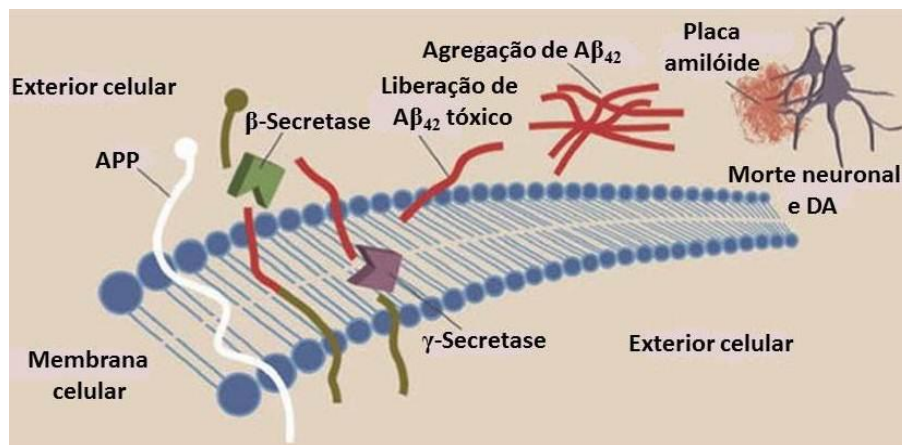


Figura 1. Clivagem da APP por ação de secretases.

Fonte: Do autor

A função da proteína Tau é estabilizar os microtúbulos dos axônios, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contatos interneuronais. Ao se acumular intracelularmente, devido a um processo de hiperfosforilação de origem pouco esclarecida, a proteína Tau gera os emaranhados neurofibrilares.²⁶

Vários estudos demonstraram que a DA está relacionada com a redução de neurotransmissores como dopamina, serotonina, noradrenalina, glutamato,

substância P e principalmente da acetilcolina (ACh). O *déficit* colinérgico pode ser retardado ou amenizado pela inibição parcial da atividade da acetilcolinesterase (AChE), estratégia conhecida como “Hipótese colinérgica”, que inspirou os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da DA, além de outros em estágios pré-clínicos. Entretanto, estes fármacos atuam no restabelecimento da função colinérgica, aliviando os sintomas e retardando a evolução da doença, garantindo assim, uma melhor qualidade de vida ao paciente, porém, sem oferecer a cura efetiva.²⁵

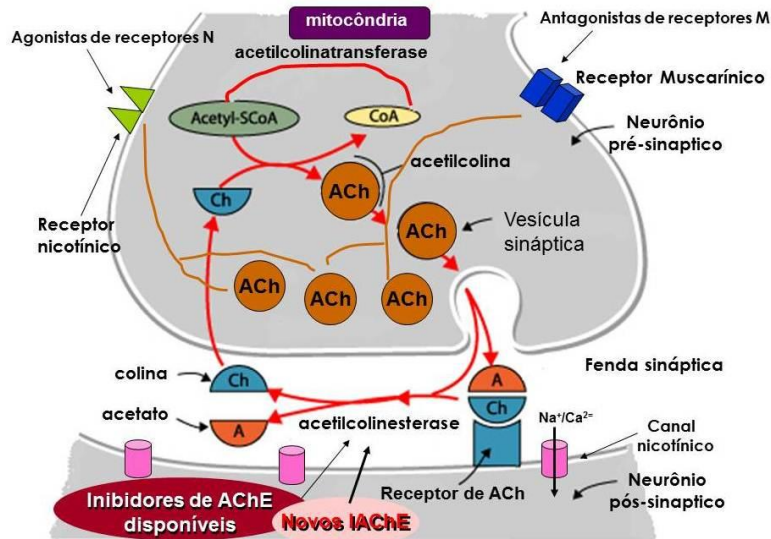


Figura 2. Esquema do processo sináptico e da liberação de ACh, com envolvimento dos receptores nicotínicos (N) e muscarínicos (M) e os possíveis alvos para fármacos em uso e em avaliação clínica.²⁵

Fonte: Do autor

Atualmente existem também muitas pesquisas na busca por novos fármacos que abordam a “Hipótese Amiloide”, que é baseada na intervenção da formação dos fragmentos insolúveis de β -amiloide e, assim, na formação e deposição das placas amiloides.²⁵

1.3 Inibidores de AChE e o arsenal terapêutico disponível ao tratamento da DA

A maioria das novas entidades químicas (NEQs) desenvolvidas para o tratamento da DA atua inibindo a atividade da enzima AChE, responsável pela hidrólise de acetilcolina (ACh) em colina e acetato.^{27,28}

Os inibidores de acetilcolinesterase (IACHEs) são classificados de acordo com a estrutura e com o mecanismo de ação em:

- Irreversíveis: possuem ligantes que interagem de maneira reversível com a enzima, em uma região próxima ao sítio catalítico;
- Pseudo-irreversíveis: incluem a classe dos carbamatos que formam um complexo carbamoilante com um resíduo de serina na tríade catalítica da AChE e possuem como protótipo a fisostigmina (**4**, Figura 3), produto natural cuja estrutura básica levou ao desenvolvimento da rivastigmina (**3**);
- Reversíveis: possuem ligantes que interagem de maneira reversível com a enzima, em uma região próxima ao sítio catalítico, como acontece, por exemplo, com as aminoacridinas (p.e. tacrina **1**), alguns alcaloides (p.e. galantamina **2**, figura 3) e as *N*-benzilpiperidinas (p.e. donepezil, **6**, figura 3).²⁹

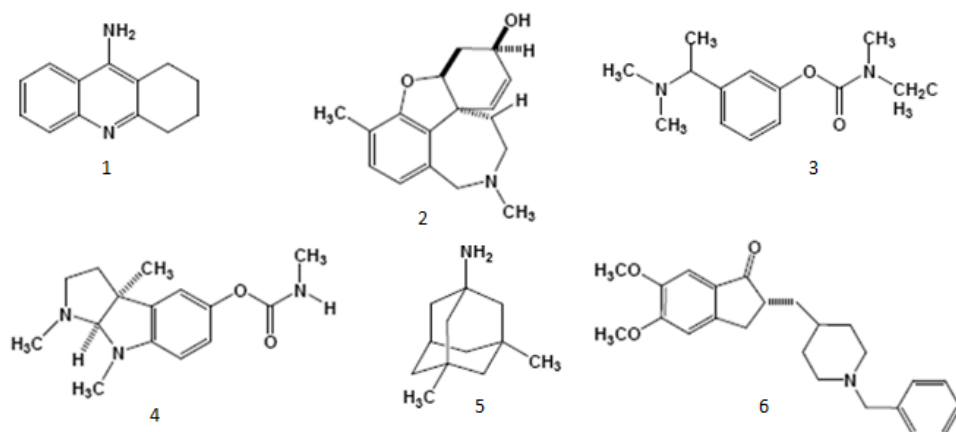


Figura 3. Fármacos comercializados para tratamento da DA e a fisostigmina (**4**), produto natural, protótipo da rivastigmina.

Fonte: Do autor

O primeiro fármaco comercial para o tratamento da DA foi a tacrina (THA, Cognex®, **1**), aprovada em 1993. Seu mecanismo de ação está baseado na inibição tanto da AChE como da butirilcolinesterase (BuChE), efetiva em pacientes com DA de intensidade leve a moderada. Entretanto, após pouco tempo de comercialização, teve seu uso restrito em alguns países devido a sua toxicidade hepática e baixa biodisponibilidade, sendo recomendada apenas para pacientes que não respondem ou toleram os demais medicamentos disponíveis. Apesar disso, sua estrutura tem sido amplamente utilizada no planejamento de muitos outros análogos ativos, com diferentes índices de seletividade e menor toxicidade, a exemplo das huprinas, bistacrinas, tacripirinas dentre outros derivados de estrutura híbrida.³⁰⁻⁵⁴

Atualmente, existem somente 4 fármacos aprovados e disponíveis comercialmente para o tratamento da DA: donepezil (Aricept®, **6**), rivastigmina (Exelon®, **3**), galantamina (Reminyl®, **2**) e memantina (Namenda®, **5**, Figura 3).

A galantamina (**2**) é um produto natural que atua como agonista de receptores nicotínicos e tem sido bastante estudada como protótipo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anticolinesterásicos.⁵⁵ Seu efeito terapêutico é consequência de um mecanismo de ação duplo: inibindo a AChE e modulando o receptor nicotínico pré-sináptico, promovendo assim uma maior liberação de ACh na fenda sináptica.⁵⁶

A rivastigmina (**3**) é um inibidor reversível de colinesterases, planejado por modificação estrutural da fisostigmina (**4**), capaz de inibir tanto a AChE como a BuChE. Sua utilização é indicada para o tratamento dos estágios leve à moderado da DA. Também é prescrita na terapêutica da doença de Parkinson (DP), sendo que seu uso oral para a DA foi aprovado 2000 e, somente em 2006, para o tratamento da DP.⁵⁷⁻⁵⁸

Dentre os fármacos disponíveis atualmente, a memantina (**5**) foi o último fármaco aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2006, sendo também o único que não atua na inibição da AChE. A memantina atua como antagonista de receptores de glutamato do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA), evitando um influxo excessivo de cálcio (Ca²⁺).⁵⁹ Nas sinapses, após o estímulo do neurônio pré-sináptico, ocorre a liberação de glutamato, que liga-se aos receptores

NMDA e estimula a entrada de íons de Ca^{2+} no citoplasma do neurônio. O influxo de Ca^{2+} induz a produção de nNOS (NO sintase neuronal) que, por sua vez, leva à liberação de óxido nítrico (NO) nos neurônios pós-sinápticos, funcionando como mensageiro para a pré-sinapse e reiniciando todo o processo.⁶⁰ Devido ao seu mecanismo de ação diferenciado, evitando a liberação excessiva de glutamato, que em altas concentrações torna-se excitotóxico e leva à morte neuronal, a memantina vem sendo indicada para os casos de evolução moderada a severa da DA.⁶¹⁻⁶³

O donepezil (6), também conhecido como E2020, surgiu no final da década de 80 como um inibidor reversível e não-competitivo da AChE,^{55,64-66} sendo o segundo fármaco aprovado pelo FDA (1996) e que rapidamente ganhou destaque por ser muito menos tóxico que a tacrina, sendo também 1250 vezes mais seletivo para AChE do que para BuChE.⁶⁴⁻⁶⁶ Vários estudos computacionais e de mecanismo de ação apontam que a seletividade deste fármaco é decorrente das subunidades *N*-benzilpiperidina e indanona, que conferem maior afinidade e especificidade para AChE.⁶⁶ Quanto aos aspectos farmacodinâmicos, o donepezil atua na inibição da AChE, aumentando a disponibilidade de ACh intra-sináptica⁶⁴, com poucos efeitos colaterais, a maioria de natureza colinérgica e de caráter transitório como náuseas, vômitos e tremores.^{68,69} Quanto aos aspectos farmacocinéticos o donepezil apresenta uma absorção linear, atingindo a concentração plasmática máxima em 3-5 horas após a administração, sem influência da alimentação.^{64,69} Além disso, o donepezil demonstra boa transposição da barreira hematoencefálica, atingindo concentração cerebral cerca de 7 vezes maior que no plasma, sendo, portanto, considerado um inibidor de ação central.⁶⁶ O donepezil é largamente metabolizado no fígado e a sua via principal de excreção, juntamente com seus metabólitos, é a renal, o que exige cautela na administração em pacientes com insuficiência renal e hepática.^{55,64-67} Estudos controlados duplo-cego, com mais de 1000 pacientes, revelaram que o uso de donepezil resultou em significativa melhora na memória, concentração, linguagem e raciocínio, sem sinais de toxicidade hepática.⁶⁰ Em virtude do perfil farmacocinético e de sua menor toxicidade em relação aos demais inibidores de AChE, o donepezil vem sendo utilizado como fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes com DA.^{69,70}

1.4 As enzimas butirilcolinesterase (BuChE) e acetilcolinesterase (AChE) como alvos contra a DA

A BuChE, também conhecida como colinesterase sérica ou acilcolina-acilidrolase, está presente principalmente nas células gliais, no tecido endotelial e nos neurônios. Juntamente com a AChE, a BuChE é responsável pela modulação dos níveis de acetilcolina e, portanto, também é um alvo terapêutico compatível com a hipótese colinérgica, a principal estratégia terapêutica para o tratamento da DA.^{71,72} Dentre os fármacos comerciais, apenas a tacrina (**1**) e a rivastigmina (**3**) inibem concomitantemente a AChE e a BuChE. As cinéticas de hidrólise da ACh por estas duas enzimas são distintas, variando de acordo com a concentração disponível do substrato. Assim sendo, em condições onde a concentração de ACh é baixa, a BuChE é menos eficiente. Por outro lado, altas concentrações de ACh levam à inibição da AChE, tornando a BuChE mais eficiente no processo de hidrólise. Este comportamento diferenciado vem sendo explorado racionalmente no planejamento e desenvolvimento de novos inibidores seletivos, uma vez que a inibição da BuChE é considerada uma via terapêutica útil e eficaz na manutenção dos níveis colinérgicos em pacientes em que atividade da AChE esteja suprimida.⁷²

A alta reatividade e sua eficiência catalítica da AChE frente a inúmeros inibidores covalentes e não-covalentes parece originar-se da arquitetura singular do sítio ativo, constituído por uma tríade de aminoácidos, Glu-327, Ser-200 e His-440 para a AChE de *Torpedo californica* (TcAChE, Figura 4).⁷³⁻⁷⁵ A existência de dois gargalos de profundidades distintas, que se estendem por meio caminho da enzima e contêm o sítio catalítico a 4 Å de sua base foram reveladas pela análise das estruturas de AChE por raio-x. Além do sítio catalítico, vários resíduos de aminoácidos auxiliares, como o Trp-84, que interage com um grupo quaternário da ACh e o Trp-279 (Figura 4),⁷⁶ localizado na abertura do gargalo que dá acesso ao sítio catalítico, estão sendo considerados como sítios de interação adicional no planejamento de novos inibidores de AChE.^{76,77} A inibição direta do sítio ativo impede a ligação da molécula substrato ou sua hidrólise por ocupação do sítio com

uma afinidade alta (a exemplo da tacrina) ou por uma reação irreversível com a serina catalítica, mecanismo pelo qual agem os inseticidas organofosforados e carbamatos.⁷⁰

Além da tríade catalítica, vários sub-sítios funcionais periféricos foram identificados. Um sítio aniônico periférico está localizado próximo da superfície da enzima, acima do acesso ao sítio catalítico, no qual o resíduo de Trp-286 exerce função particular como sítio de ligação com a subunidade amônio quaternária da ACh; uma cavidade acílica de ligação, que na AChE humana (huAChE) é constituída por resíduos Gly-122, Trp-236, Phe-295, Phe-297 e Phe-338, é responsável pelo reconhecimento e interação com a subunidade acetila da ACh.^{75,78-80} Um sub-sítio hidrofóbico, que inclui resíduos Trp-84, Tyr-130, Tyr-330 e Phe-331, que interage por empilhamento de elétrons π (interações do tipo π - π *stacking*) e/ou apolares, é responsável pela acomodação da subunidade alcoólica de um intermediário tetraédrico formado antes da liberação de colina no processo de hidrólise.⁷⁶ A estabilização de subunidades carregadas dos substratos ou outros ligantes do sítio ativo da enzima é mediado por interações do tipo cátion- π .^{78,81} Ao final do processo de hidrólise da ACh mediado pela AChE (Figura 5), ocorre acetilação do grupo OH de um resíduo de serina (Ser-200) que, posteriormente, sofre hidrólise, recompondo a estrutura enzimática original.^{75,82,83}

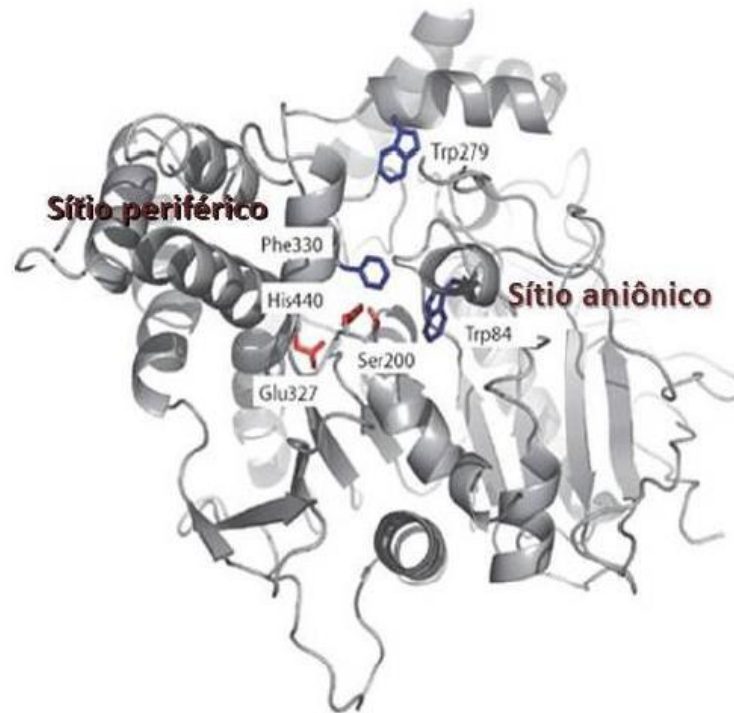


Figura 4. Visão do sítio ativo da AChE e de alguns dos principais resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica e o sítio periférico aniônico.²⁵

Fonte: Do autor

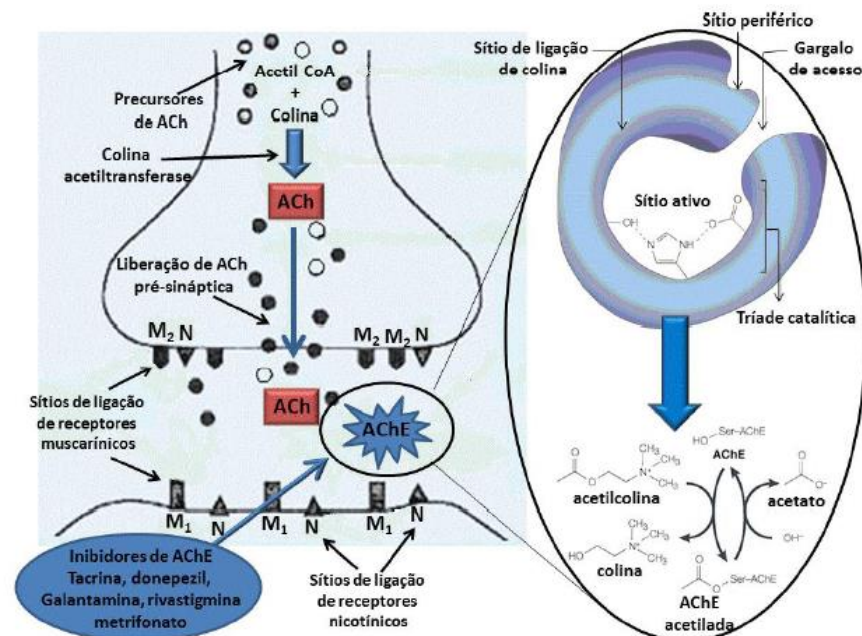


Figura 5. Esquema dos neurônios pré- e pós-sináptico, biossíntese e hidrólise da ACh.²⁵

Fonte: Do autor

1.5 Influências do processo neuroinflamatório na instalação e progresso da DA

A inflamação é o resultado de um conjunto de reações complexas em tecidos vascularizados, em resposta à ação de agentes nocivos responsáveis por injúria ou dano tecidual, manifestando-se por migração celular, ativação de leucócitos e reações sistêmicas diversas.⁵⁵ Este tipo de resposta, recrutamento e migração de células de defesa, pode ocorrer no SNC, caracterizando a neuroinflamação.⁸⁴

Em nível crônico, a inflamação cerebral é uma característica da DA visto que as características inflamatórias agudas, tais como rubor, inchaço, calor e dor não estão presentes e estruturas como micróglia, astrócitos e neurônios são os responsáveis pela reação inflamatória. Mediadores inflamatórios como citocinas, interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e TNF- α , bem como leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio e outros radicais como óxido nítrico, fatores complementares, proteases, inibidores de protease e pentraxinas são produzidos pelas células ativadas pela lesão tecidual. Uma vez que a produção de β A representa um estímulo crônico, o sistema imunológico é ativado no sentido de limpar estes produtos potencialmente tóxicos. A hipótese é que a natureza intratável das placas e emaranhados estimula uma reação inflamatória crônica.⁸⁵ A morte de neurônios adjacentes pode ocorrer por ação das células da glia ativadas cronicamente. A morte neuronal ocorre pela liberação de produtos altamente tóxicos, tais como intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, enzimas proteolíticas e fatores complementares produzidos por estas células.⁸⁶

Recentemente, inúmeros estudos têm sido publicados abordando os benefícios adicionais que poderiam ser alcançados pelo uso de fármacos anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e não-esteroidais (AINES), para o tratamento da neuroinflamação ocasionada pelo estresse oxidativo associado ao depósito de fragmentos tóxicos, à produção de substâncias reativas de oxigênio (ROS), espécies

reativas de nitrogênio (RNS) e pela formação de radicais livres associados à instalação e progressão da DA.^{63,86-88}

Estudos epidemiológicos indicam que o uso continuado de AINEs foi capaz de reduzir o risco de desenvolvimento da DA.⁸⁹ Um possível modo de ação desta classe de fármacos seria a inibição seletiva da COX-2, isoforma induzida expressa de modo elevado no cérebro de pacientes portadores da DA,⁹⁰ o que é reforçado por alguns estudos que demonstram que o RNA mensageiro (RNAm) da COX-2 está presente em níveis elevados em áreas cerebrais afetadas pela DA.⁹¹ Em várias partes do mundo, estudos clínicos têm sido conduzidos para avaliar o efeito de alguns AINEs como tratamento auxiliar da DA, mas os resultados continuam controversos.

A hipótese de que a inflamação no tecido cerebral possa contribuir para o desenvolvimento da DA está fundamentada em estudos envolvendo pacientes com artrite reumatoide tratados com AINEs.⁹²⁻⁹⁴ A inibição das enzimas COX-1 e COX-2, pelos AINEs pode diminuir significativamente a síntese de prostaglandinas, resultando em supressão do processo inflamatório. Porém, o uso prolongado destes fármacos tradicionais pode levar a distúrbios gastrintestinais.

1.6 Fármacos multi-funcionais no tratamento da DA

A busca de novos candidatos a fármacos para doenças neurodegenerativas têm sido intensa, como é o caso da doença de Alzheimer. Porém, o foco passou a ser fármacos com ação múltipla, e não mais em um único alvo, uma vez que aliado a esta patologia atuam um conjunto de fatores que unidos, como por exemplo, na DA, ocasionam o processo inflamatório, a redução de neurotransmissores, principalmente da acetilcolina, além da exacerbação da produção de radicais livres, estresse oxidativo, deposição de placas senis e neurofibrilas.⁹⁵

Com isso, pesquisas recentes estão sendo centradas em candidatos a fármacos de ação múltipla⁹⁶ capazes de atuar simultaneamente em mais de um alvo envolvido na fisiopatologia da DA.

Quando um único medicamento não é suficiente para o tratamento de uma doença, uma das alternativas terapêuticas é a associação de “medicamentos de tratamento múltiplo”, também conhecido como coquetéis. Esta abordagem consiste na combinação de dois ou mais fármacos que atuam por diferentes mecanismos terapêuticos. Outra alternativa é o uso de uma “medicação com vários compostos”, onde diferentes fármacos estão contidos na formulação de um único medicamento.⁹⁶

Partindo desse mesmo pressuposto, novas abordagens estão sendo pesquisadas para um tratamento mais eficaz no caso de doenças neurodegenerativas, como é o caso dos “ligantes direcionados a múltiplos alvos” (LDMA)⁹⁶, o que evita o risco de interações entre medicamentos diferentes e facilita o regime terapêutico dos pacientes.

A estratégia de síntese dos LDMA está baseada na hibridização de subunidades farmacofóricas de duas ou mais moléculas, e ambas deverão manter a sua capacidade de interagir com seus respectivos alvos simultaneamente, e, desta forma, procurar impedir o avanço da doença pelo bloqueio de múltiplos processos fisiopatológicos.⁹⁶

Exemplos recentes da literatura demonstram resultados promissores com novas entidades químicas capazes de atuarem como inibidores de AChE, antioxidantes, quelantes de metais, anti-amiloides, neuroprotetores e inibidores de β -secretase.^{97,98}

1 Justificativa

A necessidade de novas alternativas terapêuticas, de menor custo e maior eficácia, tem motivado a busca por novos agentes anticolinesterásicos úteis no tratamento de doenças neurodegenerativas como a DA, Doença de Parkinson, Miastenia gravis, dentre outras. Assim sendo, projetos que visem à descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos em Instituições Nacionais deverão conduzir a uma importante contribuição ao setor farmacêutico nacional, além da geração de conhecimento e de formação de recursos humanos. Diante da necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da DA, especialmente que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos disponíveis, mais acessíveis e seguros, a obtenção de candidatos a fármacos de ação dupla ou simbiótica, capazes de atuarem tanto na melhora do déficit colinérgico como na neuro-inflamação característicos da doença passam a ser uma abordagem nova e que pode representar inovação radical na descoberta de novos fármacos.

O conteúdo descrito nesta dissertação visa atender à necessidade de estudos de novas alternativas terapêuticas, à descoberta de novos candidatos a fármacos e o possível desenvolvimento de novos medicamentos úteis no tratamento de doenças inflamatórias do SNC e neurodegenerativas como a DA.

Em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, uma nova série de compostos *N*-benzil-piperidinil-arilidrazônicos foi preparada e analisada preliminarmente quanto às propriedades inibitórias de AChE, destacando-se como moléculas bastante promissoras. Como consequência destes resultados iniciais, o atual projeto foi proposto como uma continuação deste, visando à re-síntese de toda a série, bem como sua avaliação anti-inflamatória, do mecanismo e seletividade na inibição de AChE, e de suas propriedades anti-neuro-inflamatórias e colinérgicas, além da avaliação das propriedades físico-químicas *in silico* e farmacocinéticas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi continuar os estudos farmacológicos sobre uma série de novos híbridos *N*-benzil-piperidinil-arilidrazônicos, descobertos em nosso grupo de pesquisa. O desenvolvimento experimental compreende a re-síntese de toda a série-alvo, sua total caracterização e sua avaliação farmacológica, buscando identificar substâncias-líderes candidatas a fármacos duplos, capazes de atuar como inibidores de AChE e anti-inflamatórios na doença de Alzheimer.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Química:

3.2.1.1. Re-síntese da série de derivados *N*-benzil-piperidinil-arilidrazônicos.

3.2.1.2. Determinação dos rendimentos globais.

3.2.1.3. Caracterização espectroscópica completa da série, incluindo espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e de massas de alta resolução;

3.2.2. Avaliação da atividade anticolinesterásica:

3.2.2.1. Avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase *in vitro* e determinação das curvas dose-resposta, IC_{50} e K_i das substâncias mais ativas;

3.2.2.2. Avaliação da seletividade AChE x BuChE, bem como do mecanismo de ação anticolinesterásico;

3.2.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória:

3.2.3.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelos periféricos, incluindo ensaio de Von Frey, formalina e edema de pata de camundongo;

3.2.3.2. Determinação da ID_{50} das substâncias anti-inflamatórias mais promissoras;

3.2.3.3. Avaliação de efeitos locomotores: teste de campo aberto.

3.2.4 Avaliação das propriedades físico-químicas *in silico* e farmacocinéticas.

4 Planejamento Molecular e análise retrossintética

A série-alvo foi planejada através de hibridação molecular da subunidade N-benzil-piperidínica do donepezil, uma subunidade hidroxil ou Oacetil-piperidínica presente em LASSBio-767. Além disso, consideramos a inserção de uma unidade espaçadora N-acilidrazona, por ser um bióforo importante na modulação de atividade anti-inflamatória, por analogia a uma série de alcalóides semissintéticos anti-inflamatórios descoberto por nosso grupo de pesquisa (Figura 6).

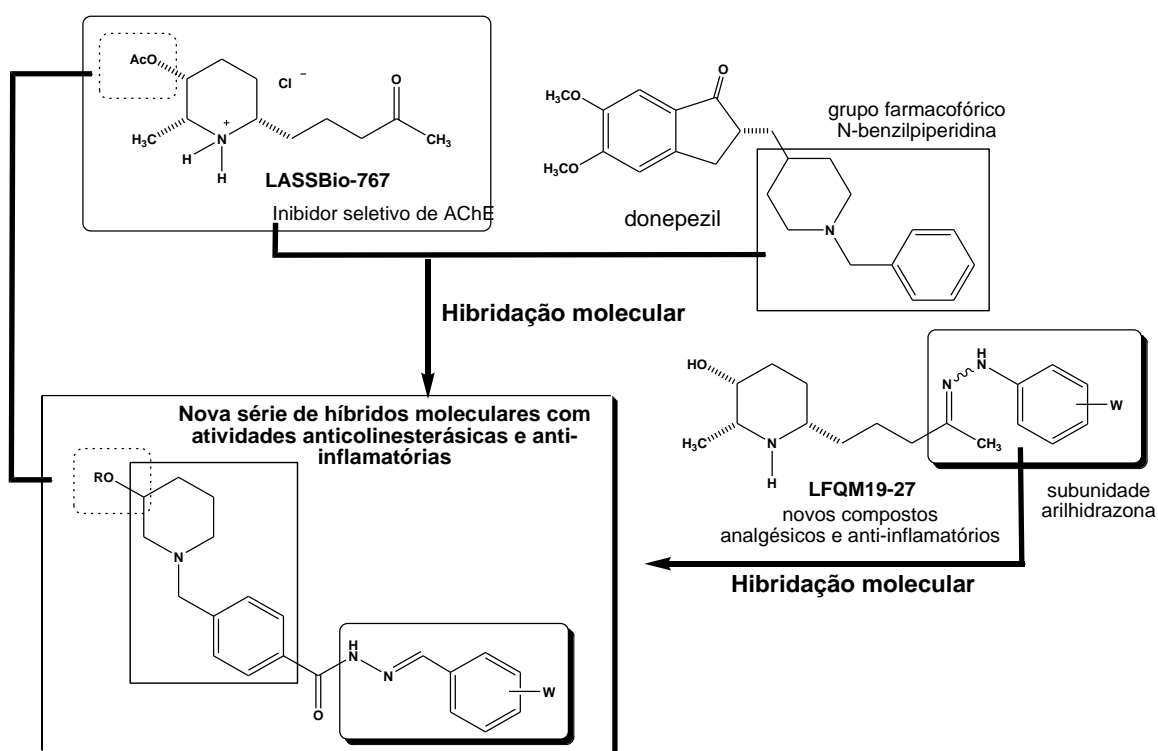


Figura 6. Planejamento molecular da nova série de candidatos a protótipos de fármacos de ação dupla para o tratamento da DA.

Fonte: Do autor

A análise retrossintética apresentada na Figura 7 indica que os compostos-alvo derivados acilidrazônicos (**8**) poderiam ser obtidos por reação de adição ácido-catalizada entre uma série de benzaldeídos funcionalizados (**9**) e a hidrazida (**10**). Esta, por sua vez poderia ser preparada por hidrazinólise do éster metílico (**11**),

derivado direto da aminação redutiva entre a 3-hidroxipiperidina (**12**) e do éster (**13**) obtido da esterificação do 4-carboxibenzaldeído (**15**), eleito como material de partida.

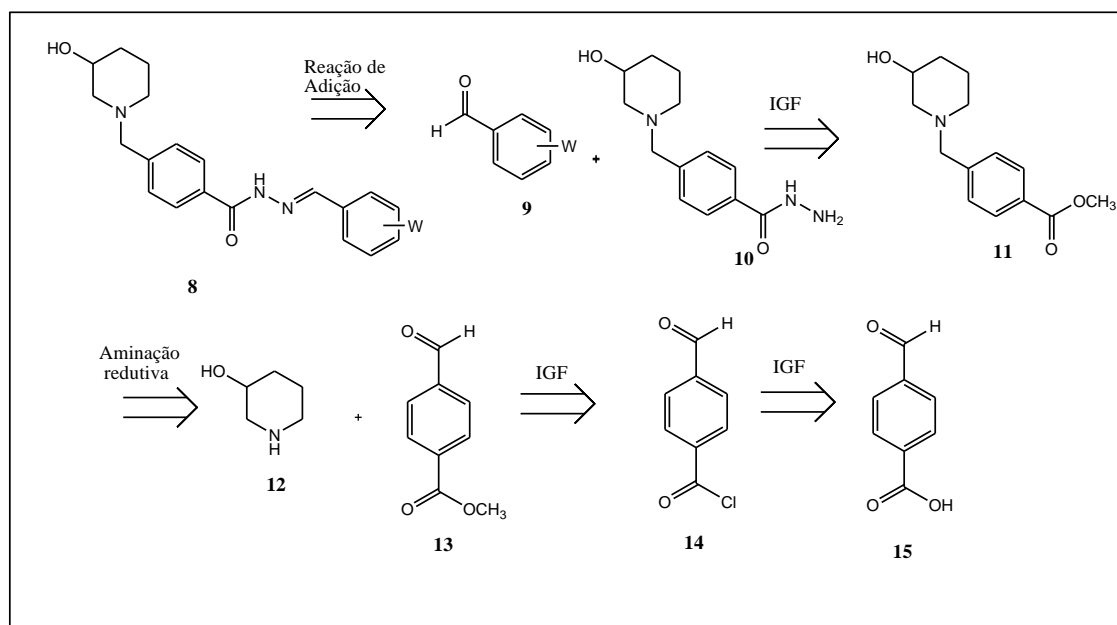


Figura 7. Análise retróssintética dos compostos-alvo.

Fonte: Do autor

A partir da análise retróssintética, foi planejada uma rota sintética divergente para os compostos-alvo **8** (LFQM-54-57, 65-67, 72, 75, 76 e 88, Figura 8), partindo do ácido 4-formil-benzóico (ou 4-carboxibenzaldeído) (**15**), comercial. Numa etapa inicial, uma reação de esterificação do ácido (**15**) em diclorometano na presença de cloreto de tionila (SOCl_2) e de dimetilformamida (DMF) originaria o cloreto de ácido (**14**) que, ao ser reagido com metanol, poderia ser transformado no éster (**13**). Na segunda etapa sintética, uma reação de aminação redutiva entre (**12**) e (**13**), na presença de $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{ZnCl}_2/\text{MeOH}$ poderia fornecer o éster N-benzilpiperidínico (**11**), que submetido à reação com monidrato de hidrazina originaria a hidrazida (**10**), intermediário-chave na rota sintética proposta. A hidrazida (**10**), ao reagir com uma série de benzaldeídos substituídos (**9**) deveria gerar a série de N-acilidrazonas-

alvo, com diferentes substituintes no anel aromático da subunidade *N*-acilidrazonil-benzílica. Para a obtenção das acilidrazonas acetiladas (LFQM-58, LFQM-68, LFQM-73, LFQM-84 e LFQM-87, Figura 8), uma etapa adicional com uma reação de acetilação com anidrido acético e 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (4-DMAP) e completaria a sequência sintética desejada.

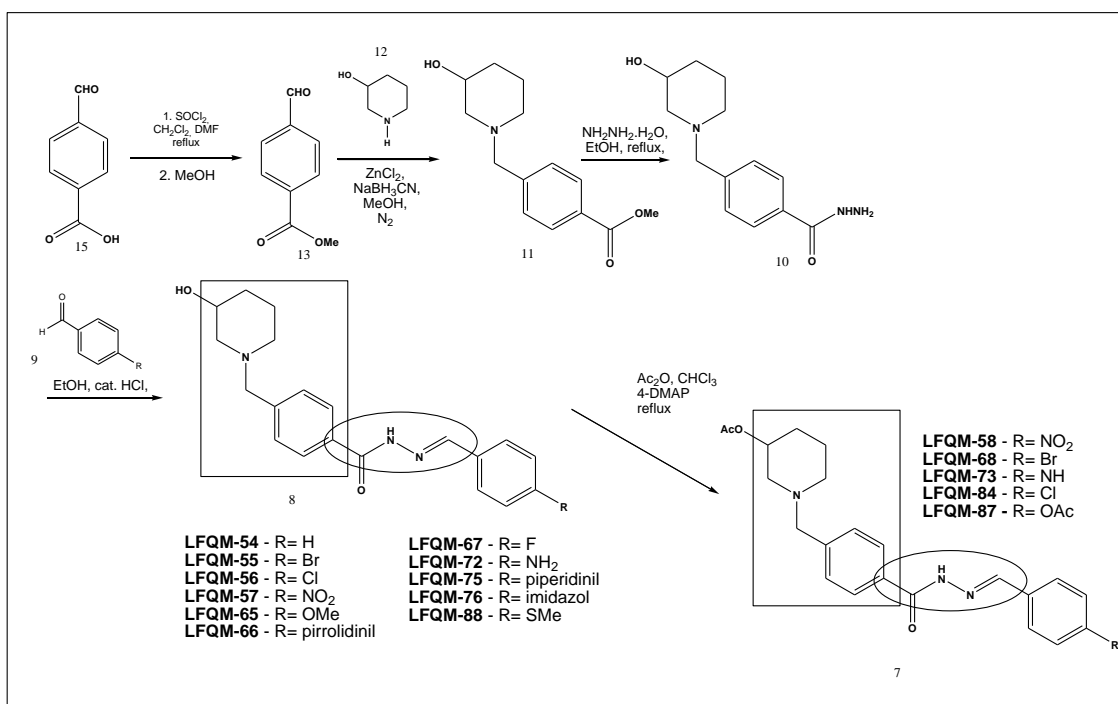
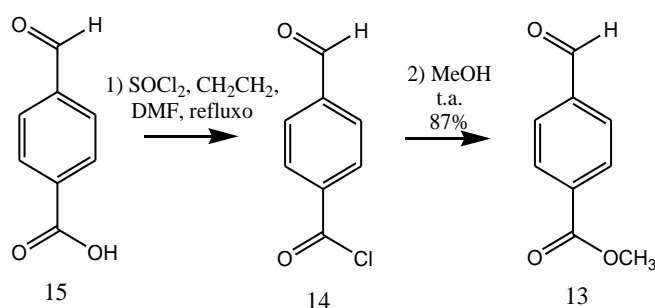


Figura 8. Rota sintética proposta para os compostos-alvo.

