

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

KRIS SIMONE TRANCHES DIAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS HÍBRIDOS FERULOIL-
DONEPEZIL, PLANEJADOS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

**ALFENAS/MG
2016**

KRIS SIMONE TRANCHES DIAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS HÍBRIDOS FERULOIL-
DONEPEZIL, PLANEJADOS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Junior.

**ALFENAS/MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Dias, Kris Simone Tranches.

Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos feruloil – donepezil planejados como candidatos a fármacos multialvo para doença de Alzheimer / Kris Simone Tranches Dias. -- Alfenas/MG, 2016.

150 f.

Orientador: Cláudio Viegas Junior.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

Bibliografia.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Curcumina. 3. Química – Síntese.
I. Viegas Junior, Cláudio. II. Título.

CDD-547

KRIS SIMONE TRANCHES DIAS

"Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos feruloil-donepezil, planejados como candidatos a fármacos para doença de Alzheimer".

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 26/08/2016

Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro
Instituição: Universidade de Brasília - UNB

Assinatura: 

Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga
Instituição: Universidade Federal do Rio de
Janeiro - UFRJ

Assinatura: 

Dedico esta Tese aos meus pais Edésio e Fátima, pelo amor incondicional e por me possibilitar aproveitar as oportunidades que apareceram em minha caminhada. À minha irmã Amanda pelo amor, incentivo e por estar sempre presente. Ao meu cunhado Marcos pela amizade e carinho e aos meus sobrinhos Pedro e Vitor que enchem nossas vidas de luz e alegria! Ao meu marido Saulo, meu amor e companheiro de todas as horas, por me dar força, coragem e acreditar na minha capacidade.

Vocês são, e sempre serão o motivo pelo qual desejo ser o meu melhor!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida e por colocar pessoas tão incríveis no meu caminho!

Ao meu orientador, Claudio Viegas Jr., toda minha admiração por ser um excelente professor, pesquisador e orientador. Obrigada por sua dedicação, que o faz por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para dar suporte aos seus alunos. E, principalmente, obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim, sua orientação, apoio e amizade ao longo desses anos me fizeram crescer como pessoa e como profissional. Muito obrigada!

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM), Matheus, Bruno, Vanessa, Sarah, Carla, Amanda, Cindy, Nathália, Rafael, Suellen, Letícia e Arielle, pela amizade e parceria. As minhas queridas amigas Carolina e Flávia, pela amizade e apoio. Certamente sem vocês o caminho seria mais duro e tortuoso!

À minha querida amiga Vanessa, pela ajuda nos ensaios antioxidante e quelante de metais.

Aos alunos de iniciação científica Cynthia e Thiago pelo grande auxílio na parte experimental.

Ao prof. Andrea Tarozzi da Universidade de Bologna pela valiosa contribuição neste trabalho e pela realização dos ensaios de neuroproteção.

Ao prof. Newton e profa. Gilda da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelas contribuições e realização dos ensaios de inibição da AChE.

À profa. Clarice pela realização dos ensaios anti-inflamatório *in vivo* e pela ajuda na interpretação e discussão dos resultados, ao prof. Alexandre Giusti-Paiva pela disponibilização do Laboratório de Fisiologia.

Ao prof. Marcelo Lourenço pela realização dos ensaios de inibição de COX e LOX.

À pós-doutoranda Isabella Alvim Guedes e seu orientador Dr. Laurent Emmanuel Dardenne do Laboratório Nacional de Computação Científica pelos resultados de *docking* molecular.

Ao prof. Márcio Coelho e seu aluno de mestrado Ivo de Souza da Universidade Federal de Minas Gerais pela ajuda e disponibilização do laboratório para realização do ensaio de edema de pata.

À aluna de doutorado Ariadne pela ajuda na determinação de pureza no HPLC e aos professores Marcelo e Gerusa pela disponibilização do laboratório.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições que certamente serão dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Alfenas.

A Universidade Federal de Alfenas e ao Instituto de Química pela redução da jornada de trabalho que foram essenciais para a conclusão do doutorado.

Aos órgãos financiadores FAPEMIG, CAPES, CNPq e INCT-INOVAR.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Com o aumento da expectativa média de vida, a Doença de Alzheimer (DA) tem atraído grande atenção, por ser uma doença neurodegenerativa grave, progressiva, incapacitante e, até o momento, sem cura. A multifatorialidade observada na patogênese da DA dificulta a elaboração de novas abordagens farmacológicas que atuem sobre alvos específicos, visto que há grande diversidade de fatores influenciando a instalação e a progressão da doença. Assim, o presente trabalho descreve a síntese de derivados híbridos feruloil-donepezil com potencial para agir em diversos alvos envolvidos na DA e atuar como inibidor da acetilcolinesterase (AChE), antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor. Os híbridos foram avaliados no ensaio de inibição de AChE pelo método de Ellman e os 3 compostos mais ativos da série, PQM-130 (**27a**), PQM-127 (**27b**) e PQM-132 (**27c**), foram selecionados para avaliação nos ensaios antioxidante direto e indireto, quelação de metais, anti-inflamatório e de neuroproteção. Com bases nos dados dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, o composto PQM-130 (**27a**) foi identificado como um promissor candidato a fármaco multialvo para o tratamento da DA pois apresentou CI_{50} de 0,46 μ M no ensaio de inibição da AChE. Dados *in silico* demonstraram que PQM-130 (**27a**) apresenta conformação similar a observada no complexo AChE-donepezil, conservando várias interações chave. Estudos cinéticos revelaram que PQM-130 (**27a**) é um inibidor não competitivo, interagindo com a região PAS da enzima com K_i de 1,04 μ M. Além de ser um potente inibidor de AChE, o composto **PQM-130 (27a)** também age como antioxidante indireto em células neuronais através da ativação de mecanismos de proteção endógenos como o sistema Nrf2 e a ativação de genes que codificam a transcrição de citoprotetores. PQM-130 (**27a**) também foi capaz de neutralizar a formação de EROs induzida pela reação de Fenton com Cu^{2+} ou Fe^{2+} e H_2O_2 em células neuronais SH-SH5Y, sugerindo a capacidade deste composto em quelar esses biometais. Além disso, os resultados *in vitro* em células neuronais sugerem que PQM-130 (**27a**) apresenta efeito neuroprotetor contra efeitos tardios, como a morte neuronal induzida pelo oligômero $A\beta_{1-42}$. Os ensaios anti-inflamatório *in vivo* revelaram significativa atividade anti-inflamatória do composto PQM-130 (**27a**), sendo capaz de reduzir o processo inflamatório induzido em diferentes modelos animais, com fortes evidências de que seu mecanismo de ação envolva a inibição da expressão de COX e LOX.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Donepezil. Curcumina. Ácido ferúlico. Hibridação molecular. Multialvo

ABSTRACT

With the increase in average life expectancy, Alzheimer's disease (AD) has attracted great attention, once it is a severe, progressive, disabling and incurable neurodegenerative disease. Nowadays, the available treatment for AD are limited and unable to interrupt the course of the disease. The multifactorial pathogenesis of AD hampers the development of new pharmacological approaches that aim specific targets, since there is great diversity of factors influencing the initiation and progression of the disease. The present work describes the synthesis of feruloyl-donepezil hybrids with potential to act in the therapeutic targets involved in AD and acts as acetylcholinesterase (AChE), antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective. The hybrids were evaluated in the inhibition assay of AChE through Ellman's method, and the 3 most active compounds of the series, PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) and PQM-132 (**27c**), were selected for evaluation in direct and indirect antioxidant assays, metal chelating, anti-inflammatory and neuroprotective agents. Based on data from *in vitro* and *in vivo*, the PQM-130 (**27a**) was identified as promising candidate for multitarget drug to treatment of DA, because had IC₅₀ of 0.46 μ M in the assay of AchE. *In silico* data showed that this compound keeps a quite similar conformation than that observed for the AChE-donepezil docked complex, retaining several key interactions. Kinetic studies revealed that PQM-130 (**27a**) is a non-competitive AChE inhibitor, interacting with the PAS region of the enzyme with a K_i of 1.04 μ M. Besides being a potent AChE inhibitor, PQM-130 (**27a**) also displayed a high indirect antioxidant activity in neuronal SH-SY5Y cells by activation of endogenous neuroprotective mechanisms such as Nrf2 and transcription of cytoprotective gene. PQM-130 (**27a**) was also able to counteract the ROS formation elicited by Fenton reaction with either Cu²⁺ or Fe²⁺ and H₂O₂ in neuronal SH-SH5Y cells, suggesting the ability of the compound to chelate these biometals. Furthermore, *in vitro* results with neuronal cells suggested that PQM-130 (**27a**) has neuroprotective effects against the late neuronal death elicited by A β ₁₋₄₂ oligomers. Inflammatory *in vivo* assays revealed a significant anti-inflammatory activity for PQM-130 (**27a**), being capable to reduce the inflammatory process induced in different animal models, with evidences that its mechanism of action involve inhibition of COX and LOX expression.

Key words: Alzheimer's disease. Donepezil. Curcumin. Ferulic acid. Molecular hybridization, Multi-target

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Esquema do processo sináptico e da liberação de ACh.....	18
Figura 02 -	Fármacos comerciais para tratamento da DA: tacrina (Cognex®, 1), donepezil (Aricept®, 2), rivastigmina (Exelon®, 3), galantamina (Reminyl®, 4) e memantina (Namea®, 5).....	20
Figura 03 -	Base molecular da hipótese da cascata amiloide.....	21
Figura 04 -	Desestabilização dos microtúbulos e formação de novos neurofibrilares.....	22
Figura 05 -	Sinalização do processo inflamatório neuronal por ativação das células microgliais e astrócitos de corrente do depósito de β A.....	23
Figura 06 -	Estrutura química dos compostos bioativos naturais curcumina (6) e ácido ferúlico (7).....	24
Figura 07 -	Aspectos conceituais da abordagem “um alvo-um fármaco” e polifarmacologia.....	26
Figura 08 -	Série de híbridos tacrina-ebesen (8) e o derivado (10) mais ativo da série.....	28
Figura 09 -	Planejamento do candidato a fármaco multialvo ASS234 (12).....	29
Figura 10 -	Planejamento estrutural dos compostos 15-17, híbridos moleculares da rivastigmina (3), resveratrol (13) e pterostilbeno (14).....	30
Figura 11 -	Híbrido molecular (20) estruturalmente planejado a partir da berberina (18) e curcumina (6).....	31
Figura 12 -	Planejamento estrutural da nova série de híbridos feruloil-donepezil (24).....	32
Figura 13 -	Reação de aminação redutiva entre 4-piperidinometanol (21) e aldeídos funcionalizados (22).....	33
Figura 14 -	Mecanismo proposto para a reação de aminação redutiva entre 4-piperidino metanol e aldeídos funcionalizados utilizando NaBH_3CN	34
Figura 15 -	Espectroscopia no infravermelho do intermediário aminobenzílico 23a	35
Figura 16 -	Interações conformacionais de sistemas piperidínicos com influência diferenciada no ambiente químico de átomos de hidrogênio em posições axiais e equatoriais.....	36
Figura 17 -	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 23a	37
Figura 18 -	Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (75 MHz, CDCl_3) do composto 23a	38
Figura 19 -	Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl_3) do composto 23a	39
Figura 20 -	Reação de proteção da hidroxila fenólica do ácido ferúlico em presença de $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ e $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$	41
Figura 21 -	Espectro no infravermelho do ácido ferúlico acetilado (24).....	42
Figura 22 -	Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$) do ácido ferúlico acetilado (24).....	43
Figura 23 -	Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$) do ácido ferúlico acetilado (24).....	44
Figura 24 -	Reação de formação do cloreto do ácido ferúlico acetilado (25).....	44
Figura 25 -	Reação de esterificação entre cloreto do ácido ferúlico acetilado (25) e intermediários aminobenzílicos (26a-g).....	45
Figura 26 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) do composto PQM-130 acetilado (26a).....	45

Figura 27 -	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz) do composto PQM-130 acetilado (26a).....	46
Figura 28 -	Reação de desproteção seletiva da hidroxila fenólica em presença de Mg/MeOH.....	46
Figura 29 -	Reação de obtenção do cloreto de ácido ferúlico (25).....	47
Figura 30 -	Reação de esterificação entre cloreto do ácido ferúlico (25) ou cloreto de ácido isoferúlico (29) e intermediários aminobenzílicos (23a-g).....	47
Figura 31 -	Espectro no infravermelho do composto PQM-130 (27a).....	48
Figura 32 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) do composto PQM-130 (27a).....	49
Figura 33 -	Espectro de RMN ¹³ C e DEPT-135 (CDCl ₃ , 75MHz) do composto PQM-130 (27a).....	50
Figura 34 -	Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto PQM-130 (27a).....	51
Figura 35 -	Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto PQM-130 (27a).....	51
Figura 36 -	Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto PQM-130 (27a).....	52
Figura 37 -	Espectro de massa de alta resolução do composto PQM-130 (27a).....	53
Figura 38 -	Formação do ânion de coloração amarela do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzoato.....	55
Figura 39 -	Triagem do perfil de inibição de EeAChE da série de híbridos feruloil-donepezil.....	56
Figura 40 -	Curva de inibição e mecanismo de inibição do composto PQM-130 (27a).....	57
Figura 41 -	Resultado do docking para PQM-130 (27a) na enzima livre (azul claro) e acetilada (amarelo), superposição com resultados experimentais do modo de ligação do donepezil (verde transparente).....	58
Figura 42 -	Resultado do docking para PQM-131 (27b) na enzima livre (azul claro) e acetilada (amarela), superposição com resultados experimentais do modo de ligação do donepezil (verde transparente).....	59
Figura 43 -	Resultado do docking para PQM-132 (27c) na enzima livre (azul claro) e acetilada (amarela), superposição com resultados experimentais do modo de ligação do donepezil (verde transparente).....	60
Figura 44 -	Compostos PQM-130 (27a), PQM-131 (27b), PQM-132 (27c) e ácido ferúlico na inibição de formação de EROS induzidas por H ₂ O ₂ em células neuronais SH-SY5Y.....	64
Figura 45 -	UV- Espectro de absorvância de PQM-130 (27a) na presença e ausência de ZnCl ₂ , FeSO ₄ , FeCl ₃ e CuSO ₄	65
Figura 46 -	Capacidade do composto PQM-130 (27a) em neutralizar a formação de EROS induzidos por FeSO ₄ /H ₂ O ₂ ou CuSO ₄ /H ₂ O ₂ em células neuronais SH-SY5Y.....	66
Figura 47 -	Atividade do composto PQM-130 (27a) no aumento dos níveis de GSH e Nrf2 nuclear, bem como efeito antioxidante indireto em células neuronais SH-SY5Y.....	68
Figura 48 -	Atividade de inibição do composto PQM-130 (27a) na formação de EROS e morte neuronal induzida por oligômeros em células neuronais SH-SY5Y.....	69
Figura 49 -	Efeito dos compostos híbridos feruloil-donepezil PQM-130 (27a), PQM-131 (27b) e PQM-132 (27c) no ensaio de formalina em camundongos.....	71
Figura 50 -	Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) (100 µmol/kg, p.o.), no ensaio de campo aberto.....	72

Figura 51 - Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) (100 μ mol/kg, p.o.), dexametasona (10 mg/kg, p.o.) ou veículo (salina + DMSO 2%) no recrutamento de leucócitos induzidos por LPS para a cavidade peritoneal de camundongos.....	73
Figura 52 - Efeitos dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) a 100 μ mol/kg (p.o.) ou indometacina (100 μ mol/kg p.o.) na hipernocicepção induzida por injeção intraplantar de carragenina (100 μ g/pata) até 3 ^a hora (Figura A) e até 7 ^a hora (Figura B).....	75
Figura 53 - Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) a 100 μ mol/kg (p.o.), indometacina (100 μ mol/kg, p.o.) ou veículo (salina + DMSO 2%) no edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina (400 μ g/pata).....	76
Figura 54 - Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) na atividade de COX-1, COX-2 e 5-LOX em camundongos tratados com (CG).....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Diferentes condições reacionais para a esterificação entre os intermediários N-benzil-piperidínicos (23) e ácido ferúlico (18).....	40
Tabela 02 -	Fórmula geral e substituintes dos compostos híbridos feruloil-donepezil (27a-g e 28a-g).....	54
Tabela 03 -	Parâmetros da potência e seletividade para inibição da colinesterase (μM).....	57
Tabela 04 -	Scores de docking dos compostos PQM-130 (27a), PQM-131 (27b), PQM-132 (27c) e donepezil (referência) fornecida por docking com o glide no modo de precisão extra.....	61
Tabela 05 -	Atividade sequestrante de DPPH, neurotoxicidade e efeito antioxidante direto em células neuronais dos híbridos feruloil-donepezil.....	62

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AChE	- Acetilcolinesterase
AChE	- Acetilcolina
ATR	- <i>Attenuated total reflectance</i>
BuChE	- Butirilcolinesterase
βA	- Beta-amiloide
COX	- Ciclooxygenase
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CC	- Cromatografia em coluna
CI₅₀	- Concentração inibitória em 50%
DA	- Doença de Alzheimer
DCC	- Dicicloexilcarbodiimida
4-DMAP	- 4-Dimetilaminopiridina
DMF	- Dimetilformamida
DTNB	- 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzóico
DPPH	- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DCFH-	- Diacetato de 2,7 diclorofluoresceína
DA	- Doença de Alzheimer
ERA	- Elemento de resposta antioxidante
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
EDAC	- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
NFKβ	- Fator nuclear Kappa beta
GSH	- Glutathiona
HOBT	- 1-Hidróxibenzotriazol
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HMBC	- <i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
IV	- Infravermelho
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
Keap1	- <i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i>

LPS	- Lipopolissacarídeo
LOX	- Lipooxigenase
MAO	- Monoaminoxidase
MCB	- Monoclorobimano
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Nrf2	- Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2
NMDAR	- Receptor de N-metil-D-aspartato
nAChR	- Receptor nicotínico de acetilcolina
PAS	- Sítio aniônico periférico
P.F.	- Ponto de fusão
ppm	- Partes por milhão
PPA	- Proteína precursora amiloide
SNC	- Sistema nervoso central
TMS	- Tetrametilsilano
UAF	- Unidade arbitrária de fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	DOENÇA DE ALZHEIMER: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, FISIOPATOLOGIA E TERAPIA ATUAL.....	18
2.2	O POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CURCUMINA E DO ÁCIDO FERÚLICO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	24
2.3	FÁRMACOS MULTIALVO: RECENTES AVANÇOS DE UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER...	25
3	OBJETIVOS.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DA SÉRIE-ALVO DE HÍBRIDOS FERULOIL-DONEPEZIL (24)	33
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA IN VITRO E ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR.....	54
4.2.1	Avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.....	55
4.2.2	Estudos de docking molecular.....	58
4.3	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE NEUROPROTEÇÃO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DIRETA E INDIRETA E QUELAÇÃO DE METAIS.....	61
4.3.1	Avaliação da atividade antioxidante direta in vitro e efeitos neurotóxicos.....	61
4.3.2	Propriedades quelantes de metais pró-oxidantes.....	64
4.3.3	Avaliação da atividade antioxidante indireta <i>in vitro</i>	66
4.3.4	Avaliação in vitro da neuroproteção.....	68
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VIVO DOS COMPOSTOS DOS COMPOSTOS PQM-130 (27a), PQM-131 (27b) E PQM-132 (27c)	70
4.4.1	Hiperalgisia induzida por formalina.....	70

4.4.2	Ensaio de campo aberto.....	71
4.4.3	Ensaio de peritonite induzida por LPS.....	72
4.4.4	Ensaio de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina – Teste de Von Frey	74
4.4.5	Ensaio de edema de pata em camundongos induzido por carragenina.....	75
4.4.6	Avaliação in vivo da expressão de COX-1, COX-2 e 5-LOX.....	77
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	78
5.1	PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS DERIVADOS AMINOBENZÍLICOS.....	78
5.2	REAÇÃO DE PROTEÇÃO DA HIDROXILA FENÓLICA DO ÁCIDO FERÚLICO.....	82
5.2.1	Dados de caracterização do composto 28.....	83
5.3	PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS 29, 32 E 33.....	83
5.4	PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ÉSTERES ACETILADOS 30a-g.....	84
5.4.1	Dados de caracterização dos compostos 30a-g.....	84
5.5	REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA HIDROXILA FENÓLICA DOS ÉSTERES ACETILADOS.....	89
5.6	OBTENÇÃO DA SÉRIE DE HÍBRIDOS FERULOIL-DONEPEZIL 27A-G e 28A-G.....	89
5.6.1	Dados de caracterização dos ésteres híbridos feruloil-donepezil 27a-g e 28a-g	89
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA- ENSAIO DE ELLMAN.....	100
5.8	DOCKING MOLECULAR.....	100
5.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	101
5.10	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DE BIOMETALIS Cu^{+2} , Fe^{+2} e Zn^{+2}	102
5.11	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA.....	102
5.11.1	Culturas celulares.....	102
5.11.2	Determinação da neurotoxicidade induzida pelos compostos.....	103

5.11.3	Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por H ₂ O ₂ e metais.....	103
5.11.4	Determinação dos níveis intracelular de glutathiona.....	104
5.11.5	Ensaio de extração nuclear e atividade de ligação a Nrf2.....	104
5.11.6	Preparação do oligômero A β ₁₋₄₂	105
5.11.7	Determinação intracelular da formação de EROs por oligômeros de A β ₁₋₄₂	105
5.11.8	Determinação da exocitose de MTT-formazana induzida por oligômeros A β ₁₋₄₂	105
5.11.9	Determinação da morte neuronal induzida por oligômeros A β ₁₋₄₂	106
5.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	106
5.12.1	Animais.....	106
5.12.2	Ensaio de hipernociceção induzida por formalina.....	107
5.12.3	Ensaio de campo aberto.....	108
5.12.4	Ensaio de hipernociceção mecânica induzida por carragenina.....	108
5.12.5	Ensaio de peritonite induzida por LPS.....	109
5.12.6	Edema de pata em camundongos induzido por carragenina.....	109
5.12.7	Ensaio de expressão de COX-1, COX-2 e 5-LOX.....	110
5.13	ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	110
6	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	112
	APÊNDICE	121

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa descrita pela primeira vez em 1906 pelo médico alemão Alois Alzheimer (MOLLER, H. J; GRAEBER, 1998). A DA é caracterizada pela destruição irreversível dos neurônios colinérgicos o que leva ao comprometimento da memória e da capacidade cognitiva, evoluindo para um quadro de depressão e incapacitação do indivíduo de realizar tarefas do cotidiano (VIEGAS et al., 2011).

A DA é uma doença de causa multifatorial, provavelmente, resultante da combinação de vários fatores de risco, incluindo idade, fatores genéticos e fatores ambientais. A idade é seu principal fator de risco, com incidência de 0,7 % entre indivíduos com 60-65 anos de idade e de cerca de 40% nos grupos etários acima dos 90 anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Nas últimas décadas, observa-se fenômeno de envelhecimento populacional no Brasil, com alterações marcantes na pirâmide etária. Os dados mais recentes indicam que em 2060 a população brasileira com faixa etária acima de 60 anos deve alcançar a marca de 73,5 milhões (IBGE, 2015). Em 2015 foram estimados cerca de 46,8 milhões de casos da doença no mundo, o que tende a aumentar para cerca de 131,5 milhões de casos em 2050 (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2015). Diante deste cenário, a DA está entre as doenças de maior preocupação dos sistemas públicos de saúde e que acarreta grande impacto socioeconômico, uma vez que o paciente perde gradualmente suas funções motoras e psicológicas evoluindo para invalidez (SLOANE et al., 2002).

A etiologia da DA ainda não foi totalmente esclarecida, mas muito progresso tem sido observado no sentido de desvendar os mecanismos da neurodegeneração, dada a importância que essa doença vem tomando a nível mundial. Algumas características histológicas e bioquímicas são aceitas como relacionadas intrinsecamente com a doença e várias hipóteses são lançadas para determinar a fisiopatologia da doença. Com vários eventos patológicos interligados que contribuem para o avanço da doença, durante os últimos anos, as pesquisas na busca de novos fármacos para o tratamento da DA têm sido direcionadas ao caráter multifatorial da doença.

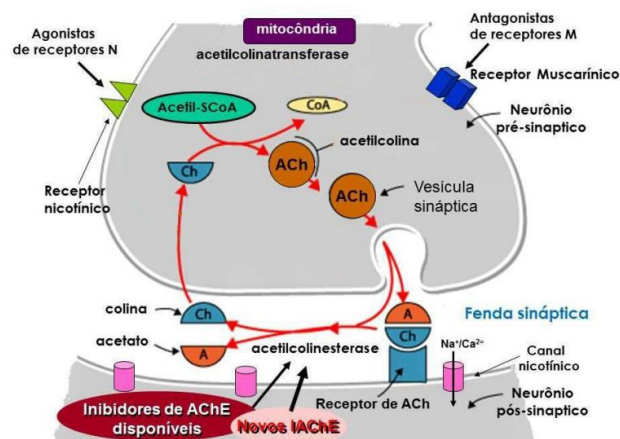
2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir serão apresentados alguns dados relacionados ao estado da arte da pesquisa em novos fármacos multialvo para a DA, bem como dados de fisiopatologia da doença e tratamento.

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, FISIOPATOLOGIA E TERAPIA ATUAL

A principal estratégia responsável pelo desenvolvimento da maioria dos fármacos disponíveis é conhecida como “Hipótese Colinérgica”. A acetilcolinesterase (AChE) age na catálise da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Esse neurotransmissor é encontrado no cérebro, onde está envolvido nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição. Pacientes com DA apresentam diminuição dos níveis de ACh no processo sináptico, diminuindo a transmissão colinérgica (Figura 01) (VIEGAS et al., 2005).

Figura 01 - Esquema do processo sináptico e da liberação de ACh

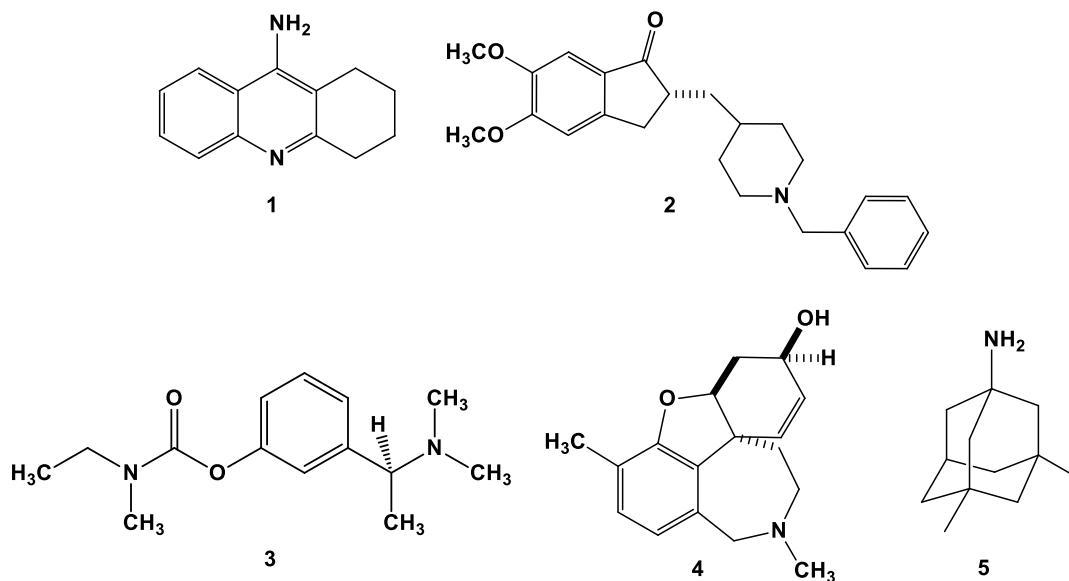


Fonte: adaptado de VIEGAS et al., 2011

Os fármacos disponíveis atualmente, além de vários candidatos à fármacos em estágios pré-clínicos, foram inspirados nessa hipótese e visam retardar ou amenizar o déficit colinérgico pela inibição parcial da atividade da AChE. Entretanto, estas substâncias restringem-se ao restabelecimento da função colinérgica, aliviando os sintomas da doença, retardando sua evolução e garantindo uma melhor qualidade de vida ao paciente, sem, contudo, oferecer a cura efetiva (ANAND; SINGH, 2013; KOLYKHALOV et al., 2011). Os tratamentos atuais da DA aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) focados no aumento da transmissão colinérgica no cérebro pela inibição das colinesterases são os fármacos tacrina (1), donepezil (2), rivastigmina (3) e galantamina (4) (Figura 02).

A tacrina (1) foi o primeiro fármaco sintético aprovado nos Estados Unidos, pelo FDA, para o tratamento da DA. Após o seu primeiro relato, vários estudos controlados foram realizados com a finalidade de verificar sua real eficácia e segurança no tratamento. Entretanto, após pouco tempo de comercialização, teve seu uso restrito em alguns países devido à sua toxicidade hepática e baixa biodisponibilidade, sendo recomendada apenas para pacientes que não respondem ou toleram os demais medicamentos disponíveis. O donepezil (2) foi o segundo fármaco aprovado nos Estados Unidos para o tratamento da DA. É um inibidor da AChE ligando-se reversivelmente e de forma não-competitiva à enzima. O uso desse medicamento resulta em melhoras significativas do desempenho cognitivo na DA leve e moderada, em comparação com a tacrina (1). A rivastigmina (3) é atualmente um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da DA, apresentando maior eficácia quanto ao aumento dos níveis cerebrais de ACh. É um inibidor reversível de colinesterases, aprovado pelo FDA em 2006. A galantamina (4), alcaloide aprovado pelo FDA em 2001, apresenta mecanismo de inibição duplo no sistema colinérgico, inibindo a AChE e modulando alostéricamente a atividade do receptor nicotínico (nAChR) (SAMADI et al., 2010), (ANAND; SINGH, 2013), (GROSSBERG, 2003). A memantina (5) (Figura 02) é o único fármaco que compõe o arsenal terapêutico contra a DA que não atua como inibidor de colinesterases. Esta nova classe, aprovada pelo FDA em 2003, atua como antagonista de receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDAR) e tem sido indicada para o tratamento da doença em grau leve a moderado. Na DA, o excesso de glutamato (um importante neurotransmissor relacionado ao aprendizado e memória) liberado em células danificadas, causa um alto influxo de cálcio nos neurônios via ativação NMDAR, o que resulta em excitotoxicidade e morte neuronal (MOLINUEVO; LLADÓ; RAMI, 2005; OLIVARES et al., 2012).

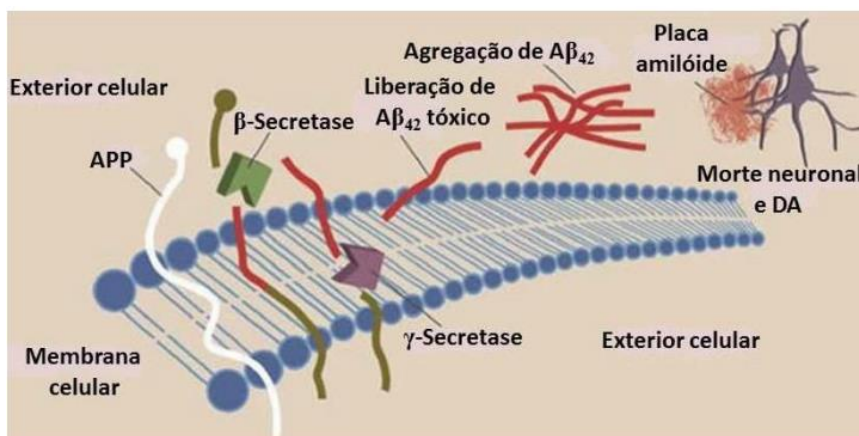
Figura 02 - Fármacos comerciais para tratamento da DA: tacrina (Cognex[®], **1**), donepezil (Aricept[®], **2**), rivastigmina (Exelon[®], **3**), galantamina (Reminyl[®], **4**) e memantina (Nameada[®], **5**)



Fonte: do autor

Outra premissa terapêutica, surgida em 1992, baseia-se na "Hipótese Amiloide". Esta hipótese considera como evento inicial da patogênese da DA a deposição de peptídeos β -amiloide (β A), que se acumulam e depositam na forma de placas amiloides e que estariam relacionadas à instalação e avanço da doença, na morte celular e no processo neuroinflamatório da DA. O peptídeo β A é produzido pela endoproteólise da proteína precursora amiloide (PPA). A PPA é uma glicoproteína transmembrana expressa no cérebro e no sistema nervoso central (SNC) responsável pela regulação da função sináptica e da atividade neuronal. Esta proteína pode ser processada proteoliticamente por duas vias: a via não-amilogênica (via α) e a via amilogênica (via β) através da atividade enzimática das proteases α , β e γ -secretases (Figura 03) (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; KARRAN; MERCKEN; DE STROOPER, 2011)

Figura 03 - Base molecular da hipótese da cascata amiloide.

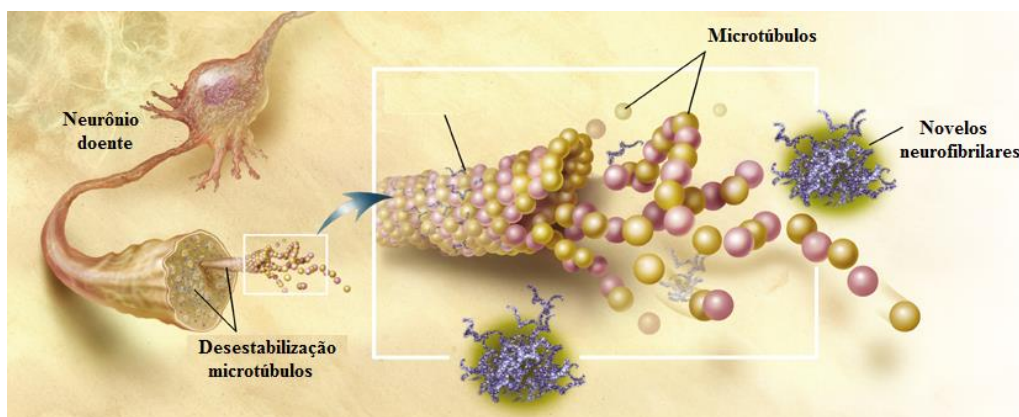


Fonte: VIEGAS et al., 2011

O processamento pela via amilogênica ocorre através da ação sequencial de duas proteases, β e γ -secretase, resultando na secreção em fragmentos amiloides de 40 a 42 aminoácidos, que são insolúveis e possuem a capacidade de se autoagregar formando as placas senis. Na via não amilogênica, a clivagem da PPA ocorre na região central do peptídeo β A pela α -secretase e os fragmentos formados são solúveis. O peptídeo β A₄₂ é a forma mais neurotóxica com maior tendência a acumular-se no cérebro e sofrer agregação, formação de fibrilas e deposição sob a forma de placas amiloides. O processo de formação de placas amiloides dá origem a uma resposta inflamatória, formação de radicais livres, estresse oxidativo e consequentes danos nos processos neuronais (FERRARI et al., 2003; MCGEER; MCGEER, 2013).

Outra proteína que está aumentada durante o processo neurodegenerativo da DA, e que também forma agregados insolúveis, é a proteína tau. Essa proteína é um importante componente do citoesqueleto neuronal encontrado nos axônios e responsável pela estabilização dos microtúbulos. Essa função de estabilização é regulada por processo de fosforilação e desfosforilação. Na forma hiperfosforilada, a proteína tau separa-se dos microtúbulos causando sua desestabilização, bem como a deposição de fragmentos proteicos no corpo celular e dentritos dos neurônios na forma de emaranhados neurofibrilares (Figura 04). A desagregação dos microtúbulos e desorganização do transporte axonal levam a importantes alterações neuronais, culminando no processo de perda de função e morte neuronal (WISCHIK; HARRINGTON; STOREY, 2014).

Figura 04 - Desestabilização dos microtúbulos e formação de novos neurofibrilares

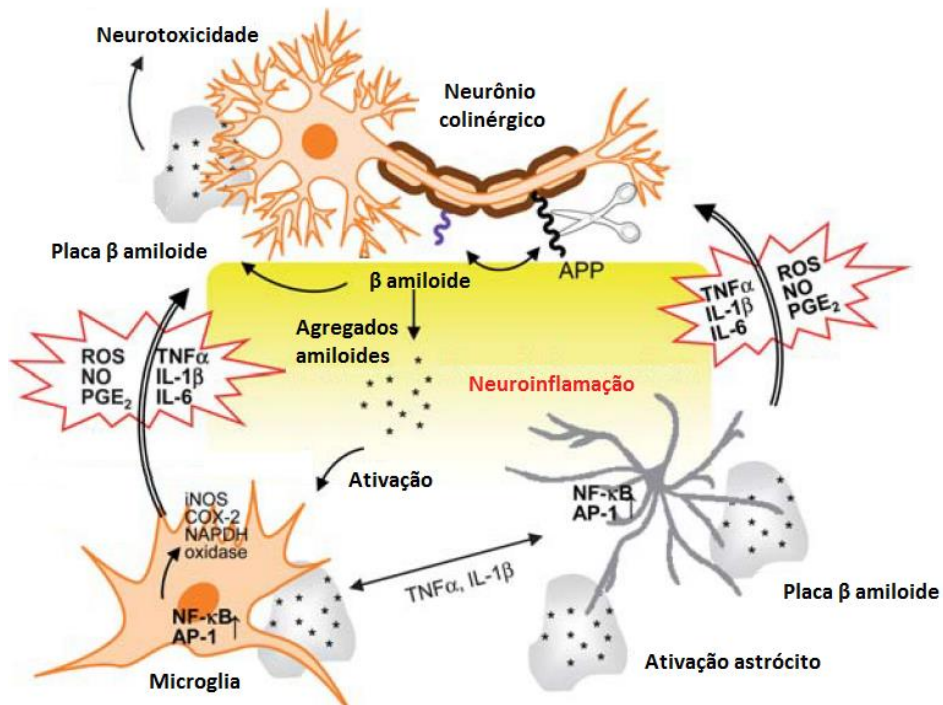


Fonte: adaptado de CRISTOFARI et al., 2016

Tanto a deposição do peptídeo β A quanto a formação dos emaranhados neurofibrilares observados na DA estão relacionados ao aumento da produção de radicais livres e ao estresse oxidativo difundido pelo cérebro. O estresse oxidativo na DA se manifesta através da presença de proteínas oxidadas, de peroxidação lipídica e da formação de espécies tóxicas, tais como peróxidos, álcoois, aldeídos, cetonas e de modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial. O peptídeo β A pode também causar neurotoxicidade por meio da produção direta destas espécies reativas, por interação com Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Estes biometais induzem o aumento do estresse oxidativo e, de fato, observa-se que o peróxido de hidrogênio é cataliticamente convertido em radical hidroxila de alta toxicidade, pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. O envolvimento de biometais na patogênese da DA vem cada vez mais sendo estudado, tanto devido à sua capacidade de causar estresse oxidativo, quanto à sua participação na secreção, no transporte e no depósito do peptídeo β A, dentre outros (AYTON; LEI; BUSH, 2015; ROBERT et al., 2015; SASTRE; RITCHIE; HAJJI, 2015)

Outro dano neuronal decisivo no processo neurodegenerativo é a neuroinflamação. Estudos evidenciam que a deposição do peptídeo β A participa da instalação do processo neuroinflamatório ativando a microglia, gerando resposta inflamatória e consequente liberação de citocinas inflamatórias e neurotóxicas, glutamato, indução de enzimas inflamatórias como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2), com consequente aumento de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Figura 05). Devido às relações entre os processos inflamatórios e a DA, várias pesquisas também têm observado o uso de fármacos anti-inflamatórios como opção para o tratamento de pacientes portadores da DA (PAN; LAI; HO, 2010; TUPPO; ARIAS, 2005).

Figura 05 - Sinalização do processo inflamatório neuronal por ativação das células microgliais e astrócitos decorrente do depósito de β A.



Fonte: adaptado de PAN; LAI; HO, 2010

Considerando as evidências que indicam o envolvimento de estresse oxidativo e de processos inflamatórios na neurodegeneração envolvida na DA, abordagens terapêuticas alternativas têm sido propostas envolvendo o uso de compostos com ação antioxidante e neuroprotetora, como o α -tocoferol (vitamina E) (GRUNDMAN, 2000), vitamina C (HEO; LEE, 2004) ou extrato de *Ginkgo biloba*, (GOLD; LARRY; WENK, 2002) na terapia da DA.

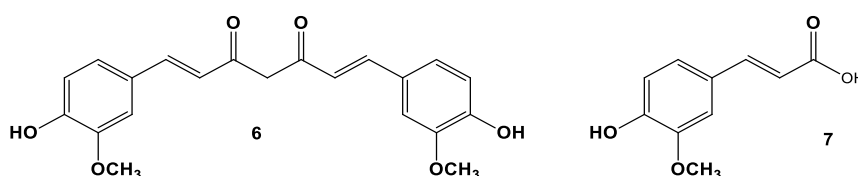
2.2 O POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CURCUMINA E DO ÁCIDO FERÚLICO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Muitos compostos com propriedades neuroprotetoras têm sido pesquisados a fim de se investigar suas capacidades em afetar o desenvolvimento do processo neurodegenerativo. Produtos naturais representam uma grande fonte de matéria-prima ou de inspiração para o planejamento e desenvolvimento de fármacos (DA ROCHA et al., 2011; SILVA et al., 2014). Dentre os principais compostos com propriedades neuroprotetoras investigados para o tratamento da DA, está a curcumina (6). Esta substância se destaca por seu efeito neuroprotetor, antioxidante, antiamilogênico e anti-inflamatório. A curcumina (6) é um composto naturalmente encontrado em rizomas de *Curcuma longa*, utilizado como corante e tempero em alimentos (MISHRA; PALANIVELU, 2008).

Estudos *in vivo*, em modelos animais transgênicos com DA, demonstram vários efeitos benéficos da curcumina (6). Esses estudos sugerem que a curcumina é capaz de reverter o processo de formação das placas amiloides, retardar o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo β A e também inibir a ativação de NFK β (fator nuclear Kappa β). Esse fator pertence à classe de fatores de transcrição gênica que regulam a expressão de múltiplos genes envolvidos na resposta inflamatória como citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e moléculas de adesão.

A estrutura química da curcumina (6) consiste em um dímero no qual está inserida a subunidade guaiacol também encontrada no ácido ferúlico (7) (Figura 6). O ácido ferúlico (7) é um composto bioativo isolado pela primeira vez em *Ferula foetida* que apresenta potente atividade antioxidante e anti-inflamatória. Estudos demonstram que o ácido ferúlico (7) também pode atenuar significativamente a morte celular neuronal causada por espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger o cérebro da neurotoxicidade do peptídeo β A (PAN et al, 2016)

Figura 06 - Estrutura química dos compostos bioativos naturais curcumina (6) e ácido ferúlico (7)



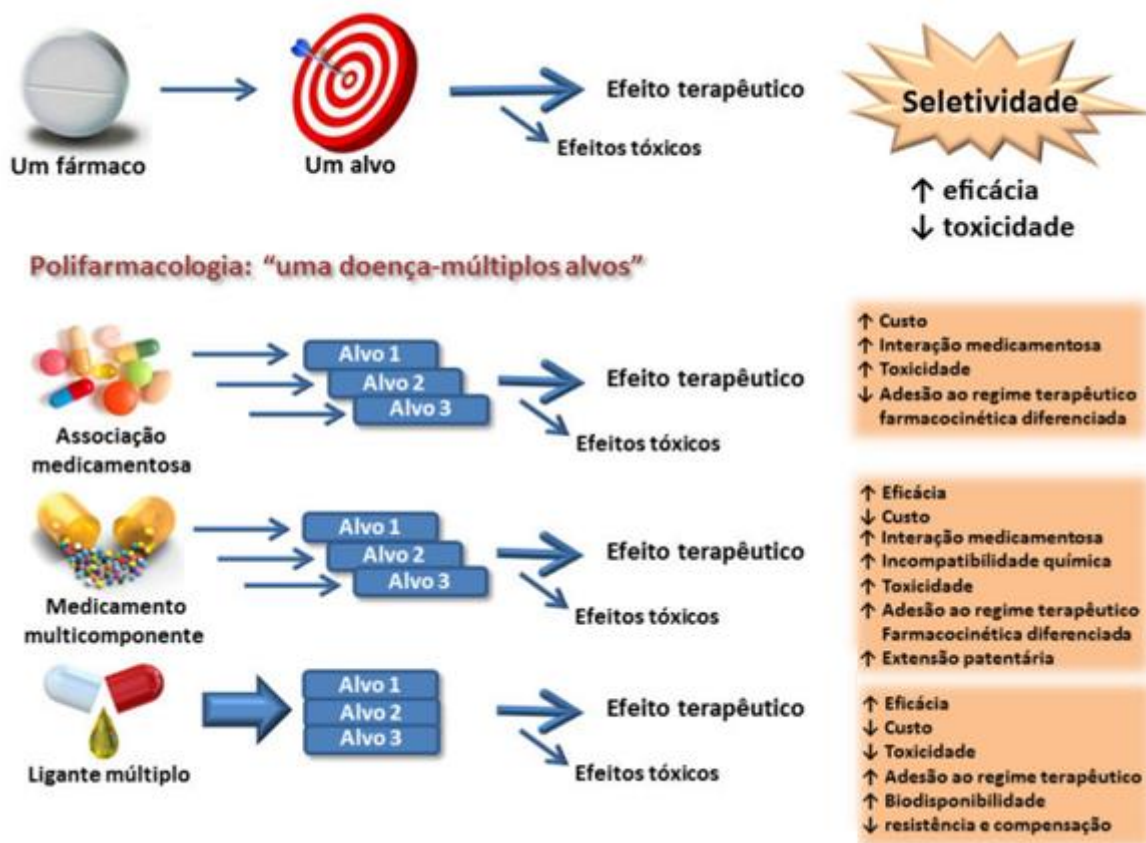
Fonte: do autor

2.3 FÁRMACOS MULTIALVO: RECENTES AVANÇOS DE UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

As estratégias de desenvolvimento de novos fármacos durante muitos anos eram focadas na identificação de moléculas potentes e seletivas, capazes de exercer seu efeito terapêutico em um único alvo molecular específico, diretamente relacionado à patogênese da doença a ser tratada. Essa estratégia está baseada no paradigma "uma doença-um alvo-um fármaco" que é associado ao desenvolvimento de entidades químicas capazes de modular determinada função biológica, atuando sobre um alvo único que, certamente, estaria envolvido na alteração fisiológica. Porém, certas doenças com fisiopatologia complexa, como as patologias neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatórias, câncer, obesidade, ansiedade e depressão, tendem ser resistentes à modulação seletiva de um único alvo, o que torna ineficaz as monoterapias usuais. A justificativa está na natureza multifatorial destas doenças, cujos processos fisiológicos possuem vias de sinalização compensatórias alternativas, que permitem a existência de caminhos paralelos, ativados quando enzimas ou determinadas vias bioquímicas são inibidas (DIAS et al., 2015; DIAS; VIEGAS, 2014).

A necessidade de contornar essas limitações e a busca por melhores resultados na prática clínica, levaram ao desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica chamada de polifarmacologia (Figura 07) (DIAS et al., 2015). Passa-se a considerar para o tratamento de doenças com características multifatoriais, abordagens clínicas como o uso de associação medicamentosa ou combinações de mais de um princípio ativo em uma mesma formulação, a exemplo do tratamento da SIDA (Síndrome da imunodeficiência adquirida), tuberculose, entre outras doenças infecciosas, alguns tipos de câncer, hipertensão, dor e inflamação crônica. No entanto, a administração de múltiplos fármacos em combinação ou associação pode acarretar efeitos deletérios, devido a perfis farmacocinéticos distintos e a possibilidade de interação medicamentosa, além de outros problemas como custo, adesão reduzida e abandono do tratamento pelo paciente (BARBOSA, 2015; BOLOGNESI, 2013)

Figura 07 - Aspectos conceituais da abordagem “um alvo-um fármaco” e polifarmacologia.

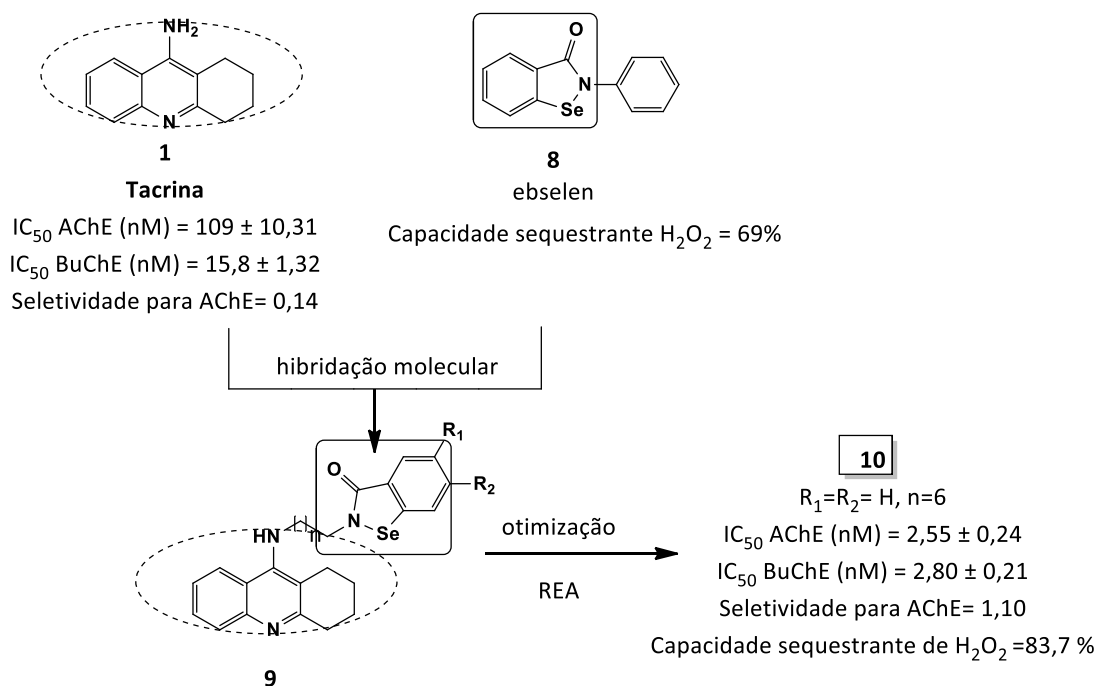


Fonte: DIAS et al., 2015

Diante desses fatos, surge uma nova abordagem que prevê a administração de um único fármaco capaz de ser reconhecido por mais de um biorreceptor, atuando de modo simultâneo em multialvos, conexos à rede bioquímica responsável pela fisiopatologia de determinada doença multifatorial. Essa estratégia, conhecida como fármacos multialvo-dirigidos (do inglês *Multi-Target-Directed Ligands*), teve início em 2005 com a publicação de Morphy e colaboradores (MORPHY; RANKOVIC, 2005) e tem sido largamente difundida na comunidade científica, mudando a concepção de planejamentos de novos fármacos para doenças neurodegenerativas como na DA. Vários compostos planejados como fármacos multialvo para a DA têm apresentado resultados positivos. Uma ferramenta que tem sido muito utilizada no planejamento desses compostos e que tem levado a descoberta de inúmeros ligantes, com propriedades múltiplas envolvidas na DA é a hibridação molecular entre subunidades estruturais de diferentes moléculas bioativas. Como por exemplo, fármacos como donepezil, tacrina e rivastigmina têm sido utilizados como modelos estruturais para hibridação molecular com compostos bioativos sintéticos ou naturais, na tentativa de se obter ligantes capazes de modular simultaneamente a atividade de mais de um alvo envolvido na DA.

Baseados nessa estratégia, Mao e colaboradores (MAO et al., 2013) utilizaram a estrutura da tacrina (**1**) como modelo para o planejamento de uma nova série de compostos híbridos (**8**) baseados na estrutura do ebselen (**8**, Figura 08). O ebselen é um composto organoselênio conhecido por sua atividade redutora e apresentar ações antioxidantes e anti-inflamatórias. Diante desses dados, foi sintetizada e avaliada uma série de compostos planejados a partir da hibridação do núcleo farmacofórico do ebselen com a estrutura da tacrina conectados por espaçadores alquílicos (Figura 08). A avaliação biológica revelou que todos os compostos inibiram a atividade da AChE *in vitro*, na faixa nanomolar, sendo que alguns compostos foram mais potentes e mais seletivos para AChE do que a tacrina (**1**). O composto **10** (Figura 08), mais ativo da série, apresentou perfil adequado para fármaco multialvo, apresentando comportamento inibitório dual da AChE, capaz de bloquear a autoagregação e a agregação induzida do peptídeo β A, além de apresentar efeitos antagonistas aos receptores NMDA e agir como mediador do estresse oxidativo cerebral. O composto **10** foi submetido a ensaio de hepatotoxicidade em células humanas, cujos resultados demonstraram que em maiores concentrações o composto **10** exibiu maior viabilidade celular quando comparado com a tacrina. Esses resultados demonstram que além de apresentar perfil de ação múltiplo, o composto **10** supera os compostos utilizados como modelo no planejamento da série de híbridos, sendo um inibidor de AChE e BuChE mais potente que a tacrina, além de atuar como antioxidante mais potente que o ebselen.

