



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PeQuiM – Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal



CINDY JULIET CRISTANCHO ORTIZ

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS LIGANTES
MULTIALVO VISANDO AO TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS.**

ALFENAS - MG

2020

CINDY JULIET CRISTANCHO ORTIZ

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS LIGANTES
MULTIALVO VISANDO AO TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS.**

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. Claudio Viegas Jr.
Co-orientadora: Dra. Vanessa Silva Gontijo.

ALFENAS – MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Cristancho Ortiz, Cindy Juliet.

C933s Síntese e avaliação farmacológica de novos ligantes multialvo visando ao tratamento de doenças neurodegenerativas / Cindy Juliet Cristancho Ortiz -- Alfenas/MG, 2020.
379 f. : il. --

Orientador: Cláudio Viegas.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Doenças Neurodegenerativas. 2. Ligantes. 3. Estresse Oxidativo. 4. Fármacos Neuroprotetores. I. Viegas, Cláudio. II. Título.

CDD-547

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá
Bibliotecária-Documentalista CRB6/425

CINDY JULIET CRISTANCHO ORTIZ

“SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS LIGANTES MULTI-ALVO VISANDO AO TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.”

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

Aprovada em: 04/02/2020

Prof. Dr. Claudio Viegas Júnior

Assinatura: 

Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco

Assinatura: 

Prof. Dr. Sérgio Scherrer

Assinatura: 

Prof. Dr. Arthur Kümmerle

Assinatura: _____

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron

Assinatura: 

Aos meus pais por me darem força, coragem e acreditar nas minhas capacidades. Aos meus irmãos e ao meu sobrinho pelo amor. Essa conquista não é só minha, é nossa. A minha mãe Gladys, pelo amor incondicional, você me deu tudo que eu sempre precisei, mas também me ensinou a ser uma mulher forte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, meu guia, meu socorro presente na hora da angústia, por seu imenso amor e por colocar as pessoas certas no meu caminho que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para minha vida.

Aos meus pais, meus irmãos, meu sobrinho e a toda minha família que nunca duvidaram das minhas capacidades, escutaram todas as minhas frustrações, me encorajaram e incentivaram a atingir meus objetivos. Não foi fácil assistir de longe suas vidas, mas meu amor por vocês me manteve firme.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Viegas Junior, uma das pessoas que mais admiro pela sua dedicação e amor ao trabalho, por ser um grande pesquisador e orientador; por abrir as portas de seu laboratório e me dar a oportunidade de aprender. Principalmente, por acreditar em mim e incentivar o amor à ciência e ao conhecimento.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM): Flavia, Grazi, Sarah, Januario, Rachelle, Kris e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos. Sem dúvida, o trabalho em equipe é uma ferramenta indispensável para alcançar os objetivos. Agradeço especialmente aos meus colegas e amigos Vanessa e Mateus, pessoas que eu admiro e que carregarei em meu coração, porque sem a ajuda deles o caminho teria sido ainda mais difícil, vocês representam tudo o que os brasileiros são para mim: felicidade, força, empatia, amizade e profissionalismo. Aos alunos de iniciação científica, especialmente ao Caio Damasio pelo grande auxílio na parte experimental. Foi extremamente enriquecedor conhecer e conviver com cada um de vocês.

Aos meus amigos Carolina, César, Cristian e Elkin, minha família em Alfenas, amo muito vocês, obrigada por todos os bons e maus momentos que passamos juntos. Aos meus amigos Andrés, Kelly e Constanza por alegrar a minha vida e ao nosso pequeno grupo de estrangeiros. Aos meus companheiros Thays, Igor e Ítalo, pelos maravilhosos momentos que tivemos juntos na nossa casa; vocês são exemplos de determinação, força, generosidade e bondade. À Heloisa, minha irmã de coração, e à família Faleiros por abrir as portas da sua casa e me tratar como uma integrante a mais da sua família. Sua amizade é um presente que ganhei da vida e vou levá-la comigo para sempre.

Agradeço aos pesquisadores que auxiliaram na construção dos resultados deste trabalho: Ao prof. Andrea Tarozzi da Universidade de Bologna pela realização dos ensaios de neuroproteção e neuroinflamação, ao Prof. Dr. Arthur Kümmerle da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pelas contribuições e realização dos ensaios de inibição da AChE, à pós-doutoranda Isabella Alvim Guedes e seu orientador Dr. Laurent Dardenne do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC/MCT), pelo teste *in silico* de modelagem molecular.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições que certamente serão dadas para o aprimoramento deste trabalho. Ao Brasil, país maravilhoso, cheio de riqueza natural e de pessoas afetuosas, simpáticas e amigáveis. Eu volto para meu país com o coração cheio de gratidão e admiração pelo povo brasileiro.

Agradeço, por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Alfenas, ao PPGQ, à OEA e ao grupo PAEC pela oportunidade de cursar o doutorado em Química. Ao CAPES, CNPq, Fapemig e INCT-Inofar pelo imprescindível auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O termo "Doenças neurodegenerativas" (DNs) engloba uma série de doenças que afetam principalmente os neurônios do encéfalo humano, principais componentes do sistema nervoso central. Quando danificados geram um conjunto de danos neurológicos progressivos, levando a problemas com o movimento, demência, perda da memória, morte neuronal etc. As três principais DNs são a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a doença de Huntington. Hoje em dia, os tratamentos farmacológicos utilizados visam unicamente tratar a sintomatologia característica de cada doença, porém o tratamento é ineficiente, devido ao caráter multifatorial que inclui estresse oxidativo (EO), neuroinflamação e proteotoxicidade. Nesse contexto, o desenvolvimento de um tratamento que abranja todos os fatores envolvidos nas DNs é uma prioridade médica e socioeconômica. Este trabalho teve como objetivos o planejamento racional, síntese, caracterização e avaliação farmacológica de três séries de compostos inspirados nas propriedades do donepezil (1), da curcumina (2) e da talidomida (3). Nas séries se caracterizam por serem constituídas por híbridos moleculares a partir dos compostos padrão unidos por um espaçador hidrazídico ou uma amida. Das 40 substâncias sintetizadas 4 foram inibidores colinesterásicos, com destaque para **PQM-189**, **PQM-263** e **PQM-266**, inibidores seletivos da Acetilcolinesterase (AChE) (CI_{50} de 3,15, 13,04 e 9,19 μ M, respectivamente) e **PQM-272** inibidor seletivo de Butirilcolinesterase (BuChE) (CI_{50} de 11,94 μ M). Os ligantes **PQM-225**, **PQM-263** e **PQM-265** e **PQM-266** tiveram um perfil antioxidante significativo frente ao estresse oxidativo induzido com DPPH, *t*-BOOH e 6-OHDA, com destaque para **PQM-263** que induziu cerca de 31% da liberação de glutathione intracelular em uma concentração de 20 μ M. Além, **PQM-225** inibiu 53% da atividade enzimática de monoamino oxidase B (MAO B). Finalmente, **PQM-189**, exibiu potencial anti-inflamatório regulando a expressão genica de óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) e interleucina 1 β (IL-1 β) induzida pelo tratamento com lipopolissacarídeo (LPS). Portanto, se ressalta o caráter neuroprotetor destes compostos na diminuição de radicais livres decorrentes do estresse oxidativo e de processos inflamatórios.

Palavras-chave: Doenças Neurodegenerativas. Multialvo. Estresse oxidativo. Neuroinflamação. Neuroproteção. MTDL. Hibridação molecular.

ABSTRACT

The term "neurodegenerative disease" includes a range of diseases that primarily affect the neurons of the human brain, major components of the central nervous system, when they are damaged generate a set of progressive neurological injury, leading to problems with locomotion, dementia, memory loss, neuronal death etc. The main neurodegenerative diseases (NDs) are Alzheimer, Parkinson and Huntington. The pharmacological treatments aimed to treat the characteristic symptoms of each disease, but the treatment is inefficient due to the multi-factorial character that includes oxidative stress, neuroinflammation and proteotoxicity. In this context, the development of a treatment that covers all factors involved in NDs is a medical and socioeconomic priority. This study aimed at the rational design, synthesis, characterization and pharmacological evaluation of three series of new compounds inspired by the properties of donepezil (**1**), curcumin (**2**) and thalidomide (**3**). These series are molecular hybrids from standard compounds joined by a hydrazide spacer or an amide. 36 substances were synthesized, of which 4 compounds were cholinesterase inhibitors: **PQM-189**, **PQM-263** and **PQM-266**, selective AChE inhibitors (IC₅₀ of 3.15, 13.04 and 9.19 μM, respectively) and **PQM-272**, selective BuChE inhibitor (IC₅₀ of 11.94 μM). The ligands **PQM-225**, **PQM-263** and **PQM-265** and **PQM-266** had a significant antioxidant profile against DPPH, *t*-BOOH and 6-OHDA-induced oxidative stress, especially **PQM-263** which induced about 31% release of intracellular glutathione at a concentration of 20 μM. In addition, **PQM-225** inhibited 53% of MAO B enzymatic activity. Finally, **PQM-189** exhibited anti-inflammatory potential by regulating LPS treatment through down-regulation of iNOS and IL-1β gene expression. Therefore, the neuroprotective character of these compounds in the elimination of free radicals due to oxidative stress and inflammatory processes is emphasized.

Keywords: Neurodegenerative Diseases. MTDL. Oxidative stress. Neuroinflammation. Neuroprotection. MTDL. Molecular hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas dos padrões moleculares que inspiraram o planejamento dos novos derivados.	26
Figura 2 - Características moleculares da fisiopatologia da DA e principais alvos biológicos.....	28
Figura 3 - Inibidores da colinesterase comercializados contra a DA.	29
Figura 4 – Mecanismo molecular na DP.	30
Figura 5 - Estrutura da levodopa	31
Figura 6 - Mecanismos celulares patogênicos na doença de Huntington.....	33
Figura 7 - Estrutura química da tetrabenazina.....	34
Figura 8 - As 3 principais características da DA dentro do sistema neuronal.....	37
Figura 9 - Características comuns das DNs, como a disfunção neuronal nas sinapses, morte neuronal.	41
Figura 10 - Modelo de Mitofagia Induzida pela Parkina e PINK1.	43
Figura 11 - Possível ligação entre α -sinucleína, processos neuroinflamatórios e neurodegeneração na DP.	45
Figura 12 - Estrutura química da safinamida.	48
Figura 13 - Estratégia de desenho do híbrido donepezil-BHT 11	50
Figura 14 - Planejamento do híbrido Curcumina-tacrina 12	51
Figura 15 - Estrutura química da talidomida (3), lenalidomida (13) e pomalidomida (14).....	52
Figura 16 - Planejamento do híbrido talidomida-imidopiridina 16 como inibidor BACE-1 para tratamento contra a DA.....	54
Figura 17 - Planejamento estrutural da nova série de híbridos donepezil-talidomida (Série A).	56
Figura 18 - Planejamento estrutural da nova série de compostos cinamoil <i>N</i> -acilidrazônicos (Série B).	57

Figura 19 - Planejamento estrutural da série de híbridos cinamoil- <i>N</i> -acilidrazônicos-donepezil (Série C).....	58
Figura 20 - Rotas sintéticas na obtenção dos compostos da série A	60
Figura 21 - Proposta de intermediários reacionais de aminação redutiva entre a piperazina (22) e o 4-fluor-benzaldeído (23a).....	61
Figura 22 - Proposta de intermediários reacionais da rota sintética da série A.....	62
Figura 23 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-189 (24g) (ATR).....	64
Figura 24 . Estruturas de ressonância das amidas. Efeitos retirador e doador de elétrons.....	65
Figura 25 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto PQM-189 (24g).....	66
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto PQM -189 (24g).....	67
Figura 27 - Espectro de massas (ESI-MS) do composto PQM-189 (24g) (ESI-MS).....	68
Figura 28 - Reação entre a tiocolina e DTNB e formação do ânion de coloração amarela (5-tio-2-nitrobenzoato).....	69
Figura 29 - (A) Triagem in vitro da atividade inibitória sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) e (B) sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-183 a PQM-190 (24a-h).....	70
Figura 30 - Resultado gráfico de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI ₅₀ para o composto PQM-189 (24g), o mais ativo frente à enzima acetilcolinesterase (AChE).....	72
Figura 31 - Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto PQM-189 (24g).	72
Figura 32 - Modos de ligação previstos para PQM-188 (24f) (A) e PQM-189 (24g) (B) na conformação 4EY7 da AChE.	76
Figura 33 - Resultado gráfico de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI ₅₀ para os compostos PQM-296 a PQM-299 (24i-l) frente à enzima AChE.....	77
Figura 34 - Espectro no ultravioleta de absorbância de PQM-189 (24g).....	80

Figura 35 - Possíveis locais quelantes de metais de PQM-189 (24g).	81
Figura 36 - Inibição da expressão relativa de mediadores inflamatórios pelo composto PQM-189 (24g) induzidos por tratamento com LPS.....	82
Figura 37 - Estereoquímica dos compostos CNA	87
Figura 38 - Proposta mecanística da formação do intermediário hidrazídico 26 a partir de HOBT e EDC.....	89
Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV do composto intermediário 26a (ATR).....	90
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto intermediário 26a	91
Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto intermediário 26a	92
Figura 42 - Proposta de mecanismo da formação dos derivados cinamoil- <i>N</i> -acilidrazona: acoplamento do intermediário 26a e diferentes aldeídos funcionalizados (27a-r).	94
Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto PQM-225 (28o) (ATR).....	95
Figura 44 - Isômeros <i>E</i> : anti-periplanar (A) e sin-periplanar (B).....	96
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do PQM-225 (28o).....	97
Figura 46 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-225 (28o).....	98
Figura 47 - Isômeros <i>E</i> do composto PQM-225 (28o): anti-periplanar (A) e sin-periplanar (B).....	99
Figura 48 - Expansão do espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do composto PQM-225 (28o) na região de 8.0 –11.6 ppm, a temperatura ambiente (25°C) até 75°C.	99
Figura 49 - Expansão do mapa de contornos HSQC do composto PQM-225 (28o) em DMSO- d_6 na região de 6.4 –8.6 ppm.	100
Figura 50 - Espectro de Massas do composto PQM-225 (28o) (ESI-MS).....	101

Figura 51 - Triagem <i>in vitro</i> da atividade inibitória sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).	103
Figura 52 - Triagem <i>in vitro</i> da atividade inibitória sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).	103
Figura 53 - Modos de ligação previstos para PQM-212 (28b) na conformação 2CKM da AChE.....	105
Figura 54 - Redução do radical DPPH pelo antioxidante.....	108
Figura 55 - Capacidade sequestrante de radicais livres dos derivados ferúlicos e estabilização do radical por ressonância.....	109
Figura 56 - Co-tratamento <i>t</i> -BOOH (100 μ M) + Composto (10 μ M) PQM-211 a PQM-228 (28a-r).....	111
Figura 57 - Co-tratamento com <i>t</i> -BOOH do composto PQM-225 (28o).	112
Figura 58 - Espectro no ultravioleta de absorbância de PQM-225 (28o).	114
Figura 59 - Atividade inibitória de formação de EROs induzida por Fe ²⁺ e H ₂ O ₂	116
Figura 60 - Atividade inibitória de MAO-A e MAO-B na concentração de 10 μ M.....	117
Figura 61 - Espectro de absorção na região IV do composto intermediário 26h (ATR). .	123
Figura 62 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto intermediário 26h	124
Figura 63 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto intermediário 26h	125
Figura 64 - Proposta de mecanismo da formação dos derivados <i>N</i> -benzilpiperidínil-cinamoil- <i>N</i> -acilidrazônicos PQM-263 – PQM-272	126
Figura 65 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto PQM-270 (30j) (ATR).	127
Figura 66 - Estrutura geral dos confôrmeros da série C, sin-periplanar (<i>sp</i>) ou anti-periplanar (<i>ap</i>).	128
Figura 67 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto PQM-270 (30j).	129
Figura 68 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto PQM-270 (30j).	130

Figura 69 - Espectro de massas do composto PQM-270 (30j) (ESI-MS).....	131
Figura 70 - (A) Triagem in vitro da atividade inibitória sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) e (B) inibitória sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-263 a PQM-272 (30a-j).....	133
Figura 71 - Resultados de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI_{50} para os compostos mais ativos frente à enzima acetilcolinesterase (AChE).	134
Figura 72 - Resultados de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI_{50} para os compostos mais ativos frente à enzima butirilcolinesterase (BuChE).	135
Figura 73 - Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em <i>Ee</i> AChE do composto PQM-263 (30a).	137
Figura 74 - Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em <i>Eq</i> BuChE do composto PQM-272 (30j).	138
Figura 75 - Modos de ligação previstos para (A) PQM-268 (30f) (conformação 4EY7), (B) PQM-263 (30a) e (C) PQM-266 (30d) nas conformações 1ZGC da AChE.....	140
Figura 76 - Porcentagem de atividade sequestrante do radical de DPPH	143
Figura 77 – Estabilização por ressonância do radical formado de PQM-264 (30b)	144
Figura 78 - Capacidade de inibição da formação de EROs induzida por <i>t</i> -BOOH com as substâncias mais ativas.....	145
Figura 79 - Teste de neuroproteção contra citotoxicidade induzida por 6-OHDA (100 μ M) no modelo de co-tratamento.	146
Figura 80 - Indução da liberação de GSH por células neuronais tratadas com substâncias teste.....	148
Figura 81 - Rota sintética dos intermediários <i>N</i> -benzilpiperazínicos 21i-j	153
Figura 82 - Abordagem sintética dos compostos PQM-183 a PQM-190 (24a-h) e PQM-296 a PQM-299 (24i-l), em presença de acetonitrila, HOBT e EDC....	156
Figura 83 - Rota sintética das substâncias alvo PQM-211 a PQM-228 (28a-r).	161

Figura 84 - Reação de acoplamento da hidrazida 26a com benzaldeídos funcionalizados (27a-r) para obtenção da série alvo PQM-211 a PQM-228 (28a-r).....	163
Figura 85 - Rota sintética das substâncias alvo PQM-263 a PQM-272 (30a-j).....	171
Figura 86 - Síntese dos intermediários (26a-j).....	172
Figura 87 - Reação de acoplamento dos intermediários hidrazídicos (26a-j) com 1-benzil-4-piperidona (29) para obtenção da série alvo PQM-263 a PQM-272 (26a-j).	176
Figura 88 - Compostos com ligações rotativas fixados durante os estudos de <i>docking</i> (setas laranja). Os diédricos não destacados nesta imagem foram definidos como livres para girar, exceto as ligações amida.	185
Figura 89 – Compostos líderes das três séries moleculares sintetizadas.....	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos de PQM-189 (24g) em AChE.	73
Tabela 2 - Scores de docking.....	74
Tabela 3 - Propriedades ADME previstas dos compostos sintetizados PQM-183 a PQM-190 e do composto padrão donepezil.....	85
Tabela 4 - Scores de docking dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).....	104
Tabela 5 - Avaliação da citotoxicidade, capacidade sequestrante de radicais livres DPPH e antioxidante frente a <i>t</i> -BOOH dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).....	107
Tabela 6 - Porcentagem de inibição frente a <i>t</i> -BOOH como co-tratamento e pré-tratamento em células SH-SY5Y.....	110
Tabela 7 - Resultados obtidos dos compostos PQM-212 (28b), PQM-220 (28j), PQM-225 (28o) e PQM-227 (28q) da atividade antioxidante e inibitória de MAO.	117
Tabela 8 - Propriedades ADME previstas dos compostos sintetizados PQM-211 a 228 (28a-r) e do composto padrão, curcumina.	120
Tabela 9 - Deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos PQM 263 a PQM 272 (DMSO- <i>d</i> ₆) e PQM-269 (Piridina- <i>d</i> ₅).	131
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de PQM-263 (30a) em AChE	137
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de PQM-272 (30j) em BuChE.	138
Tabela 12 - Scores de docking série C.....	139
Tabela 13 - Porcentagem de viabilidade celular na concentração máxima avaliada no teste de MTT.....	142
Tabela 14 - Propriedades ADME previstas dos compostos sintetizados PQM-263 a PQM-272 e dos compostos padrão curcumina e donepezil	151
Tabela 15 - Águas conservadas durante os experimentos de docking.....	184
Tabela 16 - sequências dos primers usados para RT-PCR quantitativo.	188

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASB	- Albumina de soro bovino
ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
AChEI	- Inibidor da Acetilcolinesterase
ADME	- Administração, distribução, metabolismo e excreção
AMPA	- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
βA	- Proteína beta-amiloide
BACE1	- β secretase 1
BuChE	- Butirilcolinesterase
CAG	- Citocina – Adenina – Guanina
CAS	- Sítio aniônico catalítico
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CC	- Cromatografia em coluna
CI₅₀	- Concentração inibitória de 50%
CNA	- Cinamoil- <i>N</i> -Acilidrazoncos
COX	- Ciclooxygenase
DA	- Doença de Alzheimer
DCFH-DA	- dicloro-diidrofluorescena
DH	- Doença de Huntington
DNA	- do inglês, deoxyribonucleic acid
DNs	- Doenças Neurodegenerativas
DP	- Doença de Parkinson
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	- cido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EM	- Espectrometria de massas
EO	- Estresse Oxidativo
ELISA	- do inglês, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EROs	- Espécies reativas de oxigênio

FDA	- do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
F.M.	- Fórmula molecular
GSH	- Glutathione
HSQC	- do inglês, <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
L-glu	- <i>L</i> -glutamina
LRRK2	- do inglês, <i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
Hz	- Hertz
HNE	- 4-hidroxinonenal
HRP	- do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
HTT	- Gene huntingtina
Htt	- Proteína huntingtina
iNOS	- óxido nítrico sintetase indutível
IV	- Infravermelho
LPS	- Lipopolissacarídeo
MAO	- Monoaminoxidase
mHTT	- Proteína mutante huntingtina
MDA	- Malodialdeído
MTT	- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio
MTDL	- do inglês, <i>Multi-Target Directed Ligands</i>
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MRI	- do inglês, <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NFTs	- do inglês, <i>Neurofibrillary tangles</i>
Nrf2	- do inglês, <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NMDA	- <i>N</i> -metil-D-aspartato
NO	- óxido nítrico
6-OHDA	- 6 hidroxidopamina
PARK7	- do inglês, <i>Parkinsonism Associated Deglycase</i>
PAS	- Sítio aniônico periférico
PET	- do inglês, <i>Positron Emission Tomography</i>
PCR	- do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>
PINK1	- do inglês, <i>PTEN-induced putative kinase 1</i>

PolyQ	– Poliglutamina
PPA	- Proteína precursora amiloide
PRKN	- do inglês, <i>Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
RNA	- do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
RMN	- Ressonância magnética nuclear
ROS	- do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
SN	– Substância nigra
SNC	- Sistema nervoso central
SPECT	- do inglês, <i>single photon emission computed tomography</i>
t.a.	- Temperatura ambiente
TBARS	- Ácido tiobarbitúrico
THP-1	- Linhagem celular monocítica de leucemia humana
TMS	- Tetrametilsilano
TNF-α	- Fator de necrose tumoral α
δ	- Deslocamento químico (ppm)
$\bar{\nu}$	- Número de onda (cm^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	26
1.1.1	Doença de Alzheimer	27
1.1.2	Doença de Parkinson	29
1.1.3	Doença de Huntington	32
1.2	CARACTERÍSTICAS COMUNS DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	34
1.2.1	Proteotoxicidade	35
1.2.1.1	Peptídeo β -amiloide e proteína Tau	36
1.2.1.2	α -sinucleína	38
1.2.1.3	Expansão de poliglutaminas	39
1.2.2	Estresse oxidativo	40
1.2.3	Neuroinflamação	44
1.2.4	Toxicidade por glutamato	46
1.3	FÁRMACOS MULTIALVO (MTDLs)	47
2	OBJETIVOS	55
3	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
	PARTE 1: HÍBRIDOS DONEPEZIL-TALIDOMIDA (SÉRIE A).	59
4.1	QUÍMICA	59
4.1.1	Síntese dos híbridos donepezil-talidomida (Série A).	59
4.1.2	Caracterização dos híbridos donepezil-talidomida	63

4.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS HÍBRIDOS DONEPEZIL-TALIDOMIDA -----	69
4.2.1	Avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i> (método modificado de Ellman). -----	69
4.2.1.1	Determinação do CI ₅₀ frente a AChE -----	71
4.2.1.2	Avaliação de Cinética Enzimática da Acetilcolinesterase -----	72
4.2.2	Estudo de <i>docking</i> molecular dos híbridos donepezil-talidomida -----	74
4.2.3	Avaliação da citotoxicidade e elucidação da atividade antioxidante -----	78
4.2.3.1	Avaliação da neurotoxicidade via MTT -----	78
4.2.3.2	Atividade sequestrante de DPPH -----	79
4.2.3.3	Propriedades quelantes de metais pró-oxidantes -----	79
4.2.4	Avaliação do perfil anti-neuroinflamatório <i>in vitro</i> de PQM-189 (24g) pelo ensaio qRT-PCR -----	81
4.2.5	Predição das propriedades ADME -----	83
 PARTE 2: DERIVADOS CINAMOIL-N-ACILIDRAZÔNICOS (SÉRIE B). -----		86
4.3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA SÉRIE B -----	86
4.3.1	Derivados cinamoil-N-acilidrazônicos (CNA) -----	86
4.3.2	Isomerismo dos derivados CNA -----	87
4.3.3	Síntese do intermediário hidrazídico 26a -----	88
4.3.4	Caracterização do intermediário hidrazídico 26a -----	90
4.3.5	Obtenção dos derivados CNA -----	93
4.3.6	Caracterização dos derivados CNA (série B) -----	94
4.4	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA SÉRIE B -----	102
4.4.1	Avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i> (método modificado de Ellman). -----	102
4.4.2	Estudo de <i>docking</i> molecular -----	104
4.4.3	Citotoxicidade e elucidação da atividade antioxidante -----	106
4.4.3.1	Avaliação da neurotoxicidade via MTT -----	106
4.4.3.2	Atividade sequestrante de DPPH -----	108

4.4.3.3	Atividade antioxidante frente a <i>t</i> -BOOH (co-tratamento)-----	110
4.4.3.4	Atividade antioxidante frente a <i>t</i> -BOOH após pré-tratamento com PQM-225 (28o) por 24h. -----	112
4.4.3.5	Inibição de toxicidade decorrente do estresse oxidativo induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).-----	113
4.4.3.6	Propriedades quelantes de metais pró-oxidantes-----	113
4.4.3.7	Avaliação da atividade antioxidante de PQM-212 (28b), PQM-225 (28o), PQM-226 (28p) e PQM-227 (28q) frente a Fe ²⁺ e H ₂ O ₂ . -----	115
4.4.4	Avaliação da inibição de MAO-A e MAO-B dos compostos PQM-212 (28b), PQM-220 (28j), PQM-225 (28o) e PQM-227 (28q). -----	116
4.4.5	Predição das propriedades ADME -----	118
4.5	QUÍMICA-----	122
4.5.1	Síntese dos intermediários hidrazídicos α,β-insaturados (26b-j) -----	122
4.5.2	Caracterização do intermediário 26h (Série C) -----	123
4.5.3	Obtenção dos derivados cinamoil-<i>N</i>-acilidrazônicos (série C) -----	125
4.5.4	Caracterização do híbrido donepezil-talidomida PQM-270 (30j). -----	127
4.6	AVALIAÇÃO FARMACOLOGICA (SERIE C)-----	132
4.6.1	Avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i> (método modificado de Ellman). -----	132
4.6.1.1.	Determinação do CI ₅₀ frente AChE e BuChE-----	134
4.6.1.2	Cinética Enzimática da série C frente a AChE e BuChE-----	136
4.6.2	Estudo de <i>docking</i> molecular -----	138
4.6.3	Citotoxicidade e elucidação da atividade antioxidante -----	142
4.6.3.2	Avaliação da neurotoxicidade via MTT -----	142
4.6.3.3	Atividade sequestrante de DPPH -----	142
4.6.3.4	Determinação da inibição de formação intracelular de ERO induzidas por <i>t</i> -BOOH-----	144
4.6.3.5	Atividade neuroprotetora frente 6-OHDA -----	145
4.6.4	Indução da liberação de glutatona -----	147
4.6.5	Capacidade de ativação de Nrf2 -----	148

4.6.6	Predição das propriedades ADME -----	149
5.	PARTE EXPERIMENTAL -----	152
5.1	SÍNTESE DAS SÉRIES ALVO A-C-----	153
5.1.2	Abordagem sintética da série A: PQM-183 a PQM-190 (24a-h) e PQM-296 a PQM-299 (24i-l). -----	155
5.1.3	Abordagem Sintética da série B: PQM-211 a PQM-228 -----	161
5.1.3.1	Síntese do intermediário (<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida 26a-----	162
5.1.3.2	Obtenção dos produtos-finais da série B: PQM-211-PQM-228 (28a-r).-----	163
5.1.4	Abordagem sintética da série de híbridos <i>N</i>-acilidrazônicos cinâmoil- donepezil PQM-263 a PQM-272 (30a-j) -----	171
5.1.4.1	Abordagem geral da síntese dos intermediários hidrazídicos (26a-j)-----	171
5.1.4.2	Acoplamento dos intermediários hidrazídicos funcionalizados (26a-j) com 1- benzil-4-piperidona (22): Obtenção dos compostos finais PQM-263 a PQM-272 (30a-j)-----	175
5.2	TESTES BIOLÓGICOS-----	180
5.2.1	Avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i> (método modificado de Ellman) -----	181
5.2.2	Estudo de modelagem molecular -----	184
5.2.3	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade neuroprotetora, antioxidante e quelante de biometais -----	185
5.2.3.1	Culturas celulares-----	186
5.2.3.2	Determinação da neurotoxicidade induzida pelos compostos-----	186
5.2.3.4	Atividade antioxidante: Capacidade sequestrante de radicais livres induzido por 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).-----	188
5.2.3.5	Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por terc- butil hidroperóxido (<i>t</i> -BOOH).-----	189
5.2.3.6	Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por 6- hidroxidopamina (6-OHDA).-----	189
5.2.3.7	Avaliação da capacidade quelante de biometais Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ e Zn ²⁺ -----	190

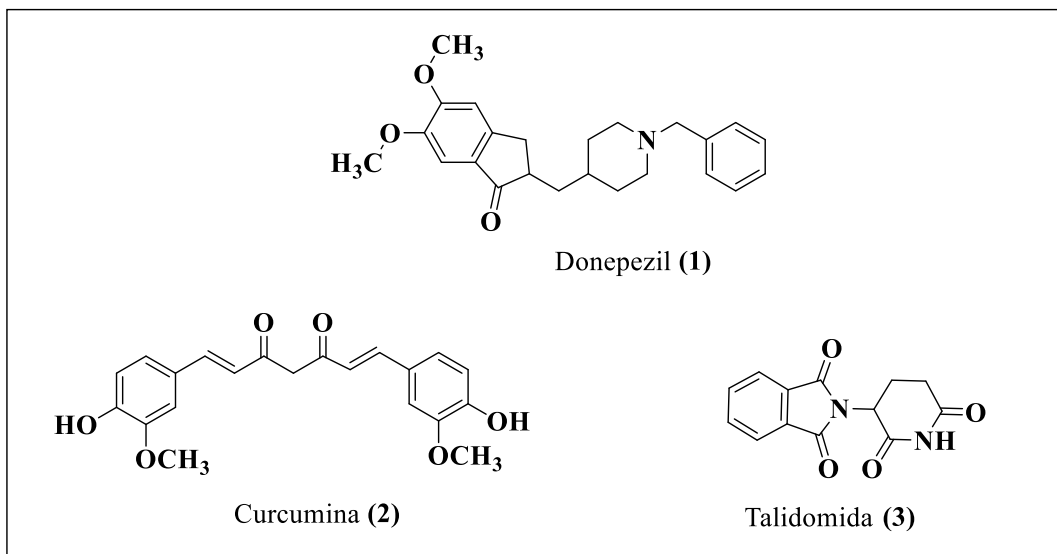
5.2.3.8	Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por H ₂ O ₂ e metais -----	190
5.2.3.9	Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) intracelular.-----	190
5.2.3.10	Determinação da atividade indutora de Nrf2. -----	191
5.2.3.11	Neuroproteção frente a proteína β-amilóide-----	192
5.2.3.12	Avaliação da inibição de MAO-A e MAO-B. -----	193
5.3	PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADME -----	194
6	CONCLUSÕES -----	195
	REFERÊNCIAS -----	198

1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas (DNs) são distúrbios neurológicos que resultam em degeneração progressiva e morte das células nervosas. Levam a problemas de locomoção ou demências, sendo a principal fonte de incapacidade globalmente (WOOD; WINSLOW; STRASSER, 2015). Isto representa um grande problema na saúde pública em todo o mundo com mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com doença de Parkinson (DP) e aproximadamente 50 milhões de pessoas com doença de Alzheimer (DA). Estima-se que o custo anual da DA é de US\$ 1 trilhão de dólares e da DP quase US\$ 25 bilhões somente nos Estados Unidos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019a) (PARKINSON'S FOUNDATION, 2018).

As DNs compartilham padrões fisiopatológicos semelhantes, como depósitos de proteínas tóxicas, estresse oxidativo, neuroinflamação, disfunção mitocondrial e morte neuronal. Os tratamentos atuais unicamente conseguem tratar alguns dos sintomas, porém ainda não há uma terapia completamente eficaz que atingia todos os fatores envolvidos. Uma vez que o paradigma tradicional de descoberta de fármacos “uma molécula, um alvo” não está abordando adequadamente muitas doenças. Devido a isso, o uso de abordagens terapêuticas alternativas, como os fármacos MTDL (sigla para o termo em inglês, *Multi-Target Directed Ligands*), é necessário para obter fármacos mais eficazes (SIMONE TRANCHES DIAS; VIEGAS, 2014). Os fármacos MTDL são capazes de atuarem, concomitantemente, em mais de um alvo molecular associado à fisiopatologia das DNs (RAMSAY *et al.*, 2018). O desenho estrutural destas novas entidades químicas utiliza diferentes ferramentas do planejamento racional de fármacos, principalmente a hibridação molecular. A hibridação molecular usa o padrão estrutural ou fragmentos estruturais de duas ou mais moléculas bioativas conhecidas, e com propriedades atraentes, cujos grupos farmacofóricos são reunidos num novo e único esqueleto molecular, capaz de reproduzir as propriedades originais das moléculas-protótipo.

Figura 1 - Estruturas dos padrões moleculares que inspiraram o planejamento dos novos derivados.



Fonte: Adaptado de (CHEUNG *et al.*, 2012; DERMECHE *et al.*, 2015; ELGUERO, 2015).

Baseados na gama de atividades presentes no donepezil (1) (inibidor da acetilcolinesterase (AChE)), na curcumina (2) (antioxidante e anti-inflamatório) e na talidomida (3) (inibidor do Fator de Necrose Tumoral Alfa (sigla em inglês: TNF- α)) (Figura 1), estes compostos foram usados como fontes de inspiração, através da hibridação molecular, no planejamento e síntese das novas entidades químicas com perfil de ação multialvo. Neste contexto, o presente trabalho visa ao planejamento, síntese e avaliação de 3 séries de novos agentes de ação múltipla, inspirados na estrutura do donepezil (1), da curcumina (2) e da talidomida (3), para o tratamento de doenças multifatoriais neurodegenerativas com aspectos fisiopatológicos comuns.

1.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O grupo de DN's mais comuns incluem doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA) e doença de Huntington (DH) (WOOD; WINSLOW; STRASSER, 2015). O risco de sofrer uma neurodegeneração aumenta com a idade e o aumento da expectativa de vida significa que nas próximas décadas mais pessoas podem ser afetadas

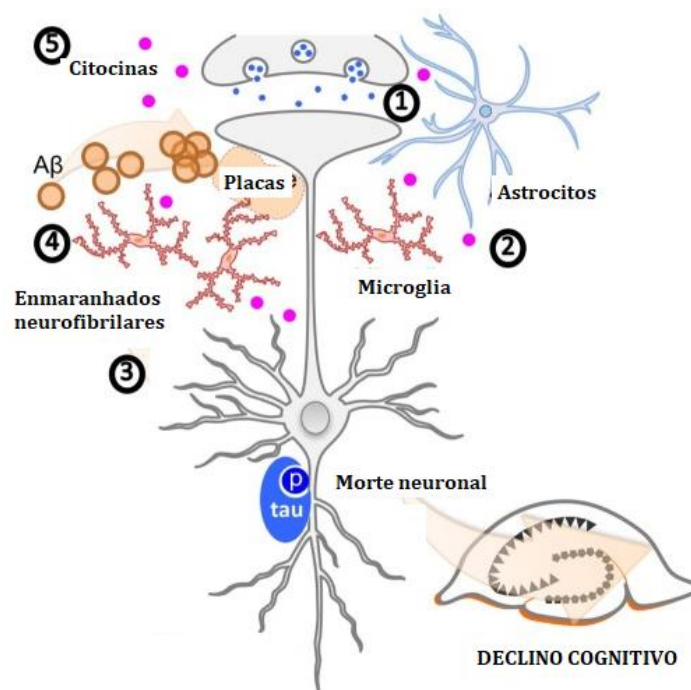
com algum tipo de neurodegeneração. Embora os tratamentos possam ajudar a mitigar alguns dos sintomas, não há atualmente nenhuma cura conhecida, especialmente pelo fato de terem caráter multifatorial (HEEMELS, 2016). Os principais processos que induzem à neurodegeneração são causados por fatores genéticos, ambientais e endógenos relacionados com a idade. A compreensão desses processos no nível molecular permite abrir novas perspectivas de abordagens mais racionais no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

1.1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA), começa gradualmente e, na medida em que avança, a capacidade cognitiva se deteriora, comprometendo a capacidade de tomar decisões e realizar normalmente tarefas cotidianas, evoluindo para o surgimento de modificações de personalidade (DOS SANTOS PICANCO *et al.*, 2018). É possível reconhecer 3 etapas da evolução da DA: leve, moderada e grave. A primeira etapa se caracteriza pela perda da memória sobre acontecimentos recentes, problemas de concentração, incluindo também, transtornos de discurso como falta de coerência e compreensão de conversas com certa complexidade; a etapa moderada adiciona-se os danos às células nervosas do SNC que podem dificultar a expressão de pensamentos e a execução de tarefas rotineiras, transtornos de linguagem, confusão, desconfiança e delírios. Finalmente, na última etapa se obtém alterações do tônus muscular, como perda dos movimentos e dependência total (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019b).

O córtex entorrinal e o hipocampo são geralmente as primeiras regiões afetadas pela patologia da DA. Estas áreas do encéfalo desempenham um papel fundamental na localização e na memória, portanto, a degradação deste sistema na DA está associada a graves deficiências na memória e na localização (GRØNTVEDT *et al.*, 2018). As principais características da doença envolvem depósitos extracelulares do peptídeo β -amiloide (β A), hiperfosforilação da proteína Tau que se acumula no citoplasma e níveis baixos de acetilcolina (ACh). Estes eventos estão associados à perda da sinapse e dos neurônios, resultando em déficit cognitivo e finalmente a demência. Algumas das estratégias terapêuticas atuais e alvos moleculares são baseados nestas teorias (**Figura 2**).

Figura 2 - Características moleculares da fisiopatologia da DA e principais alvos biológicos.

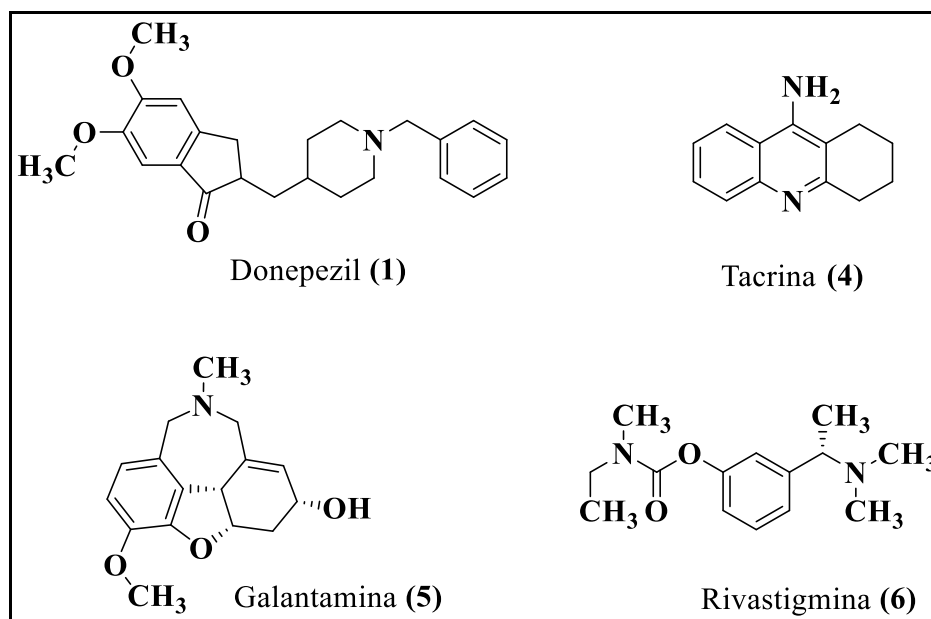


Fonte: Adaptado de (WHITTINGTON; PLANEL; TERRANDO, 2017)

Nota: (1), a neurotoxicidade por excesso de glutamato e desequilíbrio do cálcio contribuem para a disfunção sináptica e a perda neuronal; (2) a ativação da glia, promovem a inflamação (3) fosforilação da tau e formação de emaranhados neurofibrilares; (4) A formação da placa βA ; (5) Aumentos de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β , interleucina-6 e TNF- α .

A deficiência da ACh na fenda sináptica vem sendo a hipótese mais estudada para tentar descobrir a origem da doença. Os únicos tratamentos farmacológicos utilizados são baseados na melhora cognitiva dos pacientes com fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs) e moduladores do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Os inibidores de colinesterase aumentam a transmissão colinérgica diretamente, inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE) e evitando que a ACh seja hidrolisada (HAMPEL *et al.*, 2018).

Figura 3 - Inibidores da colinesterase comercializados contra a DA.



Fonte: (ANAND; SINGH, 2013).

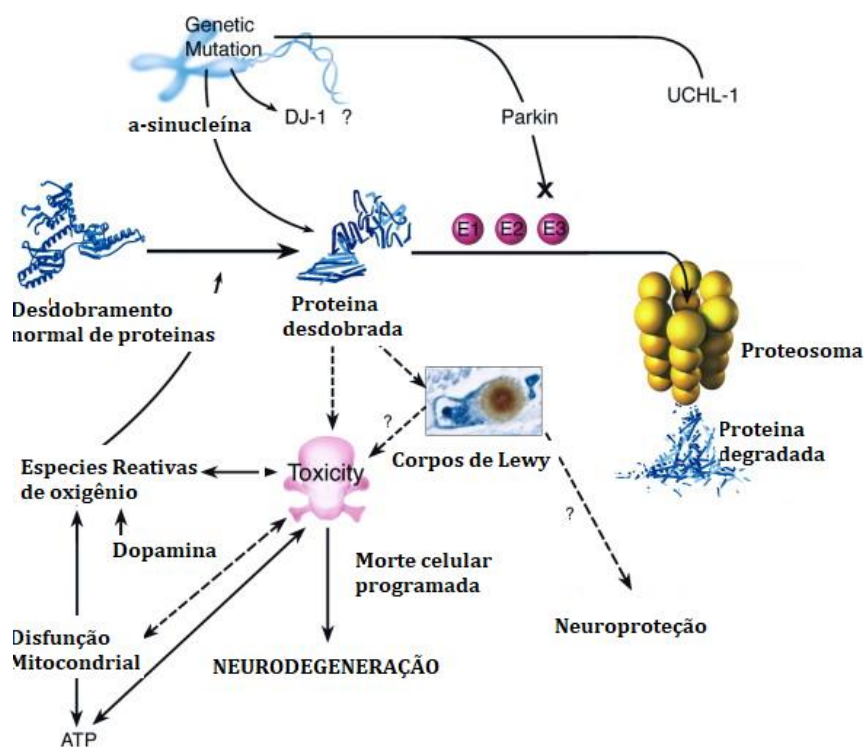
Atualmente o fármaco mais usado é o Donepezil (**1**, **Figura 3**), um derivado de piperidina altamente seletivo, com atividade reversível, e representa o melhor perfil farmacológico em âmbitos de melhora cognitiva em todos os estágios (leve, moderado e grave) da DA (SZIGETI; ZEB; RIAZ, 2017). Além disso, o donepezil, comparado a outros AChEIs (Tacrina (**4**), Galantamina (**5**), Rivastigmina (**6**), **Figura 3**) (ANAND; SINGH, 2013), possui uma meia-vida longa (70 a 80 horas) e bem absorvido oralmente com 100% da biodisponibilidade oral relativa, maior tolerabilidade devido ao aumento da especificidade para a inibição central da enzima AChE e tem interação medicamentosa mínima (ADLIMOGHADDAM *et al.*, 2018).

1.1.2 Doença de Parkinson

A DP, segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum no mundo, deve-se ao dano e morte dos neurônios dopaminérgicos na substância nigra (SN) e nos gânglios basais. A doença é caracterizada por tremores, lentidão de movimentos (bradicinesia),

rigidez e instabilidade postural, cujos processos patológicos que induzem à neurodegeneração envolvem inclusões neuronais compostas de α -sinucleína, que levam à disfunção neuronal por todo o sistema nervoso, acumulando-se em estruturas chamadas corpos de Lewy e corpos neuríticos. A propagação de formas anormais de α -sinucleína é a hipótese mais popular para explicar a deterioração progressiva dos sistemas neuronais relacionados com a doença (DICKSON, 2018).

Figura 4 – mecanismo molecular na DP.



Fonte: Adaptado de (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003)

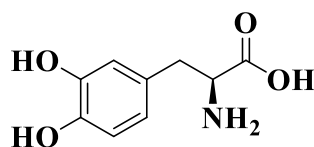
Nota: o acúmulo de proteínas mal dobradas é principal característica na neurodegeneração da DP. Mutações patogênicas podem induzir diretamente conformações proteicas anormais ou danificar a capacidade do mecanismo celular de detectar e degradar proteínas dobradas (Parkin, UCH-L1). O dano oxidativo, associado à disfunção mitocondrial e ao metabolismo anormal da dopamina, também pode promover conformações proteicas dobradas.

A perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra e a atrofia estriatal são responsáveis pelos principais sintomas motores da DP. Na **Figura 4** se observam os mecanismos moleculares envolvidos na da DP. Outros sistemas neuronais afetados pela

α -sinucleína anormal contribuem para os sintomas não motores da DP, que incluem ansiedade, depressão, distúrbios do sono, disfunção autonômica e comprometimento cognitivo (KAM *et al.*, 2018).

Em geral, a interação entre mutações genéticas e exposições ambientais pode contribuir para a progressão da DP (BHAT *et al.*, 2018). Estudos relatam que mutações genéticas no LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*), PARK7 (*Parkinsonism Associated Deglycase*), PRKN (*Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase*), PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) ou α -sinucleína, além de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, desempenham um papéis fundamentais e contribuem no risco de desenvolvimento da doença. Adicionalmente, a idade influencia vários processos fisiológicos, no início e na progressão dos distúrbios neurodegenerativos, juntamente com a neuroinflamação, isto é, processo caracterizado por um desequilíbrio de mecanismos pró e anti-inflamatórios, que opera em várias doenças relacionadas com a idade, e notavelmente nas DNs (CALABRESE *et al.*, 2018).

Figura 5 - Estrutura da levodopa



Levodopa (7)

Fonte: Adaptado de (SEBASTIANUTTO; CENCI, 2018).

A terapia de substituição da dopamina com *L*-3,4-di-hidroxifenilalanina (*L*-DOPA, **7**, **Figura 5**), o precursor natural de dopamina, trata os sintomas motores de maneira eficaz durante os primeiros anos de tratamento (SEBASTIANUTTO; CENCI, 2018). No entanto, à medida que a doença progride, causa complicações induzindo flutuações motoras e movimentos involuntários anormais (discinesia). Os sintomas leves da DP podem ser tratados com agonistas da dopamina e inibidores da MAO-B, isolados ou em combinação. Isto permite o atraso do tratamento com *L*-DOPA, evitando o início da

discinesia (RUONALA *et al.*, 2018). Quanto ao diagnóstico, são amplamente utilizadas as diferentes modalidades de neuroimagem, como a ressonância magnética (MRI), para tentar identificar biomarcadores candidatos à disfunção cognitiva na DP. Em pacientes com Parkinson observa-se uma perda regional de volume da substância cinzenta basal. A neuroimagem oferece um caminho promissor na detecção e intervenção precoces de pacientes com neurodegeneração (KALIA, 2018).

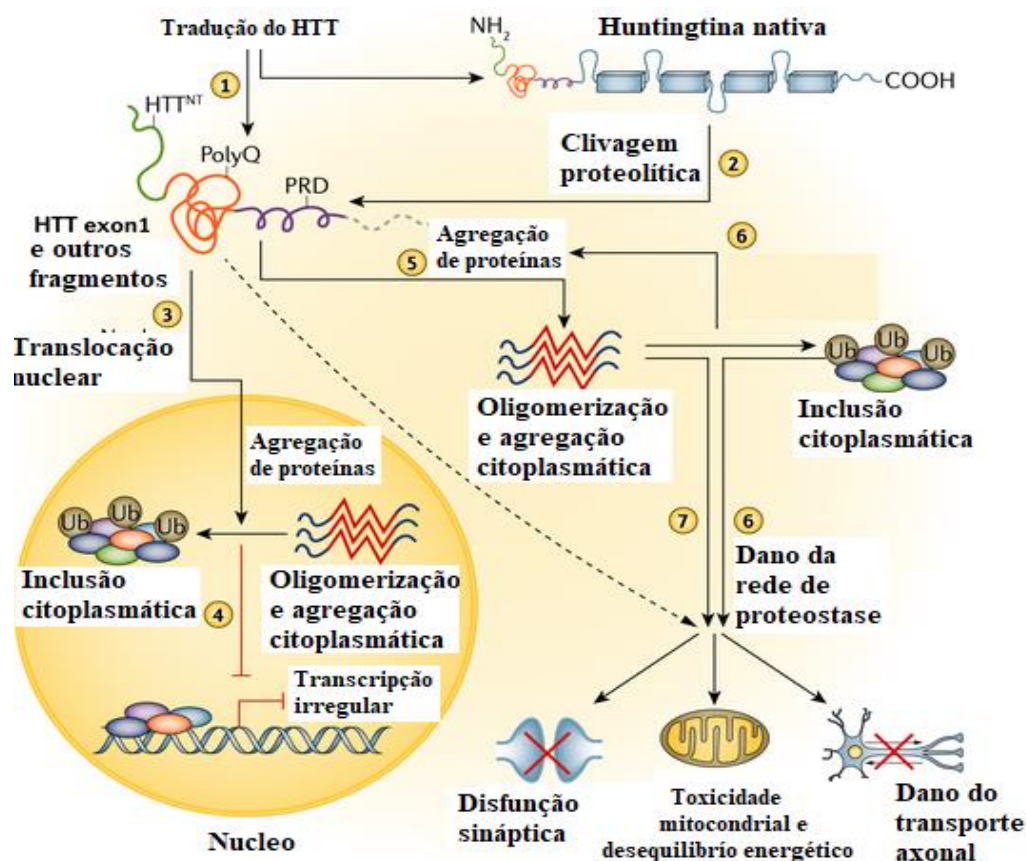
1.1.3 Doença de Huntington

Clinicamente, a DH é um transtorno hereditário, caracterizado por uma disfunção motora do sistema extrapiramidal, rede de neurônios do SNC ligados aos movimentos do corpo humano, comprometendo principalmente os neurônios médios da espinha dorsal no estriado e no córtex, que leva a distúrbio psiquiátrico e declínio cognitivo. A DH é causada por uma expansão de repetição trinucleotídica do códon CAG no éxon-1, segmento de DNA, do gene Huntingtina (HTT) do cromossomo 4, que codifica a proteína huntingtina (Htt) (MCCOLGAN; TABRIZI, 2018). A huntingtina é necessária para o desenvolvimento embrionário inicial e desempenha um papel crucial na neurogênese, na conectividade sináptica e na regulação transcricional (JIMENEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017). Ao nível celular, os eventos tóxicos estão relacionados à expressão da proteína huntingtina mutante (mHTT), com uma repetição anômala longa de poliglutamina (PolyQ). Isto resulta em agregados proteicos diferentes, causando os movimentos erráticos associados à DH. O mHTT interfere em múltiplas funções celulares, incluindo transcrição, metabolismo energético, homeostase proteica, transporte intracelular, e consequentemente, em disfunção e morte neuronal (**Figura 6**) (MCCOLGAN; TABRIZI, 2018).

A proteína mHTT afeta várias proteínas envolvidas na função sináptica, especificamente aquelas envolvidas na exocitose e endocitose, resultando em uma transmissão sináptica anormal. Enquanto, a disfunção sináptica precoce é estabelecida pela desregulação da liberação de glutamato no estriado que leva à desconexão

progressiva entre o córtex e o estriado. (ESSA *et al.*, 2019). A prevalência da mutação, mHTT, é de quatro a dez casos por cada 100.000 pessoas, em populações de origem europeia ocidental. Existe uma forte correlação inversa entre o número de repetições CAG e a idade de início dos sintomas (71% dos casos). No entanto, a idade de início, também parece ser influenciada por fatores ambientais e genéticos adicionais, como genes modificadores (JIMENEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017).

Figura 6 - Mecanismos celulares patogênicos na doença de Huntington.

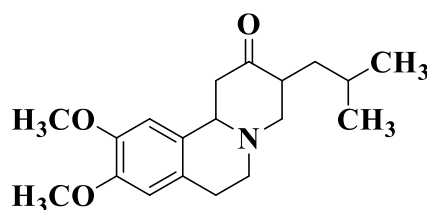


Fonte: adaptado de (MCCOLGAN; TABRIZI, 2018).

Legenda: (1) O HTT é traduzido para produzir a proteína huntingtina e polyQ. (2) A huntingtina nativa é clivada através de proteólise para gerar fragmentos proteicos adicionais. (3) Os fragmentos de proteína entram no núcleo. (4) Fragmentos são retidos no núcleo levando à formação de inclusões. (5) Os fragmentos de huntingtina se agregam no citoplasma. (6) A agregação da huntingtina e comprometimento da rede de proteostase, que também leva a prejuízos celulares globais. (7) As formas aberrantes da huntingtina resultam em prejuízos celulares globais adicionais.

Após o surgimento dos primeiros sintomas diagnosticáveis, a DH leva à morte dentro de 10 a 20 anos. Atualmente não existe uma cura da doença; portanto, o tratamento baseia-se na melhora das deficiências cognitivas. O fármaco mais comum é a tetrabenazina (**8**, **Figura 7**) aprovado para suprimir os movimentos involuntários (coreia). Porém, o risco de agravamento ou desencadeamento de depressão ou outras condições psiquiátricas (FRANK, 2014). Outras terapias mais promissoras visam reduzir os níveis de huntingtina mutante com tecnologias de supressão gênica com efeitos terapêuticos positivos (KORDASIEWICZ *et al.*, 2012; SOUTHWELL *et al.*, 2018).

Figura 7 - Estrutura química da tetrabenazina



Tetrabenazina (**8**)

Fonte: Adaptado de (FRANK, 2014).

1.2 CARACTERÍSTICAS COMUNS DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As DNs compartilham padrões fisiopatológicos semelhantes, que envolvem o processo de envelhecimento, a agregação de proteínas tóxicas insolúveis, estresse oxidativo, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, perda da homeostase celular e finalmente morte neuronal (AHMED *et al.*, 2016; WOOD; WINSLOW; STRASSER, 2015). Em cada uma das DNs há desdobramento anormal e, em seguida, agregação de uma proteína subjacente, este processo é conhecido como proteotoxicidade. O acúmulo gradual desses agregados em diferentes regiões do encéfalo, e a aceleração de sua formação pelo estresse oxidativo explicam o início e os sintomas característicos de cada doença (MAYO, 2011). O papel das vias genéticas que regulam o tempo de vida e suprimem a proteotoxicidade associada a diversas proteínas propensas à agregação sugere

uma importante relação entre a genética do envelhecimento e as DNs. Os fatores genéticos estão ligados às mutações específicas ou polimorfismos genéticos (variações nas sequências de DNA). Tais exemplos incluem a mutação na proteína precursora amiloide (PPA) levando à DA, mutação A53T em α -sinucleína levando à DP, e expansões de PolyQ na proteína huntingtina levando a DH (AHMED *et al.*, 2016).

A desregulação glutamatérgica é outro contribuinte para a patologia das DNs, pois o excesso de glutamato extracelular, pode levar à excitotoxicidade por meio da superativação dos receptores ionotrópicos de glutamato. Com base nessa hipótese, pesquisas tem se dedicado ao desenvolvimento de fármacos inibidores de receptores de glutamato (LEWERENZ; MAHER, 2015; MACHHI *et al.*, 2017; ZHANG, Z. *et al.*, 2019).

Adicionalmente, o processo neuroinflamatório pode ser devido tanto à agregação de proteínas (β -amiloide, sinucleína, agregados de Tau), micróglia ativada e astrócitos reativos, como também à liberação citocinas pró-inflamatórias e neurotoxicidade (produto também do estresse oxidativo recorrente). Todos estes fatores contribuem simultaneamente para o desenvolvimento da neurodegeneração.

1.2.1 Proteotoxicidade

O ambiente celular é composto de milhões de proteínas embaladas em seus respectivos locais subcelulares. De tal modo, a célula tem a tarefa de manter a homeostase e o controle da qualidade das proteínas. Assim, um desequilíbrio na homeostase sobre o fluxo de proteínas desdobradas pode resultar em graves danos à célula (GONOS, 2015). Entre os aspectos mais característicos nas DNs o envelhecimento está fortemente associado com o desequilíbrio da homeostase proteica (proteostase). A proteostase declina em função do tempo e pode fornecer uma explicação viável sobre porque a idade é um importante fator de risco para tais DNs. Portanto, entender a relação entre proteotoxicidade e envelhecimento pode fornecer informações importantes sobre a neurodegeneração (DOUGLAS; DILLIN, 2010).

Algumas DNs como DA, DP e DH, são caracterizadas pelo enrolamento incorreto e acúmulo de proteínas selecionadas em agregados insolúveis. O acúmulo de proteínas pode ocorrer dentro da célula (Tau ou α -sinucleína) ou fora das células (depósitos do β A), afetando os neurônios (YATES, 2018). O acúmulo de uma proteína específica é consequência de uma taxa de degradação reduzida da mesma proteína ou devido a um gene mutante que produz um produto anormal e que não é prontamente eliminado pelo mecanismo de degradação de proteínas, levando à sua acumulação (GANGULY *et al.*, 2017).

A descoberta de proteínas fortemente associadas às DNs e a compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos que resultem na modificação da biologia celular e, eventualmente, na neurodegeneração, podem beneficiar a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes no tratamento da neurodegeneração.

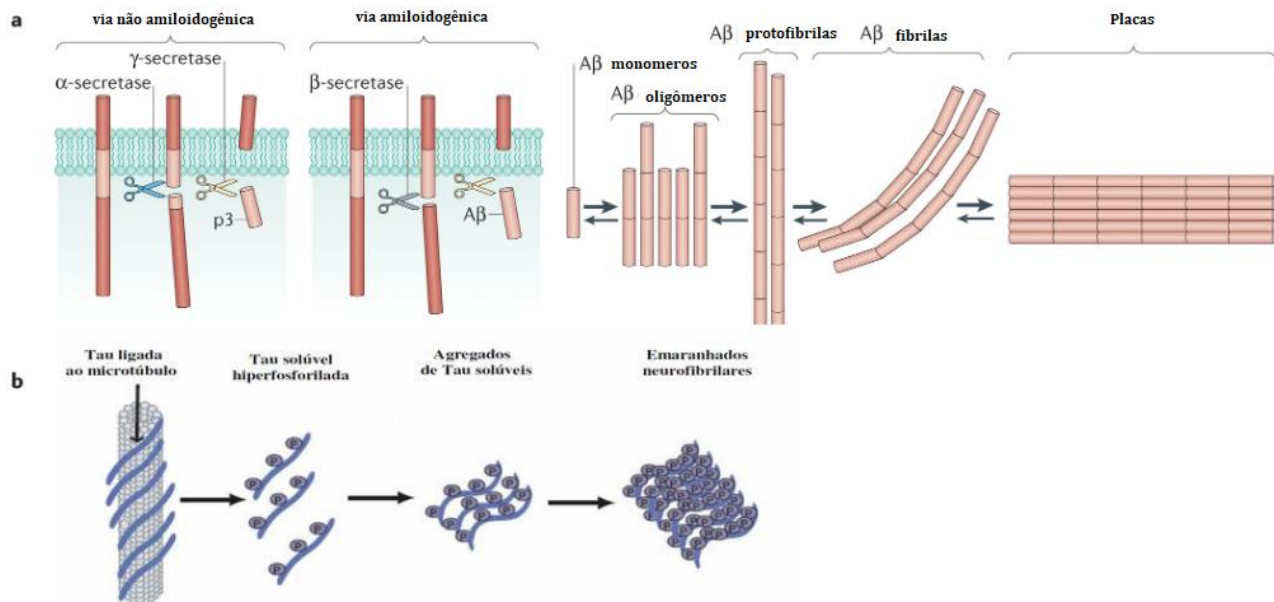
1.2.1.1 Peptídeo β -amiloide e proteína Tau

Na DA o depósito extracelular de β A (**Figura 8**) forma placas como um fenômeno patológico central o que acarreta danos aos axônios mediante à processos inflamatórios, à alteração na estrutura do citoesqueleto microtubular neuronal, à aparição das mudanças neurofibrilares e neurodegenerativas, resultando finalmente na morte neuronal. A *via* metabólica que conduz ao depósito de β A compreende a clivagem das proteínas precursoras do amilóide (PPA), uma proteína transmembranaral, por ação de enzimas β -secretase 1 (BACE1). Esse processo origina o β A insolúvel que posteriormente se deposita extracelularmente, dando lugar às placas senis (DE STROOPER; KARRAN, 2016).

Apesar do dano causado pelo acúmulo intracelular do peptídeo β A, sabe-se que não existe uma correlação entre a densidade das placas amilóides e a progressão da doença. Porém, acredita-se que o acúmulo de β A desencadeia a cascata neurotóxica, levando à formação de placas senis, fosforilação da proteína Tau, formação de enovelados neurofibrilares, neuroinflamação, perda sináptica e, eventualmente, morte neuronal (GRØNTVEDT *et al.*, 2018).

A proteína Tau tem recebido mais atenção nos últimos anos, em parte porque os resultados direcionados no β A não foram os esperados. Dado que a patologia da Tau se correlaciona melhor com o déficit cognitivo, espera-se que este seja um alvo mais eficaz do que a inibição dos depósitos β A. Em condições normais, a Tau fornece estabilidade dos microtúbulos e contribui na regulação do transporte axonal, quando a função normal da Tau é interrompida, leva ao desenvolvimento intraneuronal de enovelados neurofibrilares (NFTs) característicos da DA (CONGDON; SIGURDSSON, 2018; KAMETANI; HASEGAWA, 2018).

Figura 8 - As 3 principais características da DA dentro do sistema neuronal.



Fonte: Adaptado de (GOLDE, 2006; HEPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

Legenda: **A.** Clivagem de APP, e formação e acúmulo de β A. **B.** Formação de enovelados neurofibrilares.

Na DA, a deposição de agregados de Tau inicia no córtex entorrinal e no hipocampo antes de se espalhar para outras regiões. Durante o desenvolvimento da DA, a Tau começa a se fosforilar em múltiplos lugares, essa hiperfosforilação é o resultado do desequilíbrio da ação de diferentes quinases e fosfatases. Assim, um aumento na

fosforilação da Tau reduz a sua afinidade pelos microtúbulos, resultando na instabilidade do citoesqueleto neuronal (MEDINA *et al.*, 2016). A ruptura do sistema microtubular origina defeitos no transporte neuronal, e como consequência disto, os neurônios não podem transmitir sinais elétricos e nem transportar nutrientes. Um maior número de lesões neurofibrilares indica um grau superior da demência, enquanto que não existe uma correlação evidente com a segregação de depósitos extracelulares de β A (KAMETANI; HASEGAWA, 2018; MORENO *et al.*, 2016).

1.2.1.2 α -sinucleína

A DP é caracterizada pelo acúmulo de α -sinucleína, uma proteína pré-sináptica expressada no encéfalo especialmente no neocórtex, hipocampo, substância nigra (SN), tálamo, cerebelo e nos corpos de Lewy, que afetam particularmente os neurônios dopaminérgicos (EMAMZADEH, 2016). A α -sinucleína desempenha diferentes funções fisiológicas envolvendo a regulação do neurotransmissor da dopamina, transmissão sináptica, inibindo a oxidação de lipídios insaturados nas vesículas sinápticas. A idade de início e a gravidade da doença se correlacionam intimamente com o nível de expressão e segregação da α -sinucleína nos encéfalos de pacientes com Parkinson, nas células neuronais da SN, que leva à inflamação e à morte celular (PARIHAR *et al.*, 2019).

A α -sinucleína está envolvida diretamente nos processos patogênicos subjacentes à DP e várias outras doenças como a DA. A forma agregada da α -sinucleína prejudica as células neuronais, pois os oligômeros uma vez acumulados dentro ou fora das células, comprometem a sinapse, causando a ruptura da neurotransmissão (KURTISHI *et al.*, 2018). Sabe-se que a α -sinucleína existe na forma de monômeros estruturados e não estruturados, juntamente com diferentes espécies multiméricas que podem mudar suas características à medida que os neurônios passam de um estado não patológico para um estado patológico. Sugere-se que a α -sinucleína monomérica altamente desorganizada e com tendência a formar fibrilas *in vitro* é a forma neurotóxica da proteína (ABDULLAH *et al.*, 2017).

Nos últimos vinte anos foram identificados numerosos genes causadores de variações genéticas de risco para a DP. As primeiras causas hereditárias conhecidas da doença e da formação do corpo de Lewy foram documentadas em 1997 na mutação A53T e A30P no gene da α -sinucleína (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997). No entanto, a grande maioria dos casos de DP é causada pela ação combinada de centenas de variantes nas sequências de DNA, que também estão presentes na população em geral, exposições ambientais e de estilo de vida, bem como, fatores epigenéticos (LILL, 2016).

1.2.1.3 Expansão de poliglutaminas

A mutação em uma das duas cópias do gene HTT, que codifica a informação genética da proteína “huntingtina (Htt)”, são causa de diferentes doenças neurodegenerativas que incluem a DH. A expansão de repetições triplas de citosina-adenina-guanina (CAG) no gene HTT resulta na expansão anormal dos tratos de polyQ e, conseqüentemente, de proteína Htt irregular. As polyQ são herdadas de maneira autossômica dominante, devido ao gene mHTT que contém o trato de polyQ expandida na região N-terminal da proteína Htt no exón 1, considerado um dos principais precursores da proteotoxicidade do gene mutante mHTT (SOARES *et al.*, 2019).

A expansão de glutamina quando excede o limite crítico de 40 resíduos de glutamina resulta no acúmulo de mHTT capaz de formar inclusões nucleares e citoplasmáticas levando a disfunção neuronal e neurodegeneração (LIEBERMAN; SHAKKOTTAI; ALBIN, 2019). As inclusões podem conter diferentes proteínas chaperonas resultando no sequestro de moléculas importantes na manutenção da homeostase celular e na formação de proteínas anômalas (KUIPER *et al.*, 2017).

Adicionalmente, o número de repetições CAG do gene mHTT esta significativamente associado à idade de início da disfunção motora e cognitiva, progressão dos sintomas e declínio das capacidades do indivíduo, perda de peso, aumento do risco de morte e neurodegeneração cerebral (PODVIN *et al.*, 2019). O início da DH ocorre por volta dos 40 anos, porém o gene mHTT se expressa ao longo da vida do indivíduo. Isso sugere que existem mecanismos compensatórios que limitam a

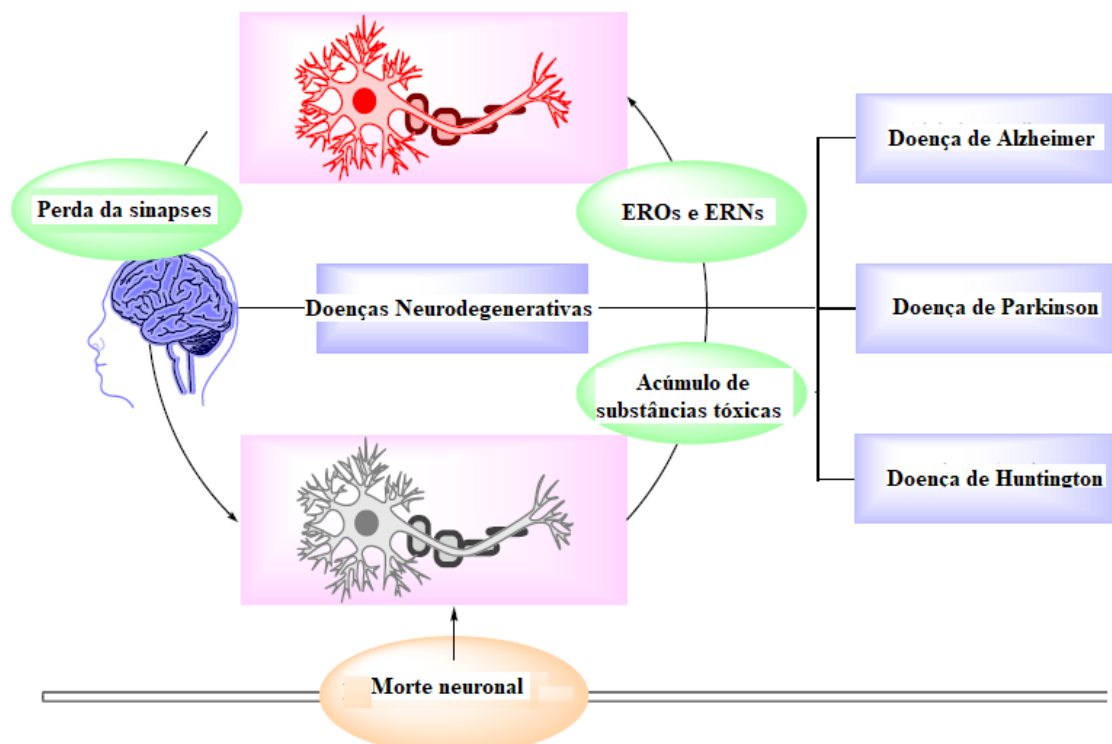
proteotoxicidade da mHTT no início da vida, mas que tais mecanismos acabam sendo superados pelo envelhecimento e progressão da doença (SOARES *et al.*, 2019). A descoberta de proteínas fortemente associadas às DNs e a compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos que resultam na modificação da biologia celular e, eventualmente, na neurodegeneração, pode beneficiar a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes no tratamento da neurodegeneração.

1.2.2 Estresse oxidativo

A homeostase redox é crucial para as funções celulares adequadas. Em condições normais, existe um equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes. Este equilíbrio facilita a capacidade dos oxidantes para desempenhar funções reguladoras importantes através da modificação direta de alguns aminoácidos nas proteínas sinalizadoras. No entanto, quando a concentração dos oxidantes supera a capacidade antioxidante, se gera uma condição de estresse EO, comumente caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2018).

Evidências crescentes sugerem que espécies reativas podem desempenhar um papel crítico no desenvolvimento das DNs (**Figura 9**), pois níveis elevado de EO comumente observado no encéfalo de pacientes com condições neurodegenerativas (LIGUORI *et al.*, 2018). Embora as EROs e ERNs possam não ser o fator desencadeante das doenças neurodegenerativas, elas provavelmente exacerbam a progressão da doença por meio de dano oxidativo e interação com as mitocôndrias (LIU, ZEWEN *et al.*, 2017). Devido aos níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes no sistema nervoso central os neurônios são susceptíveis ao EO. O aumento anormal de espécies reativas induz mutações do DNA mitocondrial, danificam a cadeia respiratória mitocondrial, alteram a permeabilidade da membrana, afetando a homeostase do Ca^{2+} e os sistemas de defesa mitocondrial. Todas estas características são manifestados nas DNs, influenciando ou alterando as funções neuronais, e desencadeando o processo de neurodegeneração (COBLEY; FIORELLO; BAILEY, 2018).

Figura 9 - Características comuns das DNs, como a disfunção neuronal nas sinapses, morte neuronal.



Fonte: Adaptado de (FEITOSA *et al.*, 2018).

Vários fatores podem induzir EO. No caso das DNs o acúmulo de proteínas desdobradas e agregação dessas proteínas modificadas desencadeiam uma resposta inflamatória no encéfalo que leva à liberação acentuada de EROs (LIU, ZEWEN *et al.*, 2017). Além disso, o EO pode inativar diretamente o sistema proteossômico responsável pela degradação dos agregados proteicos tóxicos e potencializar a oligomerização de proteínas, como α -sinucleína e β A (GANGULY *et al.*, 2017).

O EO participa do desenvolvimento da DA promovendo a deposição de β A, hiperfosforilação da proteína tau, disfunção mitocondrial e a subsequente perda de sinapses e neurônios. Assim, níveis elevados de β A estão associados a níveis altos de produtos de oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos no hipocampo e no córtex da DA. (CHEIGNON *et al.*, 2018). Adicionalmente, o encéfalo contém vários metais, como Fe, Zn, Cu, em concentrações muito altas esses íons metálicos podem se ligar à β A,

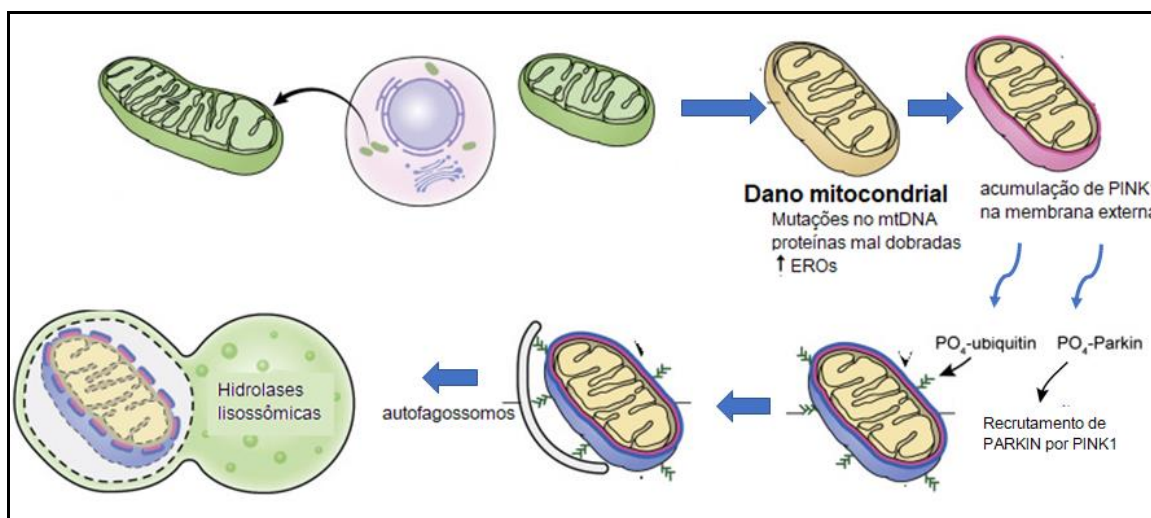
como foi observado em placas amilóides extraídas de encéfalos com DA (ATWOOD *et al.*, 2018).

Enquanto, vários marcadores de EO são relacionados à hiperfosforilação da Tau, como malonodialdeído (MDA), que é formado após a reação de EROs com lipídios poli-insaturados, ou 4-hidroxinonenal (HNE) e outras substâncias reativas como ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidas por peroxidação de lipídios intracelulares. Também a acumulação de espécies de Tau hiperfosforiladas tóxicas estimulam a produção de EROs e, portanto, as condições de EO. Estudos sugerem que o EO promove diretamente hiperfosforilação de Tau. Nesse contexto, a hiperfosforilação da tau e o EO aparecem como dois elementos de um “círculo vicioso” crucial que leva a um aumento coordenado progressivo tanto das EROs como da Tau anormal e, finalmente, da morte celular (ALAVI NAINI; SOUSSI-YANICOSTAS, 2015).

Na DP o excesso de produção de EROs contribui significativamente na perda neuronal dopaminérgica (GUO *et al.*, 2018), e está relacionado também à neuroinflamação, alterações no metabolismo de catecolaminas, disfunção mitocondrial, envelhecimento, depleção de glutathiona (GSH) e altos níveis de Ferro e Calcio (BLESA *et al.*, 2015). O aumento da apoptose neuronal observada na DP pode ser atribuída ao defeito do complexo mitocondrial I devido à mutação da cinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) (NEWMAN; SHADEL, 2018). A proteína PINK1 ajuda no controle do EO e na manutenção do potencial de membrana mitocondrial. Além disso, a agregação de α -sinucleína mostrou interromper as atividades do PINK1, comprometendo a síntese de ATP e a disfunção mitocondrial (BOSE; BEAL, 2019).

O PINK1 se acumula na membrana externa das mitocôndrias danificadas e sua atividade de cinase é necessária para a translocação da Parkina, proteína externa da membrana mitocondrial. Logo após recrutar a Parkina, o PINK1 desencadeia a sua remoção por autofagia seletiva. Por tanto, PINK1 e Parkina tem uma função de controle de qualidade mitocondrial (**Figura 10**) (PICKRELL; YOULE, 2015).

Figura 10 - Modelo de Mitofagia Induzida pela Parkina e PINK1.



Fonte: Modificado de (PICKRELL; YOULE, 2015).

Legenda: As mitocôndrias disfuncionais (mitocôndrias marrons) não importam e nem degradam o PINK1, estabilizando-o na membrana mitocondrial externa. Após a acumulação de PINK1, o PINK1 fosforila a ubiquitina e a Parkina para ativar a ligase E3 da Parkina.

Outros estudos sugerem que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos pode indicar à dopamina como fonte do EO, pois ela é facilmente metabolizada via MAO, levando à formação de aldeídos e outras EROs. Portanto, a expressão irregular de MAO está relacionada com o EO, devido ao aumento da produção de EROs, acelerando o desenvolvimento de DNs (BLESA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018).

Enquanto, na DH o aumento dos níveis de EROs, está relacionado com a proteína mHTT, quem pode interagir diretamente com as mitocôndrias, levando ao comprometimento do suprimento de energia e ao aumento do EO (ZHENG, J. *et al.*, 2018). O estresse oxidativo mediado pela disfunção mitocondrial é um fator-chave para a neurodegeneração observada na DH. A proteína mHTT altera um fator transcricional, e prejudica a expressão e a função do receptor gama proliferador de peroxissoma (co-ativador-1 α), um regulador da biogênese da mitocôndria e da expressão de enzimas antioxidantes (ESSA *et al.*, 2019). Uma hipótese trabalhada por Kumar e colaboradores (KUMAR; RATAN, 2016) sobre a origem EO na DH trata sobre uma falha nas respostas transcricionais compensatórias. Esta falha é mediada em parte devido à repressão direta da expressão gênica adaptativa por mHTT ou devido à interação direta de mHTT com

fatores de transcrição regulados por redox. Se respostas transcricionais adaptativas ao EO, são inibidas pela mHTT, então isso criará uma condição em que o estresse é persistente e não compensado.

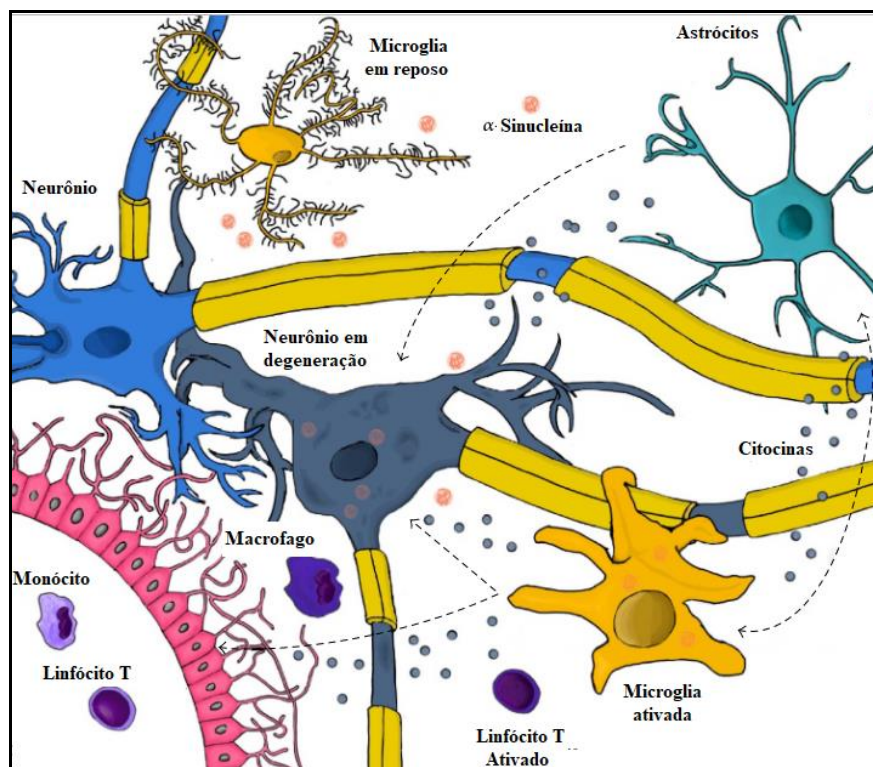
Alguns tratamentos contra DNs baseiam-se principalmente em compostos que possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Por exemplo, curcumina, resveratrol, carotenóides, vitamina A, vitamina E, coenzima Q10, representando uma estratégia terapêutica alternativa no tratamento de DNs (CHANG *et al.*, 2018; MEHTA *et al.*, 2017). Embora nenhum desses antioxidantes tenha fornecido evidência clínica clara em relação aos efeitos benéficos em DNs (GUNESCH; SCHRAMM; DECKER, 2017), o efeito neuroprotetor através da neutralização das EROs, pode evitar a formação de outros produtos tóxicos que comprometam a função mitocondrial e o acúmulo de proteína anormal (ABRAHAMS *et al.*, 2019a). Conclui-se que os antioxidantes podem modificar e reajustar o estresse oxidativo no meio biológico, desencadear efeitos neuroprotetores e impactar positivamente os processos neurodegenerativos (PANAHI *et al.*, 2019).

1.2.3 Neuroinflamação

A neuroinflamação tem sido implicada como contribuinte patológico em várias DNs, que incluem DA (BUSINARO *et al.*, 2018), DP (GELDERS; BAEKELANDT; VAN DER PERREN, 2018) e DH (LOIS *et al.*, 2018). Os depósitos de proteínas tóxicas ativam as células imunes do SNC, micróglia e astrócitos com a liberação de mediadores pró-inflamatórios (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2019). As funções pró-inflamatórias, incluindo a liberação de citocinas, ERNs e EROs, podem danificar os neurônios saudáveis, causando disfunção sináptica, perda de sinapses e morte neuronal. Portanto, um desequilíbrio entre as funções pró-inflamatórias e reparatórias das células neuroimunes pode resultar em lesão do SNC (SCHAIN; KREISL, 2017). Nesse contexto, a neuroinflamação tem sido amplamente descrita como um fator patogênico comum e central do processo neurodegenerativo (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2019). Em geral, considera-se que a eliminação dessas proteínas patológicas pelas células imunes do SNC promove neuroinflamação (**Figura 11**) podendo contribuir para a progressão das DN por

ativação da resposta imune inata ou por imunidade adaptativa prejudicada, levando à inflamação crônica, culminando em dano cerebral e deterioração (BREZOVAKOVA *et al.*, 2018).

Figura 11 - Possível ligação entre α -sinucleína, processos neuroinflamatórios e neurodegeneração na DP.



Fonte: adaptado de (GELDERS; BAEKELANDT; VAN DER PERREN, 2018).

Legenda: Na presença de α -sinucleína, a microglia é ativada, e induz uma resposta imune complexa, aumentando a expressão de mediadores pró-inflamatórios, que consequentemente ativam células imunes contribuindo ativamente na neurodegeneração.

Adicionalmente, os metais também podem contribuir no acúmulo de espécies proteicas tóxicas e promover processos inflamatórios. Por exemplo, estudos destacam o papel do cobre como co-fator no aumento da toxicidade do peptídeo β A e na modulação da atividade microglial através da formação de complexos de cobre- β A e da liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico

síntese indutível (iNOS). A resposta inflamatória associada à DA parece, portanto, causar mudanças no tráfico de cobre microglial, que podem comprometer a homeostase do cobre, sugerindo que ela é necessária fisiologicamente para prevenir a neuroinflamação (HUAT *et al.*, 2019).

Na patogênese da DH, a neuroinflamação é um forte componente, resultado da expressão de mHTT que altera processos específicos em micróglia e astrócitos, como transcrição, sinalização celular, liberação de citocinas, migração, apoio e obtenção de nutrientes aos neurônios. A ativação de células imunes cerebrais que expressam mHTT contribui na morte neuronal, neuroinflamação e ao desenvolvimento da patogênese da DH em todos os estágios de progressão e um agravamento dessa situação com o envelhecimento (CROTTI; GLASS, 2015).

Atualmente a neuroinflamação pode ser monitorada de imagens *in vivo* do SNC durante a doença. Tais técnicas incluem ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e imagens ópticas (SCHAIN; KREISL, 2017; STEPHENSON *et al.*, 2018).

1.2.4 Toxicidade por glutamato

O glutamato (*L*-glu) é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, ativa os canais iônicos permeáveis ao cálcio que também são ativados pelo NMDA ou α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA). A concentração de glutamato extracelular é mantida na faixa micromolar pela ação de transportadores de aminoácidos excitatórios que contêm glutamato para os astrócitos e neurônios. O excesso de glutamato extracelular pode levar à excitotoxicidade por meio da superativação de receptores de glutamato, comprometendo o fluxo de cálcio, a permeabilidade mitocondrial e gerando EROs (LEWERENZ; MAHER, 2015).

O cálcio, devido ao seu papel essencial na sinalização de processos pré-sinápticos e pós-sinápticos, assim como em processos celulares de diferenciação, morte celular e transporte vesicular sofre uma regulação extremamente precisa em neurônios que permitem o acoplamento simultâneo de múltiplos canais. Portanto, o aumento de cálcio neuronal desempenha um papel patogênico importante em DNs crônicas, que leva

estimulação excessiva dos neurônios, lesão neuronal aguda e morte celular (VERMA; WILLS; CHU, 2018). Na sinapse glutamatérgica, a desregulação do cálcio está diretamente ligada aos níveis altos *L*-glu e ao receptor NMDA, compreendendo neurônios pré-sinápticos, pós-sinápticos e células gliais (ZHANG, Y. *et al.*, 2016). *In vitro*, na DA, o agregado β A aumenta a toxicidade de *L*-glu mediada pelo receptor NMDA, interferindo na homeostase do cálcio e aumentando a excitabilidade neuronal. Além disso, os oligômeros β A solúveis induzem a liberação de *L*-glu dos astrócitos, conduzindo eventualmente à perda da espinha dendrítica através da hiperativação dos receptores NMDA extra-sinápticos (TALANTOVA *et al.*, 2013).

A sobrecarga de cálcio mitocondrial também desempenha um papel fundamental na DP e DH. Nesta última, a proteína mHTT, além de formar agregados nucleares insolúveis, aumenta a atividade dos receptores NMDA e perturba a sinalização de cálcio, isto também pode ser observado na DP (JIANG *et al.*, 2016). Adicionalmente, os neurônios da SN são vulneráveis aos efeitos do glutamato, que atua como uma neurotoxina na presença de um metabolismo energético celular comprometido (CASSANO *et al.*, 2016). Em modelos animais, o bloqueio dos receptores de glutamato melhora as manifestações motoras da DP (VILLALBA; MATHAI; SMITH, 2015).

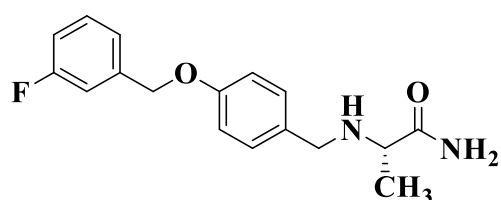
1.3 FÁRMACOS MULTIALVO (MTDLs)

Tradicionalmente, os fármacos vêm sendo concebidos com o objetivo de visar uma única entidade biológica. Porém, apesar de muitas tentativas, até agora os ensaios clínicos não obtiveram sucesso na introdução de novas terapias no mercado para tratar as DNs. Uma explicação pode ser a falta de compreensão total dos mecanismos biológicos envolvidos, falta de biomarcadores que avaliem com precisão a progressão da doença e estratégias farmacológicas usadas para tratar doenças multifatoriais. Portanto, estudos sugerem que uma hipótese multifatorial é provavelmente a melhor maneira de integrar os diversos fatores que vinculam as múltiplas vias moleculares das DNs (BOLOGNESI; CAVALLI, 2016).

O sucesso limitado da estratégia de um fármaco e um alvo para tratar as DNs estimulou a busca de novas entidades farmacológicas mais eficientes. Assim, nos últimos anos os pesquisadores têm explorado uma abordagem inovadora para o desenho racional de novos ligantes conhecida como fármacos multialvo ou MTDL visando a obtenção de moléculas com ligantes dirigidos a vários alvos associados a uma única doença. Isto permitiu o desenvolvimento de uma variedade de compostos híbridos atuando concomitantemente em diversos alvos biológicos e sua exploração em tratamentos de doenças multifatoriais, como as neurodegenerativas (RAMSAY *et al.*, 2018).

A primeira nova entidade química multialvo aprovada na última década para tratamento neurodegeneração é a safinamida (**9**) (**Figura 12**). O fármaco que combina efeitos dopaminérgicos, incluindo inibição seletiva e reversível da MAO-B e inibição da recaptação da dopamina, são responsáveis pelos efeitos nos sintomas motores da DP. Bem como propriedades não dopaminérgicas, como a inibição da liberação do glutamato, e consequente bloqueio dos canais sódio e cálcio, que acredita-se confere efeito neuroprotetor reduzindo excitotoxicidade e a morte neuronal dopaminérgica (PEVARELLO; VARASI, 2018).

Figura 12 - Estrutura química da safinamida.



Safinamida (**9**)

Fonte: Adaptado de (PEVARELLO; VARASI, 2018).

No planejamento racional de fármacos MTDL a hibridação molecular é considerada uma ferramenta chave para identificar novos padrões moleculares (CLAUDIO VIEGAS-JUNIOR; ELIEZER J. BARREIRO; CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA, 2007). Esta estratégia permite através da combinação de subunidades estruturais de diferentes moléculas bioativas, desenvolver novas entidades químicas capazes de interagir com mais de um alvo molecular, atuando por múltiplos mecanismos

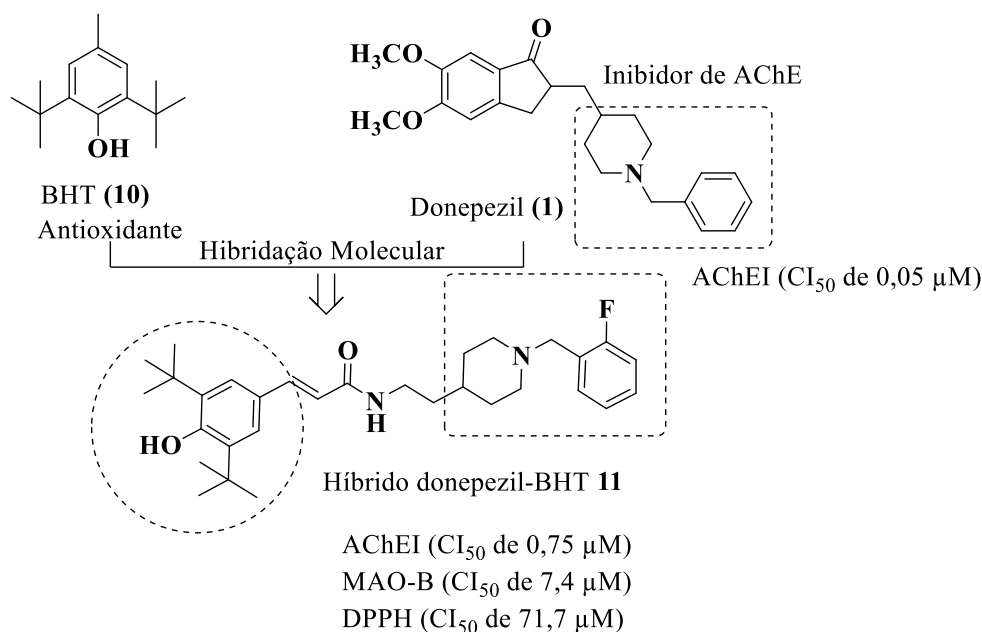
simultaneamente e com eficácia melhorada, quando comparado com os fármacos originais. A hibridação molecular, vem ganhando força, e representa uma nova perspectiva interessante na busca de um tratamento eficaz que abrange os diferentes fatores que a doença implica (AFFINI *et al.*, 2018; OLIVEIRA PEDROSA *et al.*, 2017; SANG *et al.*, 2019; YAZDANI *et al.*, 2019). Compostos híbridos contendo fragmentos de fármacos inibidores da AChE (Donepezil (**1**), Tacrina (**4**), Rivastigmina (**6**)), flavonoides, quinolinas, cumarinas entre outros, são os mais usados como padrões estruturais no desenho de novas entidades, devido a suas propriedades inibitórias de enzimas, quelante de metais, antioxidantes e anti-inflamatórias.

O donepezil (**1**) é um inibidor bivalente, ou seja, é capaz de interagir em ambos os sítios de união da enzima AChE: o sítio aniônico catalítico (CAS), por meio de interações com a fração benzílica, e o sítio aniônico periférico (PAS) através do fragmento da dimetoxiindanona (CHEUNG *et al.*, 2012). Outros inibidores bivalentes têm sido planejados através da modificação da estrutura de donepezil, a fim de alcançar um melhor perfil farmacológico e manter as duas interações (CAS e PAS).

Na literatura existe uma ampla gama de análogos híbridos do donepezil usando o fragmento de *N*-benzilpiperidina, fragmento capaz de interagir com o sítio CAS, e que combinado com outros compostos bioativos apresentam perfis farmacológicos interessantes (DE FREITAS SILVA; DIAS; *et al.*, 2018). Um destes estudos sobre derivados híbridos do donepezil, com ação multiavo foi relatado por Cai e colaboradores (**Figura 13**). Eles sintetizaram e avaliaram uma série de híbridos do donepezil-butilhidroxitolueno avaliado contra DA (CAI *et al.*, 2018).

Cai e seus colaboradores combinaram a subunidade *N*-benzilpiperidina do donepezil (**1**) ao butilhidroxitolueno (BHT) (**10**), composto com propriedades antioxidantes. Entre as estruturas desta nova família de híbridos, o composto **11** apresentou os melhores resultados, com perfil multifuncional balanceado, boa inibição da AChE (CI₅₀ de 0,75 µM) e MAO-B (CI₅₀ de 7,4 µM), excelente atividade antioxidante (CI₅₀ de 71,7 µM pelo método DPPH) e efeito inibidor da agregação βA induzida pela AChE. Adicionalmente, o composto **11** demonstrou ter potencial neuroprotetor contra o dano oxidativo induzido por H₂O₂ em células PC12.

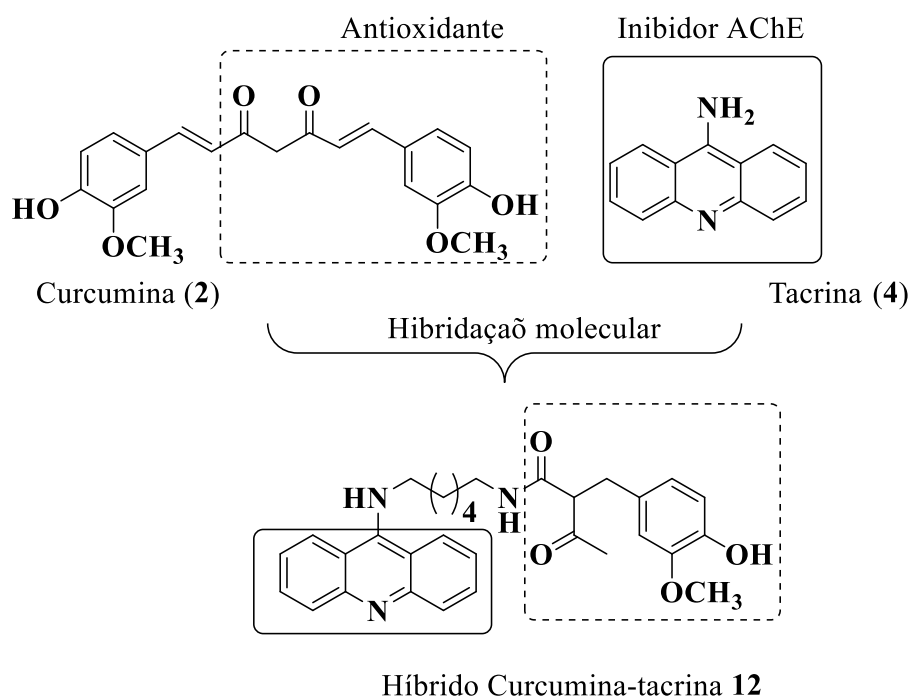
Figura 13 - Estratégia de desenho do híbrido donepezil-BHT **11**.



Fonte: Adaptado de (CAI *et al.*, 2018).

A curcumina (**2**) também tem sido utilizada, como inspiração para planejar e desenvolver diferentes compostos híbridos visando à obtenção de substância anti-neurodegenerativas e com potencial antioxidante. A curcumina (**2**) (extraída de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), conhecida também como açafrão, faz parte da família dos curcuminoides, pigmentos presentes na planta tropical, também conhecida como haldi, nativa da Ásia tropical. Entre suas aplicações, é utilizada como um tempero, de coloração amarelo-laranja e como remédio para aliviar diferentes distúrbios de saúde, por exemplo como um auxílio digestivo, febres, infecções, disenteria, artrite (ELGUERO, 2015).

A curcumina (**2**) é um potente agente anti-antioxidante; tem sido estudada por sua capacidade de eliminar as EROs que estão envolvidos na inflamação. Estudos mostram que a curcumina age como um eliminador de radicais hidroxila em concentrações mais altas e é um poderoso eliminador do radical superóxido. Essa propriedade pode ser responsável pela boa atividade anti-inflamatória. Portanto, com base nos diferentes fatores envolvidos na DNs, verificou-se que a curcumina tem a capacidade de inibir o dano inflamatório e oxidativo (ABRAHAMS *et al.*, 2019b).

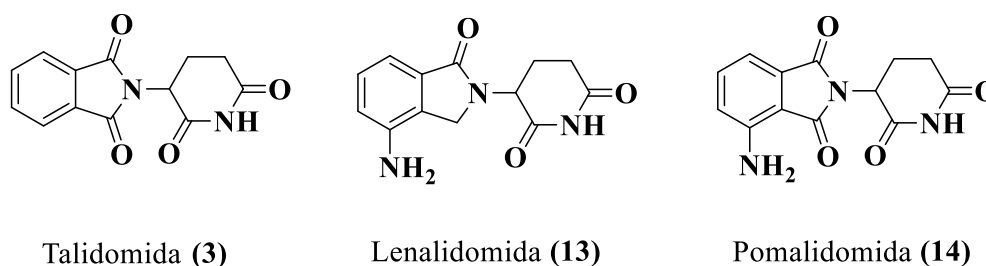
Figura 14 - Planejamento do híbrido Curcumina-tacrina **12**.

Fonte: Adaptado de biometais (LIU, ZHIKUN *et al.*, 2017).

Zhikun e colaboradores usaram a curcumina (**2**) como inspiração no planejamento de novas estruturas combinando-a com a Tacrina (**4**) (**Figura 14**), um potente inibidor da AChE, mas que leva a hepatotoxicidade e efeitos colinérgicos indesejados. A nova série molecular foi racionalizada para exibir perfil multialvo com melhores efeitos terapêuticos, sem a toxicidade original da tacrina. O composto **12**, demonstrou ter potencial na neuroproteção e na inibição das colinesterases (CI_{50} de $0.08 \pm 0.03 \mu\text{M}$ para AChE e CI_{50} de $0.22 \pm 0.1 \mu\text{M}$ para BuChE) comparado ao farmaco de referência a tacrina (CI_{50} de $0.10 \pm 0.07 \mu\text{M}$ para AChE e CI_{50} de $0.05 \pm 0.1 \mu\text{M}$ para BuChE). O composto **12** também exibiu capacidade antioxidante a partir da eliminação de radicais de oxigênio e baixa toxicidade em células PC12. Além disso, a subunidade β -dicetona demonstrou notável capacidade quelante de metais, sugerindo um potencial do composto híbrido para interromper a agregação $A\beta$ induzida por biometais (LIU, ZHIKUN *et al.*, 2017).

Outro composto utilizado nos últimos anos para avaliar seu efeito nas DN é a Talidomida (**3**). Inicialmente liberada como sedativo e para tratar o enjojo matinal de mulheres grávidas, mas que foi banida em 1961 devido aos relatos de teratogenicidade. Atualmente, a talidomida é usada para tratar com sucesso várias doenças, que incluem hanseníase, mieloma múltiplo e câncer, bem como doença de Crohn, HIV e outros, mas com severas restrições e sob supervisão da FDA (VARGESSON, 2015). No entanto, a talidomida também demonstrou ter efeitos terapêuticos sobre doenças neurodegenerativas (EKERT *et al.*, 2018a; SHEN; MARWAN, 2010). O efeito da talidomida envolve modulação de várias citocinas como o TNF α , tendo efeito anti-inflamatório (KABASAKAL; ALAN, 2012), anti-apoptótico e antioxidante (PALENCIA *et al.*, 2015).

Figura 15 - Estrutura química da talidomida (**3**), lenalidomida (**13**) e pomalidomida (**14**).



Fonte: Adaptado de (BHATIA, 2016).

Em termos de bioatividade, o fragmento isoindol e seus derivados (**Figura 15**) constituem uma classe importante de compostos heterocíclicos biologicamente ativos com perfil farmacológico diversificado, como antimicrobiano, anti-helmíntico, inseticida, antitumoral. Estes compostos heterocíclicos que foram estudados por mais de um século, tem atraído considerável atenção nos últimos anos. Os compostos a base de isoindol possuem amplo potencial como agente antiproliferativo. Recentemente, a talidomida (**3**) e seus análogos (lenalidomida (**13**) e pomalidomida (**14**) **Figura 15**) foram aprovados pela FDA como tratamento para o mieloma múltiplo, despertando novo interesse no desenvolvimento de derivados isoindol para a terapia de diversas doenças (BHATIA, 2016).

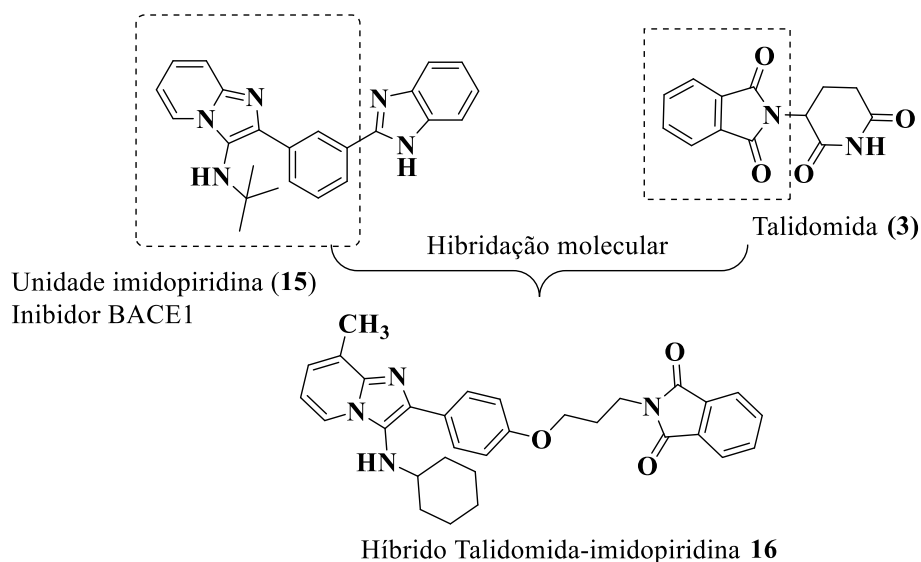
A talidomida (**3**), além de demonstrar inibição da proliferação de células endoteliais, angiogênese e capaz de passar através da barreira hematoencefálica. Também foi capaz de reduzir a perda neuronal do hipocampo pela inibição do TNF α , tornando-a uma estrutura interessante no planejamento de novos compostos contra a DA (DERMECHE *et al.*, 2015; EKERT *et al.*, 2018b).

Na DA, a quantidade excessiva de peptídeos β A, resulta na liberação significativa de fatores inflamatórios, incluindo o TNF- α . O peptídeo β A é formado através da via amiloidogênica, na qual a PPA é clivada pela BACE-1 e pela γ -secretase, levando à agregação de fibrilas β A. Estudos relatam que a inibição do receptor TNF- α reduz a atividade da enzima BACE-1, deste modo, reduz a geração de β A e melhora os déficits de aprendizado e memória (HE *et al.*, 2013). A talidomida inibe a atividade de BACE-1 e do TNF- α , demonstrando um efeito positivo da diminuição dos depósitos β A (RUSSO *et al.*, 2012). No entanto, o mecanismo da talidomida envolvendo a mitigação das características neuropatológicas da DA ainda não está claro.

Neste contexto, tanto a enzima AChE, como a BACE-1 e TNF- α , estão envolvidos no processo de agregação de proteína β A. O desenvolvimento de agentes direcionados na inibição de ambas as enzimas e do TNF- α , representa uma tentativa de obter um efeito terapêutico mais eficaz. Baseados nas características da talidomida, Azimi e sua equipe, relataram a síntese de novos híbridos de em imidazopiridinas (**15**), inibidor BACE-1, contendo uma subunidade de ftalimídica, proveniente da talidomida (**3**) (**Figura 16**).

Sabe-se que a atividade aumentada da BACE-1 induz à agregação do peptídeo β A nos encéfalos de pacientes com DA. Consequentemente, os inibidores de BACE-1 surgiram como candidatos ideais para o tratamento da DA, evitando o acúmulo e agregação de β A. Os dados obtidos pelos pesquisadores demonstram que os compostos sintetizados têm o potencial para diminuir os níveis de β -amilóide e melhorar os sintomas da DA. O composto **16**, o mais potente na inibição de BACE-1, exibiu um valor de CI_{50} de $2,84 \pm 0,95 \mu\text{M}$ (AZIMI *et al.*, 2017).

Figura 16 - Planejamento do híbrido talidomida-imidopiridina **16** como inibidor BACE-1 para tratamento contra a DA.



Fonte: Adaptado de (AZIMI *et al.*, 2017).

Tendo em conta o exposto, nossa abordagem baseia-se no desenvolvimento de uma nova série de híbridos talidomida-donepezil (**Figura 17**, pág. **56**), combinando o fragmento ftalimídico da talidomida, com propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias, a uma subunidade funcionalizada de *N*-benzilpiperadínico, procedentes do donepezil e com propriedades inibidoras da AChE (Série A); Adicionalmente duas séries inspiradas na curcumina (**Figura 18** e **Figura 19**, pág. **57** e **58**, respectivamente), derivados ferúlicos com diferentes aldeídos funcionalizados (série B) e derivados $\alpha\beta$ -insaturados-*N*-benzilpiperadínicos ligados a espaçadores *N*-acilidrazônicos (Série C). Pretendemos obter um composto MTDL, com perfil inibidor da AChE, de MAO e da agregação β A, antioxidante, neuroprotetor e anti-neuroinflamatório, visando gerar novos compostos uteis ao tratamento contra as DNs.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de três novas séries de híbridos moleculares donepezil-talidomida e de derivados cinamoil-*N*-acilidrazônicos, visando a obtenção de ligantes da enzima AChE com ação neuroprotetora, antioxidante e anti-neuroinflamatória, substâncias potenciais ao tratamento de doenças neurodegenerativas. A seguir os objetivos específicos:

- ✓ Planejamento dos novos ligantes;
- ✓ Estudos *in silico* de modelagem molecular com a enzima acetilcolinesterase, análise virtual das interações ligante-receptor dos compostos planejados;
- ✓ Estudo *in silico* de parâmetros ADME
- ✓ Síntese dos compostos, em grau de pureza e em quantidade adequados à realização dos ensaios farmacológicos;
- ✓ Identificação e caracterização das moléculas sintetizadas,
- ✓ Realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* de citotoxicidade,
- ✓ Realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* para avaliar a atividade anti-colinesterásica, antioxidante e neuroprotetora dos derivados sintetizados
- ✓ Realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* das propriedades anti-inflamatórias.

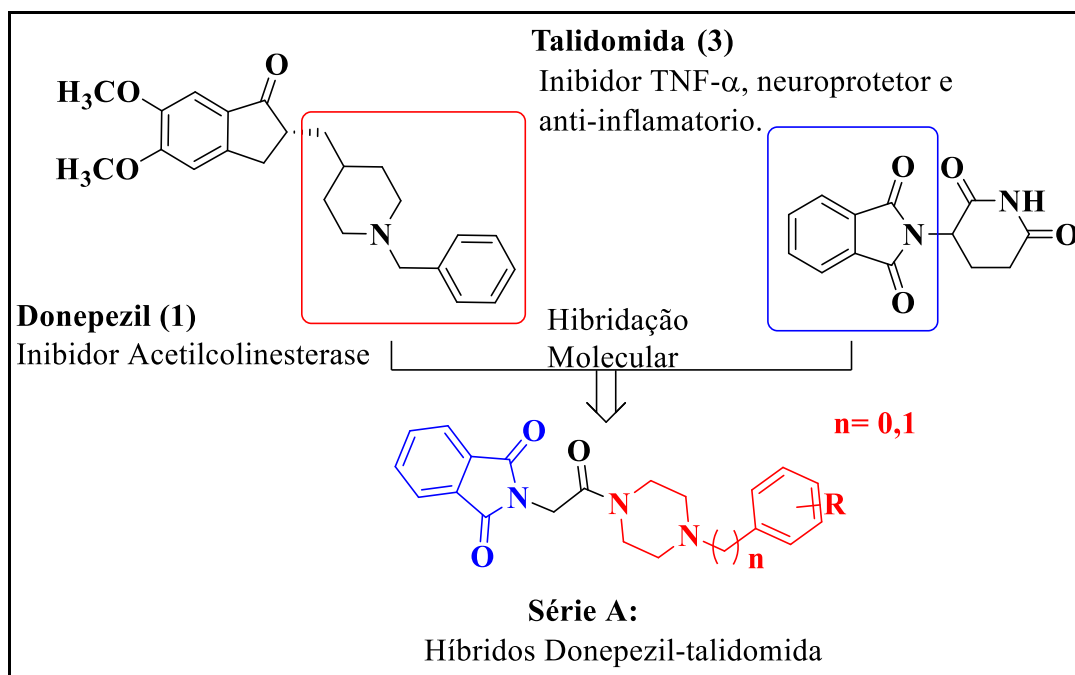
3 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Com base em similaridades estruturais presentes em diversos compostos com propriedades inibitórias da AChE (donepezil, **1**) (LI, Q. *et al.*, 2018), antioxidantes (Curcumina, **2**) (ABRAHAMS *et al.*, 2019c), neuroprotetoras e anti-inflamatórias (Talidomida, **3**) (MARTINEZ; PELOW, 2018) descritos na literatura, foram planejados 40 compostos inéditos divididos em três séries moleculares (**A-C**), visando a obtenção de ligantes multifuncionais inibidores da enzima AChE, antioxidantes, neuroprotetores e anti-inflamatórios.

A primeira série molecular (série **A**) foi inspirada a partir das estruturas do donepezil (**1**) e a talidomida (**3**). A subunidade aromática isoindolina-1,3-diona, presente na

talidomida e com propriedades inibitórias do TNF- α , foi proposta em substituição para mimetizar à subunidade 2,3-dihidro-1*H*-indenona presente no donepezil. O fragmento isoindolina-1,3-diona (**Figura 17**, em azul) foi relatado como capaz de interagir com o sítio aniônico periférico (PAS) da AChE (GREENBLATT *et al.*, 2004), demonstrando ter potencial inibitório da enzima. O fragmento *N*-benzilpiperidina presente no donepezil foi substituído por uma *N*-benzilpiperazina (**Figura 17**, em vermelho), levando à formação de uma amida. A ausência dos centros estereogênicos presentes nos compostos padrão permitem a obtenção de derivados economicamente viáveis e evitariam a teratogenicidade original da talidomida (VARGESSON, 2015). Utilizam-se diferentes benzilpiperazinas e fenilpiperazinas substituídas com grupos doadores e aceptores de elétrons para estudar seu aporte na bioatividade frente à inibição colinesterásica.

Figura 17 - Planejamento estrutural da nova série de híbridos donepezil-talidomida (**Série A**).

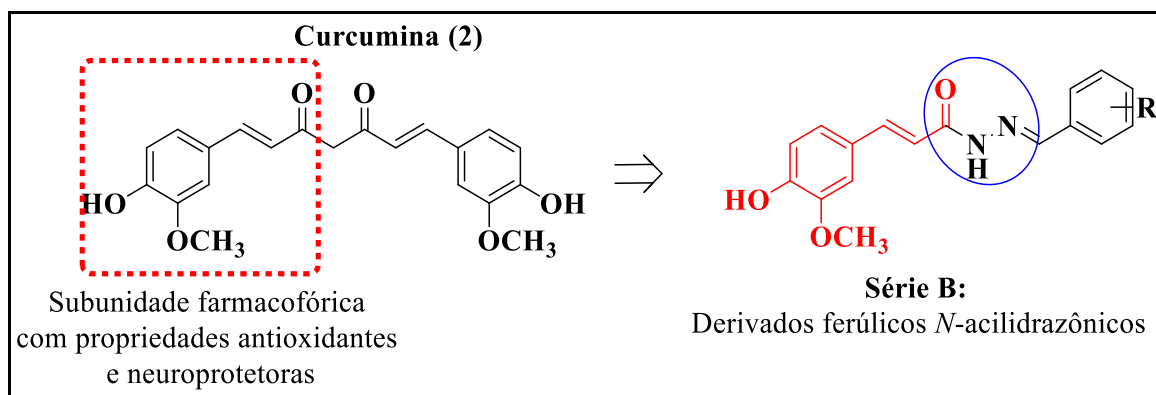


Fonte: do autor

As séries moleculares **B** e **C** (**Figura 18** e **Figura 19**, respectivamente) foram inspiradas em base à estrutura da curcumina (**2**), potente antioxidante e agente anti-

inflamatório. A curcumina tem duas características estruturais importantes que têm sido associadas a inibidores de β -amiloide: a presença de anéis fenólicos capazes de interromper o empilhamento proteico e grupos enólicos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio. O grupo fenólico da curcumina pode interagir com os resíduos aromáticos em fibrilas amiloides em empilhamentos π - π , enquanto os grupos hidroxila e a unidade $\alpha\beta$ -insaturada podem atuar como interruptores através de ligações de hidrogênio. Finalmente, uma vez que a curcumina é um inibidor da proteína cinase II dependente de cálcio/calmodulina, também atua como neuroprotetor (ELGUERO, 2015).

Figura 18 - Planejamento estrutural da nova série de compostos cinamoil *N*-acilidrazônicos (**Série B**).



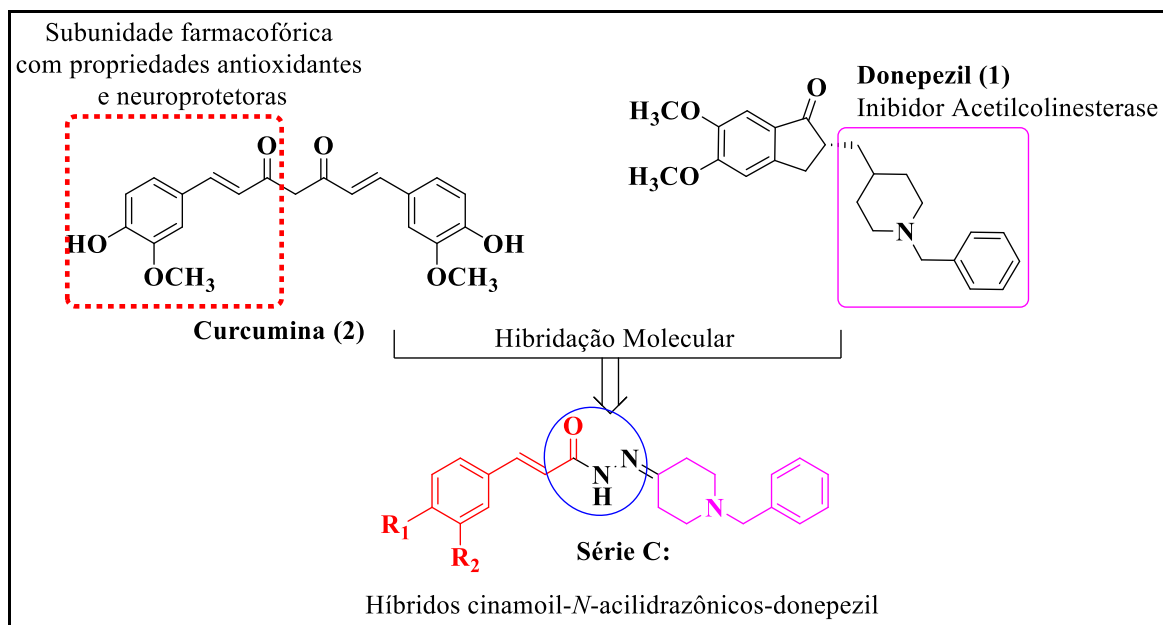
Fonte: do autor

O fragmento *N*-benzilpiperidínico, da série C, (**Figura 19**, em rosa), a qual encontra-se protonada em pH fisiológico, foi proposto com base na estrutura do donepezil, capaz de interagir com o sítio aniônico catalítico (CAS) da AChE através de interações iônicas com o receptor-alvo. Um estudo recente usando o fragmento piperazinico e contendo iminas na sua estrutura demonstrou resultados promissores na inibição da acetilcolinesterase indicando que este tipo de estruturas apresentam um perfil promissor no tratamento de DNs (ZHOU *et al.*, 2019).

Por fim, a introdução do espaçador acilidrazônico, uma classe de compostos nitrogenados, e que estão presentes em compostos bioativos, possui funções orgânicas

relacionadas à atividade biológica no tratamento da inflamação e das doenças neurodegenerativas (DA SILVA *et al.*, 2016; NAVIDPOUR *et al.*, 2014).

Figura 19 - Planejamento estrutural da série de híbridos cinamoil-*N*-acilidrazônicos-donepezil (Série C).



Fonte: do autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em três partes. Cada parte aborda os resultados de cada uma das series sintetizadas (A-C), iniciando pela parte sintética e a caracterização dos compostos orgânicos obtidos, e finalizando com os resultados *in silico* e *in vitro*, referentes aos testes biológicos realizados.

PARTE 1: HÍBRIDOS DONEPEZIL-TALIDOMIDA (SÉRIE A).

Na primeira parte serão abordados os resultados sintéticos e avaliação farmacológica da primeira família de híbridos donepezil-talidomida (**24a-1**) (PQM-183 a PQM-190 e PQM-296 a PQM-299), que foram planejados como inibidores da acetilcolinesterase e anti-neuroinflamatórios para o tratamento contra a doença de Alzheimer.

4.1 QUÍMICA

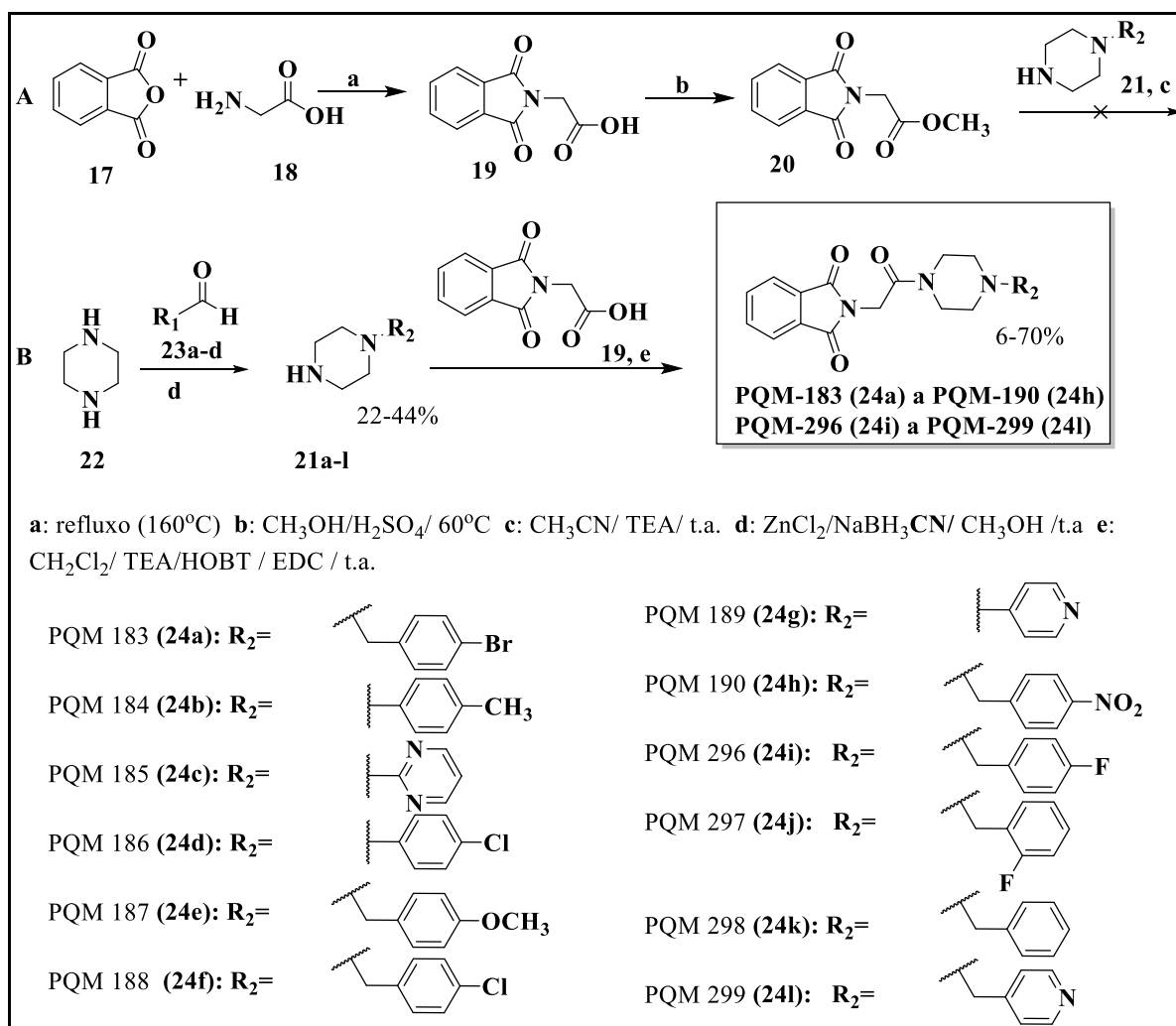
Foram sintetizados 12 compostos, racionalmente planejados a partir das estruturas do donepezil (**1**) e da talidomida (**3**). Os resultados químicos obtidos nesta etapa do trabalho serão discutidos adiante assim como a caracterização por espectroscopia na região do Infravermelho (IV), RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de Massas (EM) do principal representante desta série molecular.

4.1.1 Síntese dos híbridos donepezil-talidomida (Série A).

Inicialmente deparou-se com algumas dificuldades na obtenção dos intermediários da primeira série A; híbridos moleculares donepezil-talidomida. Na **Figura 20** está representada a primeira síntese empregada (A). A etapa inicial foi a obtenção do ácido *N*-

ftaloilglicina (**19**) a partir de anidro ftálico (**17**) e glicina (**18**), posteriormente o intermediário formado foi esterificado em meio ácido em metanol. Finalmente, acoplou-se o éster obtido com diferentes piperazinas funcionalizadas em piridina. Porém, a purificação foi difícil devido à formação de vários subprodutos e à afinidade do produto desejado com a sílica cromatográfica. Assim, o rendimento final da reação foi baixo, inferior a 10%.

Figura 20 - Rotas sintéticas na obtenção dos compostos da série A

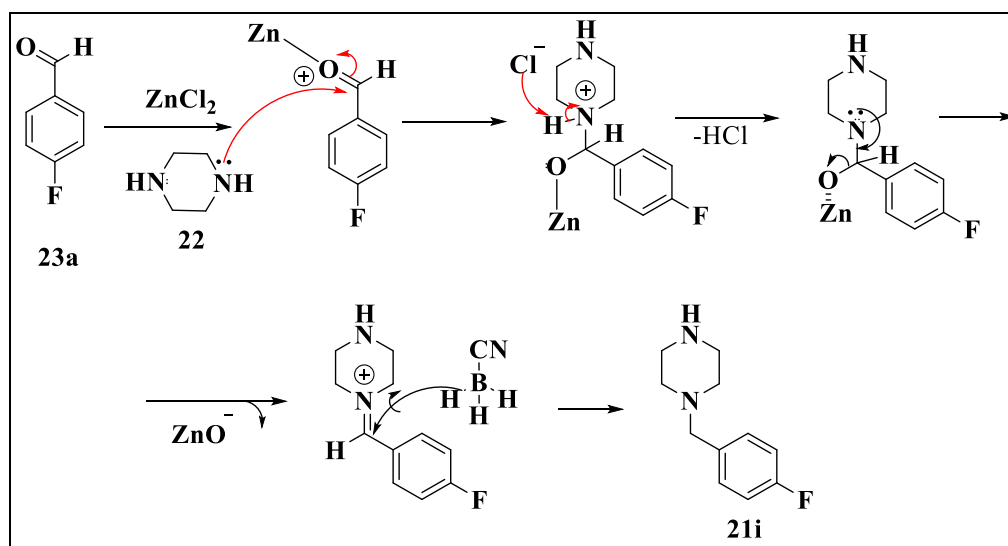


Fonte: do autor

Visando a otimização da rota sintética, foi empregada uma metodologia diferente (método **B**, **Figura 20**) para a formação de ligação C=ONH de amida. A rota sintética

proposta está baseada na preparação dos intermediários piperazínicos **21i-l** ou adquiridos comercialmente **21a-h**. A primeira etapa para obter os intermediários **21i-l** envolveu uma reação de aminação redutiva entre a piperazina e aldeídos funcionalizados em presença de NaBH_3CN e ZnCl_2 . O grupo ciano é um grupo retirador de densidade eletrônica que torna menos reativo o cianoboroidreto de sódio quando comparado com boroidreto de sódio (NaBH_4), permitindo uma redução seletiva da dupla ligação $\text{C}=\text{N}$ na presença de aldeídos (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971).

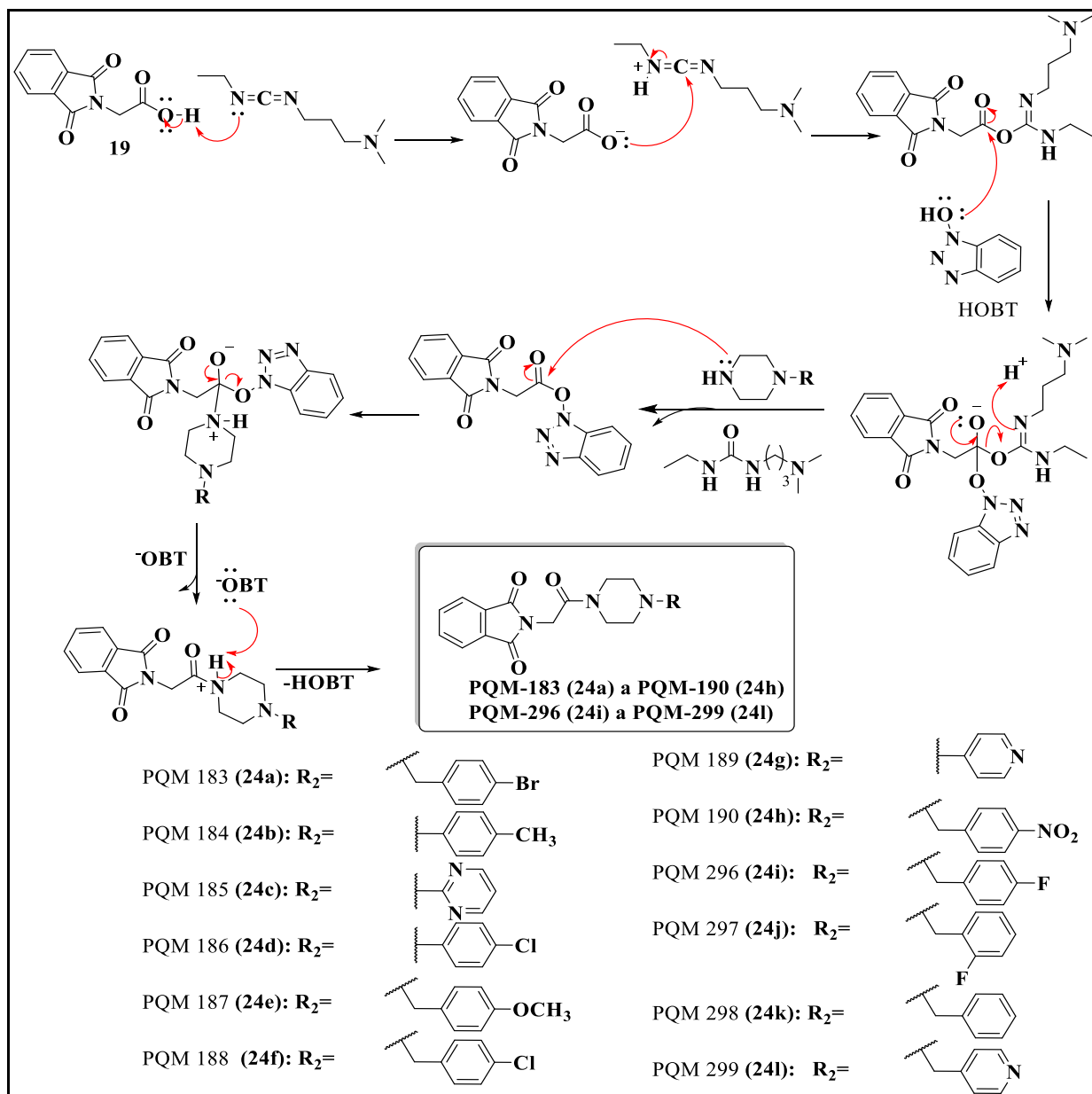
Figura 21 - Proposta de intermediários reacionais de aminação redutiva entre a piperazina (**22**) e o 4-fluor-benzaldeído (**23a**).



Fonte: adaptado de (KIM, S. *et al.*, 1985).

Nesta reação de aminação redutiva (**Figura 21**), a piperazina se adiciona à carbonila do aldeído previamente ativada pela coordenação do átomo de oxigênio carbonílico e o ácido de Lewis, cloreto de zinco, formando um íon oxônio com uma ligação metal-oxigênio. Este ácido de Lewis diminui a energia LUMO da carbonila tornando-a mais eletrofílica para logo reagir com o nucleófilo (o nitrogênio da piperazina). A base, neste caso, o ânion de cloro, abstrai o próton do grupo piperazina, levando à formação de uma imina e permitindo a eliminação de ZnO . Na sequência, o agente redutor transfere um hidreto para o átomo de carbono do intermediário iminônio, levando ao produto reduzido desejado (KIM, S. *et al.*, 1985).

Figura 22 - Proposta de intermediários reacionais da rota sintética da série A.



Fonte: do autor.