Fonte: Do autor

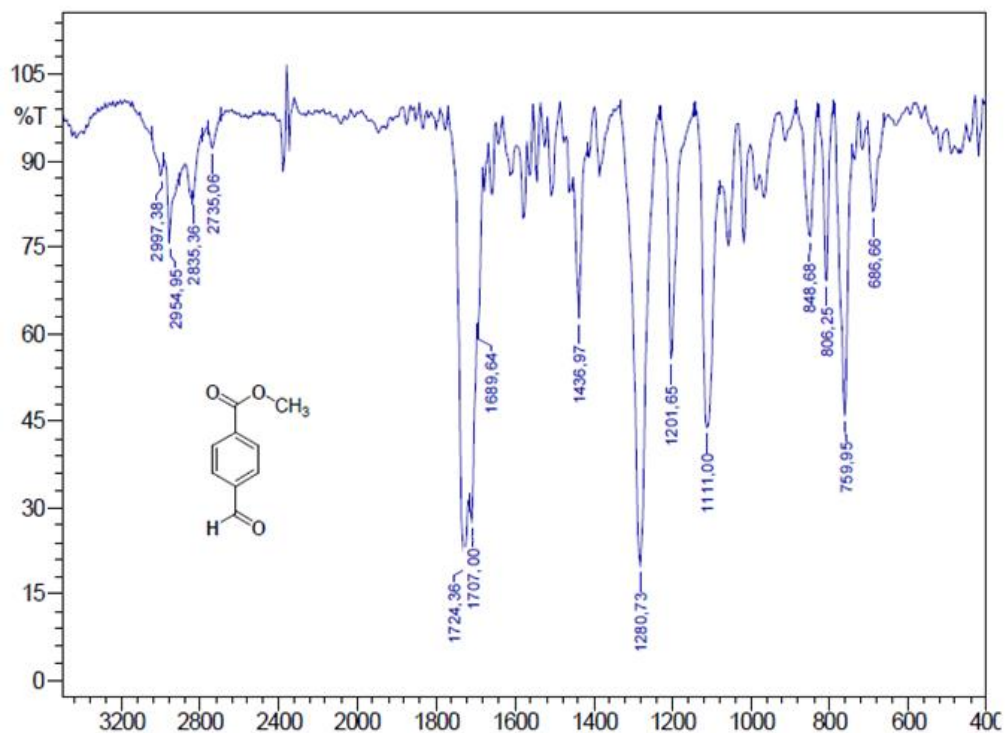
5 Resultados e discussão

O 4-carboxibenzaldeído (**15**), eleito como material de partida para a síntese das moléculas-alvo, foi convertido no cloreto de acila (**14**) por reação com SOCl_2 , catalisada por DMF, seguida de uma etapa de metanólise (Esquema 1).⁹⁹ O produto bruto da reação foi purificado em coluna cromatográfica, fornecendo o éster 4-formilbenzoato de metila (**13**) em 87% de rendimento.



Esquema 1. Reação de conversão do 4-carboxibenzaldeído (**15**) em cloreto de acila (**14**), seguida de metanólise para a obtenção do éster 4-formilbenzoato de metila (**13**).

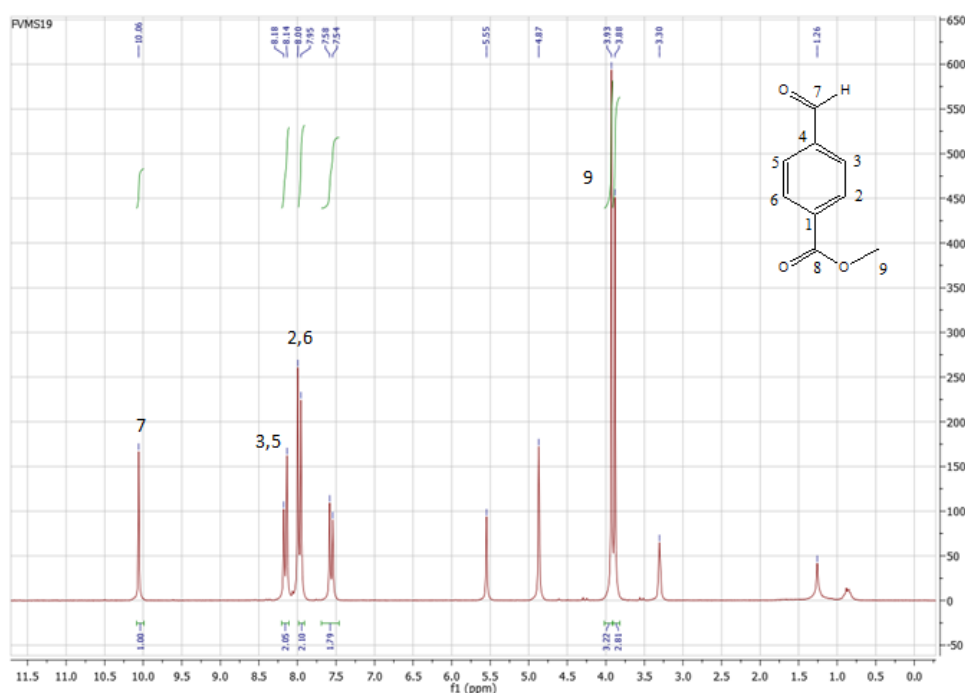
O espectro de infravermelho (IV) do éster (**13**) (Espectro 1) não apresenta a banda de ν_s OH, entre 3300 e 2500 cm^{-1} , característica do 4-carboxibenzaldeído, o que indica que ocorreu a conversão do material de partida. É possível observar duas bandas características ν_s de C-H de aldeídos em 2835 e em 2735 cm^{-1} ; bandas de ν_s de C-H de metila em 2997 e 2954 cm^{-1} ; em 1724 e 1707 cm^{-1} aparecem duas bandas sobrepostas de ν_s C=O referente às carbonilas das funções éster e aldeído, respectivamente. Em 1280 e 1111 cm^{-1} podem ser observadas as bandas características do ν_s C-O da função éster.



Espectro 1. Espectro no IV (KBr) do 4-formilbenzoato de metila (**13**).

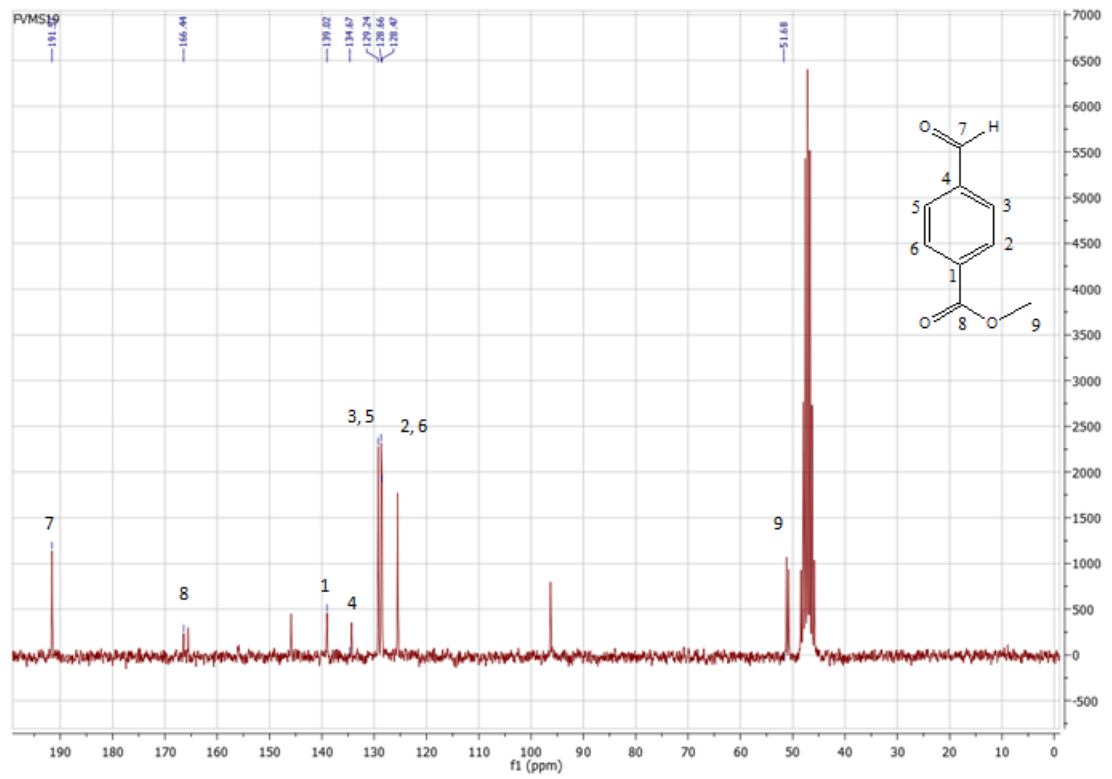
O éster (**13**) mostrou-se, aparentemente, pouco estável à temperatura ambiente, apresentando sinais de degradação quando observado em placa cromatográfica, pelo surgimento de outra substância não identificada, porém sem alterações no aspecto visual do produto puro. A análise por espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C e de massas de alta resolução, confirmou a instabilidade observada. No espectro de RMN de ^1H (Espectro 2), aparece um singlete em δ 3,88, que foi atribuído a um grupo metila do produto de decomposição, assim como alguns sinais na região de aromáticos (δ 120,0-140,0 ppm) do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 3), de menor intensidade que os atribuídos ao éster (**13**). As evidências de contaminação por degradação foram corroboradas pelo espectro de massas (Espectro 4), que apresentou grande número de sinais relativos, provavelmente a fragmentações do éster (**13**) e de seu produto de degradação.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 2), foram observados os sinais referentes à estrutura do éster (**13**), porém, com outros sinais indicativos da presença de impureza como, por exemplo, em δ 5,55; δ 1,26 e δ 7,58, o que foi atribuído a um produto estruturalmente análogo de degradação. O sinal em δ 4,87 se refere à presença de água no MeOH ¹⁰⁰ e, em δ 3,30 é o sinal referente ao solvente utilizado no experimento.



Espectro 2. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) do 4-formilbenzoato de metila (**13**).

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 3), foram observados o sinal em δ 191,6 referente ao C carbonílico do grupamento aldeídico e o sinal em δ 166,4 do C carbonílico da função éster. O sinal referente ao C metílico da metoxila pode ser observado em δ 51,7, assim como os sinais de CH aromáticos na região de δ 120-140,0. Assim como no espectro de RMN de ^1H , existem sinais que não correspondem ao produto de interesse, sendo assim, pode-se atribuí-los ao produto de degradação.

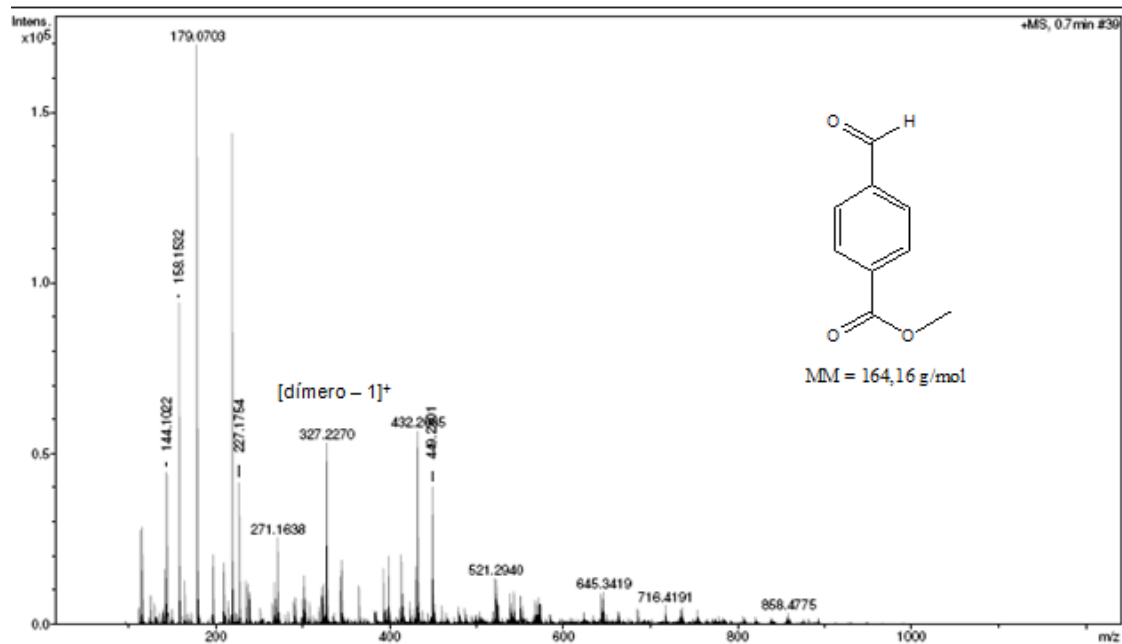


Espectro 3. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, MeOD) do 4-formilbenzoato de metila (13).

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do 4-formilbenzoato de metila (**13**).

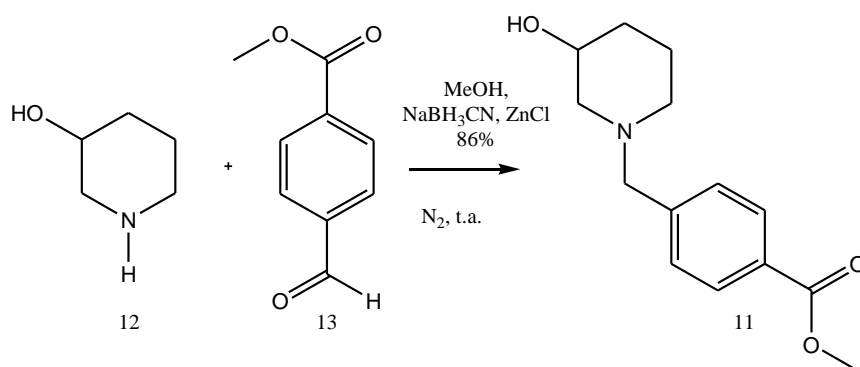
| Posição | δ ^1H (ppm) | m | J (Hz) | δ ^{13}C (ppm) |
|---------|-----------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 1 | -- | -- | --- | 139,0 |
| 2 | 7,97 | d | 10,00 | 128,4 |
| 3 | 8,16 | d | 8,00 | 129,2 |
| 4 | -- | -- | --- | 134,6 |
| 5 | 8,16 | d | 8,00 | 128,7 |
| 6 | 7,97 | d | 10,00 | 128,5 |
| 7 | 10,06 | s | --- | 191,6 |
| 8 | -- | -- | --- | 166,4 |
| 9 | 3,93 | s | --- | 51,7 |

No espectro de massas de alta resolução (Espectro 4), pode-se observar o pico referente ao [dímero (**13**)-1]⁺ com $m/z = 327.2270$, o que confirma a obtenção do éster desejado, porém impuro conforme discutido anteriormente.



Espectro 4. Espectro de massas de alta resolução do 4-formilbenzoato de metila (**13**).

Numa etapa subsequente, o éster (**13**) foi convertido na *N*-benzilpiperidina (**11**), com rendimento de 86%, por reação de aminação redutiva entre a 3-hidroxipiperidina comercial (**12**) e o formil-éster (**13**) (Esquema 2).

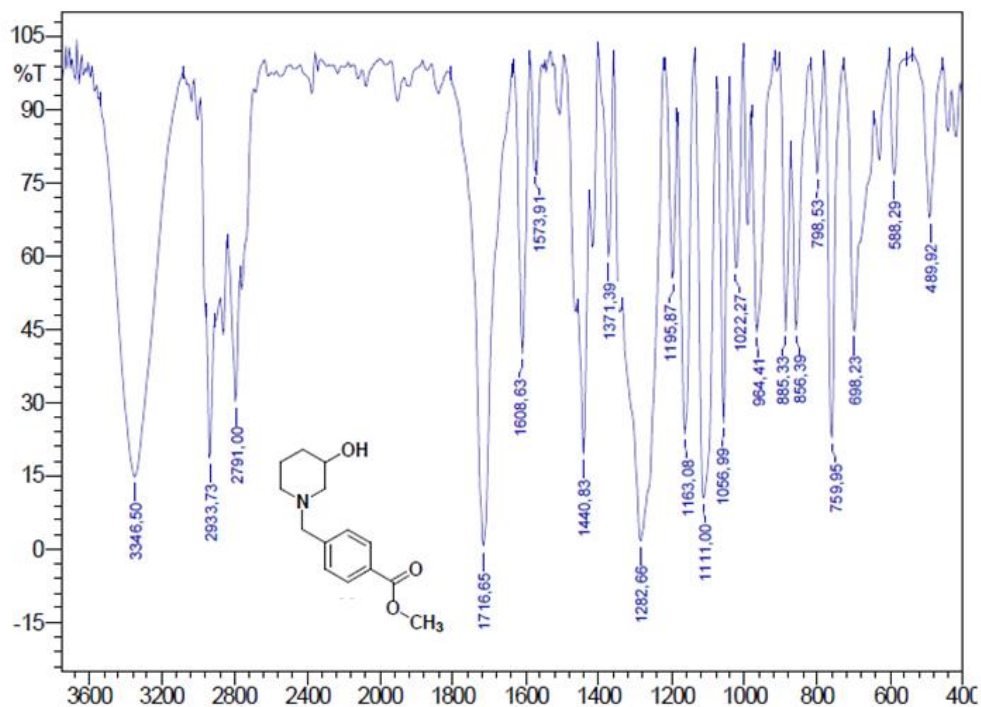


Esquema 2. Reação de aminação redutiva entre a 3-hidroxipiperidina (**12**) e o formil-éster **13**.

A técnica de aminação redutiva utilizada consistiu na preparação de uma solução metanólica do éster (**13**) com a amina (**12**). Em outro balão, foram agitados NaBH_3CN e ZnCl_2 anidro em MeOH. As duas soluções foram mantidas sob agitação em atmosfera de N_2 . Após 1h, as duas soluções foram transferidas para um único balão reacional, mantendo-se as condições de temperatura, agitação e atmosfera, até conversão completa do éster de partida.¹⁰¹

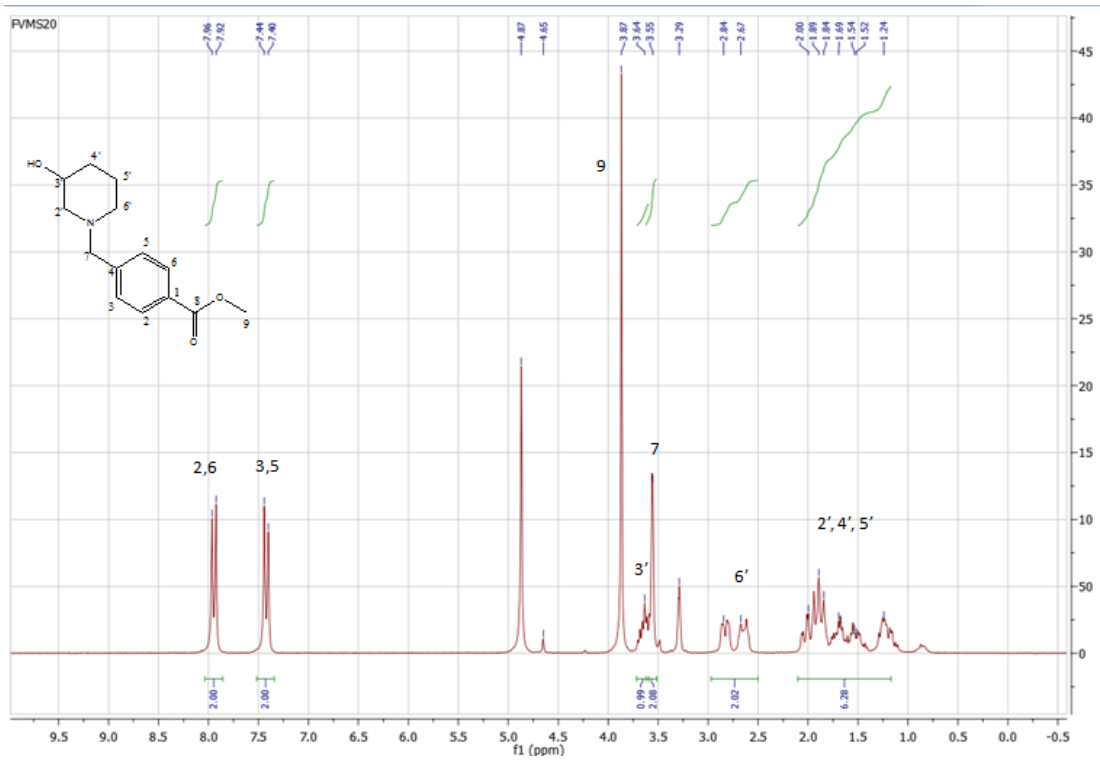
O produto 4-((3-hidroxipiperid-1-ila)metil)benzoato de metila (**11**), foi purificado em coluna cromatográfica e caracterizado por IV, RMN de ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas.

Ao analisar o espectro de IV (Espectro 5) é possível comprovar a conversão do éster (**13**) no produto (**11**) através da presença da banda de ν_s O-H em 3346 cm^{-1} e da ausência da banda de ν_s C-H em 2735 cm^{-1} característica de aldeído. Observam-se as bandas em 2933 e 2791 cm^{-1} características de ν_s C-H de metila e metileno; a banda ν_s C=O em 1716 cm^{-1} e duas bandas de ν_s C-O em 1282 (larga) e 1111 cm^{-1} característica de ésteres. Em 1282 cm^{-1} está uma banda alargada provavelmente pela sobreposição das bandas de ν_s C-O e ν_s C-N.

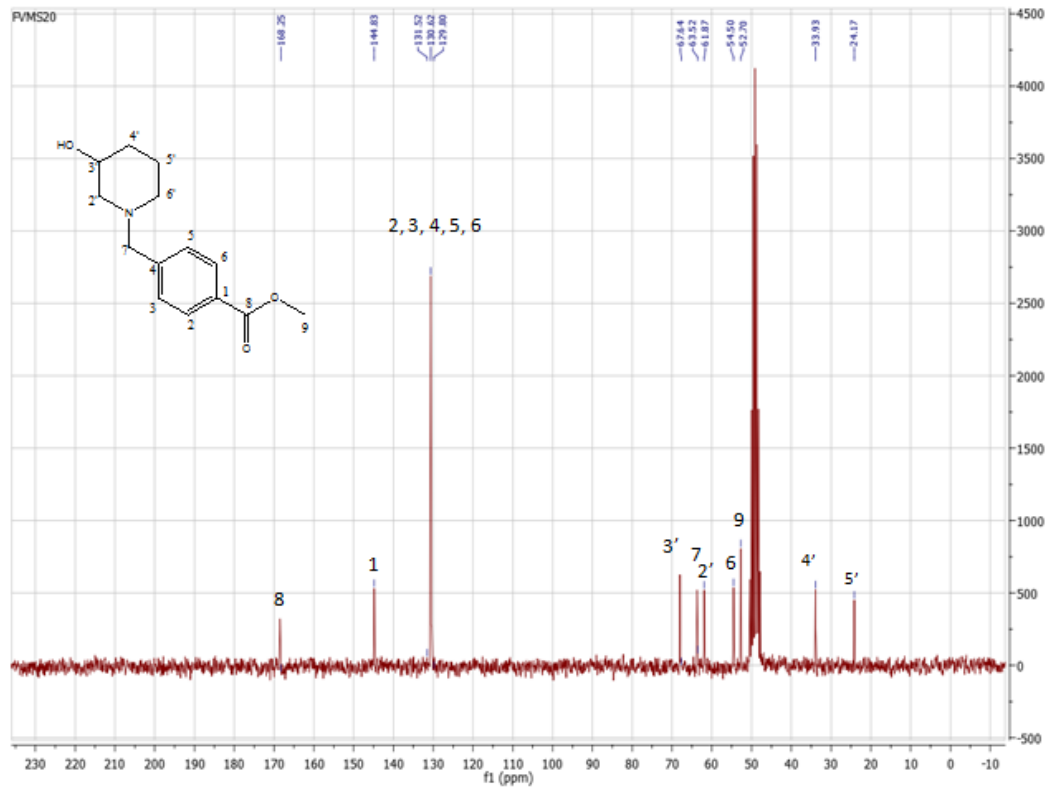


Espectro 5. Espectro no IV (KBr) do 4-((3-hidroxipiperid-1-ila)metil) benzoato de metila (**11**).

A estrutura do produto desejado foi confirmada no espectro de RMN de ^1H (Espectro 6), pela presença do singlete em δ 3,55, relativo aos hidrogênios metilênicos H-7, além dos sinais referentes à subunidade piperidínica em δ 1,00-4,00, do grupo metila de éster em δ 3,87 e do conjunto de dupletos relativos aos grupos metínicos aromáticos em δ 7,44 e 7,92. No espectro de RMN de ^{13}C também foi possível atribuir todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura da *N*-benzilpiperidina (**11**) (Espectro 7, Tabela 2).



Espectro 6. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (11).

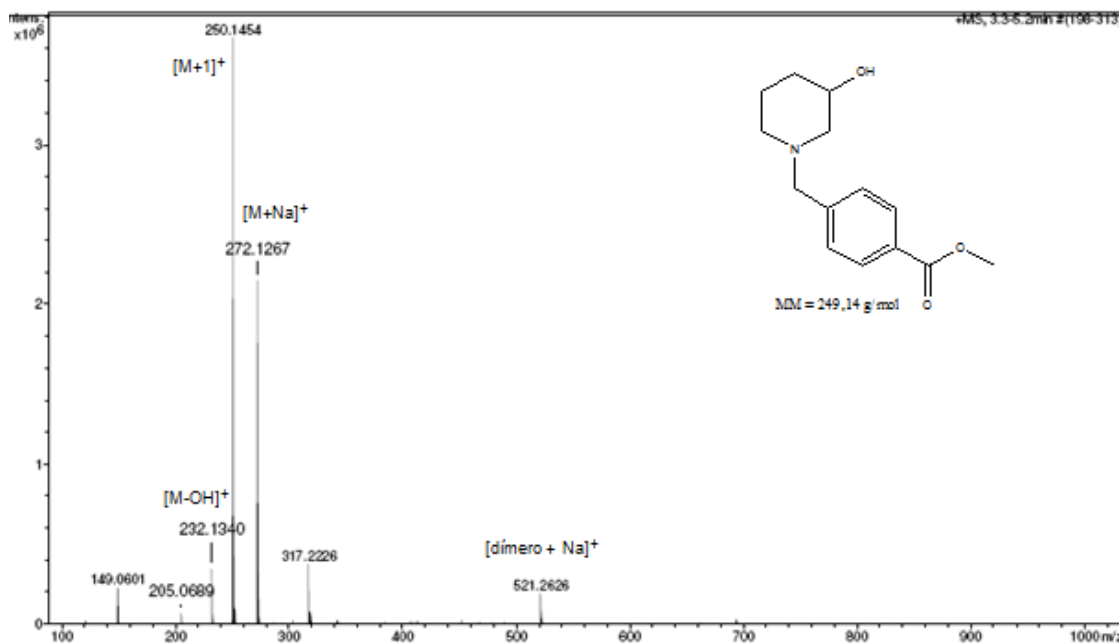


Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (**11**).

Tabela 2. Dados de RMN¹H e ¹³C do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (**11**).

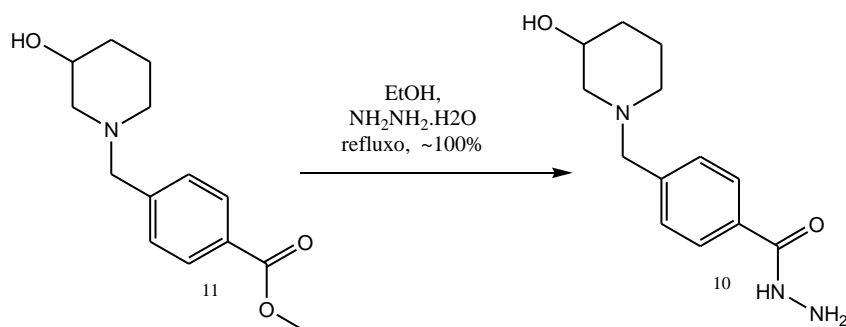
| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 1 | -- | -- | -- | 144,8 |
| 2 | 7,94 | d | 8,00 | 130,6 |
| 3 | 7,42 | d | 8,00 | 130,6 |
| 4 | -- | -- | -- | 130,6 |
| 5 | 7,42 | d | 8,00 | 130,6 |
| 6 | 7,94 | d | 8,00 | 130,6 |
| 7 | 3,55 | s | -- | 63,5 |
| 8 | -- | -- | -- | 168,3 |
| 9 | 3,87 | s | -- | 52,7 |
| 2' | 2,00 | m | -- | 61,9 |
| 3' | 3,64 | m | -- | 67,6 |
| 4' | 1,54 | m | -- | 33,9 |
| 5' | 1,84 | m | -- | 24,2 |
| 6' | 2,84 | m | -- | 54,5 |

No espectro de massas (Espectro 8), foi identificado o pico-íon- molecular [M+1]⁺ do composto em m/z = 250.1454. Também foi possível identificar os seguintes picos: [M + Na]⁺ em m/z = 272.1267; [M - OH]⁺ em m/z = 232.1340 e [dímero + Na]⁺ em m/z = 521.2626.



Espectro 8. Espectro de massas de alta resolução do 4[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoato de metila.

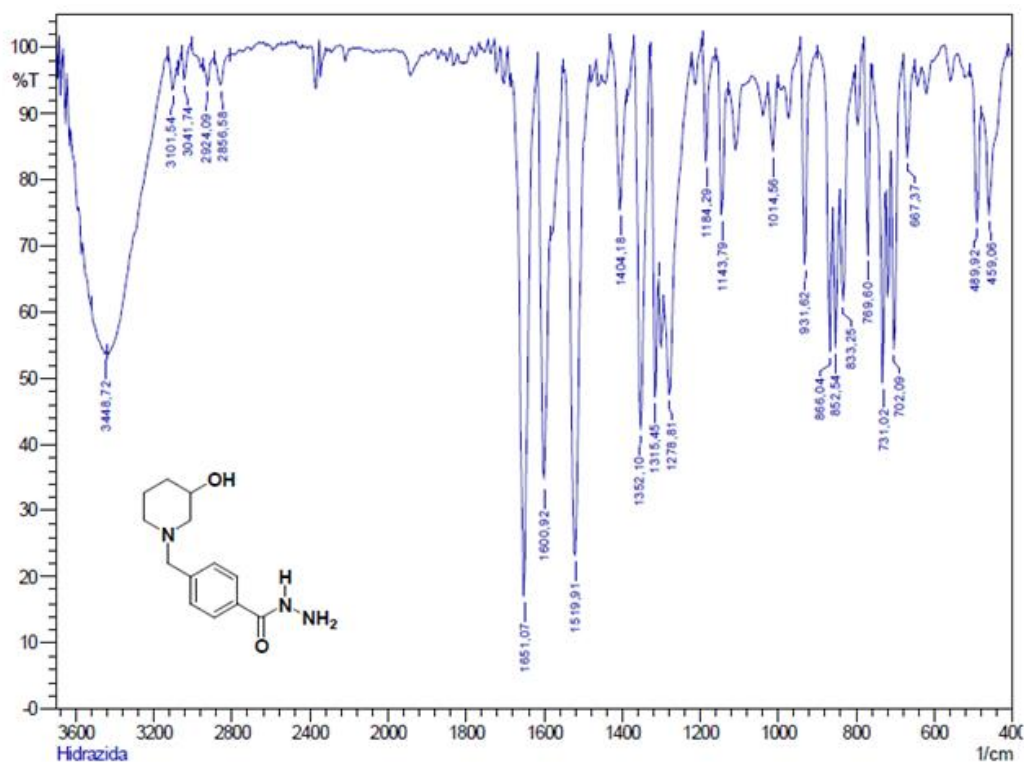
Uma vez obtida, a *N*-benzilpiperidina (**11**) foi, então, convertida na hidrazida (**10**), intermediário-chave na rota sintética proposta para a série-alvo, via reação de hidrazinólise, com monodrato de hidrazina (NH₂NH₂·H₂O) em etanol e sob refluxo.¹⁰²



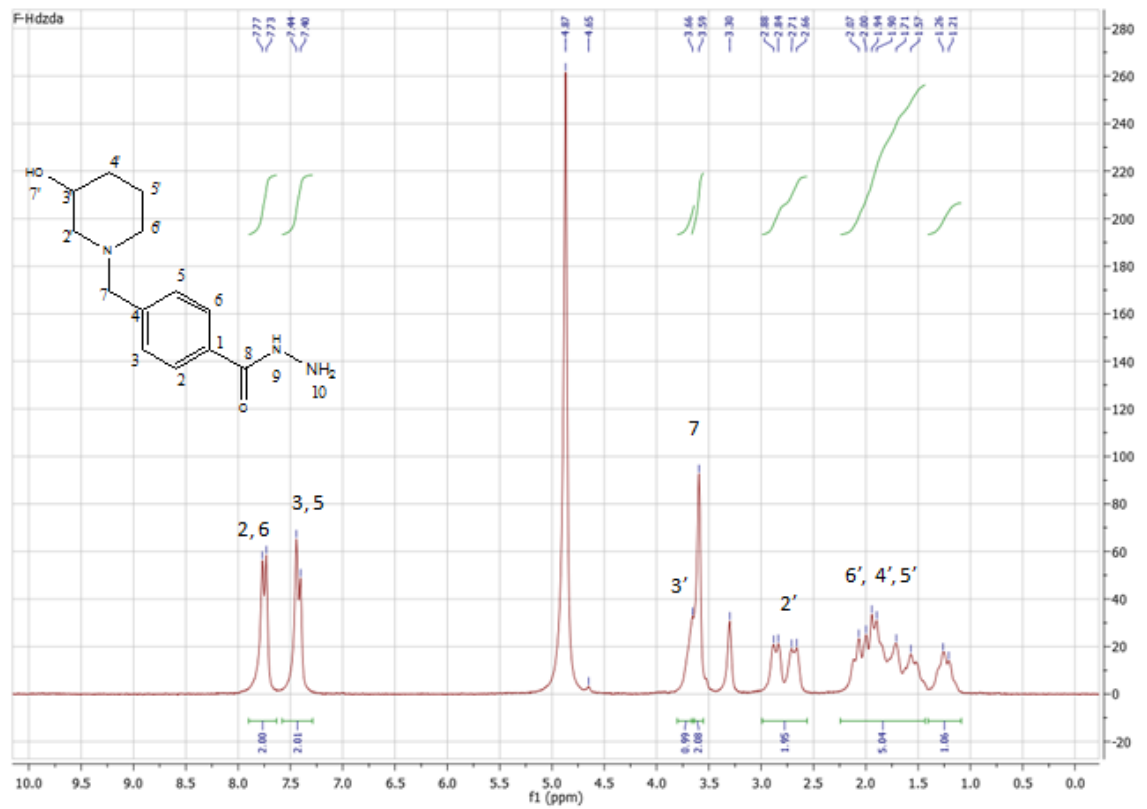
Esquema 3. Obtenção da hidrazida (**10**), a partir da reação do éster (**11**) com monodrato de hidrazina.

Foram feitos os espectros IV, de RMN ^1H e RMN ^{13}C , porém, os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C foram pouco conclusivos visto que os Hs da função hidrazida não apareceram. Mas, a estrutura foi confirmada pelo IV (Espectro 9) e pela espectrometria de massas de alta resolução (Espectro 12).

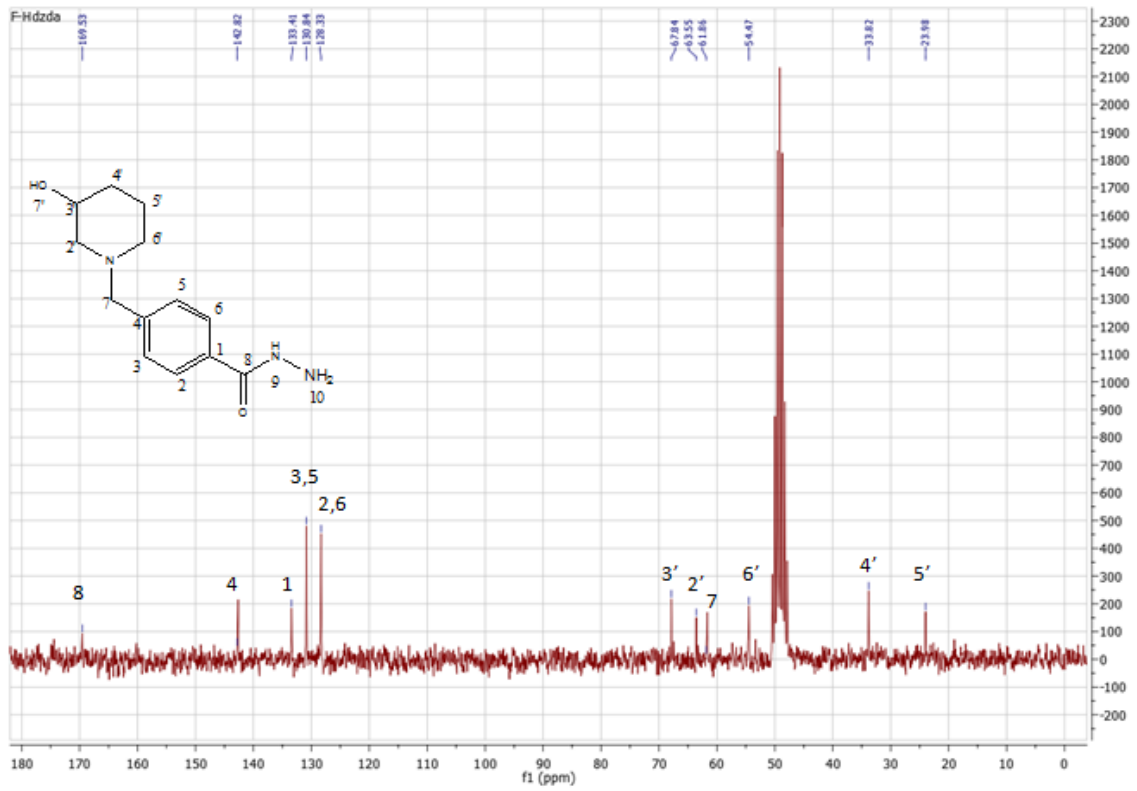
Ao comparar o espectro de IV da hidrazida (**10**) com o do éster precursor (**11**), nota-se o deslocamento da banda $\nu_{\text{C=O}}$ de 1716 para 1651 cm^{-1} e não há a banda intensa em 1111 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{C-O}}$ característica de ésteres. No espectro abaixo é possível verificar também uma banda de δ fora do plano de N-H em 1600 cm^{-1} , o que confirma a obtenção da hidrazida (**10**).



Espectro 9. Espectro no IV (KBr) da 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazida (**10**).



Espectro 10. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da 4[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoilidrazida (**10**).



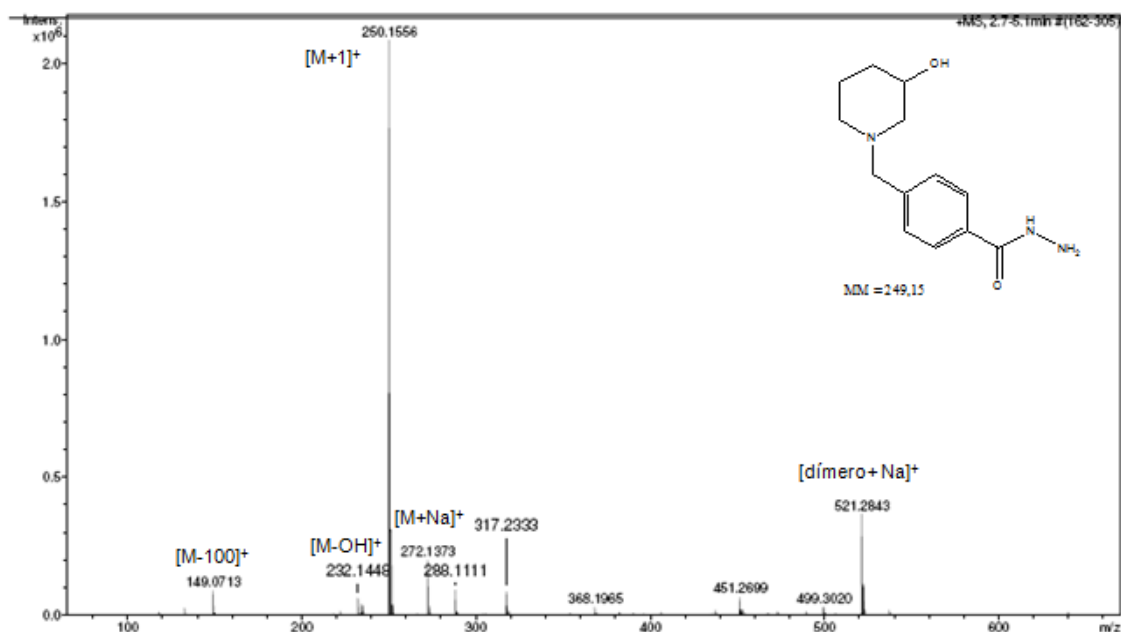
Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da 4[(3-hidroxipiperididín-1-il)metil]benzoidrazida (**10**).