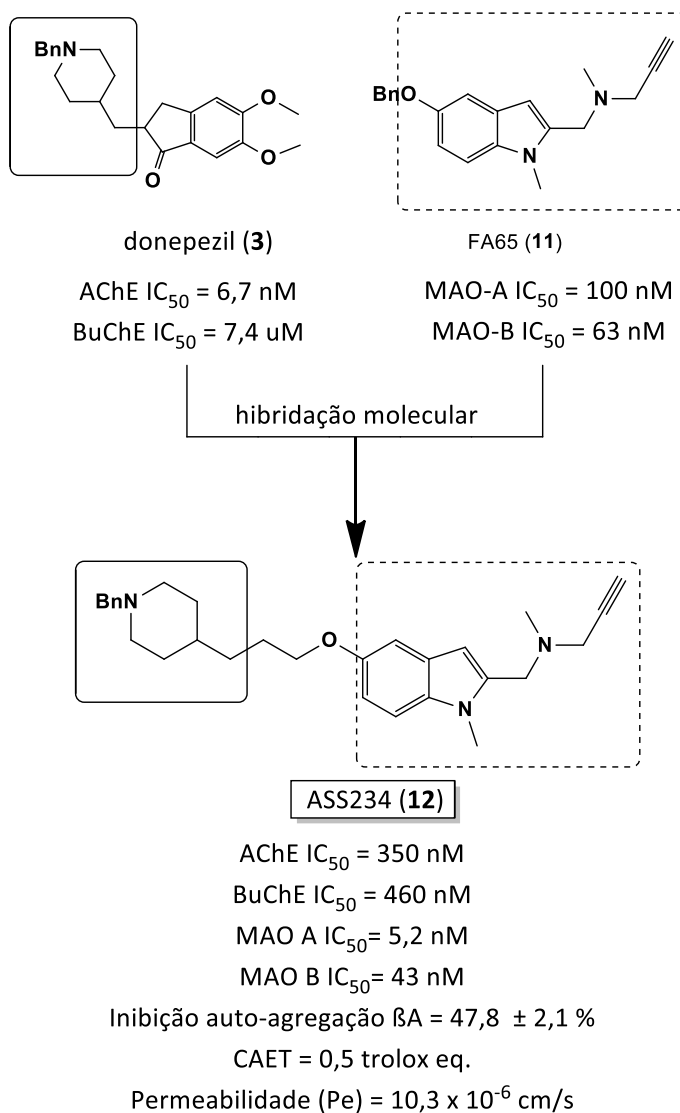
Figura 08 - Série de híbridos tacrina-ebesen (**8**) e o derivado (**10**) mais ativo da série



Fonte: do autor

O padrão estrutural do donepezil (**2**) também tem sido extensamente utilizado na construção de novos híbridos moleculares com propriedades múltiplas para o tratamento da DA. Um exemplo é o composto ASS234 (**12**) descrito por Bolea e colaboradores (BOLEA et al., 2013) (Figura 09). Este composto foi planejado por hibridação do núcleo benzilpiperidina do donepezil com o núcleo indolil-propargilamino do composto FA65 (**11**), um potente inibidor de monoaminoxidase A e B (MAO A e B) e com capacidade neuroprotetora (SAMADI et al., 2010). Diversos trabalhos relatam o perfil múltiplo de ASS234, capaz de inibir as enzimas AChE, MAO-A e B, além de interferir no processo de agregação do peptídeo β A. Em trabalho mais recente foi investigado seu efeito *in vitro* na formação dos oligômeros de β A, na mediação da toxicidade induzida pela β A, na capacidade antioxidante, além de avaliar a permeabilidade cerebral, afim de verificar sua capacidade em atravessar a barreira hematoencefálica. Os resultados demonstraram que o composto **12** protege as células de neuroblastos contra a toxicidade mediada por β A, além de inibir o sítio periférico da AChE, acarretando na inibição da autoagregação de β A. Também foi evidenciada sua alta permeabilidade cerebral, atingindo facilmente o SNC, podendo ser, assim, um bom candidato para o tratamento de doenças neurodegenerativas (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2014)

Figura 09 - Planejamento do candidato a fármaco multialvo ASS234 (**12**)

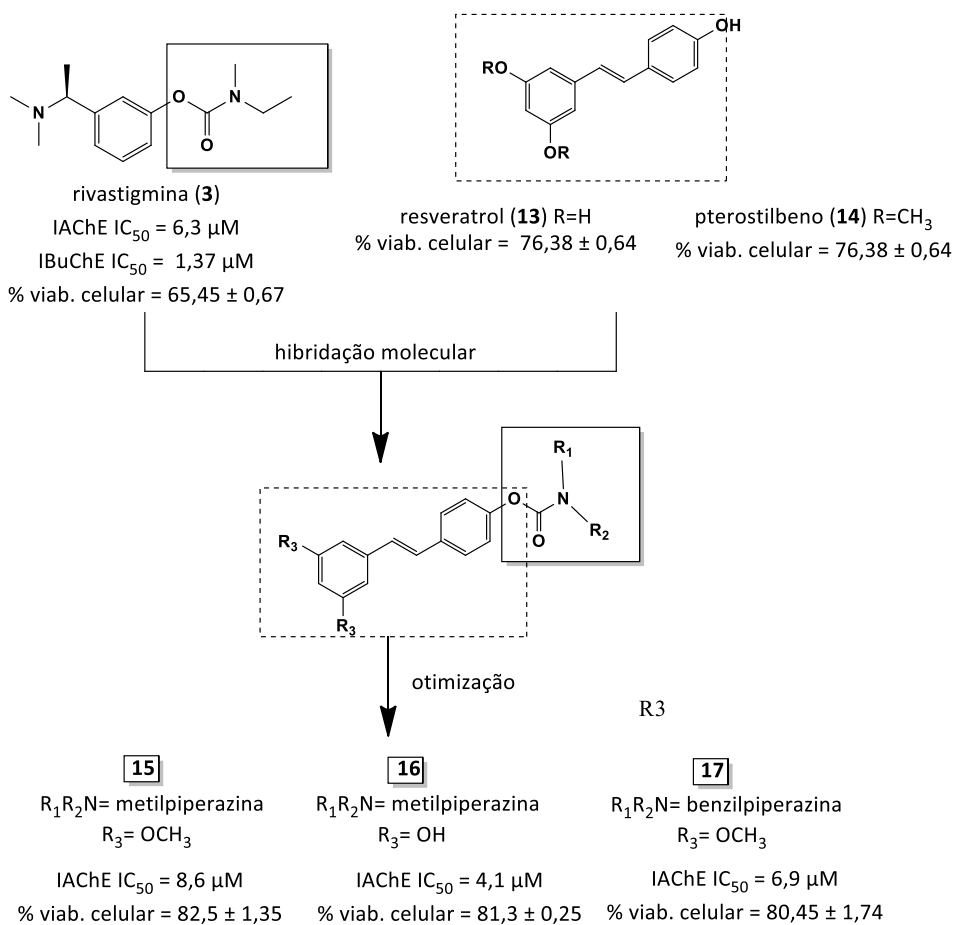


Fonte: do autor

Os produtos naturais são ótimas fontes de inspiração para a construção de novos padrões moleculares promissores no tratamento de doenças neurodegenerativas. Como por exemplo, o resveratrol (**13**) e pterostilbeno (**14**), metabólitos secundários de plantas que apresentam potentes propriedades antioxidante, anti-inflamatória e de neuroproteção, e que têm sido utilizados como modelos estruturais no planejamento de compostos com ação múltipla. Yuan e colaboradores planejaram uma série de derivados do resveratrol (**13**) e do pterostilbeno (**14**), substituídos por um grupamento carbamoíla, reconhecida como subunidade farmacofórica na rivastigmina (**3**, Figura 10). A avaliação desta nova série de híbridos moleculares, revelou as

substâncias **15-17** como as mais ativas da série, sendo **15** e **16** com atividade inibitória moderada e mais seletivos para AChE que a rivastigmina e **17** como um potencial inibidor não seletivo de AChE e BuChE, porém com efeito neuroprotetor (LI; WANG; KONG, 2014).

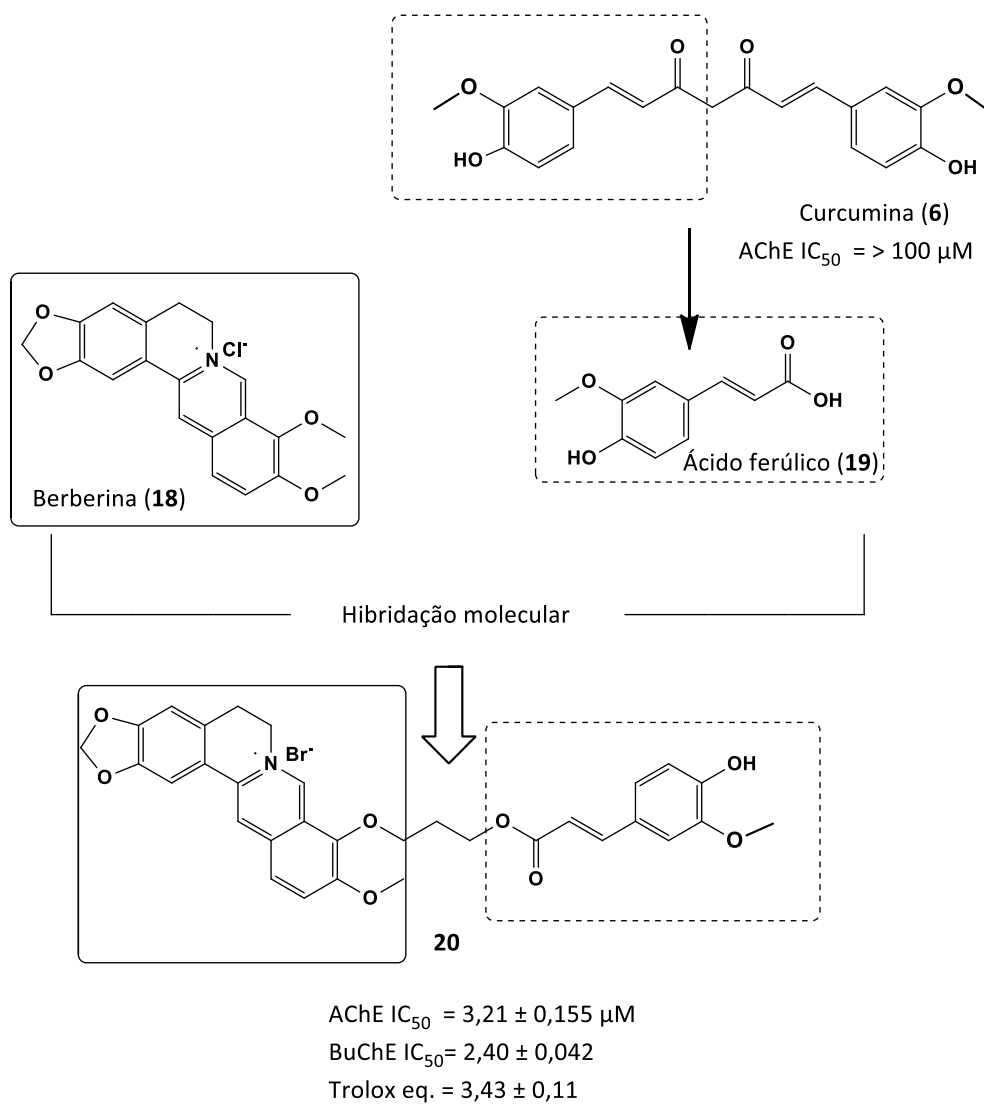
Figura 10 - Planejamento estrutural dos compostos **15-17**, híbridos moleculares da rivastigmina (**3**), resveratrol (**13**) e pterostilbeno (**14**)



Fonte: do autor

Outro exemplo é a curcumina (**6**), descrita em vários trabalhos por sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antiagregante βA. Todas essas características são críticas na patogênese da DA, o que justifica seu uso em estudos que buscam terapêuticas alternativas para o tratamento dessa demência. Jiang e colaboradores (JIANG et al., 2011) utilizaram os compostos naturais curcumina (**6**) e berberina (**17**) como modelos estruturais para gerar novos análogos com propriedades neuroprotetoras e inibitórias de AChE e BuChE (Figura 11). Os compostos sintetizados apresentaram perfil de ação múltipla.

Figura 11 - Híbrido molecular (**20**) estruturalmente planejado a partir da berberina (**18**) e curcumina (**6**)

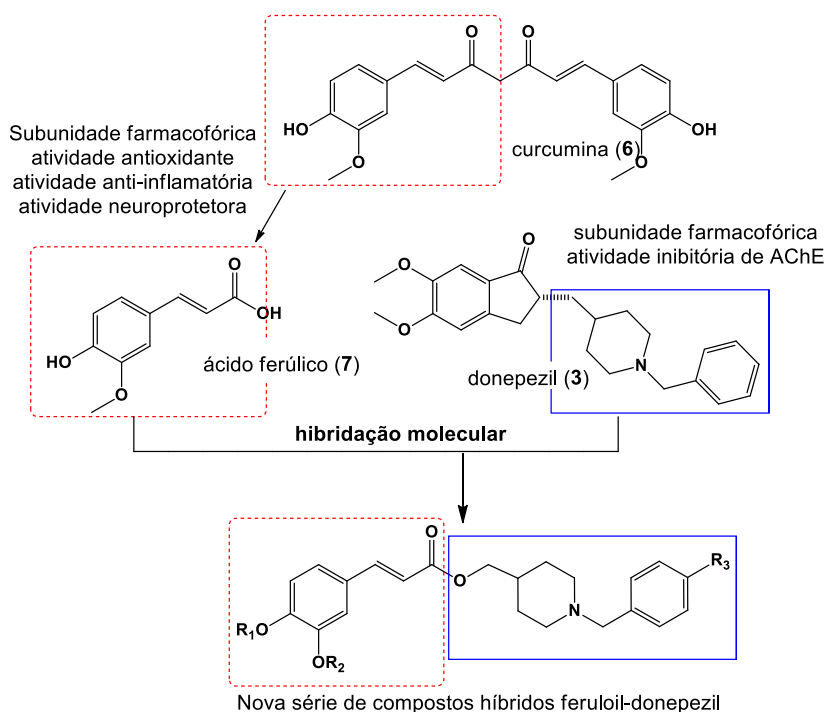


Fonte: do autor

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos de ação múltipla, com propriedades anticolinesterásica, anti-inflamatória, neuroprotetora e antioxidante, baseados na estrutura do fármaco donepezil (**3**) e na subunidade feruloil da curcumina (**6**) (Figura 12).

Figura 12 - Planejamento estrutural da nova série de híbridos feruloil-donepezil (**24**)



Fonte: do autor

Mais especificamente objetiva-se:

- Sintetizar série de compostos baseados nas estruturas do donepezil e na subunidade feruloil da curcumina planejados por hibridação molecular,
- Identificar e caracterizar a série sintetizada,
- Avaliar *in vitro* as atividades antioxidante, anticolinesterásica e neuroprotetora,
- Avaliar *in vivo* a atividade anti-inflamatória.

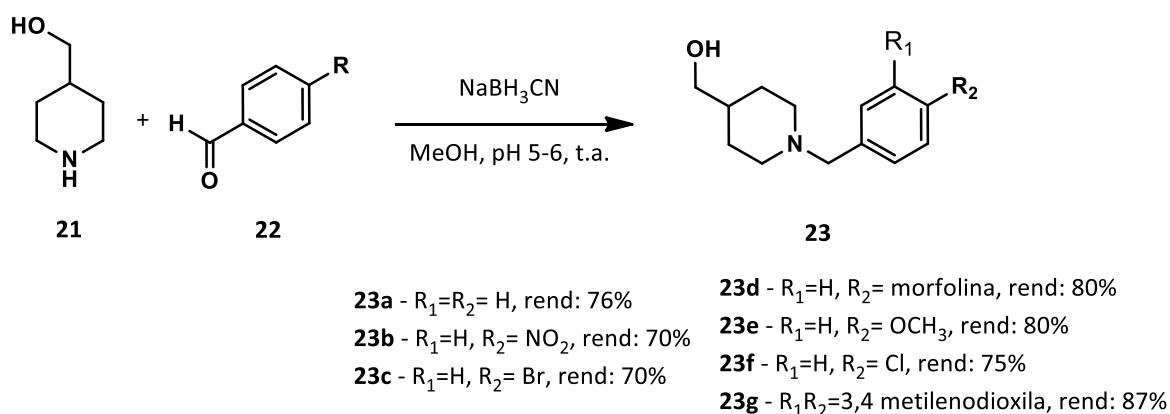
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos e discutidos os resultados obtidos no trabalho.

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DA SÉRIE-ALVO DE HÍBRIDOS FERULOIL-DONEPEZIL (**24**)

Com base na proposta sintética de obtenção dos compostos híbridos feruloil-donepezil, 4-piperidinometanol (**21**) e aldeídos funcionalizados (**22**) foram eleitos como material de partida para a síntese dos intermediários. Em uma primeira etapa esses reagentes foram submetidos a reação de aminação redutiva em presença de NaBH_3CN catalisada por ácido acético. (Figura 13).

Figura 13 - Reação de aminação redutiva entre 4-piperidinometanol (**21**) e aldeídos funcionalizados (**22**)

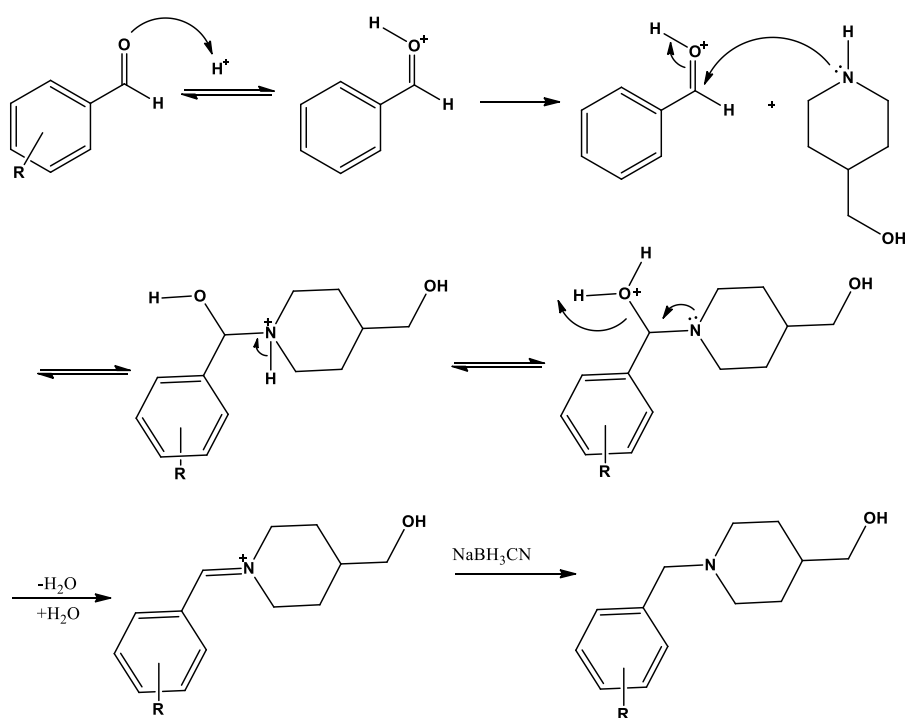


Fonte: do autor

Borch e colaboradores introduziram o cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) como agente redutor em reações de aminação redutiva em 1971. O grupo ciano é um grupo retirador de elétrons, com isso a reatividade do NaBH_3CN é menor que a reatividade do borohidreto de sódio (NaBH_4) e permite a redução seletiva da ligação dupla carbono-nitrogênio na presença de aldeído e cetona em faixa de pH 5-7. (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971).

Na reação de aminação redutiva entre o 4-piperidinometanol (**21**) e os aldeídos funcionalizados, o 4-piperidinometanol se adiciona à carbonila do benzaldeído, previamente ativada pelo meio ácido. Em seguida, ocorre transferência de próton para o grupo hidroxila, tornando-o um bom grupo abandonador durante a etapa de eliminação, que leva à formação de uma imina. Na sequência, o agente redutor transfere um hidreto para o átomo de carbono do intermediário imínico levando à obtenção do produto desejado (KIM et al., 1985). Um esquema mecanístico de formação desses compostos está representada na Figura 14.

Figura 14 - Mecanismo proposto para a reação de aminação redutiva entre 4-piperidino metanol e aldeídos funcionalizados utilizando NaBH_3CN



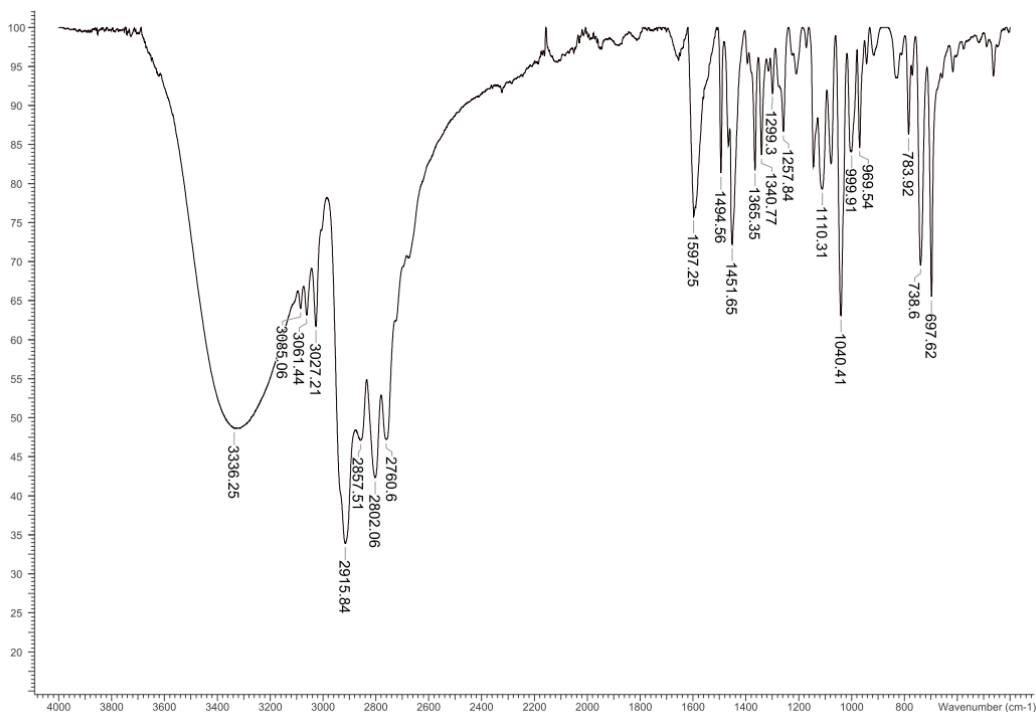
Fonte: do autor

Adaptações na metodologia da reação de aminação redutiva foram realizadas no intuito de otimizar essas reações e aumentar os rendimentos. Uma dessas adaptações foi o emprego de peneira molecular para acelerar a etapa de desidratação que conduz à imina. Com a adição de um agente desidratante o equilíbrio reacional é deslocado no sentido de formação dos produtos favorecendo o rendimento reacional.

Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em camada delgada e apresentaram rendimentos variáveis entre 70-87% dependendo do aldeído utilizado.

Dos dados obtidos pela análise espectroscópica no IV do composto **23a** (Figura 15) destaca-se a presença de uma banda larga e intensa centrada em 3336 cm^{-1} característica de estiramento de grupo OH. Observaram-se ainda bandas de estiramento de carbono sp^2 entre $3085\text{-}3027\text{ cm}^{-1}$ e de carbono sp^3 entre 2915 e 2760 cm^{-1} . Na região de 1597 e 1451 cm^{-1} notou-se a presença da banda referentes ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático, bem como em 697 e 738 cm^{-1} as bandas de deformação angular fora do plano da ligação C-H do anel aromático monossustituído. Também foram observadas as bandas em 1257 e 1040 cm^{-1} atribuídas ao estiramento de C-N do anel piperidínico e estiramento de C-O , respectivamente.

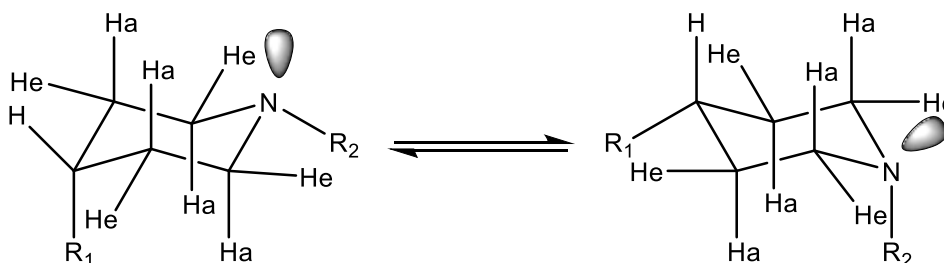
Figura 15 - Espectroscopia no infravermelho do intermediário aminobenzílico **23a**



Fonte: do autor

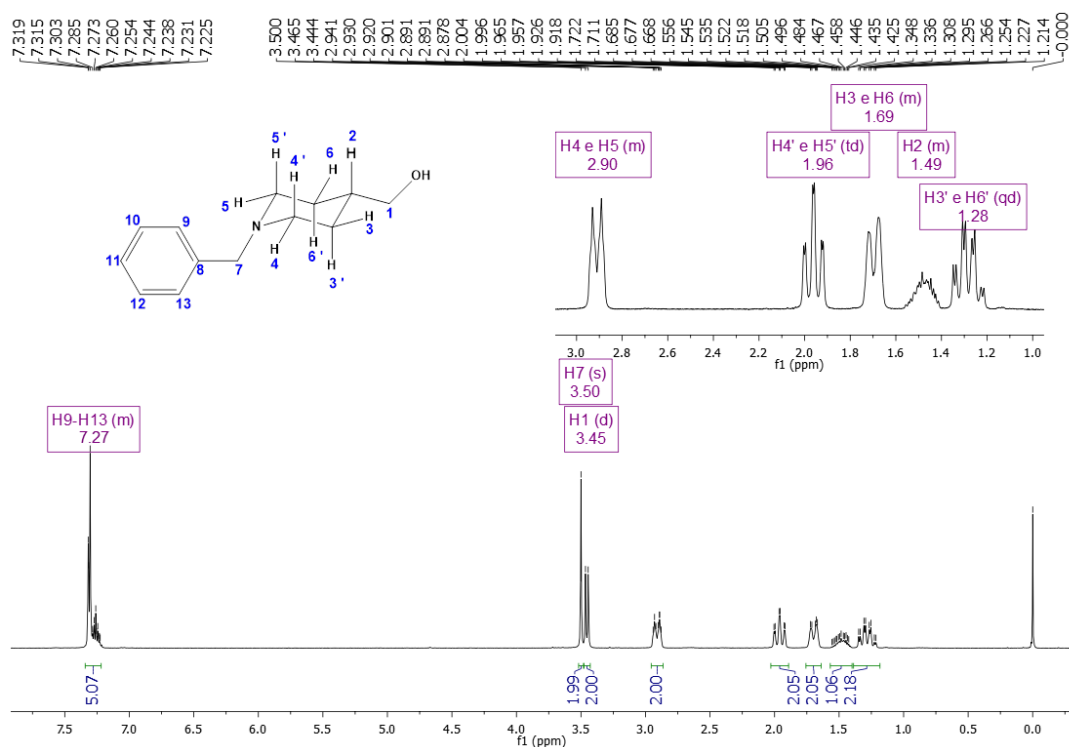
No espectro de RMN ^1H do intermediário **23a** foram observados sinais entre δ 1,21-2,94 referentes aos hidrogênios do anel piperidínico. Sistemas piperidínicos apresentam sinais característicos nos espectros de ^1H . Esses sistemas podem ser representados por duas diferentes conformações cadeira que em temperatura ambiente são convertidas rapidamente (Figura 16).

Figura 16 - Interações conformacionais de sistemas piperidínicos com influência diferenciada no ambiente químico de átomos de hidrogênio em posições axiais e equatoriais



Fonte: do autor

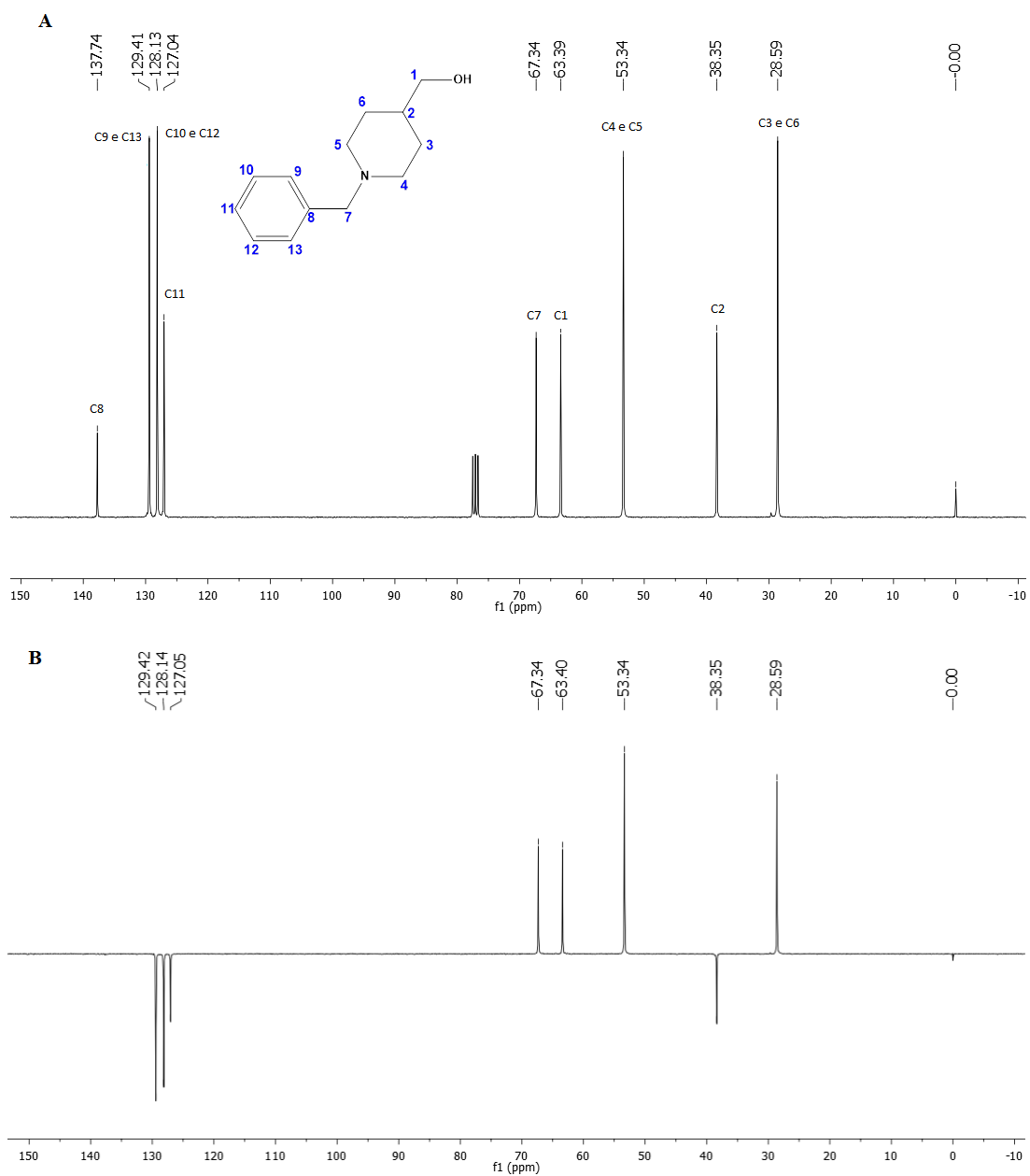
Os hidrogênios em posições axiais (Ha) e equatoriais (He) podem ser observados separadamente por RMN, devido à conformação cadeira e aos substituintes em R_1 e R_2 estarem em ambientes químicos diferentes. Os deslocamentos para campo mais baixo podem ser atribuídos aos 4 hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio. Os hidrogênios em posição equatorial são normalmente mais desblindados que os hidrogênios geminais axiais, pois estes estão em relação *syn* ao par de elétrons livre do átomo de nitrogênio (M. RUBIRALTA; DIEZ, 1991). Baseado neste fato, o multipletto em δ 2,87-2,94 foi atribuído aos hidrogênios H-5 e H-4 equatoriais e o triplo dupletto em δ 1,96 referente aos hidrogênios H-5' e H-4' axiais. O multipletto em δ 1,66-1,72 e o quadruplo dupletto em δ 1,28 foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-6 equatoriais e H-3' e H-6' axiais, respectivamente. O hidrogênio H-2 do anel piperidínico foi atribuído ao multipletto em δ 1,42-1,55. Foi também observado simpleto em δ 3,50 referente ao H-7 e um dupletto em δ 3,45 atribuído ao H-1. Os hidrogênios aromáticos foram atribuídos ao multipletto observado em δ 7,23-7,31 (Figura 17).

Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **23a**

Fonte: do autor

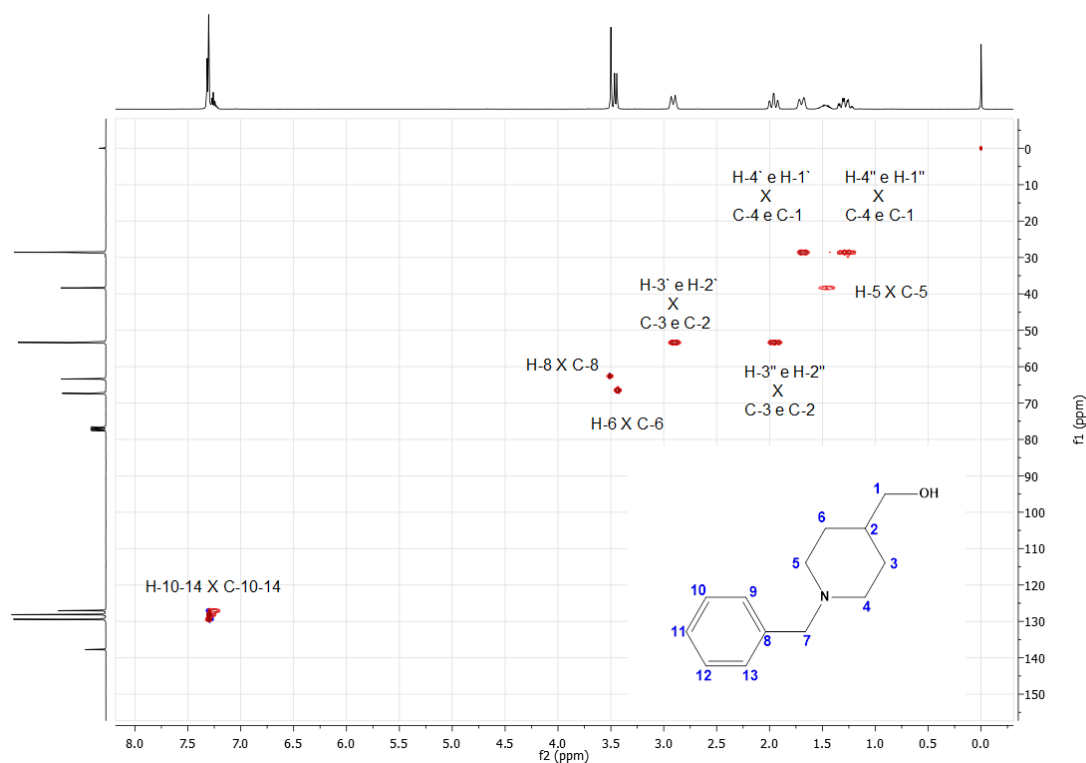
No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 18A) pode-se observar sinais referentes aos carbonos aromáticos em δ 129,4, 128,1 e 127,0 que foram atribuídos aos carbonos C-9/C-13, C-10/C-12 e C-11, respectivamente, de acordo com a proximidade com o nitrogênio do anel piperidínico que faz com que sejam mais desblindados. Em δ 67,3 e 63,4 observa-se os carbonos C-7 e C-1. Os sinais observados em δ 53,3, 38,3 e 28,6 foram atribuídos aos carbonos do anel piperidínico. O espectro de DEPT-135 (Figura 18B) confirmou parte das atribuições feitas anteriormente, com destaque para os sinais de carbonos metínicos em δ 129,4, 128,1, 127,0 e 38,3 que possuem o sinal em fase oposta.

Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (75 MHz, CDCl_3) do composto **23a**



Fonte: do autor

O mapa de contorno HSQC também foi utilizado na confirmação das atribuições dos sinais relativos à estrutura de **23a** (Figura 19)

Figura 19 - Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl₃) do composto **23a**

Fonte: do autor

Uma vez que todos os intermediários possuem padrão estrutural comum, os espectros obtidos dos compostos **23b-g** (ANEXO I) apresentaram pequenas diferenças em relação aos espectros do composto **23a**, com destaque para os sinais dos anéis aromáticos. No espectro de RMN de ¹H do composto **23b** é possível observar dois dupletos em δ 8,17 e 7,51. O sinal mais desblindado foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-10 e H-12 mais próximos do grupo NO₂ que, por ser um grupo retirador de elétrons, faz com que os hidrogênios aromáticos mais próximos estejam mais desblindados. No espectro de RMN ¹H do composto **23c**, os dupletos observados em δ 7,43 e 7,20 foram atribuídos aos hidrogênios H-10/12 e H-9/13, respectivamente. No espectro de RMN ¹H do composto **23d** além dos dupletos em δ 7,22 e 6,86 atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-10/H-12 e H-9/H-13 foram observados dois tripletos centrados em δ 3,15 e 3,86 que foram atribuídos aos hidrogênios do anel mofolina H-14/15 e H-16/17. Para os hidrogênios aromáticos do composto **23e** os dupletos dos hidrogênios aromáticos H-10/12 e H-9/13 foram observados em δ 6,84 e 7,22, respectivamente. O sinal em δ 6,84 foi atribuído aos hidrogênios H-10/12 mais próximos ao grupo substituinte metoxila. O grupo metoxila é um grupo doador de elétrons por ressonância, e age blindando os hidrogênios mais próximos a ele, que apresentam um menor deslocamento químico. Já para o composto **23f**

os sinais de ressonância dos hidrogênios aromáticos H-9/10/12/13 foram observados em um multiplete na região de δ 7,20-7,29. Sinais característicos do grupo benzodioxola foram observados no espectro de RMN ^1H do composto **23g**, um simpleto em δ 6,86 atribuído ao hidrogênio aromático H-14, outro simpleto em δ 6,74, integrando para 2H, que foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-10/H-11. O simpleto em δ 5,93, integrando para 2H, foi atribuído aos hidrogênios do anel dioxola (H-15).

Os espectros de RMN de ^{13}C dos intermediários **23b-g** também apresentaram pequenas diferenças quando comparados com o espectro do composto **23a**. Nota-se a diferença nos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos dos compostos **23b-f** que apresentam padrão de substituição 1,4. Ainda, no composto **23f**, pode-se observar dois sinais em δ 48,9 e 66,8 atribuídos aos carbonos C-14/C-17 e C-15/C-16, respectivamente. O sinal de menor deslocamento químico foi atribuído aos carbonos *orto* ao nitrogênio pois o nitrogênio doa densidade eletrônica e blinda os carbonos nessa posição. No espectro de RMN ^{13}C do composto **23g** os dois sinais mais desblindados em δ 147,6 e 146,6 foram atribuídos aos carbonos C-10 e C-11. O sinal em δ 100,9 foi atribuído ao carbono metilênico (C-15) do anel dioxola, já os carbonos aromáticos C-9, C-12 e C-13 foram atribuídos aos sinais δ 109,7, 107,8 e 122,45, respectivamente.

Dando continuidade à rota de obtenção dos compostos-alvo, os produtos da série **23** foram submetidos à reação de esterificação com o ácido ferúlico (**18**). Foram realizadas reações de esterificação utilizando diversas metodologias. Na maioria das metodologias utilizadas o produto foi formado, porém, com rendimentos insatisfatórios. As metodologias que foram empregadas estão apresentadas na Tabela 01.

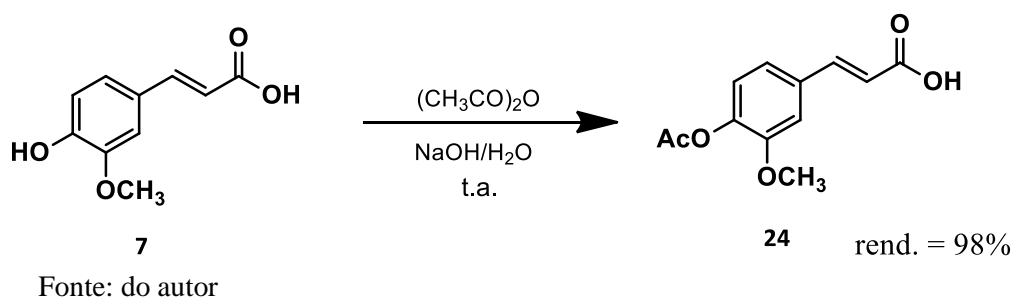
Tabela 01 - Diferentes condições reacionais para a esterificação entre os intermediários *N*-benzilpiperidínicos (**23**) e ácido ferúlico (**18**)

	CONDIÇÕES REACIONAIS	REND (%)
1	23a (1 eq.), ácido ferúlico (1 eq.), DCC (1,0 eq.), 4-DMAP (0,5 eq.), CH_2Cl_2 , t.a	20
2	23a (1 eq.), cloreto do ácido ferúlico (1 eq.), Et_3N (1,0 eq.), CH_2Cl_2 , atm. N_2 , t.a	10
3	23a (1 eq.), ácido ferúlico (1 eq.), EDC (1,2 eq.), HOBT (1,2 eq.), CH_3CN , t.a	--

Fonte: do autor

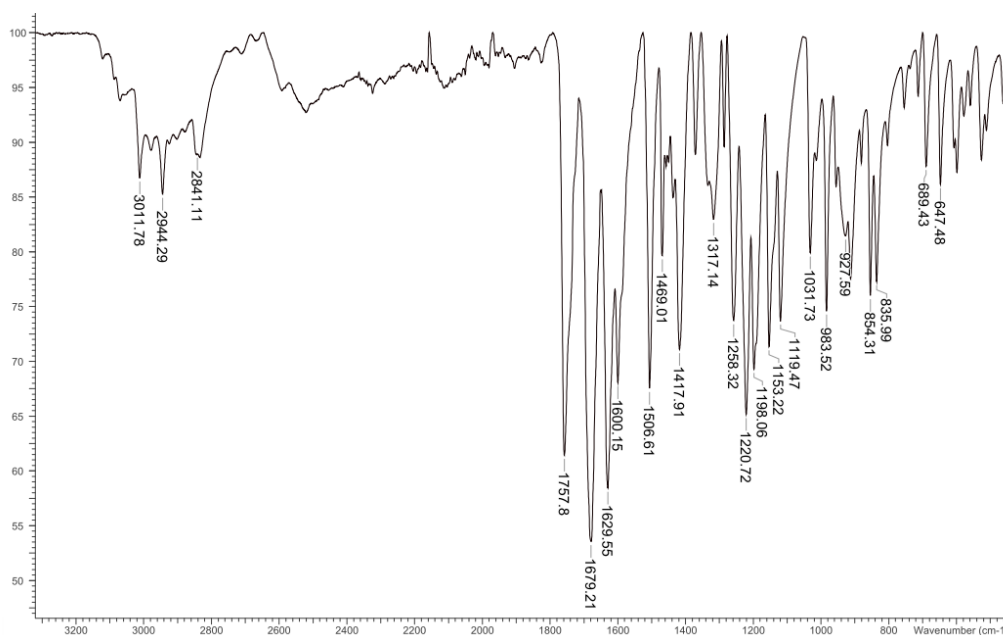
Diante desse resultado, suspeitamos que a hidroxila fenólica do substrato de partida poderia estar afetando o resultado da reação, motivo que nos levou à proteção da hidroxila fenólica do ácido ferúlico antes da etapa de esterificação. Esta proteção foi realizada com $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ em presença de NaOH em água (Figura 20). A reação se mostrou limpa e de fácil elaboração, levando ao derivado acetato desejado com rendimento médio de 98%, após purificação por recristalização em etanol. O composto **25** foi caracterizado por espectroscopia no IV e RMN de ^1H e ^{13}C , além de comparação da faixa de fusão com dados da literatura (198-201°C) (HOSODA et al., 2001).

Figura 20 - Reação de proteção da hidroxila fenólica do ácido ferúlico em presença de $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ e NaOH/ H_2O



Dos dados obtidos pela análise em espectrômetro no IV do composto **24** (Figura 21), destacam-se a presença de banda em 1679 cm^{-1} característica de vibrações de deformação axial ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster e a ausência da banda larga e intensa na região de $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ característica de OH fenólica, o que indica a formação do produto. Em 1757 cm^{-1} observa-se a banda de vibração de deformação axial de carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$), além da banda em 1417 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C-O de ácidos carboxílicos. A banda em 1629 cm^{-1} foi atribuída a ligação $\text{C}=\text{C}$ conjugada com a carbonila e as bandas em $1600\text{-}1469\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas as ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático.

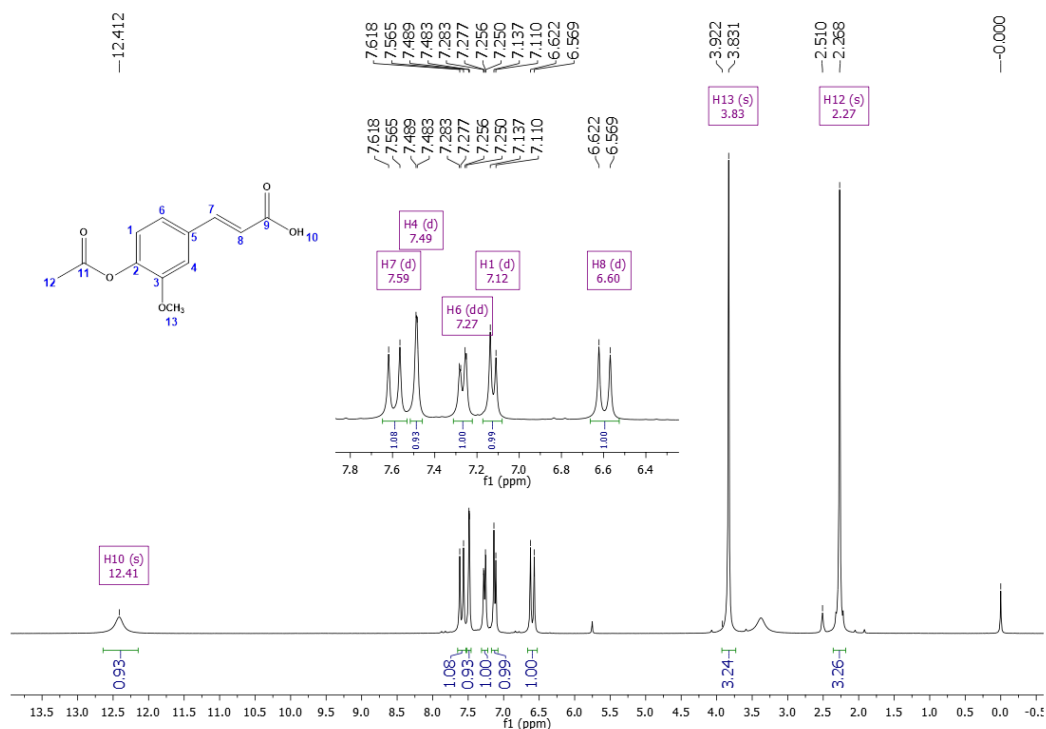
Figura 21 - Espectro no infravermelho do ácido ferúlico acetilado (**24**)



Fonte: do autor

No espectro de RMN de ^1H (Figura 22), nota-se a presença de simpleto largo e de pequena intensidade em δ 12,41, sinal característico de hidrogênio do grupo carboxila. Observa-se a presença de três hidrogênios aromáticos característicos de anel aromático com padrão de substituição 1,3,4. Um duplete em δ 7,49 com constante de acoplamento 1,8 Hz, característica de acoplamento meta, que foi atribuído ao H-4, um duplo duplete em δ 7,27 que foi atribuído ao H-6 e um duplete com constante de acoplamento 8,1 Hz, característica de acoplamento *orto*, que foi atribuído ao H-1. Os hidrogênios olefínicos conjugados com a carbonila foram observados em δ 7,59 e δ 6,60, com constante de acoplamento de 15,9 Hz, característica de acoplamento *trans*. Os hidrogênios da metoxila foram atribuídos ao singleto em δ 3,83. A acetilação do composto foi confirmada pela presença da metila do éster em δ 2,27 que foi atribuída a metila do éster. Os hidrogênios da metoxila são mais desblindados que os hidrogênios do grupo acetila, pois estão ligados diretamente a um elemento eletronegativo.

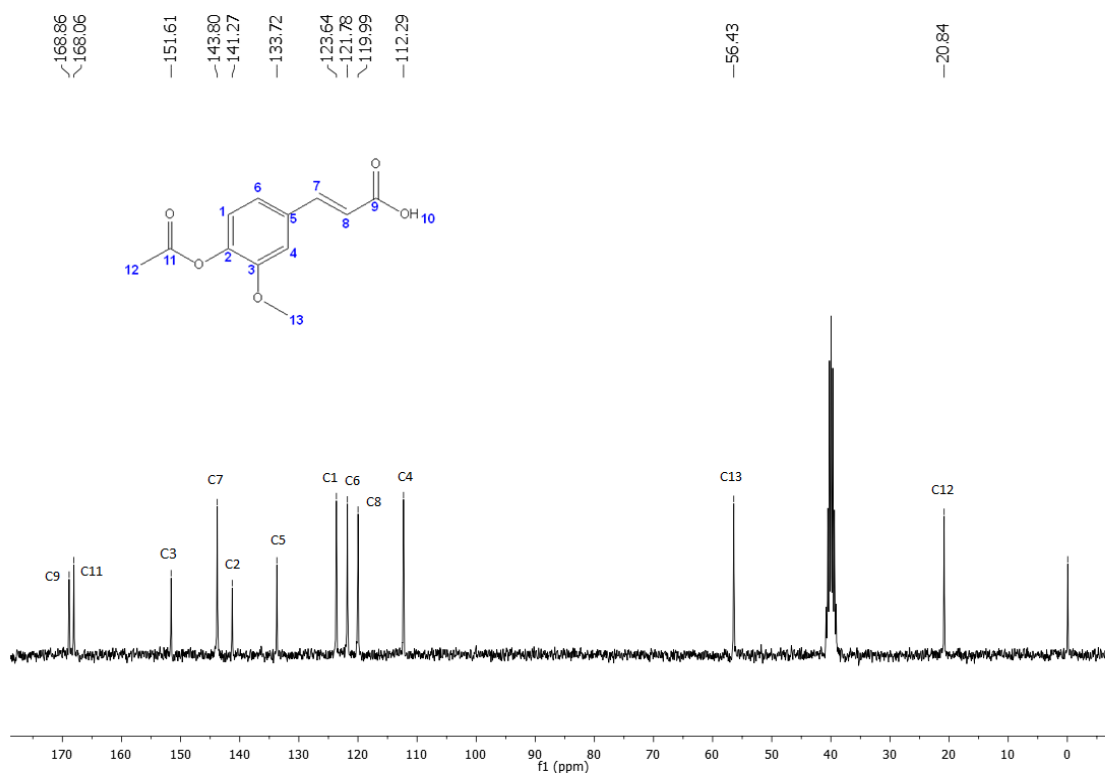
Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- D_6) do ácido ferúlico acetilado (**24**)



Fonte: do autor

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) os dois sinais mais desblindados em δ 168,9 e 168,0 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos C-9 e C-11. Os sinais de ressonância dos carbonos olefínicos foram atribuídos em δ 141,3 (C-7) e δ 119,9 (C-8). Os carbonos aromáticos hidrogenados foram observados em δ 123,6, 121,8 e 112,3, sendo o primeiro correspondente ao C-6, que faz parte do sistema de ressonância conjugado, seguido do C-1 *orto* ao grupo acetila e por último o mais blindado o C-4 que está *orto* ao grupo metoxila. Os carbonos não hidrogenados C-3, C-2 e C-5 foram atribuídos aos sinais δ 151,6, 141,3 e 133,7, respectivamente.

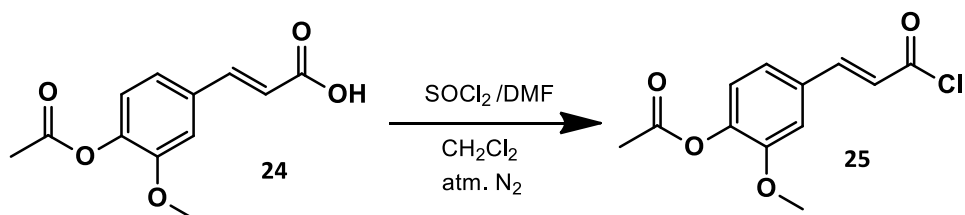
Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-D6) do ácido ferúlico acetilado (24)



Fonte: do autor

Após a proteção da hidroxila fenólica, o derivado **24** foi convertido no respectivo cloreto de ácido por reação com SOCl_2/DMF (Figura 24).

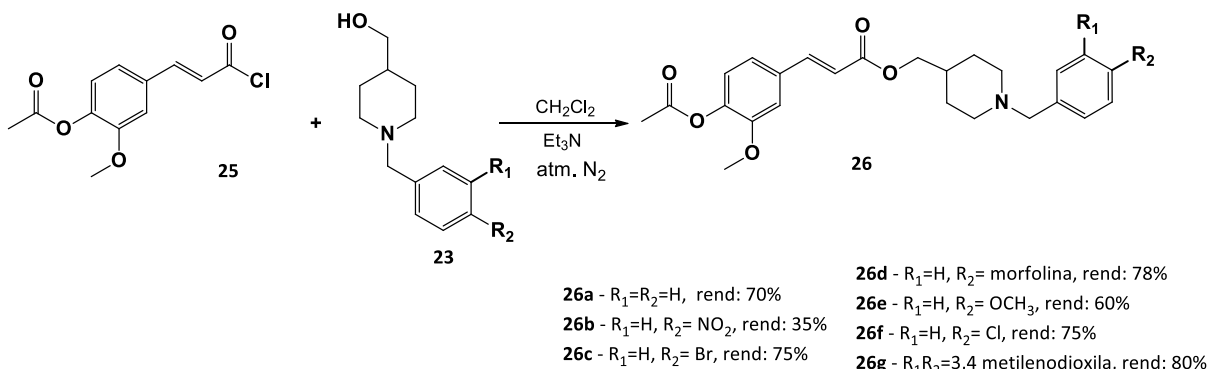
Figura 24 - Reação de formação do cloreto do ácido ferúlico acetilado (25)



Fonte: do autor

O cloreto do ácido ferúlico (**25**) foi, então, submetido a reações de esterificação com os intermediários-chave *N*-benzilpiperidínicos substituídos para fornecer a série de ésteres acetilados **26a-g** (Figura 25).