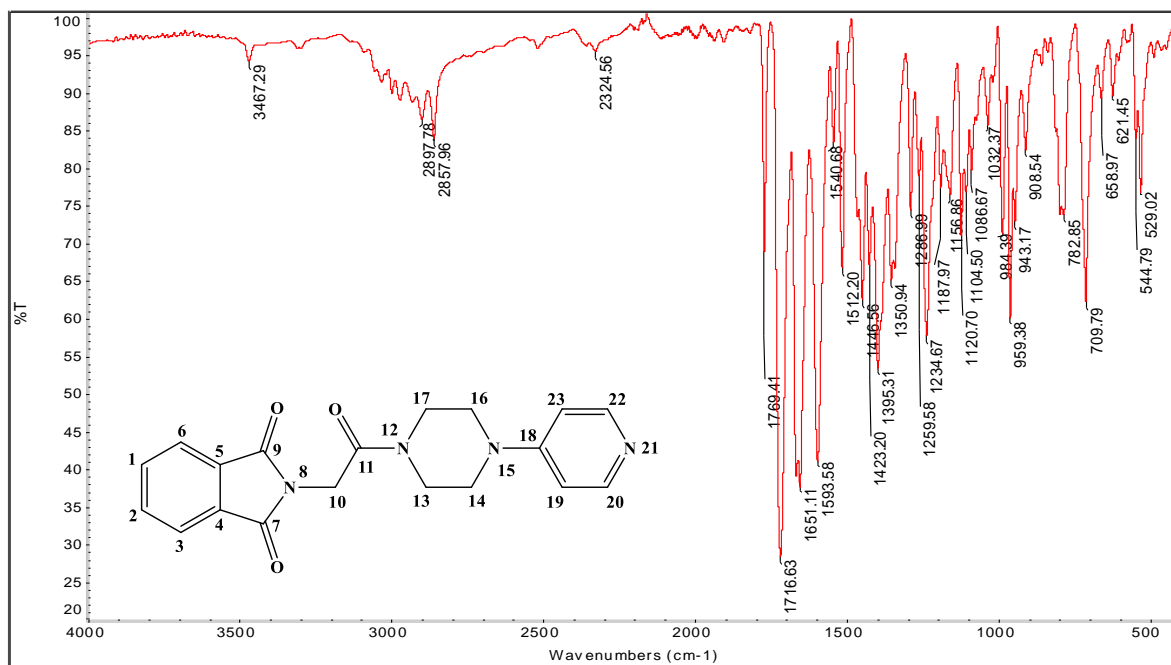
A fim de aumentar o rendimento devido à competição que leva a formação do produto disubstituído, foi feita uma alteração da metodologia proposta por Borch e colaboradores (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971), adicionando lentamente uma

solução do aldeído e ZnCl_2 em metanol à piperazina solubilizada no mesmo solvente. Após de reação a dupla ligação foi reduzida com NaBH_3CN .

Logo, os intermediários-chave **21a-l**, foram submetidos a reação de acoplamentos com o ácido *N*-ftaloilglicina (**19**) em presença de HOBT, EDC e TEA, em diclorometano, mantido sob agitação a temperatura ambiente por um período aproximado de 24 horas. Este método (método **B**, **Figura 20**) permitiu o isolamento dos produtos puros através de filtração simples, aumentando assim o rendimento final da reação levando aos derivados desejados **24a-l**. Na **Figura 22** está representado a proposta de mecanística da formação da ligação amida a partir do ácido *N*-ftaloilglicina (**19**), e piperazinas funcionalizadas **21a-l**, em presença de HOBT, EDC e TEA, em diclorometano.

4.1.2 Caracterização dos híbridos donepezil-talidomida

Como exemplo será apresentada aqui a caracterização do composto-final PQM-189 (**24g**) por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV e EM. No espectro na região do IV (**Figura 23**) da substância PQM-189 (**24g**) apresentou-se bandas de estiramento $\text{C}_{\text{sp}2}$ acima de 2897 cm^{-1} , estiramento assimétrico de $\text{C}_{\text{sp}3}$ em 2897 cm^{-1} , estiramento de $\text{C}=\text{O}$ da imida em 1716 cm^{-1} , estiramento da amida do núcleo piperazínico em 1651 cm^{-1} , estiramento $\text{C}=\text{C}$ do núcleo aromático em 1593 e 1512 cm^{-1} . Segundo dados da literatura, no espectro na região do IV realizados no composto de partida, 1-(4-piridil) piperazina (**21g**), observa-se a banda de estiramento do NH em 3241 cm^{-1} , referente ao grupo piperazina (ALVER; ŞENYEL, 2010). Assim, no espectro na região do IV do produto-final não foram observadas bandas na região de $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$, indicando que o composto não apresenta bandas referentes aos grupos O-H e nem N-H. O que demonstrou a ausência dos materiais de partida e corroborou o sucesso no acoplamento dos reagentes.

Figura 23 - Espectro de absorção na região do IV do composto PQM-189 (**24g**) (ATR).

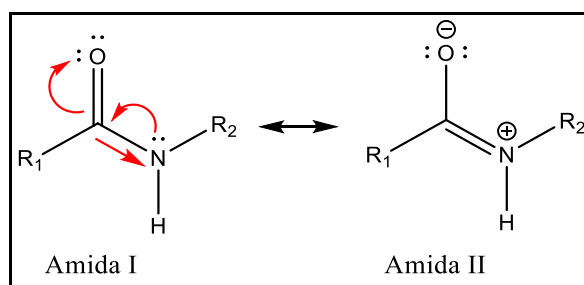
Fonte: do autor.

Os compostos da série **A** apresentam uma amida terciária ligada ao núcleo piperazínico e uma imida. Amidas apresentam uma banda forte do grupo C=O, sendo esta ligação mais fraca em relação a ligação C=O de cetonas devido ao efeito de ressonância envolvendo o par de elétrons não-ligantes do nitrogênio. Na **Figura 24** observa-se que o nitrogênio, além de retirar elétrons por efeito indutivo, doa elétrons por ressonância. Porém o efeito doador de elétrons do nitrogênio é mais significativo que o efeito indutivo retirador de elétrons, o que significa que o estiramento da ligação C=O de amidas ocorre em valor menor de número de ondas que o de cetonas (BARBOSA, 2007). No caso da ftalimida a faixa de absorção da ligação C=O esta entre 1770 e 1700 cm^{-1} . Estes valores correspondem aos observados nos compostos da série **A**.

Nos espectros de IV a absorção devida ao estiramento de ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ aparece entre 3100 e 3000 cm^{-1} e as bandas associadas a ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ (alcanos e grupos alquila) absorvem entre 3000 e 2850 cm^{-1} , bandas identificadas em todos os espectros. As vibrações de estiramento C=C de compostos aromáticos ocorrem na região de 1625-1440 cm^{-1} , nesta

série observa-se duas bandas características de estiramento C=C aromático em 1593 e 1512 cm^{-1} .

Figura 24. Estruturas de ressonância das amidas. Efeitos retirador e doador de elétrons.



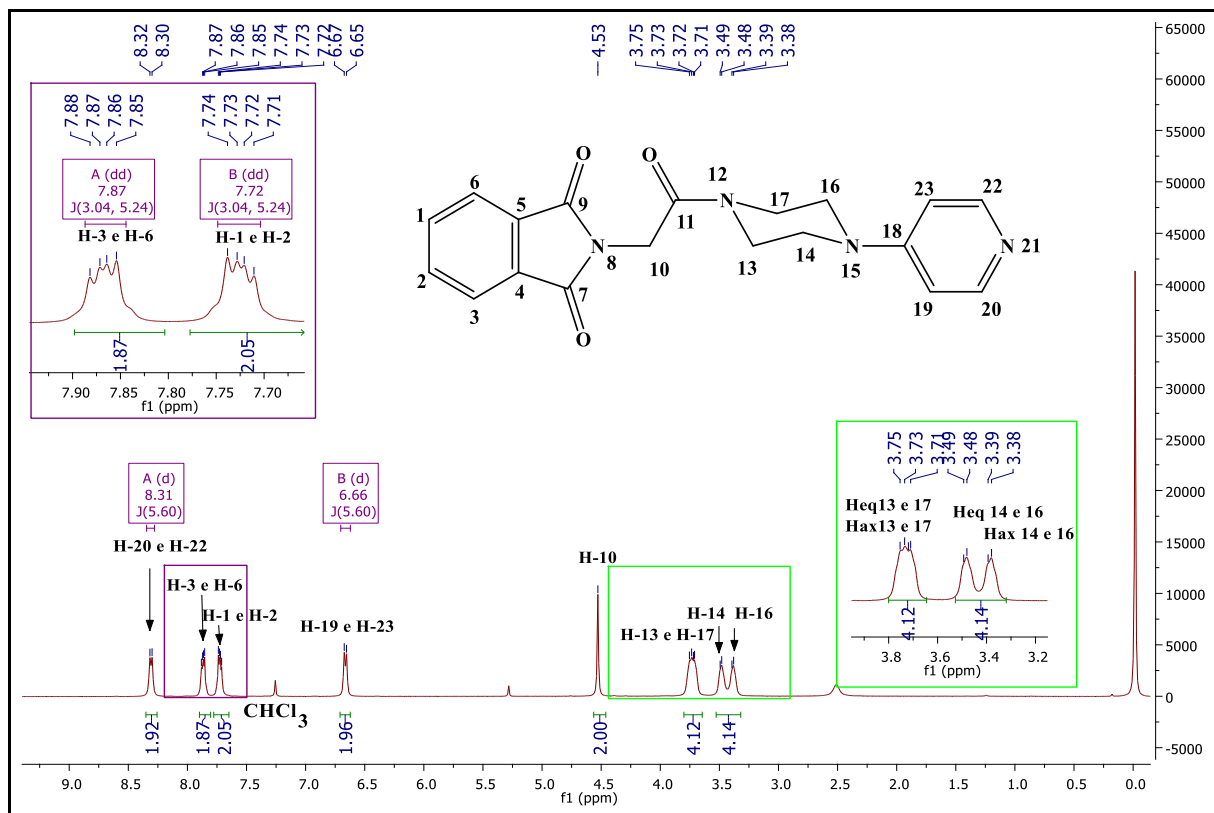
Fonte: Esquema modificado de (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 25**) do composto PQM-189 (**24g**) observa-se 2 conjuntos de sinais referentes aos hidrogênios do núcleo benzílico como duplo-dupletos em 7,87 ppm ($^4J_{\text{H}_3-\text{H}_1} = 3,04$ e $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 5,24$ Hz) e em 7,72 ppm ($^4J_{\text{H}_6-\text{H}_2} = 3,04$ e $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_1} = 5,24$ Hz). Os hidrogênios não equivalentes ligados ao anel benzênico interagem uns com outros para produzir diferentes padrões de separação (multiplicidade). Os dois pares de prótons equivalentes (H-3,6 e H-1,2) geram no espectro dois conjuntos de duplos-dupletos produto da interação a 3 e 4 ligações. A intensidade da interação entre os hidrogênios do anel depende da distância entre eles. Deste modo, os hidrogênios *orto* de nosso composto interagem com maior intensidade ($^3J = 5,2$ Hz) do que os hidrogênios *meta* ($^4J = 3,0$ Hz).

Observou-se dos conjuntos de dupletos resultado do acoplamento entre os hidrogênios *orto* e *meta* do núcleo piridínico com constantes de acoplamento $^3J_{\text{H}_{23}-\text{H}_{22}} = 5,60$ Hz, observados como 2 conjuntos de dupletos em 6,66 e 8,31 ppm (H-19, H-23 e H-20, H-22, respectivamente). Os hidrogênios (H-20 e H-22) são os mais desblindados do espectro devido ao efeito eletronegativo do nitrogênio núcleo piridínico. A conformação em cadeira deixa em ambientes químicos diferentes aos hidrogênios do núcleo da piperazina. Os hidrogênios mais desblindados são os equatoriais (Heq) e logo os axiais (Hax) próximos ao nitrogênio da ligação amida (H-13 e H-17), observados como multipletos entre 3,72 e

3,75 ppm. Seguidos pelos hidrogênios Heq-14 e Heq-16 e Hax-14 e Hax-16 entre 3,39 e 3,50 ppm. (**Anexo A**).

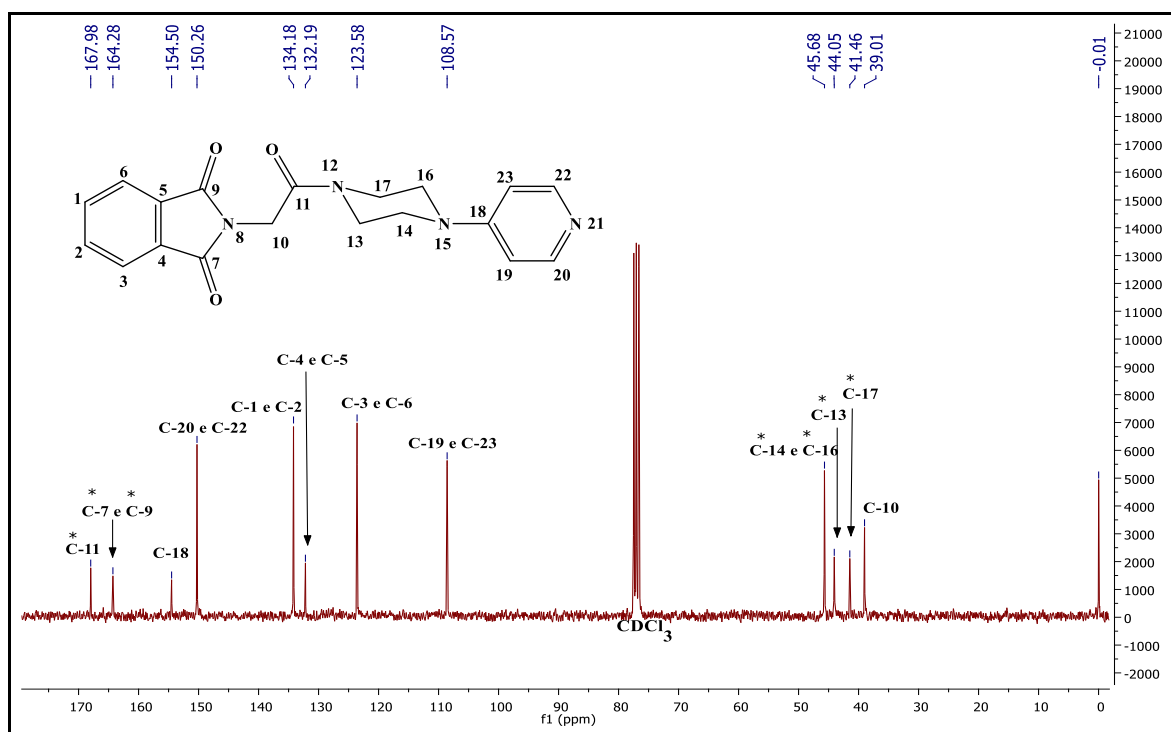
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto PQM-189 (**24g**).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 26**) observaram-se todos os sinais relativos aos 19 carbonos da estrutura de PQM-189 (**24g**): o carbono das três carbonilas em 167,9 ppm (C-11) e em 164,3 ppm (C-7 e C-9). Sinais em 134,2 ppm (C-1 e C-2), 132,2 ppm (C-4 e C-5) e 123,6 ppm (C-3 e C-6) referentes aos carbonos do anel aromático. Sinais em 150,3 ppm (C-20 e C-22) e 108,6 ppm (C-19 e C-23) referentes aos carbonos do anel piridínico. Além dos sinais em 45,7 ppm (C-14 e C16); 44,1 ppm (C-13) e 41,5 ppm (C-17), referentes aos carbonos da piperazina, os picos foram atribuídos com ajuda do mapa de correlação, HSQC (**Anexo A**).

Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto PQM -189 (**24g**).



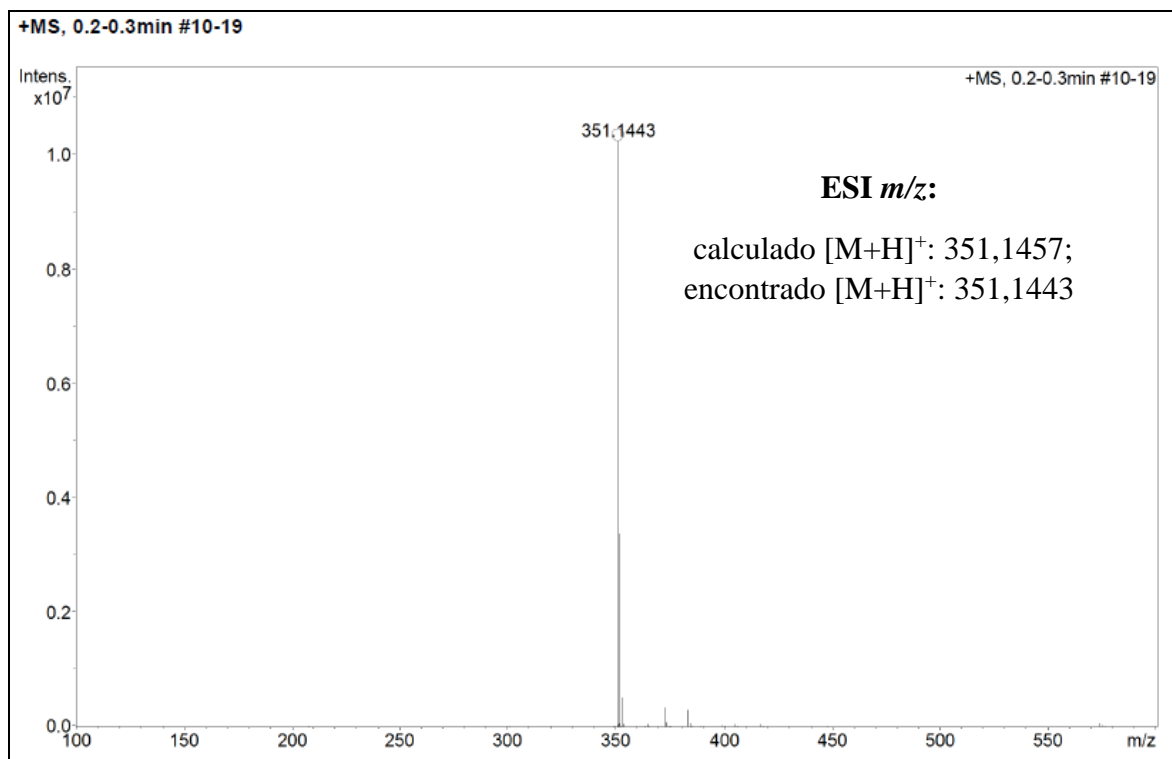
Fonte: do autor.

Nota: Nota: * sinais intercambiáveis

Os carbonos das carbonilas tem os maiores deslocamentos químicos pelo efeito exercido pelos átomos eletronegativos vizinhos (oxigênio e nitrogênio), seguidos pelos carbonos C-20 e C-22 mais desblindados devido ao efeito eletronegativo do nitrogênio da piridina.

Finalmente, no espectro de massas no modo positivo (**Figura 27**), observou-se o pico do íon *quasi*-molecular, $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação m/z de 351,1443, para um calculado de $[\text{M}+\text{H}]^+$: 351,1457. A análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e massas, nos confirmou a obtenção do produto chave PQM-189 (**24g**).

Figura 27 - Espectro de massas (ESI-MS) do composto PQM-189 (24g) (ESI-MS).



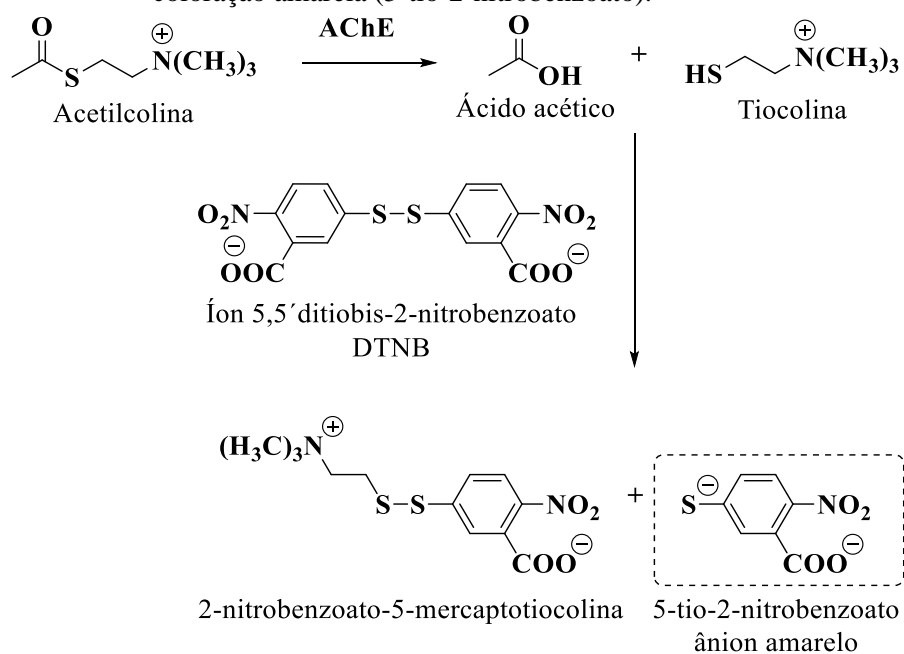
Fonte: Do autor

4.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS HÍBRIDOS DONEPEZIL-TALIDOMIDA

4.2.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro* (método modificado de Ellman).

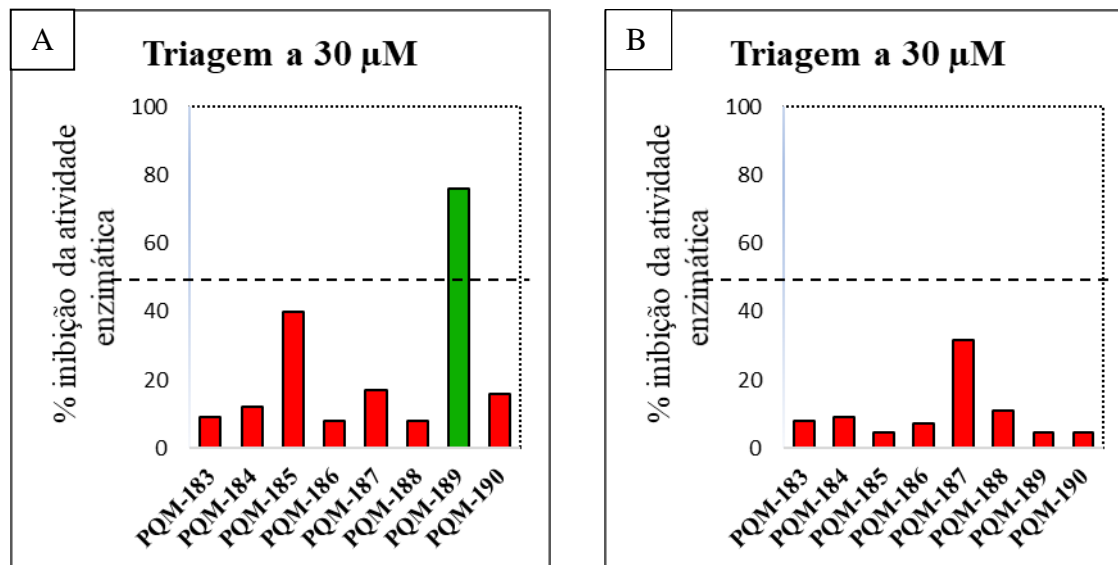
A superexpressão da acetilcolinesterase é uma das principais características na fisiopatologia da DA. A atividade anormal da AChE, responsável pela degradação da acetilcolina, leva à diminuição dos níveis deste neurotransmissor que tem papel importante na função cognitiva. Isto sugere que a terapia com inibidores de enzimas colinesterases pode melhorar os déficits cognitivos e de memória característicos da DA (KANDIAH *et al.*, 2017). Assim, os compostos desta série foram planejados como inibidores da AChE para o tratamento contra a DA. Uma vez sintetizados e caracterizados, os compostos foram submetidos a ensaios farmacológicos *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase purificada de *E. electricus* (Método A). A avaliação *in vitro* foi realizada para determinação da atividade inibitória, seletividade de inibição de AChE x BuChE, da potência (CI₅₀) de inibição, e finalmente foi realizado o estudo cinético.

Figura 28 - Reação entre a tiocolina e DTNB e formação do ânion de coloração amarela (5-tio-2-nitrobenzoato).



O método de Ellman é baseado na taxa de hidrólise da acetilcolina pela AChE dando origem à tiocolina, que reage com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), conhecido como reagente de Ellman, permitindo a quantificação de compostos de enxofre em tecidos celulares. Inicialmente, a enzima AChE hidrolisa o substrato acetilcolina resultando na formação de ácido acético e tiocolina. Esta última reage com o reagente DTNB dando origem a 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina e 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (Coloração amarela), que é quantificado espectrofotometricamente a 415 nm (**Figura 28**).

Figura 29 - (A) Triagem *in vitro* da atividade inibitória sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) e (B) sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-183 a PQM-190 (24a-h).



Fonte: Laboratório de Farmacologia Molecular UFRJ.

Preliminarmente, foi realizada uma triagem de todos os compostos sintetizados, no teste espectrofotométrico em uma concentração final de 30 µM. Os compostos PQM-183 (24a), PQM-184 (24b), PQM-185 (24c), PQM-186 (24d), PQM-187 (24e), PQM-188 (24f), apresentaram como uma suspensão fina. A triagem inicial foi realizada nessas condições, com soluções saturadas das substâncias e concentração real superestimada. A **Figura 29** apresenta os dados da análise *in vitro* da porcentagem de inibição sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) (**Figura 29, A**) e sob a enzima BuChE (**Figura 29, B**) em uma

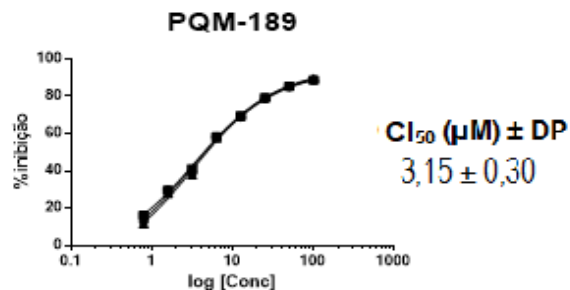
concentração de 30 μM . Como pode ser observado, a maioria das amostras apresentaram um percentual de inibição inferior a 50% nesta concentração, exceto PQM-189 (**24g**), que demonstrou inibição da atividade enzimática maior de 70% sob a AChE. Os compostos foram separados em faixas de inibição, a saber: Verde (inibição >70%) e vermelho (inibição <45%) para os demais compostos.

Finalmente, determinou-se a porcentagem de inibição sob a BuChE (**Figura 29 B**), dados que revelaram que nenhuma das amostras apresentaram percentual de inibição maior que 50% sob a BuChE nesta concentração e, logo, não foram selecionadas para realização de outros ensaios com BuChE. A partir dos resultados obtidos foi possível determinar que o composto PQM-189 (**24g**) é um inibidor seletivo para AChE, igual que seu padrão estrutural, o donepezil.

4.2.1.1 Determinação do CI_{50} frente a AChE

Na etapa seguinte, o único composto com percentual de inibição maior de 50%, PQM-189 (**24g**), foi submetido ao ensaio de dose-resposta para determinar a potência de inibição (CI_{50}). Os demais compostos apresentaram um percentual de inibição baixo (faixa vermelha), por este motivo não foram utilizados nos outros ensaios. A **Figura 30** representa o gráfico obtido das curvas de inibição de AChE da amostra PQM-189 (**24g**). A amostra foi avaliada em 7 concentrações entre 0,78125 e 100 μM . O composto analisado apresentou um valor de CI_{50} de 3,15 μM para a inibição da AChE. As curvas de porcentagem de inibição *versus* o logaritmo da concentração (μM) obtidas, apresentaram um padrão sigmoidal, característico da inibição enzimática do tipo dose-resposta.

Figura 30 - Resultado gráfico de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI_{50} para o composto PQM-189 (**24g**), o mais ativo frente à enzima acetilcolinesterase (AChE).

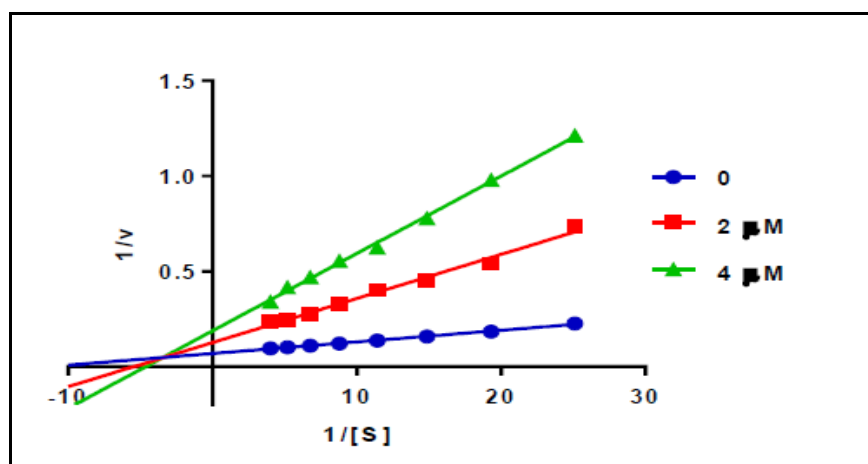


Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

4.2.1.2 Avaliação de Cinética Enzimática da Acetilcolinesterase

Nesta etapa, se determinou o mecanismo de inibição enzimática da AChE do composto PQM-189 (**24g**), em diferentes concentrações, cujos resultados levaram ao gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (**Figura 31**), usado como uma ferramenta para calcular os parâmetros cinéticos da enzima. Esta representação permite identificar $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) e K_m (constante de Michaelis-Menten) (LEHNINGER, 2014).

Figura 31 - Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto PQM-189 (**24g**).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).
Nota: V: velocidade e [S]: concentração do substrato.

A **Figura 31** representa o gráfico cinético relativo ao composto PQM-189 (**24g**) em duas concentrações diferentes, distribuídas em oito conjuntos de triplicatas. A análise do perfil destes gráficos permite caracterizar a natureza da inibição. Com base nos valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e do perfil do gráfico de Lineweaver–Burk, observou-se que o tipo de inibição promovida pelo composto testado é tipo mista, uma vez que há redução da $V_{m\acute{a}x}$ e aumento da K_m ao longo do aumento da concentração do inibidor. De maneira que o composto inibidor é capaz de se ligar tanto ao sítio catalítico da enzima (inibição competitiva) quanto ao sítio alostérico (inibição não-competitiva), atuando, assim, de duas maneiras diferentes. Desta forma, foram calculadas duas constantes de afinidade, sendo elas K_i (inibição competitiva) e K_i' (inibição não-competitiva), conforme pode ser observado nos dados da **Tabela 1**.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos de PQM-189 (**24g**) em AChE.

Concentração (μM)	$V_{m\acute{a}x} \pm \text{DP}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$K_m \pm \text{DP}$ (μM)	K_i (μM) $\pm \text{DP}^a$	K_i' (μM) $\pm \text{DP}^b$
0	$16,37 \pm 0,366$	$125,93 \pm 4,92$		
2	$8,37 \pm 0,428$	$156,00 \pm 10,75$	$0,72 \pm 0,007$	$1,68 \pm 0,020$
4	$7,30 \pm 0,215$	$253,70 \pm 11,9$		

Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Nota: $V_{m\acute{a}x}$: Velocidade máxima. K_m : constante de Michaelis-Menten; Dados obtidos \pm desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes. **a.** K_i : Constante de afinidade para inibição competitiva. **b.** K_i' : Constante de afinidade para inibição não-competitiva.

Analisando os resultados fica evidente que a substituição no anel benzílico causa um decréscimo significativo na atividade do que a substituição do anel benzílico por um pirimidínico PQM-185 (**24c**) ou por um piridínico PQM-189 (**24g**) exerce influência na atividade aumentando-a.

4.2.2 Estudo de *docking* molecular dos híbridos donepezil-talidomida

Na tentativa de compreender os resultados encontrados no ensaio de inibição *in vitro* da AChE foi realizado estudos de *docking* molecular com todos os compostos da série **A**. Esta análise molecular avalia os possíveis modos de ligação dos compostos sintetizados no sítio de ligação AChE através de estudos de ancoragem molecular. Devido às significativas mudanças conformacionais observadas no sítio aniônico periférico (PAS) (JOHNSON; MOORE, 2006), foram selecionadas três conformações representativas da AChE (LOPES, J. P. B. *et al.*, 2017), além da estrutura da AChE humana complexada com donepezil (CHEUNG *et al.*, 2012) (código PDB 4EY7). A estratégia de acoplamento consistiu na ancoragem dos compostos em cada conformação representativa do receptor, com o objetivo de considerar a flexibilidade da proteína. As estruturas selecionadas foram: 1ZGC (HAVIV *et al.*, 2005) (*Torpedo californica*), 2CKM (RYDBERG *et al.*, 2006) (*Torpedo californica*), 1Q84 (BOURNE *et al.*, 2004) (*Mus musculus*) e 4EY7 (CHEUNG *et al.*, 2012) (*Homo sapiens*). Os resultados de ancoramento para a série A e donepezil (referência) estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Scores de *docking*

Composto	<i>Docking Score</i>				<i>Ensemble Docking</i>	
	1ZGC	1Q84	2CKM	4EY7	Score	PDB ID
PQM-183 (24a)	-11,096	-12,989	-11,931	-16,632	-16,632	4EY7
PQM-184 (24b)	-9,557	-8,170	-7,027	-9,017	-9,557	1ZGC
PQM-185 (24c)	-8,705	-7,639	-6,520	-10,445	-10,445	4EY7
PQM-186 (24d)	-8,615	-8,832	-7,442	-9,076	-9,076	4EY7
PQM-187 (24e)	-7,494	-13,655	-12,110	-11,004	-13,655	1Q84
PQM-188 (24f)	-12,089	-11,918	-11,338	-16,833	-16,833	4EY7
PQM-189 (24g)	-10,921	-12,391	-7,438	-13,864	-13,864	4EY7
PQM-190 (24h)	-8,724	-9,297	-6,771	-8,453	-9,297	1Q84
Donepezil	-11.136	-10.064	-12.575	-17.941	-17.941	4EY7

Fonte: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC)

O estudo de *docking* foi realizado com o programa de *docking* molecular Glide (RICHARD A. FRIESNER *et al.*, 2006) no modo de precisão XP- Os valores mais

negativos indicam maior afinidade pela enzima. Foi selecionada a posição do ligante de acordo com a menor pontuação de XP entre todas as quatro conformações de AChE.

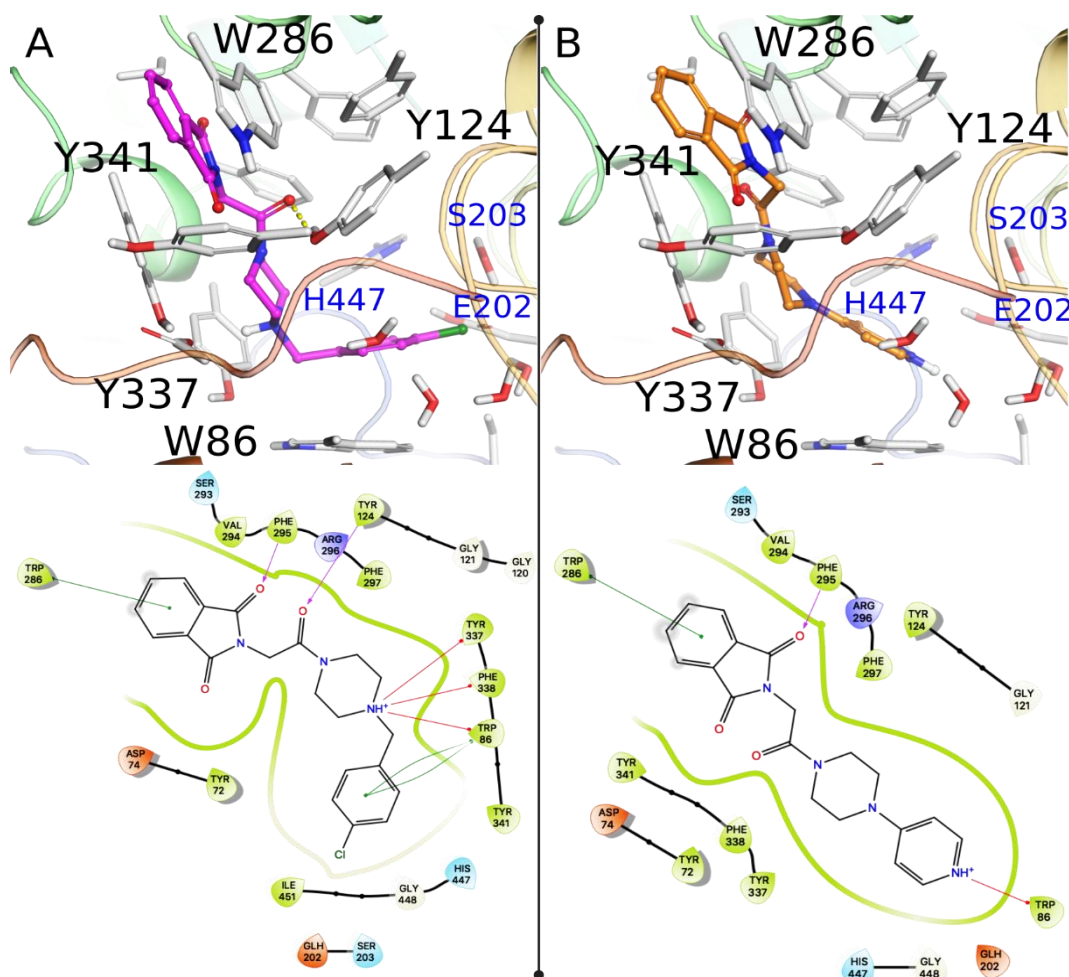
Em geral, os compostos da série A exibem um *score* de ancoragem mais favorável em relação à conformação 4EY7. Os três compostos que tiveram as melhores afinidades de ligação foram PQM-188 (**24f**) > PQM-183 (**24a**) > PQM-189 (**24g**), interagindo com o sítio de ligação da AChE em uma orientação similar (**Figura 32**): a subunidade de ftalimida está localizada na entrada do gargalo, enquanto o grupo fenila interage no fundo da cavidade. Nos três compostos, o grupo ftalimídico interage com Trp286 a partir do sítio aniônico periférico (PAS) através de uma interação de π -stacking e o oxigênio carbonílico faz uma ligação de hidrogênio com a cadeia principal Phe295 (NH). Em PQM-183 (**24a**) e PQM-188 (**24g**), a subunidade de piperazina interage através de interações cátion- π com os resíduos aromáticos Trp86, Tyr337 e Phe338 - similares àqueles observados para o grupo piperidínico do donepezil (**Figura 32, A**).

Uma vez que o PQM-183 (**24a**) e o PQM-188 (**24f**) diferem apenas no halogênio ligado ao anel fenílico (isto é, Br no PQM-183 (**24a**) e Cl no PQM-188 (**24f**)), exibem modos de ligação e *scores* de ancoragem muito semelhantes. O átomo de halogênio de ambos PQM-183 (**24a**) e PQM-188 (**24f**), está localizado próximo a uma molécula de água (Wat1), Ser203 e Glu202, mas nenhuma ligação de halogênio foi observada. O estudo sugeriu que o átomo de flour, sendo de menor tamanho poderia favorecer a ancoragem com a enzima aumentando a potência de inibição.

O PQM-189 (**24g**) é o terceiro composto com a melhor *score* de ancoragem (-13.864) foi quem demonstrou melhor atividade no ensaio *in vitro* de inibição sob AChE. A ausência de um grupo metileno entre os grupos piperazina e piridina reduziu o grau de flexibilidade deste composto e, provavelmente, afetou o pKa do átomo de nitrogênio do anel de piridina, que foi predito como positivamente carregado de acordo com Epik (software para predição do pKa de moléculas *drug-like* (SHELLEY *et al.*, 2007)). Devido a este estado de protonação, a piridina protonada foi capaz de realizar uma interação cátion- π com Trp86 na parte inferior da cavidade de ligação (**Figura 32, B**). Essa importante interação também é observada no substrato da ACh e em uma ampla variedade de inibidores potentes da ACh (CESCHI *et al.*, 2016; CHEN, Y. *et al.*, 2017; HAREL *et al.*, 1993). No entanto, o grupo piridina não é totalmente planar em relação ao Trp86 devido à perda de flexibilidade do

composto, o que pode levar a um efeito deletério sobre a afinidade de ligação deste composto. Isto sugere que a adição de um grupo metileno entre os grupos piperazina e piridina pode levar a um aumento da atividade devido a um aumento da flexibilidade, podendo interagir melhor com o resíduo de Trp86.

Figura 32 - Modos de ligação previstos para PQM-188 (**24f**) (A) e PQM-189 (**24g**) (B) na conformação 4EY7 da AChE.

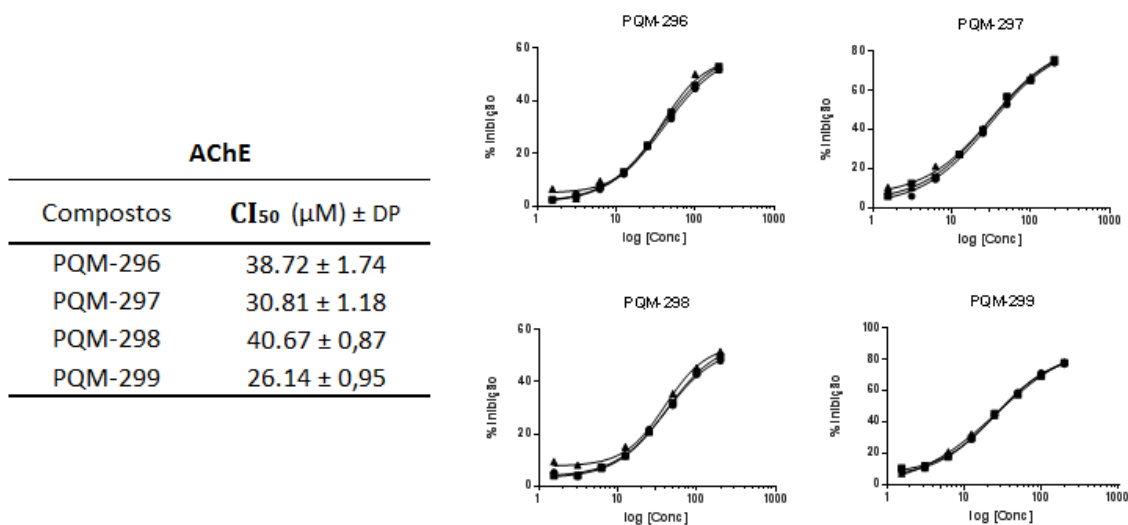


Fonte: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC).

Legenda: Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio ou interações de stacking com o ligante são marcados em pretos. Outros resíduos importantes são destacados em azul. As ligações de hidrogênio são representadas como traços amarelos na imagem 3D.

Segundo o estudo de *docking* molecular, substituintes como o flúor ou mesmo o derivado sem substituinte e o derivado PQM-189 (**24g**) possuindo um grupo metileno podem fornecer melhor afinidade com a enzima. Estes derivados foram sintetizados e testados *in vitro* frente a inibição da AChE. O derivado PQM-296 (**24i**) com flúor na posição *para* do anel, PQM-297 (**24j**) com flúor na posição *orto*, PQM-298 (**24k**) sem substituinte e, finalmente, PQM-299 (**24l**) com um grupo metileno entre a piperazina e a piridina visando aumentar a flexibilidade deste composto. Porém nenhum deles apresentou melhor perfil de inibição comparado com PQM-189 (**24g**) ($CI_{50} = 3,15 \mu M$). Os novos compostos analisados apresentaram valores de CI_{50} que variaram entre 26,14 e 40,67 μM para a inibição da AChE (**Figura 33**), sendo o mais ativo o composto PQM-299 (**24l**) ($CI_{50} = 26,14 \mu M$).

Figura 33 - Resultado gráfico de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI_{50} para os compostos PQM-296 a PQM-299 (**24i-l**) frente à enzima AChE.



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Os resultados obtidos experimentalmente sugerem que o nitrogênio na piperazina ao estar protonada no meio fisiológico é importante para a interação com o resíduo de Trp86 e que a presença de substituintes não permite esta interação observada também no donepezil. Adicionalmente, PQM-299 (**24l**) mesmo tendo o nitrogênio protonado para interagir com o

resíduo de Trp86 pode ser muito grande para entrar na cavidade da enzima ou ter adquirido outra conformação desfavorável para fornecer interações importantes. Por esse motivo, esses derivativos não foram levados em consideração para os demais testes da avaliação biológica.

Finalmente, os resultados de *docking* confirmaram que PQM-189 (**24g**) é um inibidor dual frente à AChE, apresentando conformação experimental semelhante à conformação observada no complexo AChE-donepezil, retendo a orientação original observada no donepezil. Este composto realiza importantes interações com os resíduos Trp86, Phe295 e Trp286. O estudo de *docking* molecular evidenciou que o fragmento da piridina protonada promove a interação necessária no sítio CAS essencial no processo inibitório enzimático da AChE.

4.2.3 Avaliação da citotoxicidade e elucidação da atividade antioxidante

Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à sua citotoxicidade utilizando o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) em linhagem celular SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) e em células VERO. Logo foi avaliada a atividade antioxidante frente a capacidade sequestrante do radical de DPPH e capacidade quelante de biometais.

4.2.3.1 Avaliação da neurotoxicidade *via* MTT

O método de MTT permite avaliar a viabilidade celular, com base em uma reação colorimétrica (MOSMANN, 1983). Neste primeiro teste com células SH-SY5Y, as 8 substâncias sintetizadas foram avaliadas nas concentrações de 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M e 2,5 μ M. Quando possível, foi calculado o valor de CI_{50} de toxicidade, quando não, foi expresso como maior que 80 μ M (>80). Nesta etapa verificou-se que os compostos não apresentaram toxicidade detectável na concentração máxima avaliada (80 μ M).

Posteriormente, avaliou-se a citotoxicidade do composto PQM-189 (**24g**) usando o método de MTT frente a linhagem celular VERO, células isoladas a partir do rim de macaco verde Africano adulto. As células VERO são homólogas às células do corpo humano e fáceis de serem cultivadas, além de serem amplamente utilizada para estudos de replicação de vírus (ROUROU; BEN ZAKKOUR; KALLEL, 2019), mas também tem sido usada em muitas outras aplicações, incluindo a avaliação dos efeitos de toxinas e outras substâncias químicas em células de mamíferos a nível molecular (AMMERMAN; BEIER-SEXTON; AZAD, 2008). As células VERO foram tratadas em triplicata com diversas concentrações da substância teste (1,4 μM – 1428 μM), começando por concentrações elevadas para determinar a concentração citotóxica da substância. O ensaio de citotoxicidade na linhagem celular VERO revelou toxicidade nas concentrações a partir de 480 μM , indicando baixa toxicidade de PQM-189 (**24g**).

4.2.3.2 Atividade sequestrante de DPPH

Para determinar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados foi usado o ensaio de DPPH descrito no numeral **4.4.3.2** na página **108**. Este ensaio mede a capacidade sequestrante do radical livre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos compostos. Os compostos são misturados com a solução de DPPH e após um período definido a absorbância é registrada. As substâncias sintetizadas foram avaliadas em concentrações diferentes (1,56 - 200 μM) em triplicata, e foram utilizados como padrões o ácido ascórbico e o trolox. Porém, nenhum dos compostos, híbridos donepezil-talidomida, apresentou atividade antioxidante neste ensaio, provavelmente devido à ausência de características estruturais favoráveis para exercer o efeito antioxidante como hidrogênios ácidos.

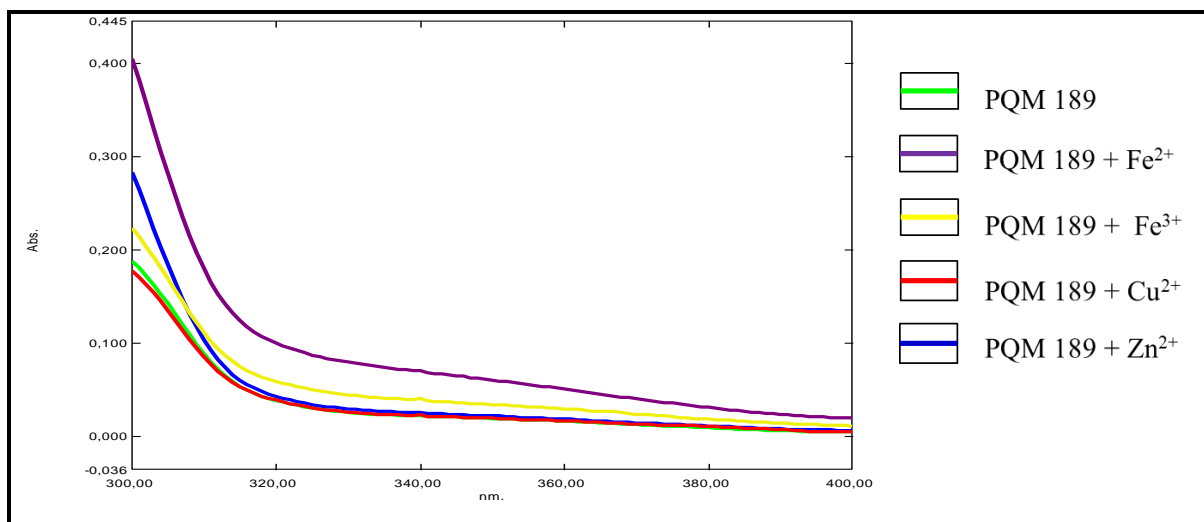
4.2.3.3 Propriedades quelantes de metais pró-oxidantes

Outra abordagem para tratar o estresse oxidativo derivado do acúmulo excessivo de metais no sistema nervoso é através de compostos quelantes que impedem a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e mantem o equilíbrio redox. Na doença de

Alzheimer os efeitos neuropatogênicos dos peptídeos β A amiloides são promovidos por interações metal- β A (CRISTÓVÃO; SANTOS; GOMES, 2016). Devido a isto, as diferentes abordagens terapêuticas visam atenuar interações anormais de metal- β A sem causar perturbação sistêmica de metais essenciais.

Nesta etapa foi avaliada a capacidade dos compostos PQM-183 a PQM-190 (**24a-h**) para quelar biometais como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} e determinada por espectroscopia de UV-VIS com comprimentos de onda variando de 200 a 500 nm, de acordo com a metodologia descrita por Chen (CHEN, S. Y. *et al.*, 2011) (**Anexo D**). Os compostos da série A exibiram um perfil similar, como exemplo será apresentado o PQM-189 (**24g**) (**Figura 34**). A análise dos resultados revelou que o composto PQM-189 (**24g**) apenas não conseguiu quelar o metal Cu^{2+} , os demais metais sim foram quelados. Essa quelação é verificada pela alteração de perfil do tipo hiperacrômico, com maior expressão para o metal Fe^{2+} , quando comparado com a amostra sozinha.

Figura 34 - Espectro no ultravioleta de absorvância de PQM-189 (**24g**).

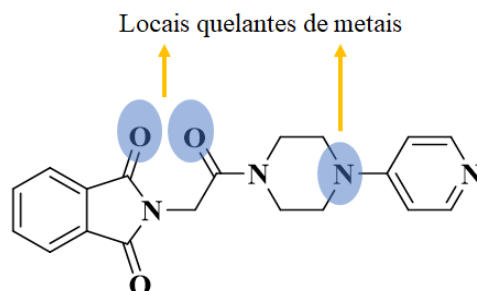


Fonte: do autor.

A série de híbridos donepezil-talidomida mesmo não tendo boa atividade antioxidante segundo o teste de DPPH, consegue quelar alguns biometais como Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} . Os pares de elétrons livres nas carbonilas e no nitrogênio do anel piperazínico presentes na estrutura dos compostos, podem fornecer locais quelantes para metais tóxicos

(Figura 35). Proporcionando efeitos benéficos na eliminação da carga corporal de metais pesados, portanto, revertendo as variáveis bioquímicas alteradas em DNs como a DA.

Figura 35 - Possíveis locais quelantes de metais de PQM-189 (**24g**).



Fonte: do autor.

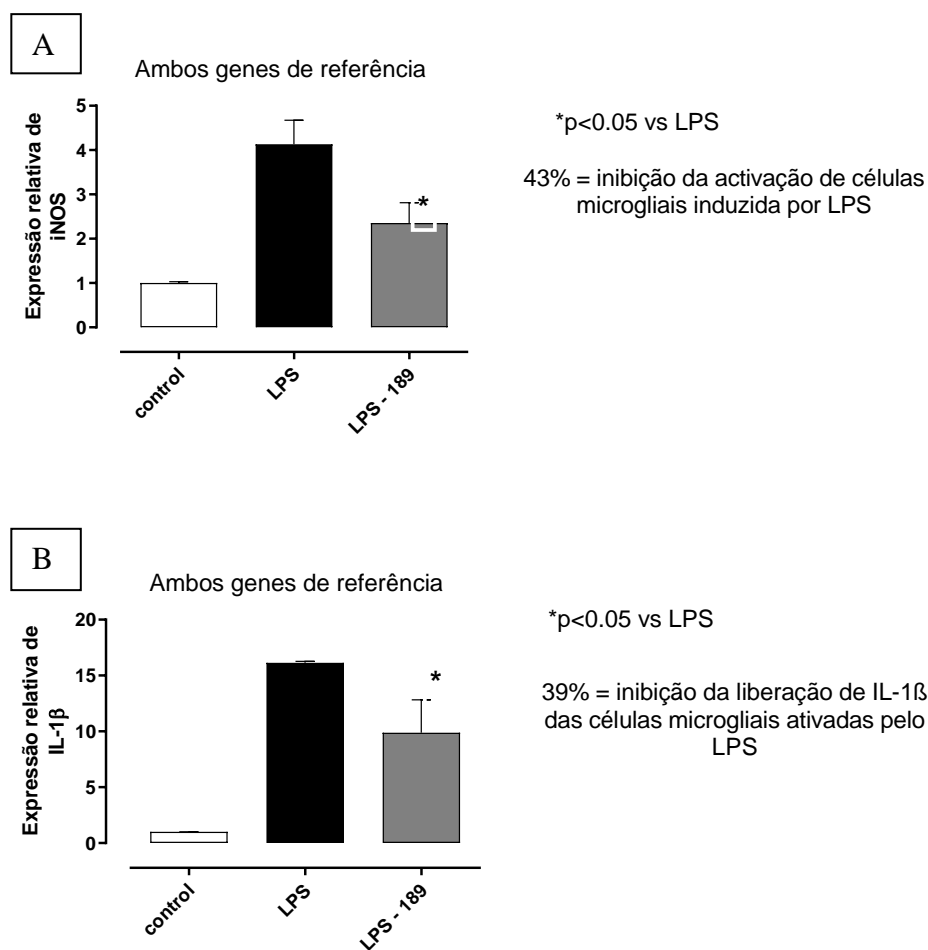
Finalmente, foi avaliada a atividade neuroprotetora frente a oligômeros β -amiloide de PQM-189 (**24g**) em duas concentrações diferentes (5 e 10 μ M), uma vez que os segregados proteicos levam a toxicidade e são responsáveis pela neuroinflamação, perda sináptica e, eventualmente, morte neuronal. Porém nenhuma atividade neuroprotetora foi observada nas concentrações avaliadas.

4.2.4 Avaliação do perfil anti-neuroinflamatório *in vitro* de PQM-189 (**24g**) pelo ensaio qRT-PCR

Nosso corpo fornece proteção frente agentes patógenos através da geração de óxido nítrico (NO) decorrente de um estímulo bacteriano. Neste processo, iNOS gera NO ativando a resposta imune através do mecanismo de defesa de macrófagos. No entanto, a superexpressão da iNOS aumenta os níveis de NO causando danos aos tecidos, e esse nível aumentado está implicado na fisiopatologia de doenças multifatoriais complexas como DP e DA. A inibição seletiva do iNOS é uma abordagem eficaz no tratamento de tais doenças complexas, impedindo a geração de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e tratando o processo inflamatório e o estresse oxidativo (MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2019). Por exemplo, a nitração da α -sinucleína e a nitrosilação de Parkina e tirosina contribuem para a

neurodegeneração (NAKAMURA; LIPTON, 2016). Adicionalmente, citosinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) aumentam a atividade da iNOS e estimulam a produção de NO (KIM, M. E. *et al.*, 2019; SOUFLI *et al.*, 2016)

Figura 36 - Inibição da expressão relativa de mediadores inflamatórios pelo composto PQM-189 (**24g**) induzidos por tratamento com LPS



Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

Legenda: **A**) Expressão relativa de iNOS e **B**) IL-1 β após 24h de incubação com LPS e PQM-189 (**24g**).

O composto PQM-189 (**24g**) foi avaliado numa concentração de 10 μ M frente à expressão de iNOS (marcador de ativação microglial) e IL-1 β (marcador de citocina pró-

inflamatória) induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em células THP-1 (linhagem celular monocítica de leucemia humana) na ausência ou presença do composto de teste e deste modo determinar sua capacidade de inibir a expressão RNA mensageiro (RNAm) (**Figura 36**). Para avaliar alterações na expressão gênica de mRNA destes mediadores inflamatórios foi empregada a reação quantitativa em cadeia da polimerase (qRT-PCR) e usou-se como genes de referência actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Estes controles internos são necessários para a normalização da expressão gênica, essencial na avaliação da expressão gênica relativa.

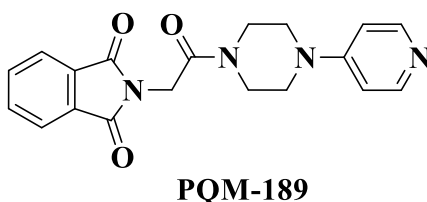
Os resultados obtidos mostraram que PQM-189 (**24g**) reduz 43% da ativação de células de tipo micróglial (**A**) e 39% da liberação de IL-1 β em células micrógliais (**B**) ativadas após 24h de incubação com LPS. Este resultado sugere que o composto pode tratar o processo inflamatório e o estresse oxidativo decorrente da super expressão de iNOS, portanto, do aumento de RNs, e regulando a liberação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β .

4.2.5 Predição das propriedades ADME

A predição das propriedades do ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) desempenha um papel importante no processo de planejamento dos fármacos, devido a que são responsáveis pelo insucesso de muitos dos fármacos nas fases clínicas. O comportamento das substâncias no organismo depende principalmente de sua estrutura química, influenciando nos parâmetros ADME, podendo ter uma relação indireta entre a estrutura e atividade biológica ou farmacológica, uma vez que a estrutura molecular influencia em todos os estágios farmacocinéticos. Os parâmetros farmacocinéticos de todos os híbridos sintetizados foram calculados juntamente com o composto padrão donepezil usando o programa QikProp (Schrödinger). Os principais parâmetros estudados para os diferentes compostos foram positivos na maioria dos casos e estão agrupados na **Tabela 3**.

A porcentagem prevista de absorção oral na maioria dos compostos sintetizados foi moderada, com uma porcentagem entre 66 e 89 % de absorção oral humana, e não superaram os valores observados no donepezil. Os compostos que satisfazem as regras de Lipinski são considerados como promissores ao desenvolvimento de fármacos, enquanto

compostos com menos (e, preferencialmente, nenhuma) violação da regra de três de Jorgensen são mais prováveis de serem disponíveis oralmente. A barreira hematoencefálica foi prevista utilizando a permeabilidade das células Caco-2 (QPPCaco) como modelo. A previsão da ligação da albumina de soro humano usando (QPlogKhsa), mostrou que os valores para todas as estruturas moleculares estão dentro do intervalo esperado. Da mesma forma, o coeficiente de partição cérebro/sangue (QPlogBB) e o valor de CI_{50} do bloqueio do canal HERG K^+ (QPlogHERG) mostram valores satisfatórios.



Concluindo, os resultados farmacológicos demonstraram a importância da subunidade *N*-benzilpiperazina e *N*-benzilpiperidina para promover as interações necessárias com a enzima AChE no processo inibitório e com destaque para PQM-189 (**24g**). Segundo o estudo de cinética enzimática, PQM-189 (**24g**) é um inibidor do tipo misto capaz de se ligar tanto ao sítio catalítico, quanto ao sítio alostérico da enzima. Observou-se que presença de substituintes no anel *N*-benzilpiperazínico influenciou negativamente na atividade inibitória, possivelmente, devido ao tamanho dos substituintes dificultando o ancoramento com a enzima. Adicionalmente, as propriedades quelantes de biometais PQM-189 (**24g**) pode ter um efeito neuroprotetor impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio decorrente da oxidação de metais.

Os resultados *in vitro* do perfil anti-neuroinflamatório sugerem que PQM-189 (**24g**) pode tratar o processo inflamatório decorrente da super expressão de iNOS e da regulação da liberação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , reduzindo 43% da ativação de células de tipo microglial e 39% da liberação de IL-1 β em células microgliais ativadas após 24h de tratamento com LPS. Os resultados *in vitro* em células de neuroblastoma humano e VERO indicaram que nosso composto líder apresenta baixa toxicidade. Finalmente, a análise conjunta dos dados obtidos revelou que PQM-189 (**24g**) é um composto promissor no tratamento anti-neuroinflamatório observados nas DNs como a DA.

Tabela 3 - Propriedades ADME previstas dos compostos sintetizados PQM-183 a PQM-190 e do composto padrão donepezil.

Composto	SNC ^a	QLogPo/w ^b	QLogS ^c	QLogHERG ^d	QPPCaco ^f	QLogBB ^g	QLogKhsa ^h	QPPMDCK ⁱ	QLogKp ^j	% Absorção oral humano ^k	Regra de 5	Regra de 3
PQM 183	1	2,12	-2,935	-5,602	129,396	-0,31	-0,443	240,718	-4,257	77,158	0	0
PQM 184	-1	2,41	-4,341	-4,782	469,669	-0,847	-0,253	311,285	-2,566	88,877	0	0
PQM 185	-2	1,099	-2,858	-4,726	292,146	-1,036	-0,874	186,166	-2,893	77,51	0	0
PQM 186	0	2,588	-4,498	-4,783	469,746	-0,663	-0,299	767,407	-2,535	89,921	0	0
PQM 187	1	1,603	-2,212	-5,572	129,524	-0,561	-0,619	90,962	-4,185	74,139	0	0
PQM 188	1	2,04	-2,814	-5,573	129,467	-0,318	-0,469	223,94	-4,254	76,695	0	0
PQM 189	-2	1,077	-2,822	-4,66	254,221	-1,084	-0,864	160,269	-3,009	76,299	0	0
PQM 190	-2	1,345	-3,818	-4,831	55,586	-1,937	-0,518	30,981	-4,275	66,051	0	0
Donepezil	1	4,442	-4,626	-6,74	894,509	0,118	0,613	485,175	-2,921	100	0	0
Valores de Referência	-2 - +2	-2 ate 6.5	-6.5 to 0.5	abaixo -5	<25 baixo; >500 alto	-3 - 1.2	-1.5 - 1.5	<25 baixo, > 500 alto	-8.0 -- 1.0	>80%: alto <25%: pobre	max 4	max 3

Fonte: do programa QikProp (Schrödinger).

Nota: **a**: sistema nervoso central. **b**: Predição do coeficiente de partição octanol/água. **c**: Predição da solubilidade aquosa, log S. S em mol dm⁻³ é a concentração do soluto em uma solução saturada que está em equilíbrio com o sólido cristalino. **d**: Valor CI₅₀ previsto para bloqueio de canais HERG K⁺. **f**: Permeabilidade prevista das células Caco-2 em nm/seg. As células Caco-2 são um modelo da barreira sanguínea do intestino. As previsões do QikProp são para o transporte não ativo. **g**: Coeficiente de partição previsto para cérebro/sangue. Nota: As previsões de QikProp são para medicamentos administrados por via oral, de modo que, por exemplo, a dopamina e a serotonina são negativas para o SNC porque são muito polares para atravessar a barreira hematoencefálica. **h**: Predição da ligação à albumina sérica humana. **i**: Permeabilidade aparente de células MDCK em nm/seg. As células MDCK são consideradas um bom mimetizador da barreira hematoencefálica. As previsões do QikProp são para transporte não ativo. **j**: Permeabilidade prevista da pele, log Kp. **k**: Absorção oral humana prevista em escala de 0 a 100%.

PARTE 2: DERIVADOS CINAMOIL-*N*-ACILIDRAZÔNICOS (SÉRIE B).

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA SÉRIE B

Foram sintetizados 18 compostos, racionalmente planejados a partir da estrutura da curcumina (2). Os resultados químicos obtidos nesta etapa do trabalho serão discutidos adiante assim como a caracterização por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de Massas do principal representante desta série molecular e finalmente será abordado a avaliação farmacológica para determinar o perfil anticolinesterásico, antioxidante, e neuroprotetor para o tratamento da DA e da DP das substâncias sintetizadas.

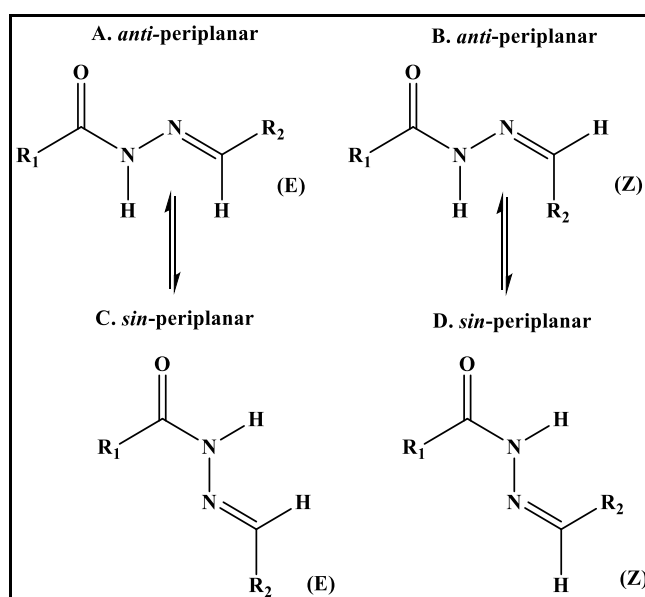
4.3.1 Derivados cinamoil-*N*-acilidrazônicos (CNA)

Os derivados cinamoil-*N*-acilidrazônicos (CNA) são estruturas moleculares capazes de fornecer ligantes úteis para mais de um tipo de receptor ou alvo de enzima por modificações estruturais. Esses compostos foram definidos como estruturas privilegiadas, conceito usado anteriormente por Duarte e colaboradores (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007) para descrever o potencial biológico de derivados CNA como novos candidatos a fármacos com diferentes perfis farmacológicos (CARVALHO *et al.*, 2012; FRAGA; BARREIRO, 2006). A série foi planejada como uma continuação de um trabalho previamente publicado por nosso laboratório sobre derivados ferúlicos. Este trabalho permitiu a obtenção de um inibidor da AChE ($\text{CI}_{50} = 0,46 \mu\text{M}$) e neuroprotetor (DIAS *et al.*, 2017). Considerando o sucesso alcançado e tendo em conta o caráter farmacofórico da subunidade cinamoil-*N*-acilidrazôna exercendo efeito auxofórico foram sintetizados novos derivados ferúlicos acoplados com diferentes aldeídos funcionalizados, visando à obtenção de compostos com perfil multialvo de interesse ao tratamento de doenças neurodegenerativas.

4.3.2 Isomerismo dos derivados CNA

De acordo com a literatura sobre derivados de CNA, estes compostos podem existir como estereoisômeros da dupla ligação C=N (*E/Z*) e como confôrmeros *sin*-periplanar (*sp*) e *anti*-periplanares (*ap*) sobre a ligação amida CO-NH (**Figura 37**) (LOPES, A. B. *et al.*, 2013). As acilidrazonas podem sofrer isomerismo devido à deslocalização de elétrons π por conta da presença do outro átomo de nitrogênio e as ligações NH podem formar interações de H que estabilizam e promovem a isomerização estrutural (BELSKAYA; DEHAEN; BAKULEV, 2010).

Figura 37 - Estereoquímica dos compostos CNA



Fonte: (LOPES, A. B. *et al.*, 2013)

A proporção dos estereoisômeros *E:Z* das acilidrazonas pode ser observada por RMN, contudo, somente em solventes específicos. Os sinais alusivos do isômero *Z* (esticamente mais impedido comparado com o isômero *E*) geralmente só é visualizado em CDCl₃ devido à estabilização através de ligações de hidrogênio intramolecular. Análises espectrométricas de RMN em CDCl₃ realizadas por pesquisadores em estruturas similares

mostrou sinais para cada uma das quatro possíveis moléculas, enquanto que a mesma análise em DMSO- d_6 mostrou apenas duas delas, as conformacionais (LOPES, A. B. *et al.*, 2013; PALLALL *et al.*, 1986). Neste último solvente, apenas o isômero *E* foi observado.

Por outro lado, a duplicidade dos sinais comumente achados nos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e NOESY tem sido atribuída por Lopes e colaboradores à presença de conformeros *sin/anti* periplanares em compostos benzil, alquil-acilidrazônicos (LOPES, A. B. *et al.*, 2013). Segundo o estudo de caracterização da ligação amida em conformeros de derivados CNA realizados por eles, nos determinamos que nossos compostos também estão classificados dentro destes isômeros (A e C, **Figura 37**).

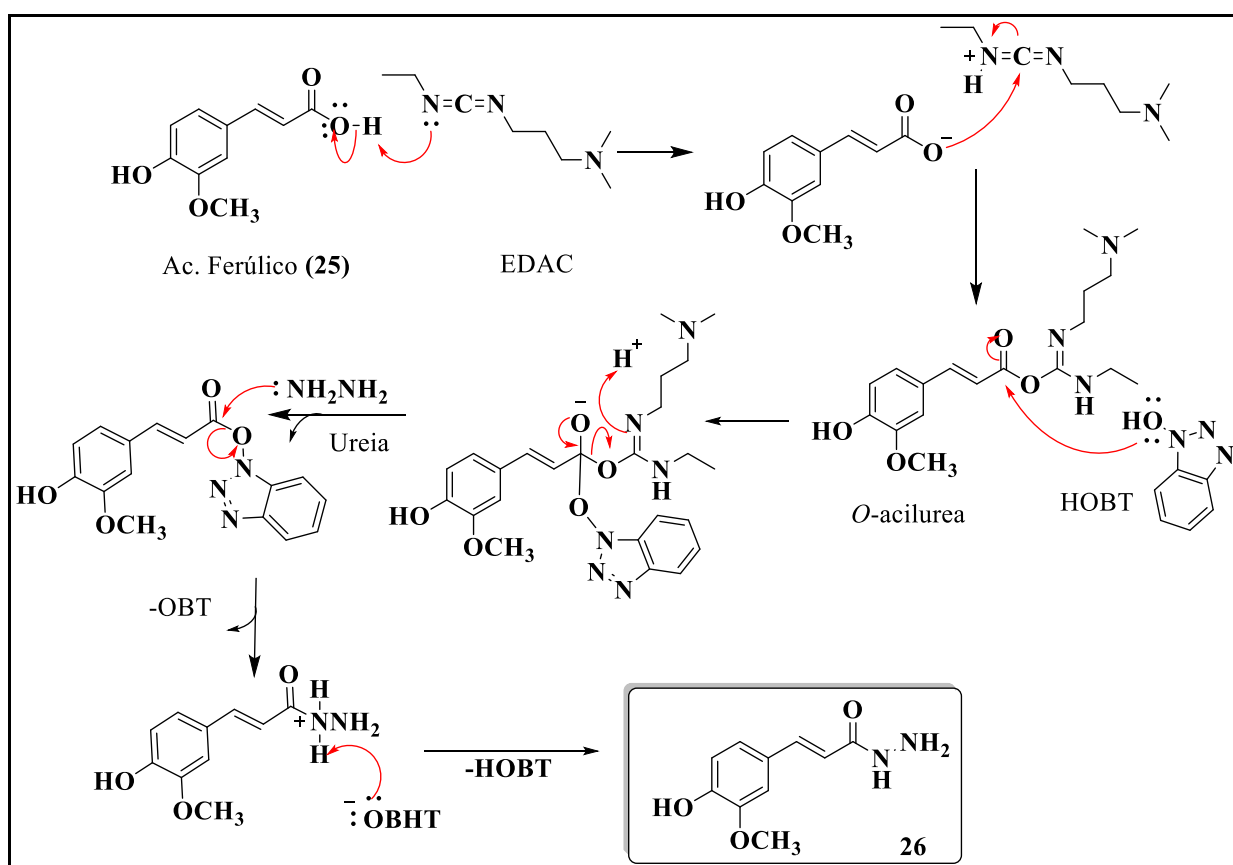
4.3.3 Síntese do intermediário hidrazídico 26a

Desta segunda série de compostos (série B) foram sintetizadas e testadas dezoito substâncias, PQM-211 (**28a**) a PQM-228 (**28r**), inspiradas na curcumina (**2**). A etapa inicial sintética foi a obtenção do intermediário hidrazídico **26a** a partir de ácido *trans*-ferúlico (**25**). Sabe-se que a formação de amidas e hidrazidas por condensação de aminas com ácidos carboxílicos na presença de carbodiimidas, como EDC [Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida], é útil na síntese de moléculas complexas, pois permite a ativação dos ácidos carboxílicos (JOULLIE; LASSEN, 2010). No entanto, para obter melhores rendimentos, são necessários aditivos tais como HOBT (hidroxibenzotriazol) durante o processo de formação de ligações carbono-nitrogênio (CHAN, L. C. *et al.*, 2007). HOBT é amplamente utilizado para a geração de ésteres ativos capazes de acilar eficientemente grupos amino.

Na **Figura 38** está representada a proposta de mecanística da formação do intermediário hidrazídico **26a**. A primeira etapa da síntese foi a obtenção do éster ativado de HOBT e ureia, a partir de ácido *trans*-ferúlico (**25**), HOBT e EDC em acetonitrila a temperatura ambiente. Esta ureia formada pode ser separada do produto por extração em fase aquosa. E por fim, ocorre uma reação de acilação empregando-se monodrato hidrazina em acetonitrila a 0°C e o produto-final é isolado por filtração simples, com sucesso e com rendimento de 85 - 95%. Uma vez obtida, a hidrazida **26a** foi então submetida ao

acoplamento com diferentes aldeídos funcionalizados (**27a-r**). Ésteres ativados tais como ésteres aromáticos são geralmente mais fáceis de hidrolisar do que ésteres alifáticos e são propensos a reagir com uma ampla gama de nucleófilos. Mais importante, eles reagem de forma limpa com aminas sob condições brandas. O aumento da eletrofilicidade do centro carbonílico, comparado com ésteres alifáticos, resulta do caráter retirador de elétrons do HOBT (MONTALBETTI; FALQUE, 2005).

Figura 38 - Proposta mecanística da formação do intermediário hidrazídico **26** a partir de HOBT e EDC.

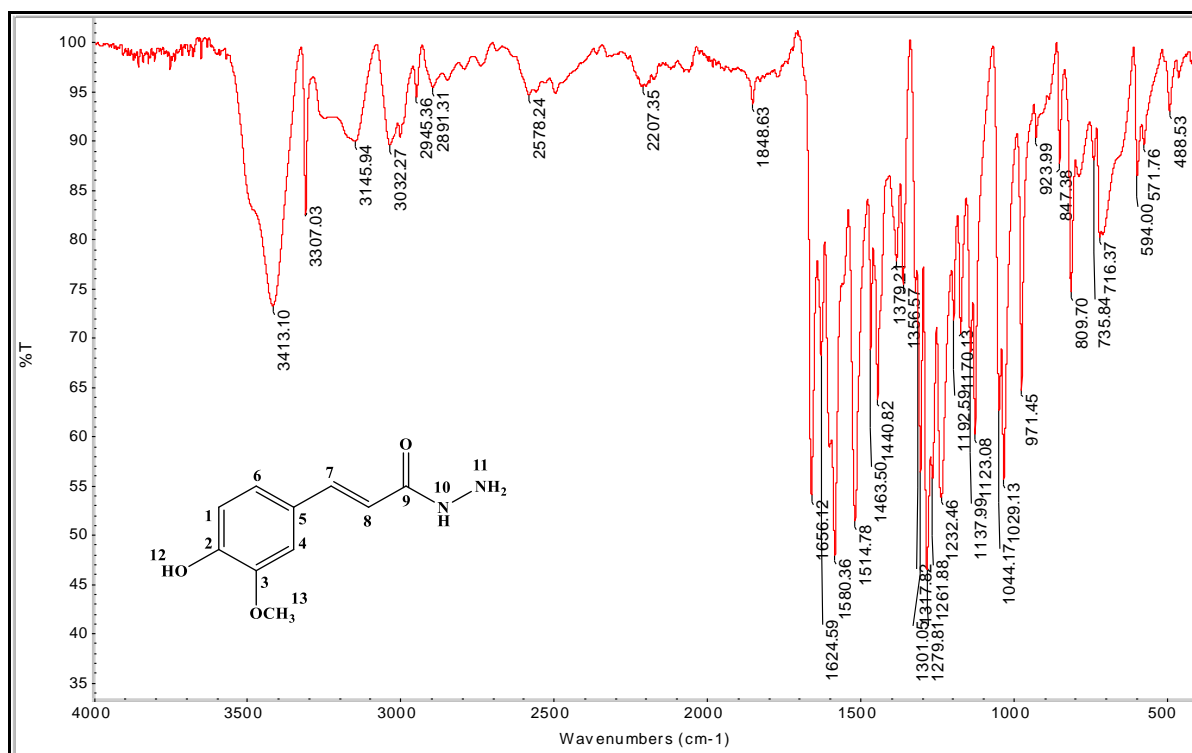


Fonte: Adaptado de (MONTALBETTI; FALQUE, 2005).

4.3.4 Caracterização do intermediário hidrazídico 26a

O composto hidrazídico **26a** foi caracterizado por análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C que confirmou a sua obtenção. No espectro, na região do infravermelho (**Figura 39**) foram observadas as principais bandas esperadas para a estrutura proposta **26**. Sendo, a banda de estiramento de O-H em 3413 cm^{-1} , banda de estiramento N-H de amida secundária em 3307 cm^{-1} , duas bandas de estiramento de N-H de aminas primarias entre 3145 cm^{-1} , estiramento de $\text{C}_{\text{sp}2}$ em 3032 cm^{-1} , estiramento de $\text{C}_{\text{sp}3}$ em 2945 cm^{-1} , estiramento de C=O de amida em 1656 cm^{-1} , deformação angular N-H em 1580 cm^{-1} , estiramento da ligação C=C aromática em 1514 cm^{-1} , bandas de estiramento assimétrico da ligação Ar-O- CH_3 em 1279 cm^{-1} e 1044 cm^{-1} .

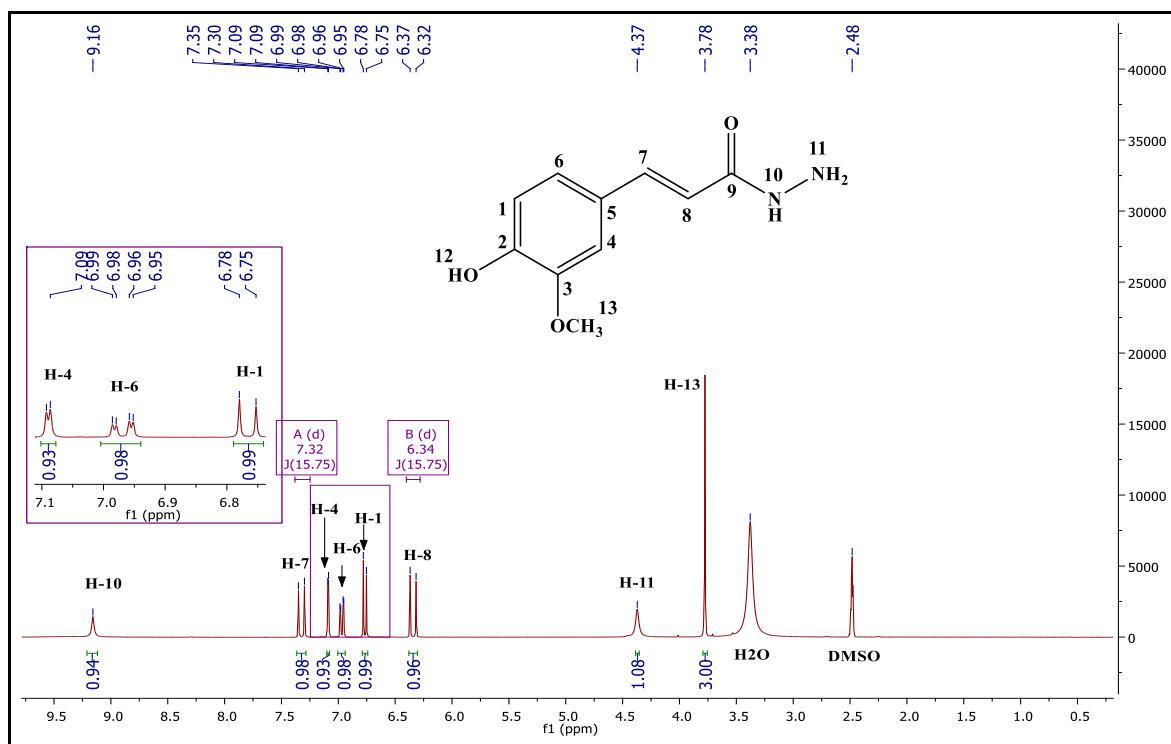
Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV do composto intermediário **26a** (ATR).



Fonte: do autor.

As hidroxilas fenólicas apresentam no espectro IV bandas largas de estiramento O-H em 3600 cm^{-1} . Porém, o fragmento fenólico tem um substituinte metoxílico na posição *orto* em relação à hidroxila que permite a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares diminuindo a intensidade da banda e deslocando-a para uma frequência mais baixa aproximadamente em 3400 cm^{-1} . Ocasionalmente, a banda pode ser larga e fraca, de difícil observação como acontece com alguns dos compostos desta série (**Anexo A**). As amins primárias apresentam duas bandas de intensidade média-fraca, que correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação N-H do grupo NH_2 em 3142 cm^{-1} . Em amidas secundárias se visualiza uma banda de absorção de estiramento de ligações N-H da forma *trans* em fase sólida entre 3270 e 3370 cm^{-1} , como se observa no espectro. Além disso, a ligação $\text{C}=\text{O}$ da amida fica enfraquecida devido ao efeito que tem insaturações conjugadas à carbonila na região entre 1680 e 1630 cm^{-1} , frequência de absorção menor da comumente observada.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto intermediário **26a**.

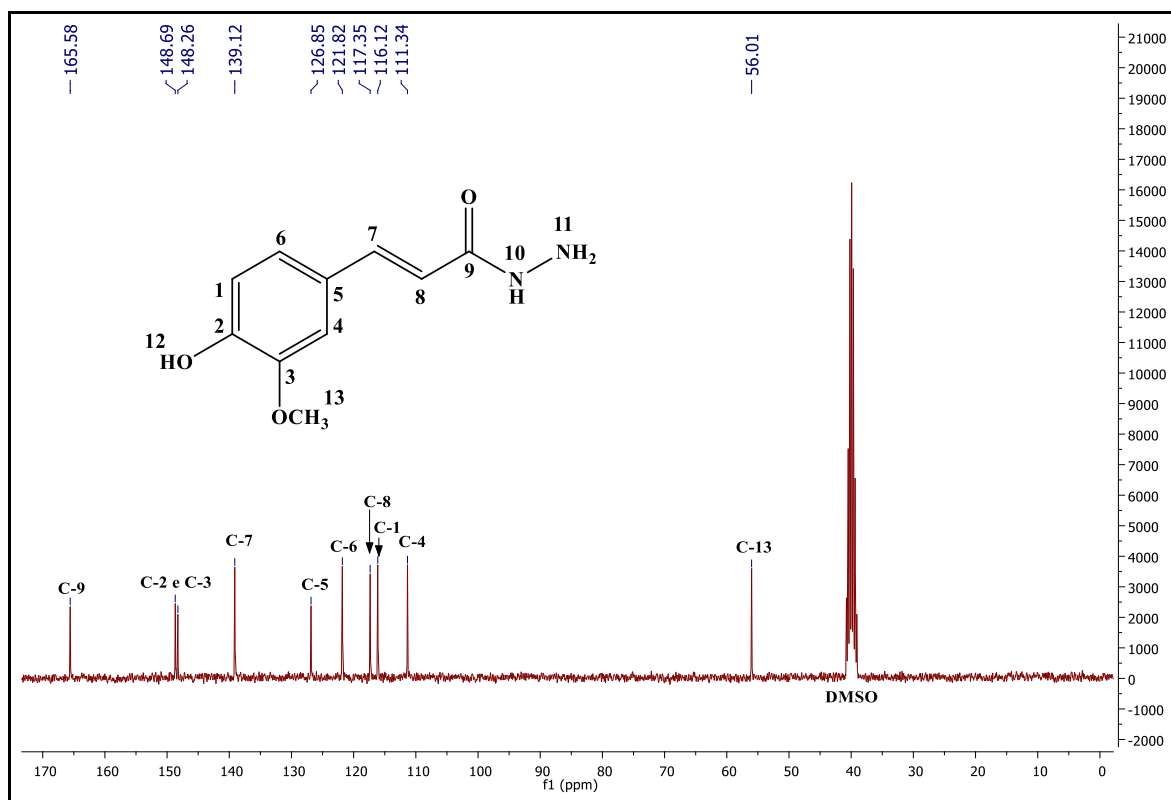


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 40**) observa-se um simpleto em 3,78 ppm, referente aos hidrogênios da metoxila (H-13), além dos dupletos em 6,34 ppm ($^3J_{\text{H8-H7}} = 15,75$ Hz) e 7,32 ppm ($^3J_{\text{H7-H8}} = 15,75$ Hz), referentes aos hidrogênios $\alpha\beta$ carbonílicos. Também foram identificados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (H-1 e H-4) como dupletos em 6,77 ppm ($^3J_{\text{H6-H1}} = 8,13$ Hz) e 7,09 ppm ($^4J_{\text{H6-H4}} = 1,89$ Hz) e um conjunto de duplo-dupletos referente a H-6 em 6,97 ppm ($^4J_{\text{H6-H4}} = 1,89$ Hz e $^3J_{\text{H6-H1}} = 8,13$ Hz) (**Anexo A**).

Empregou-se $\text{DMSO-}d_6$ para permitir a observação dos hidrogênios ligados no nitrogênio e confirmar a obtenção do intermediário chave, pois em outros solventes não foi possível observá-los. Os hidrogênios ligados a um nitrogênio amida têm deslocamentos químicos variáveis, pois muitas vezes o valor depende do solvente e da concentração e da temperatura. Os picos destes hidrogênios são largos e fracos, H-10 normalmente está em 9 ppm, enquanto H-11 está aproximadamente em 4 ppm.

Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto intermediário **26a**.



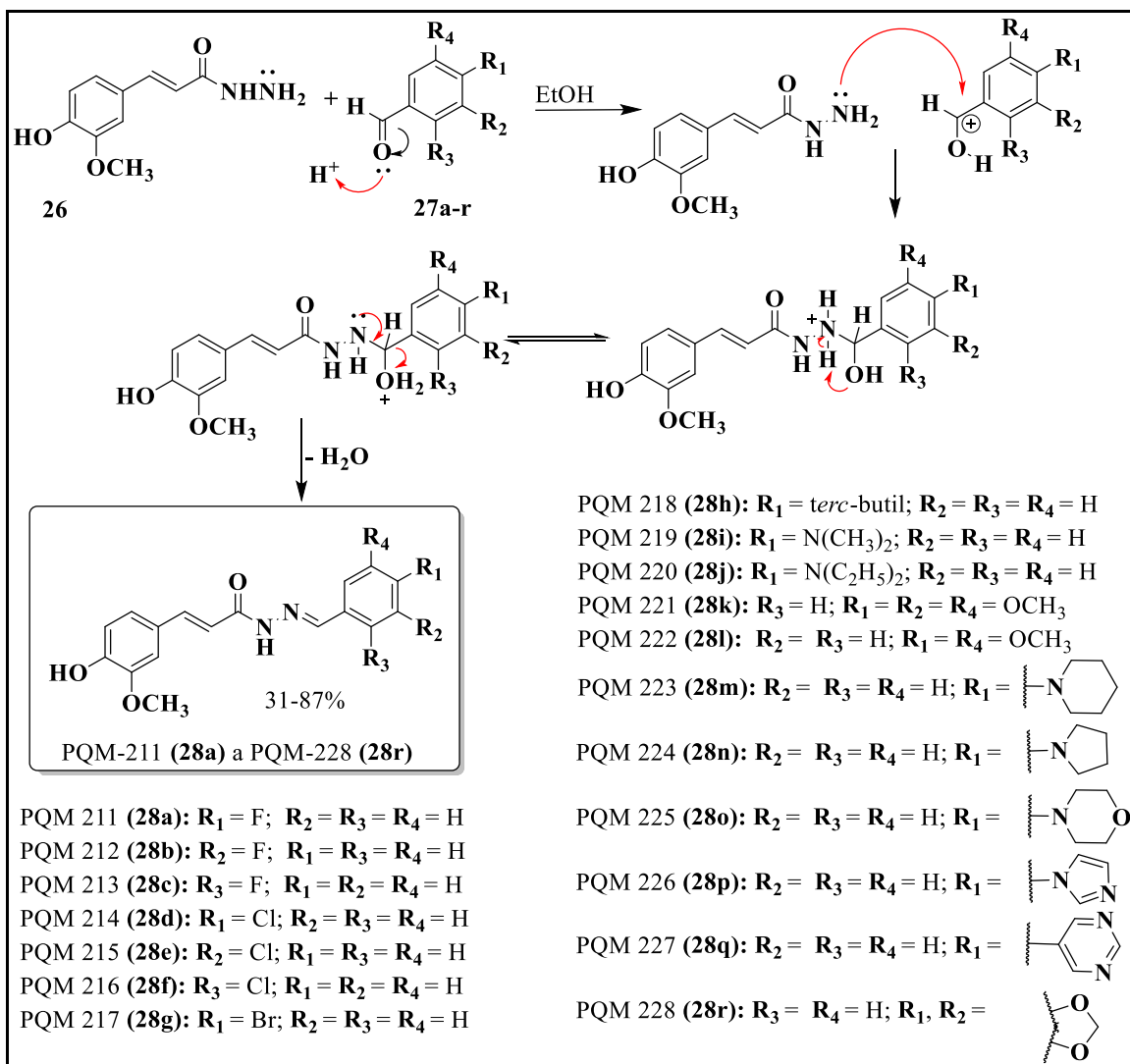
Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 41**) observaram-se todos os sinais relativos aos 10 carbonos da estrutura do composto **26a**: o carbono do grupo metoxila em 56,0 ppm (C-13). Em 165,6 ppm foi identificado o sinal referente ao carbono carbonílico de hidrazida (C-9), os sinais em 148,7 ppm (C-2); 148,3 ppm (C-3); 126,9 ppm (C-5); 121,8 ppm (C-6) e 111,5 ppm (C-4) referentes aos carbonos do anel aromático e os sinais em 139,1 ppm (C-7) e 117,4 ppm (C-8), referentes aos carbonos da insaturação $\alpha\beta$ carbonílica. Os sinais foram atribuídos com ajuda do mapa de correlação, HSQC (**Anexo A**).

4.3.5 Obtenção dos derivados CNA

Os novos compostos são derivados do ácido ferúlico (**25**) e acoplados a diferentes aldeídos funcionalizados (**27a-r**) através de um espaçador acilidrazônico após da obtenção do intermediário **26a**. Sintetizou-se sete derivados PQM-211 a PQM-217 (**28a-g**) usando cloro e flúor nas posições *orto*, *meta* e *para*, e bromo na posição *para* do anel aromático. Adicionalmente, onze compostos (PQM-218 a PQM-228 (**28h-r**)) foram sintetizados usando diferentes substituintes como *tert*-butila, dimetilamina, dietilamina, 3,4-dimetoxila, 3,4,5-trimetoxila e diferentes ciclos contendo heteroátomos. Esta variação poderia ser importante para avaliar a relação estrutura-atividade e a contribuição farmacofórica destes substituintes, além de sua influência na reatividade e consequente facilidade de obtenção e purificação. Na **Figura 42** está representada a proposta de mecanismo para este tipo de reação.

Figura 42 - Proposta de mecanismo da formação dos derivados cinamoil-*N*-acilidrazona: acoplamento do intermediário **26a** e diferentes aldeídos funcionalizados (**27a-r**).



Fonte: do autor.

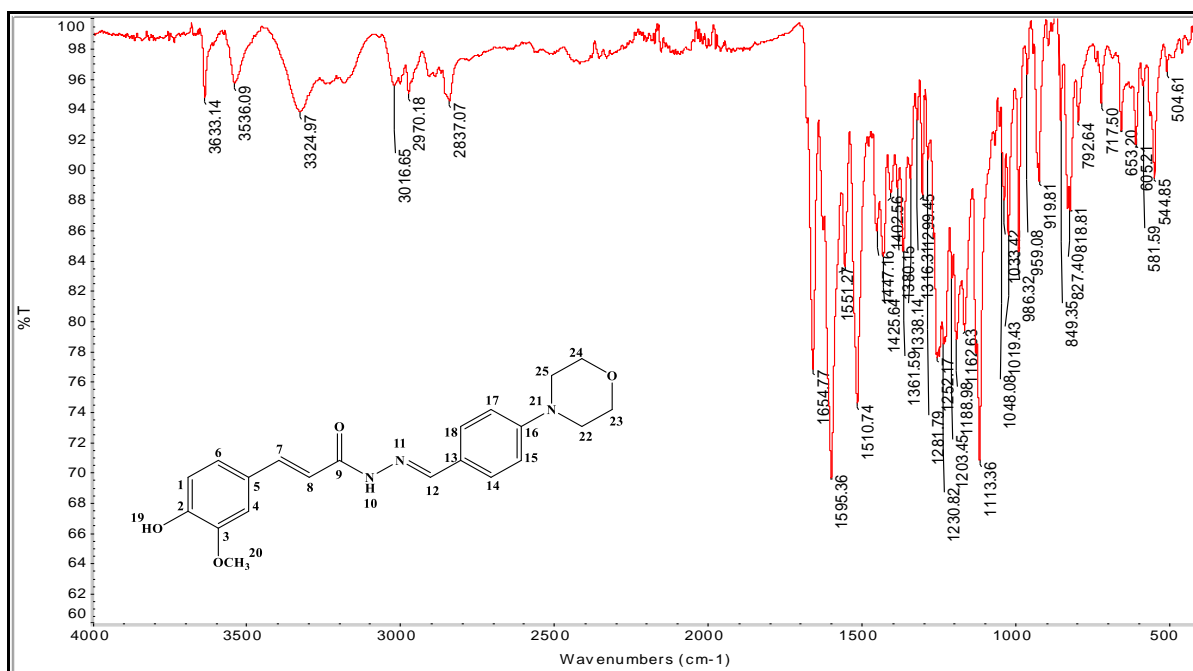
4.3.6 Caracterização dos derivados CNA (série B)

A análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de 1H e RMN de ^{13}C nos confirmou a obtenção dos produtos PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**) (Anexo A e B). Como exemplo de caracterização estrutural para essa série de compostos, será apresentada aqui a caracterização do composto PQM-225 (**28o**). Este derivado foi caracterizado pela análise

dos seus espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , infravermelho e EM (espectrometria de massas).

O espectro na região do infravermelho (**Figura 43**) da substância PQM-225 (**28o**) apresenta estiramento N-H em 3324 cm^{-1} , estiramento $\text{C}_{\text{sp}2}$ em 3016 cm^{-1} , estiramento de $\text{C}_{\text{sp}3}$ em 2970 cm^{-1} , estiramento de $\text{C}=\text{O}$ de acilidrazôna em 1654 cm^{-1} , banda de estiramento $\text{C}=\text{C}$ de compostos carbonílicos $\alpha\beta$ insaturados em 1596 cm^{-1} , estiramento $\text{C}=\text{C}$ aromático em 1510 cm^{-1} . A hidroxila fenólica tem um substituinte metoxílico na posição *orto* que pode influir na diminuição da intensidade da banda em 3500 cm^{-1} e dificultando sua observação, devido à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, como foi descrito no espectro de IV do intermediário **26a**. A ausência da banda dupla entorno característica de aminas primárias corrobora o acoplamento da hidrazida de partida.

Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto PQM-225 (**28o**) (ATR).

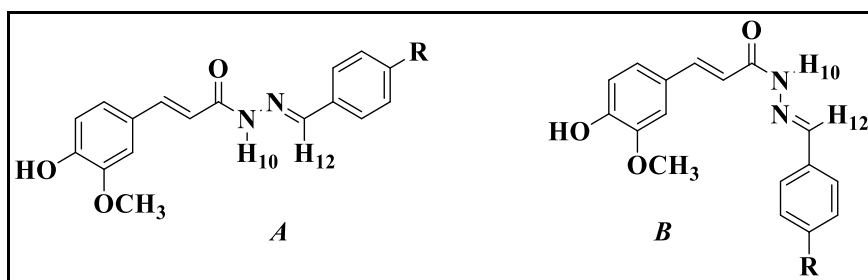


Fonte: do autor.

Como foi relatado anteriormente (4.3.2 isomerismo dos derivados CNA, pag. 87), em análises espectrométricas de RMN dos compostos acilidrazônicos em $\text{DMSO}-d_6$, é possível

observar apenas o isômero *E* nas conformações *sin* e *anti* periplanar (**Figura 44**). A duplicidade dos sinais achados nos derivados acilidrazônicos, tanto nos espectros de RMN de ^1H , como nos espectros de RMN de ^{13}C confirmam a presença dos confôrmeros *sin/anti* periplanar (*sp/ap*) sobre a ligação amida (CO-NH). O sinal mais desblindado de N=CH corresponde ao confôrmero *ap*, baseado no trabalho de Palla em que o sinal mais desblindado foi atribuído ao hidrogênio da imina do confôrmero *ap* em DMSO- d_6 e em CDCl_3 (PALLALL *et al.*, 1986). Porém, neste trabalho se deu prioridade à intensidade dos sinais, sendo o sinal mais intenso do confôrmeros mais estável *ap*.

Figura 44 - Isômeros *E*: *anti*-periplanar (A) e *sin*-periplanar (B).

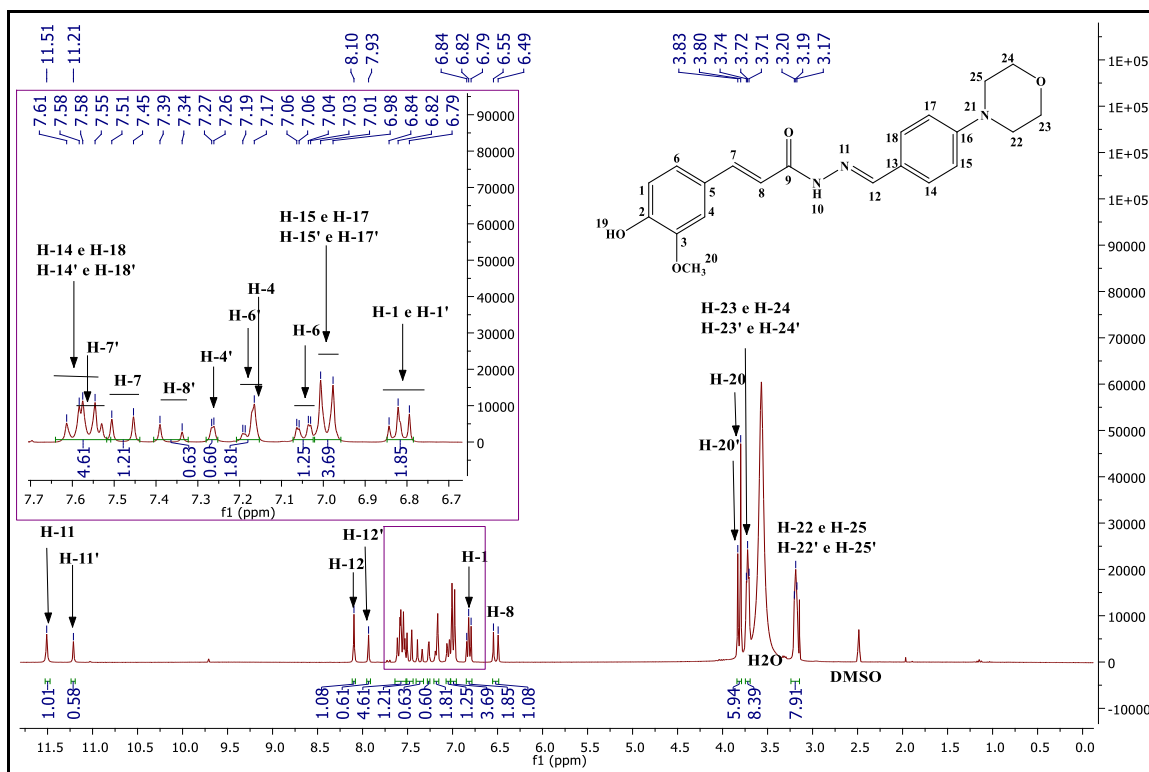


Fonte: do autor

No espectro de RMN de ^1H do composto PQM-225 (**28o**) (**Figura 45**), foi possível notar a presença da mistura de dois isômeros (*sp* e *ap*), todos os sinais do espectro estão dobrados e quando coincidiu o mesmo deslocamento, a integral correspondeu ao dobro do número de hidrogênios esperados, confirmando a presença das duas conformações (**Figura 44**). No campo alto do espectro observou-se dois simpletos em 11,51 e 11,21 ppm alusivos ao hidrogênio hidrazídico (H10 e H10') dos rotâmeros *ap* e *sp*, respectivamente. Seguidos pelos simpletos em 8,10 e 7,93 ppm referentes ao hidrogênio da ligação N=CH (H12 e H12') de cada isômero *ap/sp*, pico característico que confirma a formação da acilidrazona desejada. Além disso, observou-se dois dupletos referentes a cada um dos hidrogênios da $\alpha\beta$ instauração (H7' e H8') em 7,56 e 7,36 ppm ($^3J_{H7'-H8'}=15,69$ Hz), respectivamente, alusivos ao rotâmero *sp*. Finalmente, dois dupletos em 7,48 e 6,52 ppm ($^3J_{H7-H8}=15,66$ Hz) referentes a cada um dos hidrogênios da $\alpha\beta$ instauração (H7 e H8) do rotâmero *ap*.

Finalmente, os demais sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático da estrutura de PQM-225 (**28o**) podem ser observados nos anexos deste trabalho (**Anexo A**).

Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do PQM-225 (**28o**).

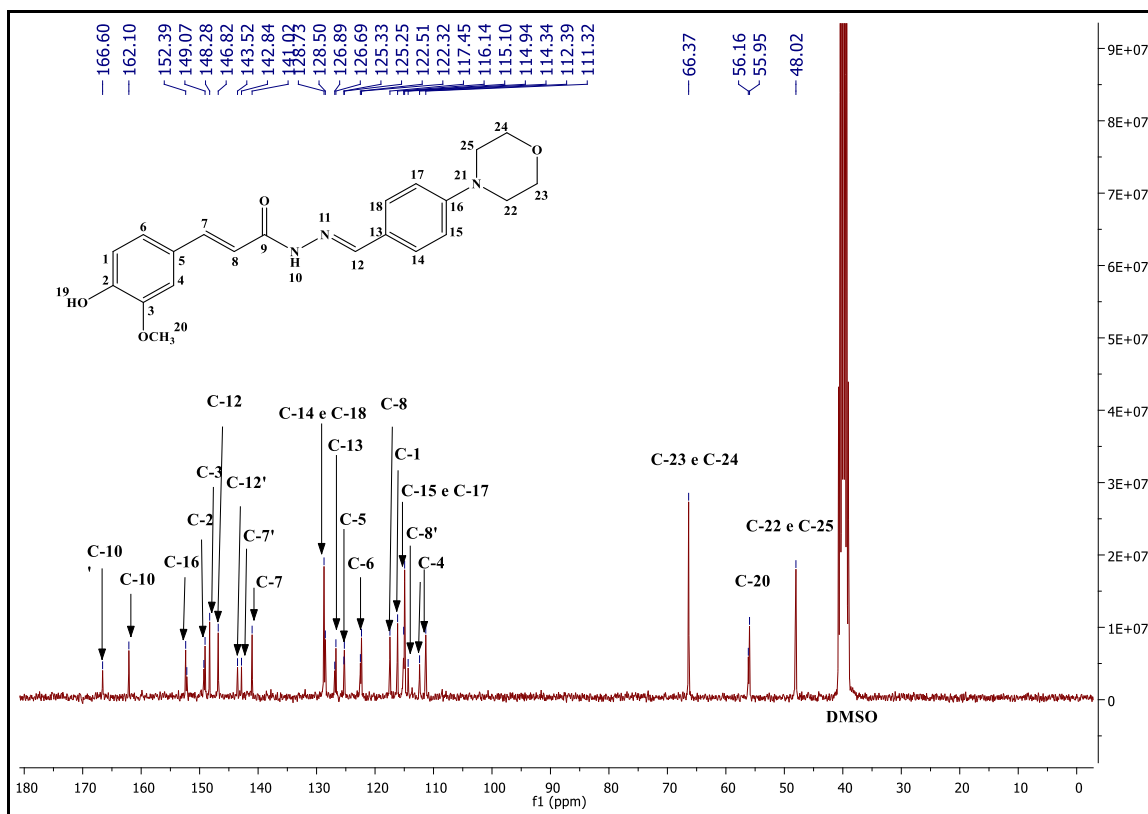


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 46**) podemos observar todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura de PQM-225 (**28o**). Nota-se a presença dos rotâmeros *ap* e *sp*, em alguns casos os sinais do carbono referente de cada isômero mantiveram um deslocamento diferente, característico de cada conformação, sendo possível observar o dobramento de alguns sinais como foi no caso do carbono carbonílico (C9 e $\text{C9}'$) da acilidrazona identificado em 166,5 ppm e 162,1 ppm, picos atribuído a cada rotâmero *ap* e *sp*, respectivamente. O carbono da ligação imídica ($\text{C}=\text{N}$) que confirma a formação do composto desejado foi observado em 146,8 e 143,5 ppm, sinais atribuídos aos carbonos C12 e $\text{C12}'$, respectivamente. Também, foram identificados em 140,9 e 117,5 ppm os

carbonos referentes à $\alpha\beta$ insaturação carbonílica do rotâmero *ap* (C7 e C8), respectivamente. Além observou-se os sinais em 142,8 e 114,3 ppm dos carbonos da $\alpha\beta$ insaturação carbonílica do rotâmero *sp* (C7' e C8'), respectivamente (**Anexo A**).

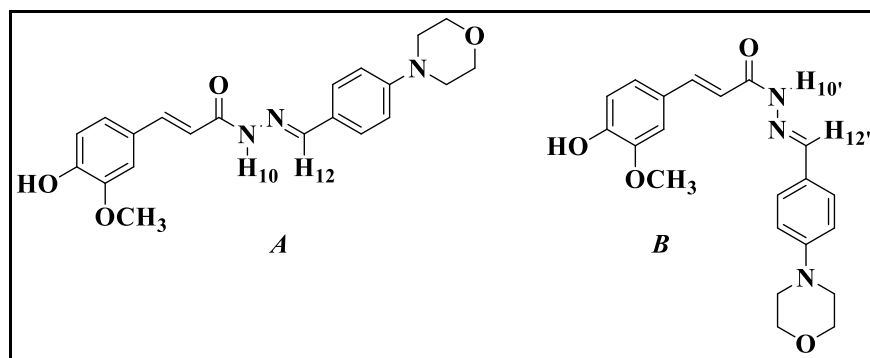
Figura 46 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto PQM-225 (**28o**).



Fonte: do autor.

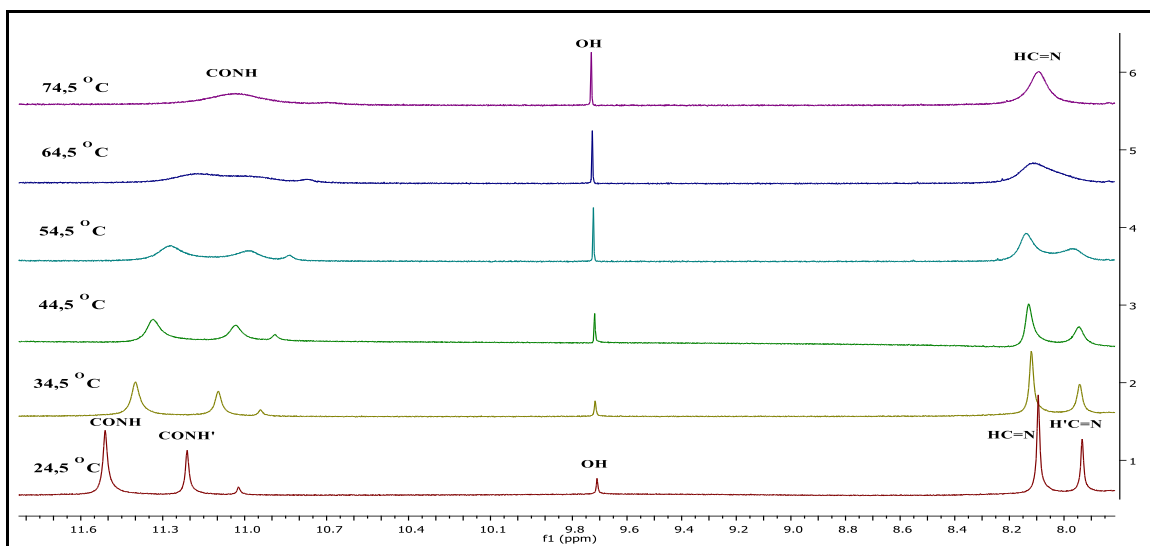
Após caracterização por espectrometria na região do IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , concluiu-se que devido à ocorrência de rotâmeros com unidade estereogênica na ligação dupla da função acilidrazônica (**Figura 47**), formada na etapa de acoplamento de **26a** com os diferentes aldeídos empregados (**27a-r**) (**Figura 42, pág. 94**), os sinais dos hidrogênios, dos carbonos e as integrais estão duplicados. A obtenção de confôrmeros já foi relatada por Silva e colaboradores (DA SILVA *et al.*, 2016), eles identificaram por meio de RMN de ^1H com curva de aquecimento na temperatura de até 120°C , a formação de rotâmeros de acilidrazonas, sendo o isômero *ap* (**Figura 47A**) o mais estável.

Figura 47 - Isômeros *E* do composto PQM-225 (**28o**): *anti*-periplanar (**A**) e *sin*-periplanar (**B**).



Fonte: do autor

Figura 48 - Expansão do espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d*₆ do composto PQM-225 (**28o**) na região de 8.0 –11.6 ppm, a temperatura ambiente (25°C) até 75°C.

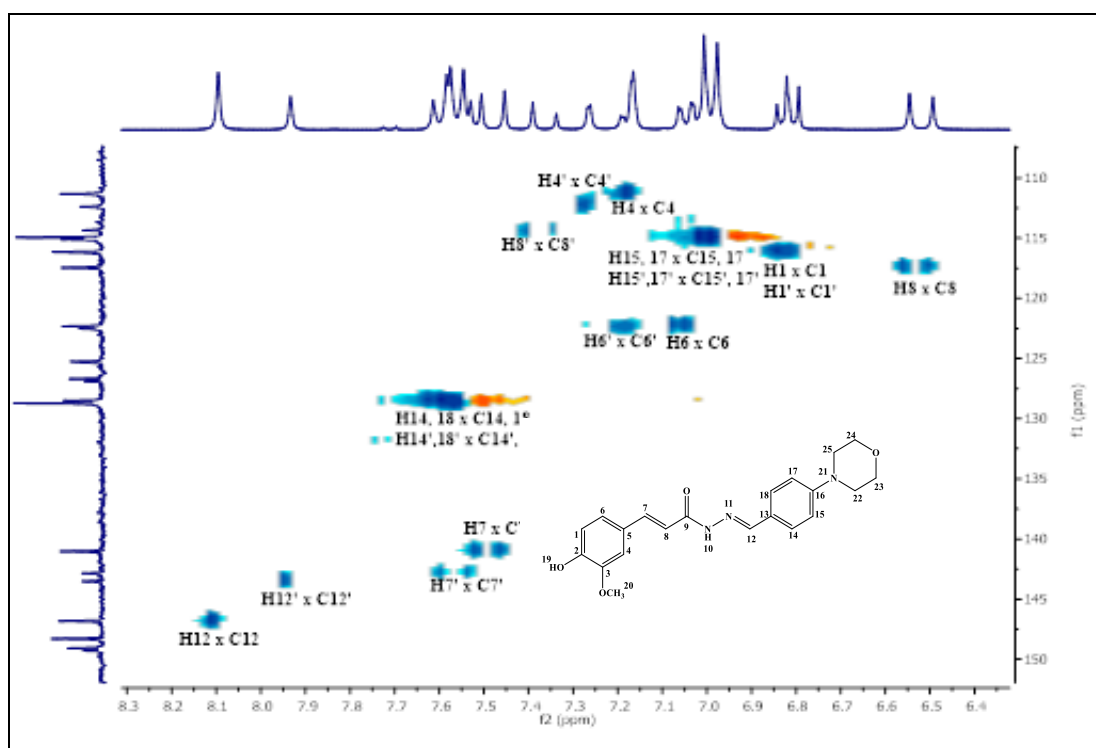


Para confirmar esta afirmação e a formação de rotâmeros de acilidrazônas foi realizada a curva de aquecimento por meio de RMN de ¹H nas temperaturas de 24,5; 34,5; 44,5; 54,5; 64,5 e 74,5 °C. Um exemplo do espectro ampliado pode ser observado na **Figura 48**. A temperatura ambiente (24,5 °C), observamos uma duplicação dos picos atribuídos às absorções de H-11 (CONH) e H-12 (HC=N). À medida que a temperatura aumenta, ocorre a interconversão entre os isômeros conformacionais derivados da rotação

em torno da ligação amida. Em nosso estudo, uma coalescência completa dos sinais foi atingida a 74,5°C.

A fim de atribuir os valores corretos dos sinais de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foi obtido o mapa de correlação, HSQC (**Figura 49**), para determinar os carbonos da insaturação $\alpha\beta$ carbonílica acoplados com seus respectivos hidrogênios. Estes hidrogênios exibiram constante de acoplamento de $J \approx 15$ Hz, sabidamente referente aos hidrogênios da insaturação $\alpha\beta$ carbonílica.

Figura 49 - Expansão do mapa de contornos HSQC do composto PQM-225 (**28o**) em DMSO- d_6 na região de 6.4 –8.6 ppm.

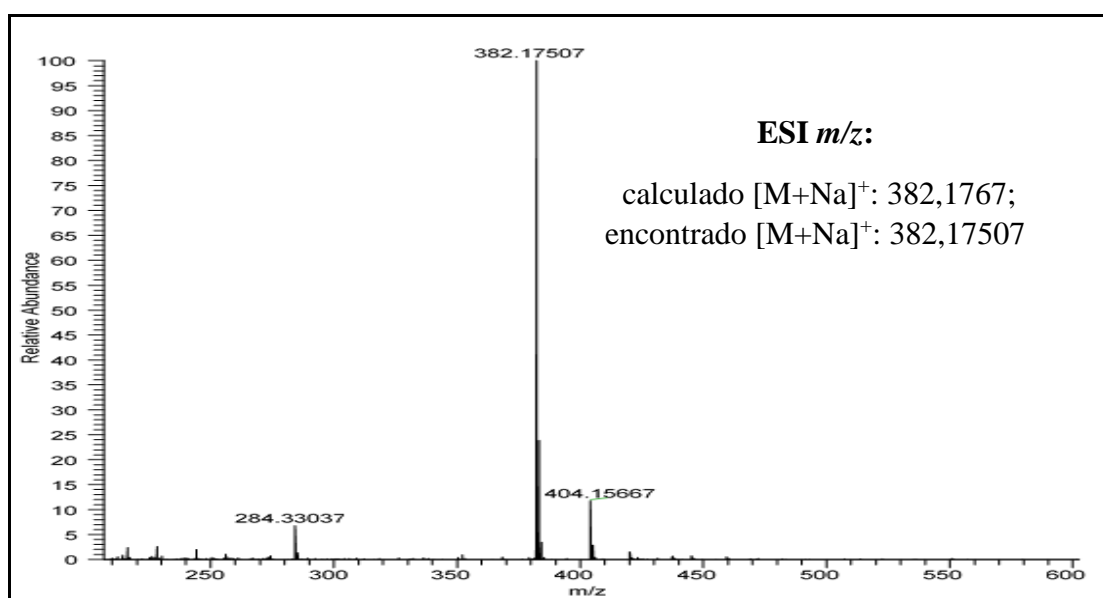


O mapa de correlação HSQC é usado para determinar as correlações diretas de ligação simples próton-carbono ($^1J_{\text{CH}}$), onde os prótons se situam ao longo do eixo X e os carbonos estão ao longo do eixo Y. No mapa observa-se que os carbonos C7' e C7 correlacionam-se diretamente com os dupletos em 7,56 e 7,48 ppm, respectivamente. Além dos carbonos C8' e C8 correlacionam-se com os dupletos em 7,36 e 6,52 ppm,

respectivamente, referentes aos hidrogênios da insaturação $\alpha\beta$ carbonílica. Também, observa-se os carbonos $N=C\text{H}$ (C12' e C12) correlacionam-se com os hidrogênios H12' e H12 em 7,93 e 8,10 ppm.

Adicionalmente, foi obtido o espectro de massas no modo positivo para determinar o pico molecular do composto PQM-225 (**28o**) (**Figura 50**), onde observou-se o pico do íon *quasi*-molecular, $[M+H]^+$ com relação m/z de 382,1751, para um calculado de $[M+H]^+$: 382,1767.

Figura 50 - Espectro de Massas do composto PQM-225 (**28o**) (ESI-MS).



Fonte: do autor.

A análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , HSQC e Massas de alta resolução, confirmou a obtenção dos 18 novos compostos desta série de análogos da curcumina. A pureza dos compostos foi determinada por HPLC e todos os compostos avaliados apresentaram pureza maior que 95%. Os espectros dos compostos PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**) estão apresentados no Anexo A.

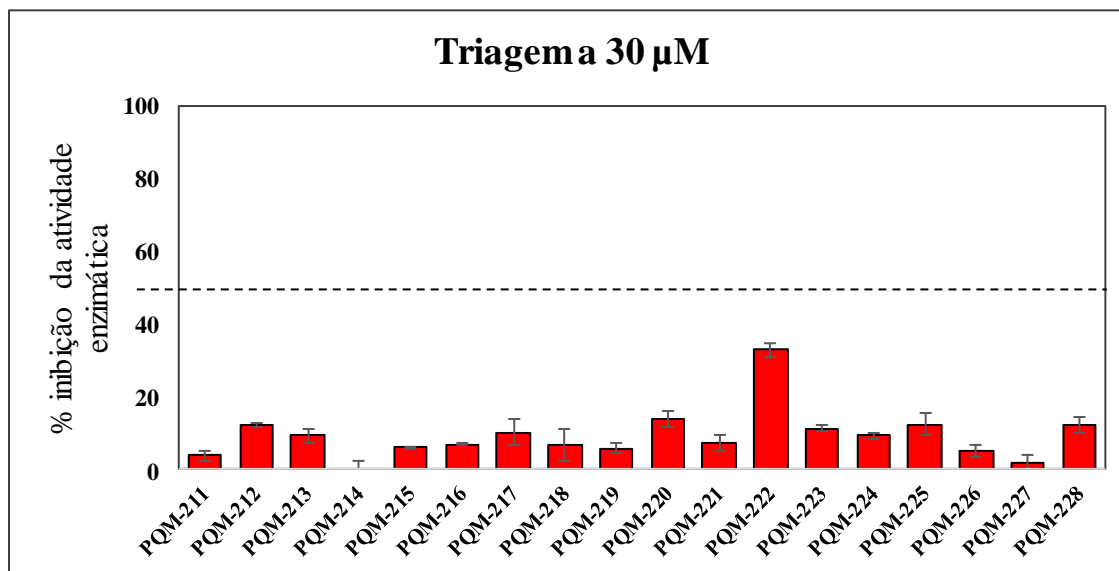
4.4 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA SÉRIE B

4.4.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro* (método modificado de Ellman).

Tanto a acetilcolina, quanto a dopamina são importantes neurotransmissores envolvidos na disfunção cognitiva na DP, segundo estudos de imagem molecular com PET ou tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) (BOHNEN *et al.*, 2003). Estes métodos permitem medir a atividade da AChE, responsável pela hidrólise da acetilcolina, demonstrando uma atividade enzimática anormal no córtex cerebral durante as primeiras etapas da DP. Portanto, a atividade cortical incomum da AChE está associada aos problemas cognitivos característicos tanto na DA quanto na DP (KALIA, 2018). Devido a isto, os 18 compostos da série B foram submetidos a ensaios farmacológicos *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase purificada de *E. electricus* no laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Método B). Determinou-se a atividade inibitória, a potência (CI₅₀) de inibição e seletividade de inibição de AChE x BuChE dos compostos.

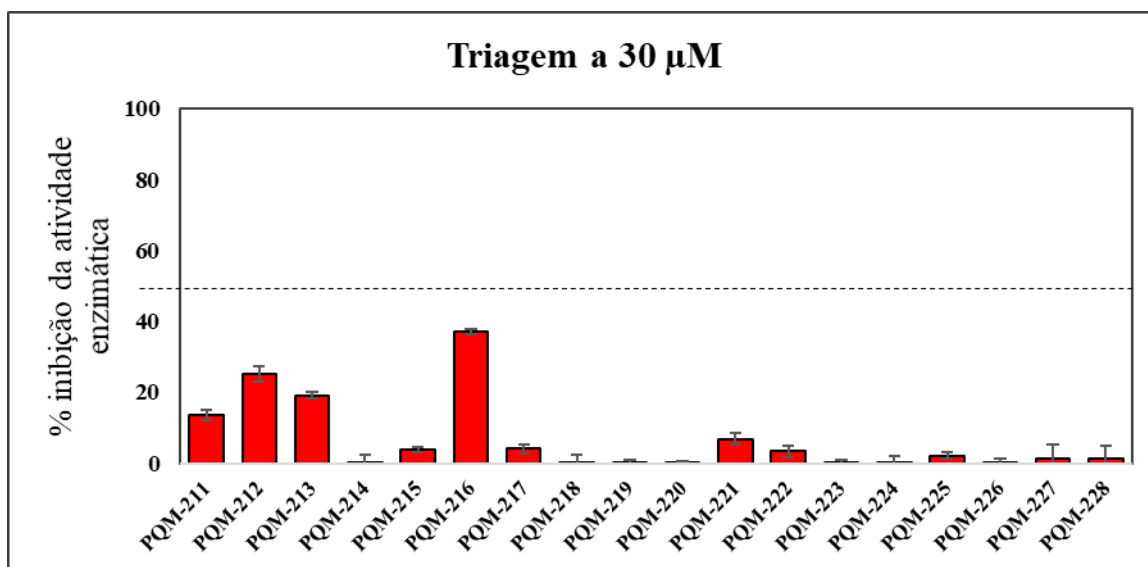
A **Figura 51** apresenta os dados da análise *in vitro* da porcentagem de inibição sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) dos compostos PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**) em uma concentração de 30 µM. A análise dos compostos revelou que nenhuma das substâncias conseguiu inibir a atividade enzimática na concentração avaliada. Posteriormente verificou-se se os compostos conseguiriam inibir a atividade enzimática da BuChE. Porém nenhum dos compostos exibiu potencial inibidor na enzima. A **Figura 52** apresenta os dados da análise *in vitro* da porcentagem de inibição sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**) em uma concentração de 30 µM. Os compostos apresentaram um percentual de inibição baixo, por este motivo não se continuou com eles para os outros ensaios.

Figura 51 - Triagem *in vitro* da atividade inibitória sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Figura 52 - Triagem *in vitro* da atividade inibitória sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Os ensaios preliminares *in vitro* sob as enzimas AChE e BuChE revelaram que os compostos da série B não conseguiram inibir a atividade enzimática. No entanto, a sobre

expressão das enzimas não é o único fator envolvido nas doenças degenerativas e estudos apontam à curcumina como potente neuroprotetor, anti-inflamatório, propriedades quelantes de metais e antioxidantes (CHEN, M. *et al.*, 2018; SRIROD; TEWTRAKUL, 2019; YANG *et al.*, 2019). Dando uma base científica para a aplicação racional da curcumina na prevenção e tratamento das doenças neurodegenerativas como a DA e a DP.

4.4.2 Estudo de *docking* molecular

Em complemento aos resultados encontrados no ensaio de inibição *in vitro* da AChE foi realizado estudos de *docking* molecular com todos os compostos da série B. Os resultados de ancoramento para a série molecular B e donepezil (referência) estão listados na **Tabela 4**.

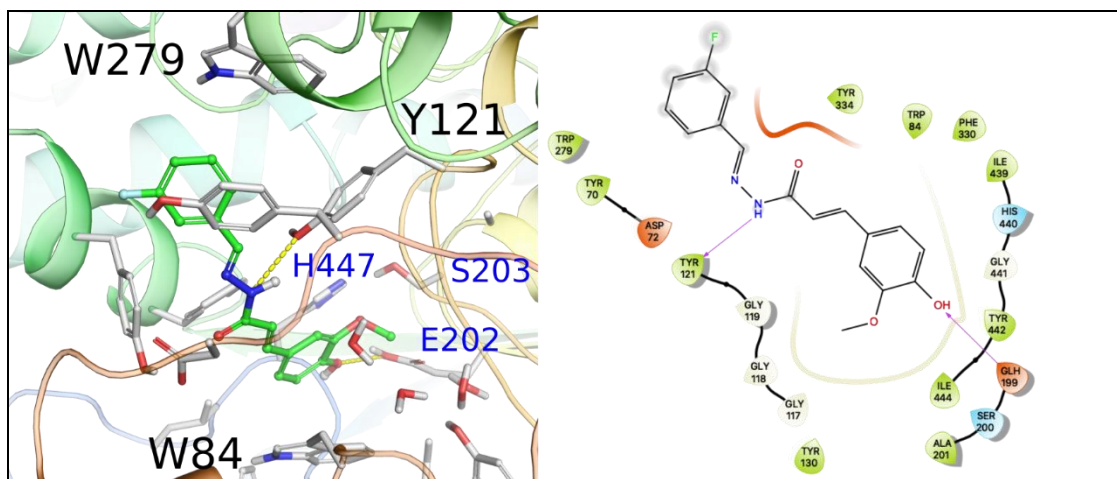
Tabela 4 - Scores de *docking* dos compostos PQM-211 a PQM-228 (28a-r).

Composto	<i>Docking Score</i>				<i>Ensemble Docking</i>	
	1ZGC	1Q84	2CKM	4EY7	Score	PDB ID
PQM-211 (28a)	-7,950	-6,995	-8,144	-7,906	-8,144	2CKM
PQM-212 (28b)	-8,492	-6,868	-9,715	-8,024	-9,715	2CKM
PQM-213 (28c)	-7,163	-6,267	-8,655	-8,205	-8,655	2CKM
PQM-214 (28d)	-7,985	-7,045	-8,309	-8,023	-8,309	2CKM
PQM-215 (28e)	-7,891	-6,425	-9,297	-7,905	-9,297	2CKM
PQM-216 (28f)	-9,196	-7,072	-8,916	-8,100	-9,196	1ZGC
PQM-217 (28g)	-7,602	-7,001	-9,548	-7,555	-9,548	2CKM
PQM-218 (28h)	-8,180	-7,557	-5,930	-9,133	-9,133	4EY7
PQM-219 (28i)	-7,957	-6,735	-9,621	-8,590	-9,621	2CKM
PQM-220 (28j)	-7,775	-7,199	-7,319	-7,730	-7,775	1ZGC
PQM-221 (28k)	-7,203	-7,043	-9,012	-8,060	-9,012	2CKM
PQM-222 (28l)	-8,226	-7,612	-8,034	-7,053	-8,226	1ZGC
PQM-223 (28m)	-7,252	-7,107	-6,617	-8,033	-8,033	4EY7
PQM-224 (28n)	-7,887	-7,816	-6,649	-8,541	-8,541	4EY7
PQM-225 (28o)	-8,135	-5,782	-7,292	-7,983	-8,135	1ZGC
PQM-226 (28p)	-8,652	-8,347	-7,303	-7,666	-8,652	1ZGC
PQM-227 (28q)	-8,700	-8,205	-6,290	-7,889	-8,700	1ZGC
PQM-228 (28r)	-8,473	-6,810	-7,016	-9,100	-9,100	4EY7
donepezil	-11,136	-10,064	-12,575	-17,941	-17,941	4EY7

Fonte: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC)

Todos os compostos desta série foram previstos como compostos de baixa afinidade com *scores* de docagem inferiores a -10,0 (valores mais negativos são melhores). Os três melhores *scores* dos compostos foram PQM-212 (**28b**), PQM-219 (**28i**) e PQM-217 (**28g**) interagindo melhor com conformação 2CKM. Os três compostos exibiram o mesmo modo de ligação (**Figura 53**): (i) o grupo 2-metoxifenol está localizado na entrada do gargalo interagindo com Glu199 (Glu202)¹ através de uma ligação de hidrogênio, (ii) o NH da *N*-acilidrazôna (NAH) do espaçador forma uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral Tyr121 (Tyr124) e (iii) o anel fenílico substituído está localizado próximo ao PAS, realizando contatos não-polares e uma interação fraca de π -stacking com Tyr70 (72). Os substituintes do anel fenílico estão expostos ao solvente, o que pode explicar os *scores* semelhantes entre os três compostos.

Figura 53 - Modos de ligação previstos para PQM-212 (**28b**) na conformação 2CKM da AChE.



Fonte: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC)

Legenda: Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio ou interações de *stacking* com o ligante são marcados em preto. Outros resíduos importantes são destacados em azul. As ligações de hidrogênio são representadas como traços amarelos na imagem 3D.

A maioria dos compostos desta série obtiveram valores de inibição semelhantes que não superaram o 20% de inibição enzimática, com exceção de PQM-222 (**28i**), que alcançou uma porcentagem levemente superior, sem chegar a ser significativa. A baixa

¹ A numeração da AChE humana é mencionada entre parênteses.

afinidade segundo o estudo de *docking* molecular confirma os resultados obtidos no ensaio *in vitro* sob a enzima AChE.

4.4.3 Citotoxicidade e elucidação da atividade antioxidante

Uma característica em comum nas DNs é o estresse oxidativo, causando o aumento anormal na geração de radicais livres no SNC, juntamente com a citotoxicidade, levando a disfunção mitocondrial, morte das células neuronais e a função sináptica alterada (KAMAT *et al.*, 2016). Há indícios que a curcumina e seus derivados, como o ácido ferúlico, protegem os neurônios contra lesões através da prevenção da neuroinflamação mediada por radicais livres implicados na patologia das DNs e contribuem na melhoria da memória (ABRAHAMS *et al.*, 2019a; CHEN, M. *et al.*, 2018). A potente atividade antioxidante da curcumina é devida principalmente a sua funcionalidade *orto*-metoxi-fenol, podendo formar uma ligação de hidrogênio intramolecular, e permitindo a abstração do átomo de hidrogênio fenólico (LI, Y. *et al.*, 2014). Deste modo os derivados do ácido ferúlico da série B, foram avaliados quanto à atividade antioxidante utilizando o ensaio de DPPH e à citotoxicidade em linhagem celular SH-SY5Y, células de neuroblastoma humano.

4.4.3.1 Avaliação da neurotoxicidade via MTT

Para avaliação do efeito neurotóxico dos compostos foi utilizado o ensaio de MTT que é um padrão utilizado para avaliar a viabilidade celular, com base em uma reação colorimétrica. O MTT (coloração amarela), quando incubado com células vivas é reduzido por succinato-desidrogenases e ressaltado a formação de cristais de roxos. A quantidade de cristais formados pela redução destas enzimas mitocondriais 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).

Deste modo, as 18 substâncias sintetizadas foram avaliadas em 8 concentrações de 80 a 2,5 μM . Quando possível, foi calculado o valor de CI_{50} de toxicidade, quando não, foi

expresso como maior que 80 μM (>80) (**Tabela 5**). Os compostos também foram separados em faixas de toxicidade: verde, amarela e vermelha (**Figura 56**). Nesta etapa verificou-se que os compostos PQM-214 (**28d**), PQM-216 (**28f**), PQM-217 (**28g**), PQM-218 (**28h**), PQM-221 (**28k**), PQM-224 (**28n**) e PQM-228 (**28r**) apresentaram alta toxicidade (faixa vermelha), já PQM-213 (**28c**), PQM-215 (**28e**) e PQM-219 (**28i**) apresentaram uma toxicidade mediana (faixa amarela) e as demais substâncias não apresentaram toxicidade detectável na concentração máxima avaliada (80 μM) (faixa azul). Essa avaliação foi feita inicialmente e em paralelo com a avaliação da atividade antioxidante frente a *t*-BOOH (co-tratamento). Este parâmetro é importante para evitar gasto de tempo e recursos com moléculas tóxicas e para evitar possíveis resultados falso positivos, como será discutido à frente.

Tabela 5 - Avaliação da citotoxicidade, capacidade sequestrante de radicais livres DPPH e antioxidante frente a *t*-BOOH dos compostos PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**).