Tabela 3: Dados de RMN¹H e ¹³C da 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoilidrazida (**10**).

| Posição | δ ¹ H (ppm) | M | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 1 | -- | -- | -- | 133,4 |
| 2 | 7,75 | d | 8,00 | 128,3 |
| 3 | 7,42 | d | 8,00 | 130,8 |
| 4 | -- | -- | -- | 142,8 |
| 5 | 7,42 | d | 8,00 | 130,6 |
| 6 | 7,75 | d | 8,00 | 128,3 |
| 7 | 3,59 | s | -- | 61,9 |
| 8 | -- | -- | -- | 169,5 |
| 9 | -- | -- | -- | -- |
| 10 | -- | -- | -- | -- |
| 2' | 2,86, 2,68 | m | -- | 63,6 |
| 3' | 3,66 | -- | -- | 67,8 |
| 4' | 1,90 | m | -- | 33,8 |
| 5' | 1,70 | m | -- | 24,0 |
| 6' | 2,00 | m | -- | 54,5 |

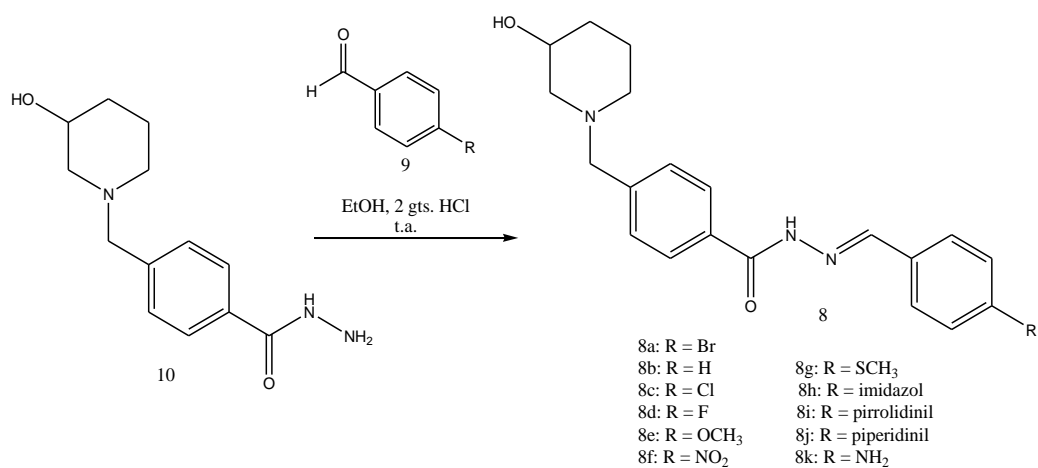
Foi possível confirmar a obtenção da hidrazida **10** por espectrometria de massas, cujo espectro (Espectro 12) apresenta pico referente ao íon molecular [M+1]⁺ em m/z = 250.1556. Também é possível verificar a presença dos picos referentes ao [M+Na]⁺ em m/z = 272.1373; [M-OH]⁺ em m/z = 232.1446;

[dímero+Na]⁺ em m/z = 521.2843 e o sinal do fragmento relativo à perda do anel piperidínico em [M-100]⁺ em m/z = 149.0713.



Espectro 12. Espectro de massas de alta resolução de 4[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzohidrazida (**10**).

Numa etapa final, a hidrazida (**10**) foi submetida ao acoplamento com uma série de benzaldeídos funcionalizados comerciais (**9**), em etanol, sob catálise de HCl¹⁰³, para gerar as respectivas 3-hidroxi-(*N*-benzil)-piperidinilacilidrazonas-alvo em rendimentos de 15-96 % (Esquema 4, Tabela 4).



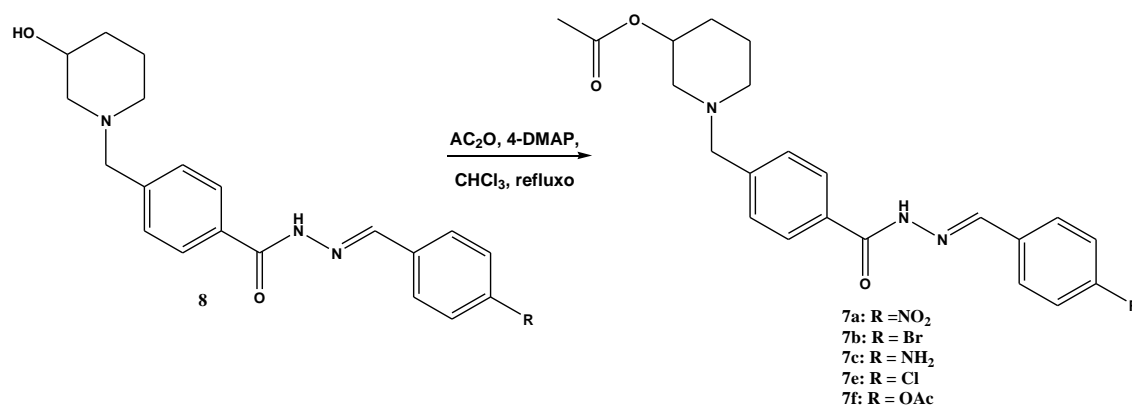
Esquema 4. Esquema da reação de acoplamento entre a hidrazida (**10**) e aldeídos funcionalizados.

Tabela 4. Dados experimentais da preparação da série de acilidrazonas-alvo **8a-I** (LFQM54-57, LFQM-65-67, LFQM-72, LFQM-75, LFQM-76 e LFQM-88).

| Substância | R | Rendimento (%) | Intervalo de Fusão (°C) |
|---------------------|-----------------|----------------|-------------------------|
| 8b (LFQM-54) | H | 32 | 194-200 |
| 8a (LFQM-55) | Br | 52 | 198-203 |
| 8c (LFQM-56) | Cl | 62 | 210-215 |
| 8f (LFQM-57) | NO ₂ | 95 | 210-214 |

| | | | |
|---------------------|------------------|----|------------------|
| 8e (LFQM-65) | OCH ₃ | 96 | 193-195 |
| 8i (LFQM-66) | Pirrolidinil | 94 | 172-180 |
| 8d (LFQM-67) | F | 68 | 225-232 |
| 8k (LFQM-72) | NH ₂ | 15 | 125-132 |
| 8j (LFQM-75) | Piperidinil | 31 | 178-186 |
| 8h (LFQM-76) | Imidazolil | 29 | 152-decomposição |
| 8g (LFQM-88) | SCH ₃ | 59 | 195-205 |

Visando avaliar a contribuição farmacofórica do grupo hidroxila em C-3 da subunidade piperidínica da série de 3-hidroxi-(*N*-benzil)-piperidinil- acilidrazonas **8** e, ainda, avaliar a influência do grupo acetila presente na estrutura de LASSBio-767, substância inibidora de AChE utilizada como protótipo na gênese da série-alvo deste projeto, algumas hidroxi-acilidrazonas da série **8** foram convertidas nos respectivos derivados acetilados, por reação com AC₂O/4-DMAP em CHCl₃¹⁰⁴ (Esquema 5, Tabela 5).



Esquema 5. Preparação da série de acilidrazonas acetiladas **7 (a-f)**, por reação de acetilação com Ac₂O, 4-DMAP e CH₂Cl₂.

Tabela 5. Dados experimentais da preparação da série de acilidrazonas-acetiladas-alvo **7a-f (LFQM-58, LFQM-68, LFQM-73, LFQM-84 e LFQM-87)**.

| Substância | R | Rendimento (%) | Faixa de Fusão (°C) |
|--------------|-----------------|----------------|---------------------|
| 7a (LFQM-58) | NO ₂ | 84 | 160-163 |
| 7b (LFQM-68) | Br | 60 | 140-150 |
| 7c (LFQM-73) | NH ₂ | 42 | 220-228 |
| 7e (LFQM-84) | Cl | 24 | 100-102 |
| 7f (LFQM-87) | OAc | 37 | 145-150 |

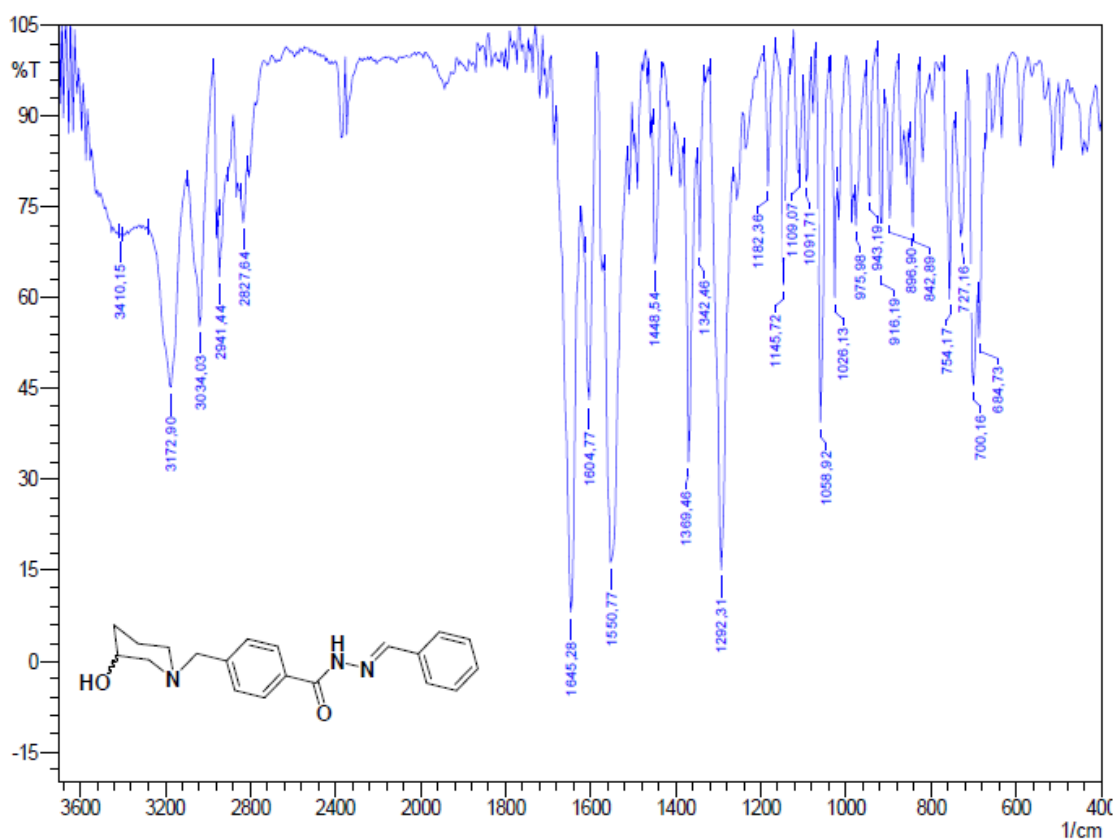
As análises por ressonância magnética nuclear (RMN) ainda estão sendo realizados em instituições colaboradoras externas (UFRRJ e UFMG) e, nem todos os espectros estão disponíveis. Por outro lado, todas as substâncias das séries **7** e **8** foram caracterizadas por infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução.

Em todas as etapas da rota sintética foi realizado um estudo com o objetivo de otimizar as reações, procurando aumentar os rendimentos e facilitar o isolamento das substâncias-alvo em relação ao trabalho anterior (Rocha, M. D. **Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos moleculares 3-O-piperidinil-N-benzilacilhidrazônicos, planejados como candidatos a fármacos simbióticos: anticolinesterásicos e anti-inflamatórios**. 2010. 117f. Dissertação (Mestrado em Química). UNIFAL-MG, Alfenas, 2010.) Porém, após a repetição de cada reação várias vezes, percebeu-se que os rendimentos anteriores não se mostraram adequadamente reprodutíveis, principalmente em relação às etapas de acoplamento entre a hidrazida-chave e diferentes aldeídos e nas reações de acetilação. Portanto, é possível observar variações entre os rendimentos do trabalho anterior e o atual, que apesar de menores em alguns casos, foram reprodutíveis após vários experimentos e em diferentes momentos da execução deste trabalho.

5.1 Caracterização estrutural das N-benzilpiperidinilacilidrazonas das séries-alvo 7 e 8.

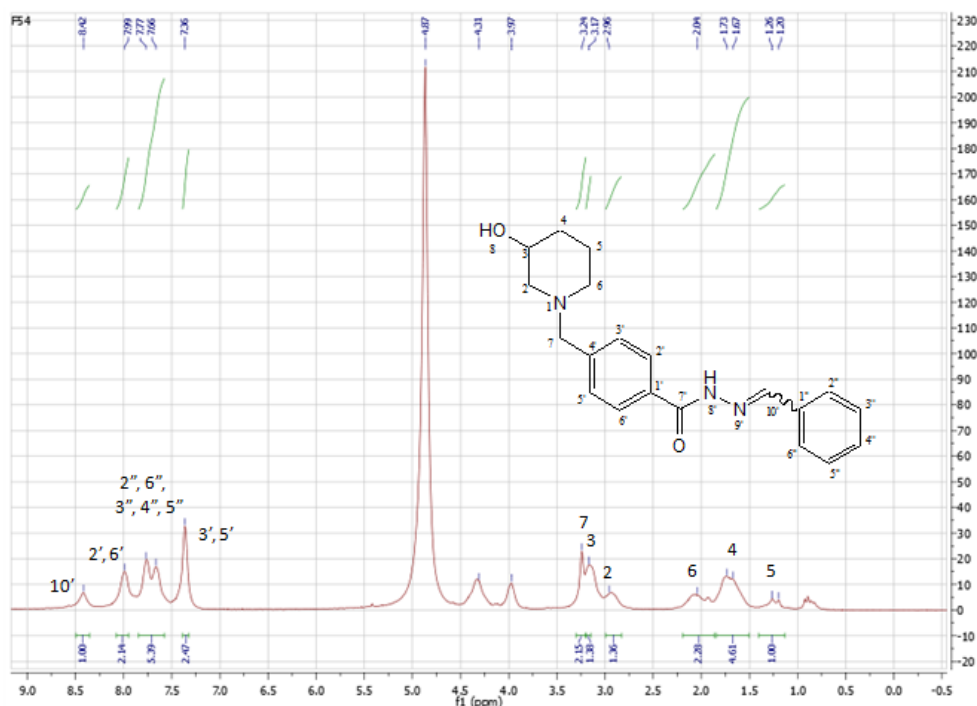
5.1.1 N-benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8b (LFQM-54)

O espectro no IV (Espectro 13) da substância **LFQM-54** apresenta bandas de ν O-H em 3410 cm^{-1} , ν N-H em 3172 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3034 cm^{-1} , ν_{s} C-H sp^3 em 2827 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , ν C=O em 1645 cm^{-1} e, dentre outras, apresenta também a banda referente ao ν C=N em 1604 cm^{-1} .



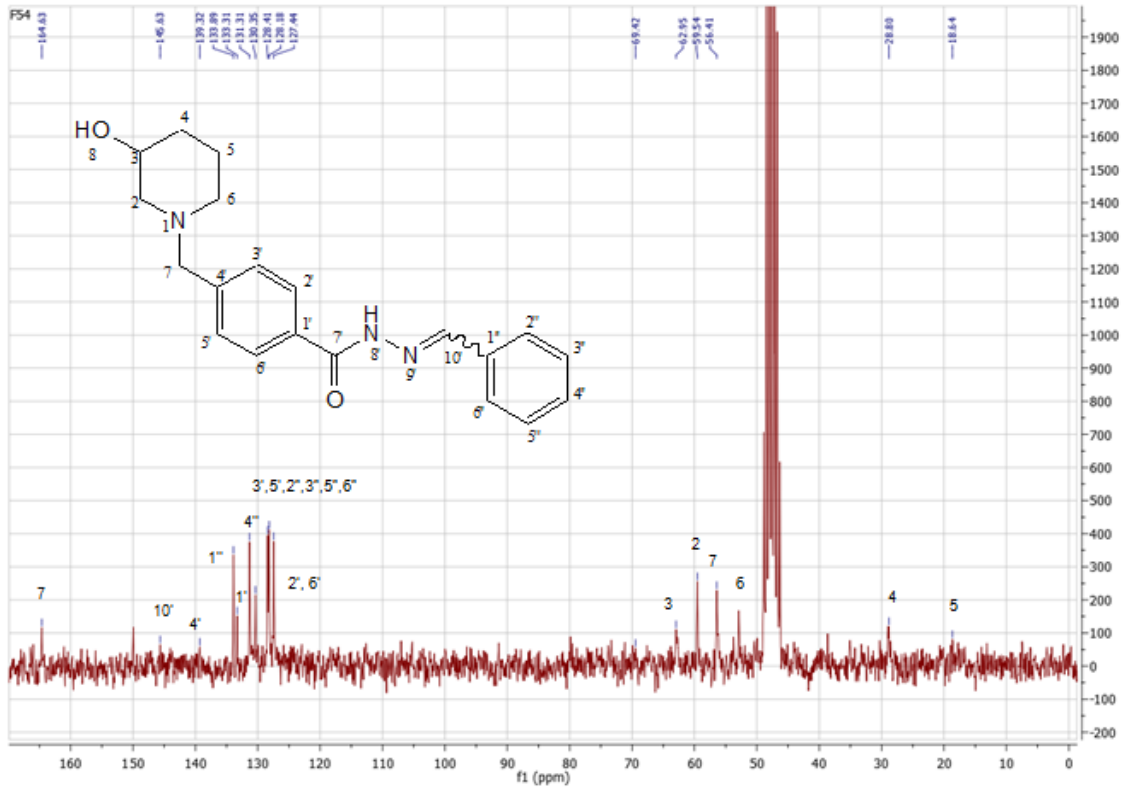
Espectro 13. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-54**.

A estrutura da **LFQM-54** foi confirmada no espectro de RMN ^1H (Espectro 14), pela presença do singlete em δ 8,42 relativo ao hidrogênio 10', além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e piperidínicos.



Espectro 14. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da substância **LFQM-54**.

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 15), pode-se observar os sinais em δ 164,6 referente ao C=O, δ 145,6 referente ao C-10 hidrazônico e em δ 56,4 referente ao C-7 mais característicos da estrutura da **LFQM-54** além dos sinais referentes aos carbonos aromáticos e piperidínicos.

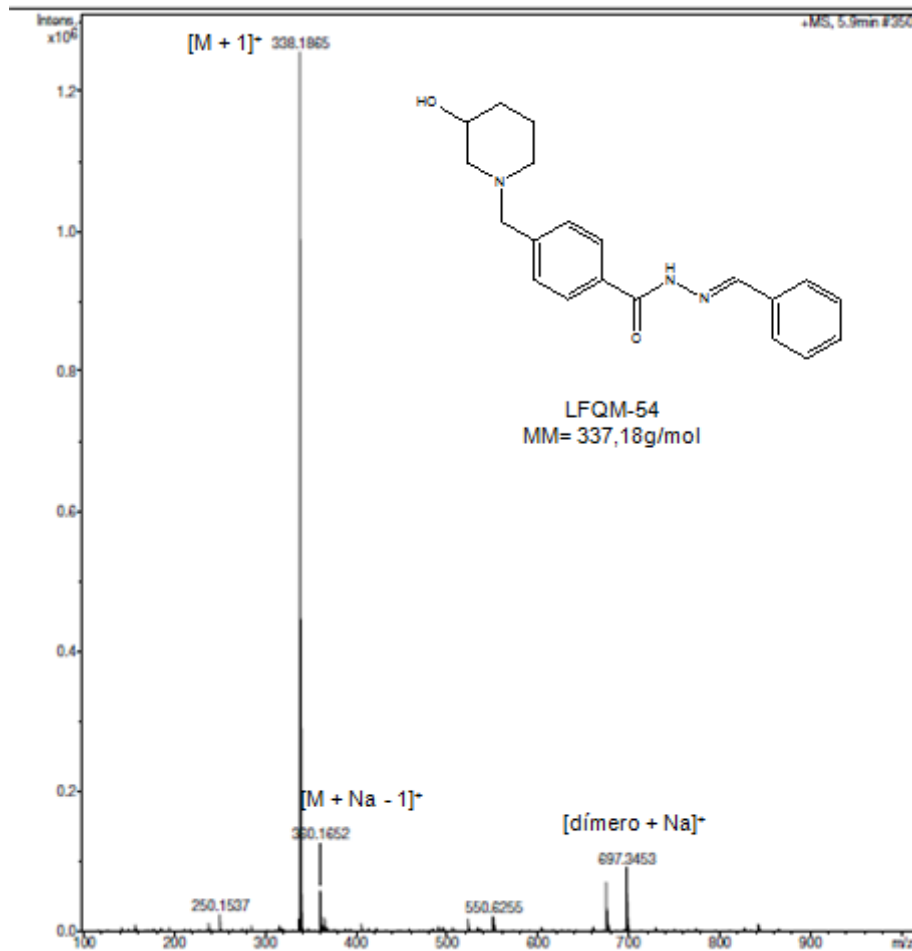


Espectro 15. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) da substância **LFQM-54**.

Tabela 6. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **8b** (LFQM-54).

| Posição | δ ¹ H (ppm) | M | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 2,96 | -- | -- | 59,5 |
| 3 | 3,17 | -- | -- | 70,0 |
| 4 | 1,73 | -- | -- | 28,8 |
| 5 | 1,26 | -- | -- | 18,6 |
| 6 | 2,04 | -- | -- | 52,9 |
| 7 | 3,24 | | | 56,4 |
| 1' | -- | -- | -- | 133,3 |
| 2' | 7,99 | -- | -- | 127,4 |
| 3' | 7,36 | -- | -- | 130,4 |
| 4' | -- | -- | -- | 139,3 |
| 5' | 7,36 | -- | -- | 130,5 |
| 6' | 7,99 | -- | -- | 127,4 |
| 7' | -- | -- | -- | 164,6 |
| 10' | 8,42 | s | -- | 145,6 |
| 1'' | -- | -- | -- | 133,9 |
| 2'' | 7,77 | -- | -- | 128,4 |
| 3'' | 7,66 | -- | -- | 128,1 |
| 4'' | 7,66 | -- | -- | 131,3 |
| 5'' | 7,66 | -- | -- | 128,1 |
| 6'' | 7,77 | -- | -- | 128,4 |

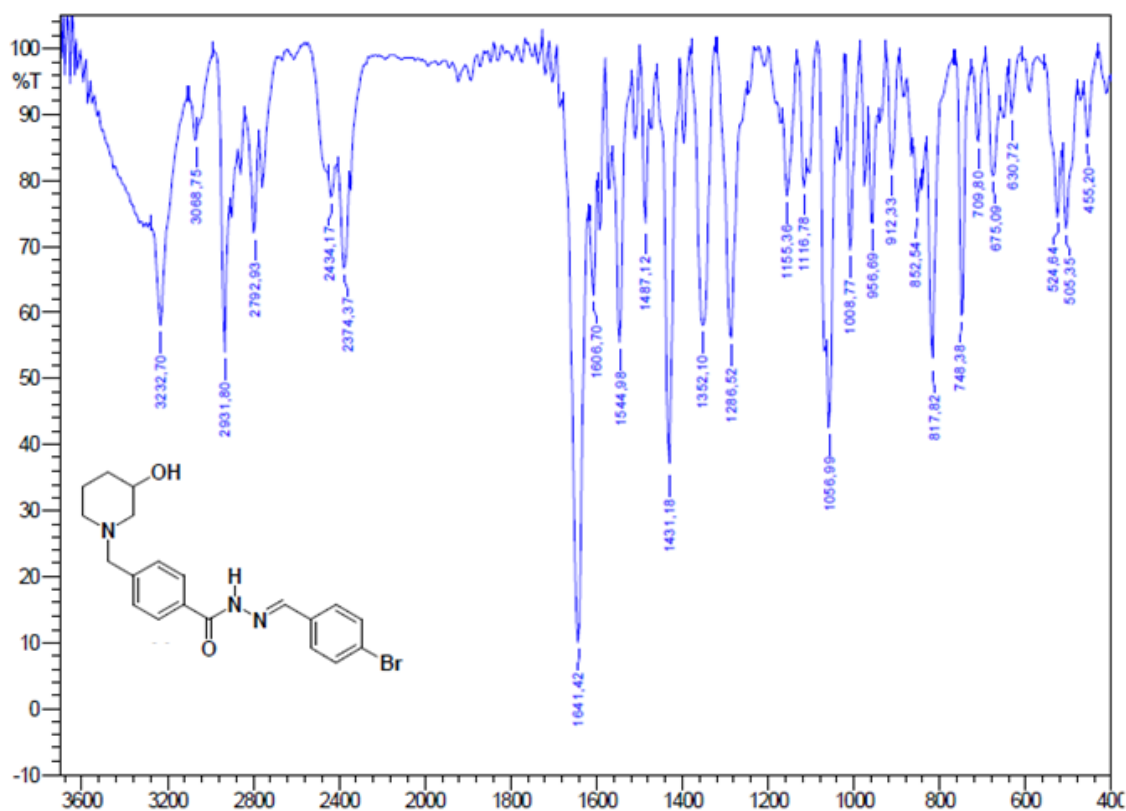
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 16) está apresentado o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 338,1965$. Também é possível verificar os picos referentes ao $[M+Na+1]^+$ em $m/z = 360,1652$ e ao $[d\acute{ı}mero+Na]^+$ em $m/z = 697,3453$.



Espectro 16. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-54**.

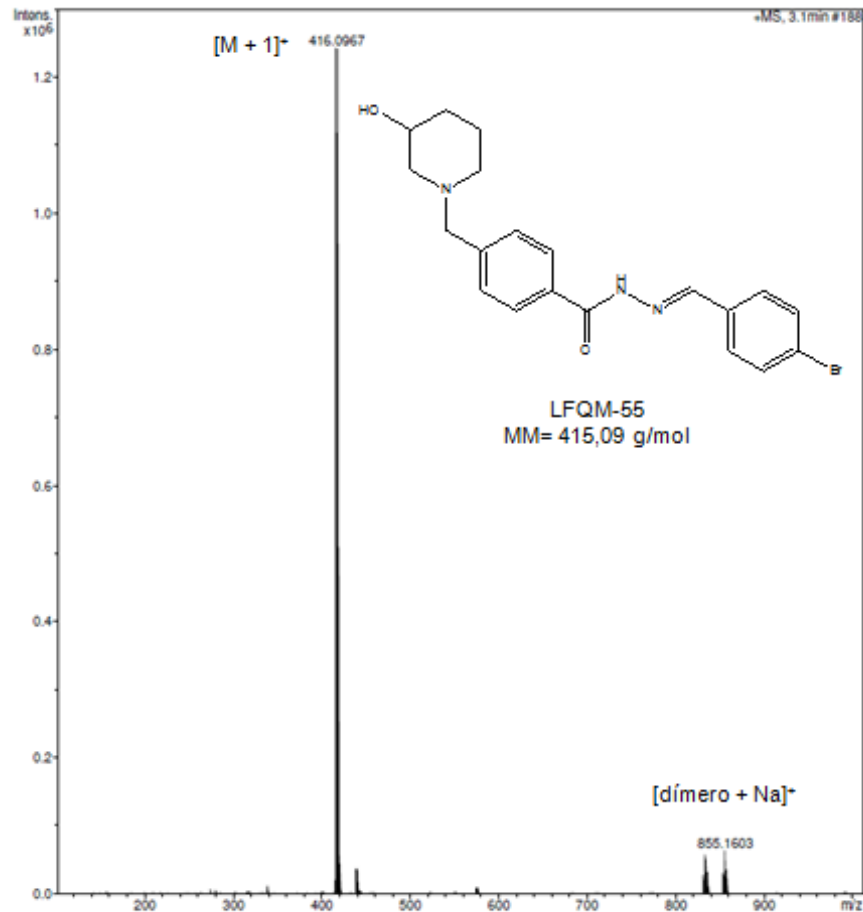
5.1.2 N- (4-bromobenzilideno-4-((3-hidroxi piperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8a (LFQM-55)

Ao se comparar o espectro no IV da hidrazida (Espectro 17) com o espectro de IV da substância **LFQM-55** (Espectro 17), nota-se o aparecimento de uma banda em 3232 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ e o deslocamento de 1651 para 1641 cm^{-1} da banda de $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ que pode estar relacionado com o acopamento da hidrazida com o aldeído.



Espectro 17. Espectro no IV (KBr) da substâncias **LFQM-55**.

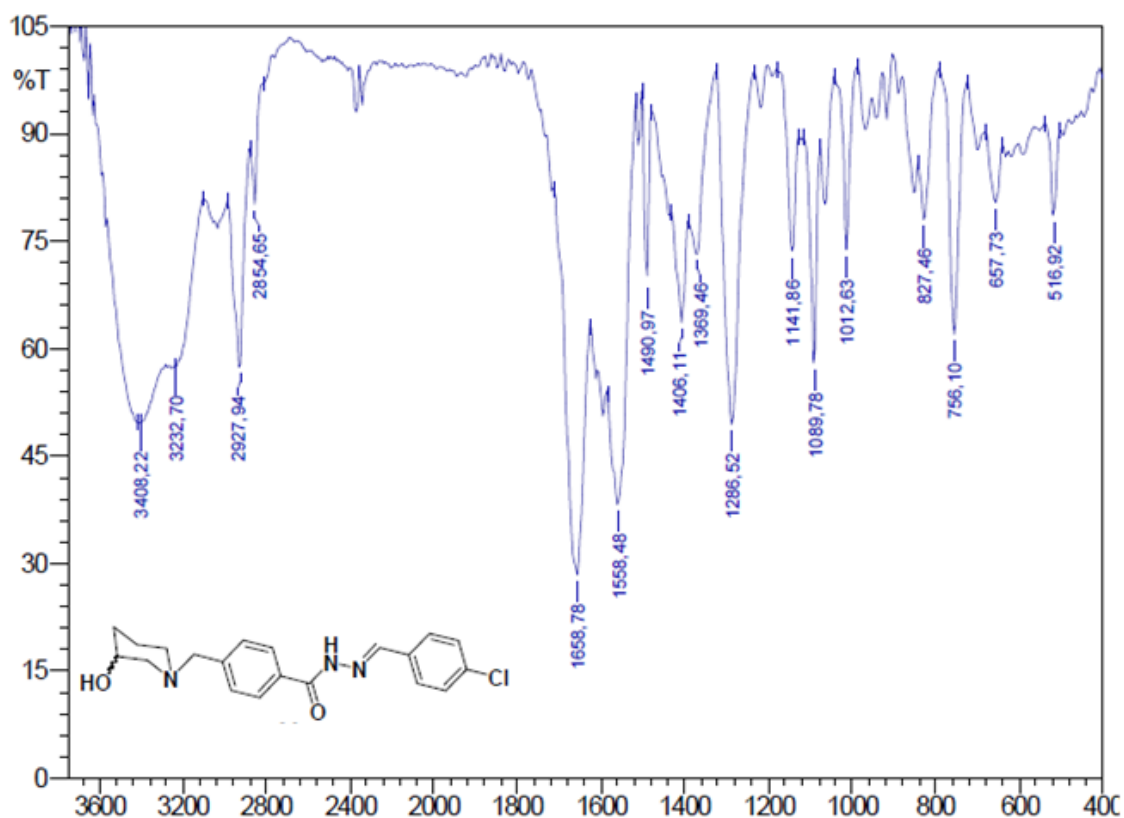
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 18) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 416,0967$ e ao $[d\acute{ı}mero+Na]^+$ em $m/z = 855,1603$.



Espectro 18. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-55**.

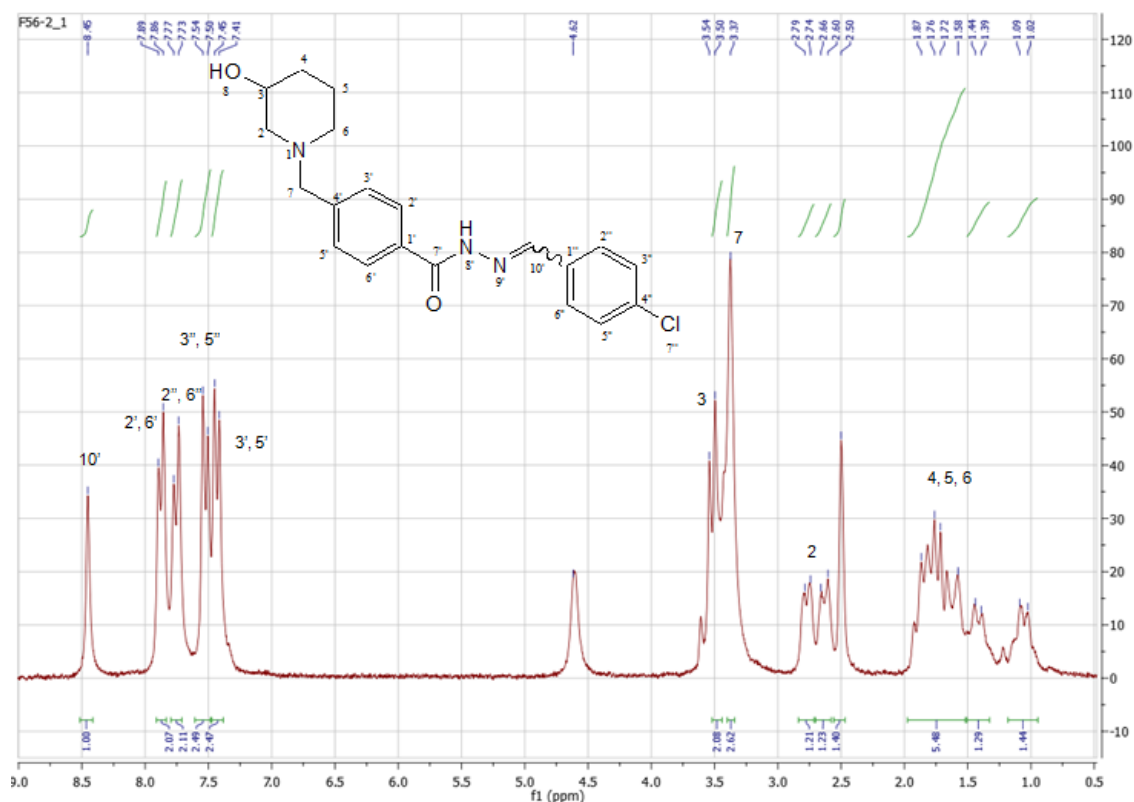
5.1.3 N- (4-clorobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8c (LFQM-56)

O espectro no IV (Espectro 19) da substância **LFQM-56** apresenta bandas de ν O-H em 3408 cm^{-1} , ν N-H em 3232 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2854 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2927 cm^{-1} , ν C=O em 1658 cm^{-1} , ν C=N em 1558 cm^{-1} , ν C-O em 1089 cm^{-1} e dentre outras, apresenta a banda referente ao ν C-Cl em 756 cm^{-1} .



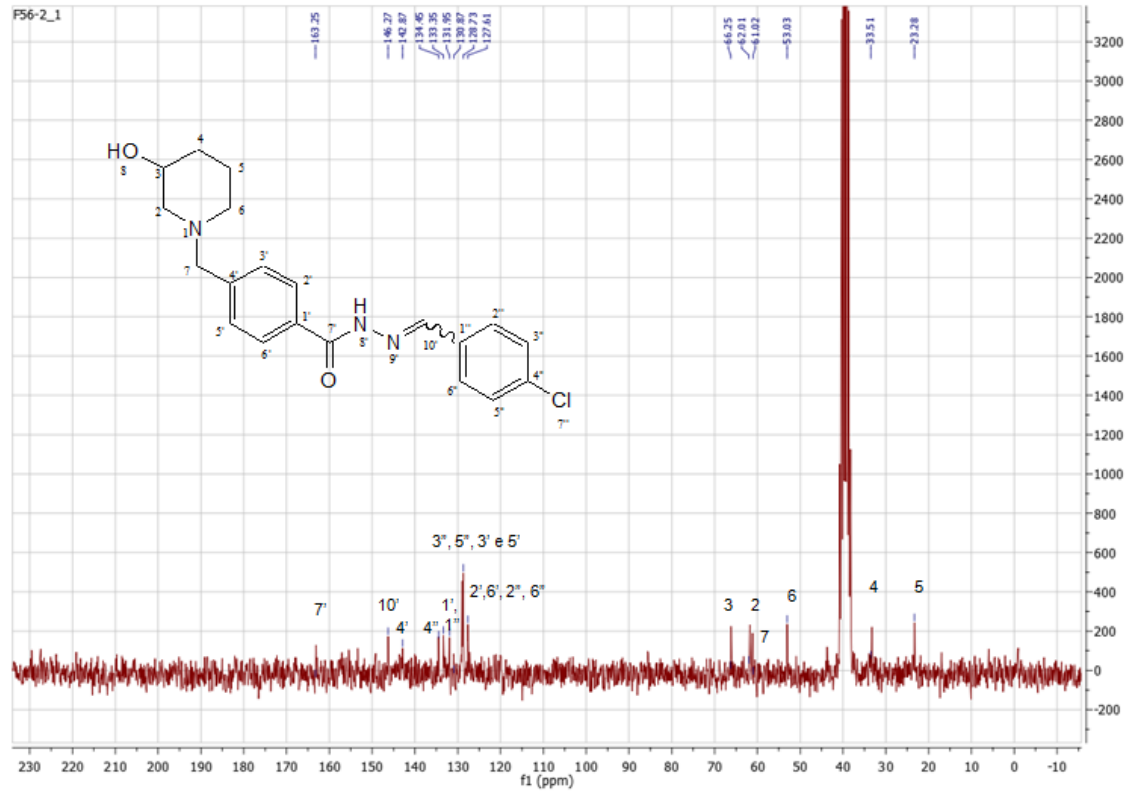
Espectro 19. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-56**.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 20), estão presentes, entre outros, o singlete referente aos H-7 em δ 3,37 e, em δ 8,45 está o singlete referente ao H-10', sinal que comprova a formação do produto desejado.



Espectro 20. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **LFQM-56**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 21), estão presentes, entre outros, os sinais referente ao C-7 em δ 61,0 e, o sinal referente ao C-10' em δ 146,3 ppm.

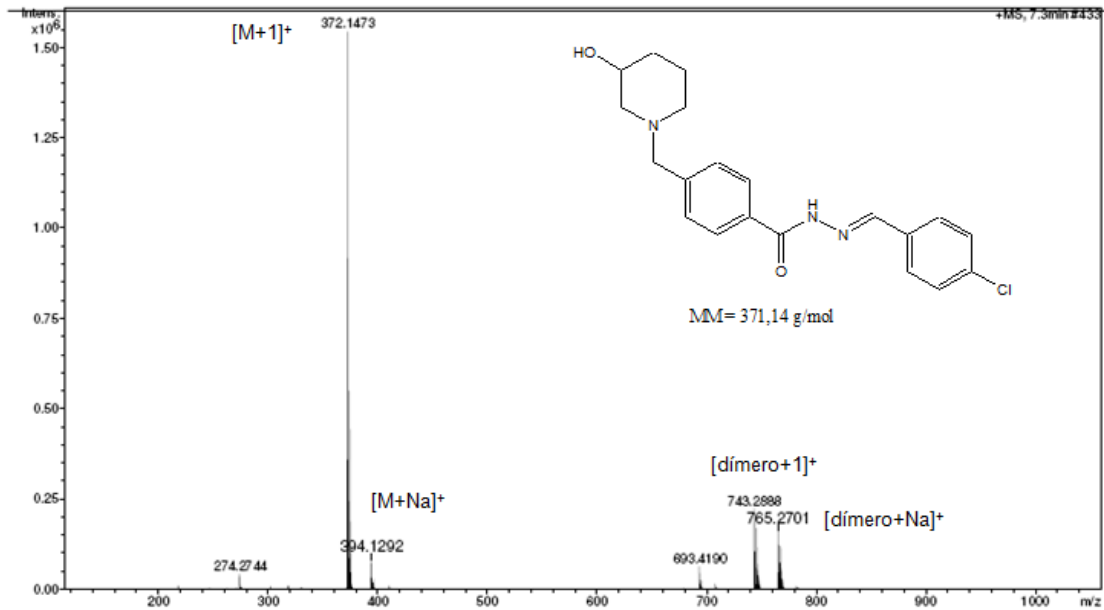


Espectro 21. Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6) da substância **LFQM-56**.