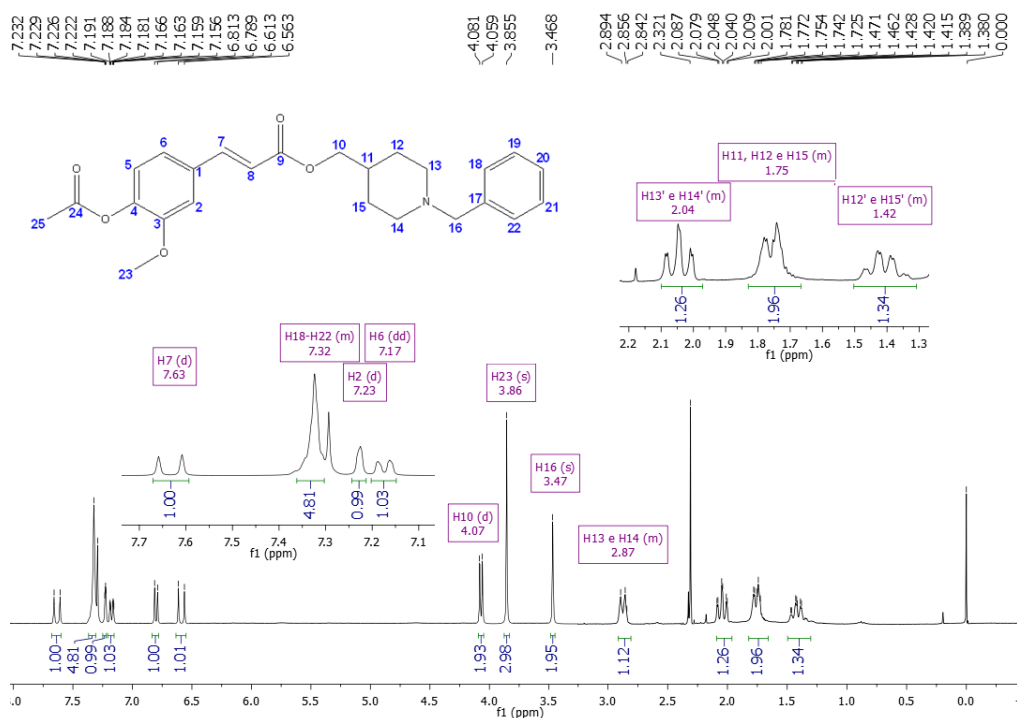
Figura 25 - Reação de esterificação entre cloreto do ácido ferúlico acetilado (**25**) e intermediários aminobenzílicos (**26a-g**)



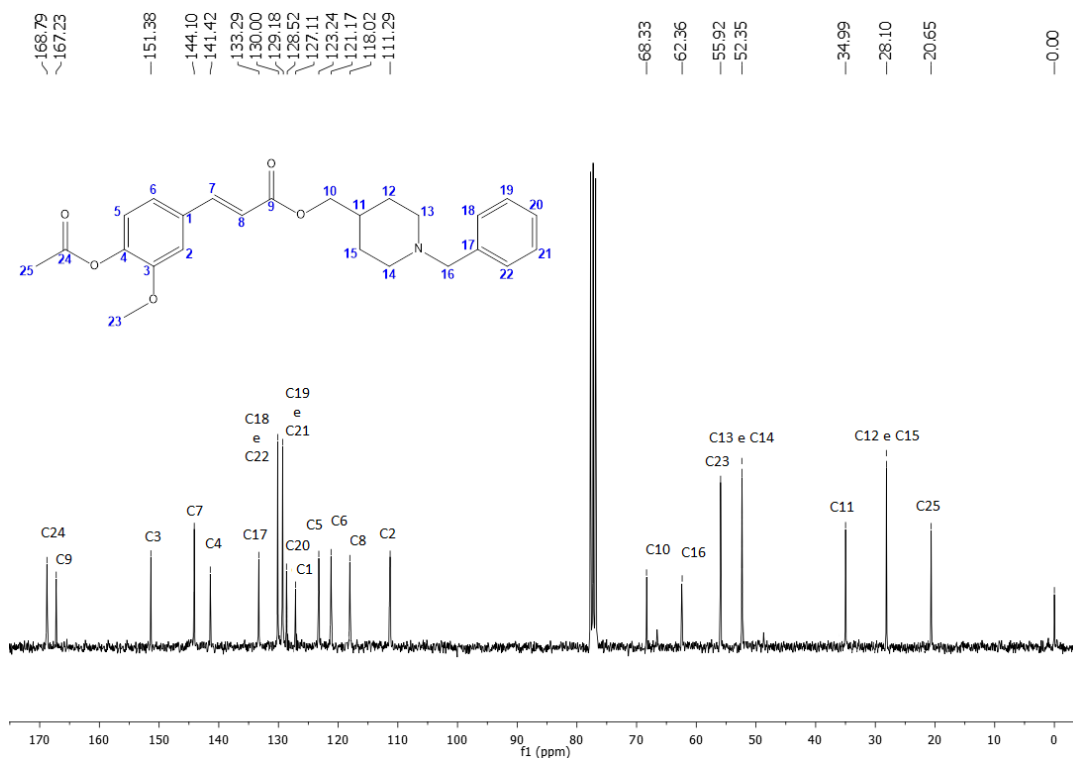
Fonte: do autor

Os ésteres **26a-g** foram obtidos com rendimentos satisfatórios em torno de 60-80% e caracterizados por RMN de ¹H e de ¹³C. A análise dos espectros de ¹H (Figura 26) e ¹³C (Figura 28) do composto **26a** confirmou a obtenção dos compostos. Devido à similaridade estrutural, serão discutidos somente os dados do composto final desacetilado PQM-130 (**27a**). Os espectros obtidos para os demais compostos acetilados estão apresentados no ANEXO I.

Figura 26 - Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) do composto PQM-130 acetilado (**26a**)

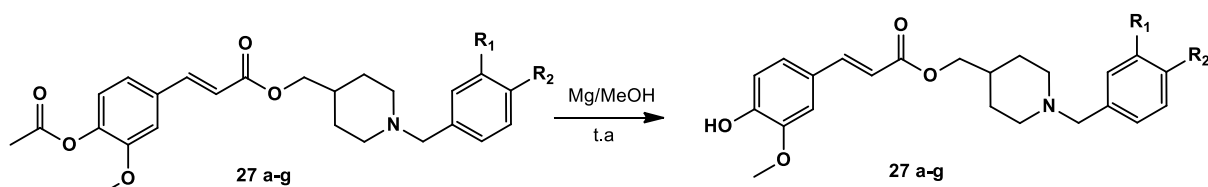


Fonte: do autor

Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) do composto PQM-130 acetilado (**26a**)

Fonte: do autor

Para obtenção dos compostos finais, os ésteres **26a-g** foram submetidos a reação de desproteção da hidroxila fenólica em presença de Mg/MeOH (Figura 28). Em condições anídras, magnésio metálico reage lentamente com metanol, gerando metóxido de magnésio e gás hidrogênio. Utilizando essa metodologia é possível clivar seletivamente funções acetato (XU; LEBEAU; WALKER, 1994), como é o caso dos compostos a serem desacetilados para formar as séries-alvo desejadas.

Figura 28 - Reação de desproteção seletiva da hidroxila fenólica em presença de Mg/MeOH 

27a - $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$, rend: 77%

27b - $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{NO}_2$, rend: 73%

27c - $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{Br}$, rend: 71%

27d - $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{morfolina}$, rend: 67%

27e - $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OCH}_3$, rend: 77%

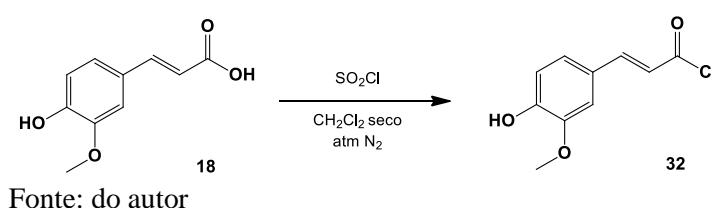
27f - $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{Cl}$, rend: 75%

27g - $\text{R}_1\text{R}_2=3,4$ metilenodioxila, rend: 73%

Fonte: do autor

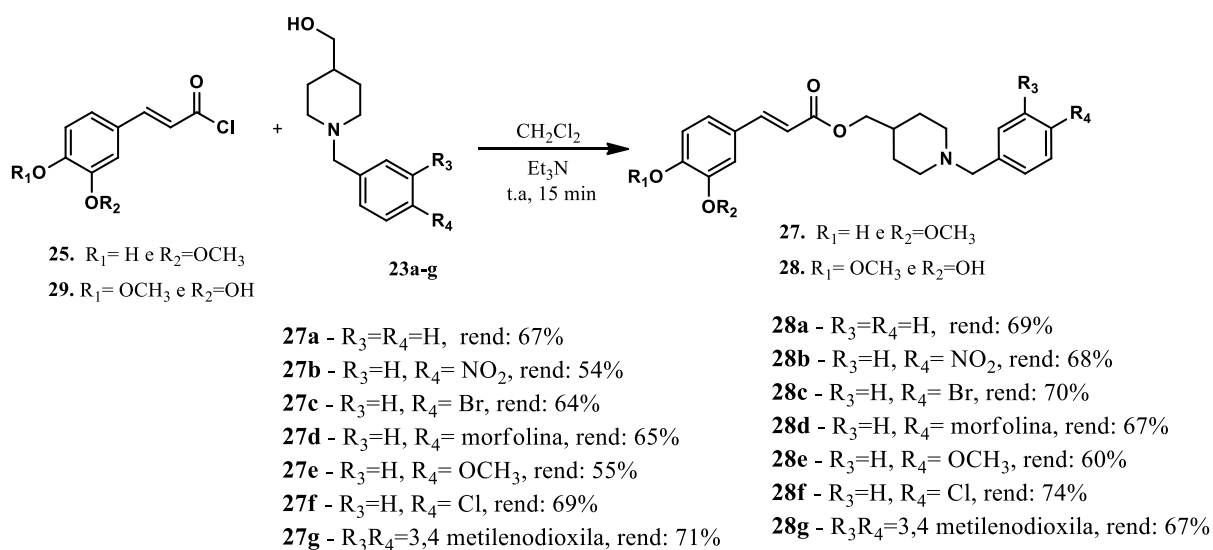
A fim de otimizar os rendimentos globais e diminuir as etapas reacionais a metodologia de esterificação do cloreto do ácido ferúlico e os intermediários aminobenzílicos foi realizada novamente com algumas mudanças relevantes. Após a formação do cloreto do ácido ferúlico (**32**, Figura 29), este foi lavado com CH_2Cl_2 seco e rotaevaporado até que se obtivesse um sólido amarelo, 1,5 eq do cloreto do ácido ferúlico foi ressuspensionado em CH_2Cl_2 seco e adicionado lentamente com o auxílio de um funil de adição sobre 1,0 eq, dos intermediários **23a-g** em CH_2Cl_2 seco (Figura 30).

Figura 29 - Reação de obtenção do cloreto de ácido ferúlico (**25**)



Ao término da adição do cloreto de ácido, o produto foi rotaevaporado imediatamente. Com a adição lenta do cloreto do ácido ferúlico não foi observado formação de outros produtos indesejados, aumentando o rendimento reacional, diminuindo etapas e consequentemente aumentando o rendimento global da formação dos produtos finais. A fim de se avaliar a relação estrutura-atividade e a contribuição da regioquímica da subunidade derivada do ácido ferúlico foi proposta uma segunda série formada a partir do ácido *iso*-ferúlico (Figura 30).

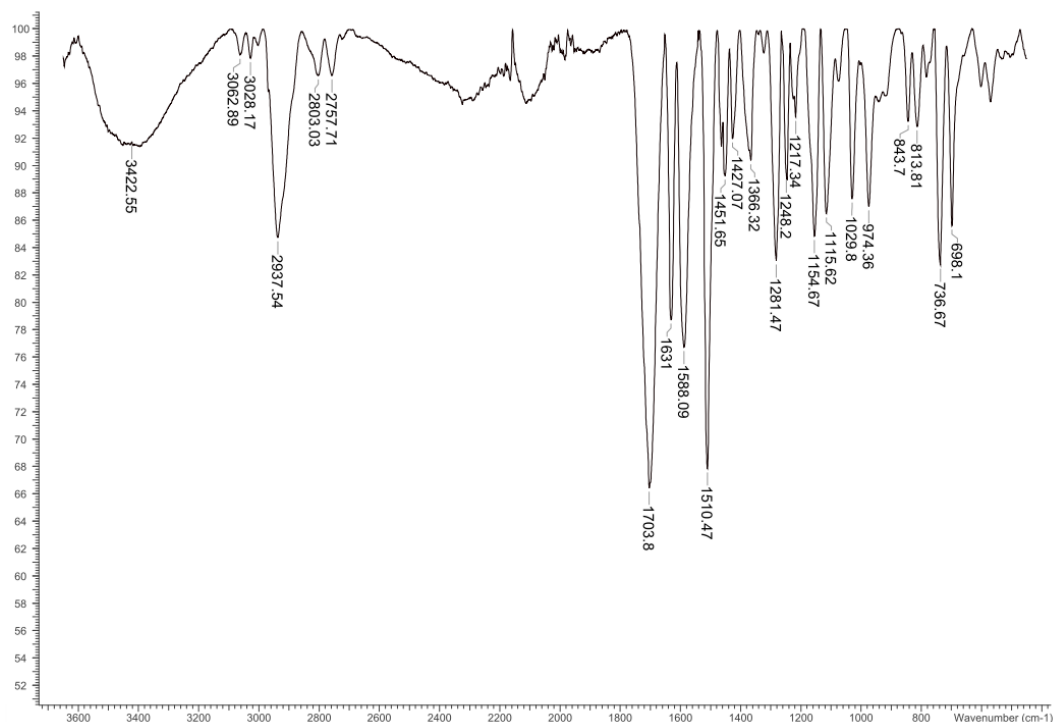
Figura 30 - Reação de esterificação entre cloreto do ácido ferúlico (**25**) ou cloreto de ácido *iso*-ferúlico (**29**) e intermediários -aminobenzílicos (**23a-g**)



Fonte: do autor

No espectro no IV do composto PQM-130 (**27a**) (Figura 31), além das bandas observadas nos intermediários, foi possível observar banda em 1703cm^{-1} que foi atribuída a carbonila do grupo éster que possui frequência menor por estar conjugada com a dupla ligação.

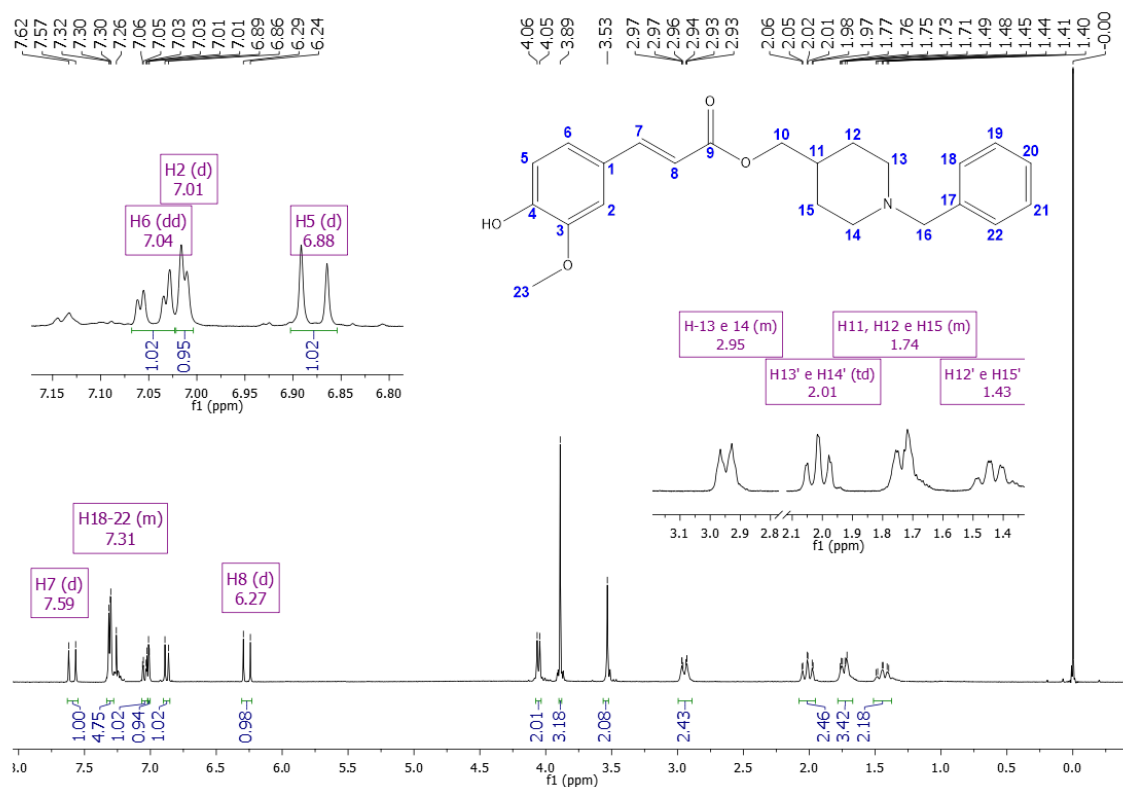
Figura 31 - Espectro no infravermelho do composto PQM-130 (**27a**)



Fonte: do autor

Analisando o espectro de RMN de ^1H (Figura 32) do composto PQM-130 (**27a**) foi observado multipletto em δ 7,31 integrado para 5 hidrogênios que foi atribuído aos hidrogênios aromáticos do anel monossustituído. O dupletto em δ 7,01, o duplo dupletto em δ 7,04 e o dupletto em δ 6,88 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel trissustituído. Também foi observado δ 3,89 um simpleto referente aos hidrogênios do grupo metila. Três multiplettos (δ 2,93 - 1,39), correspondente aos hidrogênios do anel piperidínico. Para os hidrogênios olefínicos (H-7 e H-8) foram atribuídos os duplettos em δ 7,59 e 6,27 que apresentaram constante de acoplamento de cerca de 15 Hz característica de sistemas alcenos-*E*. Os sinais em δ 4,06 e 3,53 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos (H-10 e H-16).

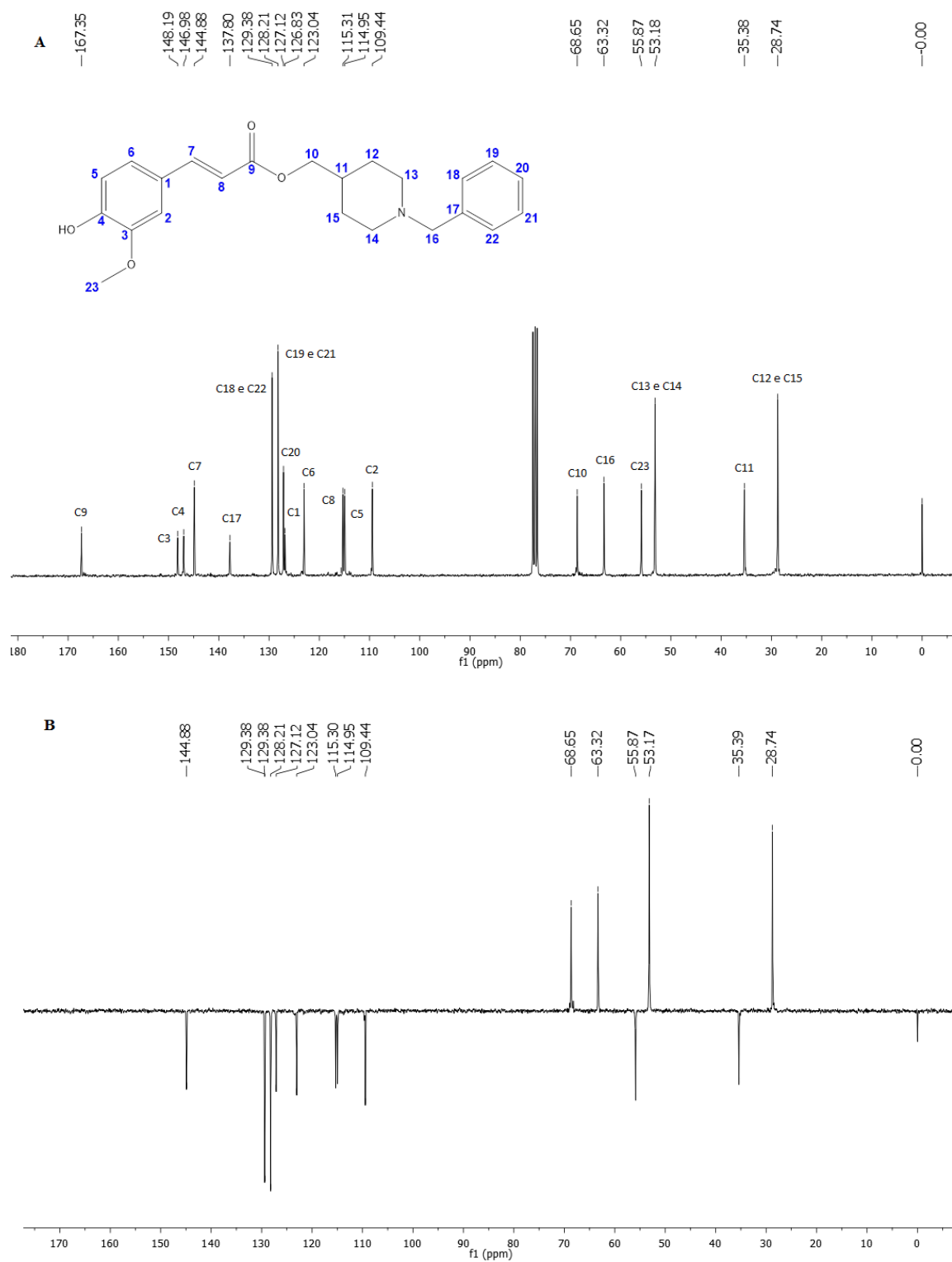
Figura 32 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-130 (**27a**)



Fonte: do autor

O espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 (Figura 33 A e B) corroboraram com a caracterização do composto PQM-130 (**27a**). Entre outros sinais foi observada a presença do sinal de carbono carbonílico do éster em δ 167,3, além dos sinais de carbonos aromáticos mais desblindados e do anel piperidínico, metilênico e metilidênico, mais blindados

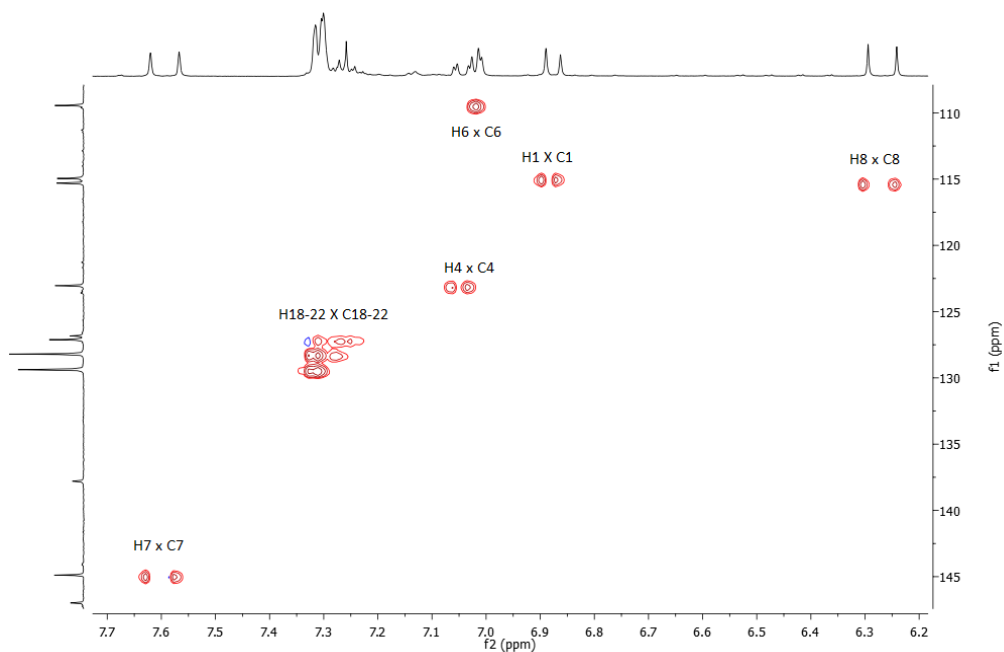
Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 (CDCl_3 , 75MHz) do composto PQM-130 (**27a**)



Fonte: do autor

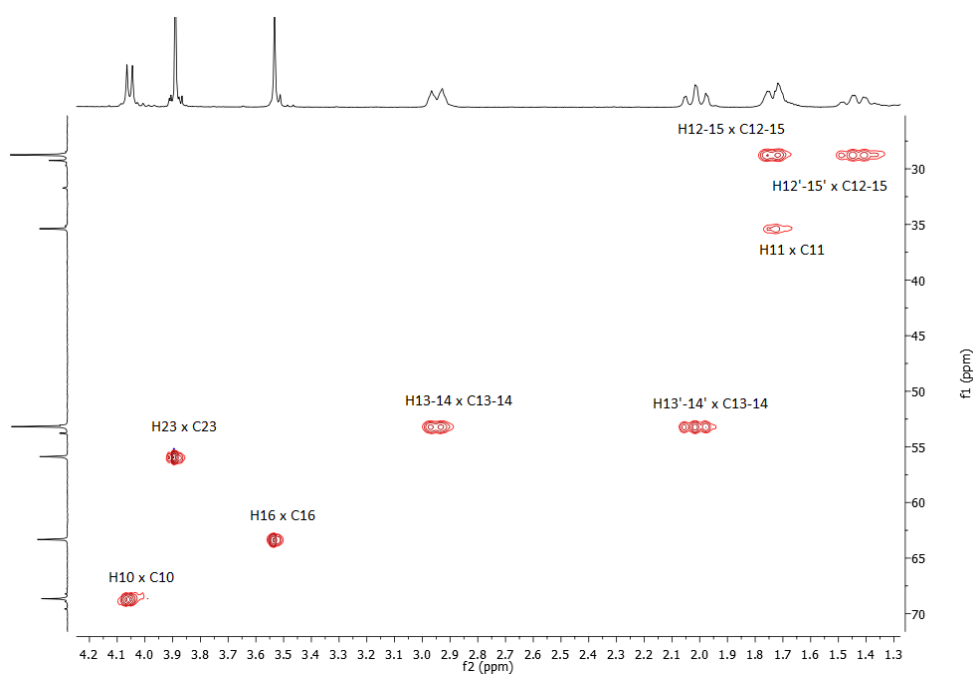
O mapa de contorno HSQC (Figura 34 e 35), analisado conjuntamente com os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT-135, confirmou a estrutura de PQM-130 (**27a**).

Figura 34 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto PQM-130 (**27a**)



Fonte: do autor

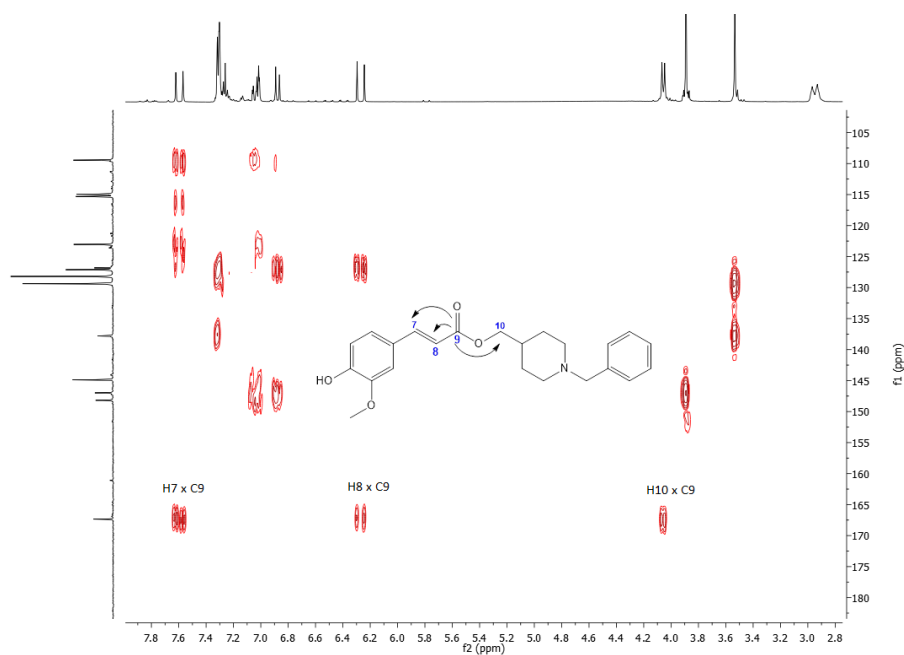
Figura 35 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto PQM-130 (**27a**)



Fonte: do autor

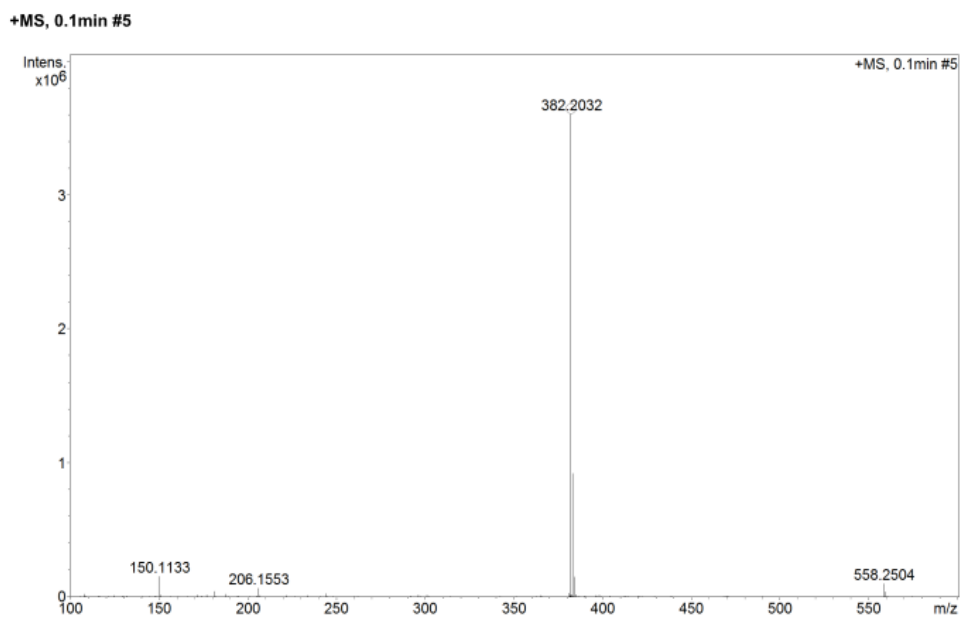
O mapa de contorno HMBC (Figura 36) também foi importante na confirmação da estrutura do composto PQM-130 (**27a**), destacando a interação H-10 e C-9, o que confirma a presença do grupamento éster.

Figura 36 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto PQM-130 (**27a**)



Fonte: do autor

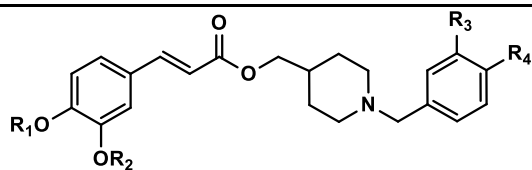
No espectro de massas de alta resolução do composto PQM-130 (**27a**) (Figura 37), foi identificado o pico-íon-molecular $[M+1]^+$ do composto em $m/z = 382,2032$ (calc. 382.2018)

Figura 37 - Espectro de massa de alta resolução do composto PQM-130 (**27a**)

Fonte: do autor

Foram sintetizados 14 novos compostos híbridos feruloil-donepezil (**27a-g** e **28a-g**) (Tabela 02). A confirmação das estruturas foi feita através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, IV e massas de alta resolução. Os espectros dos compostos **27b-g** e **28a-g** estão apresentados na sessão ANEXO I.

Tabela 02 - Fórmula geral e substituintes dos compostos híbridos feruloil-donepezil (27a-g e 28a-g)



COMPOSTOS	SUBSTITUINTES	RENDIMENTO GLOBAL%
PQM-130 (27a)	R ₁ =H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H, R ₄ =H	51
PQM-131 (27b)	R ₁ =H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H, R ₄ = NO ₂	38
PQM-132 (27c)	R ₁ =H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H, R ₄ = Br	45
PQM-133 (27d)	R ₁ =H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H, R ₄ = morfolina	52
PQM-134 (27e)	R ₁ =H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H, R ₄ = OCH ₃	44
PQM-151 (28a)	R ₁ =CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = H, R ₄ = H	53
PQM-152 (28b)	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = H, R ₄ = NO ₂	48
PQM-153 (28c)	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = H, R ₄ = Br	49
PQM-154 (28d)	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = H, R ₄ = morfolina	54
PQM-155 (28e)	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = H, R ₄ = OCH ₃	48
PQM-156 (27f)	R ₁ =H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H, R ₄ = Cl	52
PQM-157 (28f)	R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = H, R ₄ = Cl	56
PQM-158 (27g)	R ₁ = H, R ₂ = CH ₃ , R ₃ R ₄ = 3,4 metilenodioxila	62
PQM-159 (28g)	R ₁ = CH ₃ , R ₂ =H, R ₃ R ₄ = 3,4 metilenodioxila	67

Fonte: do autor

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA *IN VITRO* E ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR

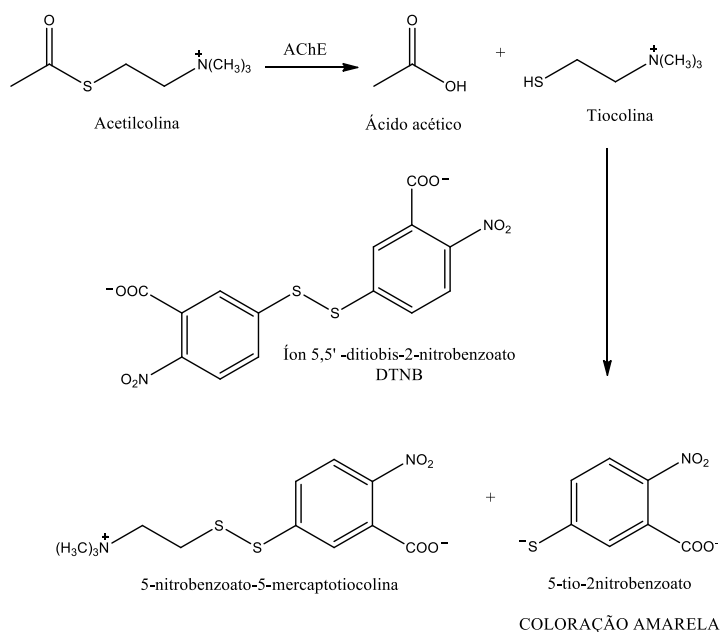
A seguir serão descritos os ensaios *in vitro* e *in silico* com a AChE.

4.2.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman

Uma vez sintetizados e caracterizados, todos os compostos da série de híbridos feruloil-donepezil foram submetidos a ensaios farmacológicos *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase purificada de *E. electricus*. Os ensaios foram realizados no laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela metodologia descrita em Viegas (2005) (VIEGAS et al., 2005) com modificações.

Nesse método, a enzima hidrolisa o substrato acetiltiocolina resultando na produção de tiocolina que reage com 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), conhecido como reagente de Ellman, para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato que pode ser detectado a 405 nm (ELLMAN et al., 1961). A reação para a formação do composto de cor amarela proposto por Ellman está apresentado na figura abaixo.

Figura 38 - Formação do ânion de coloração amarela do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

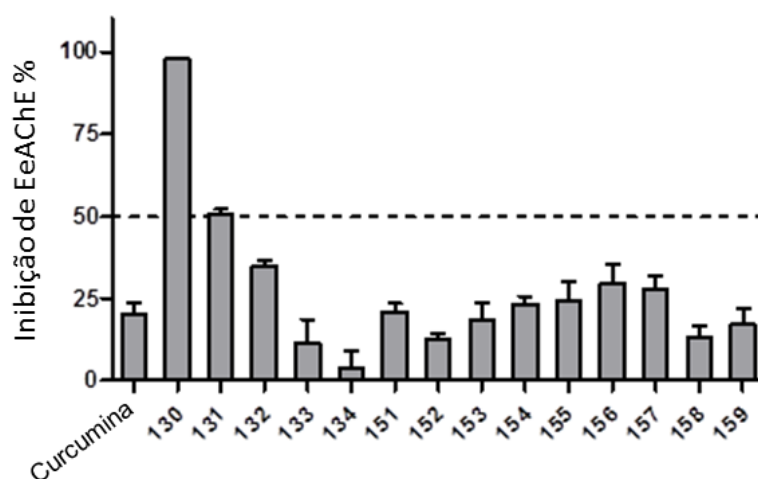


Fonte: do autor

Foi realizada uma triagem de todas as substâncias sintetizadas **27a-g** e **28a-g** na concentração final de 30 μ M, levando em consideração ser um valor acima do CI₅₀ de inibidores clássicos da AChE. A Figura 39 apresenta os percentuais de inibição da atividade da AChE pelos compostos avaliados, observa-se que todos os compostos foram capazes de inibir a

acetilcolinesterase em diferentes percentuais, sendo os compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) os mais ativos da série. Os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-131 (**27b**) apresentaram percentual de inibição maior que 50% e, portanto, foram selecionados para determinação do CI_{50} e da seletividade da AChE *versus* BuChE.

Figura 39 - Triagem do perfil de inibição de EeAChE da série de híbridos feruloil-donepezil na concentração de 30 μ M.

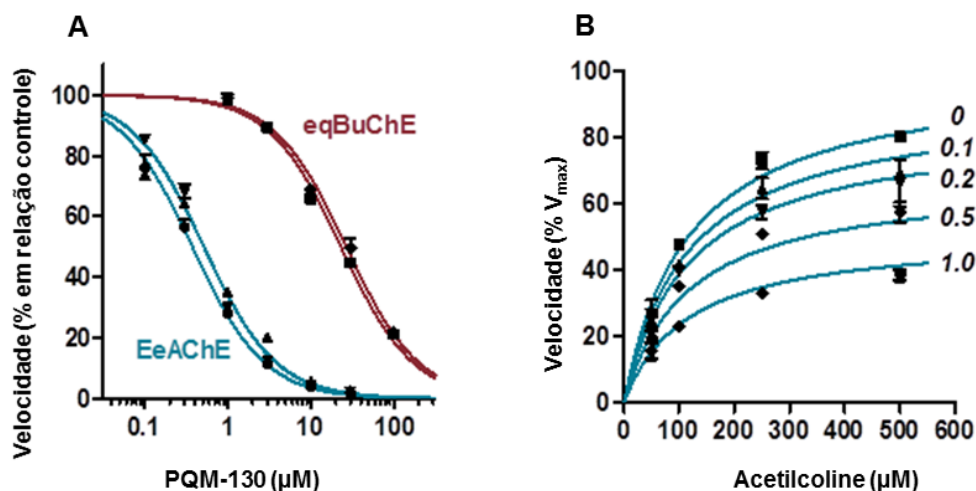


Fonte: do autor

O composto PQM-130 (**27a**) apresentou potente atividade inibitória de AChE, apresentando CI_{50} de 0,46 μ M, já o PQM-131 (**27b**) (CI_{50} = 16,74 μ M) foi 30 vezes menos potente quando comparado ao PQM-130 (**27a**). O ensaio de seletividade demonstrou que PQM-130 (**27a**) é seletivo para AChE, sendo 56 vezes mais potente quando comparado com a capacidade de inibição de BuChE (CI_{50} = 24,97 μ M) (Figura 40A). Já o composto PQM-131 (**27b**) apresentou percentagem inibitória da BuChE de apenas 4,3% na dose de 30 μ M, e devido a esse fato sua CI_{50} não foi determinada.

O perfil do gráfico (Figura 40B) obtido para o composto PQM-130 (**27a**) indica que as substâncias atuam através do 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. Analisando os resultados fica claro que a substituição no anel piperidínico causa decréscimo significativo na atividade, além de que a troca da posição entre os grupos hidroxila e metoxila da subunidade fenólica também exerce influência na atividade. Na tentativa de compreender os resultados encontrados no ensaio de inibição *in vitro* da AChE foi realizado estudos de *docking* molecular com os três compostos mais ativos da série.

Figura 40 - Curva de inibição e mecanismo de inibição do composto PQM-130 (27a).



Nota: A) Curva de inibição de EeAChE e eqBuChE do composto PQM-130 (27a). Experimentos diferentes são mostrados com símbolos diferentes, apresentados como médias \pm SD das triplicatas; parâmetros ajustados da curva são mostrados na tabela 03. B) Os dados da competição do substrato para EeAChE e o melhor ajuste do modelo (inibição linear simples não-competitiva). A concentração de PQM-130 (27a) está indicada a direita de cada curva. Os dados foram obtidos a partir de dois experimentos, cada um realizado em triplicata.

Fonte: do autor

Tabela 03 - Parâmetros da potência e seletividade para inibição da colinesterase (µM)

COMPOSTO	EeAChE CI ₅₀	eqBuChE CI ₅₀	EeAChE K _i
PQM-130 (27a)	0,46 (3)	24,97 (2)	1,04 (2)
PQM-131 (27b)	16,74 (3)	-	-
Curcumina	132,13 (2)	> 300 (2)	-
Donepezil	0,026 (3)	4,69 (2)	0,038 (2)

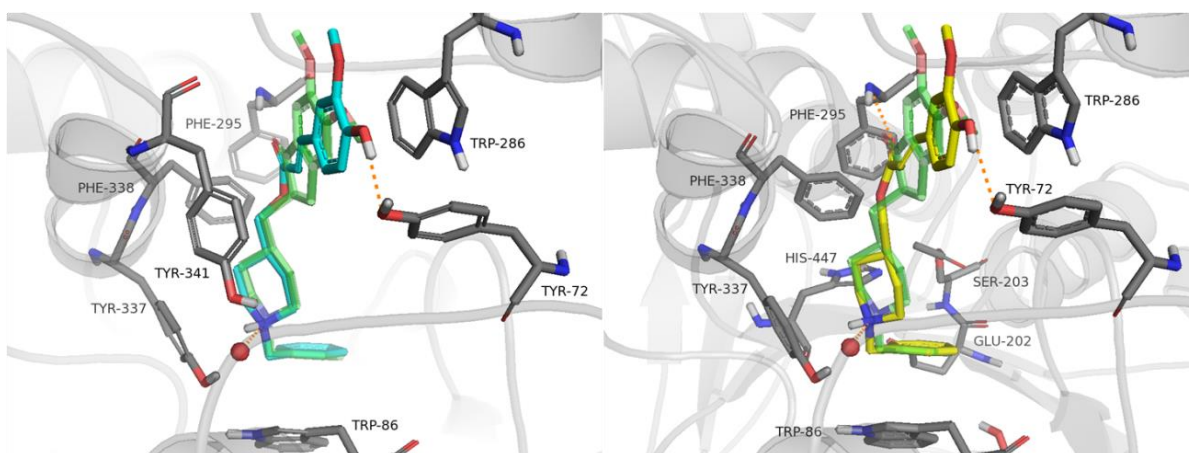
Nota: Os CI₅₀ são estão representados como médias geométricas de experimentos independentes e K_i são do modelo mais apropriado (inibição não competitiva simples) ajustado para o conjunto de dados completo. O número de experiências é indicado entre parênteses; cada um deles foi executada em triplicado.

Fonte: do autor

4.2.2 Estudos de *docking* molecular

O composto PQM-130 (**27a**) exibiu um modo de ligação e índices de similaridade em ambas as formas da enzima livres e acetiladas (Figura 41). Curiosamente, o modo de ligação previsto para esse composto é muito semelhante com a conformação experimental observada no complexo AChE-donepezil (PDB 4ey7), conservando várias interações chave: (i) os grupos fenila e piperidina são localizados na mesma região de interação observadas na interação do donepezil, com o grupo fenila interagindo com o Trp86 através de interações *stacking* e o anel piperidínico com Tyr337 através de ligação de hidrogênio com uma molécula de água (W931); (ii) a ligação de hidrogênio entre o grupo carbonila do grupamento éster com o NH da cadeia principal (backbone) da Phe295 (interação do grupo carbonila do anel indanona no donepezil). (iii) Interações *stacking* entre o anel aromático da subunidade guaiacol e o sistema indol do Trp286 localizada no PAS. (iv) adicionalmente, a hidroxila fenólica está localizada a uma distância que permite a interação de ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr72 (3.06 Å).

Figura 41 - Resultado do docking para PQM-130 (**27a**) na enzima livre (azul claro) e acetilada (amarelo), superposição com resultados experimentais do modo de ligação do donepezil (verde transparente).



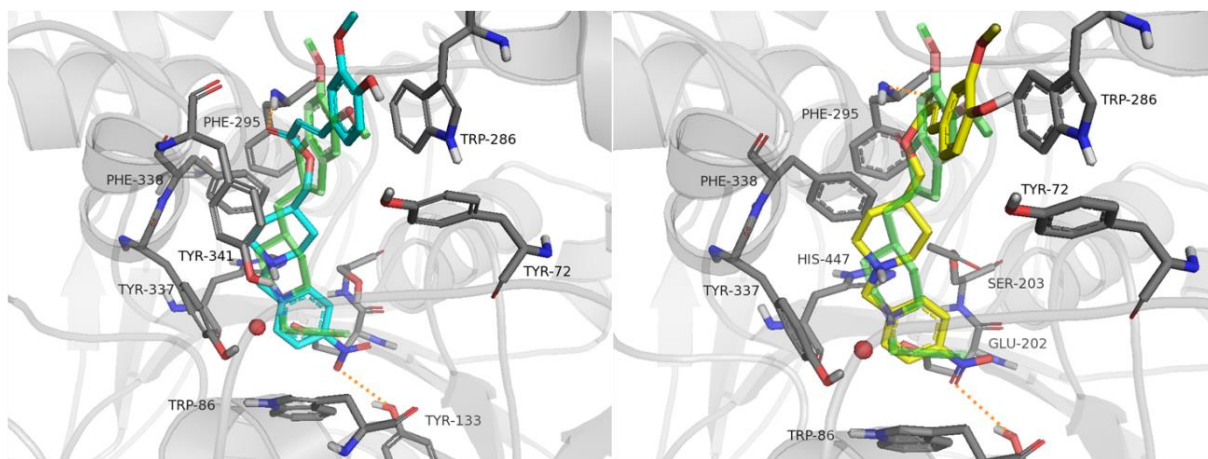
Nota: W93 é representado como uma esfera vermelha e as ligações de hidrogênios são representadas como linhas tracejadas alaranjadas.

Fonte: do autor

O modo de ligação previsto para o PQM-131 (**27b**) na enzima livre e acetilada também são similares, exibindo o anel nitrofenil orientado para a tríade catalítica (Figura 42). As principais interações encontrada são: (i) ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila da

Tyr133, (ii) ponte salina entre o grupo nitro e a cadeia lateral do Glu202 (iii) interações *stacking* entre anel nitrofenil e Trp86 (não planar) e His447, (iv) interação cátion- π entre o grupo NH protonado no anel piperidínico e Phe338, Tyr337 e Trp86 (longa distância $> 6\text{\AA}$), (vi) ligação de hidrogênio entre a carbonila do grupamento éster com o NH da cadeia principal (backbone) da Phe295, (vii) Interações *stacking* entre o anel benzênico e o núcleo indanona do Trp286 do PAS (boa geometria).

Figura 42 - Resultado do docking para PQM-131 (**27b**) na enzima livre (azul claro) e acetilada (amarela), superposição com resultados experimentais do modo de ligação do donepezil (verde transparente).

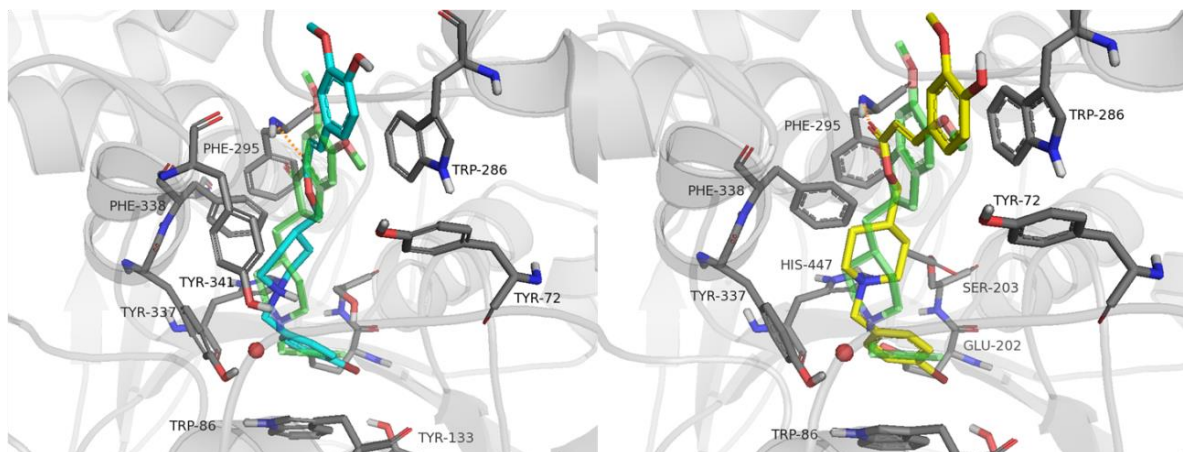


Nota: W931 é representado como uma esfera vermelha e as ligações de hidrogênios são representadas com linhas tracejadas alaranjadas

Fonte: do autor

O modo de ligação do PQM-132 (**27c**) foi significativamente similar em ambas as formas da enzima livre e acetilada, realizando algumas interações observadas para o donepezil porém com alguns desvios na geometria: (i) interações *stacking* entre o anel 4-bromofenil com o Trp86, com o átomo de bromo orientado para a tríade catalítica e rodeados por três moléculas de água (W731, W722 and W729, não mostrado), (ii) interação cátion- π entre a Tyr337 e Phe338, (iii) ligação de hidrogênio entre a carbonila do grupo éster e o NH da cadeia principal Phe295, (iv) interações *stacking* entre os scores da forma livre e acetiladas (~ 2.6 kcal/mol) que pode ser devido a melhor geometria das interações com Trp286 no PAS (interações *stacking*) e com Phe338 (interações cátion- π com o NH protonado orientado para o anel fenila na forma acetilada, enquanto o mesmo grupo está apontado para o lado oposto do anel aromático (Figura 43).

Figura 43 - Resultado do docking para PQM-132 (**27c**) na enzima livre (azul claro) e acetilada (amarela), superposição com resultados experimentais do modo de ligação do donepezil (verde transparente).



Nota: W931 é representado como uma esfera vermelha e as ligações de hidrogênios são representadas com linhas tracejadas alaranjadas.

Fonte: do autor

Todos os três compostos exibiram degradação significativa nos scores no complexo de Michaelis (AChE complexada com o substrato de ACh). O PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) exibiram os melhores ancoramentos de scores, retendo a orientação original observada no donepezil. Por outro lado, PQM-131 (**27b**) exibiu orientação invertida quando se compara com os modos de ligação previstos para a enzima livre e acetilada.

Os resultados de *docking* dos derivados no sítio ativo da AChE demonstraram que o composto de melhor perfil inibitório (PQM-130 (**27a**)) apresenta conformação experimental semelhante a conformação observada no complexo AChE-donepezil, fazendo interações importantes com os resíduos Trp86, Tyr337, Phe295 e Trp286 que estão localizados nos sítios catalíticos e aniônico periférico. Este estudo foi capaz de destacar, também, a importância da subunidade guaiacol para promover a interações observada entre a hidroxila fenólica e Tyr72 (3.06 Å) que segundo os resultados dos ensaios *in vitro* parecem ser essenciais para a inibição de atividade.

Tabela 04 - Scores de *docking* dos compostos PQM-130 (27a), PQM-131 (27b), PQM-132 (27c) e donepezil (referência) fornecida por *docking* com o *glide* no modo de precisão extra

COMPOSTOS	AChE LIVRE	AChE ACETILADA	COMPLEXO DE MICHAELIS
PQM-130 (27a)	-16.129	-16.956	-11.567
PQM-131 (27b)	-15.586	-15.982	-9.961
PQM-132 (27c)	-13.913	-16.566	-11.463
Donepezil	-15.469	-15.862	-11.757

Fonte: do autor

4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE NEUROPROTEÇÃO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DIRETA E INDIRETA E QUELAÇÃO DE METAIS

A seguir serão apresentados e discutidos os ensaios *in vitro* de neuroproteção, antioxidante e quelação de metais.

4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante direta *in vitro* e efeitos neurotóxicos

Vários evidências indicam que o estresse oxidativo desempenha papel importante na indução e na ativação de vias múltiplas de sinalização de células que contribuem para a produção de substâncias tóxicas que promovem o desenvolvimento da DA (KAMAT et al., 2016). Deste modo, os híbridos feruloil-donepezil foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante utilizando ensaio de radicais DPPH em concentrações diferentes (12,5 - 100 μ M). Ácido ferúlico, ácido *iso*-ferúlico e trolox foram utilizados como padrões e os resultados estão apresentados na Tabela 05. Verificou-se que quase todos os derivados da série do ácido ferúlico foram eficazes na eliminação de radicais livres, em comparação com os compostos da série do ácido *iso*-ferúlico. O mesmo foi observado com o padrão ácido ferúlico que exibiu atividade cem vezes maior que o padrão *iso*-ferúlico, o que indica que provavelmente a maior atividade observada se deve à subunidade do ácido ferúlico. Estes resultados demonstram claramente que de modo semelhante a inibição da AChE, a regioquímica desempenha papel importante na atividade antioxidante dos compostos alvo.

Esses resultados poderiam ser explicados por analogia com o efeito de ácidos *p*-hidroxicinâmicos substituídos, em que o átomo de oxigênio do grupo hidroxila é capaz de compartilhar a carga negativa e, assim, aumentar a estabilização do radical através da extensão de conjugação. No entanto, se os radicais hidroxila assumirem orientação *meta*, o átomo de oxigênio não é capaz de compartilhar a carga, e isso provavelmente influencia a atividade antioxidante dos compostos (CAI et al., 2006).