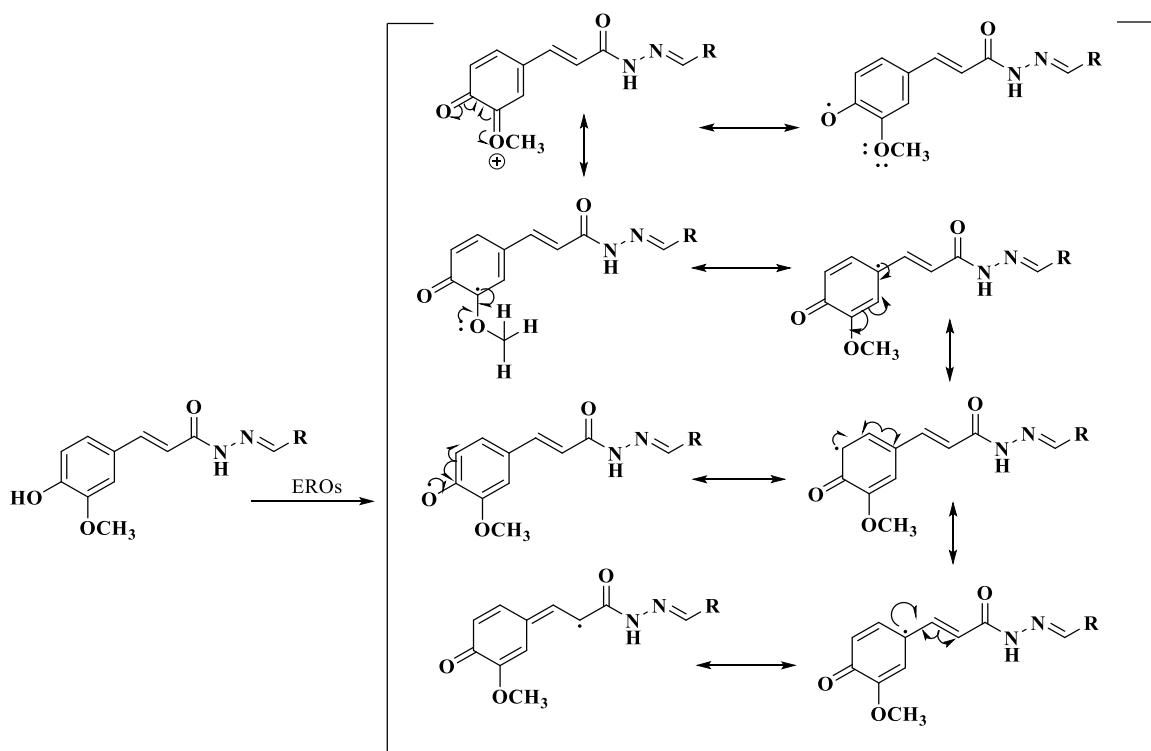
Compostos	CI ₅₀	Atividade sequestrante de DPPH CE ₅₀ (μM) ^b	Compostos	CI ₅₀	Atividade sequestrante de DPPH CE ₅₀ (μM) ^b
	SH-SY5Y (μM) ^a			SH-SY5Y (μM) ^a	
PQM 211 (28a)	>80	42,91	PQM 220 (28j)	>80	22,24
PQM 212 (28b)	>80	28,29	PQM 221 (28k)	30,6	58,97
PQM 213 (28c)	60,6	7,77	PQM 222 (28l)	>80	65,61
PQM 214 (28d)	5,0	34,59	PQM 223 (28m)	>80	38,28
PQM 215 (28e)	48,4	27,08	PQM 224 (28n)	12,3	7,19
PQM 216 (28f)	39,9	31,75	PQM 225 (28o)	>80	8,90
PQM 217 (28g)	4,5	28,63	PQM 226 (28p)	>80	25,42
PQM 218 (28h)	36,0	38,33	PQM 227 (28q)	>80	22,36
PQM 219 (28i)	68,3	24,37	PQM 228 (28r)	33,9	69,59
Ác.ascórbico	id	18,99			
Trolox	id	17,08			

Fonte: Laboratório PeQuiM e QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

Nota: **id**: Indeterminado. **a**: avaliação da citotoxicidade via MTT, na linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano em 5 concentrações (2,5 - 80 μM). **b**: Atividade antioxidante frente a DPPH. Todos os compostos foram analisados em triplicata e os resultados estão apresentados como a média.

O ácido ferúlico possui propriedades antioxidantes, devido à capacidade sequestrante de radicais livres (**Figura 55**). Os grupos metoxila e hidroxila, grupos doadores de elétrons, presentes no anel aromático aumentam a facilidade de abstração de átomos de hidrogênio, permitindo finalizar as reações em cadeia dos radicais livres. Adicionalmente, o núcleo fenólico acoplado a uma cadeia lateral conjugada facilita a formação de um radical fenoxi estabilizado por ressonância. A carboníla com uma ligação dupla C-C insaturada adjacente fornece locais de ataque adicionais para os radicais livres, impedindo-os de atacar as membranas.

Figura 55 - Capacidade sequestrante de radicais livres dos derivados ferúlicos e estabilização do radical por ressonância.



Fonte: do autor.

As substâncias sintetizadas foram avaliadas quanto à sua atividade antioxidante em concentrações diferentes (1,56 - 200 μM) em triplicata. Ácido ascórbico e trolox foram utilizados como padrões e os resultados estão apresentados na **Tabela 5**. Como esperado, verificou-se que quase todos os derivados da série de derivados do ácido *trans*-ferúlico foram eficazes na eliminação de radicais livres, com destaque para PQM-225 (**28o**).

4.4.3.3 Atividade antioxidante frente a *t*-BOOH (co-tratamento)

Para continuar com os estudos das propriedades antioxidantes foi realizado um teste com uma sonda fluorescente (dicloro-diidrofluoresceína (DCFH-DA)) para determinar a capacidade dos compostos de diminuir a formação de ROS induzido por hidroperóxido de *tert*-butila (*t*-BuOOH), em células SH-SY5Y. Este teste visa corroborar os resultados obtidos no DPPH, mas neste caso a atividade antioxidante é verificada em meio extracelular. Na primeira etapa o estudo foi empregado na forma de co-tratamento com todas as substâncias que apresentaram segurança no teste de toxicidade para verificar sua capacidade de inibição indireta da formação de ROS pelas células, agindo na ativação de processos antioxidantes celulares ou diretamente na inibição de ROS pelas células. Posteriormente, numa etapa de pré-tratamento as células foram colocadas em contacto com as substâncias durante 24h.

Tabela 6 - Porcentagem de inibição frente a *t*-BOOH como co-tratamento e pré-tratamento em células SH-SY5Y.

Compostos	Co-T- <i>t</i> -BOOH (10 µM) % Inib.	Compostos	Co-T- <i>t</i> -BOOH (10 µM) % Inib.
PQM 211 (28a)	38,27	PQM 220 (28j)	41,04
PQM 212 (28b)	61,49	PQM 221 (28k)	nd
PQM 213 (28c)	57,43	PQM 222 (28l)	nd
PQM 214 (28d)	nd	PQM 223 (28m)	In
PQM 215 (28e)	51,68	PQM 224 (28n)	In
PQM 216 (28f)	nd	PQM 225 (28o)	79,07
PQM 217 (28g)	nd	PQM 226 (28p)	62,67
PQM 218 (28h)	nd	PQM 227 (28q)	67,72
PQM 219 (28i)	26,98	PQM 228 (28r)	nd

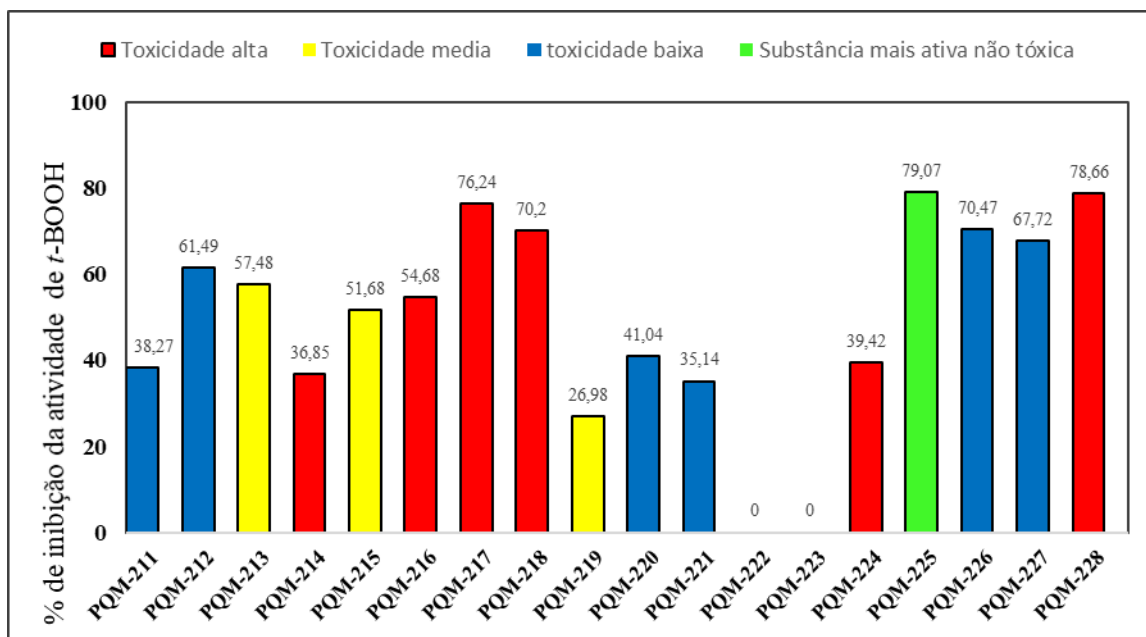
Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

Nota: nd: Não determinado. In: Inativo

As substâncias foram avaliadas na concentração de 10 µM e o pró-oxidante, foi utilizado na concentração de 100 µM e os resultados são expressos em porcentagem de inibição da formação de ROS (**Tabela 6**). Este teste difere do DPPH, pois depende da atividade das células para gerarem ROS no meio o qual será detectado e quantificado. Quando o *t*-BOOH é adicionado, a quantidade de ROS formado pelas células é maior que o

normal. Neste caso é feito um controle negativo, apenas células (mede o nível basal de ROS produzido pela célula), um controle positivo, células + *t*-BOOH (que mede a quantidade de ROS produzido pela célula induzida por *t*-BOOH) e os pontos experimentais onde são adicionados as células + *t*-BOOH + composto em estudo (que vai verificar a capacidade do composto de bloquear a indução do *t*-BOOH). Os resultados estão relatados na **Figura 56**.

Figura 56 - Co-tratamento *t*-BOOH (100 μ M) + Composto (10 μ M) PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**).



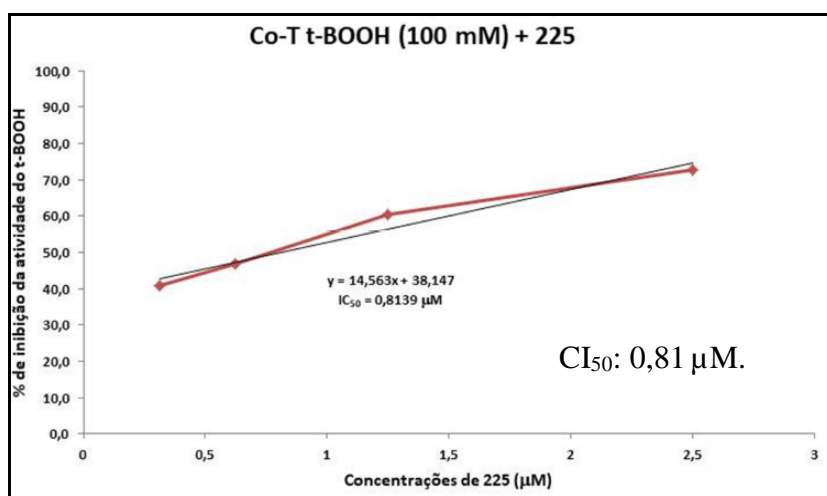
Fonte: QUUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*), Itália.

Para facilitar a compreensão dos resultados os compostos foram separados em faixas de toxicidade. Na **Figura 56** podemos verificar, em azul, as substâncias que apresentaram, baixa ou nenhuma toxicidade, em amarelo aquelas com toxicidade média e em vermelho as substâncias que apresentam alta toxicidade. Finalmente, em verde, a substância mais ativa não tóxica até o momento PQM-225 (**28o**). Notou-se que os compostos em vermelho não tiveram sua atividade antioxidante quantificada (**Tabela 6**), constam como não determinado (nd), nestes casos temos os resultados falso positivos, na verdade o decaimento da quantidade de ROS formado (detectado neste teste) não se deve a inibição da atividade do

t-BOOH pelo composto, mas sim pela morte celular decorrente da toxicidade deste composto. Por isso a importância de avaliar a citotoxicidade antes de qualquer outro estudo.

Este ensaio corroborou os resultados obtidos no teste de DPPH, confirmando a PQM-225 (**28o**) (CE_{50} : 8,90 μ M), como o composto com melhor perfil antioxidante da série inibindo 79% da formação EROs em meio celular, respectivamente. Finalmente, determinou-se CI_{50} do composto mais ativo não tóxico no teste anterior, PQM-225 (**28o**), uma vez que agrega boa atividade com DPPH e com *t*-BOOH. A seguir na **Figura 57** está determinado CI_{50} do composto, obteve-se o CI_{50} : 0,81 μ M.

Figura 57 - Co-tratamento com *t*-BOOH do composto PQM-225 (**28o**).



Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*), Itália.

4.4.3.4 Atividade antioxidante frente a *t*-BOOH após pré-tratamento com PQM-225 (**28o**) por 24h.

Em uma segunda etapa, o composto líder PQM-225 (**28o**) passou pelo teste de pré-tratamento na concentração de 10 μ M. As células neuronais ficaram em contato com o composto por 24h em incubadora. Após este período o meio de cultura foi retirado e adicionado o *t*-BOOH, por fim segue-se o teste normalmente. Esta etapa visa verificar a capacidade do PQM-225 (**28o**) ser armazenado pelas células neuronais. Com os resultados deste teste podemos ter uma noção da capacidade da substância estudada, uma vez que, se armazenada na célula a molécula demonstra possibilidade de utilização crônica e em

baixas concentrações. Esta análise foi critério de seleção para decidir se a molécula seria submetida ao teste de ativação de glutatona, uma vez que este só é realizado na forma de pré-tratamento. No entanto, PQM-225 (**28o**) não foi ativo nesta etapa, as células se mostraram incapazes de armazenar o composto.

4.4.3.5 Inibição de toxicidade decorrente do estresse oxidativo induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

A 6-OHDA é um análogo de dopamina altamente oxidável que pode ser capturado através do transportador de dopamina e que afeta principalmente aos neurônios catecolaminérgicos. Está neurotoxina comumente usada para induzir dano celular em modelos de DP, através perda induzida de neurônios dopaminérgicos (HERNANDEZ-BALTAZAR; ZAVALA-FLORES; VILLANUEVA-OLIVO, 2017). O modelo induzido pela 6-OHDA reproduz os principais processos celulares envolvidos na DP, tais como estresse oxidativo, neurodegeneração, neuroinflamação e morte neuronal por apoptose.

Neste contexto o composto líder PQM-225 (**28o**) foi avaliado quanto a capacidade de inibir os efeitos tóxicos da 6-OHDA. Nesta análise as células neuronais são cultivadas em placa de 96 poços e submetidas a um tratamento com 6-OHDA (100 μ M) para induzir a toxicidade, e o composto em análise nas diferentes concentrações (10-0,625 μ M). Finalmente, o composto foi submetido ao teste de MTT para indagar a viabilidade celular do mesmo, desta forma podemos verificar a capacidade do composto teste de proteger as células contra a agressão oxidativa da 6-OHDA. Porém, o composto PQM-225 (**28o**) não apresentou resultado significativo neste estudo.

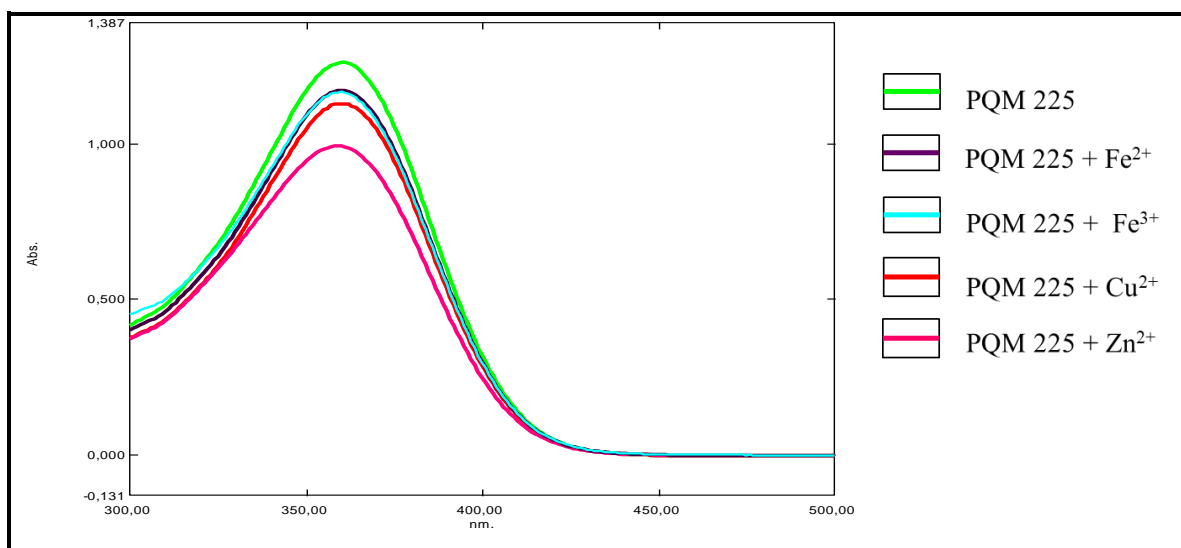
4.4.3.6 Propriedades quelantes de metais pró-oxidantes

Como já foi discutido na pág. 79, os metais desempenham uma ação importante na regulação de diferentes processos biológicos. No entanto, o acúmulo excessivo de metais no sistema nervoso pode prejudicar a atividade enzimática e está correlacionado várias doenças neurodegenerativas (CHEN, P.; MIAH; ASCHNER, 2016). Abordagens

farmacêuticas visam a obtenção de compostos quelantes de metais para evitar o efeito pro-oxidativo decorrente dos altos níveis de metais como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} presentes em pacientes com DNs.

A capacidade dos compostos da série B para quelar biometais foi estudada por espectrofotometria de UV-VIS com comprimentos de onda variando de 200 a 500 nm, de acordo com a metodologia descrita por Chen (CHEN, S. Y. *et al.*, 2011). Foram obtidos deslocamentos das curvas de absorção dos compostos em soluções em ausência de metais e contendo os diferentes metais indicando a atividade quelante dos mesmos. Todos os compostos desta série molecular exibiram um perfil quelante similar (**Anexo C**).

Figura 58 - Espectro no ultravioleta de absorbância de PQM-225 (**280**).



Fonte: do autor.

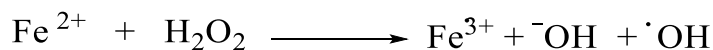
O composto **PQM-225** (**Figura 58**) apresentou-se uma absorção em 360,96 nm (λ). Quando Fe^{2+} e Fe^{3+} foram adicionados à solução de **PQM-225**, causou um leve deslocamento hipsocrômico na banda para 358,96 nm e um efeito hipocrômico (diminuição da intensidade da absorbância) de 1,260 para 1,173 e 1,162, respectivamente; indicando uma baixa obtenção do complexo composto-metal correspondente, via quelação. Do mesmo modo, após adição de Cu^{2+} , foi observado o mesmo efeito hipocrômico para 1,125. A maior

diminuição de intensidade para 0.991 se apresentou após da adição de Zn^{2+} em todos os compostos testados da série B.

4.4.3.7 Avaliação da atividade antioxidante de PQM-212 (**28b**), PQM-225 (**28o**), PQM-226 (**28p**) e PQM-227 (**28q**) frente a Fe^{2+} e H_2O_2 .

O teste foi realizado a fim de demonstrar o efeito antioxidante das substâncias com melhor perfil antioxidante frente à capacidade quelante de Fe^{2+} . Esta análise visa reforçar e aprovar a capacidade quelantes dos compostos, uma vez que o mecanismo mais provável para a diminuição de EROs no meio seja a capacidade dos compostos de quelar o Fe^{2+} , impedindo a reação de Fenton de ocorrer (ZHAO, 2019).

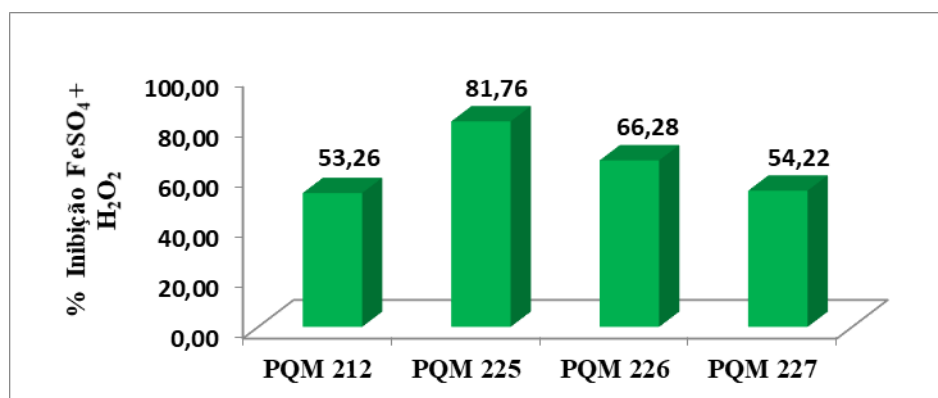
Reação de Fenton



A reação de Fenton é a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reação que causa uma grande formação de radicais hidroxila, com alto poder oxidante. A análise consistiu em colocar as células neuronais (SH-SY5Y) em contato com Fe^{2+} , H_2O_2 e os compostos em estudo na concentração de 10 μM e avaliar a formação de EROs no meio. O resultado expressa a porcentagem da inibição da reação de Fenton no meio extracelular em relação ao controle positivo (**Figura 59**).

Controle positivo: Células + $FeSO_4$ + H_2O_2 .

Figura 59 - Atividade inibitória de formação de EROs induzida por Fe^{2+} e H_2O_2



Fonte: QUUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*), Itália.

Nesta análise foram avaliados os compostos que apresentaram melhor atividade inibidora (superior a 60 %) de formação de EROs induzida por *t*-BOOH (co-tratamento a 10 μM), PQM-212 (**28b**), PQM-225 (**28o**), PQM-226 (**28p**) e PQM-227 (**28q**). Todos os compostos avaliados apresentaram atividade inibitória da reação de fenton com destaque do composto PQM-225 (**28o**) com inibição de 82%.

4.4.4 Avaliação da inibição de MAO-A e MAO-B dos compostos PQM-212 (**28b**), PQM-220 (**28j**), PQM-225 (**28o**) e PQM-227 (**28q**).

A monoaminoxidase (MAO) é uma enzima conhecida por desempenhar atividades importantes na degradação de neurotransmissores como noradrenalina, dopamina e serotonina. A inibição da MAO, em especial MAO-B, leva a um aumento destes neurotransmissores na fenda sináptica e consequente melhoria nos sintomas de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, principalmente em estágios iniciais (CHAN, H. H. *et al.*, 2018). Considerando a importância da atividade de MAO principalmente na DP, foi avaliada a capacidade inibitória frente a MAO A e B dos compostos que apresentaram os melhores resultados no ensaio de *t*-BOOH.

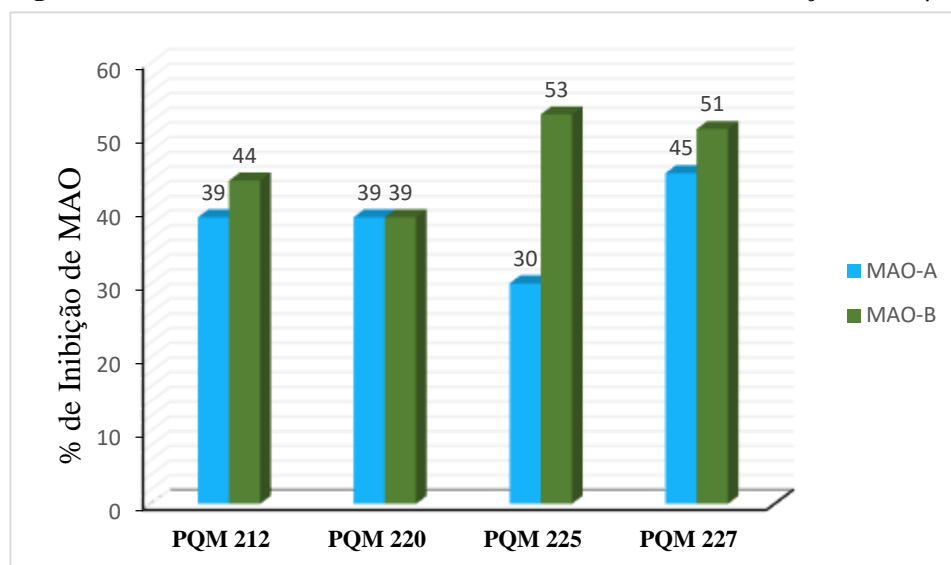
Tabela 7 - Resultados obtidos dos compostos PQM-212 (**28b**), PQM-220 (**28j**), PQM-225 (**28o**) e PQM-227 (**28q**) da atividade antioxidante e inibitória de MAO.

Composto	% inibição (10 μ M) MAO-A	% inibição (10 μ M) MAO-B
PQM 212	39,5	44,4
PQM 220	39,4	39,5
PQM 225	30,4	53,4
PQM 227	45,3	51,3

Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*), Itália.

Podemos destacar que PQM-225 (**28o**) e PQM-227 (**28q**) foram capazes de inibir 53% e 51% da atividade enzimática de MAO B, respetivamente (**Figura 60**). Notou-se que a maioria dos compostos foram seletivos para MAO-B. Enquanto, PQM-220 (**28j**) não apresentou seletividade entre as duas isoformas da enzima. Entre as características estruturais destaca-se que tanto PQM-225 (**28o**) quanto PQM-227 (**28q**) possuem substituintes bastante volumosos em posição *para* do anel aromático proveniente do aldeído o que poderia resultar numa maior seletividade da inibição de MAO B.

Figura 60 - Atividade inibitória de MAO-A e MAO-B na concentração de 10 μ M



Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*), Itália.

A inibição da MAO-B pode ter efeitos neuroprotetores, devido à diminuição da geração de radicais livres decorrentes da oxidação da dopamina. A participação enzimática de MAO-B no metabolismo da dopamina leva ao aumento de peróxido de hidrogênio; portanto, a atividade anormal desta enzima está relacionada ao desenvolvimento de estresse oxidativo e dano oxidativo em DNs. Outro aspecto importante é capacidade de MAO-B para transformar 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) no metabólito neurotóxico ativo, o íon 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺), usado em modelos animais para induzir a DP (DEZSI; VECSEI, 2017).

Por outro lado, os inibidores da MAO-A são utilizados no tratamento de doenças psiquiátricas em pacientes com depressão, sintoma neuropsiquiátrico mais comum em pacientes com DP (GOODARZI *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2018). Isto pode ser interessante, pois a combinação de diferentes tipos de atividade na mesma molécula pode ser eficaz no tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos e neurológicos em pacientes com DP, deste modo melhorar a eficácia do tratamento da DP e outras doenças neurodegenerativas (FINBERG; RABEY, 2016).

4.4.5 Predição das propriedades ADME

Os parâmetros farmacocinéticos dos derivados ferúlicos sintetizados foram calculados juntamente com os compostos padrão curcumina usando o programa QikProp (Schrödinger). Os principais parâmetros estudados foram positivos na maioria dos casos e estão agrupados na **Tabela 8**, os resultados computacionais sugerem que os derivados da série molecular B possuem as condições adequadas para exercer atividade no sistema nervoso central, a permeabilidade da barreira hematoencefálica é importante para atingir os alvos biológicos deste estudo.

A porcentagem prevista de absorção oral na maioria dos compostos sintetizados foi altamente satisfatória, com uma porcentagem superior aos 85% de absorção oral humana em comparação com os valores da curcumina, composto caracterizado por ter baixa biodisponibilidade que dificulta seu uso terapêutico em doenças neurodegenerativas. Algumas características estruturais podem influenciar na absorção dos compostos, como a presença de grupos aromáticos que aumentam a lipossolubilidade, porém, compostos de

maior tamanho podem ter efeito contrário na absorção. Isto explicaria por que os compostos mais volumosos obtiveram menor porcentagem de absorção oral (PQM-226 (**28p**), PQM-227 (**28q**) e PQM-228 (**28r**)).

Enquanto, o coeficiente partição octanol/água (QPlogPo/wb), parâmetro que quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos, tem valores moderados na maioria dos compostos da série B, sugerindo um possível balanço entre permeabilidade e solubilidade dos compostos. A maioria dos compostos de teste apresentaram valores muito bons em comparação com a curcumina, frente a permeabilidade das células Caco-2 (QPPCaco), um modelo da barreira sanguínea do intestino. Os compostos mais volumosos (PQM-226 (**28p**), PQM-227 (**28q**) e PQM-228 (**28r**)) obtiveram valores baixos de permeabilidade do intestino, provavelmente devido ao tamanho do composto. Outros parâmetros como a ligação da albumina de soro humano usando (QPlogKhsa), coeficiente de partição cérebro/sangue (QPlogBB) e o valor de CI_{50} do bloqueio do canal HERG K^+ (QPlogHERG), obtiveram valores satisfatórios sugerindo propriedades adequadas para exercer atividade no SCN, superando os valores obtidos pelo composto padrão, curcumina.

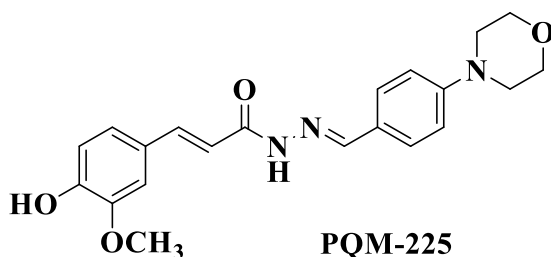
Tabela 8 - Propriedades ADME previstas dos compostos sintetizados PQM-211 a 228 (**28a-r**) e do composto padrão, curcumina.

Composto	SNC ^a	QPlogPo/w ^b	QPlogS ^c	QPlogHERG ^d	QPPCaco ^f	QPlogBB ^g	QPlogKhsa ^h	QPPMDCK ⁱ	QPlogKp ^j	% Absorção oral humano ^k	Regra de 5	Regra de 3
PQM 211	-2	3,5	-4,689	-6,112	626,719	-1,099	0,214	538,565	-2,008	100	0	0
PQM 212	-2	3,502	-4,694	-6,115	627,07	-1,099	0,215	538,752	-2,007	100	0	0
PQM 213	-2	3,51	-4,813	-6,265	581,285	-1,173	0,233	457,006	-2,041	96,977	0	0
PQM 214	-2	3,755	-5,057	-6,147	626,879	-1,054	0,285	735,79	-2,042	100	0	0
PQM 215	-2	3,76	-5,068	-6,155	626,707	-1,056	0,287	735,485	-2,041	100	0	0
PQM 216	-2	3,762	-5,183	-6,318	579,688	-1,137	0,305	608,866	-2,069	100	0	0
PQM 217	-2	3,834	-5,18	-6,183	627,033	-1,048	0,309	791,504	-2,043	100	0	0
PQM 218	-2	4,543	-6,046	-6,222	606,962	-1,36	0,715	288,385	-2,109	100	0	1
PQM 219	-2	3,804	-5,508	-6,476	588,727	-1,412	0,381	279,032	-2,071	100	0	0
PQM 220	-2	4,387	-5,96	-6,512	592,843	-1,556	0,549	281,141	-1,932	100	0	1
PQM 221	-2	3,658	-4,889	-5,88	717,41	-1,374	0,231	345,503	-1,942	100	0	0
PQM 222	-2	3,592	-4,809	-6,056	721,741	-1,303	0,233	347,758	-1,873	100	0	0
PQM 223	-2	4,581	-6,693	-6,653	623,775	-1,364	0,743	297,03	-2,12	100	0	1
PQM 224	-2	4,155	-6,007	-6,383	586,964	-1,341	0,578	278,129	-2,196	100	0	1
PQM 225	-2	3,61	-5,619	-6,469	604,409	-1,336	0,316	287,074	-2,14	100	0	0
PQM 226	-2	3,617	-5,473	-6,972	307,909	-1,65	0,365	138,482	-2,265	92,66	0	0
PQM 227	-2	2,947	-5,348	-7,194	181,359	-2,047	0,161	78,148	-2,616	84,626	0	0
PQM 228	-2	2,845	-3,972	-5,699	626,572	-1,162	0,026	298,47	-2,114	93,666	0	0
Curcumina	-2	2,932	-4,518	-6,394	234,428	-2,034	-0,014	103,135	-2,555	86,533	0	0
Valores de Referencia	-2 - +2	-2 ate 6.5	-6.5 a 0.5	menor -5	<25 baixo; >500 alto	-3 - 1.2	-1.5 - 1.5	<25 baixo, > 500 alto	-8.0 – – 1.0	>80%: alto <25%: pobre	max 4	max 3

Fonte: programa QikProp (Schrödinger).

a: sistema nervoso central. **b:** Predição do coeficiente de partição octanol/água. **c:** Predição da solubilidade aquosa, log S. S em mol dm⁻³ é a concentração do soluto em uma solução saturada que está em equilíbrio com o sólido cristalino. **d:** Valor CI₅₀ previsto para bloqueio de canais HERG K⁺. **f:** Permeabilidade prevista das células Caco-2 em nm/seg. As células Caco-2 são um modelo da barreira sanguínea do intestino. As previsões do QikProp são para o transporte não ativo. **g:** Coeficiente de partição previsto para cérebro/sangue. Nota: As previsões de QikProp são para medicamentos administrados por via oral, de modo que, por exemplo, a dopamina e a serotonina são negativas para o SNC porque são muito polares para atravessar a barreira hematoencefálica. **h:** Predição da ligação à albumina sérica humana. **i:** Permeabilidade aparente de células MDCK em nm/seg. As células MDCK são consideradas um bom mimetizador da barreira hematoencefálica. As previsões do QikProp são para transporte não ativo. **j:** Permeabilidade prevista da pele, log Kp. **k:** Absorção oral humana prevista em escala de 0 a 100%.

A avaliação farmacológica da série **B** corroborou a importância do fragmento 4-hidroxi-3-metoxifenila para manter as características antioxidantes provenientes do composto padrão curcumina. O ensaio de DPPH, demonstrou que PQM-225 (**28o**) (CE_{50} : 8,90 μ M), composto substituído com 4-*N*-morfolinobenzil, possui o melhor perfil antioxidante da série **B**, e foi capaz de inibir um 79% da formação EROs em meio celular no ensaio de atividade antioxidante frente a *t*-BOOH e 82% de inibição de ROS decorrente da capacidade quelante de Fe^{2+} , impedindo a reação de Fenton ocorrer.



Apesar que nossos derivados ferúlico não inibir a enzima AChE, possuem um perfil antioxidante de PQM-225 (**28o**). Considerando o elevado dano oxidativo característico das DNs que levam a disfunção mitocondrial e morte neuronal, este composto tem perfil neuroprotetor com potencial uso no tratamento de DNs. Adicionalmente, PQM-225 (**28o**) inibiu o 53% da atividade de MAO-B, enzima responsável pela degradação de neurotransmissores como a dopamina, permitindo um aumento da disponibilidade de dopamina, e conseqüentemente, melhoria dos sintomas da DP e de DA.

PARTE 3: HÍBRIDOS CURCUMINA-DONEPEZIL (SÉRIE C).

No seguinte capítulo serão abordados os resultados da parte sintética e avaliação farmacológica da terceira família de compostos híbridos da curcumina-donepezil (PQM-263 a PQM-272 (**30a-j**)), que foram planejados como inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento contra DNs.

4.5 QUÍMICA

Foram sintetizados 10 compostos, racionalmente planejados a partir das estruturas do donepezil (**1**) e ácido ferúlico proveniente da curcumina (**2**). Os resultados químicos obtidos nesta etapa do trabalho serão discutidos adiante assim como a caracterização por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de Massas do principal representante desta série molecular.

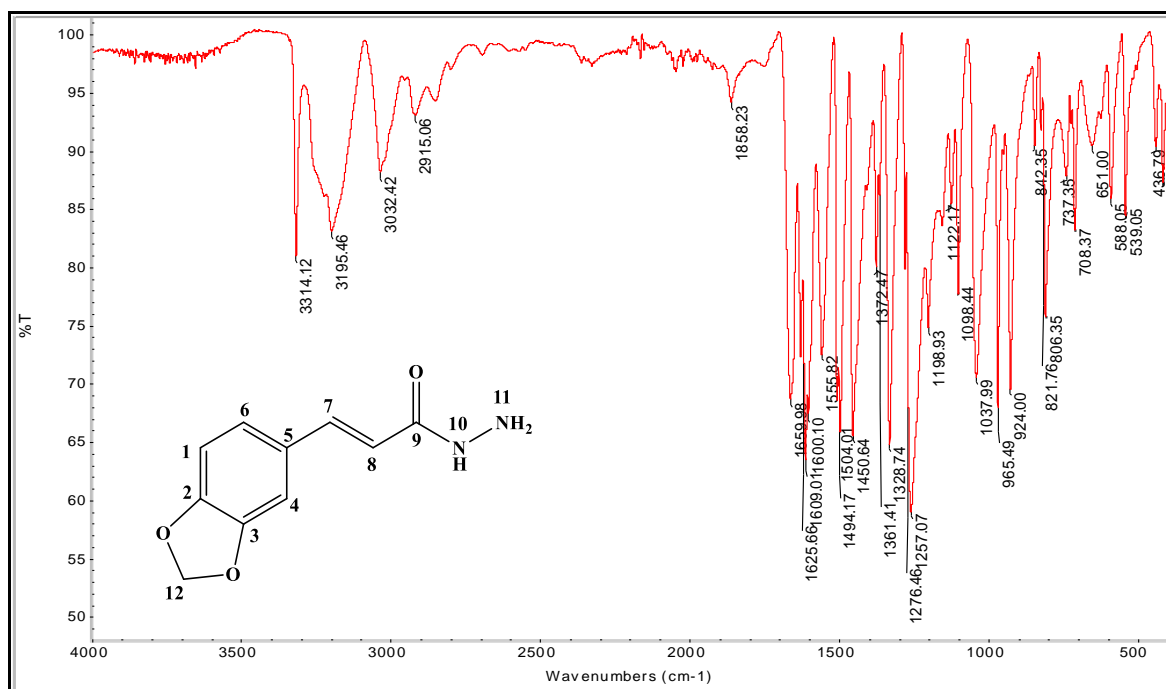
4.5.1 Síntese dos intermediários hidrazídicos α,β -insaturados (**26b-j**)

Foram sintetizadas dez substâncias, PQM-263 a PQM-272 (**30a-j**), inspiradas na curcumina (**2**) e no donepezil (**1**). A etapa sintética inicial foi a obtenção dos intermediários hidrazídicos (**26a-j**) a partir de diferentes ácidos funcionalizados $\alpha\beta$ insaturados (**26a-j**). O processo de formação de ligações carbono-nitrogênio foi realizado na presença de reagentes como HOBT, EDC em acetonitrila, a metodologia usada foi a mesma descrita no numeral 4.3.3 na pág. 88. Os intermediários foram isolados por filtração simples em fase aquosa, com sucesso e com rendimentos compreendidos entre 28 e 96%. Uma vez obtidas, as hidrazidas foram submetidas ao acoplamento com 1-benzil-piperidona (**29**). Como exemplo de caracterização estrutural para a série C de compostos hidrazídicos $\alpha\beta$ insaturados, será apresentada aqui a caracterização do composto intermediário (**26h**). Este derivado foi caracterizado pela análise dos seus espectros de Infravermelho (IV) e de RMN de ^1H , de ^{13}C e espectroscopia de Massas.

4.5.2 Caracterização do intermediário 26h (Série C)

No espectro na região do infravermelho (**Figura 61**) foram observadas as principais bandas esperadas para a estrutura proposta (**26h**). Banda de estiramento N-H de amida secundária em 3314 cm^{-1} e duas bandas de estiramento de N-H de amins primárias em 3195 cm^{-1} , banda de estiramento de C=O de amida em 1659 cm^{-1} . Finalmente, banda característica de éteres em 1257 cm^{-1} e banda de estiramento da ligação C-O-C (assimétrico) em 924 cm^{-1} . A ausência de uma banda larga característica do estiramento OH em ácidos carboxílicos e o deslocamento da banda de estiramento de C=O de menor intensidade, confirma a formação do produto desejado a partir do ácido de partida.

Figura 61 - Espectro de absorção na região IV do composto intermediário **26h** (ATR).

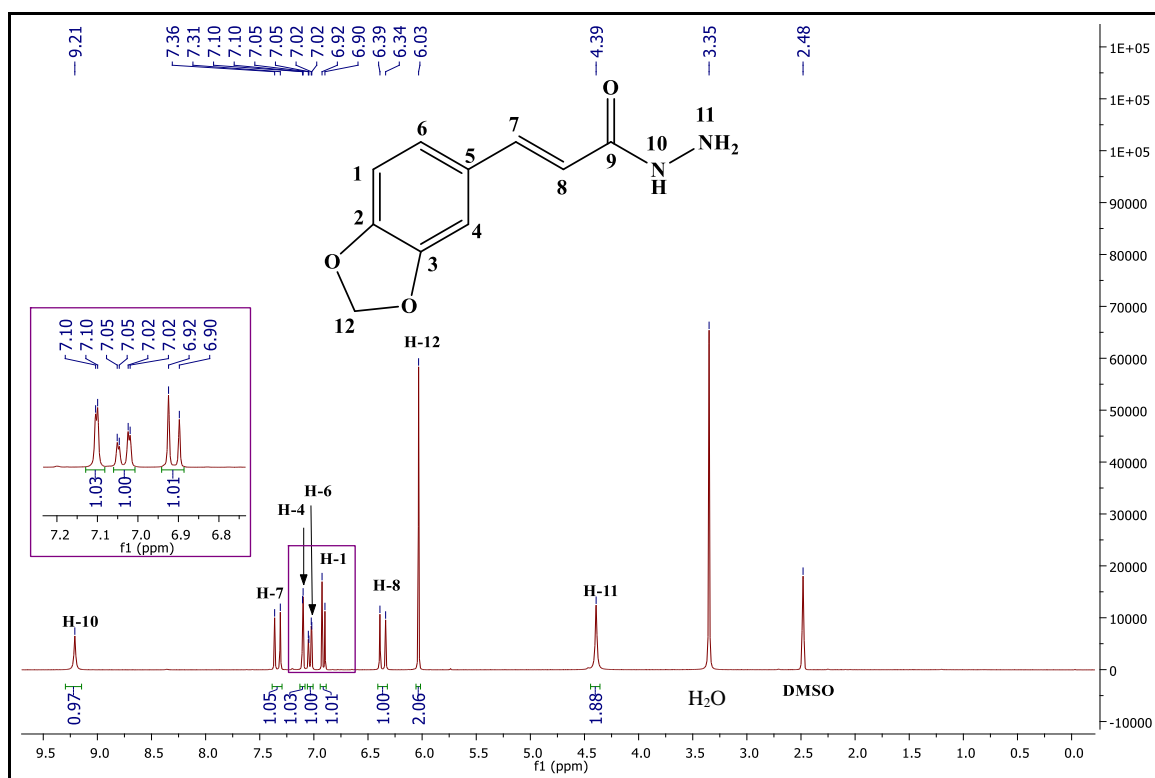


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ¹H (**Figura 62**) observou-se um simpleto em 6,03 ppm, referente aos hidrogênios do benzodioxol (H-12), além dos dupletos em 6,36 e 7,34 ppm

($^3J_{H8-H7}= 15,76$ Hz e $^3J_{H7-H8}=15,76$ Hz, respectivamente) referentes aos hidrogênios $\alpha\beta$ carbonílicos. Também foram identificados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos como dupletos em 6,91 e 7,10 ppm ($^3J_{H1-H6}= 8,01$ Hz e $^4J_{H4-H6}= 1,50$ Hz, respectivamente) e um conjunto de duplo-dupletos em 7,04 ppm ($^4J_{H4-H6}= 1,50$ e $^3J_{H1-H6}= 8,01$ Hz). Finalmente, os hidrogênios hidrazídicos: H-11 e H-10; como singletos em 4,39 e 9,31 ppm, respectivamente (**Anexo A e B**).

Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto intermediário **26h**.



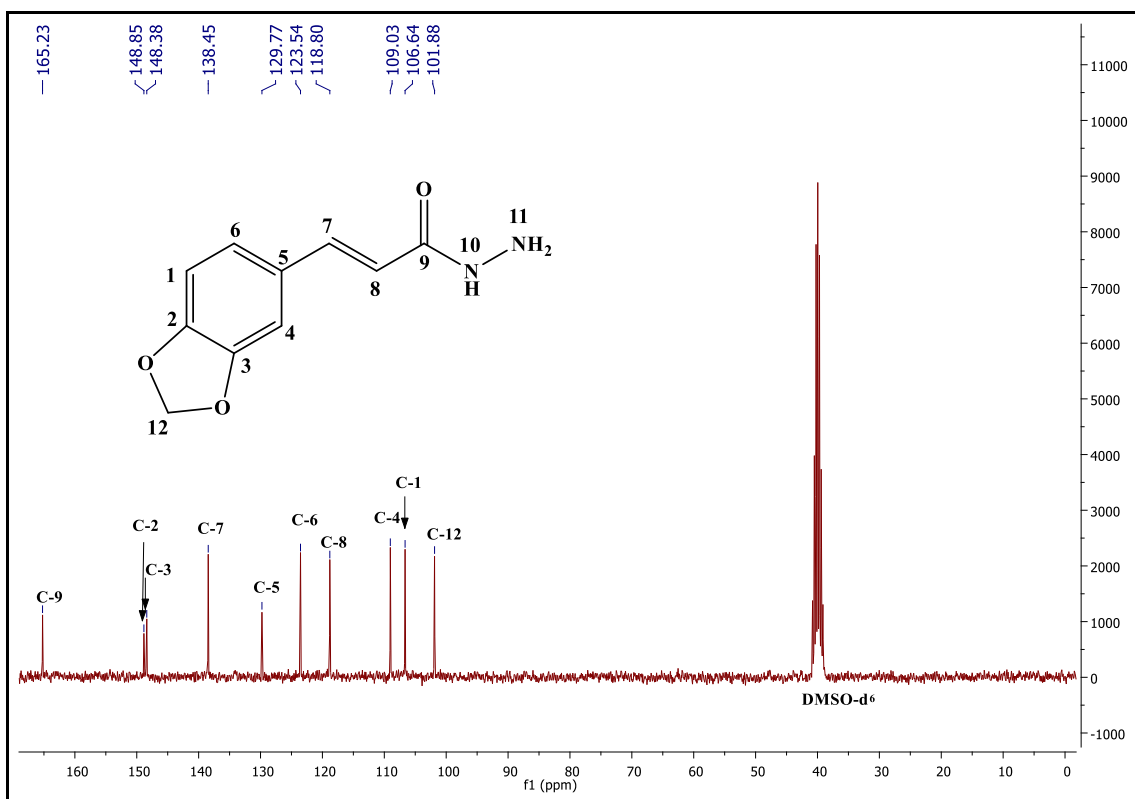
Fonte: do autor.

Os hidrogênios do benzodiazol (H-12) são os H- sp^3 mais desblindados devido ao efeito da eletronegatividade dos oxigênios vizinhos, deslocando-os em 6,03 ppm. Da mesma forma como aconteceu com os compostos da série B, nesta série C empregou-se DMSO- d_6 para permitir a observação dos hidrogênios ligados no nitrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 63**) observaram-se todos os sinais relativos aos 10 carbonos da estrutura de **26h**. O carbono C-12 do grupo benzodiazola em 101,9

ppm. Em 165,2 ppm (C-9) foi identificado o sinal referente ao carbono carbonílico de hidrazida; os sinais em 148,9 (C-2); 148,4 (C-3); 129,8 (C-5); 123,5 (C-6); 109,0 (C-4) e 106,6 ppm (C-1) referentes aos carbonos do anel aromático e os sinais em 138,5 ppm (C-7) e 118,8 ppm (C-8), referentes aos carbonos da insaturação $\alpha\beta$ carbonílica (**Anexos A e B**). Os sinais foram atribuídos com ajuda do mapa de correlação, HSQC.

Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto intermediário **26h**.



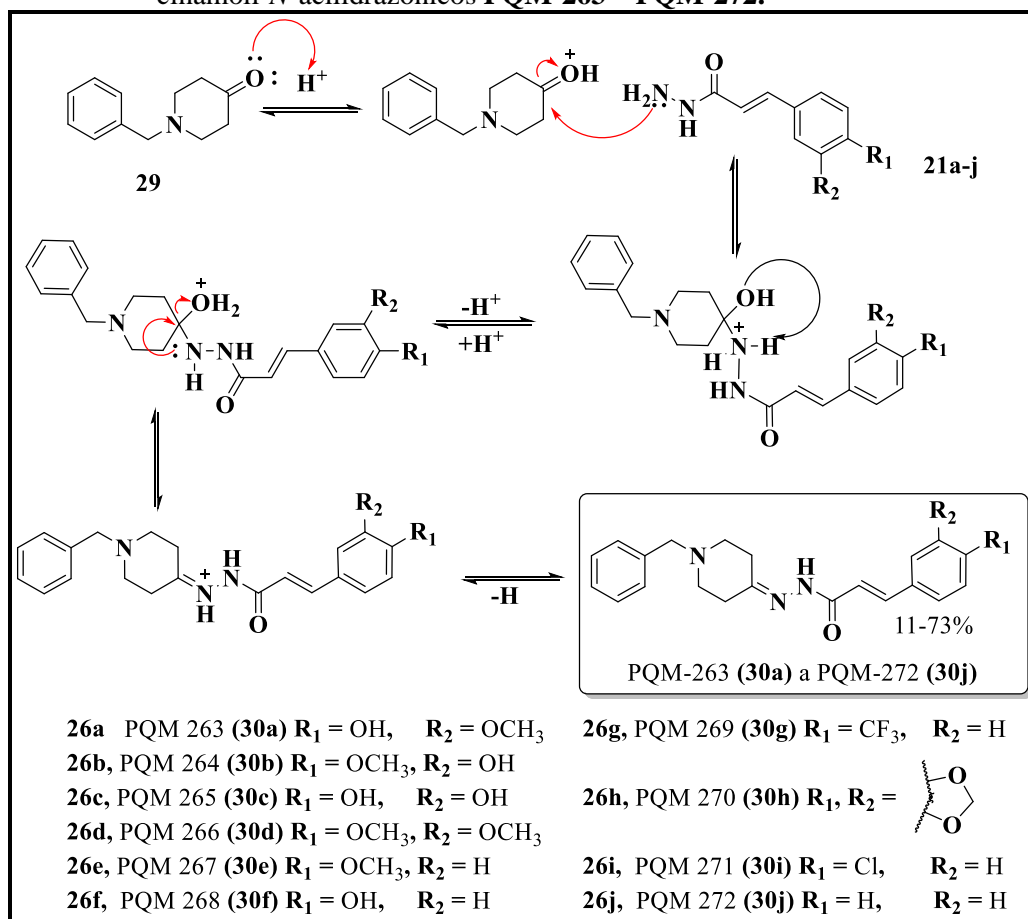
Fonte: do autor.

4.5.3 Obtenção dos derivados cinamoil-*N*-acilidrazônicos (série C)

Os intermediários hidrazídicos $\alpha\beta$ insaturados **26a-j** foram acoplados com 1-benzil-4-piperidona (**29**), nova classe de derivados cinamoil-*N*-acilidrazônicos concebidos por hibridação molecular com o donepezil (**1**). Sintetizou-se dez derivados mono e dissustituídos, usando substituintes como cloro, triflúormetila, metoxila, hidroxila e

diazola, nas posições *orto* e *para* do anel aromático, os quais estavam disponíveis no nosso laboratório. A reação foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 3 dias em metanol em meio ligeiramente ácido; o produto-final foi isolado por filtração e recristalizado em etanol, quando necessário foi purificado por coluna cromatográfica em gel de sílica.

Figura 64 - Proposta de mecanismo da formação dos derivados *N*-benzilpiperidinil-cinamoil-*N*-acilidrazônicos PQM-263 – PQM-272.



Fonte: do autor.

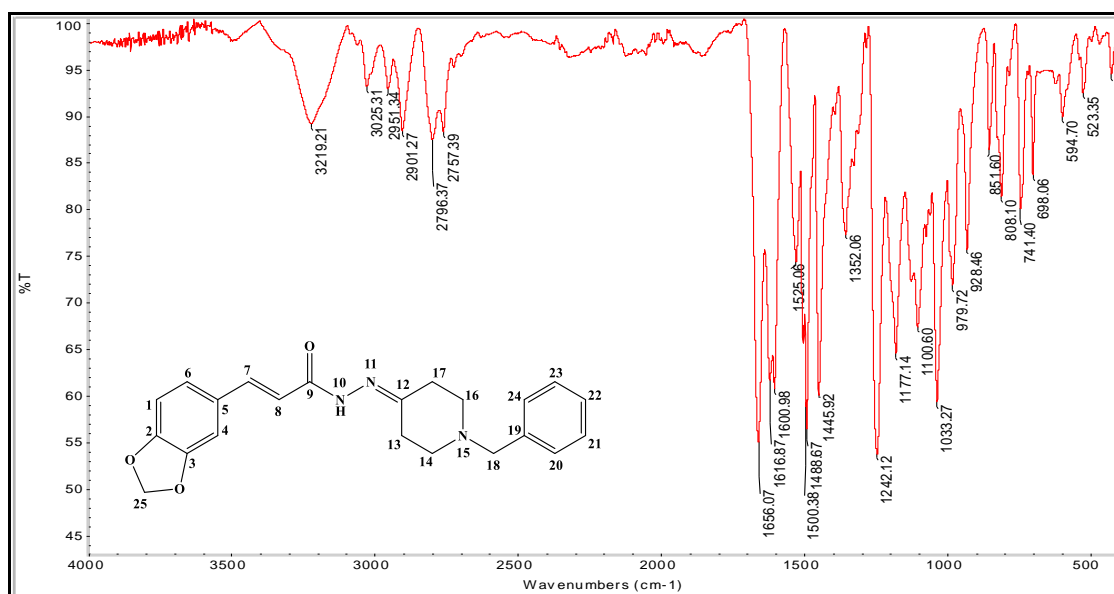
A adição de nucleófilos a alcenos conjugados deficientes em elétrons (por exemplo, ésteres, cetonas, aldeídos e amidas α , β -insaturadas,) é uma das reações mais importantes na formação de ligações carbono-carbono e carbono-heteroátomos em síntese orgânica (CALOW *et al.*, 2014). Na **Figura 64** está representada a proposta de

mecanismo para este tipo de reação, as iminas são formadas quando qualquer amina primária reage com um aldeído ou cetona sob condições apropriadas.

4.5.4 Caracterização do híbrido donepezil-talidomida PQM-270 (30j).

A análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C nos confirmou a obtenção dos produtos PQM-263 a PQM-272 (30a-j) (Anexos A e B). Como exemplo de caracterização estrutural para essa série de compostos, será apresentada aqui a caracterização do composto PQM-270 (30j). Este derivado foi caracterizado pela análise dos seus espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , infravermelho e EM.

Figura 65 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto PQM-270 (30j) (ATR).



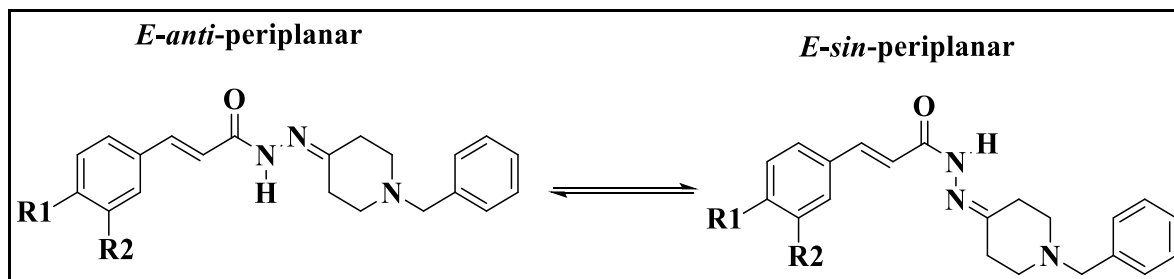
Fonte: do autor.

O espectro na região do infravermelho (**Figura 65**) da substância PQM-270 (30j) apresenta estiramento N-H em 3219 cm^{-1} , estiramento $\text{C}_{\text{sp}2}$ em 3025 cm^{-1} , estiramento de $\text{C}_{\text{sp}3}$ em 2951 cm^{-1} , estiramento de C=O de acilidrazonas em 1656 cm^{-1} , banda de estiramento C=C de compostos carbonílicos α,β -insaturados em 1616 cm^{-1} , estiramento

C=N em 1600 cm^{-1} estiramento C=C aromático em 1525 cm^{-1} , bandas de estiramento assimétrico da ligação C-O-C em 928 cm^{-1} .

Nos espectros de RMN da série C identificou-se o mesmo padrão de sinais observado na série B, visto que as estruturas são semelhantes foi sugerida a presença de isômeros conformacionais (*ap* e *sp*), existência que foi comprovada na série B a través de relatos na literatura (DA SILVA *et al.*, 2016; LOPES, A. B. *et al.*, 2013; PALLALL *et al.*, 1986) e com ajuda de RMN com curva de aquecimento em 6 temperaturas diferentes ($24,5$ a $74,5^\circ\text{C}$). À medida que a temperatura aumentou, ocorreu a interconversão entre os isômeros conformacionais derivados da rotação em torno da ligação amida, confirmando nossa teoria sobre a duplicidade dos sinais (**Figura 48**, pág. 99). Assim, o hidrogênio de NH pode ser *sin*-periplanar (*sp*) ou *anti*-periplanar (*ap*) em relação ao átomo de oxigênio carbonílico do isômero *E* (**Figura 66**). O isômero *E* é mais estável que o isômero *Z*, portanto, o único comumente observado em DMSO-*d*₆. Enquanto, o confôrmero *ap* é o mais estável entre os dois possíveis confôrmeros por apresentar menor impedimento estérico, portanto, foi relatado tendo o sinal de maior intensidade que seu par *sp* ao momento de atribuir os sinais.

Figura 66 - Estrutura geral dos confôrmeros da série C, *sin*-periplanar (*sp*) ou *anti*-periplanar (*ap*).

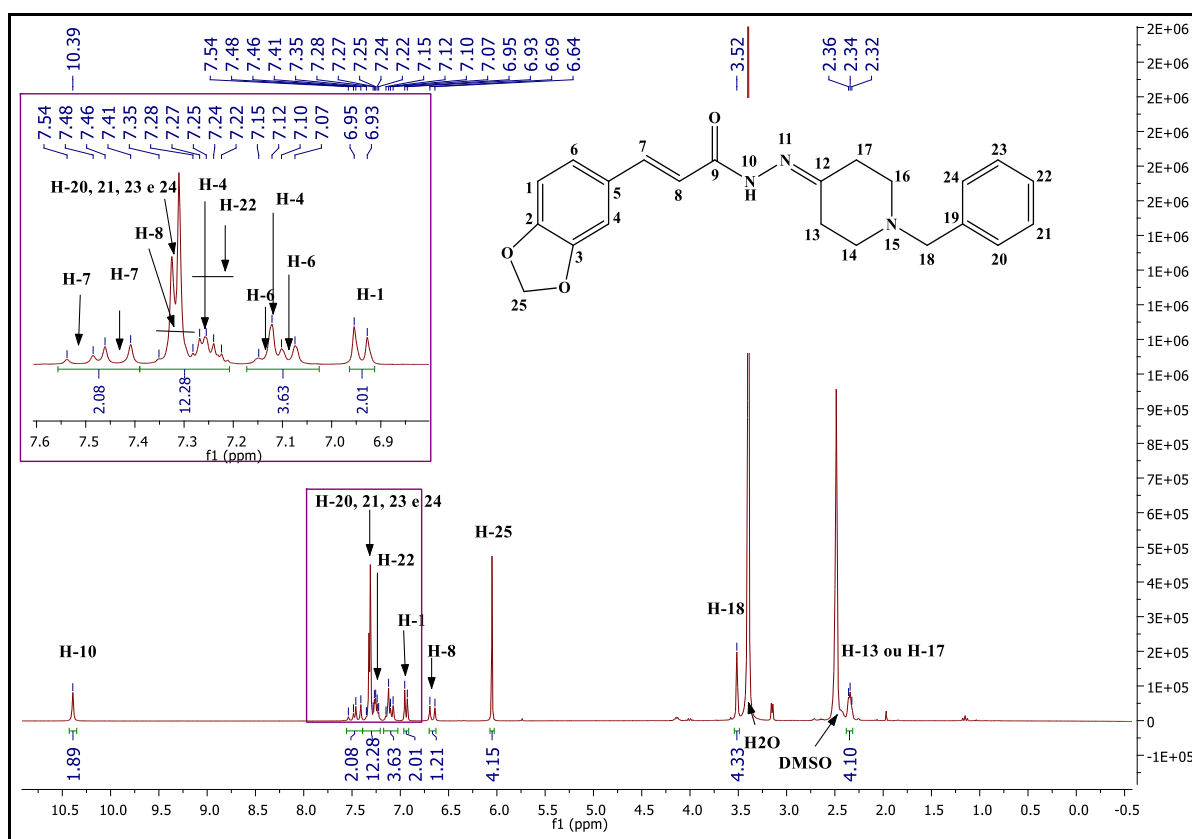


Fonte: adaptado de (DA SILVA *et al.*, 2016)

No campo alto do espectro de RMN de ^1H (**Figura 67**) do composto PQM-270 (**30j**). Observou-se um simpleto em $11,39\text{ ppm}$, com integral de ≈ 2 alusiva aos hidrogênios hidrazídicos (H10' e H10) dos rotâmeros *sp/ap*, respectivamente. Seguidos pelos dupletos em $7,51$ e $7,43\text{ ppm}$ referentes aos hidrogênios (H7' e H7) da $\alpha\beta$ insaturação ($^3J_{\text{H7-H8}}=15,93\text{ Hz}$; $15,68\text{ Hz}$, respectivamente) e mais dois dupletos em $7,32$

e 6,67 ppm referentes aos outros hidrogênios (H8' e H8) da $\alpha\beta$ insaturação ($^3J_{H7-H8}=15,93$ Hz; 15,68 Hz, respectivamente). Os sinais referentes aos hidrogênios do anel piperidínico estão debaixo do sinal do DMSO, o que impediu sua identificação no espectro de hidrogênio, porém foi possível ver um único tripleto (H-13 ou H-17) em 2,34 ppm (J_{H13} ou $H17= 5,11$ Hz, 4H). Finalmente, os demais sinais referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos da estrutura estão relatados nos anexos deste trabalho (**Anexos A e B**).

Figura 67 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto PQM-270 (**30j**).

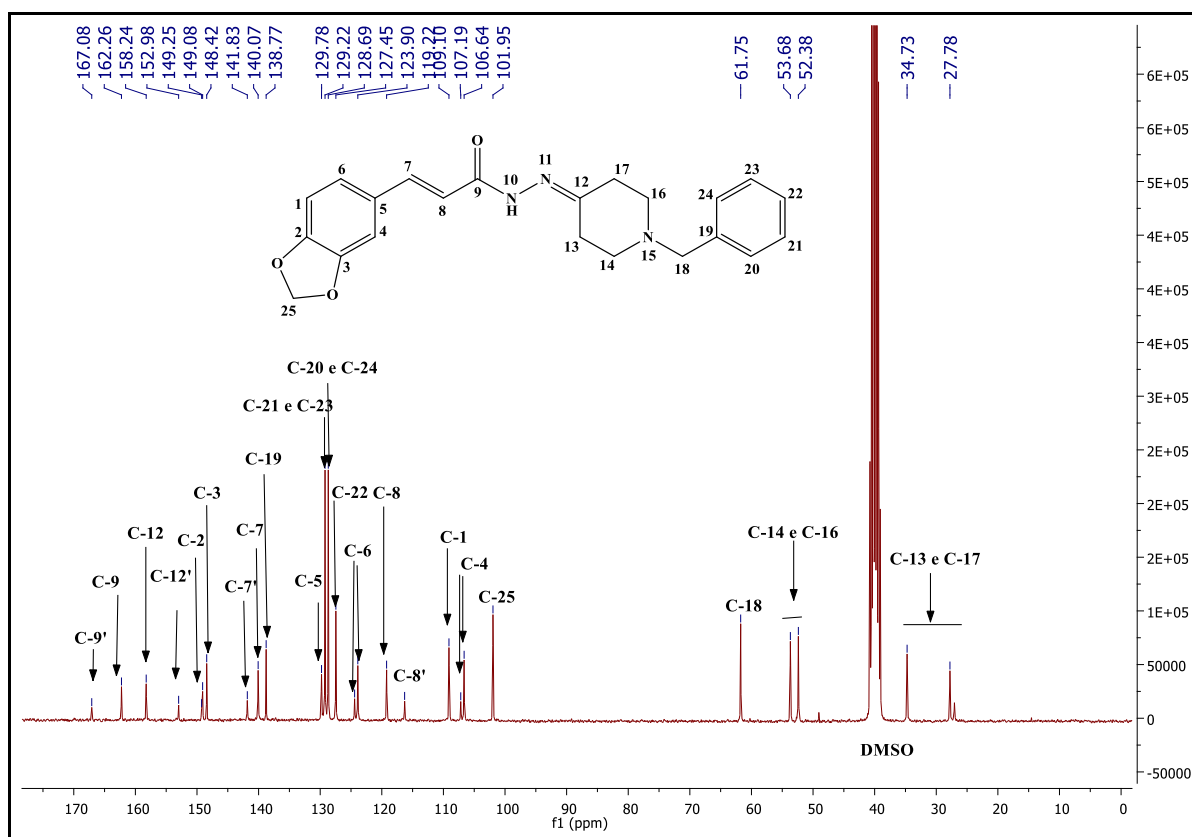


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) (**Figura 68**) observou-se todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura de PQM-270 (**30j**). No espectro também se confirmou a presença dos confôrmers *ap* e *sp* como foi relatado com a série B deste trabalho. Foram identificados os carbonos carbonílicos (C9' e C9) em 167,8 e 162,3 ppm,

respectivamente. O deslocamento mais característico concerne aos carbonos da ligação imina C=N (C12 e C12') em 158,2 e 152,9 ppm das duas conformações e que corroboram a formação do composto sintetizado. Dos sinais em 141,8 e 140,1 (C7' e C7, respectivamente) e dois mais em 119,2 e 116,3 (C8 e C8', respectivamente) referentes da $\alpha\beta$ insaturação. Os sinais foram atribuídos com ajuda do mapa de correlação de HSQC. Os demais sinais e suas atribuições estão relatados nos anexos deste trabalho (**Anexos A e B**).

Figura 68 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto PQM-270 (**30j**).



Fonte: do autor.

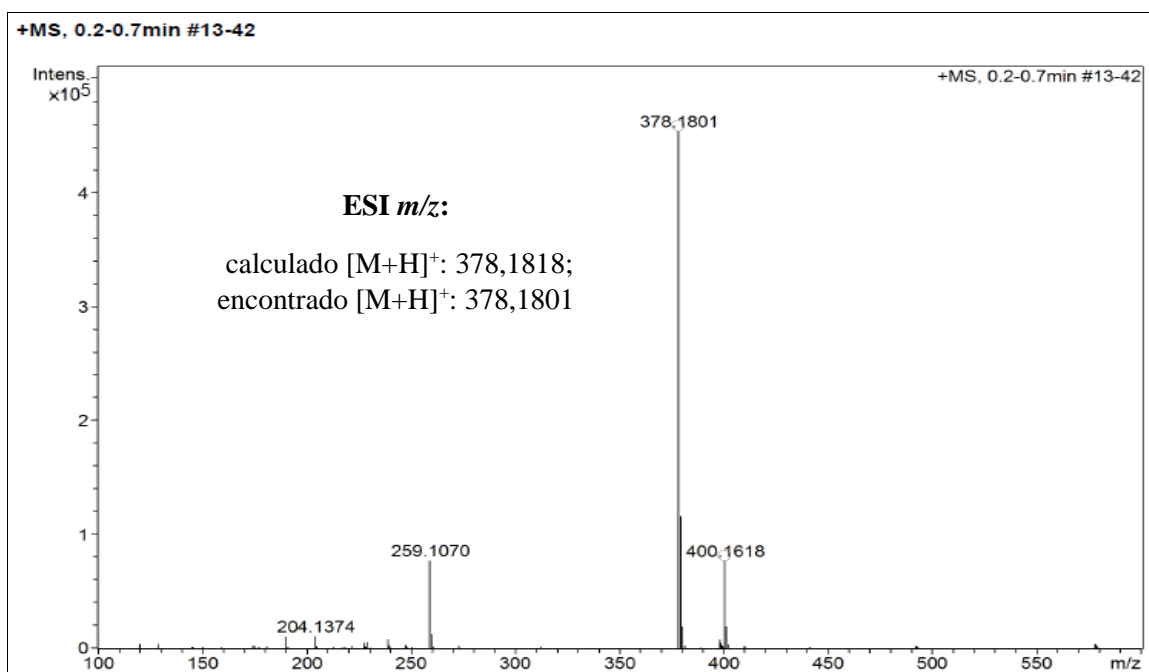
Os sinais mais característicos dos dois confômeros (*sp/ap*) para cada um dos derivados da série C estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais dos derivados *N*-acilidrazônicos **PQM 263** a **PQM 272** (DMSO-*d*₆) e **PQM-269** (Piridina-*d*₅).

Composto	H-7		H-8		CO-NH		C-12	
PQM 263 (30a)	7,45	7,53	6,66		10,33	10,36	152,1	157,2
PQM 264 (30b)	7,37	7,45	6,61	7,25	10,34	10,36	152,1	157,2
PQM 265 (30c)	7,42	7,36	7,17	6,55		10,32	152,2	157,3
PQM 266 (30d)	7,46	7,55	6,70	7,30		10,36	152,1	157,2
PQM 267 (30e)	7,49	7,55	6,73	7,28	10,41	10,45	152,3	158,1
PQM 268 (30f)	7,41	7,50	6,61	7,23	10,30	10,34	152,3	157,3
PQM 269 (30g)	8,06	8,14	7,05	7,38	11,34	11,40	152,1	157,2
PQM 270 (30h)	7,43	7,51	6,67	7,32		10,39	152,9	158,2
PQM 271 (30i)	7,49	7,54	6,81	7,27	10,45	10,51		159,2
PQM 272 (30j)	7,55	7,62	6,87		10,48		153,7	158,7

Fonte: do autor.

Figura 69 - Espectro de massas do composto PQM-270 (**30j**) (ESI-MS).



Fonte: do autor.

Finalmente, foi obtido o espectro de massas no modo positivo para determinar o pico molecular do composto PQM-270 (**30j**) (**Figura 69**), onde observou-se o pico do íon *quasi*-molecular, [M+H]⁺ com relação *m/z* de 378,1801, para um calculado de [M+H]⁺:

378,1818. A análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , HSQC e Massas, confirmou-se a obtenção do produto-chave PQM-270 (**30j**).

4.6 AVALIAÇÃO FARMACOLOGICA (SERIE C)

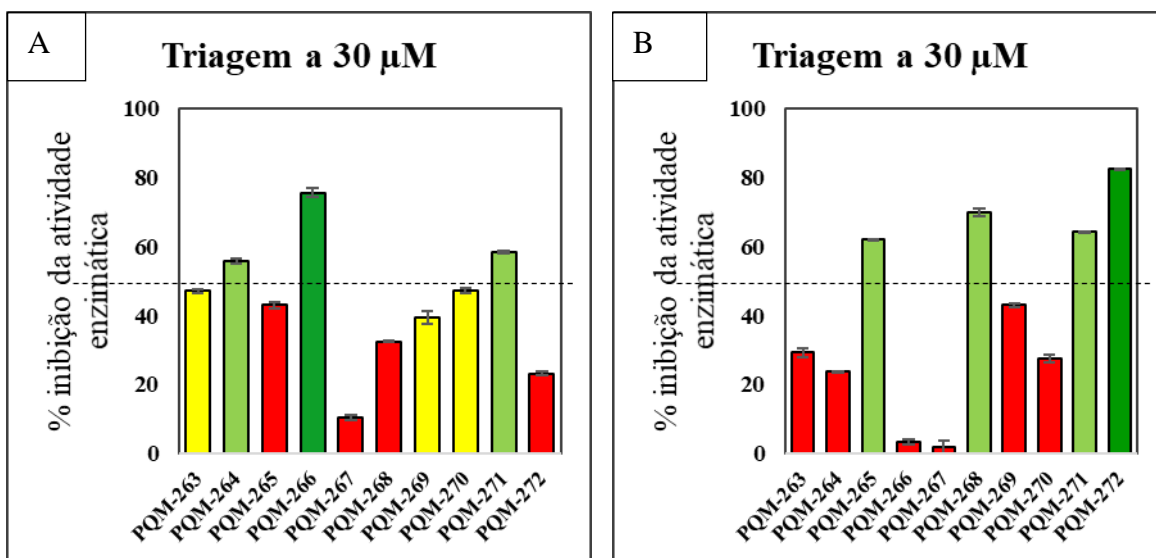
4.6.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro* (método modificado de Ellman).

Uma vez sintetizados e caracterizados os 10 compostos da série C, planejados como inibidores das colinesterases, foram submetidos a ensaios farmacológicos *in vitro* de inibição das enzimas AChE e BuChE no laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Método B). Determinou-se a atividade inibitória, a potência (CI_{50}) de inibição e seletividade de inibição de AChE *x* BuChE dos compostos.

Inicialmente foi realizada uma triagem de todos os compostos sintetizados. A **Figura 70 (A)** apresentam os dados da análise *in vitro* da porcentagem de inibição sob a enzima AChE dos compostos PQM-263 a PQM-272 (**30a-j**) em uma concentração de 30 μM . A análise dos compostos demonstrou inibição da atividade enzimática em torno de 50%, ou maior, para 6 compostos. Os mesmos foram separados em faixas de inibição, a saber: Verde escuro (inibição >75%) para o composto PQM-266 (**30d**); Verde claro (inibição entre 50 e 75%) para os compostos PQM-264 (**30b**) e PQM-271 (**30i**); Amarelo (inibição entre 45 e 50%) para os compostos PQM-263 (**30a**), PQM-269 (**30g**) e PQM-270 (**30h**); e vermelho (inibição <45%) para os demais compostos.

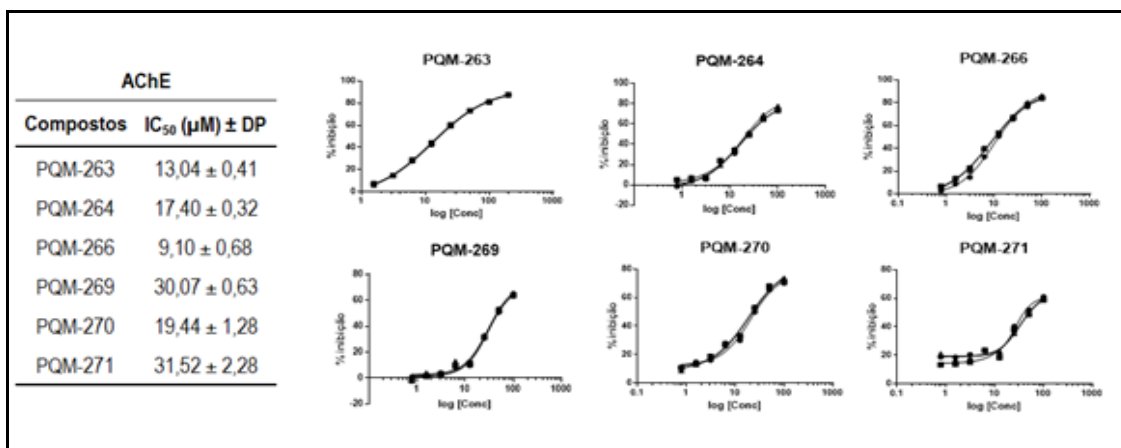
Posteriormente, foi avaliado o potencial inibidor sob enzima BuChE. Os dados da análise *in vitro* da porcentagem de inibição em uma concentração de 30 μM estão relatados na **Figura 70 (B)**. A análise dos compostos demonstrou inibição da atividade enzimática superior a 50% para 4 compostos separados em faixas de inibição, a saber: Verde escuro (inibição >75%) para o composto PQM-272 (**30j**); Verde claro (inibição entre 50 e 75%) para os compostos PQM-265 (**30c**); PQM-268 (**30f**) e PQM-271 (**30i**); e vermelho (inibição <45%) para os demais compostos.

Figura 70 - (A) Triagem *in vitro* da atividade inibitória sob a enzima acetilcolinesterase (AChE) e (B) inibitória sob a enzima butirilcolinesterase (BuChE) dos compostos PQM-263 a PQM-272 (30a-j).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Interessante observar, que PQM-266 (30d) foi seletivo na inibição de AChE, PQM-268 (30f) e PQM-272 (30j) foram seletivos para BuChE, enquanto, PQM-271 (30i) inibiu inibição as duas enzimas. Estas características podem ser aproveitadas no tratamento da DA, devido que na etapa mais avançada da DA, a ACh é principalmente hidrolisada pela BuChE. Significando um aumento da atividade da BuChE (ANAND; SINGH, 2013), portanto, levando à diminuição do nível de ACh no estágio tardio da DA. Logo, o desenvolvimento de um inibidor seletivo da BuChE como PQM-268 (30f) e PQM-272 (30j), pode representar uma estratégia terapêutica interessante no estado mais avançado da doença (LI, Q. *et al.*, 2017). Sobre inibidores duais de AChE-BuChE, atualmente a rivastigmina (6) é o único inibidor dual aprovado pela FDA para tratamento da DA na etapa leve, moderada e grave, e na DP no estágio leve a moderado, demonstrando melhoras no progresso cognitivo dos pacientes (KANDIAH *et al.*, 2017). Isto sugere que os inibidores duais de AChE-BuChE como PQM-271 (30i) também podem ser considerados como uma vantagem terapêutica para demências corticais (DA e DP), beneficiando a cognição y tratando os sintomas comportamentais.

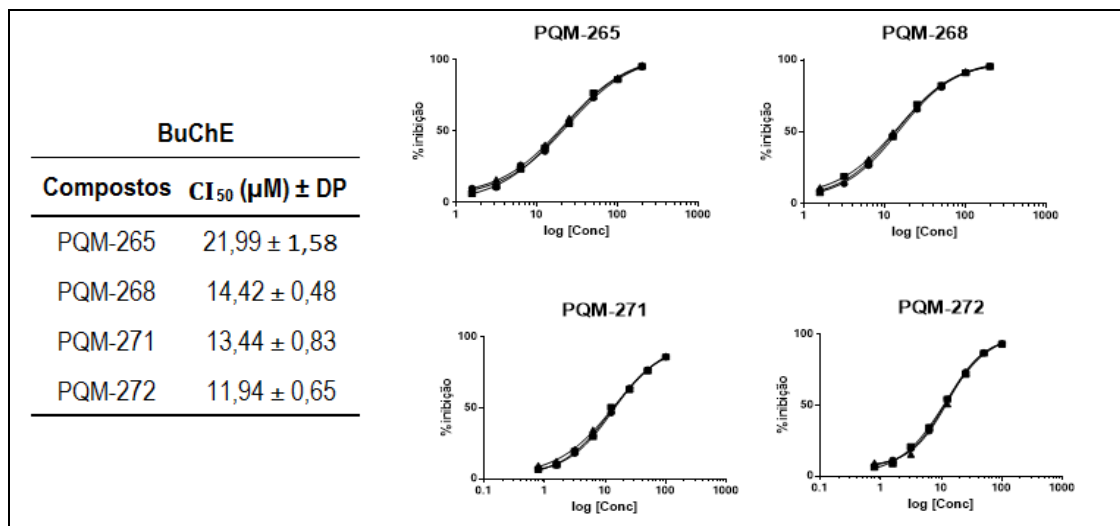
4.6.1.1. Determinação do CI_{50} frente AChE e BuChE**Figura 71** - Resultados de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI_{50} para os compostos mais ativos frente à enzima acetilcolinesterase (AChE).

Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Na seguinte etapa avaliou-se o potencial de inibição (CI_{50}) dos compostos que apresentaram um percentual de inibição maior de 45 % de inibição (faixa amarela e verde) na concentração de 30 μ M. Os demais compostos apresentaram um percentual de inibição baixo (faixa vermelha), por este motivo não se continuou com eles para os outros ensaios.

As substâncias analisadas apresentaram valores de CI_{50} que variaram entre 9,10 - 31,52 μ M para a inibição da AChE, onde o composto mais ativo foi o PQM-266 (**30d**) ($CI_{50} = 9,10 \mu$ M, **Figura 71**); e entre 11,94 - 21,99 μ M para BuChE, onde o mais ativo foi o PQM-272 (**30j**) ($CI_{50} = 11,94 \mu$ M, **Figura 72**). Os valores obtidos de desvio padrão (DP) foram inferiores a 10% do CI_{50} de acordo com o recomendado pela literatura.

Figura 72 - Resultados de inibição enzimática dose-resposta para o cálculo dos valores de CI_{50} para os compostos mais ativos frente à enzima butirilcolinesterase (BuChE).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Cabe destacar que os demais compostos, com exceção do PQM-263 (**30a**), PQM-265 (**30c**) e PQM-268 (**30f**), foram insolúveis em meio aquoso tamponado à concentração de 200 μM , deste modo, a curva de inibição foi realizada a partir da concentração mais alta de 100 μM para estes e 200 μM para os compostos solúveis. Ademais, houve a necessidade de aquecer a 50°C por 1 minuto os compostos PQM-269 (**30g**), PQM-270 (**30h**) e PQM-271 (**30i**), para que estes fossem solúveis a concentração final desejada (100 μM). As curvas de porcentagem de inibição versus o logaritmo da concentração (μM) obtidas, para todos os compostos, apresentaram um padrão sigmoidal, característico da inibição enzimática do tipo dose-resposta, com exceção do PQM-269 (**30g**) e PQM-271 (**30i**) (em AChE), onde o máximo de inibição não pode ser determinado devido à não solubilidade dos mesmos a concentrações superiores à 100 μM .

A análise da relação estrutura-atividade, sugeriu que os compostos dissustituídos são mais ativos que os monossustituídos e não substituídos. Também, a troca de uma hidroxila (PQM-265 (**31c**)) por uma metoxila (PQM-266 (**30d**)) na posição *meta* do anel aumenta a potência de inibição sob a AChE. Além disso, duas metoxilas em *orto* e *para*, aumentam tanto a potência de inibição, quanto a seletividade sob AChE destacando ao composto PQM-266 (**30d**) com o melhor perfil de substituição. Porém, a influência dos

substituintes na atividade sob a BuChE foi diferente, sugerindo que a ausência de substituintes aumenta tanto a potência de inibição, quanto a seletividade sob a BuChE (PQM-272 (**30j**)). Finalmente, observou-se que a presença de uma hidroxila na posição *para* do anel também aumenta a atividade inibitória dos compostos sobre a BuChE.

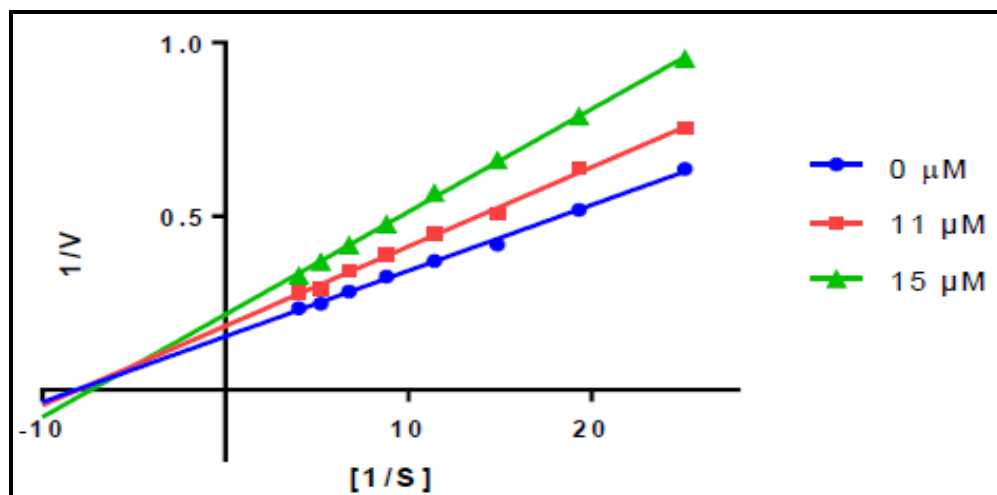
4.6.1.2 Cinética Enzimática da série C frente a AChE e BuChE

Na seguinte etapa se determinou o mecanismo de inibição enzimática da AChE frente ao composto PQM-263 (**30a**, **Figura 73**) e da BuChE frente ao composto PQM-272 (**30j**, **Figura 74**), em diferentes concentrações, cujos resultados levaram ao gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, usado como uma ferramenta para calcular os parâmetros cinéticos da enzima. Deste modo sabe-se que:

- A inclinação é K_m/V_{max}
- A abscissa na origem ($1/V = 0$) é $-1/K_m$
- A ordenada na origem ($1/[S] = 0$) é $1/V_{max}$

Com base nos valores da constante de Michaelis-Menten (K_m), a velocidade máxima ($V_{máx}$) e do perfil do gráfico de Lineweaver-Burk, observou-se que o tipo de inibição promovida pelo compostos testados é do tipo mista, se ligando tanto ao sítio catalítico da enzima (inibição competitiva) quanto ao sítio alostérico (inibição não-competitiva), atuando, assim, de duas maneiras diferentes. Desta forma, foram calculadas duas constantes de afinidade para cada um dos compostos, nas respectivas enzimas as quais foram ensaiadas a partir do gráfico, as constantes de afinidade, sendo elas K_i (inibição competitiva) e $K_{i'}$ (inibição não-competitiva), conforme pode ser observado nos dados abaixo (**Tabela 10** e **Tabela 11**).

Figura 73 - Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* do composto PQM-263 (**30a**).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Nota: V: velocidade e [S]: concentração do substrato.

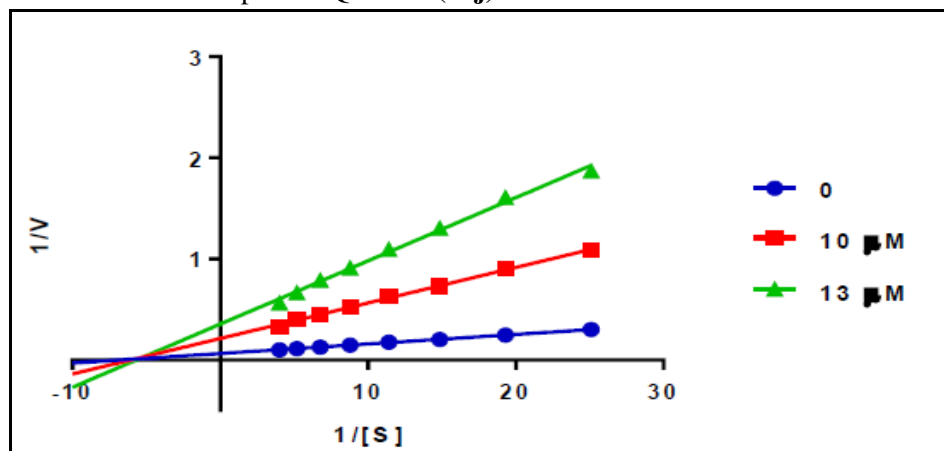
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de PQM-263 (**30a**) em AChE

Concentração (μM)	$V_{\max} \pm SD$ (μM/min)	$K_m \pm SD$ (μM)	$K_i (\mu M) \pm SD$	$K_i' (\mu M) \pm SD$
0	7.15 ± 0.495	133.90 ± 1.41		
11	5.88 ± 0.207	148.35 ± 2.47	19.04 ± 0.823	40.31 ± 1.628
15	6.39 ± 0.276	228.00 ± 13.0		

Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Nota: V_{\max} : Velocidade máxima. K_m : constante de Michaelis-Menten; Dados obtidos \pm desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes. K_i : Constante de afinidade para inibição competitiva. K_i' : Constante de afinidade para inibição não-competitiva.

Figura 74 - Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBuChE do composto PQM-272 (**30j**).



Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Nota: V: velocidade e [S]: concentração do substrato.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de PQM-272 (**30j**) em BuChE.

Concentração (μM)	$V_{\max} \pm SD^a$ (μM/min)	$K_m \pm SD^b$ (μM)	$K_i (\mu M) \pm SD^c$	$K_i' (\mu M) \pm SD^d$
0	16.09 ± 0.292	152.93 ± 0.28		
10	5.17 ± 0.288	191.75 ± 3.18	1.62 ± 0.020	3.35 ± 0.039
13	3.14 ± 0.136	247.75 ± 1.34		

Fonte: Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM).

Nota: V_{\max} : Velocidade máxima. K_m : constante de Michaelis-Menten; Dados obtidos \pm desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes. K_i : Constante de afinidade para inibição competitiva. K_i' : Constante de afinidade para inibição não-competitiva.

4.6.2 Estudo de *docking* molecular

Para compreender os resultados encontrados no ensaio de inibição *in vitro* das colinesterases foi realizado estudos de *docking* molecular com todos os compostos da série C. Foram selecionadas três conformações representativas da AChE, além da estrutura da AChE humana complexada com donepezil (código PDB 4EY7). As

estruturas selecionadas foram: 1ZGC (*Torpedo californica*), 2CKM (*Torpedo californica*), 1Q84 (*Mus musculus*) e 4EY7 (*Homo sapiens*). Os resultados de ancoramento para a série molecular C e donepezil (referência) estão listados na **Tabela 12**.

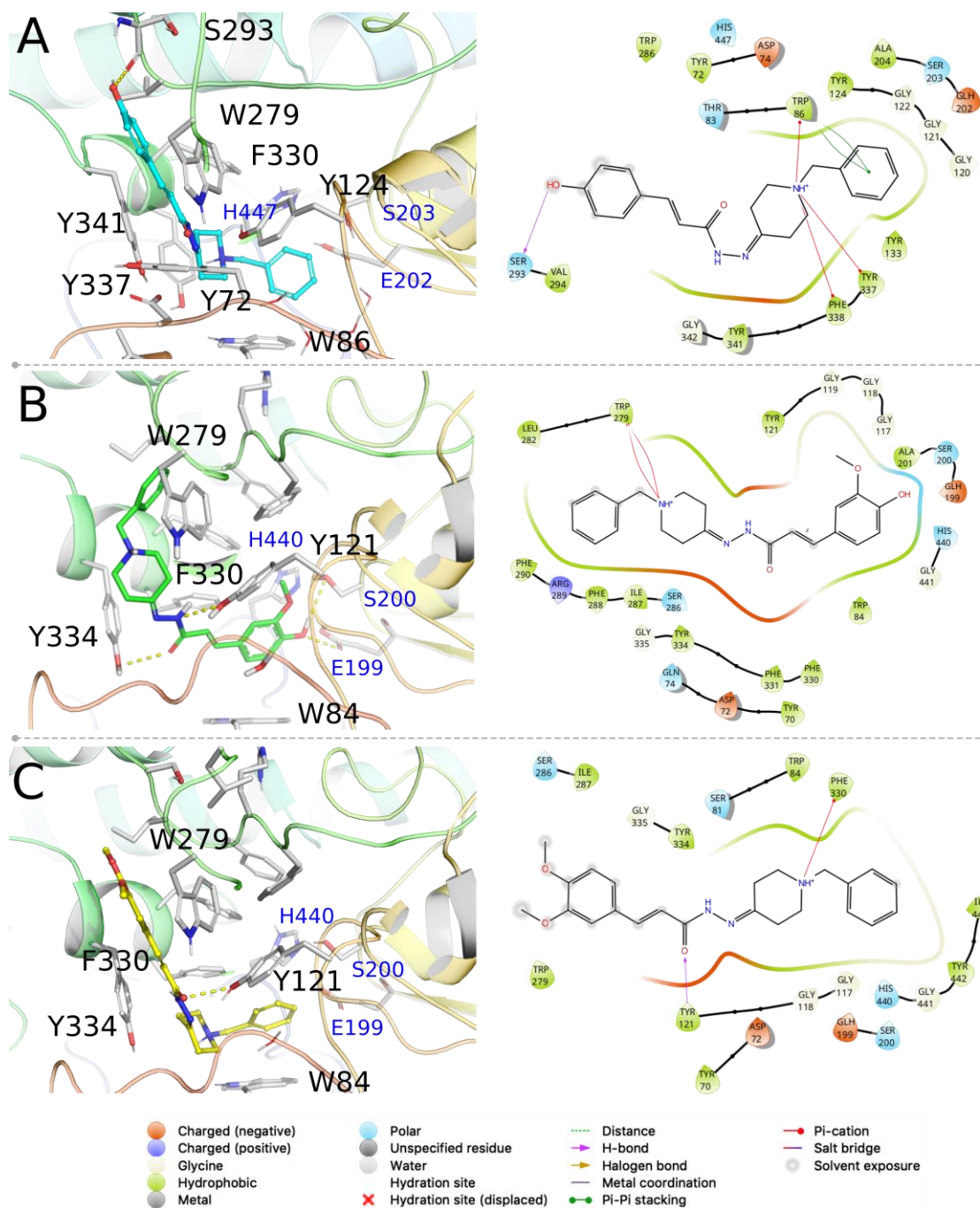
Tabela 12 - Scores de docking

Composto	Docking Score				Ensemble Docking	
	1ZGC	1Q84	2CKM	4EY7	Score	PDB ID
PQM 263 (30a)	-12,960	-9,326	-7,110	-9,160	-12,960	1ZGC
PQM 264 (30b)	-12,131	-9,902	-6,794	-9,421	-12,131	1ZGC
PQM 265 (30c)	-11,029	-10,486	-7,634	-8,274	-11,029	1ZGC
PQM 266 (30d)	-11,941	-10,221	-6,350	-7,070	-11,941	1ZGC
PQM 267 (30e)	-8,800	-9,726	-6,554	-6,600	-9,726	1Q84
PQM 268 (30f)	-9,520	-9,999	-8,767	-14,142	-14,142	4EY7
PQM 269 (30g)	-9,039	-8,513	-8,680	-7,732	-9,039	1ZGC
PQM 270 (30h)	-10,973	-9,560	-7,131	-9,443	-10,973	1ZGC
PQM 271 (30i)	-10,615	-9,617	-7,890	-10,149	-10,615	1ZGC
PQM 272 (30j)	-10,356	-10,309	-7,897	-9,121	-10,356	1ZGC
donepezil	-11,136	-10,064	-12,575	-17,941	-17,941	4EY7

Fonte: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC)

Os compostos desta série apresentaram modos de ligação mais favoráveis à conformação 1ZGC da AChE, exceto PQM-267 (**30e**) e PQM-268 (**30f**), que interagem melhor com as conformações 1Q84 e 4EY7, respectivamente. O PQM-268 (**30f**) foi previsto com a melhor *score* de ancoragem (-14.142) e interage no sítio de ativo da AChE através de (**Figura 75, A**): (i) interações *stacking* entre o anel fenílico e a cadeia lateral Trp86, (ii) interações cátion- π do grupo piperidina com Trp86, Tyr337 e Phe338, (iii) ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila do fragmento fenólico com a cadeia principal Ser293. Apesar de não ter ligação de hidrogênio ideal entre o grupo NAH, o átomo de N insaturado está dentro da distância de ligação de hidrogênio de Tyr124 (2,75 Å).

Figura 75 - Modos de ligação previstos para (A) PQM-268 (**30f**) (conformação 4EY7), (B) PQM-263 (**30a**) e (C) PQM-266 (**30d**) nas conformações 1ZGC da AChE.



Fonte: Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC).

Legenda: Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio ou interações de *stacking* com o ligante são marcados em preto. Outros resíduos importantes são destacados em azul. As ligações de hidrogênio são representadas como traços amarelos na imagem 3D.

PQM-263 (**30a**) obteve a segunda melhor pontuação de encaixe (-12.960 kcal / mol), interagindo melhor com o sitio ativo da AChE da conformação 1ZGC em uma orientação invertida quando comparado ao modo de ligação PQM-268 (**30f**). Para PQM-263 (**30a**), a porção metoxifenol foi prevista para interagir no fundo da cavidade de ligação, perto do CAS, com o grupo hidroxila a uma distância de ligação de hidrogênio das cadeias laterais Glu199 (2,87 Å) e Ser200 (3,69 Å). Enquanto a porção fenila está localizada próxima ao anel indol Trp84, realizando uma interação não ideal *stacking* (**Figura 75, B**). O NH e o oxigênio carbonílico do grupo acilidrazona estão dentro das distâncias das ligações de hidrogênio das cadeias laterais Tyr121 (3,06 Å) e Tyr334 (3,20 Å). O anel de piperidina está orientado na entrada da cavidade, realizando uma interação cátion- π com Trp279 da PAS.

PQM-266 (**30d**) (**Figura 75, C**), o composto da série que experimentalmente apresentou os melhores resultados frente à inibição da AChE *in vitro*, exibiu melhor pontuação de acoplamento contra a conformação 1ZGC. Este modo de ligação é caracterizado por (i) interações cátion- π do grupo piperidina com Phe330, (ii) ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico do grupo acilidrazona com a cadeia lateral Tyr121 e (iii) interações hidrofóbicas entre o 1,2 -dimetoxibenzeno e a região PAS. De acordo com os resultados de *docking*, o grupo dimetoxibenzeno de PQM-266 (**30d**) não é capaz de realizar as interações *stacking* ótimas com Trp279 como observadas no donepezil, provavelmente devido à porção ligante ligeiramente mais longa do derivado de CNA (cinamoil *N*-acilidrazônico). Além disso, os dois grupos metoxila estão mais expostos ao solvente no composto PQM-266 (**30d**) no modo de ligação experimental ao donepezil. No entanto, como a região PAS é altamente flexível, é possível que a AChE seja capaz de ajustar essa região para acomodar o composto PQM-266 (**30d**) por meio de um mecanismo de ajuste induzido, proporcionando interações *stacking* e hidrofóbicas ótimas com PAS.

4.6.3 Citotoxicidade e elucidação da atividade antioxidante

Tendo em conta o dano oxidativo associado às DNs os híbridos curcumina-donepezil, foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante utilizando o ensaio de DPPH e quanto à toxicidade em células SH-SY5Y.

4.6.3.2 Avaliação da neurotoxicidade via MTT

As 10 substâncias sintetizadas foram avaliadas em 8 concentrações de 80 a 2,5 μM em triplicata. Nesta etapa verificou-se que nenhuma das substâncias avaliadas apresentou citotoxicidade no teste de MTT na concentração máxima avaliada (80 μM) (**Tabela 13**). Essa avaliação foi feita inicialmente e em paralelo com a avaliação da atividade antioxidante frente a *t*-BOOH (co-tratamento), relatado no numeral 4.6.3.4.

Tabela 13 - Porcentagem de viabilidade celular na concentração máxima avaliada no teste de MTT.

Composto	% viabilidade em 80 μM	Composto	% viabilidade em 80 μM
PQM-263 (30a)	99,88	PQM-268 (30f)	73,59
PQM-264 (30b)	92,43	PQM-269 (30g)	127,28
PQM-265 (30c)	63,85	PQM-270 (30h)	92,48
PQM-266 (30d)	80,70	PQM-271 (30i)	81,84
PQM-267 (30e)	114,31	PQM-272 (30j)	77,33
Controle	100%		

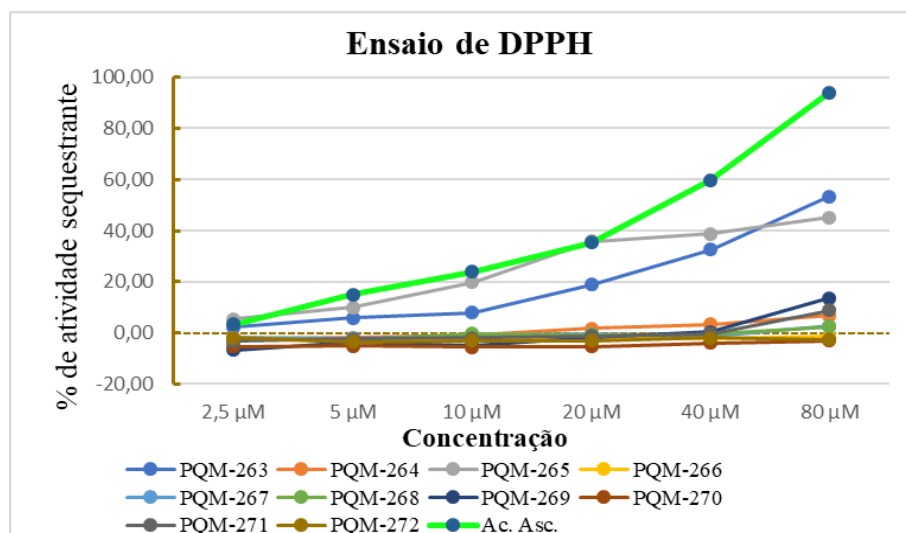
Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

4.6.3.3 Atividade sequestrante de DPPH

Posteriormente, avaliou-se a habilidade dos compostos da série de híbridos donepezil-curcumina em sequestrar os radicais livres DPPH em concentrações diferentes (1,56 - 200 μM) em triplicata. A capacidade sequestrante de radicais foi representada

como porcentagem da atividade sequestrante do radical de DPPH e ácido ascórbico foi usado como padrão, os resultados estão apresentados na **Figura 76**. Podemos destacar os compostos PQM-263 (**30a**) e PQM-265 (**30c**) os quais apresentaram a melhor capacidade sequestrante de radicais livres.

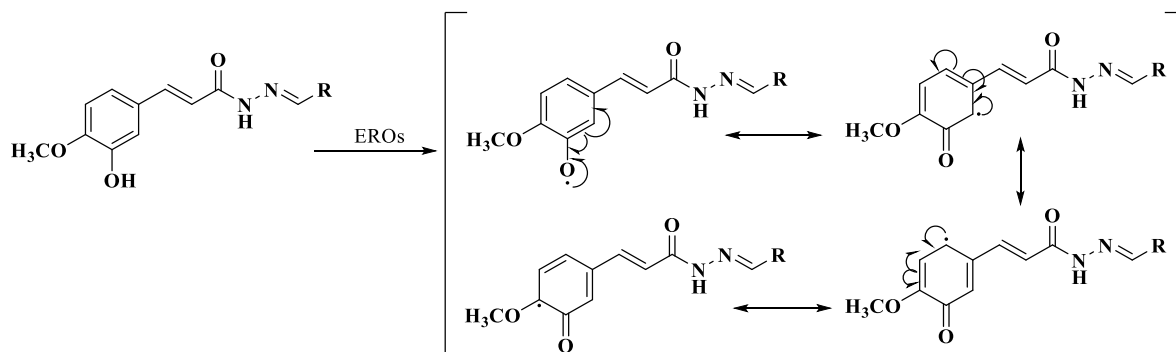
Figura 76 - Porcentagem de atividade sequestrante do radical de DPPH



Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

A análise dos dados revelou a importância do padrão de substituição 4-metoxi-3-hidroxi na atividade antioxidante, dado que os compostos PQM-263 (**30a**) e PQM-264 (**30b**) unicamente se diferenciam na posição dos mesmos substituintes (PQM-264 (**30b**): 4-hidroxi-3-metoxi). Isto levou ao decaimento significativo da capacidade sequestrante de radicais livres, devido a que a 4-hidroxila facilita a formação de um radical fenoxi estabilizado por ressonância (ver **Figura 55** da página **109**). Mesmo efeito foi observado em PQM-265 (**30c**), que possui o padrão de substituição de 3,4 dihidroxi, sendo os melhores representantes com atividade antioxidante da série C. PQM-264 (**30b**) estabiliza menos efetivamente o radical formado, já que este padrão de substituição não permite a participação da $\alpha\beta$ insaturação (**Figura 77**).

Figura 77 – Estabilização por ressonância do radical formado de PQM-264 (**30b**)



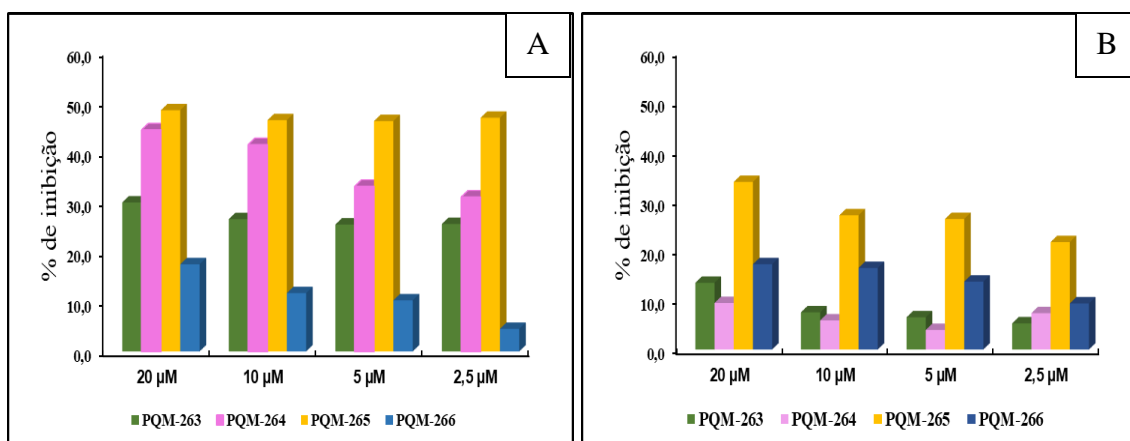
Fonte: do autor

4.6.3.4 Determinação da inibição de formação intracelular de ERO induzidas por *t*-BOOH

Seguindo com as avaliações do perfil antioxidantes as substâncias com melhor atividade frente a DPPH foram submetidas a avaliação da capacidade de inibição da formação de EROs por *t*-BOOH no meio celular. Inicialmente foi realizado o teste com modelo de co-tratamento, ou seja, as substâncias a testar e o indutor de EROs foram administrados ao mesmo tempo, os resultados estão expressos na **Figura 78A** em porcentagem de inibição da formação de EROs em relação a células exposta apenas a *t*-BOOH.

Neste ponto podemos destacar PQM-265 (**30c**) que, corroborando os resultados frente a DPPH, apresentou os melhores resultados antioxidantes. A análise dos dados revelou que PQM-264 (**30b**) apresentou boa atividade frente a *t*-BOOH. Porém, sua atividade não foi significativa frente a DPPH, o que sugere que esta substância pode ter uma possível atividade inibitória indireta na cadeia de formação de ROS pela célula ou na indução da capacidade antioxidante da mesma célula, uma vez que *t*-BOOH induz à célula a liberar EROs. Caso contrário, acontece com o ensaio de DPPH que gera radicais livres no meio por atividade química e não celular. Por fim, PQM-263 (**30a**) apresentou atividade mediana tanto no teste DPPH quanto no modelo de co-tratamento com *t*-BOOH.

Figura 78 - Capacidade de inibição da formação de EROs induzida por *t*-BOOH com as substâncias mais ativas.



Fonte: QUUVI (Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita).

Nota: A) Modelo de co-tratamento e B) Modelo de pré-tratamento

Em seguida as substâncias foram submetidas a avaliação da inibição de EROs induzida por *t*-BOOH pelo modelo de pré-tratamento, ou seja, as células são tratadas com a molécula teste por 24h, posteriormente a solução contendo a solução teste é retirada e adicionado o indutor da formação de EROs, este modelo de tratamento visa verificar a capacidade das substâncias para entrar nas células e desenvolverem sua atividade biológica. Os resultados também estão expressos em porcentagem de inibição da formação de EROs em relação a células não tratadas e expostos na **Figura 78B**.

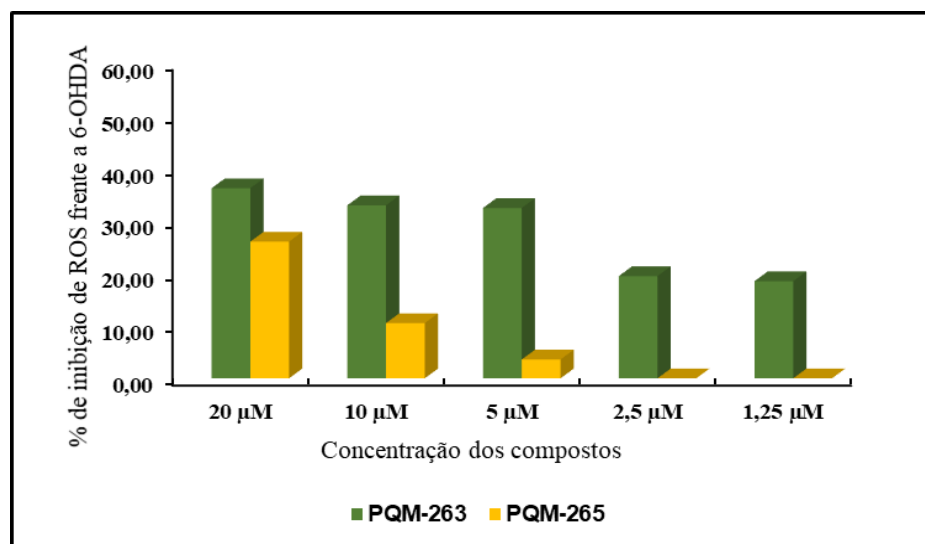
Podemos observar que no modelo de pré-tratamento que PQM-265 (**30c**) manteve uma boa atividade, agora com maior aspecto dependente da concentração, porém, PQM-264 (**30b**) apresentou baixa atividade neste modelo, o que nos sugere que as células podem ser capazes de armazenar apenas PQM-265 (**30c**).

4.6.3.5 Atividade neuroprotetora frente 6-OHDA

A capacidade neuroprotetora dos compostos nas DN está diretamente ligada com sua atividade antioxidante. Os mecanismos patológicos mais importantes no processo de lesão cerebral incluem estresse oxidativo devido a um excesso de espécies reativas de

oxigênio que danificam as diferentes estruturas celulares, induzem à inflamação e, finalmente, levam à morte neuronal. Para evitar os efeitos tóxicos destas espécies se usam compostos antioxidantes capazes de controlar e neutralizar os radicais livres, por tanto, um composto antioxidante tem como objetivo a proteção das diferentes estruturas neuronais (LALKOVIČOVÁ; DANIELISOVÁ, 2016).

Figura 79 - Teste de neuroproteção contra citotoxicidade induzida por 6-OHDA (100 μ M) no modelo de co-tratamento.



Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

Por tanto, para determinar o potencial antioxidante dos compostos sintetizados foi realizado o teste com a neurotoxina que mimetiza a toxicidade da DP, a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), capaz de induzir um quadro oxidativo muito semelhante ao observado na DP.

Foi avaliado o efeito neuroprotetor dos compostos líderes da série C, PQM-263 (30a) e PQM-265 (30c) em 5 concentrações (1,25–20 μ M) enquanto à inibição da produção intracelular de EROs após a exposição ao 6-OHDA e, depois as células tratadas foram submetidas ao teste de MTT para indagar a viabilidade celular, desta forma podemos verificar a capacidade dos compostos para proteger as células contra a agressão oxidativa da 6-OHDA. A substância PQM-263 (30a) protegeu as células da toxicidade

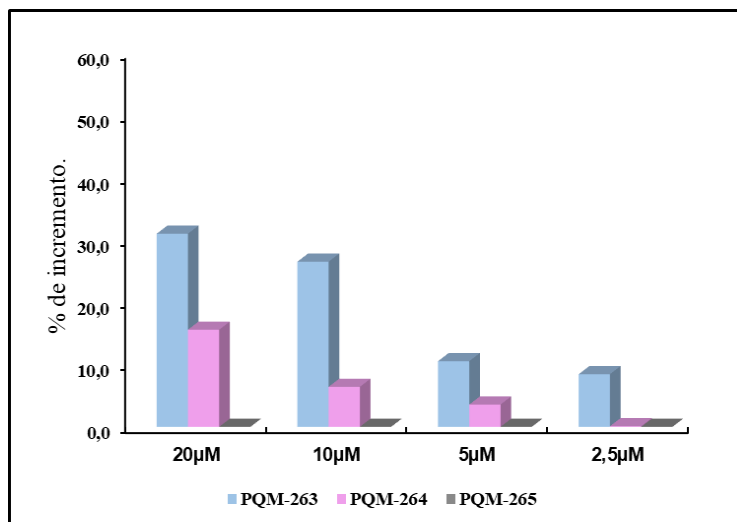
induzida por 6-OHDA ao inibir ao redor dos 40% da formação de EROs, a atividade não foi dose dependente uma vez que nas concentrações de 5, 10 e 20 μM , não teve mudanças significativas na resposta biológica. Enquanto, PQM-265 (**30c**) inibiu ao redor dos 30% da formação de EROs na concentração de 20 μM e a resposta foi dependente da dose utilizada no teste. Resultado que corrobora o obtido no teste de DPPH, aonde PQM-263 (**30a**) possui um padrão estrutural mais favorável na neutralização de EROs. Esses achados indicam que o tratamento com as substâncias avaliadas pode efetivamente impedir a produção de EROs induzida por 6-OHDA nas concentrações utilizadas.

4.6.4 Indução da liberação de glutathiona

A glutathiona (GSH) é um antioxidante endógeno e uma das principais enzimas responsáveis pelo controle natural do estresse oxidativo e na manutenção dos mecanismos homeostáticos redox das células. Para compreender melhor os mecanismos pelos quais as substâncias atuam como antioxidantes foi realizado um estudo para verificar a indução da liberação de GSH pelas células de neuroblastoma humano tratadas usando um leitor de placas de fluorescência. As concentrações celulares de GSH foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico com monoclorobimano (mCIB) em placas de 96 poços em diferentes concentrações (10-0,625 μM) dos compostos teste. O mCIB é um tinte fluorescente útil para determinar a concentração de GSH em culturas de células neuronais humanas. Os resultados estão expressos na **Figura 80** em porcentagem de incremento na concentração de GSH em relação a células não tratadas.

Nesta etapa verificou-se que PQM-265 (**30c**), apesar de obter os melhores resultados antioxidantes até o momento possui um mecanismo de atividade não dependente de GSH, uma vez que foi o único dos avaliados que não apresentou nenhuma indução da liberação de GSH. Finalmente, podemos destacar a PQM-263 (**30a**), que induziu um aumento de 30% na concentração de GSH a 20 μM , esse resultado pode explicar a manutenção das atividades antioxidantes medianas nos testes de co-tratamento e pré-tratamento com *t*-BOOH.

Figura 80 - Indução da liberação de GSH por células neuronais tratadas com substâncias teste.



Fonte: QUVI (*Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita*).

4.6.5 Capacidade de ativação de Nrf2

Um dos mecanismos pelos quais pode haver uma regulação positiva nos níveis de GSH é pela ativação do fator nuclear Nrf2, responsável por induzir a célula a aumentar a produção e liberação de GSH (DE FREITAS SILVA; PRUCCOLI; *et al.*, 2018). Por esse motivo foi realizado um teste imunológico do tipo ELISA para detecção dos níveis de Nrf2 por células neuronais tratadas com PQM-263 (30a). Relatos na literatura demonstraram que a curcumina possui a capacidade de ativar o Nrf2 e elevar os níveis de GSH, melhorando significativamente os danos oxidativos neuronais dopaminérgicos na SN em modelo animais induzidos por Rotenona (CUI; LI; ZHU, 2016), e proteger os astrócitos da lesão oxidativa induzida por metilmercurio (YANG *et al.*, 2019). Essa atividade pode ser graças às propriedades eletrofílicas derivadas da presença de grupos aceptores de Michael na estrutura, um grupo carbonila $\alpha\beta$ insaturado, permitindo a interação com resíduos proteicos e ativando o fator nuclear Nrf2, por tanto, o Nrf2 pode ter um papel interessante no tratamento de DNs (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018).

Neste ensaio não se comprovou ativação de Nrf2 por ação de PQM-263 (**30a**). Apesar do resultado obtido existem outros mecanismos que podem induzir a expressão da GSH. Os níveis de GSH são influenciados através da atividade de glutamato cisteína ligase (GCL) enzima indispensável na síntese de glutatona, e composta por uma subunidade catalítica (GCLC) e outra modificada (GCLM) (LU, 2013). Mudanças na atividade GCL podem resultar a partir da expressão destas subunidades. A literatura relata que o tratamento antioxidante com curcumina pode influenciar a expressão de GCLC (ZHENG, S.; YUMEI; CHEN, 2007). Outros fatores promotores da expressão de GCLC são o fator nuclear kappa B (NF κ B), o gene Sp-1, ativador de proteína (AP-1), ativador de proteína 2 (AP-2), fator resposta aos metais (MRE) e resposta antioxidante (ARE)/resposta ao eletrófilos (EpRE) (LU, 2013; ROBACZEWSKA *et al.*, 2016) que aumentam a síntese de glutatona frente ao estresse oxidativo e poderiam explicar a liberação de GSH induzido por PQM-263 (**30a**).

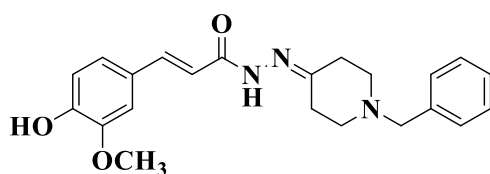
4.6.6 Predição das propriedades ADME

Os parâmetros farmacocinéticos dos derivados ferúlicos sintetizados foram calculados juntamente com os compostos padrão curcumina e donepezil usando o programa QikProp (Schrödinger). Os principais parâmetros estudados foram positivos na maioria dos casos e estão agrupados na **Tabela 14**. A porcentagem prevista de absorção oral foi satisfatória na maioria dos compostos sintetizados, com uma porcentagem superior ao 85%.

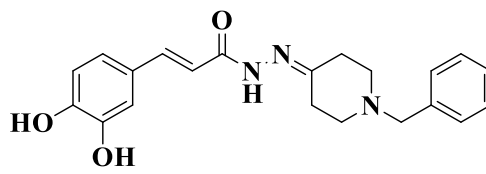
O coeficiente de partição (QPlogPo/wb) que determina a lipofilicidade dos compostos, parâmetro indispensável para atravessar as membranas obteve valores médios na maioria dos compostos, valor importante pois o equilíbrio de solubilidade tanto em fase orgânica, quanto aquosa determina a biodisponibilidade dos compostos e seu êxito para atingir os diferentes alvos biológicos. Os compostos com maior valor de coeficiente de partição, PQM-265 (**30c**) e PQM-268 (**30f**), possuem maior hidrossolubilidade produto da presença de grupos hidroxilas, por tanto, menor permeabilidade frente a células Caco-2 (QPPCaco) e células MDCK, consideradas um modelo da barreira sanguínea do intestino e mimetizador da barreira hematoencefálica, respectivamente. Os

resultados indicam que esses compostos podem ter dificuldade em atingir seus alvos biológicos no SNC.

Os demais os resultados computacionais sugerem que os derivados da série molecular C como ligação da albumina de soro humano (QPlogKhsa), coeficiente de partição cérebro/sangue (QPlogBB) e o valor de CI_{50} do bloqueio do canal HERG K^+ (QPlogHERG) possuem as condições adequadas para exercer atividade no SNC.



PQM-263



PQM-265

Como conclusão desta terceira parte, observamos que a análise dos resultados farmacológicos confirmou a importância da subunidade *N*-benzilpiperazina e *N*-benzilpiperidina presentes tanto na série A, quanto na série C para promover as interações necessárias com as enzimas AChE e BuChE no processo inibitório enzimático. Entre os compostos líderes da série C, obteve-se inibidores seletivos para AChE (PQM-266 (**30d**)) e para BuChE (PQM-268 (**30f**) e PQM-272 (**30j**)), assim como inibidores não seletivos como PQM-271 (**30i**), que inibiu as duas enzimas. Características que podem ser aproveitadas no tratamento das 3 DNs estudadas durante este trabalho, beneficiando a cognição e tratando os sintomas comportamentais. Outra característica dos compostos foi sua atividade neuroprotetora através da inibição de produção de ROS frente a DPPH, *t*-BOOH e 6-OHDA com destaque para PQM-263 (**30a**), PQM-265 (**30c**) e PQM-266 (**30d**), sem apresentar toxicidade detectável na concentração máxima avaliada (80 μ M) durante o teste de MTT. Adicional às propriedades antioxidantes, podemos destacar a capacidade de PQM-263 (**30a**), para induzir um aumento de 30% na concentração de GSH a 20 μ M. Os resultados sugerem que PQM-263 (**30a**) e PQM-266 (**30d**) são compostos promissores para o tratamento de DNs como DA e DP, com atividade anti-colinesterásica e neuroprotetora.

Tabela 14 - Propriedades ADME previstas dos compostos sintetizados **PQM-263** a **PQM-272** e dos compostos padrão curcumina e donepezil

Composto	SNC ^a	QPlogPo/w ^b	QPlogS ^c	QPlogHERG ^d	QPPCaco ^f	QPlogBB ^g	QPlogKhsa ^h	QPPMDCK ⁱ	QPlogKp ^j	% Absorção oral humano ^k	Regra de 5	Regra de 3
PQM-263	-2	3,845	-5,246	-7,638	106,502	-1,234	0,631	48,632	-4,243	85,742	0	0
PQM-264	-2	3,944	-5,371	-7,835	141,137	-1,115	0,625	65,931	-3,947	88,512	0	0
PQM-265	-2	2,973	-4,771	-7,759	33,903	-1,853	0,407	14,112	-5,155	71,741	0	0
PQM-266	0	4,758	-6,103	-7,905	309,827	-0,72	0,858	154,237	-3,337	100	0	1
PQM-267	1	4,577	-5,736	-7,895	310,358	-0,624	0,825	154,523	-3,302	100	0	1
PQM-268	-2	3,696	-5,002	-7,761	98,569	-1,182	0,609	44,728	-4,227	84,273	0	0
PQM-269	1	5,496	-6,647	-7,715	402,073	-0,118	1,061	899,863	-3,217	92,782	1	1
PQM-270	1	4	-4,881	-7,424	323,593	-0,473	0,607	161,658	-3,407	95,292	0	0
PQM-271	1	4,995	-5,926	-7,678	402,405	-0,212	0,912	503,517	-3,152	100	0	1
PQM-272	1	4,496	-5,174	-7,779	401,976	-0,37	0,791	204,37	-2,986	100	0	0
Curcumina	-2	2,932	-4,518	-6,394	234,428	-2,034	-0,014	103,135	-2,555	86,533	0	0
Donepezil	1	4,442	-4,626	-6,74	894,509	0,118	0,613	485,175	-2,921	100	0	0
Valores de Referencia	-2 - +2	-2 ate 6.5	-6.5 a 0.5	menor -5	<25 baixo; >500 alto	-3 - 1.2	-1.5 - 1.5	<25 baixo, > 500 alto	-8.0 -- 1.0	>80%: alto <25%: pobre	max 4	max 3

Fonte: programa QikProp (Schrödinger).

Nota: **a**: sistema nervoso central. **b**: Predição do coeficiente de partição octanol/água. **c**: Predição da solubilidade aquosa, log S. S em mol dm⁻³ é a concentração do soluto em uma solução saturada que está em equilíbrio com o sólido cristalino. **d**: Valor CI₅₀ previsto para bloqueio de canais HERG K⁺. **f**: Permeabilidade prevista das células Caco-2 em nm/seg. As células Caco-2 são um modelo da barreira sanguínea do intestino. As previsões do QikProp são para o transporte não ativo. **g**: Coeficiente de partição previsto para cérebro/sangue. Nota: As previsões de QikProp são para medicamentos administrados por via oral, de modo que, por exemplo, a dopamina e a serotonina são negativas para o SNC porque são muito polares para atravessar a barreira hematoencefálica. **h**: Predição da ligação à albumina sérica humana. **i**: Permeabilidade aparente de células MDCK em nm/seg. As células MDCK são consideradas um bom mimetizador da barreira hematoencefálica. As previsões do QikProp são para transporte não ativo. **j**: Permeabilidade prevista da pele, log Kp. **k**: Absorção oral humana prevista em escala de 0 a 100%.

5. PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODOS GERAIS

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) da marca BRUKER AC-300, operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados da marca Sigma-Aldrich, utilizando como referência interna o TMS (tetrametilsilano) ou o sinal residual do solvente. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz). As multiplicidades estão abreviadas da seguinte maneira: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete).

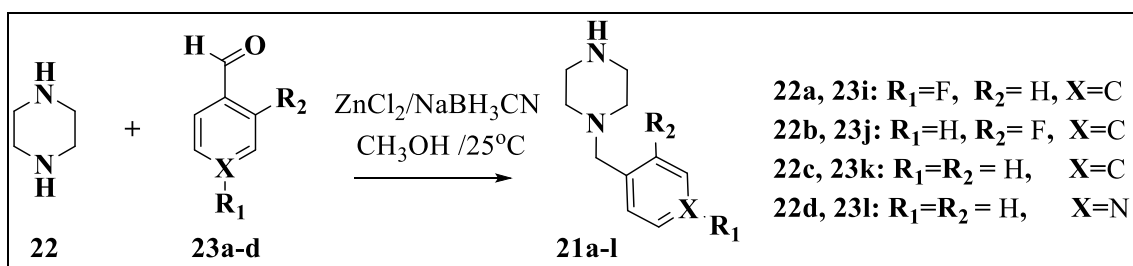
Os espectros na região do infravermelho (IV) foram realizados no espectrofotômetro FT-IR Thermo Scientific USA (modelo Nicolet iS50) acoplado a Pike Gladi ATR technologies do Laboratório de Fármacos e Medicamentos da UNIFAL-MG. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com a FIOCRUZ-RJ no aparelho BRUKER COMPASS com ionização por electrospray. Os espectros foram adquiridos num intervalo de m/z de 80-1000. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em folha de gel de sílica 60 F₂₅₄, da marca Merck, na espessura de 0,2 μ , em suporte de alumínio. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada de UV $\lambda = 254$ ou 365 nm, reveladores químicos de iodocloroplatinado ou em câmara de iodo sublimado. Quando necessária, as purificações foram realizadas em coluna cromatográfica de vidro de diferentes diâmetros, empregando como fase estacionária gel de sílica flash (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm), da marca Sigma-Aldrich e sistemas eluentes de natureza e gradientes de concentração diferentes. Todos os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich, sem purificações adicionais. As faixas de fusão foram feitas em tubo capilar, utilizando-se um equipamento Marte (PFM II) com amostra triturada e empacotada em tubo capilar. Os compostos com estruturas análogas foram numerados diferente da numeração da nomenclatura IUPAC, a fim de ser comprados quando necessário.

5.1 SÍNTESE DAS SÉRIES ALVO A-C

5.1.1 Síntese dos intermediários 21i-l

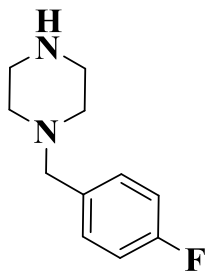
Em um balão monotubulado de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 1 eq. de piperazina solubilizada em 20 mL de metanol. Logo com ajuda de uma pipeta Pasteur, adicionou-se lentamente uma solução contendo 6,4 mmol do aldeído correspondente (**23a-d**) e 3,2 mmol de ZnCl₂, mantendo a solução resultante sob agitação, à temperatura ambiente. Após hora, adicionam-se 6,4 mmol de NaBH₃CN, mantendo sob agitação, à temperatura ambiente até que a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) indicou o término reacional - aproximadamente 24h - (eluente: CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1). Em seguida, o precipitado formado foi filtrado e o sobrenadante removido no rota-evaporador. Adicionam-se 10 mL de água destilada e posteriormente o produto da aminação reductiva foi extraído em funil de separação com CH₂Cl₂ (4 x 25 mL). A fase orgânica resultante foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada sob vácuo. O produto bruto foi então purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (eluente: eluente: CH₂Cl₂/CH₃OH 9,5:0,5) e os intermediários foram obtidos na forma de um óleo **21i-l**.

Figura 81 - Rota sintética dos intermediários *N*-benzilpiperazínicos **21i-j**.



Fonte: do autor.

1-(4-fluorbenzil)piperazina **21i**



Rendimento: 26%

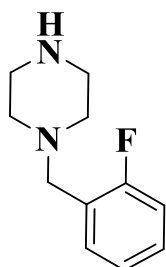
Aspecto físico: óleo transparente

FM: C₁₁H₁₅FN₂

MM: 194,2534 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 1; Anexo B, fig. 1**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 2; Anexo B, fig. 2**).

1-(2-fluorbenzil)piperazina **21j**



Rendimento: 22%

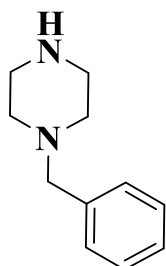
Aspecto físico: óleo amarelo claro

FM: C₁₁H₁₅FN₂

MM: 194,2534 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 1; Anexo B, fig. 3**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 2; Anexo B, fig. 4**).

1-benzilpiperazina **21k**



Rendimento: 23%

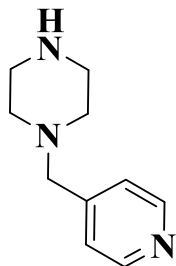
Aspecto físico: óleo amarelo claro

FM: C₁₁H₁₆N₂

MM: 176,1313 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 3; Anexo B, fig. 5**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 4; Anexo B, fig. 6**).

1-(piridin-4-ilmetil)piperazina **21l**



Rendimento: 44%

Aspecto físico: óleo transparente

FM: C₁₀H₁₅N₃

MM: 177,1266 g.mol⁻¹

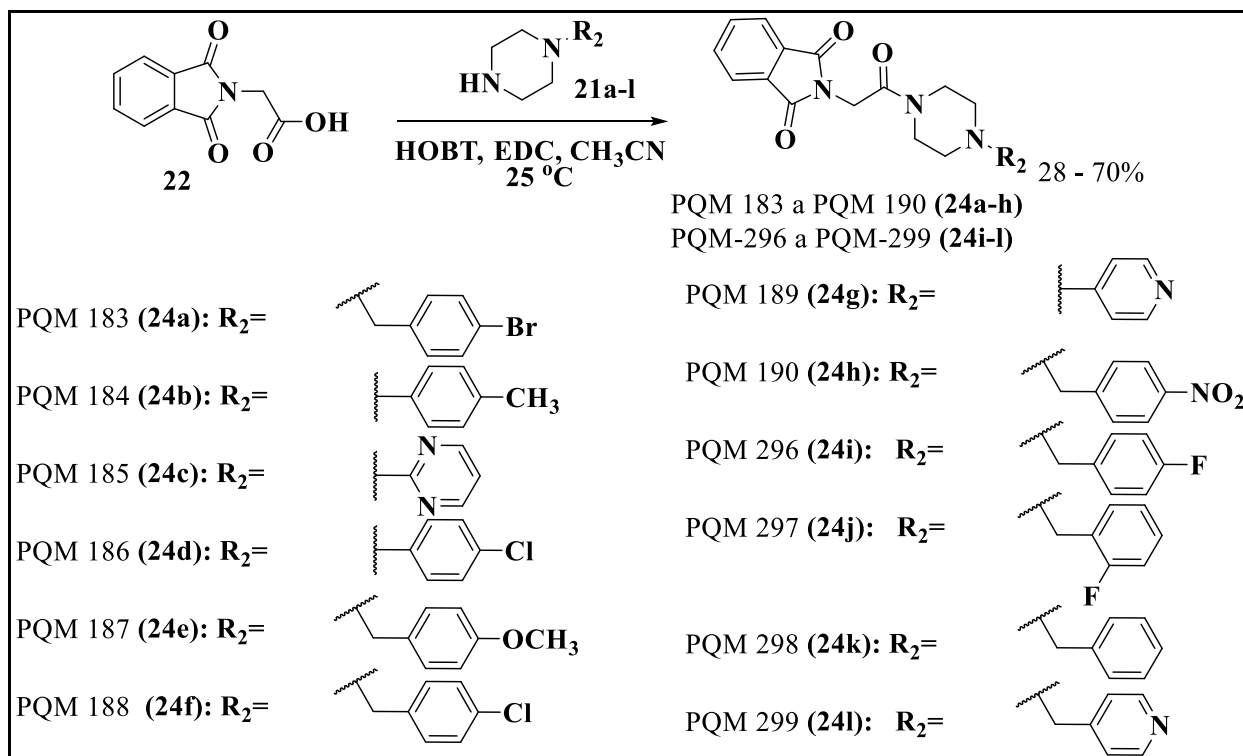
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 3; Anexo B, fig. 7**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 4; Anexo B, fig. 8**).

5.1.2 Abordagem sintética da série A: PQM-183 a PQM-190 (24a-h) e PQM-296 a PQM-299 (24i-l).

MÉTODO A (SINGH et al., 2016).