Tabela 7. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-56**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 2,74 – 2,79 | m | -- | 62,0 |
| 3 | -- | -- | -- | 66,3 |
| 4 | 1,58 – 1,72 | m | -- | 33,5 |
| 5 | 1,39 – 1,44 | m | -- | 23,3 |
| 6 | 1,76 – 1,87 | m | -- | 53,0 |
| 7 | 3,37 | s | -- | 61,0 |
| 1' | -- | -- | -- | 135,0 |
| 2' | 7,87 | d | 6,00 | 127,6 |
| 3' | 7,43 | d | 8,00 | 131,0 |
| 4' | -- | - | -- | 134,5 |
| 5' | 7,43 | d | 8,00 | 131,0 |
| 6' | 7,87 | d | 6,00 | 127,6 |
| 7' | -- | -- | -- | 163,3 |
| 10' | 8,45 | s | -- | 146,3 |
| 1'' | -- | -- | -- | 132,0 |
| 2'' | 7,75 | d | 8,00 | 127,6 |
| 3'' | 7,52 | d | 8,00 | 130,9 |
| 4'' | -- | -- | -- | 133,4 |
| 5'' | 7,52 | d | 8,00 | 130,9 |
| 6'' | 7,75 | d | 8,00 | 127,6 |

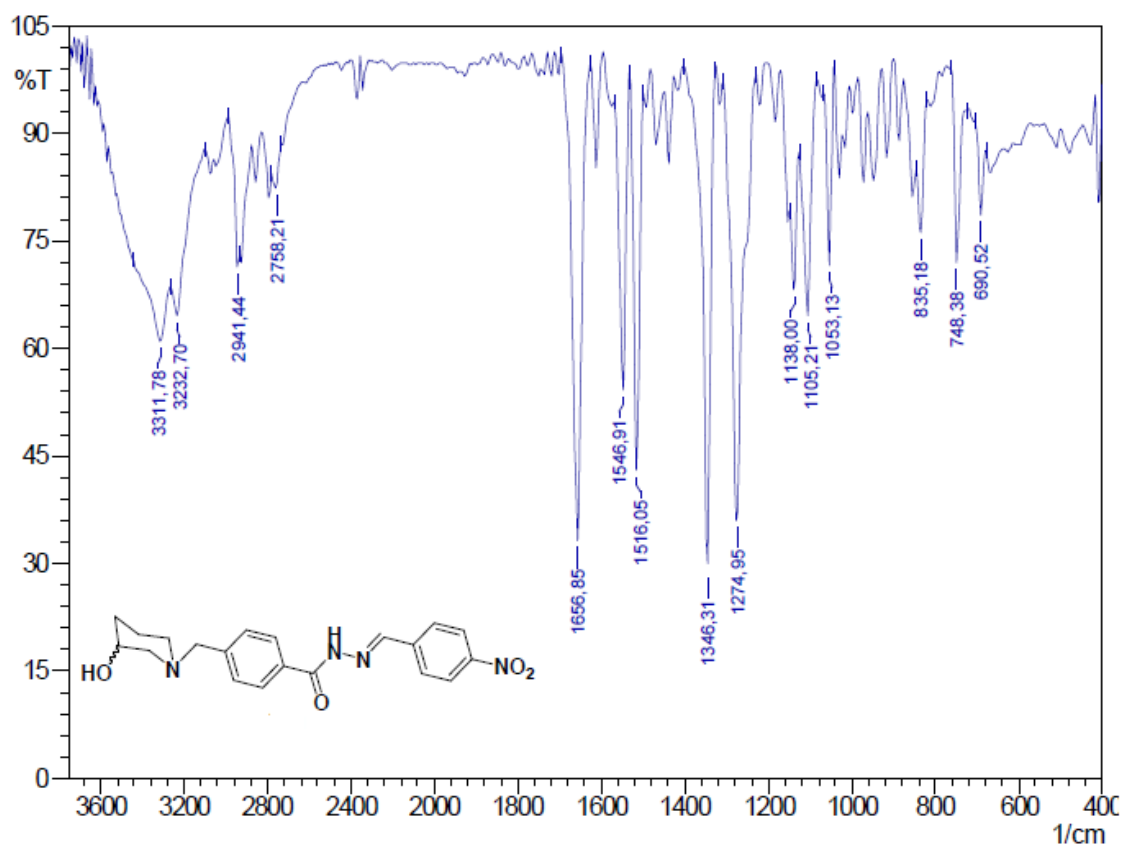
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 22) está presente o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 372,1473$. Também é possível verificar os picos referentes ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 394,1292$, ao $[\text{dímero}+1]^+$ em $m/z = 743,2888$ e ao $[\text{dímero}+Na]^+$ em $m/z = 765,2701$.



Espectro 22. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-56**.

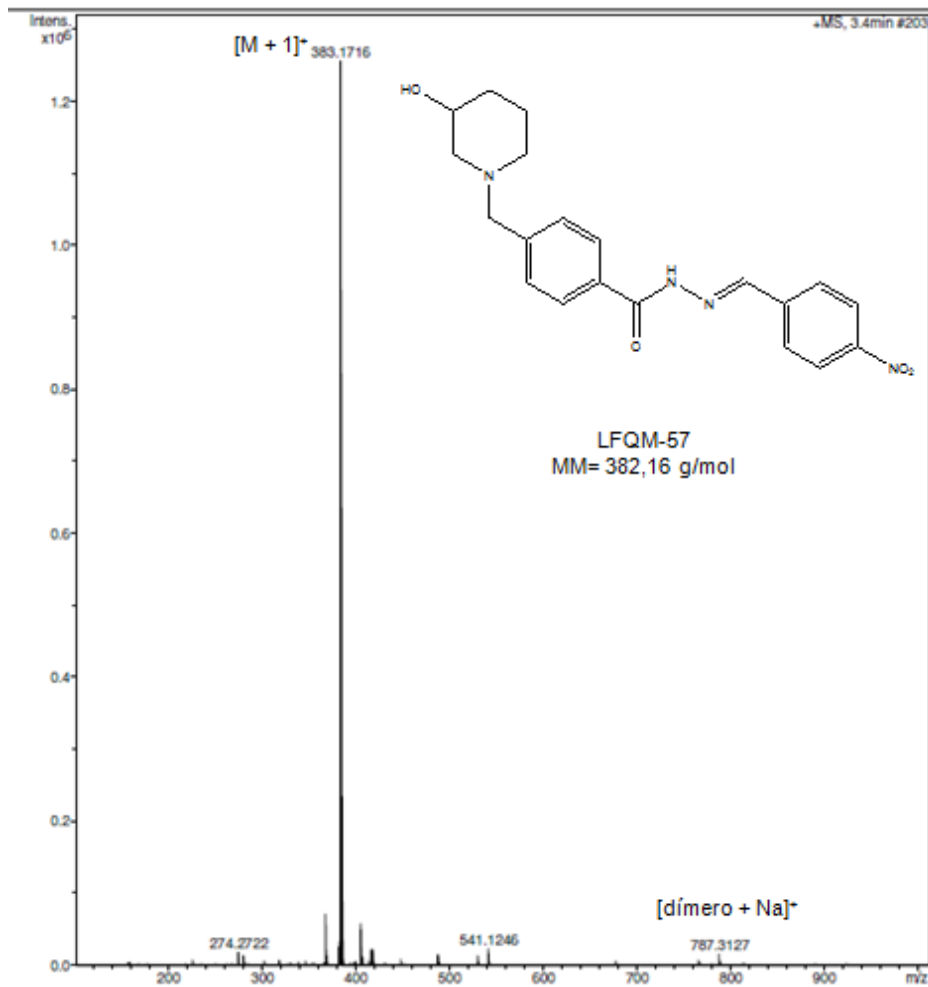
5.1.4 N- (4-nitrobenzilideno-4-((3-hidroxi piperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8f (LFQM-57).

O espectro no IV (Espectro 23) da substância **LFQM-57** apresenta bandas de ν O-H em 3311 cm^{-1} , ν N-H em 3232 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , ν C=O em 1655 cm^{-1} , ν C=N em 1546 cm^{-1} , ν C-O em 1053 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν N=O em 1516 e 1346 cm^{-1} .



Espectro 23. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-57**.

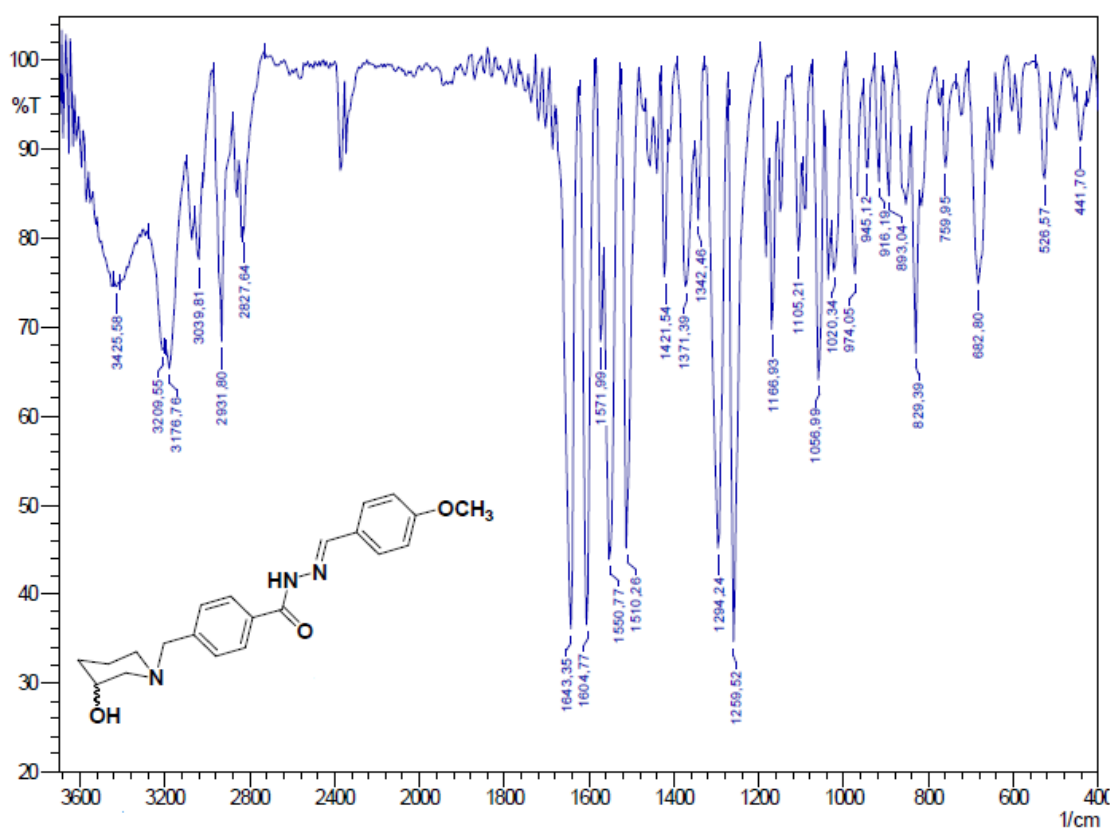
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 24) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 383,1716$ e ao $[d\acute{ı}mero + Na]^+$ em $m/z = 787,3127$.



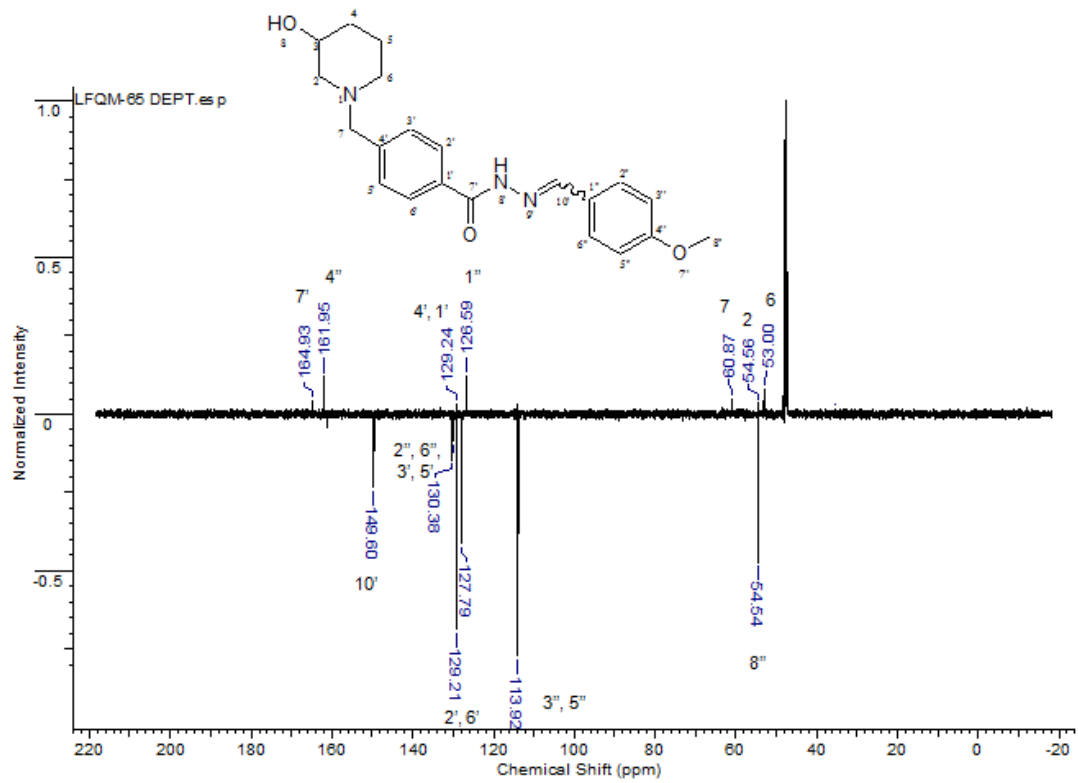
Espectro 24. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-57**.

5.1.5 N- (4-metoxibenzilideno-4-((3-hidroxi piperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8e (LFQM-65).

O espectro no IV (Espectro 25) da substância **LFQM-65** apresenta bandas de ν O-H em 3425 cm^{-1} , ν N-H em 3209 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3039 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2827 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2931 cm^{-1} , ν C=O em 1643 cm^{-1} , ν C=N em 1604 cm^{-1} , ν C-O em 1056 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as bandas referente ao δ C-H sp^3 da metila em 1421 e 1371 cm^{-1} .



Espectro 25. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-65**.



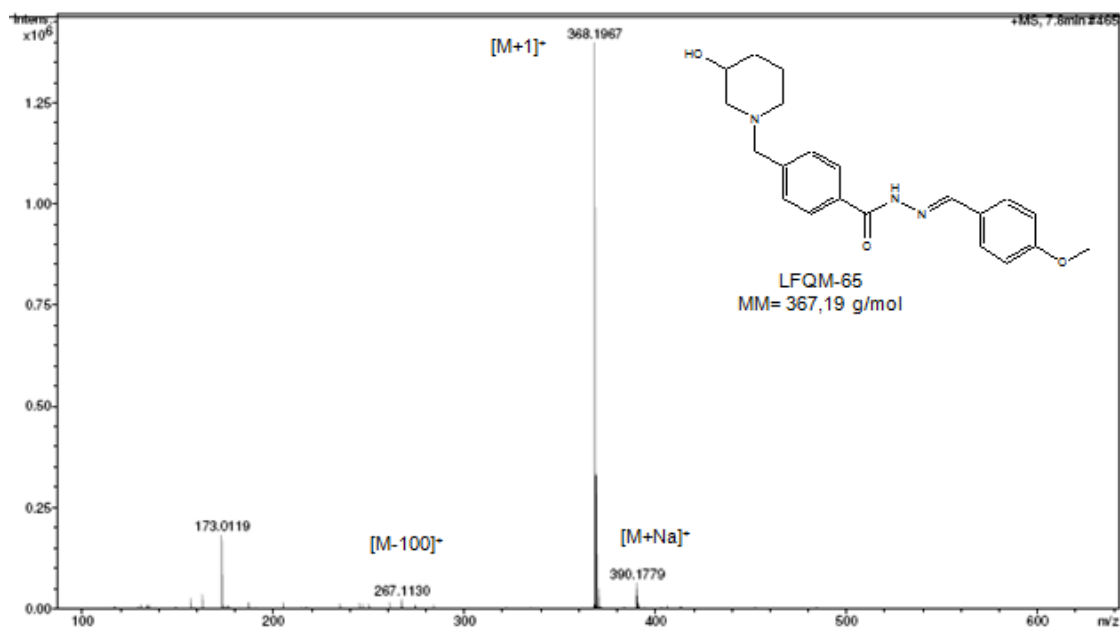
Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C dept Q (100 MHz, MeOD) da substância **LFQM-65**.

Tabela 8. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-65**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 3,07 | m | -- | 54,6 |
| 3 | 4,10 | m | -- | -- |
| 4 | 1,50 – 2,0 | m | -- | -- |
| 5 | 1,50 – 2,00 | m | -- | -- |
| 6 | 1,50 - 2,00 | m | -- | 53,0 |
| 7 | -- | -- | -- | 60,9 |
| 1' | -- | -- | -- | 129,2 |
| 2' | 8,00 | d | 10,00 | 129,2 |
| 3' | 7,62 | d | 5,00 | 130,4 |
| 4' | -- | - | -- | 129,2 |
| 5' | 7,62 | d | 5,00 | 130,4 |
| 6' | 8,00 | d | 10,00 | 129,2 |
| 7' | -- | -- | -- | 165,0 |
| 8' | -- | -- | -- | -- |
| 10' | 8,36 | s | -- | 149,6 |
| 1'' | -- | -- | -- | 126,6 |
| 2'' | 7,81 | d | 10,00 | 130,4 |
| 3'' | 7,01 | d | 10,00 | 113,9 |
| 4'' | -- | -- | -- | 162,0 |
| 5'' | 7,01 | d | 10,00 | 113,9 |
| 6'' | 7,81 | d | 10,00 | 130,4 |
| 7'' | -- | -- | -- | -- |

| | | | | |
|----|------|---|----|------|
| 8" | 3,87 | s | -- | 54,5 |
|----|------|---|----|------|

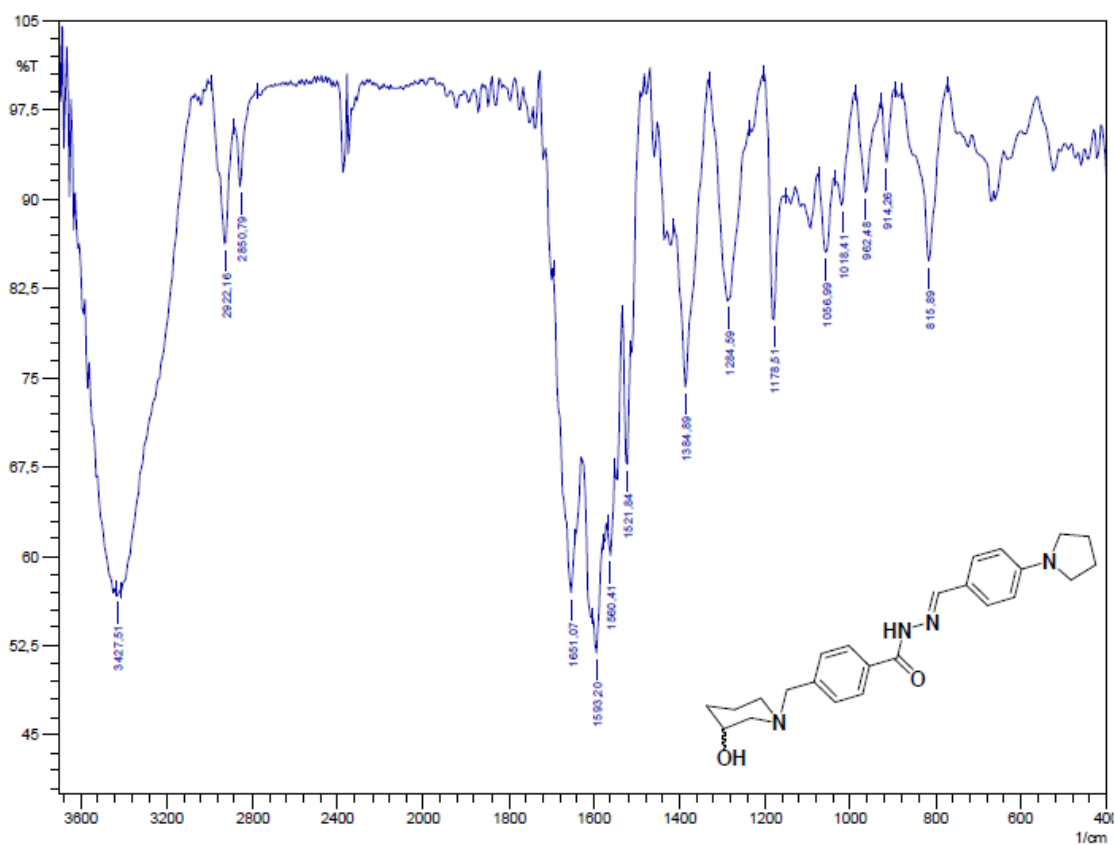
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 28) foi identificado o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 368,1967$. Também é possível verificar a presença do pico referente a perda da subunidade piperidínica $[M-100]^+$ em $m/z = 267,1130$ e do pico referente ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 390,1779$.



Espectro 28. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-65**.

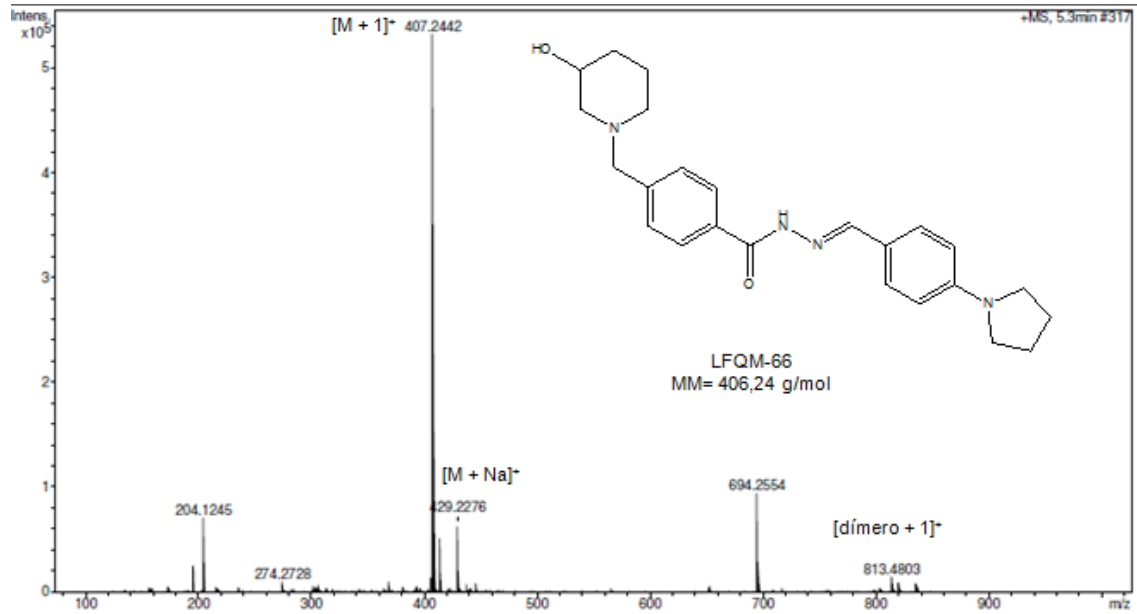
5.1.6 N- (4-(pirrolidin-1-ila)benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8i (LFQM-66).

O espectro no IV (Espectro 29) da substância **LFQM-66** apresenta bandas de ν O-H em 3427 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2922 cm^{-1} , ν_{s} C-H sp^3 em 2850 cm^{-1} , ν C=O em 1651 cm^{-1} e entre outras a banda referente ao ν C=N em 1593 cm^{-1} .



Espectro 29. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-66**.

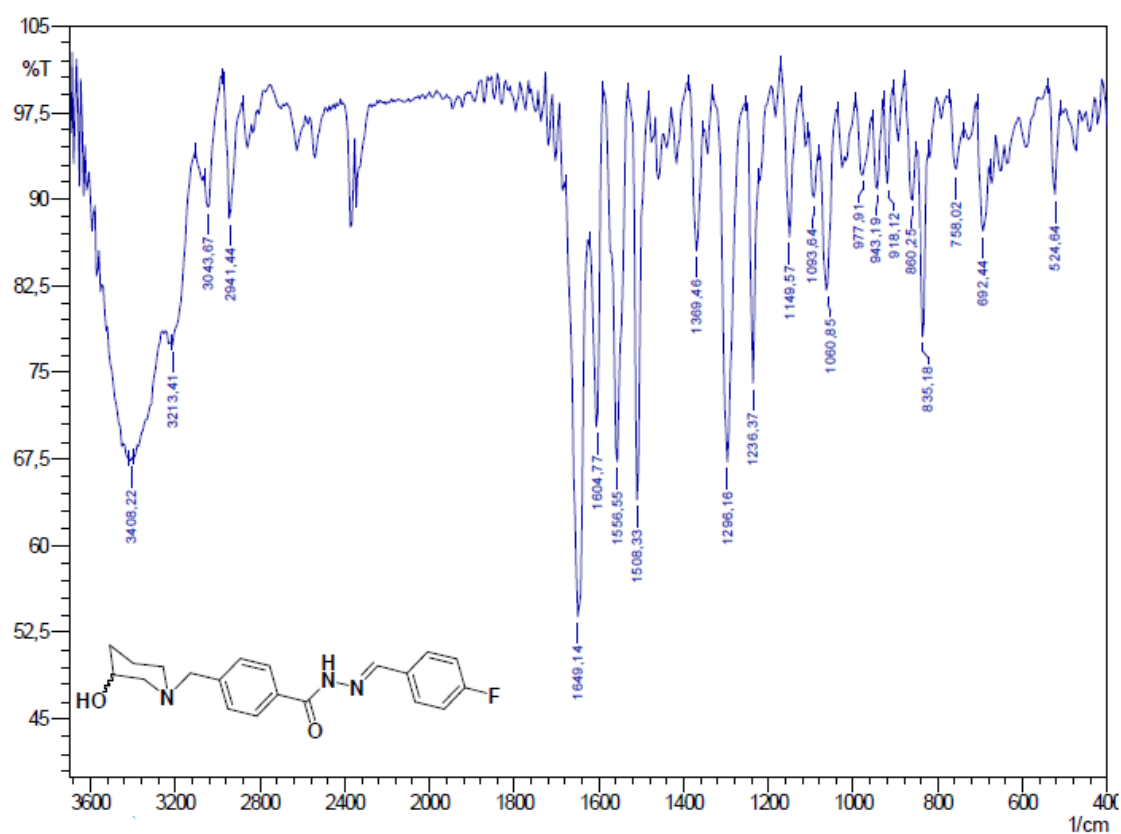
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 30) estão identificados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 407,2442$, ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 429,2276$ e ao $[d\acute{ı}mero + Na]^+$ em $m/z = 813,4803$.



Espectro 30. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-66**.

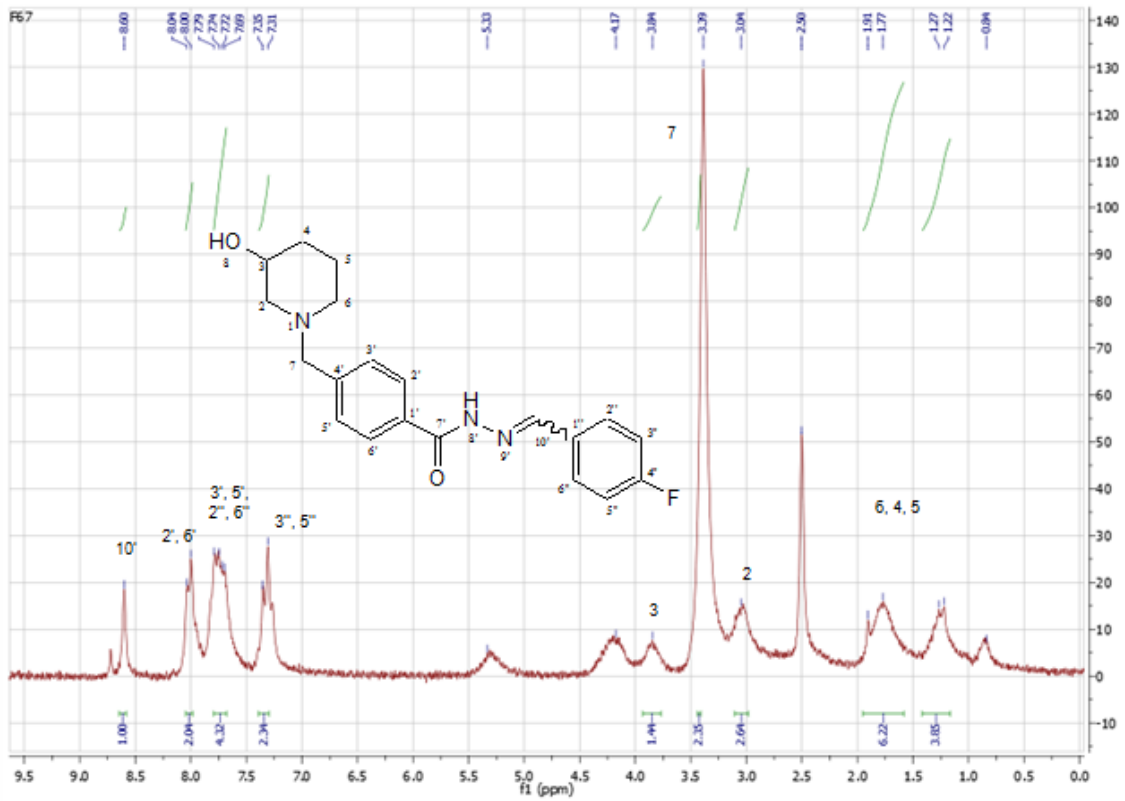
5.1.7 N- (4-fluorbenzilideno-4-((3-hidroxi piperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8d (LFQM-67).

O espectro no IV (Espectro 31) da substância **LFQM-67** apresenta bandas de ν O-H em 3408 cm^{-1} , ν N-H em 3213 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3043 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , ν C=O em 1649 cm^{-1} e dentre outras apresenta a banda referentes ao ν C=N em 1604 cm^{-1} .



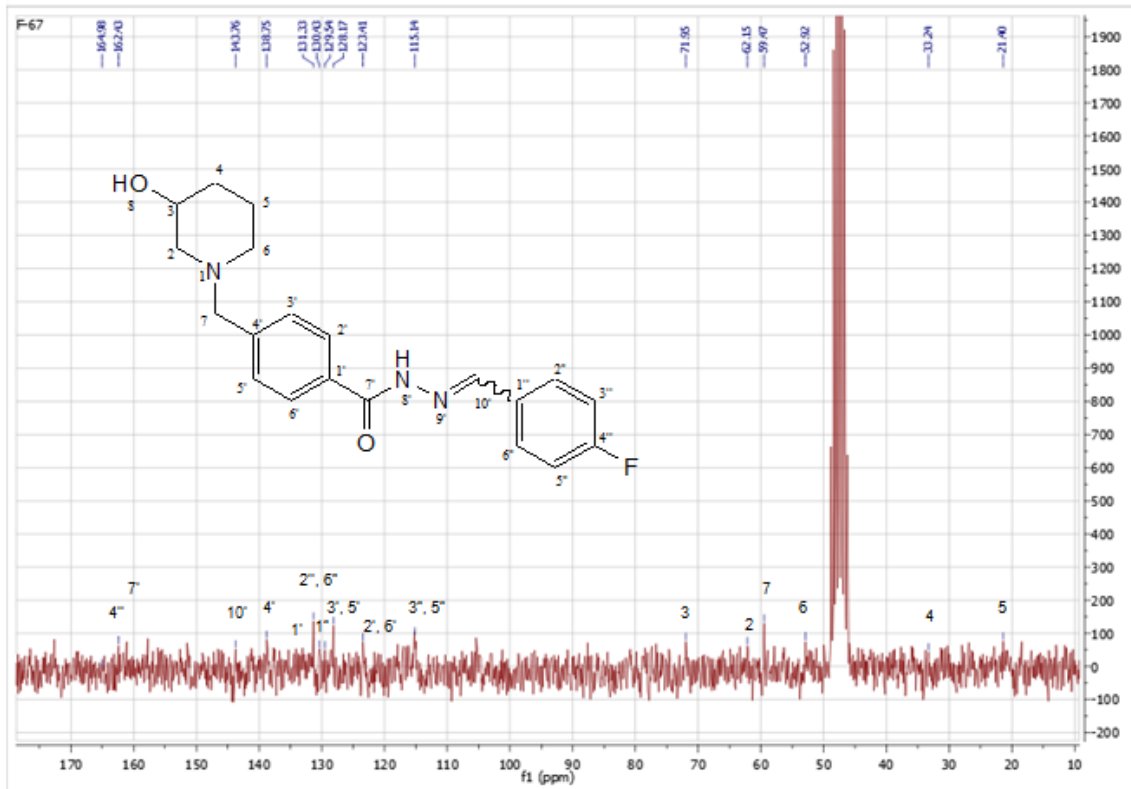
Espectro 31. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-67**.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 32) observa-se entre outros sinais, o singlete referente ao H-10' em δ 8,60 e o singlete referente ao H-7 em δ 3,39 ppm.



Espectro 32. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **LFQM-67**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 33) observa-se entre outros sinais, o sinal referente ao C- $10'$ em δ 143,8, o sinal referente ao C-7 em δ 59,5 e o sinal referente à carbonila C- $7'$ em δ 162,4 ppm.

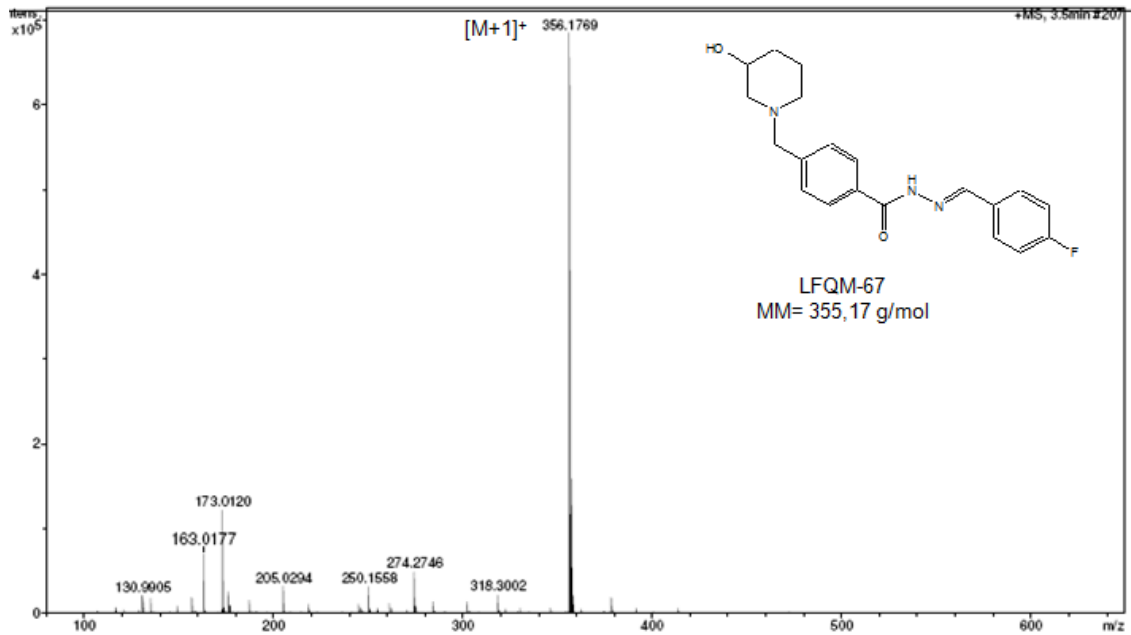


Espectro 33. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) da substância **LFQM-67**.

Tabela 9. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-67**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 3,04 | m | -- | 62,2 |
| 3 | 3,84 | m | -- | 72,0 |
| 4 | 1,77 – 1,91 | m | -- | 33,2 |
| 5 | 1,77 – 1,91 | m | -- | 21,4 |
| 6 | 1,77– 1,91 | m | -- | 52,9 |
| 7 | 3,39 | s | -- | 59,5 |
| 1' | -- | -- | -- | 131,3 |
| 2' | 8,02 | d | 8,00 | 123,3 |
| 3' | 7,77 | m | -- | 128,2 |
| 4' | -- | - | -- | 138,7 |
| 5' | 7,77 | m | -- | 128,2 |
| 6' | 8,02 | d | 8,00 | 123,4 |
| 7' | -- | -- | -- | 162,4 |
| 10' | 8,60 | s | -- | 143,8 |
| 1'' | -- | -- | -- | 129,5 |
| 2'' | 7,77 | m | -- | 130,5 |
| 3'' | 7,33 | d | 8,00 | 115,1 |
| 4'' | -- | -- | -- | 165,0 |
| 5'' | 7,33 | d | 8,00 | 115,1 |
| 6'' | 7,77 | m | -- | 130,5 |

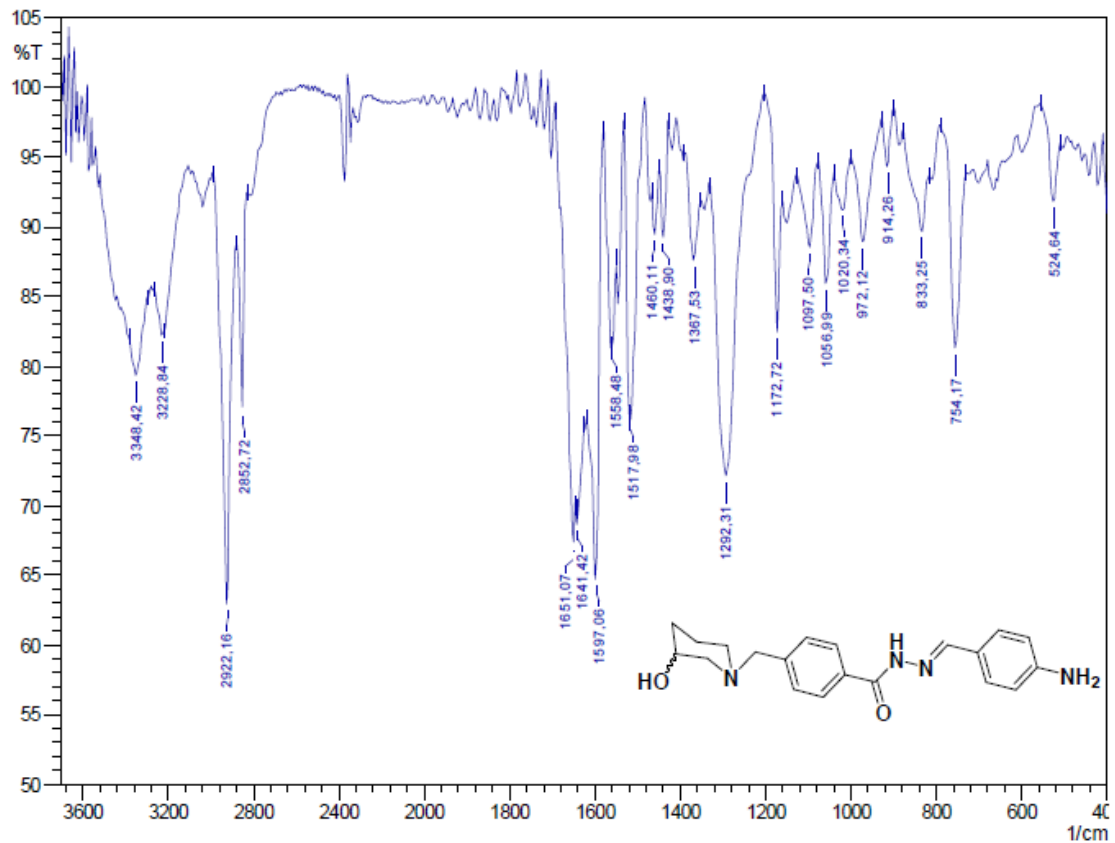
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 34) está apresentado o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 356,1769$.