Tabela 05- Atividade sequestrante de DPPH, neurotoxicidade e efeito antioxidante direto em células neuronais dos híbridos feruloil-donepezil

COMPOSTOS	ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE DPPH CI ₅₀ (μM) ^a	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DIRETA CI ₅₀ (μM) ^b	NEUROTOXICIDADE CI ₅₀ (μM) ^c
PQM-130 (27a)	49,41	16,87	n.d. ^e (6%) ^f
PQM-131 (27b)	46,66	25,94	n.d. (9%)
PQM-132 (27c)	45,38	n.d. ^d	n.d. (28%)
PQM-133 (27d)	73,77	-	-
PQM-134 (27e)	78,09	-	-
PQM-151 (28a)	> 100	-	-
PQM-152 (28b)	> 100	-	-
PQM-153 (28c)	> 100	-	-
PQM-154 (28d)	> 100	-	-
PQM-155 (28e)	> 100	-	-
PQM-156 (27f)	20,47	-	-
PQM-157 (27g)	> 100	-	-
PQM-158 (28f)	12,45	-	-
PQM-159 (28g)	> 100	-	-
Donepezil	-	n.d.	-
Trolox	04,86	-	-
Ác. Ferúlico	35,54	11,82	-
Ác. <i>iso</i> -ferúlico	>100	-	-

- A atividade antioxidante está demonstrada através dos valores de CI₅₀ μM. Todos os compostos foram analisados em triplicata e os resultados estão apresentados como média.
- Concentração dos compostos capaz de inibir 50% a formação de EROS induzidas por H₂O₂ (100 μM) em células neuronais SH-SY5Y. Os valores estão apresentados como a média de dois experimentos independentes.
- Concentração dos compostos capaz de inibir 50% da viabilidade neuronal após 24h de tratamento.
- n.d: CI₅₀ não determinado pois na concentração mais alta avaliada (40μM) foi observado um valor de inibição de formação de EROS induzidas por H₂O₂ em células neuronais menor que 50%.
- n.d: CI₅₀ não determinado pois na concentração mais alta avaliada (40μM) foi observado um valor de inibição da viabilidade celular menor que 50%.
- Valores em parênteses indicam o percentual de inibição da viabilidade neuronal observada na maior concentração testada (40 μM).

Fonte: do autor

Em seguida avaliou-se os efeitos neurotóxicos e a capacidade antioxidante direta dos compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) de neutralizar o radical DPPH em células neuronais SH-SY5Y.

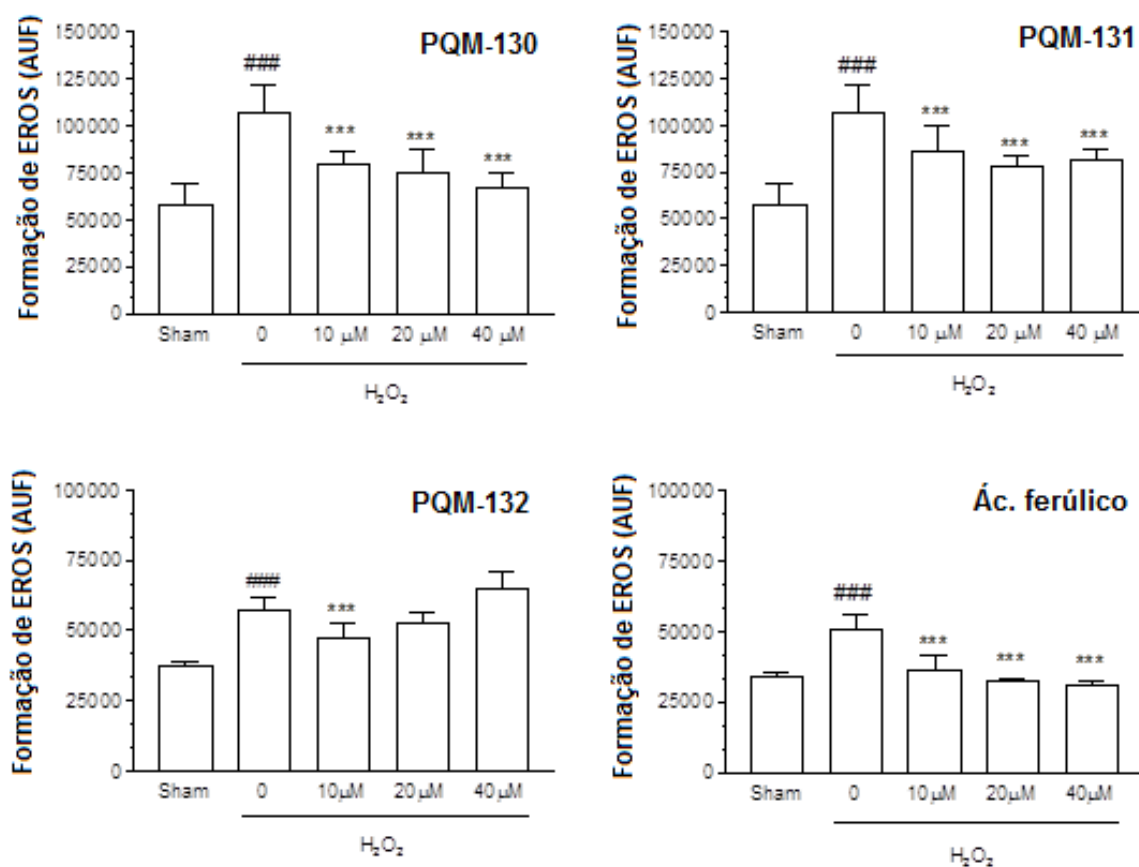
Para avaliação do efeito neurotóxico dos compostos foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) que é um modelo utilizado para avaliar a viabilidade celular, de forma rápida e objetiva, com base em uma reação colorimétrica. O MTT (coloração amarela), quando incubado com células vivas é reduzido por enzimas mitocondriais denominadas succinato-desidrogenases e observado a formação de cristais de formazana (coloração violeta). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983).

Como descrito na tabela 05, 24 horas após o tratamento das células com os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-131 (**27b**) (1,25-40 μM) a viabilidade das células neuronais não foram afetadas no ensaio de MTT, enquanto o tratamento similar com o composto PQM-132 (**27c**) demonstrou ligeira diminuição na viabilidade celular (28%) na concentração mais alta utilizada (40 μM).

Em paralelo, foi observado uma forte capacidade dos compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) de inibir a formação de EROs intracelular induzida por H_2O_2 em células SH-SY5Y utilizando sonda fluorescente DCFDA. O H_2DCFDA se difunde através da membrana da célula e é hidrolisado por esterases intracelulares para a forma não fluorescente, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). DCFH reage com H_2O_2 intracelular e forma 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um corante fluorescente verde.

Ambos os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-131 (**27c**) mostraram efeito antioxidante dependente da concentração com diminuição significativa da formação de EROs nas concentrações de 10, 20 e 40 μM ($p < 0.001$). O composto PQM-132 (**27c**) apresentou inibição significativa na formação de EROs somente em 10 μM ($p < 0.001$), demonstrando efeito pró-oxidante em concentrações mais altas. Como esperado, donepezil não apresentou nenhum efeito antioxidante direto (dados não mostrados). Estes resultados demonstram a ausência de efeitos citotóxicos e pró-oxidantes para os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-131 (**27b**) e sugerem que o padrão de ácido ferúlico contribui de forma eficaz na diminuição da formação de EROs em células neuronais células SH-SY5Y.

Figura 44 - Compostos PQM-130 (27a), PQM-131 (27b), PQM-132 (27c) e ácido ferúlico na inibição de formação de EROS induzidas por H₂O₂ em células neuronais SH-SY5Y.



Nota: As células foram pré-tratadas com os compostos em várias concentrações e H₂O₂ (100 μM) por 30 minutos. No final do tratamento, a formação intracelular de EROS foram determinadas utilizando uma sonda DCFDA. Os valores de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) são mostrados como médias ± SD de três experimentos (###p<0.001 vs sham; ***p<0.001 vs tratamento com H₂O₂)

Fonte: do autor

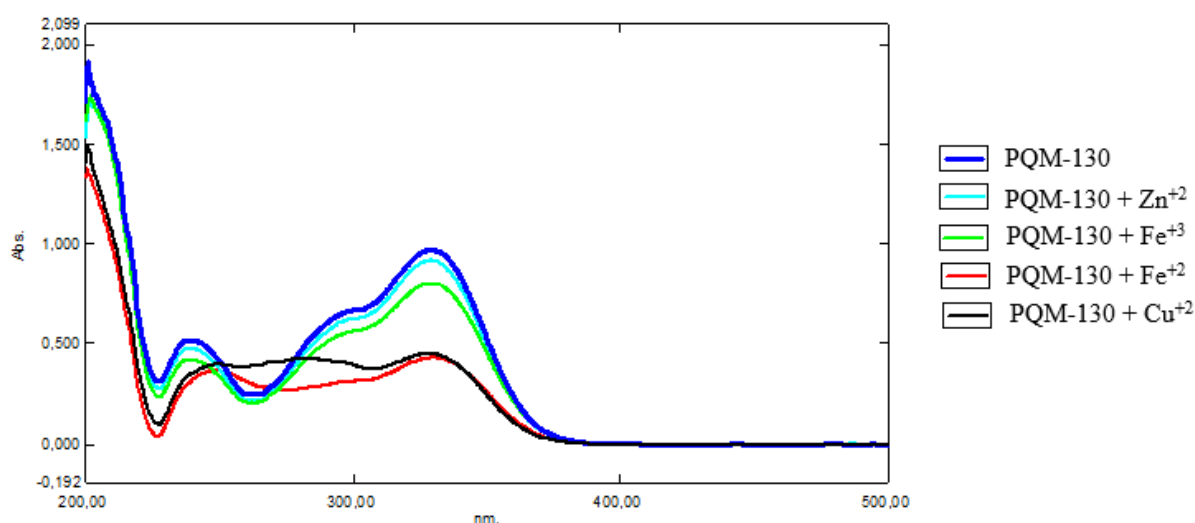
4.3.2 Propriedades quelantes de metais pró-oxidantes

Vários trabalhos demonstram que o desequilíbrio na homeostase de biometais como Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ e Fe³⁺ no SNC e as suas interações com a proteína precursora de amiloide (APP) e Aβ poderia contribuir para a patologia da DA (GONZALEZ-DOMINGUEZ; GARCIA-BARRERA; GOMEZ-ARIZA, 2014), (JOMOVA et al., 2010), (BARNHAM; BUSH, 2008). Em particular, cobre e ferro ativam o sistema redox e podem gerar EROS via reações Fenton e

Haber-Weiss e promovem a formação do oligômero neurotóxico A β . Portanto, compostos com propriedades quelantes de metais podem representar uma estratégia terapêutica adicional para o tratamento da DA. A capacidade dos compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) para quelar biometals como Cu⁺², Fe⁺², Fe⁺³ e Zn⁺² foi estudada por espectroscopia de UV-VIS com comprimentos de onda variando de 200 a 400 nm, de acordo com a metodologia descrita por Chen (CHEN et al., 2011b). O composto PQM-130 (**27a**), exibiu habilidade seletiva para quelar Cu⁺² e Fe⁺². O espectro de absorção na concentração de 75 μ M de PQM-130 (**27a**) e na presença de CuSO₄, FeSO₄, FeCl₃ e ZnCl₂ (150 μ M) por 30 minutos em etanol são mostrados na Figura 45.

É possível observar que o composto PQM-130 (**27a**) apresentou absorções com λ_{max} (log ϵ) em 328,20 nm (0,970), 299,00 nm (0,660) e 237,20 nm (0,517). Quando Cu⁺² foi adicionado à solução de PQM-130 (**27a**), causou significativo deslocamento na banda para 237,20 nm (0,517) para 248,00 nm (0,470), indicando a formação do complexo do composto com o metal correspondente via quelação. Do mesmo modo, após adição de Fe⁺², foi observado o deslocamento da banda de 237,20 nm (0,517) a 249,20 nm (0,430). Em contraste, a adição de FeCl₃ e ZnCl₂ não causou nenhum efeito significativo no deslocamento das bandas, o que confirmou que o composto PQM-130 (**27a**) é capaz de quelar apenas Cu⁺² e Fe⁺² e não é capaz de quelar Fe⁺³ e Zn⁺². Os compostos PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) apresentaram o mesmo perfil do composto PQM-130 (**27a**). A mesma capacidade de quelar os metais Cu⁺² e Fe⁺² é observada para a curcumina e é atribuída a subunidade α - β insaturada (GUPTA et al., 2011).

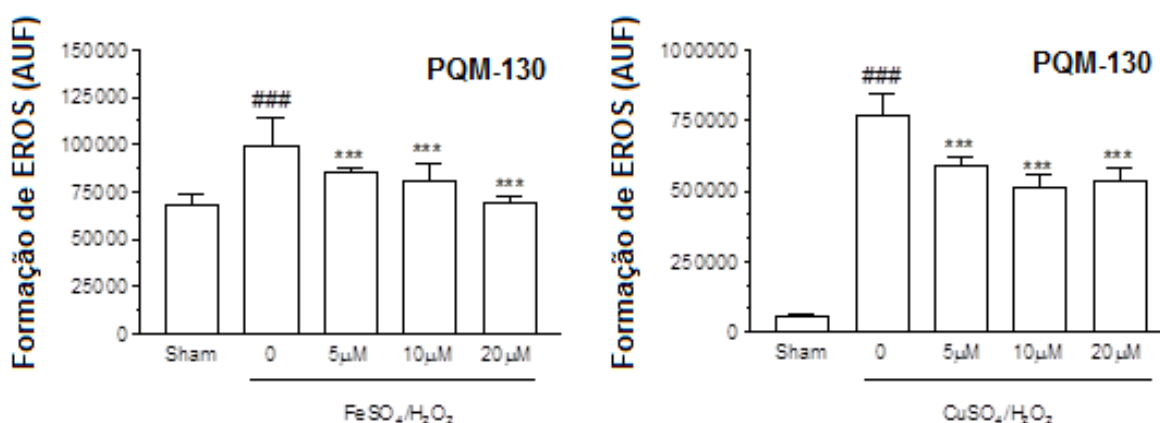
Figura 45 - UV- Espectro de absorbância de PQM-130 (**27a**) na presença e ausência de ZnCl₂, FeSO₄, FeCl₃ e CuSO₄



Fonte: do autor

Em seguida, determinou-se a capacidade do composto PQM-130 (**27a**) de neutralizar a formação de EROs induzida pela reação de Fenton com Cu^{2+} ou Fe^{2+} e H_2O_2 em células neuronais SH-SH5Y utilizando a sonda fluorescente DCFDA. Em ambas as reações, 5, 10 e 20 μM de composto PQM-130 (**27a**) neutralizou de forma significativa a formação de EROs nas células neuronais SH-SH5Y ($p < 0,001$) (Figura 46).

Figura 46 - Capacidade do composto PQM-130 (**27a**) em neutralizar a formação de EROs induzidos por $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ou $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ em células neuronais SH-SY5Y.



Nota: As células foram tratadas com várias concentrações do composto PQM-130 (**27a**) e $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ou $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (25 $\mu\text{M}/100 \mu\text{M}$) por 30 minutos. Ao final do tratamento a formação intracelular de EROs foi determinada utilizando uma sonda DCFDA. Os valores de unidade arbitrária de fluorescência (UAF) são demonstrados como médias \pm SD de três experimentos independentes (### $p < 0.001$ vs sham; *** $p < 0.001$ vs tratado with $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ou $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$).

Fonte: do autor

4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante indireta *in vitro*

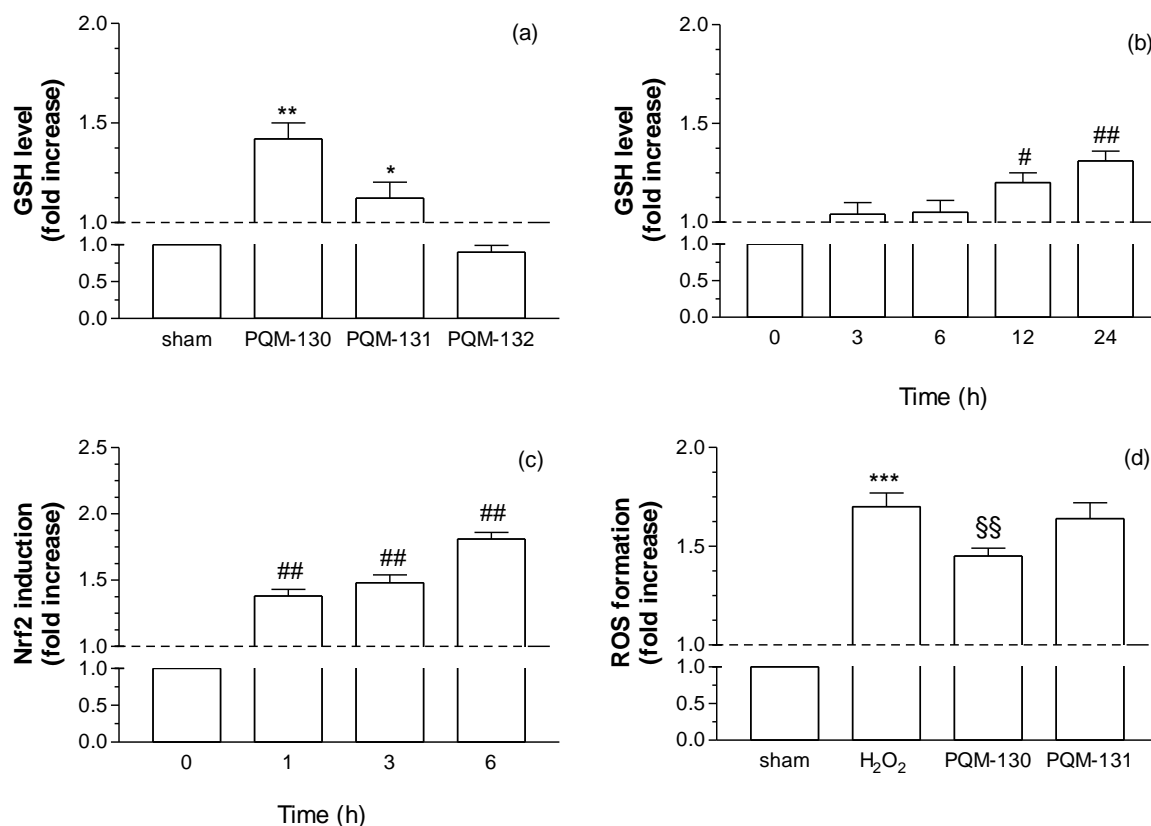
Estudos recentes relatam que moléculas como a curcumina e o ácido ferúlico que contêm funcionalidades que são receptores de Michael e hidroxilas fenólicas com propriedades antioxidantes diretas, também podem induzir proteínas antioxidantes e citoprotetoras a nível celular e atuarem como antioxidantes indiretos. Em particular, estes antioxidantes indiretos podem ativar via que tem sido reconhecida como um dos principais mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, o sistema Keap1/Nrf2/ERA. O Nrf2 (fator nuclear eritróide

2) é um fator de transcrição localizado no citoplasma que regula a expressão da maioria das enzimas que participam do sistema antioxidante. Sob condições normais, Nrf2 é mantido inativo pela proteína Keap1 (E3 Ubiquitin ligase associando proteína 1). Este fator é ativado por alterações do estado redox da célula, tais como o aumento das concentrações de EROs e subprodutos de danos oxidativos. A ativação dessa via ativa genes que codificam a transcrição da glutathione (GSH), além de enzimas da fase II, detoxificantes e antioxidantes. Estas inibem a produção de EROs e protegem as células dos danos induzidos pelo estresse oxidativo (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008).

Com base nestas considerações, foram determinados os níveis de GSH intracelular após 24 h de tratamento das células neuronais SH-SH5Y com 20 μ M dos compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**), utilizando sonda fluorescente monoclorobimano (MCB). Conforme demonstrado na figura 47a, nas células tratadas com os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-131 (**27b**), observou-se o aumento dos níveis de GSH, com aumento máximo de 1,4 e 1,2 vezes, respectivamente. Além disso, o composto PQM-130 (**27a**) induziu aumento dependente do tempo dos níveis de GSH com um aumento máximo de 24 vezes em 24 h (Figura 47b).

Diante dos resultados, o composto PQM-130 (**27a**) foi eleito para se avaliar a capacidade de ativação do fator de transcrição Nrf2 a nível nuclear, um evento essencial para a indução de genes de enzimas que sintetizam a GSH. Na concentração de 20 μ M de PQM-130 (**27a**) foi observado um aumento dependente do tempo de ativação do fator nuclear Nrf2 iniciando em 1 hora. Células COS-7 transfectadas com Nrf2 foram utilizadas como controle positivo do ensaio (Figura 47c). A atividade deste controle positivo mostrou a confiabilidade deste ensaio (dados não apresentados). Finalmente, para verificar se o aumento do nível total de GSH observada em células SH-SY5Y poderia realmente acarretar efeitos antioxidantes, as células SH-SY5Y foram tratadas com H_2O_2 24 h do ensaio. Os resultados demonstram que a concentração de 20 μ M de PQM-130 (**27a**) preveniu significativamente a formação de EROs induzidas por H_2O_2 em células SH-SY5Y (Figura 47d)

Figura 47 - Atividade do composto PQM-130 (**27a**) no aumento dos níveis de GSH e Nrf2 nuclear, bem como efeito antioxidante indireto em células neuronais SH-SY5Y.



Nota: As células foram tratadas com 20 μ M dos compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) durante 24 h (a) diferentes tempos de tratamento (b, c). No final do tratamento, com os níveis de GSH e Nrf2 nuclear determinados utilizando sonda de MCB e imunoenensaio, respectivamente. (d) Após 24 h de tratamento com 20 μ M do composto PQM-130 (**27a**), as células foram também tratadas com H₂O₂ (100 μ M, 30 min) para avaliar a formação intracelular de EROs usando sonda DCFDA em células SH-SY5Y. Os resultados são expressos como uma porcentagem das células de controle. Os valores são registados como média \pm SD de três experimentos independentes (* p < 0,05, ** P < 0,01, *** p < 0,001 x sham; #p < 0,05, ## P < 0,01 vs x não tratado; §§p < 0,01 x tratado com H₂O₂).

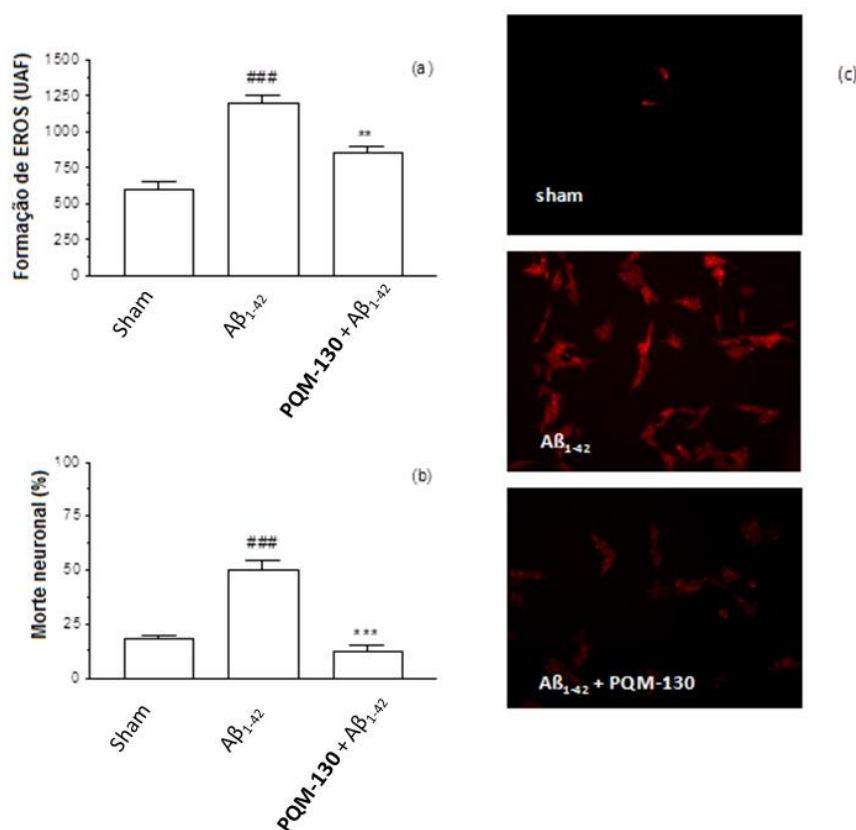
Fonte: do autor

4.3.4 Avaliação *in vitro* da neuroproteção

Vários estudos têm sugerido que os oligômeros de A β pode causar disfunção sináptica seletiva e / ou a perda neuronal no córtex e no hipocampo, duas regiões do cérebro afetadas na DA. (HAASS; SELKOE, 2007). Oligômeros A β podem aderir ao plasma, na membrana dos neurônios e causar lesões por combinação de espécies de radicais iniciando peroxidação lipídica

e formando poros permeáveis a íons que iniciam cascata de processos patológicos que termina com a morte neuronal. (RAUK, 2008). Diante disso, foi avaliado a capacidade do composto PQM-130 (**27a**) em neutralizar a formação de EROs em eventos neurotóxicos precoces e tardios desencadeados por oligômeros $A\beta_{1-42}$. O composto PQM-130 (**27a**) (20 μ M) diminuiu a formação de EROs induzidas por oligômeros $A\beta_{1-42}$ em células SH-SY5Y neuronais. Entretanto, no ensaio de MTT (dados não mostrados) o composto PQM-130 (**27a**) não foi capaz de reverter o dano celular induzido por oligômeros $A\beta_{1-42}$ em células SH-SY5Y neuronais, mas apresentaram efeitos neuroprotetores interessantes contra a morte neuronal provocada por oligômeros $A\beta_{1-42}$ (Figura 48).

Figura 48 - Atividade de inibição do composto PQM-130 (**27a**) na formação de EROS e morte neuronal induzida por oligômeros em células neuronais SH-SY5Y.



Nota: As células foram pré-tratadas com PQM-130 (**27a**) (20 μ M) e de oligômeros $A\beta_{1-42}$ (20 μ M) por 4 h (a) ou 24 h (b). No final do tratamento a formação de EROs e morte neuronal foi determinada utilizando sonda DCFDA e iodeto de propídio. (c). As imagens representam a formação de EROs. Os resultados são expressos como porcentagem das células controle. Os valores são mostrados como média \pm SD de três experimentos independentes. (^{###} $p < 0.001$ vs sham; ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs tratados com $A\beta_{1-42}$ oligômeros).

Fonte: do autor

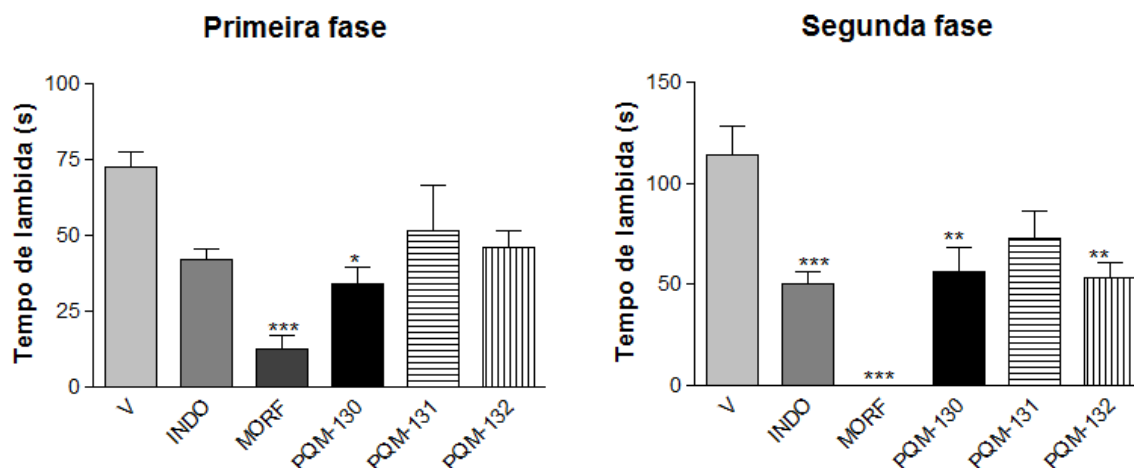
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO* DOS COMPOSTOS PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) E PQM-132 (**27c**)

A seguir serão descritos os resultados dos ensaios *in vivo* com os compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**).

4.4.1 Hiperalgisia induzida por formalina

Com o objetivo de se avaliar o possível efeito anti-inflamatório dos compostos PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) foi realizado o ensaio de hipernociceção induzida por formalina. Este ensaio é constituído de duas fases: a primeira, após 5 minutos da aplicação de formalina, é atribuído o caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opioides, enquanto a segunda fase (20 a 30 minutos) é caracterizada como dor de origem inflamatória, sensível à analgésicos anti-inflamatórios não-estereoidais (MCNAMARA et al., 2007). A administração intraplantar de formalina induz a liberação de diversos mediadores químicos. Na fase neurogênica a resposta antinociceptiva é mediada por neurotransmissores excitatórios como o glutamato, substância P e bradicinina. Na segunda fase do ensaio de formalina, as alterações fisiológicas induzidas pela resposta inflamatória levam à liberação de histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina. (SHIBATA et al., 1989). De acordo com os resultados obtidos (Figura 49), o composto PQM-130 (**27a**) demonstrou atividade antinociceptiva na primeira fase do ensaio de formalina, além de ser capaz de diminuir significativamente, a manifestação da dor na segunda fase. O composto PQM-132 (**27c**) apresentou perfil antinociceptivo significativo apenas na fase inflamatória do ensaio de formalina. Já o composto PQM-131 (**27b**) não foi capaz de diminuir de forma significativa a dor provocada pelo estímulo nocivo em nenhuma das duas fases. Os resultados sugerem um potencial perfil antinociceptivo para os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) e possível mecanismo de ação periférico na dessensibilização de nociceptores através da diminuição da liberação de mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação gerada em decorrência da administração intraplantar do agente halogênico, diminuindo assim a dor inflamatória.

Figura 49 - Efeito dos compostos híbridos feruloil-donepezil PQM-130 (27a), PQM-131 (27b) e PQM-132 (27c) no ensaio de formalina em camundongos.



Nota: Os animais foram pré-tratados oralmente com os compostos (100 $\mu\text{mol/kg}$), indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$), morfina (39 $\mu\text{mol/kg}$) ou veículo (salina + DMSO 2%) uma hora antes da administração de formalina. O tempo total gasto lambendo a pata traseira foi medido na primeira e segunda fase após a administração intraplantar de formalina. Cada barra representa a média com S.E.M para 8 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância quando comparado com o grupo controle (veículo): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

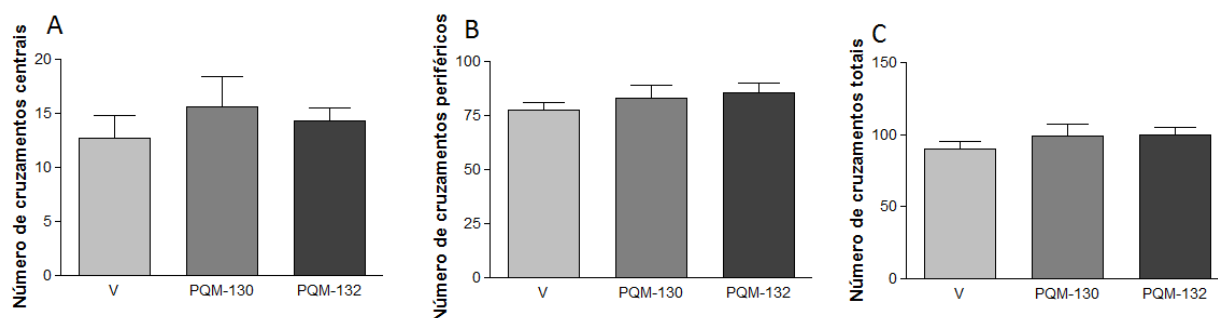
Fonte: do autor

4.4.2 Ensaios de Campo aberto

Devido ao fato dos ensaios de nociceção serem avaliados através do comportamento animal, compostos que induzem sedação ou estimulação do animal podem fornecer resultados falso-positivo/negativo. A avaliação da influência dos compostos na capacidade motora dos animais permite uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos ensaios de avaliação da capacidade antinociceptiva (RODRIGUES et al., 2002). O ensaio de campo aberto tem por objetivo avaliar a capacidade motora e o comportamento dos animais submetidos a um ambiente restrito. Dessa forma, foi avaliado se os compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) causariam efeitos não específicos, tais como relaxamento muscular ou sedação através do ensaio de campo aberto. A Figura 50 mostra que os compostos na dose de 100 $\mu\text{g/Kg}$ não alteraram o comportamento normal dos animais, ou seja, não apresentaram sinais de sedação ou de diminuição da capacidade. Esses resultados validam a ação antinociceptiva dos

compostos, observada no ensaio de antinocicepção induzida pela formalina, pois demonstram que o comportamento dos animais não derivou de alterações neurológicas ou motoras, mas de um efeito antinociceptivo propriamente dito.

Figura 50 - Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) (100 μ mol/kg, p.o.), no ensaio de campo aberto.



Nota: A: médias do número de cruzamentos centrais no. B: número de cruzamentos periféricos. C: número de cruzamentos totais.

Fonte: do autor

4.4.3 Ensaio de peritonite induzida por LPS

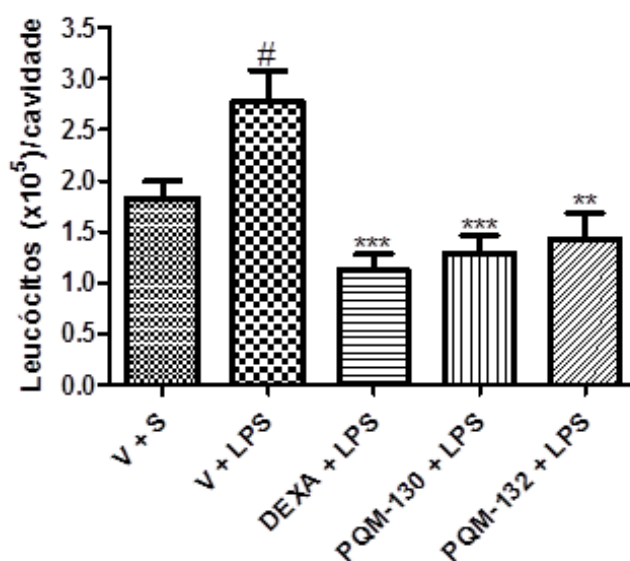
O efeito antinociceptivo dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) observado na segunda fase do teste da formalina (nocicepção inflamatória) foi um indicativo de que estes compostos poderiam produzir efeito antinociceptivo e anti-inflamatório através de mecanismos periféricos, possivelmente por meio da inibição da síntese ou liberação de prostaglandinas, mediado pela inibição da ciclooxigenase (COX), ou por outra via inflamatória. Para confirmar a possível atividade anti-inflamatória dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) foram realizados os modelos de peritonite aguda induzido por LPS, hiperalgisia mecânica e edema da pata induzido por carragenina.

No ensaio de peritonite aguda, o agente utilizado para a indução da inflamação foi lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas e conhecido como importante ativador da resposta imunológica. In vivo, o LPS pode interagir com diferentes receptores de superfície de macrófagos, especialmente o complexo receptor 2 CD14/Toll, levando a eventos de sinalização intracelular e consequente secreção de mediadores inflamatórios tais como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral

α (TNF α). Quando o LPS é injetado na cavidade abdominal do animal é desencadeado uma inflamação aguda e ocorre à migração de leucócitos para o local da inflamação. (DANTZER, 2009). Considerando que a inibição da migração de leucócitos é também um dos efeitos característicos de fármacos com propriedades anti-inflamatórias, o teste da peritonite induzida por LPS teve por objetivo avaliar a influência dos compostos na migração leucocitária para cavidade peritoneal.(GENG, 2001).

Os resultados ilustrados na Figura 51 mostram que o número de leucócitos totais no exsudato peritoneal dos grupos que receberam como tratamento os compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) foi significativamente menor em comparação com o grupo de controle (veículo + LPS) e dexametasona, que reforçam suas propriedades anti-inflamatórias previamente observadas.

Figura 51 - Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) (100 μ mol/kg, p.o.), dexametasona (10 mg/kg, p.o.) ou veículo (salina + DMSO 2%) no recrutamento de leucócitos induzidos por LPS para a cavidade peritoneal de camundongos.



Nota: Cada barra representa a média \pm S.E.M. de 8 animais por grupo. #P<0.05 comparado com o grupo salina + veículo. *** P<0.01; ** P<0.01; *P<0.05 comparado com o grupo veículo + LPS

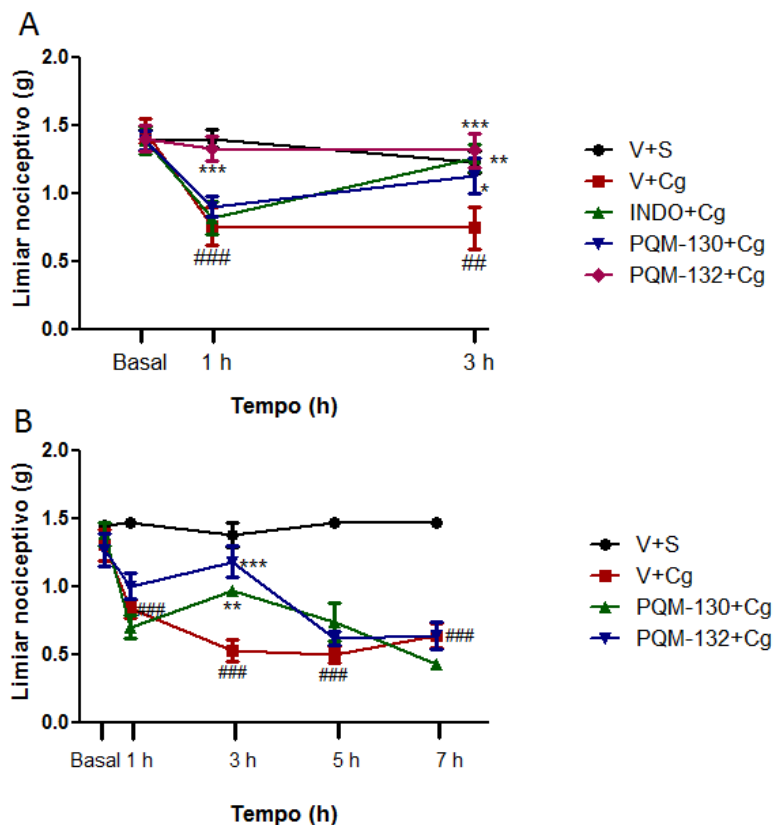
Fonte: do autor

4.4.4 Ensaio de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina – Teste de Von Frey

Em seguida, os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) foram avaliados quanto à sua capacidade para interferir na hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina (teste de Von Frey). Neste modelo, avaliou-se a sensibilidade dos animais a um estímulo mecânico, após a indução de hiperalgesia por uma injeção intraplantar de carragenina. A indução de hipernocicepção por carragenina ocorre por meio de ativação da cascata de citocinas que conduz à liberação de mediadores inflamatórios (prostaglandinas), que provocam a ativação de fibras A δ e C de terminações nervosas sensoriais, aumentando o fluxo local e a permeabilidade vascular através da liberação de substância P e neuroquinina A.

O limiar de nocicepção dos animais foi medido pela intensidade da força aplicada na pata necessária para obter uma resposta reflexa (movimento de retirada da pata). Os resultados demonstrados nas Figuras 52A e 52B evidenciam que a administração de carragenina acarretou em um efeito hiperalgésico com o pico do efeito na 3 hora após a administração intraplantar. Na figura 52A, é possível observar que os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) exibiram um efeito antinociceptivo significativo após a 3 hora de tratamento. O composto PQM-130 (**27a**) mostrou efeito muito similar ao observado para a indometacina, utilizada como controle positivo. Além disso, PQM-132 (**27c**) demonstrou ser mais ativo durante todo o período do experimento, com uma maior amplitude de significância estatística relacionada com o grupo indometacina e veículo. Tal como representado na Figura 52B, ambos os compostos exibiram a atividade anti-inflamatória máxima 3 horas após o tratamento, com uma diminuição rápida na sua eficácia após esse tempo.

Figura 52 - Efeitos dos compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) a 100 $\mu\text{mol/kg}$ (p.o) ou indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$ p.o.) na hipernociceção induzida por injeção intraplantar de carragenina (100 $\mu\text{g/pata}$) até 3ª hora (Figura A) e até 7ª hora (Figura B).



Nota: Cada barra representa a média \pm S.E.M. de 8 animais. ### $P < 0.001$ comparado com o grupo salina + veículo. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ comparado com o grupo veículo + LPS.

Fonte: do autor

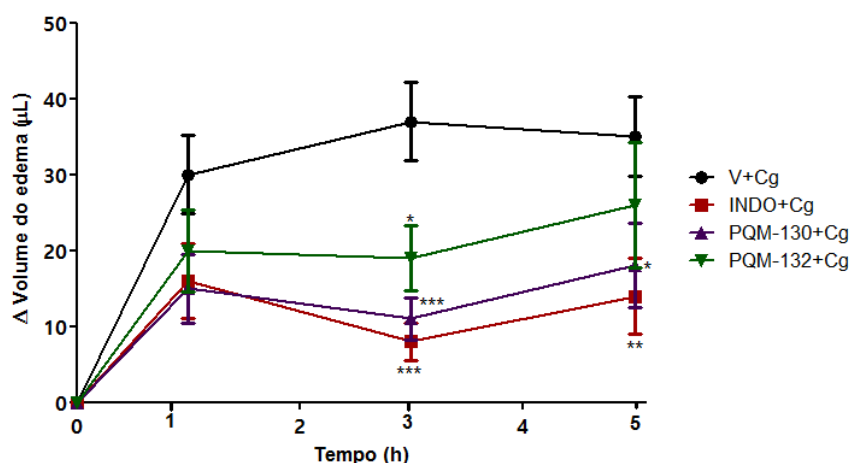
4.4.5 Ensaio de edema de pata em camundongos induzido por carragenina

Com o objetivo de confirmar o efeito anti-inflamatório dos compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) foi realizado o ensaio de edema da pata de camundongos induzido por carragenina. Neste modelo, o desenvolvimento de edema induzido por carragenina é um evento bifásico. A fase precoce (1-2 horas) é mediada principalmente por histamina, serotonina e bradicinina, seguido por uma fase tardia (3-6 h), sustentada pela liberação de prostaglandinas e

NO produzido pela isoforma indutível da ciclooxigenase (COX-2) e NO-sintase (iNOS) (SANTA-CECÍLIA et al., 2011), (SEIBERT et al., 1994).

Neste ensaio, os compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) promoveram um significativo decréscimo na formação do edema de pata induzido pela carragenina em comparação com o grupo veículo (Figura 53). Os perfis inibitórios de ambos os compostos foram similares ao da indometacina, mostrando o efeito máximo na 3^a hora, com uma potência mais elevada para o composto PQM-130 (**27a**). O mecanismo de ação da indometacina é dado por meio do bloqueio da COX e, por sua vez, impede a biossíntese de prostaglandinas.

Figura 53 - Efeito dos compostos PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) a 100 $\mu\text{mol/kg}$ (p.o), indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$, p.o.) ou veículo (salina + DMSO 2%) no edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina (400 $\mu\text{g/pata}$).



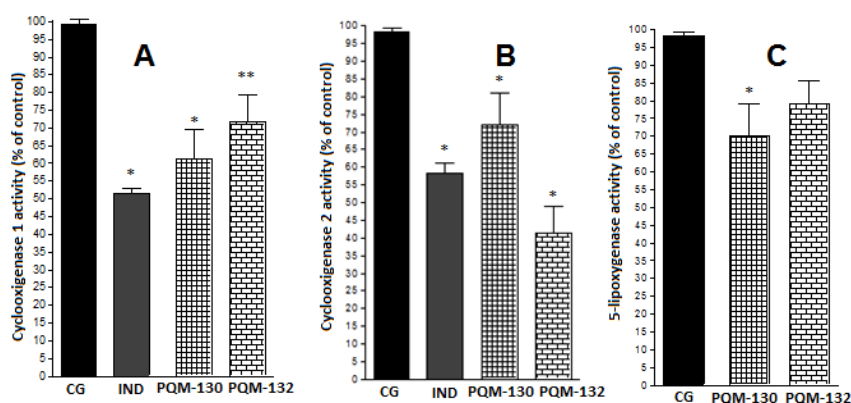
Nota: Cada ponto representa a média \pm S.E.M de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância quando comparado com o grupo controle (veículo + carragenina): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fonte: do autor

4.4.6 Avaliação *in vivo* da expressão de COX-1, COX-2 e 5-LOX

Vários estudos sugerem que a subunidade farmacofórica derivados de curcumina pode exibir efeitos anti-inflamatórias através da inibição da ciclooxigenase 1 (COX-1), e 2 (COX-2) e 5-lipooxigenase (5-LOX) (CHINTHALAPALLY, 2015). Neste contexto e diante dos resultados observados nos ensaios anti-inflamatórios *in vivo* foi avaliada a capacidade dos compostos de PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) para inibir a atividade da COX-1, COX-2 e 5-LOX de camundongos tratados com os compostos e carragenina. A atividade de inibição de COX-1, COX-2 e 5-LOX foi medida no soro sanguíneo de camundongos, usando ensaio de imunossorvente ligado à enzima. Como demonstrado na Figura 54, os compostos PQM-130 (27a), PQM-132 (27c) e a indometacina, diminuíram significativamente a atividade de COX-1 (percentagem de inibição, 40%, 30% e 50%, respectivamente) e COX-2 (27%, 60% e 42%, respectivamente); por outro lado, apenas PQM-130 (27a) apresentou a capacidade para inibir a atividade da 5-LOX (30%). Diante destes resultados, pode-se observar que dentre os compostos estudados, PQM-130 (27a) demonstrou um perfil de atividade inibidora da expressão sobre a COX-1, COX-2 e 5-LOX, corroborando seu efeito anti-inflamatório evidenciado *in vivo*.

Figura 54 - Efeito dos compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) na expressão de COX-1, COX-2 e 5-LOX em camundongos tratados com carragenina



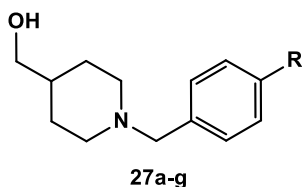
Nota: Camundongos foram tratados com os compostos PQM-130 (27a) e PQM-132 (27c) (100 $\mu\text{mol/kg}$, p.o) e indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$, p.o.) 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina (400 $\mu\text{g/pata}$). Após 3 h, a atividade de COX-1, COX-2 e 5-LOX foi determinada como reportada na parte experimental. Valores foram expressos como médias \pm SEM (n=8) (*P<0.05 comparado com o grupo carragenina; **P<0.01 comparado com o grupo carragenina e indometacina).

Fonte: do autor

5 PARTE EXPERIMENTAL

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro da marca BRUKER AC-300 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em CDCl_3 ou DMSO-D_6 , utilizando como referência interna o TMS. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofotômetro FT-IR Thermo Scientific® modelo Nicolet iS50 com ATR do Laboratório de Fármacos e Medicamentos da UNIFAL-MG. As faixas de fusão dos produtos foram obtidas utilizando-se equipamento Buchi 535, sem correção. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas folhas cromatográficas de sílica gel, UV254, na espessura de 0,2 μ , em suporte de alumínio. Os solventes utilizados foram de grau P.A, tratados adicionalmente segundo a literatura (PERRIM, 1988), quando necessário. As purificações em coluna cromatográfica, quando necessárias, foram realizadas em colunas de vidro de diferentes diâmetros e comprimentos, utilizando como fase estacionária gel de sílica 70-230 mesh e sistemas eluentes de natureza e gradientes de concentração diversos. A pureza dos produtos finais foi obtida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no aparelho Thermo Scientific Ultimate 3000, com coluna ODS- 2 Hypersil (4,6 mm x 250 mm) e detector SPD-M20A (Diode Array).

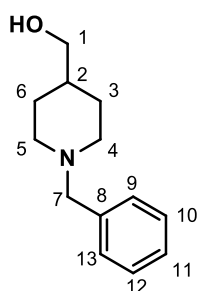
5.1 PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS DERIVADOS AMINOBENZÍLICOS



Em um balão monotubulado de 50 mL foram adicionados 1,2 eq. de 4-piperidinometanol e 1 eq. dos benzaldeídos funcionalizados, em 10 mL de metanol seco e peneira molecular 3A°. O pH da solução foi ajustado para ~ 6 utilizando-se ácido acético glacial. O sistema foi mantido sob agitação magnética, em temperatura ambiente, por duas horas. Após esse período, foi adicionado à solução 1 eq. de NaBH_3CN e o sistema reacional foi mantido por 48 horas em temperatura ambiente. Ao final da reação, o solvente foi removido e adicionou-se 20 mL de água destilada e então foi realizada uma extração ácido-base, a mistura reacional foi acidificada com HCl 10M a $\text{pH} \sim 3$ e extraído com AcOEt (3x 30mL) em seguida alcalinizada a $\text{pH} \sim 12$ com NaOH 10M. A fase aquosa alcalina foi extraída com AcOEt (3 x 30 mL). As fases orgânicas

extraídas da fase aquosa alcalinizada foram combinadas, seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna (CC).

5.1.1 Dados de caracterização dos derivados aminobenzílico



Nome do composto: *N*-benzil-4-piperidinometanol (**27a**)

F.M.: $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}$

M.M.: 205,15

Característica: óleo incolor

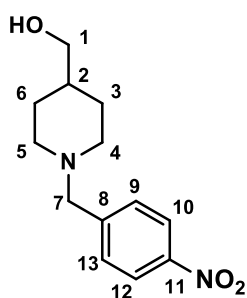
Rendimento: 76%

IV-ATR (ν_{max} , cm^{-1}): 3336, 3085, 2915, 1597, 1494, 1451, 1040, 1257, 738,

697.

RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz): 7,23-7,31 (m, 4H, H_{9-13}), 3,50 (s, 2H, H_7), 3,45 (d, 2H, $J=6,3$ Hz, H_1), 2,87-2,94 (m, 2H, H_4 e H_5), 1,96 (t, $J=11,7$ Hz, 2H, H_4' e H_5'), 1,66-1,72 (m, 2H, H_3 e H_6), 1,42-1,55 (m, 1H, H_2), 1,28 (qd, 2H, H_3' e H_6').

RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75 MHz): 137,7 (C_8), 129,4 (C_9 e C_{13}), 128,1 (C_{10} e C_{12}), 127,0 (C_{11}), 67,3 (C_1), 63,4 (C_7), 53,3 (C_4 e C_5), 38,3 (C_2), 28,6 (C_3 e C_6).



Nome do composto: *N*-4-nitrobenzil-4-piperidinometanol (**27b**)

FM.: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$

M.M.: 250,13

Característica: sólido amarelo intenso

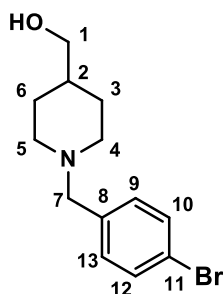
PF: 128-130°C

Rendimento: 70%

IV-ATR (ν_{max} , cm^{-1}): 3306, 3103, 2945, 1604, 1511, 1036, 1252, 1347, 849.

RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz): 8,17 (d, 2H, $J=9,0$ Hz, H_{10} e H_{12}), 7,51 (d, 2H, $J=8,2$ Hz, H_9 e H_{13}), 3,58 (s, 2H, H_7), 3,51 (d, 2H, $J=6,3$ Hz, H_1), 2,85-2,88 (m, 2H, H_4 e H_5), 1,98-2,07 (m, 2H, H_4' e H_5'), 1,71-1,74 (m, 2H, H_3 e H_6), 1,45-1,60 (m, 1H, H_2), 1,27-1,37 (m, 2H, H_3' e H_6').

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 147,1 (C₁₁), 146,8 (C₈), 146,8 (C₈), 129,5 (C₁₀ e C₁₂), 123,5 (C₉ e C₁₃), 67,8 (C₁), 62,5 (C₇), 53,6 (C₄ e C₅), 38,3 (C₂), 28,8 (C₃ e C₆).



Nome do composto: *N*-4-bromobenzil-4-piperidinometanol (**27c**)

F.M.: C₁₃H₁₈BrNO

M.M.: 283,06

Característica: óleo amarelo claro

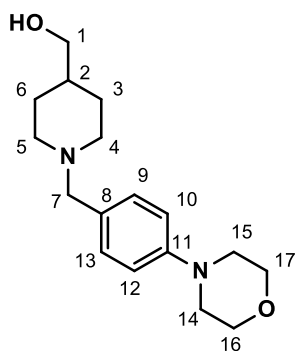
Rendimento: 70%

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3343, 3054, 2932, 1592, 1490, 1241, 1036, 1013,

803.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,43 (d, 2H, $J=8,5$ Hz, H₁₀ e H₁₂), 7,20 (d, 2H, $J=8,5$ Hz, H₉ e H₁₃), 3,48 (d, 2H, $J=6,4$ Hz, H₁), 3,45 (s, 2H, H₇), 2,85-2,92 (m, 2H, H₄ e H₅), 1,92-2,00 (m, 2H, H_{4'} e H_{5'}), 1,68-1,73 (m, 2H, H₃ e H₆), 1,42-1,56 (m, 1H, H₂), 1,21-1,36 (m, 2H, H_{3'} e H_{6'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 137,3 (C₈), 130,9 (C₉ e C₁₃), 131,3 (C₁₀ e C₁₂), 120,8 (C₁₁), 67,8 (C₁), 62,6 (C₇), 53,3 (C₄ e C₅), 38,4 (C₂), 28,6 (C₃ e C₆).



Nome do composto: *N*-4-morfolinobenzil-4-piperidinometanol (**27d**)

F.M.: C₁₇H₂₆N₂O₂

M.M.: 290,2

Característica: sólido amarelo claro

Rendimento: 80%

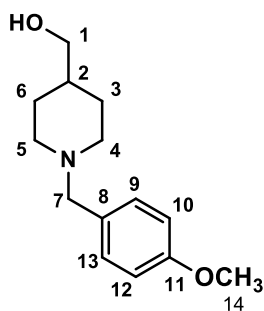
PF: 121-125°C

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3380, 3041, 2921, 1611, 1515, 1449, 1114,

924.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,22 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H₁₀ e H₁₂), 6,86 (d, 2H, $J=8,7$ Hz, H₉ e H₁₃), 3,86 (t, $J=9,6$ Hz, 2H, H₁₄ e H₁₇), 3,48 (d, 2H, $J=6,3$ Hz, H₁), 3,44 (s, 2H, H₇), 3,15 (t, $J=9,6$ Hz, 2H, H₁₅ e H₁₆), 2,89-2,93 (m, 2H, H₄ e H₅), 1,91-1,99 (m, 2H, H_{4'} e H_{5'}), 1,67-1,73 (m, 2H, H₃ e H₆), 1,43-1,53 (m, 1H, H₂), 1,22-1,35 (m, 2H, H_{3'} e H_{6'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 124,6 (C₈), 131,3 (C₉ e C₁₃), 115,2 (C₁₀ e C₁₂), 151,0 (C₁₁), 66,5 (C₁), 66,7 (C₁₅ e C₁₆), 61,2 (C₇), 52,1 (C₄ e C₅), 48,9 (C₁₄ e C₁₇), 37,5 (C₂), 27,2 (C₃ e C₆).