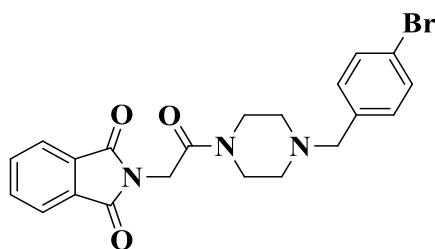
Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 500 mg do ácido *N*-Ftaloilglicina obtido comercialmente (**18**, 1 eq, 2,44 mmol) em diclorometano anidro (10 mL), adicionou-se 1,2 eq de EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e 4 eq. TEA (triethylamina) mantendo agitação magnética por duas horas em banho de gelo (0°C). Após 15 min foram adicionados 1,5 eq de HOBT (1-hidroxi-benzotriazol) e manteve-se agitando durante mais 15 minutos. Em seguida adicionou-se lentamente a piperazina correspondente (**23a-l**). O sistema reacional foi mantido em agitação por um período de aproximadamente 24 horas, sempre com acompanhamento da reação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (DCM:MeOH) (9,5:0,5) até verificar o término da reação. Ao final da reação, o produto formado foi concentrado em rotaevaporador e seco na linha de alto vácuo. Finalmente, realizou-se extração com acetato de etila/água (3 x 20 ml de água). A fase orgânica resultante foi secada com MgSO₄ e rotaevaporada sob pressão reduzida. O bruto reacional obtido foi purificado por coluna cromatográfica (Acetato de etila x Hexano, 7:3), quando necessário foi recristalizado no solvente adequado obtendo-se os compostos PQM-183 a PQM-190 (**24a-h**) e PQM-296 a PQM-299 (**24i-l**) (**Figura 82**).

Figura 82 - Abordagem sintética dos compostos PQM-183 a PQM-190 (**24a-h**) e PQM-296 a PQM-299 (**24i-l**), em presença de acetonitrila, HOBT e EDC.



Fonte: do autor.

2-(2-(4-(4-bromobenzil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-183 (**24a**)



Rendimento: 32%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

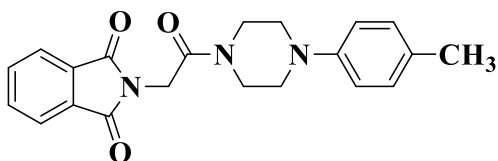
FM: $C_{21}H_{20}BrN_3O_3$

MM: $441,0688 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **F.F.:** $156-158^\circ\text{C}$

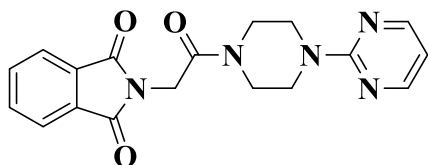
IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): **Anexo B, fig. 9.**

HRMS (ESI) m/z : calculado $[M+H]^+$: 442,0766; encontrado $[M+H]^+$: 442,0758 (**Anexo B, fig. 12**). **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 5; Anexo B, fig. 10**).

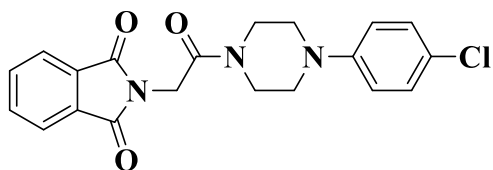
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 6; Anexo B, fig. 11**).

2-(2-oxo-2-(4-(p-tolil)piperazina-1-il)etil)isoindolina-1,3-diona PQM-184 (**24b**)**Rendimento:** 55%**Aspecto físico:** sólido amarelo claro**FM:** C₂₁H₂₁N₃O₃**MM:** 363,1583 g.mol⁻¹, **F.F.:** 192-194°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 13.**

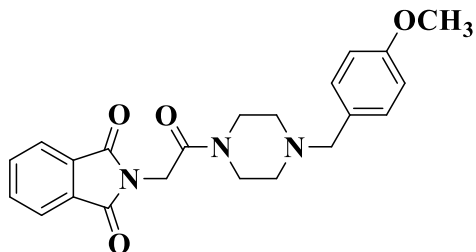
HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 364,1661; encontrado [M+H]⁺: 364,1641 (**Anexo B, fig. 16**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 5; Anexo B, fig. 14**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 6; Anexo B, fig. 15**).

2-(2-(4-(4-clorofenil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-185 (**24c**)**Rendimento:** 70%**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₁₈H₁₇N₅O₃**MM:** 351,1331 g.mol⁻¹, **F.F.:** 258-260°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 17.**

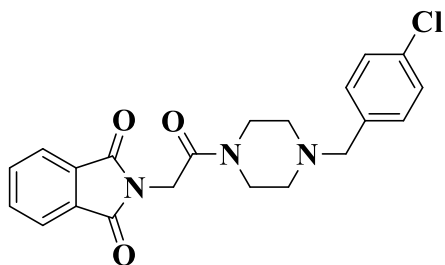
HRMS (ESI) m/z : calculado [M+Na]⁺: 374,1229; encontrado [M+Na]⁺: 374,1209 (**Anexo B, fig. 20**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 5; Anexo B, fig. 18**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 6; Anexo B, fig. 19**).

2-(2-(4-(4-clorofenil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-186 (**24d**)**Rendimento:** 36%**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₂₀H₁₈ClN₃O₃**MM:** 383,1037 g.mol⁻¹ **F.F.:** 230-232°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 21.**

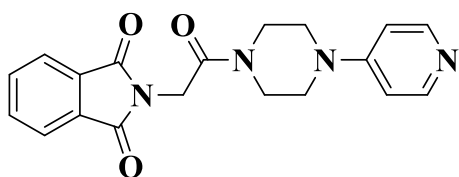
HRMS (ESI) m/z : calculado [M+Na]⁺: 406,0934; encontrado [M+Na]⁺: 406,0915 (**Anexo B, fig. 24**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 7; Anexo B, fig. 22**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 8; Anexo B, fig. 23**).

2-(2-(4-(4-metoxibenzil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-187 (**24e**)**Rendimento:** 41%**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₂₂H₂₃N₃O₄**MM:** 393,1689 g.mol⁻¹ **F.F.:** 166-168°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 25.**

HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 394,1767; encontrado [M+H]⁺: 394,1759 (**Anexo B, fig. 28**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 7; Anexo B, fig. 26**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 8; Anexo B, fig. 27**).

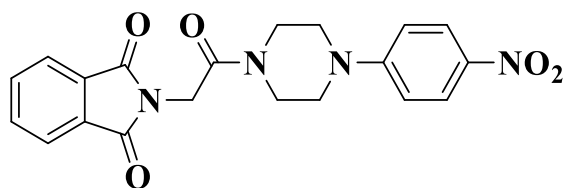
2-(2-(4-(4-clorobenzil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-188 (**24f**)**Rendimento:** 27%**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₂₁H₂₀ClN₃O₃**MM:** 397,1193 g.mol⁻¹ **F.F.:** 146-149%**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 29.**

HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 398,1271; encontrado [M+H]⁺: 398,1271 (**Anexo B, fig. 32**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 7; Anexo B, fig. 30**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 8; Anexo B, fig. 31**).

2-(2-oxo-2-(4-(piridin-4-il)piperazina-1-il)etil)isoindolina-1,3-diona PQM-189 (**24g**)**Rendimento:** 32%**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₁₉H₁₈N₄O₃**MM:** 350,1379 g.mol⁻¹ **F.F.:** 238-239°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 33.**

HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 351,1457; encontrado [M+H]⁺: 351,13443 (**Anexo B, fig. 36**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 9; Anexo B, fig. 34**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 10; Anexo B, fig. 35**).

2-(2-(4-(4-nitrofenil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-190 (**24h**)



Rendimento: 28%

Aspecto físico: sólido amarelo brilhante

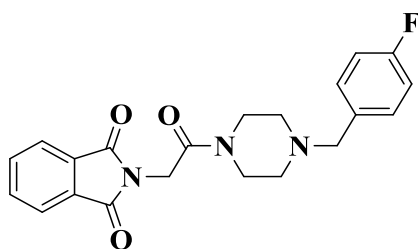
FM: C₂₀H₁₈N₄O₅

MM: 394,1277 g.mol⁻¹ **F.F.:** >300°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 37.**

HRMS (ESI) m/z : calculado [M+Na]⁺: 417,1175; encontrado [M+Na]⁺: 417,1153 (**Anexo B, fig. 40**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 9; Anexo B, fig. 38**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 10; Anexo B, fig. 39**).

2-(2-(4-(4-fluorobenzil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-296 (**24i**)



Rendimento: 10%

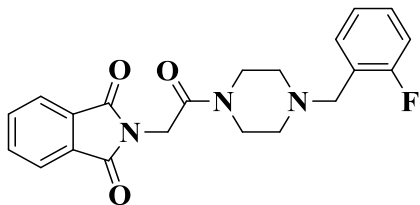
Aspecto físico: sólido branco

FM: C₂₁H₂₀FN₃O₃

MM: 381,1489 g.mol⁻¹, **F.F.:** 155-158°C

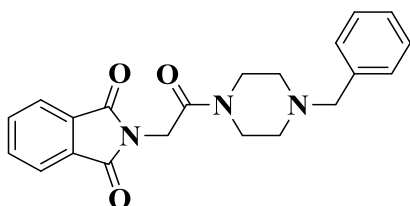
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 41.**

HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 382,1567; encontrado [M+H]⁺: 382,1552 (**Anexo B, fig. 44**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 9; Anexo B, fig. 42**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 10; Anexo B, fig. 43**).

2-(2-(4-(2-fluorbenzil)piperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-297 (**24j**)**Rendimento:** 6%**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₂₁H₂₀FN₃O₃**MM:** 381,1489 g.mol⁻¹, **F.F.:** 126-128°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 45.**

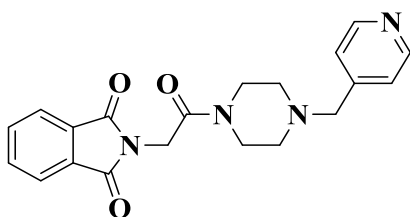
HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 382,1567; encontrado [M+H]⁺: 382,1551 (**Anexo B, fig. 48**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 11; Anexo B, fig. 46**).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 12; Anexo B, fig. 47**).

2-(2-(4-(4-benzilpiperazina-1-il)-2-oxoetil)isoindolina-1,3-diona PQM-298 (**24k**)**Rendimento:** 14%**Aspecto físico:** sólido amarelo claro**FM:** C₂₁H₂₁N₃O₃**MM:** 363,1583 g.mol⁻¹, **F.F.:** 156-160°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 49.**

HRMS (ESI) m/z : calculado [M+H]⁺: 364,1661; encontrado [M+H]⁺: 364,1650 (**Anexo B, fig. 52**). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 11; Anexo B, fig. 50**).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 12; Anexo B, fig. 51**).

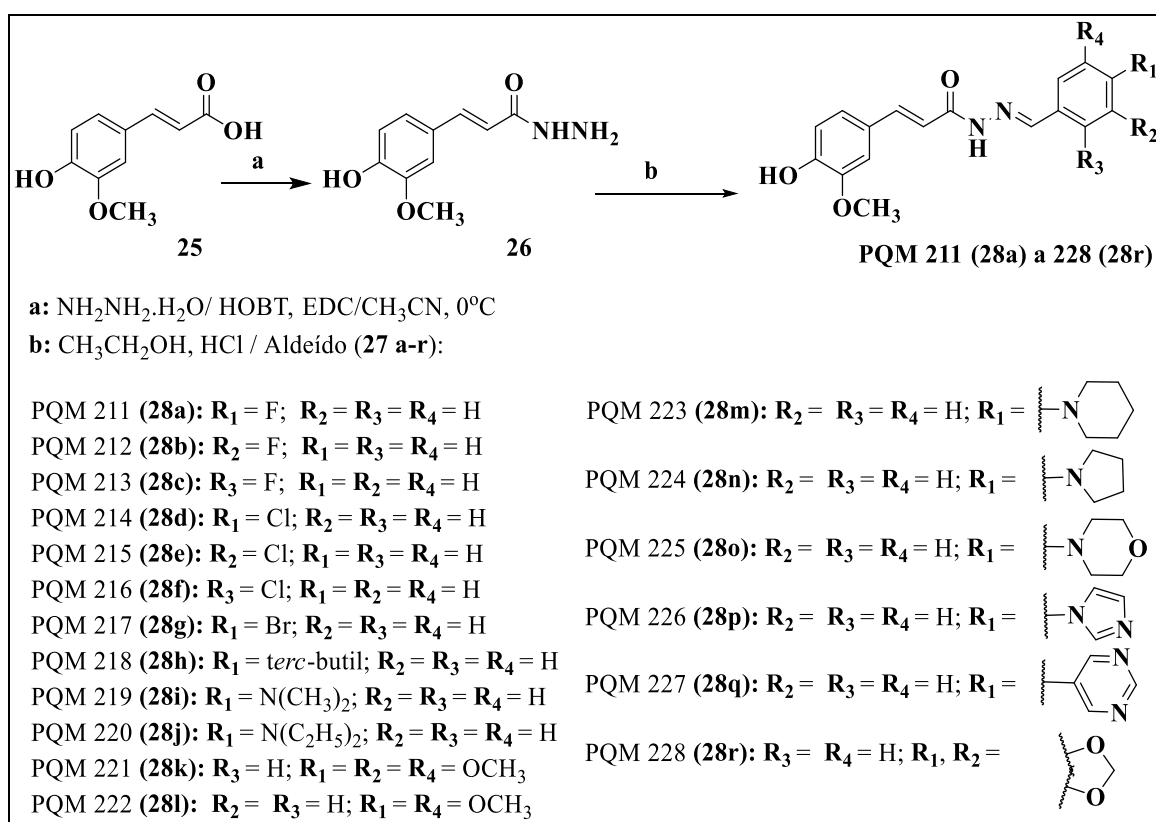
2-(2-oxo-2-(4-(piridina-4-ilmetil)piperazina-1-il)etil)isoindolina-1,3-diona PQM-299 (**24l**)**Rendimento:** 20%**Aspecto físico:** sólido amarelo claro**FM:** C₂₀H₂₀N₄O₃**MM:** 364,1535 g.mol⁻¹, **F.F.:** 152-155°C**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 53.**

HRMS (ESI) m/z : calculado $[M+H]^+$: 365,1614; encontrado $[M+H]^+$: 365,1599 (**Anexo B, fig. 56**). **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 11; Anexo B, fig. 54**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 12; Anexo B, fig. 55**).

5.1.3 Abordagem Sintética da série B: PQM-211 a PQM-228

MÉTODO B (CARVALHO *et al.*, 2012)

Figura 83 - Rota sintética das substâncias alvo PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**).



Fonte: do autor.

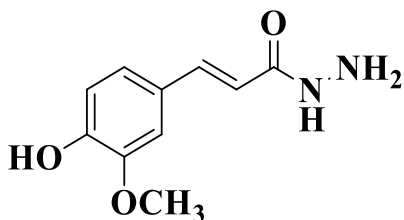
A rota sintética da série alvo de híbridos moleculares da curcumina (**Figura 83**) foi baseada na preparação do intermediário chave hidrazídico **26a**, obtido a partir do ácido ferúlico (**25**) e monidrato de hidrazida, como na metodologia proposta por Carvalho e colaboradores (CARVALHO *et al.*, 2012) seguido pelo acoplamento com diferentes

benzaldeídos funcionalizados, que levou à formação dos derivados acilidrazônicos, PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**).

5.1.3.1 Síntese do intermediário (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida **26a**

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 300 mg do ácido *trans*-ferúlico (**25**, 1 eq, 1,51 mmol) em acetonitrila (15 mL), adicionou-se 255 mg (1,2 eq, 1,81 mmol) de HOBT e 347 mg (1,2 eq, 1,81 mmol) de EDC, mantendo-se agitação por duas horas a temperatura ambiente (25 °C). Em um segundo balão em banho de gelo, agitou-se uma solução de hidrato de hidrazida (10 eq) em acetonitrila (10 mL). Em seguida, adicionou-se lentamente, com ajuda de uma pipeta Pasteur gota-a-gota a primeira reação à solução de hidrato de hidrazida. Ao término da adição, o meio reacional foi concentrado em evaporador e seco sob vácuo. Finalmente, adicionou-se uma solução de NaHCO₃ 5 % (4 mL). Agitou-se para permitir a formação do precipitado e isolou-se por filtração para finalmente obter o intermediário hidrazídico **26a**.

(*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida **26a**



Rendimento: 96%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₀H₁₂N₂O₃

MM: 208,0848 g.mol⁻¹

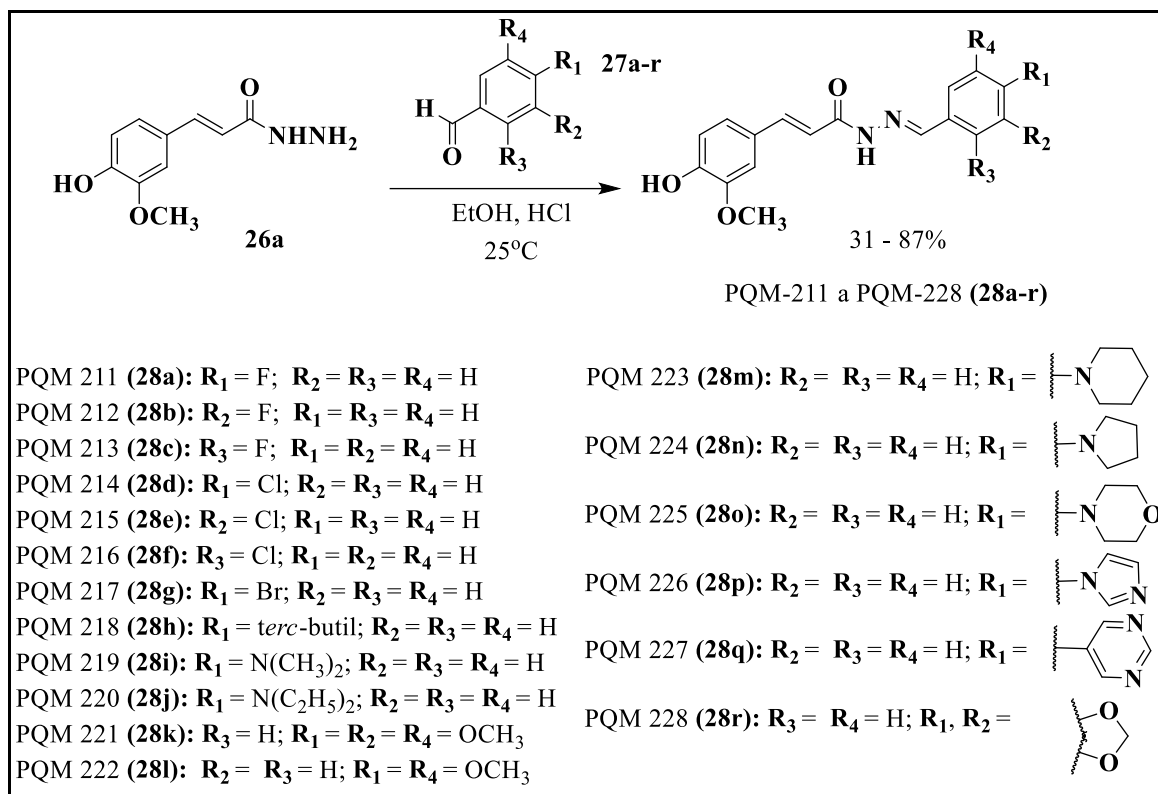
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 129**

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 25; Anexo B, fig. 130**).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 26; Anexo B, fig. 131**).

5.1.3.2 Obtenção dos produtos-finais da série B: PQM-211-PQM-228 (28a-r).

Figura 84 - Reação de acoplamento da hidrazida **26a** com benzaldeídos funcionalizados (**27a-r**) para obtenção da série alvo PQM-211 a PQM-228 (**28a-r**).

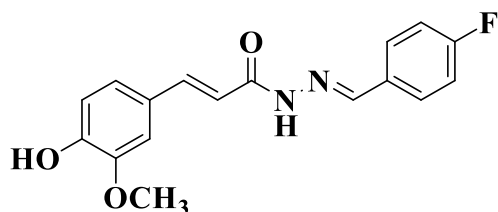


Fonte: do autor.

Em um balão de 50 mL contendo uma solução de etanol (10 mL) e o aldeído correspondente (**27 a-r**, 1,2 eq), adicionou-se lentamente o intermediário **26a**. O sistema foi mantido sob agitação magnética em meio ácido (6 gotas de HCl concentrado) a temperatura ambiente até consumo total da hidrazida **26a**. A evolução da reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se como eluente acetato de hexano/acetato de etila (3:7). Após confirmação do término reacional, o solvente foi removido sob pressão reduzida, seguido de recristalização do produto em etanol/diclorometano ou purificação em coluna cromatográfica (CC) com gel de sílica flash

(220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm) usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila (2:8).

(*E*)-*N'*-(4-fluorobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-211 (**28a**)



Rendimento: 67%

Aspecto físico: sólido amarelo

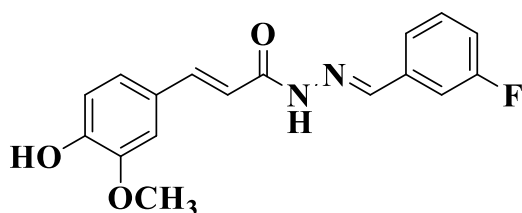
FM: C₁₇H₁₅FN₂O₃

MM: 314,1067 g.mol⁻¹ **F.F.:** 138-141°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 57.**

HRMS (ESI): encontrado [M+Na]⁺: 337,0959; calculado [M+Na]⁺: 337,0964 (**Anexo B, fig. 60**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 13; Anexo B, fig. 58**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 14; Anexo B, fig. 59**).

(*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-212 (**28b**)



Rendimento: 37%

Aspecto físico: sólido bege

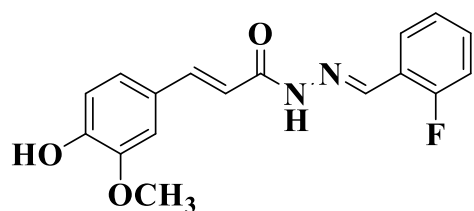
FM: C₁₇H₁₅FN₂O₃

MM: 314,1067 g.mol⁻¹ **F.F.:** 212-215°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 61.**

HRMS (ESI): encontrado [M+H]⁺: 337,0962; calculado [M+Na]⁺: 337,0964 (**Anexo B, fig. 64**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 13; Anexo B, fig. 62**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 14; Anexo B, fig. 63**).

(*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-213 (**28c**)



Rendimento: 42%

Aspecto físico: sólido bege

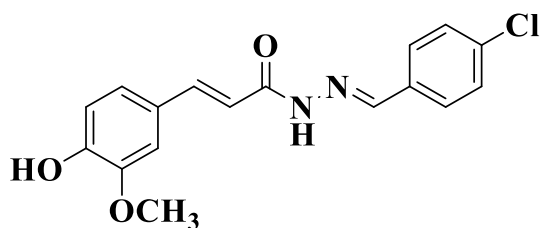
FM: C₁₇H₁₅FN₂O₃

MM: 314,1067 g.mol⁻¹ **F.F.:** 215-217 °C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 65.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 337,0972; calculado $[M+Na]^+$: 337,0964 (**Anexo B, fig. 68**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 13; Anexo B, fig. 66**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 14; Anexo B, fig. 67**).

(*E*)-*N'*-(4-clorobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-214 (**28d**)



Rendimento: 63%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

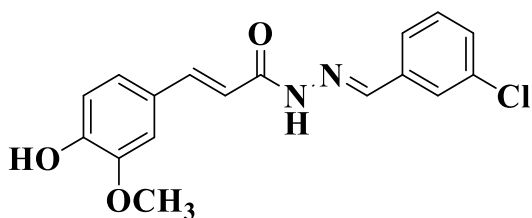
FM: C₁₇H₁₅ClN₂O₃

MM: 330,0771 g.mol⁻¹ **F.F.:** 225-227°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 69.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 353,0647; calculado $[M+Na]^+$: 353,0669 (**Anexo B, fig. 72**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 15; Anexo B, fig. 70**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 16; Anexo B, fig. 71**).

(*E*)-*N'*-(3-clorobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-215 (**28e**)



Rendimento: 45%

Aspecto físico: sólido branco

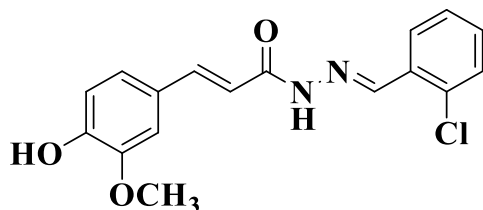
FM: C₁₇H₁₅ClN₂O₃

MM: 330,0771 g.mol⁻¹ **F.F.:** 215-217°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 73.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 353,0677; calculado $[M+Na]^+$: 353,0669 (**Anexo B, fig. 76**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 15; Anexo B, fig. 74**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 16; Anexo B, fig. 75**).

(*E*)-*N'*-(2-clorobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-216 (**28f**)



Rendimento: 46%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

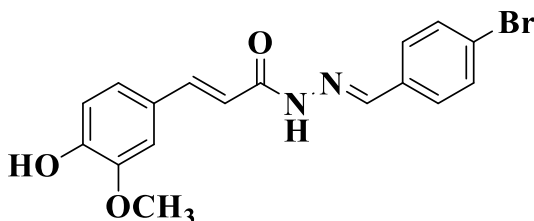
FM: C₁₇H₁₅ClN₂O₃

MM: 330,0771 g.mol⁻¹ **F.F.:** 230-232°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 77.**

HRMS (ESI): encontrado [M+Na]⁺: 353,0666; calculado [M+Na]⁺: 353,0669 (**Anexo B, fig. 80**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 15; Anexo B, fig. 78**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 16; Anexo B, fig. 79**).

(*E*)-*N'*-(4-bromobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-217 (**28g**)



Rendimento: 67%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

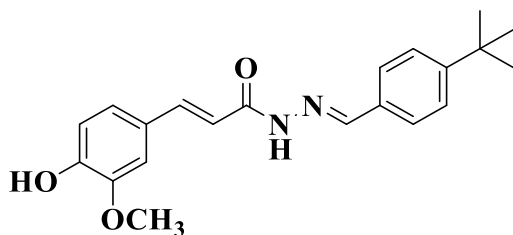
FM: C₁₇H₁₅BrN₂O₃

MM: 374,0266 g.mol⁻¹ **F.F.:** 224-226°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 81.**

HRMS (ESI): encontrado [M+Na]⁺: 397,0155; calculado [M+Na]⁺: 397,0164 (**Anexo B, fig. 84**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 17; Anexo B, fig. 82**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 18; Anexo B, fig. 83**).

(*E*)-*N'*-(4-(tert-butil)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-218 (**28h**)



Rendimento: 31%

Aspecto físico: sólido verde claro

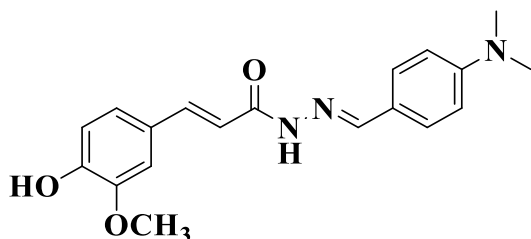
FM: C₂₁H₂₄N₂O₃

MM: 352,1787 g.mol⁻¹ **F.F.:** 235-238°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 85.**

HRMS (ESI): encontrado [M+Na]⁺: 375,1691; calculado [M+Na]⁺: 375,1685 (**Anexo B, fig. 88**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 17; Anexo B, fig. 86**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 18; Anexo B, fig. 87**).

(*E*)-*N'*-(4-(dimetilamino)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-219 (**28i**)



Rendimento: 53%

Aspecto físico: sólido amarelo escuro

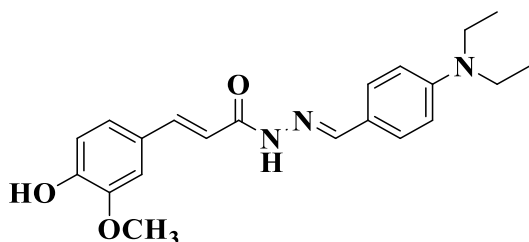
FM: C₁₉H₂₁N₃O₃

MM: 339,1583 g.mol⁻¹ **F.F.:** 121-123 °C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 89.**

HRMS (ESI): encontrado [M+Na]⁺: 362,1471; calculado [M+Na]⁺: 362,1481 (**Anexo B, fig. 92**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 17; Anexo B, fig. 90**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 18; Anexo B, fig. 91**).

(*E*)-*N'*-(4-(dietilamino)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-220 (**28j**)



Rendimento: 55%

Aspecto físico: sólido Amarelo escuro

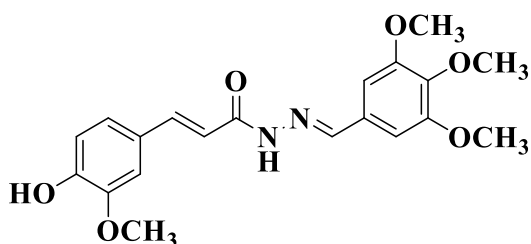
FM: C₂₁H₂₅N₃O₃

MM: 367,1896 g.mol⁻¹ **F.F.:** 163-165°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 93.**

HRMS (ESI): encontrado [M+H]⁺: 368,1963; [M+H]⁺: 368,1896 (**Anexo B, fig. 96**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 19; anexo B, fig. 94**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 20; Anexo B, fig. 95**).

(*E*)-*N'*-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-221 (**28k**)



Rendimento: 52%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

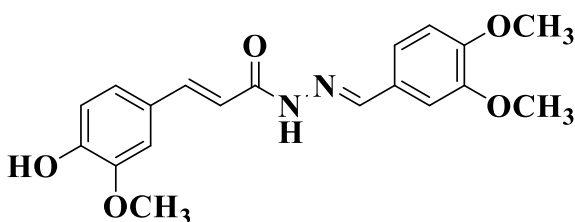
FM: C₂₀H₂₂N₂O₆

MM: 386,1478 g.mol⁻¹ **F.F.:** 205-208°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 97.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 409,1368; calculado $[M+Na]^+$: 409,1376 (**Anexo B, fig. 100**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 19; Anexo B, fig. 98**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 20; Anexo B, fig. 99**).

(*E*)-*N'*-(3,4-dimetoxibenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-222 (**28l**)



Rendimento: 85%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

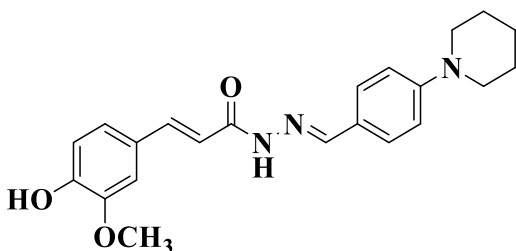
FM: C₁₉H₂₀N₂O₅

MM: 356,1372 g.mol⁻¹ **F.F.:** 135-137°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 101.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 379,1263; calculado $[M+Na]^+$: 379,1270 (**Anexo B, fig. 104**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 19; Anexo B, fig. 102**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 20; Anexo B, fig. 103**).

(*E*)-*N'*-(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-223 (**28m**)



Rendimento: 75%

Aspecto físico: sólido amarelo

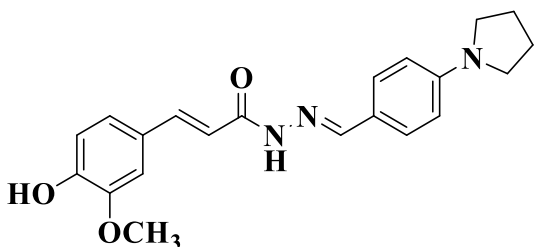
FM: C₂₂H₂₅N₃O₃

MM: 379,1896 g.mol⁻¹ **F.F.:** 120-122°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 105.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+H]^+$: 380,1956; calculado $[M+H]^+$: 380,1974 (**Anexo B, fig. 108**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 21; Anexo B, fig. 106**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 22; Anexo B, fig. 107**).

(*E*)-*N'*-(4-(pirrolidin-1-il)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-224 (**28n**)



Rendimento: 44%

Aspecto físico: sólido verde

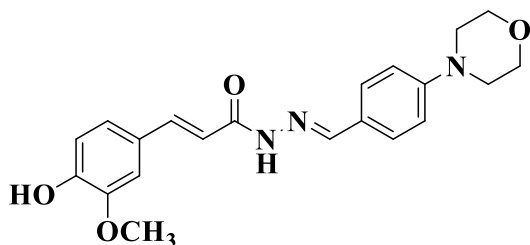
FM: C₂₁H₂₃N₃O₃

MM: 365,1739 g.mol⁻¹ **F.F.:** 245-248°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 109.**

HRMS (ESI): encontrado [M+H]⁺: 366,1813; calculado [M+H]⁺: 366,1818 (**Anexo B, fig. 112**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 21; Anexo B, fig. 110**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 22; Anexo B, fig. 111**).

(*E*)-*N'*-(4-morfolinobenzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-225 (**28o**)



Rendimento: 47%

Aspecto físico: sólido rosa claro

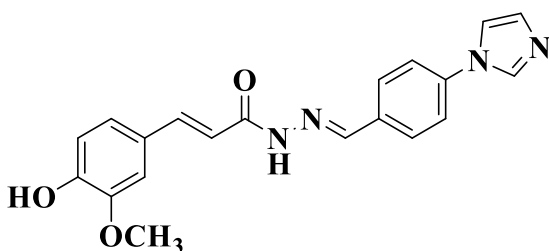
FM: C₂₁H₂₃N₃O₄

MM: 381,1689 g.mol⁻¹ **F.F.:** 225-227°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 113.**

HRMS (ESI): encontrado [M+H]⁺: 382,1751; calculado [M+H]⁺: 382,1767 (**Anexo B, fig. 116**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 21; Anexo B, fig. 114**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 22; Anexo B, fig. 115**).

(*E*)-*N'*-(4-(1*H*-imidazol-1-il)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-226 (**28p**)



Rendimento: 87%

Aspecto físico: sólido amarelo

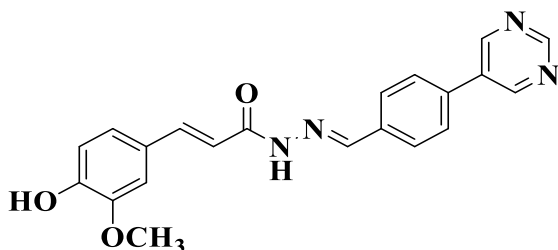
FM: C₂₀H₁₈N₄O₃

MM: 362,1379 g.mol⁻¹ **F.F.:** 262-264°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 117.**

HRMS (ESI): encontrado $[M+H]^+$: 363,0936; calculado $[M+H]^+$: 363,1457 (**Anexo B, fig. 120**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 23; Anexo B, fig. 118**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 24; Anexo B, fig. 119**).

(*E*)-*N'*-(4-(pirimidino-5-il)benzilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-227 (**28q**)



Rendimento: 78%

Aspecto físico: sólido amarelo

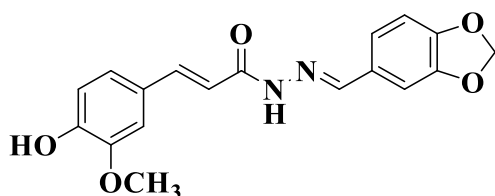
FM: C₂₁H₁₈N₄O₃

MM: 374,1379 g.mol⁻¹ **F.F.:** 225-227°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): Anexo B, fig. 121.

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 397,1262; calculado $[M+Na]^+$: 397,1277 (**Anexo B, fig. 124**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 23; Anexo B, fig. 122**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 24; Anexo B, fig. 123**).

(*E*)-*N'*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-228 (**28r**)



Rendimento: 61%

Aspecto físico: sólido amarelo

FM: C₁₈H₁₆N₂O₅

MM: 340,1059 g.mol⁻¹ **F.F.:** 217-219°C

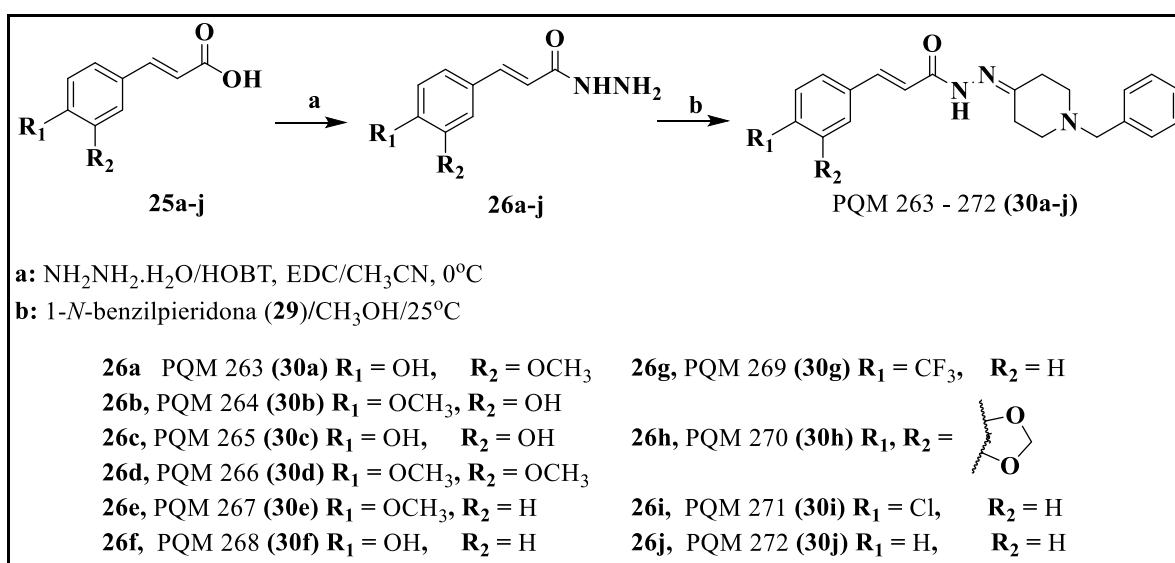
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): Anexo B, fig. 125.

HRMS (ESI): encontrado $[M+Na]^+$: 363,1467; calculado $[M+Na]^+$: 363,0957 (**Anexo B, fig. 128**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 23; Anexo B, fig. 126**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 24; Anexo B, fig. 127**).

5.1.4 Abordagem sintética da série de híbridos *N*-acilidrazônicos cinâmico-donepezil PQM-263 a PQM-272 (30a-j)

A rota sintética da série alvo de híbridos moleculares inspirados na curcumina (**2**) e no donepezil (**1**) foi baseada na preparação dos intermediários chaves hidrazídicos (**26a-j**), obtidos a partir de diferentes ácido $\alpha\beta$ saturados substituídos (**25a-j**) com monohidrato de hidrazida (CARVALHO *et al.*, 2012). Seguido pelo acoplamento com 1-benzil-4-piperidona (**29**) comercial, que forneceu os derivados acilidrazônicos PQM-263 – PQM-272 (Figura 85).

Figura 85 - Rota sintética das substâncias alvo PQM-263 a PQM-272 (30a-j)



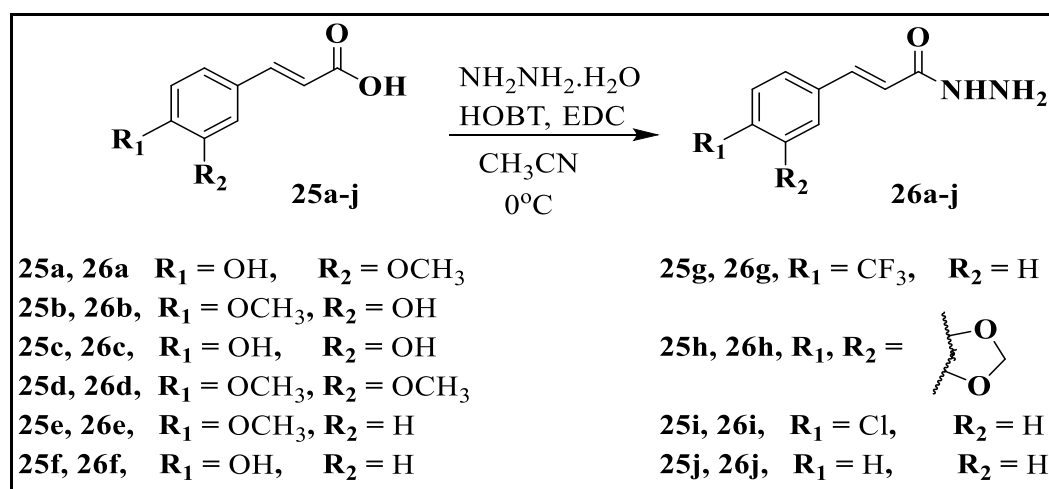
Fonte: do Autor

5.1.4.1 Abordagem geral da síntese dos intermediários hidrazídicos (26a-j)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 300 mg do ácido cinâmico correspondente (**25a-j**, 1 eq.) em acetonitrila (10 mL), adicionou-se HOBT (1,2 eq) e EDAC (1,2 eq), mantendo agitação magnética por duas horas aproximadamente a temperatura ambiente (25°C). Em um segundo balão em banho de gelo agitou-se uma solução de

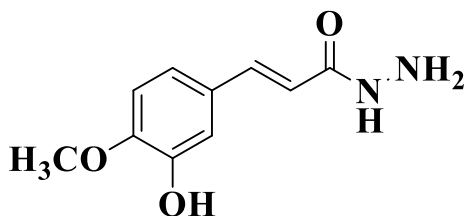
monohidrato de hidrazida (10 eq) em acetonitrila (10 mL), em seguida adicionou-se, lentamente, com ajuda de uma pipeta Pasteur gota-a-gota a primeira reação à solução de monohidrato de hidrazida. Ao término da adição, o meio racional foi concentrado no rotaevaporador e seco sob vácuo. Finalmente, adicionou-se uma solução de NaHCO₃ 5 % (4 mL). Agitou-se para permitir a formação do precipitado e isolou-se por filtração para finalmente obter os intermediários hidrazídicos (**26a-j**).

Figura 86 - Síntese dos intermediários (**26a-j**).



Fonte: do autor.

(*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acilidrazida (**26b**)



Rendimento: 78%

Aspecto físico: sólido branco

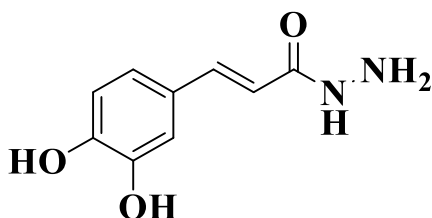
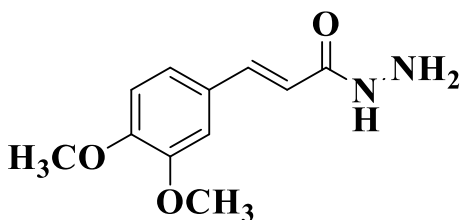
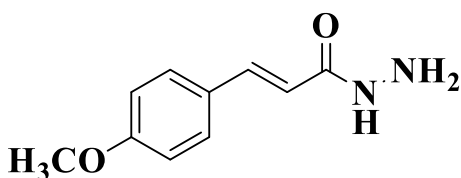
FM: C₁₀H₁₂N₂O₃

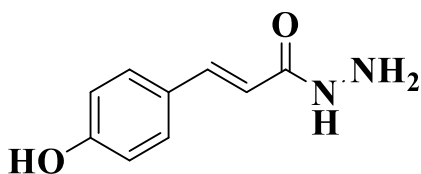
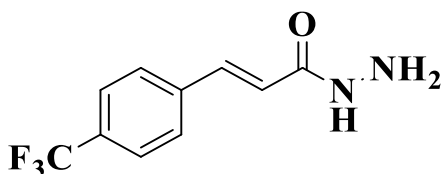
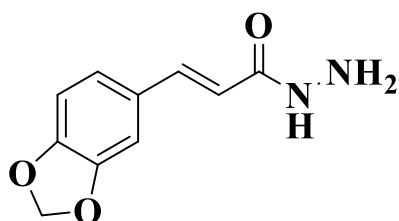
MM: 208,0848 g.mol⁻¹

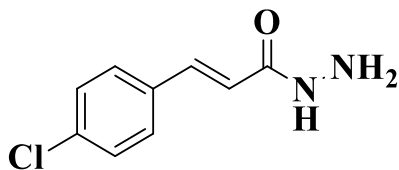
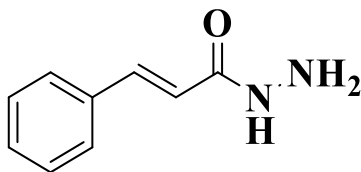
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): Anexo B, fig. 132.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 25; Anexo B, fig. 133).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 26; Anexo B, fig. 134).

(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)acilidrazida (26c)**Rendimento:** 38 %**Aspecto físico:** sólido amarelo claro**FM:** C₉H₁₀N₂O₃**MM:** 194,0691 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 135.****RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 27; Anexo B, fig. 1136**).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 28; Anexo B, fig. 137**).**(E)-3-(3,4-dimetoxifenil)acilidrazida (26d)****Rendimento:** 84 %**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₁₁H₁₄N₂O₃**MM:** 222,1004 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 138.****RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 27; Anexo B, fig. 139**).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 28; Anexo B, fig. 140**).**(E)-3-(4-metoxifenil)acilidrazida (26e)****Rendimento:** 58 %**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₁₀H₁₂N₂O₂**MM:** 192,0899 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 141.****RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 29; Anexo B, fig. 142**).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 30; Anexo B, fig. 143**).

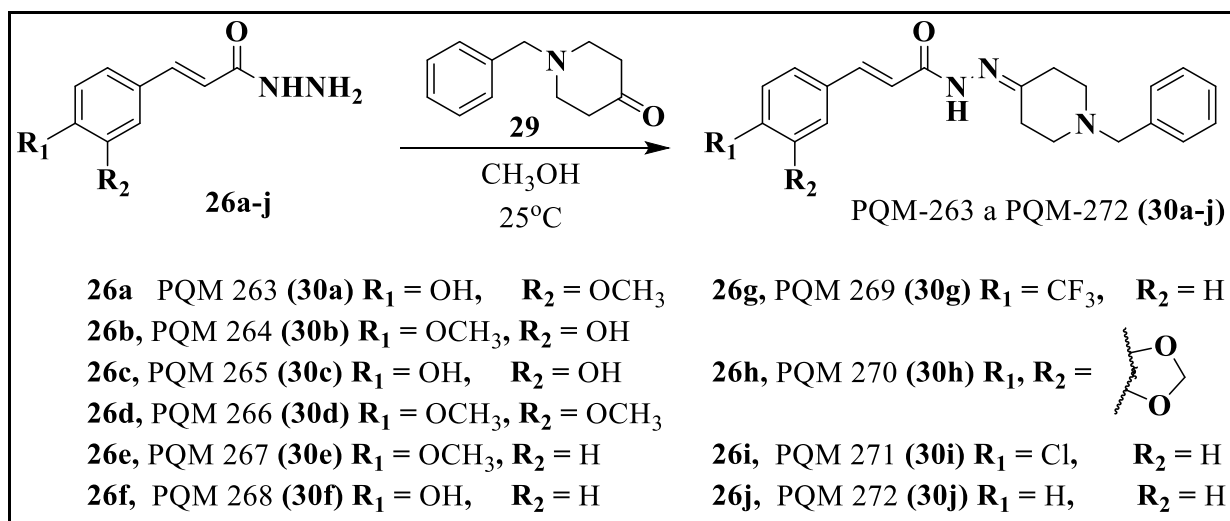
(E)-3-(4-hidroxifenil)acilidrazida (26f)**Rendimento:** 79 %**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₉H₁₀N₂O₂**MM:** 178,0742 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): Anexo B, fig. 144.**RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 29; Anexo B, fig. 145).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 30; Anexo B, fig. 146).**(E)-3-(4-(trifluorometil)fenil)acilidrazida (26g)****Rendimento:** 76 %**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₁₀H₉F₃N₂O**MM:** 230,0667 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): Anexo B, fig. 147.**RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 31; Anexo B, fig. 148).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 32; Anexo B, fig. 149).**(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)acilidrazida (26h)****Rendimento:** 66 %**Aspecto físico:** sólido marrom**FM:** C₁₀H₁₀N₂O₃**MM:** 206,0691 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): Anexo B, fig. 150.**RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 31; Anexo B, fig. 151).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, tabela 32; Anexo B, fig. 152).

(E)-3-(4-clorofenil)acilidrazida (26i)**Rendimento:** 82 %**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₉H₉ClN₂O**MM:** 196,0403 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 153.****RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 33; Anexo B, fig. 154**).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 34; Anexo B, fig. 155**).**Hidrazida *trans*-cinâmica (26j)****Rendimento:** 28 %**Aspecto físico:** sólido branco**FM:** C₉H₁₀N₂O**MM:** 162,0793 g.mol⁻¹**IV** ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 156****RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 33; Anexo B, fig. 157**).**RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 34; Anexo B, fig. 158**).**5.1.4.2 Acoplamento dos intermediários hidrazídicos funcionalizados (26a-j) com 1-benzil-4-piperidona (22): Obtenção dos compostos finais PQM-263 a PQM-272 (30a-j)**

Em um balão de 50 mL contendo 1-benzil--piperidona (**29**, 1,2 eq) em metanol (10 mL), adicionou-se lentamente o intermediário hidrazídico correspondente (**26a-j**). O sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente até consumo total da hidrazida. A evolução da reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) usando como eluente acetato de etila (100%). Após confirmação do término da reação, o produto foi filtrado e lavado com uma solução gelada de acetato:hexano (1:1). As reações em que o produto não precipitou, o solvente foi primeiramente rotaevaporado sob pressão reduzida, seguida da adição acetato de etila para favorecer a precipitação. Finalmente, realizou-se uma

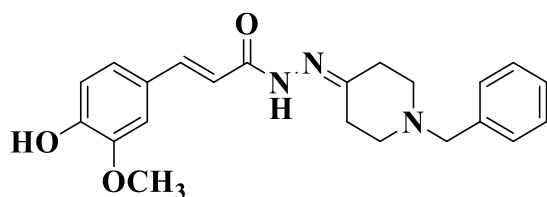
filtração para finalmente obter os produtos-finais desta série de análogos do donepezil PQM-263 a PQM-272 (**26a-j**).

Figura 87 - Reação de acoplamento dos intermediários hidrazídicos (**26a-j**) com 1-benzil-4-piperidona (**29**) para obtenção da série alvo PQM-263 a PQM-272 (**26a-j**).



Fonte: do autor

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acilidrazida PQM-263
(**30a**)



Rendimento: 46 %

Aspecto físico: sólido branco

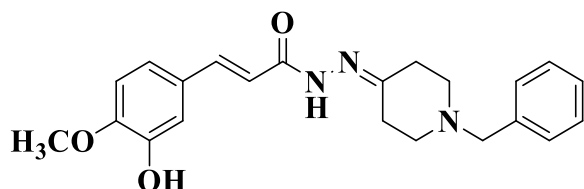
FM: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$

MM: 379,1896 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **F.F.:** 200-203°C

IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): **Anexo B, fig. 159.**

HRMS (ESI) m/z : calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 380,1974; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 380,1978 (**Anexo B, fig. 162**). **RMN de ^1H** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 35; Anexo B, fig. 160**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 36; Anexo B, fig. 161**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acilidrazida PQM-264 (30b)



Rendimento: 37 %

Aspecto físico: sólido branco

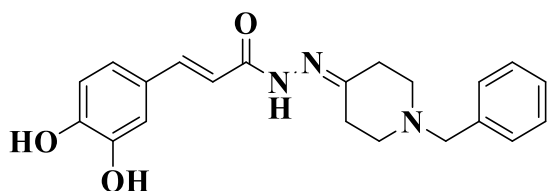
FM: C₂₂H₂₅N₃O₃

MM: 379,1896 g.mol⁻¹ **F.F.:** 191-192°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 163.**

HRMS (ESI) *m/z*: calculado [M+H]⁺: 380,1974; encontrado [M+H]⁺: 380,1964 (**Anexo B, fig. 166**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 35; Anexo B, fig. 164**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 36; Anexo B, fig. 165**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(3,4-dihidroxifenil)acilidrazida PQM-265 (30c)



Rendimento: 19 %

Aspecto físico: sólido amarelo

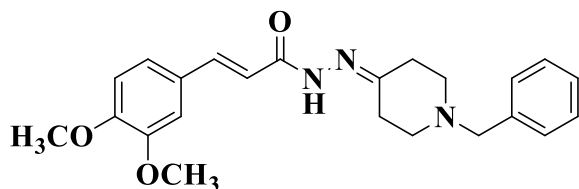
FM: C₂₁H₂₃N₃O₃

MM: 365,1739 g.mol⁻¹ **F.F.:** 139-140°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 167.**

HRMS (ESI) *m/z*: calculado [M+H]⁺: 366,1818; encontrado [M+H]⁺: 366,1803 (**Anexo B, fig. 170**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 35; Anexo B, fig. 168**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 36; Anexo B, fig. 169**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(3,4-dimetoxifenil)acilidrazida PQM-266 (30d)



Rendimento: 55 %

Aspecto físico: sólido branco

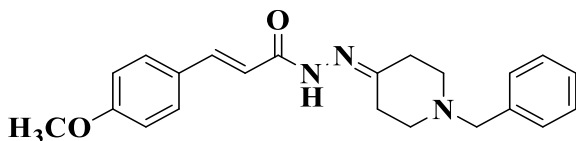
FM: C₂₃H₂₇N₃O₃

MM: 393,2052 g.mol⁻¹ **F.F.:** 184-185°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 171.**

HRMS (ESI) m/z : calculado $[M+H]^+$: 394,2131; encontrado $[M+H]^+$: 394,2124 (**Anexo B, fig. 174**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 37; Anexo B, fig. 172**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 38; Anexo B, fig. 173**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(4-metoxifenil)acilidrazida PQM-267 (**30e**)



Rendimento: 29 %

Aspecto físico: sólido branco

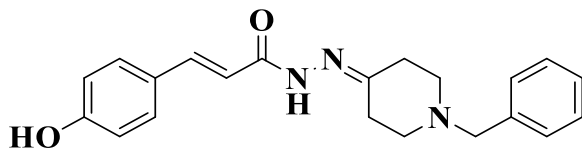
FM: C₂₂H₂₅N₃O₂

MM: 363,1947 g.mol⁻¹ **F.F.:** >300°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 175.**

HRMS (ESI) m/z : calculado $[M+H]^+$: 364,2025; encontrado $[M+H]^+$: 364,2015 (**Anexo B, fig. 178**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 37; Anexo B, fig. 176**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 38; Anexo B, fig. 177**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(4-hidroxifenil)acilidrazida PQM-268 (**30f**)



Rendimento: 39 %

Aspecto físico: sólido amarelo claro

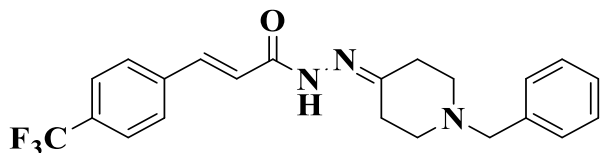
FM: C₂₁H₂₃N₃O₂

MM: 349,1790 g.mol⁻¹ **F.F.:** 223-226°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 179.**

HRMS (ESI) m/z : calculado $[M+H]^+$: 350,1869; encontrado $[M+H]^+$: 350,1858 (**Anexo B, fig. 182**). **RMN de 1H** (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 37; Anexo B, fig. 180**). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 38; Anexo B, fig. 181**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(4-(trifluorometil) fenil)acilidrazida PQM-269 (**30g**)



Rendimento: 57 %

Aspecto físico: sólido branco

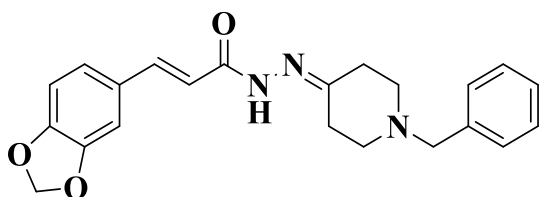
FM: C₂₂H₂₂F₃N₃O

MM: 401,1715 g.mol⁻¹ **F.F.:** 185-188°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 183.**

HRMS (ESI) *m/z*: calculado [M+H]⁺: 402,1793; encontrado [M+H]⁺: 402,1783 (**Anexo B, fig. 186**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 39; Anexo B, fig. 184**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 40; Anexo B, fig. 185**).

(*E*)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilidene) acilidrazida PQM-270 (**30h**)



Rendimento: 56 %

Aspecto físico: sólido marrom claro

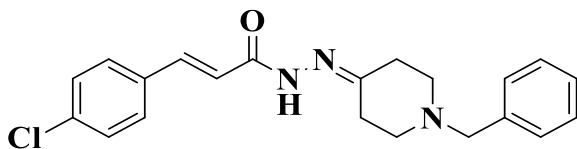
FM: C₂₂H₂₃N₃O₃

MM: 377,1739 g.mol⁻¹ **F.F.:** 88-90°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 187.**

HRMS (ESI) *m/z*: calculado [M+H]⁺: 378,1818; encontrado [M+H]⁺: 378,1801 (**Anexo B, fig. 190**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 39; Anexo B, fig. 188**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 40; Anexo B, fig. 189**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)-3-(4-clorofenil)acilidrazida PQM-271 (**30i**)



Rendimento: 73 %

Aspecto físico: sólido branco

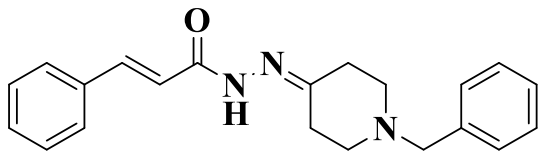
FM: C₂₁H₂₂ClN₃O

MM: 367,1451 g.mol⁻¹ **F.F.:** 206-209°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 191.**

HRMS (ESI) *m/z*: calculado [M+H]⁺: 368,1530; encontrado [M+H]⁺: 368,1525 (**Anexo B, fig. 194**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 39; Anexo B, fig. 192**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 40; Anexo B, fig. 193**).

(*E*)-*N'*-(1-benzilpiperidina-4-ilideno)cinamohidrazida PQM-272 (**30j**)



Rendimento: 11 %

Aspecto físico: sólido amarelo claro

FM: C₂₁H₂₃N₃O

MM: 333,1841 g.mol⁻¹**F.F.:**180-183°C

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): **Anexo B, fig. 195.**

HRMS (ESI) *m/z*: calculado [M+H]⁺: 334,1919; encontrado [M+H]⁺: 334,1919 (**Anexo B, fig. 198**). **RMN de ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 41; Anexo B, fig. 196**). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (**Anexo A, tabela 41; Anexo B, fig. 197**).

5.2 TESTES BIOLÓGICOS

As 3 séries sintetizadas foram testadas para avaliar seus efeitos *in vitro* sobre a atividade inibitória das enzimas MAO, AChE e BuChE, bem como o tipo de mecanismo de inibição da AChE e sua neurocitotoxicidade. Também foi realizado o estudo *in silico* de modelagem molecular para entender as possíveis interações dos compostos com a enzima AChE. Finalmente, foi avaliado o perfil antioxidante, quelante de biometais, neuroprotetor e anti-inflamatório dos compostos-alvo e deste modo determinar o perfil de ação multialvo.

5.2.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro* (método modificado de Ellman)

O estudo da atividade anticolinesterásica foi realizada em parceria com o laboratório de Farmacologia Molecular na Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ) no Instituto de ciências biomédicas, sob orientação do professor Dr. Newton Castro (Metodologia A) e no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRJR), sob orientação do professor Dr. Arthur Kümmerle (Metodologia B).

Metodologia A

Inibição da AChE e BuChE: Para avaliação *in vitro* da inibição de *EeAChE* (E.C.3.1.1.7, 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; DIAS *et al.*, 2017). Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 µL da enzima (0,5 U/mL) e 5 µL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (10 mM) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4), 100 µL das soluções dos compostos avaliados (duas vezes mais concentrado), juntamente com 55 µL de tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) atingindo o volume de 180 µL. Após 10 minutos, 20 µL 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).

As amostras foram dissolvidas em DMSO a uma concentração de 0,1 M, obtendo-se assim uma concentração de DMSO de 0,03% na concentração final 30 μ M na triagem, sendo que esta concentração não interfere no ensaio. Em seguida as amostras foram avaliadas no ensaio de inibição de acetilcolinesterase purificada de *E. electricus*. Para a realização do ensaio, foi necessário que as amostras estivessem diluídas em meio aquoso (solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4), a triagem inicial foi feita a uma concentração final de 30 μ M. A seguir foi feita uma avaliação no teste espectrofotométrico em uma concentração final (nominal) de 30 μ M por se tratar de um valor bem acima do CI_{50} dos inibidores da colinesterase clássicos.

Metodologia B

Inibição da AChE e BuChE: A atividade anticolinesterásica foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão *tris*-HCl 0,02 M (pH = 7,5) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (15 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionadas soluções de tratamento com o composto inibidor em concentração final de 30 μ M. O controle veículo (DMSO - concentração final 0,2% v/v para AChE ou BuChE), foi utilizado como referência (controle negativo). Foram adicionados ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) às colinesterases de enguia elétrica (*ee*AChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (*eq*BChE) na presença de albumina sérica bovina (ABS). A absorbância foi registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, iodeto de acetilcolina (ACTI) ou iodeto de butirilcolina (BCTI), segundo o caso foi adicionado e a absorbância foi registrada após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente a $\lambda = 415$ nm por 3 vezes dentro de 30 segundos. A atividade enzimática foi calculada como percentagem da média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com DMSO, descontada da média dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão). Os valores de inibição foram calculados com auxílio do

programa Excel. Os valores de CI_{50} foram calculados no programa Graphpad Prism 7.0 usando o modelo de regressão não-linear para inibição dose-resposta.

Avaliação de Cinética Enzimática da Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase:

Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão *tris*-HCl 0,02 M (pH = 7,5) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (2 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150 μ L de solução do composto inibidor (**PQM- 189**; **PQM - 272**) em duas concentrações diferentes (2 e 4 μ M) distribuídas em oito conjuntos de triplicatas cada. Os oito conjuntos de triplicatas tratados com DMSO (concentração final 0,2 % v / v para AChE e 0,18% v / v para BChE), foram utilizados como controle negativo. A seguir, foram adicionados 60 μ L de DTNB a 1,1 mM e 30 μ L de AChE isolada do encéfalo de enguia elétrica (*ee*AChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (*eq*BChE) a 0,20 U / mL na presença de 1 mg/mL de ASB. A absorbância foi então registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após 10 minutos de incubação a 25°C, 24 μ L de solução do substrato iodeto de acetiltocolina (ACTI) ou iodeto de butiriltocolina (BCTI) em oito concentrações diluídas em série (fator = 1,3) de 2,75 - 0,44 mM (concentração final: 0,25 - 0,04 mM) foram adicionados aos respectivos poços e a absorbância registrada após incubação durante 10 minutos a 25°C a $\lambda = 415$ nm. Os gráficos recíprocos de Lineweaver-Burk foram obtidos por plotagem de um gráfico de 1/velocidade *versus* 1/[substrato] para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de K_i , K_i' (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente), K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática-inibição e cinética enzimática-substrato *versus* velocidade.

5.2.2 Estudo de modelagem molecular

A análise de *docking* molecular foi realizada em parceria com o Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) na cidade de Petrópolis-RJ, sob orientação da professora Isabella Alves. Foram selecionadas três conformações representativas da AChE (LOPES, J. P. B. *et al.*, 2017), além da estrutura da AChE humana complexada com donepezil (CHEUNG *et al.*, 2012) (código PDB 4EY7), devido às significativas mudanças conformacionais observadas no sítio aniônico periférico (PAS) da enzima AChE (Johnson and Moore, 2006). A estratégia de acoplamento consistiu na ancoragem dos compostos em cada conformação representativa do receptor, com o objetivo de considerar a flexibilidade da proteína. As estruturas selecionadas foram: 1ZGC (HAVIV *et al.*, 2005) (*Torpedo californica*), 2CKM (RYDBERG *et al.*, 2006) (*Torpedo californica*), 1Q84 (BOURNE *et al.*, 2004) (*Mus musculus*) e 4EY7 (CHEUNG *et al.*, 2012) (*Homo sapiens*). Todos os inibidores das quatro conformações representativas da AChE interagem tanto com o CAS como com o PAS. As águas conservadas foram identificadas através da superposição das estruturas e consideradas explicitamente durante os experimentos de ancoragem (**Tabela 15**).

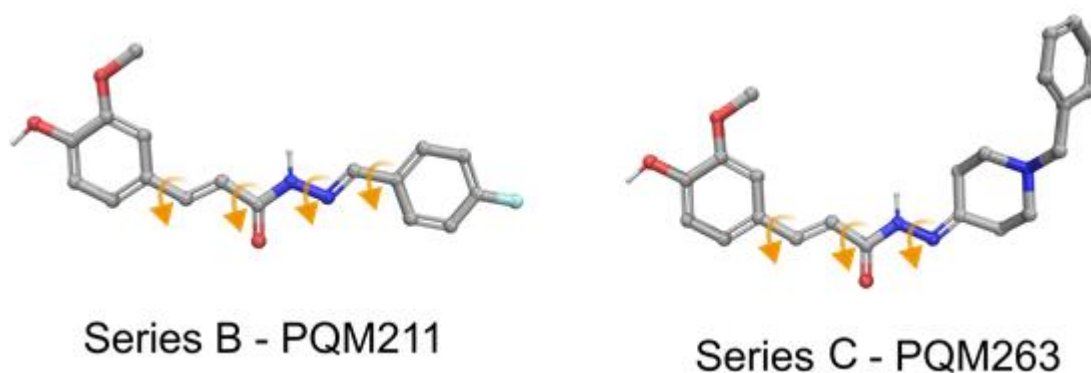
Tabela 15 - Águas conservadas durante os experimentos de *docking*.

Água	1ZGC	1Q84	2CKM	4EY7
Wat1	1468	1708	2062	729
Wat2	1481	1755	2054	737
Wat3	1489	1715	2061	722
Wat4	1531	1735	2035	731

As estruturas dos receptores foram preparadas com a ferramenta *Protein Preparation Wizard* da Schrödinger Suite 2018-4 (MADHAVI SASTRY *et al.*, 2013) e os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos foram previstos usando PROPKA com pH = 7. Finalmente, uma otimização da rede de ligação de hidrogênio dos complexos proteína-ligante foi realizada para ajustar a orientação dos átomos de hidrogênio, seguida por uma minimização de energia dos átomos de hidrogênio. Os compostos foram projetados e preparados com LigPrep da Maestro para estabelecer os isômeros, estados de protonação e

tautômeros com Epik (GREENWOOD *et al.*, 2010) a pH $7,0 \pm 0,4$. Aplicamos restrições de torção a algumas ligações rotativas para manter a planaridade observada para alguns compostos durante os estudos de *docking* (**Figura 88**). A ligação rotativa do grupo amida foi mantida fixa à conformação *trans* em todos os compostos.

Figura 88 - Compostos com ligações rotativas fixados durante os estudos de *docking* (setas laranja). Os diédricos não destacados nesta imagem foram definidos como livres para girar, exceto as ligações amida.



O estudo de *docking* foi realizado com o programa de *docking* molecular Glide (RICHARD A. FRIESNER *et al.*, 2006) no modo de precisão XP - indicado para ligantes altamente flexíveis e para reduzir falsos positivos. Todas as estruturas foram alinhadas com a conformação 1ZGC usando a super ferramenta Pymol. As grades receptoras foram centradas no ligante nativo presente no complexo 1Q84 (X: 98.06, Y: 53.14 e Z: 22.06). Também foram redockados os ligantes co-cristalizados em suas respectivas conformações AChE e nas estruturas não-nativas (isto é, cross-docking) para validar o protocolo de *docking*. Foi selecionada a posição do ligante de acordo com a menor pontuação de XP entre todas as quatro conformações de AChE.

5.2.3 Avaliação *in vitro* da atividade neuroprotetora, antioxidante e quelante de biometais

Os experimentos que foram conduzidos na universidade de Bolonha, no campus de Rimini, sob supervisão do Dr. Tarozzi e focados na avaliação *in vitro* dos efeitos de

neuroproteção, antioxidante e de neurotoxicidade em culturas neuronais humanas. Em particular, foi seguido um protocolo experimental dividido em 3 fases, onde foi investigado o mecanismo de ação neuroprotetor das substâncias sintetizadas contra o estresse oxidativo induzido por hidroperóxido tercbutila (*t*-BuOOH), 6-OHDA, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e biometais. Também foram realizados ensaios de 1.1.1.4 Neuroproteção frente a proteína β-amilóide, determinação dos níveis de glutathiona (GSH) intracelular, da atividade indutora de Nrf2 e anti-inflamatória. Finalmente, em colaboração com o professor Marco Catto foi realizado o estudo de inibição da enzima MAO-A e MAO-B.

5.2.3.1 Culturas celulares

Células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol/L-glutamina, 50 U/mL penicilina e 50 µg/mL estreptomicina. Foram encubadas a 37°C com 5% CO₂.

5.2.3.2 Determinação da neurotoxicidade induzida pelos compostos

A viabilidade celular foi avaliada em termos de atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT, como descrito previamente por Tarozzi (2007) (TAROZZI *et al.*, 2007). As células foram semeadas em placas de 96 poços 2 x 10⁴ células/poço, encubadas por 24h e posteriormente tratadas com os compostos testes nas concentrações adequadas (80-2,5 µM) e encubadas novamente por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado à solução de MTT (5 mg/mL) em solução salina balanceada de Hank (HBSS) por 2 h a 37 °C em 5% CO₂. Após lavagem com HBSS, os cristais de formazana foram dissolvidos em 150 µl de 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.

5.2.3.3 Determinação da expressão génica pelo ensaio PCR (Reação em cadeia de polimerase) em tempo real.

As células THP-1 (monócíticas de leucemia humana) foram semeadas em placas de 6 poços, $2,5 \times 10^6$ células por poço, e incubadas com PMA (5ng/mL) por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas com LPS (1µg/mL) na presença dos compostos **PQM-189** (10 µM) por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min a 4°C para obtenção dos pellets. O RNA foi isolado a partir dos pellets obtidos utilizando *PureLink[®] RNA Mini Kit* (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram lizadas na presença de isotiocianato de guanidina, um sal capaz de proteger o RNA das RNases endógenas. Após a homogeneização, etanol foi adicionado a amostra e a solução foi processada através do *Spin Cartidge* contendo uma membrana à base de sílica capaz de isolar o RNA. O RMN total purificado foi eluído em água livre de RNases e quantificado através de espectrometria utilizando *NanoVue Plus spectrophotometer* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) para quantificação de Real-Time PCR (qRT-PCR). A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando *SuperScript[®] VILO MasterMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Inicialmente o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total. O sistema *CFX Connect[™] Real Time* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) foi utilizado para a ampliação e quantificação por real time. As reações de PCR de cada amostra foram realizadas em triplicata, com volume final de 20 µL em placa de 96 poços. A solução de PCR contém 2 µL de cDNA (10 ng/L), 10 µL de *SYBR[™] Select Master Mix* (Invitrogen) e primers na concentração final de 300 nM, a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificações a 95 °C por 3 seg e 60 °C por 30 seg. Após as reações de amplificação foi realizada uma curva de *Melting* iniciando a 65 °C e elevando até 95 °C com 5 leituras/°C. Expressão relativa foi calculada de acordo com método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ com β -Actina e GAPDH (*Life technologies*) como padrões e células não tratadas como controle. As sequências dos *primers* usados neste estudo estão na **Tabela 16**.

Tabela 16 - seqüências dos *primers* usados para RT-PCR quantitativo.

Nome do gene	Frente (For)/ Reverso (Rev)	Seqüência 5' a 3'
iNOS	For Rev	TGAACTACGTCCTGTCCCCT CTCTTCTCTTGGGTCTCCGC
IL-1 β	For Rev	TGATGGCTTATTACAGTGGCAATG GTAGTGGTGGTCGGAGATTGC
B-Actina	For Rev	GCGAGAAGATGACCCAGATC GGATAGCACAGCCTGGATAG
GAPDH	For Rev	GGTCGGAGTCAACGGATTTG GGAAGATGGTGTGATGGGATTTTC

5.2.3.4 Atividade antioxidante: Capacidade sequestrante de radicais livres induzido por 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

A habilidade dos compostos das séries de híbridos donepezil-talidomida e derivados ferúlicos *N*-acilidrazônicos em sequestrar os radicais livres induzido por DPPH foi realizado no nosso laboratório (PEQUIM) da UNIFAL-MG de acordo com método descrito por Gontijo 2012 com modificações (GONTIJO *et al.*, 2012). Os compostos foram avaliados nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 μ M. Uma alíquota de 4 mL da amostra foi adicionada à 1mL da solução de DPPH (0.5 mM em etanol). A solução foi vigorosamente agitada à temperatura ambiente e após 30 minutos a absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro UV-*vis* (Shimadzu). Cada solução foi analisada em triplicata e as médias dos valores foi plotada para obtenção do CI₅₀. Ácido ascórbico, BHT e trolox foram utilizados como padrões. A capacidade sequestrante de radicais foi representada como porcentagem de inibição de acordo com a equação: % inibição = [(absorbância do controle – absorbância da amostra) / absorbância do controle] \times 100.

5.2.3.5 Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH).

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 x 10⁴ cel/poço, no caso do co-tratamento ou 2 x 10⁴ cel/poço, no caso do pré-tratamento e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida o meio de cultura foi removido e 100 µL de DCFH-DA (10 µg/mL) foi adicionado em cada poço e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período de incubação a solução de DCFH-DA é descartada e é adicionado 100 µL dos compostos testes nas concentrações adequadas (10-0,625 µM) e 100 µL de *t*-BOOH em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µM) em cada poço. A formação de EROs foi determinada (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) utilizando um leitor de microplacas nos tempos de 15, 30 e 45 minutos. Em paralelo o teste foi repetido, mas com o tratamento das células com os compostos testes 24 h antes da adição do *t*-BOOH e leitura nos tempos 15, 30 e 45 minutos, as concentrações utilizadas foram as mesmas do co-tratamento.

5.2.3.6 Determinação da inibição de formação intracelular de EROs induzidas por 6-hidroxdopamina (6-OHDA).

Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3 x 10⁴ cel/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida o meio de cultura é descartado e adicionou-se 50 µL das soluções dos compostos testes (10-0,625 µM) e 50 µL de 6-OHDA (100 e 200 µM) em cada poço, a placa foi então incubada por 2h a 37°C em 5% CO₂. Terminado o período de tratamento o conteúdo da placa foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo (DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)+ 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*)) a cada poço e a placa foi novamente incubada por 22h a 37°C em 5% CO₂. Por fim foi realizado um teste de MTT, como descrito anteriormente.

5.2.3.7 Avaliação da capacidade quelante de biometais Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 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, P.; MIAH; ASCHNER, 2016) Foram preparadas soluções de 15 μM dos compostos em metanol e soluções de 15 μM dos compostos em presença de 15 μM de CuSO_4 , FeSO_4 , FeCl_3 e ZnCl_2 . Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente em cubeta de quartzo.

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

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 a solução de DCFH-DA foi descartada em seguida 50 μL , das várias concentrações dos compostos (10-0,625 μM), 100 μL H_2O_2 (100 μM ou 200 μM) e 50 μL de $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (50 μM) foram adicionados a cada poço. A formação de EROs foi determinada (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) utilizando um leitor de microplacas nos tempos 15, 30 e 45 minutos.

5.2.3.9 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) intracelular.

Para determinar os níveis de GSH intracelular foi realizado um ensaio fluorimétrico com monoclorobimano (mCIB) e células incubadas em placas de 96 poços (SEBASTIÀ *et al.*, 2003). Inicialmente as células SH-SY5Y foram semeadas nas placas de 96 poços com 2×10^4 cel/poços, e incubadas durante 24 horas. Após este tempo se prepararam os tratamentos em diferentes concentrações dos compostos estudados (10 a 0,625 μM) e, logo

cada placa foi incubada por mais 24h a 37 °C em 5% CO₂. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado mCIB (50 µM) em HBSS 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. Os valores são expressos como uma porcentagem das células de controle.

5.2.3.10 Determinação da atividade indutora de Nrf2.

Obtenção dos pellets nuclear e citoplasmático: O experimento foi realizado em cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Inicialmente, se separou o conteúdo citoplasmático do nuclear utilizando o Kit de extração nuclear da empresa *Active Motif* e a concentração de Nrf2 foi determinada utilizando kit TrsndSM[®] Nrf2 da mesma empresa. Logo as células foram semeadas em placa de petri de 100 mm com 7,5x10⁶ células por placa e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Após período de incubação foi realizado o tratamento das células com a substância teste a 10 µM em diferentes tempos (3 h, 6 h, 12 h e 24 h). Após o tempo de tratamento o meio de cultura foi retirado e as células foram coletadas com auxílio de raspador celular e transferidas para um tubo falcom e levado para centrifugação a 4 °C, 500 rpm por 5 minutos, ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado e passou-se a trabalhar com o pelet formado. Em seguida o pellet formado foi suspenso em 500 µL de uma solução de tampão fosfato-salino e inibidor de fosfatase e transferido para um ependorff de 2 mL, em seguida foram adicionados 25 µL de detergente (presente no kit) e homogeneizou-se com auxílio de vortex. Finalmente, o ependorff foi centrifugado por 30 segundos a 14.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante, contendo a fração citoplasmática das células, foi transferido para outro ependorff rotulado e armazenado a -80 °C. O precipitado se reservou para próxima etapa. O pellet formado anteriormente foi suspenso em 50 µL de solução de lise completa (presente no kit) e homogeneizado com auxílio de vortex, em seguida o ependorff foi deixado em gelo por 30 minutos sob agitação. Em seguida, foi novamente levado ao vortex por 30 segundos e centrifugado a 14.000 rpm a 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante, contendo a fração nuclear das células, foi transferido para ependorff rotulado e armazenado a -80 °C.

Teste de Bradford: Inicialmente foi preparada uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino (ASB) como proteína a ser detectada, foi preparada uma curva utilizando um branco e 5 volumes diferentes (0, 2, 5, 10 e 20 μL) de ASB em um total de 800 μL de solução em água bidestilada. Em seguida preparou-se soluções contendo 2 μL de amostra e 798 μL de água bidestilada. Por fim foi adicionado 200 μL da sonda *Bio-Rad protein dye*, e foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm. Utilizando os dados da curva de calibração determinou-se a concentração de proteína em cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Teste de ELISA para determinação da ativação de Nrf2: O teste está dividido em quatro etapas, inicialmente preparou-se as amostras em uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para os cálculos desta etapa foram utilizados os resultados do teste de Bradford. Foi utilizada placa de ELISA de 96 poços na qual estava imobilizada a sequência de oligonucleotídeos que possuem a área específica que se liga a forma ativa do Nrf2 presente no extrato nuclear avaliado (5'-GTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3'). Inicialmente 10 μL de amostra foram adicionados a cada poço da placa de ELISA, logo a placa foi incubada por uma 1h a temperatura ambiente e sob agitação. Ao término desta etapa o solvente foi descartado e a placa foi lavada três vezes com solução específica para este fim (wash buffer). Em uma segunda etapa foi adicionado 100 μL da solução de anticorpos primários (anti-Nrf2), a placa foi mantida em repouso por 1 h a temperatura ambiente, em seguida a placa foi lavada mais três vezes com solução de lavagem. A terceira etapa consistiu na adição de 100 μL de uma solução contendo o anticorpo secundário complexado com enzima *horseradish peroxidase* (HRP), após adição do segundo anticorpo a placa foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 1 h de incubação e foi realizada três lavagens com solução apropriada. A quarta e última etapa consistiu na adição de uma solução colorimétrica presente no kit utilizado *Development Solution*, após incubação de 15 minutos foi adicionada a segunda solução, *Stop Solution* e foi realizada a leitura da placa a 450 nm.

5.2.3.11 Neuroproteção frente a proteína β -amilóide

Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3 x 10⁴ cel/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida o meio de cultura é

descartado e adicionou-se 50 μL das soluções dos compostos testes (10-0,625 μM) e 50 μL de uma solução de proteína β -amilóide em HBSS (10 μM) em cada poço, a placa foi então incubada por 4h a 37 °C em 5% CO_2 . Terminado o período de tratamento o conteúdo da placa foi descartado e adicionou-se 100 μL de reagente de MTT a cada poço e a placa foi novamente incubada por 1h a 37 °C em 5% CO_2 . Em seguida foi adicionado 10 μL de uma solução de Tween-20 em água (10 %) em cada poço e a placa foi colocada em agitação a 37 °C por 10 minutos. Por fim os 110 μL contidos em cada poço da placa foram transferidos para uma nova placa, a quantidade de formazan foi medida (570 nm, referência filtro 690 nm) utilizando um leitor de microplacas (VICTOR™ X3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram expressos como porcentagem de neuroproteção comparados ao controle negativo (células não tratadas com composto teste).

5.2.3.12 Avaliação da inibição de MAO-A e MAO-B.

Os testes de inibição de MAO foram realizados pelo grupo do professor Dr. Marco Catto de universidade de Bari (UNIBA) na Itália. Os ensaios de inibição da MAO humana foram realizados utilizando método baseado em fluorescência, usando *kynuramine* como substrato não seletivo MAO A e MAO B (PISANI *et al.*, 2016). Foram utilizadas MAO A e MAO B recombinantes humanos (microsomas a partir de células de inseto infectadas com baculovírus; Sigma-Aldrich). As reações foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços de fundo redondo pretas (Greiner). As amostras foram pré-incubadas 20 min a 37 °C antes de adicionar soluções de MAO, em seguida, incubadas por mais 30 min. A fluoresceína foi registada em comprimentos de onda de excitação/emissão de 320-400 nm num leitor de fluoresceína de microplacas de 96 poços (Tecan Infinite M100 Pro). As atividades inibitórias foram determinadas por meio de regressões não lineares realizadas com o software GraphPad Prism 5.0 e são expressas como porcentagem de inibição a 10 μM . Os resultados são a média de três experimentos independentes.

5.3 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADME

Com base em modelos estruturais 2D, desenhados no software ChemDraw Professional versão 15.0, os compostos estudados foram submetidos ao Programa QikProp 3.1 (Schrödinger) para a predição de propriedades ADME e algumas propriedades físico-químicas relevantes para avaliação de provável perfil farmacocinético e de toxicidade.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram reproduzidas com sucesso 40 compostos inéditos divididos em três séries de compostos análogos do donepezil, da curcumina e da talidomida como novos ligantes visando o tratamento de doenças multifatoriais com propriedades anticolinesterásicas e neuroprotetoras. A principal dificuldade das rotas foi à etapa de purificação de alguns compostos extremamente polares, porém a maioria foi isolado por filtração simples e os rendimentos em geral foram satisfatórios. Finalmente, a análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e espectrometria de massas, confirmou a obtenção dos produtos sintetizados. Os compostos de CNA (série **B** e **C**) existem como mistura de confôrmeros *sin*-periplanar (*sp*) e *anti*-periplanares (*ap*) sobre a ligação amida CO-NH, este fenômeno foi observado pela duplicidade dos sinais nos espectros de RMN e confirmado por RMN com curva de aquecimento em diferentes temperaturas, além dos achados na literatura de compostos da mesma família.

Foi avaliado o perfil anticolinesterásico dos compostos com destaque para PQM-189 (**24g**) e PQM-266 (**30d**), como inibidores seletivos da AChE (CI_{50} de 3,15 e 9,19 μM , respectivamente) e PQM-268 (**30f**) e PQM-272 (**30j**) como inibidores seletivos de BuChE (CI_{50} de 14,42 e 11,94 μM , respectivamente). Os resultados indicam que o fragmento *N*-benzilpiperidina e *N*-benzilpiperazina ausentes na série B e presentes na série A e C, promovem as interações necessárias com as enzimas colinesterásicas no processo de inibição.

Avaliou-se a atividade inibidora de MAO A e MAO B, enzima encarregada da degradação da dopamina e alvo importante no tratamento da DP. A análise de dados revelou que PQM-225 (**28o**) e PQM-227 (**28q**) foram capazes de inibir 53% e 51% da atividade enzimática de MAO B, respetivamente. Portanto, ressaltando o caráter neuroprotetor destes compostos devido à diminuição da geração de radicais livres decorrentes da oxidação da dopamina.

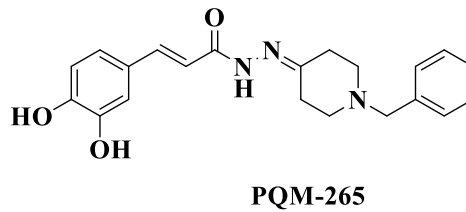
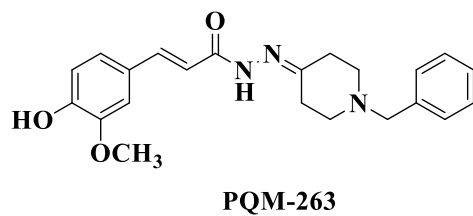
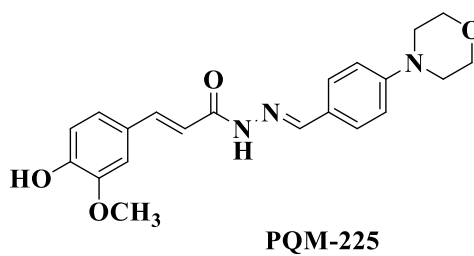
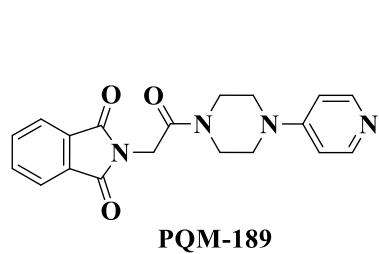
Sendo a talidomida um fármaco usado no tratamento de doenças inflamatórias e fonte de inspiração no planejamento da série A, foi avaliado *in vitro* o perfil anti-

neuroinflamatório de PQM-189 (**24g**). Os resultados sugerem que o composto pode tratar o processo inflamatório decorrente da super expressão de iNOS e da regulação da liberação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , reduzindo 43% da ativação de células de tipo microglial e 39% da liberação de IL-1 β em células microgliais ativadas após de tratamento com LPS. Os resultados indicam que o objetivo de obter um composto inibidor da AChE e anti-inflamatório foi atingido com sucesso.

Os compostos também foram submetidos a teste *in vitro* para avaliar a citotoxicidade e elucidar a atividade antioxidante com destaque para PQM-225 (**28o**), PQM-263 (**30a**) e PQM-265 (**30c**) com menor toxicidade no ensaio de MTT e melhor perfil antioxidante frente ao estresse oxidativo induzido com DPPH, *t*-BOOH e 6-OHDA, favorecendo a eliminação de radicais livres formados. Observou-se que o padrão de substituição 4-hidroxi-3-metoxi, presente no ácido ferúlico, permite a neutralização de radicais livres de maneira mais eficiente e representam os melhores compostos antioxidantes da série B e C.

De um modo geral, a predição das propriedades do ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) foram muito bons. A porcentagem prevista de absorção oral na maioria dos compostos sintetizados foi satisfatória, com uma porcentagem superior ao 85% de absorção oral humana em comparação com os valores de referência usando a curcumina e o donepezil.

Os achados sugerem que os compostos sintetizados são ligandos promissores com propriedades anticolinesterásicas, antioxidante, quelantes de biometais, neuroprotetores e anti-neuroinflamatórios para o tratamento de doenças com caráter multifatorial como a DA e a DP (**Figura 89**). Atingiu-se o objetivo deste trabalho no desenho de novos compostos híbridos com perfil de ação multialvo e visando ao tratamento de DNs.

Figura 89 – Compostos líderes das três séries moleculares sintetizadas

Fonte: do autor

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, R. *et al.* Subcellular Parkinson's Disease-Specific Alpha-Synuclein Species Show Altered Behavior in Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7639–7655, 11 dez. 2017.

ABRAHAMS, S. *et al.* Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. **Neuroscience**, v. 406, p. 1–21, 15 maio 2019c.

ADLIMOGHADDAM, A. *et al.* A review of clinical treatment considerations of donepezil in severe Alzheimer's disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 876–888, 1 out. 2018.

AFFINI, A. *et al.* Novel indanone derivatives as MAO B/H3R dual-targeting ligands for treatment of Parkinson's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 148, p. 487–497, mar. 2018.

AHMED, R. M. *et al.* Neuronal network disintegration: common pathways linking neurodegenerative diseases. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 87, n. 11, p. 1234–1241, 1 nov. 2016.

ALAVI NAINI, S. M.; SOUSSI-YANICOSTAS, N. Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–17, 20 out. 2015.

ALVER, Ö.; ŞENYEL, M. Vibrational spectroscopic and conformational studies of 1-(4-pyridyl)piperazine. **Chemical Papers**, v. 64, n. 4, p. 504–514, 2010.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. *Alzheimer's and Dementia Stages*.

AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, M.; AZAD, A. F. Growth and maintenance of Vero cell lines. **Current protocols in microbiology**, v. Appendix 4, p. Appendix 4E, nov. 2008.

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

ATWOOD, C. S. *et al.* Role of Free Radicals and Metal Ions in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Metal Ions in Biological Systems**. [S.l.]: Routledge, 2018. p. 309–364.

AZIMI, S. *et al.* Discovery of imidazopyridines containing isoindoline-1,3-dione framework as a new class of BACE1 inhibitors: Design, synthesis and SAR analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 729–737, 29 set. 2017.

BARBOSA, L. C. D. A. Absorções de grupos funcionais comuns. In: EDITORA UFV (Org.). *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. 1a. ed. Viçosa: [s.n.], 2007. p. 55–138.

BELSKAYA, N. P.; DEHAEN, W.; BAKULEV, V. A. Synthesis and properties of hydrazones bearing amide, thioamide and amidine functions. **Arkivoc**, v. 2010, n. 1, p. 275–332, 2010.

BHAT, S. *et al.* Parkinson's disease: Cause factors, measurable indicators, and early diagnosis. **Computers in Biology and Medicine**, v. 102, p. 234–241, 1 nov. 2018.

BHATIA, R. Isoindole Derivatives: Propitious Anticancer Structural Motifs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 189–207, 2016.

BLESA, J. *et al.* Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 91, 8 jul. 2015.

BOHNEN, N. I. *et al.* Cortical Cholinergic Function Is More Severely Affected in Parkinsonian Dementia Than in Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 12, p. 1745, 1 dez. 2003.

BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A. Multitarget Drug Discovery and Polypharmacology. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1190–1192, 20 jun. 2016.

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

BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in induced pluripotent stem cell models of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 49, n. 4, p. 525–532, 1 fev. 2019.

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. 1449–54, 10 fev. 2004.

BREZOVAKOVA, V. *et al.* Dendritic Cells as an Alternate Approach for Treatment of Neurodegenerative Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 6, p. 1207–1214, 13 ago. 2018.

BUSINARO, R. *et al.* Modulation of Inflammation as a Way of Delaying Alzheimer's Disease Progression: The Diet's Role. **Current Alzheimer Research**, v. 15, n. 4, p. 363–380, 22 fev. 2018.

CAI, P. *et al.* Donepezil-butylated hydroxytoluene (BHT) hybrids as Anti-Alzheimer's disease agents with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 161–176, 5 set. 2018.

CALABRESE, V. *et al.* Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, p. 80–91, 1 fev. 2018.

CALOW, A. D. J. *et al.* Understanding α,β -unsaturated imine formation from amine additions to α,β -unsaturated aldehydes and ketones: An analytical and theoretical investigation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 5163–5172, 2014.

CARVALHO, S. A. *et al.* Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as

potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512–521, 2012.

CASSANO, T. *et al.* Glutamate and Mitochondria: Two Prominent Players in the Oxidative Stress-Induced Neurodegeneration. **Current Alzheimer Research**, v. 13, p. 185–197, 2016.

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.

CESCHI, M. A. *et al.* Novel series of tacrine-tianeptine hybrids: Synthesis, cholinesterase inhibitory activity, S100B secretion and a molecular modeling approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 758–772, out. 2016.

CHAN, H. H. *et al.* A novel selective MAO-B inhibitor with neuroprotective and anti-Parkinsonian properties. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, n. September 2017, p. 254–262, jan. 2018.

CHAN, L. C. *et al.* Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide / N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide /. **Journal of Organic Chemistry**, n. 3, p. 8863–8869, 2007.

CHANG, K.-H. *et al.* Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 485, p. 79–87, 1 out. 2018.

CHEIGNON, C. *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox Biology**, v. 14, p. 450–464, 1 abr. 2018.

CHEN, M. *et al.* Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 4, p. 742–752, abr. 2018.

CHEN, P.; MIAH, M. R.; ASCHNER, M. Metals and Neurodegeneration. **F1000Research**, v. 5, n. 5, p. 366, 2016.

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

CHEN, Y. *et al.* Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation of tacrine–cinnamic acid hybrids as multi-target acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **RSC Advances**, v. 7, n. 54, p. 33851–33867, 4 jul. 2017.

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.

CLAUDIO VIEGAS-JUNIOR; ELIEZER J. BARREIRO; CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 1 jul. 2007.

COBLEY, J. N.; FIORELLO, M. L.; BAILEY, D. M. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 15, p. 490–503, 1 maio 2018.

CONGDON, E. E.; SIGURDSSON, E. M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. **Nature reviews. Neurology**, v. 14, n. 7, p. 399–415, 2018.

CRISTÓVÃO, J. S.; SANTOS, R.; GOMES, C. M. Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer ' s Disease. v. 2016, 2016.

CROTTI, A.; GLASS, C. K. The choreography of neuroinflammation in Huntington ' s disease. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 6, p. 364–373, 1 jun. 2015.

CUI, Q.; LI, X.; ZHU, H. Curcumin ameliorates dopaminergic neuronal oxidative damage via activation of the Akt/Nrf2 pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 2, p. 1381–1388, 1 fev. 2016.

DA SILVA, G. S. *et al.* Effects of novel acylhydrazones derived from 4-quinolone on the acetylcholinesterase activity and A β 42 peptide fibrils formation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1464–1470, 2016.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson ' s Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003.

DE STROOPER, B.; KARRAN, E. The Cellular Phase of Alzheimer ' s Disease. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 603–615, 11 fev. 2016.

DE FREITAS SILVA, M.; DIAS, K. S. T.; *et al.* Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer ' s Disease: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, 11 jan. 2018.

DE FREITAS SILVA, M.; PRUCCOLI, L.; *et al.* The Keap1/Nrf2-ARE Pathway as a Pharmacological Target for Chalcones. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1803, 20 jul. 2018.

DERMECHE, K. *et al.* Qualitative Structure-Activity Relationships and 2D-QSAR Modeling of TNF- α ; Inhibition by Thalidomide Derivatives. **Journal of Bionanoscience**, v. 9, n. 5, p. 395–400, 1 out. 2015.

DEZSI, L.; VECSEI, L. Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson ' s Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 4, p. 425–439, 5 jul. 2017.

DIAS, K. S. T. *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel feruloyl-donepezil hybrids as potential multitarget drugs for the treatment of Alzheimer ' s disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 440–457, 2017.

DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 46, p. S30–S33, 1 jan. 2018.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V.; KAZANTSEV, A. G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p. 3576–3590, 1 out. 2018.

DOS SANTOS PICANCO, L. C. *et al.* Alzheimer ' s Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 26, p. 3141–3159, 4 set. 2018.

DOUGLAS, P. M.; DILLIN, A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration.

Journal of Cell Biology, v. 190, n. 5, p. 719–729, 2010.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1108–1119, 2007.

EKERT, J. O. *et al.* TNF alpha inhibitors in Alzheimer's disease: A systematic review. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 688–694, 1 maio 2018a.

EKERT, J. O. *et al.* TNF alpha inhibitors in Alzheimer's disease: A systematic review. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 688–694, 1 maio 2018b.

ELGUERO, J. Curcumin and curcuminoids : chemistry , structural studies and biological properties. **Anales de la real academia nacional de farmacia**, v. 81, n. 4, p. 278–310, 2015.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

EMAMZADEH, F. N. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, v. 21, p. 29, 2016.

ESSA, M. M. *et al.* Protective Effects of Antioxidants in Huntington's Disease: an Extensive Review. **Neurotoxicity Research**, estresse oxidativo, v. 35, n. 3, p. 739–774, 11 abr. 2019.

FEITOSA, C. M. *et al.* Determination of Parameters of Oxidative Stress in vitro Models of Neurodegenerative Diseases-A Review. **Current Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 100–109, 2018.

FINBERG, J. P. M.; RABEY, J. M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 340, 18 out. 2016.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 167–98, 2006.

FRANK, S. Treatment of Huntington's Disease. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 153–160, 24 jan. 2014.

GANGULY, G. *et al.* Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume11, p. 797–810, mar. 2017.

GELDERS, G.; BAEKELANDT, V.; VAN DER PERREN, A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–12, 16 abr. 2018.

GOLDE, T. E. Disease modifying therapy for AD? **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 3, p. 689–707, nov. 2006.

GONOS, E. Proteasome Activation Delays Aging and Protects Against Proteotoxicity in Neurodegenerative Disease. [S.l.]: Springer, Cham, 2015. p. 7–7.

- 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.
- GOODARZI, Z. *et al.* Detecting depression in Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 87, n. 4, p. 426–37, 26 jul. 2016.
- GREENBLATT, H. M. *et al.* The Complex of a Bivalent Derivative of Galanthamine with *Torpedo* Acetylcholinesterase Displays Drastic Deformation of the Active-Site Gorge: Implications for Structure-Based Drug Design. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 47, p. 15405–15411, dez. 2004.
- GREENWOOD, J. R. *et al.* Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 6–7, p. 591–604, jun. 2010.
- GRØNTVEDT, G. R. *et al.* Alzheimer's disease. **Current Biology**, v. 28, n. 11, p. R645–R649, jun. 2018. D
- GUNESCH, S.; SCHRAMM, S.; DECKER, M. Natural antioxidants in hybrids for the treatment of neurodegenerative diseases: a successful strategy? **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 711–713, 9 maio 2017.
- GUO, J. *et al.* Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1817–1825, 19 jan. 2018.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 2, p. 183–186, 12 jul. 2018.
- HAMPEL, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 1 jul. 2018.
- HAREL, M. *et al.* Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 19, p. 9031–5, 1 out. 1993.
- HAVIV, H. *et al.* Crystal packing mediates enantioselective ligand recognition at the peripheral site of acetylcholinesterase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 31, p. 11029–11036, 2005.
- HE, P. *et al.* Long-Term Treatment of Thalidomide Ameliorates Amyloid-Like Pathology through Inhibition of β -Secretase in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55091, 6 fev. 2013.
- HEEMELS, M.-T. Neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 179–179, 9 nov. 2016.
- 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, 1 jun. 2015.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. **Neurología**, v. 32, n. 8, p. 533–539, 1 out. 2017.

HUAT, T. J. *et al.* Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 9, p. 1843–1868, 19 abr. 2019.

JIANG, R. *et al.* Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 36, n. 12, p. 3453–70, 23 mar. 2016.

JIMENEZ-SANCHEZ, M. *et al.* Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, p. a024240, 1 jul. 2017.

JOHNSON, G.; MOORE, S. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 2, p. 217–225, 1 jan. 2006.

JOULLIE, M. M.; LASSEN, K. M. Evolution of amide bond formation. **Arkivoc**, v. 2010, n. 8, p. 189–250, 2010.

KABASAKAL, L.; ALAN, S. Thalidomide attenuates learning and memory deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 88, n. 3–4, p. 145–152, 2012.

KALIA, L. V. Biomarkers for cognitive dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 46, p. S19–S23, 1 jan. 2018.

KAM, T.-I. *et al.* Poly(ADP-ribose) drives pathologic α -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 362, n. 6414, p. eaat8407, 2 nov. 2018.

KAMETANI, F.; HASEGAWA, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 25, 30 jan. 2018.

KANDIAH, N. *et al.* Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, p. 697, 2017.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 4, p. 412–22, ago. 2011.

KIM, M. E. *et al.* Anti-Neuroinflammatory Effects of Vanillin Through the Regulation of Inflammatory Factors and NF- κ B Signaling in LPS-Stimulated Microglia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 3, p. 884–893, 15 mar. 2019.

KIM, S. *et al.* Zinc-Modified Cyanoborohydride as a Selective Reducing Agent. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 1927–1932, 1985.

KORDASIEWICZ, H. B. *et al.* Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. **Neuron**, v. 74, n. 6, p. 1031, 21 jun. 2012.

KUIPER, E. F. E. *et al.* Chaperones in Polyglutamine Aggregation: Beyond the Q-Stretch.

Frontiers in neuroscience, v. 11, p. 145, 2017.

KUMAR, A.; RATAN, R. R. Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly. **Journal of Huntington's Disease**, v. 5, n. 3, p. 217–237, 1 out. 2016.

KURTISHI, A. *et al.* Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, n. August, 2018.

LALKOVIČOVÁ, M.; DANIELISOVÁ, V. Neuroprotection and antioxidants. **Neural regeneration research**, v. 11, n. 6, p. 865–74, jun. 2016.

LEHNINGER, D. AND C. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6th. ed. Porto Alegre: Artmed, 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.

LEWERENZ, J.; MAHER, P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 469, 16 dez. 2015.

LI, Q. *et al.* Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 463–477, 5 out. 2018.

LI, Q. *et al.* Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 294–309, 26 maio 2017.

LI, Y. *et al.* Design, synthesis and evaluation of rivastigmine and curcumin hybrids as site-activated multitarget-directed ligands for Alzheimer's disease therapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 4717–4725, 2014.

LIEBERMAN, A. P.; SHAKKOTTAI, V. G.; ALBIN, R. L. Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 1–27, 24 jan. 2019.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

LILL, C. M. Genetics of Parkinson's disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 30, n. 6, p. 386–396, 1 dez. 2016.

LIU, ZEWEN *et al.* Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–11, 12 jul. 2017.

LIU, ZHIKUN *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of multifunctional tacrine-curcumin hybrids as new cholinesterase inhibitors with metal ions-chelating and neuroprotective property. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 2387–2398, 15 abr. 2017.

LOIS, C. *et al.* Neuroinflammation in Huntington's Disease: New Insights with 11C-PBR28

- PET/MRI. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 2563–2571, 21 nov. 2018.
- LOPES, A. B. *et al.* Characterization of amide bond conformers for a novel heterocyclic template of N-acylhydrazone derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 11683–11704, 2013.
- LOPES, J. P. B. *et al.* Chiral bistacrine analogues: Synthesis, cholinesterase inhibitory activity and a molecular modeling approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2218–2228, 2017.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–53, maio 2013.
- MACHHI, J. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Novel Multi-target-Directed Benzazepines Against Excitotoxicity. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 9, p. 6697–6722, 15 nov. 2017.
- 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, 12 mar. 2013.
- MARTINEZ, B.; PELOW, P. Neuroprotection by immunomodulatory agents in animal models of Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 9, p. 1493, set. 2018.
- MAYO, K. J. Protein aggregation and neurodegeneration. **Methods**, v. 53, n. 3, p. 185–186, 1 mar. 2011.
- MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: a clinical review. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 24–34, 1 jan. 2018.
- MEDINA, M. *et al.* New Features about Tau Function and Dysfunction. **Biomolecules**, v. 6, n. 2, p. 21, 19 abr. 2016.
- MEHTA, V. *et al.* ACE Alzheimer's: The Role of Vitamin A, C and E (ACE) in Oxidative Stress induced Alzheimer's Disease. **Journal of Medical Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. e000086, 3 out. 2017.
- MINHAS, R.; BANSAL, Y.; BANSAL, G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**, 10 set. 2019.
- MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, 2005.
- MORENO, H. *et al.* Tau pathology-mediated presynaptic dysfunction. **Neuroscience**, v. 325, p. 30–38, 14 jun. 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Protein S-Nitrosylation as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 jan. 2016

NAVIDPOUR, L. *et al.* Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activities of arylidene-2-(3-chloroanilino)nicotinic acid hydrazides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 6, p. 2793–2802, 12 jun. 2014.

NEWMAN, L. E.; SHADEL, G. S. Pink1/Parkin link inflammation, mitochondrial stress, and neurodegeneration. **The Journal of cell biology**, v. 217, n. 10, p. 3327–3329, 1 out. 2018.

OLIVEIRA PEDROSA, M. *et al.* Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 1044–1079, 2017.

PALENCIA, G. *et al.* Anti-apoptotic, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects of thalidomide on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 351, n. 1–2, p. 78–87, 2015.

PALLALL, G. *et al.* CONFORMATIONAL BRHAVIOUR AND E/Z ISOURRIWTION OF E-ACYL AND H_ABOYLHYDRAZONES. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3649–3656, 1986.

PANAHI, Y. *et al.* Neuroprotective effects of antioxidants in the management of neurodegenerative disorders: A literature review. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 2742–2748, 1 mar. 2019.

PARIHAR, A. *et al.* Alpha Synuclein and Parkinson's Disease. **Pathology, Prevention and Therapeutics of Neurodegenerative Disease**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 1–14.

PARKINSON'S FOUNDATION. **Parkinson Report Spring 2018**. New York: [s.n.], 2018.

PEVARELLO, P.; VARASI, M. Discovery and Development of Safinamide, a New Drug for the Treatment of Parkinson's Disease. **Successful Drug Discovery**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018. p. 383–415.

PICKRELL, A. M.; YOULE, R. J. The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 257–273, 21 jan. 2015.

PISANI, L. *et al.* Exploring Basic Tail Modifications of Coumarin-Based Dual Acetylcholinesterase-Monoamine Oxidase B Inhibitors: Identification of Water-Soluble, Brain-Permeant Neuroprotective Multitarget Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 6791–6806, 2016.

PODVIN, S. *et al.* Multiple clinical features of Huntington's disease correlate with mutant HTT gene CAG repeat lengths and neurodegeneration. **Journal of Neurology**, v. 266, n. 3, p. 551–564, 28 mar. 2019.

POLYMEROPOULOS, M. H. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5321, p. 2045–7, 27 jun. 1997.

RAMSAY, R. R. *et al.* A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, aqui hay un resumen intesante sobre la historia de mtdl y sobre los medicamentos que han tenido seceso usando esta herramienta.,

v. 7, p. 3, 2018.

RICHARD A. FRIESNER, * *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. 2006.

ROBACZEWSKA, J. *et al.* Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 67, n. 3, p. 331–7, jun. 2016.

ROUROU, S.; BEN ZAKKOUR, M.; KALLEL, H. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media. **Vaccine**, 11 jun. 2019.

RUONALA, V. *et al.* Levodopa-Induced Changes in Electromyographic Patterns in Patients with Advanced Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 35, 5 fev. 2018.

RUSSO, I. *et al.* 3,6'-Dithiothalidomide, a new TNF- α synthesis inhibitor, attenuates the effect of A β 1-42 intracerebroventricular injection on hippocampal neurogenesis and memory deficit. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 6, p. 1181–1192, 1 set. 2012.

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.

SANG, Z. *et al.* Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Ferulic Acid Derivatives as Multi-Target-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 1008–1024, 20 fev. 2019.

SANTA-CECÍLIA, F. V. *et al.* The Neuroprotective Effect of Doxycycline on Neurodegenerative Diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 4, p. 981–986, 23 maio 2019.

SCHAIN, M.; KREISL, W. C. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders—a Review. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 17, n. 3, p. 25, 10 mar. 2017.

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**, v. 51A, n. 1, p. 16–25, jan. 2003.

SEBASTIANUTTO, I.; CENCI, M. A. mGlu receptors in the treatment of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 38, p. 81–89, 1 fev. 2018.

SHELLEY, J. C. *et al.* Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 12, p. 681–691, 27 dez. 2007.

SHEN, Y.; MARWAN, N. *Use of Thalidomide for Alzheimers Disease Treatment and Prevention*. . United States: [s.n.], 2010

SIMONE TRANCHES DIAS, K.; 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, n. 3, p. 239–255, 2014.

- SOARES, T. R. *et al.* Targeting the proteostasis network in Huntington's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 49, p. 92–103, 1 jan. 2019.
- SOUFLI, I. *et al.* Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 353, 2016.
- SOUTHWELL, A. L. *et al.* Huntingtin suppression restores cognitive function in a mouse model of Huntington's disease. **Science translational medicine**, v. 10, n. 461, p. eaar3959, 3 out. 2018.
- SRIROD, S.; TEWTRAKUL, S. Anti-inflammatory and wound healing effects of cream containing Curcuma mangga extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, p. 111828, 28 jun. 2019.
- STEPHENSON, J. *et al.* Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 204–219, 1 jun. 2018.
- SZIGETI, K.; ZEB, M.; RIAZ, A. Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease. **Clinical Medicine Insights: Geriatrics**, v. 10, n. 0, 2 mar. 2017.
- TALANTOVA, M. *et al.* A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. E2518-27, 2 jul. 2013.
- 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.
- VARGESSON, N. Review Thalidomide-Induced Teratogenesis : History and Mechanisms. **BIRTH DEFECTS RESEARCH**, v. 105, p. 140–156, 2015.
- VERMA, M.; WILLS, Z.; CHU, C. T. Excitatory Dendritic Mitochondrial Calcium Toxicity: Implications for Parkinson's and Other Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 523, 2 ago. 2018.
- VILLALBA, R. M.; MATHAI, A.; SMITH, Y. Morphological changes of glutamatergic synapses in animal models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 117, 25 set. 2015.
- WANG, R. *et al.* Ratiometric Near-Infrared Fluorescent Probe for Synergistic Detection of Monoamine Oxidase B and Its Contribution to Oxidative Stress in Cell and Mice Aging Models. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 6, p. 4054–4061, 20 mar. 2018.
- WHITTINGTON, R. A.; PLANEL, E.; TERRANDO, N. **Impaired resolution of inflammation in Alzheimer's disease: A review. Frontiers in Immunology**. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 6 nov. 2017
- WOOD, L. B.; WINSLOW, A. R.; STRASSER, S. D. Systems biology of neurodegenerative diseases. **Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro**, v. 7, n. 7, p. 758–75, jul. 2015.
- WU, Y.-H. *et al.* Depression in Parkinson's disease: A case-control study. **PLOS ONE**, v.

13, n. 2, p. e0192050, 1 fev. 2018.

XIAOWU, R. L. *et al.* Structure-Based Design of Parasitic Protease Inhibitors. v. 4, n. 9, p. 1421–1427, 1996.

YANG, B. *et al.* Curcumin protects against methylmercury-induced cytotoxicity in primary rat astrocytes by activating the Nrf2/ARE pathway independently of PKC δ . **Toxicology**, v. 425, p. 152248, 1 set. 2019.

YATES, D. Neurodegenerative disease: A proteostatic boost. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 61–61, 19 jan. 2018.

YAZDANI, M. *et al.* Multi-target inhibitors against Alzheimer disease derived from 3-hydrazinyl 1,2,4-triazine scaffold containing pendant phenoxy methyl-1,2,3-triazole: Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic Chemistry**, v. 84, n. October 2018, p. 363–371, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 7, p. 1039–1047, 2016.

ZHANG, Z. *et al.* Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4391, 6 set. 2019.

ZHAO, Z. Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. **AGING MEDICINE**, v. 2, n. 2, p. 82–87, 20 jun. 2019.

ZHENG, J. *et al.* A Mitochondria-Associated Oxidative Stress Perspective on Huntington's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 329, 19 set. 2018.

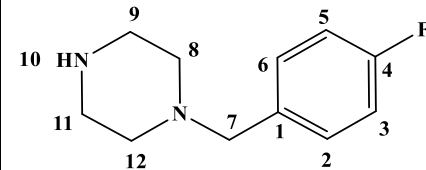
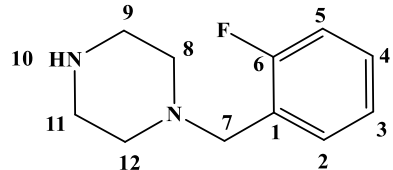
ZHENG, S.; YUMEI, F.; CHEN, A. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 444–453, 1 ago. 2007.

ZHOU, Y. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel copper-chelating acetylcholinesterase inhibitors with pyridine and N-benzylpiperidine fragments. **Bioorganic Chemistry**, v. 93, p. 103322, dez. 2019.

ANEXO A

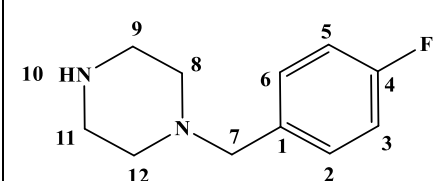
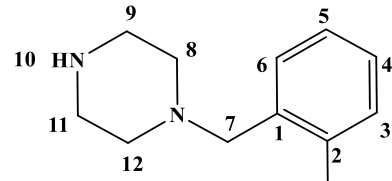
**TABELAS DOS DADOS DE RMN DE ^1H E
RMN DE ^{13}C**

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H dos compostos intermediários 21i-j (300 MHz, CDCl_3)

Hidrogênio	 21i			 21j		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-2	6,98	8,70	t	7,12-6,98	-	m
H-3	7,21	5,40; 8,70	dd	7,27-7,19	-	m
H-4	-	-	-	7,12-6,98	-	m
H-5	7,21	5,40; 8,70	dd	7,35	1,74; 7,46	dd
H-6	6,98	8,70	t	-	-	-
H-7	3,44	-	s	3,57	-	s
H-8	2,39	-	s	2,69	-	s
H-9	2,87	4,85	t	2,90	4,89	t
H-10	2,06	-	s	2,48	-	s
H-11	2,87	4,85	t	2,90	4,89	t
H-12	2,39	-	s	2,69	-	s

Fonte: do autor.

Tabela 2 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos intermediários 21i-j (75 MHz, CDCl_3)

Carbono	 21i		 21j	
	δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	133,7		124,3	J_{CF} (Hz)=14,57
C-2	130,7	J_{CF} (Hz)=7,90	161,4	J_{CF} (Hz)=246,04
C-3	115,0	J_{CF} (Hz)=21,12	115,3	J_{CF} (Hz)=22,17
C-4	162,0	J_{CF} (Hz)= 244,86	128,9	J_{CF} (Hz)=8,15
C-5	115,0	J_{CF} (Hz)=21,12	123,9	J_{CF} (Hz)=3,20
C-6	130,7	J_{CF} (Hz)=7,90	131,7	J_{CF} (Hz)=4,31
C-7	62,8		55,8	
C-8	54,3		53,6	
C-9	46,0		45,7	
C-11	46,0		45,7	
C-12	54,3		53,6	

Fonte: do autor.

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H dos compostos intermediários 21k-l (300 MHz, CDCl_3)

Hidrogênio	23k			23l		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-2	7,31	4,38	d	7,21	1,61; 4,36	dd
H-3	7,31	4,38	d	8,51	1,61; 4,36	dd
H-4	7,28-7,24	-	m	-	-	-
H-5	7,31	4,38	d	8,51	1,61; 4,36	dd
H-6	7,31	4,38	d	7,21	1,61; 4,36	dd
H-7	3,48	-	s	3,47	-	s
H-8	2,41	-	s	2,41	-	s
H-9	2,88	4,85	t	2,89	4,83	t
H-10	1,89	-	s	2,25	-	s
H-11	2,41	-	s	2,89	4,83	t
H-12	2,88	4,85	t	2,41	-	s

Fonte: do autor.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos intermediários 21k-l (75 MHz, CDCl_3)

Carbono	23k	23l
	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	138,0	147,6
C-2	128,2	123,9
C-3	129,3	149,7
C-4	127,0	-
C-5	129,3	149,7
C-6	128,2	123,9
C-7	63,7	62,3
C-8	54,5	54,4
C-9	46,0	45,9
C-11	46,0	45,9
C-12	54,5	54,4

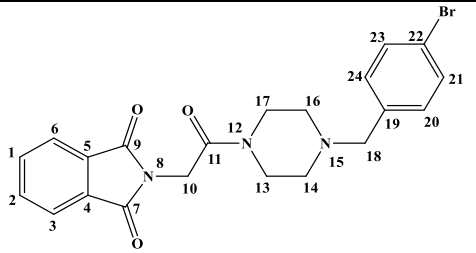
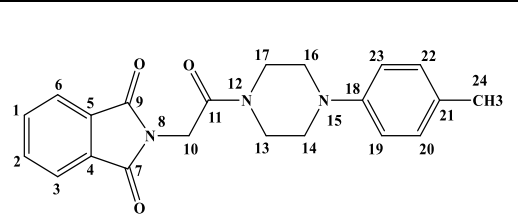
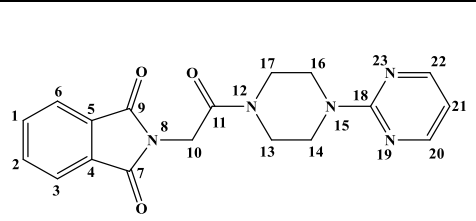
Fonte: do autor.

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 183 - PQM 185 (300 MHz, CDCl_3)

Hidrogênio	PQM 183			PQM 184			PQM 185		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-1 e H-2	7,71	3,01; 5,55	dd	7,72	3,02; 5,52	dd	7,72	3,09; 5,44	dd
H-3 e H-6	7,86	3,01; 5,55	dd	7,88	3,02; 5,52	dd	7,87	3,09; 5,44	dd
H-10	4,48	-	s	4,54	-	s	4,55	-	s
H-13	3,61	-	t	3,76	-	t	3,97	-	t
H-14	2,50	-	t	3,22	-	t	3,69	-	t
H-16	2,43	-	t	3,12	-	t	3,61	-	t
H-17	3,52	-	t	3,69	-	t	3,86	-	t
H-18	3,48	-	s	-	-	-	-	-	-
H-19	-	-	-	6,86	8,10	d	-	-	-
H-20	7,21	8,37	d	7,10	8,10	d	8,33	4,76	d
H-21	7,45	8,37	d	-	-	-	6,55	4,76	t
H-22	-	-	-	7,10	8,10	d	8,33	4,76	d
H-23	7,45	8,37	d	6,86	8,10	d	-	-	-
H-24	7,21	8,37	d	2,28	-	s	-	-	-

Fonte: do autor.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 183 - PQM 185 (75 MHz, CDCl_3)

	 <p style="text-align: center;">PQM 183</p>	 <p style="text-align: center;">PQM 184</p>	 <p style="text-align: center;">PQM 185</p>
Carbono	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1 e C-2	134,1	134,1	134,1
C-3 e C-6	123,5	123,6	123,6
C-4 e C-5	132,3	132,3	132,3
C-7 e C-9	163,9	164,0	164,3
C-10	39,1	39,1	39,2
C-11	168,1	168,1	168,0
C-13	42,3	42,3	42,1
C-14	52,5	50,1	43,4
C-16	52,2	49,9	43,4
C-17	44,8	44,8	44,6
C-18	62,1	148,8	161,5
C-19	136,7	117,2	-
C-20	130,9	129,8	157,8
C-21	131,5	130,4	110,6
C-22	121, 16	129,8	157,8
C-23	131,5	117,2	-
C-24	130,9	20,5	-

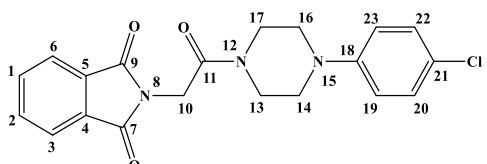
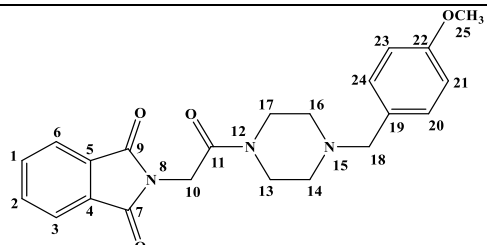
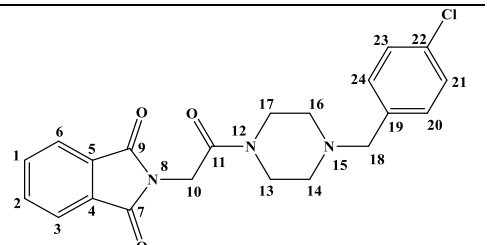
Fonte: do autor.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 186 - PQM 188 (300 MHz, CDCl_3)

Hidrogênio	PQM 186			PQM 187			PQM 188		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1 e H-2	7,72	3,04; 5,50	dd	7,71	3,10; 5,43	dd	7,71	3,01; 5,4	dd
H-3 e H-6	7,87	3,04; 5,50	dd	7,86	3,10; 5,43	dd	7,86	3,01; 5,4	dd
H-10	4,53	-	s	4,47	-	s	4,47	-	s
H-13	3,75	-	t	3,60	-	t	3,60	-	t
H-14	3,24	-	t	2,50	-	t	2,50	-	t
H-16	3,14	-	t	2,43	-	t	2,43	-	t
H-17	3,69	-	t	3,52	-	t	3,52	-	t
H-18	-	-	-	3,48	-	s	3,50	-	s
H-19	6,85	9,06	d	-	-	-	-	-	-
H-20	7,23	9,06	d	6,86	8,70	d	7,36-7,12	-	m
H-21	-	-	-	7,23	8,70	d	7,36-7,12	-	m
H-22	7,23	9,06	d	-	-	-	-	-	-
H-23	6,85	9,06	d	7,23	8,70	d	7,36-7,12	-	m
H-24	-	-	-	6,86	8,70	d	7,36-7,12	-	m
H-25	-	-	-	3,80	-	s	-	-	-

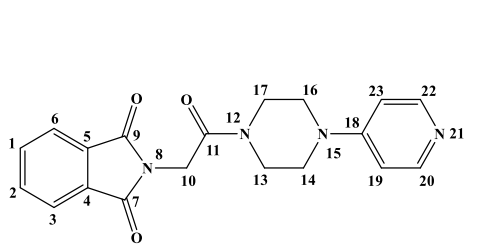
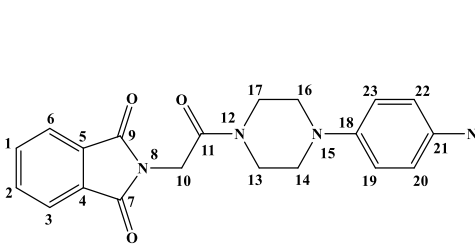
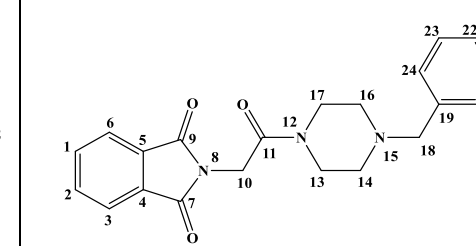
Fonte: do autor.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **PQM 186** - **PQM 188** (75 MHz, CDCl_3 .)

	 PQM 186	 PQM 187	 PQM 188
Carbono	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1 e C-2	134,1	134,0	134,1
C-3 e C-6	123,6	123,5	123,5
C-4 e C-5	132,3	132,3	133,1
C-7 e C-9	164,0	163,8	163,9
C-10	39,1	39,1	39,1
C-11	168,0	168,1	168,1
C-13	42,1	42,3	42,3
C-14	49,5	52,6	52,7
C-16	49,3	52,4	52,5
C-17	44,6	44,8	44,8
C-18	149,4	62,2	62,0
C-19	118,0	129,5	136,2
C-20	129,2	130,3	128,5
C-21	125,7	113,7	130,3
C-22	129,2	158,9	132,3
C-23	118,0	113,7	130,3
C-24	-	130,3	128,5
C-25	-	55,3	-

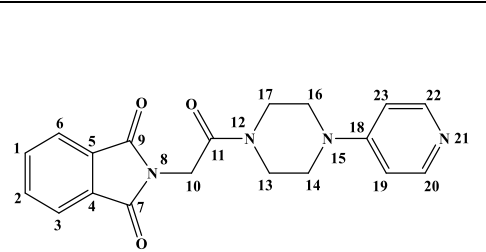
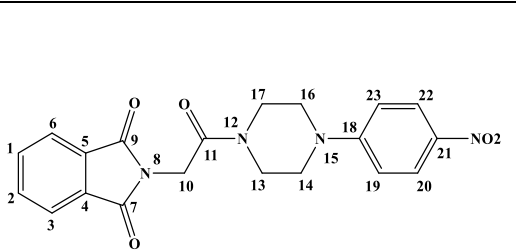
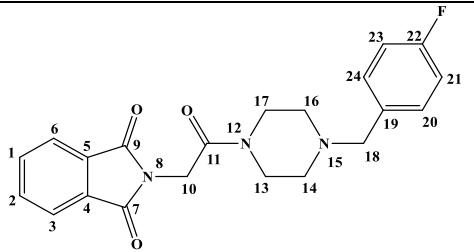
Fonte: do autor.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H dos compostos **PQM 189** (300 MHz, CDCl_3), **PQM 190** (DMSO-d_5) e **PQM 296** (300 MHz, CDCl_3)

Hidrogênio	 PQM 189			 PQM 190			 PQM 296		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-1 e H-2	7,72	3,04; 5,24	dd	7,85-7,93	-	m	7,72	3,03; 5,50	dd
H-3 e H-6	7,87	3,04; 5,24	dd	7,85-7,93	-	m	7,87	3,03; 5,50	dd
H-10	4,53	-	s	4,59	-	s	4,48	-	s
H-13	3,82-3,62	-	m	3,75	4,09; 6,47	dd	3,61	-	t
H-14	3,49	3,93	t	3,60-3,57	-	m	2,43	-	t
H-16	3,39	4,23	t	3,51	3,79; 7,45	dd	2,51	-	t
H-17	3,82-3,62	-	m	3,60-3,57	-	m	3,52	-	t
H-18	-	-	-	-	-	-	3,50	-	s
H-19	6,66	5,60	d	7,02	9,45	d	-	-	-
H-20	8,31	5,60	d	8,07	9,45	d	7,01	8,70	d
H-21	-	-	-	-	-	-	7,27	2,26; 7,75	dd
H-22	8,31	5,60	d	8,07	9,45	d	-	-	-
H-23	6,66	5,60	d	7,02	9,45	d	7,27	2,26; 7,75	dd
H-24	-	-	-	-	-	-	7,01	8,70	d

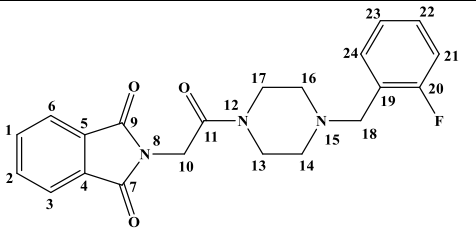
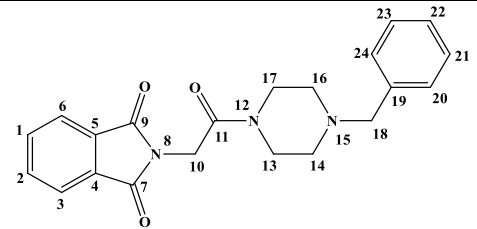
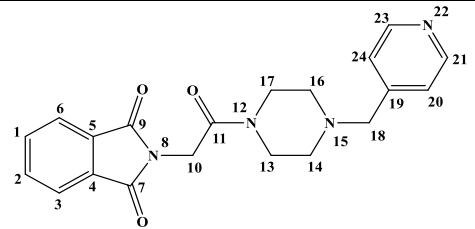
Fonte: do autor.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **PQM 189** (CDCl_3 , 75 MHz), **PQM 190** ($\text{DMSO}-d_5$) e **PQM 296** (CDCl_3 , 75 MHz)

			
	PQM 189	PQM 190	PQM 296
Carbono	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1 e C-2	134,2	135,2	134,1
C-3 e C-6	123,6	123,8	123,5
C-4 e C-5	132,2	132,1	132,2
C-7 e C-9	164,3	165,0	163,8
C-10	39,0	43,6	39,1
C-11	168,0	168,1	168,1
C-13	44,1	46,1	42,3
C-14	45,7	46,4	52,6
C-16	45,7	46,4	52,4
C-17	44,5	46,1	44,7
C-18	154,5	154,8	62,0
C-19	108,6	113,1	133,3
C-20	150,3	126,2	130,5; J_{CF} (Hz)=7,93
C-21	-	137,5	115,2; J_{CF} (Hz)=21,2
C-22	150,3	126,2	162,1; J_{CF} (Hz)=245,6
C-23	108,6	113,1	130,5; J_{CF} (Hz)=7,93
C-24	-	-	115,2; J_{CF} (Hz)=21,2

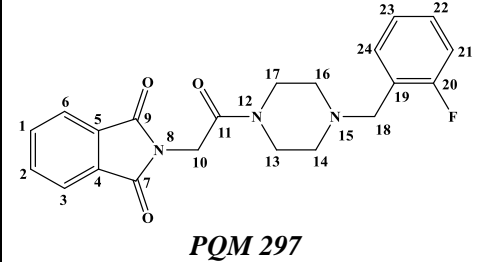
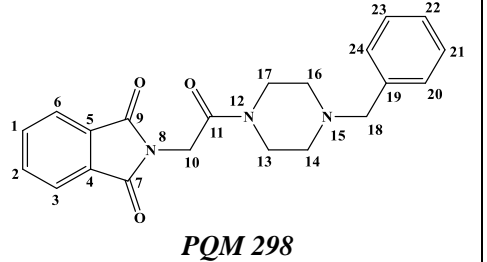
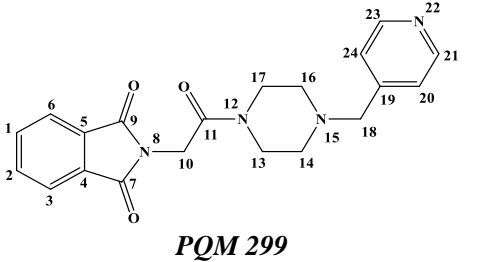
Fonte: do autor.

Tabela II - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 297 - PQM 299 (300 MHz, CDCl_3)

Hidrogênio	 PQM 297			 PQM 298			 PQM 299		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-1 e H-2	7,72	3,04; 5,46	dd	7,72	3,10; 5,41	dd	7,72	3,09; 5,41	dd
H-3 e H-6	7,87	3,04; 5,46	dd	7,87	3,10; 5,41	dd	7,87	3,09; 5,41	dd
H-10	4,48	-	s	4,49	-	s	4,49	-	s
H-13	3,64-3,59	-	m	3,63	5,05	t	3,63	-	t
H-14	2,58	5,04	t	2,54	5,05	t	2,54	-	t
H-16	2,50	5,04	t	2,45	5,05	t	2,46	-	t
H-17	3,54	5,04	t	3,53	5,05	t	5,58-3,52	-	m
H-18	3,63	-	s	3,55	-	s	3,54	-	s
H-20	-	-	-	7,36-7,31	-	m	7,29	5,87	d
H-21	7,16-7,01	-	m	7,36-7,31	-	m	8,56	5,87	d
H-22	7,31-7,22	-	m	7,30-7,25	-	m			
H-23	7,16-7,01	-	m	7,36-7,31	-	m	8,56	5,87	d
H-24	7,35	1,53;7,43	td	7,36-7,31	-	m	7,29	5,87	d

Fonte: do autor.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **PQM 297** - **PQM 299** (75 MHz, CDCl_3)

			
	PQM 297	PQM 298	PQM 299
Carbono	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1 e C-2	134,1	134,1	134,1
C-3 e C-6	123,5	123,5	123,8
C-4 e C-5	132,3	132,3	132,2
C-7 e C-9	163,8	163,8	163,9
C-10	39,1	39,1	39,1
C-11	168,1	168,1	168,1
C-13	42,3	44,8	44,7
C-14	52,5	52,7	52,8
C-16	52,7	52,5	52,6
C-17	44,7	42,3	42,2
C-18	55,2	62,9	61,5
C-19	123,9	137,6	147,0
C-20	161,4; J_{CF} (Hz)= 246,17	128,4	123,6
C-21	115,4; J_{CF} (Hz)= 22,20	129,1	150,0
C-22	129,2; J_{CF} (Hz)= 8,14	127,4	-
C-23	124,0; J_{CF} (Hz)=3,22	129,1	150,0
C-24	131,5; J_{CF} (Hz)= 4,15	128,4	123,6

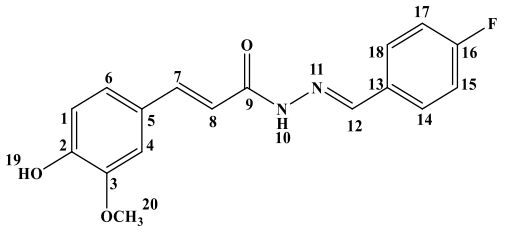
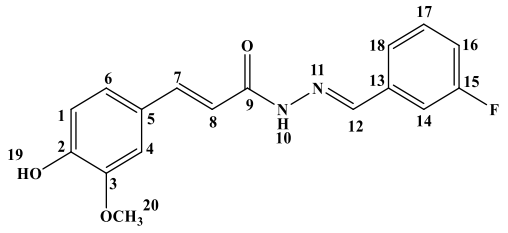
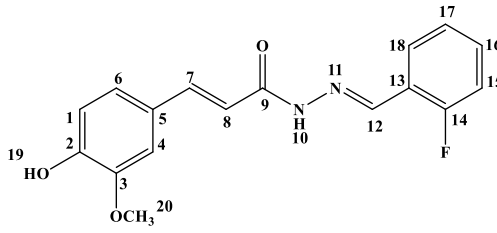
Fonte: do autor.