Espectro 34. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-67**.

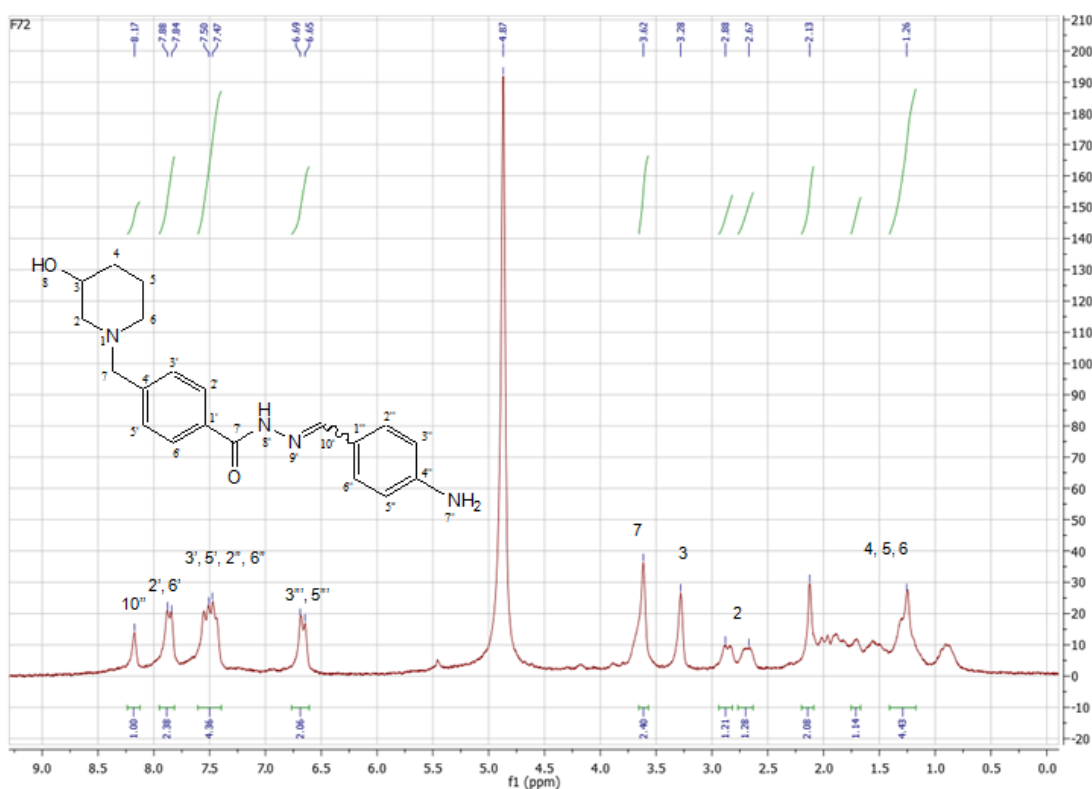
5.1.8 N- (4-aminobenzilideno-4-((3-hidroxi piperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8k (LFQM-72)

O espectro no IV (Espectro 31) da substância **LFQM-72** apresenta a duas bandas características de amins primárias ν N-H em 3348 cm^{-1} e 3228 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2852 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2922 cm^{-1} , ν C=O em 1651 cm^{-1} , ν C=N em 1597 cm^{-1} e entre outras, ν C-O em 1056 cm^{-1} .



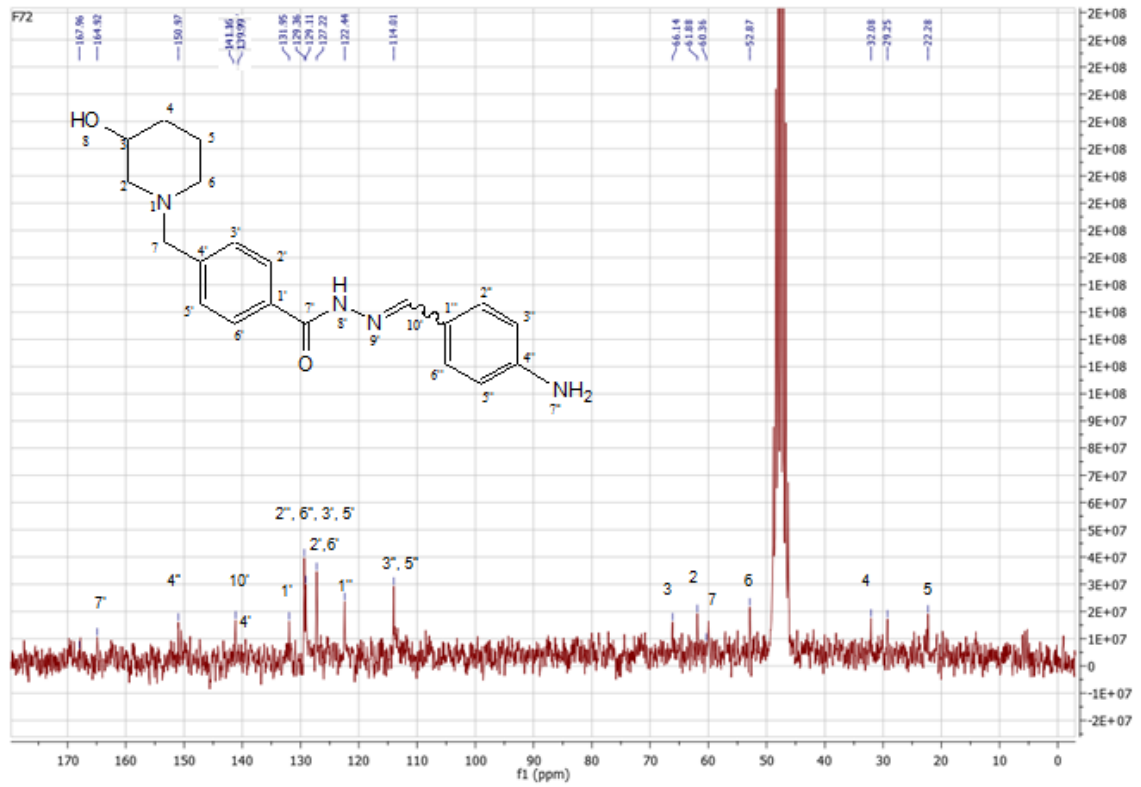
Espectro 31. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-72**.

A estrutura da **LFQM-72** foi confirmada no espectro de RMN ^1H (Espectro 32), pelos singletos em δ 8,17 e em δ 3,62 relativos aos hidrogênios 10' e 7, respectivamente, além dos sinais referentes ao hidrogênios aromáticos e piperidínicos.



Espectro 32. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da substância **LFQM-72**.

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 33), pode-se observar o sinal em δ 164,9 referente ao carbono carbonílico, em δ 60,4 está o sinal referente ao C-7 e, entre outros, é possível observar em δ 141,4 referente ao C-10.

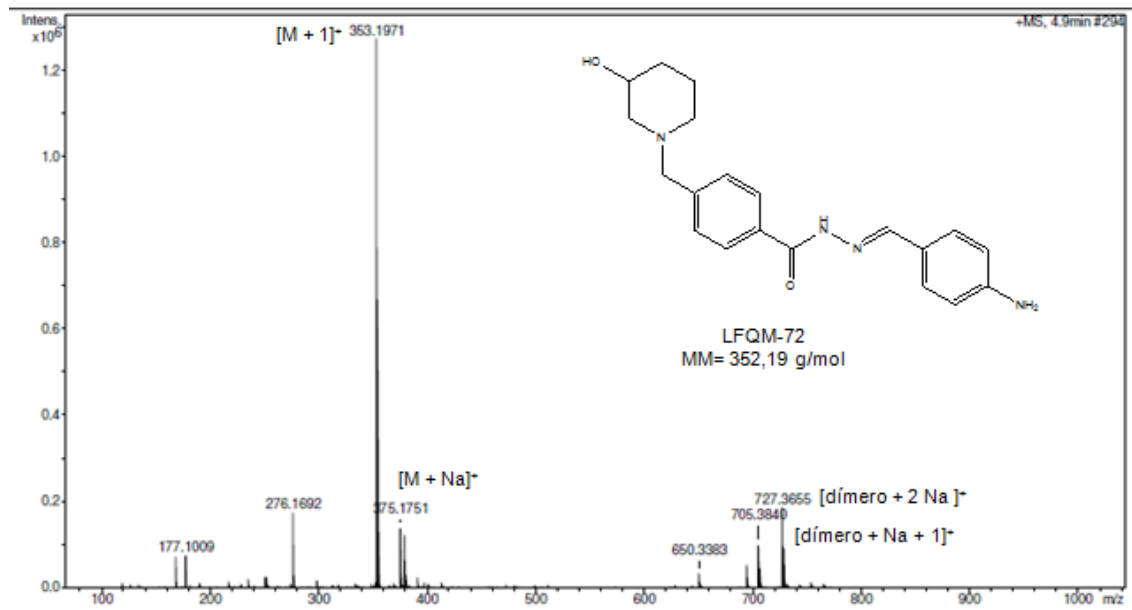


Espectro 33. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) da substância **LFQM-72**.

Tabela 10. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-72**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 2,67 – 2,68 | m | -- | 61,9 |
| 3 | 3,25 | s | -- | 66,1 |
| 4 | 1,26 – 2,13 | m | -- | 32,1 |
| 5 | 1,26 – 2,13 | m | -- | 22,3 |
| 6 | 1,26 – 2,13 | m | -- | 52,9 |
| 7 | 3,62 | S | -- | 60,4 |
| 1' | -- | -- | -- | 132,0 |
| 2' | 7,86 | d | 8,00 | 129,1 |
| 3' | 7,48 | m | - | 129,4 |
| 4' | -- | -- | -- | 140,0 |
| 5' | 7,48 | m | -- | 129,4 |
| 6' | 7,86 | d | 8,00 | 129,1 |
| 7' | -- | -- | -- | 164,9 |
| 8' | -- | -- | -- | -- |
| 10' | 8,17 | s | -- | 141,4 |
| 1'' | -- | -- | -- | 122,4 |
| 2'' | 7,48 | m | -- | 129,4 |
| 3'' | 6,67 | d | 8,00 | 114,0 |
| 4'' | -- | -- | -- | 151,0 |
| 5'' | 6,67 | d | 8,00 | 114,0 |
| 6'' | 7,48 | m | -- | 129,4 |
| 7'' | -- | -- | -- | -- |

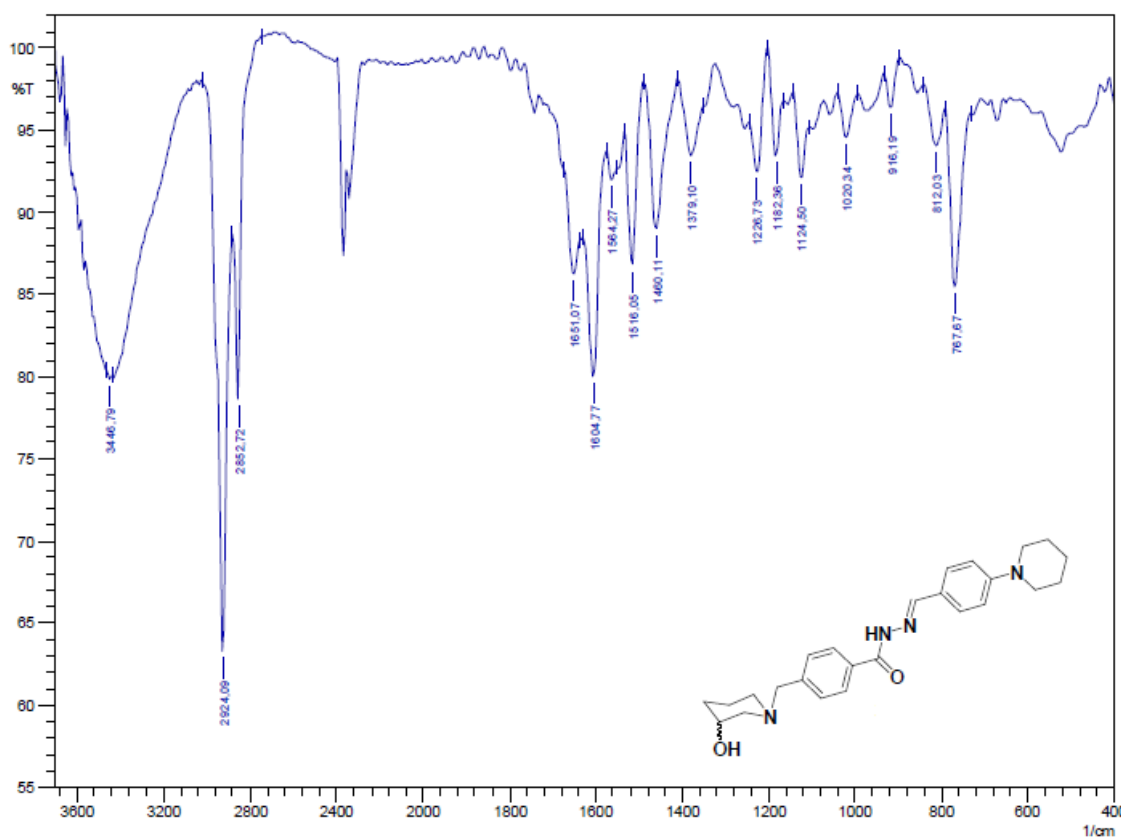
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 35) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 353,1971$, ao pico $[M+Na]^+$ em $m/z = 375,1751$, ao $[d\acute{ı}mero + 2 Na]^+$ em $m/z = 727,3665$ e ao $[d\acute{ı}mero + Na + 1]^+$ em $m/z = 705,3840$.



Espectro 35. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-72**.

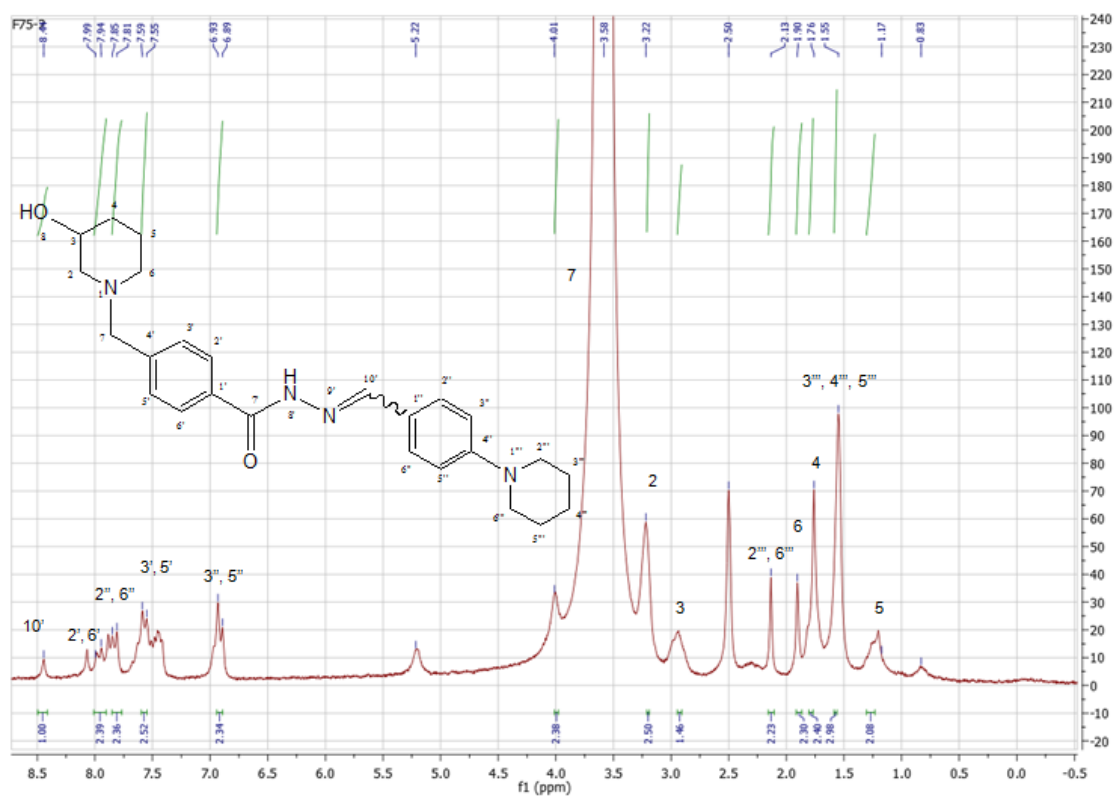
5.1.9 N-((4-piperidi-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8h (LFQM-75)

O espectro no IV (Espectro 36) da substância **LFQM-75** apresenta bandas de ν O-H em 3446 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2852 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2924 cm^{-1} , ν C=O em 1651 cm^{-1} , ν C=N em 1604 cm^{-1} e, dentre outras, apresenta a banda referente ao δ C-H sp^3 dos carbonos metilênicos em 1460 cm^{-1} .



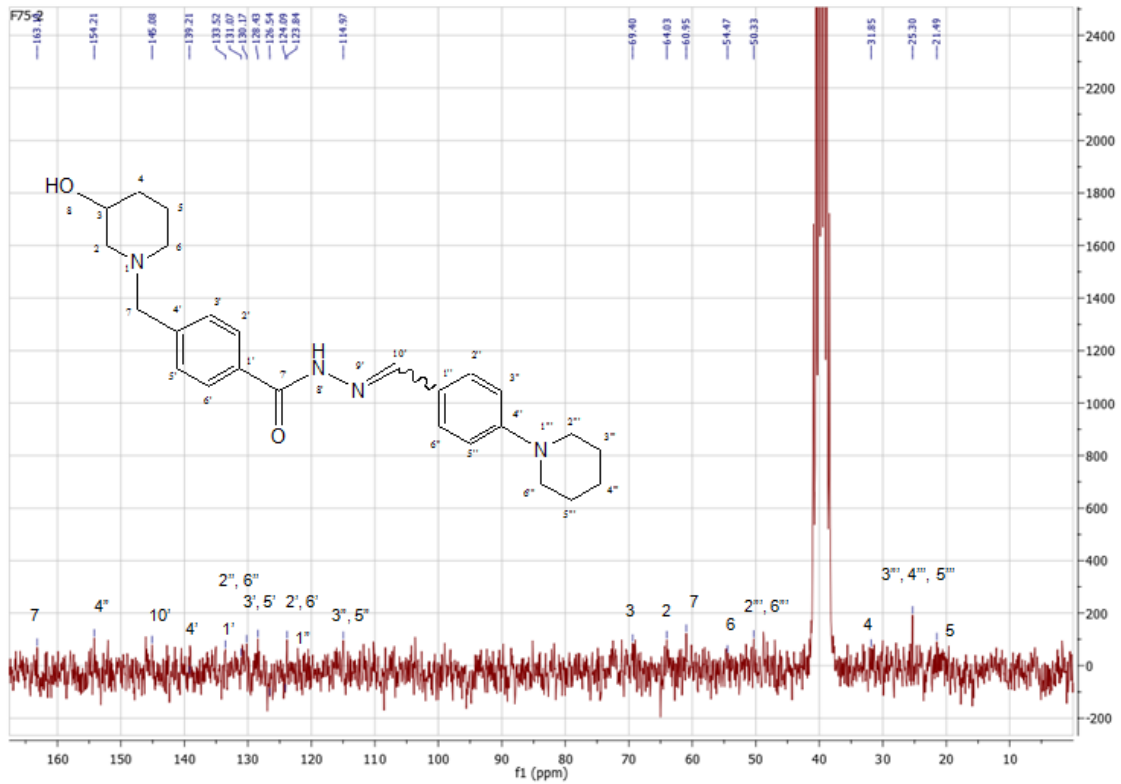
Espectro 36. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-75**.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 37) é possível observar entre outros sinais, o singlete em δ 3,58 referente ao H-7 e o singlete referente ao H-10'.



Espectro 37. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **LFQM-75**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 38) é possível observar entre outros sinais, o sinal em δ 61,0 referente ao C-7, o sinal referente ao C-10' em δ 145,1 e o sinal do carbono carbonílico em δ 163,1 ppm.



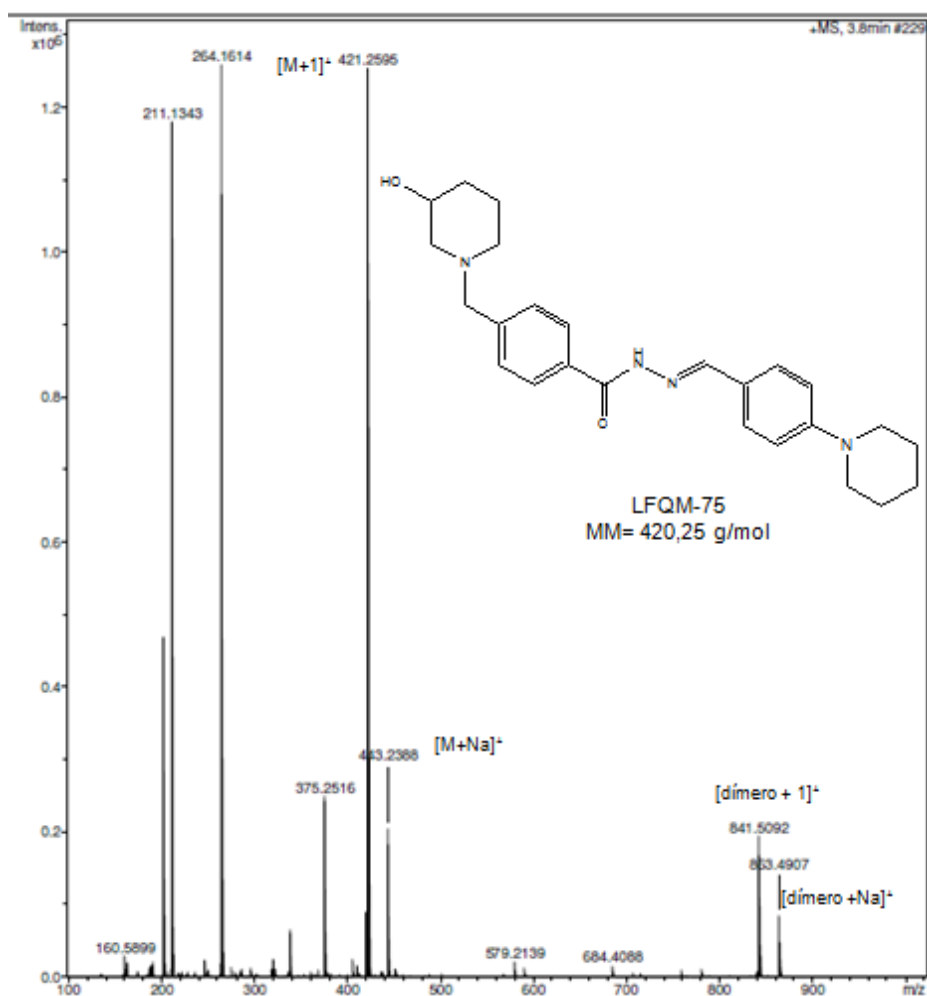
Espectro 38. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) da substância **LFQM-75**.

Tabela 11. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-75**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 3,22 | -- | -- | 64,0 |
| 3 | 2,90 | -- | -- | 69,4 |
| 4 | 1,76 | -- | -- | 31,9 |
| 5 | 1,17 | -- | -- | 21,5 |
| 6 | 1,90 | -- | -- | 54,5 |
| 7 | 3,58 | s | -- | 61,0 |
| 1' | -- | -- | -- | 131,1 |
| 2' | 7,97 | d | 10,00 | 124,1 |
| 3' | 7,57 | d | 8,00 | 128,5 |
| 4' | -- | - | -- | 139,2 |
| 5' | 7,57 | d | 8,00 | 128,5 |
| 6' | 7,97 | d | 10,00 | 124,1 |
| 7' | -- | -- | -- | 163,1 |
| 10' | 8,44 | s | -- | 145,1 |
| 1'' | -- | -- | -- | 123,8 |
| 2'' | 7,83 | d | 8,00 | 131,1 |
| 3'' | 6,91 | d | 8,00 | 115,00 |
| 4'' | -- | -- | -- | 154,2 |
| 5'' | 6,91 | d | 8,00 | 115,0 |
| 6'' | 7,83 | d | 8,00 | 131,1 |
| 2''' | 2,13 | -- | -- | 50,3 |
| 3''' | 1,55 | s | -- | 25,3 |

| | | | | |
|------|------|----|----|------|
| 4''' | 1,55 | s | -- | 25,3 |
| 5''' | 1,55 | s | -- | 25,3 |
| 6''' | 2,13 | -- | -- | 50,3 |

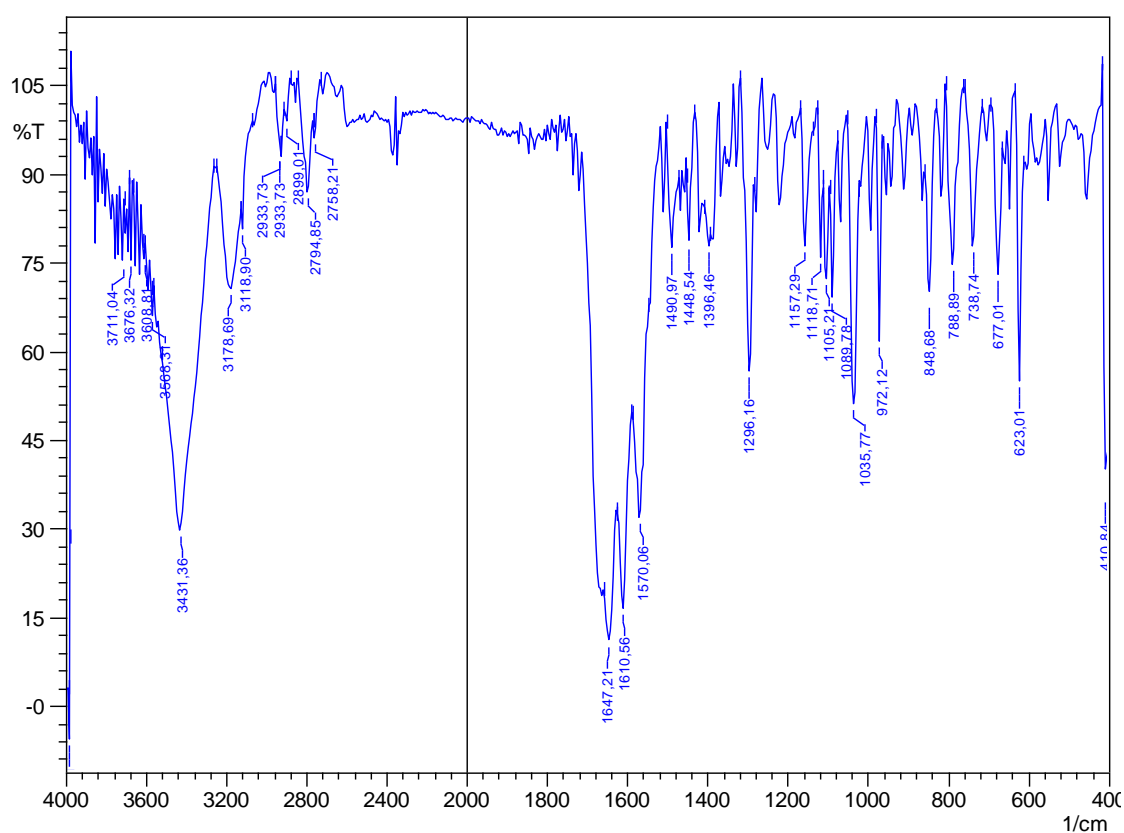
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 39) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 421,2596$, ao pico $[M+Na]^+$ em $m/z = 443,2388$, ao $[d\acute{ı}mero + 1]^+$ em $m/z = 841,5092$ e ao $[d\acute{ı}mero + Na]^+$ em $m/z = 853,4907$.



Espectro 39. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-75.

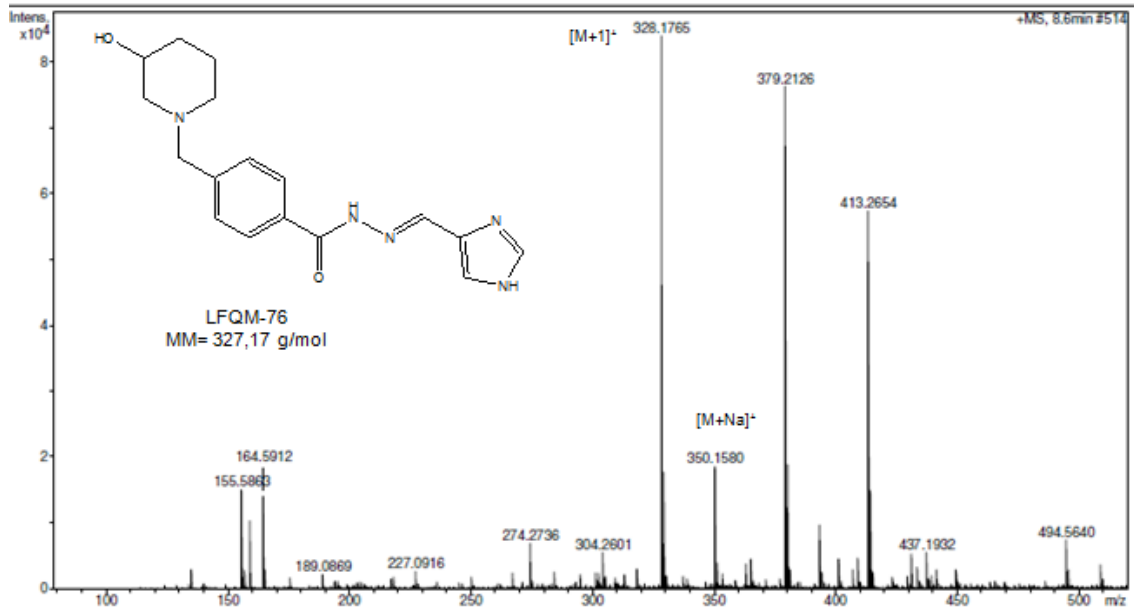
5.1.10. N-((1-H-imidazol-4-ila)metileno)-4-((3-hidr3xipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8h (LFQM-76)

O espectro no IV (Espectro 40) da substância **LFQM-76** apresenta bandas de ν O-H em 3431 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2899 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2933 cm^{-1} , ν C=O em 1647 cm^{-1} e, entre outras, apresenta ν C=N em 1610 cm^{-1} .



Espectro 40. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-76**.

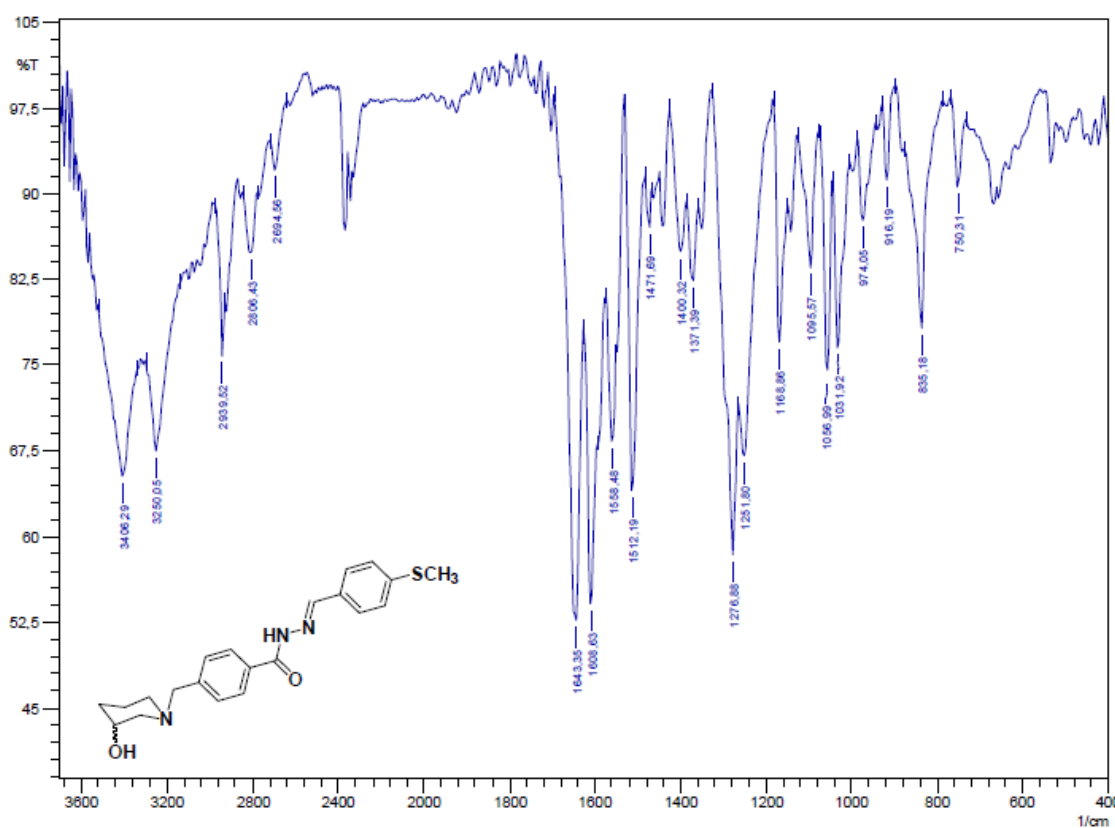
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 41) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 328,1765$ e ao pico $[M+Na]^+$ em $m/z = 350,1590$.



Espectro 41. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-76**.

5.1.11 N- (4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidróxipiperidin-1-ila)metil)benzohidrazida: 8g (LFQM-88)

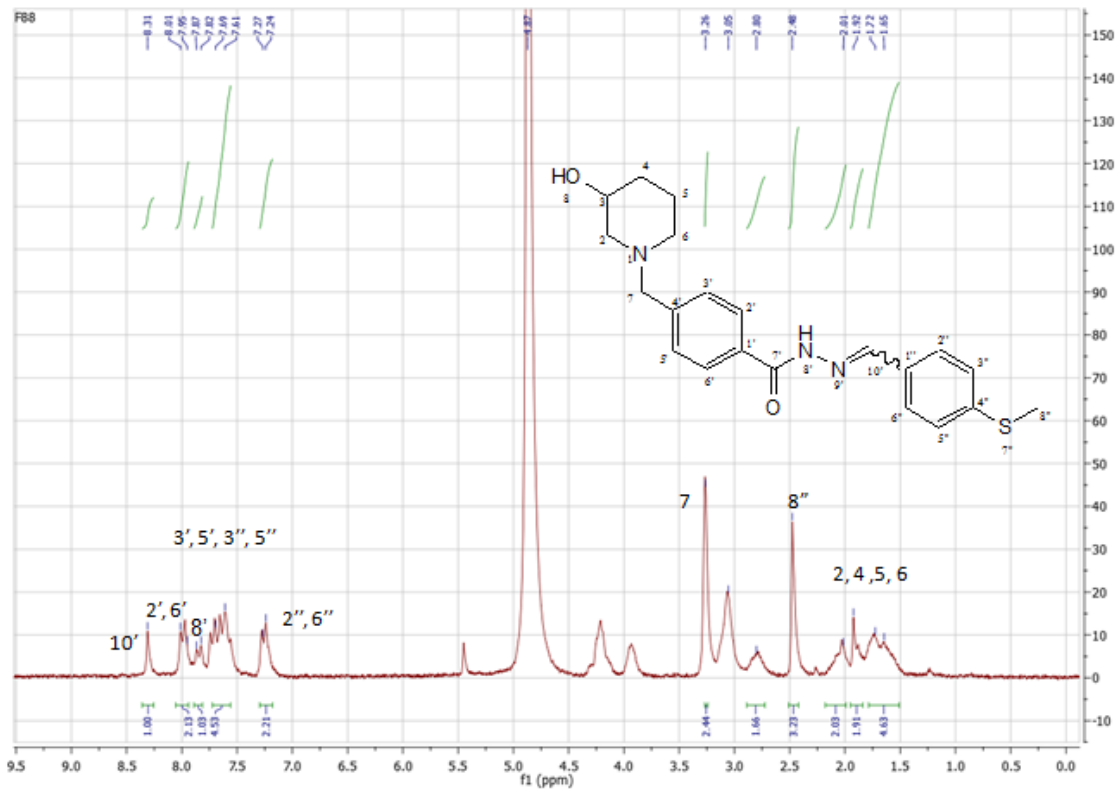
O espectro no IV (Espectro 42) da substância **LFQM-88** apresenta bandas de ν O-H em 3406 cm^{-1} , ν N-H em 3250 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2939 cm^{-1} , ν C-S em 2694 cm^{-1} , ν C=O em 1643 cm^{-1} , ν C=N em 1608 cm^{-1} , ν C-O em 1056 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as banda referente ao δ C-H sp^3 da metila em 1400 e 1371 cm^{-1} .



Espectro 42. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-88**.