Nome do composto: *N*-4-metoxibenzil-4-piperidinometanol (**27e**)

F.M. C₁₄H₂₁NO₂

M.M.: 235,16

Característica: óleo amarelo claro

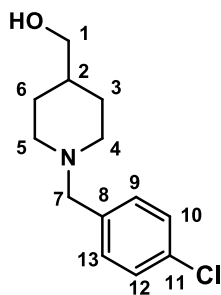
Rendimento: 80%

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3361, 3072, 2926, 1611, 1511, 1244, 1034, 1178

851.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,22 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H₉ e H₁₃), 6,84 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H₁₀ e H₁₂), 3,45 (d, 2H, *J*= 6,4 Hz, H₁), 3,44 (s, 2H, H₇), 3,79 (s, 3H, H₁₅), 2,86-2,92 (m, 2H, H₄ e H₅), 1,93 (t, *J*=11,7, 2H, H_{4'} e H_{5'}), 1,66-1,72 (m, 2H, H₃ e H₆), 1,41-1,53 (m, 1H, H₂), 1,20-1,33 (m, 2H, H_{3'} e H_{6'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 159,2 (C₁₁), 126,9 (C₈), 131,3 (C₉ e C₁₃), 113,8 (C₁₀ e C₁₂), 66,6 (C₁), 61,6 (C₇), 52,5 (C₄ e C₅), 55,22 (C₁₄), 37,7 (C₂), 27,6 (C₃ e C₆).



Nome do composto: *N*-4-clorobenzil-4-piperidinometanol (**27f**)

F.M.: C₁₃H₁₈ClNO

M.M.: 239,11

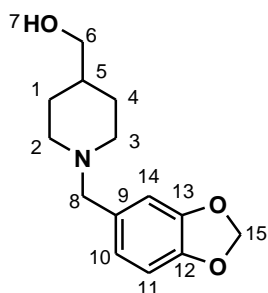
Característica: óleo amarelo claro

Rendimento: 75%

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3319, 3052, 2919, 1255, 1489, 1086, 1039.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,20-7,29 (m, 4H, H₉, H₁₀, H₁₂ e H₁₃), 3,42 (s, 2H, H₇), 3,39 (d, 2H, *J*= 6.3 Hz, H₁), 2,80-2,85 (m, 2H, H₄ e H₅), 1,87-1,95 (m, 2H, H_{4'} e H_{5'}), 1,62-1,68 (m, 2H, H₃ e H₆), 1,36-1,45 (m, 1H, H₂), 1,16-1,29 (m, 2H, H_{3'} e H_{6'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 136,3 (C₈), 132,7 (C₁₁), 130,6 (C₁₀, C₁₂), 128,2 (C₉ e C₁₃), 67,2 (C₁), 62,5 (C₇), 53,2 (C₄ e C₅), 38,2 (C₂), 28,5 (C₃ e C₆).



Nome do composto: *N*-(benzo-1,3-dioxol-5-il-metil)

piperidinometanol (**27g**)

F.M.: C₁₄H₁₉NO₃

M.M.: 249,14

Característica: óleo incolor

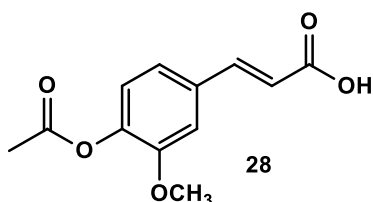
Rendimento: 87 %

IV (ν_{max} , cm⁻¹): 3369, 3068, 2943, 1502, 1491, 1441, 1209, 1243, 1033, 925.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 6,86 (s, 1H, H₉), 6,74 (s, 2H, H₁₂ e H₁₃), 5,93 (s, 2H, H₁₄), 3,43 (s, 2H, H₇), 3,48 (d, 2H, *J*= 7.2 Hz, H₁), 2,88-2,94 (m, 2H, H₄ e H₅), 1,92-2,01 (m, 2H, H_{4'} e H_{5'}), 1,68-1,73 (m, 2H, H₃ e H₆), 1,23-1,36 (m, 2H, H_{3'} e H_{6'}), 1,43-1,55 (m, 1H, H₂).

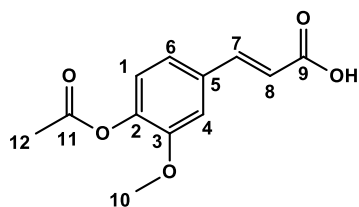
RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 131,7 (C₈), 109,7 (C₉), 147,6 (C₁₀), 146,6 (C₁₁), 107,8 (C₁₂), 122,5 (C₁₃), 100,8 (C₁₄), 67,7 (C₁), 63,0 (C₇), 53,2 (C₄ e C₅), 38,4 (C₂), 28,6 (C₃ e C₆).

5.2 REAÇÃO DE PROTEÇÃO DA HIDROXILA FENÓLICA DO ÁCIDO FERÚLICO



Em um balão monotubulado foi adicionado 1,0 eq. do ácido ferúlico em uma solução de NaOH (2,5q.), a solução foi mantida em banho de gelo em temperatura abaixo de 10°C. Em seguida, lentamente adicionou-se 2,5 eq. de Ac₂O. Após a adição de

Ac₂O a reação permaneceu por três horas em temperatura ambiente. Após esse período a mistura reacional foi novamente resfriada a 0 °C e neutralizada com HCl 2M. O precipitado foi filtrado e purificado por recristalização em etanol.

5.2.1 Dados de caracterização do composto **28**

Nome do composto: Ácido (*E*)-4-acetilóxi-3-metoxicinâmico

F.M.: C₁₂H₁₂O₅

M.M.: 236,22

Característica: sólido branco

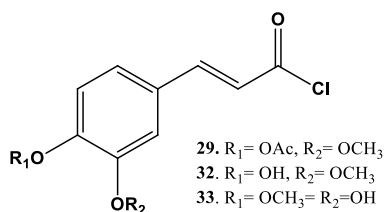
PF: 198-201°C

Rendimento: 98%

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3011, 2841, 1757, 1679, 1629, 1600, 1506, 1469, 854, 647

RMN ¹H (δ , CDCl₃, **300 MHz**): 12,41 (s, 1H, H₁₂), 7,59 (d, *J*=15,9, 1H, H₇), 7,49 (d, *J*=1,8, 1H, H₄), 7,27 (dd, *J*=8,2 e 1,8, 1H, H₆), 7,12 (d, *J*=8,2, 1H, H₁), 6,60 (d, *J*=15,9, 1H, H₈), 3,83 (s, 3H, H₁₃), 2,27 (s, 3H, H₁₂).

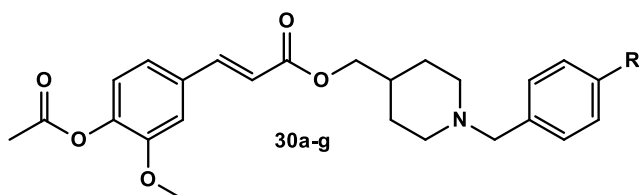
RMN ¹³C (δ , CDCl₃, **75 MHz**): 168,9 (C₉), 168,0 (C₁₁), 151,6 (C₃), 143,8 (C₇), 141,3 (C₂), 133,7 (C₅), 123,6 (C₁), 121,8 (C₆), 120,0 (C₈), 112,3 (C₄), 56,4 (C₁₃), 20,84 (C₁₂).

5.3 PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS **29**, **32** E **33**

Em um balão monotubulado foi adicionado 1,0 eq. do ácido ferúlico ou ácido *iso*-ferúlico ou ácido ferúlico acetilado em 15 mL de CH₂Cl₂ seco seguido da adição de 10 eq. de SOCl₂ e 25 μL de DMF. A reação permaneceu em t.a. em atmosfera de

N₂ por 2 horas. Após esse período, o solvente foi rotaevaporado e o produto obtido foi lavado com CH₂Cl₂ seco até a obtenção de um sólido amarelo.

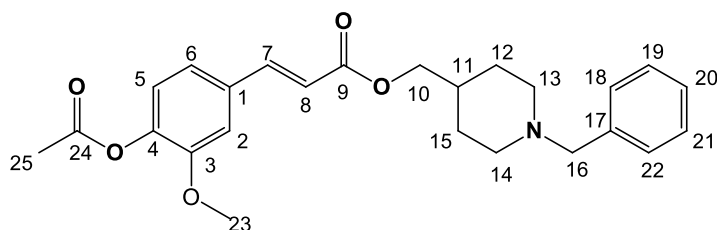
5.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ÉSTERES ACETILADOS **30a-g**



Em um balão monotubulado foram adicionados 1 eq. do cloreto ácido ferúlico acetilado (**29**) e 1 eq. dos intermediários *N*-benzil piperidínicos substituídos (**27a-g**)

em 10 mL de CH₂Cl₂ seco. Após 15 minutos o solvente foi rotaevaporado e o produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica.

5.4.1 Dados de caracterização dos compostos **30a-g**



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-benzilpiperidin-4-il)metil 3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30a**)

Característica: óleo viscoso amarelo claro

Rendimento: 70%

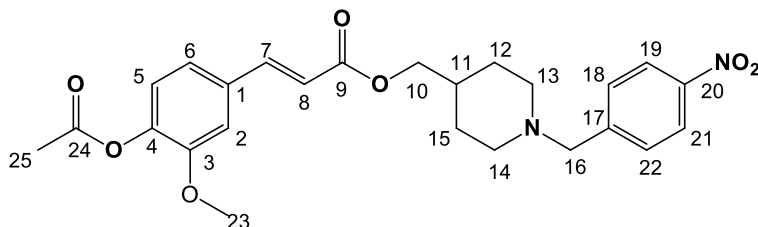
F.M.: C₂₅H₂₉NO₅

M.M.: 423,20

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,63 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,32 (m, 5H, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁ e H₂₂), 7,17 (dd, 1H, *J*=7,5 e 1,2, H₆), 7,23 (d, 1H, *J*=1,2, H₂), 6,80 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,27 (d, 1H, *J*=15,1, H₈), 4,07 (d, 2H, *J*=6,8, H₁₀), 3,86 (s, 3H, H₂₃), 2,32 (s, 3H, H₂₅), 3,47 (s, 2H, H₁₆), 2,84-2,89 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,87-2,00 (m, 2H, H_{13'} e H_{14'}), 1,72-1,78 (m, 2H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,38-1,47 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 168,8 (C₂₄), 167,2 (C₉), 151,4 (C₃), 141,4 (C₄), 144,1 (C₇), 127,11 (C₁), 133,3 (C₁₇), 130,0 (C₁₈ e C₂₂), 129,2 (C₁₉ e C₂₁), 128,5 (C₂₀), 121,2 (C₆), 118,0 (C₈).

123,24 (C₅), 111,29 (C₂), 68,3 (C₁₀), 62,4 (C₁₆), 55,9 (C₂₃), 52,3 (C₁₃ e C₁₄), 35,4 (C₁₁), 28,1 (C₁₂ e C₁₅), 20,65 (C₂₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30b**)

Característica: óleo viscoso amarelo intenso

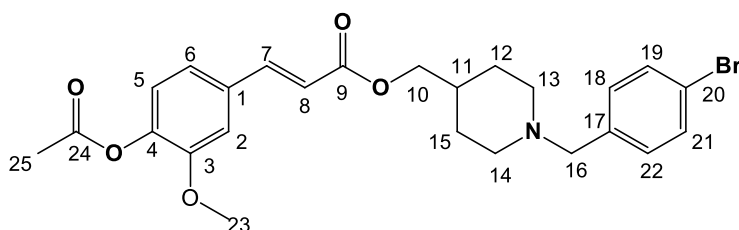
Rendimento: 65%

F.M.: C₂₅H₂₈N₂O₇

M.M.: 468,19

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 8,15 (d, 2H, *J*=8,5, H₁₉, H₂₁), 7,58 (d, 1H, *J*=15,5, H₇), 7,46 (d, 2H, *J*=8,7, H₁₈ e H₂₂), 7,15 (dd, 1H, *J*= 8,0 e 1,8, H₆), 7,21 (d, 1H, *J*=1,8, H₂), 6,83 (d, 1H, *J*=8,0, H₅), 6,26 (d, 1H, *J*=15,5, H₈), 4,05 (d, 2H, *J*=6,0, H₁₀), 3,87 (s, 3H, H₂₃), 2,32 (s, 3H, H₂₅), 3,49 (s, 2H, H₁₆), 2,82-2,86 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,99-2,03 (m, 1H, H₁₃ e H₁₄), 1,70-1,74 (m, 1H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,33-1,45 (m, 2H, H₁₂ e H₁₅).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,4 (C₉), 167,2 (C₂₄), 151,5 (C₃), 145,2 (C₁₇), 146,9 (C₂₀), 142,6 (C₄), 144,9 (C₇), 127,0 (C₁), 130,2 (C₁₉ e C₂₁), 123,9 (C₁₈ e C₂₂), 122,3 (C₆), 116,5 (C₈), 123,0 (C₅), 111,6 (C₂), 68,7 (C₁₀), 62,5 (C₁₆), 56,1 (C₂₃), 53,5 (C₁₃ e C₁₄), 35,4 (C₁₁), 29,1 (C₁₂ e C₁₅), 21,3 (C₂₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30c**)

Característica: óleo viscoso incolor

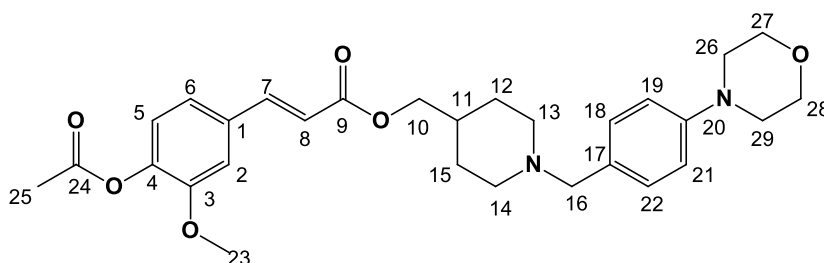
Rendimento: 75%

F.M.: C₂₅H₂₈BrNO₅

M.M.: 501,12

RMN ^1H (δ , CDCl_3 , **300 MHz**): 7,61 (d, 1H, $J=15,9$, H_7), 7,40 (d, 2H, $J=8,3$, H_{19} e H_{21}), 7,21 (d, 2H, $J=8,4$, H_{18} e H_{22}), 7,18 (dd, 1H, $J=8,3$ e $2,0$, H_6), 7,23 (d, 1H, $J=2,0$, H_2), 6,85 (d, 1H, $J=7,5$, H_5), 6,31 (d, 1H, $J=15,9$, H_8), 4,05 (d, 2H, $J=6,0$, H_{10}), 3,45 (s, 2H, H_{16}), 3,89 (s, 3H, H_{23}), 2,33 (s, 3H, H_{25}), 2,83-2,92 (m, 2H, H_{13} e H_{14}), 1,96-2,01 (m, 1H, $\text{H}_{13'}$ e $\text{H}_{14'}$), 1,61-1,74 (m, 1H, H_{11} , H_{12} e H_{15}), 1,42-1,46 (m, 2H, $\text{H}_{12'}$ e $\text{H}_{15'}$).

RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , **75 MHz**): 168,8 (C_{24}), 167,2 (C_9), 151,3 (C_3), 142,1 (C_4), 144,6 (C_7), 135,7 (C_{17}), 131,2 (C_{19} e C_{21}), 131,2 (C_{18} e C_{22}), 127,1 (C_1), 122,2 (C_6), 120,1 (C_{20}), 116,9 (C_8), 123,9 (C_5), 111,8 (C_2), 68,3 (C_{10}), 62,1 (C_{16}), 53,8 (C_{13} e C_{14}), 55,7 (C_{23}), 34,9 (C_{11}), 28,6 (C_{12} e C_{15}), 21,0 (C_{25}).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-morfolinobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30d**)

F.M.: $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$

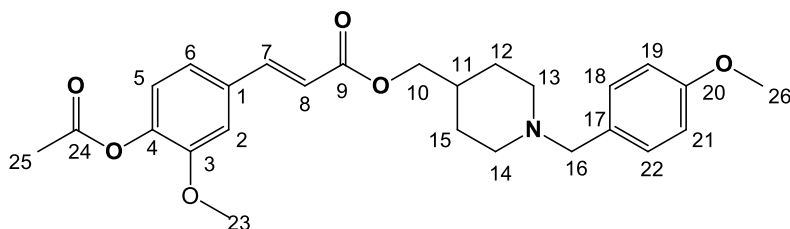
M.M.: 508,61

Característica: óleo viscoso incolor

Rendimento: 78%

RMN ^1H (δ , CDCl_3 , **300 MHz**): 7,59 (d, 1H, $J=15,1$, H_7), 7,11-7,18 (m, 3H, H_6 , H_{18} e H_{22}), 7,24 (d, 1H, $J=1,4$, H_2), 6,89 (d, 1H, $J=8,3$, H_5), 6,82 (d, 2H, $J=7,5$, H_{19} e H_{21}), 6,32 (d, 1H, $J=15,1$, H_8), 4,06 (d, 2H, $J=6,5$, H_{10}), 3,85 (s, 3H, H_{23}), 3,74 (t, 4H, $J=4,7$, H_{26} e H_{27}), 3,16 (t, 4H, $J=4,6$, H_{25} e H_{28}), 3,46 (s, 2H, H_{16}), 2,32 (s, 3H, H_{25}), 2,89-2,93 (m, 2H, H_{13} e H_{14}), 1,95-2,0 (m, 1H, $\text{H}_{13'}$ e $\text{H}_{14'}$), 1,68-1,63 (m, 3H, H_{11} , H_{12} e H_{15}), 1,32-1,46 (m, 2H, $\text{H}_{12'}$ e $\text{H}_{15'}$).

RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , **75 MHz**): 168,3 (C_{24}), 167,5 (C_9), 150,5 (C_{20}), 151,6 (C_3), 141,9 (C_4), 145,0 (C_7), 131,0 (C_{17}), 129,2 (C_{18} e C_{22}), 127,8 (C_1), 122,2 (C_6), 116,3 (C_8), 122,5 (C_5), 115,2 (C_{19} e C_{21}), 110,9 (C_2), 68,5 (C_{10}), 67,0 (C_{25} e C_{26}), 62,1 (C_{16}), 52,9 (C_{13} e C_{14}), 49,1 (C_{24} e C_{27}), 56,3 (C_{23}), 35,2 (C_{11}), 28,6 (C_{12} e C_{15}), 21,5 (C_{25}).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-metoxibenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30e**)

F.M.: C₂₆H₃₁NO₆

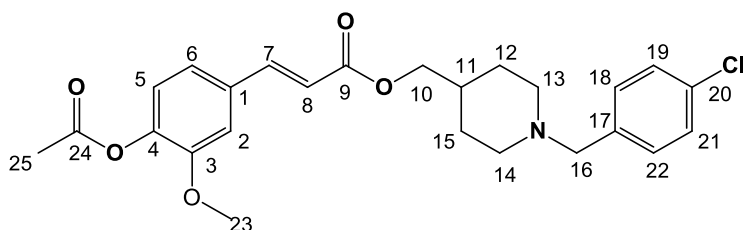
M.M.: 453,22

Característica: óleo viscoso amarelo claro

Rendimento: 60%

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,59 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,29 (d, 2H, *J*=7,2, H₁₈ e H₂₂), 7,15 (dd, 1H, *J*= 7,5 e 1,8, H₆), 7,21 (d, 1H, *J*=1,8, H₂), 6,87 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,94 (d, 2H, *J*=7,2, H₁₉ e H₂₁), 6,39 (d, 1H, *J*=15,1 H₈), 4,06 (d, 2H, *J*=6,5, H₁₀), 3,87 (s, 3H, H₂₃), 3,77 (s, 3H, H₂₆), 3,56 (s, 2H, H₁₆), 2,35 (s, 3H, H₂₅), 2,92-2,94 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,98-2,05 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,73-1,78 (m, 1H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,42-1,49 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 168,2 (C₂₄), 167,5 (C₉), 158,2 (C₂₀), 151,1 (C₃), 142,6 (C₄), 144,8 (C₇), 130,5 (C₁₈ e C₂₂), 126,9 (C₁), 127,0 (C₁₇), 122,0 (C₆), 116,4 (C₈), 123,8 (C₅), 113,6 (C₁₉ e C₂₁), 111,4 (C₂), 68,1 (C₁₀), 62,9 (C₁₆), 55,1 (C₂₃), 55,8 (C₂₆), 52,9 (C₁₃ e C₁₄), 35,1 (C₁₁), 28,9 (C₁₂ e C₁₅), 20,71 (C₂₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30f**)

Característica: óleo viscoso amarelo claro

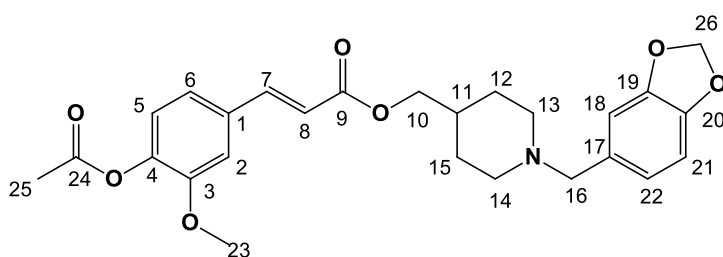
Rendimento: 75%

F.M.: C₂₅H₂₈ClNO₅

M.M.: 415,16

RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz): 7,59 (d, 1H, $J=15,9$, H_7), 7,17-7,27 (d, 6H, H_2 , H_6 , H_{18} , H_{19} , H_{21} e H_{22}), 6,86 (d, 1H, $J=8,5$, H_5), 6,38 (d, 1H, $J=15,9$, H_8), 4,07 (d, 2H, $J=6,5$, H_{10}), 3,85 (s, 3H, H_{23}), 3,52 (s, 2H, H_{16}), 2,34 (s, 3H, H_{25}), 2,86-2,90 (m, 1H, H_{13} e H_{14}), 1,96-2,02 (m, 2H, $\text{H}_{13'}$ e $\text{H}_{14'}$), 1,71-1,75 (m, 2H, H_{11} , H_{12} e H_{15}), 1,34-1,45 (m, 2H, $\text{H}_{12'}$ e $\text{H}_{15'}$).

RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75 MHz): 168,3 (C_{24}), 167,7 (C_9), 151,6 (C_3), 141,3 (C_4), 144,9 (C_7), 135,5 (C_{17}), 132,9 (C_{20}), 130,8 (C_{18} e C_{22}), 128,5 (C_{19} e C_{21}), 127,5 (C_1), 122,2 (C_6), 116,3 (C_8), 124,1 (C_5), 111,8 (C_2), 68,8 (C_{10}), 62,7 (C_{16}), 55,6 (C_{24}), 52,3 (C_{13} e C_{14}), 35,6 (C_{11}), 28,3 (C_{12} e C_{15}), 20,41, (C_{25}).



Nome do composto: Acrilato (*E*)-(1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)piperidin-4-il)metil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) (**30g**)

Característica: óleo viscoso incolor

PF: 198-201°C

Rendimento: 80%

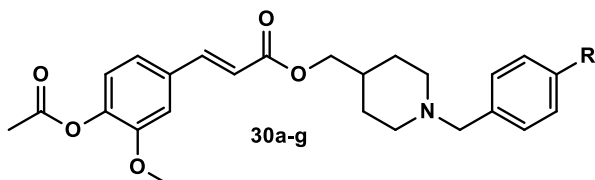
F.M.: $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_7$

M.M.: 467,19

RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz): 7,58 (d, 1H, $J=15,0$, H_7), 7,16 (dd, 1H, $J=8,5$ e $1,9$, H_6), 7,22 (d, 1H, $J=1,9$, H_2), 6,88 (d, 1H, $J=7,5$, H_5), 6,86 (s, 1H, H_{18}), 6,78 (m, H_{21} e H_{22}), 6,39 (d, 1H, $J=15,0$, H_8), 5,96 (s, 2H, H_{26}), 4,05 (d, 2H, $J=6,0$, H_{10}), 3,85 (s, 3H, H_{23}), 3,53 (s, 2H, H_{16}), 2,35 (s, 3H, H_{25}), 2,85-2,90 (m, 2H, H_{13} e H_{14}), 1,96-2,03 (m, 1H, $\text{H}_{13'}$ e $\text{H}_{14'}$), 1,71-1,75 (m, 3H, H_{11} , H_{12} e H_{15}), 1,35-1,47 (m, 2H, $\text{H}_{12'}$ e $\text{H}_{15'}$).

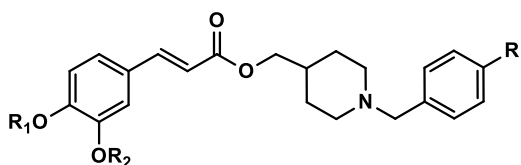
RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75 MHz): 168,8 (C_{24}), 167,2 (C_9), 151,9 (C_3), 142,6 (C_4), 147,0 (C_{19}), 146,75 (C_{20}), 145,0 (C_7), 132,39 (C_{17}), 127,94 (C_1), 121,15 (C_6), 122,43 (C_{22}), 116,66 (C_8), 123,00 (C_5), 100,95 (C_{24}), 111,8 (C_2), 109,8 (C_{21}), 107,6 (C_{18}), 69,7 (C_{10}), 62,75 (C_{16}), 55,8 (C_{23}), 52,0 (C_{13} e C_{14}), 34,3 (C_{11}), 29,60 (C_{12} e C_{15}), 20,34 (C_{25}).

5.5 REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA HIDROXILA FENÓLICA DOS ÉSTERES ACETILADOS



Em um balão monotubulado foram adicionados 1 eq. dos ésteres acetilados (**30a-g**) em 10 mL de metanol seco. Adicionou-se à mistura reacional 1,1 eq. de magnésio metálico e a atmosfera do balão foi substituída por N₂. Após 30 min, uma branda reação exotérmica é observada, com desprendimento de H₂. A reação foi mantida por 3 horas, sob agitação magnética, em atmosfera inerte. No final da reação adicionou-se água. As fases orgânicas foram combinadas, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna (CC).

5.6 OBTENÇÃO DA SÉRIE DE HÍBRIDOS FERULOIL-DONEPEZIL **27a-g** E **28a-g**

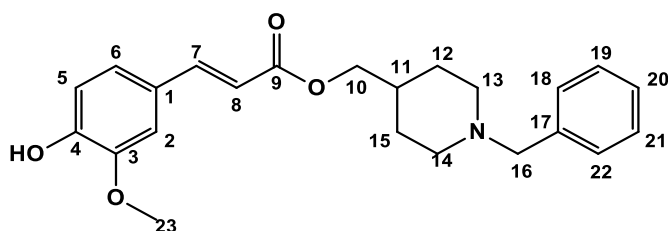


31 a-g R₁= H e R₂=OCH₃

34 a-g R₁= OCH₃ e R₂=OH

Em um balão monotubulado foram adicionados 1 eq. do cloreto ácido ferúlico (**29**) ou 1 eq. do cloreto do ácido *iso*-ferúlico e 1 eq. dos intermediários *N*-benzil piperidínicos substituídos (**27a-g**) em 10 mL de CH₂Cl₂ seco. Após 15 minutos o solvente foi rotaevaporado e o produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica

5.6.1 Dados de caracterização dos ésteres híbridos feruloil-donepezil **27a-g** e **28a-g**



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-benzilpiperidin-4-il)metil 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-130 (27a)

F.M.: C₂₃H₂₇NO₄

M.M.: 381,19

Característica: sólido amarelo

PF: 110-113°C

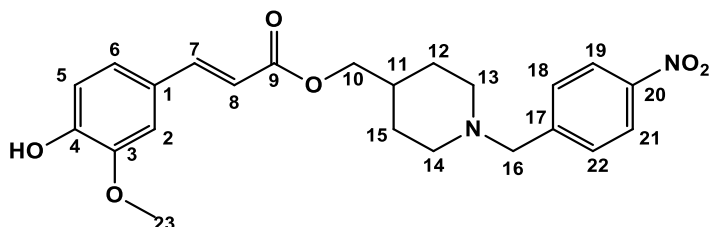
Rendimento: 68%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 382.20205 (calc. 382,20183)

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3422, 3062, 2937, 1703, 1631, 1588, 1510, 1451, 1281, 1029, 1154.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,60 (d, 1H, *J*=15,9, H₇), 7,30-7,31 (m, 5H, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁ e H₂₂), 7,04 (dd, 1H, *J*=8,2 e 1,8, H₆), 7,01 (d, 1H, *J*=1,8, H₂), 6,88 (d, 1H, *J*=8,1, H₅), 6,27 (d, 1H, *J*=15,9, H₈), 4,06 (d, 2H, *J*=6,0, H₁₀), 3,89 (s, 3H, H₂₃), 3,53 (s, 2H, H₁₆), 2,93-2,97 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,97-2,05 (m, 2H, H_{13'} e H_{14'}), 1,71-1,76 (m, 2H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,40-1,49 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 167,3 (C₉), 148,2 (C₃), 147,0 (C₄), 144,8 (C₇), 137,8 (C₁₇), 129,4 (C₁₈ e C₂₂), 128,2 (C₁₉ e C₂₁), 127,1 (C₂₀), 126,8 (C₁), 123,0 (C₆), 115,3 (C₈), 114,9 (C₅), 109,4 (C₂), 68,6 (C₁₀), 63,3 (C₁₆), 55,9 (C₂₃), 53,2 (C₁₃ e C₁₄), 35,4 (C₁₁), 28,7 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-131 (27b)

F.M.: C₂₃H₂₆N₂O₆

M.M.: 426,18

Característica: sólido amarelo intenso

PF: 120-123°C

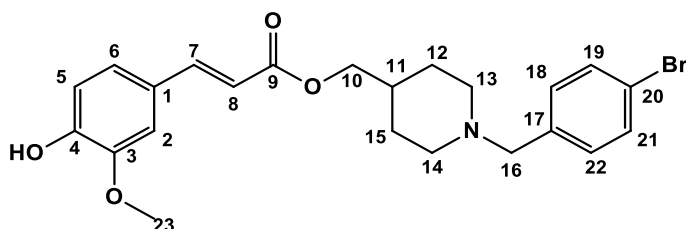
Rendimento: 55%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 427.18635 (calc. 427,18691)

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3377, 3072, 2922, 1698, 1631, 1588, 1509, 1256, 1029, 1149.

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 8,13 (d, 2H, *J*=8,7, H₁₉, H₂₁), 7,58 (d, 1H, *J*=15,9, H₇), 7,48 (d, 2H, *J*=8,7, H₁₈ e H₂₂), 7,03 (dd, 1H, *J*= 8,1 e 1,8, H₆), 7,00 (d, 1H, *J*=1,8, H₂), 6,87 (d, 1H, *J*=8,0, H₅), 6,26 (d, 1H, *J*=15,9, H₈), 4,05 (d, 2H, *J*=6,0, H₁₀), 2,84-2,87 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,98-2,06 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,70-1,75 (m, 1H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,31-1,45 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}), 3,87 (s, 3H, H₂₃), 3,56 (s, 2H, H₁₆).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,4 (C₉), 148,3 (C₃), 147,2 (C₁₇), 147,0 (C₂₀), 146,6 (C₄), 145,0 (C₇), 126,9 (C₁), 129,6 (C₁₉ e C₂₁), 123,6 (C₁₈ e C₂₂), 123,1 (C₆), 115,3 (C₈), 115,0 (C₅), 109,6 (C₂), 68,7 (C₁₀), 62,6 (C₁₆), 56,0 (C₂₄), 53,5 (C₁₃ e C₁₄), 35,4 (C₁₁), 29,0 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-132 (27c)

F.M.: C₂₃H₂₆BrNO₄

M.M.: 459,10

Característica: óleo viscoso amarelo claro

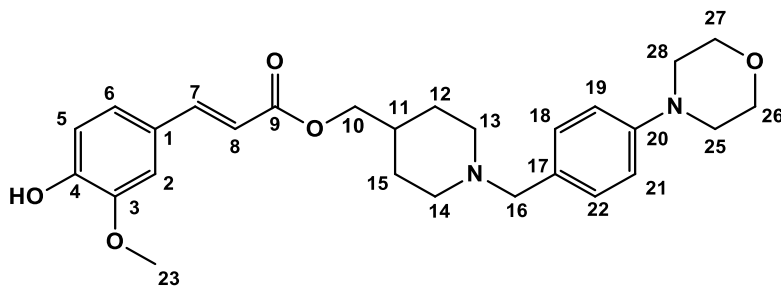
Rendimento: 65%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 460.11243 (calc. 460.11234)

IV-ATR (ν_{max}, cm⁻¹): 3428, 3063, 2937, 1699, 1630, 1588, 1509, 1253, 1115.

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,62 (d, 1H, *J*=15,9, H₇), 7,42 (d, 2H, *J*=8,3, H₁₉ e H₂₁), 7,19 (d, 2H, *J*=8,4, H₁₈ e H₂₂), 7,09 (dd, 1H, *J*= 8,3 e 2,0, H₆), 7,05 (d, 1H, *J*=2,0, H₂), 6,85 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,31 (d, 1H, *J*=15,9, H₈), 4,06 (d, 2H, *J*=6,0, H₁₀), 3,44 (s, 2H, H₁₆), 3,90 (s, 3H, H₂₃), 2,85-2,90 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,93-2,01 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,60-1,76 (m, 1H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,45-1,47 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,1 (C₉), 151,0 (C₃), 149,1 (C₄), 144,6 (C₇), 136,7 (C₁₇), 131,2 (C₁₉ e C₂₁), 130,7 (C₁₈ e C₂₂), 127,3 (C₁), 122,6 (C₆), 120,7 (C₂₀), 115,7 (C₈), 113,0 (C₅), 109,5 (C₂), 68,6 (C₁₀), 62,5 (C₁₆), 53,1 (C₁₃ e C₁₄), 55,8 (C₂₄), 35,4 (C₁₁), 28,9 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-morfolinobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-133 (27d)

F.M.: C₂₇H₃₄N₂O₅

M.M.: 466,25

Característica: sólido branco

PF: 128-132°C

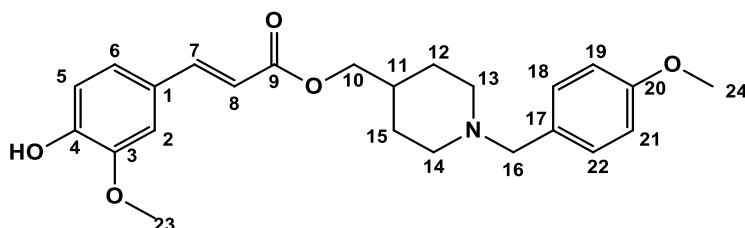
Rendimento: 65%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 467.25468 (calc. 467,25459)

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3427, 3067, 2954, 1698, 1609, 1509, 1439, 1261, 1118.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,57 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,10-7,17 (m, 4H, H₂, H₆, H₁₈ e H₂₂), 6,94 (d, 1H, *J*=8,3, H₅), 6,81 (d, 2H, *J*=7,5, H₁₉ e H₂₁), 6,35 (d, 1H, *J*=15,1, H₈), 4,06 (d, 2H, *J*=6,8, H₁₀), 3,85 (s, 3H, H₂₃), 3,74 (t, 4H, *J*=4,7, H₂₆ e H₂₇), 3,16 (t, 4H, *J*=4,6, H₂₅ e H₂₈), 3,46 (s, 2H, H₁₆), 2,90-2,95 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,93-2,02 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,68-1,63 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,34-1,46 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 167,4 (C₉), 150,7 (C₂₀), 148,5 (C₃), 147,3 (C₄), 145,1 (C₇), 130,8 (C₁₇), 129,3 (C₁₈ e C₂₂), 127,9 (C₁), 123,2 (C₆), 115,7 (C₈), 115,5 (C₅), 115,2 (C₁₉ e C₂₁), 109,7 (C₂), 68,6 (C₁₀), 67,0 (C₂₅ e C₂₆), 62,4(C₁₆), 52,8 (C₁₃ e C₁₄), 49,4 (C₂₄ e C₂₇), 56,0 (C₂₃), 35,3(C₁₁), 28,4 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-metoxibenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-134 (27e)

F.M.: C₂₄H₂₉NO₅

M.M.: 411,22

Característica: óleo viscoso amarelo claro

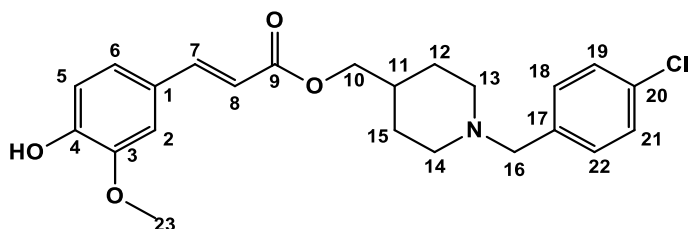
Rendimento: 55%

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3383, 3067, 2935, 1713, 1583, 1509, 1244, 1029, 1149.

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 412.2134 (calc. 412,21239)

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,59 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,30 (d, 2H, *J*=7,2, H₁₈ e H₂₂), 7,10 (dd, 1H, *J*= 7,5 e 2,0, H₆), 7,06 (d, 1H, *J*=2,00, H₂), 7,00 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,94 (d, 2H, *J*=7,2, H₁₉ e H₂₁), 6,46 (d, 1H, *J*=15,1 H₈), 4,07 (d, 2H, *J*=6,8, H₁₀), 3,87 (s, 3H, H₂₃), 3,78 (s, 3H, H₂₄), 3,56 (s, 2H, H₁₆), 2,99-2,96 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 2,00-2,08 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,73-1,78 (m, 1H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,43-1,52 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ , CDCl₃, 75 MHz): 167,3 (C₉), 158,8 (C₂₀), 148,1 (C₃), 146,8 (C₄), 144,8 (C₇), 130,6 (C₁₈ e C₂₂), 126,9 (C₁), 126,6 (C₁₇), 123,0 (C₆), 115,4 (C₈), 114,8 (C₅), 113,6 (C₁₉ e C₂₁), 109,4 (C₂), 68,6 (C₁₀), 62,5 (C₁₆), 55,9 (C₂₃), 55,2 (C₂₄), 52,9 (C₁₃ e C₁₄), 35,4 (C₁₁), 28,6 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-156 (27f)

Característica: óleo viscoso amarelo claro

Rendimento: 70%

F.M.: C₂₃H₂₆ClNO₄

M.M.: 415,16

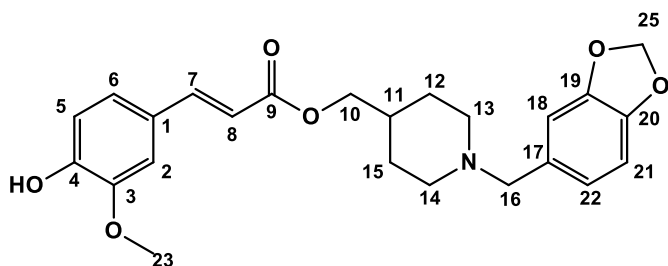
HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 416.16289 (calc. 416,16286)

IV-ATR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3386, 3064, 2935, 1704, 1632, 1588, 1509, 1248, 1116.

RMN ¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz): 7,59 (d, 1H, *J*=15,4, H₇), 7,22-7,25 (m, 4H, H₁₈, H₁₉, H₂₁ e H₂₂), 7,10 (dd, 1H, *J*= 7,5 e 2,1, H₆), 7,06 (d, 1H, *J*=2,1, H₂), 6,89 (d, 1H, *J*=8,2, H₅), 6,41 (d, 1H, *J*=15,4, H₈), 4,07 (d, 2H, *J*=6,4, H₁₀), 3,84 (s, 3H, H₂₃), 3,55 (s, 2H, H₁₆), 2,87-2,91 (m, 1H,

H₁₃ e H₁₄), 1,94-2,03 (m, 2H, H_{13'} e H_{14'}), 1,70-1,75 (m, 2H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,37-1,46 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,3 (C₉), 148,6 (C₃), 147,3 (C₄), 145,0 (C₇), 135,5 (C₁₇), 133,0 (C₂₀), 130,8 (C₁₈ e C₂₂), 128,3 (C₁₉ e C₂₁), 126,5 (C₁), 122,9 (C₆), 115,3 (C₈), 114,9 (C₅), 109,8 (C₂), 68,4 (C₁₀), 62,1 (C₁₆), 55,8 (C₂₄), 52,9 (C₁₃ e C₁₄), 35,1 (C₁₁), 28,3 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato (*E*)-(1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)piperidin-4-il)metil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)

Código: PQM-158 (27g)

Característica: óleo viscoso incolor

Rendimento: 72%

F.M.: C₂₄H₂₇NO₆

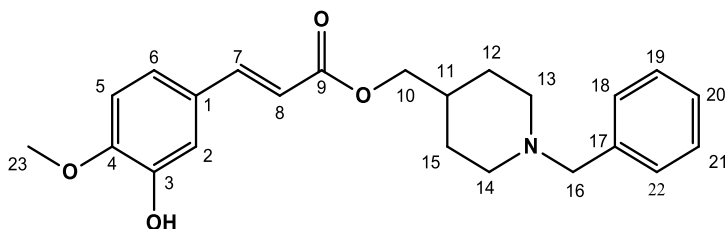
M.M.: 425,18

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 426.1917 (calc. 426.19166)

IV-ATR (ν_{max}, cm⁻¹): 3388, 3069, 2923, 1701, 1630, 1588, 1488, 1240, 1032.

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,57 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,10 (dd, 1H, *J*= 8,4 e 1,8, H₆), 7,06 (d, 1H, *J*=1,8, H₂), 6,99 (d, 1H, *J*=7,2, H₅), 6,85 (s, 1H, H₁₈), 6,78 (m, H₂₁ e H₂₂), 6,42 (d, 1H, *J*=15,0, H₈), 5,95 (s, 2H, H₂₅), 4,04 (d, 2H, *J*=6,0, H₁₀), 3,84 (s, 3H, H₂₃), 3,53 (s, 2H, H₁₆), 2,87-2,91 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,95-2,04 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,72-1,75 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,33-1,46 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 166,8 (C₉), 148,3 (C₃), 147,7 (C₄), 147,4 (C₁₉), 146,7 (C₂₀), 144,9 (C₇), 131,4 (C₁₇), 126,9 (C₁), 123,1 (C₆), 122,4 (C₂₂), 115,6 (C₈), 115,0 (C₅), 100,9 (C₂₅), 109,7 (C₂), 109,7 (C₂₁), 107,9 (C₁₈), 69,5 (C₁₀), 62,7 (C₁₆), 55,9 (C₂₃), 52,9 (C₁₃ e C₁₄), 34,0 (C₁₁), 29,6 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-benzilpiperidin-4-il)metil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-151 (**28a**)

F.M.: C₂₃H₂₇NO₄

M.M.: 381,19

Característica: sólido branco

PF: 118-122°C

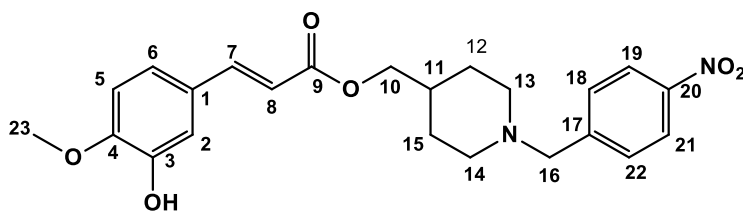
Rendimento: 70%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 382.2032 (calc. 382.20183)

IV-ATR (v_{max}, cm⁻¹): 3422, 3062, 2937, 1703, 1588, 1510, 1281, 1154.

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,60 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,28-7,31 (m, 5H), 7,09-7,14 (m, 2H, H₂ e H₆), 6,97 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,35 (d, 1H, *J*=15,1, H₈), 4,05 (d, 2H, *J*=6,7, H₁₀), 2,94-2,98 (m, 2H), 1,98-2,06 (m, 2H), 1,73-1,77 (m, 2H), 1,41-1,49 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,54 (s, 2H).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,3 (C₉), 149,1 (C₄), 145,4 (C₃), 144,4 (C₇), 137,5 (C₁₇), 129,3 (C₁₈ e C₂₂), 128,5 (C₁₉ e C₂₁), 127,5 (C₂₀), 125,7 (C₁), 121,6 (C₆), 114,5 (C₂), 110,8 (C₅), 115,2 (C₈), 68,3 (C₁₀), 62,8 (C₁₆), 52,3 (C₁₃ e C₁₄), 55,9 (C₂₃), 35,1 (C₁₁), 28,6 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-152 (**28b**)

F.M.: C₂₃H₂₆N₂O₆

M.M.: 426,18

Característica: sólido amarelo

PF: 126-129°C

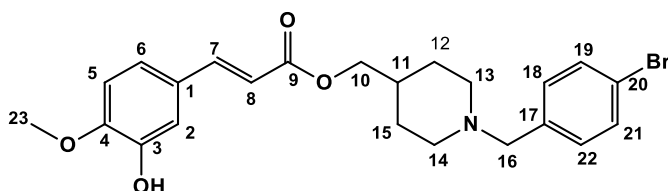
Rendimento: 68%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 427.18705 (calc. 427,18691)

IV-ATR (ν_{\max} , cm^{-1}): 3319, 3062, 2938, 1698, 1590, 1515, 1346, 1243, 1118.

RMN ¹H (δ , CDCl_3 , **300 MHz**): 8,18 (d, 2H, $J=8,7$, H₁₉, H₂₁), 7,59 (d, 1H, $J=15,9$, H₇), 7,49 (d, 2H, $J=8,7$, H₁₈ e H₂₂), 7,09-7,11 (m, 2H, H₂ e H₆), 6,96 (d, 1H, $J=8,0$, H₅), 6,35 (d, 1H, $J=15,9$, H₈), 4,05 (d, 2H, $J=6,5$, H₁₀), 2,85-2,90 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 2,00-2,09 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,72-1,78 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,35-1,47 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}), 3,54 (s, 2H, H₁₆), 3,85 (s, 3H, H₂₃).

RMN ¹³C (δ , CDCl_3 , **75 MHz**): 167,7 (C₉), 147,3 (C₂₀), 145,3 (C₄), 145,3 (C₃), 147,5 (C₁₇), 144,3 (C₇), 129,7 (C₁₉ e C₂₁), 125,6 (C₁), 123,6 (C₁₈ e C₂₂), 121,4 (C₆), 115,1 (C₈), 114,4 (C₂), 110,7 (C₅), 68,5 (C₁₀), 62,6 (C₁₆), 56,1 (C₂₃), 53,5 (C₁₃ e C₁₄), 35,5 (C₁₁), 29,0 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-153 (28c)

F.M.: C₂₃H₂₆BrNO₄

M.M.: 459,10

Característica: óleo incolor viscoso

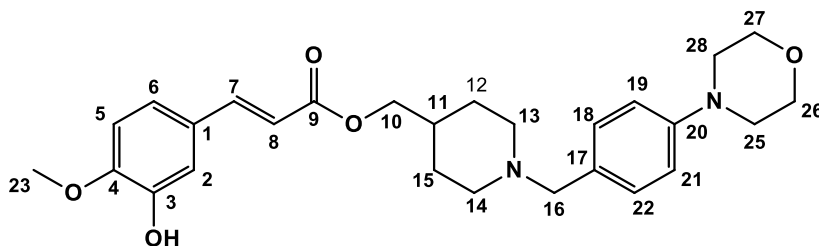
Rendimento: 70%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 460.11370 (calc. 460,11234)

IV-ATR (ν_{\max} , cm^{-1}): 3406, 3063, 2934, 1698, 1630, 1589, 1510, 1253, 1116.

RMN ¹H (δ , CDCl_3 , **300 MHz**): 7,60 (d, 1H, $J=15,1$, H₇), 7,43 (d, 2H, $J=7,5$, H₁₉ e H₂₁), 7,20 (d, 2H, $J=8,4$, H₁₈ e H₂₂), 7,09 (d, 1H, $J=2,0$, H₂), 7,13 (dd, 1H, $J=7,4$ e $2,0$, H₆), 6,98 (d, 1H, $J=7,5$, H₅), 6,41 (d, 1H, $J=15,1$, H₈), 4,05 (d, 2H, $J=6,7$, H₁₀), 2,97-2,90 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,99-2,04 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,70-1,74 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,37-1,48 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}), 3,45 (s, 2H, H₁₆), 3,88 (s, 3H, H₂₃).

RMN ¹³C (δ , CDCl_3 , **75 MHz**): 167,4 (C₉), 148,4 (C₄), 145,0 (C₃), 144,2 (C₇), 136,9 (C₁₇), 131,1 (C₁₉ e C₂₁), 130,3 (C₁₈ e C₂₂), 125,2 (C₁), 121,6 (C₆), 120,4 (C₂₀), 115,4 (C₈), 114,2 (C₂), 111,2 (C₅), 69,8 (C₁₀), 62,4 (C₁₆), 53,0 (C₁₃ e C₁₄), 35,2 (C₁₁), 28,9 (C₁₂ e C₁₅), 55,9 (C₂₃).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-morfolinobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-154 (28d)

F.M.: C₂₇H₃₄N₂O₅

M.M.: 466,25

Característica: óleo incolor viscoso

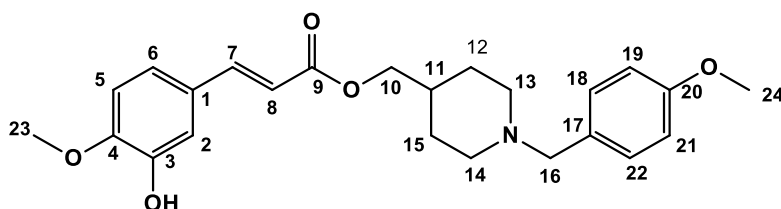
Rendimento: 68%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 467.25471 (calc. 467,25459)

IV-ATR (ν_{max}, cm⁻¹): 3395, 3066, 2948, 1711, 1631, 1589, 1509, 1268, 1119.

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,58 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,20 (d, 2H, *J*=7,6, H₁₈ e H₂₂), 7,07-7,12 (m, 2H, H₂ e H₆), 7,01 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,81 (d, 2H, *J*=8,3, H₁₉ e H₂₁), 6,32 (d, 1H, *J*=15,1, H₈), 4,03 (d, 2H, *J*=6,5, H₁₀), 3,83 (s, 3H, H₂₃), 3,74 (t, 4H, *J*=4,7, H₂₆ e H₂₇), 3,45 (s, 2H, H₁₆), 3,16 (t, 4H, *J*=4,6, H₂₅ e H₂₈), 2,91-2,95 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,94-2,03 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,70-1,73 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,34-1,46 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,4 (C₉), 150,7 (C₂₀), 148,1 (C₄), 146,5 (C₃), 145,00 (C₇), 130,8 (C₁₇), 128,7 (C₁₈ e C₂₂), 125,9 (C₁), 121,3 (C₆), 115,9 (C₁₉ e C₂₁), 115,2 (C₈), 114,8 (C₂), 110,9 (C₅), 68,7 (C₁₀), 66,9 (C₂₅ e C₂₆), 62,1 (C₁₆), 56,0 (C₂₃), 52,6 (C₁₃ e C₁₄), 49,4 (C₂₄ e C₂₇), 35,7 (C₁₁), 28,3 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-metoxibenzil)piperidin-4-il)metil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-155 (28e)

F.M.: C₂₄H₂₉NO₅

M.M.: 411,22

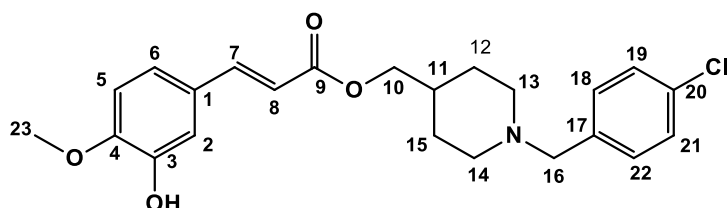
Característica: óleo amarelo claro viscoso

Rendimento: 60%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 412.21244 (calc. 412,21239)

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,59 (d, 1H, *J*=15,1, H₇), 7,31 (d, 2H, *J*=7,5, H₁₈ e H₂₂), 7,11 (dd, 1H, *J*= 7,5 e 2,0, H₆), 7,06 (d, 1H, *J*=2,0, H₂), 7,00 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,95 (d, 2H, *J*=7,5, H₁₉ e H₂₁), 6,46 (d, 1H, *J*=15,1 H₈), 4,07 (d, 2H, *J*=6,5, H₁₀), 3,87 (s, 3H, H₂₃), 3,78 (s, 3H, H₂₄), 3,58 (s, 2H, H₁₆), 2,93-2,97 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,97-2,06 (m, 1H, H_{13'} e H_{14'}), 1,70-1,76 (m, 1H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,38-1,50 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,4 (C₉), 158,7 (C₂₀), 148,1 (C₄), 147,0 (C₃), 144,7 (C₇), 127,1 (C₁₇), 130,9 (C₁₈ e C₂₂), 125,7 (C₁), 121,7 (C₆), 115,1 (C₈), 114,4 (C₂), 113,6 (C₁₉ e C₂₁), 111,0 (C₅), 68,2 (C₁₀), 62,3 (C₁₆), 55,9 (C₂₃), 55,5 (C₂₄), 52,4 (C₁₃ e C₁₄), 35,4 (C₁₁), 28,3 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(4-clorobenzil)piperidin-4-il)metil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-157 (28f)

F.M.: C₂₃H₂₆ClNO₄

M.M.: 415,16

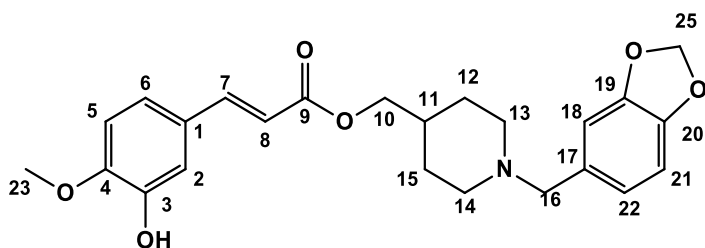
Característica: óleo amarelo claro viscoso

Rendimento: 75%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 416.16292 (calc. 416,162862)

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,59 (d, 1H, *J*=15,9, H₇), 7,23-7,26 (d, 2H, *J*=7,3, H₁₈, H₁₉, H₂₁ e H₂₂), 7,10-7,14 (m, 2H, H₂ e H₆), 6,93 (d, 1H, *J*=7,5 H₅), 6,43 (d, 1H, *J*=15,9, H₈), 4,05 (d, 2H, *J*=6,5, H₁₀), 1,69-1,76 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,36-1,44 (m, 2H, H_{12'} e H_{15'}), 3,82 (s, 3H, H₂₃), 3,56 (s, 2H, H₁₆), 2,85-2,90 (m, 1H, H₁₃ e H₁₄), 1,93-2,02 (m, 2H, H_{13'} e H_{14'}).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,4 (C₉), 148,6 (C₃), 145,4 (C₅), 144,2 (C₇), 135,5 (C₁₇), 133,0 (C₂₀), 131,8 (C₁₈ e C₂₂), 128,5 (C₁₉ e C₂₁), 126,5 (C₁), 122,9 (C₆), 115,2 (C₈), 114,3 (C₂), 110,8 (C₅), 68,4 (C₁₀), 62,1 (C₁₆), 55,8 (C₂₃), 52,9 (C₁₃ e C₁₄), 35,1 (C₁₁), 28,3 (C₁₂ e C₁₅).