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 211 - PQM 213 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	PQM 211			PQM 212			PQM 213		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,82	8,09	d	6,82	7,99	d	6,82	7,61	d
	6,84	7,99	d	-	-	-	6,84	7,98	d
H-4	7,18	1,51	d	7,18	-	s	7,18	-	s
	7,26	1,40	d	7,29	-	s	7,27	-	s
H-6	7,06	1,51; 8,09	dd	7,07	7,99	d	7,06	7,61	d
	7,18	1,40; 7,99	dd	7,24	8,86	d	7,23	7,98	d
H-7	7,51	15,66	d	7,39	15,86	d	7,53	16,12	d
	7,58	15,77	d	7,60	16,08	d	7,59	16,39	d
H-8	6,56	15,66	d	6,53	15,86	d	6,54	16,12	d
	7,37	15,77	d	7,23	16,08	d	7,37	16,39	d
H-10	11,41	-	s	11,45	-	s	11,52	-	s
	11,77	-	s	11,74	-	s	11,98	-	s
H-12	8,04	-	s	8,04	-	s	8,26	-	s
	8,23	-	s	8,23	-	s	8,46	-	s
H-14	7,85 – 7,72	-	m	7,57-7,42	-	m	-	-	-
H-15, 17	7,26	8,75	t	-	-	-	7,31-7,25	-	m
H-16	-	-	-	7,57-7,42	-	m	7,90	8,67	t
	-	-	-	-	-	-	8,06	8,43	t
H-18	7,85 – 7,72	-	m	7,57-7,42	-	m	7,47-7,42	-	m
H-19	-	-	-	9,55	-	s	9,63	-	s
H-20	3,80	-	s	3,81	-	s	3,80	-	s
	3,83	-	s	3,83	-	s	3,82	-	s

Fonte: do autor.

Tabela 14 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 211 - PQM 213 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

	 PQM 211		 PQM 212		 PQM 213	
Carbano	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	116,2		116,2		116,6	
C-2	149,2	149,4	149,3	149,4	149,3	149,5
C-3	148,3		148,3		148,3	
C-4	111,4	112,7	111,5	112,8	111,51	112,7
C-5	126,5	126,6	126,6	126,8	126,50	-
C-6	122,4	122,5	122,5	122,7	122,5	122,6
C-7	142,1	143,3	-	143,5	141,8	143,6
C-8	114,0	117,2	114,0	117,1	113,8	117,0
C-9	162,5	167,0	162,56	167,1	162,7	167,0
C-12	141,5	145,4	141,8	145,2	136,0	139,1
C-13	131,4	131,5	137,4	137,5	132,1	132,0
C-14	129,6		113,3		161,0	
	J_{CF} (Hz) = 8,15		J_{CF} (Hz) = 22,4		J_{CF} (Hz) = 230,67	
C-15	116,3		162,9		116,2	
	J_{CF} (Hz) = 21,76		J_{CF} (Hz) = 243,8		J_{CF} (Hz) = 21,45	
C-16	163,5		113,4		126,8	
	J_{CF} (Hz) = 247,5		J_{CF} (Hz) = 22,5		J_{CF} (Hz) = 14,03	
C-17	116,3		131,3		125,4	
	J_{CF} (Hz) = 21,76		J_{CF} (Hz) = 8,24		-	
C-18	129,6		123,8		132,3	
	J_{CF} (Hz) = 8,15		-		J_{CF} (Hz) = 8,10	
C-20	56,0	56,2	56,0	56,2	56,0	56,2

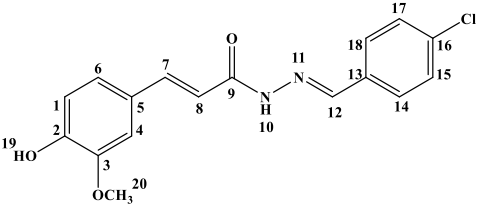
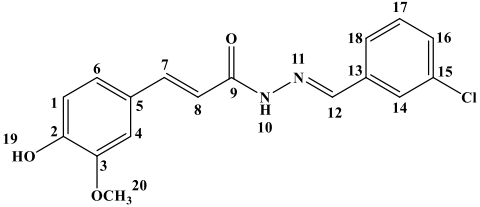
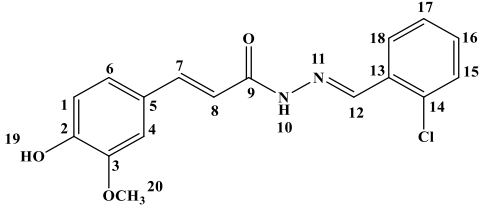
Fonte: do autor.

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 214 - PQM 216 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	PQM 214			PQM 215			PQM 216		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,80	8,06	d	6,81	7,98	d	6,82	8,08	d
	6,81	8,07	d	6,82	8,07	d	6,82	7,86	d
H-4	7,18	-	s	7,18	-	s	7,20	-	s
	7,27	-	s	7,30	-	s	7,29	-	s
H-6	7,06	8,06	d	7,06	7,98	d	7,08	8,08	d
	7,21	8,07	d	7,20	8,07	d	7,22	7,86	d
H-7	7,62	15,72	d	7,53	16,02	d	7,61	15,67	d
	7,58	15,96	d	7,58	15,94	d	7,56	15,97	d
H-8	6,50	15,72	d	6,52	16,02	d	6,49	15,67	d
	7,36	15,96	d	7,38	15,94	d	7,39	15,97	d
H-10	11,43	-	s	11,46	-	s	11,59	-	s
	11,64	-	s	11,68	-	s	11,85	-	s
H-12	8,02	-	s	8,01	-	s	8,43	-	s
	8,18	-	s	8,18	-	s	8,59	-	s
H-14	7,77	8,39	d	7,44	-	s	-	-	-
	7,72	8,49	d	-	-	-	-	-	-
H-15	7,49	8,39	d	-	-	-	7,52-7,49	-	m
H-16	-	-	d	7,46	8,05	d	7,42	5,57	d
H-17	7,49	8,39	d	7,72 – 7,63	-	m	7,41	5,57	d
H-18	7,77	8,39	d	7,78	12,38	d	8,08-7,93	-	m
	7,72	8,49	d	-	-	-	8,18-8,09	-	m
H-19	9,56	-	s	9,55	-	s	9,60	-	s
H-20	3,80	-	s	3,81	-	s	3,81	-	s
	3,83	-	s	3,83	-	s	3,82	-	s

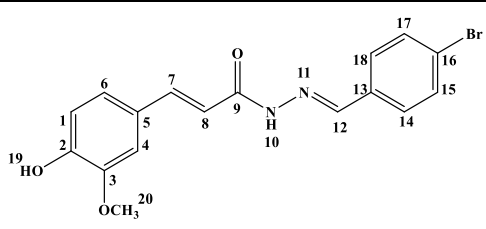
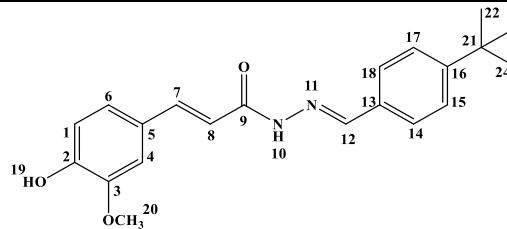
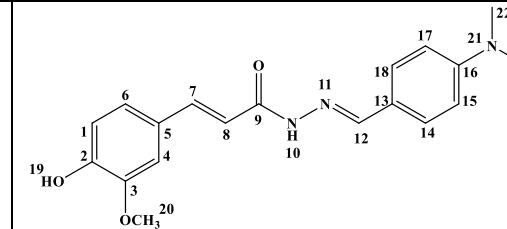
Fonte: do autor.

Tabela 16 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 214 - PQM 216 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

	 PQM 214		 PQM 215		 PQM 216	
Carbono	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	116,2		116,2		116,2	
C-2	149,3	149,4	149,3	149,4	149,4	149,7
C-3	148,3		148,3		148,3	
C-4	111, 38	112,7	111,5	112,5	111, 58	112,8
C-5	126,6	126,8	126,6	-	126,5	126,8
C-6	122,5	-	122,5	122,8	122,5	122,6
C-7	141,8	143,4	141,6	143,46	142,0	143,6
C-8	113,9	117,0	114,0	117,0	113,9	117,0
C-9	162,4	167,0	162,5	167,1	162,6	167,1
C-12	141,9	145,4	141,9	144,8	139,3	142,4
C-13	134,5	134,8	134,1		133,3	134,5
C-14	129,1		129,8	130,0	132,1	
C-15	129,6		137,2		130,3	
C-16	133,7	133,8	131,2		131,5	131,8
C-17	129,4		126,8		128,1	
C-18	129,1		126,1		127,3	127,5
C-20	55,2	56,0	56,0	56,2	55,0	56,2

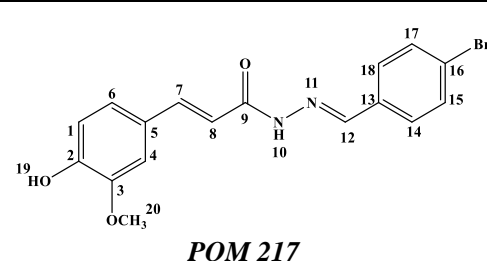
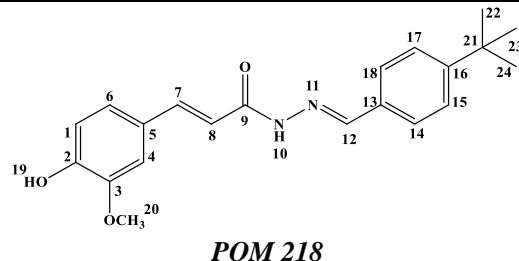
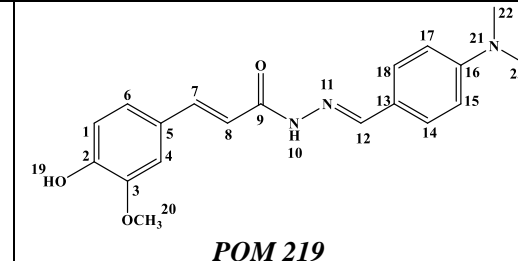
Fonte: do autor.

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 217 - PQM 219 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 PQM 217			 PQM 218			 PQM 219		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,81	7,86	d	6,80	8,01	d	6,86	8,01	d
	6,83	8,04	d	6,80	7,74	d	8,88	8,07	d
H-4	7,18	-	s	7,17	-	s	7,19	-	s
	7,27	-	s	7,26	-	s	7,29	-	s
H-6	7,06	7,86	d	7,06	8,01	d	7,07	8,01	d
	7,21	8,04	d	7,19	7,74	d	7,20	8,07	d
H-7	7,53	15,87	d	7,52	15,66	d	7,51	15,60	d
	7,62	15,87	d	7,58	16,67	d	7,56	15,26	d
H-8	6,50	15,64	d	6,50	15,66	d	6,64	15,60	d
	7,36	15,64	d	7,37	15,67	d	7,40	15,26	d
H-10	11,42	-	s	11,31	-	s	11,31	-	s
	11,62	-	s	11,50	-	s	11,81	-	s
H-12	8,00	-	s	8,01	-	s	8,03	-	s
	8,18	-	s	8,17	-	s	8,23	-	s
H-14, H-18	7,74-7,61	-	m	7,62	8,43	d	7,76-7,64	-	m
	-	-	-	7,65	8,43	d	-	-	-
H-15, H-17	7,74-7,61	-	m	7,44	8,43	d	7,26-7,14	-	m
H-19	9,53	-	s	9,52	-	s	9,67	-	s
H-20	3,81	-	s	3,81	-	s	3,83	-	s
	3,83	-	s	3,84	-	s	3,86	-	s
H-22 H-23	-	-	-	1,27	-	s	3,04	-	s
H-24	-	-	-	1,27	-	s	-	-	-

Fonte: do autor.

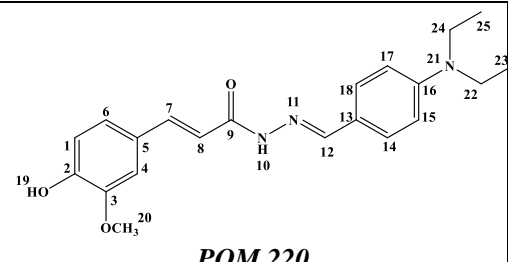
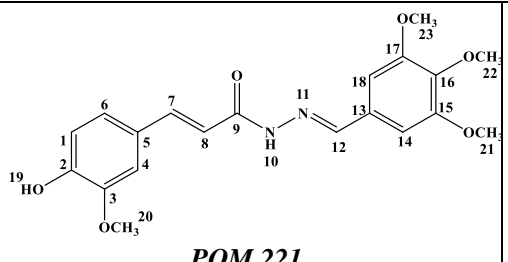
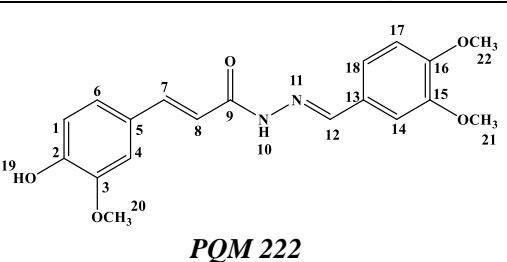
Tabela 18 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 217 - PQM 219 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

	 PQM 217		 PQM 218		 PQM 219	
Carbono	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	116,2		116,2		116,2	
C-2	149,3	149,5	149,2	149,4	149,1	149,3
C-3	148,3		148,3		148,2	
C-4	111,5	112,7	111,5	112,6	111,5	112,4
C-5	126,6	126,8	126,7	126,9	126,6	126,7
C-6	122,4	122,6	122,4	122,5	122,2	122,5
C-7	141,7	143,4	141,5	143,2	140,9	142,8
C-8	114,0	117,2	114,2	117,3	114,1	117,9
C-9	162,2	166,6	162,3	166,9	162,1	166,5
C-12	142,0	145,2	146,6	143,2	142,9	146,7
C-13	134,05	134,21	132,1		128,5	
C-14, C-18	129,3		127,4		128,8	
C-15, C-17	132,3		126,1		115,6	
C-16	123,3	123,5	152,9	153,2	131,9	
C-20	56,0	56,3	56,0	56,2	55,9	56,1
C-21	-	-	35,0		-	
C-22, C-23	-	-	31,4		42,1	
C-24	-	-	31,4		-	

Fonte: do autor.

Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 220 - PQM 222 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

(continua)

Hidrogênio	 PQM 220			 PQM 221			 PQM 222		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,81	7,76	d	6,80	8,10	d	6,80	8,11	d
	6,84	6,50	d	-	-	-	-	-	-
H-4	7,17	-	s	7,18	-	s	7,17	-	s
	7,26	-	s	7,34	-	s	7,31	-	s
H-6	7,05	7,76	d	7,07	8,58	d	7,05	8,11	d
	7,18	6,50	d	7,09	7,83	d	7,18	7,45	d
H-7	7,48	15,76	d	7,51	15,65	d	7,50	15,64	d
	7,56	15,38	d	7,56	15,26	d	7,55	16,20	d
H-8	6,49	15,76	d	6,56	15,65	d	6,50	15,64	d
	7,37	15,38	d	7,46	15,26	d	7,44	16,20	d
H-10	11,06	-	s	11,40	-	s	11,27	-	s
	11,27	-	s	11,54	-	s	11,43	-	s
H-12	7,89	-	s	7,94	-	s	7,95	-	s
	8,05	-	s	8,13	-	s	8,12	-	s
H-14	7,49	8,88	d	7,01	-	s	7,31	-	s
	7,52	8,61	d	7,06	-	s	7,41	-	s
H-15	6,69	8,92	d	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-17	6,69	8,92	d	-	-	-	6,98	7,97	d
	-	-	-	-	-	-	7,00	8,29	d
H-18	7,49	8,88	d	7,01	-	s	7,12	7,97	d
	7,52	8,61	d	7,06	-	s	7,18	8,29	d
H-19	-	-	-	9,53	-	s	9,51	-	s

(conclusão)

Hidrogênio	<i>PQM 220</i>			<i>PQM 221</i>			<i>PQM 222</i>		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-20	3,82	-	s	3,81	-	s	3,80	-	s
	3,85	-	s	-	-	-	3,81	-	s
H-21	-	-	-	3,68	-	s	3,83	-	s
H-22, H-24	3,38	6,91 e13,90	dd	3,83	-	s	3,78	-	s
H-23, H-25	1,11	6,96	t	3,68	-	s	-	-	-

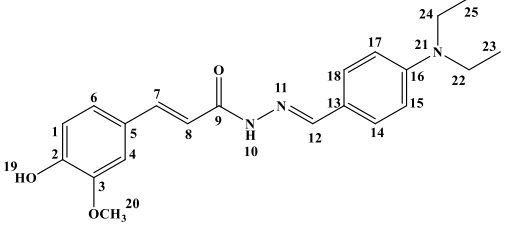
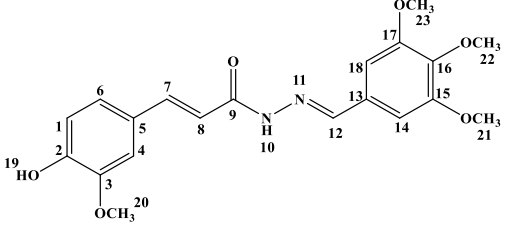
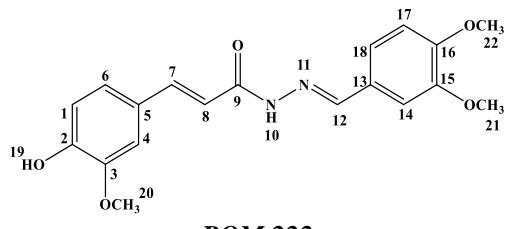
Fonte: do autor.

Tabela 20 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos *PQM 220* - *PQM 222* (DMSO- d_6 , 75 MHz)

(continua)

Carbono	<i>PQM 220</i>		<i>PQM 221</i>		<i>PQM 222</i>	
	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	116,0		116,2		116,05	116,17
C-2	149,2	149,4	149,2	149,4	149,1	149,3
C-3	148,2		148,3		148,3	
C-4	111,2	112,3	110,8	111,5	111,3	111,4
C-5	126,4	126,6	126,4	126,8	126,7	126,9
C-6	122,1	122,3	122,4	123,6	122,2	122,4

(conclusão)

	 PQM 220		 PQM 221		 PQM 222	
Carbano	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-7	140,5	142,4	141,5	142,9	141,2	142,8
C-8	114,2	117,3	114,3	117,2	114,4	117,4
C-9	161,7	166,2	162,4	166,9	162,2	166,8
C-12	143,9	148,2	142,8	146,6	143,1	146,8
C-13	128,8		130,4		127,6	
C-14	129,0		104,45	104,75	108,7	108,8
C-15	111,4		153,6		111,9	
C-16	149,0		139,6		149,5	
C-17	111,4		153,6		150,8	151,1
C-18	129,0		104,5	104,8	121,7	123,3
C-20	55,8	56,0	55,7		56,0	
C-21	-		56,4		55,9	
C-22, 24	44,0		60,6		55,7	
C-23, 25	12,7		56,4		-	

Fonte: do autor.

Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 223 - PQM 225 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

(continua)

Hidrogênio	PQM 223			PQM 224			PQM 225		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,85	7,84	d	6,80	7,59	d	6,81	8,28	d
	6,86	7,00	d	6,83	7,40	d	6,85	7,55	d
H-4	7,20	-	s	7,16	-	s	7,17	1,60	d
	7,31	-	s	7,26	-	s	7,26	1,60	d
H-6	7,08	7,84	d	7,04	7,59	d	7,05	1,60; 8,28	dd
	7,21	7,00	d	7,16	7,40	d	7,18	1,60; 7,55	dd
H-7	7,54	15,94	d	7,42	15,76	d	7,48	15,66	d
	7,61	15,81	d	7,47	15,91	d	7,56	15,69	d
H-8	6,60	15,94	d	6,48	15,76	d	6,52	15,66	d
	7,40	15,81	d	7,37	15,91	d	7,36	15,69	d
H-10	11,47	-	s	11,05	-	s	11,21	-	s
	11,85	-	s	11,24	-	s	11,51	-	s
H-12	8,07	-	s	7,89	-	s	7,93	-	s
	8,27	-	s	8,04	-	s	8,10	-	s
H-14, H-18	7,81	8,57	d	7,50	8,46	d	7,56	8,90	d
	7,88	7,84	d	7,52	8,50	d	7,60	8,90	d
H-15, H-17	7,80-7,67	-	m	6,55	8,50	d	6,99	8,90	d
H-19	-	-	-	9,49	-	s	-	-	-
H-20	3,82	-	s	3,81	-	s	3,80	-	s
	3,86	-	s	3,84	-	s	3,83	-	s
H-22	3,50-3,46	-	m	3,26	-	s	3,23-3,15	-	m
H-23	1,97-1,89	-	m	1,94	-	s	3,76-3,69	-	m

(conclusão)

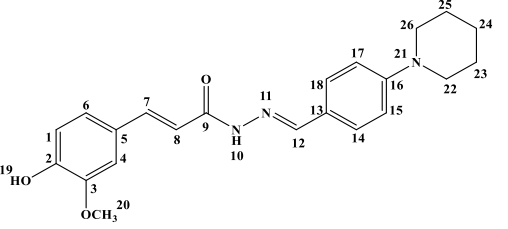
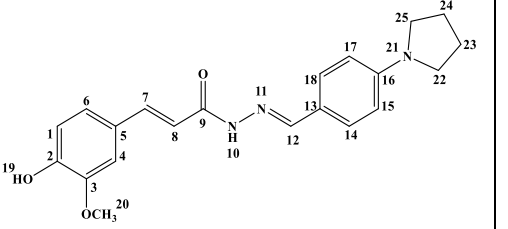
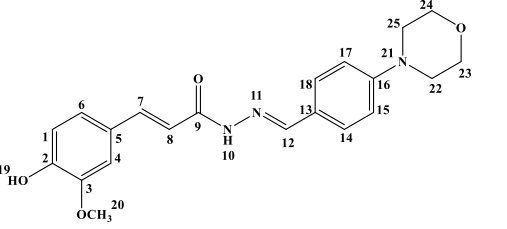
Hidrogênio	PQM 223			PQM 224			PQM 225		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-24	1,69-1,60	-	m	1,94	-	s	3,76-3,69	-	m
H-25	1,97-1,89	-	m	3,26	-	s	3,23-3,15	-	m
H-26	3,50-3,46	-	m	-	-	-	-	-	-

Fonte: do autor.

Tabela 22 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 223 - PQM 225 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

Carbono	PQM 223		PQM 224		PQM 225	
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	116,2		116,2		116,1	
C-2	149,3	19,5	149,0	149,2	149,1	149,3
C-3	148,3		148,3		148,3	
C-4	111,6	112,6	111,3	112,4	111,3	112,4
C-5	126,6	126,8	126,8	127,0	125,3	125,3

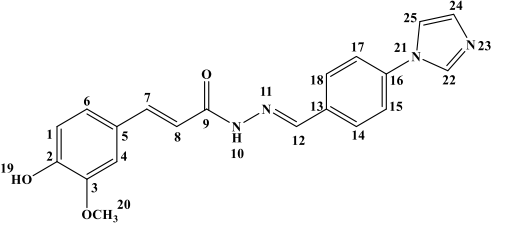
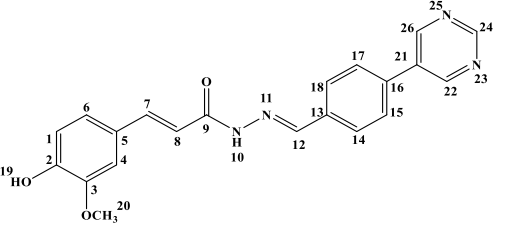
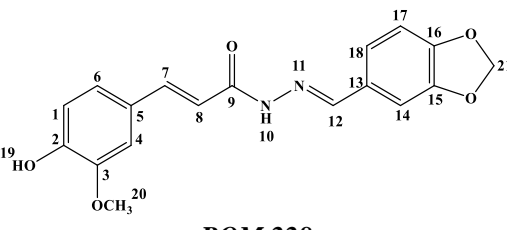
(conclusão)

Carbano	 PQM 223		 PQM 224		 PQM 225	
	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-6	122,4	122,7	122,4	-	122,3	122,5
C-7	141,6	143,4	140,7	142,5	141,0	143,5
C-8	114,0	117,3	114,6	117,7	114,3	117,5
C-9	162,5	167,0	161,8	166,4	162,1	166,5
C-12	141,9	-	144,3	-	143,5	146,8
C-13	128,7	-	128,8	129,0	126,7	126,9
C-14	121,2		121,5		128,5	
C15, C17	120,9		112,0		114,9	115,1
C-16	145,3	-	152,4	152,4	152,4	152,4
C-18	121,2		122,2		128,5	128,7
C-20	56,0	56,2	56,0	56,2	56,0	56,2
C-22	54,6		47,7		48,0	
C-23	23,8		25,4		66,4	
C-24	21,9		25,4		66,4	
C-25	23,8		47,7		48,0	
C-26	54,6		-		-	

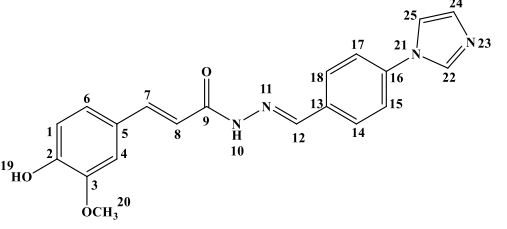
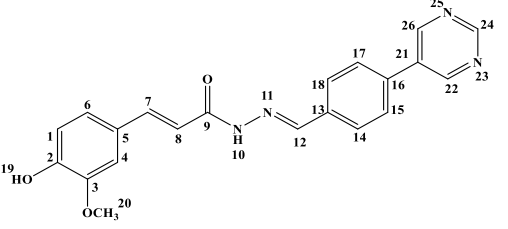
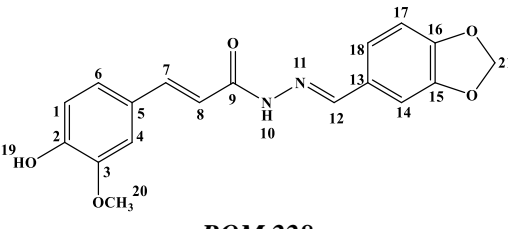
Fonte: do autor.

Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 226 - PQM 228 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

(continua)

Hidrogênio	 PQM 226			 PQM 227			 PQM 228		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,84	7,93	d	6,82	7,88	d	6,80	8,07	d
	6,87	7,83	d	6,85	7,77	d	6,82	7,92	d
H-4	7,18	-	s	7,18	-	s	7,16	-	s
	7,30	-	s	7,30	-	s	7,27	-	s
H-6	7,06	7,93	d	7,07	7,88	d	7,05	8,07	d
	7,22	7,83	d	7,21	7,77	d	7,21	7,92	d
H-7	7,41	15,69	d	7,41	15,68	d	7,37	15,64	d
	7,60	15,88	d	7,60	15,90	d	7,56	15,67	d
H-8	6,65	15,69	d	6,58	15,68	d	6,48	15,64	d
	7,53	15,88	d	7,53	15,90	d	7,50	15,67	d
H-10	11,57	-	s	11,50	-	s	11,23	-	s
	12,12	-	s	11,86	-	s	11,46	-	s
H-12	8,14	-	s	8,10	-	s	7,94	-	s
	8,37	-	s	8,30	-	s	8,11	-	s
H-14	7,96- 7,90	-	m	7,81	8,67	d	7,26	-	s
	-	-	-	7,70	7,83	d	7,42	-	s
H-15	7,96- 7,90	-	m	7,85	8,44	d	-	-	-
H-17	7,96- 7,90	-	m	7,85	8,44	d	6,95	7,93	d
	-	-	-	-	-	-	6,96	7,96	d
H-18	7,96- 7,90	-	m	7,87	8,67	d	7,12	7,93	d
	-	-	-	7,90	7,83	d	7,15	7,96	d
H-19	9,80	-	s	-	-	-	9,51	-	s

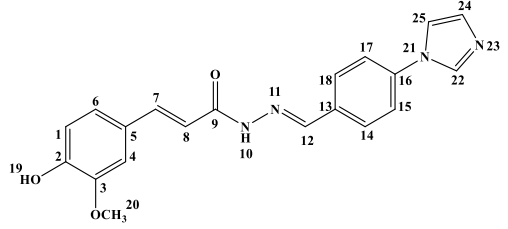
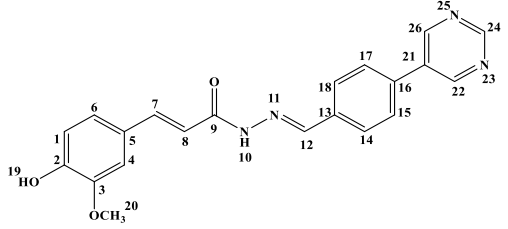
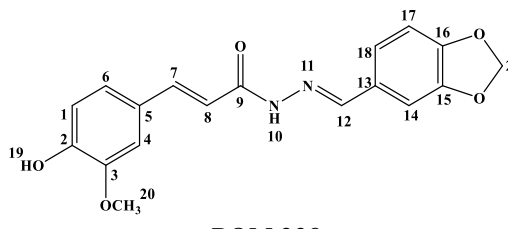
(conclusão)

Hidrogênio	 PQM 226			 PQM 227			 PQM 228		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-20	3,80	-	s	3,80	-	s	3,80	-	s
	3,84	-	s	3,83	-	s	3,83	-	s
H-21	-	-	-	-	-	-	6,06	-	s
H-22, H-26	8,34	1,67	t	9,20	-	s	-	-	-
H-24	7,88	2,07	d	7,90	-	s	-	-	-
H-25	8,00	8,32	d	-	-	-	-	-	-

Fonte: do autor.

Tabela 24 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **PQM 226 - PQM 228** (DMSO- d_6 , 75 MHz)

(continua)

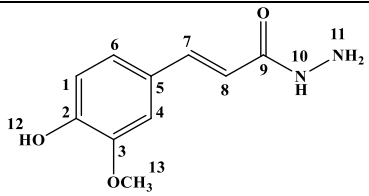
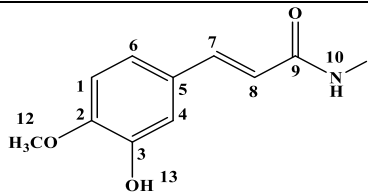
Carbono	 PQM 226		 PQM 227		 PQM 228	
	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	116,2		116,2		116,2	
C-2	149,4	149,5	149,3	149,5	149,3	149,4
C-3	148,3		148,3		148,4	

(conclusão)

Carbono	PQM 226		PQM 227		PQM 228	
	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-4	111,6	112,6	111,7	112,7	111,4	112,7
C-5	126,6	126,8	126,6	126,8	126,7	126,9
C-6	122,0		122,42	122,4	122,6	122,4
C-7	141,7	143,6	141,7	143,4	141,3	143,1
C-8	113,9	117,2	114,0	117,2	114,3	117,3
C-9	162,7	167,1	162,5	167,0	162,3	166,8
C-12	141,6	144,7	142,4	145,6	143,1	146,4
C-13	128,8		133,1		129,3	
C-14	122,7		127,4		105,6	
C-15	121,1		128,2		148,3	
C-16	136,0		135,3	135,5	149,2	
C-17	121,1		128,2		108,9	
C-18	122,7		127,4		123,5	123,7
C-20	56,0	56,2	56,0	56,2	56,0	56,2
C-21	-	-	135,1		102,0	
C-22	135,8		155,2		-	-
C-23	-	-	-	-	-	-
C-24	135,0		157,7		-	-
C-25	121,5		155,2		-	-

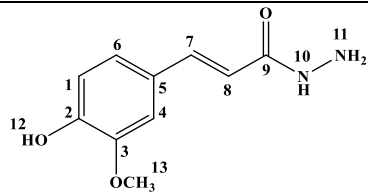
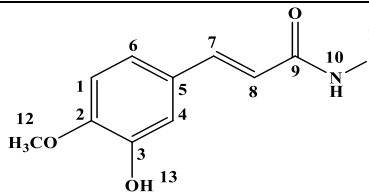
Fonte: do autor.

Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H dos compostos **26a** e **26b** (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 26a			 26b		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-1	6,77	8,13	d	6,93	8,13	m
H-4	7,09	1,89	d	6,99	1,56	d
H-6	6,97	1,89 e 8,13	dd	6,93-6,95	-	m
H-7	7,32	15,75	d	7,30	15,74	d
H-8	6,34	15,75	d	6,32	15,74	d
H-10	9,16	-	s	9,24	-	s
H-11	4,37	-	s	4,42	-	s
H-12	-	-	-	3,79	-	s
H-13	3,78	-	s	9,19	-	s

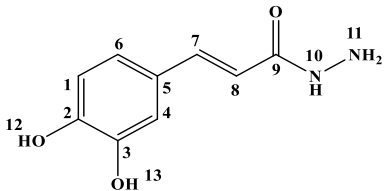
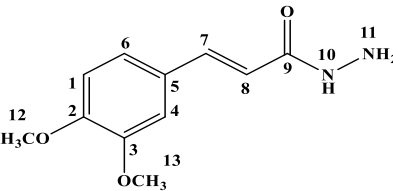
Fonte: do autor.

Tabela 26 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **26a** e **26b** (DMSO- d_6 , 75 MHz)

Carbono	 26a		 26b	
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	116,1	113,2	113,2	113,2
C-2	148,7	148,9	148,9	148,9
C-3	148,3	146,5	146,5	146,5
C-4	111,3	111,9	111,9	111,9
C-5	126,9	127,6	127,6	127,6
C-6	121,8	120,0	120,0	120,0
C-7	139,1	138,1	138,1	138,1
C-8	117,4	117,3	117,3	117,3
C-9	165,6	164,7	164,7	164,7
C-12	-	55,4	55,4	55,4
C-13	56,0	-	-	-

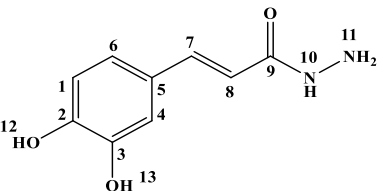
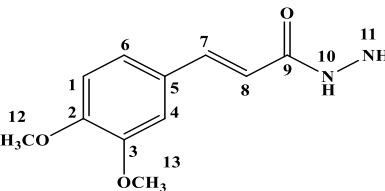
Fonte: do autor.

Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H dos compostos **26c** e **26d** (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 26c			 26d		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,74	8,10	d	6,95	8,25	d
H-4	6,95	1,96	d	7,12	1,84	d
H-6	6,84	1,96 e 8,10	dd	7,09	1,84 e 8,25	dd
H-7	7,27	15,72	d	7,37	15,77	d
H-8	6,26	15,72	d	6,41	15,77	d
H-10	9,24	-	s	9,19	-	s
H-11	4,43	-	s	4,39	-	s
H-12	-	-	-	3,76	-	s
H-13	-	-	-	3,77	-	s

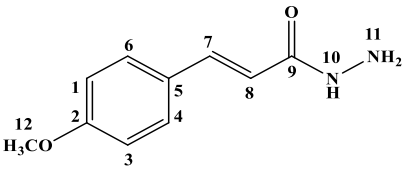
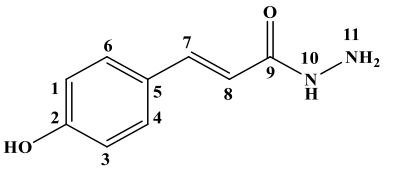
Fonte: do autor.

Tabela 28 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos **26c** e **26d** (DMSO- d_6 , 75 MHz)

Carbono	 26c		 26d	
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	116,2		111,7	
C-2	147,8		150,0	
C-3	146,0		148,8	
C-4	114,0		110,0	
C-5	126,8		127,6	
C-6	120,9		121,1	
C-7	139,2		138,2	
C-8	116,9		117,8	
C-9	165,6		164,8	
C-12	-		55,5	

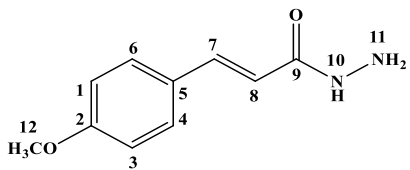
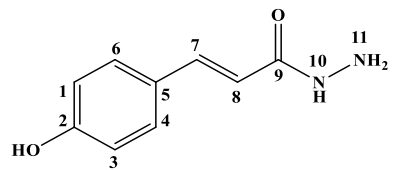
Fonte: do autor.

Tabela 29 - Dados de RMN de ^1H dos compostos 26e e 26f (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 26e			 26f		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,94	8,57	d	6,77	8,58	d
H-3	6,94	8,57	d	6,77	8,58	d
H-4	7,47	8,57	d	7,36	8,58	d
H-6	7,47	8,57	d	7,36	8,58	d
H-7	7,37	15,80	d	7,33	15,81	d
H-8	6,38	15,80	d	6,31	15,81	d
H-10	9,26	-	s	9,18	-	s
H-11	4,45	-	s	4,36	-	s
H-12	3,75	-	s	-	-	-

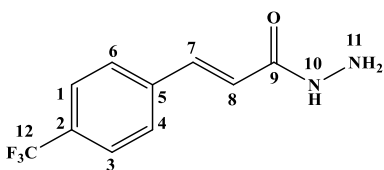
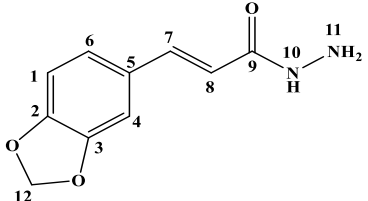
Fonte: do autor.

Tabela 30 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos 26e e 26f (DMSO- d_6 , 75 MHz)

Carbono	 26e	 26f
	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	114,8	116,2
C-2	160,7	159,3
C-3	114,8	116,2
C-4	129,5	129,8
C-5	127,9	126,4
C-6	129,5	129,8
C-7	138,3	138,8
C-8	118,2	117,1
C-9	165,4	165,6
C-12	55,7	-

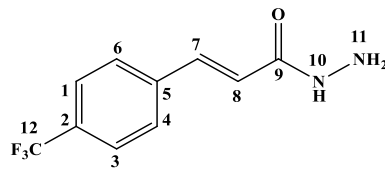
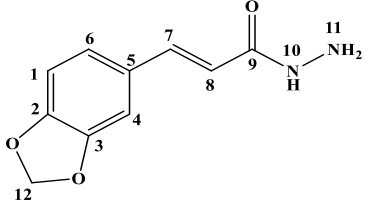
Fonte: do autor.

Tabela 31 - Dados de RMN de ^1H dos compostos 26g e 26h (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 26g			 26h		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	7,77-7,70	-	m	6,91	8,01	d
H-3	7,77-7,70	-	m	-	-	-
H-4	7,77-7,70	-	m	7,10	1,50	d
H-6	7,77-7,70	-	m	7,04	1,50; 8,01	dd
H-7	7,49	15,87	d	7,34	15,76	d
H-8	6,66	15,87	d	6,36	15,76	d
H-10	9,45	-	s	9,21	-	s
H-11	4,49	-	s	4,39	-	s
H-12	-	-	-	6,03	-	s

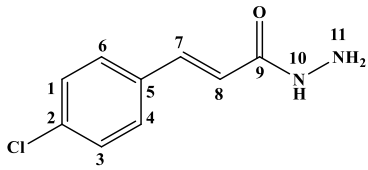
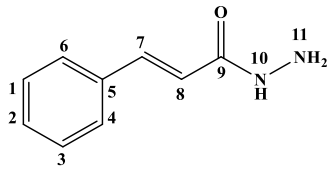
Fonte: do autor.

Tabela 32 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos 26g e 26h (DMSO- d_6 , 75 MHz)

Carbono	 26g		 26h	
	δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	126,2 - J_{CF} (Hz) = 3,53		106,6	
C-2	129,6 - J_{CF} (Hz) = 31,88		148,9	
C-3	126,2 - J_{CF} (Hz) = 3,53		148,4	
C-4	128,5		109,0	
C-5	139,5		129,8	
C-6	128,5		123,5	
C-7	136,9		138,5	
C-8	123,6		118,8	
C-9	164,3		165,2	
C-12	124,6 - J_{CF} (Hz) = 271,85		101,9	

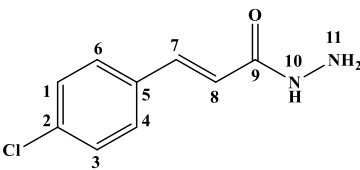
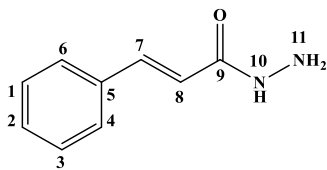
Fonte: do autor.

Tabela 33 - Dados de RMN de ^1H dos compostos 26i e 26j (DMSO-d₆, 300 MHz)

Hidrogênio	 26i			 26j		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	7,58	8,53	d	7,40-7,31	-	m
H-2	-	-	-	7,40-7,31	-	m
H-3	7,58	8,53	d	7,40-7,31	-	m
H-4	7,46	8,53	d	7,54	6,73	d
H-6	7,46	8,53	d	7,54	6,73	d
H-7	7,43	15,87	d	7,43	15,84	d
H-8	6,54	15,87	d	6,54	15,84	d
H-10	9,40	-	s	9,36	-	s
H-11	4,49	-	s	4,46	-	s

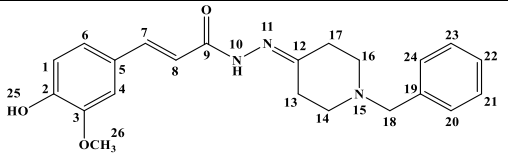
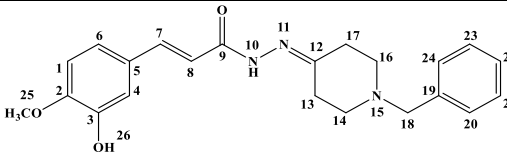
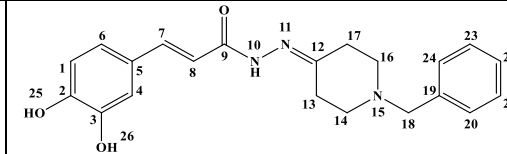
Fonte: do autor.

Tabela 34 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos 26i e 26j (DMSO-d₆, 75 MHz)

Carbono	 26i	 26j
	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	129,6	129,4
C-2	134,3	129,9
C-3	129,6	129,4
C-4	129,4	127,9
C-5	134,3	135,4
C-6	129,4	127,9
C-7	137,3	138,6
C-8	121,5	120,7
C-9	164,7	164,9

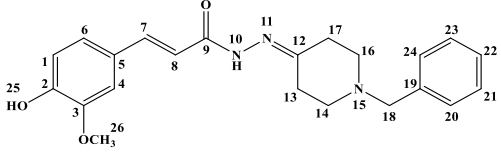
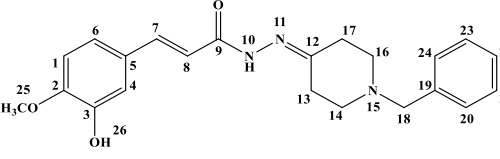
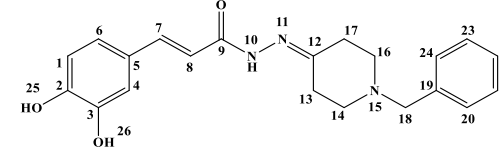
Fonte: do autor.

Tabela 35 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 263 – PQM 264 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 PQM 263			 PQM 264			 PQM 265		
	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M	δ (ppm)	J (Hertz)	M
H-1	6,81	7,85	d	6,95	7,77	d	6,74	8,17	d
H-4	7,08	-	s	7,02	-	s	6,96	-	s
	7,17	-	s	7,09	-	s	7,03	-	s
H-6	7,03	7,85	d	6,98	7,77	d	6,85	8,17	d
	7,17	8,04	d	7,01	8,41	d	6,90	6,96	d
H-7	7,45	15,59	d	7,39	15,57	s	7,36	15,60	d
	7,53	16,53	d	7,48	15,74	d	7,42	15,42	d
H-8	6,66	15,59	d	6,61	15,57	d	6,55	15,60	d
	-	-	-	7,28	15,74	d	7,17	15,42	d
H-10	10,33	-	s	10,36	-	s	10,32	-	s
	10,36	-	s	10,39	-	s	-	-	-
H-13 e H-17	2,37	5,33	t	2,36	5,51	t	2,33	5,37	t
H-14 e H-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-18	3,54	-	s	3,54	-	s	3,51	-	s
H20,21,23,24	7,39-7,25	-	m	7,34	4,37	d	7,34-7,27	-	m
H-22	7,30-7,23	-	m	7,31-7,22	-	m	7,28-7,21	-	m
H-25	9,51	-	s	3,80	-	s	9,24	-	s
H-26	3,81	-	s	9,22	-	s	9,24	-	s

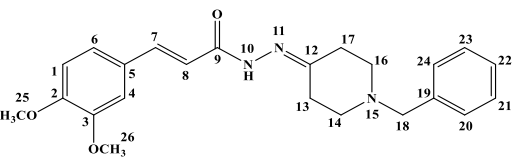
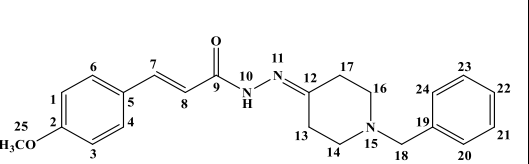
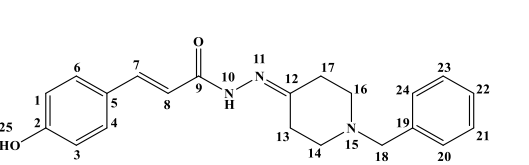
Fonte: do autor.

Tabela 36 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 263 – PQM 265 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

	 PQM 263		 PQM 264		 PQM 265	
Carbono	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	115,6		112,1		115,7	
C-2	148,4	148,7	149,4	149,6	147,5	147,7
C-3	147,7		146,8		145,5	
C-4	110,6	111,4	113,5		113,8	
C-5	126,3		127,0		126,3	
C-6	121,8		120,5	121,1	120,5	121,1
C-7	140,2	140,1	141,8	141,75	142,0	
C-8	114,2	115,0	118,1	118,07	113,8	116,8
C-9	162,0		162,0	166,7	162,0	166,7
C-12	152,1	157,2	152,5	157,7	152,2	157,3
C13 e C17	27,2	34,2	27,4	34,4	27,2	34,2
C14 e C16	51,8	53,2	52,0	53,3	51,8	53,1
C-18	61,3		61,4		61,2	
C-19	138,2		137,9		138,2	
C-20,C-24	128,1		128,3		128,1	
C-21,C-23	128,6		128,8		128,6	
C-22	126,9		127,9		126,87	
C-25	-		55,7		-	
C-26	55,4		-		-	

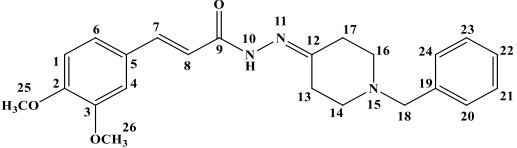
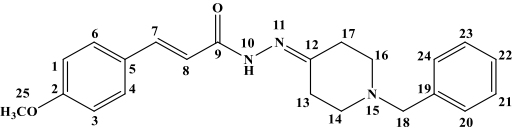
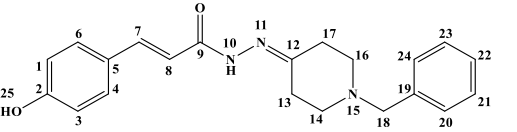
Fonte: do autor.

Tabela 37 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 266 – PQM 268 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 PQM 266			 PQM 267			 PQM 268		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-1	6,97	8,04	d	6,99	8,66	d	6,78	7,75	d
H-3	-	-	-	6,99	8,66	d	6,78	7,75	d
H-4	7,15	-	s	7,54	8,66	d	7,40	7,75	d
	7,20	-	s	7,60	8,31	d	-	-	-
H-6	7,13	8,04	d	7,54	8,66	d	7,40	7,75	d
	-	-	-	7,60	8,31	d	-	-	-
H-7	7,46	15,45	d	7,49	15,70	d	7,41	15,59	d
	7,55	15,59	d	7,55	15,47	d	7,50	16,44	d
H-8	6,70	15,45	d	6,73	15,70	d	6,61	15,59	d
	7,30	15,59	d	7,28	15,47	d	7,23	16,44	d
H-10	10,36	-	s	10,41	-	s	10,30	-	s
	-	-	-	10,45	-	s	10,34	-	s
H13 e H17	2,31 - 2,38	-	m	2,36	5,38	t	2,31 – 2,36	-	m
H14 e H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-18	3,51	-	m	3,53	-	s	3,51	-	s
H-20, H-21	7,33-7,30	-	m	7,34	4,33	d	7,31	4,20	d
H-22	7,27 -7,19	-	m	7,30 – 7,23	-	m	7,21 -7,28	-	m
H-23, H-24	7,33-7,30	-	m	7,34	4,33	d	7,31	4,20	d
H-25	3,76	-	s	3,79	-	s	9,90	-	s
H-26	3,78	-	s	-	-	-	-	-	-

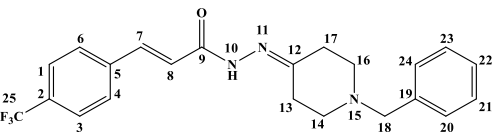
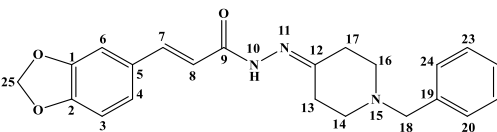
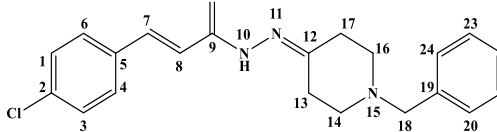
Fonte: do autor.

Tabela 38 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 266 – PQM 268 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

			
	PQM 266	PQM 267	PQM 268
Carbano	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1	111,5	114,9	115,7
C-2	150,0	150,2	158,9
C-3	148,6	148,6	159,2
C-4	109,6	130,2	115,7
C-5	127,4	129,3	129,6
C-6	121,3	128,0	125,9
C-7	139,6	130,2	129,3
C-8	115,0	140,0	139,9
C-9	161,6	141,5	141,6
C-12	152,1	115,6	113,9
C13 e 17	27,0	118,0	117,0
C14 e 16	51,6	162,4	162,0
C-18	61,0	167,1	166,7
C-19	138,1	153,0	152,2
C-20, 24	127,9	158,1	157,4
C-21, 23	128,4	27,4	27,2
C-22	126,7	34,4	34,2
C-25	55,3	52,4	51,8
C-26	55,3	53,7	53,1
		61,8	61,2
		138,8	138,2
		128,7	128,6
		129,2	128,1
		127,5	126,9
		55,7	-
		-	-

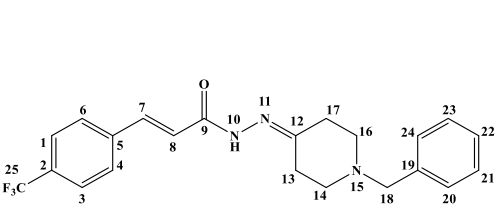
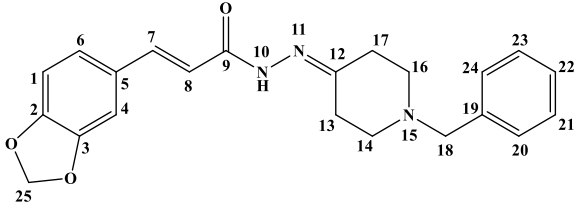
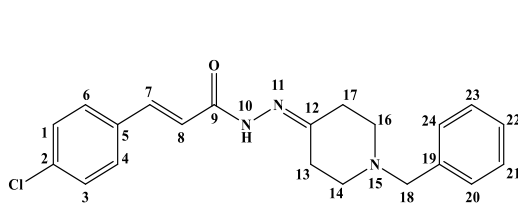
Fonte: do autor.

Tabela 39 - Dados de RMN de ^1H dos compostos PQM 269 (300 MHz, Piridina- d_5), PQM 270 e PQM 271 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Hidrogênio	 PQM 269			 PQM 270			 PQM 271		
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M	δ (ppm)	<i>J</i> (Hertz)	M
H-1	7,71	8,12	d	6,94	8,10	d	7,68 - 7,59	-	m
H-3	7,71	8,12	d	-	-	-	7,68 - 7,59	-	m
H-4	7,60	8,12	d	7,12	-	s	7,49 - 7,44	-	m
	-	-	-	7,25	-	s	-	-	-
H-6	7,60	8,12	d	7,09	8,10	d	7,49 - 7,44	-	m
	-	-	-	7,13	8,10	d	-	-	-
H-7	8,06	15,67	d	7,43	15,68	d	7,49	15,74	d
	8,14	16,04	d	7,51	15,93	d	7,54	16,67	d
H-8	7,05	15,67	d	6,67	15,68	d	6,81	15,74	d
	7,38	16,04	d	7,32	15,93	d	7,27	16,67	d
H-10	10,56	-	s	10,39	-	s	10,45	-	s
	10,61	-	s	-	-	-	10,51	-	s
H-13 ou 17	2,43	5,44	t	2,34	5,11	t	2,49 - 2,47	-	m
H-13 ou 17	2,67	5,53	t	-	-	-	-	-	-
H-14 e 16	2,81	5,65	t	-	-	-	-	-	-
H-18	3,48	-	s	3,52	-	s	-	-	-
H-20	7,45-7,27	-	m	7,32	4,36	d	7,31	4,32	d
H-21	7,45-7,27	-	m	7,32	4,36	d	7,31	4,32	d
H-22	7,45-7,27	-	m	7,28 - 7,21	-	m	7,28 - 7,20	-	m
-H-23	7,45-7,27	-	m	7,32	4,36	d	7,31	4,32	d
H-24	7,45-7,27	-	m	7,32	4,36	d	7,31	4,32	d
H-25	-	-	-	6,05	-	s	-	-	-

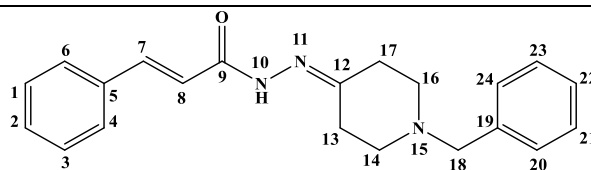
Fonte: do autor.

Tabela 40 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos PQM 269 (75 MHz, Piridina- d_5), PQM 270 e PQM 271 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

	 PQM 269		 PQM 270		 PQM 271	
Carbono	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
C-1	124,2		109,1	-	129,8	
C-2	130,0		149,1	148,3	134,6	-
C-3	124,2		148,4		129,8	
C-4	126,4		106,6	107,2	129,5	
C-5	129,1		129,8	-	134,3	
C-6	126,4		123,9	124,4	129,5	
C-7	139,4	140,1	141,8	140,1	139,0	
C-8	-	121,2	116,3	119,2	121,9	
C-9	161,5	166,4	162,3	167,1	161,9	-
C-12	153,8	159,1	153,0	158,2	159,2	-
C13 e 17	27,9	34,8	27,8	34,7	27,8	34,6
C14 e 16	52,4	53,7	52,4	53,7	52,3	53,6
C-18	61,7		61,8		61,7	
C-19	138,5		138,8		138,6	
C-20, 24	129,2		129,2		128,7	
C-21, 23	128,7		128,7		129,3	
C-22	127,5		127,5		127,5	
C-25	122,8		102,0		-	

Fonte: do autor.

Tabela 41 - Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) e dados de RMN de ^{13}C do composto **PQM 272** (DMSO- d_6 , 75 MHz)



PQM 272

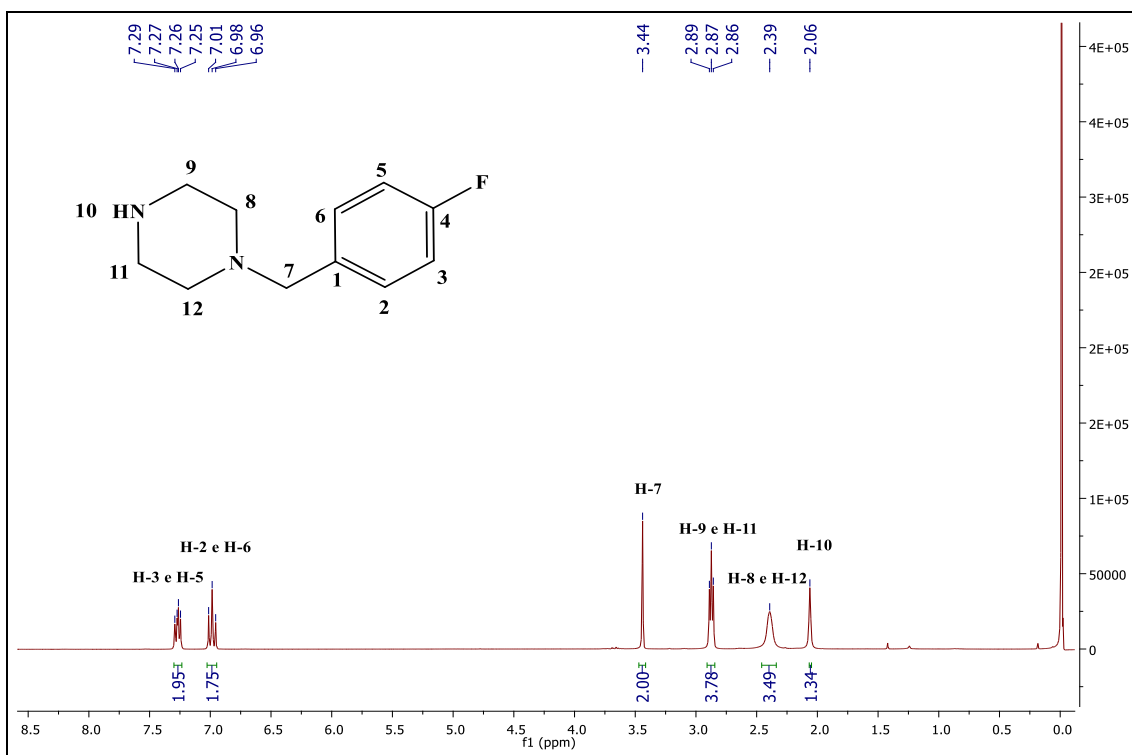
Hidrogênio	δ (ppm)	J (Hertz)	M	Carbono	δ (ppm)	
H-1	7,42	6,68	d	C-1	130,8	
H-2	7,45-7,40	-	m	C-2	130,1	130,3
H-3	7,42	6,68	d	C-3	130,8	
H-4	7,59	6,68	d	C-4	129,4	
H-5	-	-	-	C-5	127,4	
H-6	7,59	6,68	d	C-6	129,4	
H-7	7,55	15,69	d	C-7	140,2	141,9
	7,62	15,59	d	-	-	-
H-8	6,87	15,69	d	C-8	118,3	121,3
	7,43	15,59	d	-	-	-
H-9	-	-	-	C-9	162,0	166,8
H-10	10,48	-	s	-	-	-
H-12	-	-	-	C-12	153,7	158,7
H-13 e 17	2,40 – 2,36	-	m	C13 e 17	27,9	34,8
H-14 e 16	-	-	-	C14 e 16	52,4	53,7
H-18	3,54	-	s	C-18	61,7	
H-19	-	-	-	C-19	138,8	
H-20	7,33	3,54	d	C-20	128,5	
H-21	7,33	3,54	d	C-21	129,2	
H-22	7,30-7,23	-	m	C-22	128,1	
H-23	7,33	3,54	d	C-23	129,2	
H-24	7,33	3,54	d	C-24	128,5	

Fonte: do autor.

ANEXO B

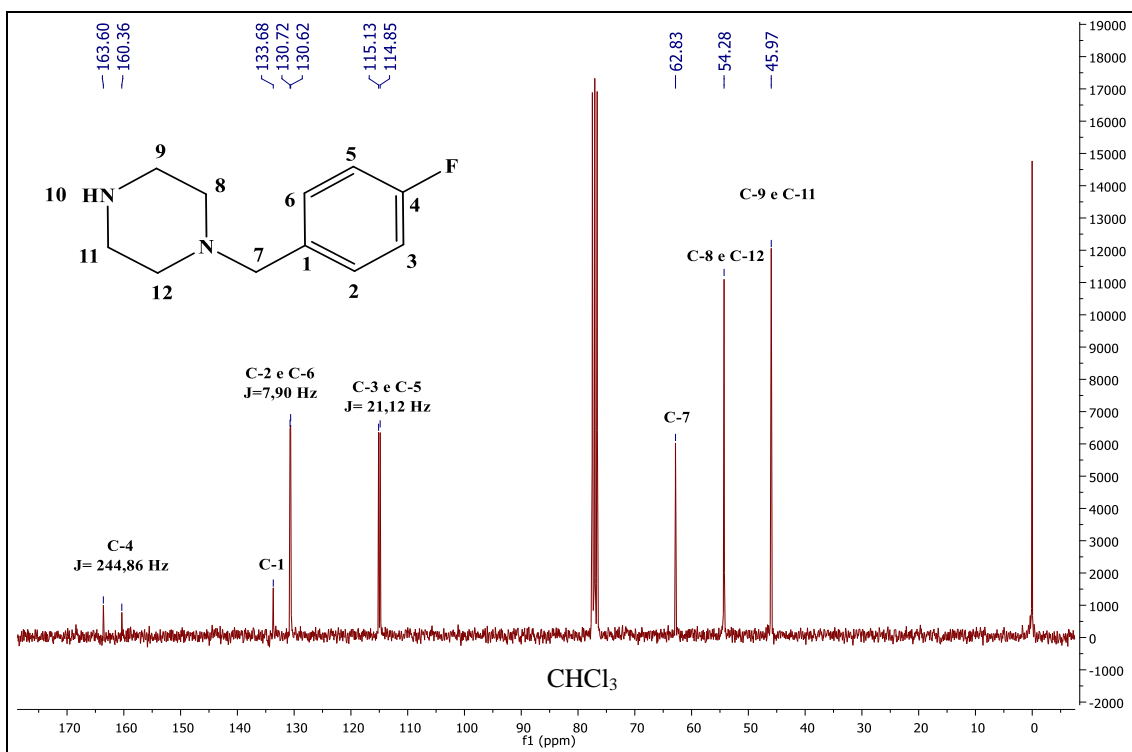
ESPECTROS DE CARACTERIZAÇÃO

Figura 1 - Espectro de RMN de ^1H do composto intermediário **21i** (300 MHz, CDCl_3)



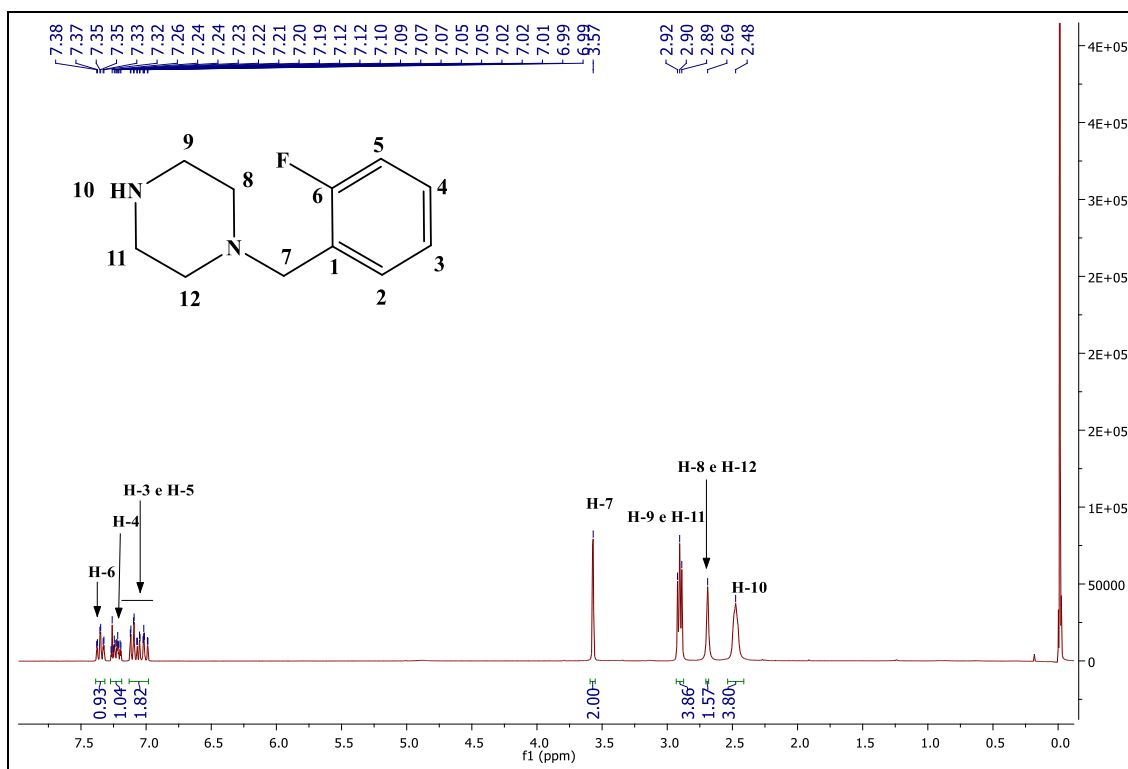
Fonte: do autor

Figura 2 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto intermediário **21i** (75 MHz, CDCl_3).



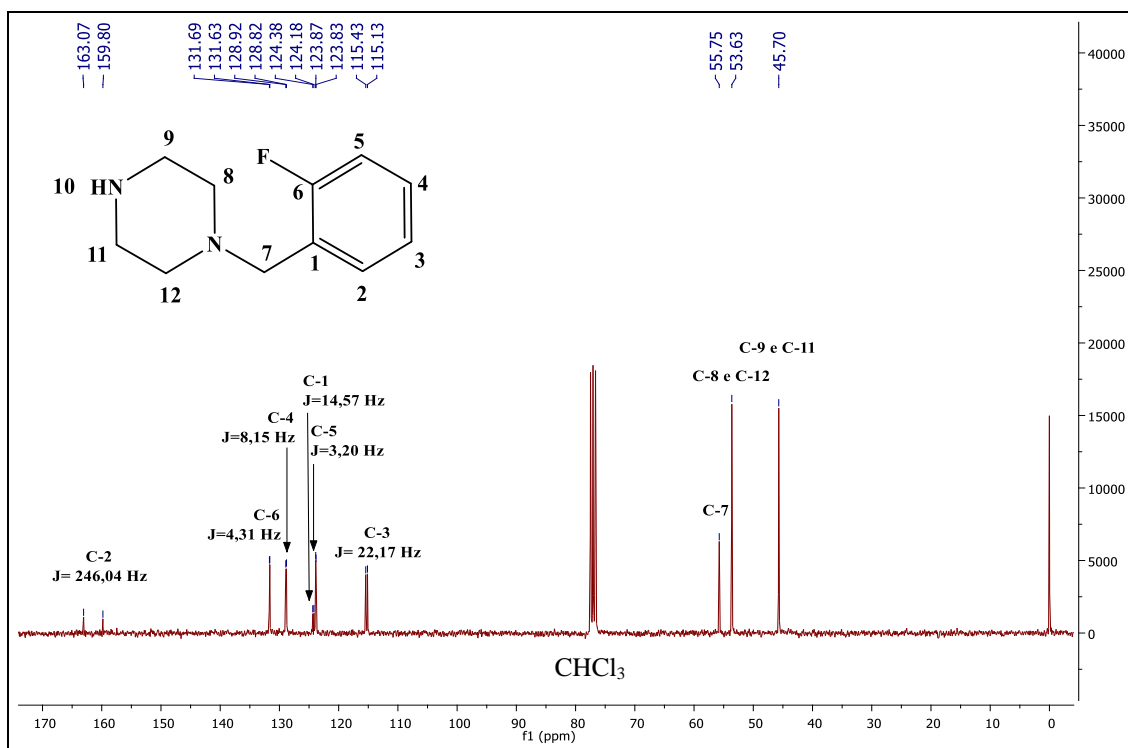
Fonte: do autor

Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H do composto intermediário **21j** (300 MHz, CDCl_3).



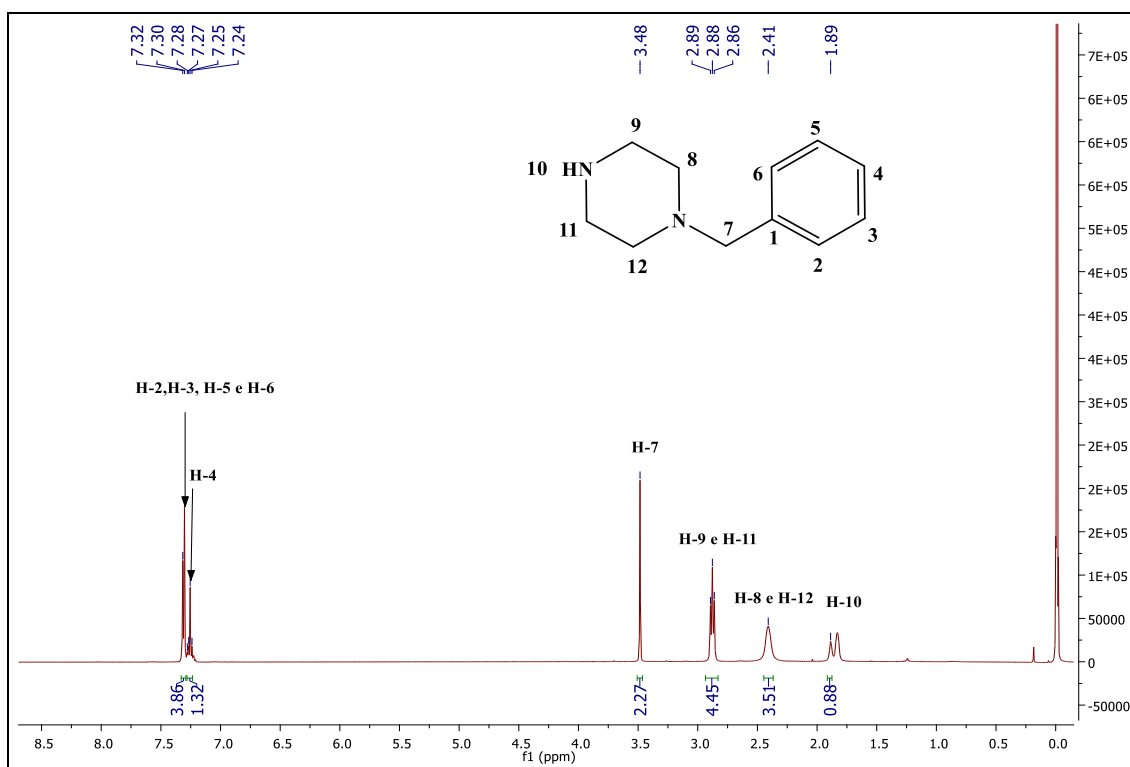
Fonte: do autor.

Figura 4 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto intermediário **21j** (75 MHz, CDCl_3).



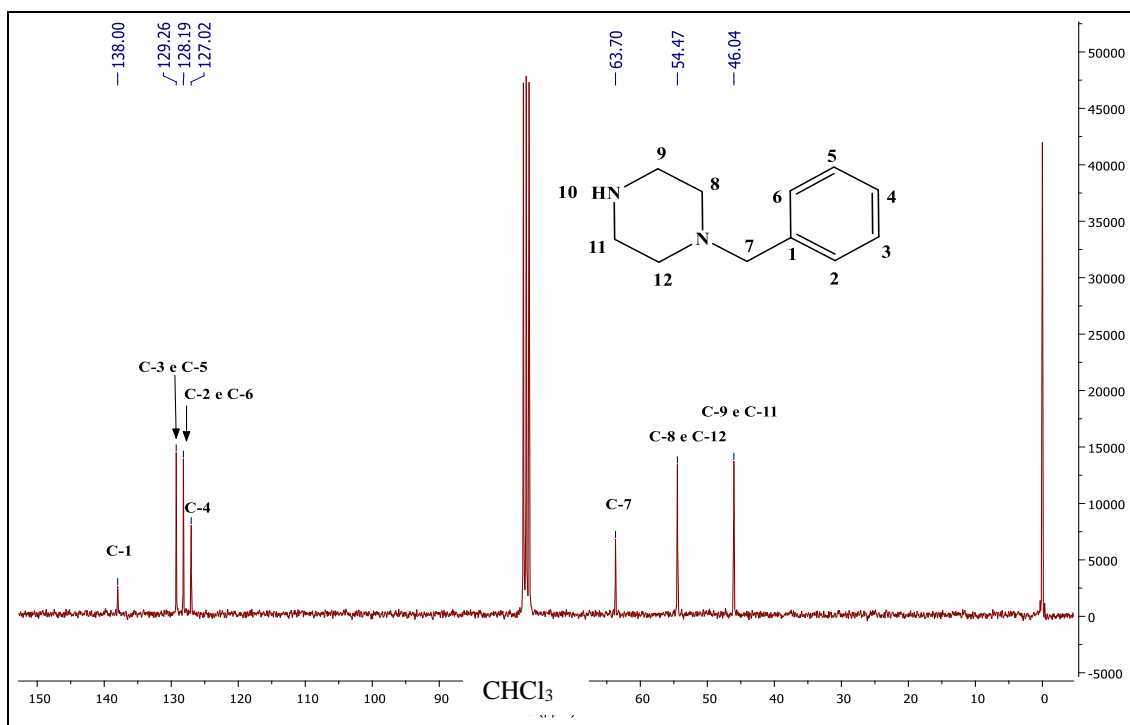
Fonte: do autor.

Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H do composto intermediário **21k** (300 MHz, CDCl_3).



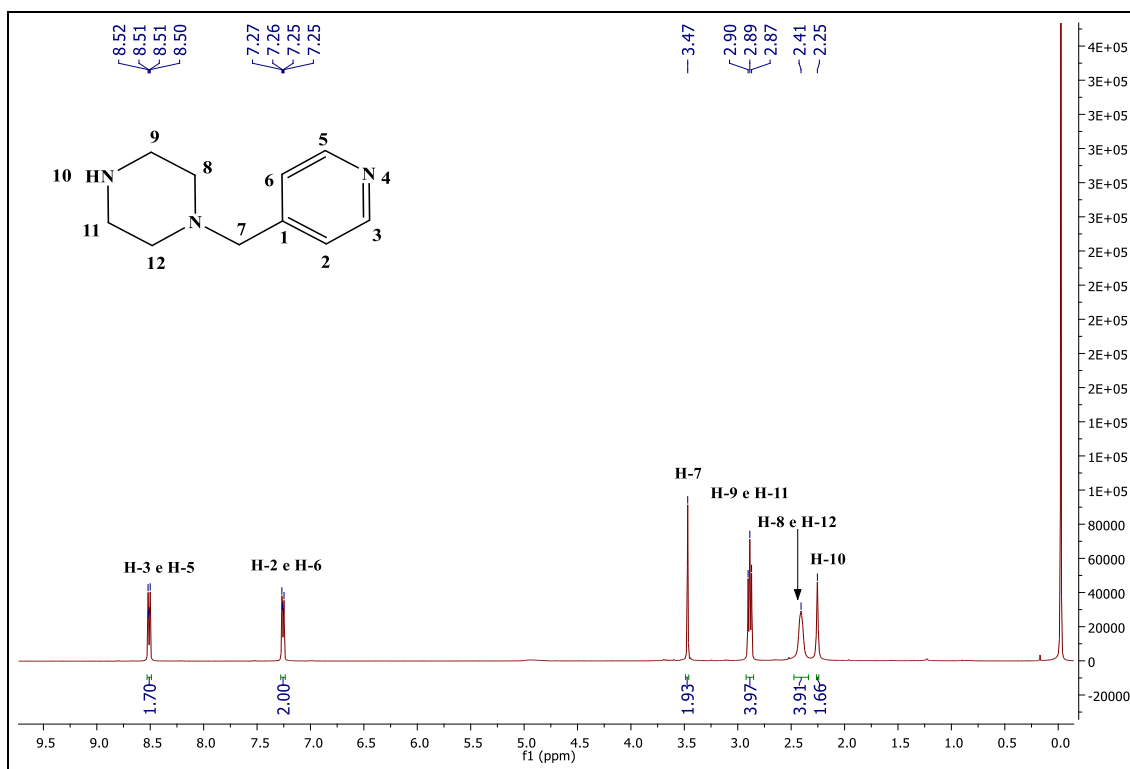
Fonte: do autor

Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto intermediário **21k** (75 MHz, CDCl_3).



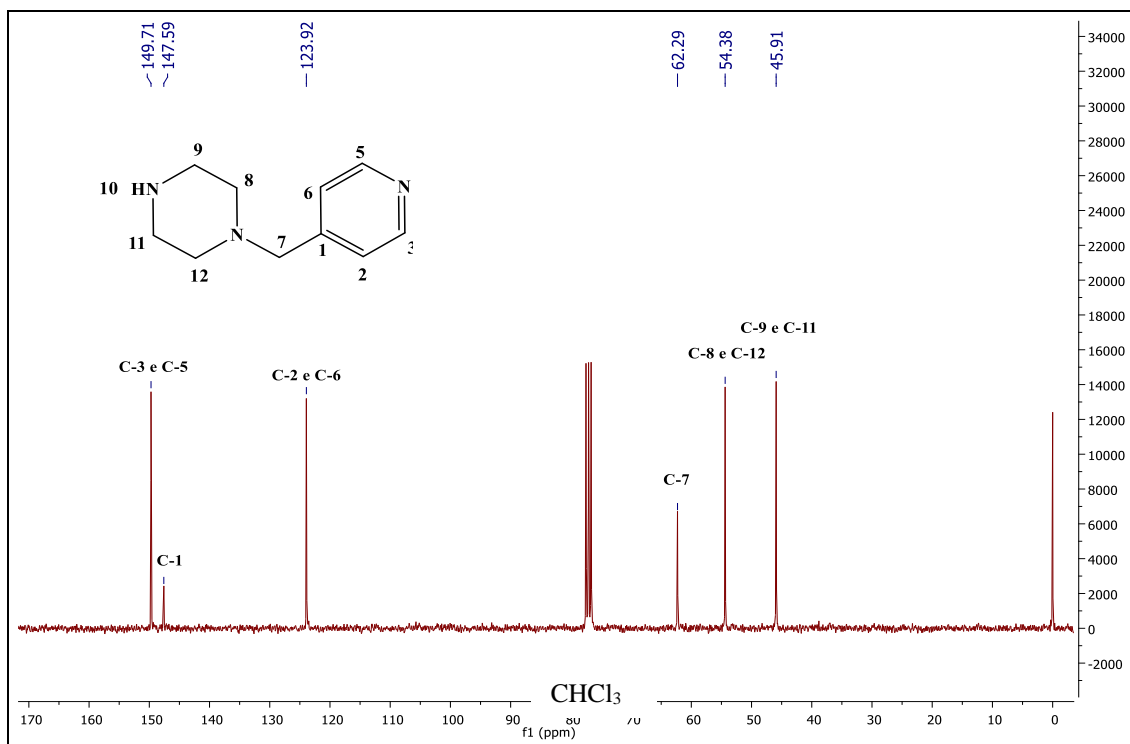
Fonte: do autor

Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H do composto intermediário **21I** (300 MHz, CDCl_3)



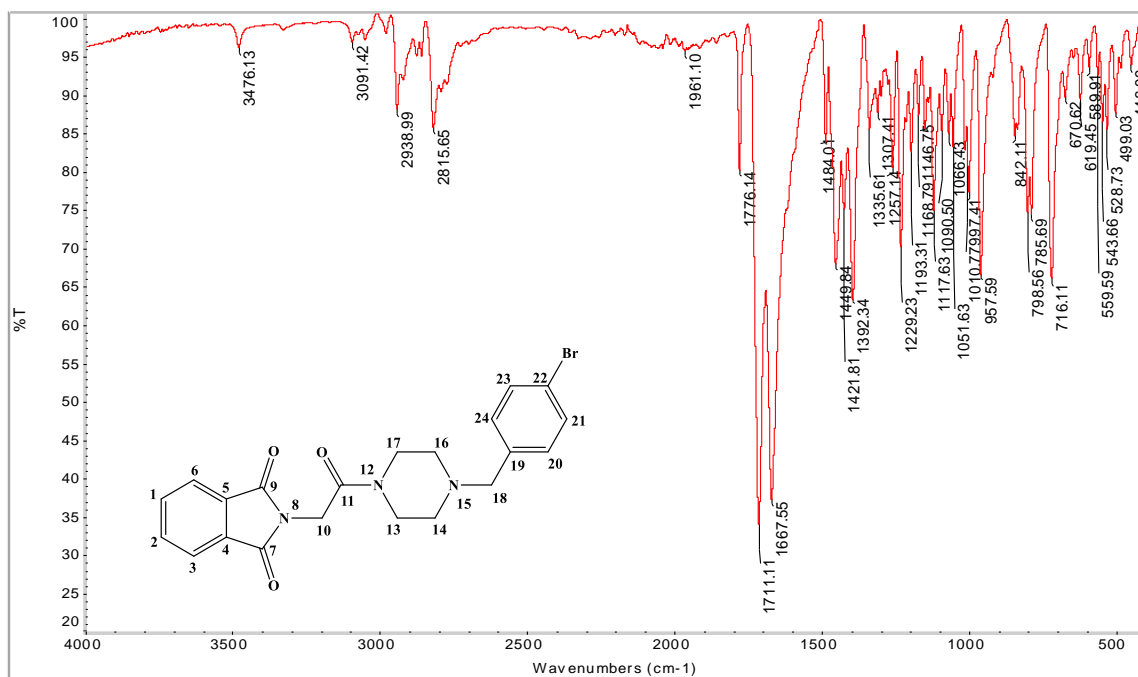
Fonte: do autor

Figura 8 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto intermediário **21I** (75 MHz, CDCl_3)



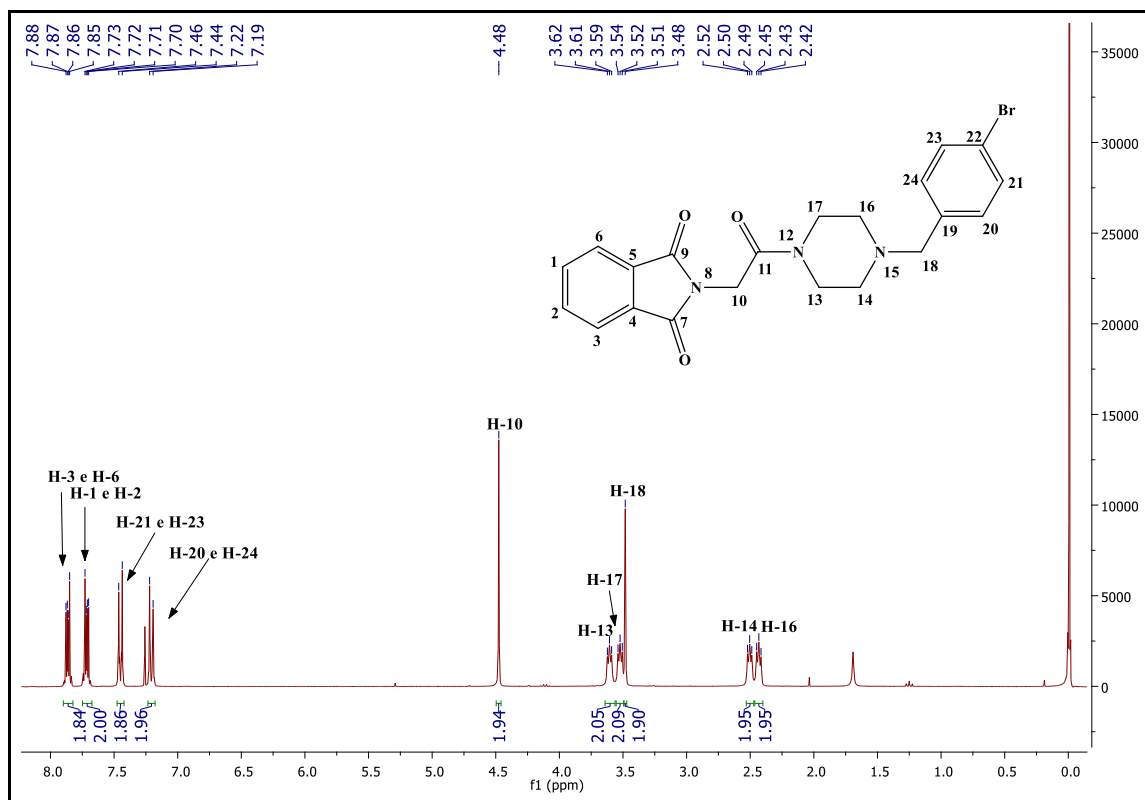
Fonte: do autor

Figura 9 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 183**



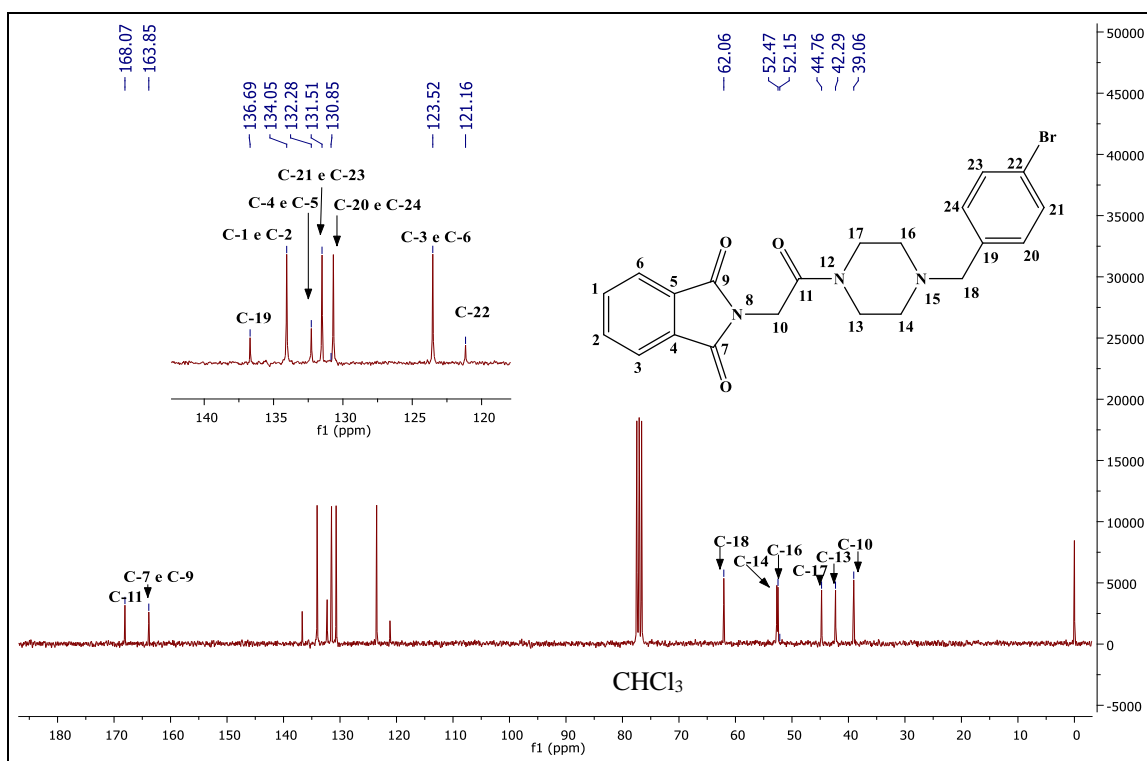
Fonte: do autor

Figura 10 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 183** (300 MHz, CDCl₃)



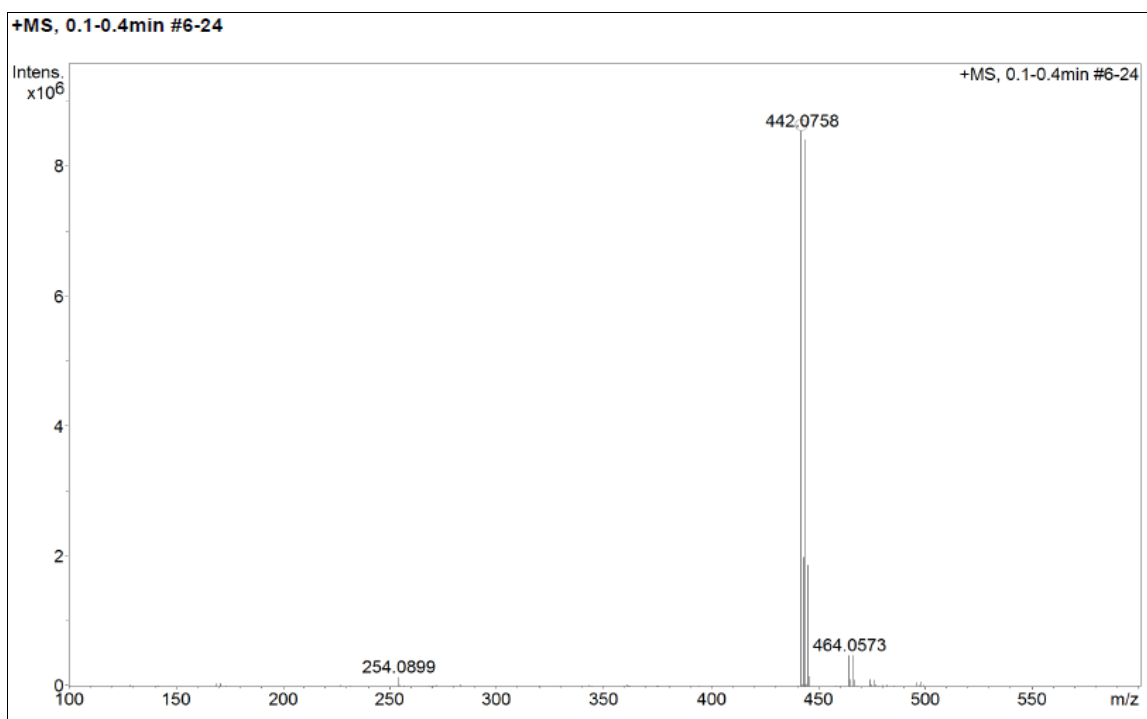
Fonte: do autor

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 183** (75 MHz, CDCl_3)



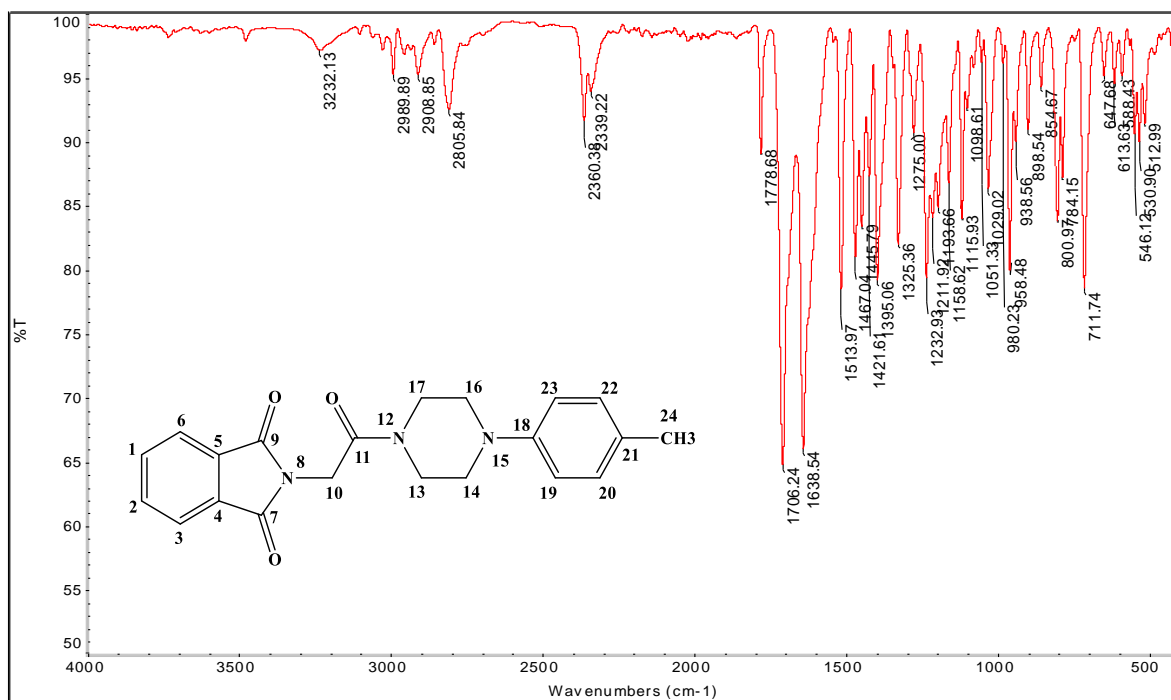
Fonte: do autor

Figura 12 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 183**



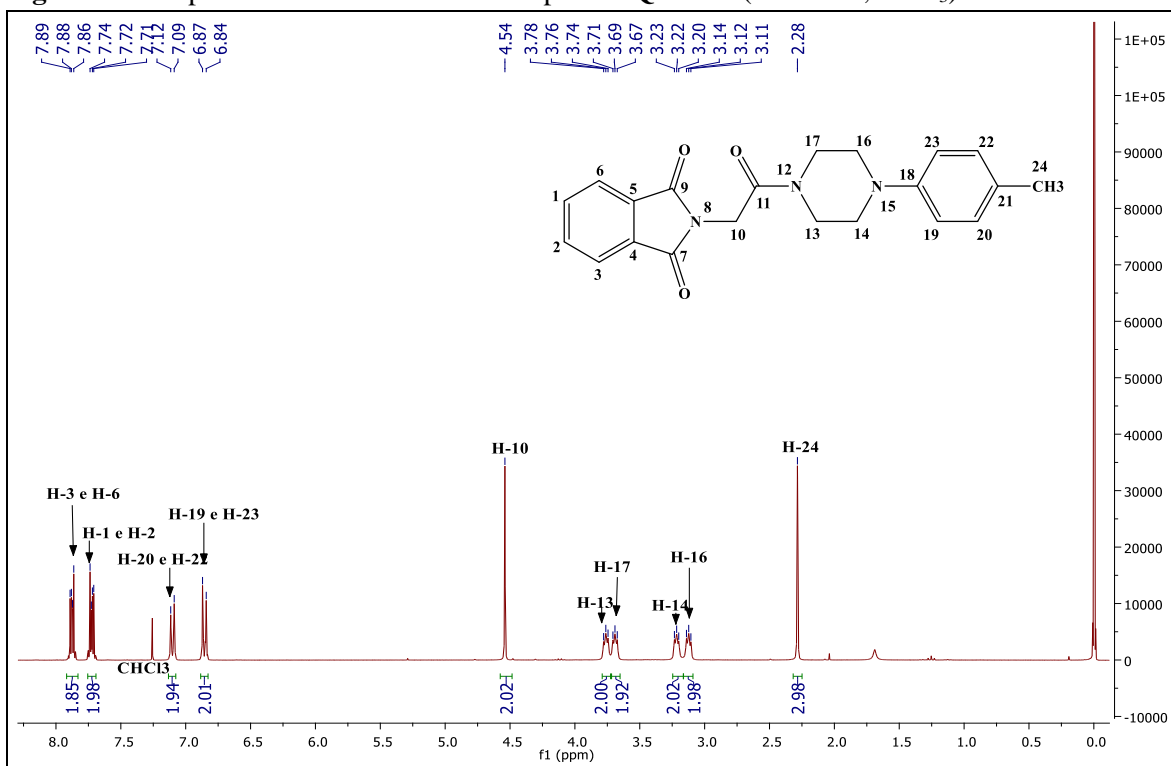
Fonte: do autor

Figura 13 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 184**



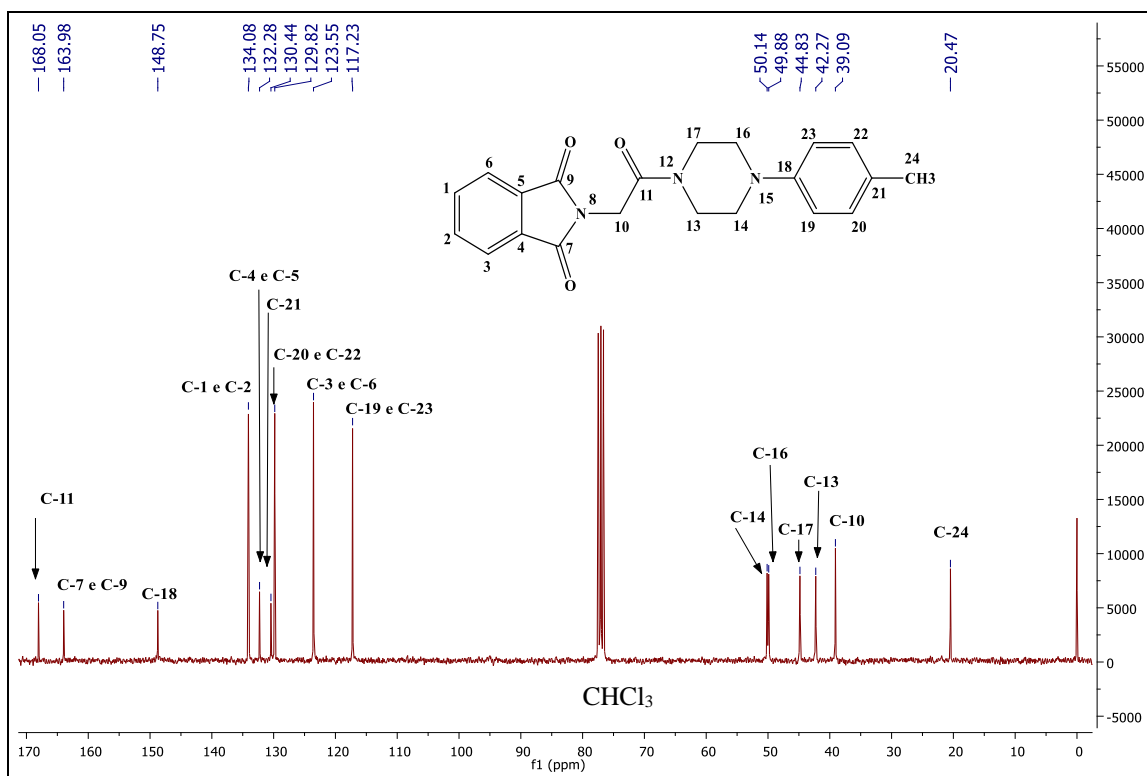
Fonte: do autor

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 184** (300 MHz, CDCl_3)



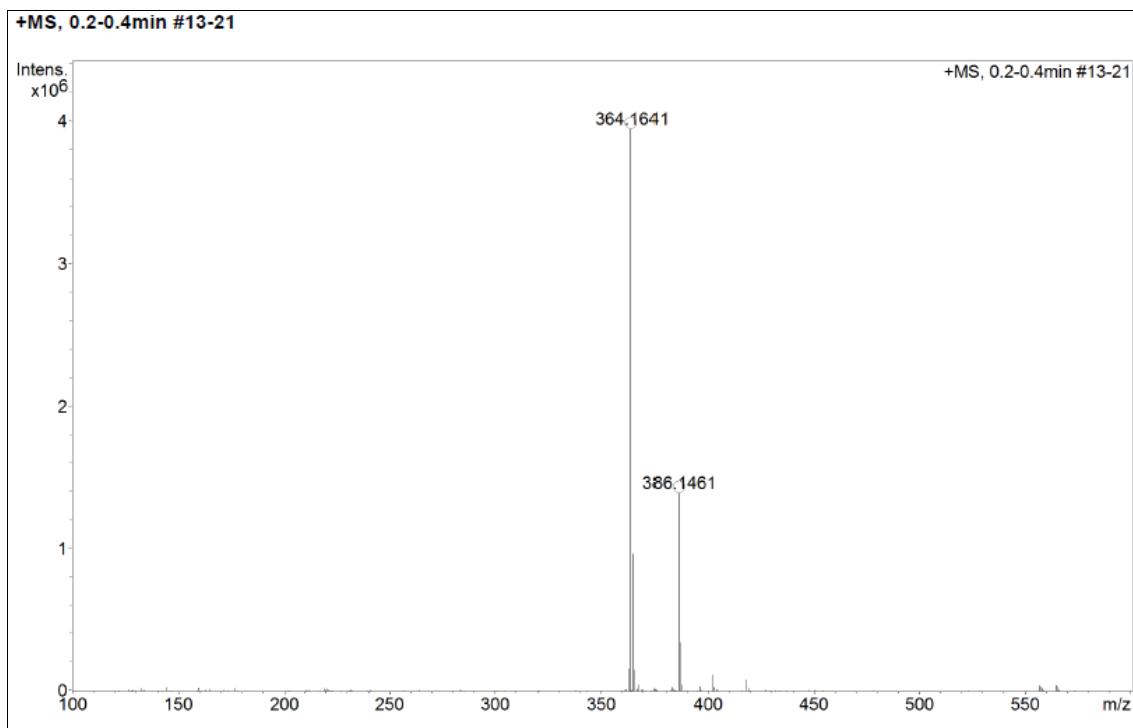
Fonte: do autor

Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 184** (75 MHz, CDCl_3)



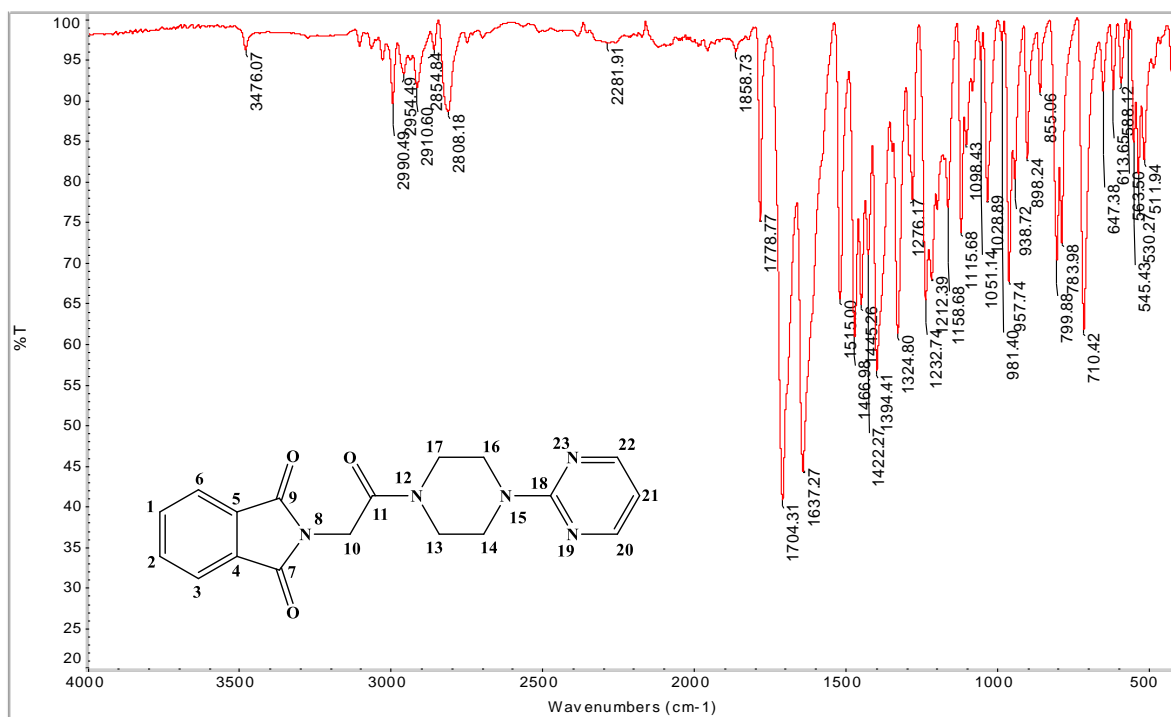
Fonte: do autor

Figura 16 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 184**



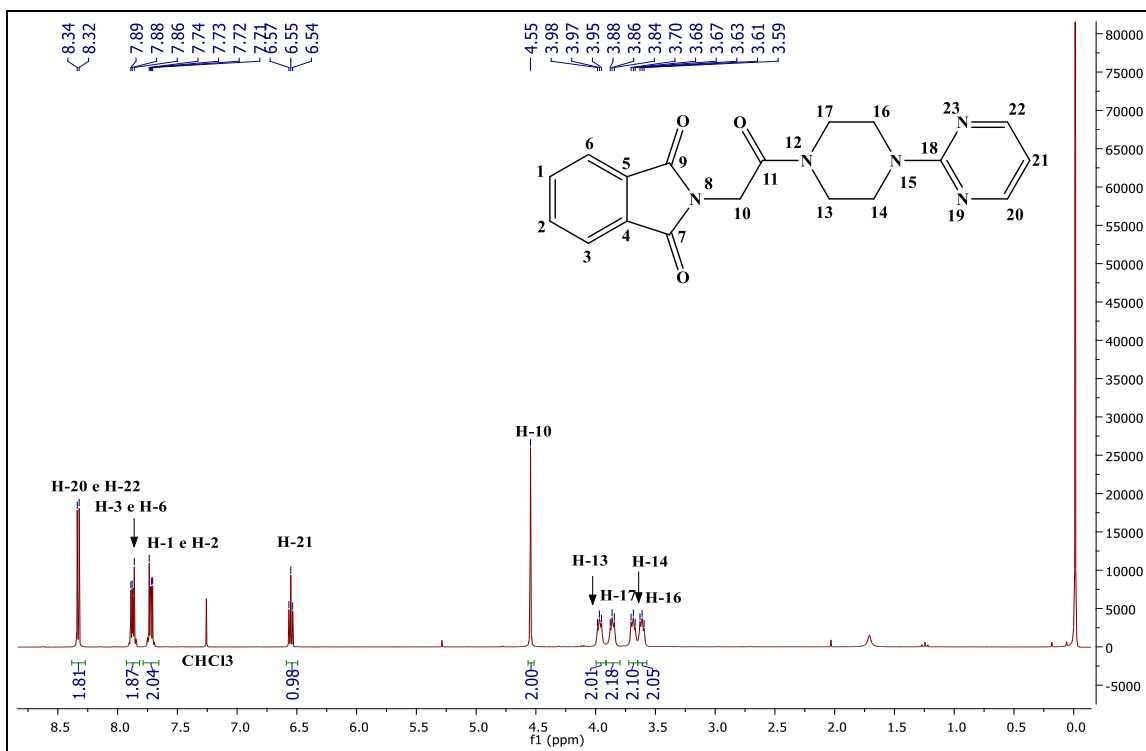
Fonte: do autor

Figura 17 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 185**



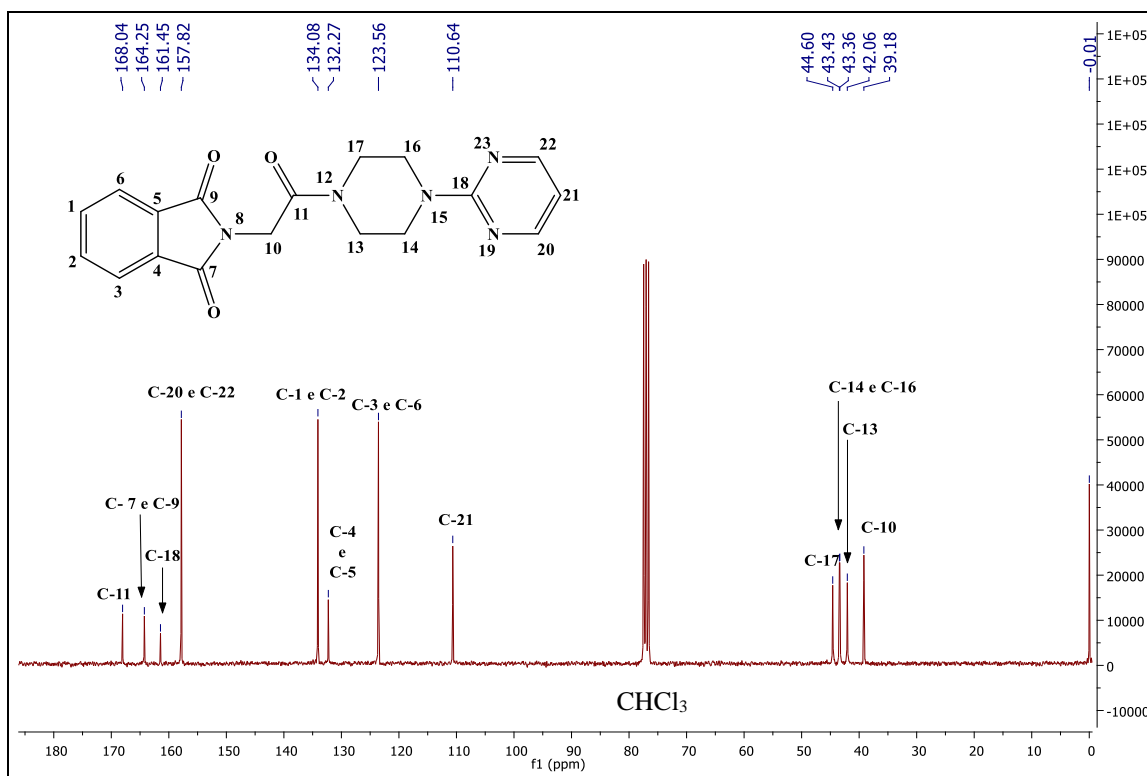
Fonte: do autor

Figura 18 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 185** (300 MHz, CDCl₃)



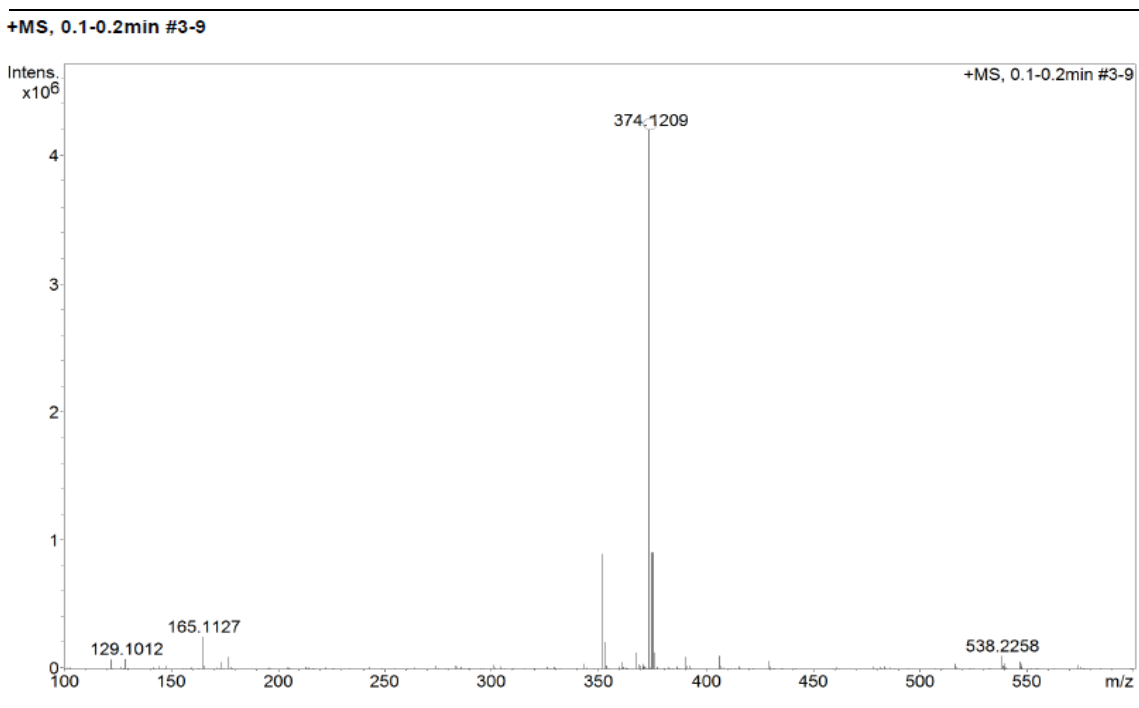
Fonte: do autor

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 185** (75 MHz, CDCl_3)



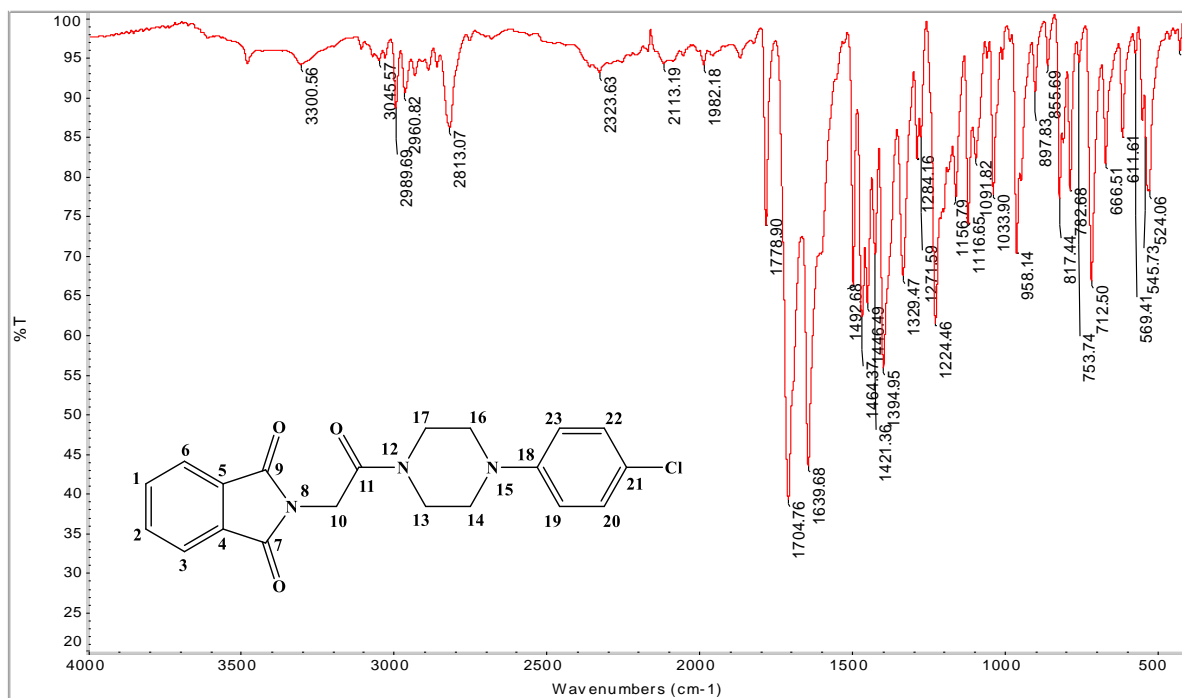
Fonte: do autor

Figura 20 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 185**



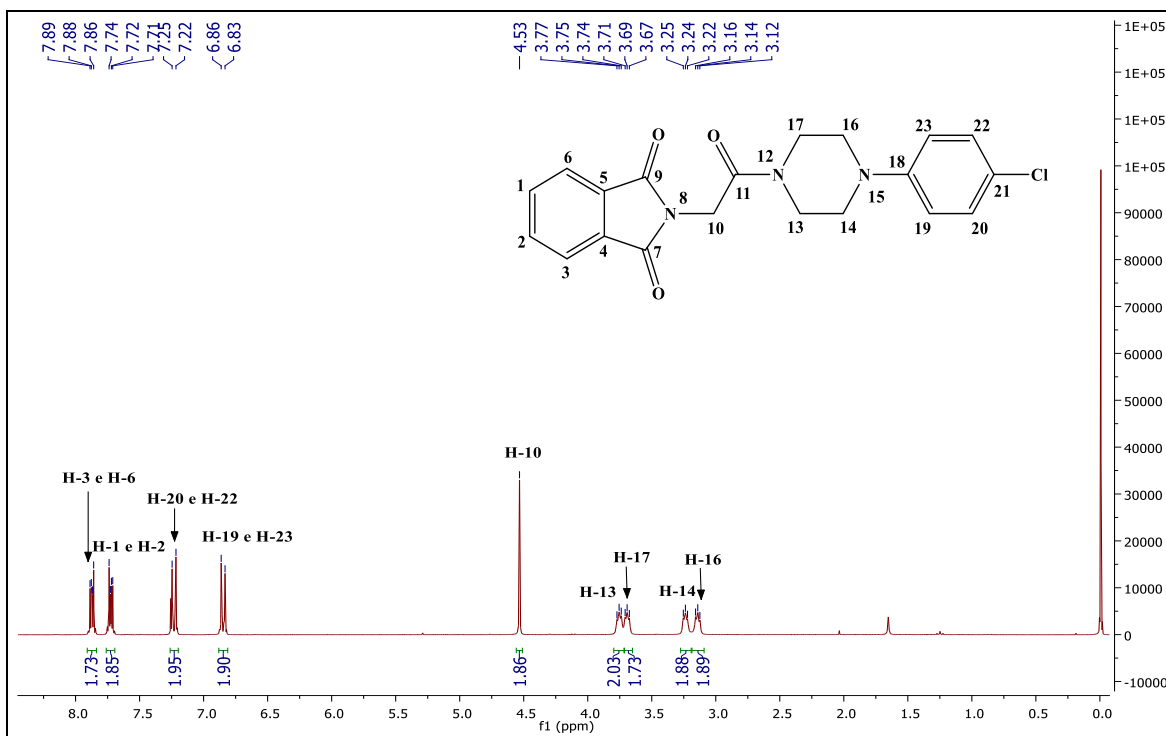
Fonte: do autor

Figura 21 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 186**



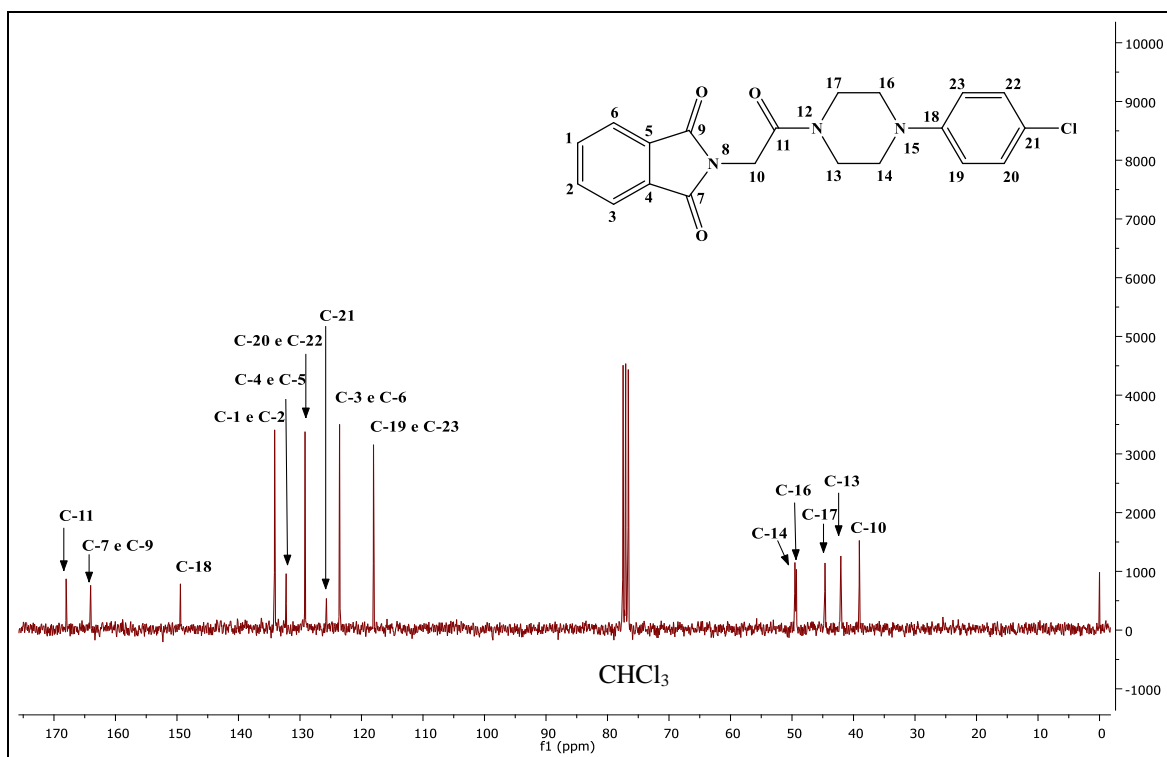
Fonte: do autor

Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 186** (300 MHz, CDCl_3)



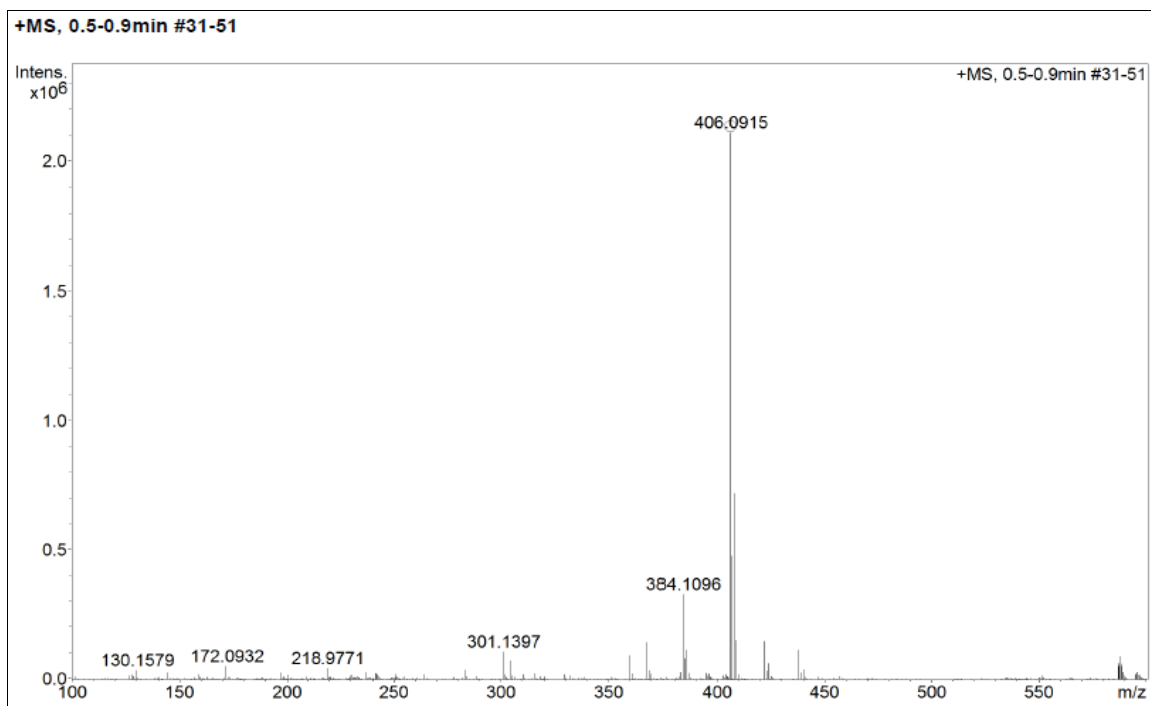
Fonte: do autor

Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 186** (75 MHz, CDCl_3)



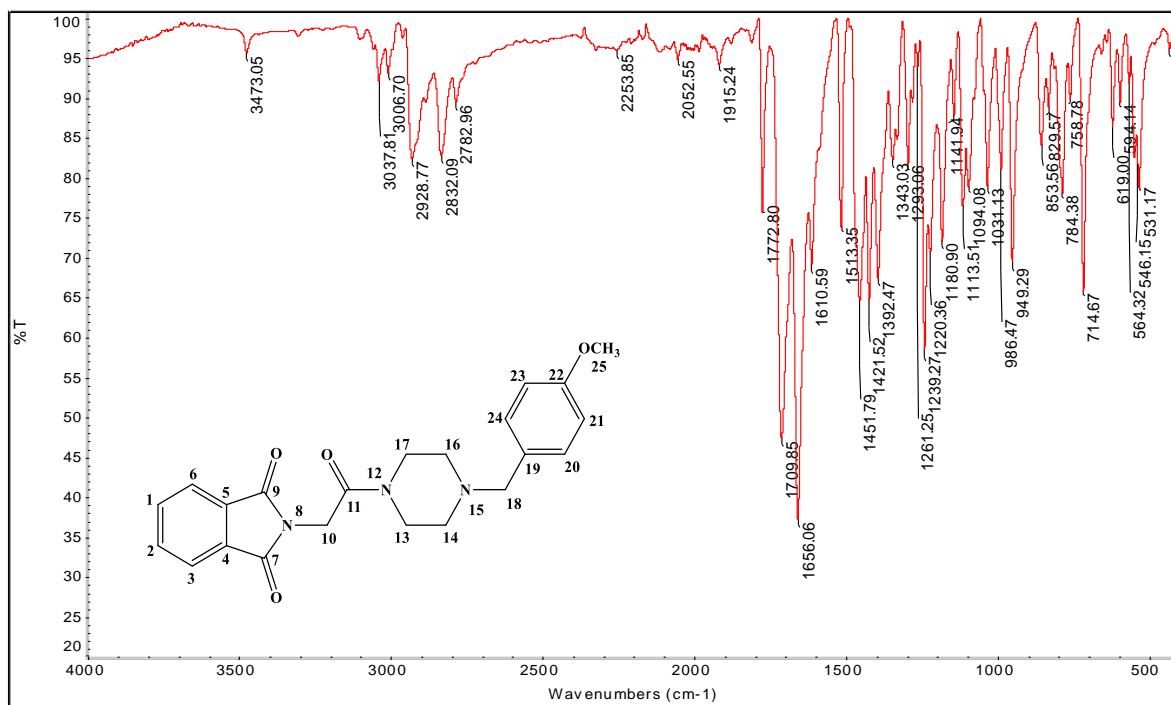
Fonte: do autor

Figura 24 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 186**



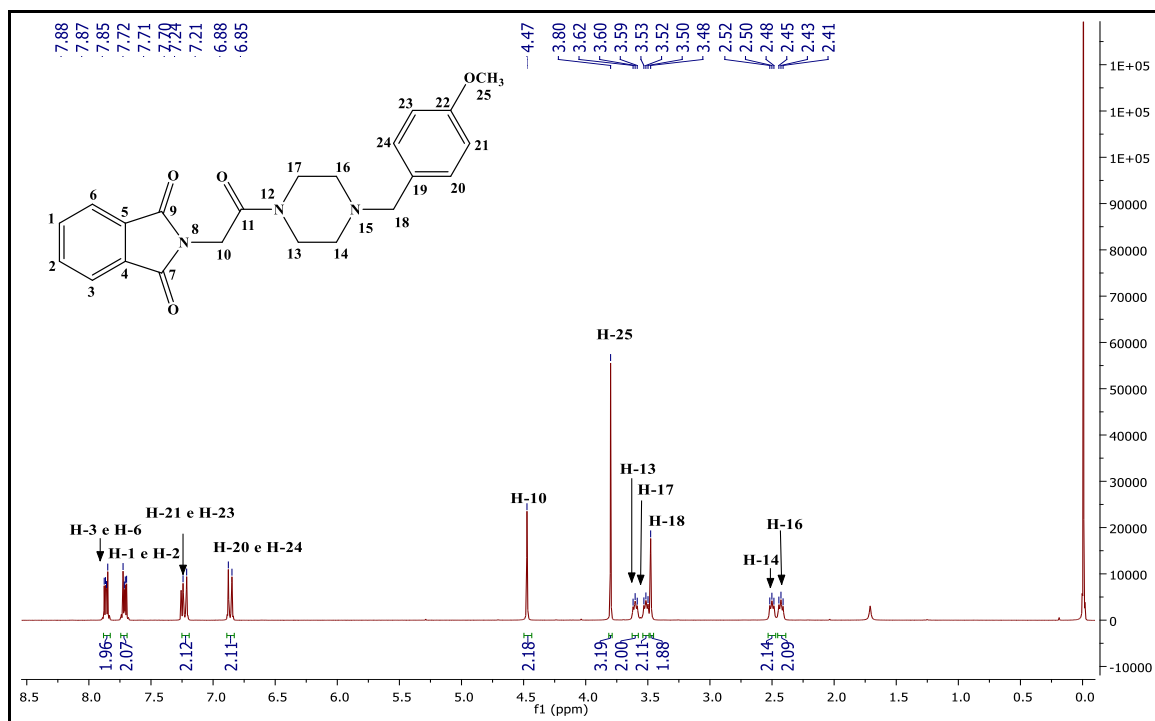
Fonte: do autor

Figura 25 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 187**



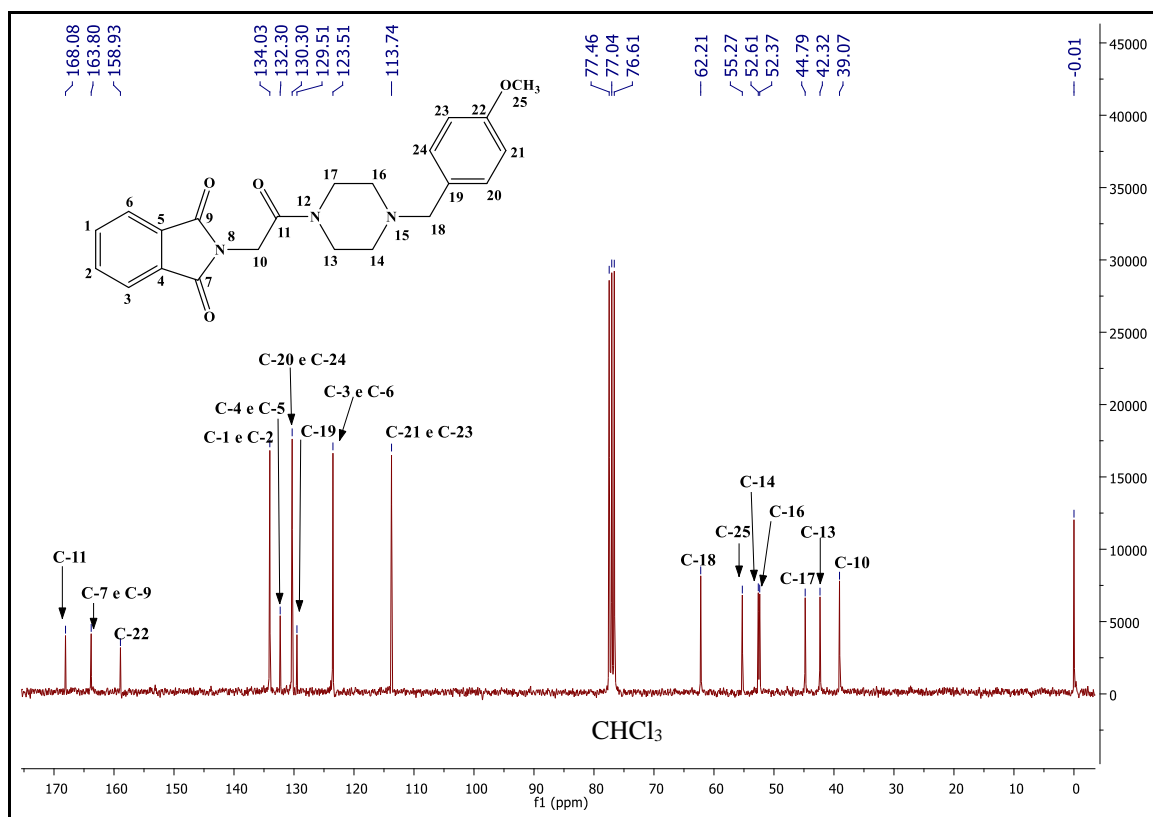
Fonte: do autor

Figura 26 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 187** (300 MHz, CDCl₃)



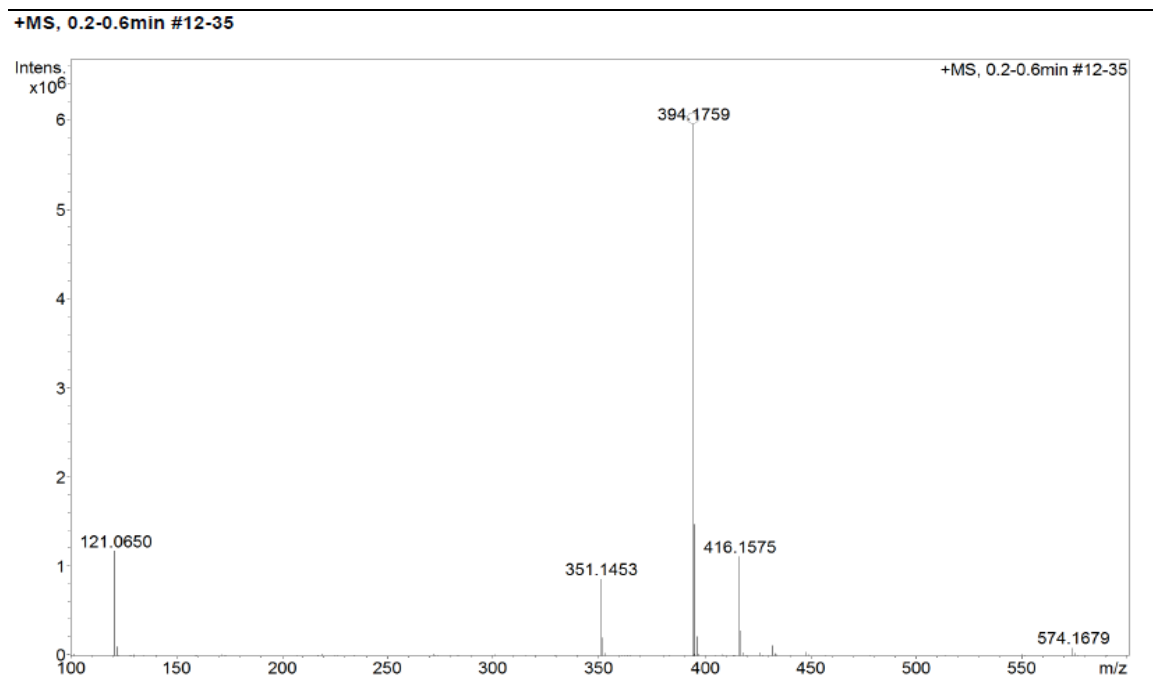
Fonte: do autor

Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 187** (75 MHz, CDCl_3)