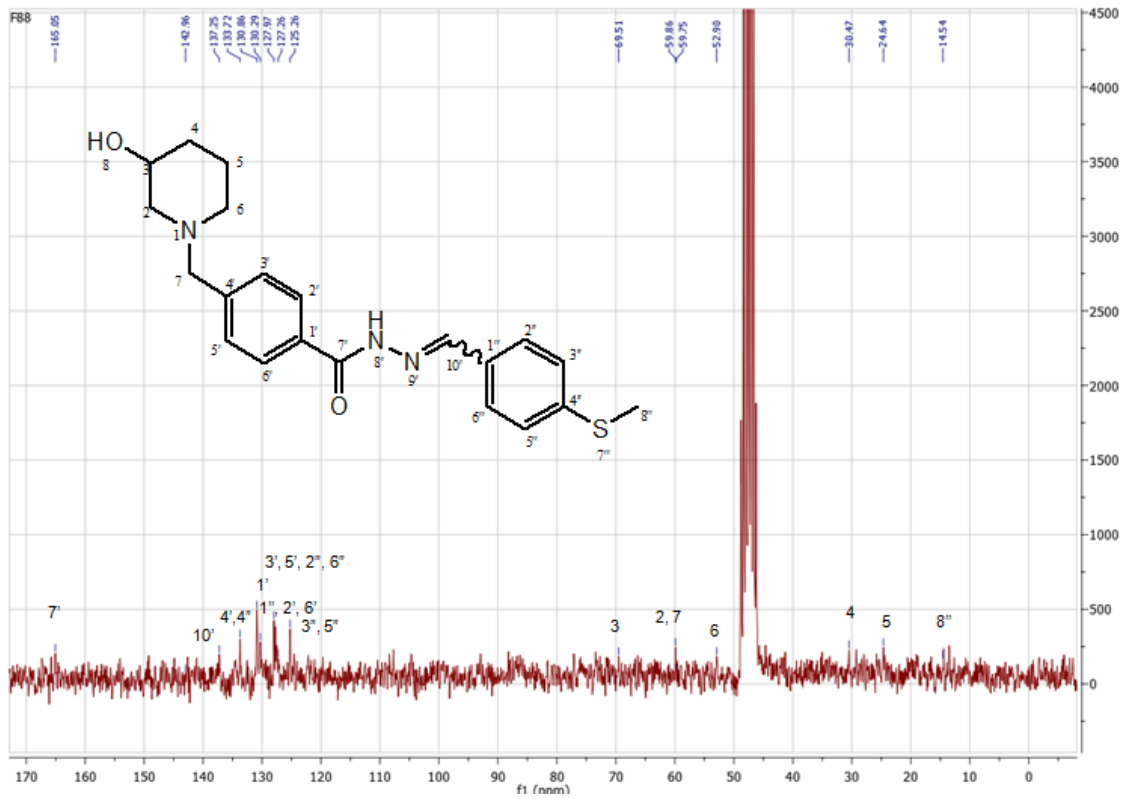
A estrutura da **LFQM-88** foi confirmada no espectro de RMN^1H (Espectro 43), pelos singletos em δ 8,31 relativo ao hidrogênio 10', em δ 3,26 relativo ao

hidrogênio H-7 e, em δ 2,48 referente à metila 8'' característica da estrutura desejada.



Espectro 43. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da substância **LFQM-88**.

No espectro de RMN ¹³C (Espectro 44), pode-se observar o sinal em δ 165,0 referente ao carbono carbonílico, em δ 143,0 está o sinal referente ao C-10' e, entre outros, em δ 59,8 está o sinal referente ao C-7.



Espectro 44. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância **LFQM-88**.

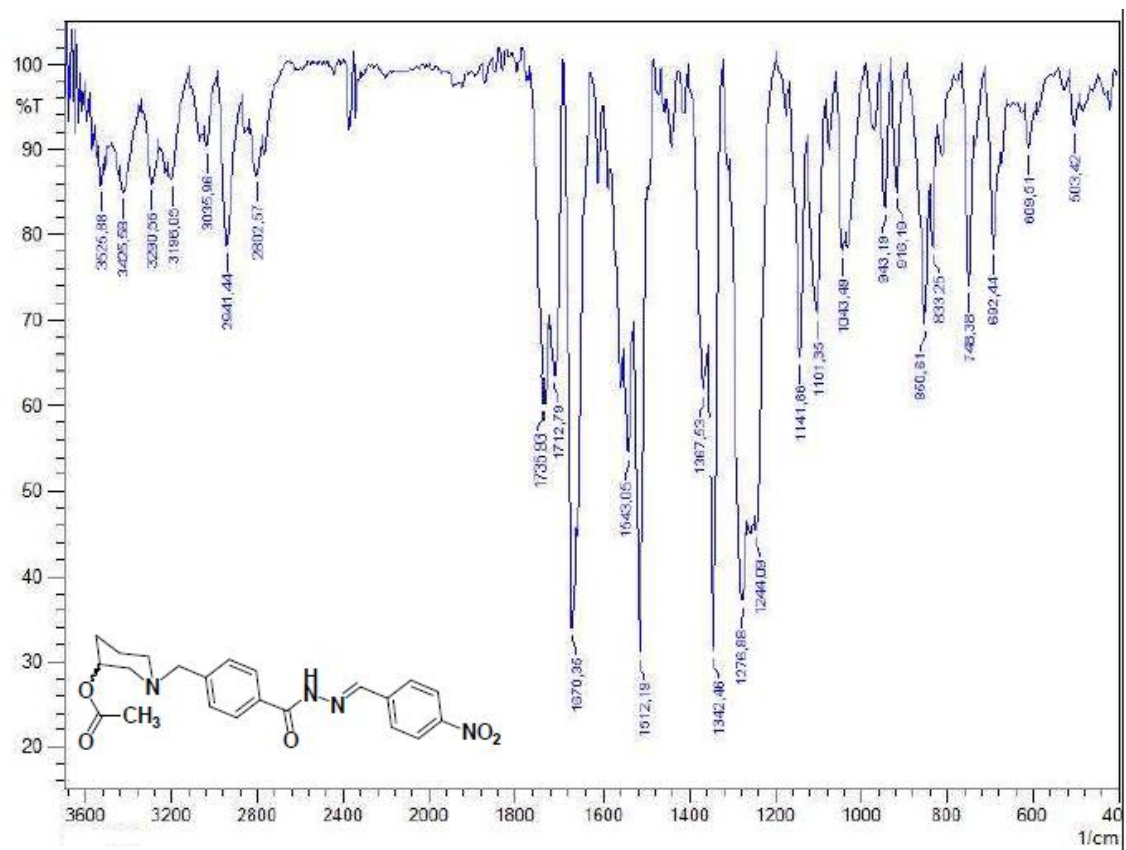
Tabela 12. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-88**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | M | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 2,01 | m | -- | 59,9 |
| 3 | 2,8 | m | -- | 69,5 |
| 4 | 1,72 | m | -- | 30,5 |
| 5 | 1,65 | m | -- | 24,6 |
| 6 | -- | -- | -- | 53,0 |
| 7 | 3,26 | s | -- | 59,8 |
| 1' | -- | -- | -- | 130,9 |
| 2' | 7,98 | d | 12,00 | 128,0 |
| 3' | 7,65 | m | - | 130,3 |
| 4' | -- | -- | -- | 137,3 |
| 5' | 7,65 | m | -- | 130,3 |
| 6' | 7,98 | d | 12,00 | 128,0 |
| 7' | -- | -- | -- | 165,0 |
| 10' | 8,31 | s | -- | 143,0 |
| 1'' | -- | -- | -- | 128,0 |
| 2'' | 7,25 | d | 6,00 | 130,3 |
| 3'' | 7,65 | m | -- | 125,3 |
| 4'' | -- | -- | -- | 143,0 |
| 5'' | 7,65 | m | -- | 125,3 |
| 6'' | 7,25 | d | 6,00 | 130,3 |
| 8'' | 2,48 | s | -- | 14,5 |

5.2 Caracterização estrutural das N-benzilpiperidinilacilidrazonas o-acetiladas.

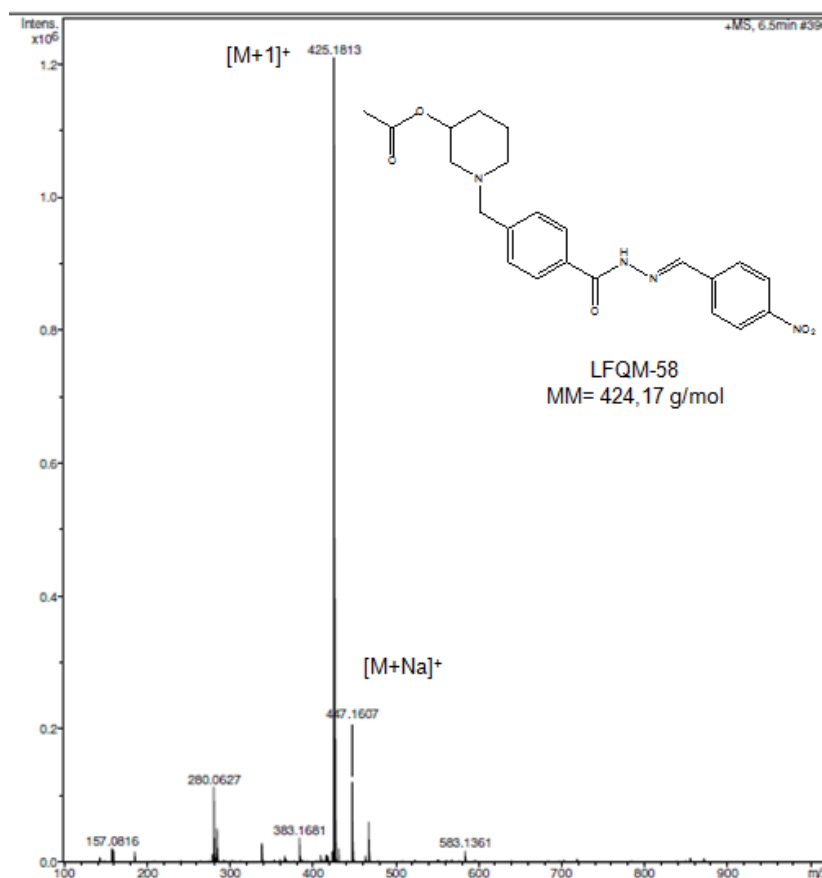
5.2.1 *N*-(4-nitrobenzilideno)-4-[(3-*O*-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: **7a** (LFQM-58)

O espectro no IV (Espectro 46) da substância **LFQM-58** não apresenta a banda de ν O-H o que confirma a conversão do grupo –OH em –Oacetilado. É possível verificar a presença das seguintes bandas: ν N-H em 3425 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3035 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , ν_{s} C-H sp^3 em 2802 cm^{-1} , ν C=O de éster em 1735 cm^{-1} , ν C=O em 1670 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν N=O em 1543 e 1387 cm^{-1} .



Espectro 46. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-58**.

No espectro de massas de alta resolução (Espectro 47) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 425,1813$ e ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 447,1607$.

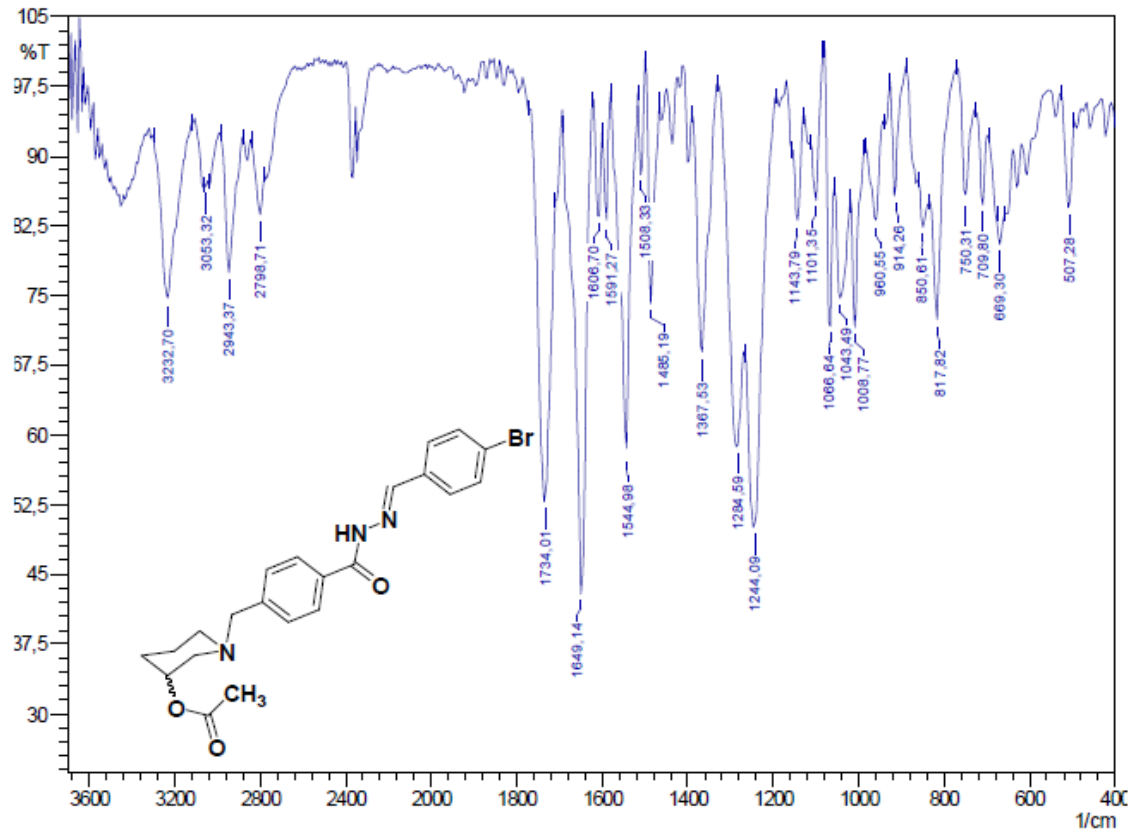


Espectro 47. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-58**.

5.2.2 *N*-(4-bromobenzilideno)-4-[(3-*O*-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: **7b** (LFQM-68)

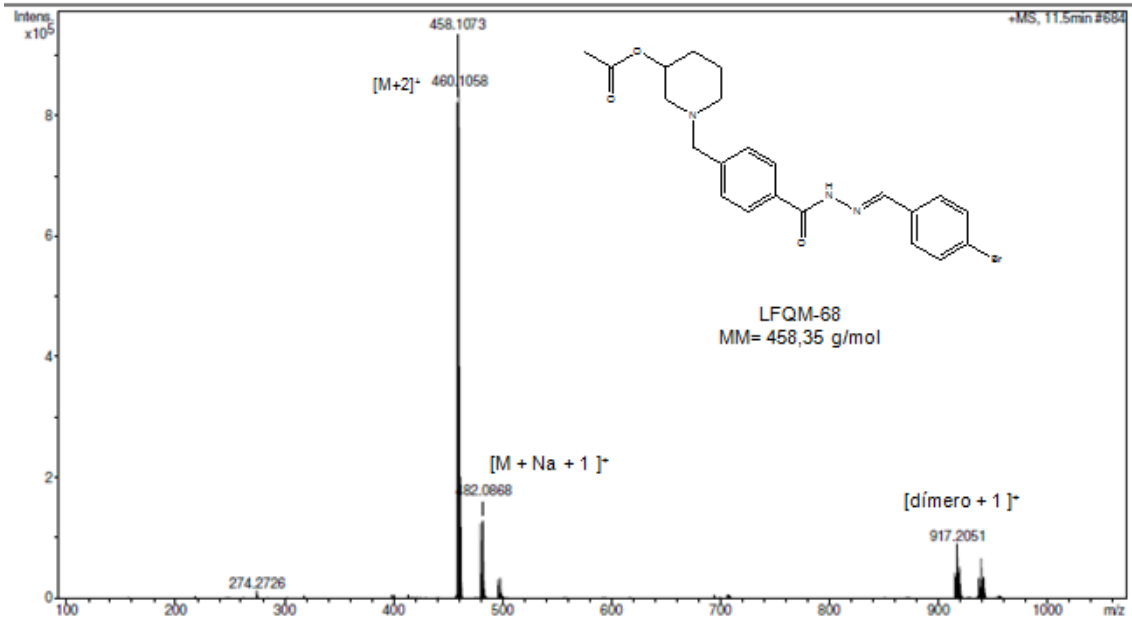
No espectro no IV (Espectro 48) da substância **LFQM-68** é possível verificar a presença das seguintes bandas: ν N-H em 3232 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3053 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2943 cm^{-1} , ν_{s} C-H sp^3 em 2798 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de duas bandas distintas de carbonila: ν C=O em

1734 cm^{-1} e em 1649 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν C-O em 1204 e 1244 cm^{-1} .



Espectro 48. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-68**.

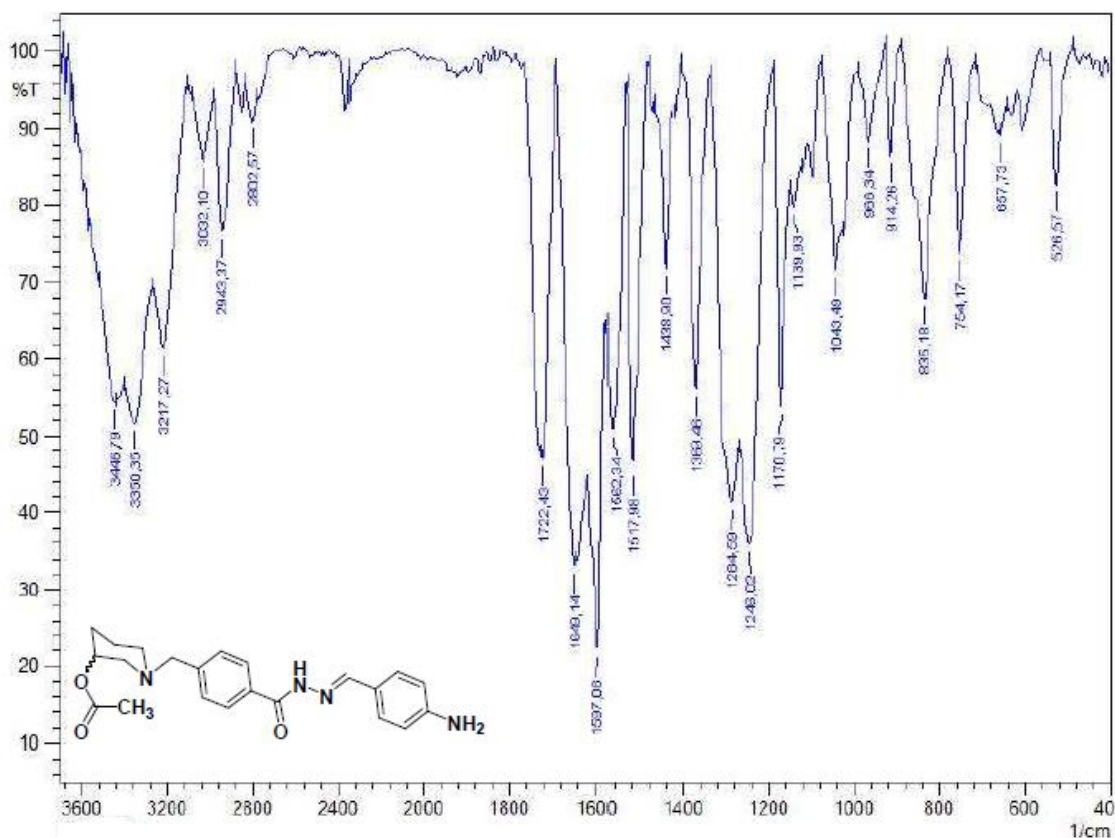
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 49) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[\text{M}+2]^+$ em $m/z = 460,1058$, ao $[\text{M}+ \text{Na} +1]^+$ em $m/z = 482,0868$ e ao $[\text{dímero} + 1]^+$ em $m/z = 917,2051$.



Espectro 49. Espectro de massas de alta resolu\c{c}o da subst\ancia **LFQM-68**.

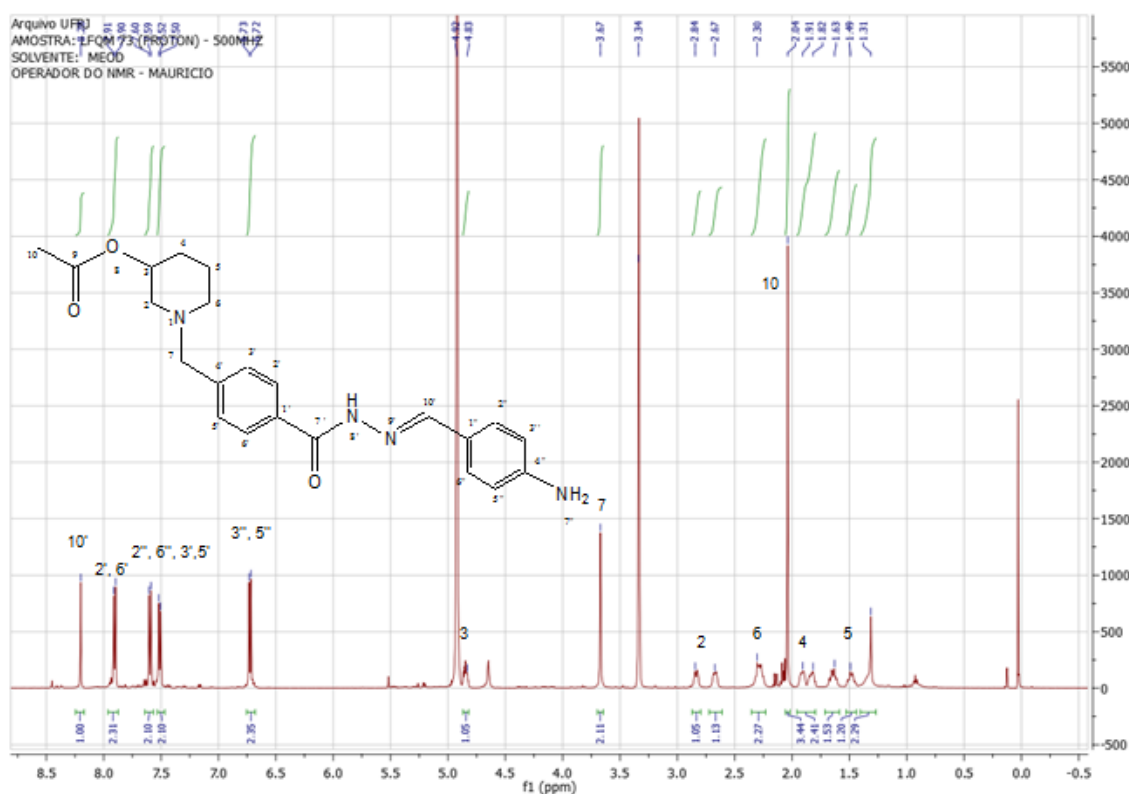
5.2.3 *N*-(4-aminobenzilideno)-4-[(3-*O*-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: **7c** (LFQM-73)

No espectro no IV (Espectro 50) da substância **LFQM-73** é possível verificar a presença das seguintes bandas: ν N-H de amina primária em 3446 e 3350 cm^{-1} , ν N-H de amina secundária em 3217 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3032 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2943 cm^{-1} , ν_{s} C-H sp^3 em 2802 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de duas bandas distintas de carbonila: ν C=O em 1722 cm^{-1} e em 1649 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν C=O em 1264 e 1248 cm^{-1} .



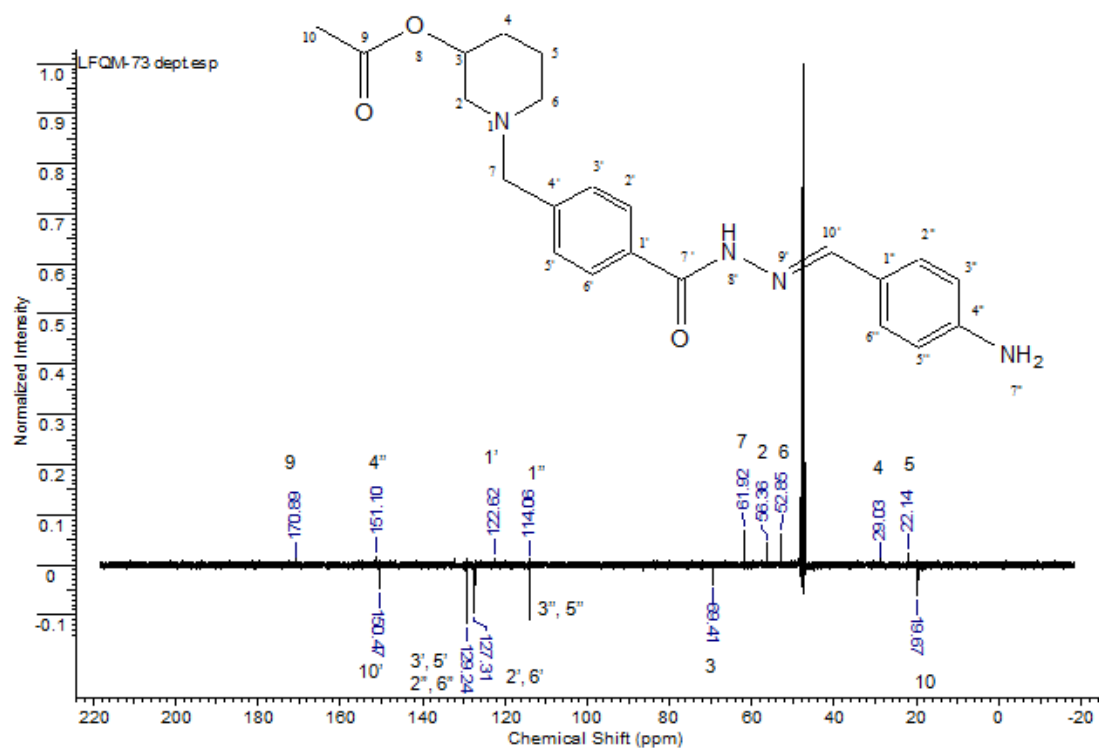
Espectro 50. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-73**.

A estrutura da **LFQM-73** foi confirmada no espectro de RMN¹H (Espectro 51), pelos singletos em δ 8,20 relativo ao hidrogênio 10' e em δ 2,04 referente a metila 10, além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e piperidínicos.



Espectro 51. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, MeOD) da substância **LFQM-73**.

No espectro de RMN¹³C dept Q (Espectro 52), pode-se observar o sinal em δ 170,9 referente ao carbono carbonílico C-9 do grupamento acetila, sinal em δ 165,8 referente ao carbono carbonílico C-7', o sinal em δ 62,0 referente ao carbono C-7 e, entre outros, apresenta o sinal em δ 19,7 referente ao carbono da metila C-10.

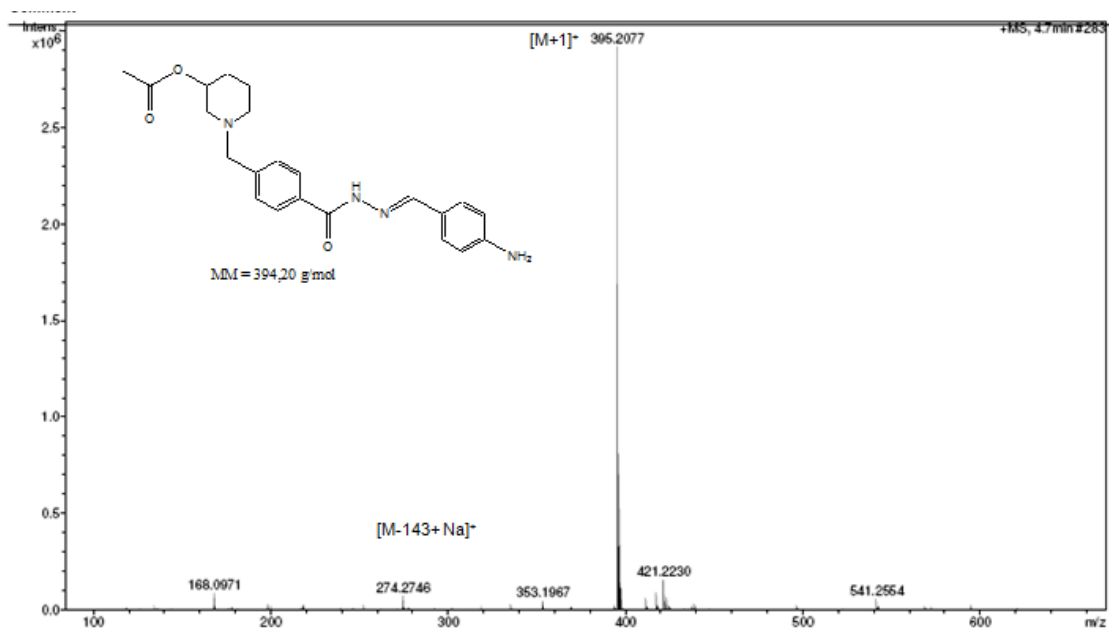


Espectro 52. Espectro de RMN dept Q (100 MHz, MeOD) da substância **LFQM-73**.

Tabela 13. Dados de RMN¹H e ¹³C dept Q da substância **LFQM-73**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 2,84; 2,67 | m | -- | 56,4 |
| 3 | 4,83 | m | -- | 69,4 |
| 4 | 1,91; 1,82 | m | -- | 29,0 |
| 5 | 1,49; 1,31 | m | -- | 22,1 |
| 6 | 2,30 | m | -- | 52,9 |
| 7 | 3,67 | s | -- | 62,0 |
| 9 | -- | -- | -- | 170,9 |
| 10 | 2,04 | s | -- | 19,7 |
| 1' | -- | -- | -- | 123,0 |
| 2' | 7,90 | d | 5,00 | 127,3 |
| 3' | 7,51 | d | 10,00 | 129,2 |
| 4' | -- | -- | -- | 141,5 |
| 5' | 7,51 | d | 10,00 | 129,2 |
| 6' | 7,90 | d | 5,00 | 127,3 |
| 7' | -- | -- | -- | 165,8 |
| 10' | 8,20 | s | -- | 150,5 |
| 1'' | -- | -- | -- | 114,1 |
| 2'' | 7,60 | d | 5,00 | 129,2 |
| 3'' | 6,72 | d | 5,00 | 113,4 |
| 4'' | -- | -- | -- | 151,1 |
| 5'' | 6,72 | d | 5,00 | 113,4 |
| 6'' | 7,6 | d | 5,00 | 129,2 |

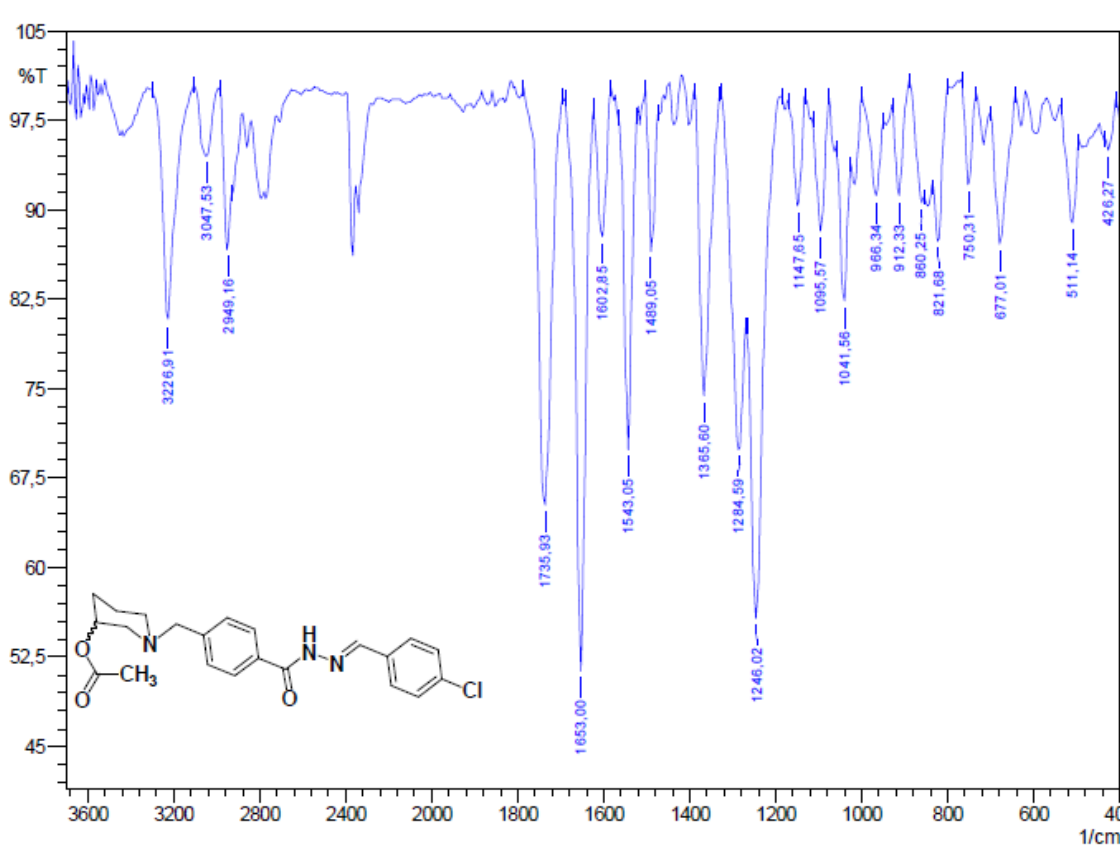
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 53) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 395,2077$ e ao pico referente a perda do grupamento piperidinilacetila ($m/z = 143$) $[M-143 + Na]^+$ em $m/z = 274,2746$.



Espectro 53. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-73**.

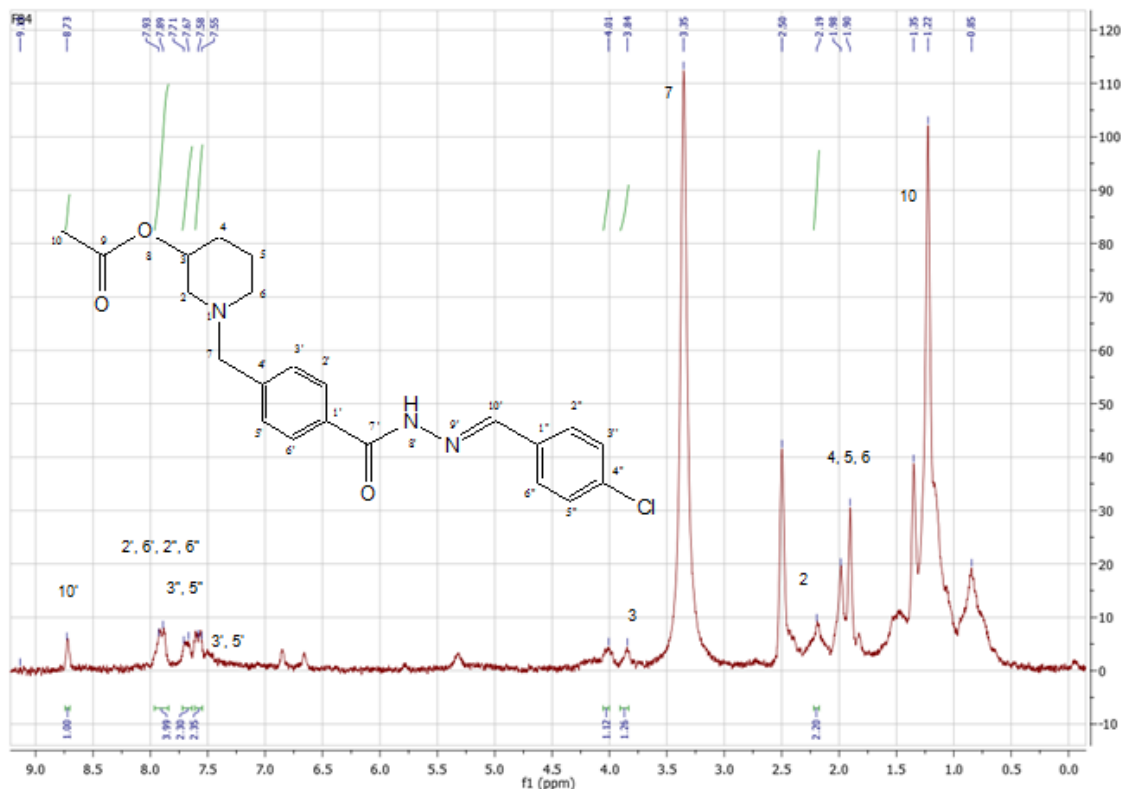
5.2.4 *N*-(4-clorobenzilideno)-4-[(3-*O*-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: **7e** (LFQM-84)

No espectro no IV (Espectro 54) da substância **LFQM-84** é possível verificar a presença das seguintes bandas: ν N-H em 3226 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3047 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2949 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de duas bandas distintas de carbonila: ν C=O em 1735 cm^{-1} e em 1653 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν C=O em 1284 e 1246 cm^{-1} .



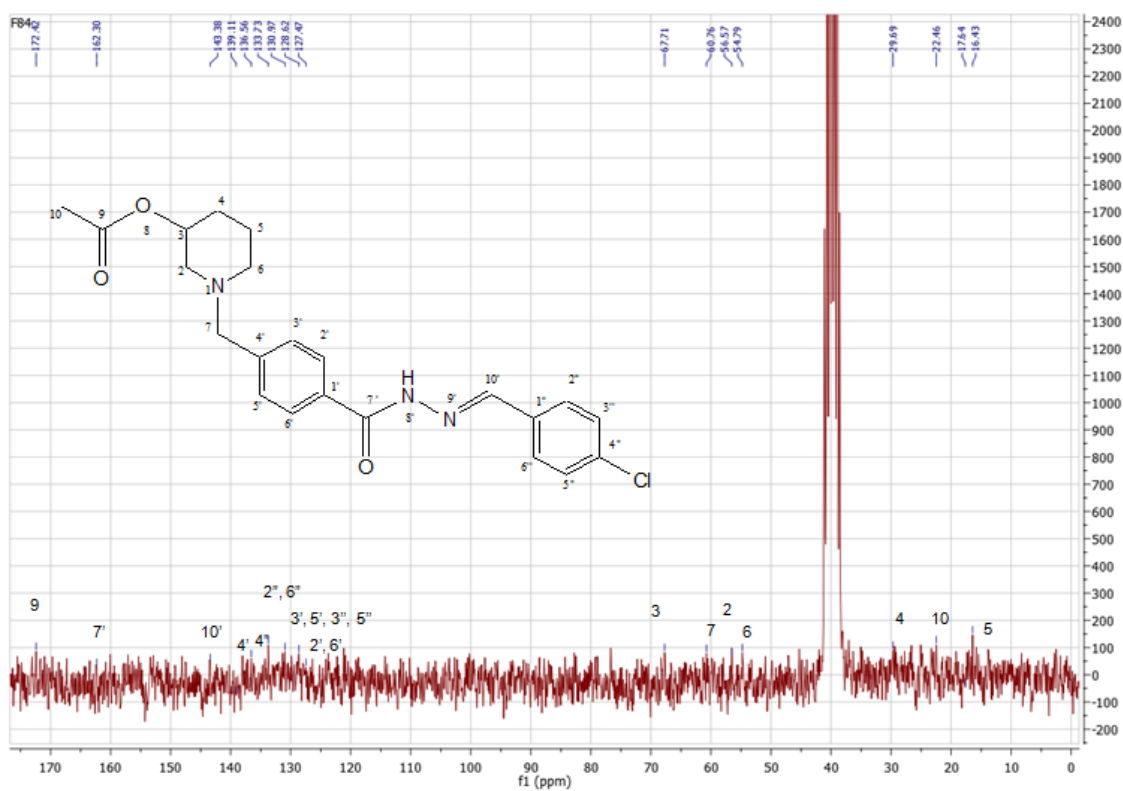
Espectro 54. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-84**.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 55) da substância **LFQM-84** observam-se entre outros sinais, o singlete referente à metila da subunidade acetato em δ 1,22 e o singlete referente ao H-10' em δ 8,73 ppm.



Espectro 55. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **LFQM-84**.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **LFQM-84** (Espectro 56) observam-se entre outros sinais, o sinal referente à metila da subunidade acetato em δ 22,5, o sinal em referente ao C-10' em δ 143,4, os sinais referentes aos carbonos carbonílicos C-7' em δ 162,3 e C-9 em δ 172,4 ppm.