Nome do composto: Acrilato de (*E*)-(1-(benzo[d][1,3]dioxola-5-ilmetil)piperidin-4-il)metil 3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)

Código: PQM-159 (28g)

F.M.: C₂₄H₂₇NO₆

M.M.: 425,18

Característica: óleo incolor viscoso

Rendimento: 78%

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: 426.19049 (calc. 426.19166)

RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz): 7,59 (d, 1H, *J*=15,0, H₇), 7,14 (dd, 1H, *J*= 8,4 e 1,9, H₆), 7,09 (d, 1H, *J*=1,8, H₂), 7,00 (d, 1H, *J*=7,5, H₅), 6,85 (s, 1H, H₁₈), 6,80 (s, H₂₁ e H₂₂), 6,42 (d, 1H, *J*=15,0, H₈), 5,97 (s, 2H, H₂₄), 4,05 (d, 2H, *J*=6,5, H₁₀), 3,80 (s, 3H, H₂₃), 3,55 (s, 2H, H₁₆), 2,90-2,97 (m, 2H, H₁₃ e H₁₄), 1,99-2,04 (m, 1H, H₁₃ e H₁₄), 1,70-1,74 (m, 3H, H₁₁, H₁₂ e H₁₅), 1,37-1,48 (m, 2H, H₁₂ e H₁₅).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃, 75 MHz): 167,3 (C-9), 149,4 (C₄), 147,0 (C₂₀), 146,2 (C₁₉), 145,4 (C₃), 144,2 (C₇), 132,2 (C₁₇), 125,1 (C₁), 121,9 (C₂₂), 121,1 (C₆), 115,4 (C₈), 114,1 (C₂), 111,4 (C₅), 100,8 (C₂₄), 108,9 (C₂₁), 107,4 (C₁₈), 69,0 (C₁₀), 63,0 (C₁₆), 56,0 (C₂₃), 51,4 (C₁₃ e C₁₄), 35,8 (C₁₁), 28,3 (C₁₂ e C₁₅).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA- ENSAIO DE ELLMAN

Para avaliação *in vitro* da inibição de EeAChE (E.C.3.1.1.7, tipo V-S, purificada de *Electrophorus electricus*) e eqBuChE (E.C. 3.1.1.8, purificada de soro equino), o ensaio cinético foi realizado de acordo com o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) modificado, utilizando placas de 96 poços conforme descrito previamente (CASTRO et al., 2008), (LEMES et al., 2016). Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 μ L da enzima (0,5 U/mL) e 5 μ L de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (10 mM) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7.4), 100 μ L das soluções dos compostos avaliados (duas vezes mais concentrado), juntamente com 55 μ L de tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) atingindo o volume de 180 μ L. Após 10 minutos, 20 μ L do substrato apropriado (iodeto de acetilcolina ou butirilcolina, concentração final de 0,5 M) foram adicionados e a absorbância foi lida em um espectrofotômetro SpectraMax 250 (*Molecular Devices*) a 412 nm durante 5 minutos com intervalos de 12 s. Curvas de progressão foram adquiridas através do *software* softmax PRO 5.0 (*Molecular Devices*) a partir da qual a velocidade máxima de hidrólise foi calculada e a análise realizada com o *software* prisma (Graphpad). Os dados da competição dos substratos de duas experiências foram reunidos e analisados por ajuste global de modelos de inibição alternados, selecionados por critérios de probabilidade (CASTRO et al., 2008). Todos os reagentes foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (Brazil). Os compostos avaliados foram solubilizados em DMSO (0,05 M) e diluídos em tampão fosfato para as concentrações descritas imediatamente antes do ensaio. O solvente não teve nenhum efeito detectável na concentração mais alta utilizada (0,2% v/v).

5.8 DOCKING MOLECULAR

Foram analisados os modos de interação dos três compostos PQM-130 (**27a**), 131 (**27b**) e 132 (**27c**) em três diferentes estados da AChE: livre, acetilada e como complexo de Michaelis (AChE complexada com o substrato ACh). Todos os modelos foram baseados na estrutura da AChE complexada com o inibidor donepezil na resolução de 2.35Å (PDB 4ey7) (CHEUNG et al., 2012). Uma vez que a estrutural tridimensional da enzima acetilada ainda não foi determinada experimentalmente, foi gerado o modelo acetilado da estrutura de raio-X do

complexo, uma vez que este inibidor é proposto para inibir ambas as formas da enzima (livre e acetilada) (INOUE et al., 1996). A presença de águas conservadas no sítio de ligação foram analisadas através da superposição de diversos complexos AChE-inibidor, como exemplo, 1q83, 1q84 (BOURNE et al., 2004), 4ey7 (CHEUNG et al., 2012) and 2ckm (RYDBERG et al., 2006). As quatro moléculas de água W729, W722, W731, W737 e W931 foram extraídas da estrutura do complexo da AChE com o donepezil (PDB 4ey7) e consideradas explicitamente durante os experimentos de docking molecular. A estrutura da acetilcolinesterase foi preparada utilizando a ferramenta Protein Preparation Wizard (MADHAVI SASTRY et al., 2013) no programa Maestro Suite 2014 (versão 9.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014).

Nessa etapa, todos os átomos de hidrogênio foram adicionados, o estado de protonação e os tautômeros dos resíduos de His foram otimizados em pH 7.0 (OLSSON et al., 2011). A rede de energia foi gerada no módulo Glide module (Glide, versão 6.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) e os centros de coordenadas foi baseado no ligante presente no complexo 4ey7 (X: 9.6, Y: -6.7 e Z: -35.73). As estruturas dos compostos foram concebidas manualmente no programa Maestro Suite 2014 (versão 9.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014), enquanto a estrutura do composto de referência foi extraída do complexo (PDB-4ey7). Todas as estruturas foram preparadas com LigPrep (versão 2.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) e o estado de protonação foi determinado com Epik em $\text{pH} = 7.0 \pm 0.5$ (FOLOPPE; HUBBARD, 2006), (SHELLEY et al., 2007). Estudos de docking foram realizados com o software Glide (versão 6.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) utilizando o modo de ancoragem de predição extra (FRIESNER et al., 2006) e todas as outras opções foram mantidas com valores padrões. A conformação do anel foi mantida com a menor energia potencial durante as análises.

5.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A habilidade dos compostos da série de híbridos feruloil-donepezil em sequestrar os radicais livres DPPH foi avaliada de acordo com método descrito por Gontijo 2012 com modificações (GONTIJO et al., 2012). Os compostos foram avaliados nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μM . Uma alíquota de 4 mL da amostra foi adicionada à 1mL da solução de DPPH (0.5 mM em etanol). A solução foi homogeneizada em vortex e após 30 minutos a absorbância foi medida a 517 nm. Cada solução foi analisada em triplicata e as médias dos valores foi plotada para obtenção do CI_{50} . Trolox, ácido ferúlico e ácido *iso*-ferúlico foram

utilizados como padrões. A capacidade sequestrante de radicais foi representada como porcentagem de inibição de acordo com a equação: %inibição = [(absorbância of controle – absorbância da amostra)/absorbância of do controle]] × 100.

5.10 VALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DE BIOMETAIS Cu^{+2} , Fe^{+2} E Zn^{+2}

A investigação da capacidade dos compostos de quelar biometais foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu) seguindo a metodologia descrita por Chen e colaboradores (CHEN et al., 2011a) Foram preparadas soluções de 20 μM dos compostos em metanol e soluções de 20 μM dos compostos em presença de 20 μM de CuSO_4 , FeSO_4 e ZnCl_2 . Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente em cubeta de quartzo.

5.11 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA

A seguir serão descritas as metodologias utilizadas nos ensaios *in vitro* para avaliação da atividade neuroprotetora.

5.11.1 Culturas celulares

Células neuronais humanas foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol/L-glutamina, 50 μg /mL penicilina e 50 μg /mL estreptomicina a 37°C e mantidas em incubadora umidificada com 5% CO_2 .

5.11.2 Determinação da neurotoxicidade induzida pelos compostos

A viabilidade neuronal em termos de atividade mitocondrial foi avaliada no ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), como descrito previamente por Tarozzi (2007) (TAROZZI et al., 2007). As células foram semeadas em placas de 96 poços 2×10^4 células/poço, incubadas por 24h e tratadas subsequentemente com várias concentrações dos compostos (1.25–40 μM) por 24 h a 37 °C em 5% CO_2 . Em seguida, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado MTT (5 mg/mL) em salina tampão fosfato (PBS) por 2 h a 37 °C em 5% CO_2 . Após lavagem com PBS, os cristais de formazana foram dissolvidos em isopropanol. A quantidade de formazana foi medida (570 nm, referência filtro 690 nm) utilizando um leitor de microplacas (VICTOR™ X3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A neurotoxicidade foi expressa como a concentração do composto capaz de inibir 50% da viabilidade celular.

5.11.3 Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por H_2O_2 e metais

A formação de EROS foi determinada utilizando uma sonda fluorescente diacetato de 2'-7'-dicloro-diidrofluorescina (DCFH-DA), como reportada previamente por Tarozzi, 2007, como modificações (TAROZZI et al., 2007). Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^4 cel/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO_2 . Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e 100 μL de DCFH-DA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado em cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente foi adicionado à solução de DCFH-DA várias concentrações dos compostos (5-40 μM) e H_2O_2 (100 μM) ou $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, ou $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (100 $\mu\text{M}/25 \mu\text{M}$). Em paralelo, as células SH-SY5Y foram tratadas com os compostos por 24 h antes do tratadas com H_2O_2 . A formação de EROs foi determinada (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) utilizando um leitor de microplacas.

5.11.4 Determinação dos níveis intracelular de glutathiona

O nível celular de GSH foi determinado pelo ensaio fluorimétrico com monoclorobimano (MCB) em placas de 96 poços como reportado previamente com algumas modificações (SEBASTIÀ et al., 2003). Inicialmente as células foram semeadas nas placas de 96 poços com 2×10^4 cel/poços, incubadas por 24 horas e tratamento subsequente com 20 μ M dos compostos em vários tempos diferentes (3-24 h) a 37 °C em 5% CO₂. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado MCB (50 μ M) em PBS por 30 min a 37 °C em 5% CO₂. A quantidade de GSH foi medida (excitação a 360 nm e emissão a 465 nm) utilizando um leitor de microplaca (X3 VICTOR™, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Os valores são expressos como uma porcentagem das células de controle.

5.11.5 Ensaio de extração nuclear e atividade de ligação a Nrf2

A extração nuclear e o ensaio de ligação de Nrf2 foram realizados utilizando os Kits Extrato Nuclear e Transam Nrf2 (Ativo Motif, Carlsbad, CA, EUA), respectivamente, de acordo com como orientações do fabricante. A concentração de proteína nas amostras foi medida usando o reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye*. As células SH-SY5Y foram semeadas em discos de cultura (tamanho de 60 mm) a 2×10^6 células/placa, incubadas durante 24 horas e subsequentemente, tratadas com 20 μ M de composto em diferentes tempos de tratamento (1-6 h) a 37 °C em 5% de CO₂. No final do tratamento, 20 μ g do extrato nuclear foi avaliado por transam Kit Nrf2 nuclear. Os valores foram expressos como porcentagem das células de controle.

5.11.6 Preparação do oligômero A β ₁₋₄₂

Os peptídeos A β ₁₋₄₂ (Bachem AG, Bubendorf, Suíça) foram dissolvidos em hexa flúor isopropanol a 1 mg/mL, sonicado, incubado à temperatura ambiente durante 24 h e liofilizado. O filme A β ₁₋₄₂ não agregado resultante foi dissolvido com DMSO e armazenado a 20 ° C até utilização. A agregação A β ₁₋₄₂ na forma oligomérica foi preparado como previamente descrito (TAROZZI et al., 2008). A morfologia das formas A β ₁₋₄₂ oligoméricas foi verificada usando microscopia eletrônica de transmissão.

5.11.7 Determinação intracelular da formação de EROs por oligômeros de A β ₁₋₄₂

As células SH-SY5Y foram cultivadas em lâminas de cultura com 8 poços (área de superfície de 0,7 cm² / poço), a 1x10⁴ células/poço, durante 24 h. As células foram então tratadas durante 3 h com o composto (20 uM) e oligômeros A β ₁₋₄₂ (10 uM) a 37°C em 5% de CO₂. No final do tratamento, as células foram lavadas e incubadas com DHE (10 uM) durante 30 min no escuro. Após a remoção das sondas, as células foram lavadas com PBS e incubadas com DMEM isento de soro durante 1 hora a 37 °C. A formação intracelular de EROs foi medida através de um microscópio de fluorescência (Eclipse Ti invertido microscópio, Nikon Europa, Amsterdam, Holanda). As imagens de fluorescência foram capturadas com software de imagem NIS-Elements (instrumentos Nikon Europa). Quatro áreas selecionadas aleatoriamente com 50-100 células foram analisadas e os valores obtidos são expressos como unidades de fluorescência arbitrárias (AUF).

5.11.8 Determinação da exocitose de MTT-formazana induzida por oligômeros A β ₁₋₄₂

A exocitose de MTT-formazana induzida por oligômeros A β ₁₋₄₂ foi determinada utilizando o ensaio MTT, como relatado anteriormente (KURAPATI et al., 2014). As células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3x10⁴ células/poço, e incubadas durante 24 h e após incubação foram tratadas com 20 uM dos compostos e 10 uM dos oligômeros A β ₁₋

⁴², durante 4 a 37 ° C em 5% de CO₂. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado MTT (5 mg / mL) em PBS durante 2 h a 37 ° C em 5% de CO₂. As células SH-SY5Y foram examinadas sob um microscópio e fotografados para detectar a exocitose MTT-formazana. Os cristais em forma de agulha sobre a superfície das células tratadas com apenas oligômeros A β ₁₋₄₂ são facilmente visíveis ao microscópio de luz e representam a exocitose de MTT-formazana.

5.11.9 Determinação da morte neuronal induzida por oligômeros A β ₁₋₄₂

A morte neuronal induzida por A β ₁₋₄₂ oligômeros foi determinada usando o marcador fluorescente iodeto de propídio, como previamente relatado, com pequenas modificações (TAROZZI et al., 2009). As células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços 5 x 10³ células / poço, incubadas durante 24 h e tratadas com o composto (20 μ M) e oligômeros A β ₁₋₄₂ (10 μ M) durante 24 a 37°C em 5% de CO₂. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado iodeto de propídio (25 μ g/ml) em PBS durante 10 min a 37°C. As células marcadas com iodeto de propídio foram então examinadas sob um microscópio de fluorescência (Eclipse Ti microscópio invertido). Quatro áreas selecionadas aleatoriamente com 50-100 células em cada foram analisados e os valores obtidos são expressos como porcentagem de células mortas e calculada pela fórmula: (células iodeto de propídio-positivos n/células totais x 100)

5.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

5.12.1 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos machos das linhagens Swiss e CD1 (pesando 30-40 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais permaneceram em média 7 dias antes do experimento em sala climatizada no local do experimento para ambientação, com livre acesso a água e comida, em condições de

temperatura ambiente variando de 23 a 28°C, com ciclo de claro e escuro de 12 horas. Os animais foram privados de comida durante cerca de 12 horas antes de cada experimento e ao término, os animais foram sacrificados com halotano. Todos os experimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa, estabelecidas pelo Comitê de Ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Federal de Alfenas (CEUA-UNIFAL-MG). O presente estudo foi aprovado para execução segundo o parecer emitido pelo CEUA-UNIFAL-MG sob o protocolo n°: 633/2015.

5.12.2 Ensaio de hipernocicepção induzida por formalina

Todos os animais, independentemente do grupo experimental, foram pré-expostos (ambientados) ao aparato experimental (caixa de observação) por um período de 1 hora. Os compostos e os padrões foram solubilizados em salina estéril e DMSO (2%). Os compostos foram administrados na dose de 100µg/kg por gavagem (v.o.) e o controle positivo morfina foi aplicado na dose de 10mg/kg por via intraperitoneal (i.p.).

O ensaio foi realizado utilizando 6 grupos de 8 camundongos os quais foram pré-tratados em jejum por via oral da seguinte forma: Grupo 1: veículo (DMSO 2% em salina). Grupo 2: veículo (DMSO 2% em salina). Grupo 3: PQM-130 (**27a**) + formalina. Grupo 4: PQM-131 (**27b**) + formalina. Grupo 5: PQM-132 (**27c**) + formalina. Grupo 6: Indometacina (10 mg/Kg, v.o) + formalina. Grupo 7: Morfina (10 mg/Kg, i.p) + formalina. Após 1 hora do tratamento dos grupos 1 ao 6, e 30 minutos do tratamento do grupo 7 foi aplicado uma solução de formalina, 5% em salina estéril (0.9% NaCl), na pata direita traseira por via subcutânea. O tempo gasto para lambe a pata afetada foi avaliado durante dois intervalos de tempo após a injeção: 0-5 min (primeira fase ou dor neurogênica) e 15 a 30 min (segunda fase ou dor inflamatória). (SANTOS; CALIXTO, 1997), (VELOSO, 2012).

5.12.3 Ensaio de campo aberto

Para excluir a possibilidade de prejuízo no desempenho motor dos animais após o tratamento com os compostos (n= 8 animais), foi avaliada a atividade locomotora espontânea no campo aberto. A atividade locomotora foi avaliada em um campo aberto, que consiste em uma arena circular de acrílico dividida em 12 quadrantes, dos quais 8 junto às paredes do aparato foram considerados periferia e as 4 demais, os centrais. Após 1 hora do tratamento oral com as substâncias-teste na dose de 100 μ M, cada camundongo foi colocado individualmente na arena circular. 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. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com etanol a 10%. (VELOSO et al., 2010).

5.12.4 Ensaio de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina – Teste de Von Frey

Neste modelo experimental, a hipernocicepção é induzida pela injeção intraplantar de solução de carragenina. O efeito antinociceptivo dos compostos avaliados e dos controles são medidos através do comportamento dos animais perante a estimulação mecânica de filamentos de Von Frey. Os filamentos apresentam diferentes diâmetros e são capazes de fornecer pressões variadas sob a pata. O limiar (ponto final) é caracterizado pela retirada da pata do animal seguido por um claro movimento de recuo (encolhida) da pata. Após a retirada da pata a intensidade da pressão é registrada. O estímulo da pata é repetido até que se conseguissem duas medidas similares. Os animais (n= 8 animais) foram colocados individualmente em caixas de acrílico (12x10x17 cm) com chão de grade de arame por cerca de 60 min antes do início do teste para ambientação. Após o período de ambientação as patas dos animais foram tocadas com os filamentos para a realização da leitura basal. Após uma hora do tratamento com os compostos avaliados e os padrões, os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina 100 μ g/pata e registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal, depois de uma, três, cinco e sete horas após a aplicação da carragenina. (CUNHA et al., 2004), (ORLANDI, 2011).

5.12.5 Ensaio de peritonite induzida por LPS

A peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) avaliou o possível efeito dos compostos na migração dos leucócitos para dentro da cavidade peritoneal. Os animais (n=8) foram pré-tratados em jejum por via oral com o veículo DMSO, os compostos foram administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$ e a indometacina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos, aplicou-se o agente inflamatório (lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* sorotipo 026:B6-Sigma, 100 $\mu\text{g/kg}$, i.p). Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados por inalação de halotano (anestésico das vias aéreas). Uma incisão foi feita entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino. Em seguida, o peritônio de cada animal foi lavado com 3 mL de PBS (Tampão fosfato) 0,1 M. O peritônio foi suavemente massageado e a suspensão de células, foi aspirada ao máximo com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Cada amostra coletada foi precisamente medida e feita a correção para o volume injetado no peritônio. Uma alíquota de 10 μL do exsudato foi utilizada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer (CUNHA et al., 1998), (SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

5.12.6 Edema de pata em camundongos induzido por carragenina

O ensaio de edema de pata foi baseado no método descrito por Levy (LEVY, 1969). Os animais foram divididos em 5 grupos de 8 camundongos CD1. Uma hora antes da administração da carragenina, os cinco grupos foram tratados por via oral com veículo (salina + DMSO 2%), indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$), PQM-130 (**27a**) e PQM-132 (**27c**) (100 $\mu\text{mol/kg}$). Após a administração oral das substâncias 20 μL da solução de carragenina (400 $\mu\text{g/pata}$) foi injetado para todos os animais na pata direita. O volume da pata, até a articulação tibiotarsal, foi medida utilizando um pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile) na hora basal (zero hora) e nas 1^a, 3^a e 5^a horas após Cg. O cálculo do edema de pata foi obtido pela diferença entre o volume da hora basal, sem carragenina e o volume da pata inflamada 1, 3 e 5 hs após aplicação i.p de Cg.

5.12.7 Ensaio de expressão de COX-1, COX-2 e 5-LOX

Camundongos foram tratados com os compostos (100 $\mu\text{mol/kg}$, p.o.) ou veículo uma hora antes da injeção i.p de carragenina. Três horas após a injeção de carragenina, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas a 1500rpm/20 min e armazenadas a -70°C . A análise da expressão de COX-1, COX-2 e 5-LOX foi realizada de acordo com as instruções do fabricante dos kits utilizados (USCN Life Science Inc. para COX-1; R&D Systems for COX-2 e 5-LOX) utilizando um anticorpo específico para revestir os poços. A leitura das placas foi realizada em um leitor de microplacas a 450nm (PRINCE et al., 2015; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; SMITH et al., 1998)

5.12.8 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando o programa GraphPad Prism v.5.0. Os dados obtidos foram expressos obedecendo a média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo método ANOVA seguida pelo pós-teste Newman-Kells ($p < 0.05$)

6 CONCLUSÃO

A série-alvo de híbridos donepezil-curcumina PQM-130-134 e PQM-151-159 foi obtida em rendimentos satisfatórios. As substâncias obtidas foram submetidas à avaliação da atividade anticolinesterásica, antioxidante direta e indireta, capacidade quelante de biometais, atividade neuroprotetora e anti-inflamatória. A avaliação de inibição da AChE pelo ensaio de Ellman revelou que todas as substâncias foram capazes de inibir moderadamente a atividade da AChE, destacando-se PQM-130 (**27a**), PQM-131 (**27b**) e PQM-132 (**27c**) que apresentaram os melhores resultados, sendo PQM-130 (**27a**) a mais potente ($CI_{50}=0,46 \mu M$). Estas três substâncias foram as mais ativas da série na inibição de AChE e foram selecionadas para avaliação adicional quanto às propriedades de quelação de biometais, antioxidante indireta, neuroprotetora e anti-inflamatória, além de estudos cinéticos de ancoramento (*docking*) molecular. Os dados *in silico* revelaram que PQM-130 (**27a**) é um inibidor não-competitivo da AChE, podendo interagir preferencialmente com o sítio aniônico periférico (PAS) da enzima. Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o composto PQM-130 (**27a**) apresenta o melhor perfil de ação múltipla. O composto PQM-130 (**27a**) é um inibidor potente da AChE, exibindo também a maior atividade antioxidante indireta em células SH-SY5Y neuronais, além de ser capaz de quelar os metais Cu^{+2} e Fe^{+2} . Ademais, os resultados sugerem que PQM-130 (**27a**) apresenta significativo efeito neuroprotetor contra a morte neuronal induzida por oligômeros $A\beta_{1-42}$. No ensaio anti-inflamatório *in vivo*, foi observada uma atividade anti-inflamatória significativa, reduzindo consideravelmente o processo inflamatório induzido em diferentes modelos animais e com fortes indícios de que seu mecanismo de ação esteja envolvido com a expressão de COX e LOX. Portanto, este conjunto de resultados sugerem que o composto PQM-130 (**27a**) seja um potencial candidato a protótipo de fármaco multialvo útil ao tratamento da DA, sendo capaz de atuar como inibidor de AChE, antioxidante, quelante de biometais, neuroprotetor e anti-inflamatório, além de possuir um padrão molecular inédito. Contudo, estudos adicionais de farmacocinética, estabilidade química e plasmática e toxicidade aguda ainda necessitam ser realizados.

REFERÊNCIAS

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, p. 1–84, 2016.

ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 4, p. 375–399, 2013.

AYTON, S.; LEI, P.; BUSH, A. I. Biometals and their therapeutic implications in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 12, n. 1, p. 109–20, 2015.

BARBOSA, M. L. C. Doenças multifatoriais e os desafios no planejamento de fármacos multialvos: A contribuição do laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas - LASSBio **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 576–593, 2015.

BARNHAM, K. J.; BUSH, A. I. Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 222–228, 2008.

BAUTISTA-AGUILERA, O. M. et al. Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezil-indolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 82–95, 2014.

BOLEA, I. et al. Multipotent, permeable drug ASS234 inhibits A β aggregation, possesses antioxidant properties and protects from A β -induced apoptosis in vitro. **Current Alzheimer research**, v. 10, n. 8, p. 797–808, 2013.

BOLOGNESI, M. L. Polypharmacology in a Single Drug: Multitarget Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1639–1645, 1 mar. 2013.

BORCH, R. F.; BERNSTEIN, M. K.; DURST, H. D. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. **Journal of American Chemistry Society**, v. 93, n. 12, p. 2897–2904, 1971.

BOURNE, Y. et al. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 6, p. 1449–1454, 2004.

CAI, Y. et al. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872–2888, maio 2006.

CASTRO, N. G. et al. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, n. 3, p. 339–349, 2008.

CHEN, S.-Y. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer’s disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5596–5604, 2011a.

CHEN, S.-Y. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer’s disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5596–5604, set. 2011b.

CHEUNG, J. et al. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282–10286, 26 nov. 2012.

CHINTHALAPALLY, V. R. REGULATION OF COX AND LOX BY CURCUMIN. In: BHARAT, B. A.; YOUNG, J. S.; SHISHIR, S. (Eds.). . **The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease**. New York: Springer, 2015. v. 1p. 213–226.

CUNHA, S.H. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Acute Inflammation Pain**. v.102, p. 1755–1760, 2005

DA ROCHA, M. D. et al. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders II: Alzheimer’s Disease. **Cns & Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 10, n. 2, p. 251–270, 2011.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behaviour, and Depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247–264, 2009.

DIAS, K. S. T. et al. Recent Applications of the Multi-Target Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer’s Disease. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, 2015.

DIAS, K. S. T.; VIEGAS, C. Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer’s Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 12, p. 239–255, 2014.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. SUPPL. 1, p. 128–138, 7 mar. 2008.

ELLMAN, G. L. et al. A New and Rapid Colorimetric of Acetylcholinesterase Determination. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

FERRARI, A. et al. ??-Amyloid Induces Paired Helical Filament-Like Tau Filaments in Tissue Culture. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 40162–40168, 2003.

FOLOPPE, N.; HUBBARD, R. Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods? **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 29, p. 3583–3608, 2006.

FRIESNER, R. A. et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6177–6196, 2006.

GENG, J. G. Directional migration of leukocytes: their pathological roles in inflammation and strategies for development of anti-inflammatory therapies. **Cell research**, v. 11, n. 2, p. 85–8, 2001.

GOLD, P. E.; LARRY, C.; WENK, G. L. Ginkgo Biloba as a cognitive enhancer. **Psychological Science In The Public Interest**, v. 71, n. 4, p. 57–63, 2002.

GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230–1235, 2012.

GONZALEZ-DOMINGUEZ, R.; GARCIA-BARRERA, T.; GOMEZ-ARIZA, J. L. Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. **BioMetals**, v. 27, n. 3, p. 539–549, 2014.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Getting on and staying on. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 64, n. 4, p. 216–235, 2003.

GRUNDMAN, M. Vitamin E and Alzheimer disease: The basis for additional clinical trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 630–636, 2000.

GUPTA, S. C. et al. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1937, 2011.

HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 101–112, 2007.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7514–7517, 2004.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, 2015.

HOSODA, A. et al. Preparation of a 1,6-di-O-feruloyl-myo-inositol derivative: An efficient method for introduction of ferulic acid to 1,6-vicinal hydroxyl groups of myo-inositol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 7199–7201, 2001.

IBGE. **Mudança demográfica no Brasil no início do século XXI**. Rio de Janeiro: [s.n.].

INOUE, A. et al. The Simulated Binding of (\pm)-2,3-Dihydro-5,6-dimethoxy-2-[[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]methyl]-1 H -inden-1-one Hydrochloride (E2020) and Related Inhibitors to Free and Acylated Acetylcholinesterases and Corresponding Structure–Activity Analyses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 22, p. 4460–4470, jan. 1996.

JIANG, H. et al. Benzenediol-berberine hybrids: Multifunctional agents for Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 7228–7235, 2011.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, n. 1–2, p. 91–104, 2010.

KAMAT, P. K. et al. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 648–661, 2016.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698–712, 2011.

KIM, S. et al. Zinc-modified cyanoborohydride as a selective reducing agent. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 1927–1932, 1985.

KOLYKHALOV, I. V. et al. Cholinergic treatment of Alzheimer's disease and its influence on health and the quality of life of carers. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 41, n. 5, p. 542–547, 2011.

KURAPATI, K. R. V. et al. β -Amyloid1-42, HIV-1Ba-L (Clade B) infection and drugs of abuse induced degeneration in human neuronal cells and protective effects of ashwagandha (*Withania somnifera*) and its constituent Withanolide A. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–23, 2014.

LEMES, L. F. N. et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687–700, 2016.

LI, S. Y.; WANG, X. B.; KONG, L. Y. Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivatives as multi-targeted agents against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 36–45, 2014.

RUBIRALTA, M.; DIEZ, E. G. A. **PIPERIDINE: Structure, Preparation, Reactivity, and Synthetic Applications of Piperidine and its Derivatives**. 1st Editio ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. v. 43

MADHAVI SASTRY, G. et al. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 3, p. 221–234, 2013.

MAO, F. et al. Novel tacrine-ebesen hybrids with improved cholinesterase inhibitory, hydrogen peroxide and peroxynitrite scavenging activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 24, p. 6737–6742, 2013.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: Implications for therapy. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 4, p. 479–497, 2013.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 30, 2007.

MISHRA, S.; PALANIVELU, K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease :

An overview. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 11, n. 1, p. 13, 2008.

MOLINUEVO, J. L.; LLADÓ, A.; RAMI, L. Memantine: targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and other dementias. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 20, n. 2, p. 77–85, 2005.

MOLLER, H. J. AND GRAEBER, M. B. The case described by Alois Alzheimer in 1911. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 248, p. 111–122, 1998.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 2005.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

OLIVARES, D. et al. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 6, p. 746–758, 1 jun. 2012.

OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK_a Predictions BT - Journal of Chemical Theory and Computation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 2, p. 525–537, 2011.

PAN, M.-H.; LAI, C.-S.; HO, C.-T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, n. 1, p. 15–31, 2010.

PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, p. 84, 2015.

RAUK, A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? **Dalton transactions**, n. 10, p. 1273–1282, 2008.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 1 maio 2011.

ROBERT, A. et al. Regulation of copper and Iron homeostasis by metal chelators: A possible chemotherapy for alzheimers disease. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 5, p. 1332–

1339, 2015.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 1347–1358, fev. 2002.

RYDBERG, E. H. et al. Complexes of Alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 18, p. 5491–5500, 2006.

SAMADI, A. et al. Multipotent drugs with cholinergic and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. I. Synthesis, biological assessment, and molecular modeling of simple and readily available 2-aminopyridine-, and 2-chloropyridine-. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 5861–5872, 2010.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280–285, 2011.

SASTRE, M.; RITCHIE, C. W.; HAJJI, N. Metal Ions in Alzheimer's **Disease Brain**. v. 2, n. Cd, p. 1–6, 2015.

SEBASTIÀ, J. et al. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. **Cytometry. Part A : the Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 51, n. 1, p. 16–25, 2003.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12013–7, 1994.

SHELLEY, J. C. et al. Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 12, p. 681–691, 2007.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347–52, 1989.

SILVA, T. et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 116–145, 2014.

SLOANE, P. D. et al. THE PUBLIC HEALTH IMPACT OF ALZHEIMER'S DISEASE, 2000 – 2050 : Potential Implication of Treatment Advances. **Annual Review Public Health**, v. 23, p. 213–231, 2002.

SMITH, C. J. et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13313–13318, 27 out. 1998.

TAROZZI, A. et al. Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 424, n. 1, p. 36–40, 2007.

TAROZZI, A. et al. Cyanidin 3-O-glucopyranoside protects and rescues SH-SY5Y cells against amyloid-beta peptide-induced toxicity. **NeuroReport**, v. 19, n. 15, p. 1483–1486, out. 2008.

TAROZZI, A. et al. Sulforaphane as an inducer of glutathione prevents oxidative stress-induced cell death in a dopaminergic-like neuroblastoma cell line. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 5, p. 1161–1171, 2009.

TUPPO, E. E.; ARIAS, H. R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 2, p. 289–305, 2005.

VIEGAS, C. et al. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4184–4190, 2005.

VIEGAS, C. et al. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4184–4190, 2005.

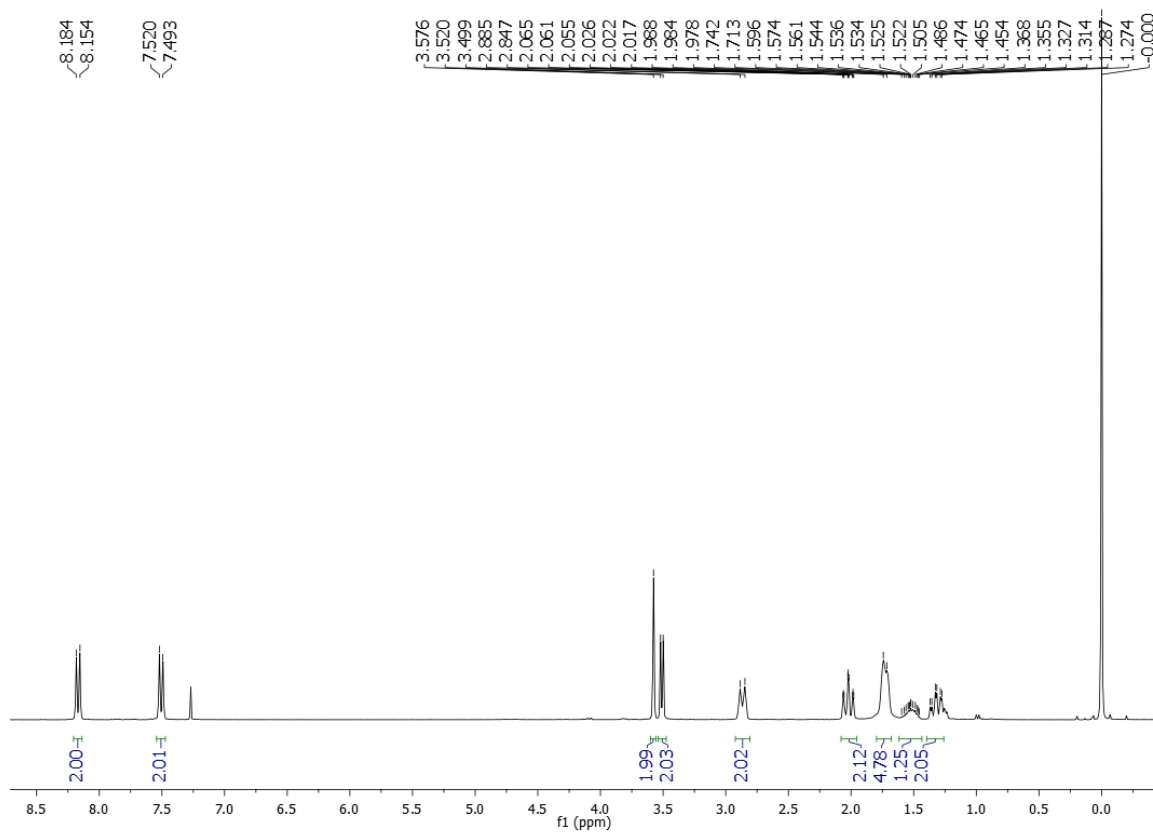
VIEGAS, F. P. D. et al. Alzheimer's Disease: Characterization, Evolution and Implications of the Neuroinflammatory Process. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, 2011.

WISCHIK, C. M.; HARRINGTON, C. R.; STOREY, J. M. D. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 529–539, 2014.

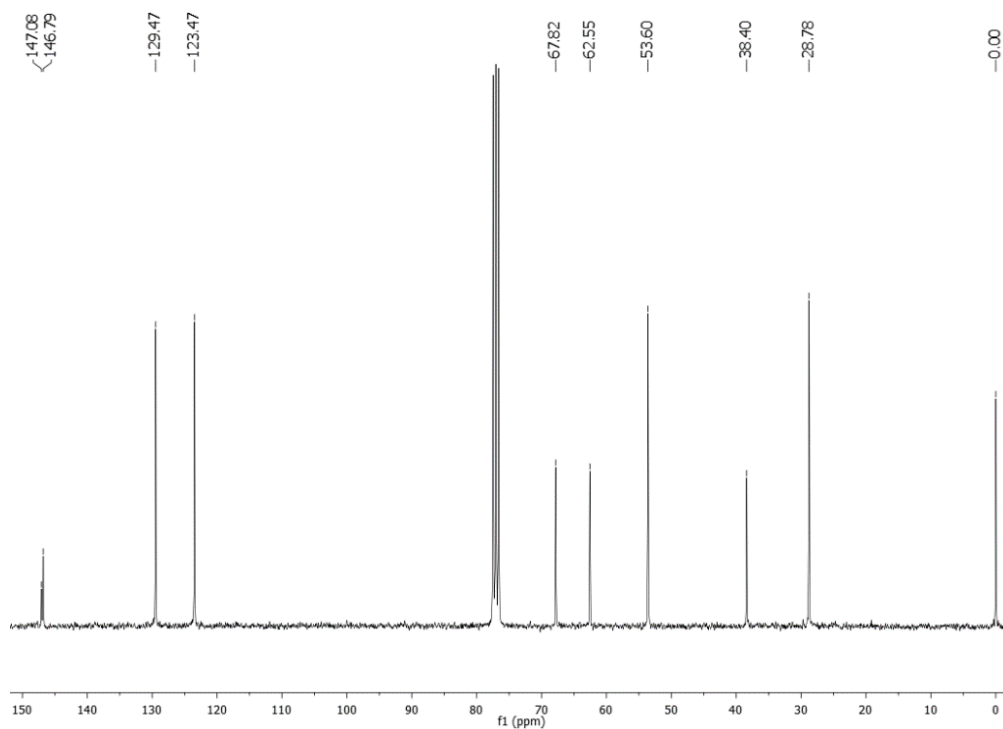
WORLD ALZHEIMER REPORT. The Global Impact of Dementia An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer Disease International**, p. 1–82, 2015.

XU, Y. C.; LEBEAU, E.; WALKER, C. Selective deprotection of esters using magnesium and methanol. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 34, p. 6207–6210, 1994.

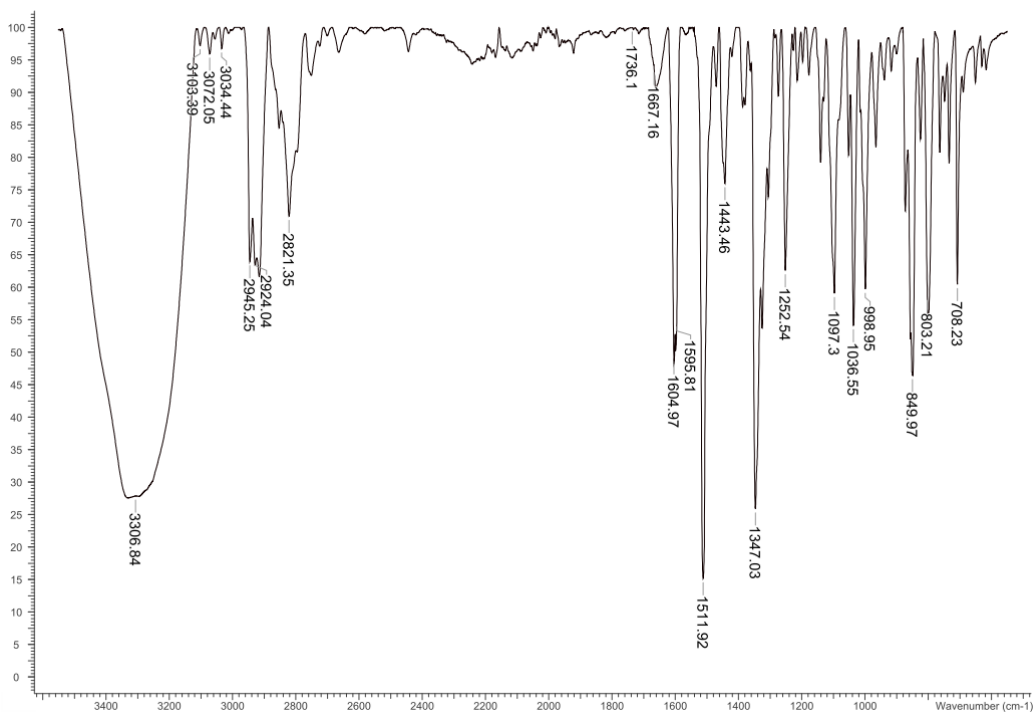
APENDICE A

Figura A1- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto **27b**

Fonte: do autor

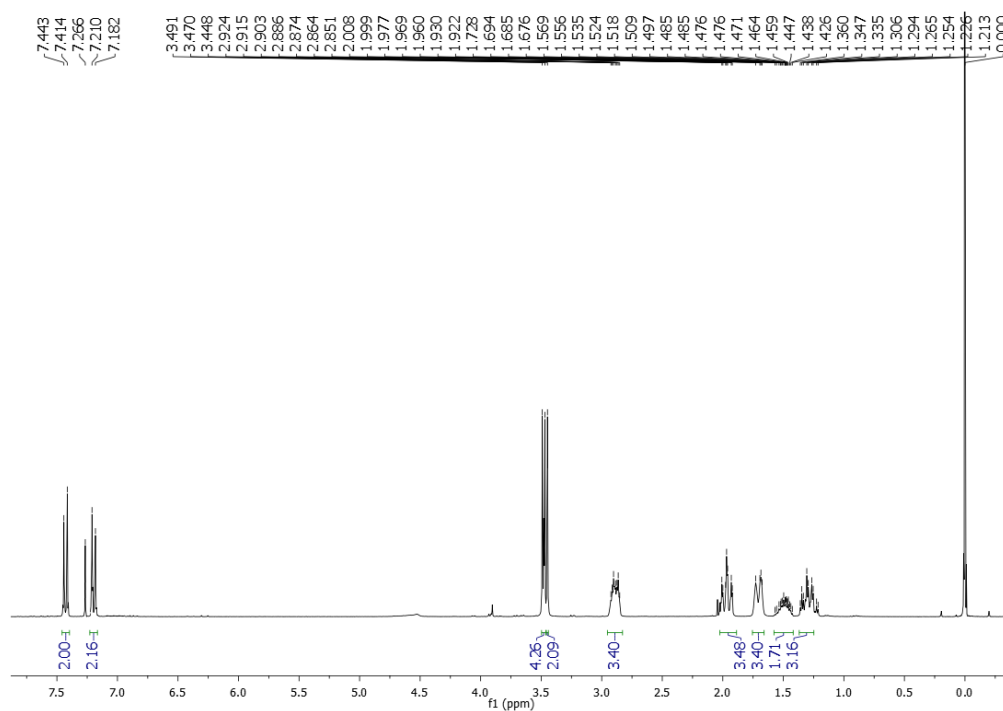
Figura A2- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto **27b**

Fonte: do autor

Figura A3- Espectro no infravermelho do composto **27b**

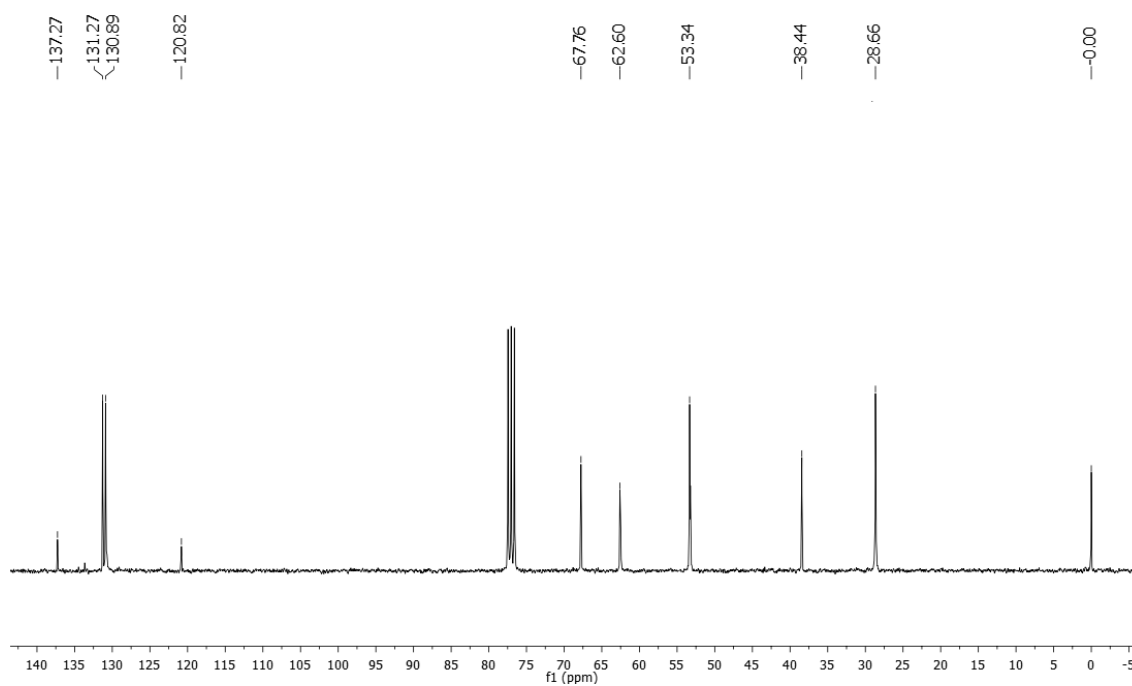
Fonte: do autor

Figura A4. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto **27c**

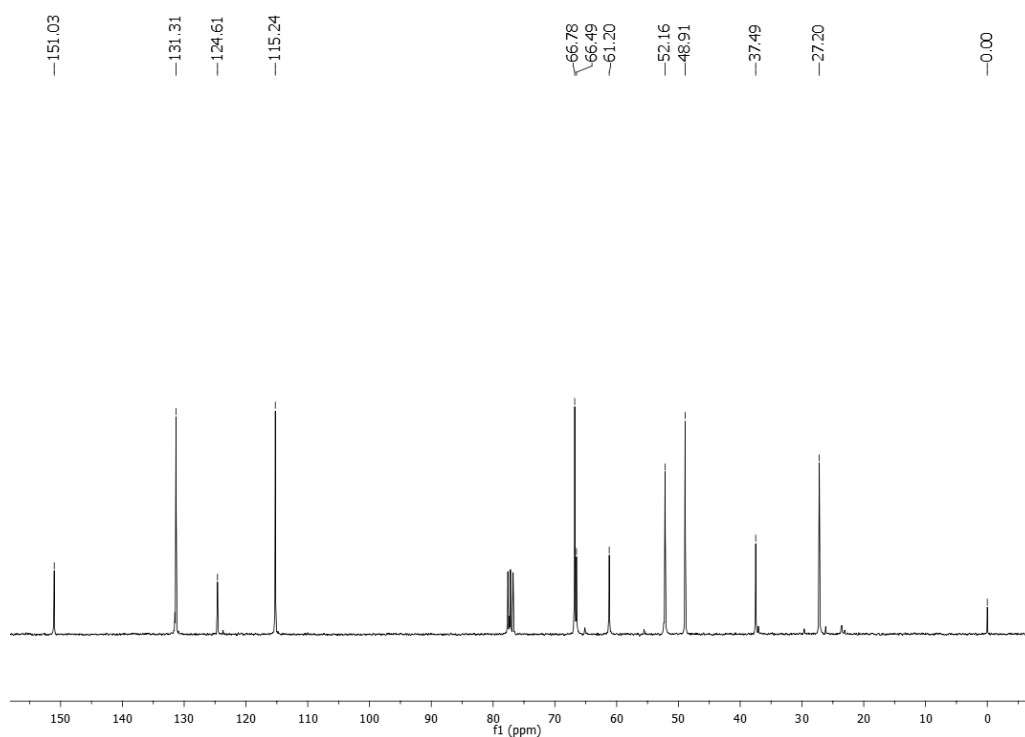


Fonte: do autor

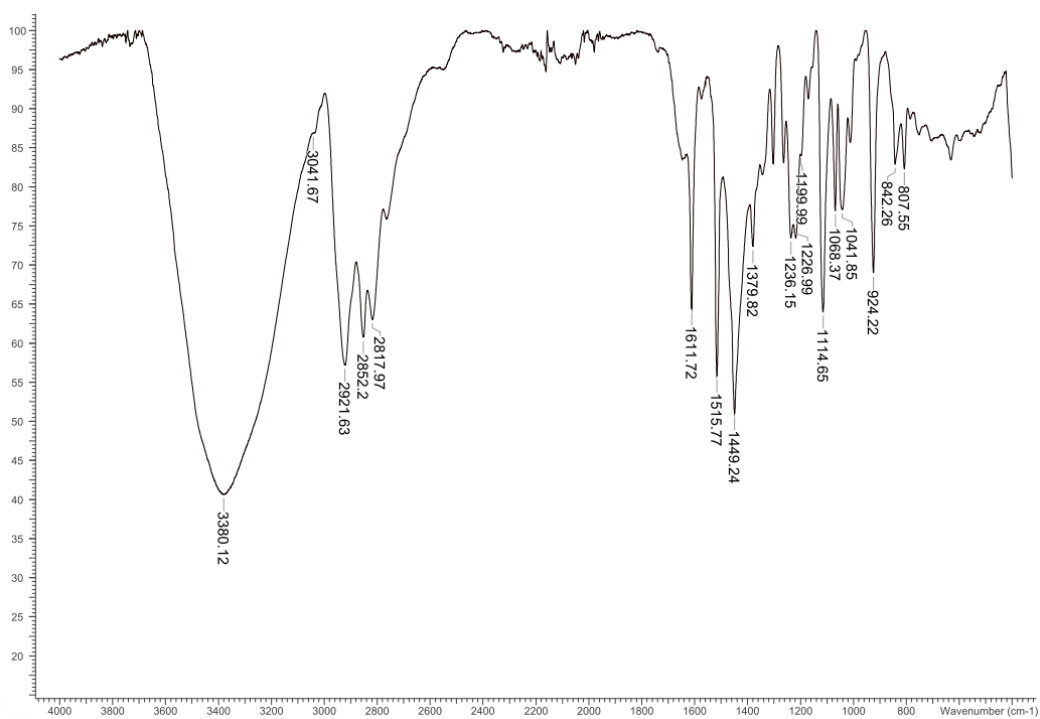
Figura A5- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto **27c**