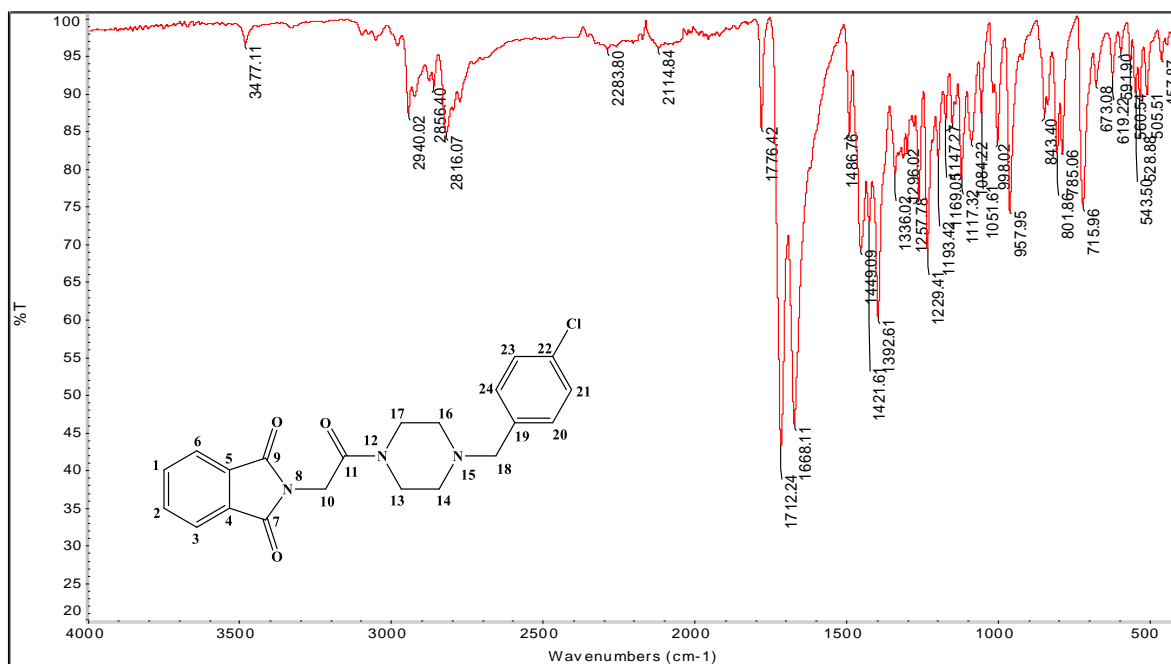
Fonte: do autor

Figura 28 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 187**



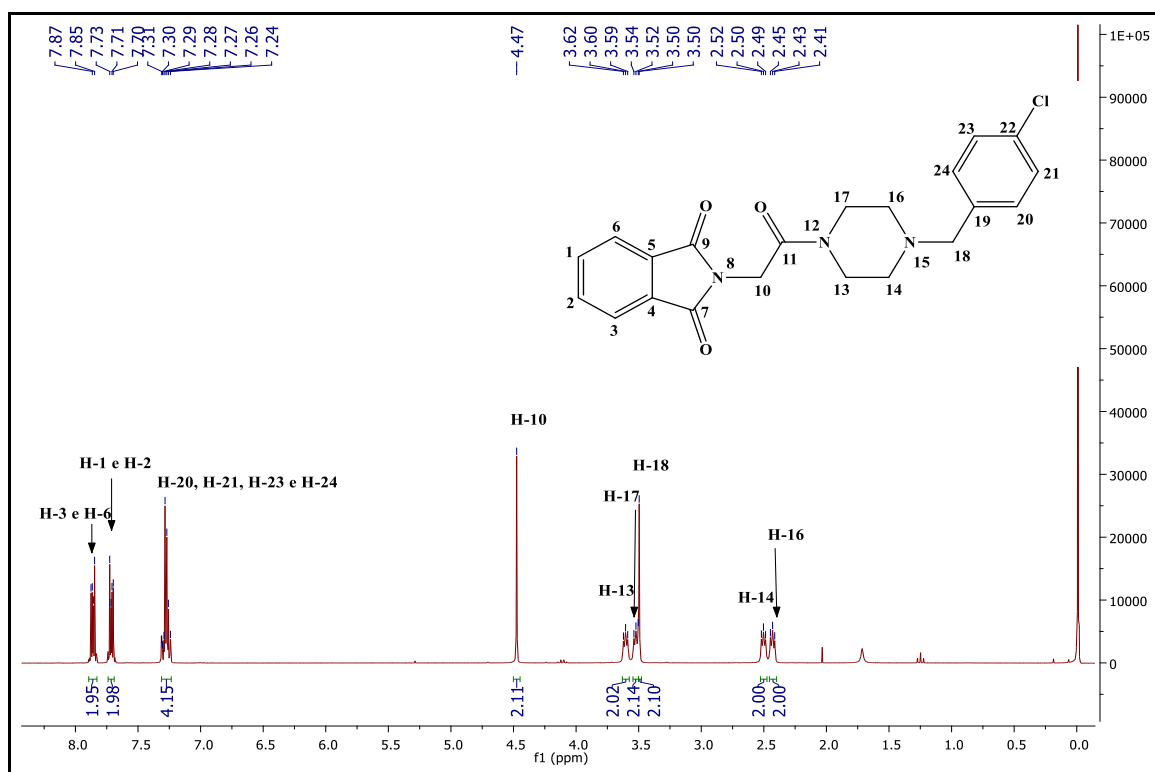
Fonte: do autor

Figura 29 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 188**



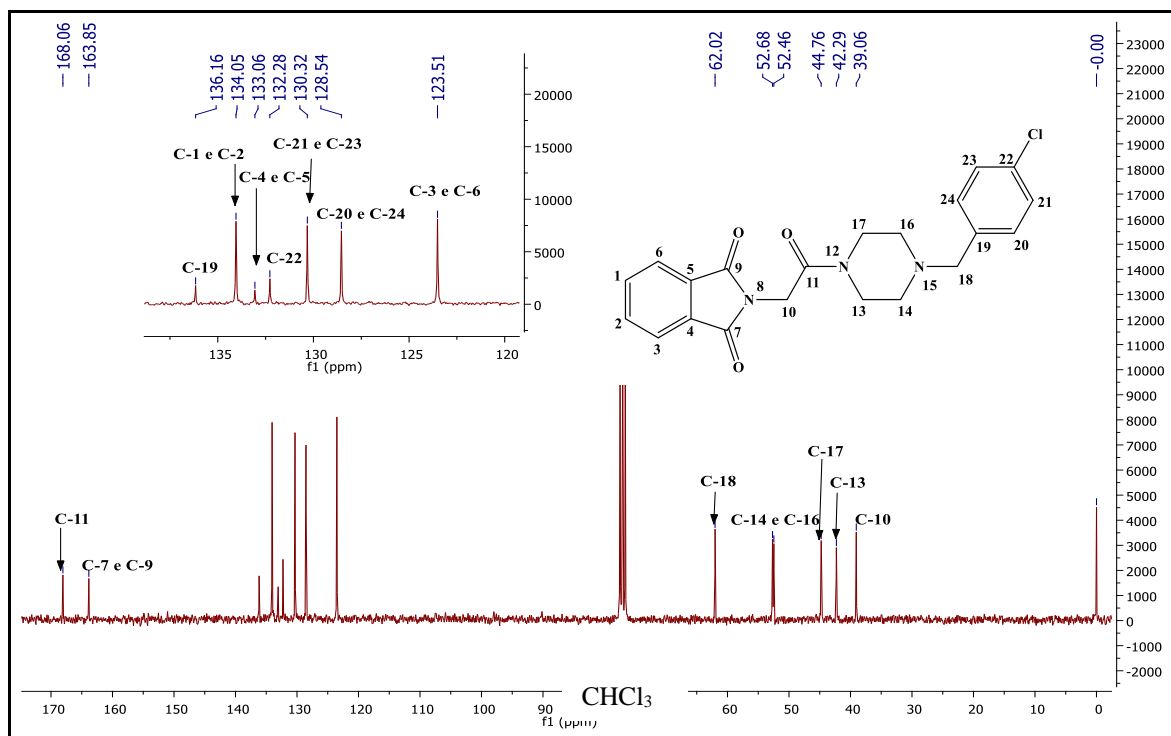
Fonte: do autor

Figura 30 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 188** (300 MHz, CDCl₃)



Fonte: do autor

Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 188** (75 MHz, CDCl_3)



Fonte: do autor

Figura 32 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 188**

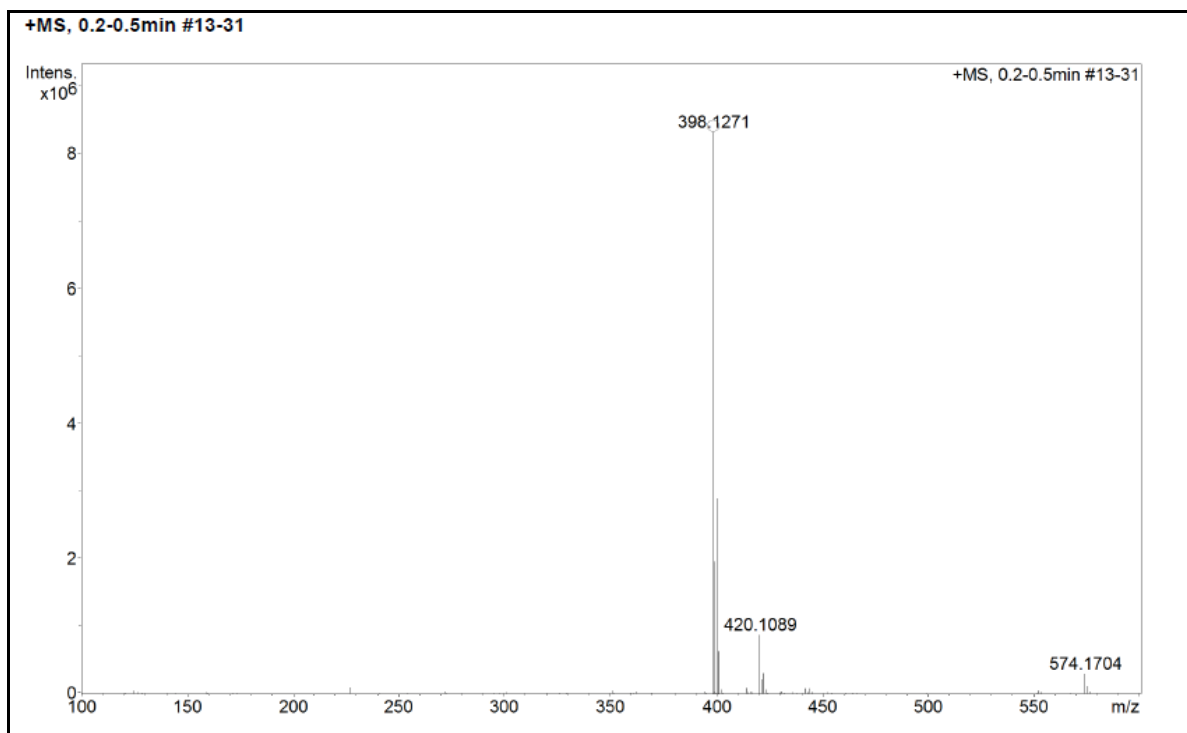
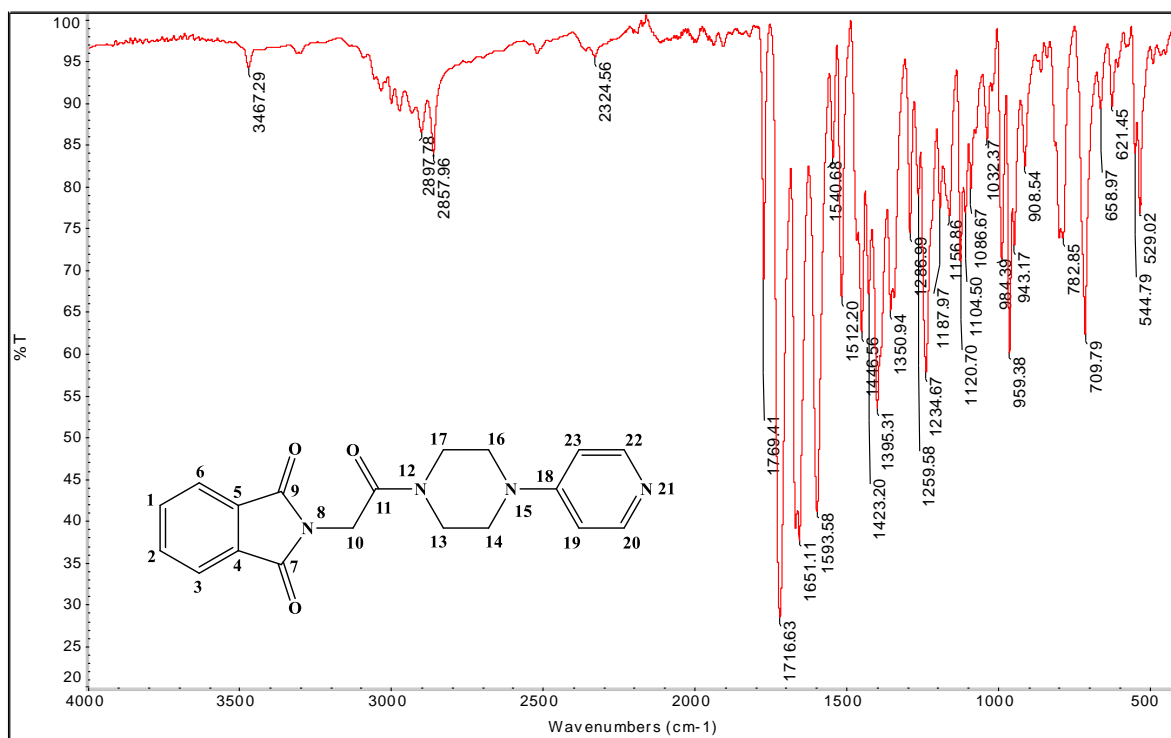
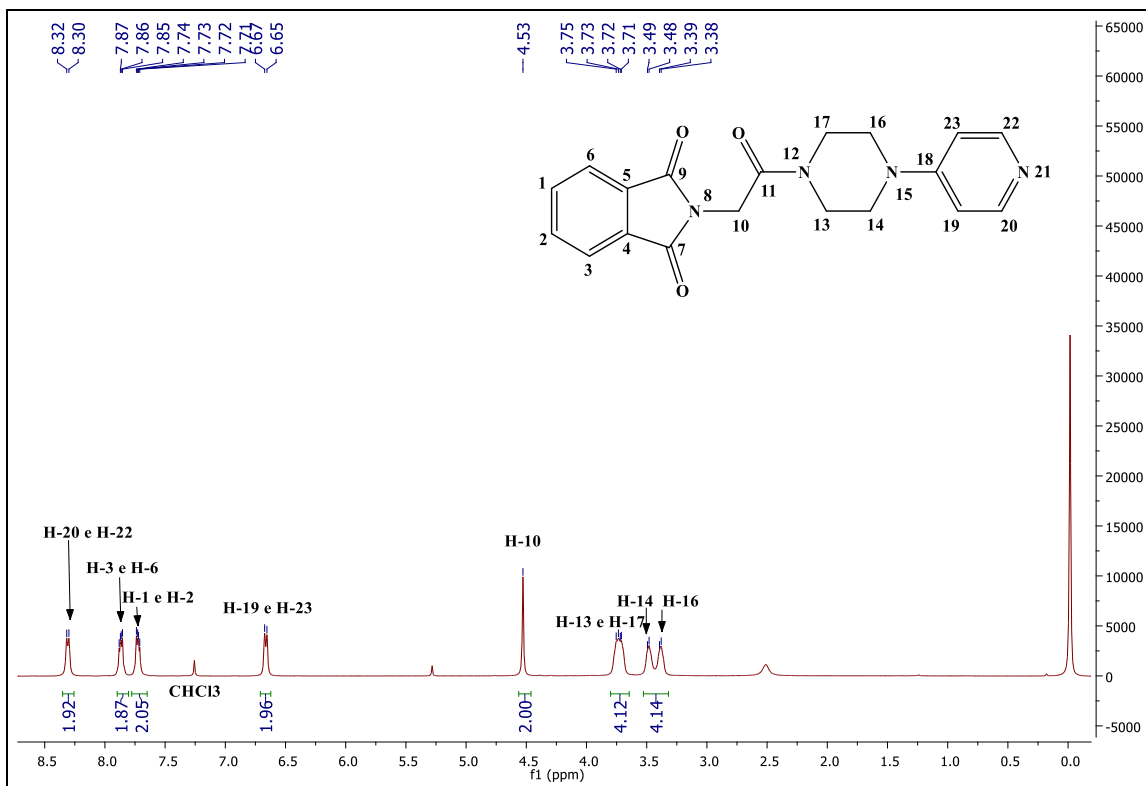


Figura 33 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 189**



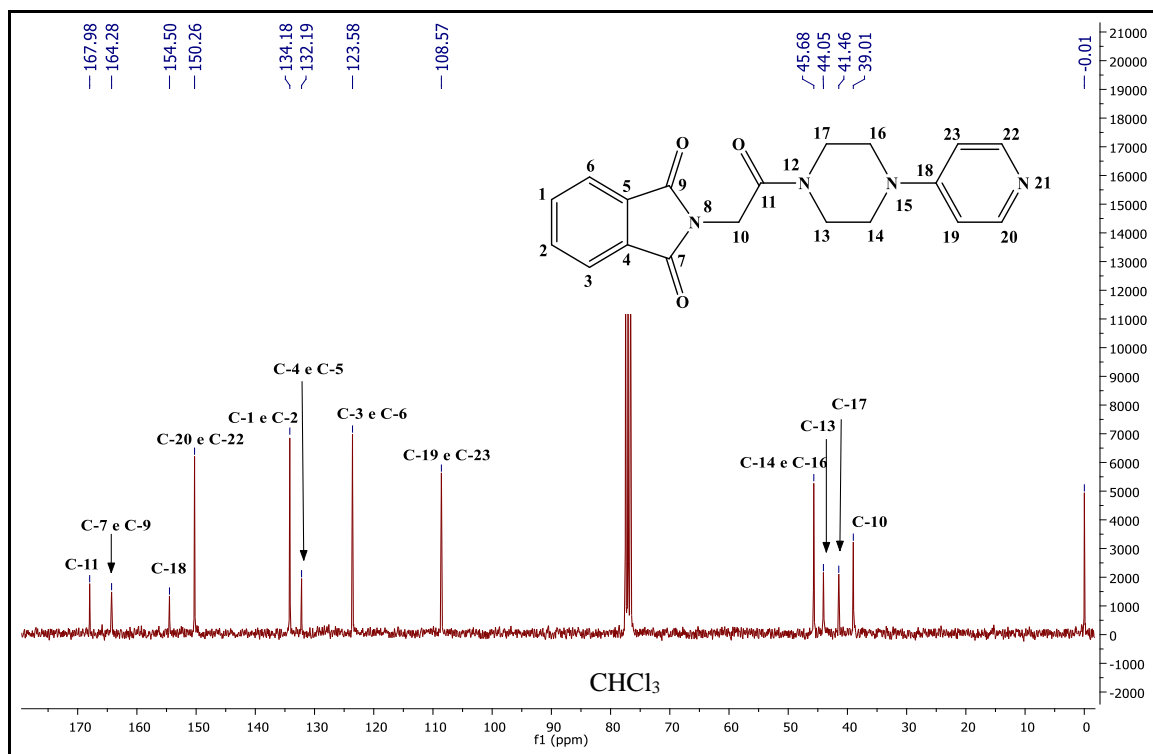
Fonte: do autor

Figura 34 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 189** (300 MHz, CDCl₃)



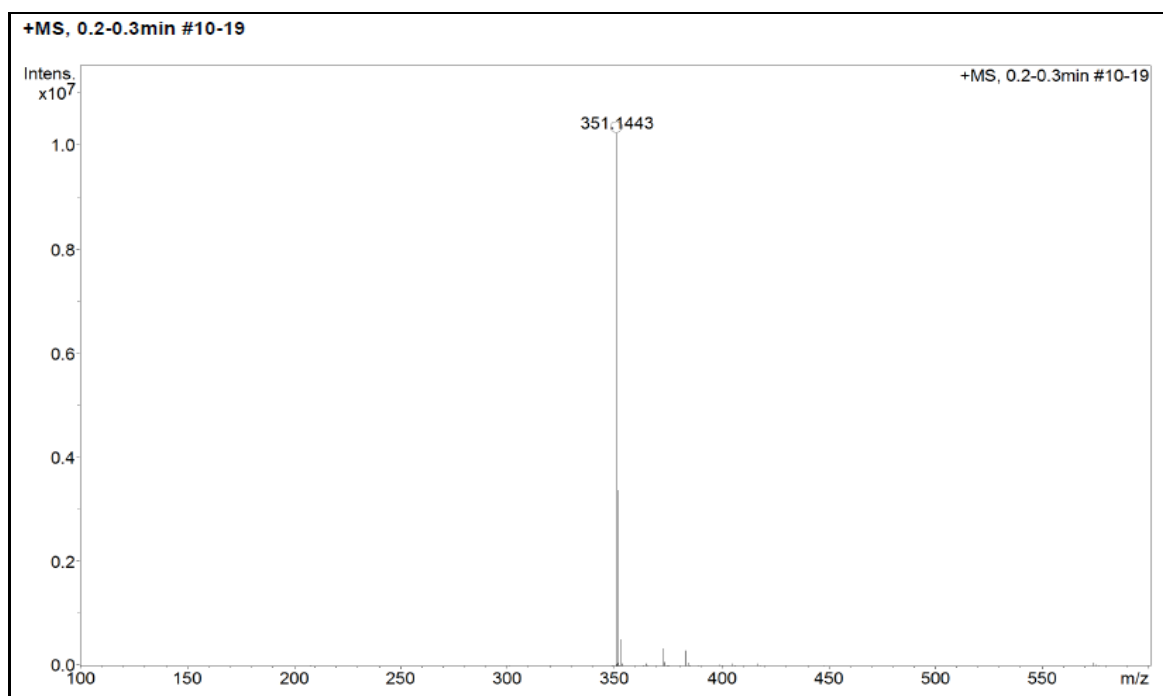
Fonte: do autor

Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 189** (75 MHz, CDCl_3)



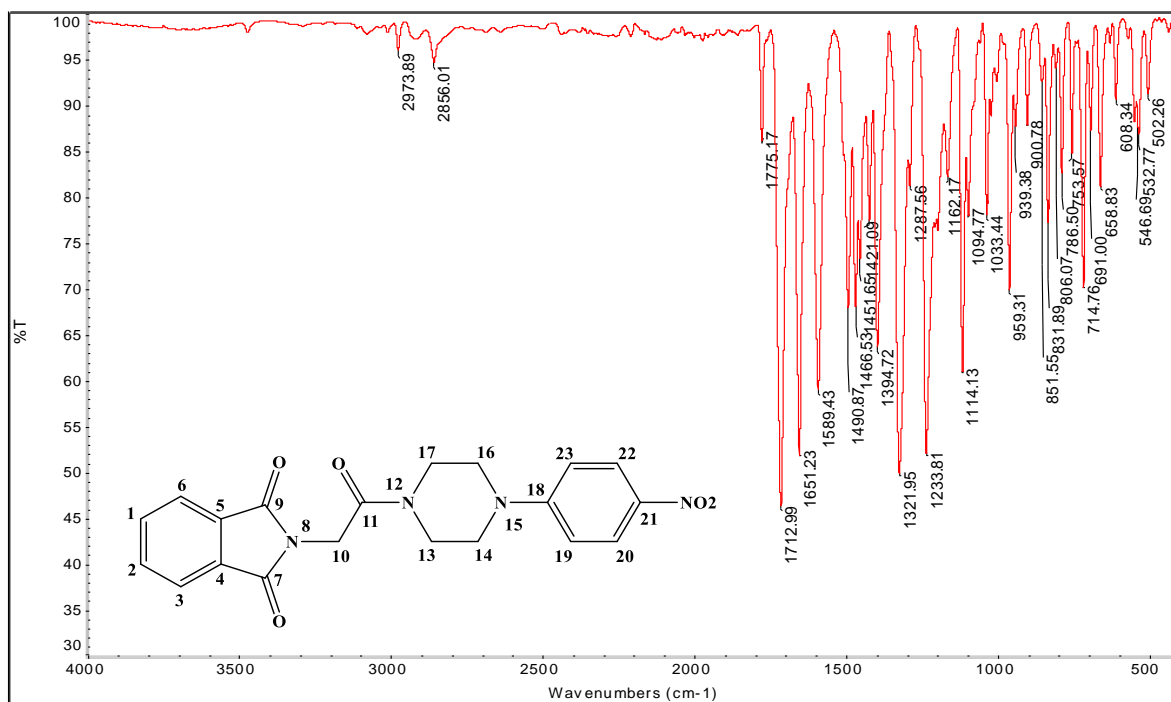
Fonte: do autor

Figura 36 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 189**



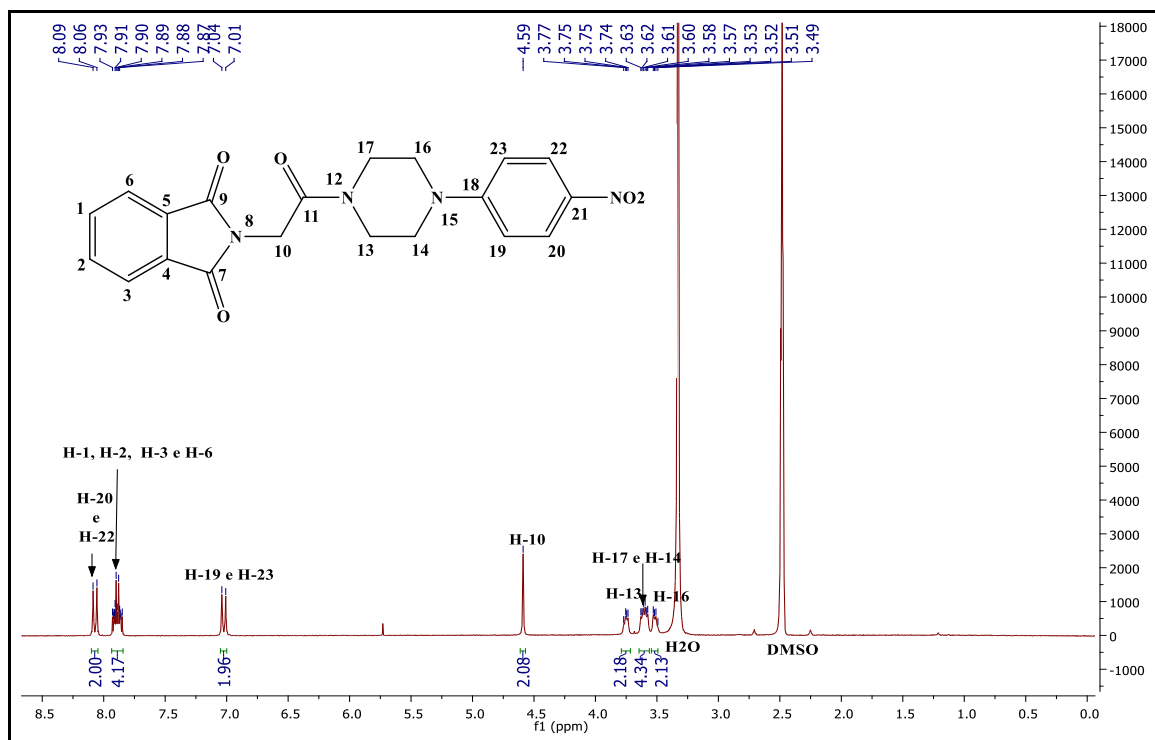
Fonte: do autor

Figura 37 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 190**



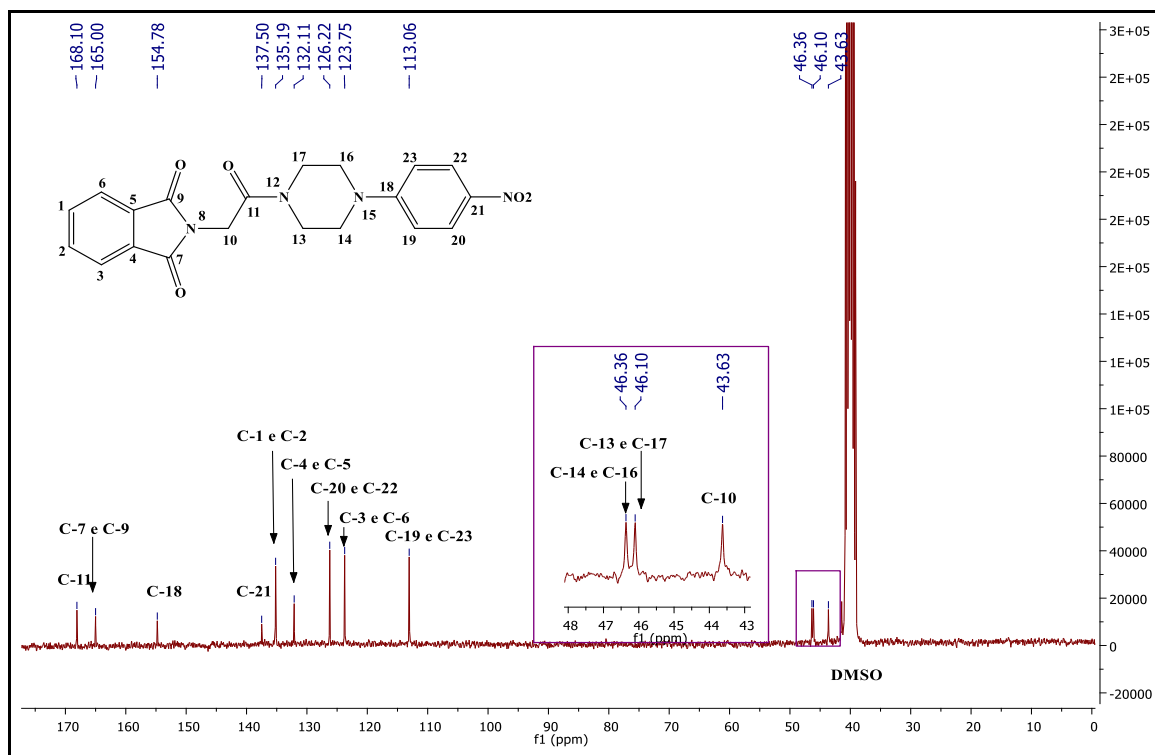
Fonte: do autor

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 190** (300 MHz, DMSO-d_6).



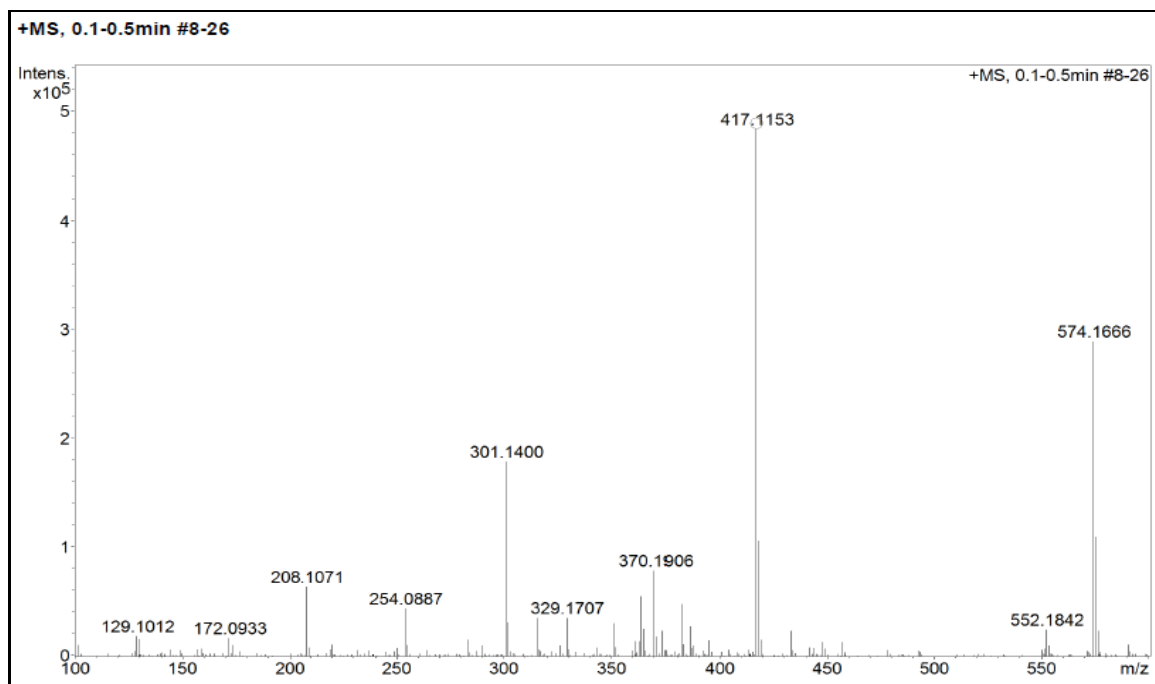
Fonte: do autor

Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 190** (75 MHz, CDCl_3)



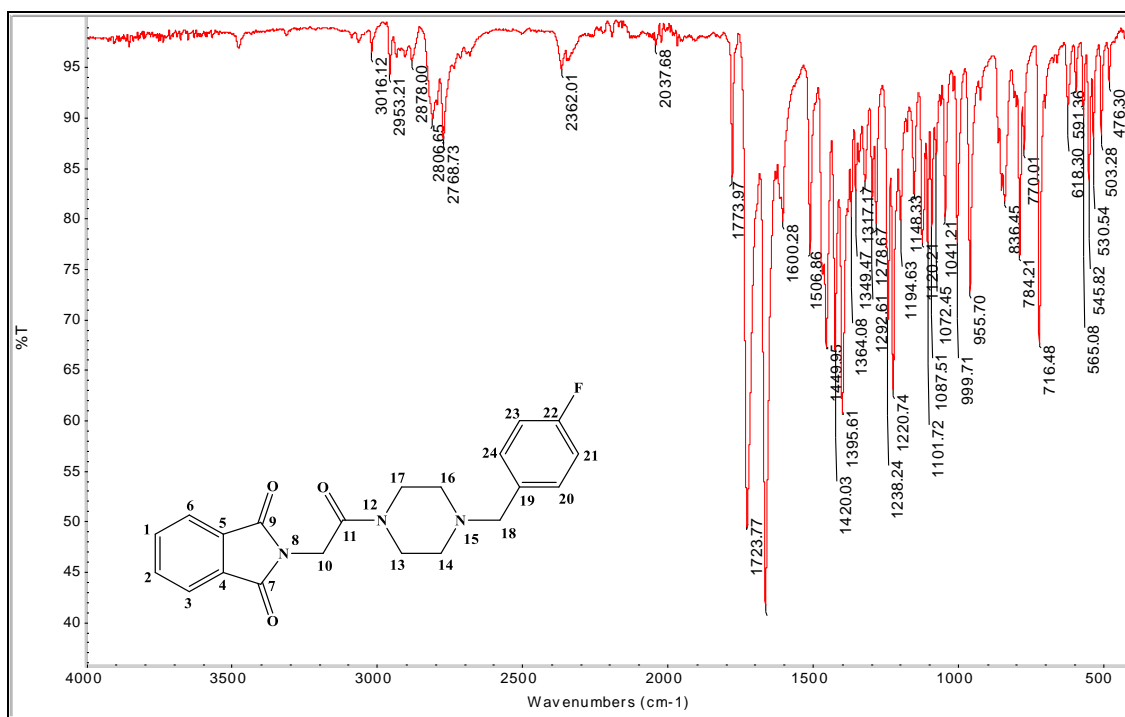
Fonte: do autor

Figura 40 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 190**



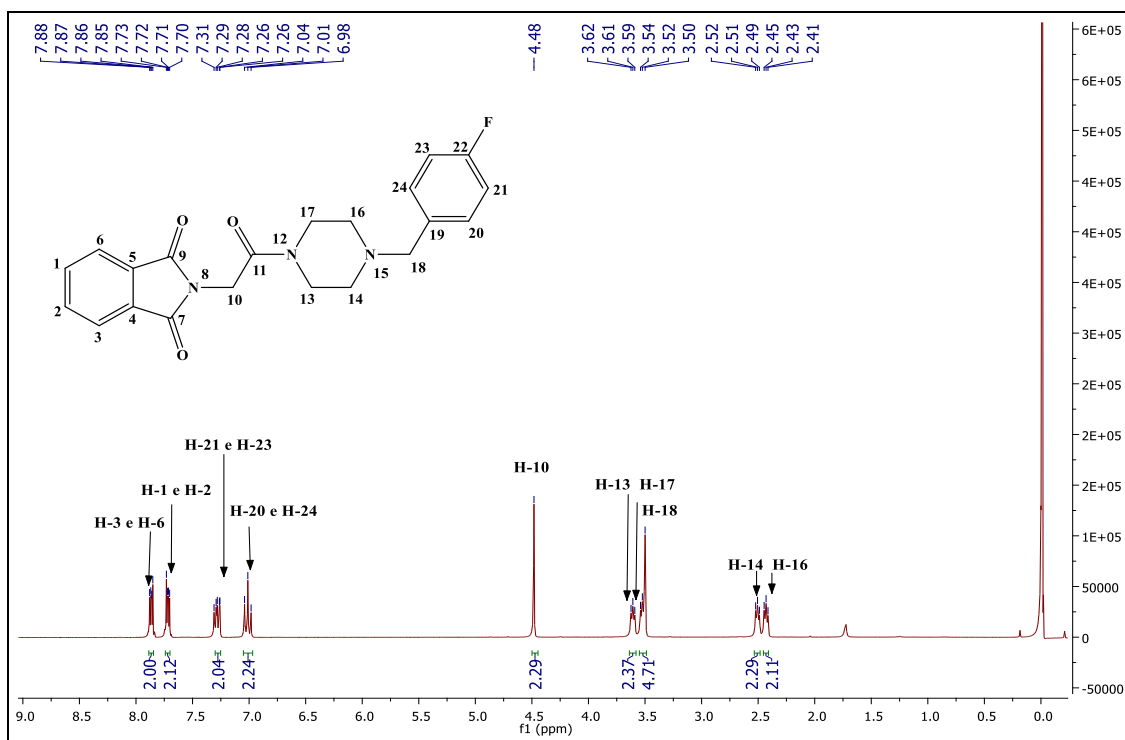
Fonte: do autor

Figura 41 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 296**.



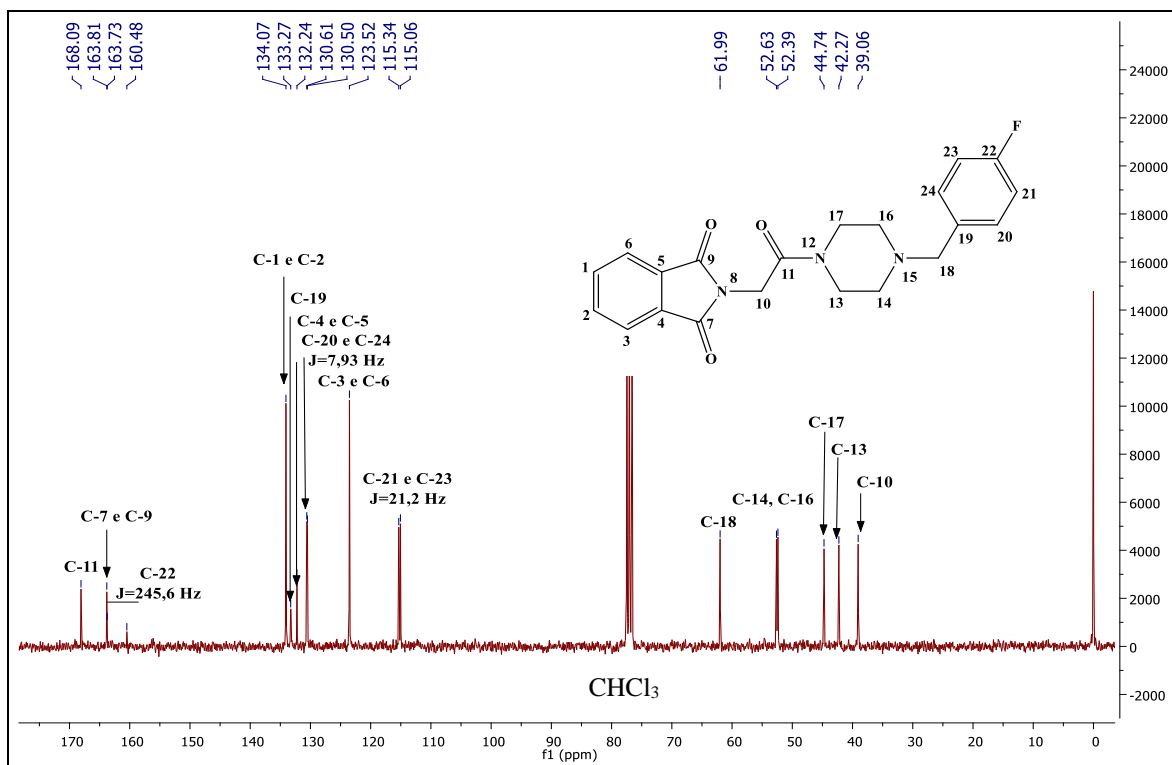
Fonte: do autor

Figura 42 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 296** (300 MHz, CDCl₃).



Fonte: do autor

Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 296** (75 MHz, CDCl_3).



Fonte: do autor

Figura 44 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 296**

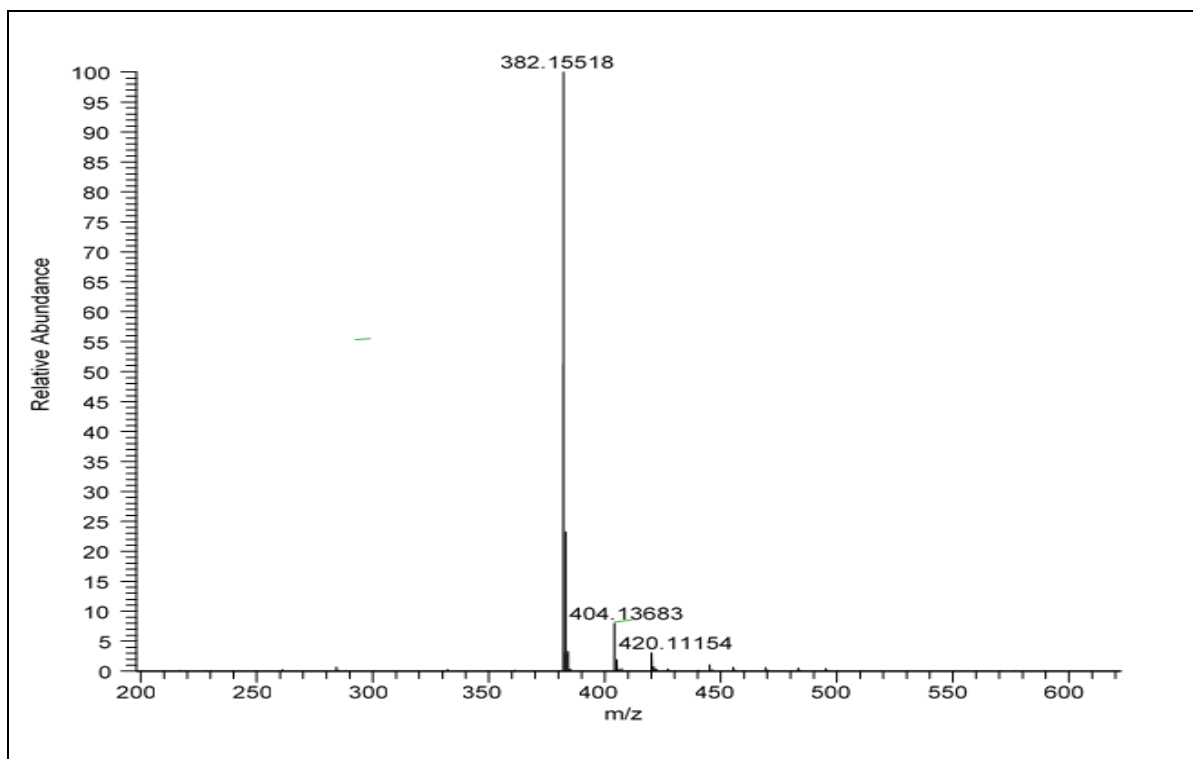
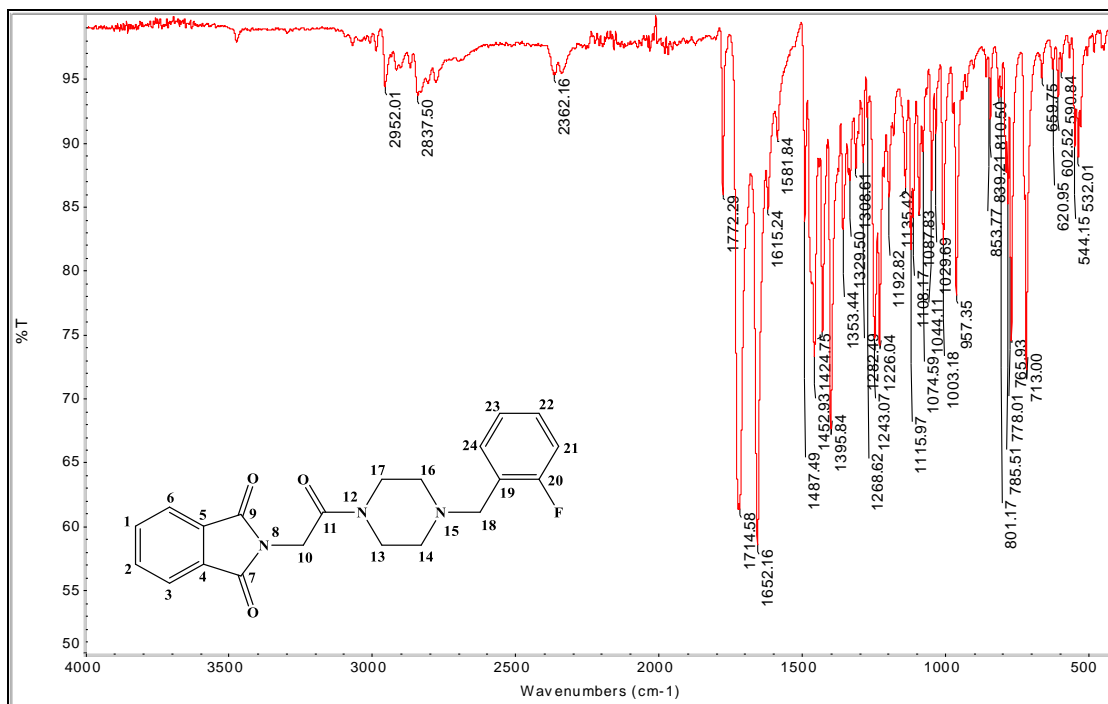
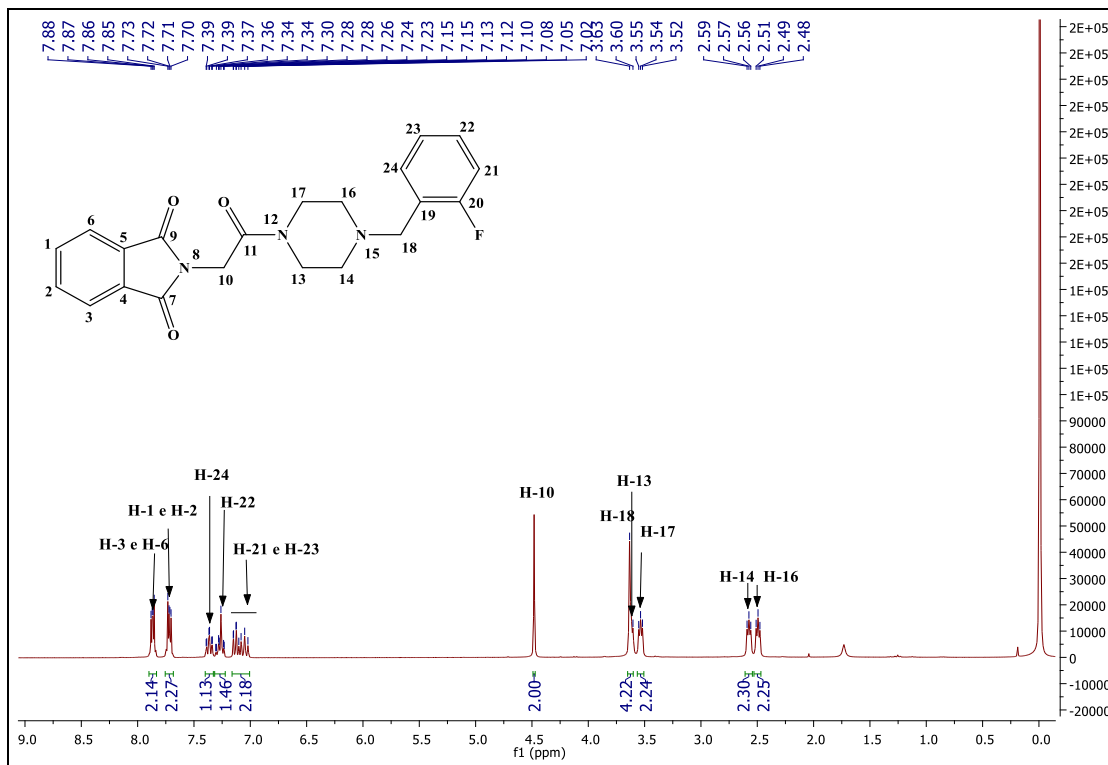


Figura 45 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 297**



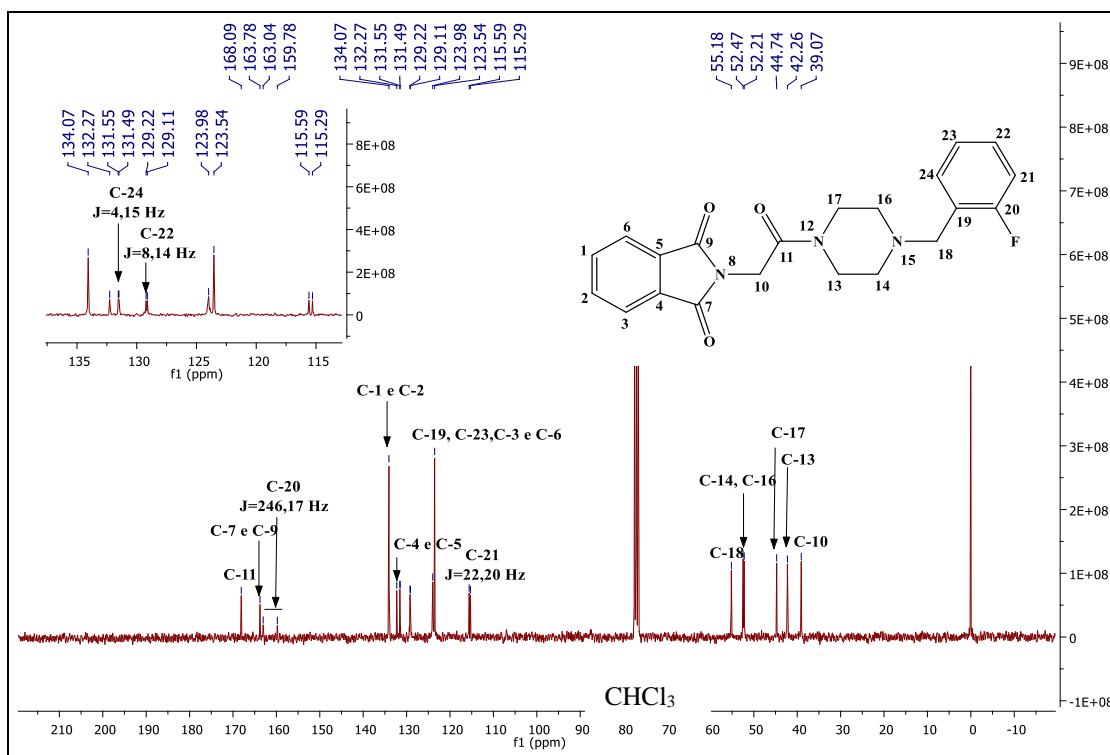
Fonte: do autor

Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 297** (300 MHz, CDCl_3)



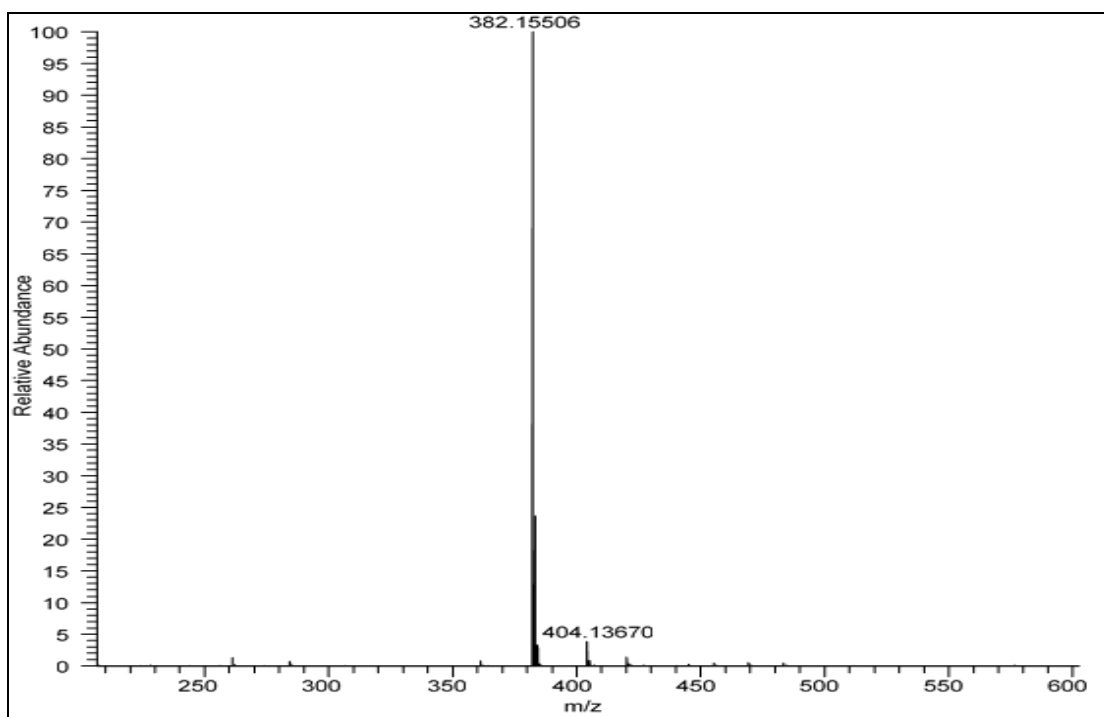
Fonte: do autor

Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 297** (75 MHz, CDCl_3)



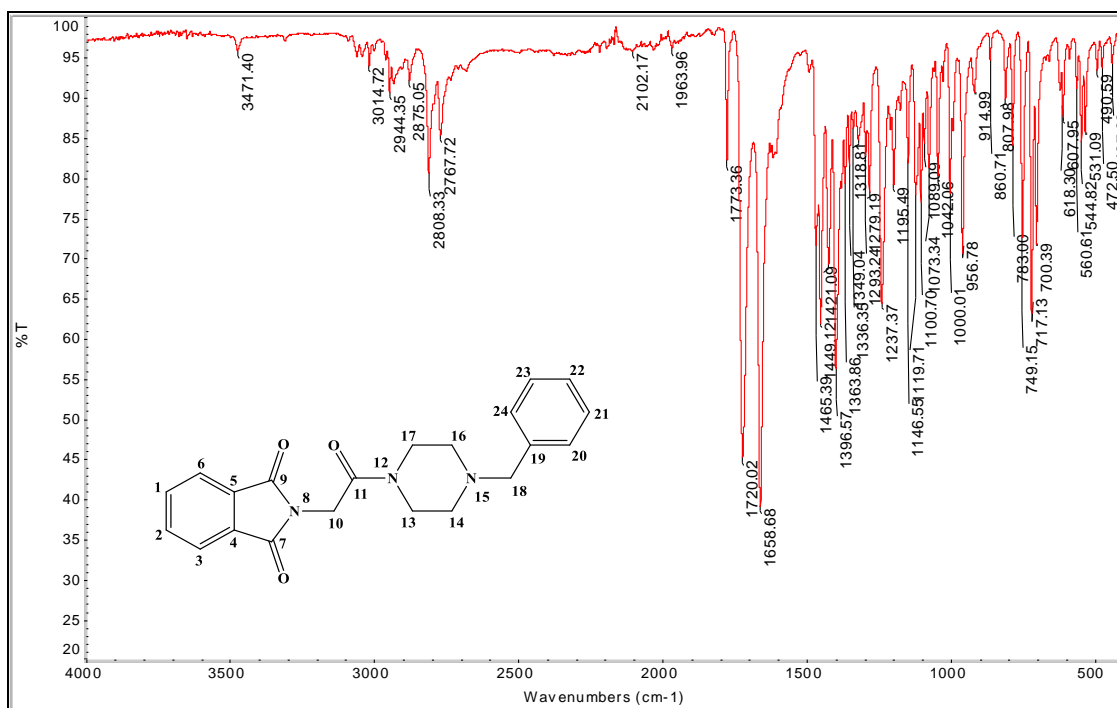
Fonte: do autor

Figura 48 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 297**



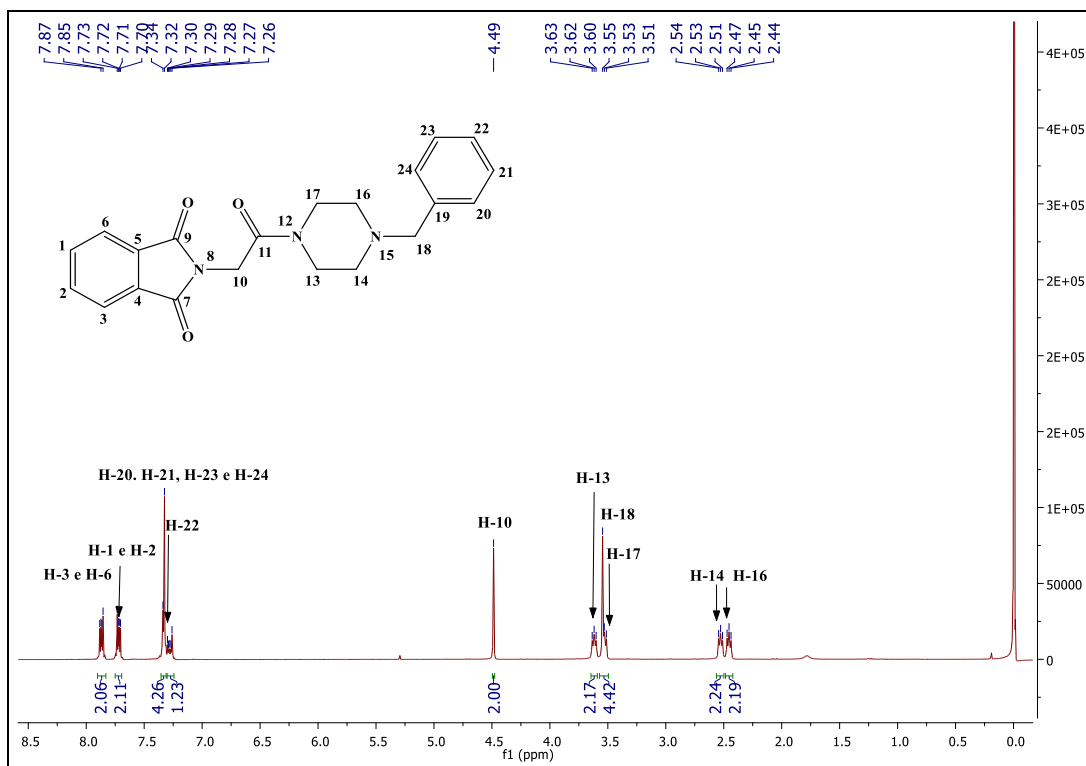
Fonte: do autor

Figura 49 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 298**



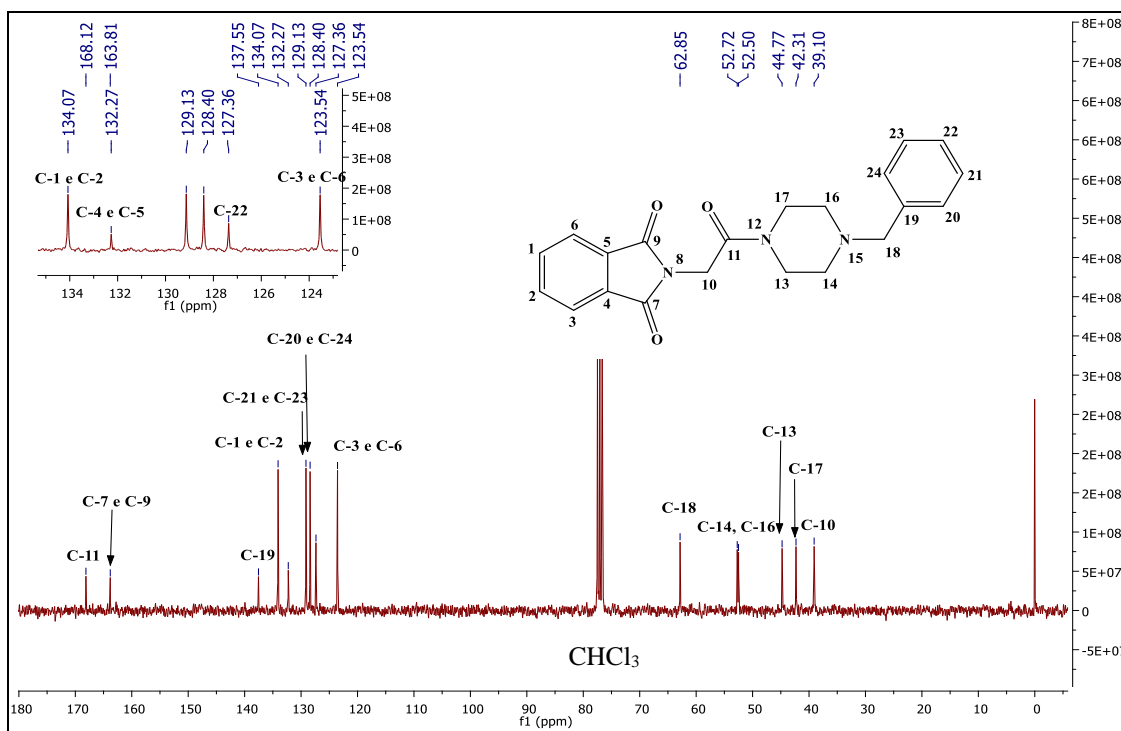
Fonte: do autor

Figura 50 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 298** (300 MHz, CDCl₃)



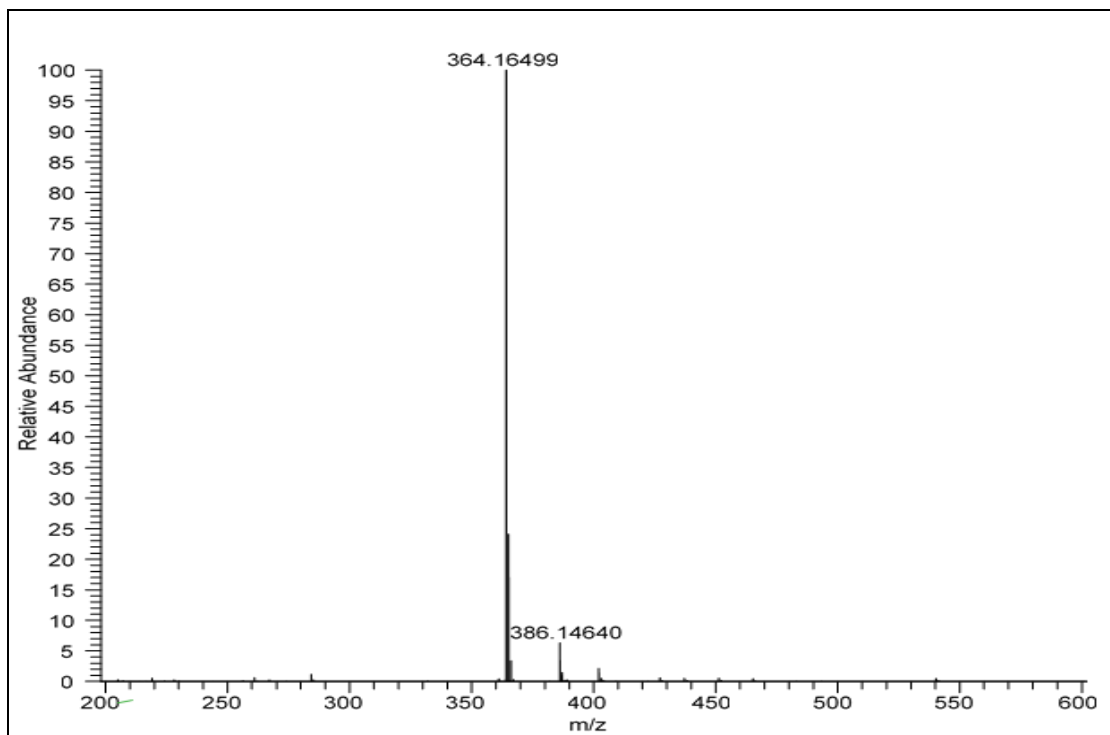
Fonte: do autor

Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 298** (75 MHz, CDCl_3)



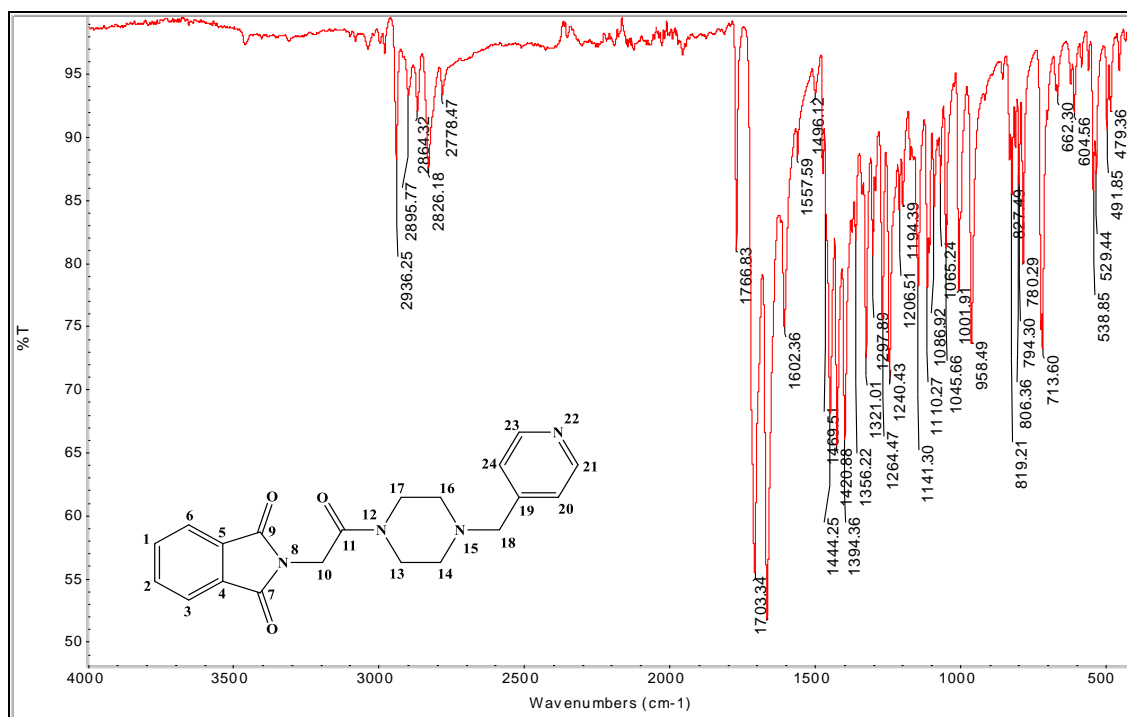
Fonte: do autor

Figura 52 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 298**



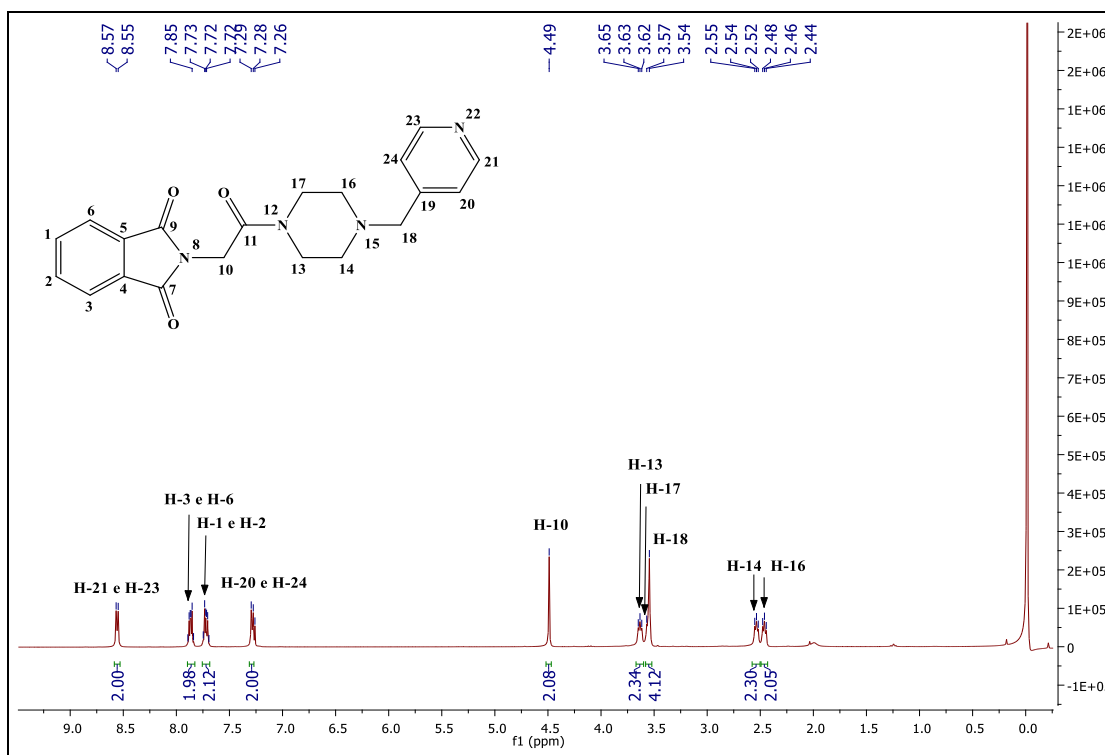
Fonte: do autor

Figura 53 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 299**



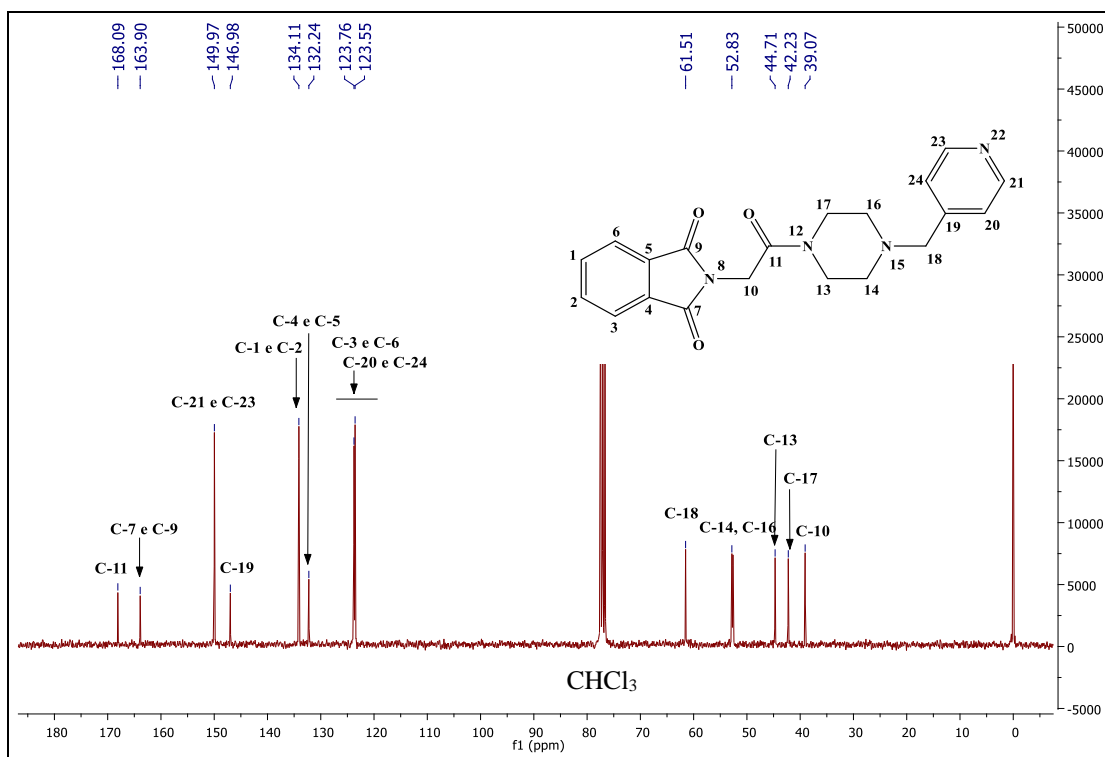
Fonte: do autor

Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 299** (300 MHz, CDCl_3)



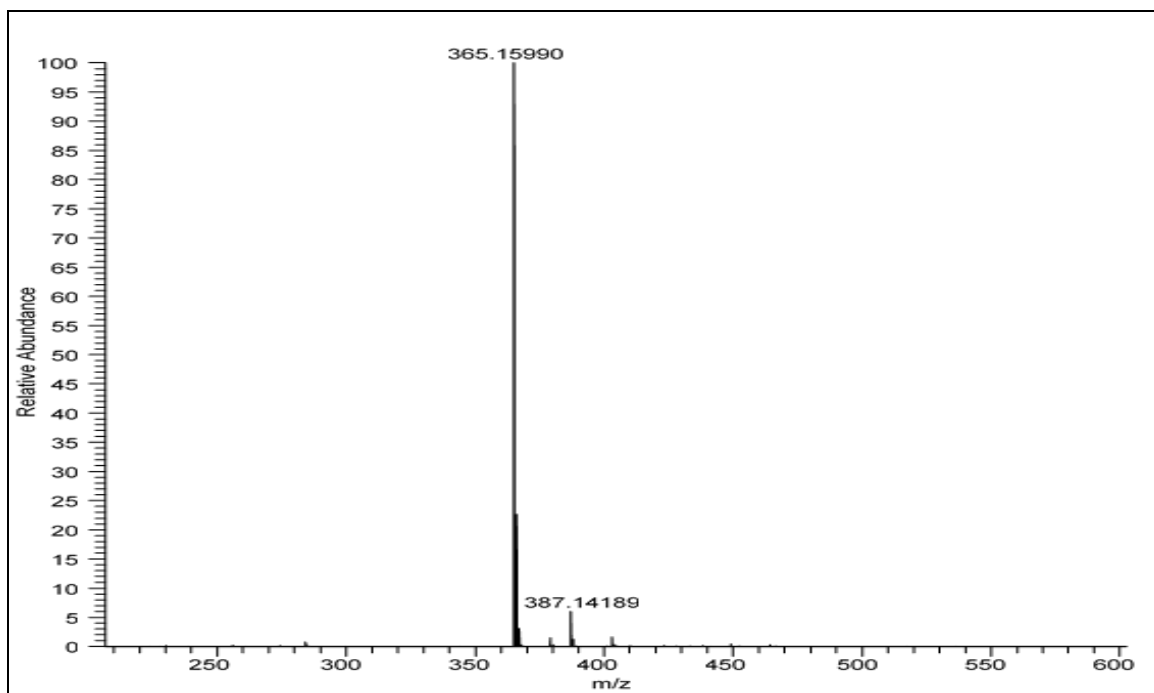
Fonte: do autor

Figura 55 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 299** (75 MHz, CDCl_3)



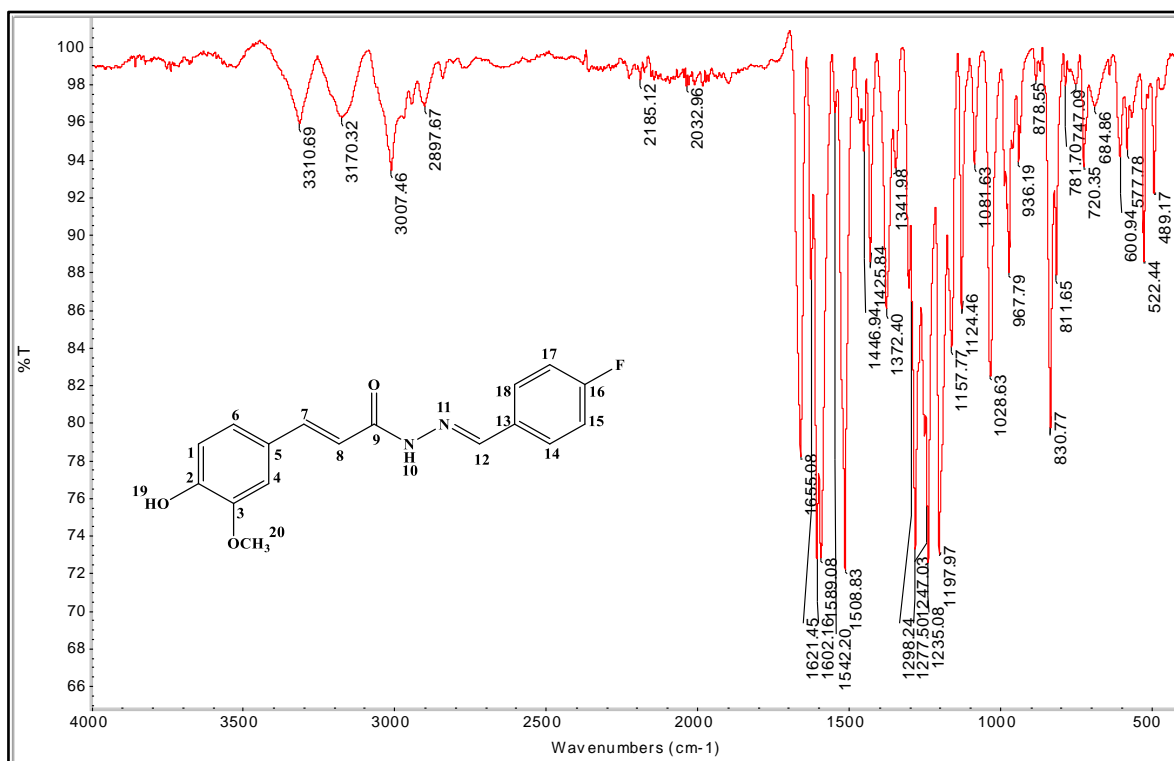
Fonte: do autor

Figura 56 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 299**



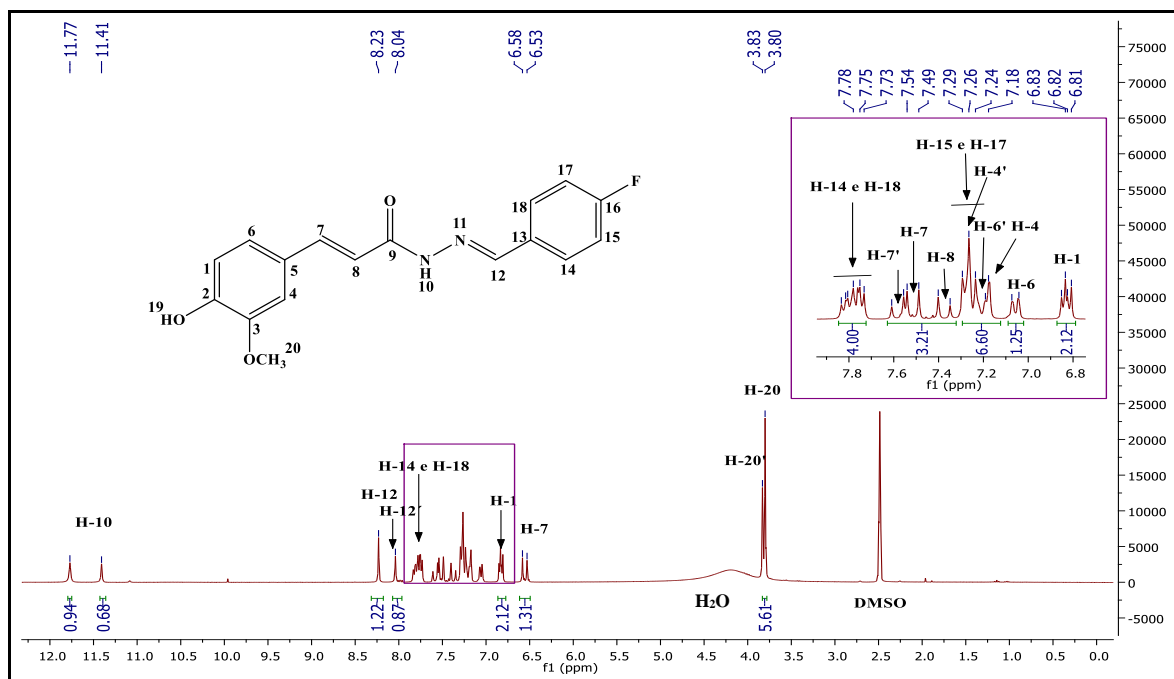
Fonte: do autor

Figura 57 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 211**



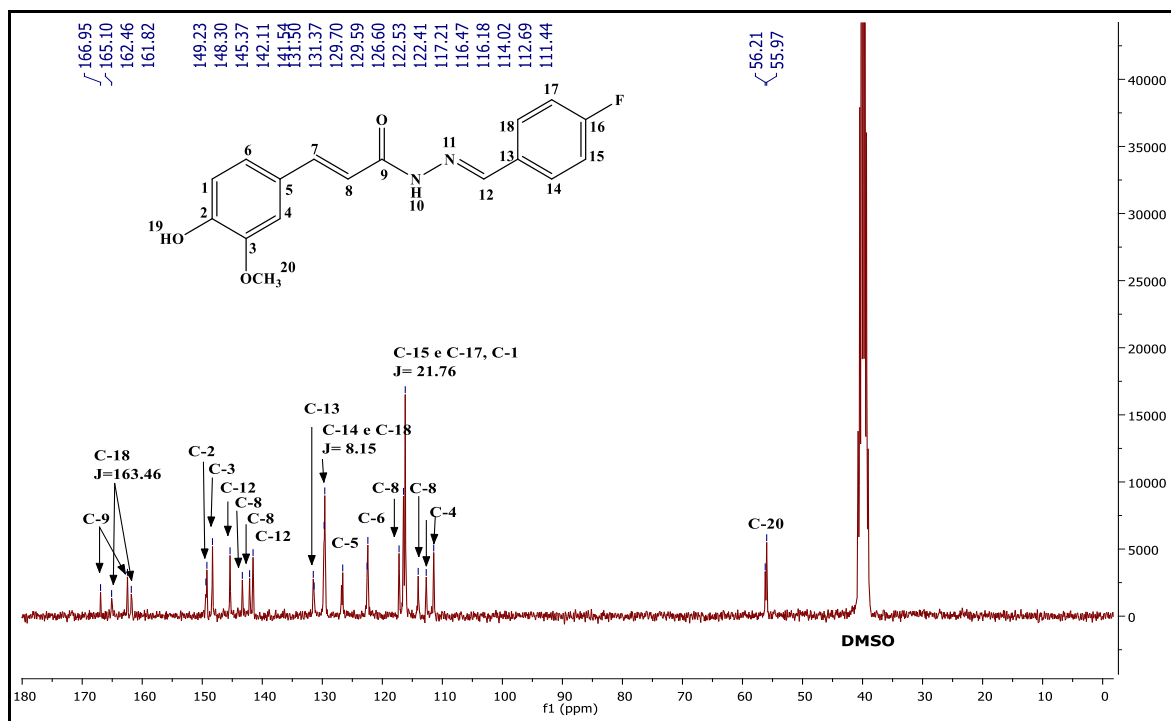
Fonte: do autor

Figura 58 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 211** (300 MHz, DMSO-d₆)



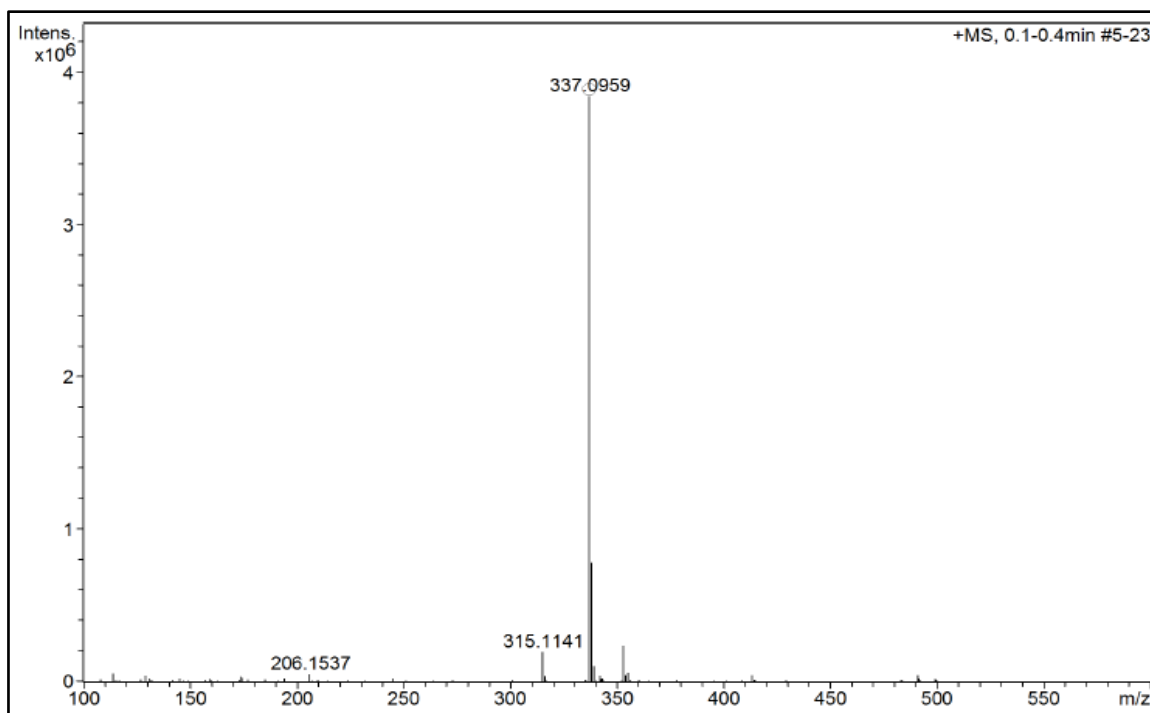
Fonte: do autor

Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 211** (75 MHz, DMSO-d_6)



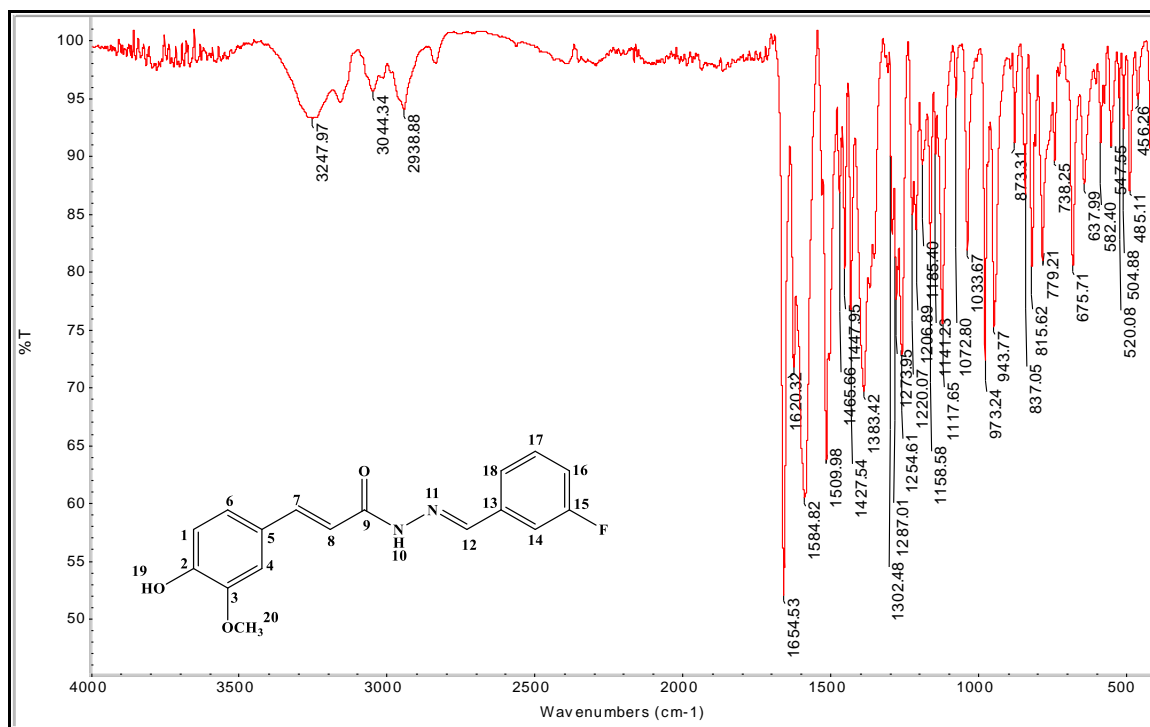
Fonte: do autor

Figura 60 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 211**



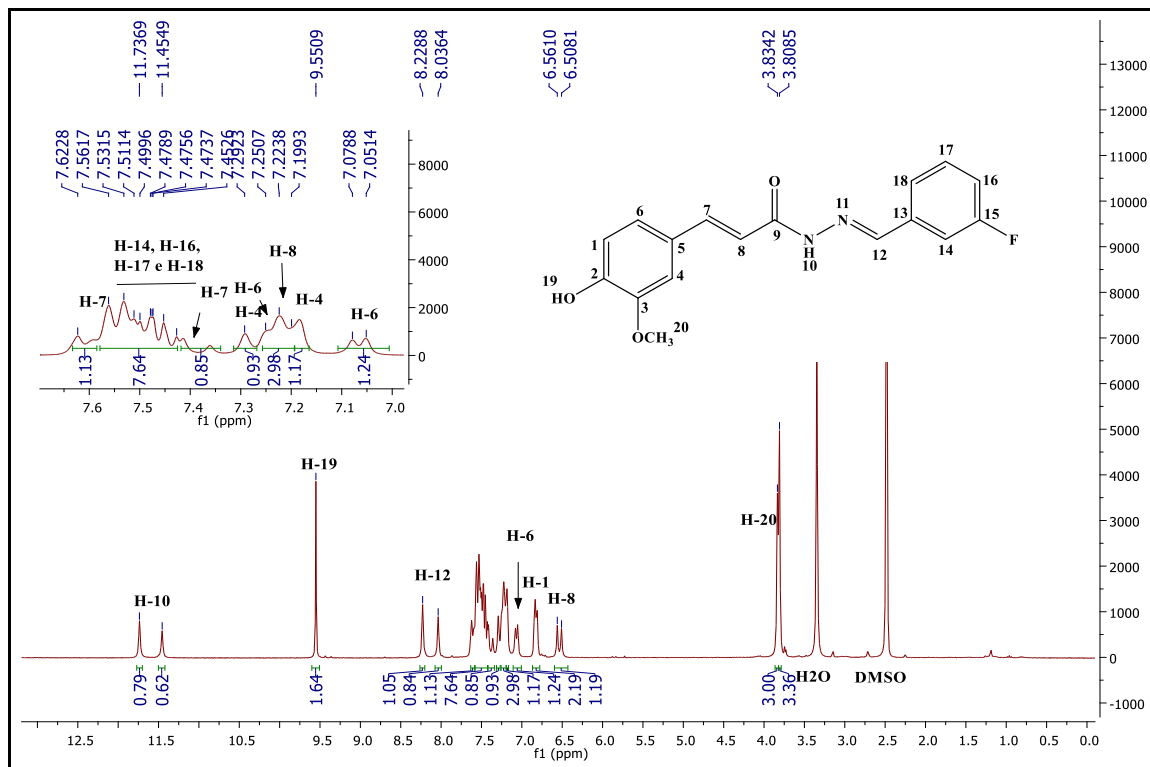
Fonte: do autor

Figura 61 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 212**



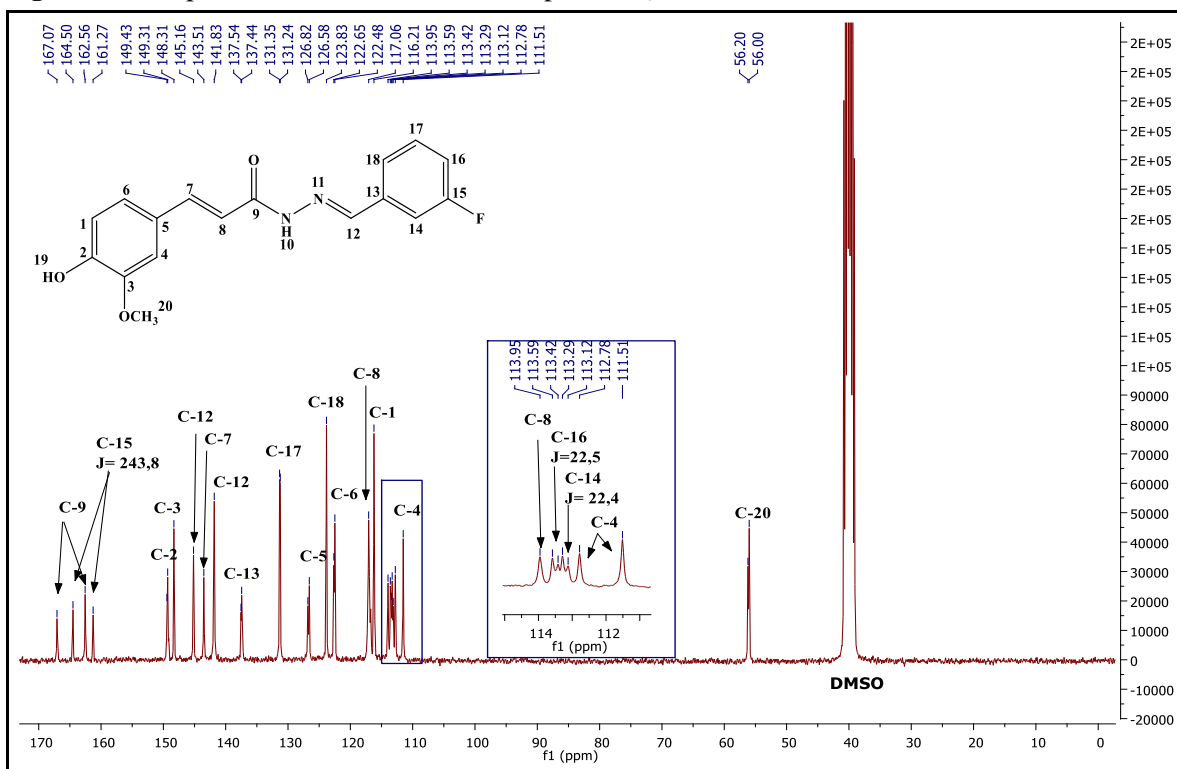
Fonte: do autor

Figura 62 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 212** (300 MHz, DMSO-d₆)



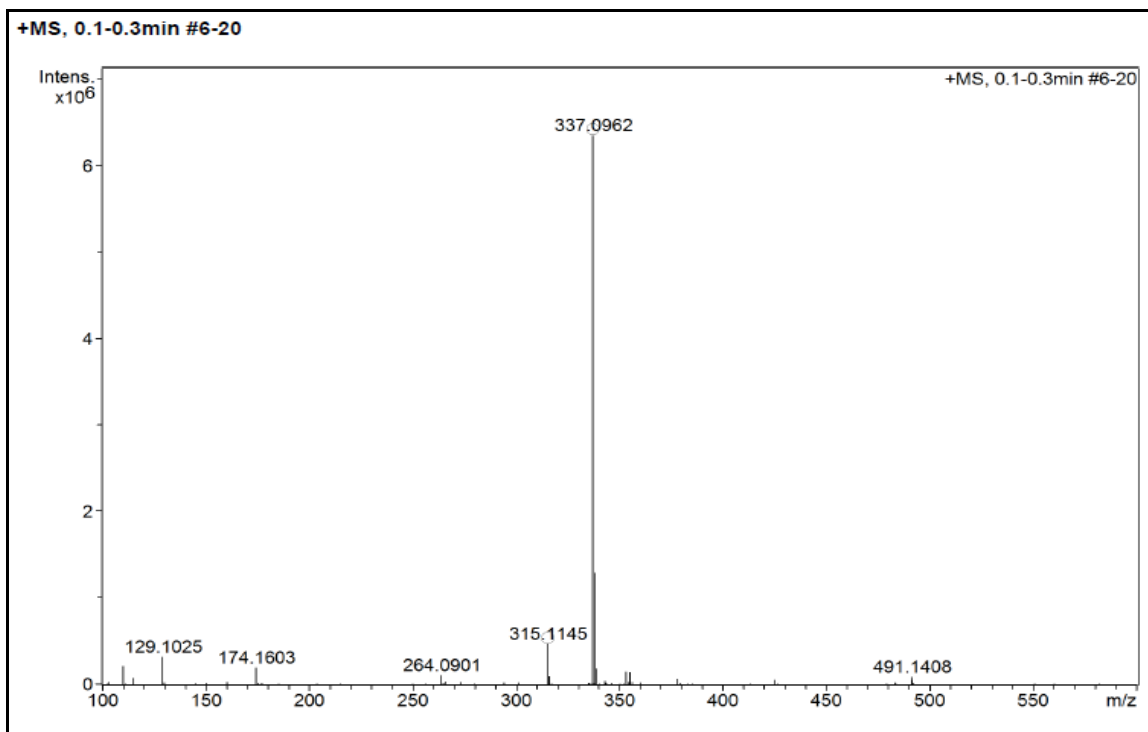
Fonte: do autor

Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 212** (75 MHz, DMSO-d_6)



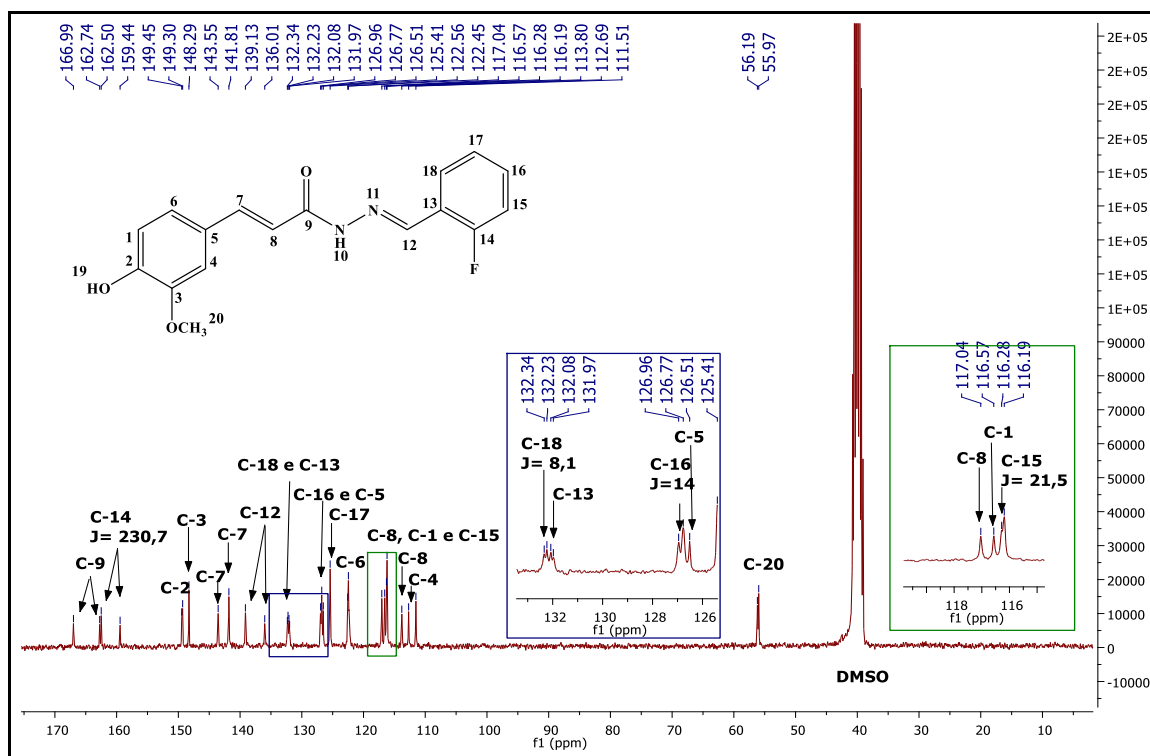
Fonte: do autor

Figura 64 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 212**



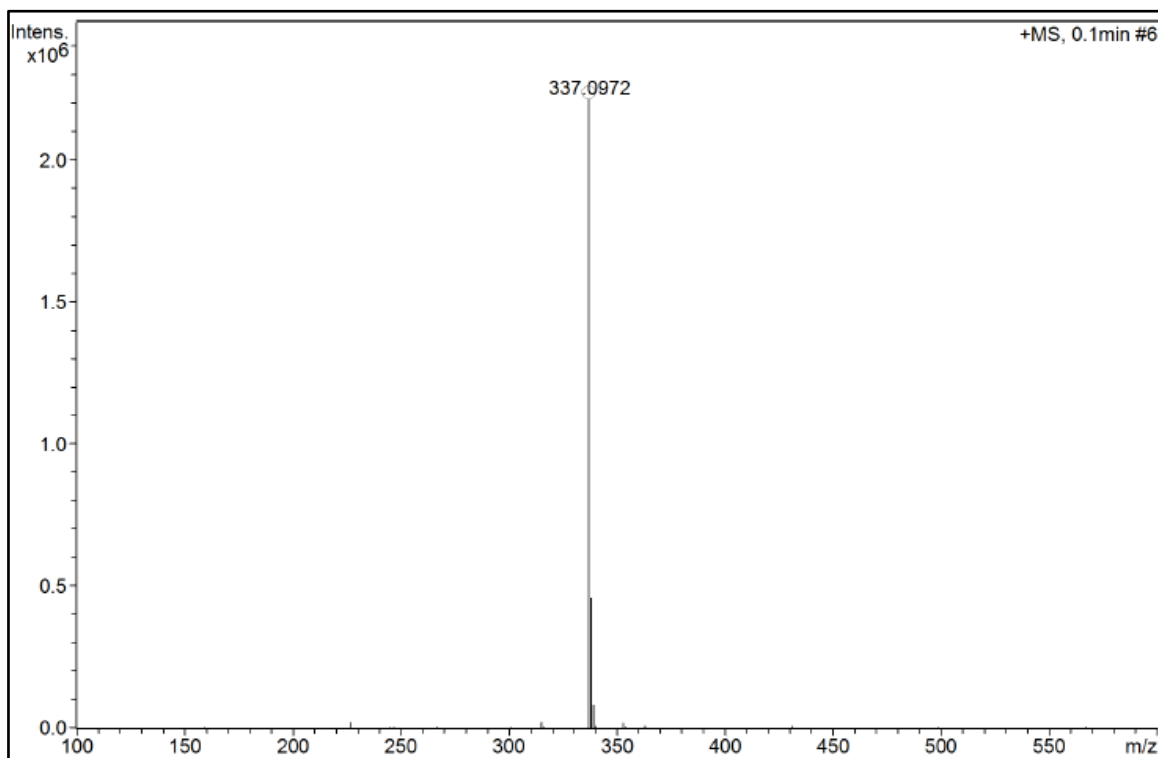
Fonte: do autor

Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 213** (75 MHz, DMSO-d_6).



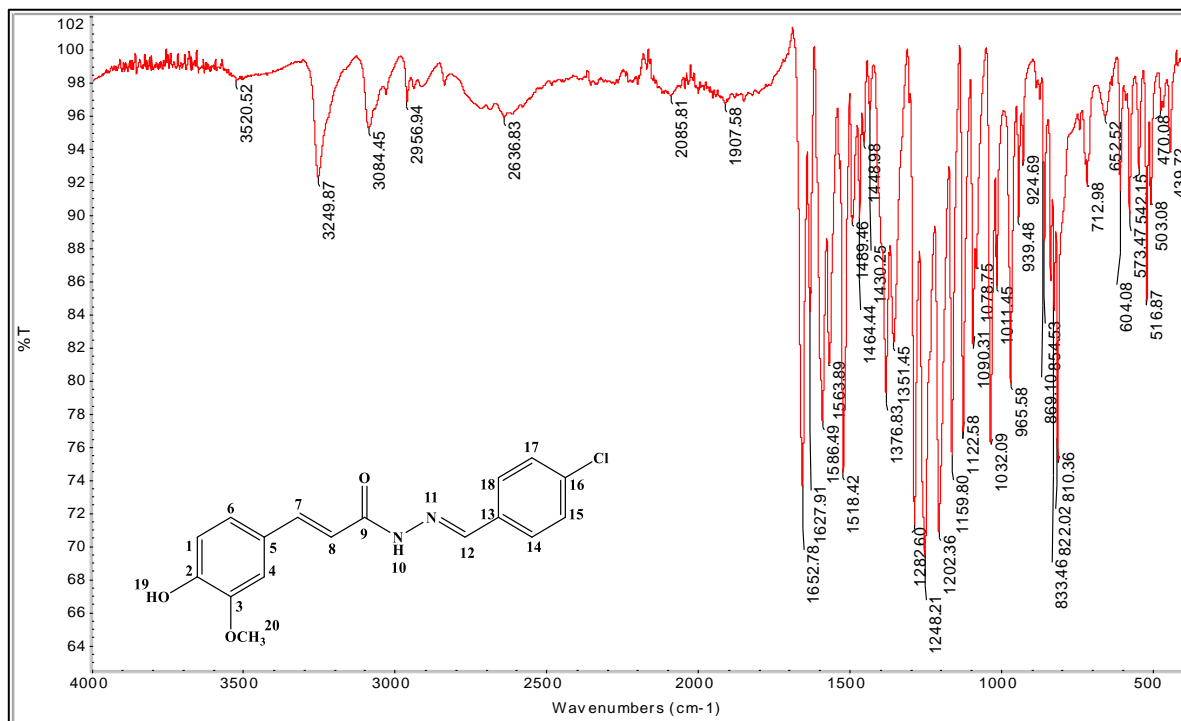
Fonte: do autor

Figura 68 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 213**



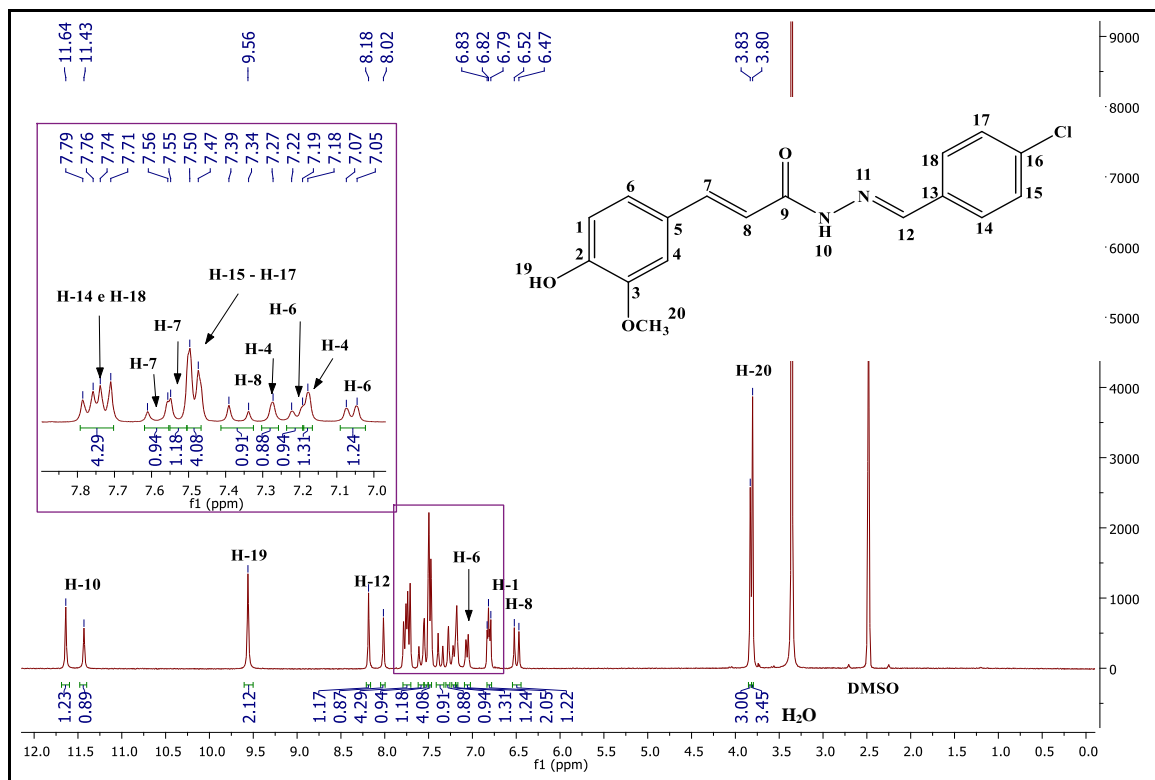
Fonte: do autor

Figura 69 - Espectro na região do infravermelho de PQM 214



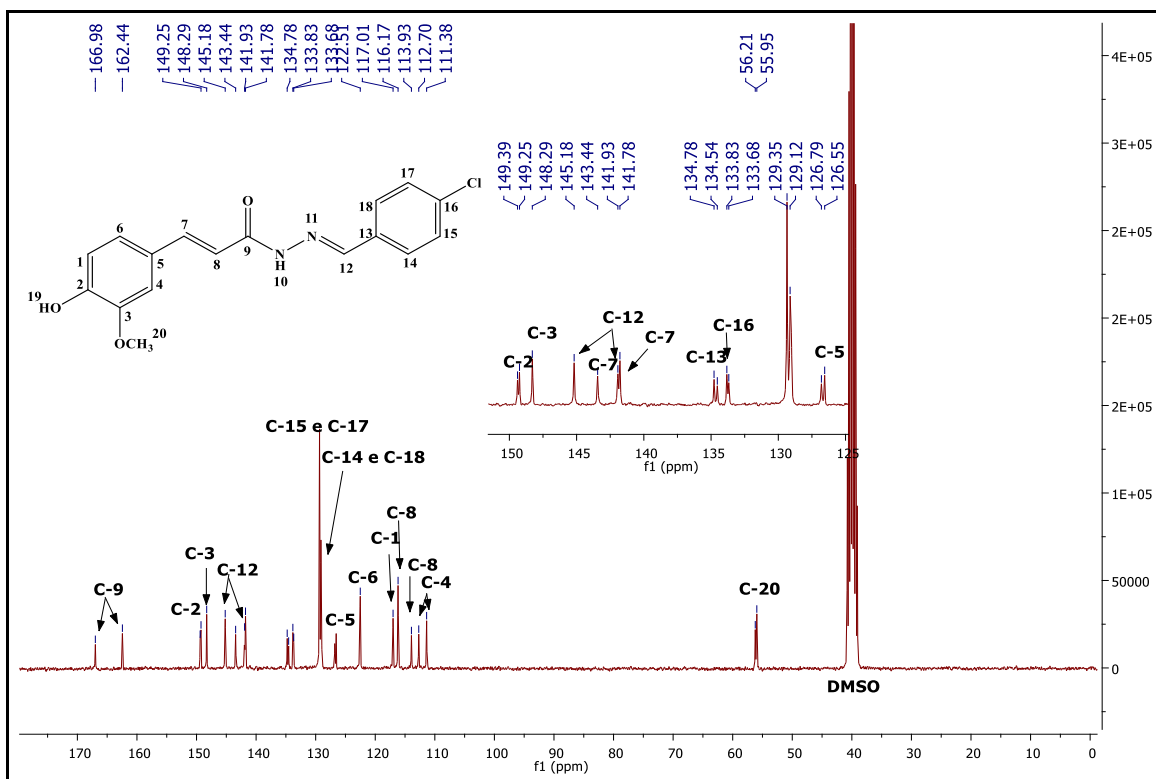
Fonte: do autor

Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H do composto PQM 214 (300 MHz, DMSO-d_6)



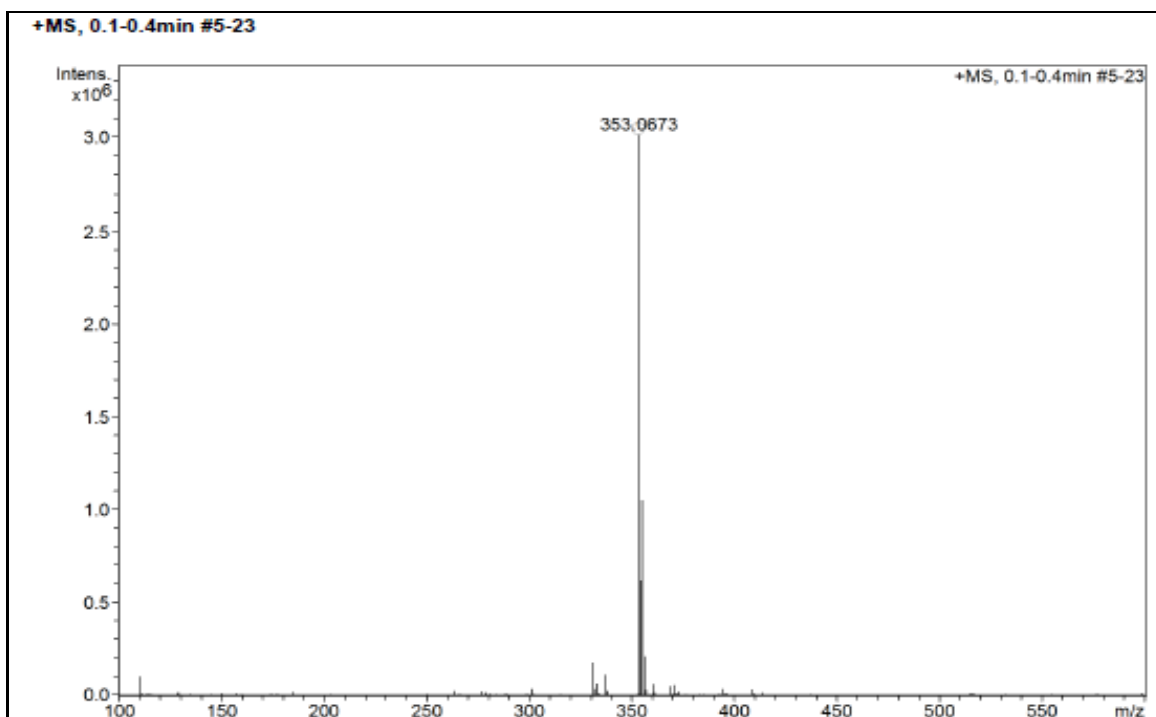
Fonte: do autor

Figura 71 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 214** (75 MHz, DMSO-d_6)



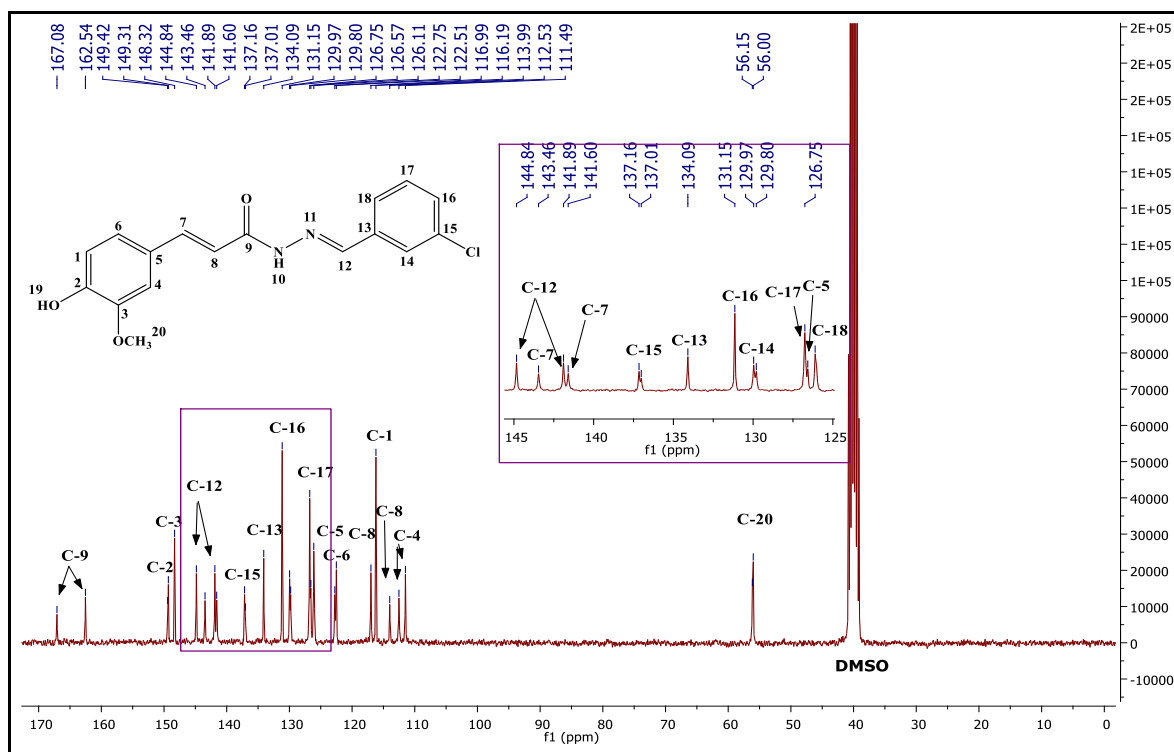
Fonte: do autor

Figura 72 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 214**



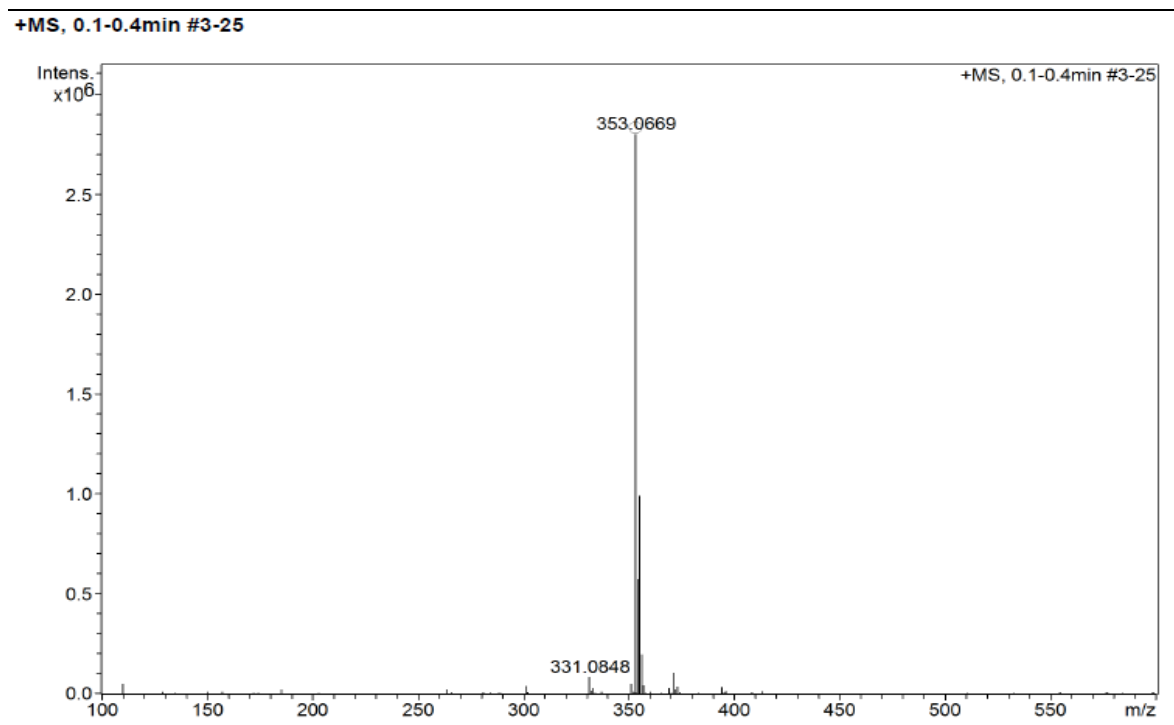
Fonte: do autor

Figura 75 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 215** (75 MHz, DMSO-d_6)



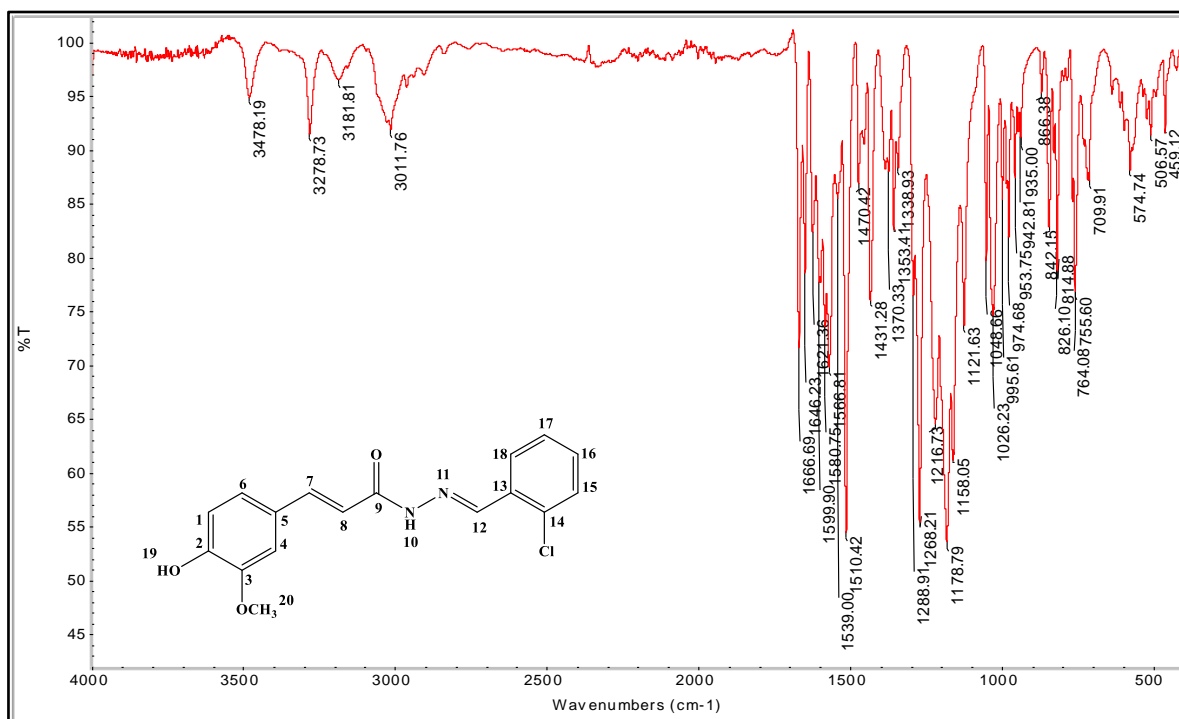
Fonte: do autor

Figura 76 - Espectro de massas (ESI-MS) de **PQM 215**



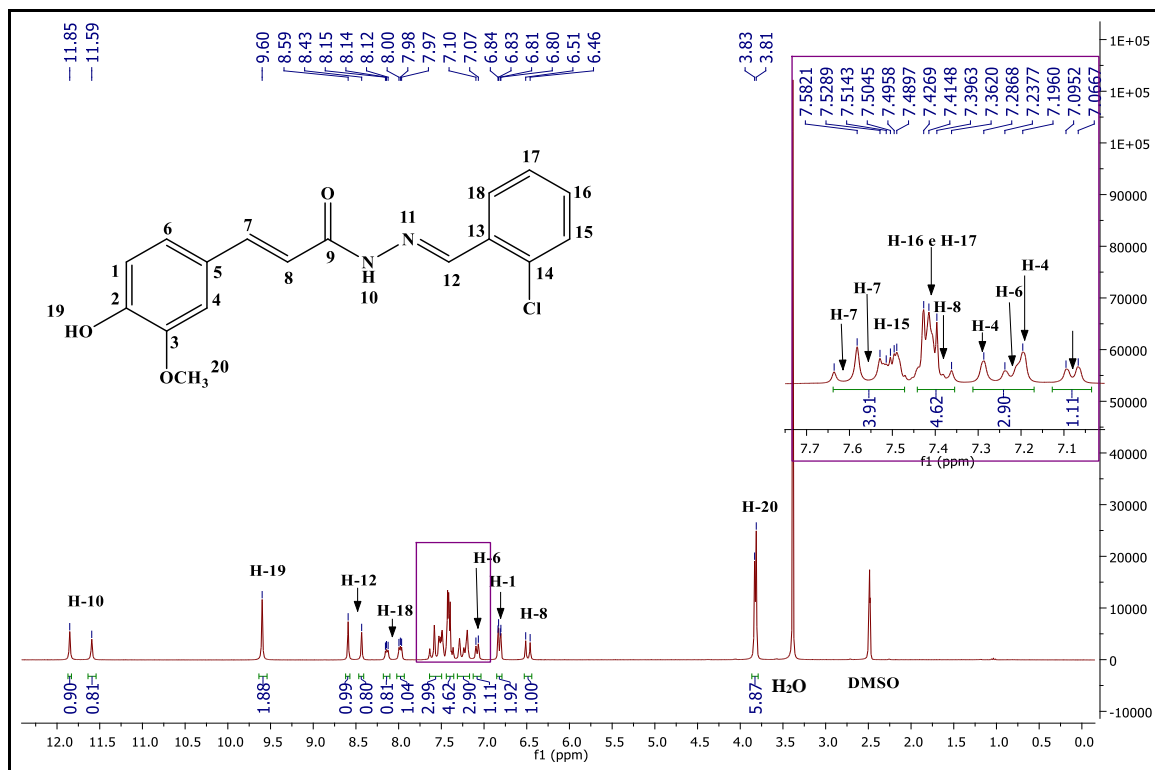
Fonte: do autor

Figura 77 - Espectro na região do infravermelho de PQM 216



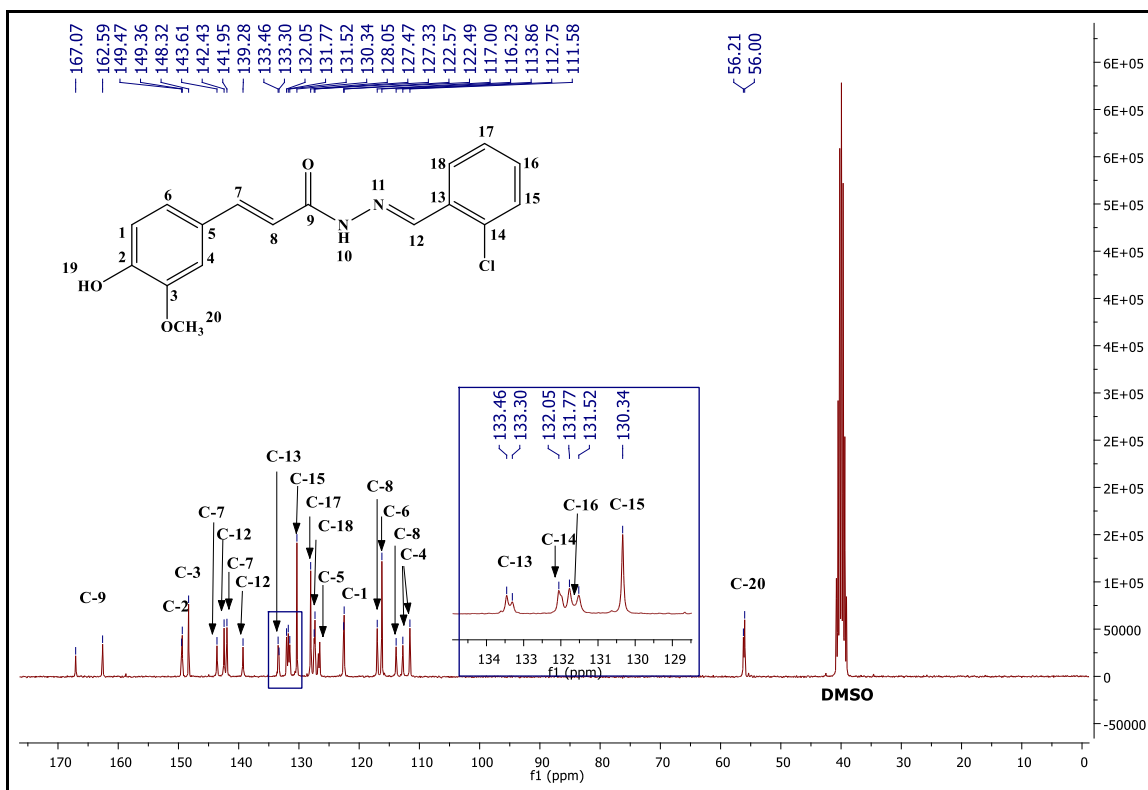
Fonte: do autor

Figura 78 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 216 (300 MHz, DMSO-d₆)



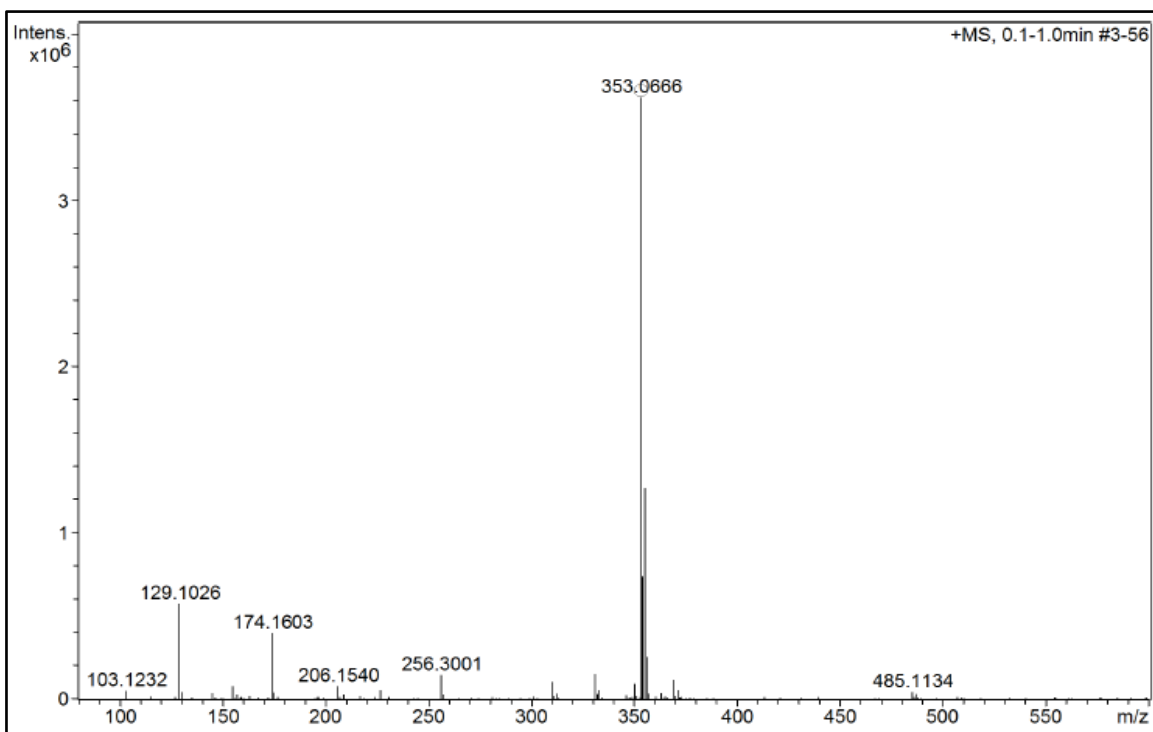
Fonte: do autor

Figura 79 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 216** (75 MHz, DMSO-d_6)