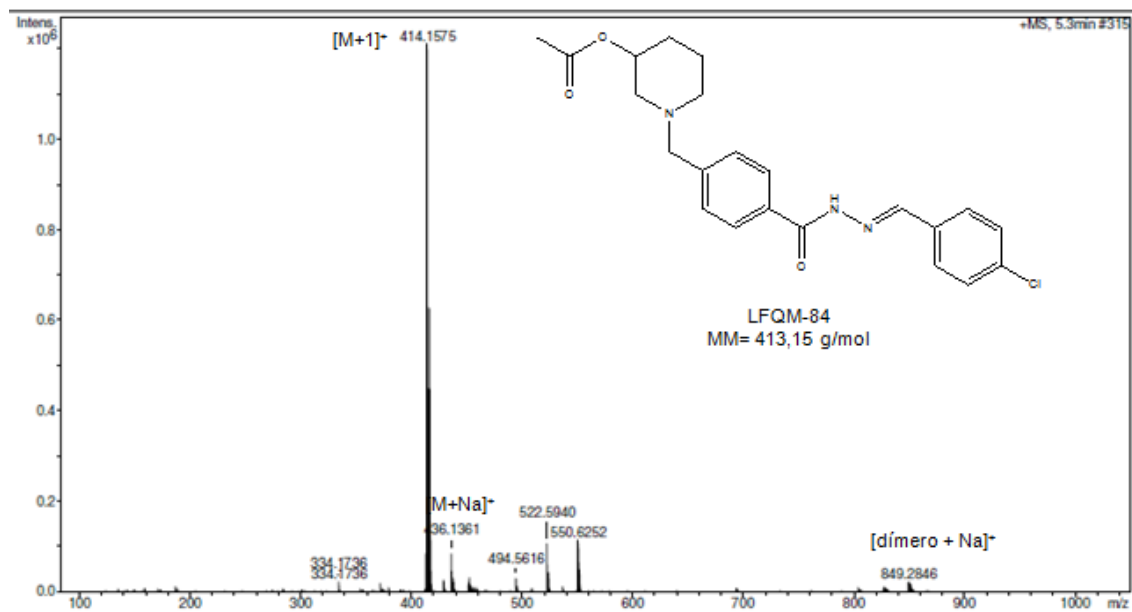


Espectro 56. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) da substância **LFQM-84**.

Tabela 14. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **LFQM-84**.

| Posição | δ ¹ H (ppm) | m | J (Hz) | δ ¹³ C (ppm) |
|---------|-------------------------------|----|--------|--------------------------------|
| 2 | 2,19 | m | -- | 56,4 |
| 3 | 3,84 | m | -- | 67,7 |
| 4 | 1,90 – 1,98 | -- | -- | 29,7 |
| 5 | 1,90- 1,98 | -- | -- | 16,4 |
| 6 | 1,90 – 1,98 | -- | -- | 54,8 |
| 7 | 3,35 | s | -- | 60,8 |
| 9 | -- | -- | -- | 172,4 |
| 10 | 1,22 | s | -- | 22,5 |
| 1' | -- | -- | -- | 132,0 |
| 2' | 7,91 | d | 8,00 | 127,5 |
| 3' | 7,57 | m | -- | 131,0 |
| 4' | -- | -- | -- | 139,0 |
| 5' | 7,57 | m | -- | 131,0 |
| 6' | 7,91 | d | 8,00 | 127,5 |
| 7' | -- | -- | -- | 162,3 |
| 10' | 8,73 | s | -- | 143,4 |
| 1'' | -- | -- | -- | 132,0 |
| 2'' | 7,91 | d | 8,00 | 133,7 |
| 3'' | 7,69 | d | 8,00 | 128,6 |
| 4'' | -- | -- | -- | 136,6 |
| 5'' | 7,69 | d | 8,00 | 128,6 |
| 6'' | 7,91 | d | 8,00 | 133,7 |

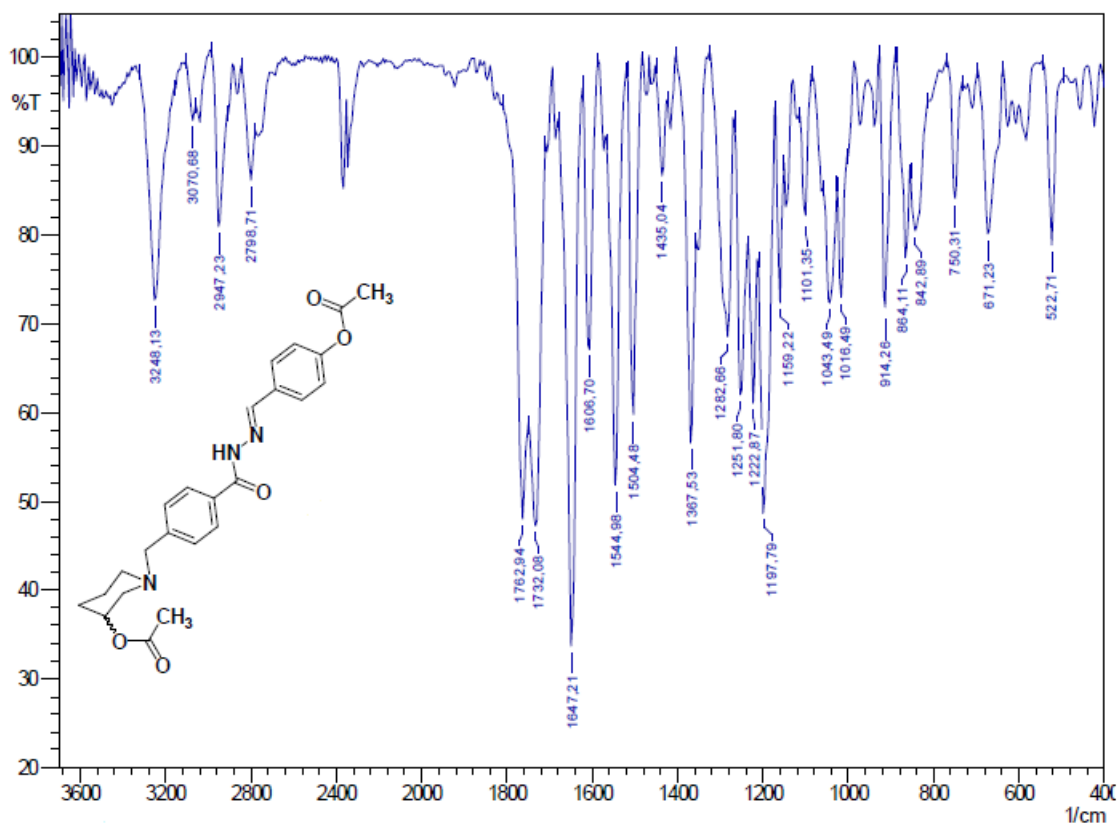
No espectro de massas de alta resolução (Espectro 57) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 414,1575$, ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 436,1361$ e ao $[d\acute{ı}mero + Na]^+$ em $m/z = 849,2846$.



Espectro 57. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-84**.

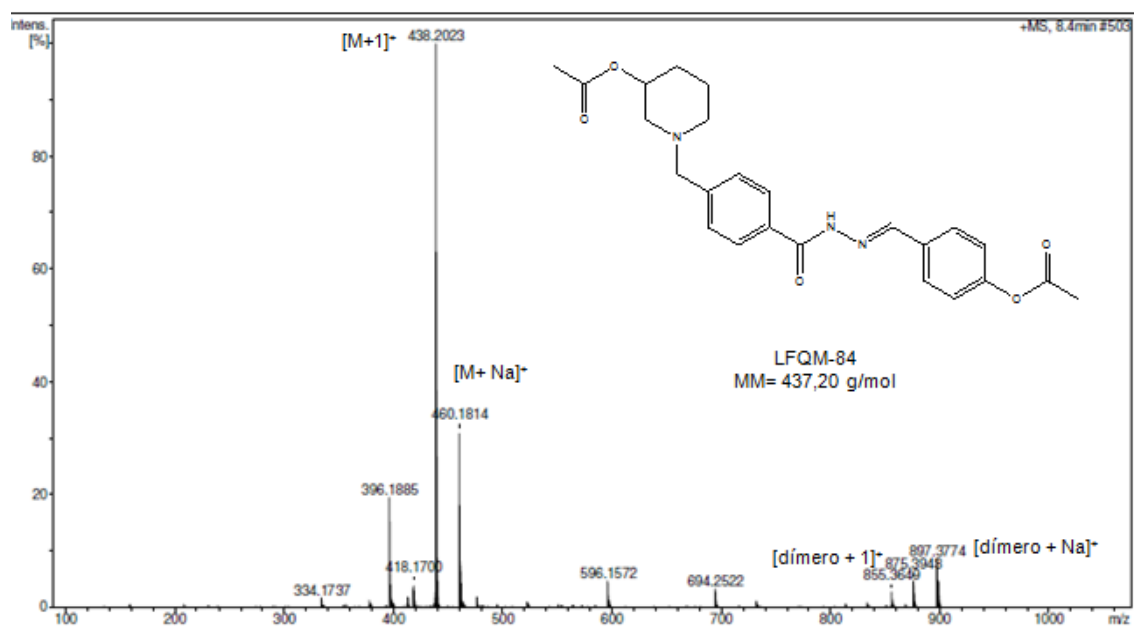
5.2.5 *N*-(4-*O*-acetilbenzilideno)-4-[(3-*O*-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: 7f (LFQM-87)

No espectro no IV (Espectro 58) da substância **LFQM-87** é possível verificar a ausência da banda de ν O-H e a presença das seguintes bandas: ν N-H em 3248 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3070 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2947 cm^{-1} , ν_{s} C-H sp^3 em 2798 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de três bandas distintas de carbonila: ν C=O em 1762, 1732 e, em 1656 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν C=O em 1282, 1251, 1222 e 1197 cm^{-1} .



Espectro 58. Espectro no IV (KBr) da substância **LFQM-87**.

No espectro de massas de alta resolução (Espectro 59) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 438,2023$, ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 460,1814$, ao $[\text{dímero} + 1]^+$ em $m/z = 875,3948$ e ao $[\text{dímero} + Na]^+$ em $m/z = 897,3774$.



Espectro 59. Espectro de massas de alta resolução da substância **LFQM-87**.

6 Avaliação Farmacológica

6.1 Ensaios de atividade inibitória de acetilcolinesterase

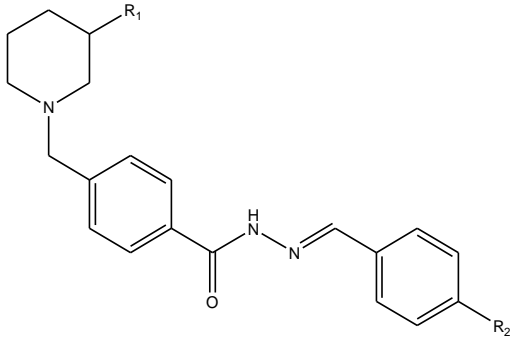
Todas as 16 N-benzilpiperidinil-acilidrazonas sintetizadas como derivados híbridos do donepezil foram avaliadas quanto à capacidade inibitória *in vitro* de AChE, pelo método de Ellman modificado.^{105,106}

Inicialmente foi realizada uma triagem, na concentração 100 µM das substâncias-teste (Tabela 11), que levaram à seleção dos compostos com inibição superior a 50% para determinação das curvas dose-resposta e, permitiram a determinação dos valores de IC₅₀ e a constante de inibição (Ki) (Tabela 16).

Para tanto foi utilizada AChE comercial, purificada de *Electrophorus Electricus* e as substâncias-teste foram avaliadas na concentração de 100 µM. Nesta concentração, as substâncias com maior capacidade inibitória foram **LFQM-57**, **LFQM-75**, **LFQM-76** e **LFQM-88**, que inibiram a atividade enzimática em 91,67%, 81,78%, 81,12% e 81,27%, respectivamente. Sendo que outras 8 substâncias que inibiram acima de 60% da atividade inibitória também foram selecionadas para a determinação de IC₅₀ e Ki. Outro dado interessante foi que todos os derivados acetilados na subunidade piperidínica foram muito pouco ativos, indicando que o grupo -OH livre é essencial para a atividade anticolinesterásica.

A determinação da curva dose-resposta revelou as substâncias mais potentes da série frente a inibição da AChE, sendo **LFQM-57** a mais potente (IC₅₀= 2,71 µM), seguida de **LFQM-67** (IC₅₀= 8,65 µM), **LFQM-88** (IC₅₀= 10,39 µM), **LFQM-75** (IC₅₀= 10,89 µM), **LFQM-55** (IC₅₀= 11,89 µM), **LFQM-65** (IC₅₀= 13,19 µM) e **LFQM-66** (IC₅₀= 14,73 µM). A determinação dos valores da Ki para as moléculas mais ativas confirmou **LFQM-57**, **LFQM-88** e **LFQM-75** como as de maior afinidade pela AChE.

Tabela 15. Efeito das acilidrazonas-alvo sobre a AChE a 100 μM , valores de IC_{50} e K_i .

|  | | | | | |
|--|----------------|------------------|---------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Código | R ₁ | R ₂ | % de inibição | IC_{50} (μM) | K_i (μM) |
| LFQM-54 | OH | H | 65, 305 | 30,01 | - |
| LFQM-55 | OH | Br | 76, 203 | 11,89 | - |
| LFQM-56 | OH | Cl | 74, 827 | 25,39 | - |
| LFQM-57 | OH | NO ₂ | 91, 675 | 2,71 | 2,4 |
| LFQM-65 | OH | OCH ₃ | 76, 891 | 13,19 | 11,5 |
| LFQM-66 | OH | Pirrolidinil | 75, 176 | 14,73 | - |
| LFQM-67 | OH | F | 78, 804 | 8,65 | 13,4 |
| LFQM-72 | OH | NH ₂ | 67, 622 | 21,46 | - |
| LFQM-75 | OH | Piperidinil | 81, 789 | 10,89 | 9,7 |
| LFQM-76 | OH | Imidazol | 81, 123 | 21,71 | 21,4 |
| LFQM-88 | OH | SCH ₃ | 81, 279 | 10,39 | 8,4 |
| LFQM-58 | OAc | NO ₂ | 60, 681 | 33,56 | - |

| | | | | | |
|----------------|-----|-----------------|---------|------------|---|
| LFQM-68 | OAc | Br | 29, 563 | ≥ 100 | - |
| LFQM-73 | OAc | NH ₂ | 25, 732 | ≥ 100 | - |
| LFQM-84 | OAc | Cl | 26, 414 | ≥ 100 | - |
| LFQM-87 | OAc | Ac | 32, 757 | ≥ 100 | - |

As substâncias **LFQM-56**, **LFQM-57**, **LFQM-65**, **LFQM-67**, **LFQM-75**, **LFQM-76** e **LFQM-88** foram selecionadas para o estudo de seletividade AChE x BuChE e estudo de mecanismo de ação como mostram as Figuras 9 e 10 abaixo:

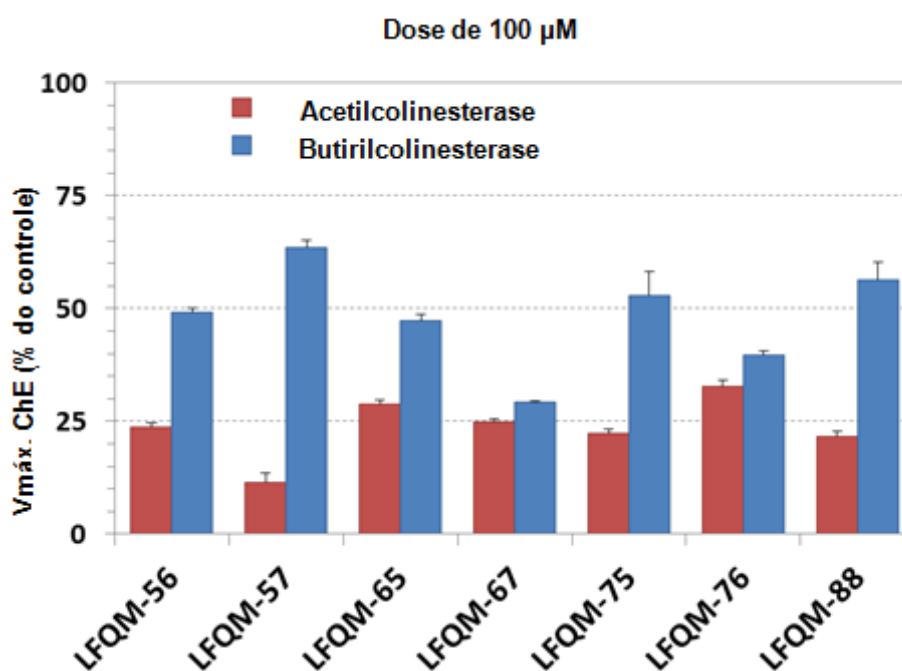


Figura 9. Estudo preliminar da seletividade AChE x BUCHE.

O ensaio da seletividade AChE x BuChE mostrou que, de forma geral, as substâncias testadas são seletivas para a AChE com exceção da **LFQM-67** e da **LFQM-76** que não se mostraram seletivas. Destaque para as substâncias **LFQM-57** e **LFQM-88** que mostraram as maiores seletividades para AChE, seguidas da **LFQM-75**, **LFQM-56** e **LFQM-65**.

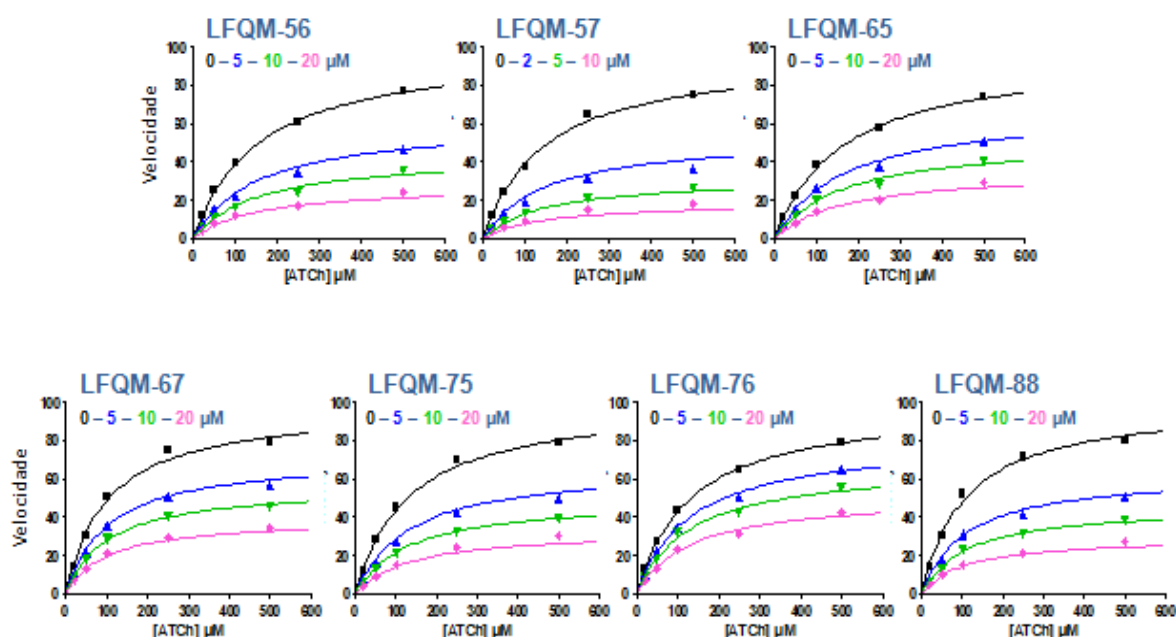


Figura 10: Gráficos de velocidade de inibição X concentração da AChE para as substâncias **LFQM-56**, **LFQM-57**, **LFQM-65**, **LFQM-67**, **LFQM-75**, **LFQM-76** e **LFQM-88**.

O perfil dos gráficos obtidos indica que as substâncias atuam através de um mecanismo de inibição não-competitivo. Neste tipo de mecanismo, a velocidade é diminuída em função da queda da concentração da enzima ativa causada pela ação do inibidor.

Um inibidor não-competitivo não apresenta, necessariamente, semelhança estrutural com o substrato e, pode se ligar tanto ao complexo enzima - substrato quanto na enzima livre. O inibidor não-competitivo se liga em um sítio de ligação diferente do sítio de ligação do substrato. ¹⁰⁶

6.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Visando à avaliação preliminar de possíveis propriedades anti-inflamatórias, todas as substâncias da série-alvo foram submetidas a uma a uma triagem através do teste de pressão na pata de camundongos (von Frey eletrônico). Após este estudo inicial, as substâncias que se mostraram ativas foram submetidas ao ensaio de hiperalgesia induzida por formalina, ensaio que permite uma avaliação mais completa dos efeitos antinociceptivos decorrente da interferência sobre mediadores inflamatórios. As substâncias mais ativas no ensaio de formalina foram ensaiadas adicionalmente, no teste de edema de pata induzido por carragenina, com a determinação da ID₅₀.

Após a seleção das substâncias mais promissoras como IChEs, com perfil duplo e com melhor efeito anti-inflamatório, realizou-se avaliação em campo aberto visando avaliar possíveis efeitos sobre a locomoção dos animais.

Para todos os experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos (30-40g) provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas.

6.2.1 Teste de pressão na pata de camundongos (von Frey eletrônico)

Muitos estímulos são capazes de causar uma resposta nociceptiva em animais e, o ensaio de von Frey utiliza do estímulo mecânico para obter seu resultado. Aplica-se um estímulo na pata do animal e assim que uma resposta é obtida (retirada da pata) o estímulo é cessado. Neste modelo experimental, a hipernocicepção é induzida pela injeção intraplantar de carragenina e a tensão medida pelo transdutor é registrada quando o animal retira a pata.

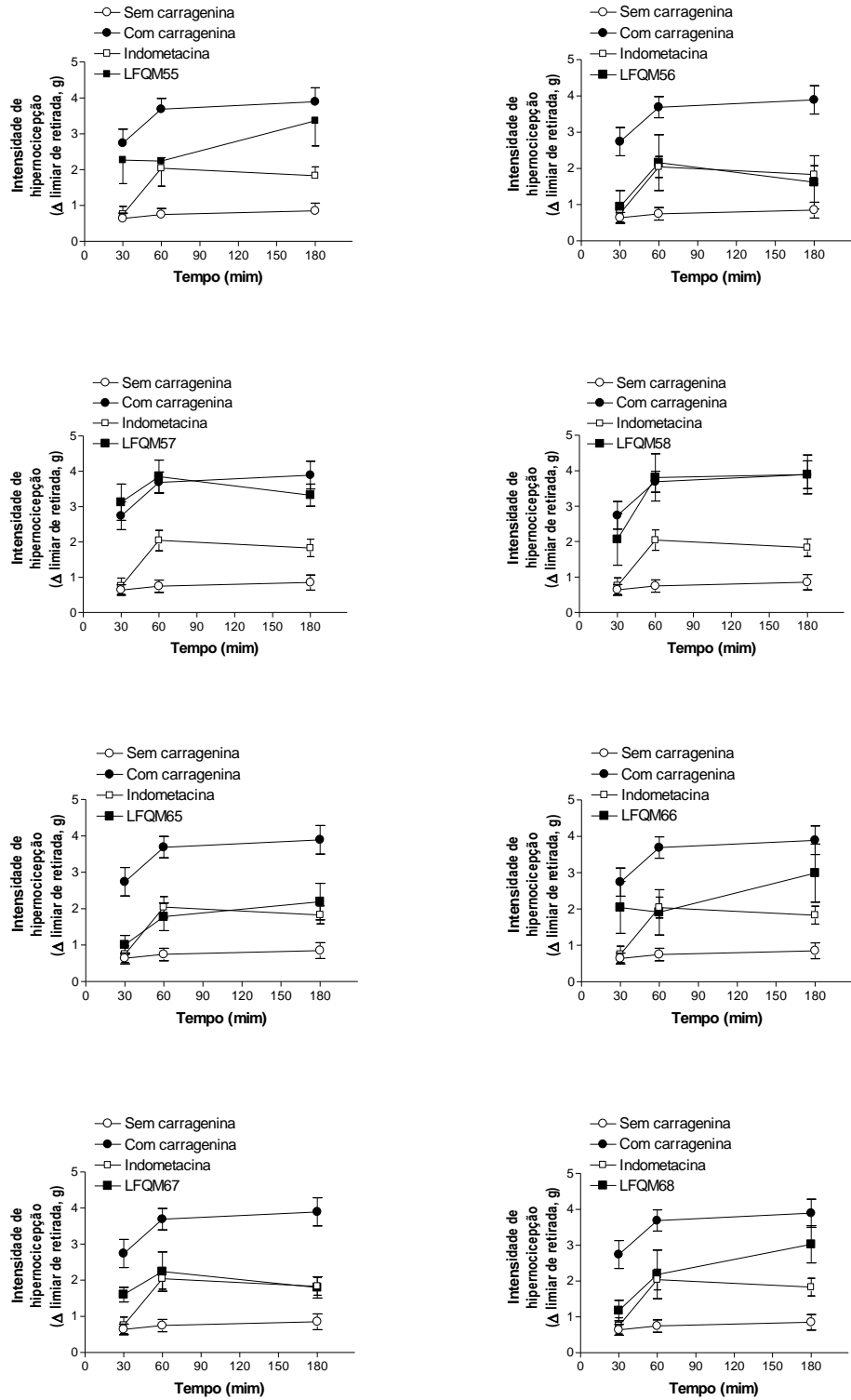


Figura 11. Efeito anti-inflamatório das substâncias-alvo (LFQM-55, LFQM-56, LFQM-57, LFQM-58, LFQM-65, LFQM-66, LFQM-67 e LFQM-68) (100 µmol/Kg) no ensaio de von Frey, utilizando a indometacina (100 µmol/Kg) como padrão positivo.

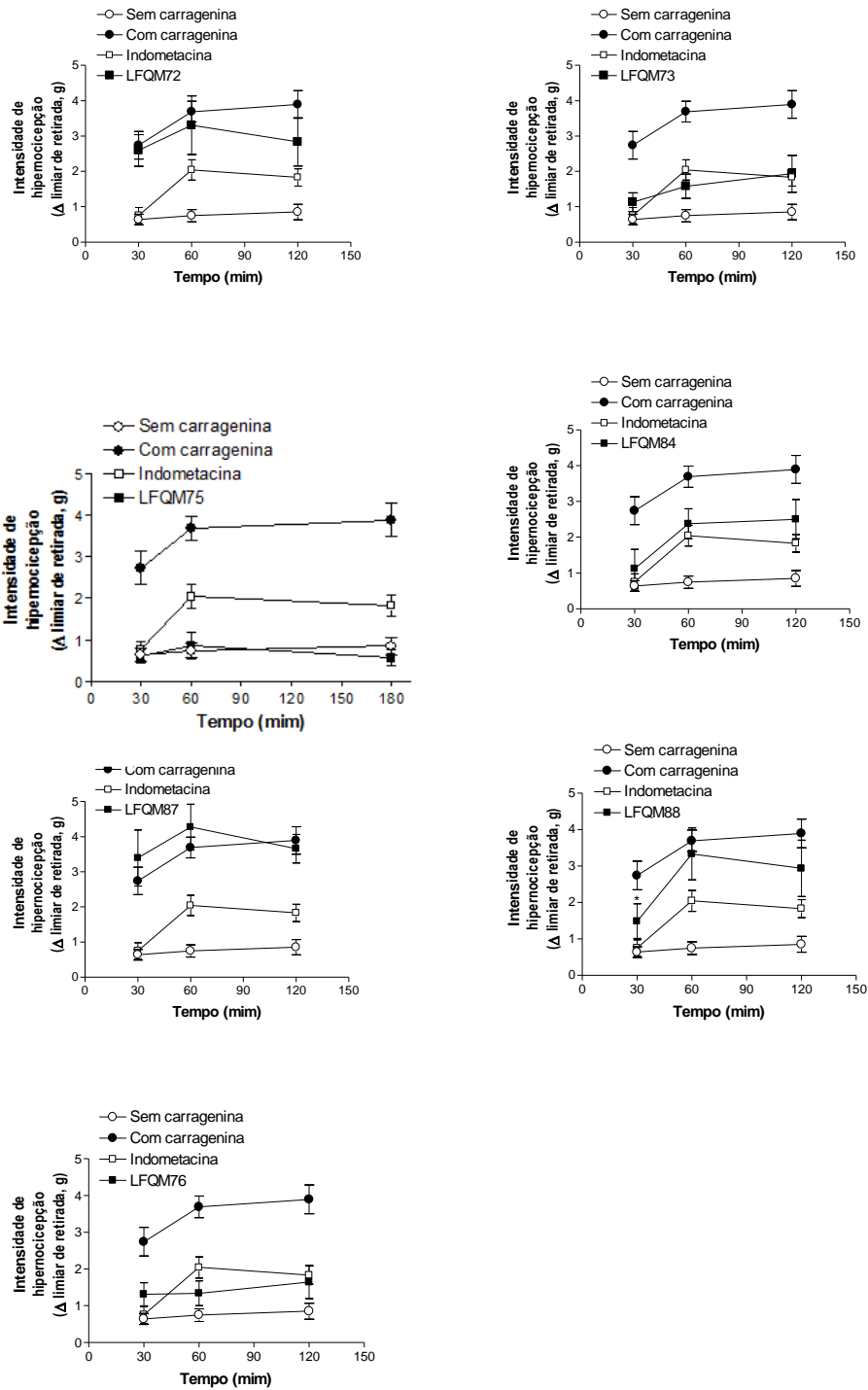


Figura 12. Efeito anti-inflamatório das substâncias-alvo (**LFQM-72, LFQM-73, LFQM-75, LFQM-84, LFQM-87, LFQM-88 e LFQM-76**) (100 $\mu\text{mol/kg}$) no ensaio de von Frey, utilizando a indometacina (100 $\mu\text{mol/Kg}$) como padrão positivo.

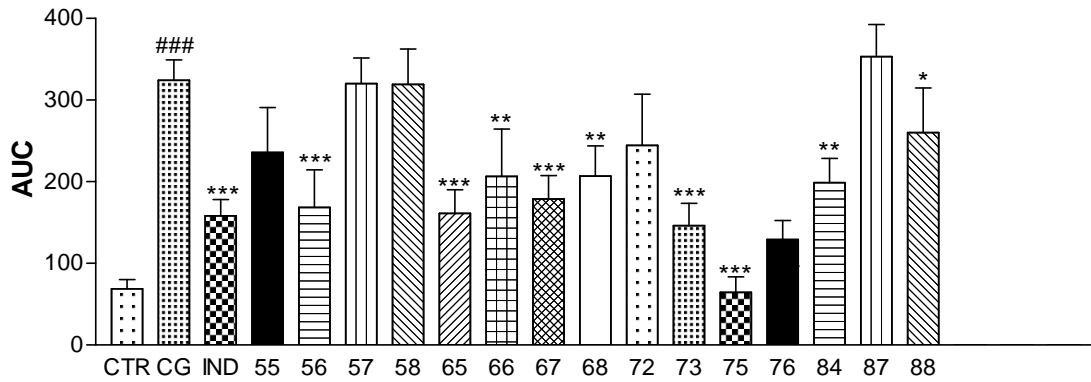


Figura 13. Gráfico de área sobre a curva do efeito anti-inflamatório de todas as substâncias-alvo (100 µM) no ensaio de Von Frey, utilizando a indometacina (100 µM) como padrão.

p < 0.001 quando comparado com o grupo controle sem carragenina.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 quando comparado ao grupo controle com carragenina.

Os resultados obtidos no ensaio de Von Frey eletrônico, as substâncias **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-66**, **LFQM-67**, **LFQM-68**, **LFQM-73**, **LFQM-75**, **LFQM-76** e **LFQM-84** revelaram uma significativa atividade anti-inflamatória, sendo capazes de diminuir a intensidade de hipernocicepção induzida dos camundongos. Essas substâncias foram selecionadas para o ensaio de hiperalgesia induzida por formalina.

6.2.2 Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina

As propriedades analgésicas associadas ao efeito anti-inflamatório foram analisadas através do ensaio de hiperalgesia induzida por formalina em pata de camundongos. Neste ensaio, os animais recebem a administração intraplantar de uma solução de formalina e exibem comportamento nociceptivo espontâneo

reconhecido e quantificado pela observação da quantidade de lambidas na pata lesada. Este ensaio é caracterizado por duas fases distintas de avaliação. A primeira fase, chamada neurogênica ou fase inicial compreende os primeiros 5 minutos e, está associada à excitação de nociceptores periféricos, antes de iniciada a resposta inflamatória. Numa segunda fase, durante 10-15 minutos, é avaliada a resposta de sensibilização central dos animais à sensação dolorosa, mediada por citocinas e quimiocinas oriundas do processo inflamatório tecidual, sendo, portanto, a fase que melhor representa a avaliação anti-inflamatória de substâncias de interesse.^{107,108}

Os resultados do ensaio de formalina, na dose única de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por substância-teste, indicaram que as substâncias **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67**, **LFQM-75**, **LFQM-76** e **LFQM-84** apresentaram na primeira fase, atividade antinociceptiva significativa comparada ao veículo.

Na fase inflamatória (segunda fase), as substâncias **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67**, **LFQM-73** e **LFQM-76** apresentaram atividade anti-inflamatória significativa, comparada ao veículo (Figura 14).

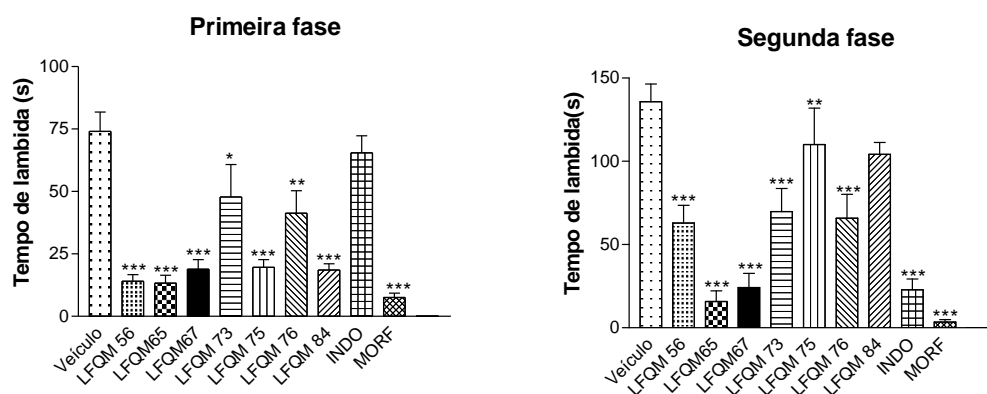


Figura 14. Efeito das substâncias-teste **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67**, **LFQM-73**, **LFQM-75**, **LFQM-76**, **LFQM-84** (100 $\mu\text{mol/kg}$), indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$) e morfina (39 $\mu\text{mol/kg}$) sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina.

Baseado nos resultados anticolinesterásicos e anti-inflamatórios obtidos, fez-se o cruzamento dos dados e pode-se concluir, de forma preliminar, que as substâncias **LFQM-56** , **LFQM-65** e **LFQM-67** são potentes candidatas a protótipos de fármacos de ação dupla e , a substância **LFQM-73** é uma potente candidata a protótipo de fármaco anti-inflamatório. Dessa forma, essas 4 substâncias foram selecionadas para ensaios mais aprofundados de avaliação anti-inflamatória. As substâncias **LFQM-57** e **LFQM-88** que não demonstraram atividade anti-inflamatória significativa, exibiram importantes atividades inibitórias de AChE e com alta seletividade. Portanto, estas substâncias estão sendo estudadas adicionalmente como possíveis candidatas a protótipos de fármacos anticolinesterásicos.

6.2.3 Teste de edema de pata induzido por carragenina

A administração intraplantar de carragenina em uma das patas em camundongos provoca uma reação inflamatória reprodutível por ser padrão irritante contínuo para análise de inflamação e de fármacos anti-inflamatórios. O processo inflamatório induzido por carragenina se instala imediatamente após sua administração, resultante da ação combinada da liberação de prostaglandinas, bradicinina, histamina, taquicininas e espécies reativas de oxigênio. Nesta condição, os neutrófilos facilmente migram para os locais de inflamação e a resposta inflamatória é quantificada pelo aumento no tamanho da pata (edema) dos animais que é modulado por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória.¹⁰⁸

Os resultados obtidos neste ensaio, com medidas do volume da pata, evidenciaram que as substâncias-teste foram capazes de reduzir significativamente

o edema induzido por carragenina. De forma geral, as substâncias atuaram de modo comparável ao observado no grupo tratado com indometacina (Figura 14).

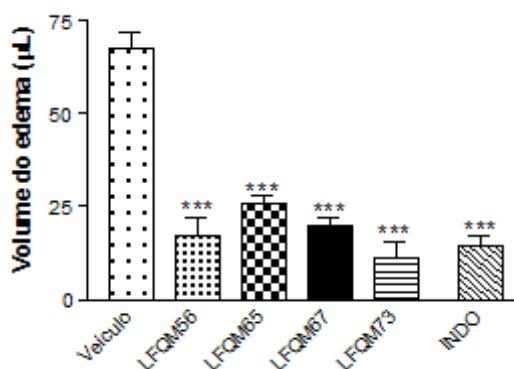


Figura 14: Efeito das acilidrazonas **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-73** (100 µmol/kg), no ensaio de edema de pata de camundongo induzido por carragenina.

A ID_{50} foi estimada neste mesmo experimento utilizando diferentes doses das substâncias testes e do fármaco padrão (1, 3, 10, 30 e 100 µmol/Kg) (Figura 16).¹⁰⁹

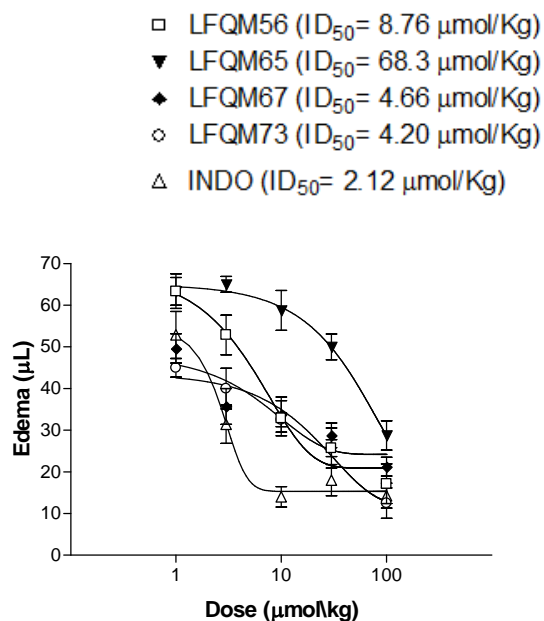


Figura 16. Estimativa da ID₅₀ das acilidrazonas **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-73** (100μmol/kg), no ensaio de edema de pata de camundongo induzido por carragenina.

Os resultados obtidos neste ensaio, com medidas do volume da pata evidenciaram que as substâncias-teste foram capazes de inibir 50% do edema em concentrações que variam de 4.20 (**LFQM-73**) a 68.3 μM (**LFQM-65**).

6.2.4 Avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto

Neste modelo farmacológico foi avaliado o efeito das substâncias-teste na função motora e no comportamento dos animais submetidos a um ambiente restrito, dividido em áreas específicas a serem exploradas pelo animal (Figura 17).