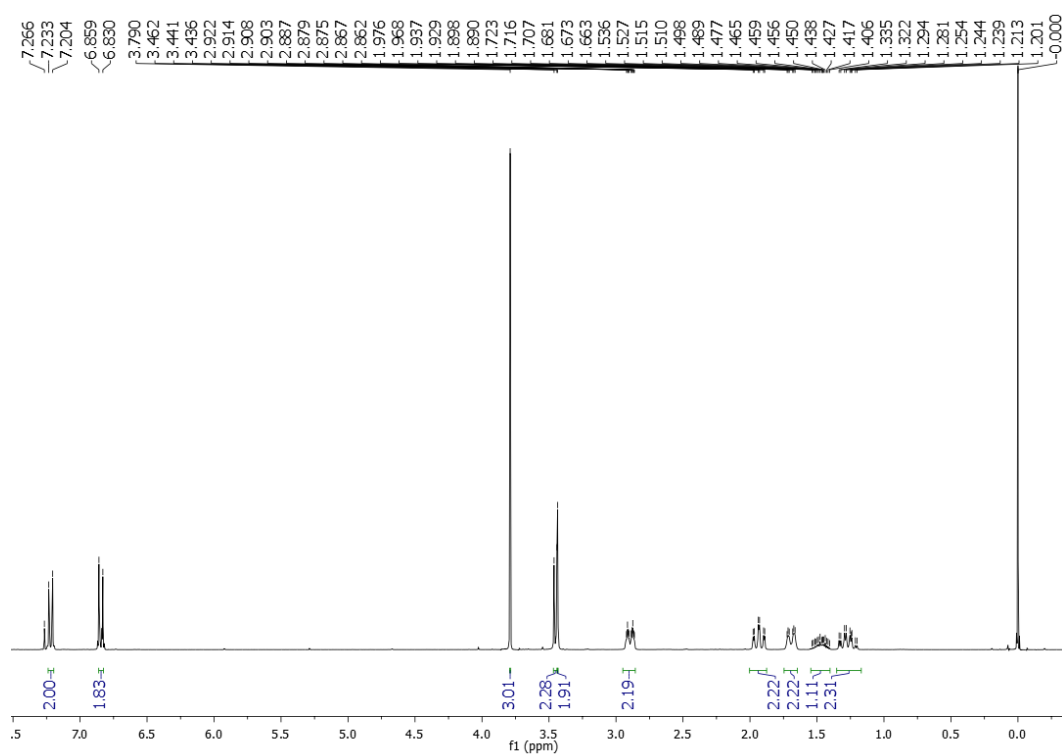
Fonte: do autor

Figura A8- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto **27d**

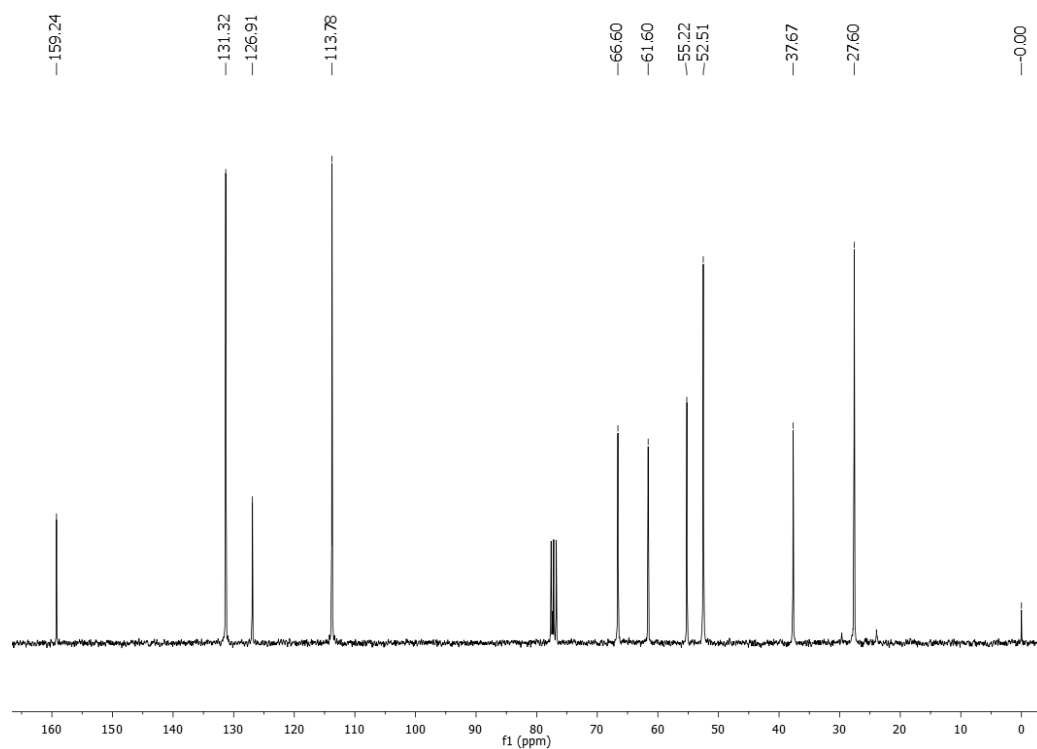
Fonte: do autor

Figura A9- Espectro no infravermelho do composto **27d**

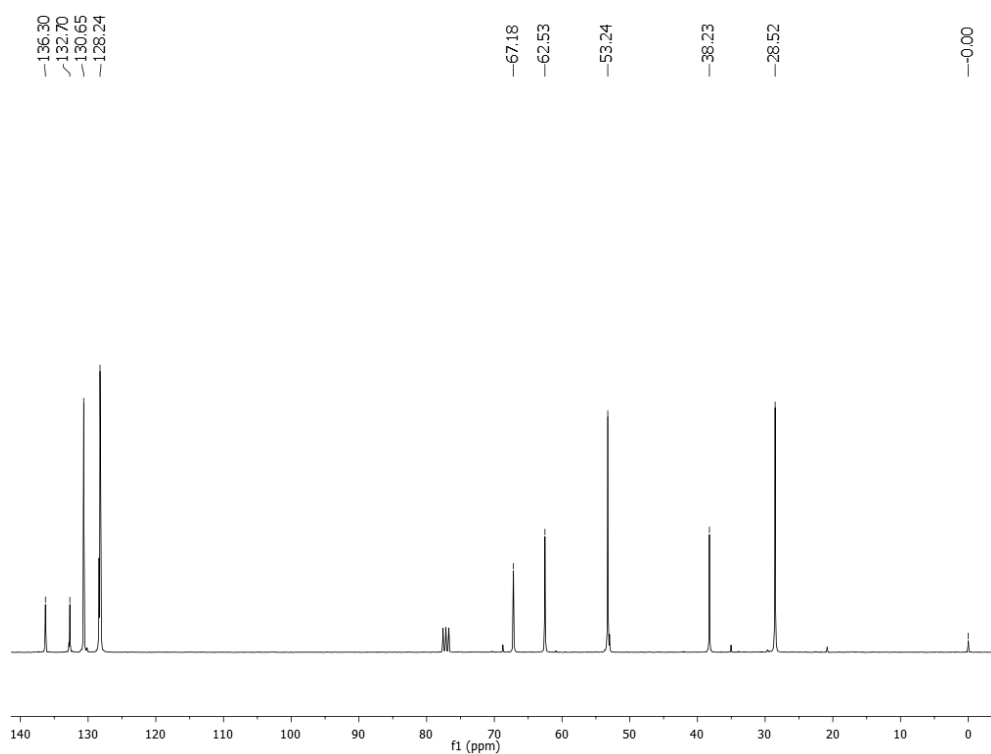
Fonte: do autor

Figura A10- Espectro de RMN ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) do composto **27e**

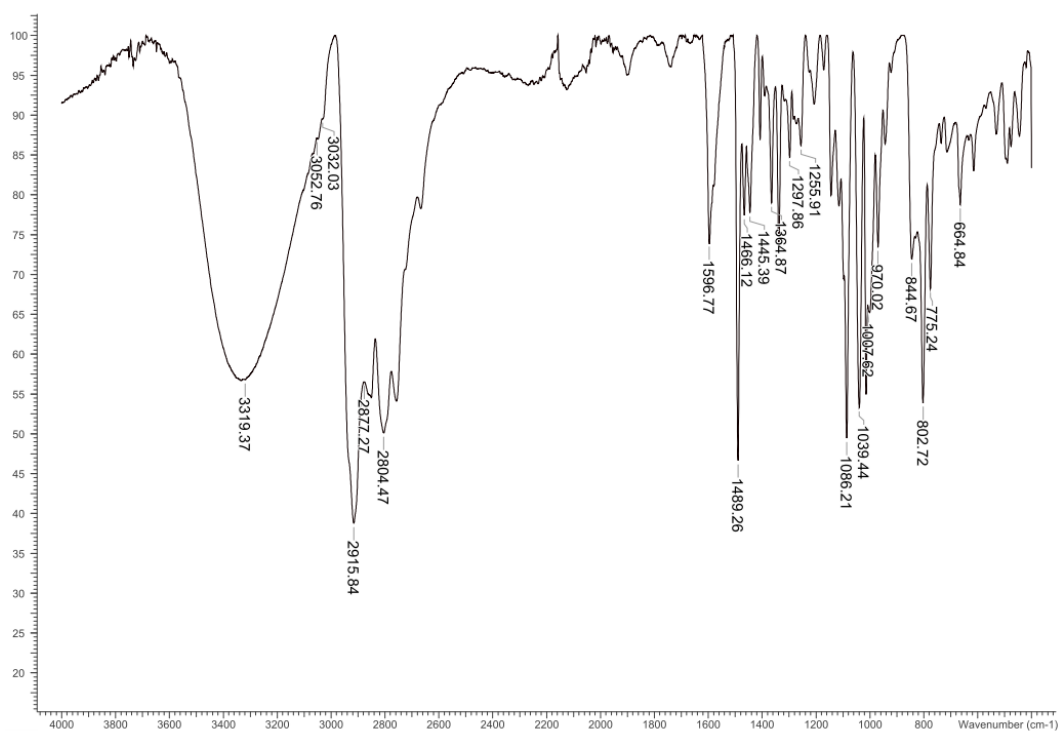
Fonte: do autor

Figura A11. Espectro de RMN ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75MHz) do composto **27e**

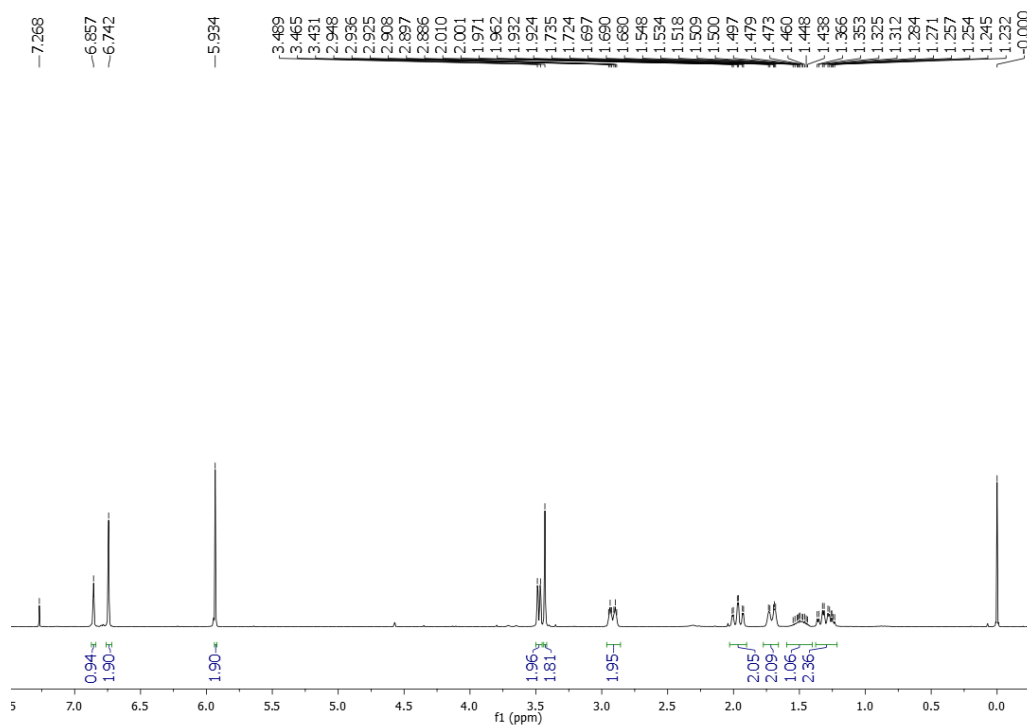
Fonte: do autor

Figura A14- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto **27f**.

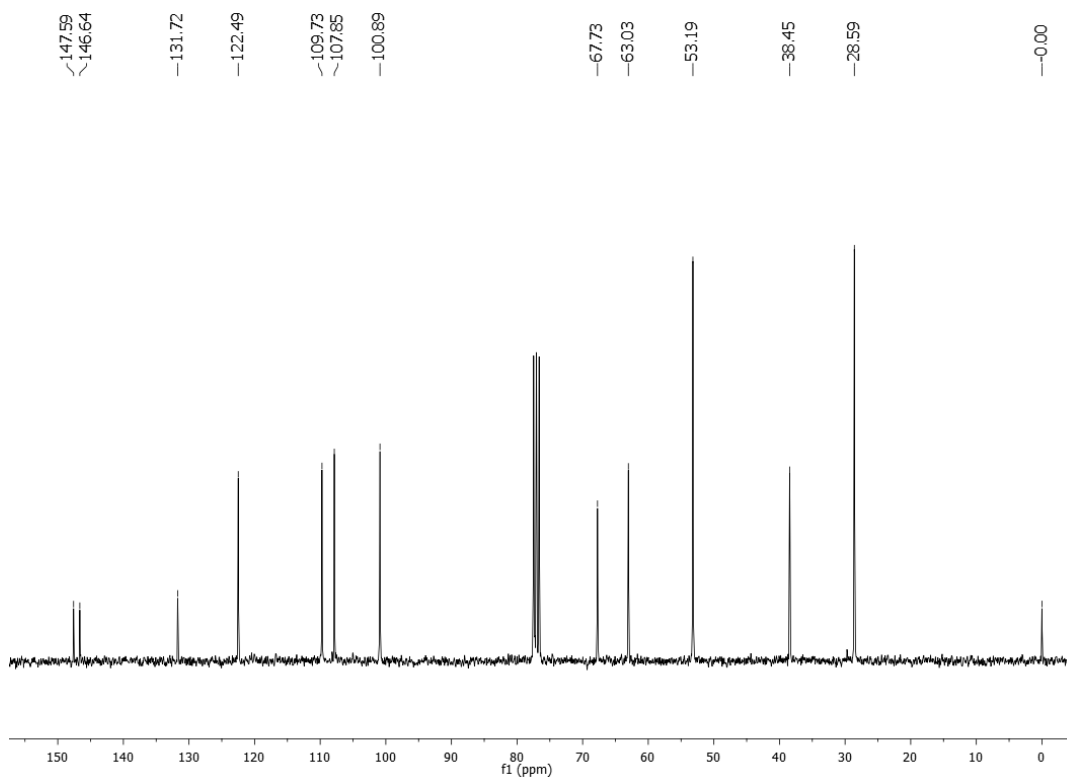
Fonte: do autor

Figura A15- Espectro no infravermelho do composto **27f**

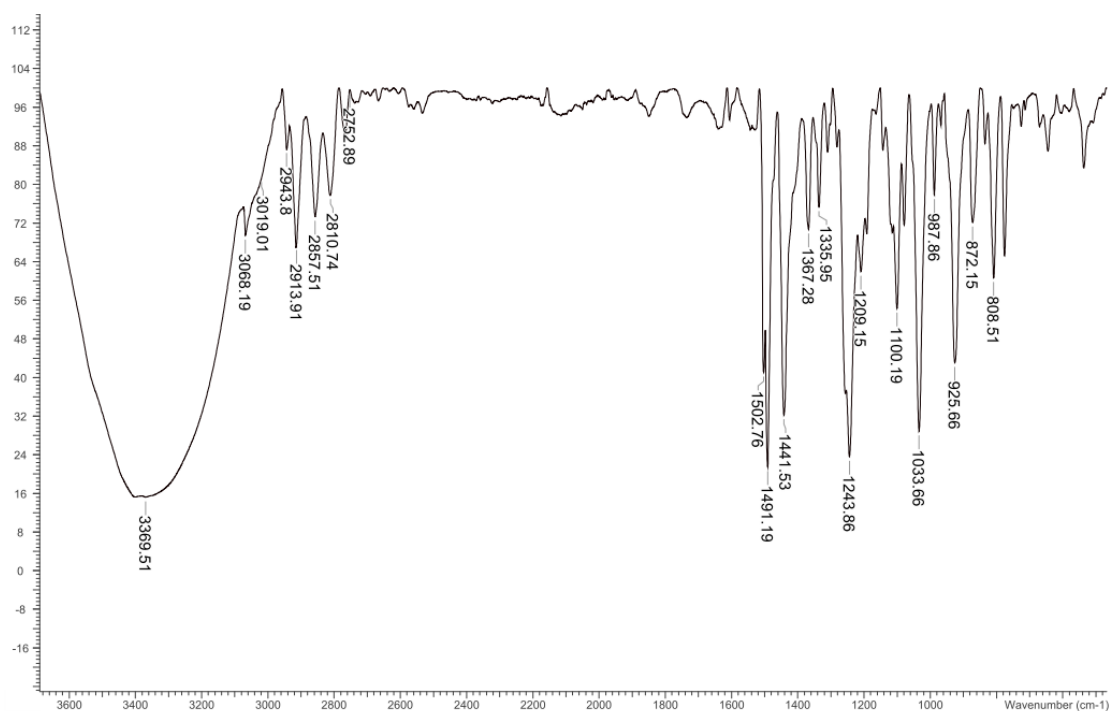
Fonte: do autor

Figura A16- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto **27g**.

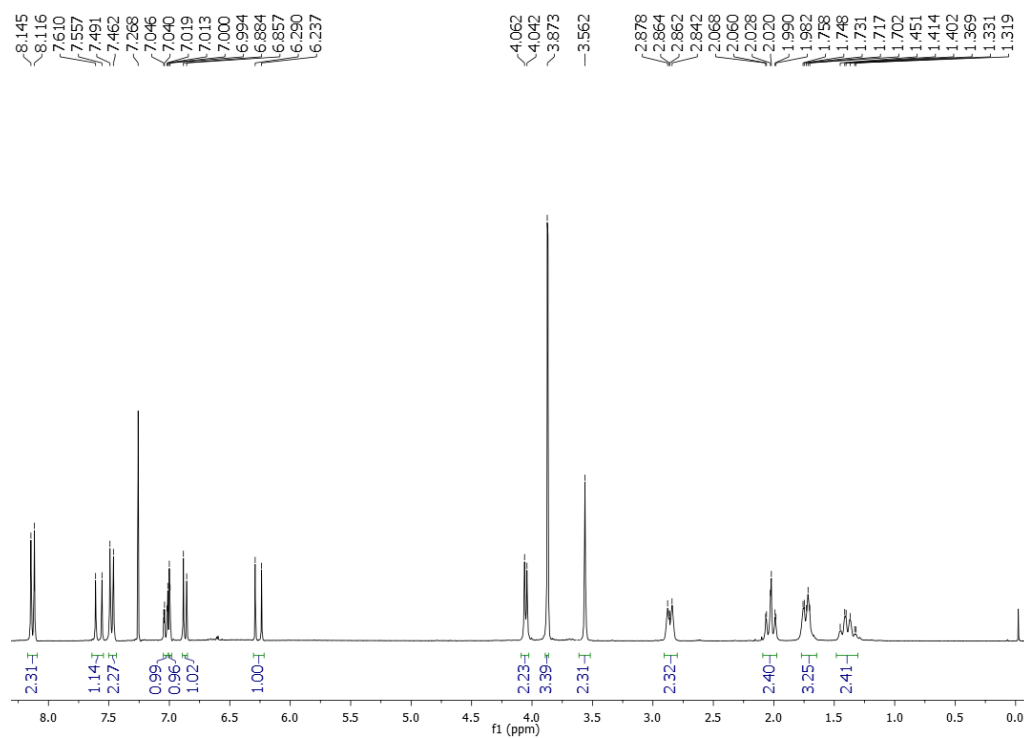
Fonte: do autor

Figura A17. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto **27g**

Fonte: do autor

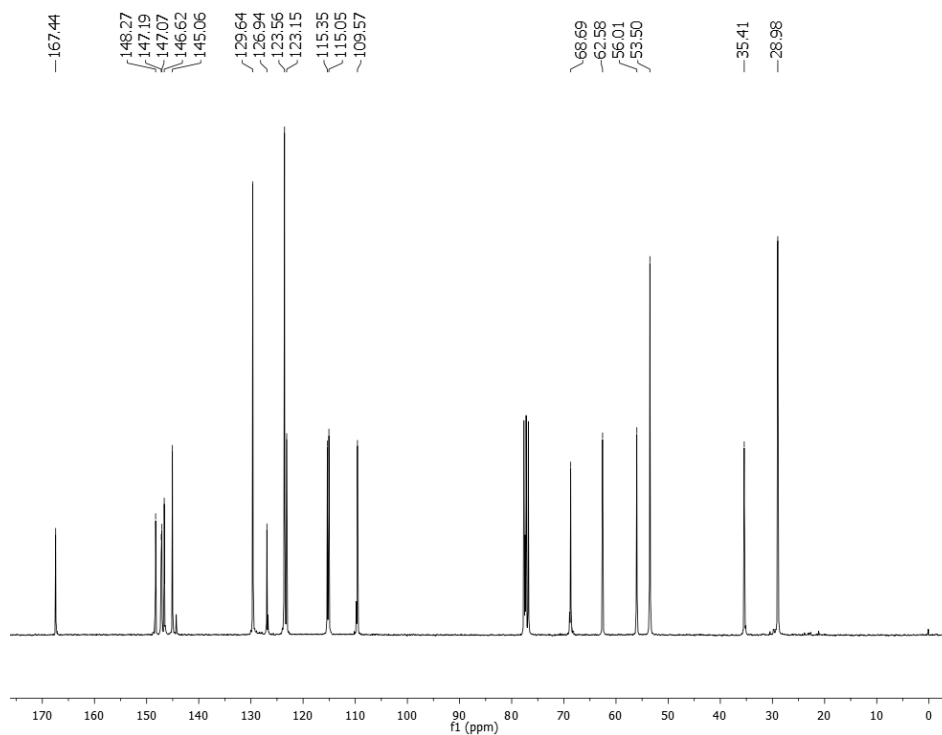
Figura A18- Espectro no infravermelho do composto **27g**

Fonte: do autor

Figura A19- Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do composto PQM-131 (**27b**)

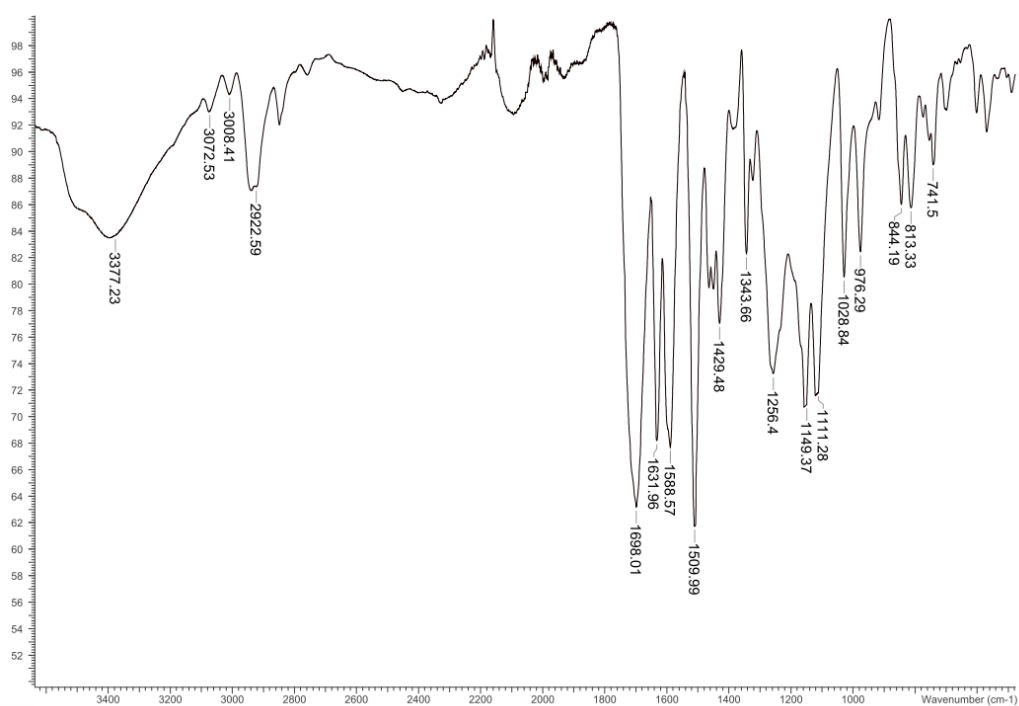
Fonte: do autor

Figura A20- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-131 (**27b**)

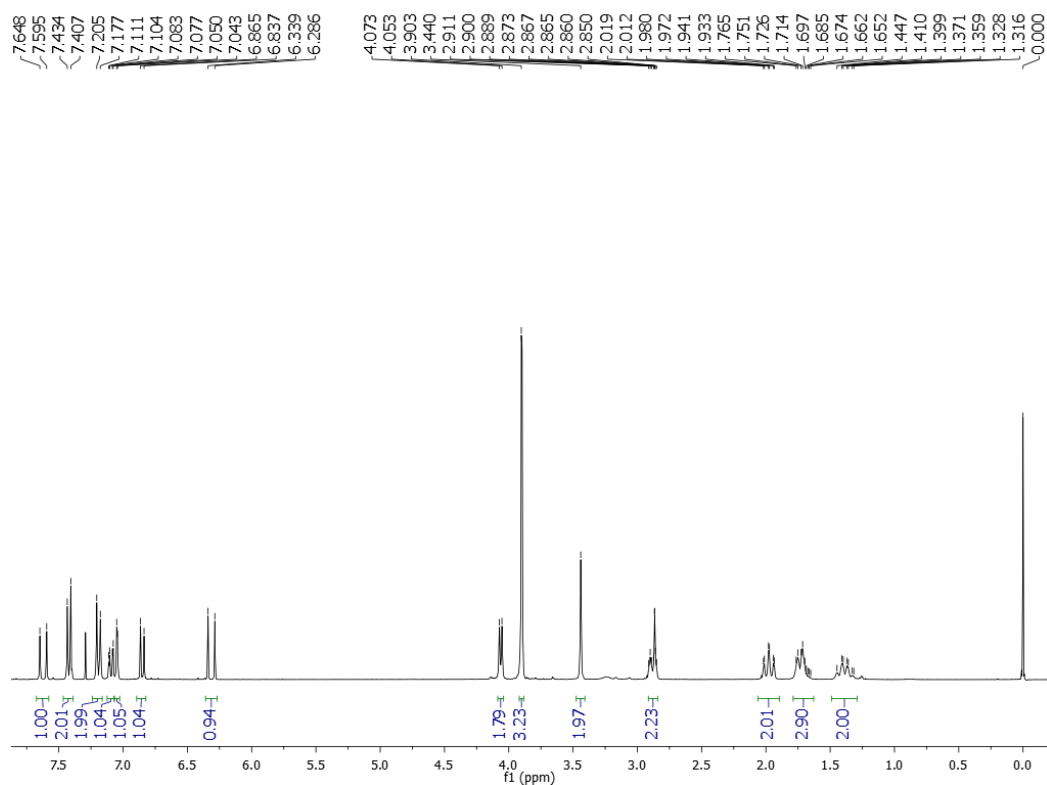


Fonte: do autor

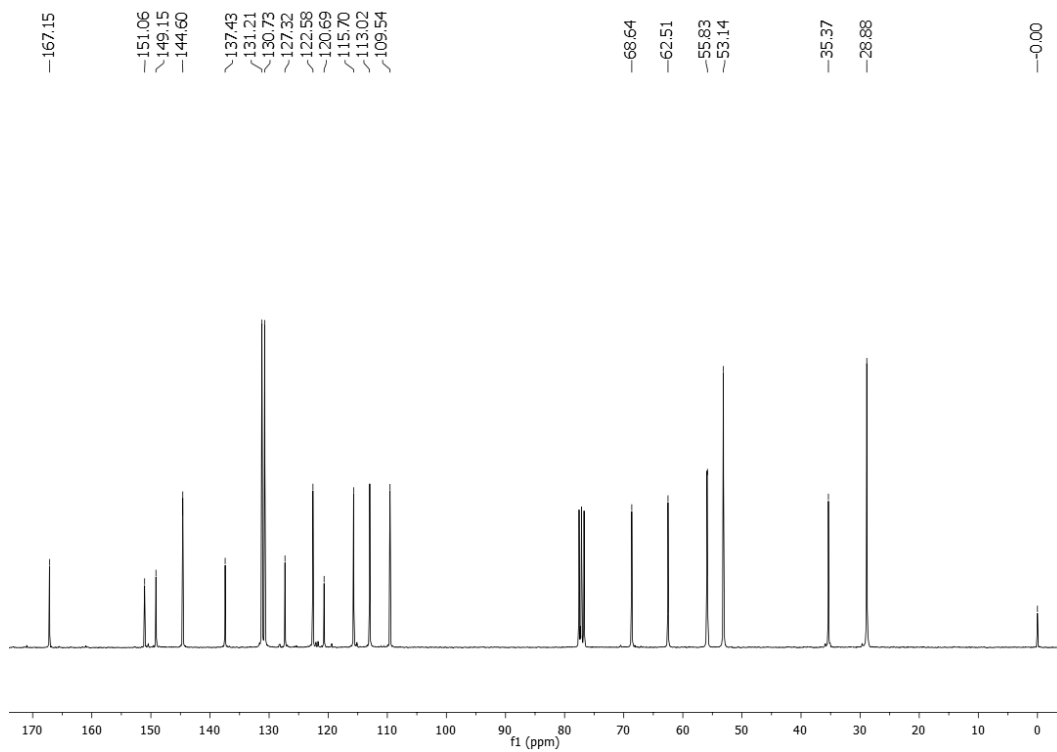
Figura A21- Espectro no infravermelho do composto PQM-131 (**27b**)



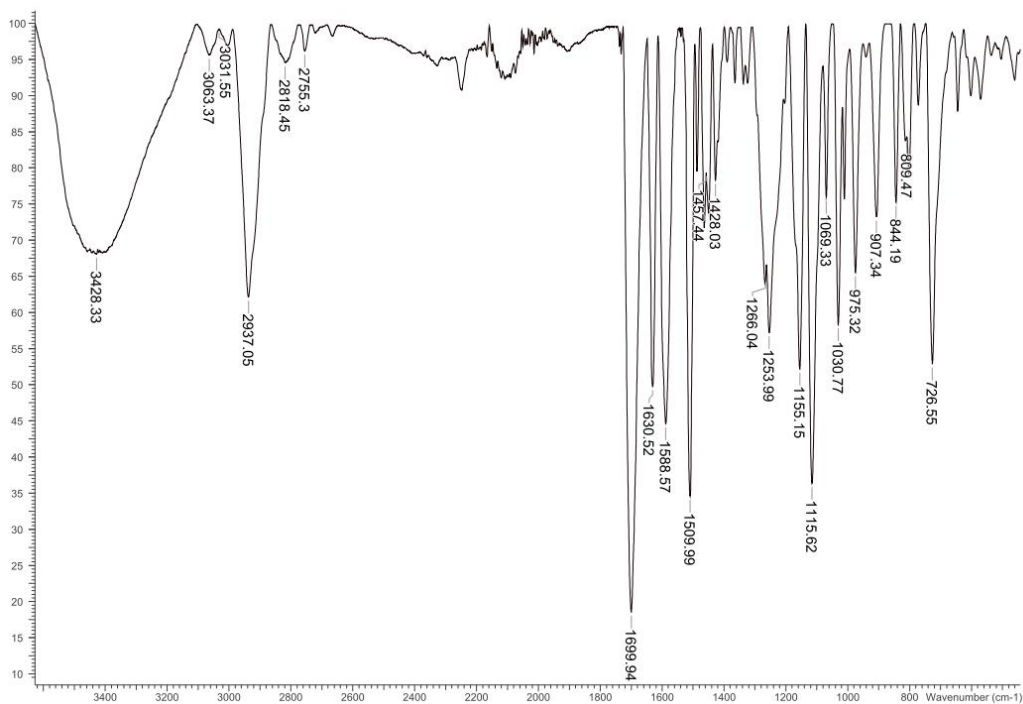
Fonte: do autor

Figura A22- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-132 (**27c**)

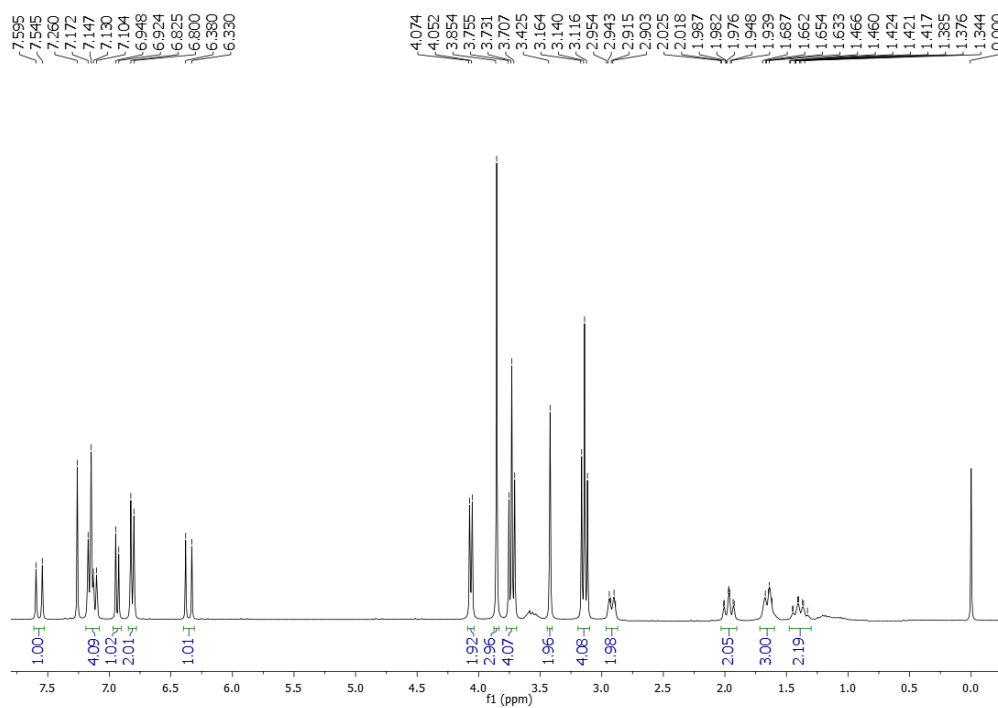
Fonte: do autor

Figura A23- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-132 (**27c**)

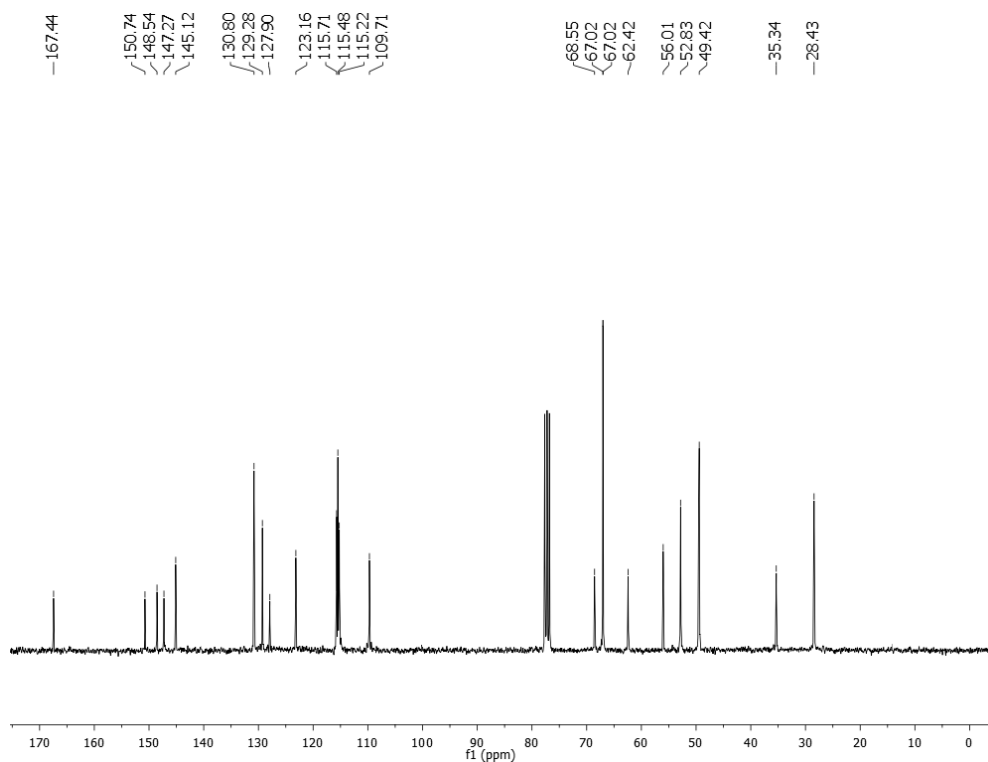
Fonte: do autor

Figura A24- Espectro no infravermelho do composto PQM-132 (**27c**)

Fonte: do autor

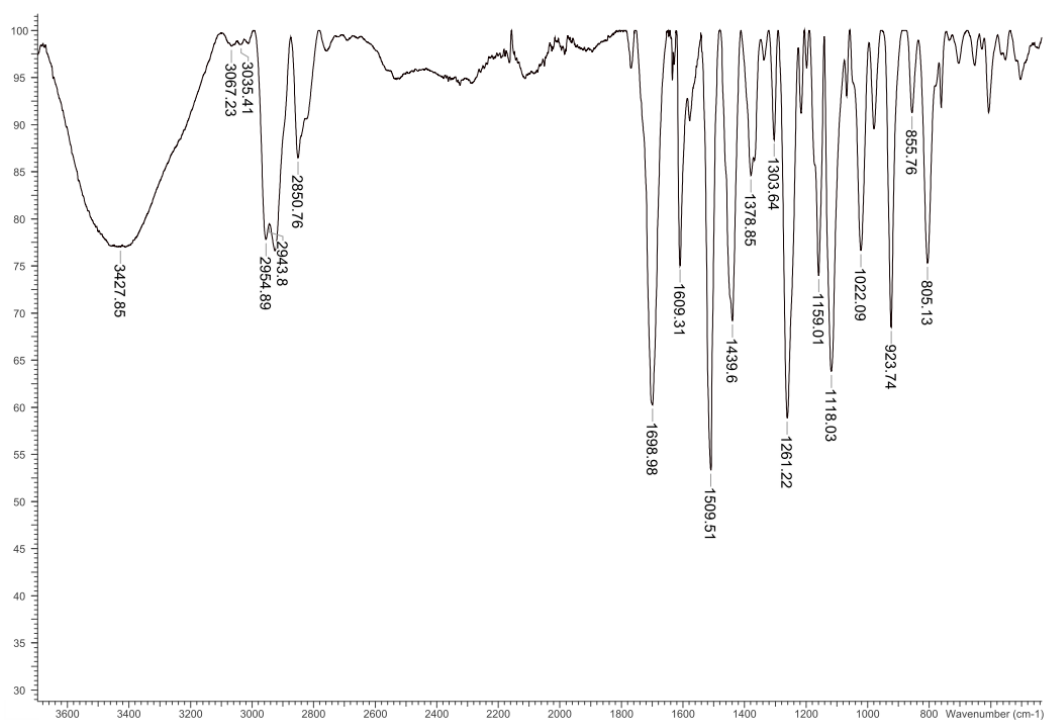
Figura A25- Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do composto PQM-133 (**27d**)

Fonte: do autor

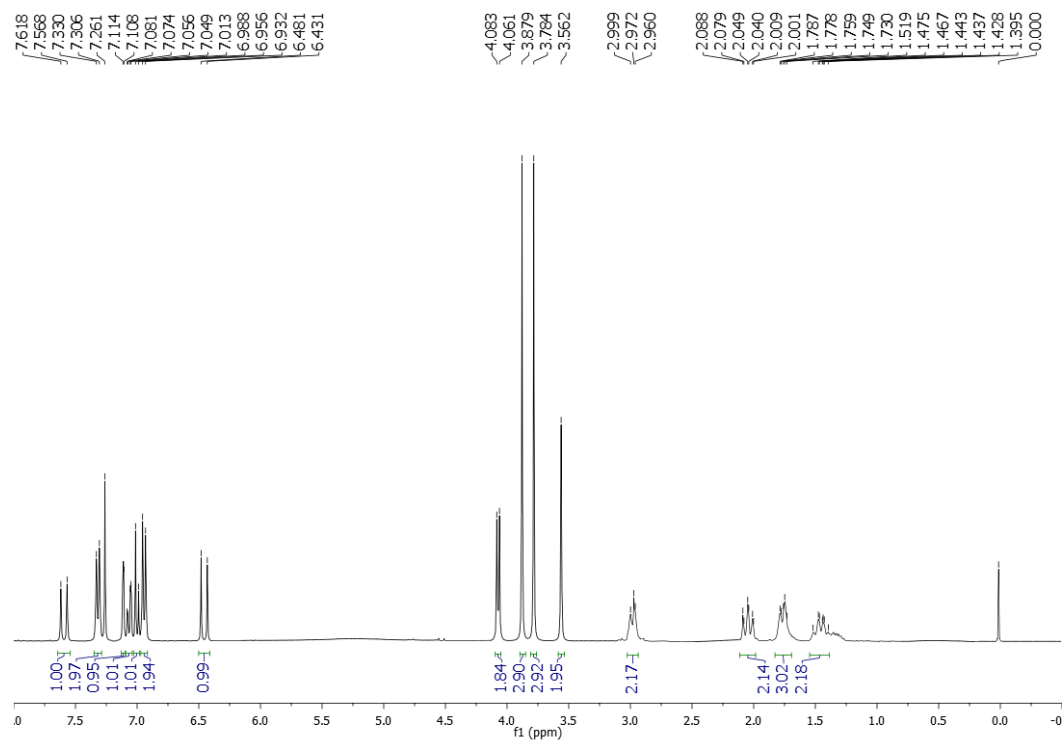
Figura A26- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-133 (27d)

Fonte: do autor

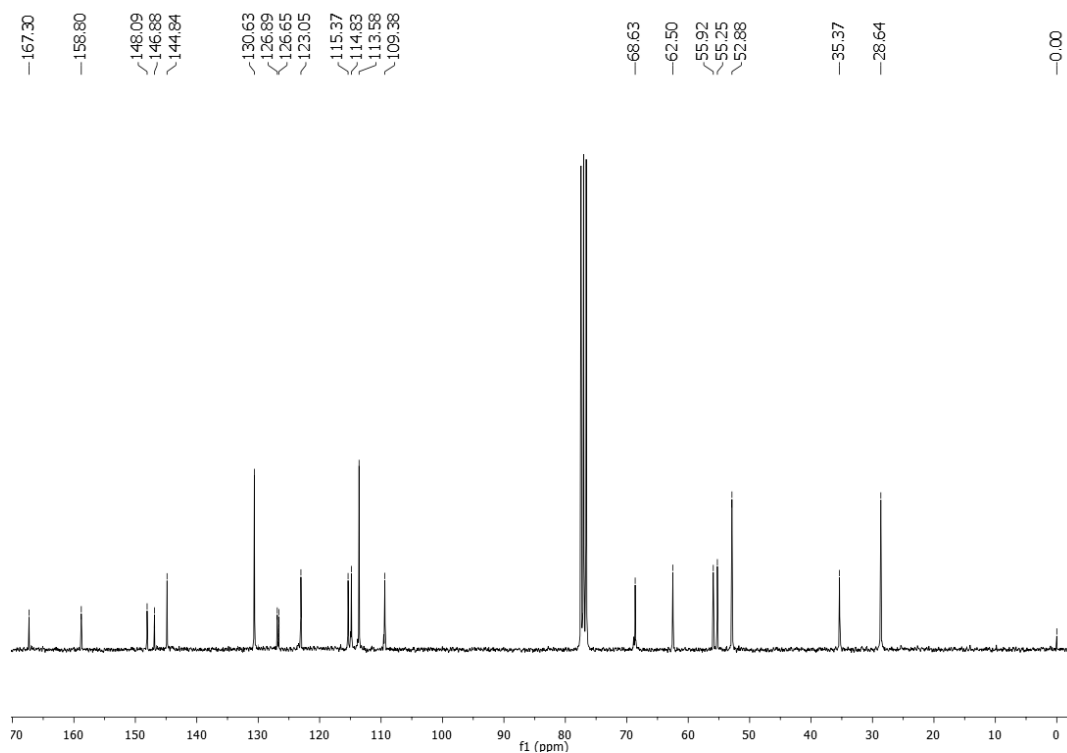
Figura A27- Espectro no infravermelho do composto PQM-133 (27d)



Fonte: do autor

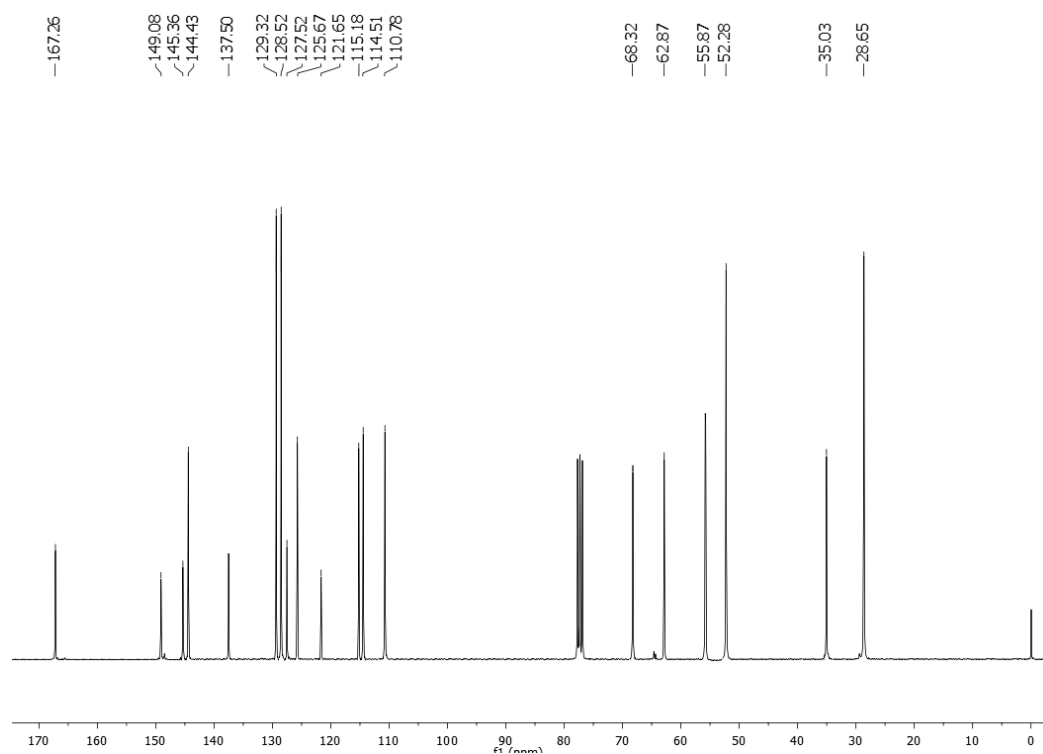
Figura A28- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-134 (**27e**)

Fonte: do autor

Figura A29- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-134 (**27e**)

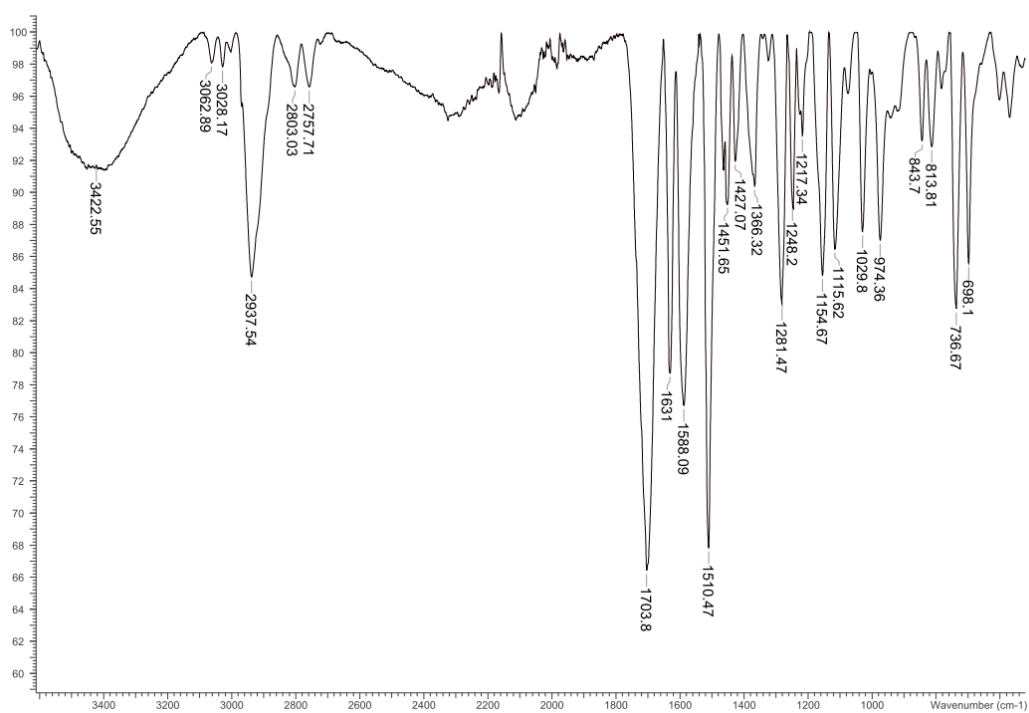
Fonte: do autor

Figura A32. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-151 (**28a**)

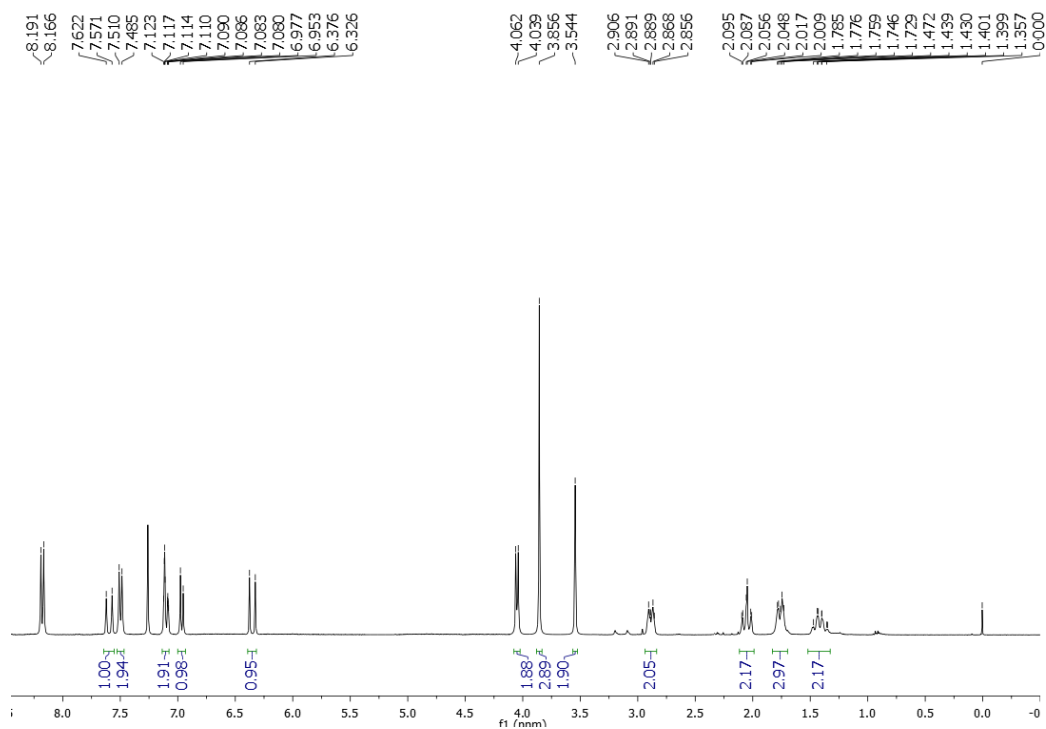


Fonte: do autor

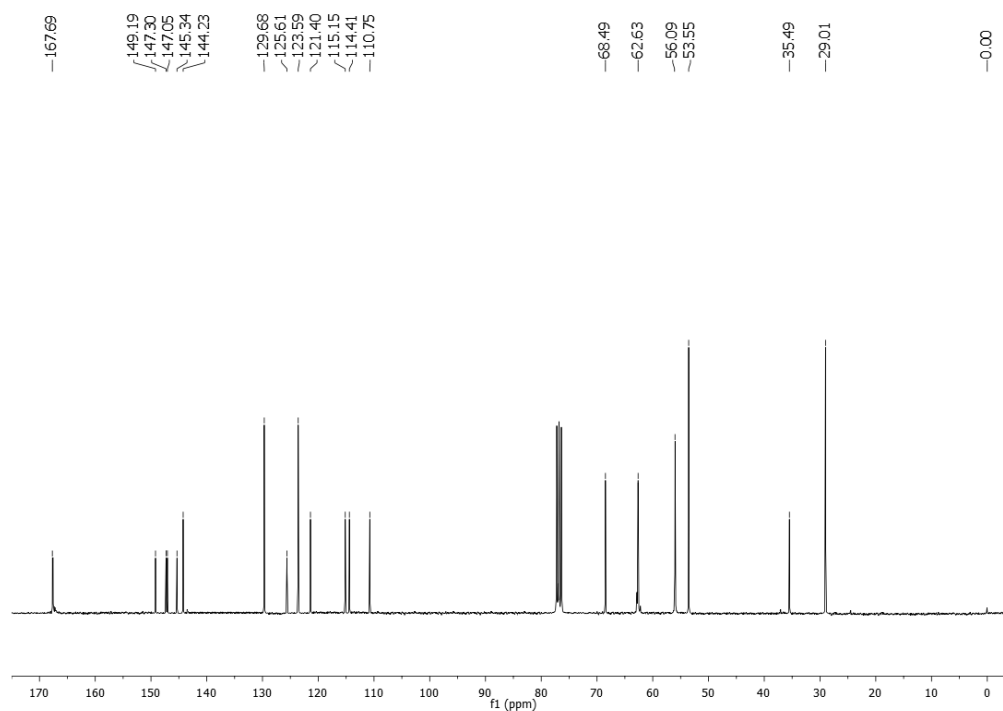
Figura A33. Espectro no infravermelho do composto PQM-151 (**28a**)



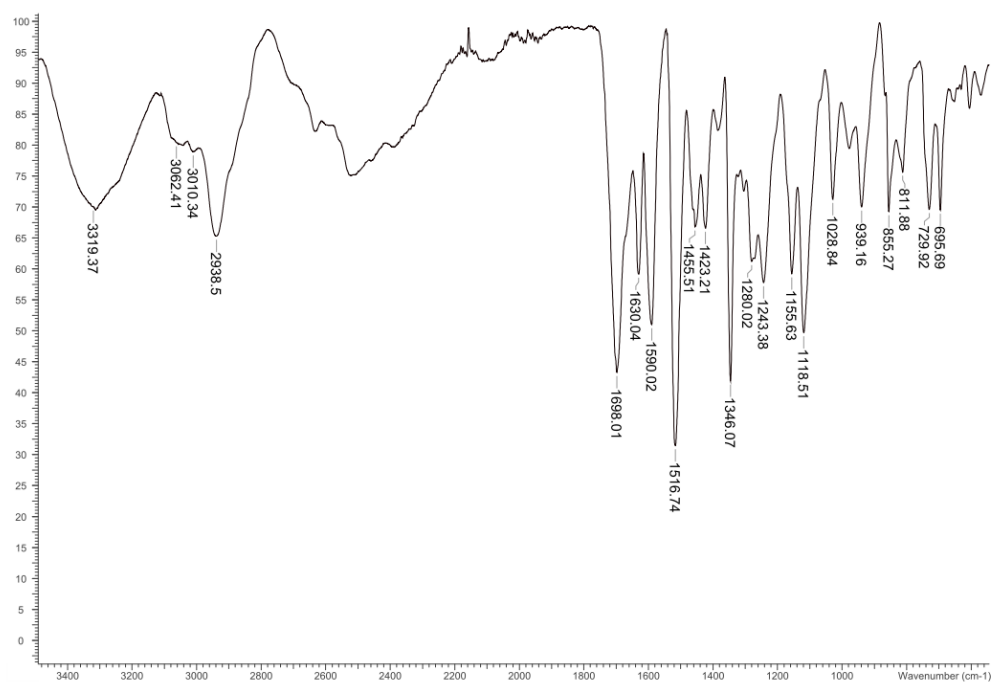
Fonte: do autor

Figura A34. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-152 (**28b**)