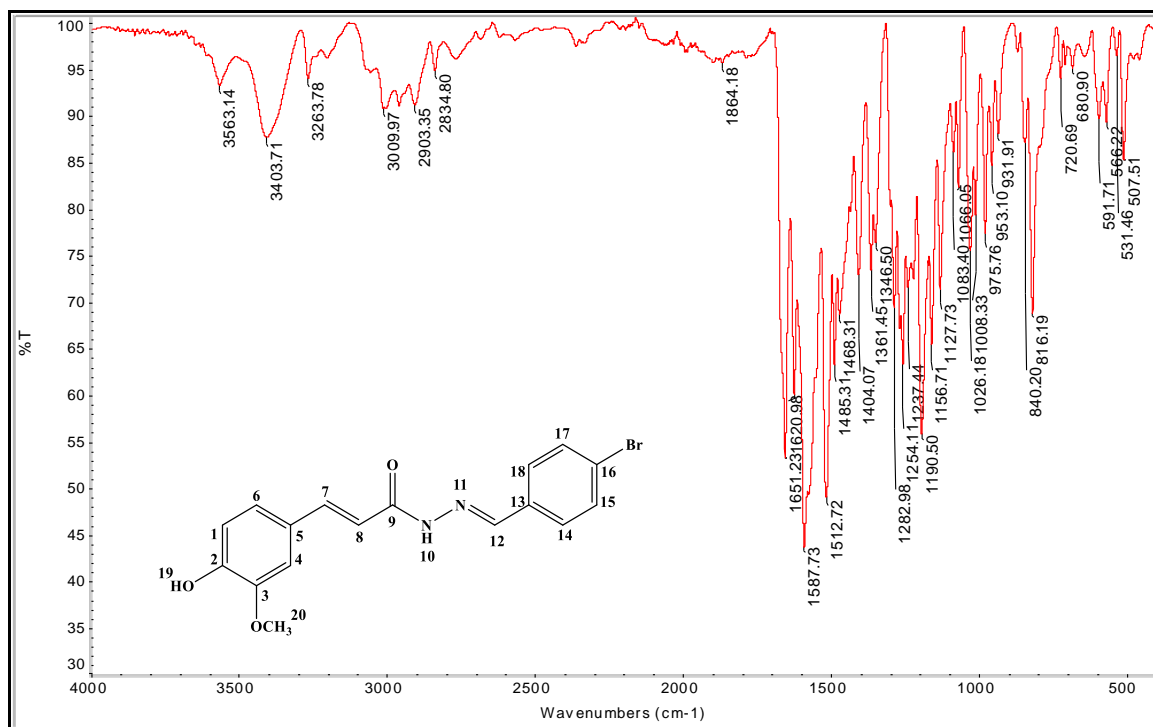
Fonte: do autor

Figura 80 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 216**



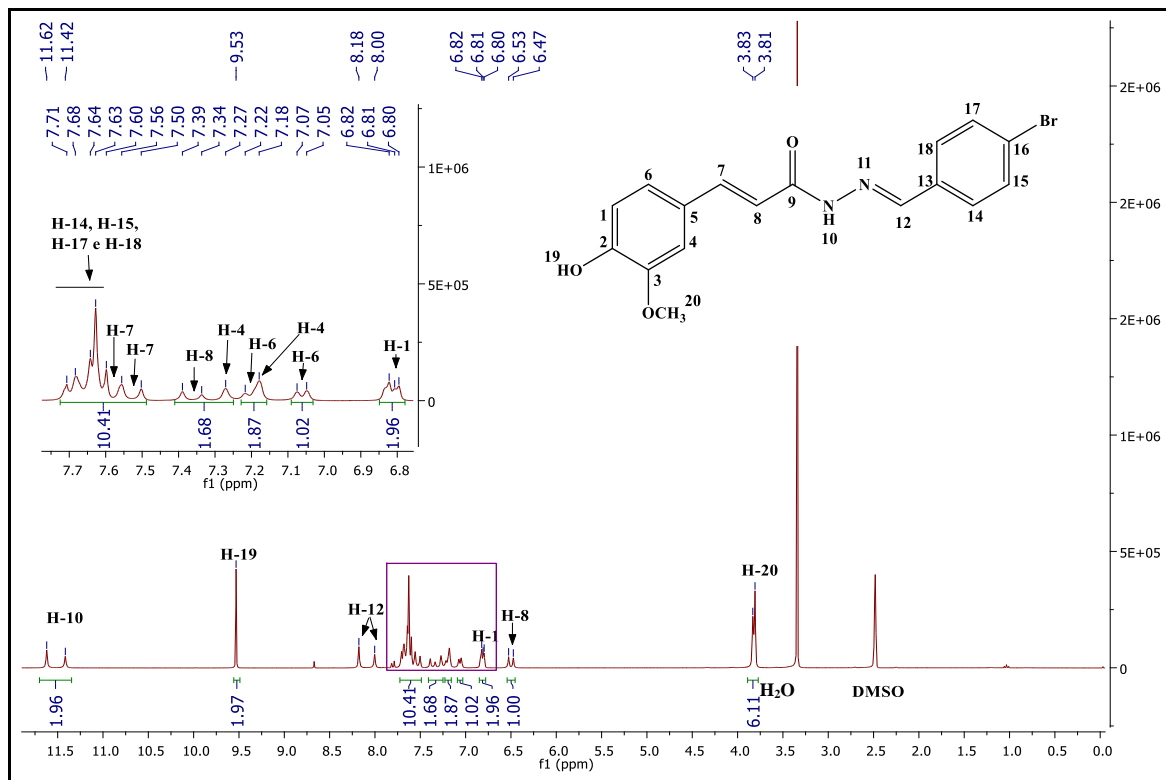
Fonte: do autor

Figura 81 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM 217**



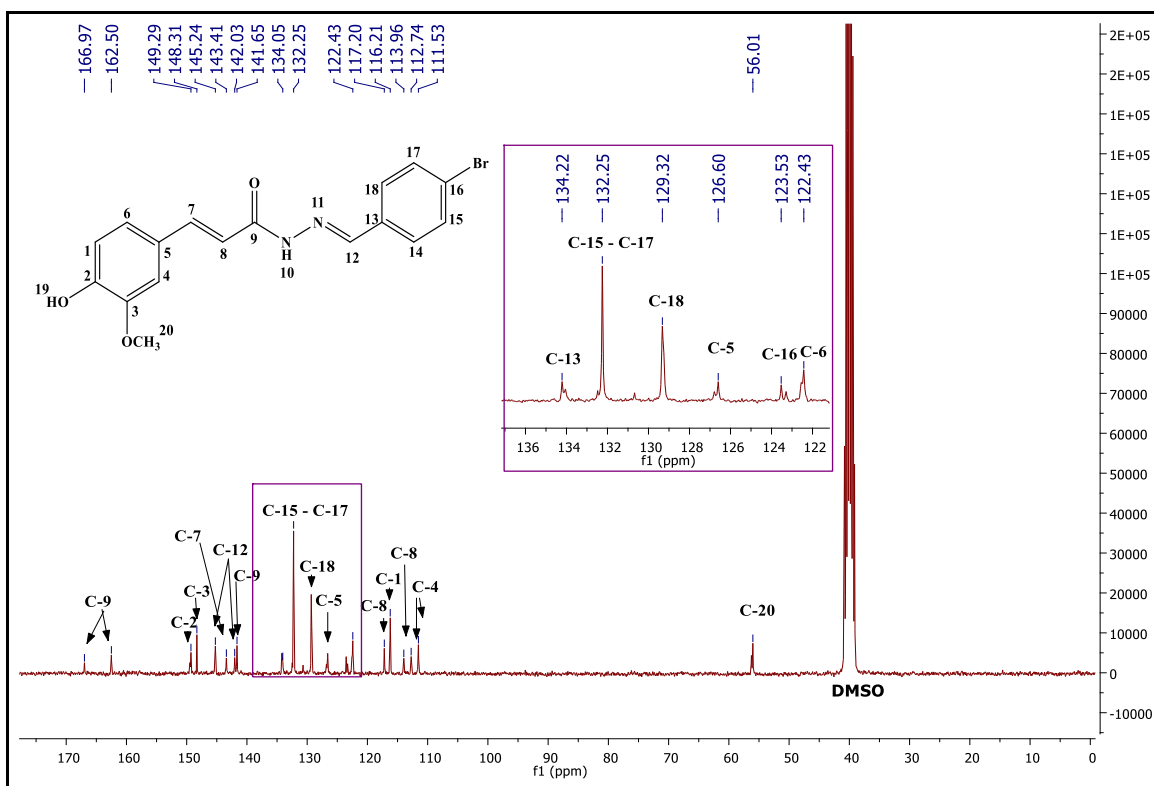
Fonte: do autor

Figura 82 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 217** (300 MHz, DMSO-d₆)



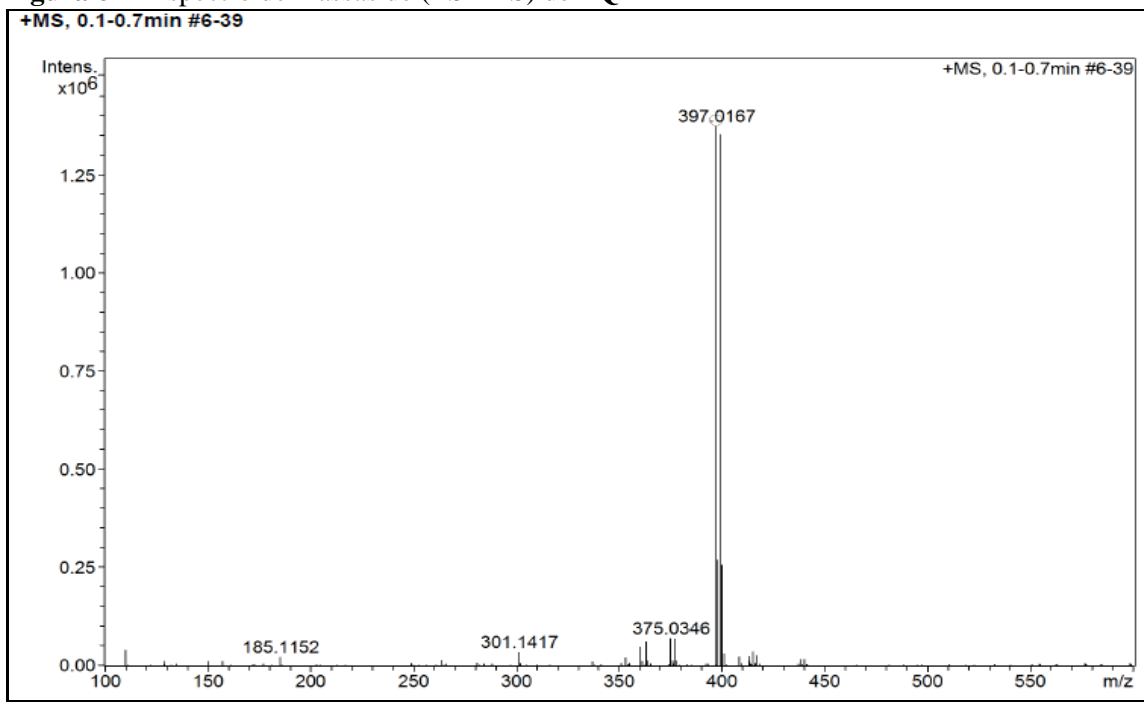
Fonte: do autor

Figura 83 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 217** (75 MHz, DMSO-d_6)



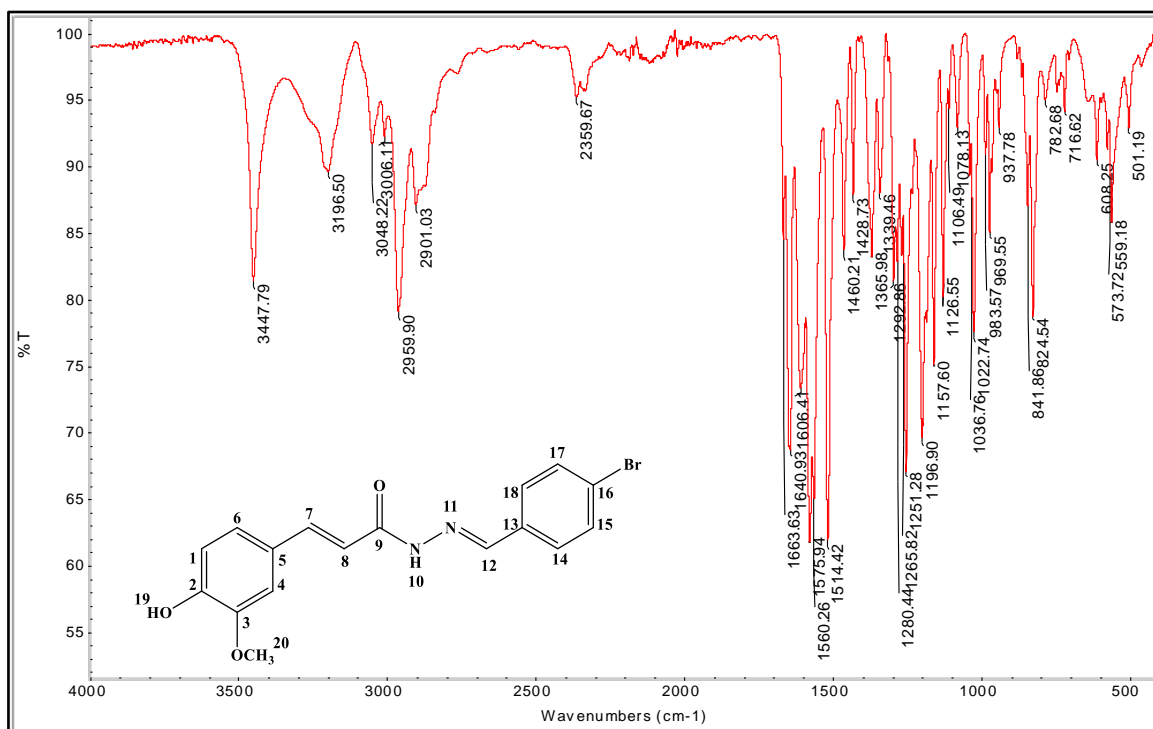
Fonte: do autor

Figura 84 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 217**



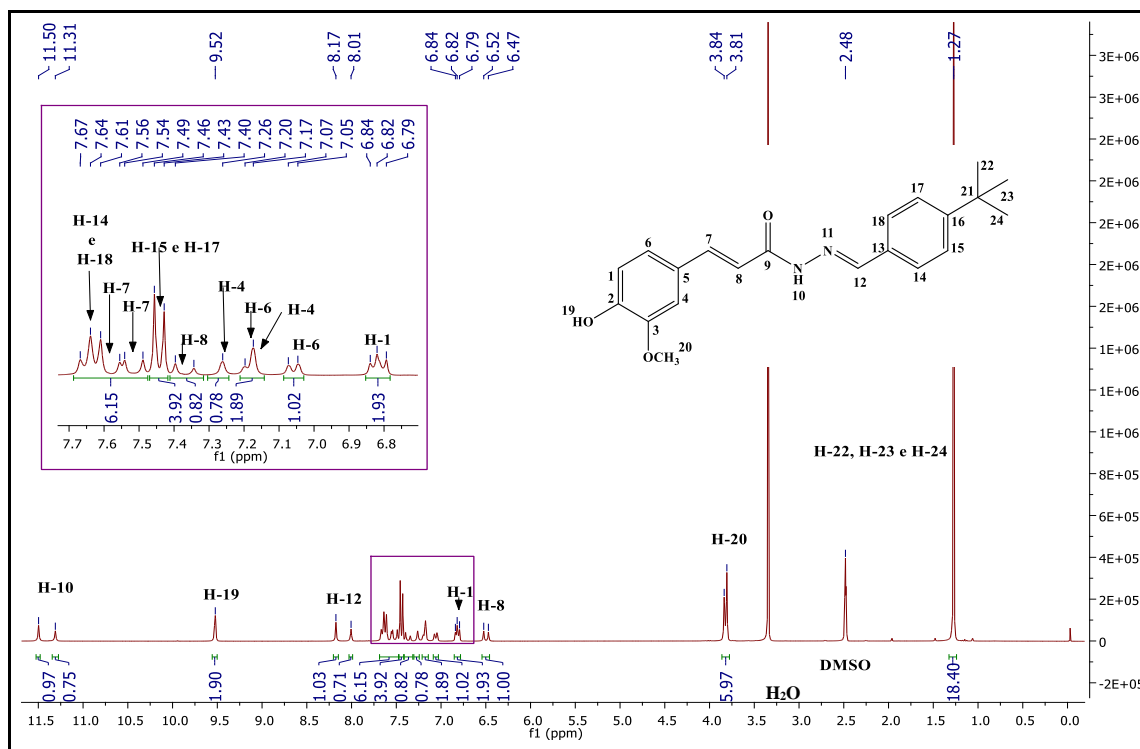
Fonte: do autor

Figura 85 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 218**



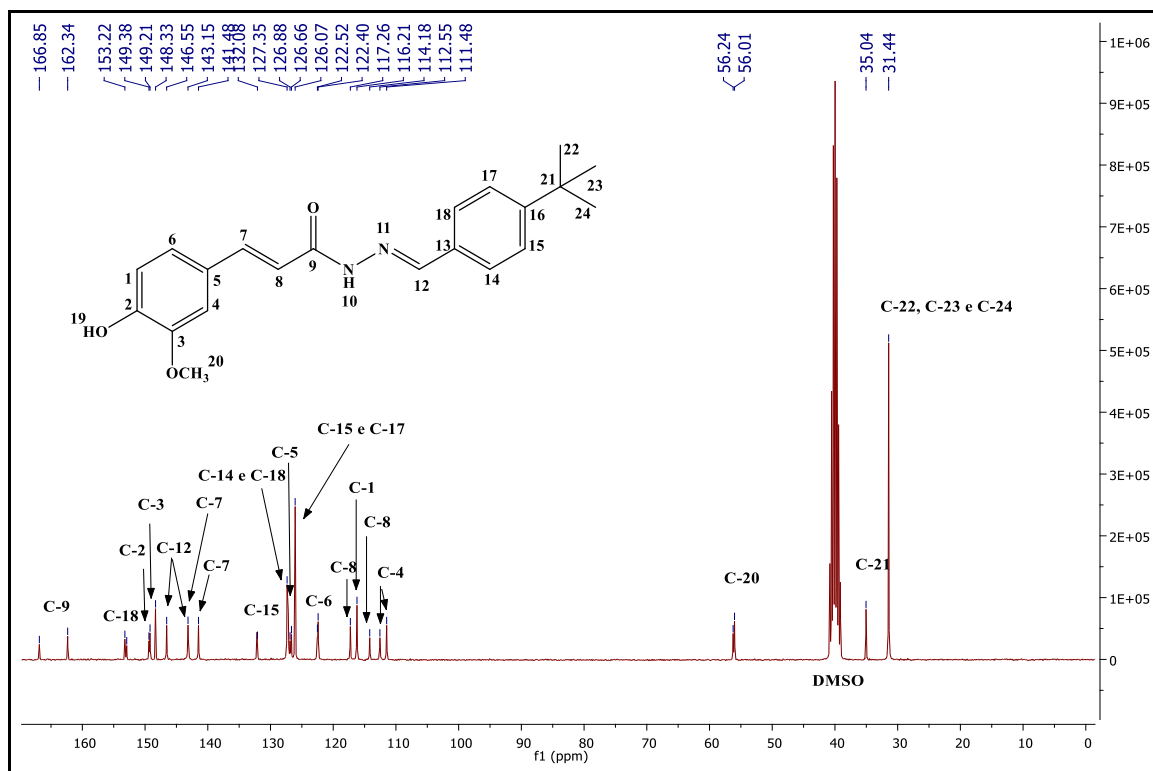
Fonte: do autor

Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 218** (300 MHz, DMSO-d_6)



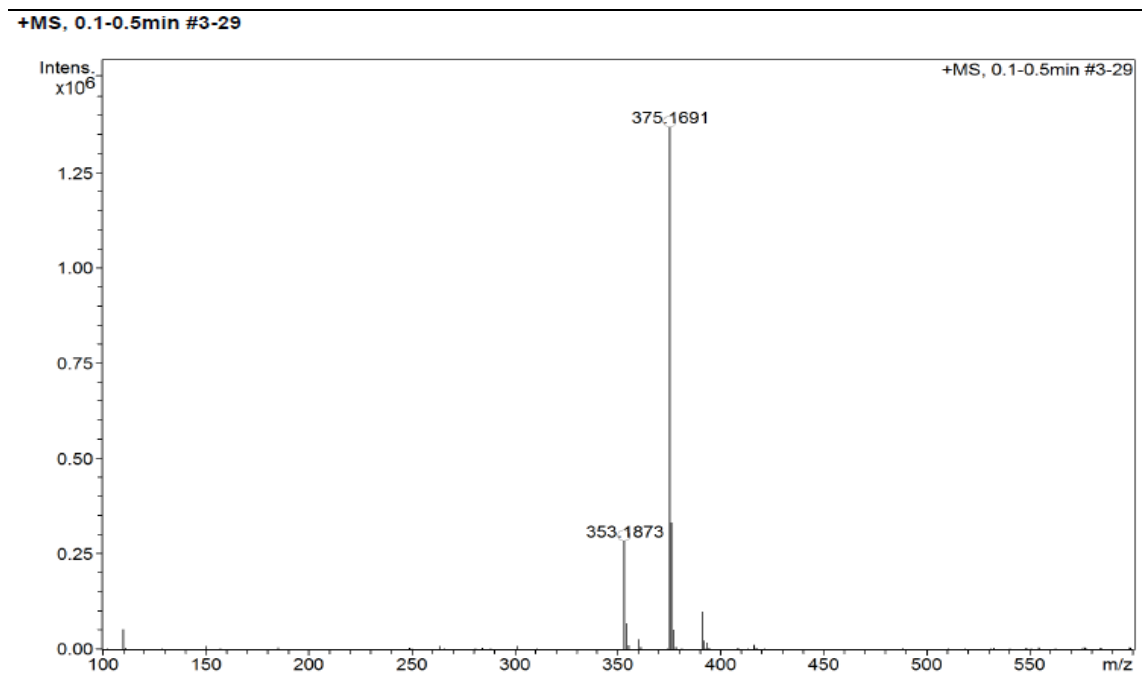
Fonte: do autor

Figura 87 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 218** (75 MHz, DMSO-d_6)



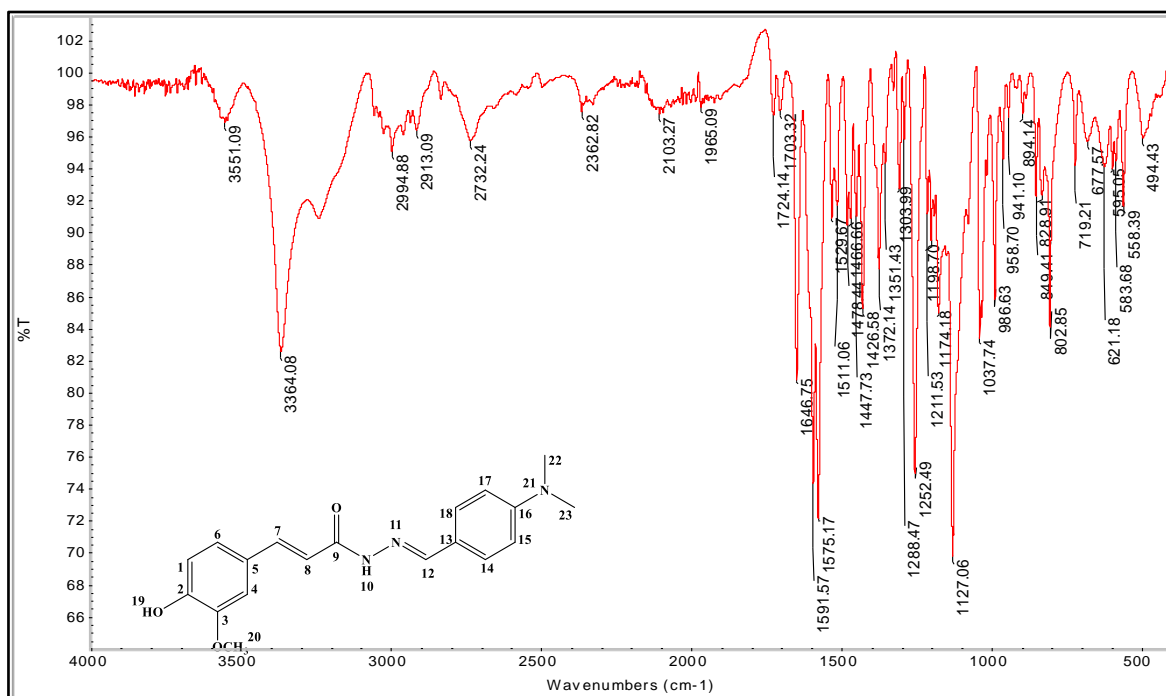
Fonte: do autor

Figura 88 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 218**



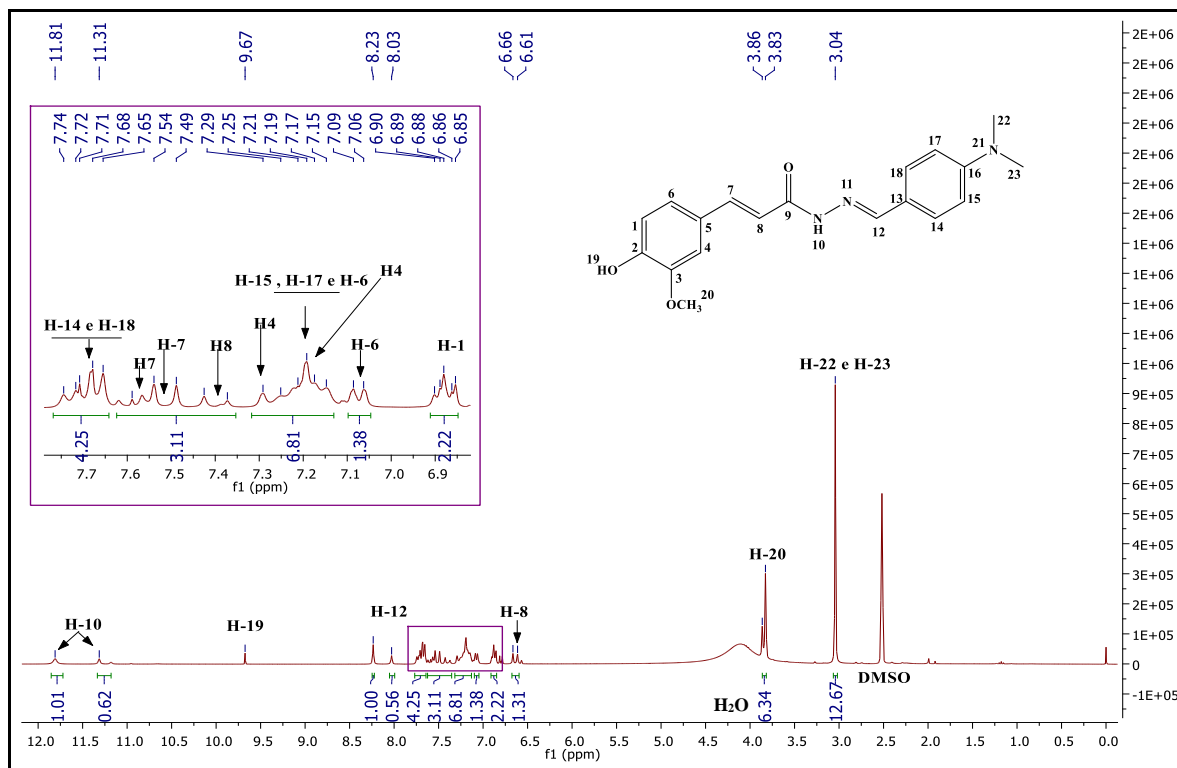
Fonte: do autor

Figura 89 - Espectro na região do infravermelho de PQM 219



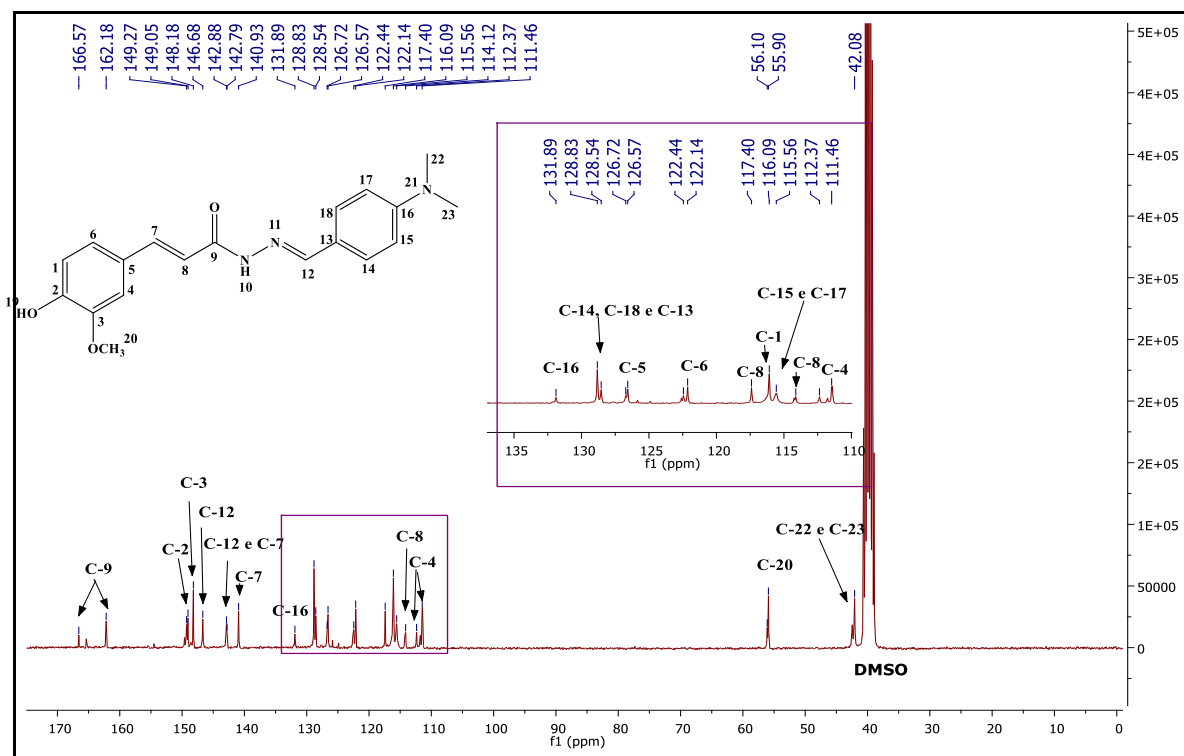
Fonte: do autor

Figura 90 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 219 (300 MHz, DMSO-d₆)



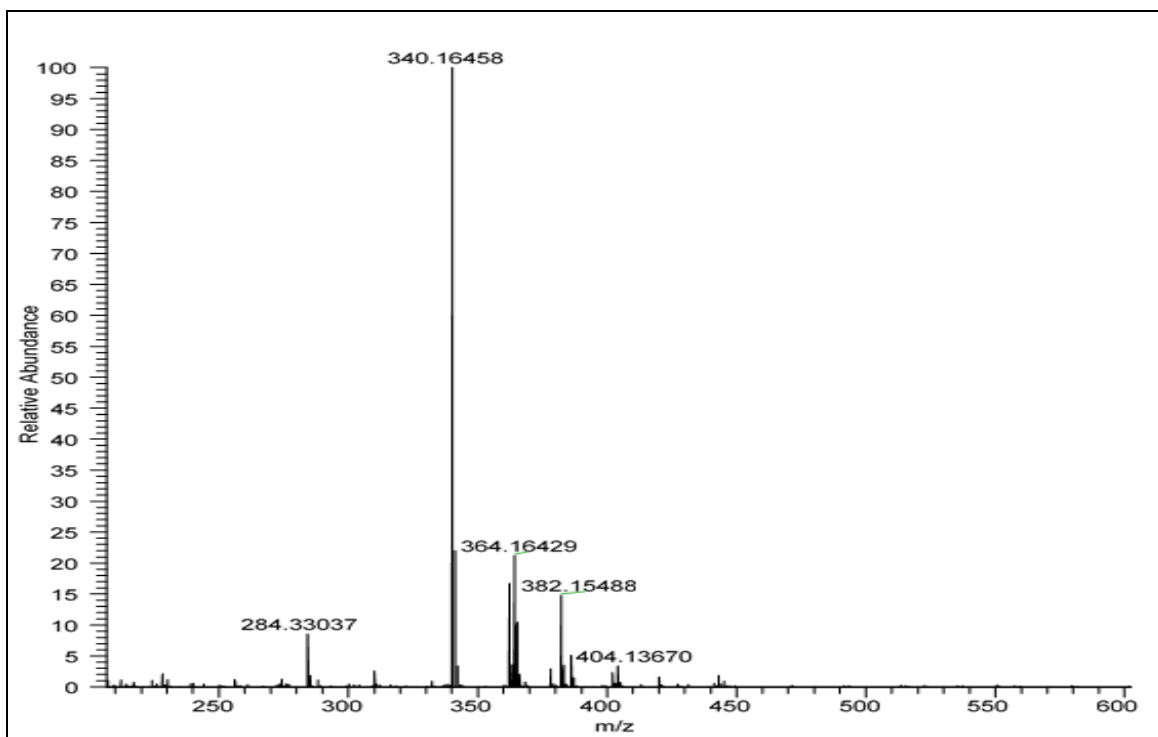
Fonte: do autor

Figura 91 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 219** (75 MHz, DMSO-d_6)



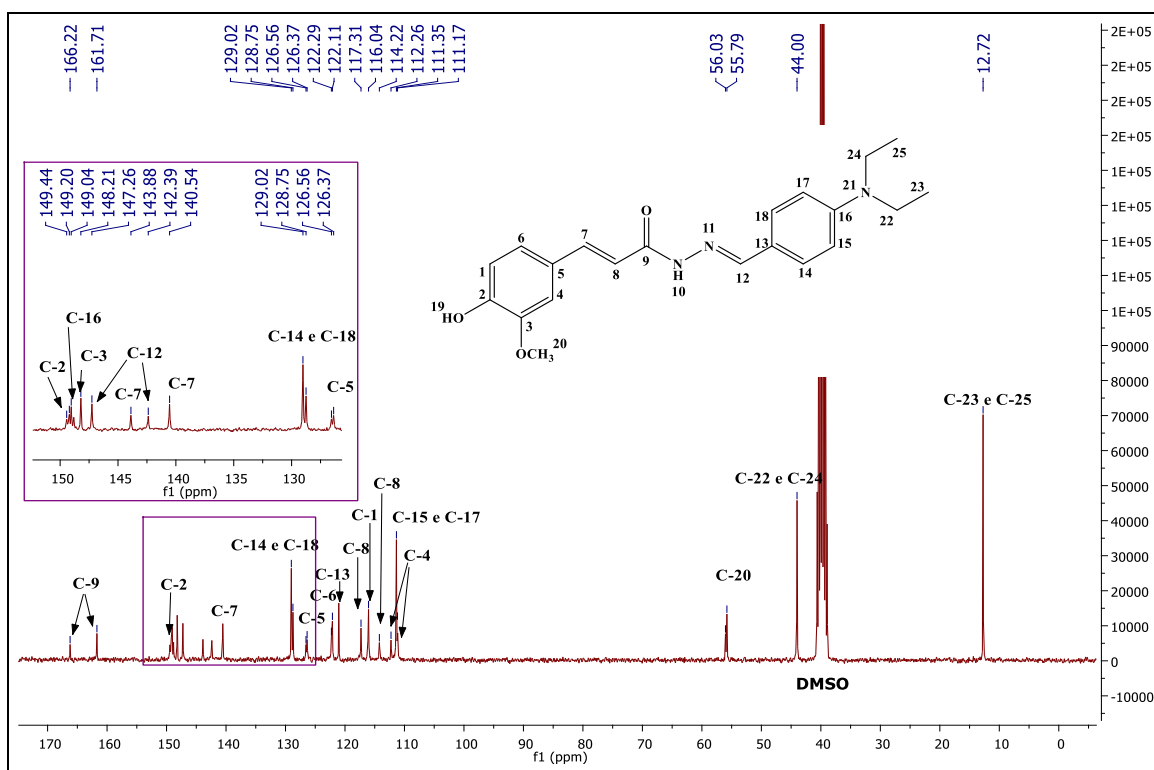
Fonte: do autor

Figura 92 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 219**



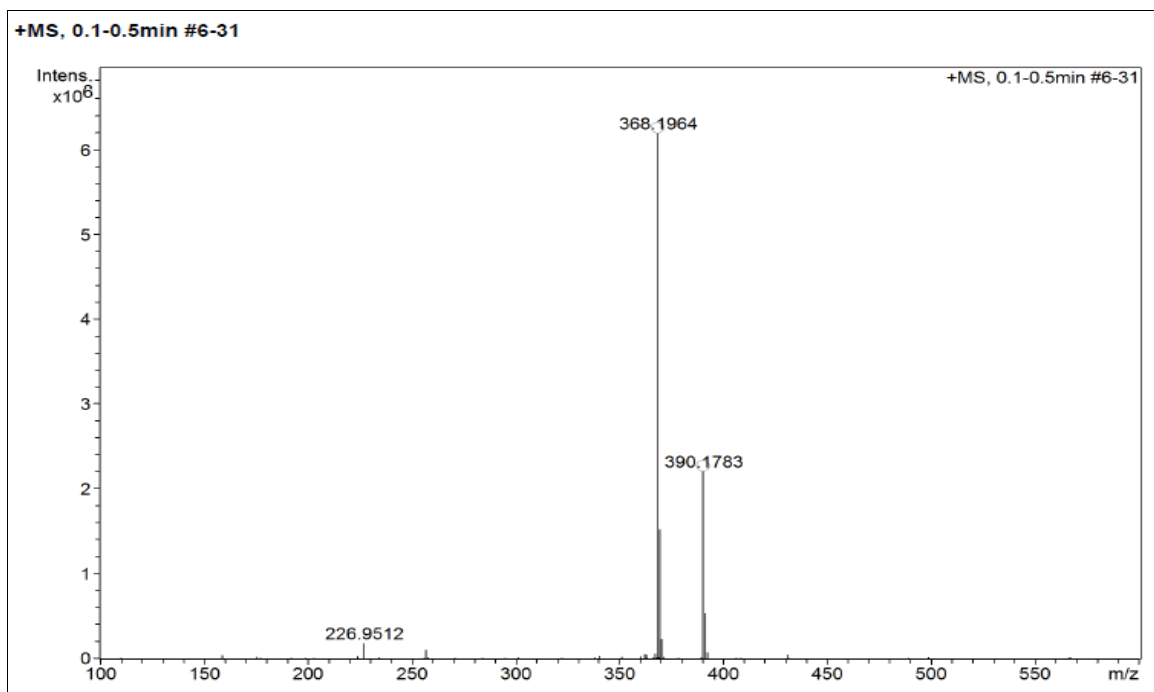
Fonte: do autor

Figura 95 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 220** (75 MHz, DMSO-d_6)



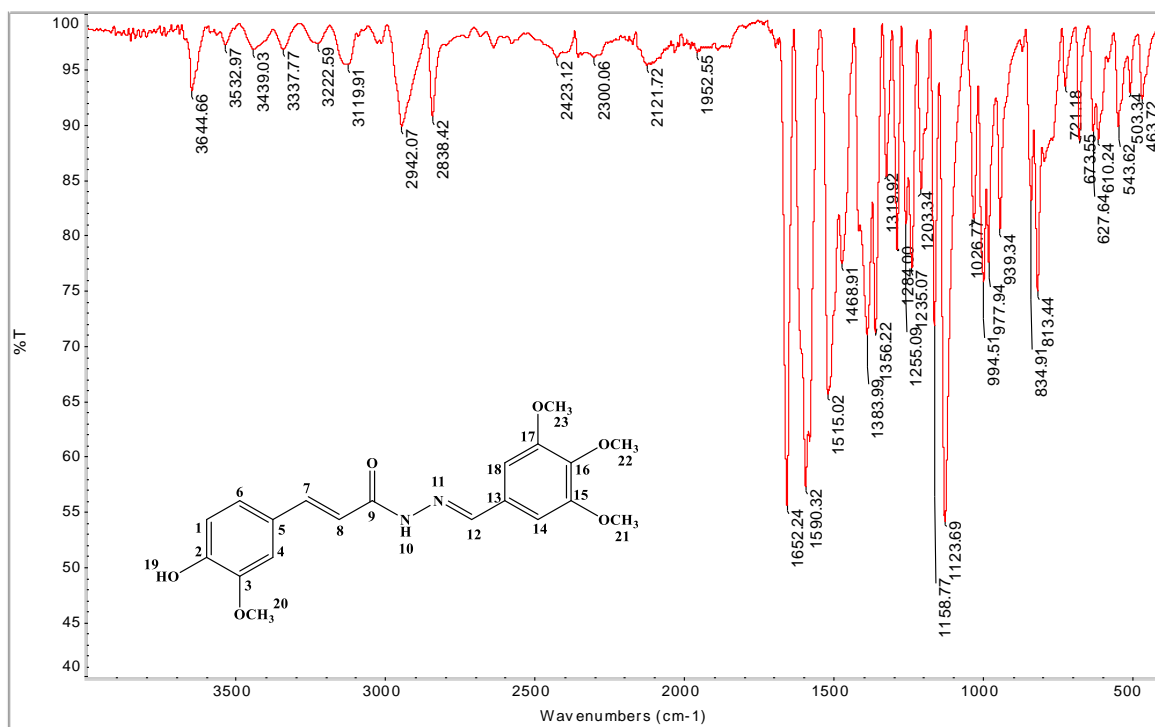
Fonte: do autor

Figura 96 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 220**



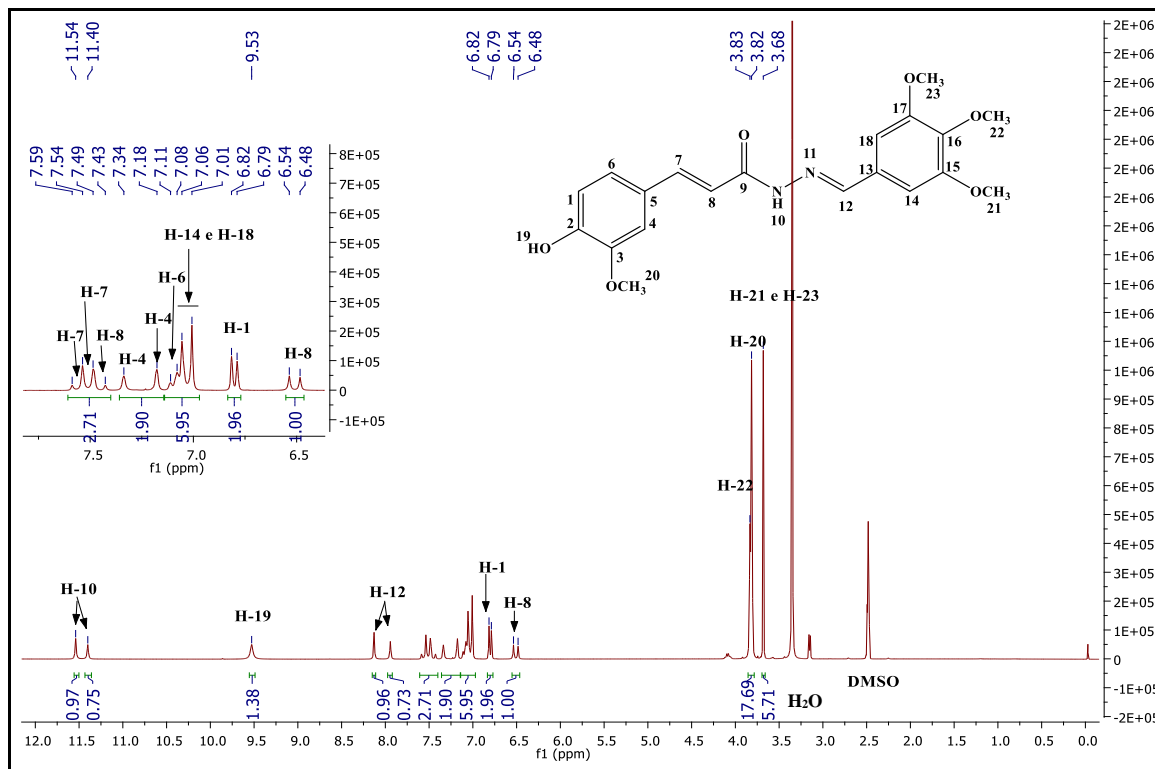
Fonte: do autor

Figura 97 - Espectro na região do infravermelho de PQM 221



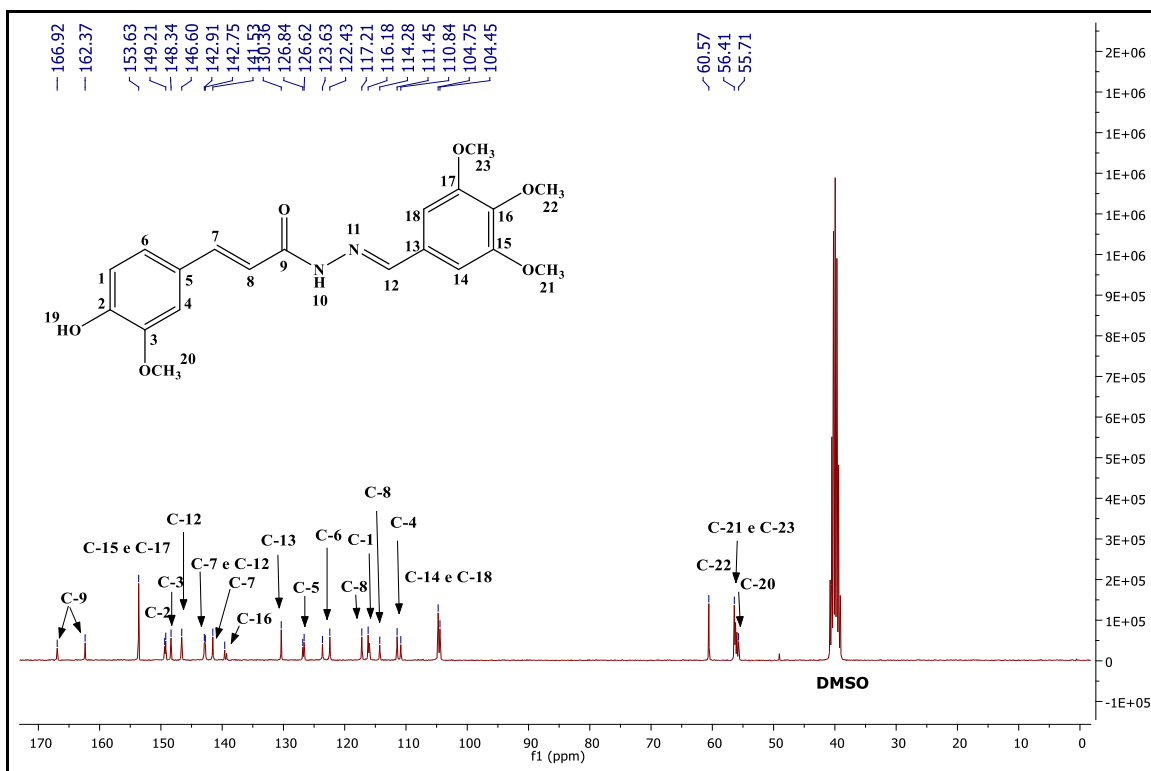
Fonte: do autor

Figura 98 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 221 (300 MHz, DMSO-d₆)



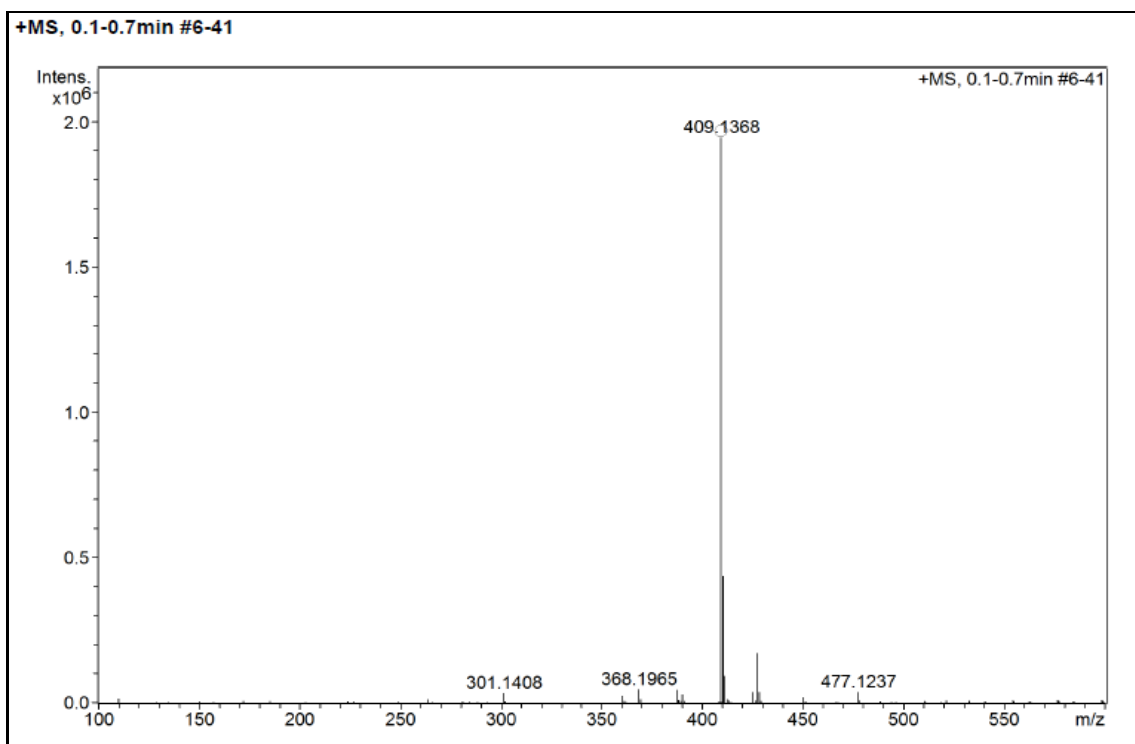
Fonte: do autor

Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 221** (75 MHz, DMSO-d_6)



Fonte: do autor

Figura 100 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 221**



Fonte: do autor

Figura 101 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 222**

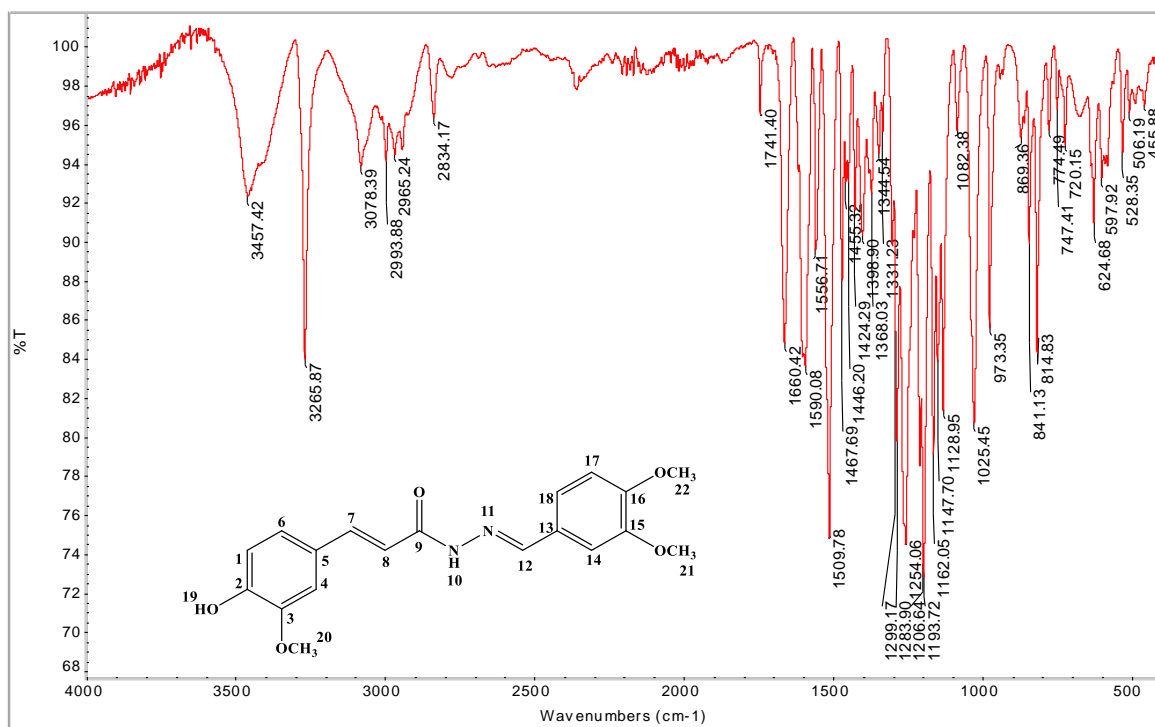


Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H do composto **PQM 222** (300 MHz, DMSO-d_6)

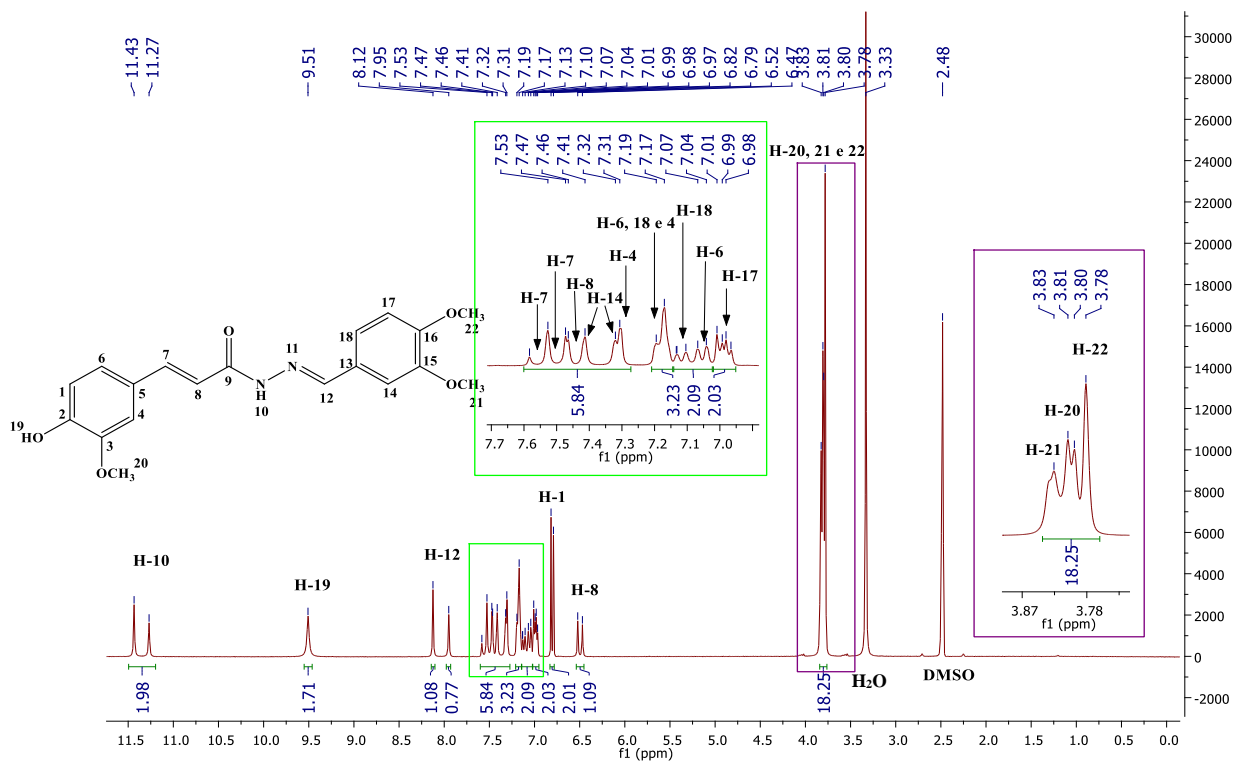
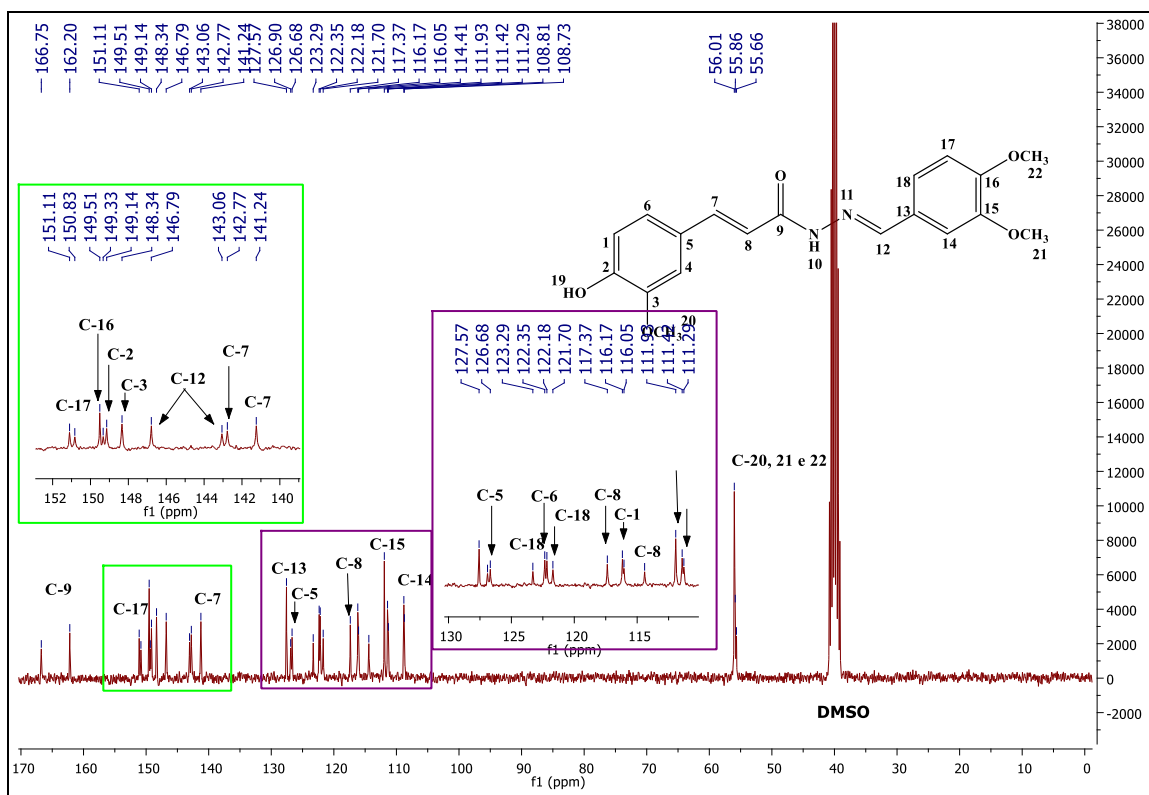
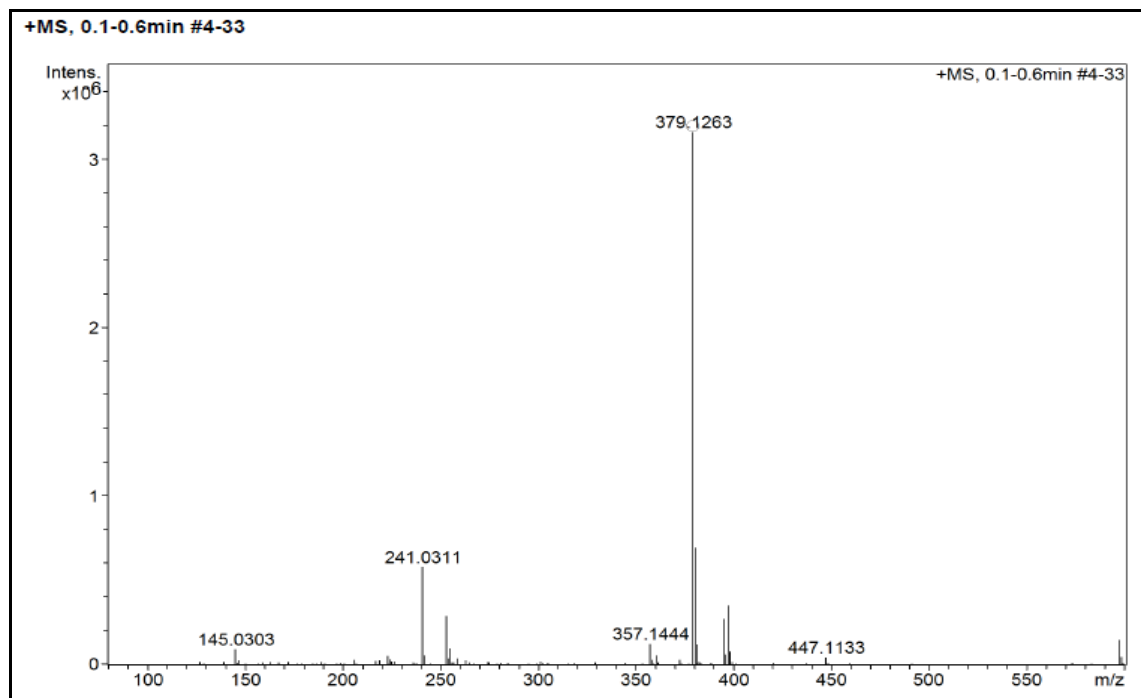


Figura 103 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 222** (75 MHz, DMSO-d_6)



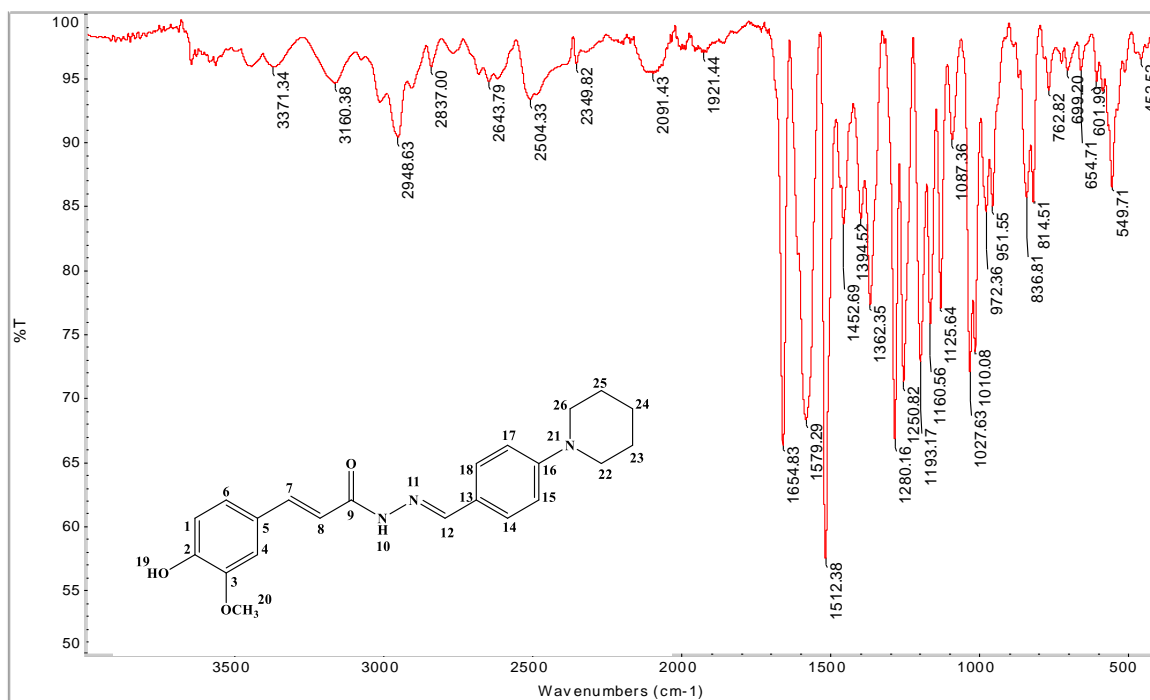
Fonte: do autor

Figura 104 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 222**



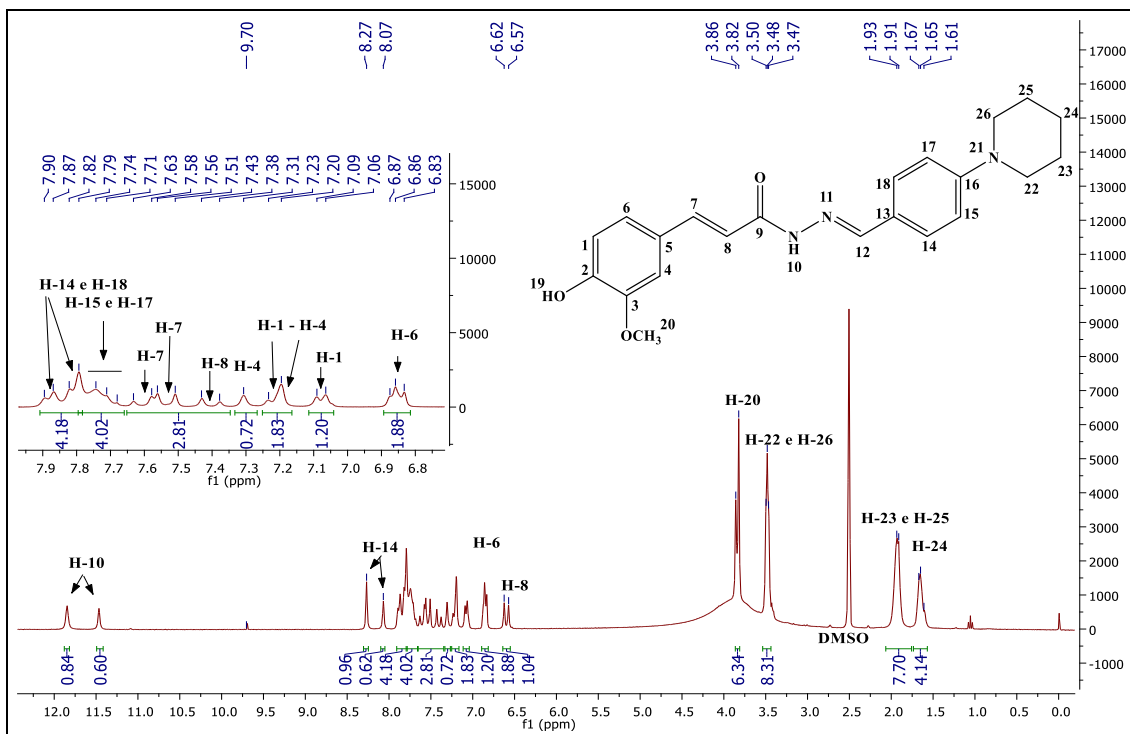
Fonte: do autor

Figura 105 - Espectro na região do infravermelho de PQM 223



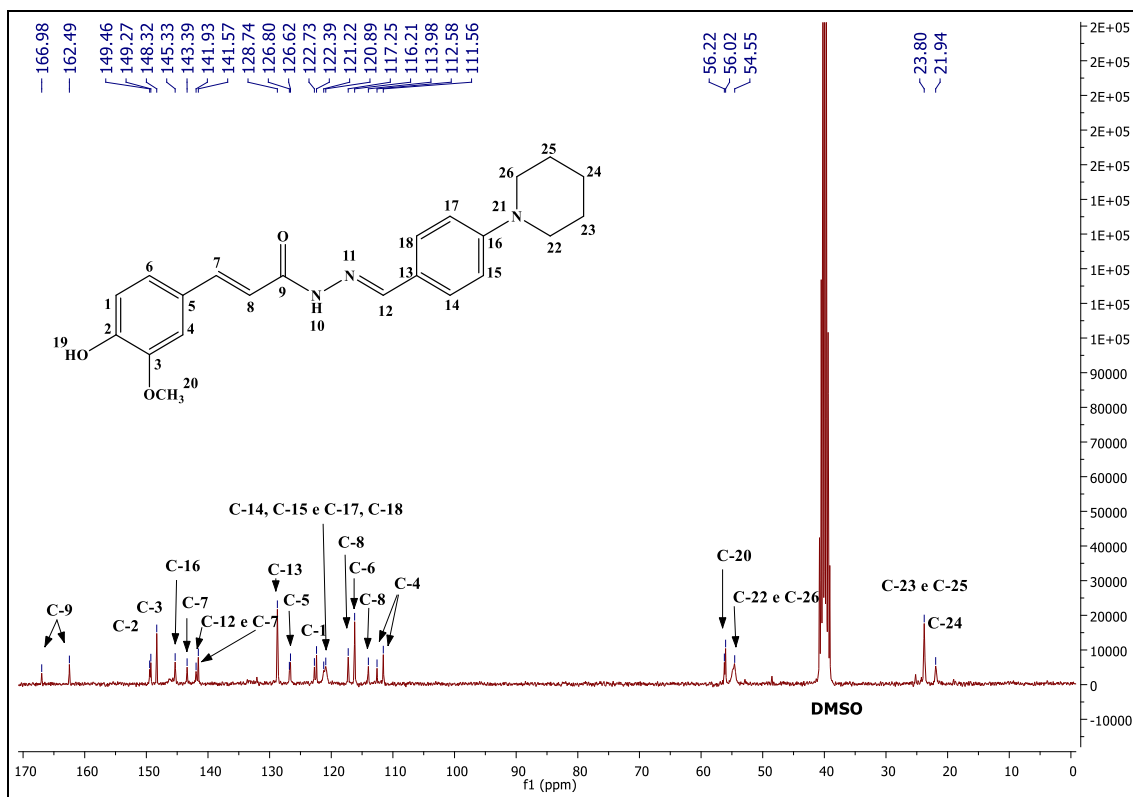
Fonte: do autor

Figura 106 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 223 (300 MHz, DMSO-d₆)



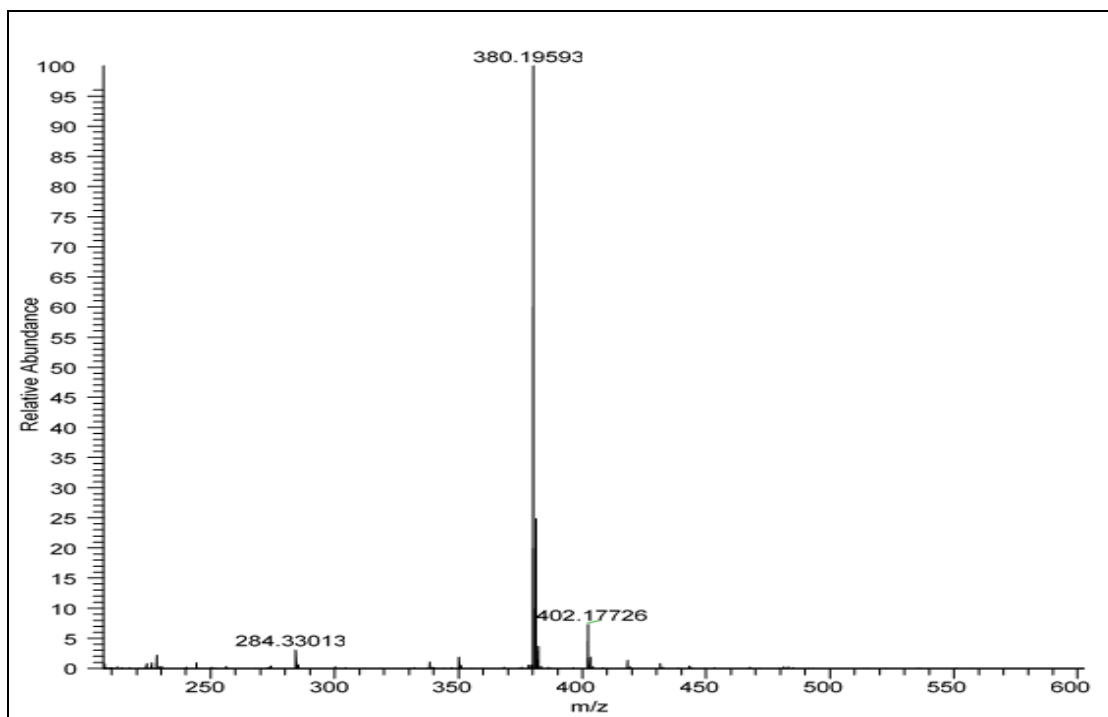
Fonte: do autor

Figura 107 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 223** (75 MHz, DMSO-d_6)



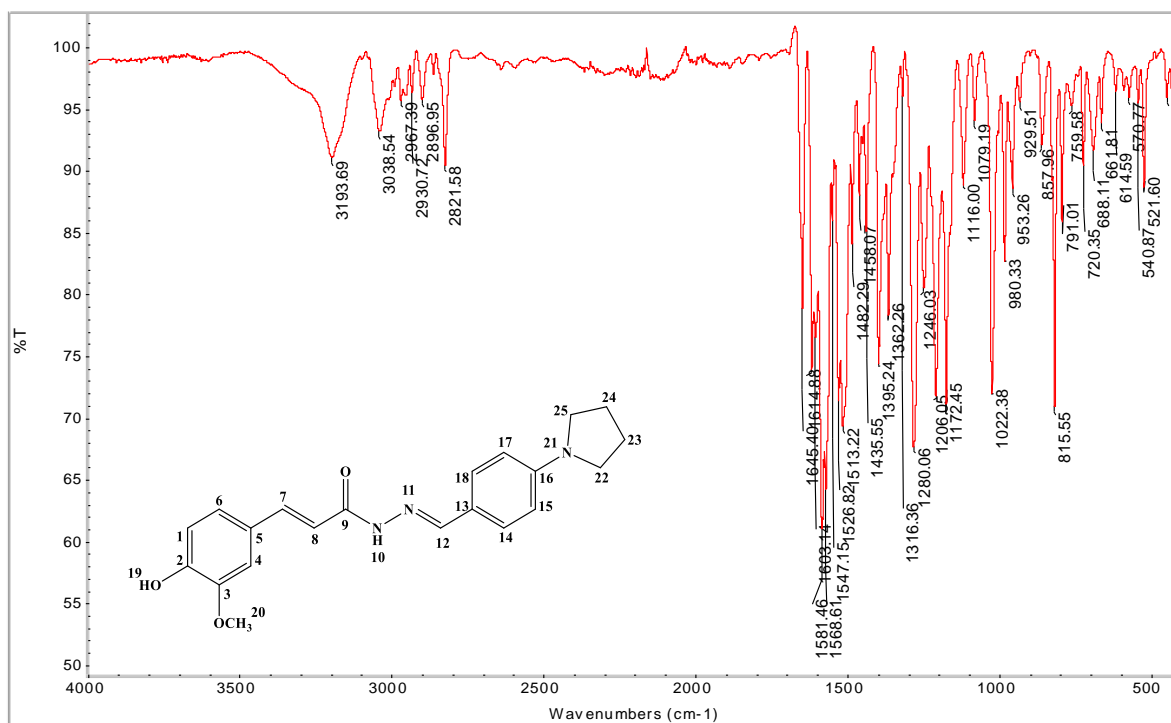
Fonte: do autor

Figura 108 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 223**



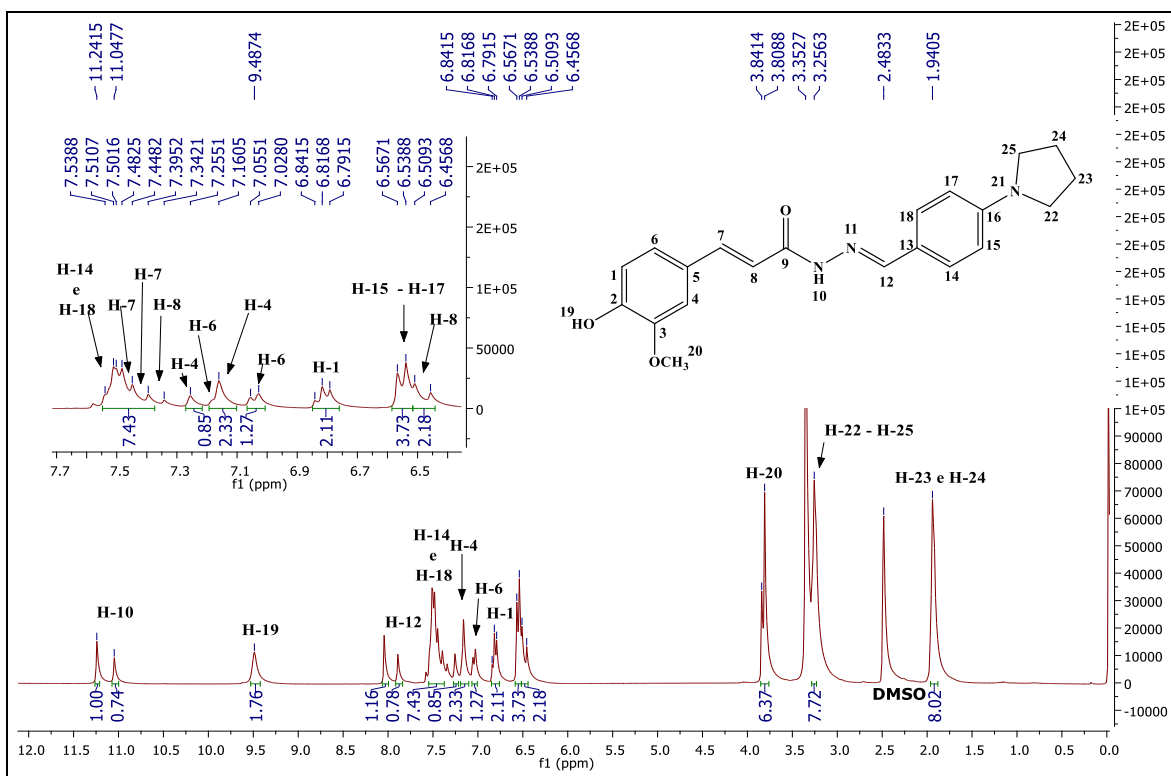
Fonte: do autor

Figura 109 - Espectro na região do infravermelho de PQM 224



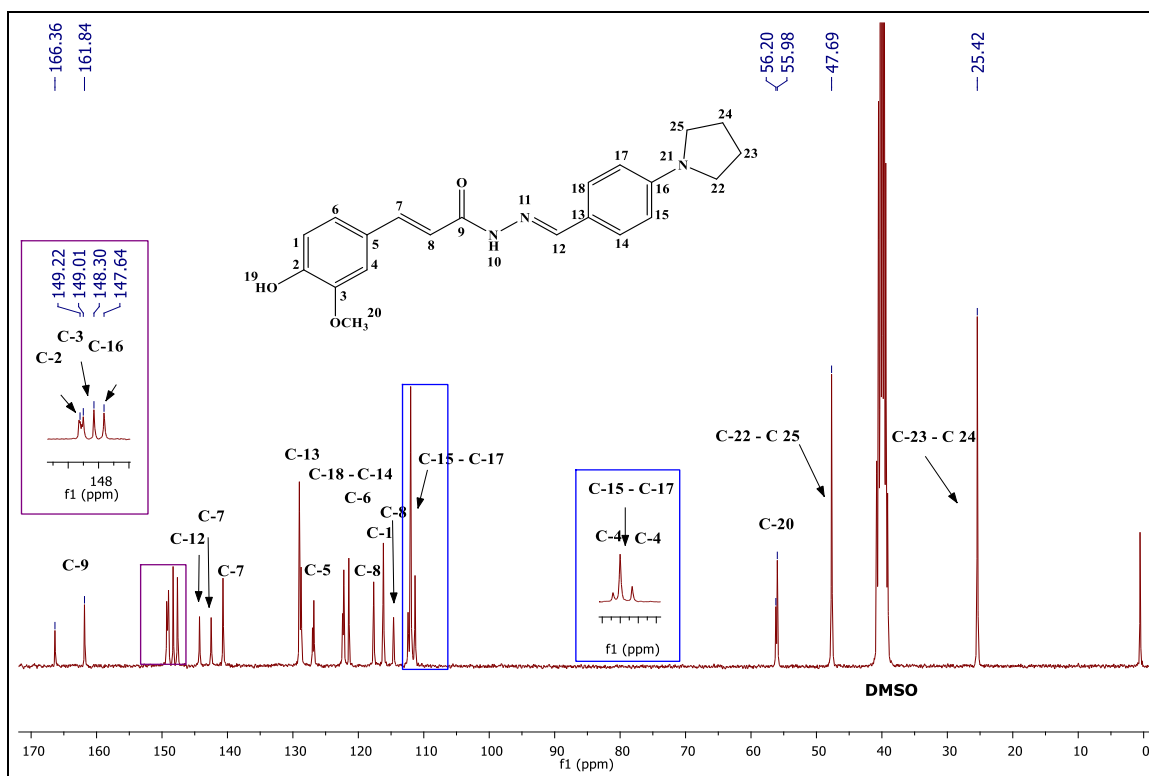
Fonte: do autor

Figura 110 - Espectro de RMN de ^1H do composto PQM 224 (300 MHz, DMSO- d_6)



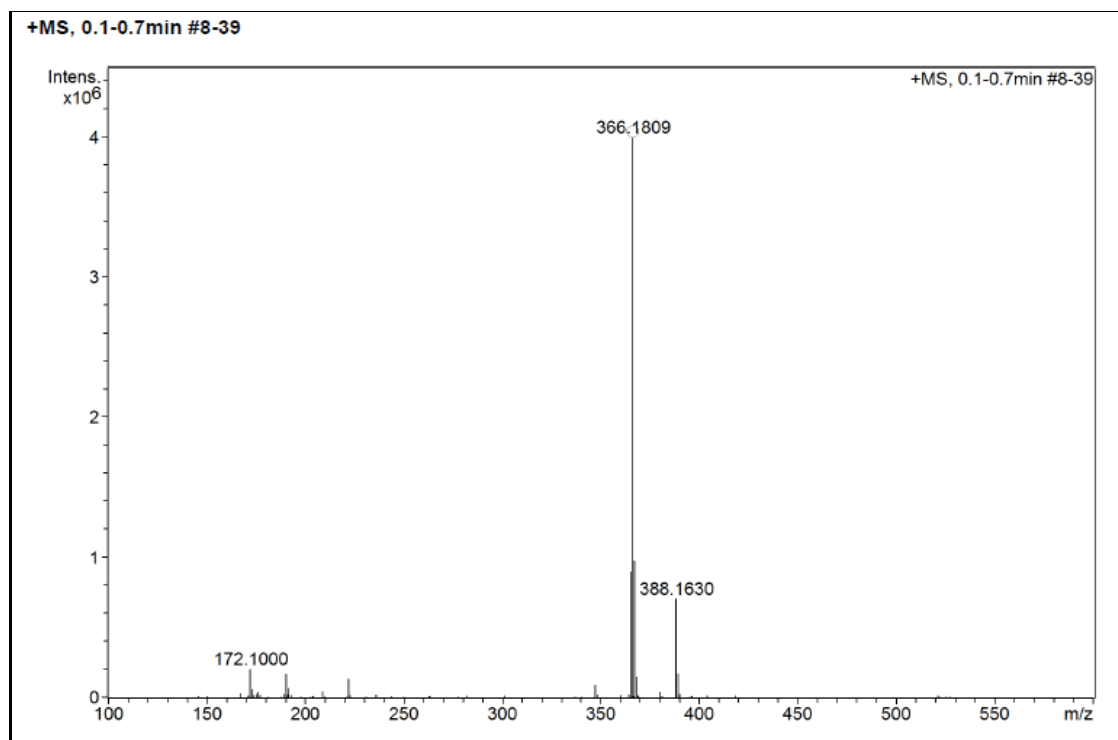
Fonte: do autor

Figura 111 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 224** (75 MHz, DMSO-d_6)



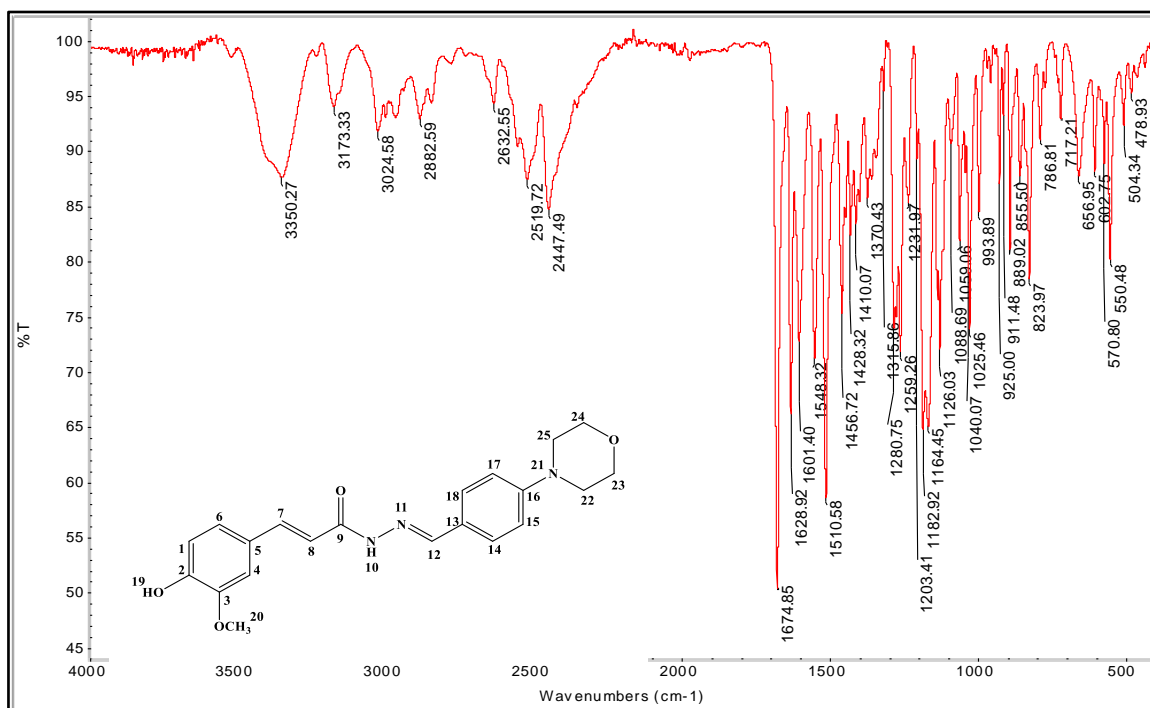
Fonte: do autor

Figura 112 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 224**



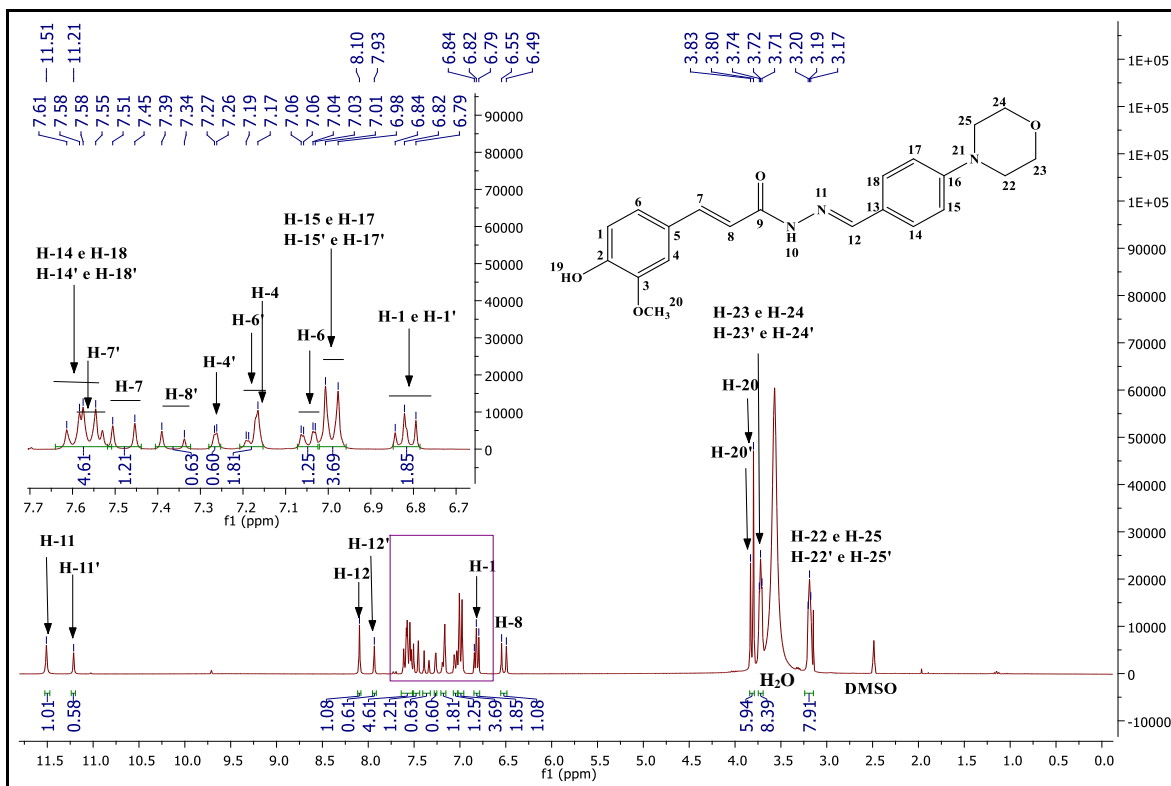
Fonte: do autor

Figura 113 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 225**



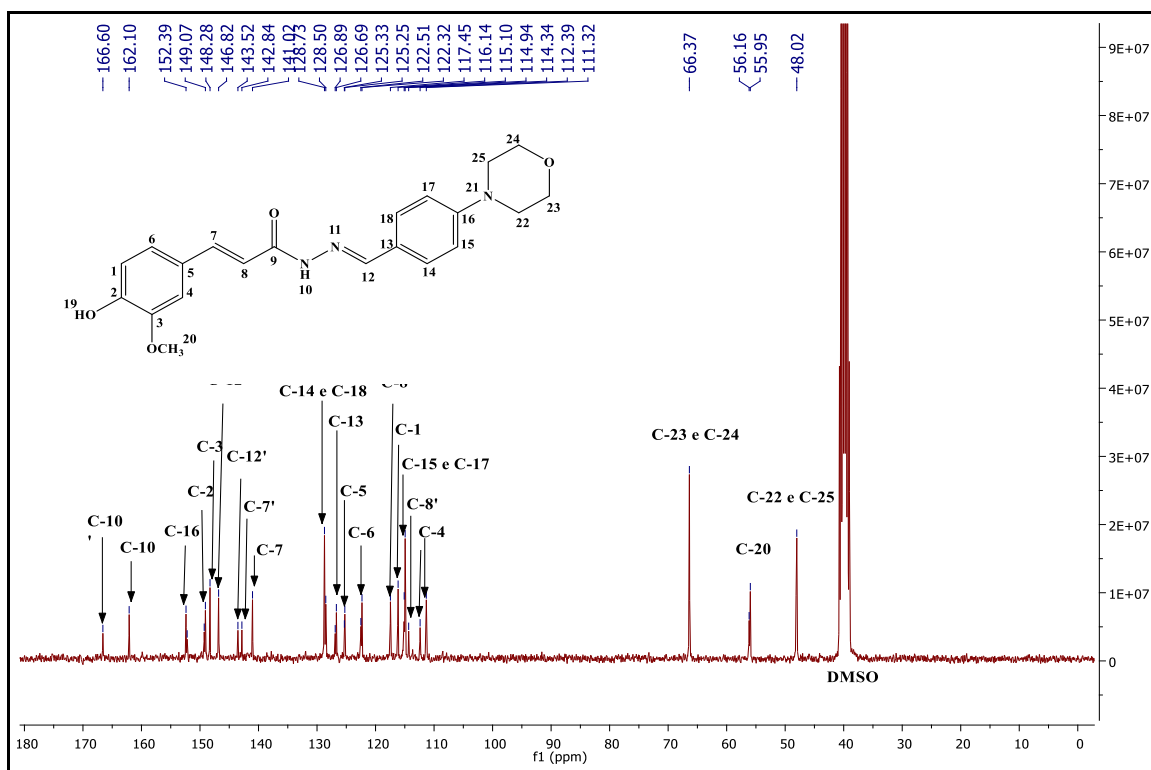
Fonte: do autor

Figura 114 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 225** (300 MHz, DMSO-d₆)



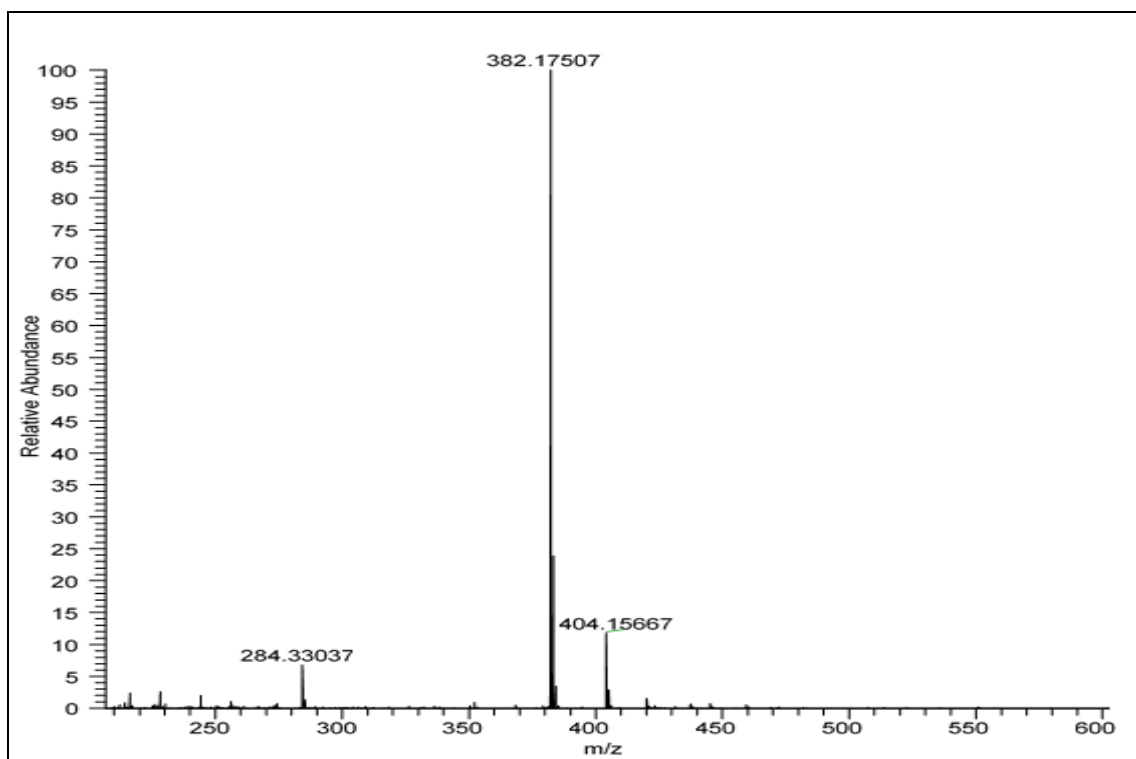
Fonte: do autor

Figura 115 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 225** (75 MHz, DMSO-d_6)



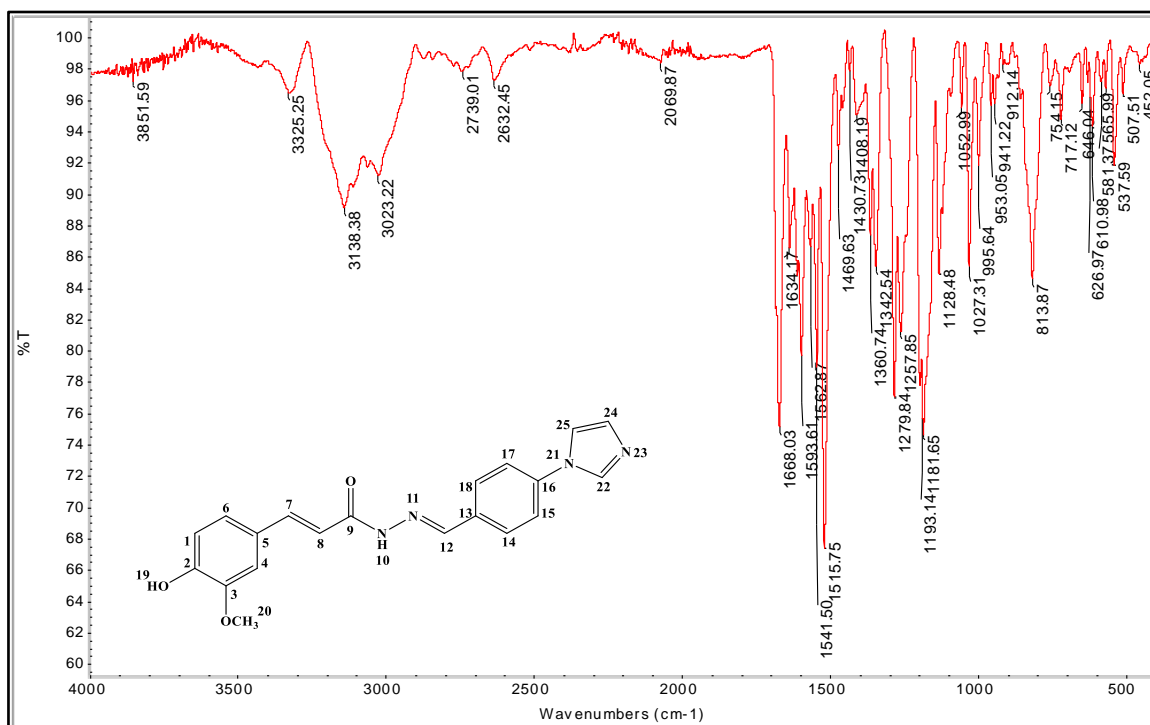
Fonte: do autor

Figura 116 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 225**



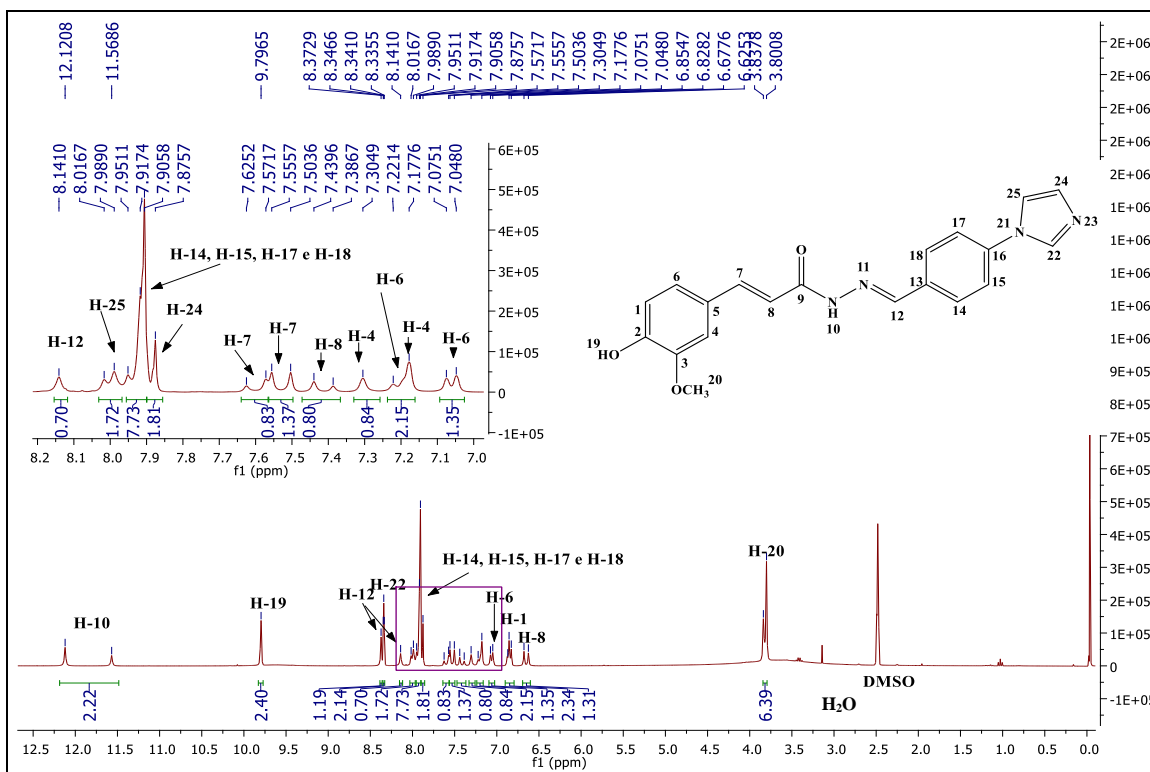
Fonte: do autor

Figura 117 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 226**



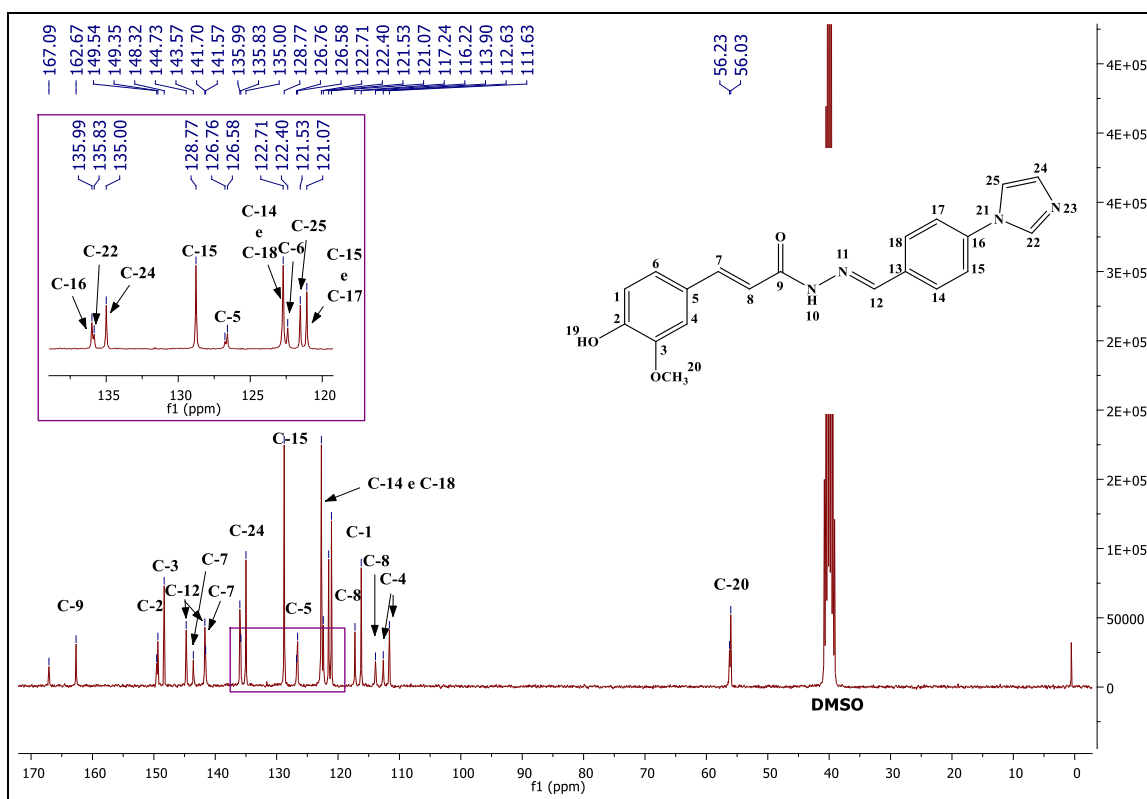
Fonte: do autor

Figura 118 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 226** (300 MHz, DMSO-d₆)



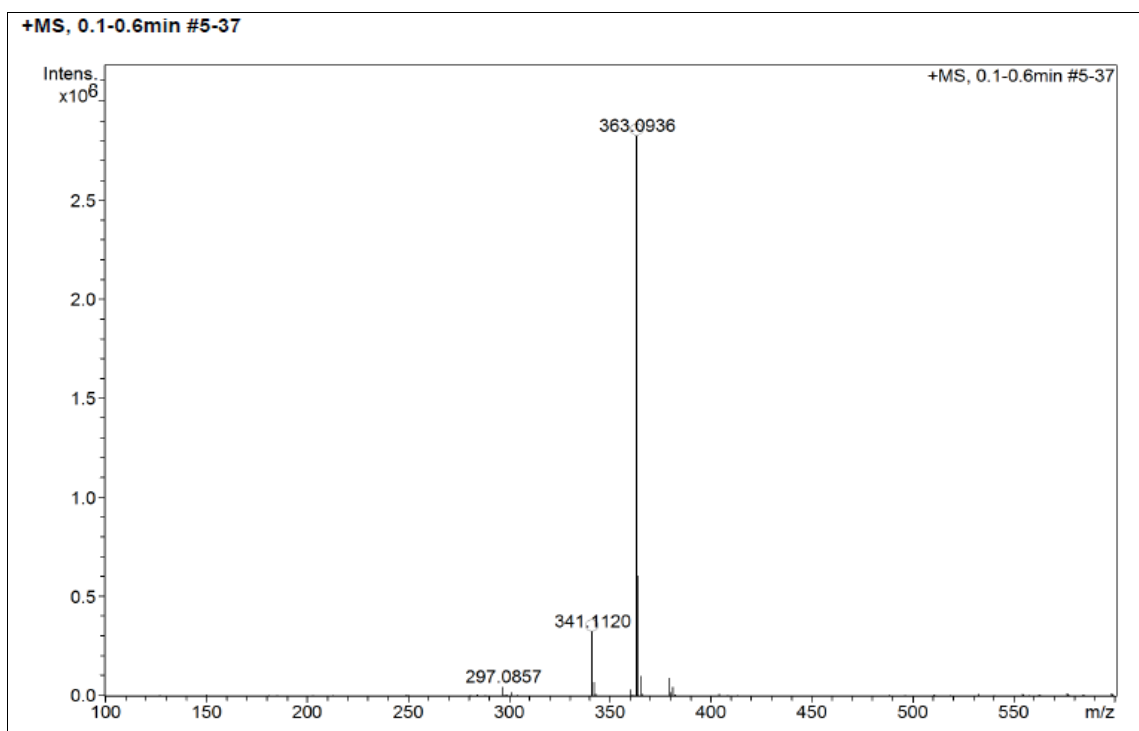
Fonte: do autor

Figura 119 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 226** (75 MHz, DMSO-d_6)



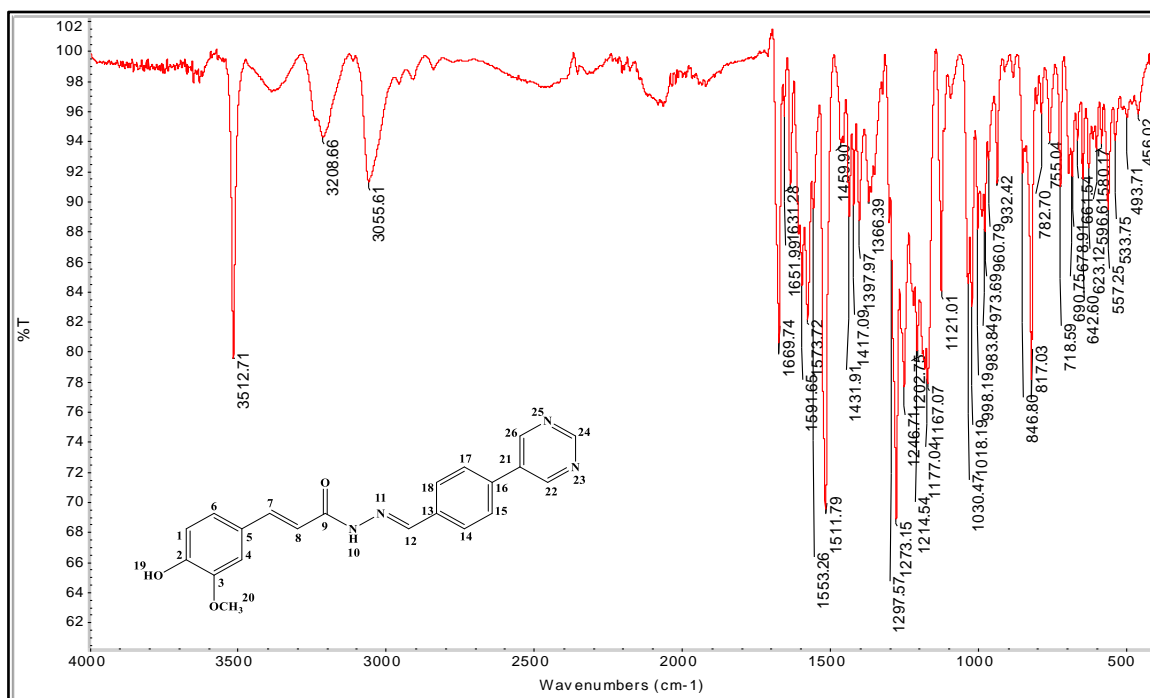
Fonte: do autor

Figura 120 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 226**



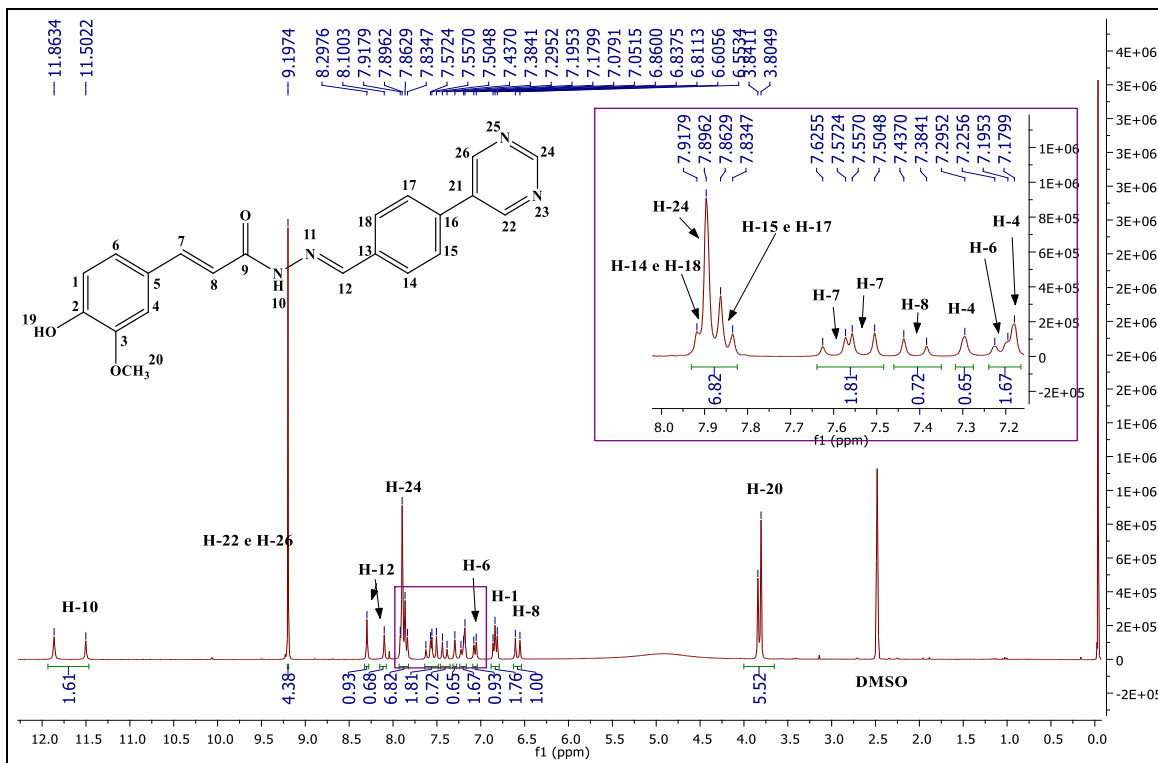
Fonte: do autor

Figura 121 - Espectro na região do infravermelho de PQM 227

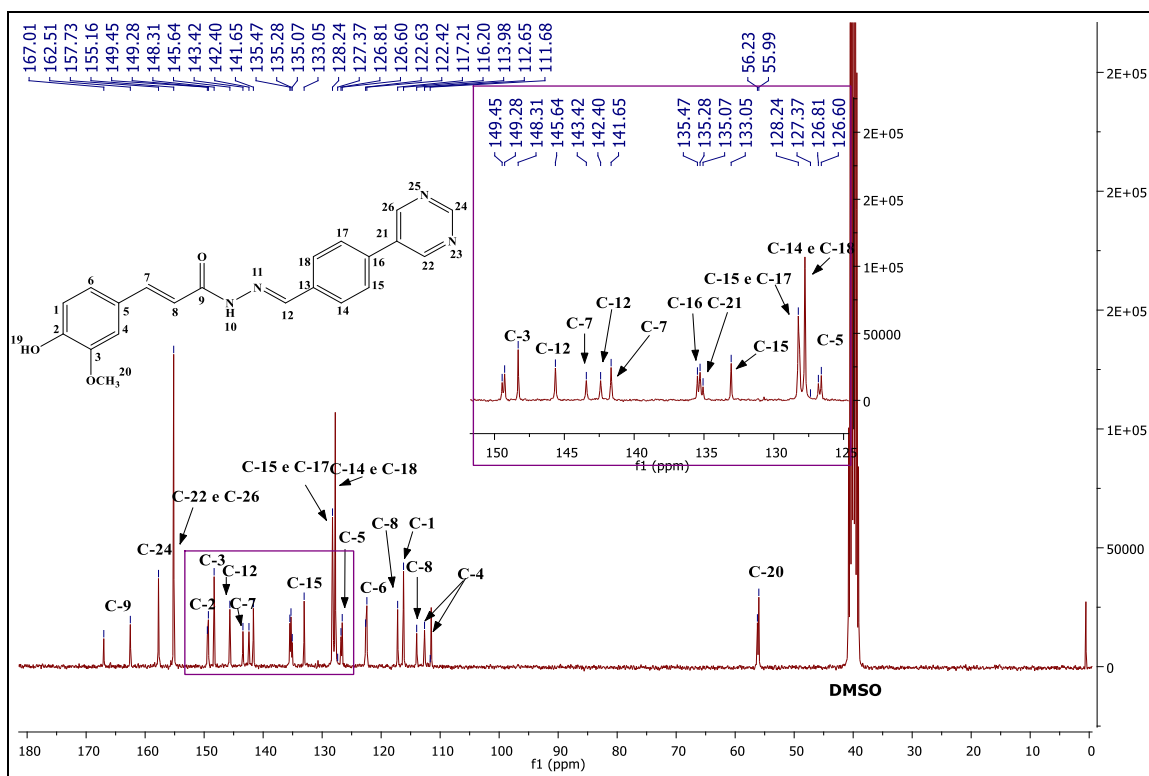


Fonte: do autor

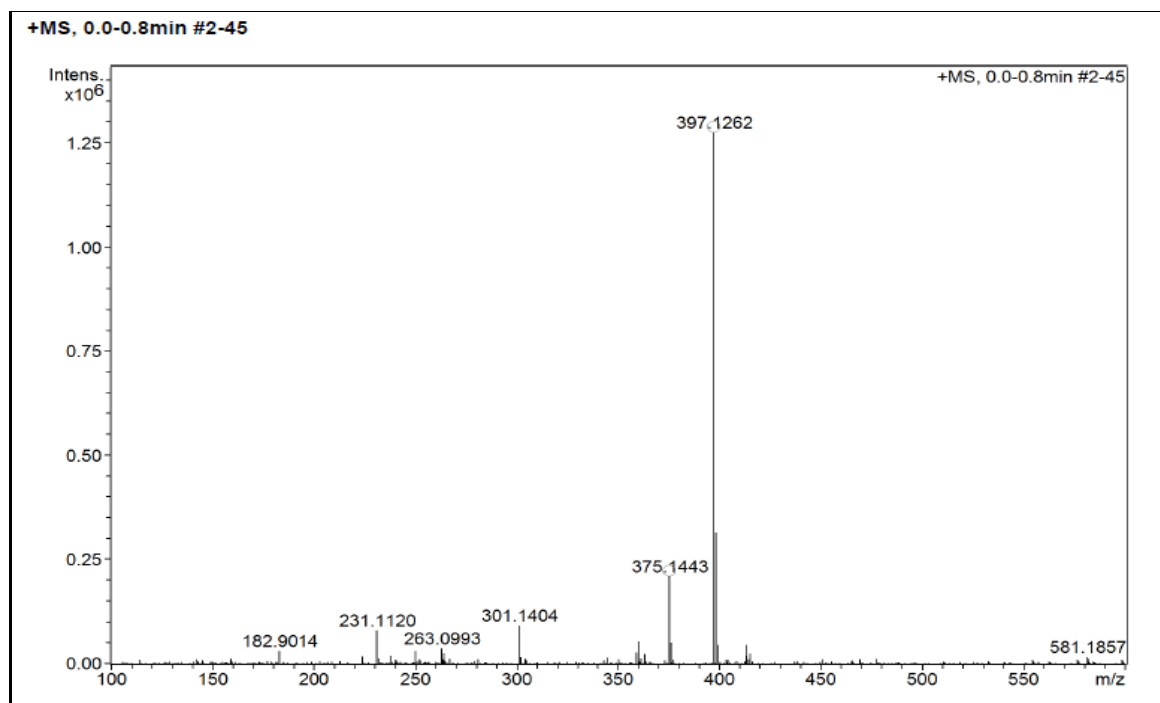
Figura 122 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 227 (300 MHz, DMSO-d₆)



Fonte: do autor

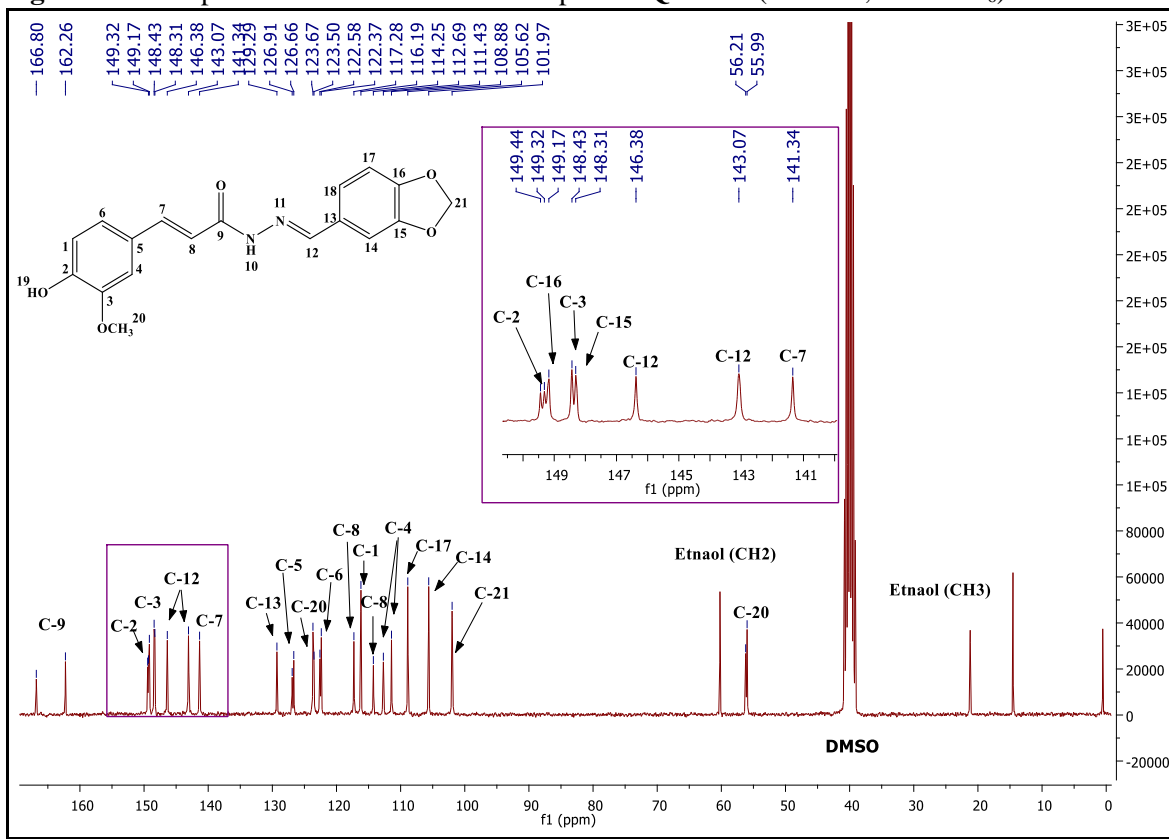
Figura 123 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 227** (75 MHz, DMSO-d_6)

Fonte: do autor

Figura 124 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 227**

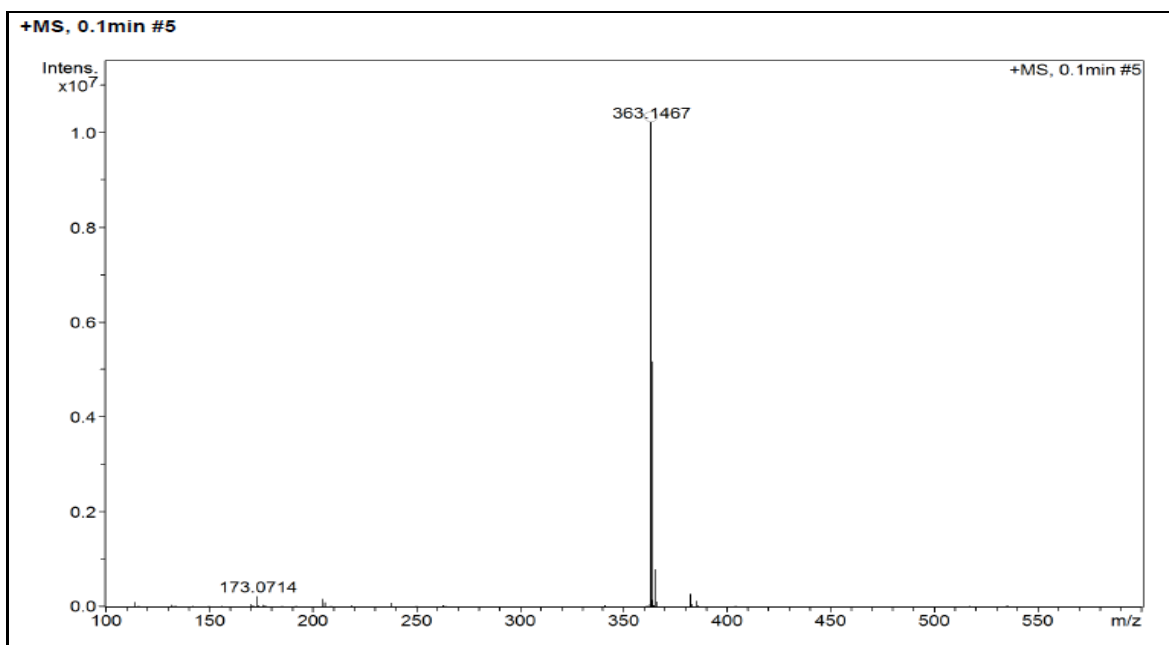
Fonte: do autor

Figura 127 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 228** (75 MHz, DMSO-d_6)



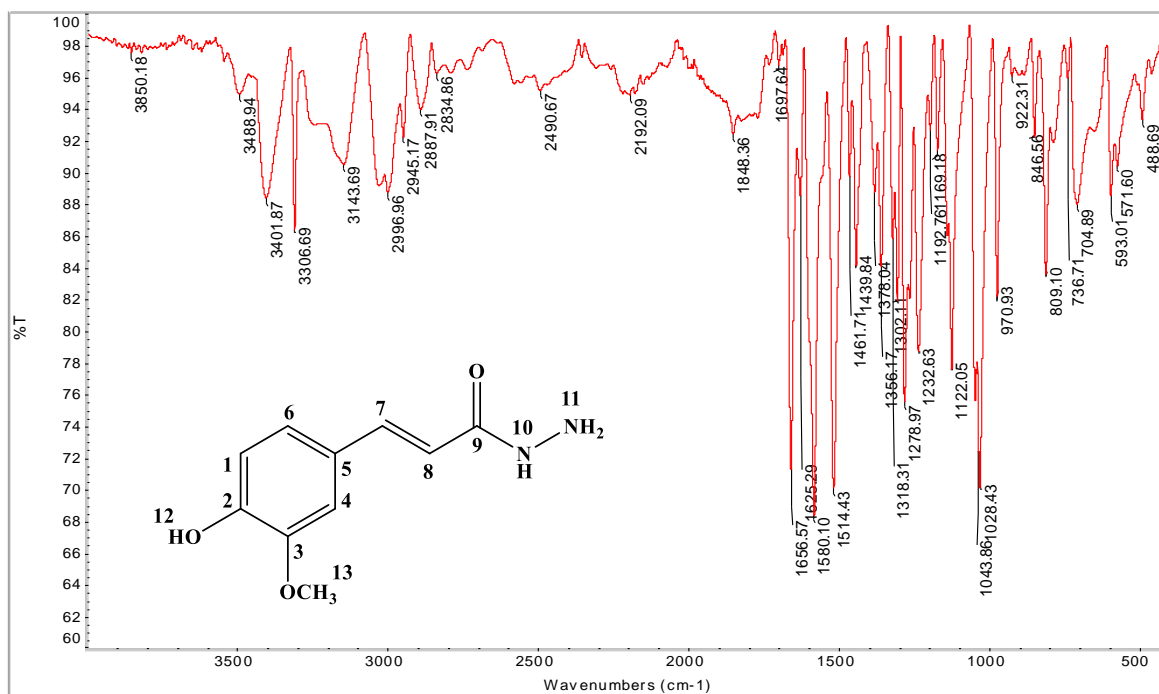
Fonte: do autor

Figura 128 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 228**



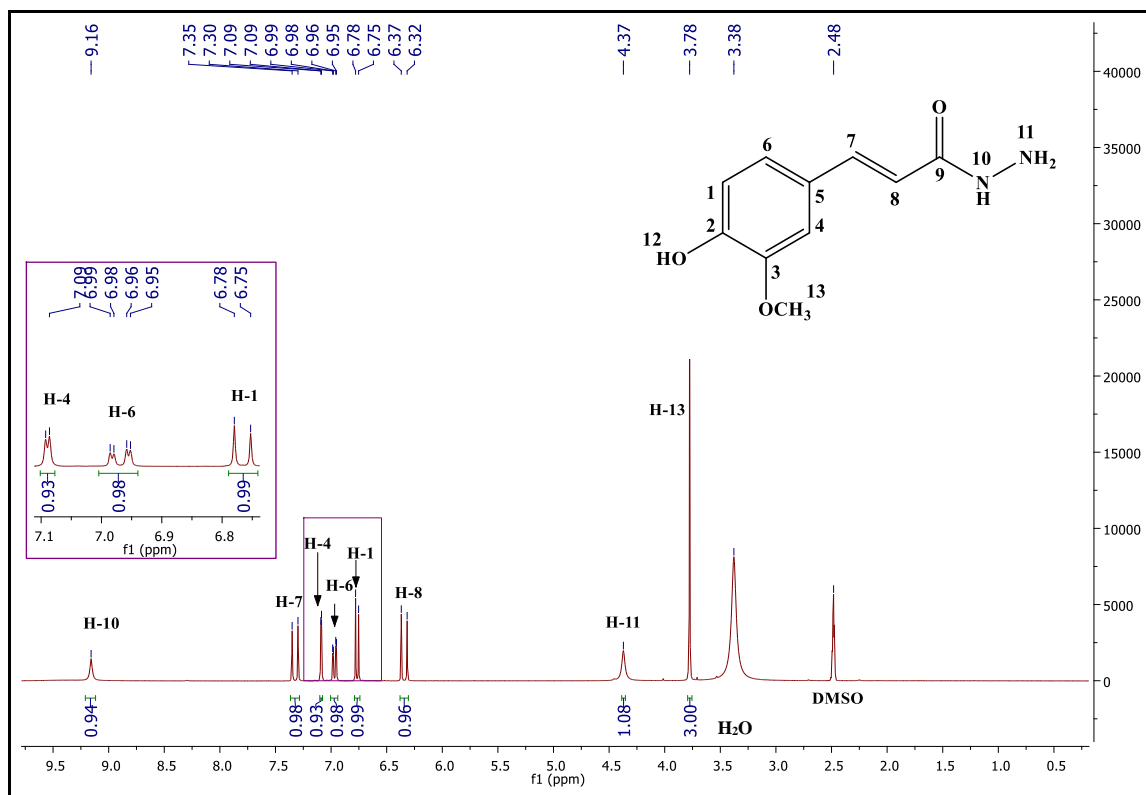
Fonte: do autor

Figura 129 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26a**



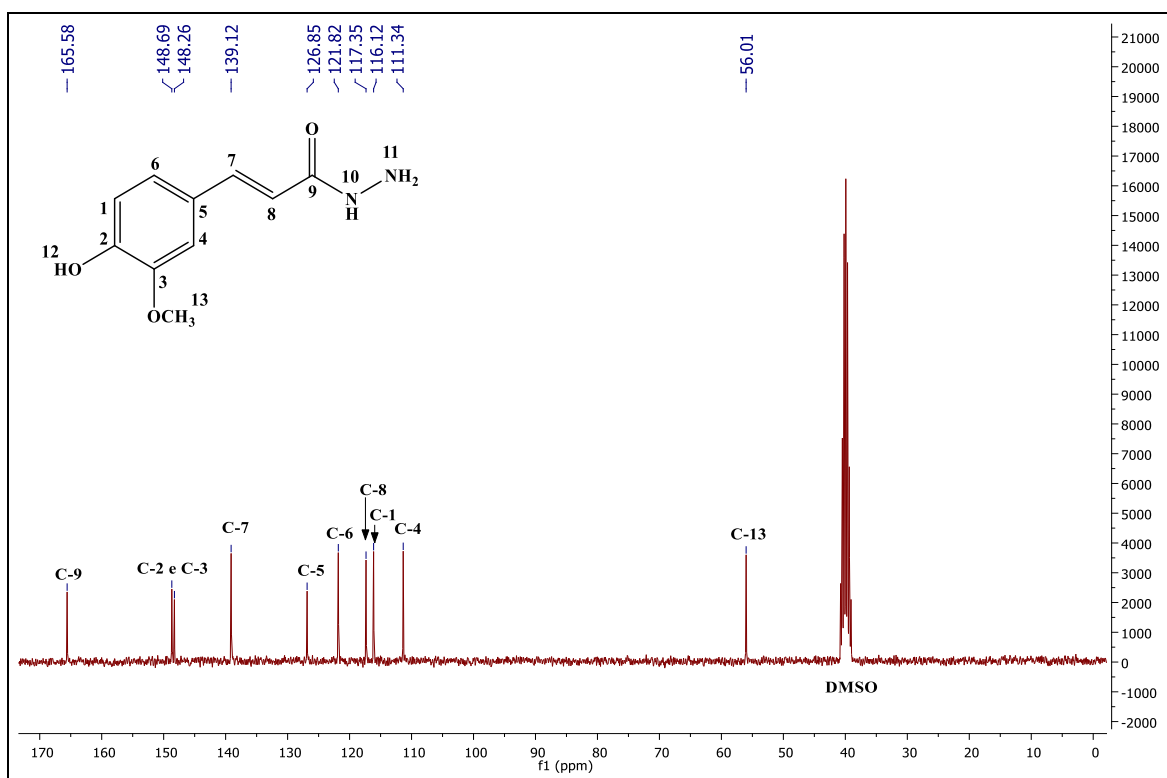
Fonte: do autor

Figura 130 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26a** (300 MHz, DMSO-d_6)