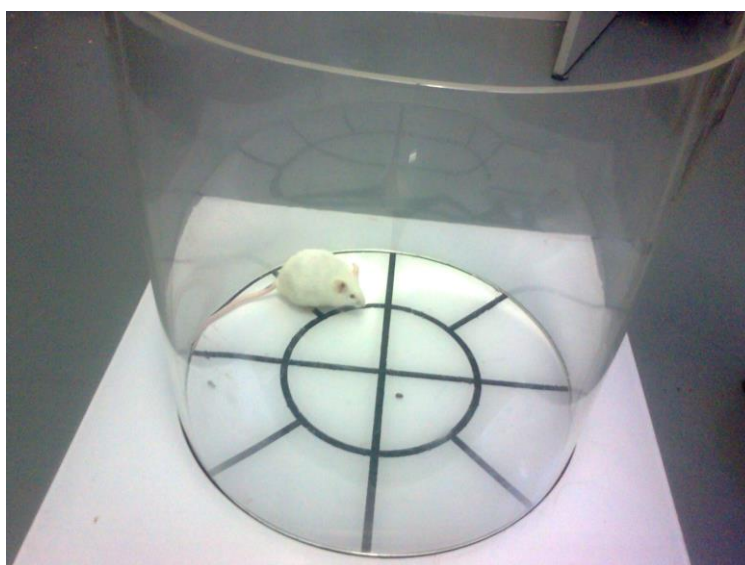


Figura 17. Arena circular de acrílico utilizada no ensaio de campo aberto.

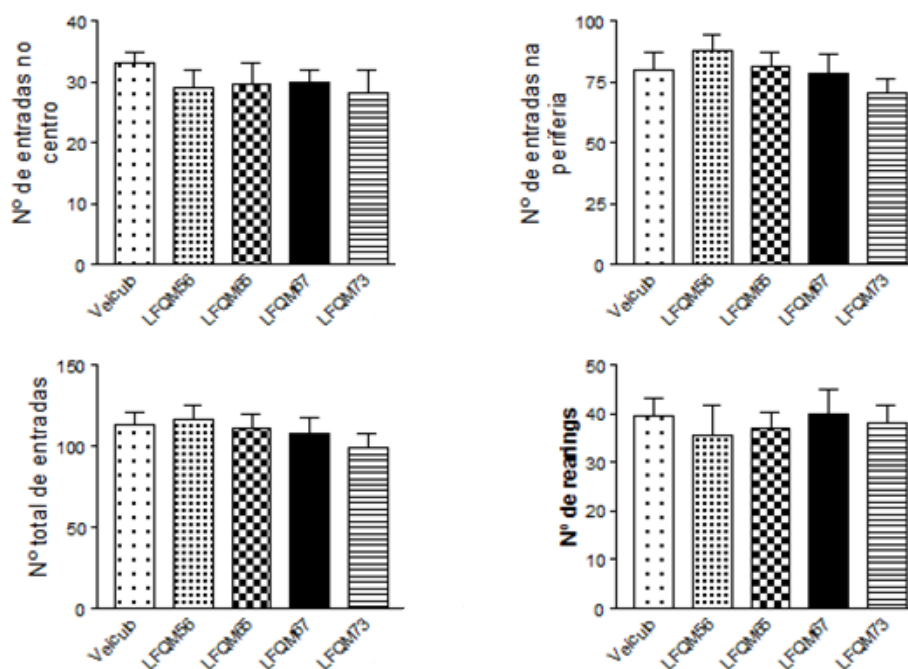


Figura 18. Efeito das substâncias **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-73** no ensaio de campo aberto na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$.

Os resultados obtidos neste ensaio, foram conclusivos de que as substâncias não afetaram a capacidade locomotora dos animais.

Os ensaios anti-inflamatórios mostraram a substância **LFQM-73** como a mais potente anti-inflamatória da série e permitiram eleger as substâncias **LFQM-56** e **LFQM-67** como as melhores com atividade dupla.

7 Ensaio de citotoxicidade (viabilidade celular) em macrófagos humanos

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT que é um teste usado para avaliar a viabilidade celular, de execução rápida e objetiva, baseado em uma reação colorimétrica. O sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) entra na mitocôndria da célula viável e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais formazan, de coloração azul escuro. A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular.

Tabela. Efeito da citotoxicidade em macrófagos

| Substância | CC50 (µg/mL) | CC50 (µmol/L) | CC90 (µg/mL) | CC90 (µmol/L) |
|------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| LFQM56 | 73,41304 | 197,4209 | 166,8186 | 448,6054 |
| LFQM57 | 180,0668 | 470,8697 | 388,8351 | 1016,7930 |
| LFQM67 | 181,68 | 511,1898 | 371,9387 | 1046,5174 |
| LFQM73 | 281 | 712,3536 | 568,0264 | 1439,9845 |
| LFQM75 | 250,9349 | 596,6865 | 507,2137 | 1206,0800 |
| LFQM88 | 95,999 | 250,3179 | 190,7846 | 497,4720 |

O resultado indicou que as substâncias mais ativas são pouco citotóxicas e, a substância **LFQM-56** é a mais citotóxica com uma CC50 (concentração citotóxica para 50% das células) de 197,4209 µmol/L. Porém, vale ressaltar que a IC50 da

LFQM-56 para a inibição da AChE é de 25,90 μM ou seja, aproximadamente 8 vezes menor que a dose citotóxica.

8 Estimativas *in silico* de parâmetros químicos, físico-químicos e ADME

Alguns parâmetros ADME e dados químicos e físico-químicos foram previstos *in silico*, para as moléculas mais ativas da série, utilizando o Programa QikProp v. 3.5, desenvolvido pela Empresa Schrödinger.

QikProp é um software rápido, preciso e fácil de usar para a predição das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Este software foi projetado pelo professor William L. Jorgensen e atualmente é distribuído pela empresa Schrödinger. QikProp prediz descritores fisicamente importantes e propriedades farmacologicamente relevantes de moléculas orgânicas, quer individualmente ou em lotes.

O Qikprop requer estruturas 3D que são comparadas a um banco de 1712 fármacos conhecidos. Além de prever as propriedades moleculares, QikProp apresenta faixas comparativas de uma propriedade em particular com a respectiva propriedade de 95% dos fármacos conhecidos. QikProp também aponta 30 tipos de grupos funcionais reativos que podem causar falsos positivos em ensaios de triagem de alto rendimento (HTS). Ao realizar uma avaliação, QikProp analisa rapidamente os tipos de átomos e as cargas, os ângulos, o volume da molécula e a área superficial. QikProp usa então esta informação, juntamente com os descritores físicos calculados utilizando Mecânica Estatística de Monte Carlo nas equações de regressão. O resultado é uma previsão precisa das propriedades farmacologicamente relevantes de uma molécula.

Os dados mais relevantes são apresentados na tabela 2 e indicam que as substâncias-líder estão perfeitamente dentro dos parâmetros de referência, que o programa gera, segundo o fabricante, a partir de 95% dos fármacos disponíveis aprovados. Além de parâmetros ADME, são apresentados ainda valores de volume molecular, previsão de sítios de metabolização, solubilidade em água (log S) e da qualidade de absorção humana. Considerando este estudo, em comparação com os dados experimentais obtidos, percebe-se uma convergência entre, por exemplo, as substâncias que tiveram atividade dupla e os parâmetros previstos para atividade no

sistema nervoso central; resultado semelhante foi observado para, aquelas cuja previsão indicou fraca ou ausência de atividade no SNC e que, de fato, demonstraram um melhor perfil anti-inflamatório. À exceção de **LFQM-57**, as substâncias com melhor perfil anti-inflamatório *in vivo*, sem significativas atividades anticolinesterásicas *in vitro*, também apresentaram dados computacionais coerentes, uma vez que foi prevista uma baixa ou ausência de atividade no SNC.

Os valores de *clog P*, capacidade de ligação à albumina sérica, absorção humana foram adequados quanto aos valores de referência e em comparação com o donepezil, e são preditivos importantes para antecipar parâmetros de biodisponibilidade. O único dado preocupante parece ser relativo a um possível bloqueio de canais de $hERG K^+$, o que seria um indicativo de toxicidade cardíaca, merecendo, portanto, confirmação experimental.

De forma geral, podemos inferir que as substâncias apresentam perfil de biodisponibilidade e toxicidade adequados, uma vez que além das substâncias-alvo atenderem aos valores de referência, apresentam também dados coerentes aos obtidos para o donepezil, fármaco de referência.

Tabela 16. Estimativas *in silico* de parâmetros químicos, físico-químicos e ADME das substâncias-líder da série-alvo e do donepezil.

| Perfil de atividade** | LFQM-56 | LFQM-57 | LFQM-67 | LFQM-73 | LFQM-75 | LFQM-88 | donepezil | VR* |
|--|--|--|--|---|---|--|---|-------------|
| | AD ^a | IACHe ^b | AD | AI ^c | IACHe | IACHe | IACHe | |
| Descritor/ parâmetro ADME | | | | | | | | |
| Massa molecular | 371,866 | 384,434 | 355,411 | 394,472 | 420,553 | 383,507 | 379,498 | 130-725 |
| Metabólitos primários ou grupos funcionais reativos | Desalq. amina; ROH 2º→RCOR; H-benzílico →ROH | Desalq. amina; ROH 2º→RCOR; H-benzílico →ROH; lig. simples het- átomo | Desalq. amina; ROH 2º→RCOR; H-benzílico →ROH | Desalq. amina; H-benzílico→R OH; NH tipo anilina →NOH ou NCOR; éster esteric.acessível | Desalq. de amina; ROH 2º→RCOR; H-tipo benzílico→ROH | Desalq. amina; ROH 2º→RCOR; H-benzílico →ROH | H-benzílico →ROH; α,β-desidrogenação na C=O; Desalq amina e éter; | — |
| Volume molecular | 1210,396 | 1245,471 | 1182,380 | 1315,137 | 1429,326 | 1284,767 | 1266,695 | 500-2000 |
| Log P oct/H₂O | 3,330 | 1,785 | 3,076 | 2,559 | 3,939 | 3,451 | 4,368 | -2,0-6,5 |
| Log S (solub. H₂O) | -4,636 | -3,559 | -4,272 | -4,543 | -5,730 | -4,846 | -4,477 | -6,5-0,5 |
| Log K HSA (albumina) | 0,350 | 0,017 | 0,280 | 0,314 | 0,726 | 0,403 | 0,569 | -1,5-1,5 |
| Log BB (cérebro/sangue) | -0,641 | -2,152 | -0,685 | -1,784 | -0,914 | -0,810 | 0,189 | -3,0-1,2 |
| Atividade SNC (de -- a ++) | + | -- | + | -- | +/- | +/- | + | — |
| Bloqueio canais HERG K+ (log IC₅₀) | -7,055 | -7,004 | -7,023 | -7,214 | -7,157 | -7,139 | -6,608 | < -5 (ruim) |
| % absorção oral humana | 86 | 59 | 84 | 68 | 89 | 87 | 100 | <25% baixa |
| Qualidade absorção oral humana | alta | média | alta | Média | alta | alta | alta | >80% alta |

*VR = intervalo ou valor recomendado para 95% dos fármacos conhecidos (fonte: QikProp 3.2 Manual User – Schrödinger Software)

**definido após avaliação farmacológica *in vitro* e *in vivo* da série-alvo

^aAD= atividade dupla: inibitória de AChE e anti-inflamatória

^bIChE = atividade inibitória de AChE

^cAI = atividade anti-inflamatória

9 Parte Experimental

9.1 Química

9.1.1 Generalidades

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas folhas cromatográficas de sílica gel, W/UV254, na espessura de 0,2 μ , em suporte de alumínio. A visualização das substâncias foi feita câmara escura com lâmpada de UV $\lambda = 254$ ou 365 nm, em câmara de vapor de iodo sublimado. A remoção de solventes foi feita em evaporadores rotatórios da marca Ika®-Werke, modelo HB4 basic e Heidolph, modelo Laborata 4000, além de sistema de alto-vácuo, quando necessário. Os solventes utilizados foram de grau P.A, tratados adicionalmente segundo a literatura,¹¹⁰ quando necessário e os reagentes comerciais utilizados das marcas Acros, Sigma-Aldrich e Merck. As purificações em coluna aberta, quando necessárias, foram realizadas em colunas de vidro de diferentes diâmetros e comprimentos, utilizando como fase estacionária gel de sílica da marca Acros, granulometria 70-230 mesh e sistemas eluentes de diferentes constituições e gradientes de concentração.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em aparelho da marca Shimadzu modelo Prestig-21, acoplado a um microcomputador munido com o software IR solution, do LABIQ (Laboratório Interdisciplinar de Química) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). As análises foram feitas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em números de ondas (cm^{-1}).

As faixas de fusão foram medidas em triplicata, em equipamento Marte (PFM II), com amostras trituradas e empacotadas em tubos capilares.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados no espectrômetro BRUKER AVANCE DPX 200 MHz do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas gerais (UFMG). Como referência interna foi utilizado o pico do tetrametilsilano (TMS) presente no clorofórmio deuterado (δH e δC 0,00 ppm), ou pico do metanol (δH 3,31 ppm e δC 49,00 ppm). Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

Outros espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro MAGNET SYSTEM 500 MHz/54 mm ULTRASHIELD PLUS, LONG HOLD TIME – Bruker operado em 500 MHz (^1H) e em 100 MHz dept q (^{13}C) na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os Solventes deuterados utilizados foram CDCl_3 , $\text{MeOH-}d_4$ e $\text{DMSO-}d_6$.

9.1.2 Reação de esterificação do 4-carboxibenzaldeído com SOCl_2

Em um balão de fundo redondo de 2 bocas, foram adicionados 6,78 mmols do 4-carboxibenzaldeído (**15**), 10 mL de CH_2Cl_2 , 27,26 mmols (2 mL) de cloreto de tionila, recentemente destilado, e quatro gotas de DMF. A solução foi agitada, sob refluxo, com monitoramento por CCD (eluente: hexano/acetato de etila: 8:2) por 40 minutos. Após este tempo, o solvente foi cuidadosamente removido sob pressão reduzida. Em seguida, 8 mL de metanol foram adicionados ao produto bruto da reação e a solução resultante foi agitada, a temperatura ambiente por 1 hora.⁹⁹ O excesso de MeOH foi removido por destilação e o resíduo foi purificado em coluna,

resultando no 4-formilbenzoato de metila (**13**), como um sólido cristalino branco, em 87 % de rendimento.

9.1.3 Reação de aminação redutiva entre o 4-formilbenzoato de metila (13**) e 3-hidroxi-piperidina (**12**)**

Em um balão de fundo redondo monotubulado foram misturados 4,65 mmols do éster (**13**), 9,30 mmols da 3-hidroxi-piperidina (**12**) e 5 mL de metanol, mantendo a solução resultante sob agitação por 1 h, a temperatura ambiente, sob atmosfera de N₂. Em outro balão, foram misturados 2,33 mmols de ZnCl₂ anidro, 4,65 mmols de NaBH₃CN e 3 mL de metanol anidro, mantendo sob agitação por 1h, em atmosfera de N₂. Passado este tempo, as duas soluções foram misturadas em um único balão, mantendo-se a atmosfera de N₂, por mais 24h, com acompanhamento por CCD. Após consumo do material de partida, o solvente foi removido, seguido da adição de solução aquosa de NaOH a 20% até pH ~ 12. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (4 X 10 mL) e a fase orgânica combinada foi subsequentemente lavada com 20 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo¹⁰¹, resultando no éster N-benzilpiperidínico (**11**), em 86% de rendimento, como um sólido amarelado.

9.1.4 Reação de hidrazinólise entre o 4[(3-hidroxi-piperididín-1-il)metil]benzoato de metila (11**) e monodrato de hidrazina**

Em um balão de 1 boca foram misturados 2,55 mmols do 4[(3-hidroxi-piperididín-1-il)metil]benzoato de metila (**11**), 3 mL de etanol e 3,8 mL (76,38

mmol) de monohidrato de hidrazina a 98%. A solução resultante foi refluxada por 3 horas, sob acompanhamento por CCD.¹⁰² Ao final da reação, o solvente foi removido a pressão reduzida e o excesso de hidrazina foi retirado em linha de alto vácuo, resultando na hidrazida (**10**), com rendimento quantitativo.

9.1.5 Procedimento geral para obtenção das *N*-acilidrazonas-alvo

Em um balão de fundo redondo monotubulado foram adicionados 1 eq. molar da hidrazida (**10**), 1,2 eq. do aldeído de interesse, 5 mL de etanol anidro e 2 gotas de HCl concentrado. A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD. Ao final da reação, o solvente foi removido sob pressão reduzida,¹⁰³ fornecendo as respectivas *N*-acilidrazonas, que foram purificadas em coluna.

9.1.6 Procedimento geral para obtenção das *O*-acetil-piperidinil-*N*-acilidrazonas

Em um balão de 2 bocas, foram misturados 1 eq. molar da *N*-acilidrazona, 0,05 eq. de 4-DMAP, 10 eq. de anidrido acético e 5 mL de CHCl₃. A solução resultante foi agitada, sob refluxo e monitoramento por CCD. Após conversão completa, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto acetilado bruto foi purificado em coluna.¹⁰⁴

9.1.7 Reação de redução com metal em solução para obtenção da LFQM-72

Em um balão de 2 bocas, adicionou-se 0,99 mmols da nitroacilidrazona (**LFQM-57**), 0,59 mmols de NH_4Cl , 5,53 mmols de Fe° e 6 mL de EtOH/ H_2O 2:1. O meio reacional foi mantido sob refluxo por 3 horas e, posteriormente, foi filtrado em Celite®. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida¹¹¹ e o produto resultante foi purificado em coluna, fornecendo a aminofenil-acilidrazona (**LFQM-72**), como um sólido amarelo, em 14% de rendimento.

9.1.8 Reação de redução com metal em solução para obtenção da LFQM-73

Em um balão de 2 bocas foram misturados 0,80 mmols da nitro-acilidrazona acetilada (**LFQM-58**), 0,48 mmols de NH_4Cl , 4,50 mmols de Fe° e 6 mL de EtOH/ H_2O 2:1. O meio reacional mantido sob refluxo por 3 horas, seguido de filtração em Celite®. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida¹¹¹ e o produto resultante foi purificado em coluna, fornecendo a aminofenil-acilidrazona acetilada (**LFQM-73**) como um sólido amarelo, em 42% de rendimento.

9.2 Avaliação farmacológica

A avaliação farmacológica dos compostos-alvo foi realizada em laboratórios colaboradores ao LFQM. Os ensaios *in vitro*, para avaliação da atividade anticolinesterásica, foram realizados pelo grupo do prof. Dr. Newton G. Castro, no

Departamento de Farmacologia Básica e Clínica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ.

A avaliação do perfil anti-inflamatório foi realizada sob supervisão do Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Estes ensaios envolveram protocolos de identificação, quantificação e caracterização da atividade anti-inflamatória em camundongos.

9.2.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Cada substância foi avaliada quanto à inibição da atividade da acetilcolinesterase, utilizando o método de Ellman.¹⁰⁵ O ensaio foi modificado em relação ao anteriormente descrito,¹⁰⁶ usando-se a acetilcolinesterase purificada da *Electrophorus electricus* (tipo V-S, Sigma). A enzima foi dissolvida em solução-tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4) a 50 U/mL e mantida congelada. A reação de hidrólise da acetiltiocolina (0,5 mM, Sigma, EUA) foi acompanhada por 5 min em espectrofotômetro de microplacas SpectraMax 250 (Molecular Devices, EUA) a $\lambda = 412$ nm, em volume de 0,2 mL (pH 7,4), à temperatura ambiente (22–25 °C). A velocidade máxima de reação foi obtida por regressão linear de 10 pontos consecutivos com o programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Imediatamente antes de cada ensaio, a atividade da enzima foi avaliada, ajustando-se a concentração da solução de trabalho de modo a ter uma velocidade de reação no grupo controle (sem inibidor) entre 0,1 e 0,2 unidades de densidade óptica por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata, sempre com um grupo controle (sem inibidor), e os valores de velocidade de reação na presença das amostras foram expressos como porcentagem da média do grupo controle.

As substâncias-teste foram dissolvidas em DMSO anidro (P.A., Vetec, Brasil) a 0,1 M ou 0,2 M e inicialmente testadas em concentração fixa de 0,1 mM, para

triagem. Foi verificado que na concentração final de DMSO no ensaio (0,1% ou 0,05% v/v) não houve variação significativa na atividade da acetilcolinesterase.

As substâncias que inibiram mais que 50% a atividade enzimática na triagem foram ensaiadas em seis concentrações sucessivas para obtenção da curva dose-resposta. As estimativas de IC₅₀ foram obtidas por regressão não-linear, utilizando o programa Prisma (GraphPad), segundo a expressão: $V(\%) = 100 \cdot (1 + c \cdot CI_{50}^{-1})^{-1}$, onde c é a concentração da amostra e V é a velocidade de reação (média das triplicatas). Todos os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez, e os valores relatados são médias das repetições.

9.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Para a avaliação anti-inflamatória foram utilizados camundongos Swiss machos (30–40 g), provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG. Os animais foram tratados com ração comercial e água “ad libitum”, durante todo o período de experimento, garantida sua adaptação por 7 dias em sala climatizada a $23 \pm 2^\circ \text{C}$, em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Foram privados de comida durante cerca de 8 horas antes de cada experimento e ao término, os animais foram sacrificados com halotano. Para os experimentos, os animais foram subdivididos e mantidos separadamente em grupos de 8-10 indivíduos.

9.2.2.1 Teste de pressão na pata de camundongos (von Frey eletrônico)

Neste modelo experimental, a hipernocicepção é induzida pela injeção intraplantar de carragenina e a tensão medida pelo transdutor é registrada quando o animal retira a pata.

A tensão aplicada na pata foi repetida até que se conseguissem duas medidas similares. Os camundongos foram colocados em uma caixa de acrílico (12x10x17 cm) por 30 minutos antes do teste para que eles fossem ambientados. Durante esse período de adaptação, as patas dos animais foram tocadas 2-3 vezes com a ponta do transdutor e, após esse período, a leitura basal foi realizada.

Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina 100 µg/pata e registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal, depois de 30 min., 1h de três horas da aplicação da carragenina.^{112,113}

9.2.2.2 Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina

Após 1 hora do tratamento dos animais com as substâncias-teste e do controle, e 30 minutos após o tratamento com morfina (via intraperitoneal), aplicou-se por via intraplantar, 20 µL de solução de formaldeído a 5% na pata traseira direita dos animais. Imediatamente, observou-se o tempo que os animais levaram lambendo a pata que recebeu a solução de formalina, durante 5 minutos após a aplicação e por mais 10 minutos, após 20 minutos da aplicação do estímulo nociceptivo.¹⁰⁸

9.2.2.3. Teste de edema de pata induzido por carragenina e ID₅₀.

Após 1 hora do tratamento das moléculas testes e controle, o edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina (400 µg/pata) como agente inflamatório no volume de 20 µL, que foi aplicada na região plantar da pata posterior direita dos animais. Após três horas da administração da carragenina, a pata na qual a inflamação foi induzida foi imersa até a região tíbio-társica na cuba do pletismógrafo e o edema foi calculado pela diferença entre o volume final (após carragenina) e o volume inicial (sem carragenina).¹⁰⁹ A ID₅₀ foi estimada no mesmo experimento utilizando diferentes doses das substâncias testes e do fármaco padrão (1, 3, 10, 30 e 100 µmol/Kg).¹⁰⁹

9.2.2.4 Avaliação da atividade locomotora no campo aberto

Após 1 hora do tratamento oral com as substâncias-teste na dose de 100 µM, cada camundongo foi colocado individualmente em uma arena circular de acrílico dividido em quadrantes, dos quais 8 junto às paredes do aparato foram considerados periferia e os 4 demais, os centrais. Cada camundongo foi colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos para posterior análise. Foi registrado o número de cruzamentos com as quatro patas no centro, na periferia, o número total de entradas e o número de “rearings” (exploração vertical). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com etanol a 10%.¹⁰⁸

9.2.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um software GraphPad versão 3.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação de três ou mais médias foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de *Newman-Keuls*. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo da ID_{50} foi realizada regressão não linear.

9.2.2.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos humanos

Para a avaliação da citotoxicidade dos derivados foi utilizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) A suspensão celular de monócitos normais na concentração de $2,4 \times 10^6$ células/mL foi distribuída em uma placa de 96 poços, 90 μ L por poço, e incubadas a 37 °C em incubadora a 5% de CO_2 , juntamente com mais 10 μ L da amostra teste em diferentes concentrações. Neste estudo foram utilizadas as concentrações de 100; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,48; 0,24; 0,06 μ g/mL dos compostos testados e a placa foi incubada por 48 horas. Após o período de incubação as células dos poços controle e do teste foram observadas microscopicamente. Após adicionou-se 10 μ L do corante MTT (5 mg/mL) e as células foram novamente incubadas por mais 4 horas. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionaram-se 100 μ L de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorvância correspondente a cada amostra foi medida no leitor espectrofotométrico de microplacas a 560 nm. A absorvância obtida das células controle não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular

(MOSMANN, 1983). Os dados foram avaliados utilizando regressão linear para se obter os valores de CC50.

10 Conclusões

Uma nova família de 16 híbridos moleculares foi sintetizada, envolvendo uma rota sintética divergente, em 4 etapas e com rendimento global médio de 36%. As 16 substâncias sintetizadas apresentam padrão estrutural inédito e foram submetidas à triagem quanto às suas propriedades inibitórias de acetilcolinesterase *in vitro* e anti-inflamatórias utilizando o ensaio de von Frey eletrônico. Os compostos que apresentaram efeito anti-inflamatório significativo foram selecionados para investigação adicional nos ensaios de hiperalgesia induzida por formalina e edema de pata de camundongo.

Os resultados obtidos da triagem revelaram 3 grupos de substâncias com perfis de atividade distintos. As substâncias **LFQM-57**, **LFQM-75** e **LFQM-88** foram as mais potentes inibidoras seletivas da AChE, inibindo a 100 μM cerca de 91,7%, 81,8% e 81,3% da atividade enzimática, com IC_{50} = 2,71, 10,89 e 10,39 μM , respectivamente, sem, contudo apresentarem atividades anti-inflamatórias significativas. A substância **LFQM-73** (ID_{50} edema = 4.20 $\mu\text{mol/kg}$) apresentou o melhor perfil de atividade anti-inflamatória, porém, não apresentou atividade anticolinesterásica. Já as substâncias **LFQM-56** (IC_{50} AChE = 25.39 μM ; ID_{50} edema = 8.76 $\mu\text{mol/kg}$) e **LFQM-67** (IC_{50} AChE = 8.65 μM ; ID_{50} edema = 4.66 $\mu\text{mol/kg}$) demonstraram os melhores perfis de ação dupla da série. Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos centrais, incluindo sedação e alterações motoras, os compostos **LFQM-56**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-73** foram selecionados para os ensaios de campo aberto, não tendo sido evidenciada alteração motora e comportamental em nenhuma das substâncias na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$.

Diante destes resultados foi possível identificar-se 5 novas substâncias promissoras como novos candidatos a protótipos de fármacos úteis ao tratamento da DA, sendo 3 inibidores de AChE e 2 com perfil de ação duplo, além de uma outra

substância com potentes propriedades anti-inflamatórias, todas com padrão estrutural inédito.

No momento, as substâncias com perfil de atividade dupla estão sendo ensaiadas *in vivo* para avaliação de suas propriedades anti-inflamatórias no sistema nervoso central. Este ensaio baseia-se na administração intratecal do peptídeo βA_{1-42} , mais tóxico e susceptível à agregação para indicação de neurofibrilas e a instalação de um processo neuro-inflamatório conseqüente.

A administração das substâncias teste permite a avaliação do efeito anti-inflamatório ou em possível efeito anti-amiloide que poderá ser evidenciado pelo efeito anti-agregante de βA ou ainda promovendo a desagregação neurofibrilar. Estes experimentos estão sendo realizados na UFMG, sob coordenação do Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Jr e da Dra. Aline Cristina Campos.

Paralelamente, na UFRJ, sob coordenação dos Profs. Dr. Newton G. Castro e Gilda Neves, estão sendo conduzidos experimentos *in vivo* para estudo do efeito das substâncias anticolinesterásicas e de perfil duplo em modelos de aprendizado e memória. Estes ensaios utilizam indução de amnésia por administração de escopolamina e posterior avaliação em modelos cognitivos como labirinto aquático e acesso restritivo à comida. Além disso, estes ensaios também podem informar sobre efeitos tóxicos centrais.

Este conjunto de dados deverão ser suficientes para a confirmação das propriedades anticolinesterásicas, anti-inflamatórias e ambas, em cada caso, levando à possível identificação da substância-líder em cada grupo e, portanto, os candidatos mais promissores à fármacos úteis à doenças inflamatórias e à doença de Alzheimer.

Referências Bibliográficas

1. Anand, P.; Singh, B.; Singh, N. **Bioorg. Med. Chem.** 2012, v. 20, 1175–1180.
2. Moller, H.J.; Graeber, M.B. **Eur. Arch. Psych Clin. Neurosci.** 1998, v. 248, 111–22.
3. Goedert, M.; Spillatini, M.G. **Science.** 2006, v. 314, 777-81.
4. Mohamed, T. et.al. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 22 ,2012, 4707–4712.
5. Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 2003, v. 306, 821-827.
6. Samadi, A. et al. **J. Bioorg. Med. Chem.** 2011, 19, 122–133.
7. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/perguntas-e-respostas/quantas-pessoas-sofrem-de-doenca-de-alzheimer-no-mundo-e-no-brasil>> acesso em 28/03/2012.
8. Disponível em <<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2012/04/em-50-anos-percentual-de-idosos-mais-que-dobra-no-brasil.html>> acesso em 05/11/2012.
9. Disponível em <<http://ultimosegundo.ig.com.br/mundo/bbc/2012-10-01/mundo-tera-mais-de-1-bilhao-de-idosos-em-dez-anos-diz-onu.html>> acessado em 05/11/2012
10. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/perguntas-e-respostas/qual-e-a-idade-da-maioria-das-pessoas-com-doenca-de-alzheimer>> acessado em 05/11/2012.
11. Rang, H. P. et al. **Farmacologia**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2003**, p. 564-566.
12. Felice, F. G.; Ferreira, S. T. **Cell. Mol. Neurobiol.** **2002**, 22, 545-563.

13. Glenner, G. G.; Wng, C. W. **Biochem. Biophys. Res. Commum.** 1985, v. 120, 885-890.
14. Masters, C. L. et al. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1985, v. 82, 4245-4529.
15. Kang, J. et al. **Nature.** 1987, v. 325, 733-736.
16. Selkoe, D. J. **Neuron.**1991, v. 6, 487-498.
17. Selkoe, D. J. **J. Biol. Chem.**1996, v. 271, 18295-18298.
18. Geula, C. et al. **Nat. Med.** 1998, v. 4, 827-831.
19. Lorenzo, A. yankner, B. A. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1994,v. 91, 12243-12247.
20. Pike, C. J. et al. **Neurosc.** 1993, v. 13, 1676-1687.
21. Selkoe, C. J. **Curr. Opin. Neurobiol.** 1994, v. 4, 708-716.
22. Verbeek, M. M.; Ruiten, D. J.; Wall, R. M. **Biol. Chem.** 1997, v 402, 533-537.
23. Numan, J.; Small, D. H. **FeBes Lett.** 2000, 483, 6-10.
24. Iwatsubo, T. et al. **Neuron.**1994, v. 3, 45-53.
25. Viegas, F. P. D. et al. **Rev. Virtual Quim.** 2011, v. 3 (4), 286-306
26. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/conceitos/neuropatologia>> acesso em 05/11/2012
27. Viegas Jr., C. et al. **Química Nova.** 2004, v. 27, 4, 655-660.
28. Colletier, J-P. et al. **The Embo Journal.** 2006, v. 25, 2746 – 2756.
29. Camps, P.; Muñoz-Torredo, D. **Mini Rev. Med. Chem.** 2002, 2, 11.
30. Viegas Jr., C. et al. **Mini Rev. Med. Chem.** 2005, v. 5, 915.

31. Savini, L.; et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2001, v. 11, 1779.
32. Gemma, S. et al. **J. Med. Chem.** 2006, 49, 3421.
33. Shao, D.; Zou, C.; Luo, C.; Tang, X.; Li, Y. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2004, v. 14, 4639.
34. Alcalá, M. M.; et al. **Neuropharmacol.** 2003, v. 44, 749.
35. Alonso, D. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2005, v. 13, 6588.
36. Valenti, P. et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 1997, v. 7, 2599.
37. Pang, Y. et al. **J. Biol. Chem.** 1997, v. 271, 23646.
38. Carlier, P. R. **Bioorg. Med. Chem.** 1999, v. 7, 351.
39. Badia, A. **Bioorg. Med. Chem.** 1998, v. 6, 427.
40. Carlier, P. R. et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 1999, v. 9, 2335.
41. Marco-Contelles, J. et al. **J. Med. Chem.** 2006, v. 49, 7607.
42. Camps, P. et al. **J. Med. Chem.** 2001, v. 44, 4733.
43. Rios, C. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2002, v. 10, 2077.
44. McKenna, M. T. et al. **J. Med. Chem.** 1997, v. 40, 3516.
45. Tumiatti, V. et al. **Curr. Med. Chem.** 2010, v. 17, 1825.
46. Rosini, M. et al. **J. Med. Chem.** 2005, v. 48, 360.
47. Pereira, J. D. et al. **Eur. J. Pharmacol.** 2011, v. 660, 411.
48. Samadi, A. et al. **J. Bioorg. Med. Chem.** 2011, v. 19, 122.
49. Marco-Contelles, J. **Bioorg. Med. Chem.** 2011, v. 19, 122.

50. Marco-Contelles, J. et al. **J. Med. Chem.** 2009, v. 52, 2724.
51. Marco-Contelles, J. et al. **J. Med. Chem.** 2006, v. 49, 7607.
52. Marco-Contelles, J. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2006, v. 14, 8176.
53. Camps, P. et al. **J. Med. Chem.** 2009, v. 52, 5365.
54. Camps, P. et al. **J. Med. Chem.** 2005, v. 48, 1701.
55. Dooley, M.; Lamb, H. M. **Drugs Aging.** 2000, v. 16, 199.
56. Fuentes, P. G.; Slachevsky, A. **Rev. Med. Chile.** 2005, 133, 224.
57. Emre, M. et al. **CNS Neurosci. Ther.** 2010, v. 16, 246.
58. Weinstock, M. **CNS Drugs.** 1999, v. 12, 307.
59. Neugrosch, J.; Sano, M. *Mount Sinai J. Med.* 2010, 77, 3; Camps, P.; Muñoz-Torredo, D. **Mini Rev. Med. Chem.** 2002, 2, 11.
60. Goodman, L. S.; Gilman, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11. ed., MacGraw-Hill Interamericana do Brasil: Rio de Janeiro, 2006.
61. Viegas Jr., C. et al. **Quím. Nova.** 2004, v. 27, 655.
62. Colletier, J-P. et al. **The Embo Journal.** 2006, v. 25, 2746.
63. Rocha, M. D. et al. **CNS Neurol. Dis. Drug Targ.** 2011, v. 10, 251.
64. Goldsmith, D. R.; Scott, L. J. **Drugs Aging.** 2003, v. 20, 1127.
65. Jackson, S.; Ham, R. J.; Wilkinson, D. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 2004, 58, 1.
66. Sugimoto, H. et al. **J. Pharmacol.** 2002, v. 89, 7.
67. Wilkinson, D. G. et al. **Drugs Aging.** 2004, v. 21, 453.

68. Jann, M. W.; Shirley, K. R.; Small, G. W. **Clin. Pharmacokinet.** 2002, v. 41, 719.
69. Rogers, S. L.; Friedhoff, L. T. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998, 46, 1.
70. Viegas Jr. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2005, v. 13, 4184.
71. Freitas, H. F.; Paz, O. S.; Castilho, M. S. **Quim. Nova.** 2009, v. 32, 2114.
72. Greig, N. H. et al. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 2005, v. 102, 17213.
73. Scheuner, D. et al. **Nat. Med.** 1996, v. 2, 864.
74. Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 19509.
75. Guo, J.; Hurley, M. M.; Wright, J. B.; Lushington, G. H. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5492.
76. Scheuner, D. et al. **Nat. Med.** 1996, v. 2, 864.
77. Tripathi, A.; Srivastava, U. C. **Annals of Neurosci.** 2008, 15, 106.
78. Ordentlich, A. et al. **J. Biol. Chem.** 1998, v. 273, 19509.
79. Hörnberg, A. et al. **Biochemistry.** 2005, v. 44, 1154.
81. Castro, A.; Martinez, A. **Mini Rev. Med. Chem.** 2001, v. 1, 267
82. Scheuner, D. et al. **Nat. Med.** 1996, 2, 864.
83. Geula, C. **Nat. Med.** 1998, v. 4, 827.
84. Minett, T. S. C.; Bertolucci, P. H. F. **Rev. Neuroc.** 2000, v. 8, 11.
85. Emre, M. et al. **J. Med.** 2004, 351, 2509.
86. Vasto, S.; et al. **Brain Res. Rev.** 2008, v. 58, 96-105.

87. Giunta, B. et al. **J. Inflammation**. 2008, v. 5, 51.
88. Rocha-González, H.I.; Ambriz-Tututi, M.; Granados-Soto, V. **CNS Neurosci. Ther.** 2008, v. 14, 234.
89. Heneka, M. T.; O'Banion, M. K. **J. Neuroimmunol.** 2007, 184, 69.
90. Hoozemans, J. J. et al. **Curr. Drug Targ.** 2003, 4, 461.
91. Tuppo, E. E.; Arias, H. R. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 2005, v. 37, 289.
92. Hol, P. C.; et al. **Neurosci. Res.** 1999, v. 57, 295.
93. Campos, H. C. et al. **CNS Neurol. Dis. Drug Targ.**, 2011, v. 10, 239.
94. Aisen, P. S. **Lancet Neurol.** 2002, v. 1, 279.
95. Vasto, S., et al. **Brain Res. Rev.** 2008, v. 58, 96.
96. Cavalline, A. et al. **J. Med. Chem.** 2008, v. 51, 347.
97. Bolognese, L. M.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. **Cur. Opin. Chem. Bio.** 2009, v. 12, 303-308.
98. Bolognese, L. M. et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2011, v. 21, 2655–2658.
99. Lima, L. M. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2002, v. 10, 3067-3073.
100. Silverstain, R. M.; Webster, F. X.; Klemie, D. J. **Identificação de compostos orgânicos**, 7 ed., LTC, 2006
101. Kim, S.; Oh, C. H.; Ko, J. S.; Ahn, K. H.; Kim, Y. J. **J. Org. Chem.** 1985, v. 50, 1927-1932.
102. Romeiro, N. C. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2009, v. 17, 641-652.
103. Barreiro, E. J. et al. **Eur. J. Med. Chem.** 2000, v. 35, 187-203.

104. Hansen, M. M. e Riggs, J. A. **Tet. Lett.** 1998, v. 39, 2705-2706.
105. Ellman, G. L.; Courtney, D. K.; Andres. V. Jr.; Feartherstone, R. M. **Biochem. Pharmacol.** 1961, v. 7, 88-95.
106. Castro, N. C. et al. **Eur. J. Pharmacol.** 2008, v. 580, 339–349.
107. Vilela, F. C. et al. **J. Ethnopharmacol.** 2009, v. 124, 306-310,
108. Veloso, Clarice C. et al. **Rev. Bras. Farmacog.** 2012, v. 22, 162-168.
109. Viegas Jr, C. **Chem Pharmaceutical Bulletin**, 2008, v. 56, 407-412.
110. Perrim, D. D.; Armarengo W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals.** 3 ed., Pergamon Press, 1988.
111. Maia, R. C.; et al.; **Bioorg. Med. Chem.** 2009, v. 17, 6517.
112. Orlandi, L. et al. **J. Ethnopharmacol**, 2011, v. 137, 1469-1476.
113. Santos, A. R. S.; Calixto, **J. B. Neuropept.** 1997, v. 31(4), 381-389.