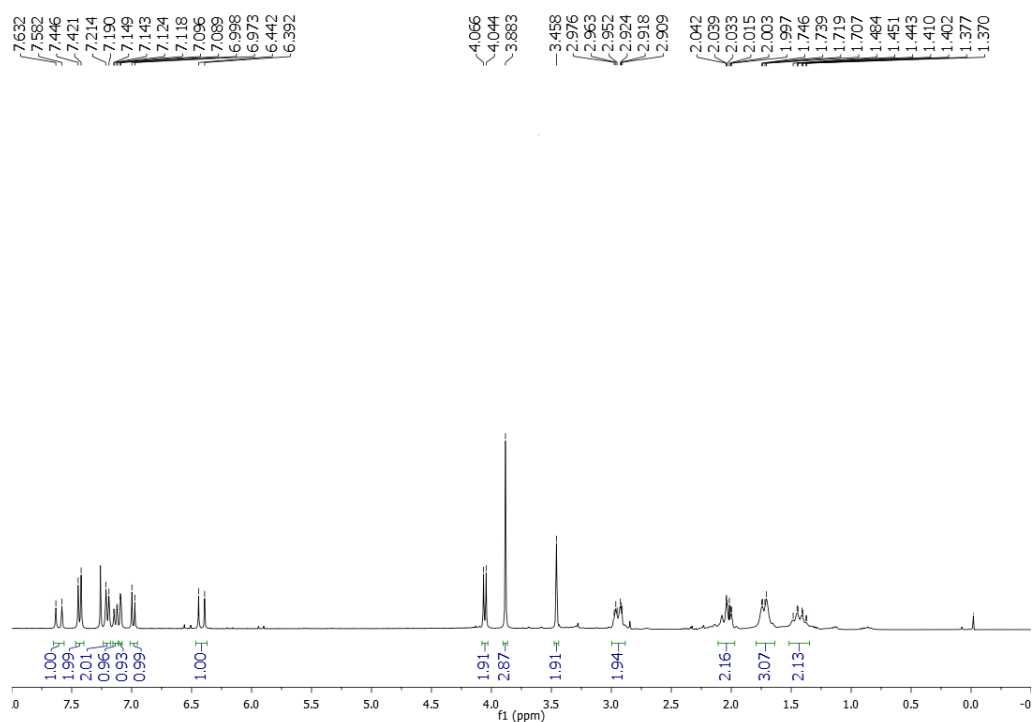
Fonte: do autor

Figura A35. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-152 (**28b**)

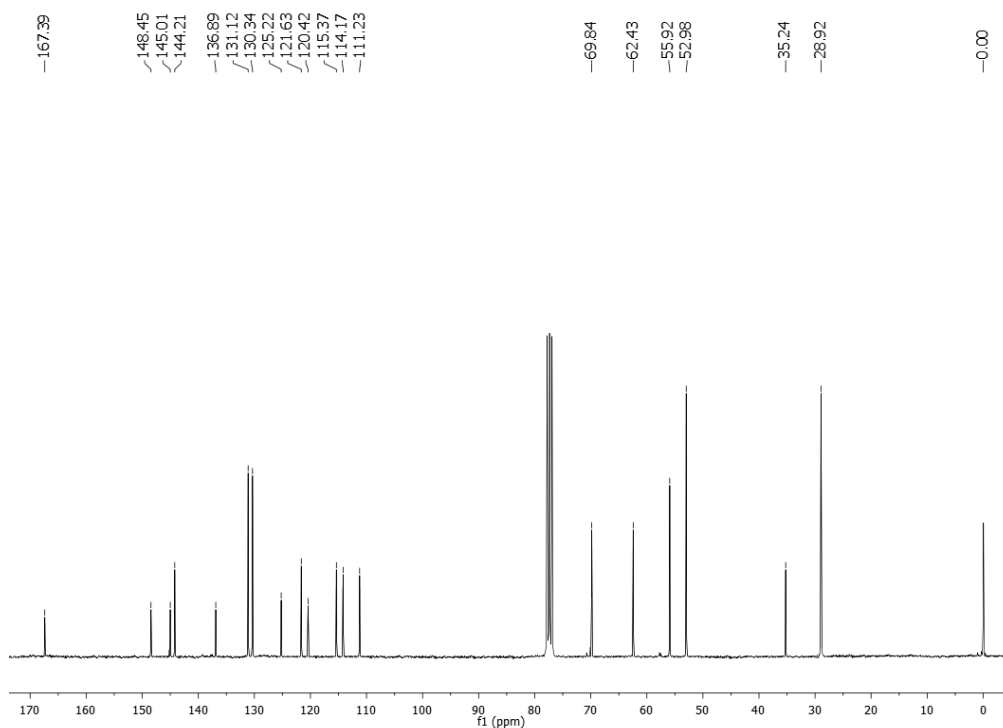
Fonte: do autor

Figura A36. Espectro no infravermelho do composto PQM-152 (**28b**)

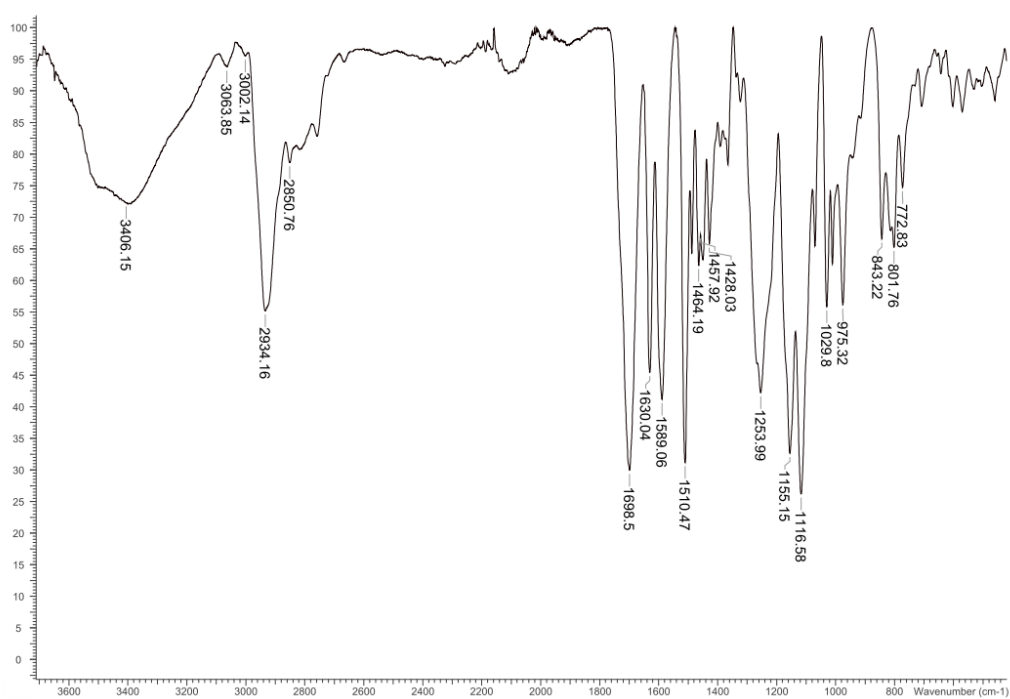
Fonte: do autor

Figura A37- Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do composto PQM-153 (**28 c**)

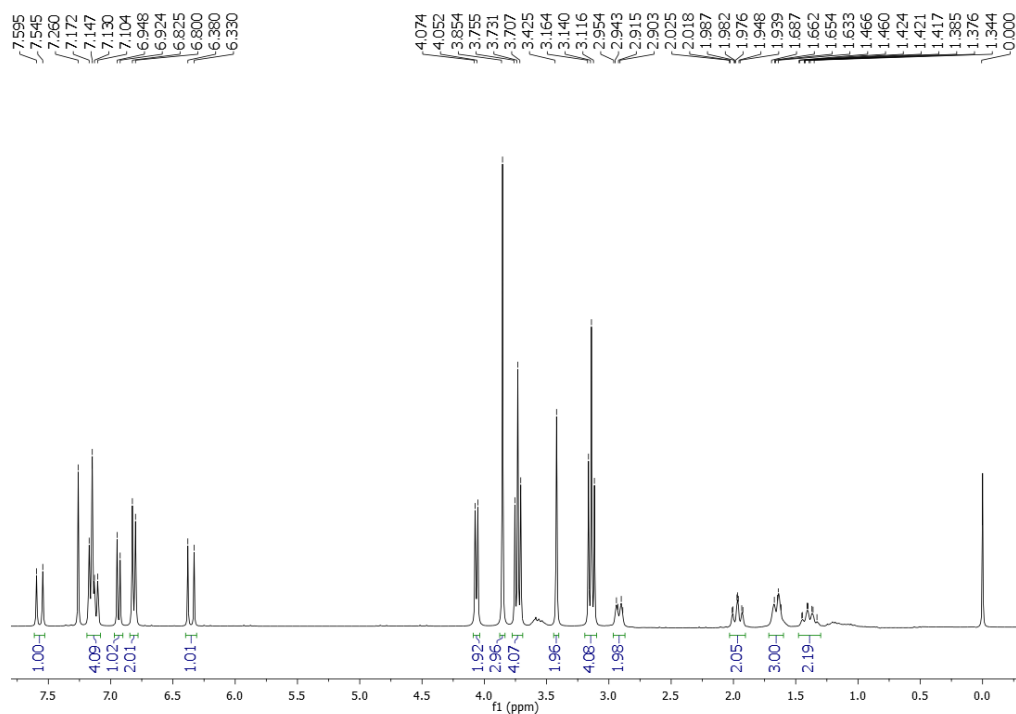
Fonte: do autor

Figura A38- Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-153 (**28 c**)

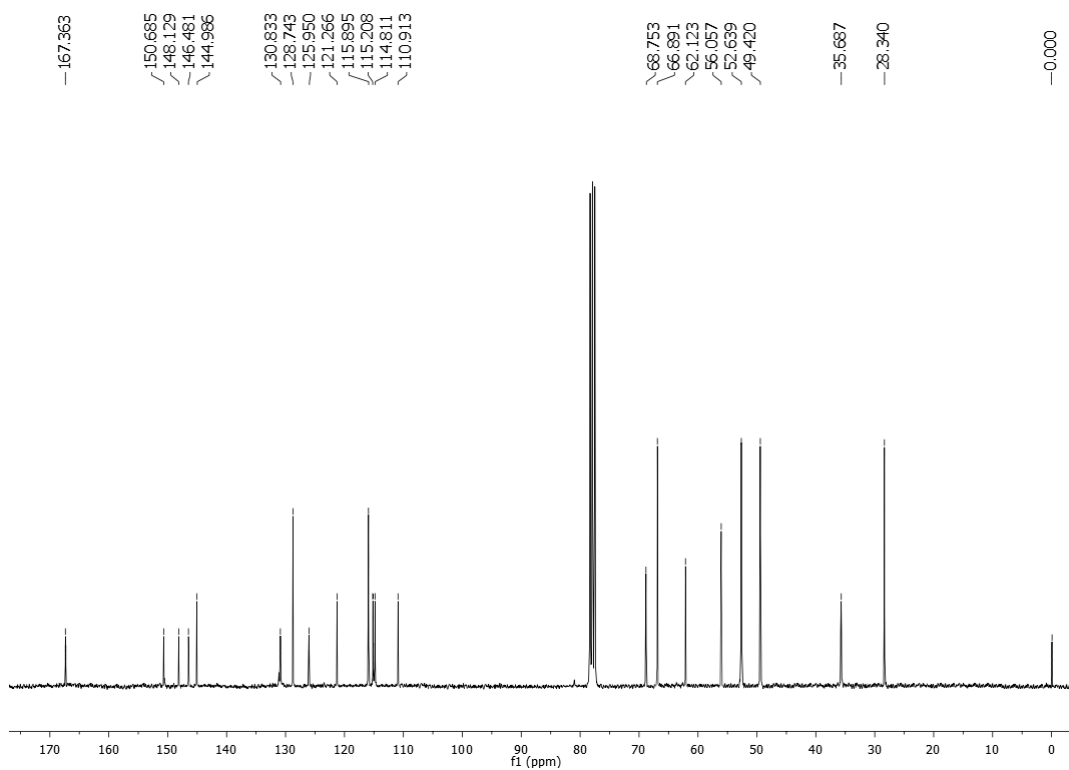
Fonte: do autor

Figura A39- Espectro no infravermelho do composto PQM-153 (**28 c**)

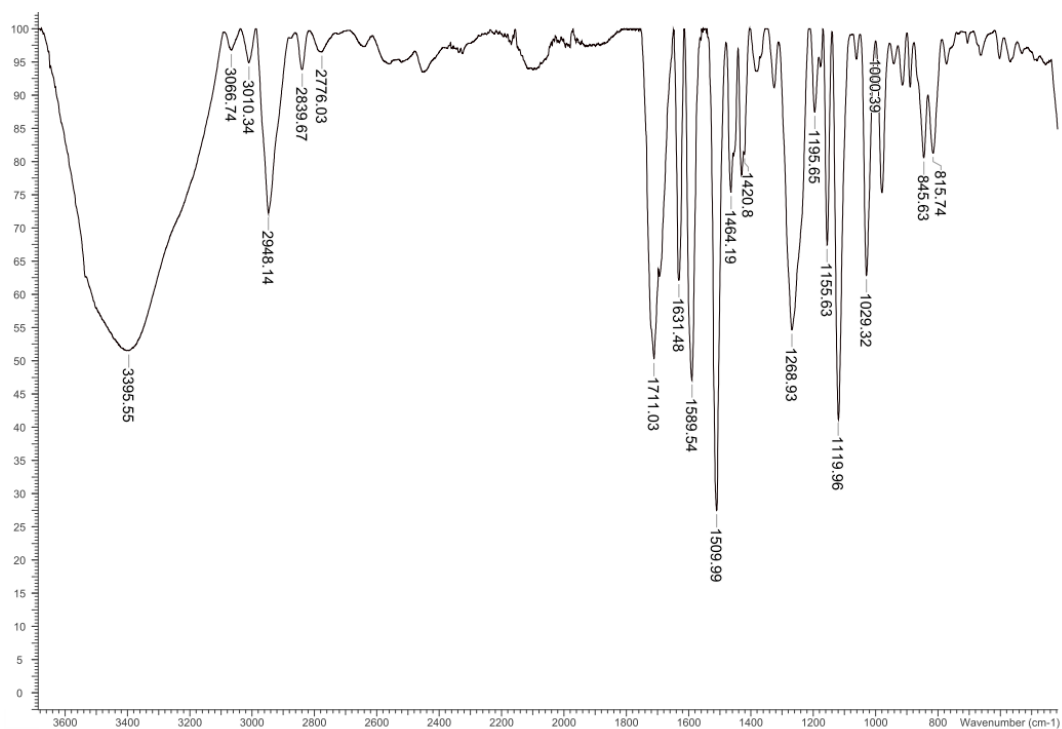
Fonte: do autor

Figura A40. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-154 (**28d**)

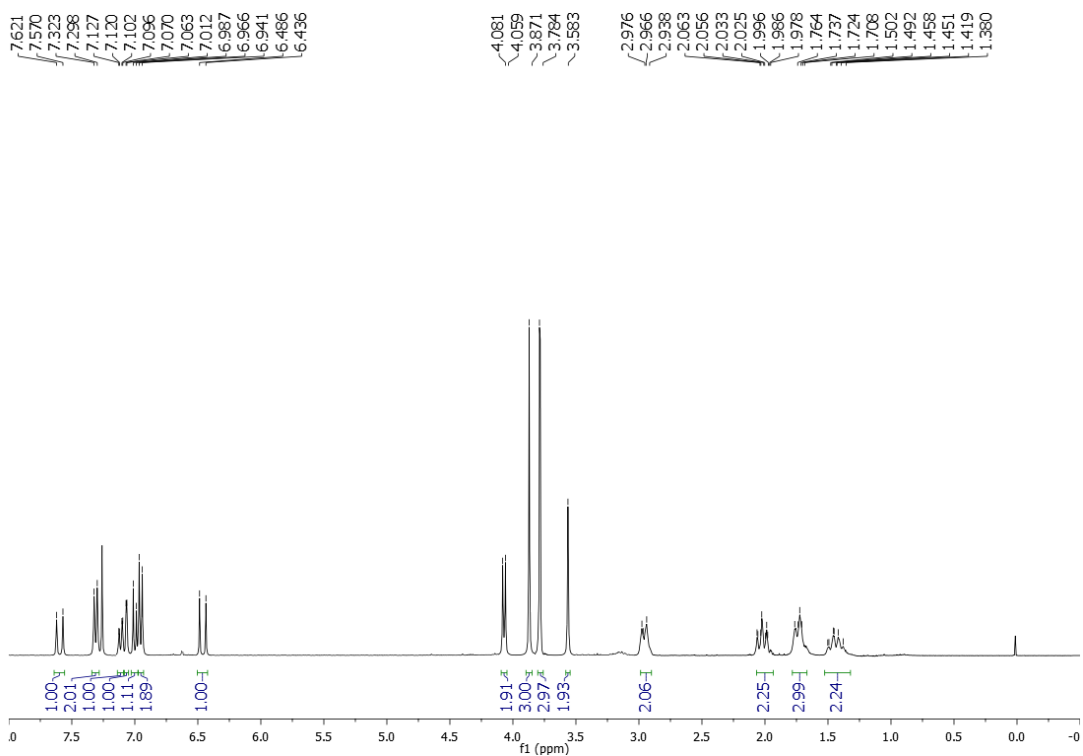
Fonte: do autor

Figura A41. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-154 (**28d**)

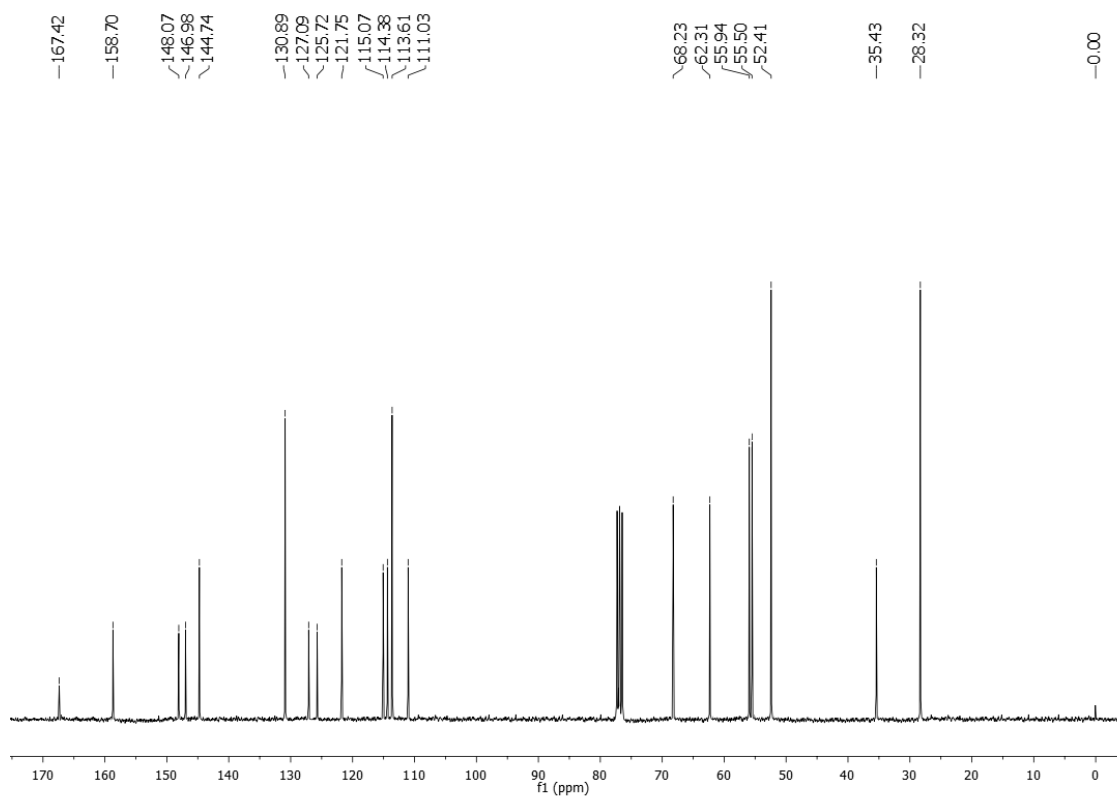
Fonte: do autor

Figura A42- Espectro no infravermelho do composto PQM-154 (**28d**)

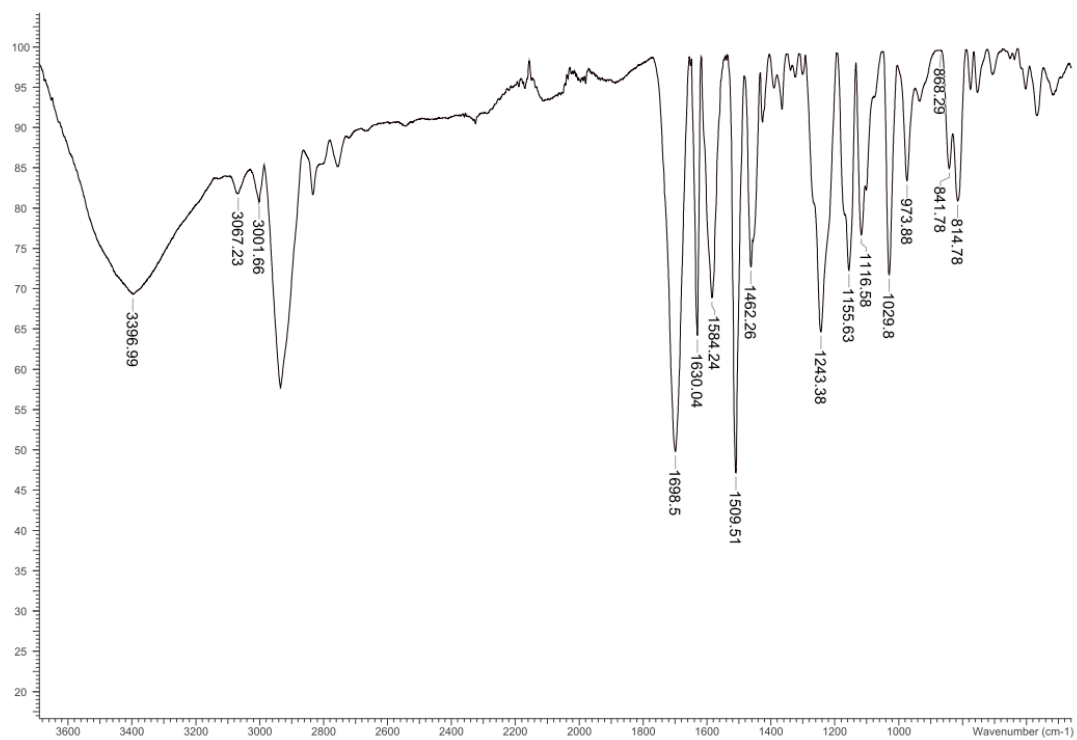
Fonte: do autor

Figura A43. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-155 (**28e**)

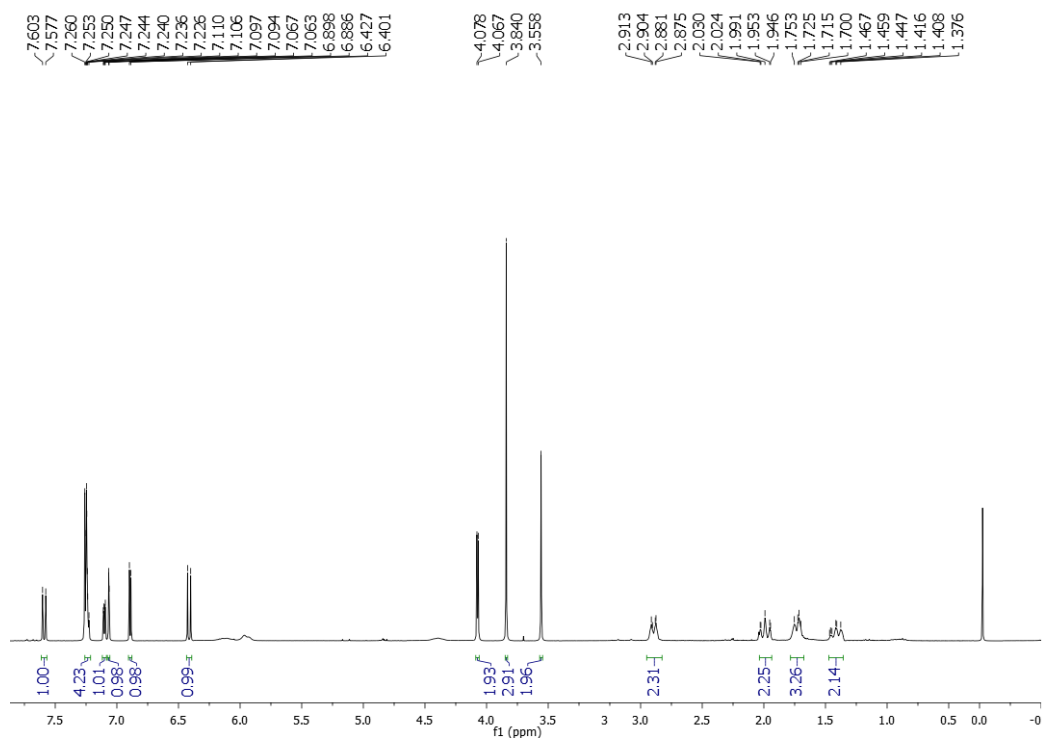
Fonte: do autor

Figura A43. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-155 (**28e**)

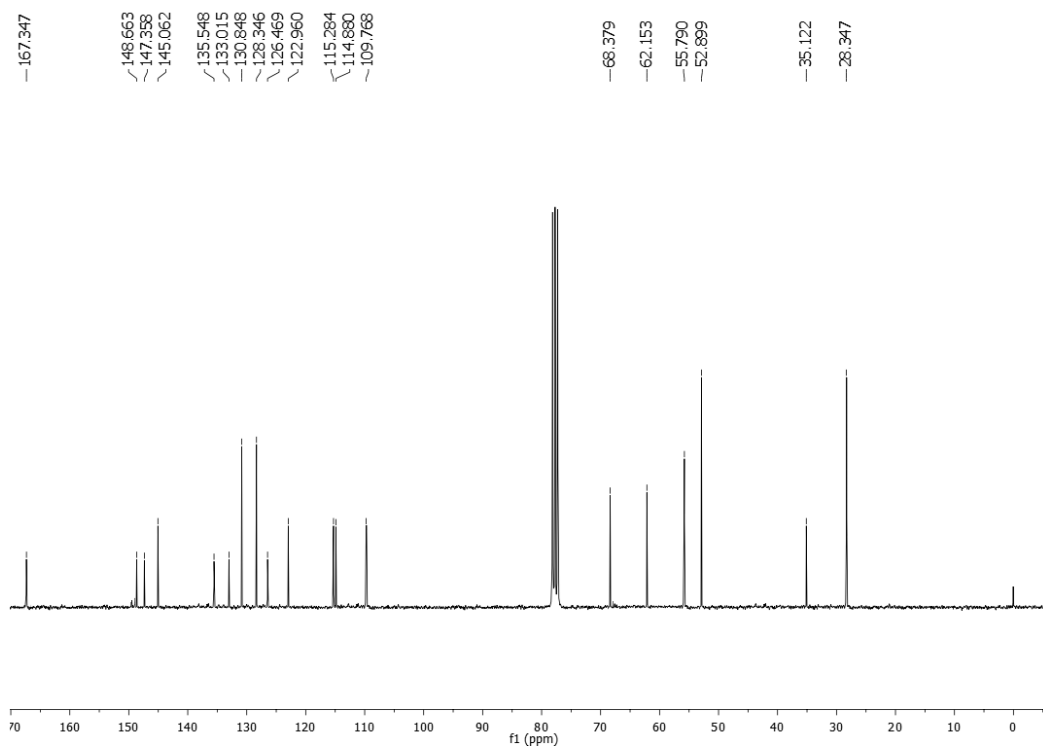
Fonte: do autor

Figura A45- Espectro no infravermelho do composto PQM-155 (**28e**)

Fonte: do autor

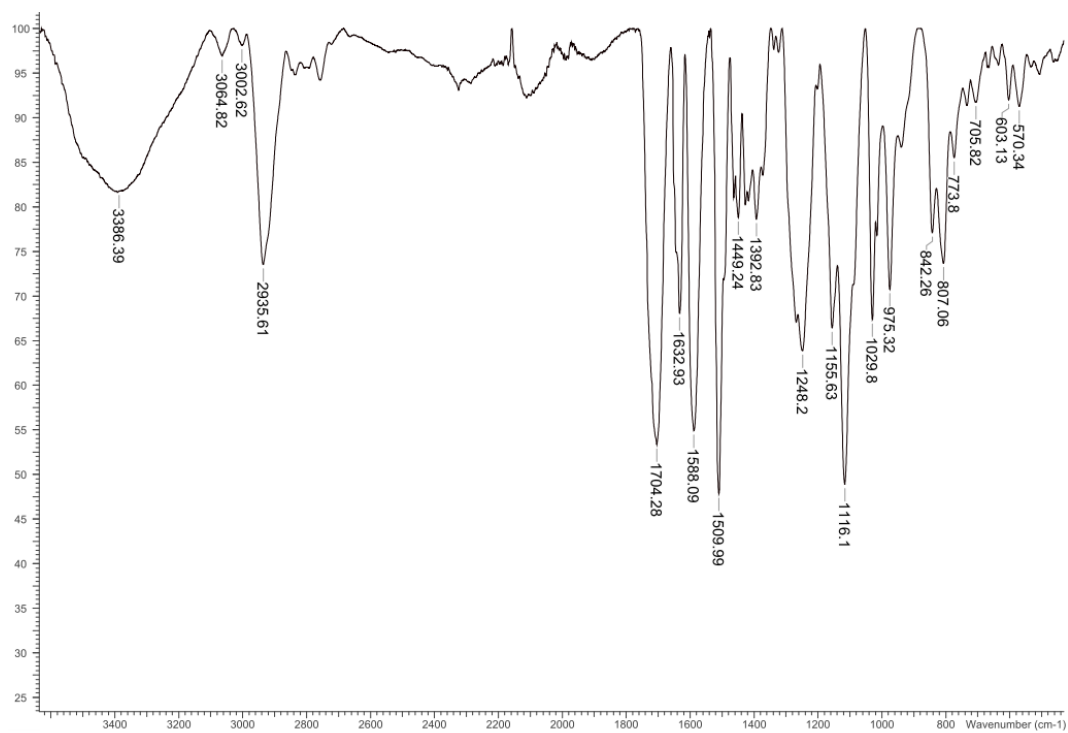
Figura A46. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-156 (**27f**)

Fonte: do autor

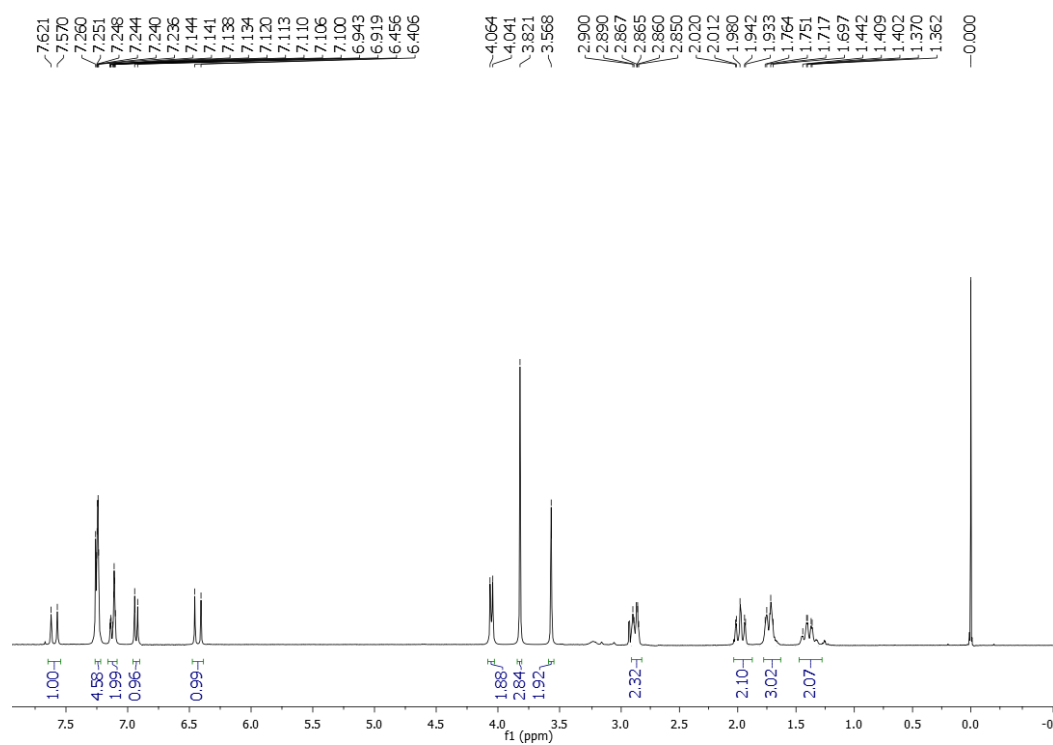
Figura A47. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-156 (**27f**)

Fonte: do autor

Figura A48. Espectro no infravermelho composto PQM-156 (27f)

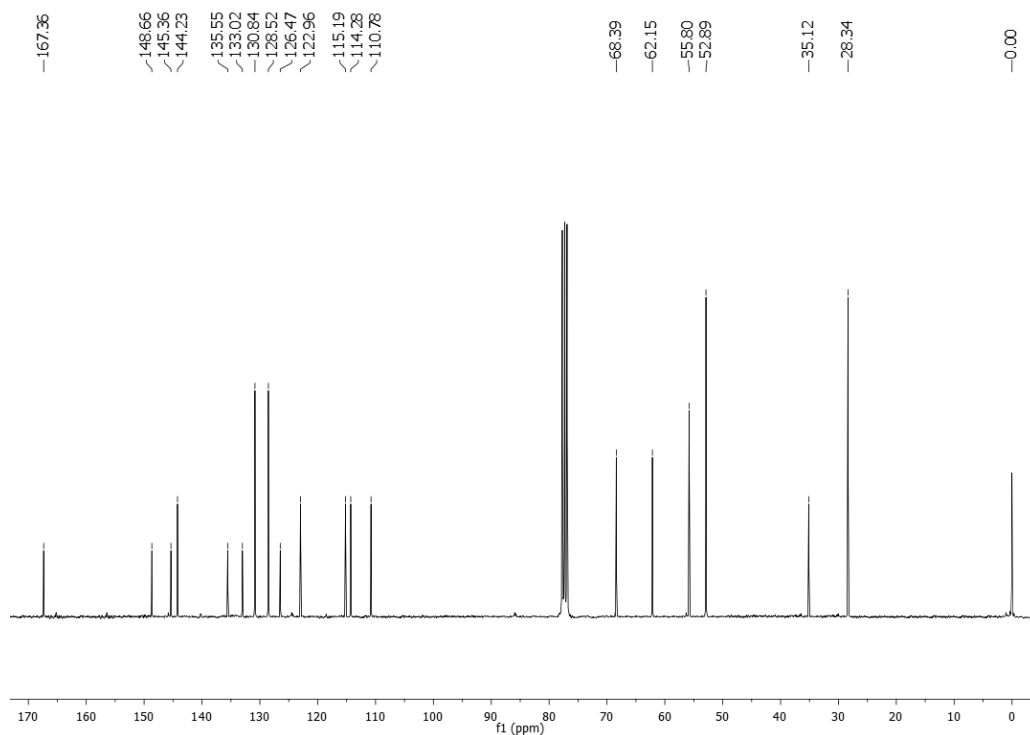


Fonte: do autor

Figura A49. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do composto PQM-157 (28f)

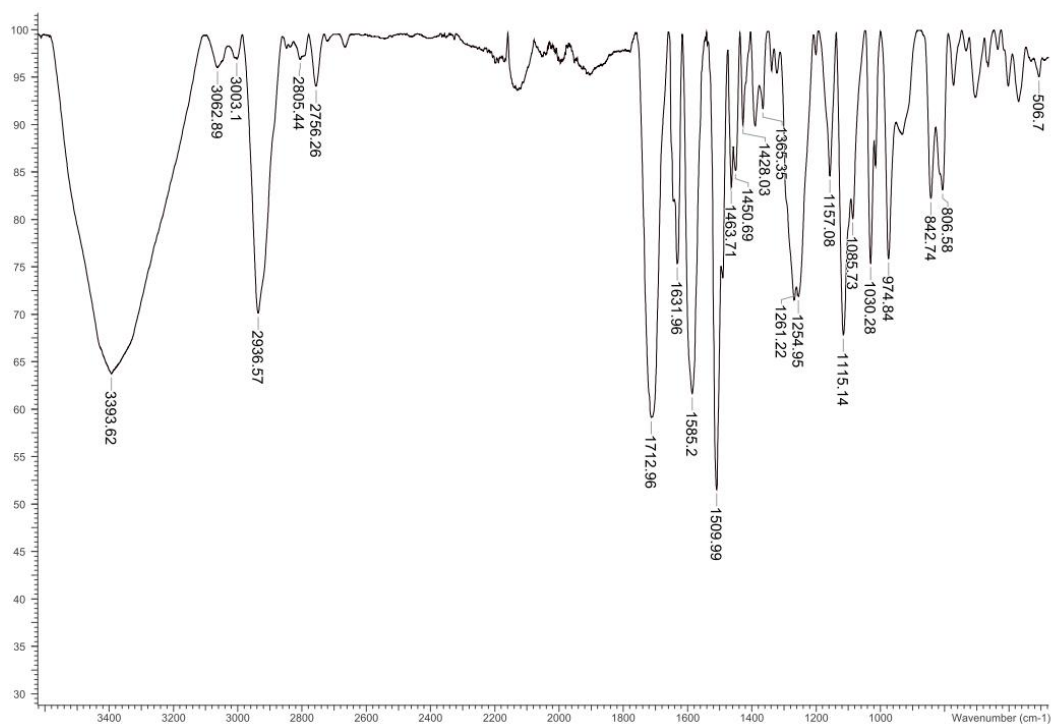
Fonte: do autor

Figura A50. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-157 (**28f**)



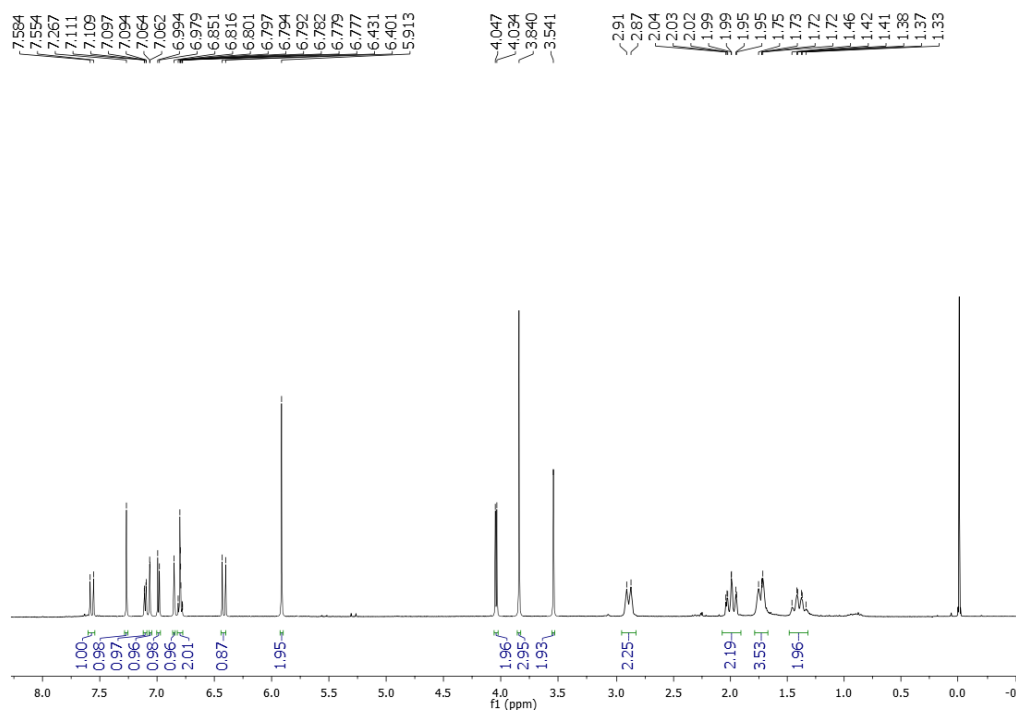
Fonte: do autor

Figura A51. Espectro no infravermelho do composto PQM-157 (**28f**)



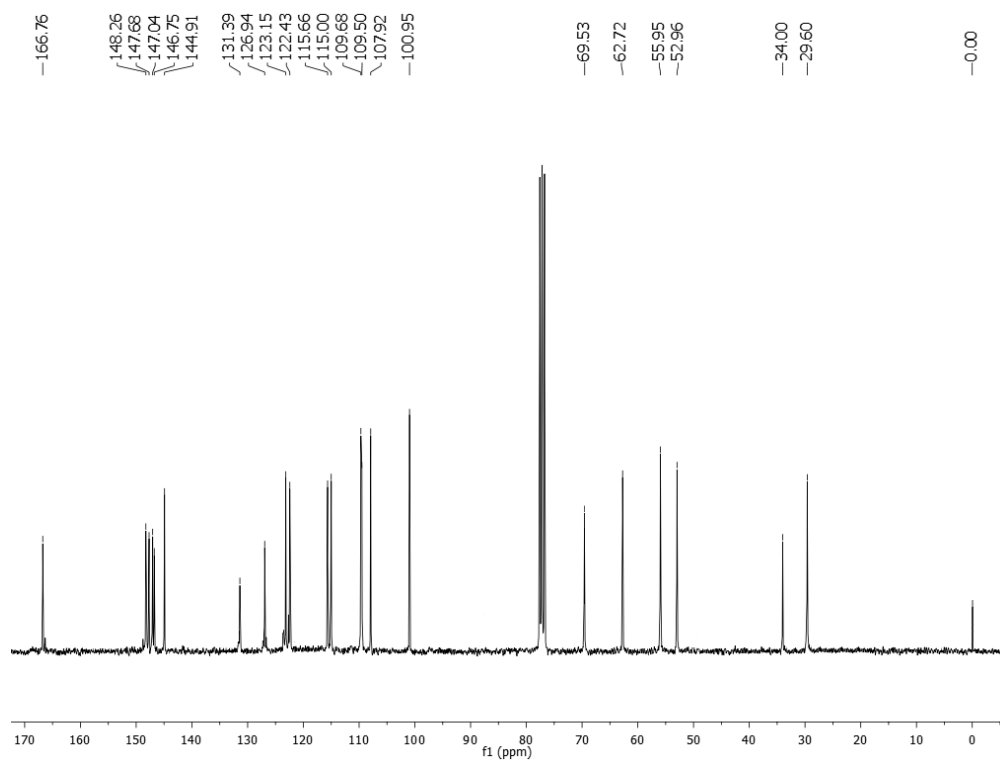
Fonte: do autor

Figura A52. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-158 (**27g**)



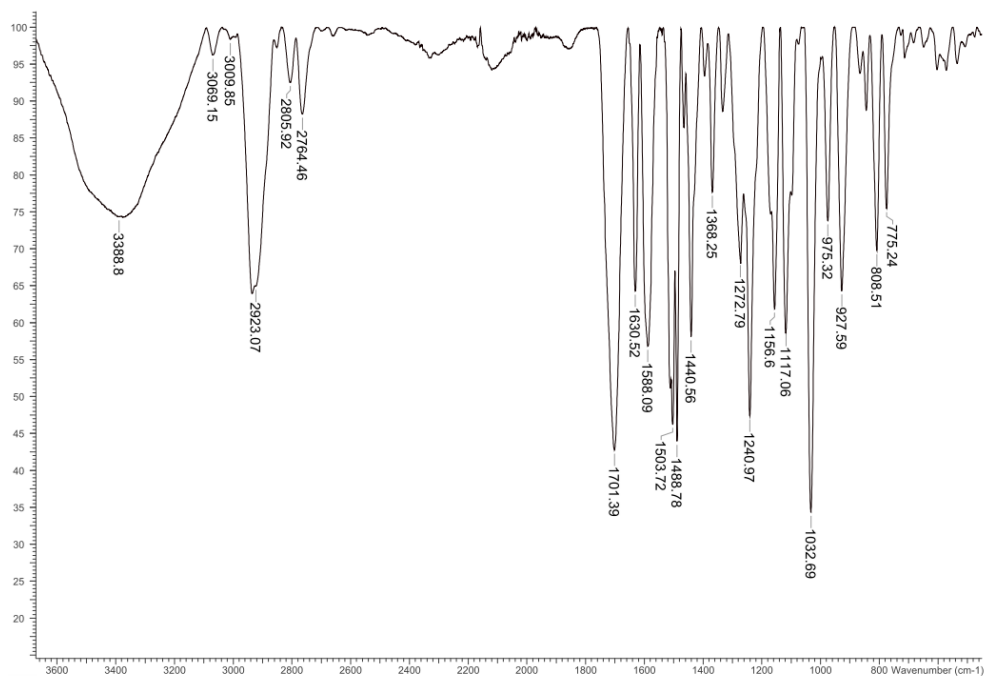
Fonte: do autor

Figura A53. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-158 (**27g**)

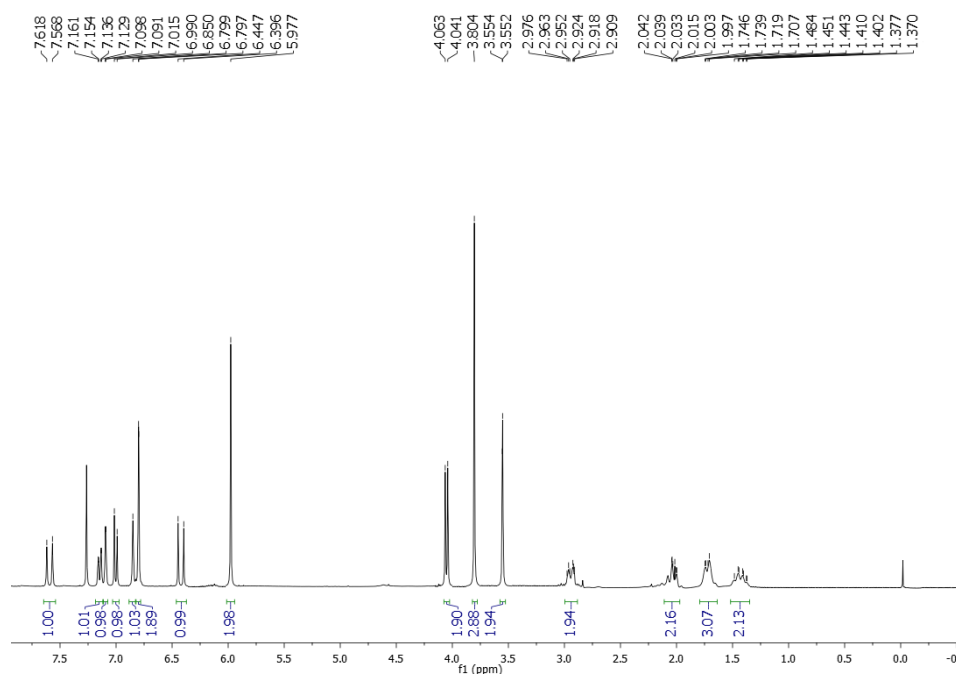


Fonte: do autor

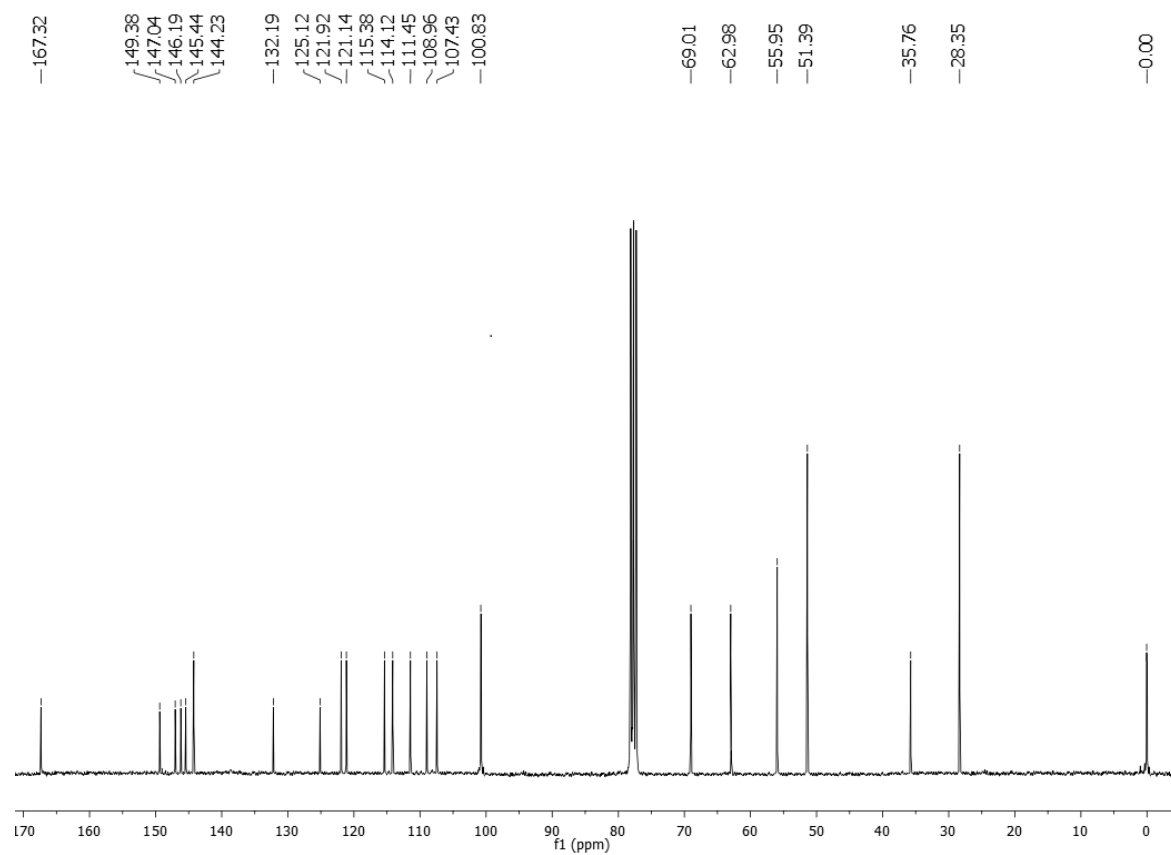
Figura A54. Espectro no infravermelho do composto PQM-158 (27g)



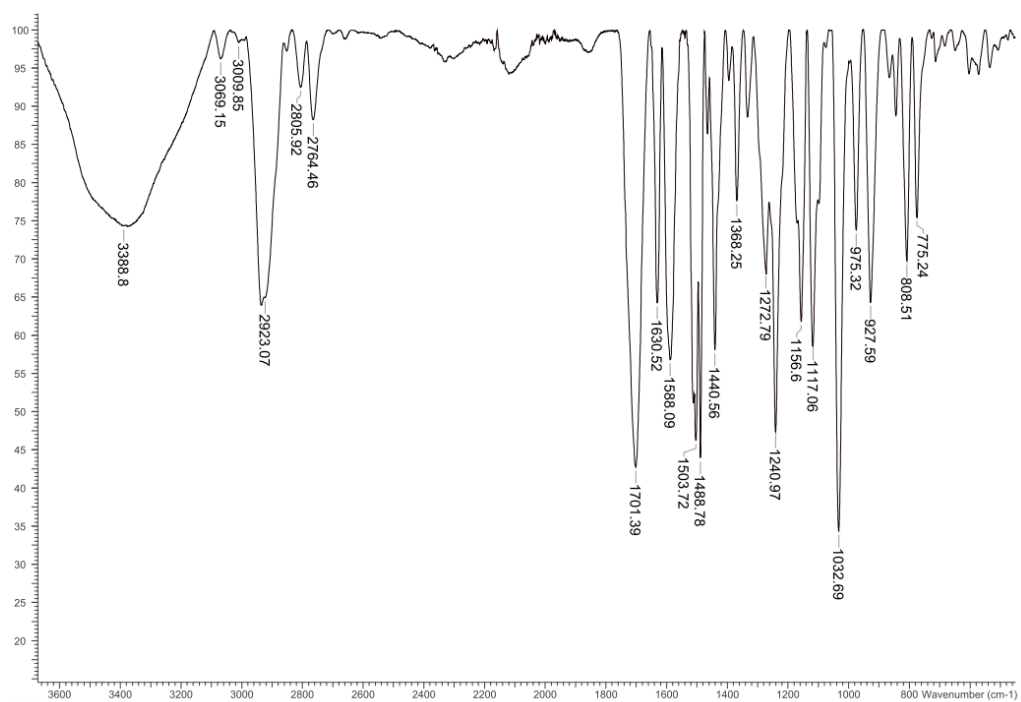
Fonte: do autor

Figura A55. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto PQM-159 (28g)

Fonte: do autor

Figura A56. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do composto PQM-159 (**28g**)

Fonte: do autor

Figura A57. Espectro no infravermelho do composto PQM-159 (**28g**)

Fonte: do autor