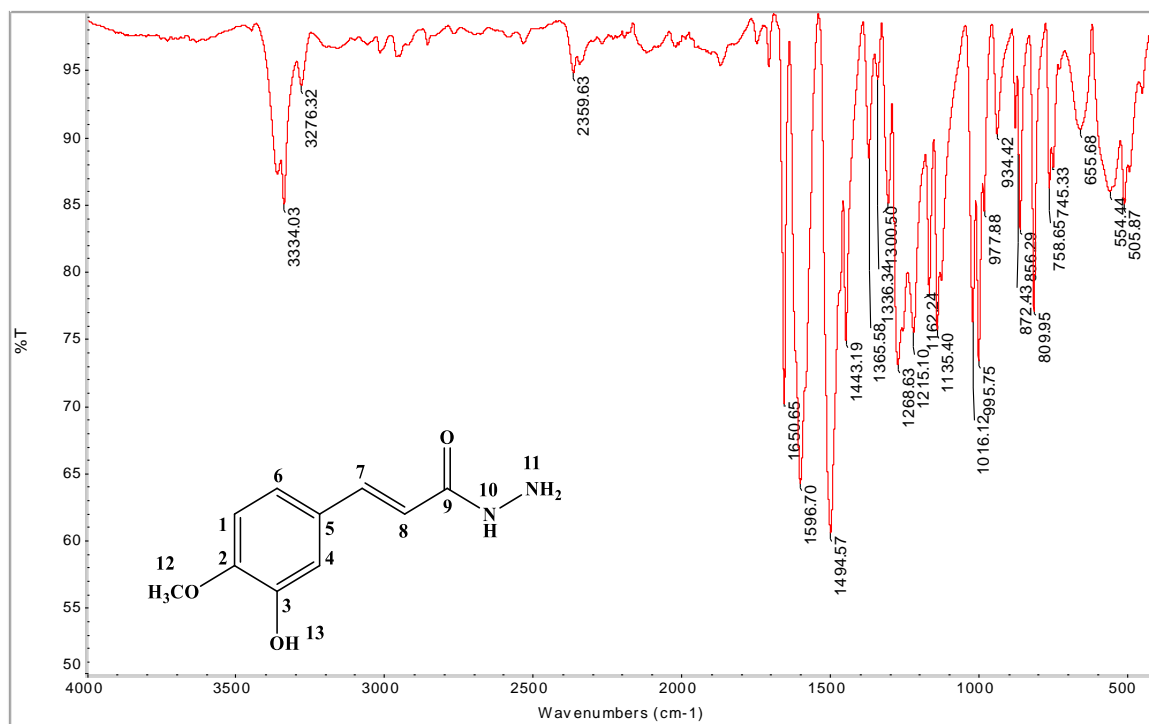
Fonte: do autor

Figura 131 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **Hidrazida 26a** (75 MHz, DMSO-d_6)



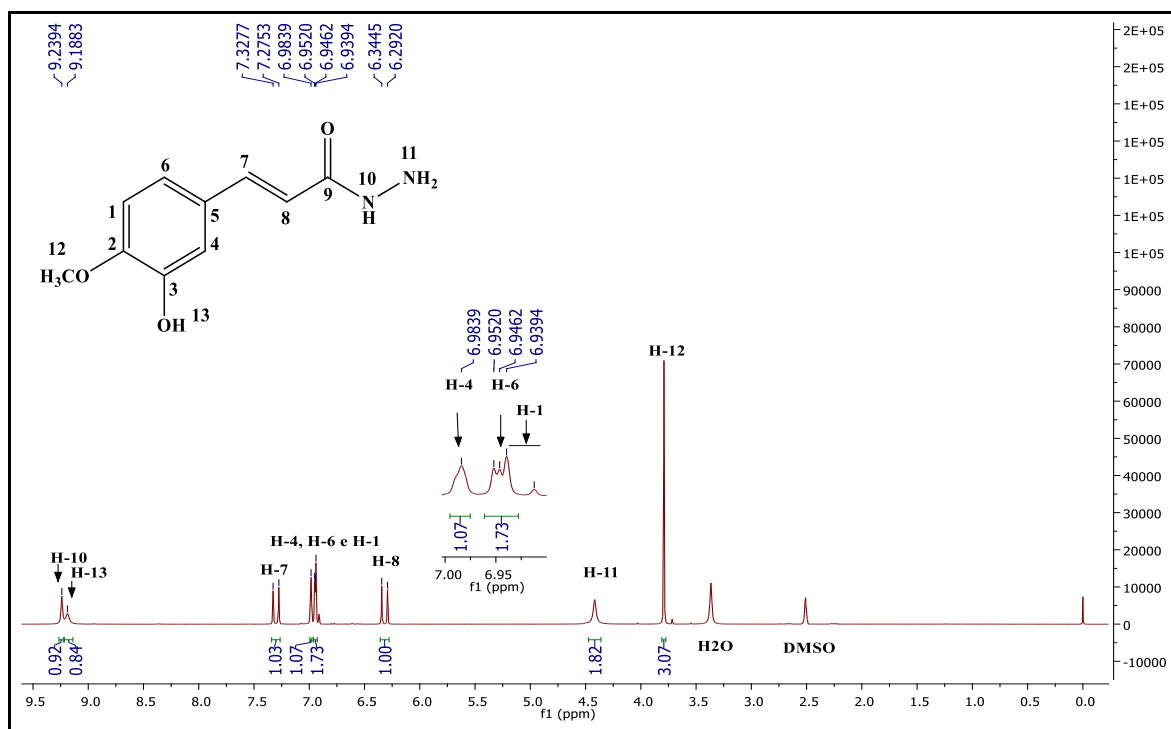
Fonte: do autor

Figura 132 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26b**



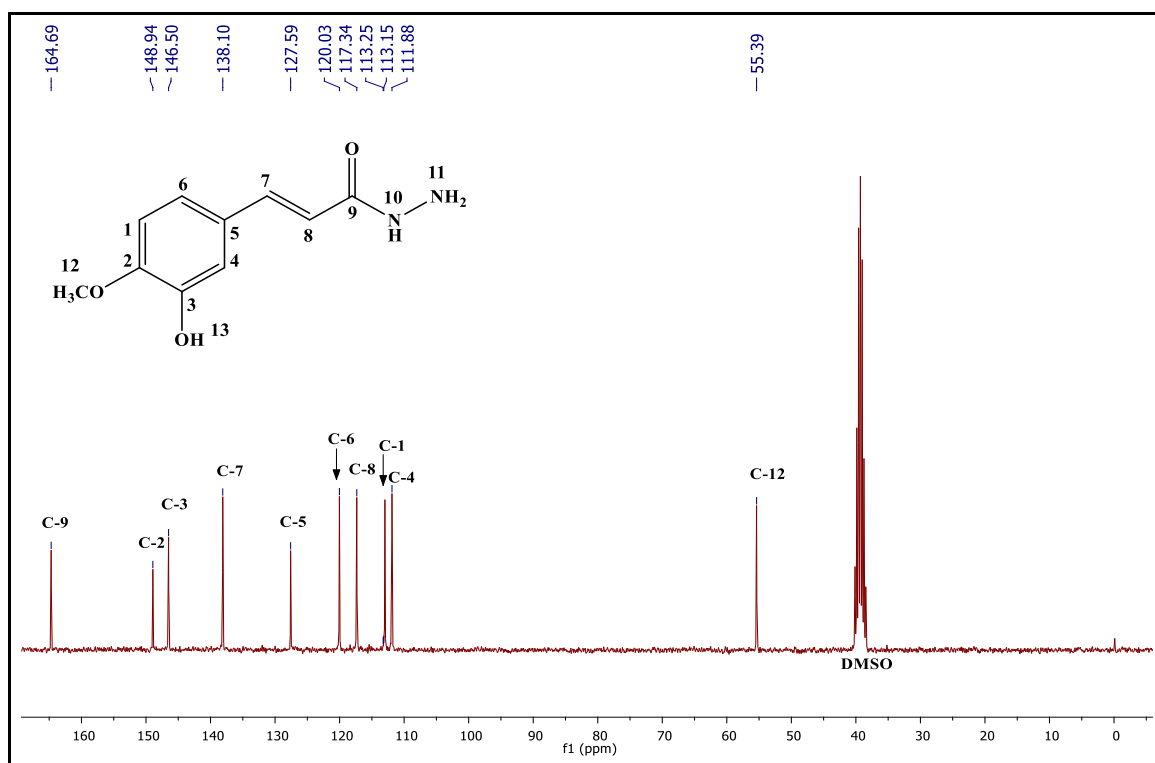
Fonte: do autor

Figura 133 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26b** (300 MHz, DMSO-d_6)



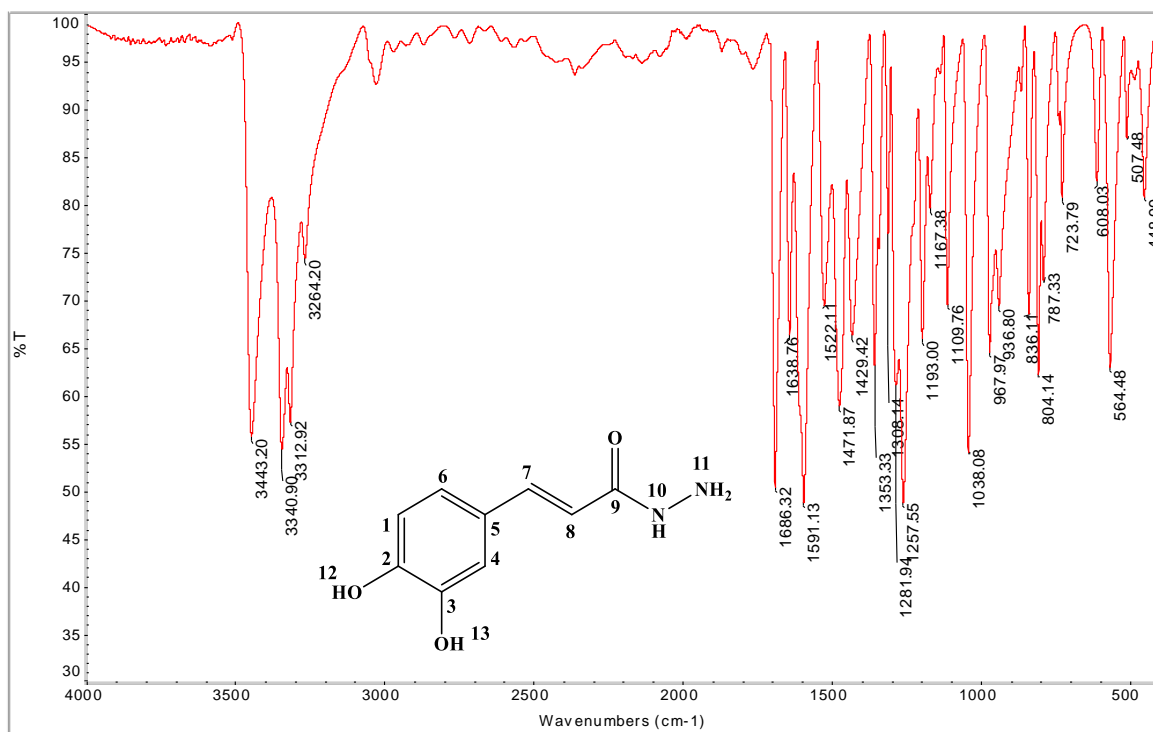
Fonte: do autor

Figura 134 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26b** (75 MHz, DMSO-d_6)



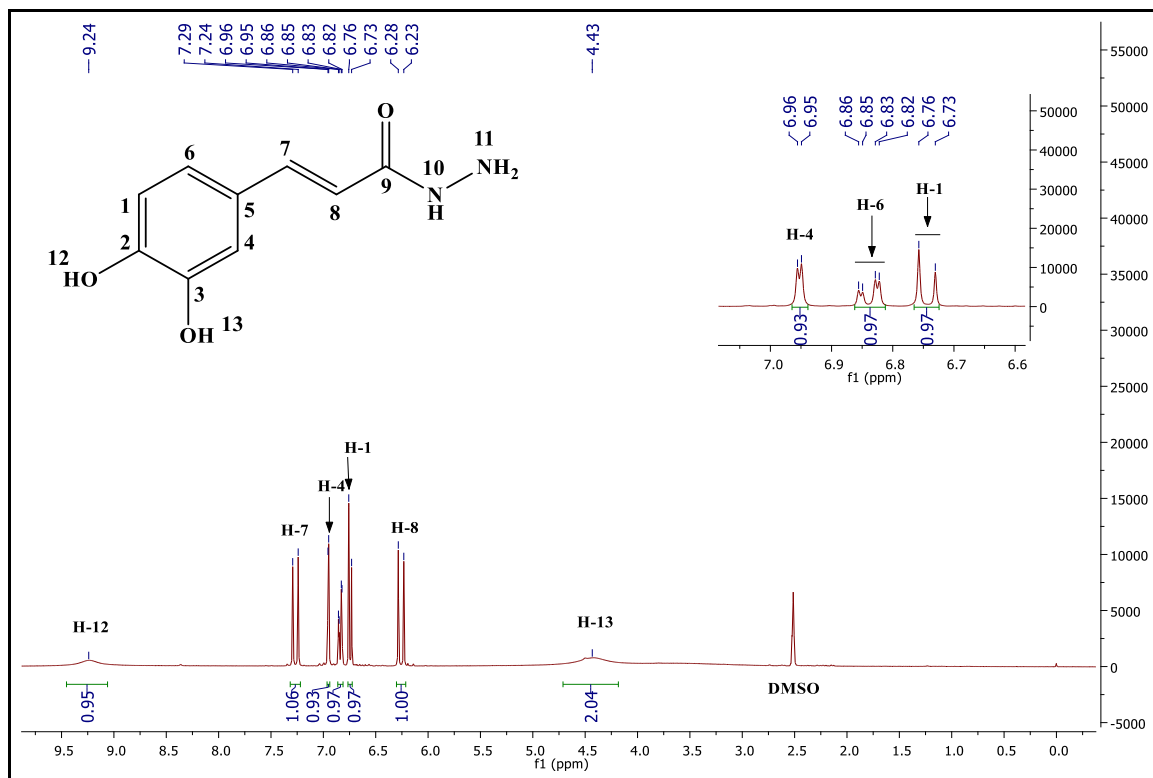
Fonte: do autor

Figura 135 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26c**



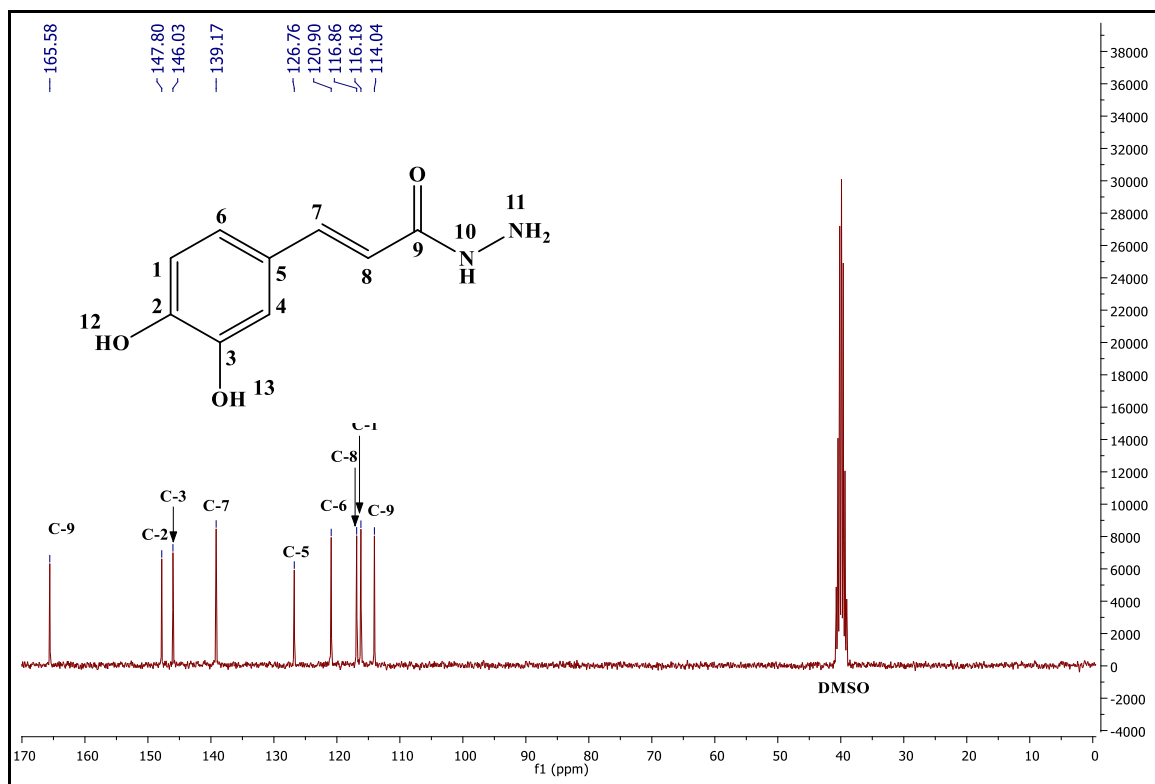
Fonte: do autor

Figura 136 - Espectro de RMN de ¹H do composto **Hidrazida 26c** (300 MHz, DMSO-d₆)



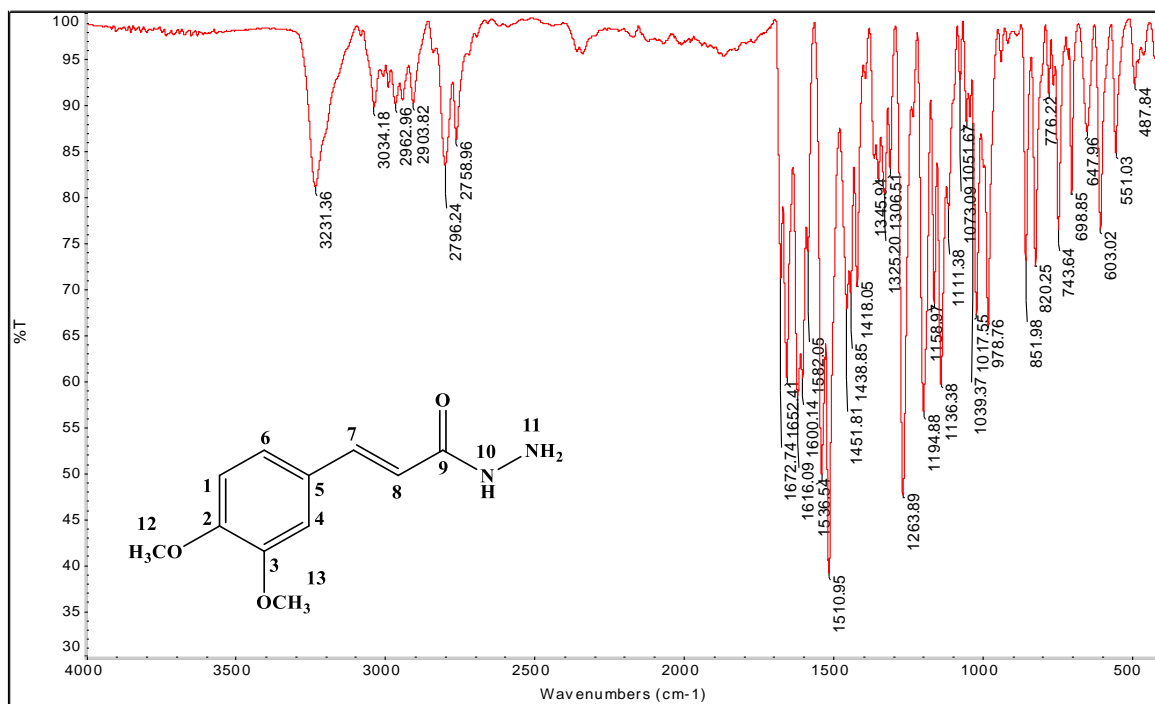
Fonte: do autor

Figura 137 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26c** (75 MHz, DMSO-d_6)



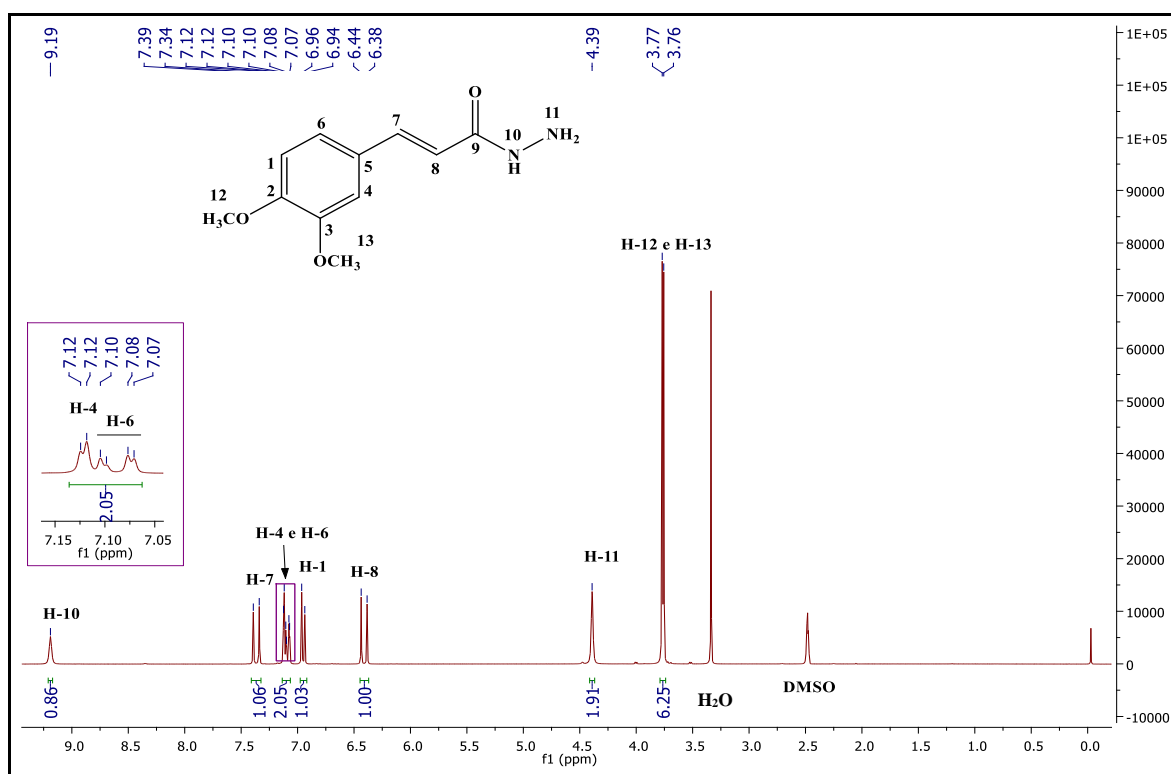
Fonte: do autor

Figura 138 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26d**



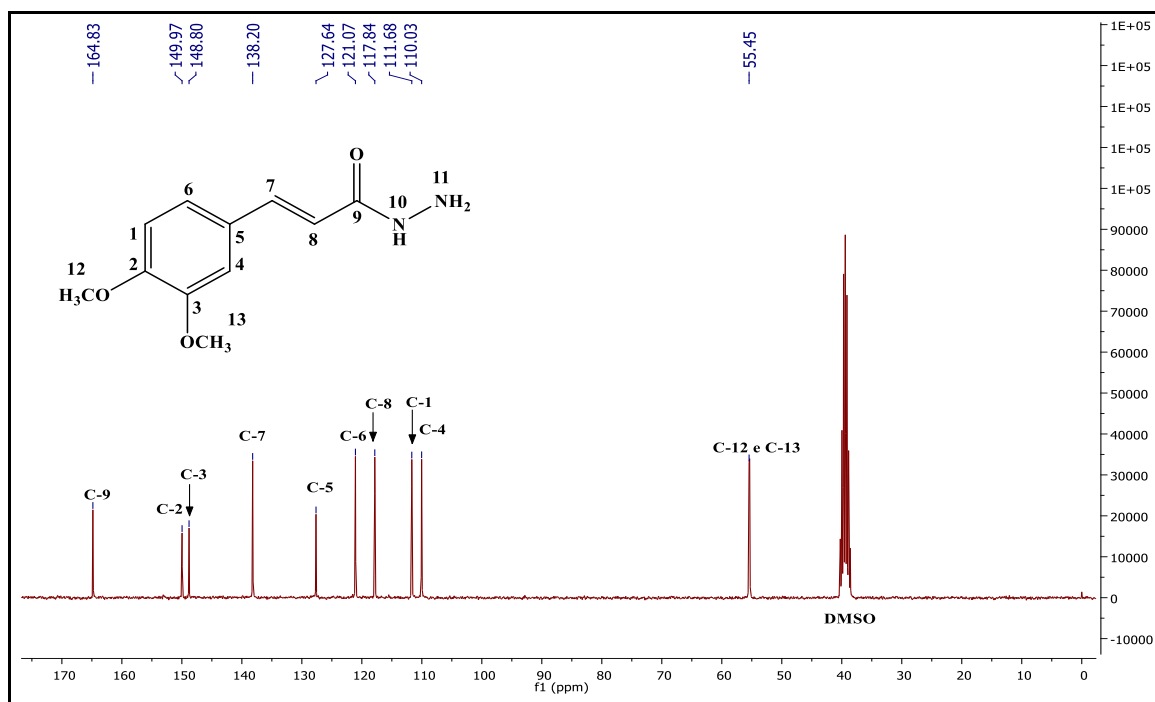
Fonte: do autor

Figura 139 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26d** (300 MHz, DMSO-d_6)



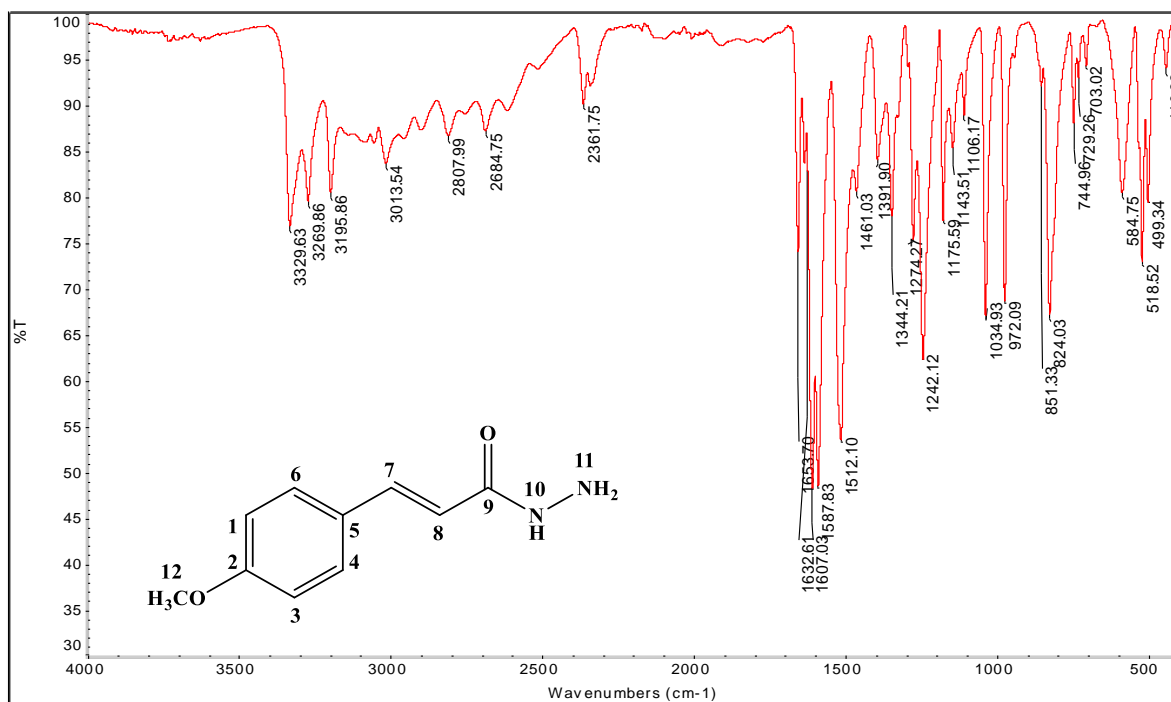
Fonte: do autor

Figura 140 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26d** (75 MHz, DMSO-d_6)



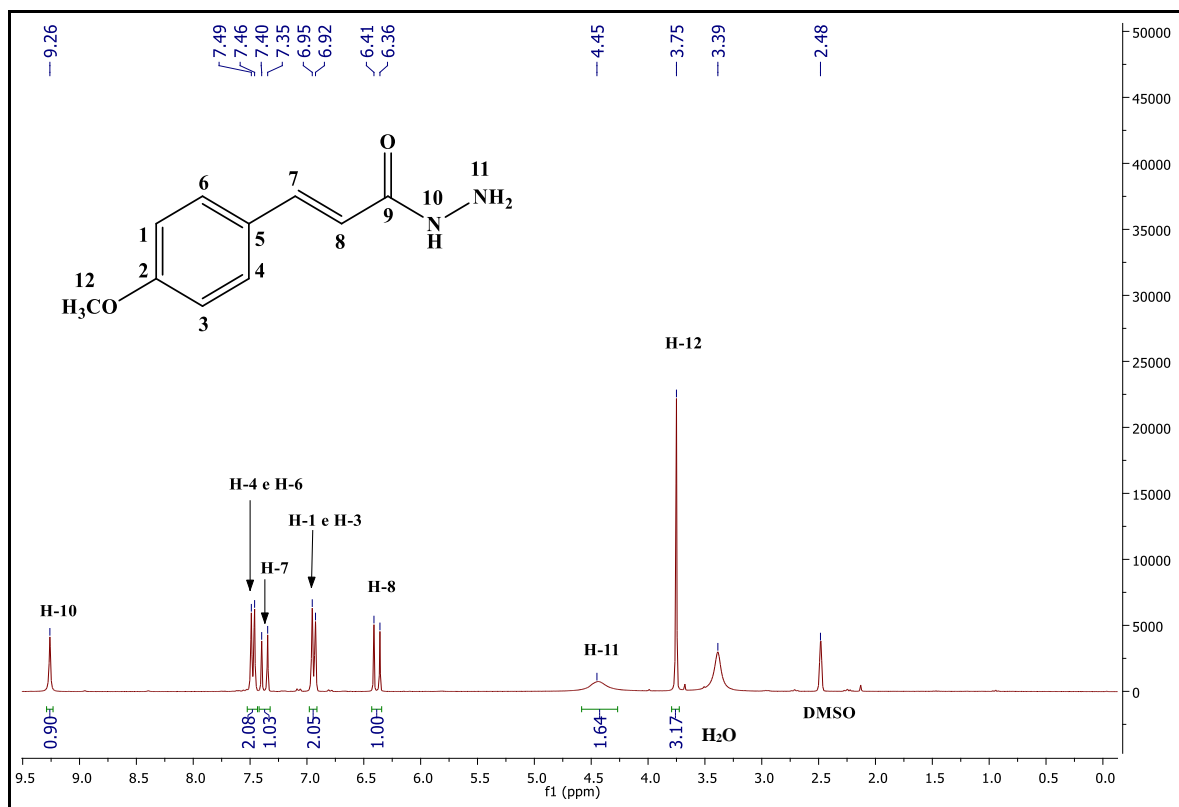
Fonte: do autor

Figura 141 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26e**



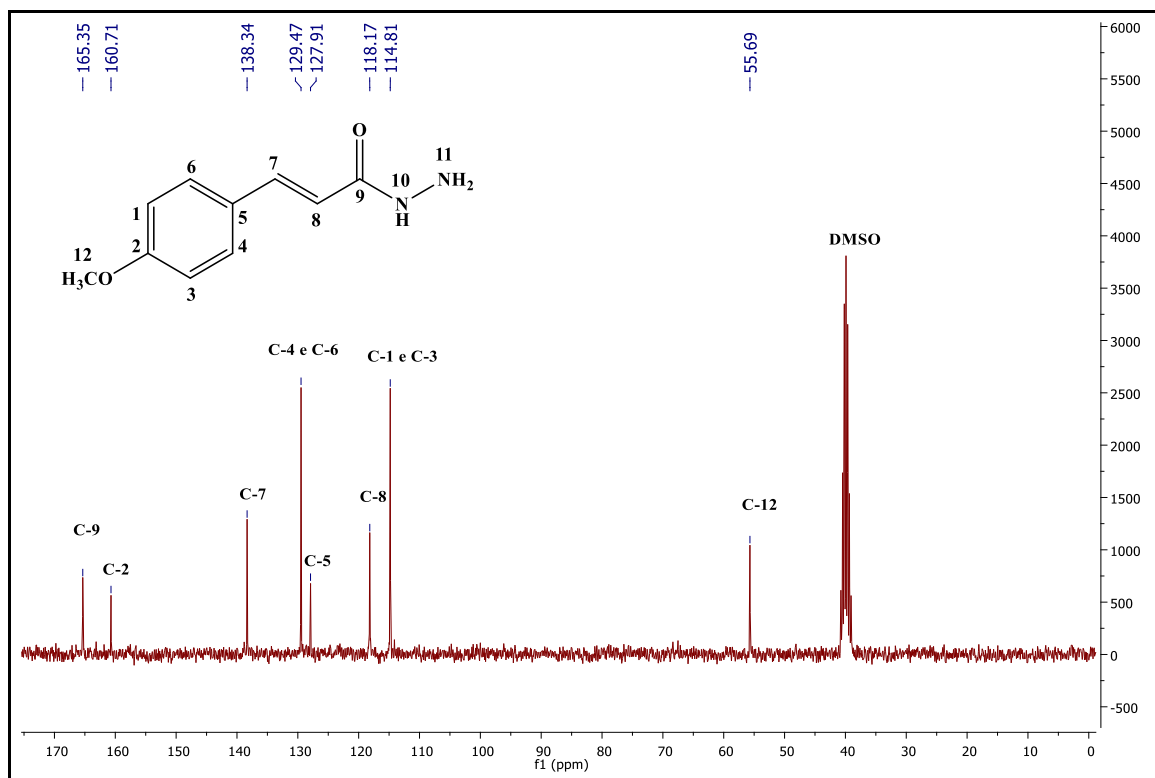
Fonte: do autor

Figura 142 - Espectro de RMN de ¹H do composto **Hidrazida 26e** (300 MHz, DMSO-d₆)



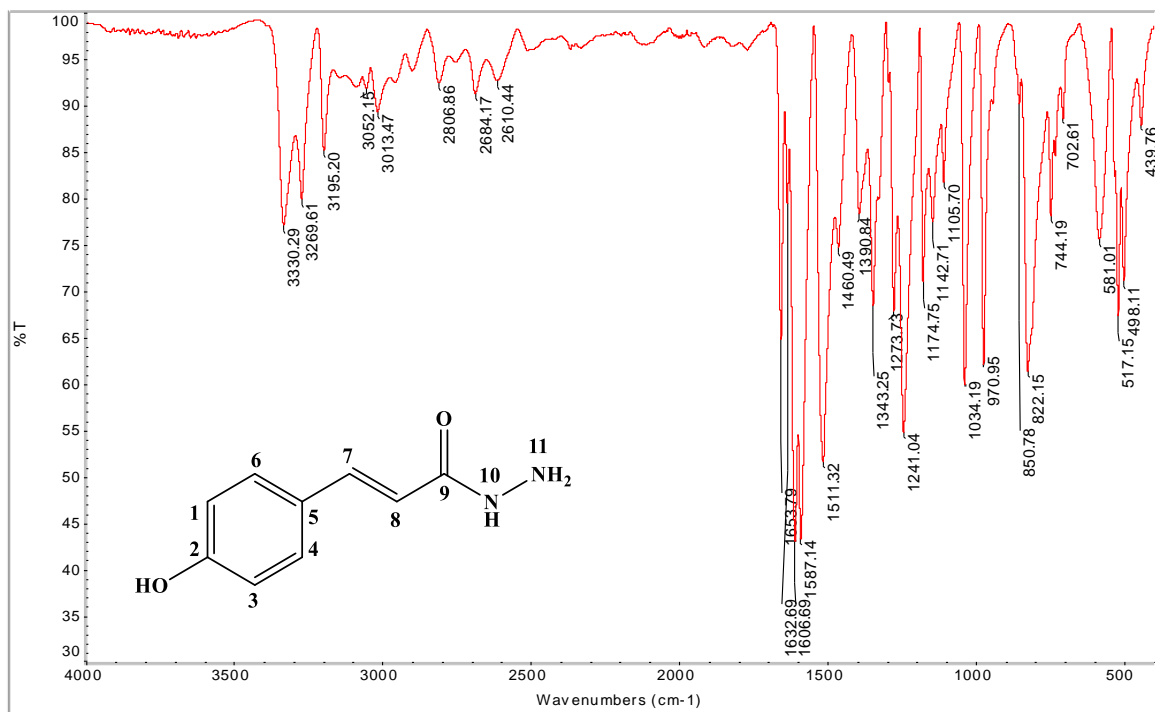
Fonte: do autor

Figura 143 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26e** (75 MHz, DMSO-d_6)



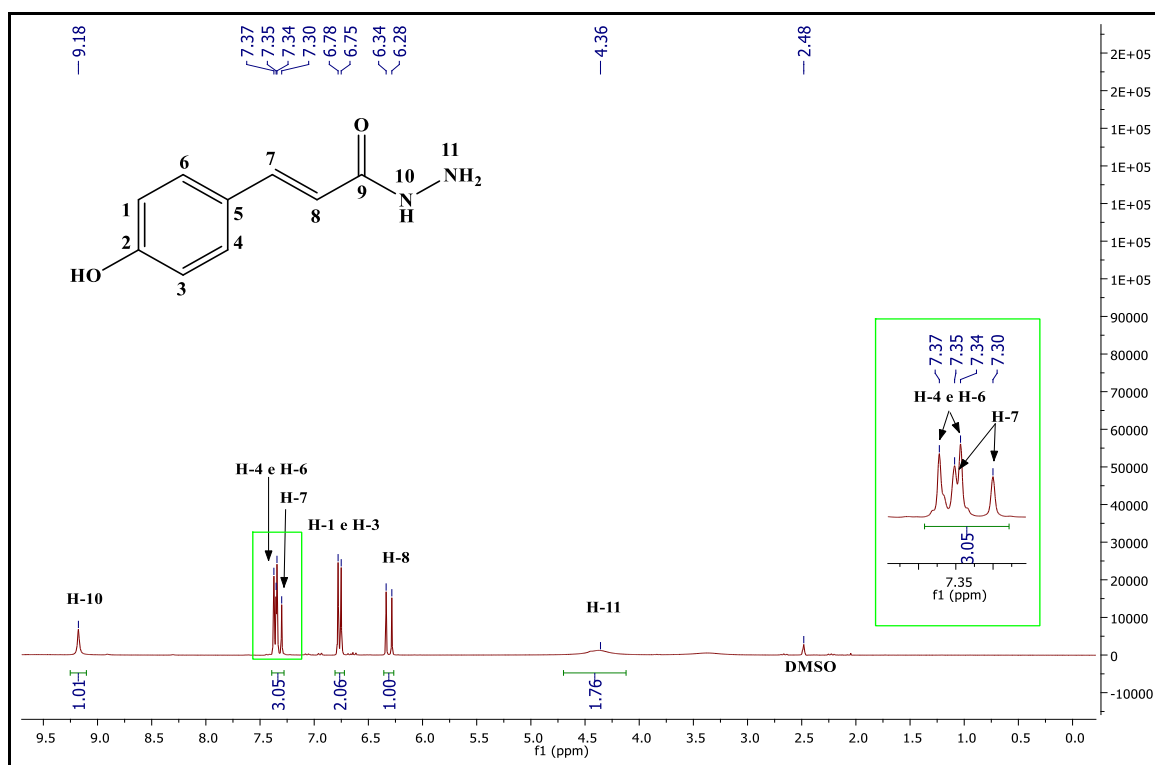
Fonte: do autor

Figura 144 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26f**



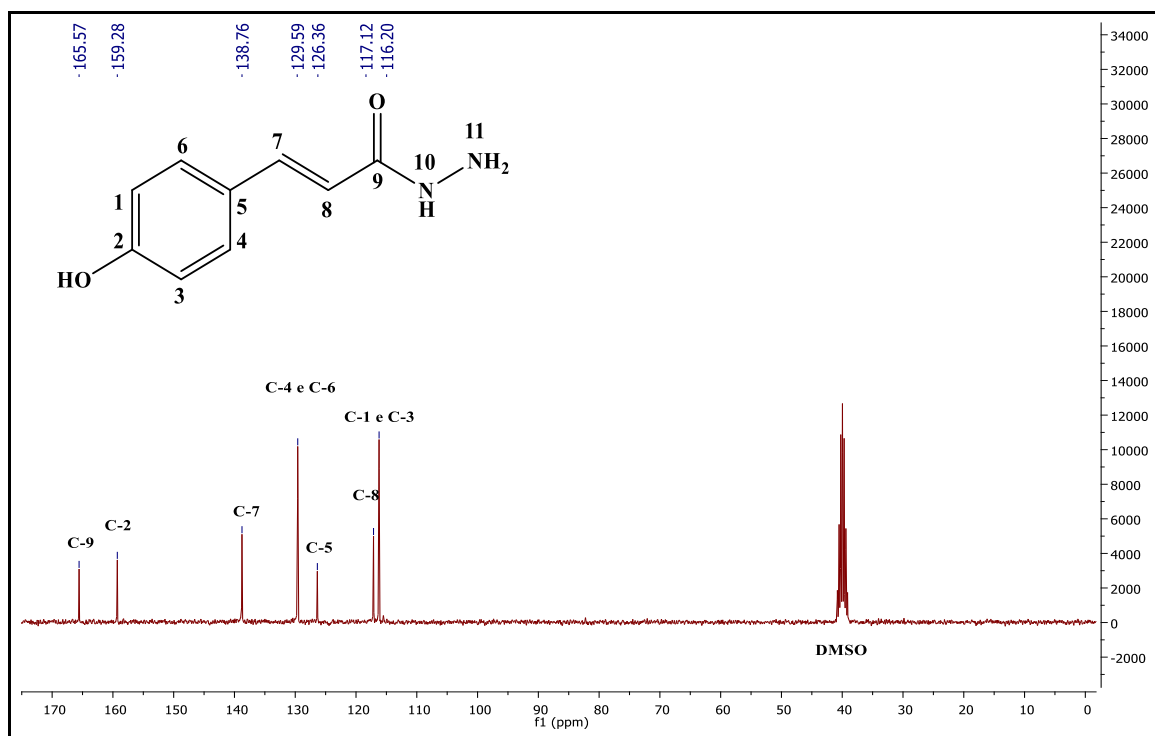
Fonte: do autor

Figura 145 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26f** (300 MHz, DMSO-d_6)



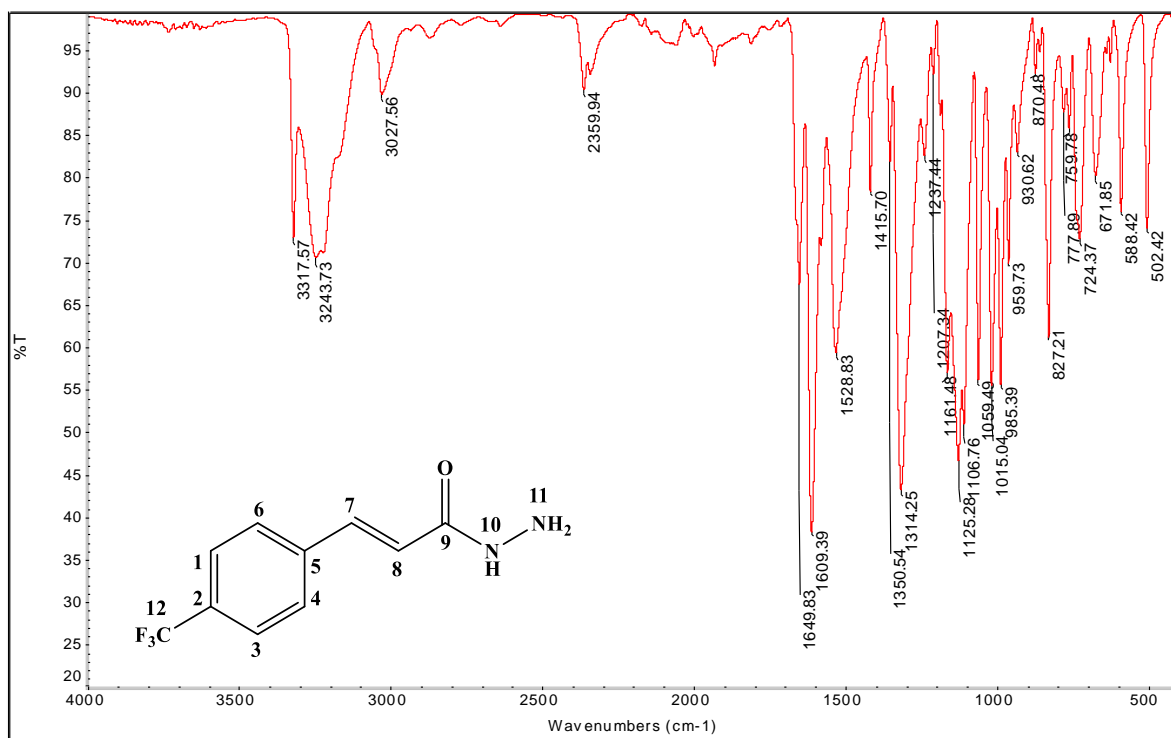
Fonte: do autor

Figura 146 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26f** (75 MHz, DMSO-d_6)



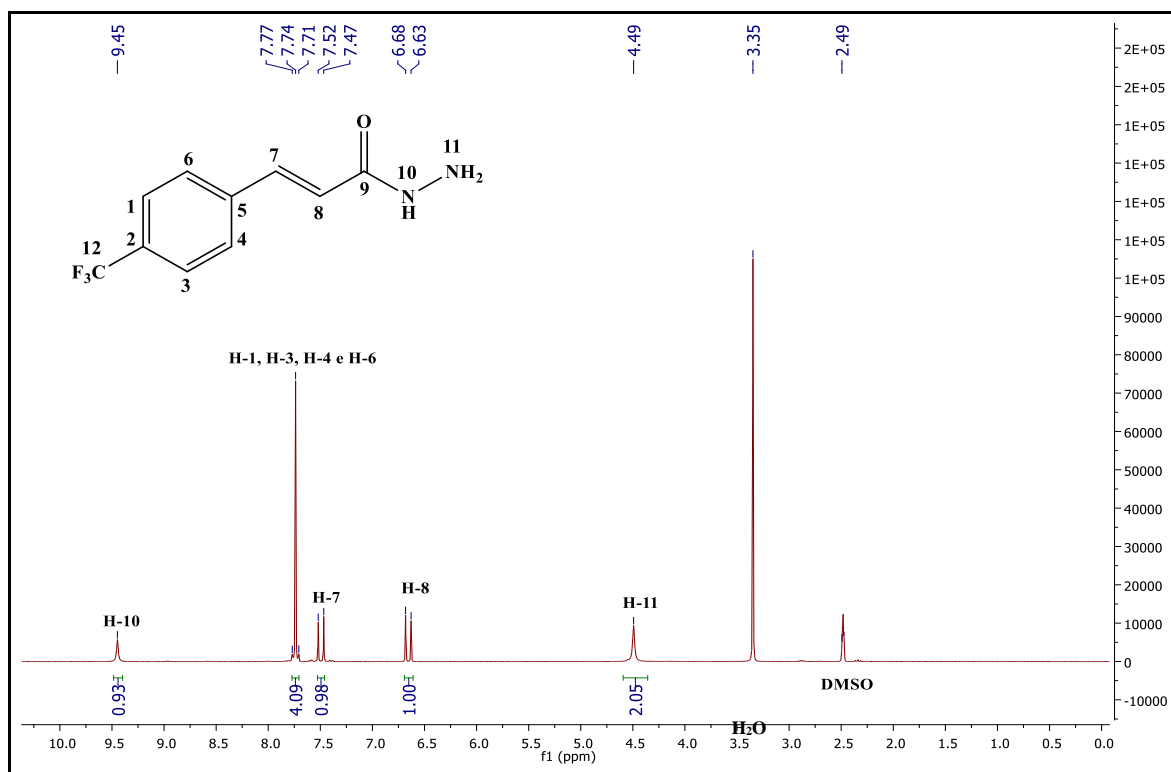
Fonte: do autor

Figura 147 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26g**



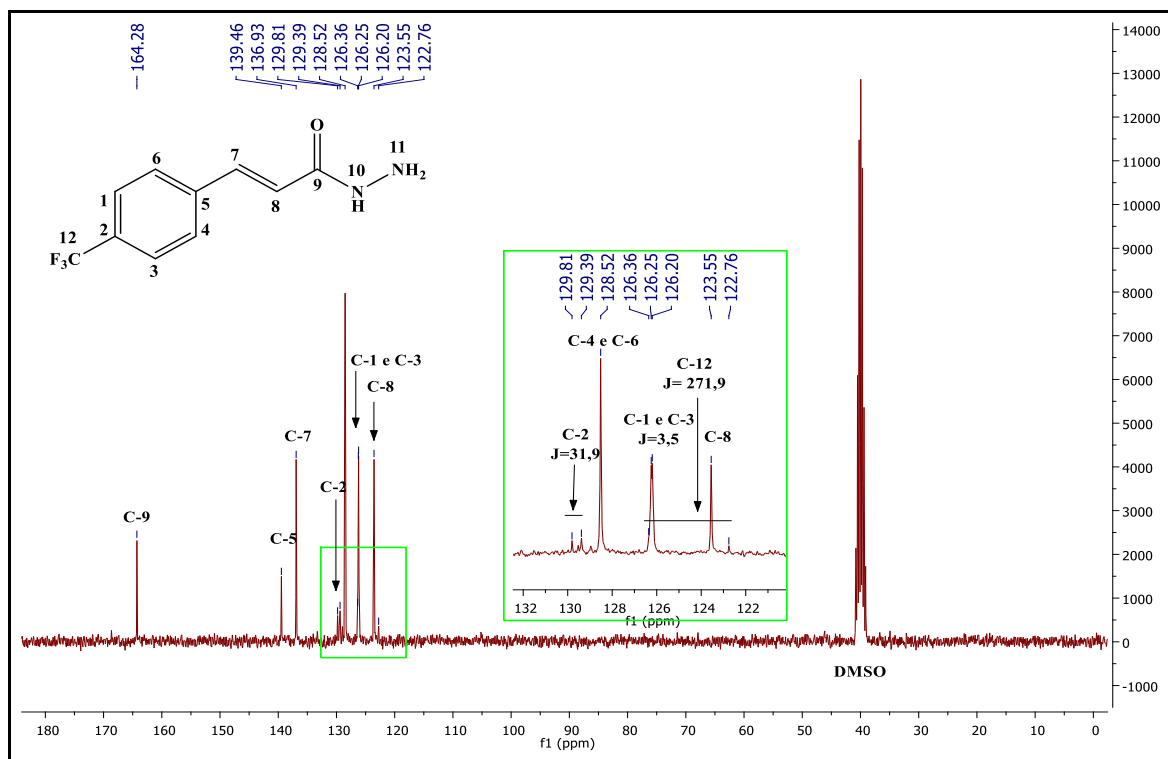
Fonte: do autor

Figura 148 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26g** (300 MHz, DMSO-d_6)



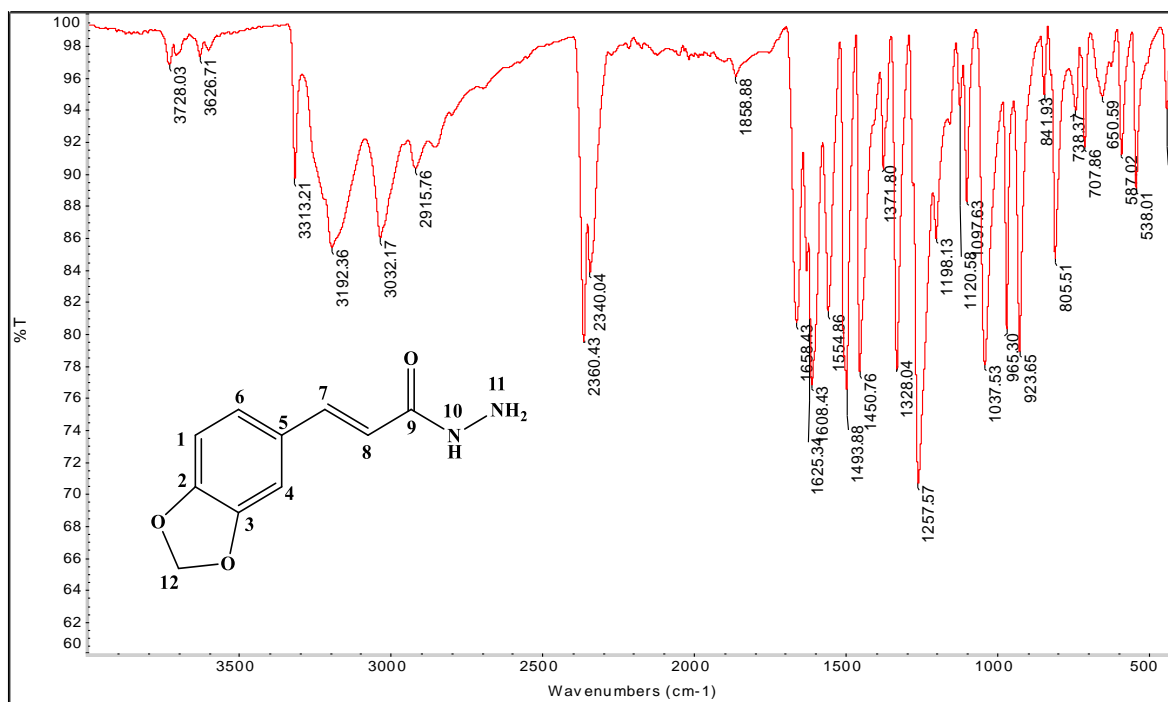
Fonte: do autor

Figura 149 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26g** (75 MHz, DMSO-d_6)



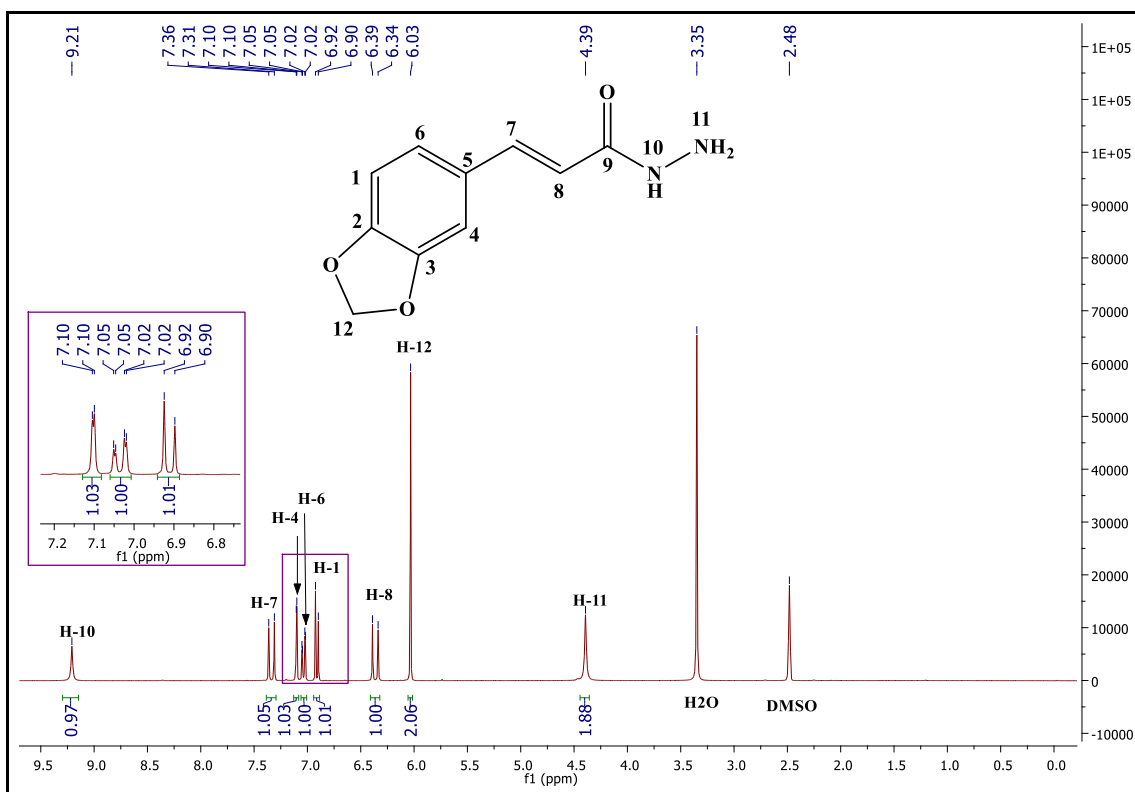
Fonte: do autor

Figura 150 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26h**



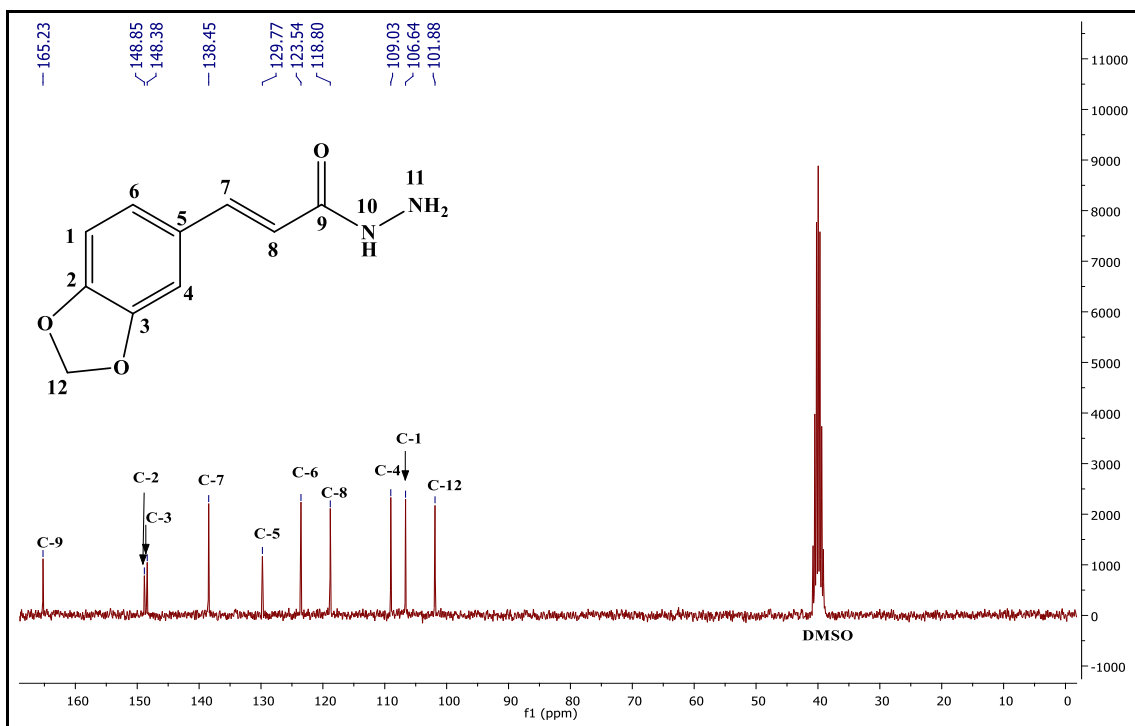
Fonte: do autor

Figura 151 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26h** (300 MHz, DMSO-d_6)



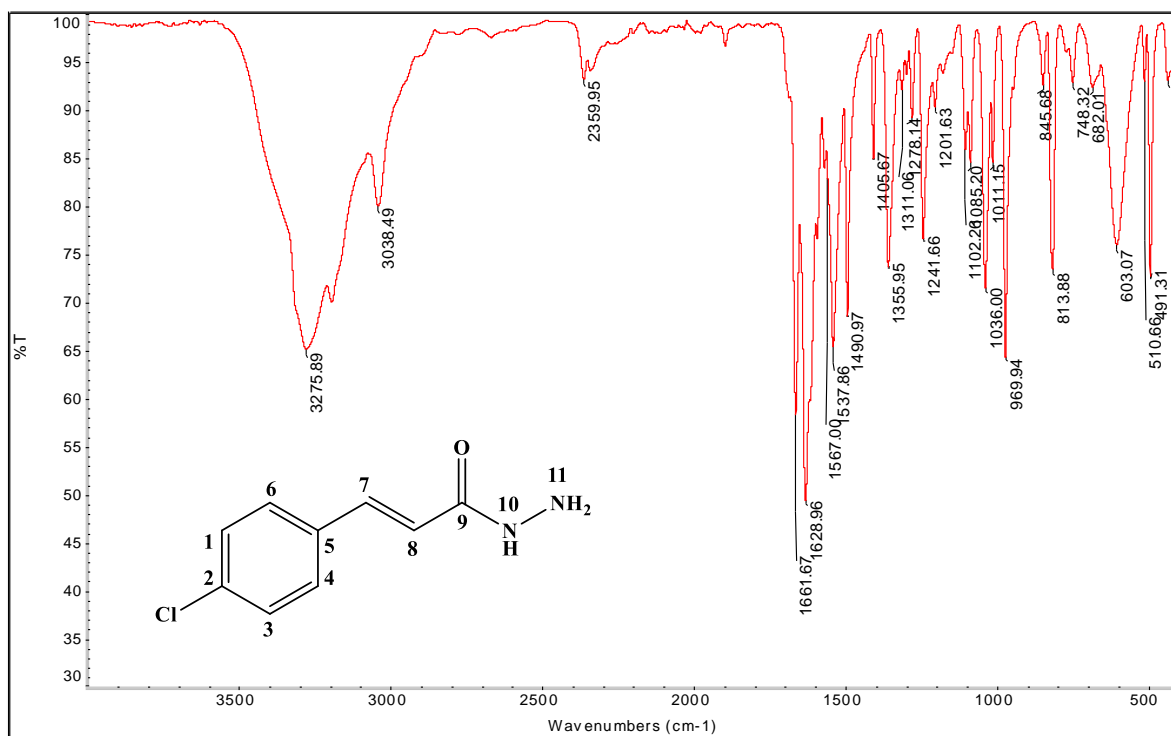
Fonte: do autor

Figura 152 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26h** (75 MHz, DMSO-d_6)



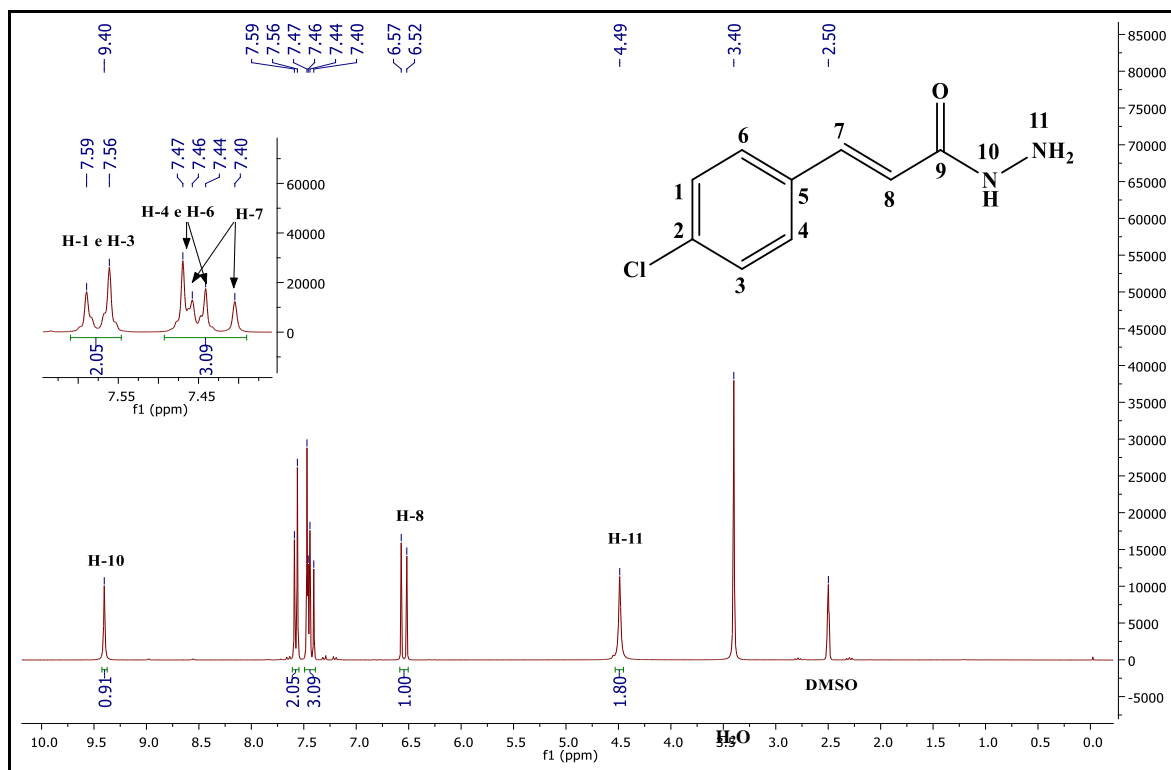
Fonte: do autor

Figura 153 - Espectro na região do infravermelho de **Hidrazida 26i**



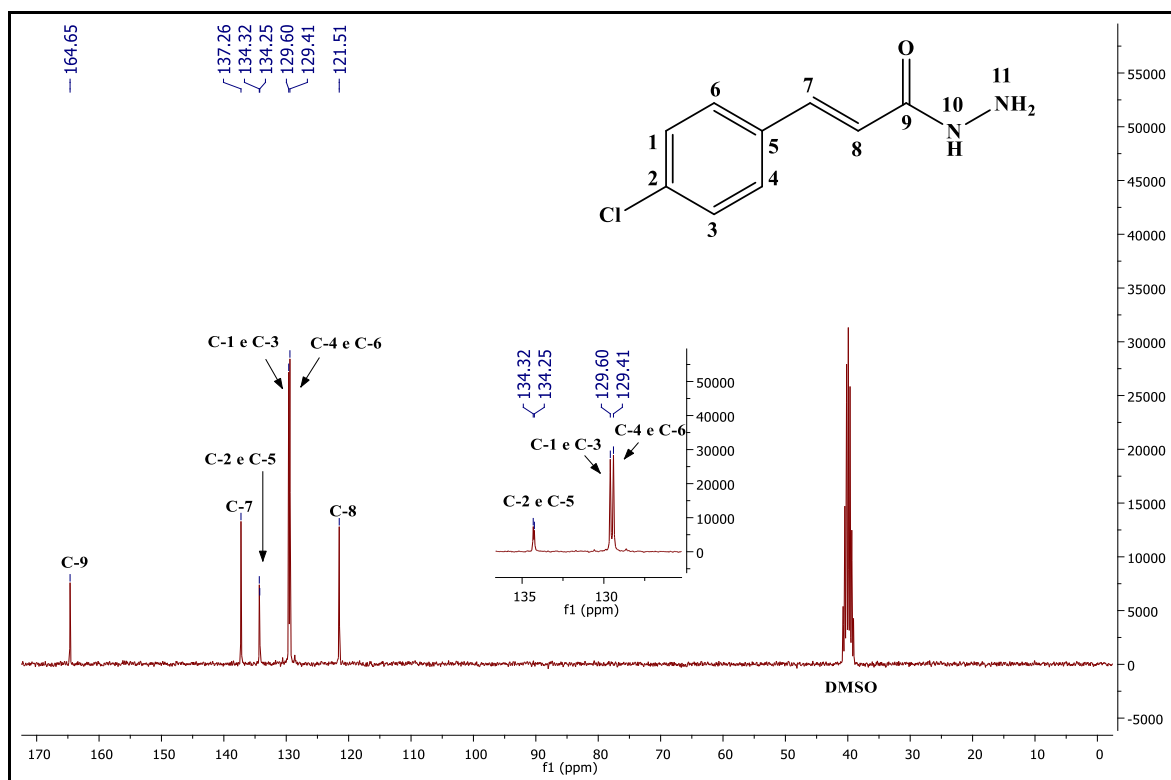
Fonte: do autor

Figura 154 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26i** (300 MHz, DMSO-d_6)



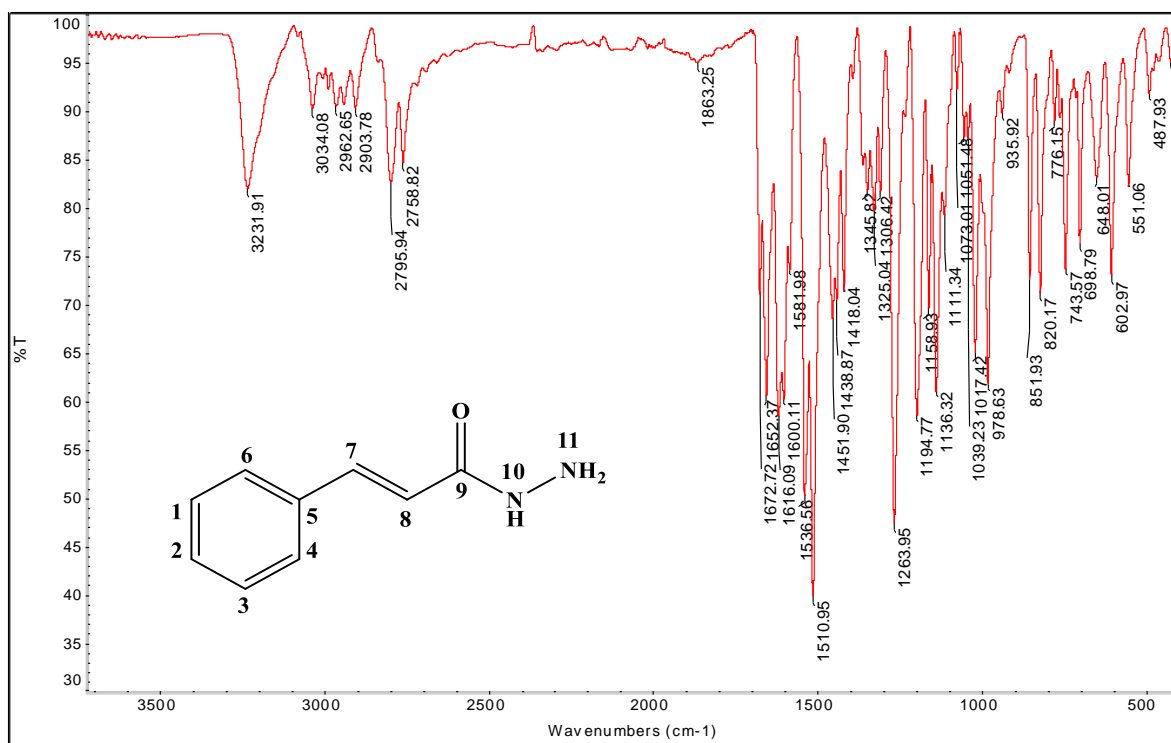
Fonte: do autor

Figura 155 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto hidrazida 26i (75 MHz, DMSO- d_6)



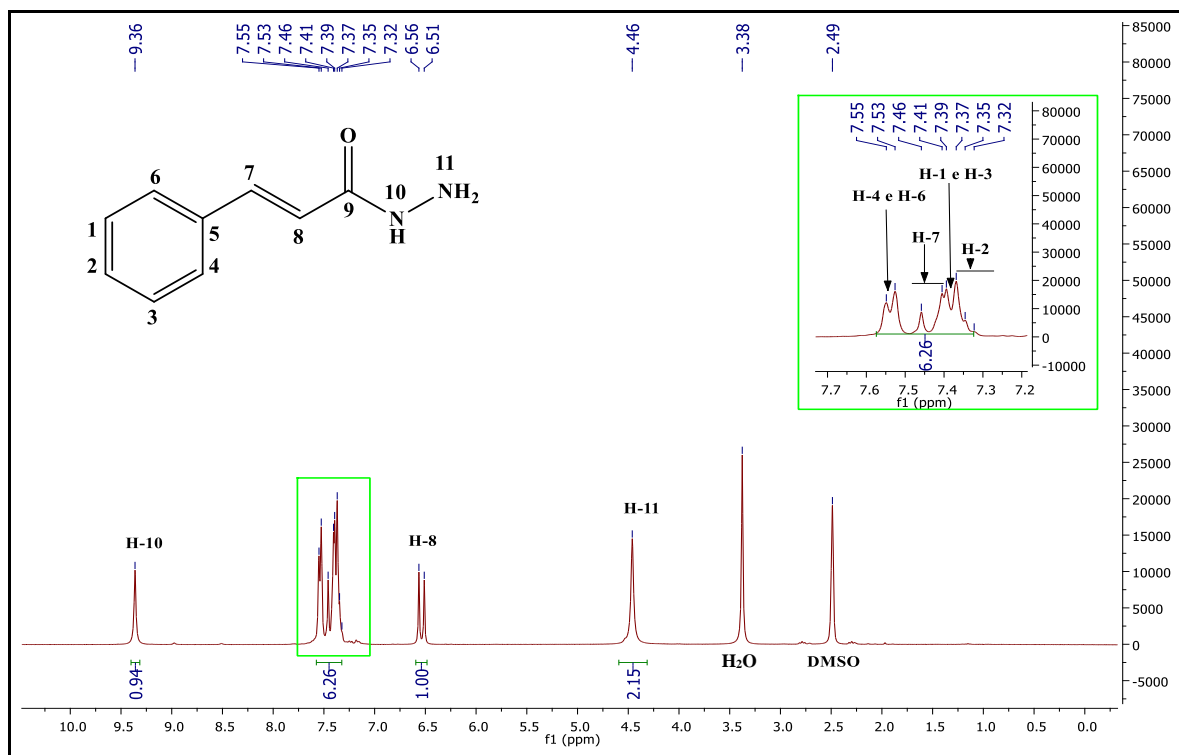
Fonte: do autor

Figura 156 - Espectro na região do infravermelho de Hidrazida 26j



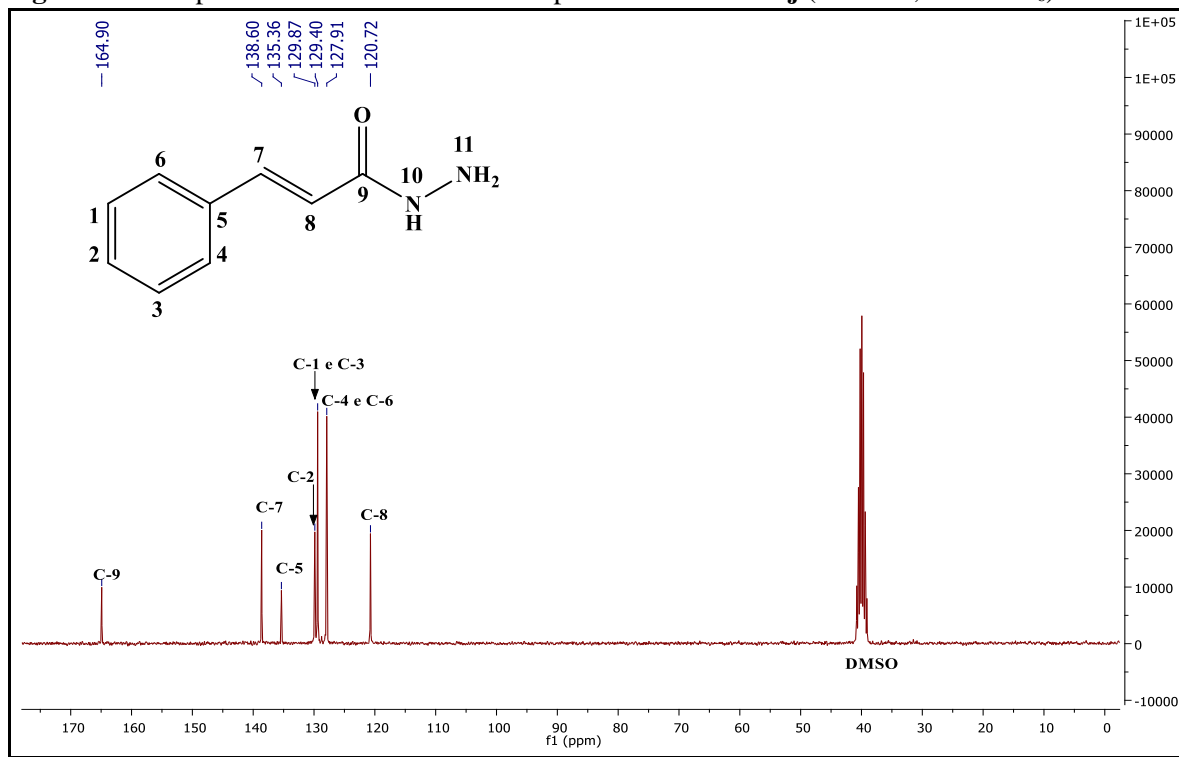
Fonte: do autor

Figura 157 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Hidrazida 26j** (300 MHz, DMSO-d_6)



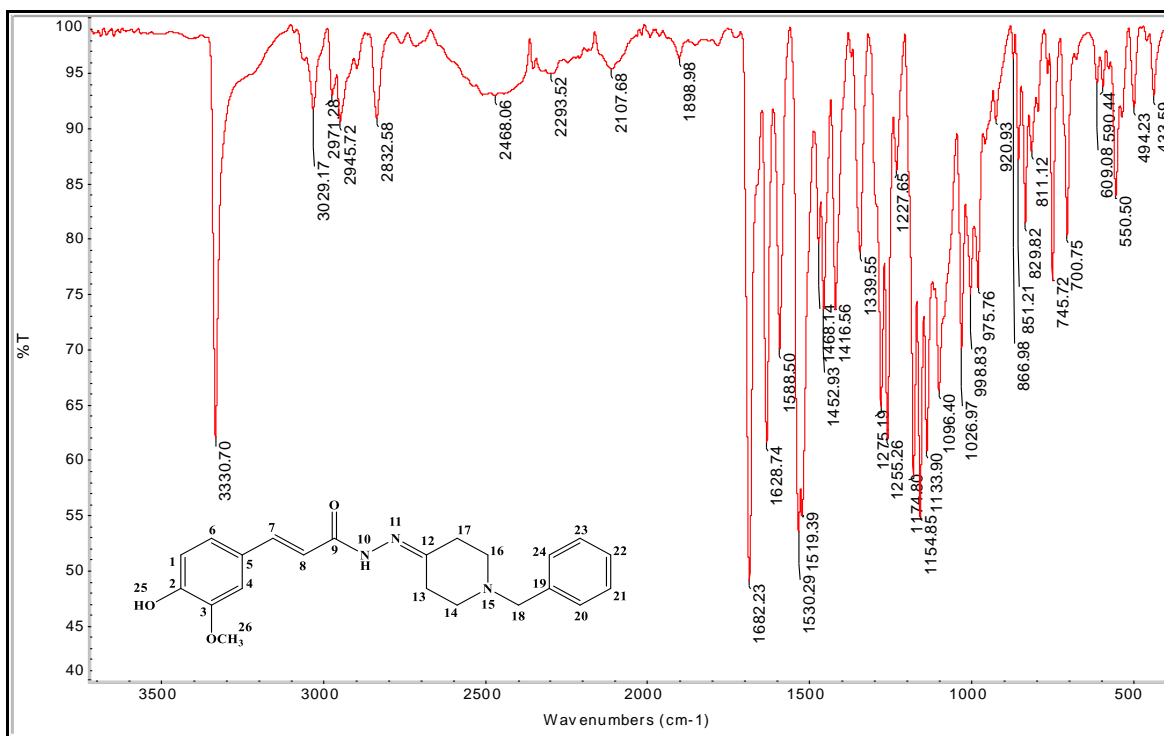
Fonte: do autor

Figura 158 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **hidrazida 26j** (75 MHz, DMSO-d_6)



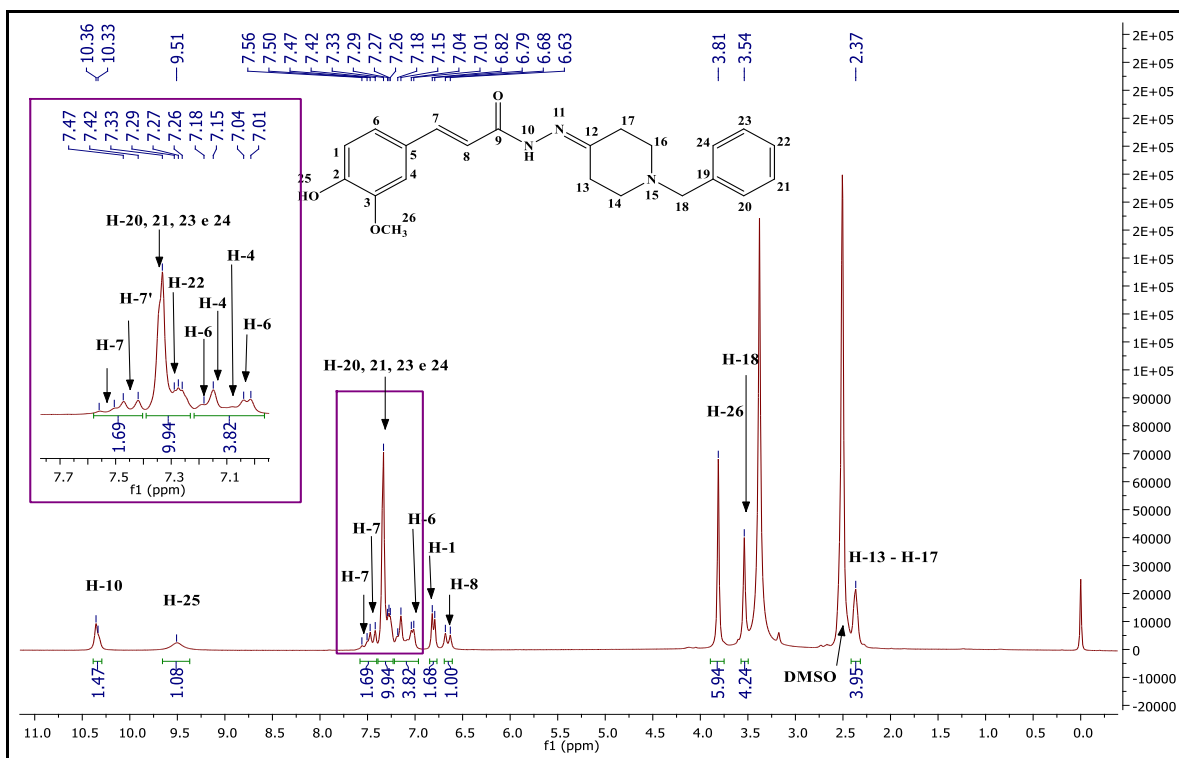
Fonte: do autor

Figura 159 - Espectro na região do infravermelho de PQM 263



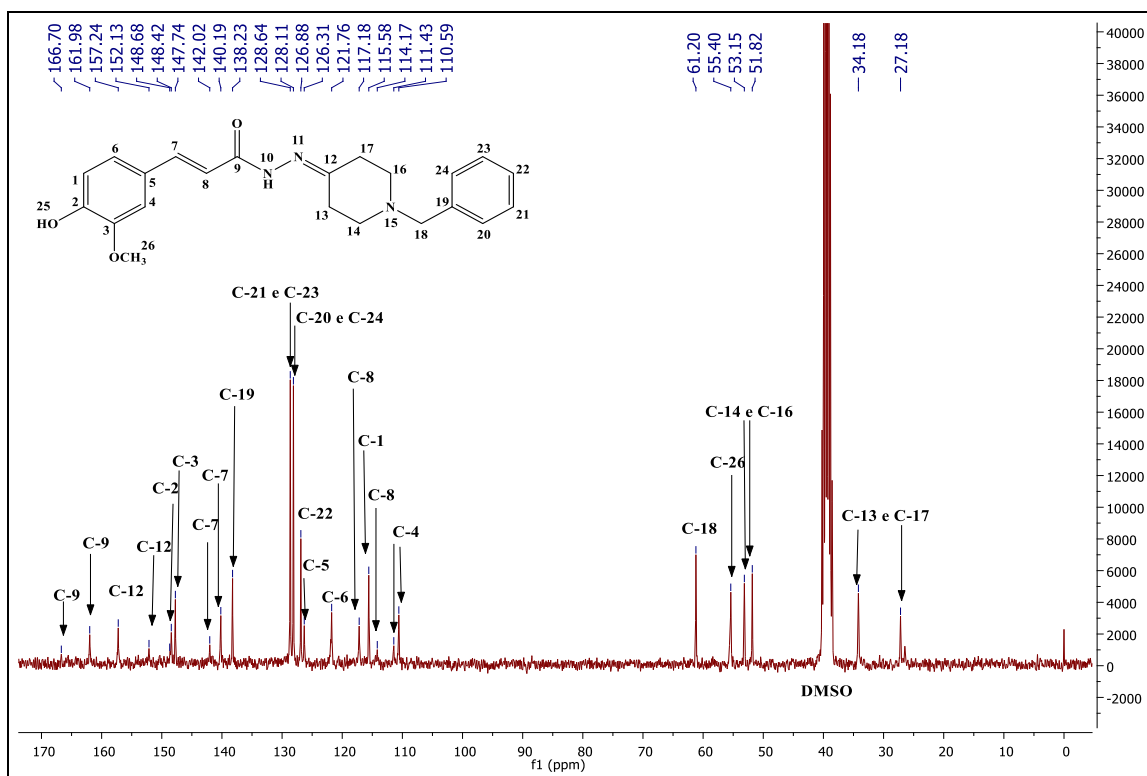
Fonte: do autor

Figura 160 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 263 (300 MHz, DMSO-d₆)



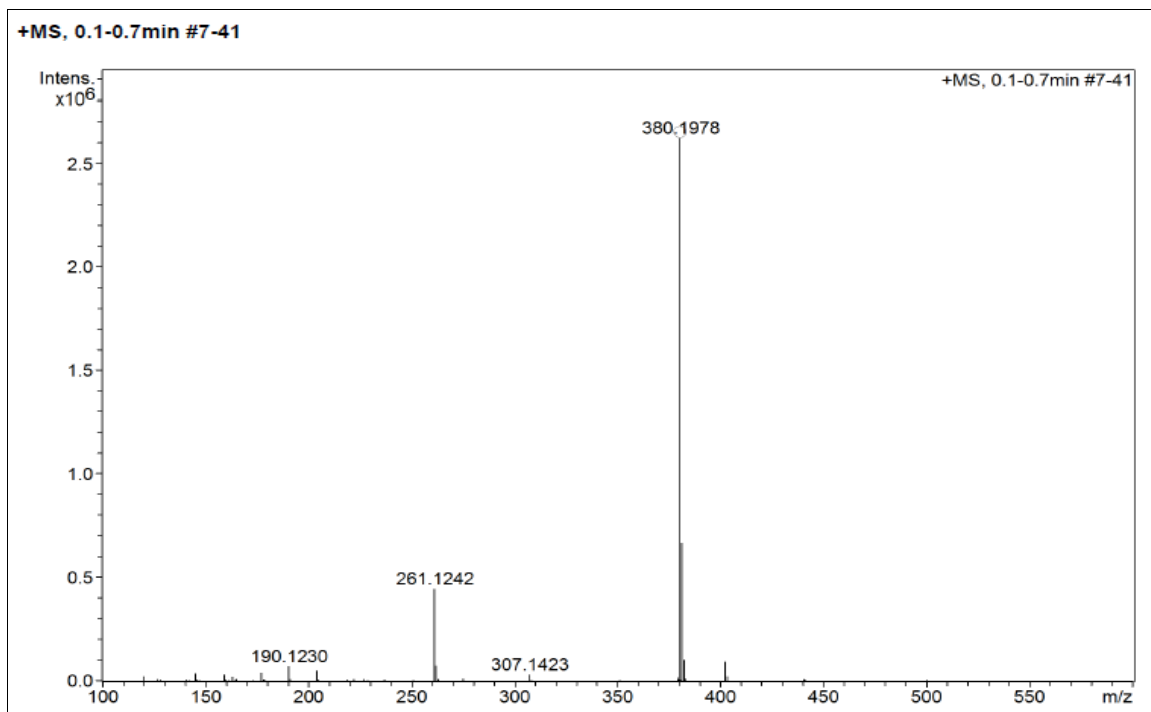
Fonte: do autor

Figura 161 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 263** (75 MHz, DMSO-d_6)



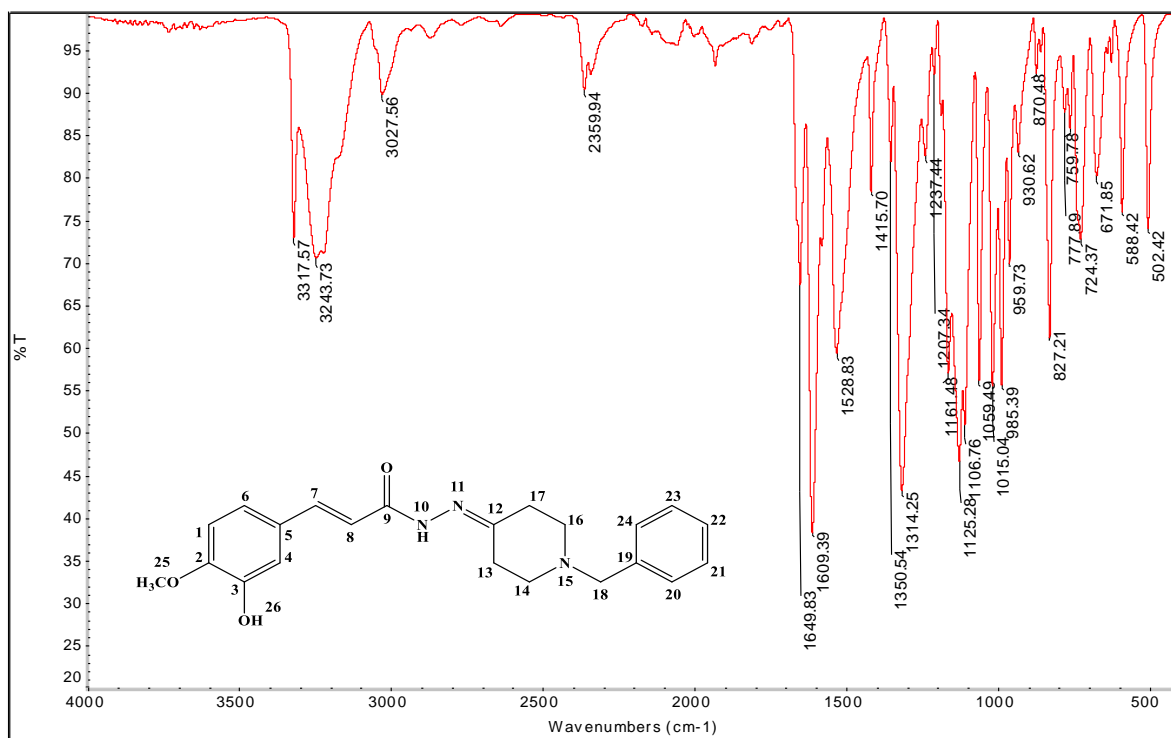
Fonte: do autor

Figura 162 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 263**



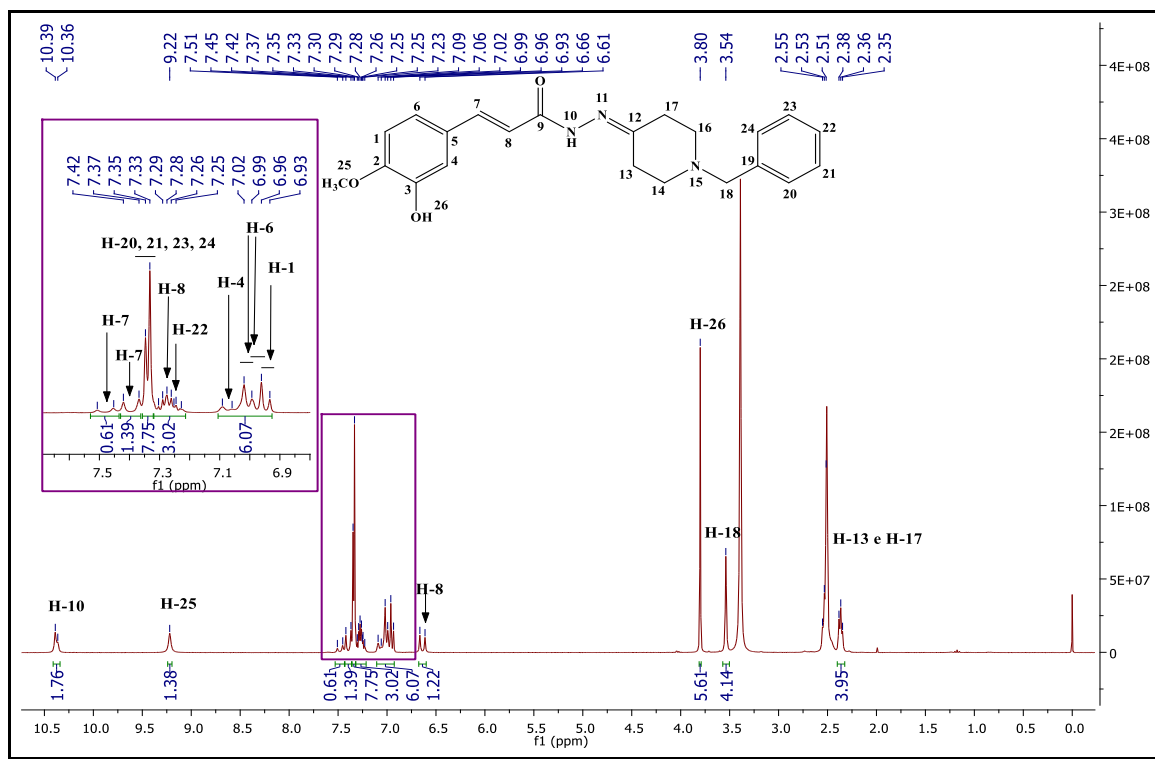
Fonte: do autor

Figura 163 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 264**



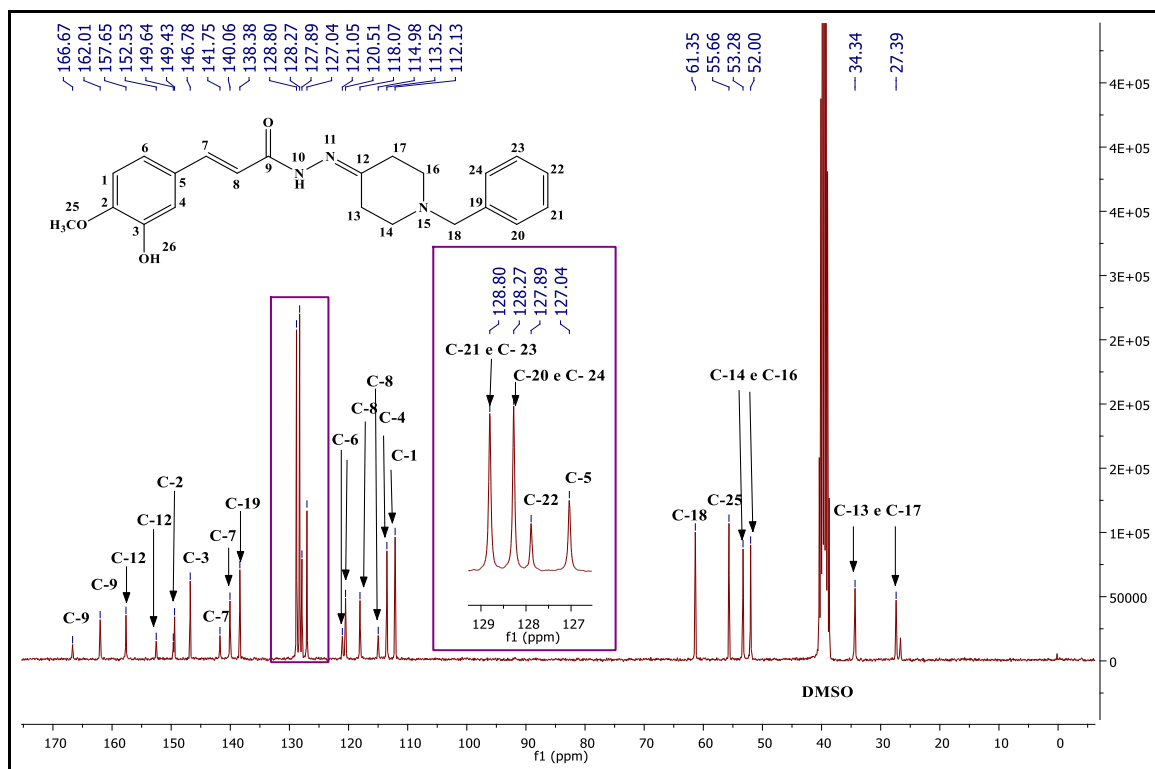
Fonte: do autor

Figura 164 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 264** (300 MHz, DMSO-d₆)



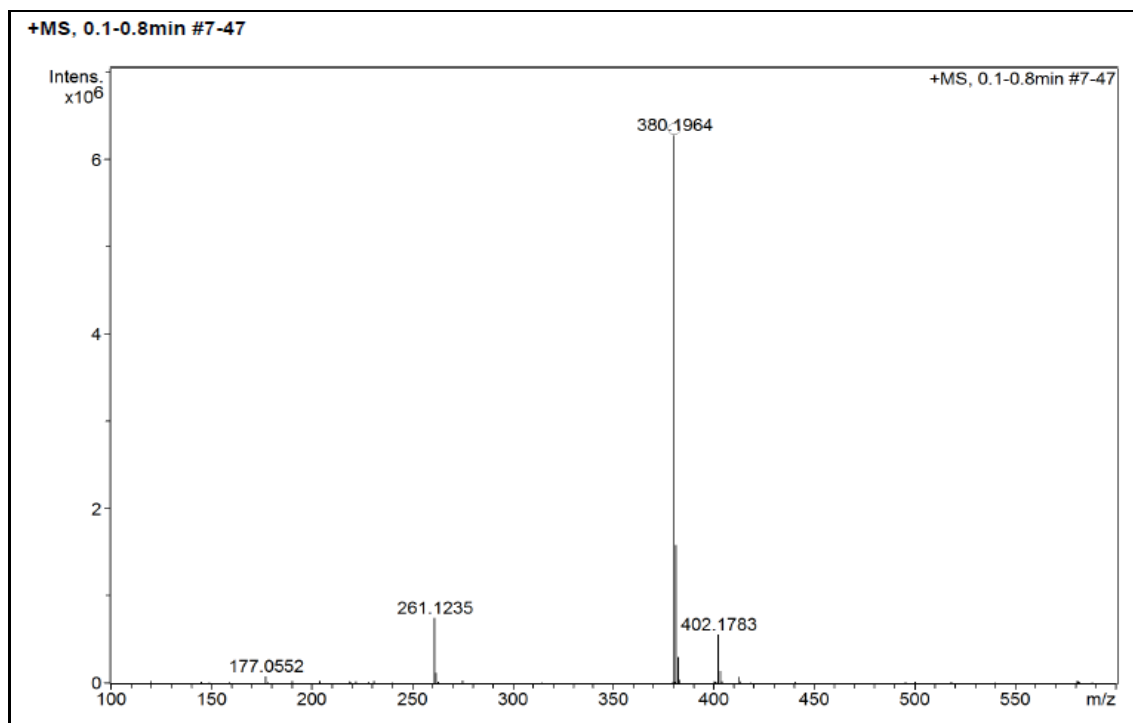
Fonte: do autor

Figura 165 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 264** (75 MHz, DMSO-d_6)



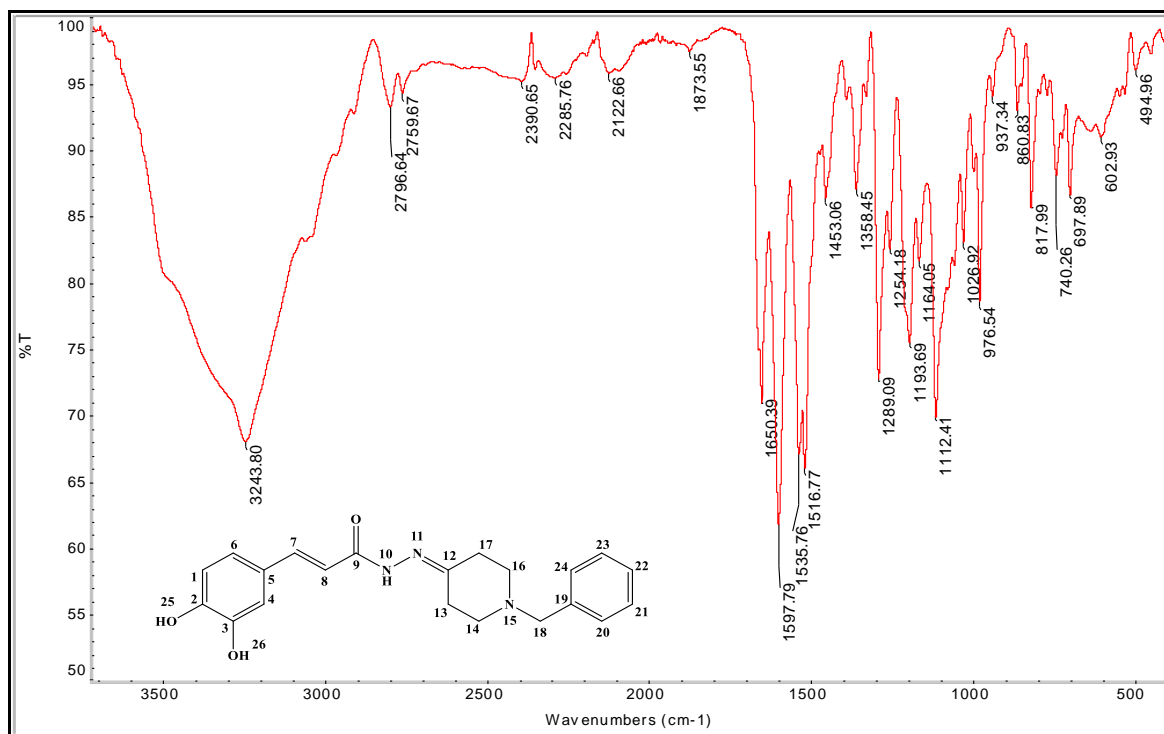
Fonte: do autor

Figura 166 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 264**



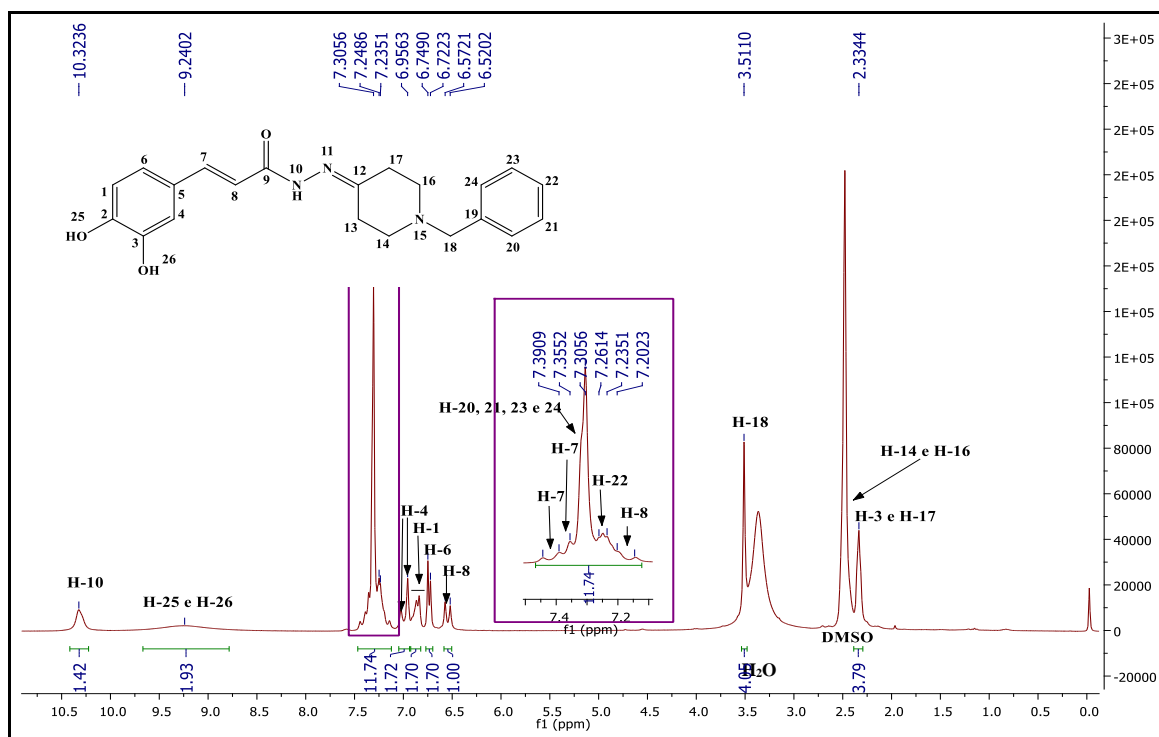
Fonte: do autor

Figura 167 - Espectro na região do infravermelho de PQM 265



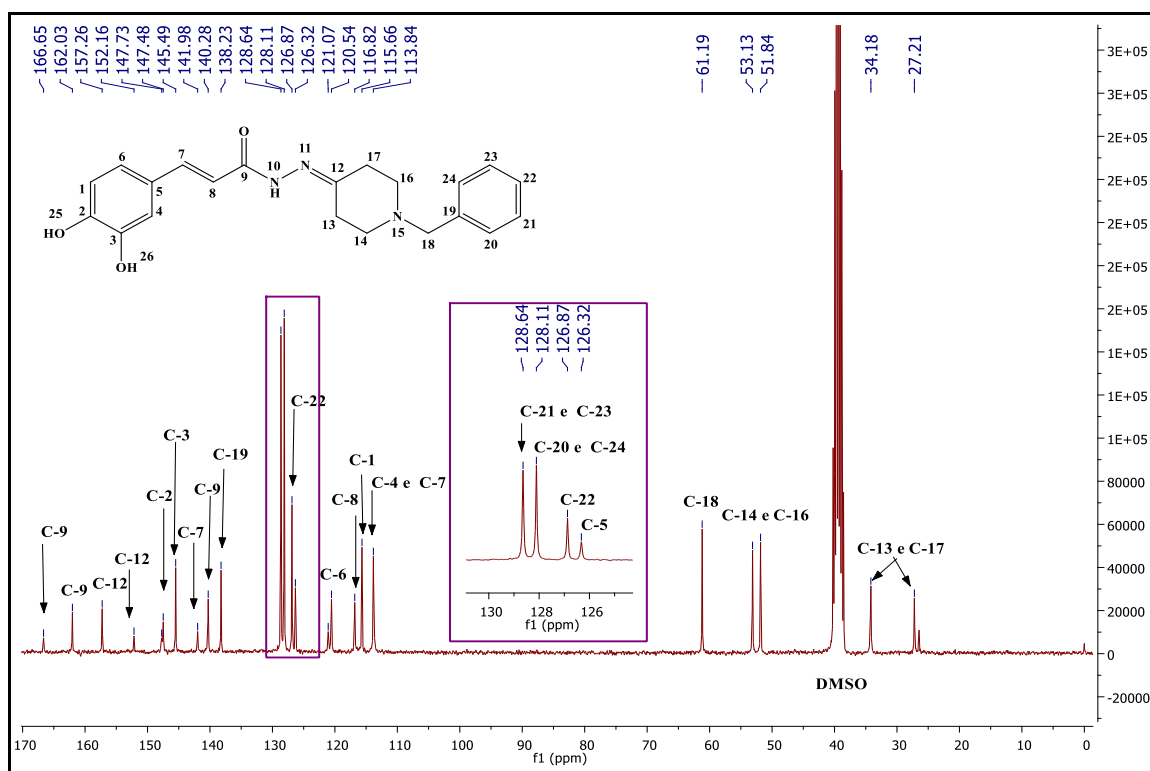
Fonte: do autor

Figura 168 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 265 (300 MHz, DMSO-d₆)



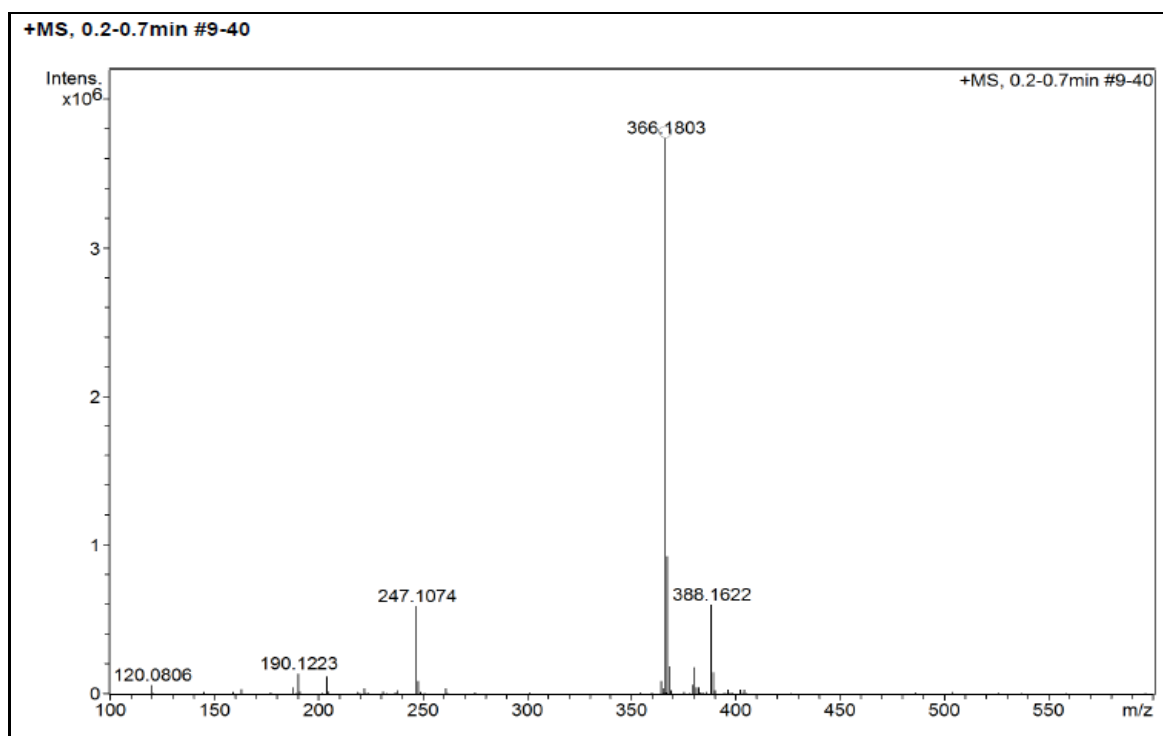
Fonte: do autor

Figura 169 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 265** (75 MHz, DMSO-d_6)



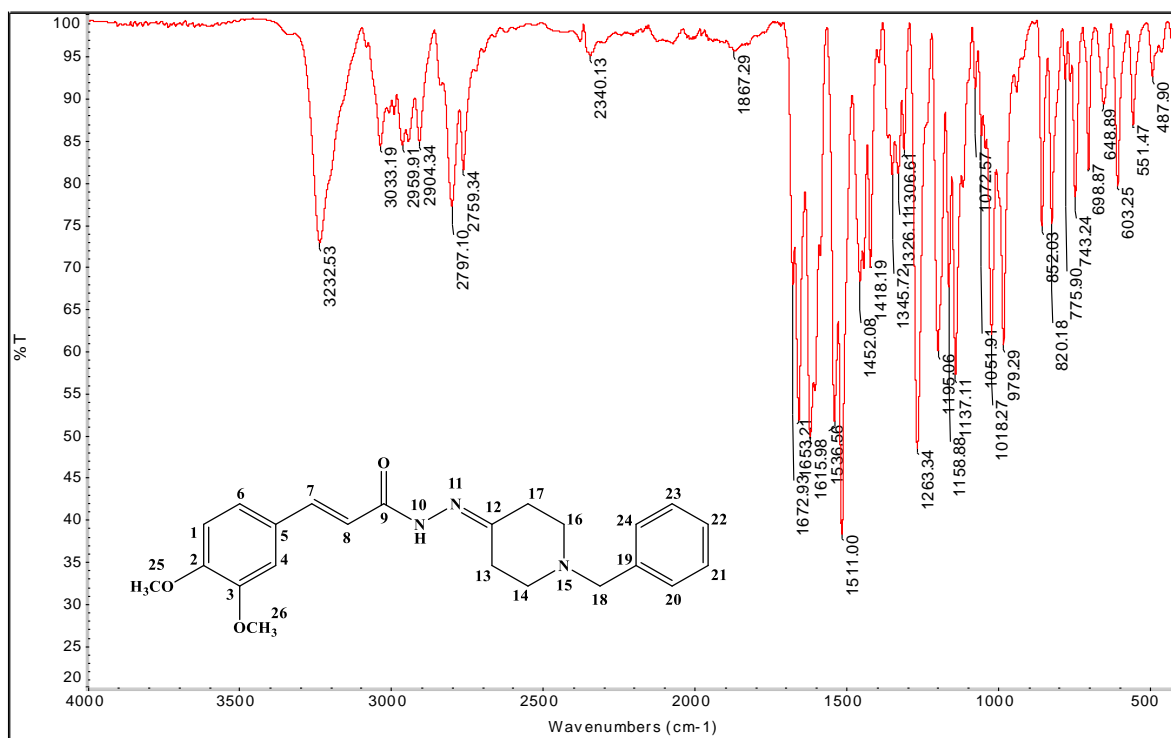
Fonte: do autor

Figura 170 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 265**



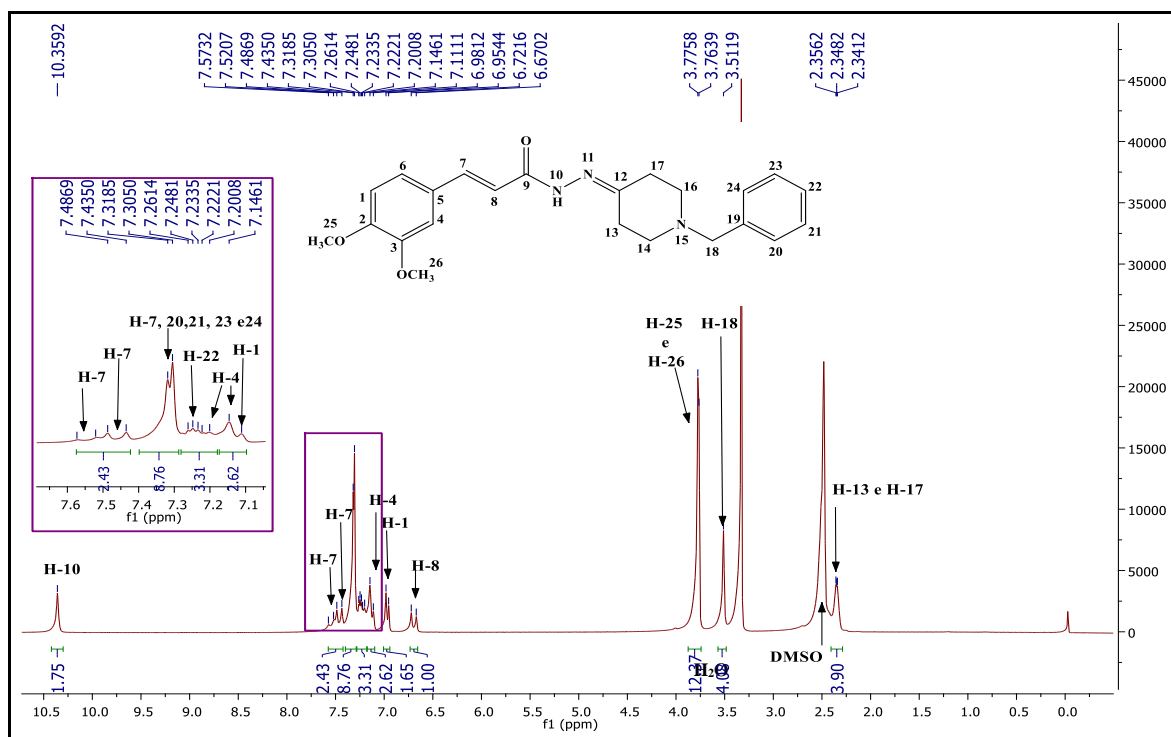
Fonte: do autor

Figura 171 - Espectro na região do infravermelho de PQM 266



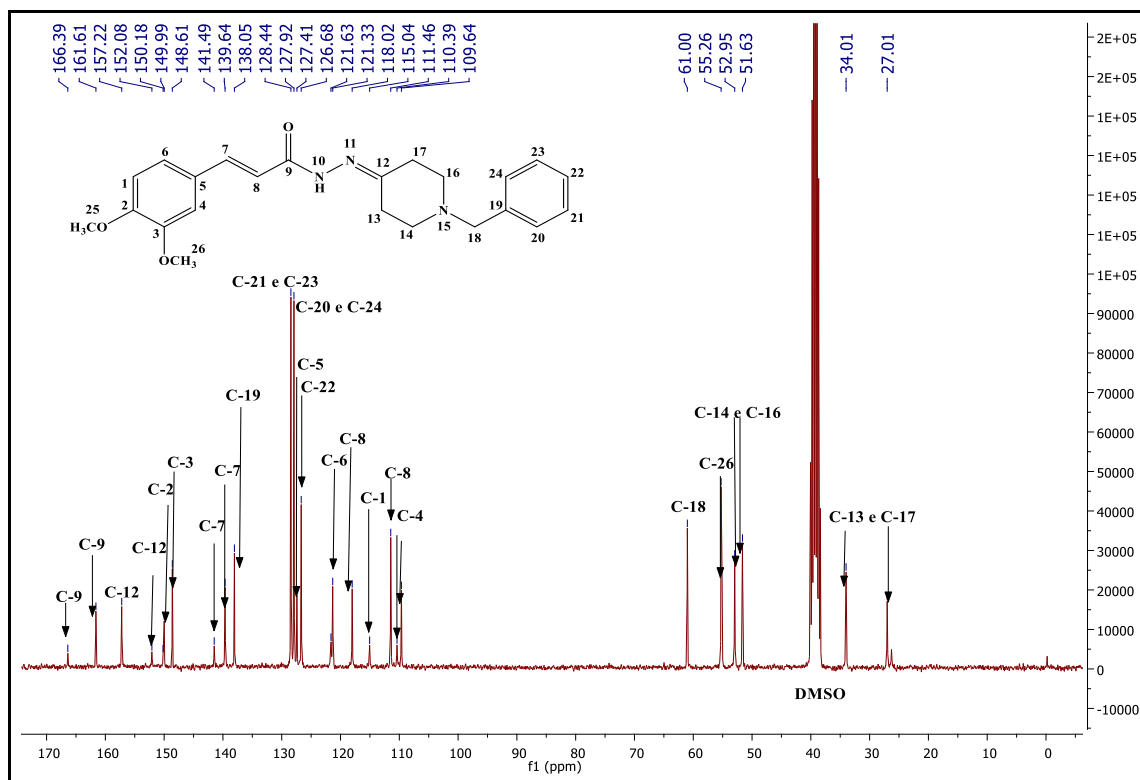
Fonte: do autor

Figura 172 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 266 (300 MHz, DMSO-d₆)



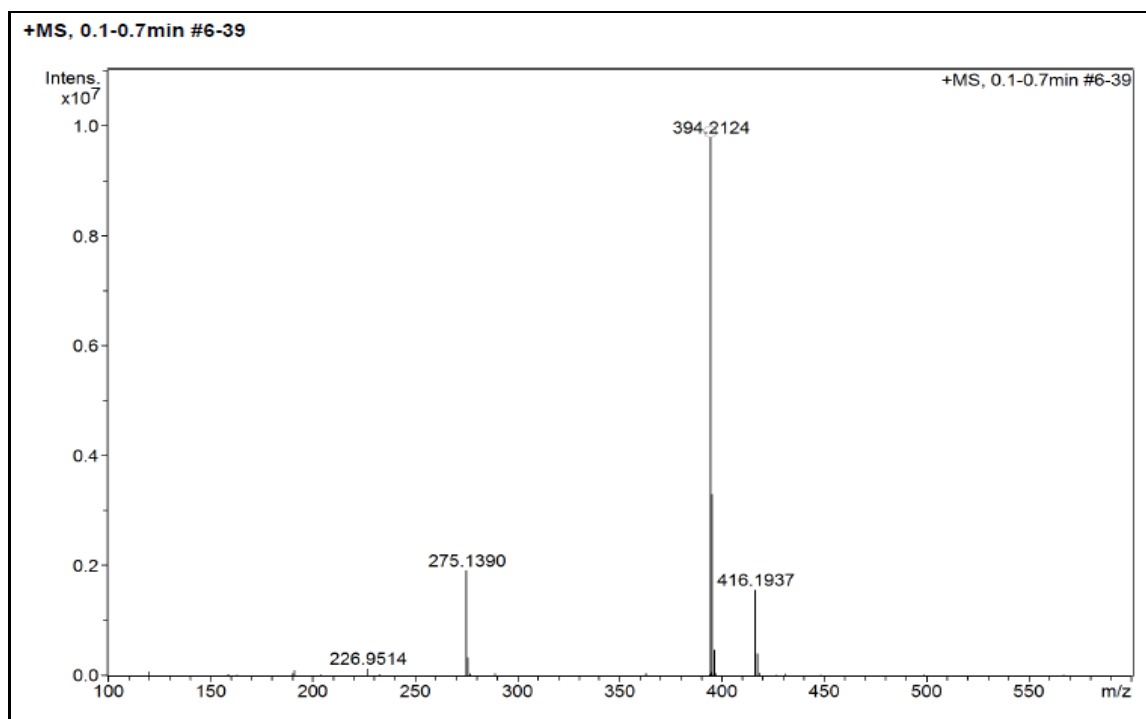
Fonte: do autor

Figura 173 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 266** (75 MHz, DMSO-d_6)



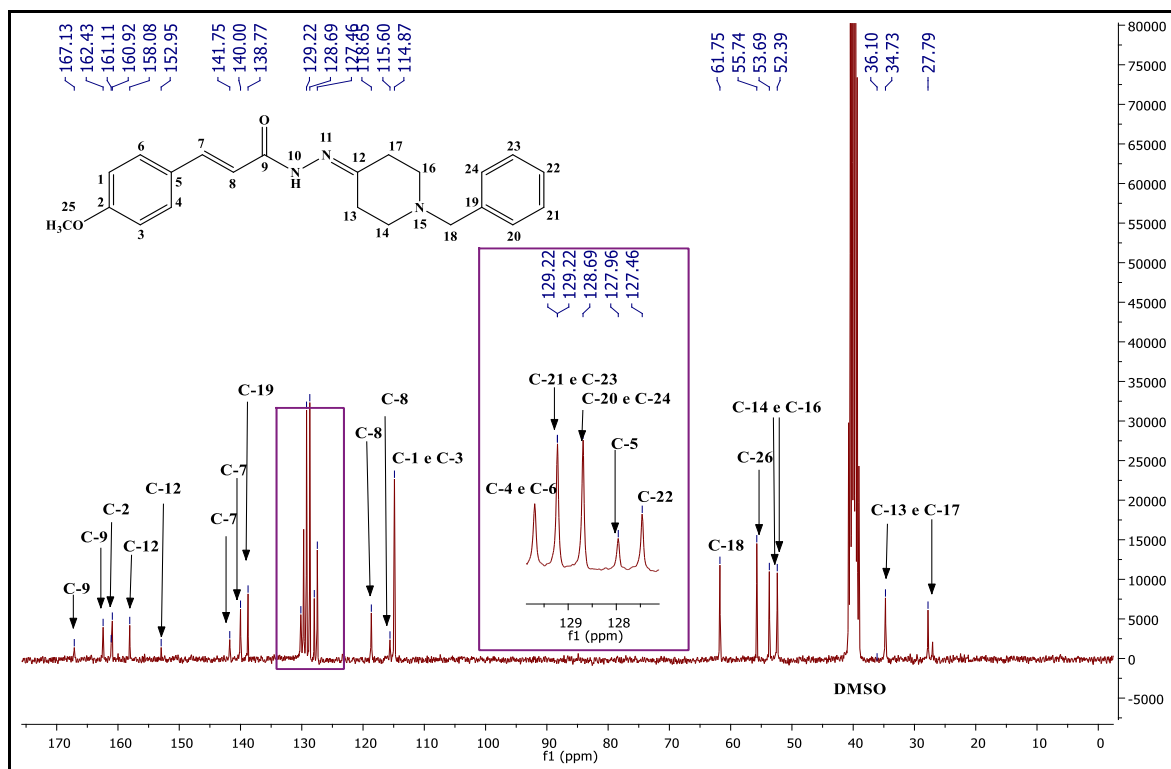
Fonte: do autor

Figura 174 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 266**



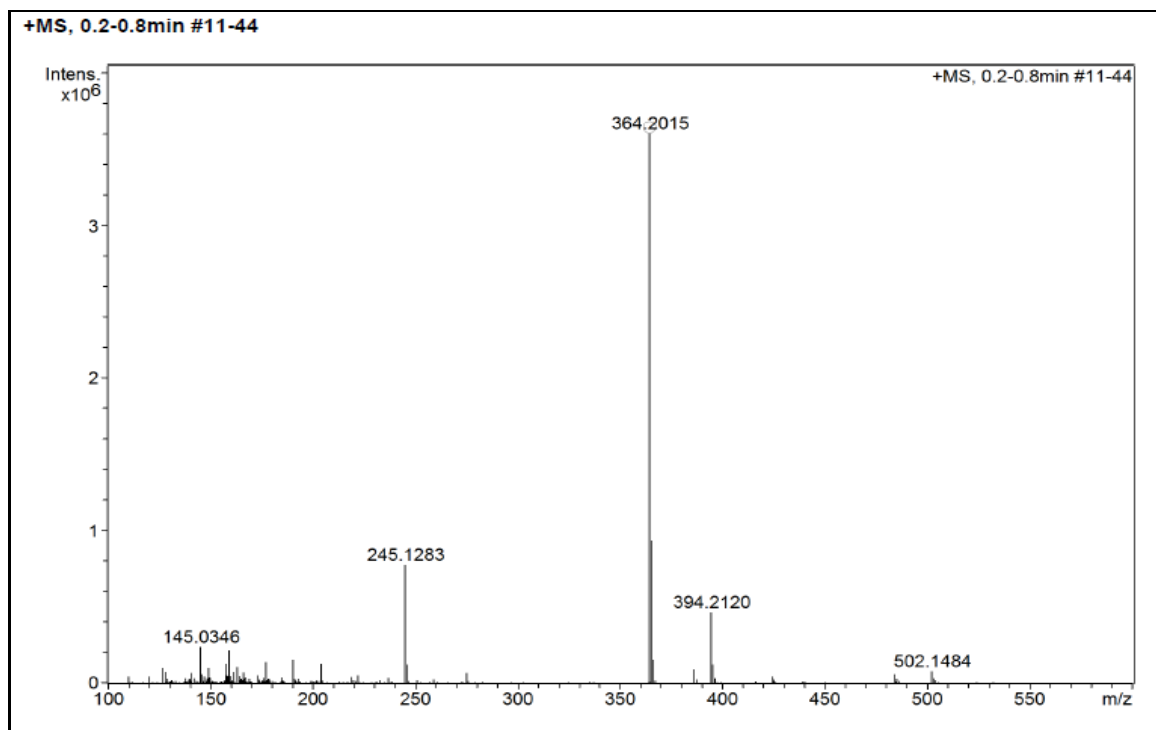
Fonte: do autor

Figura 177 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 267** (75 MHz, DMSO-d_6)



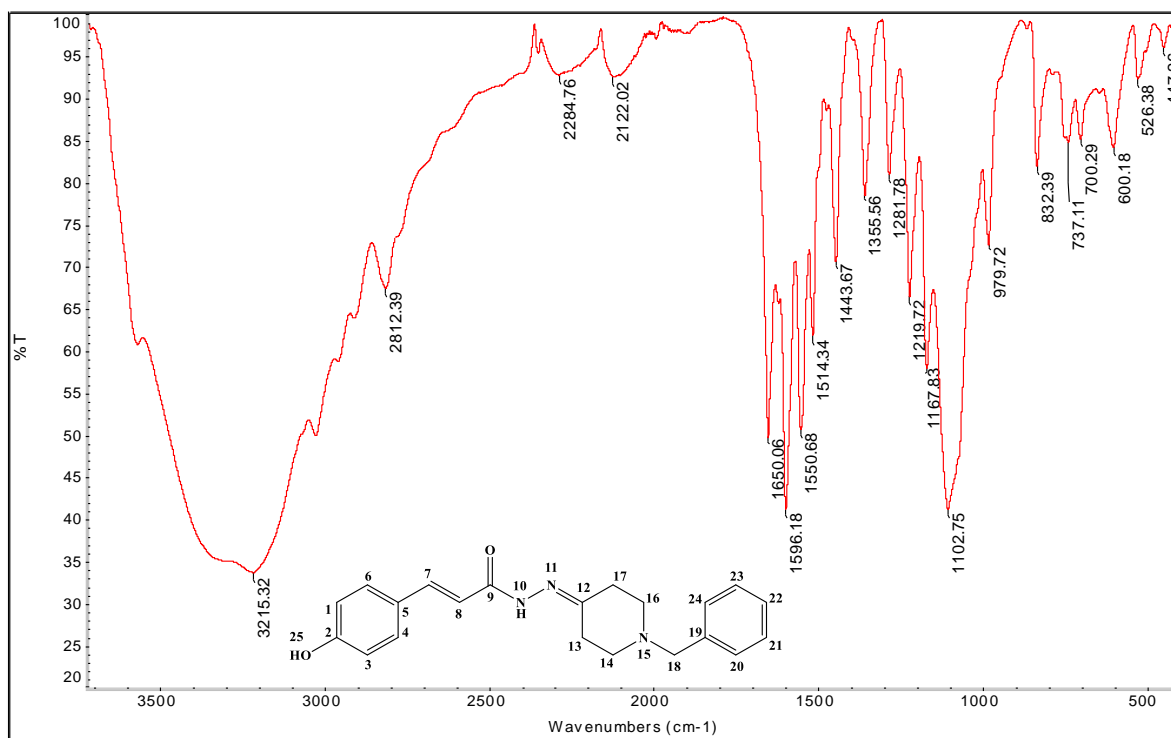
Fonte: do autor

Figura 178 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 267**



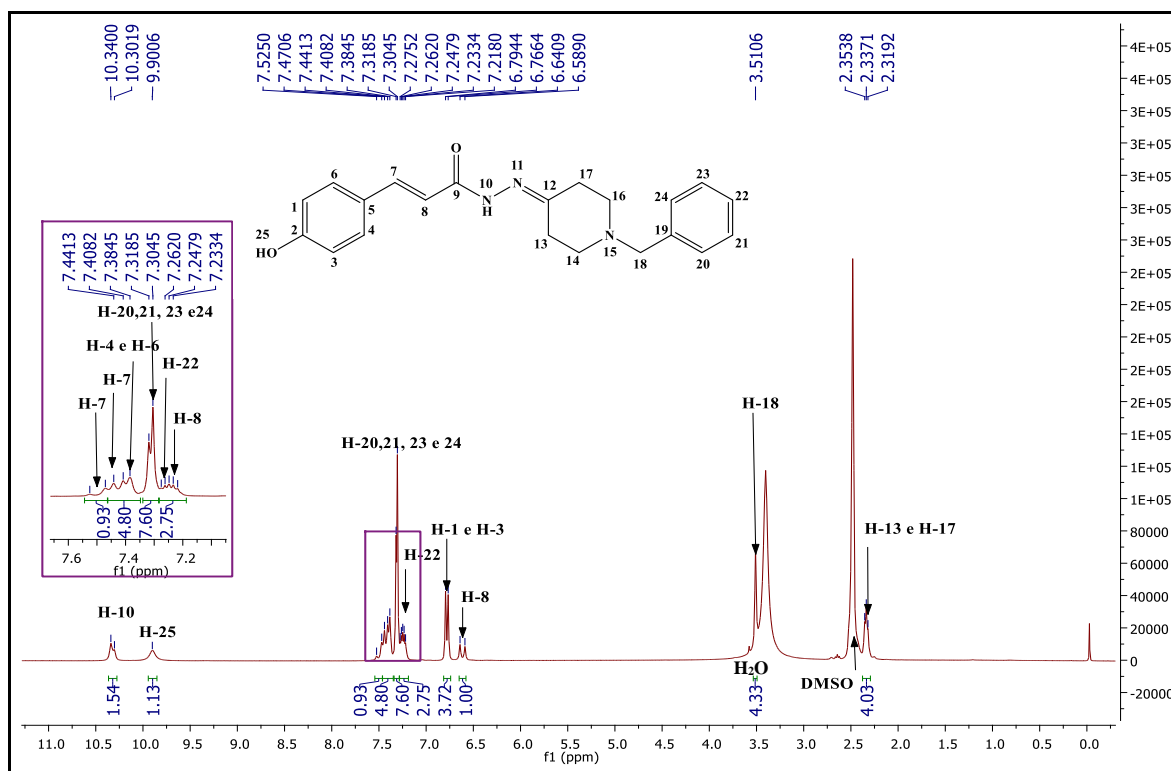
Fonte: do autor

Figura 179 - Espectro na região do infravermelho de PQM 268



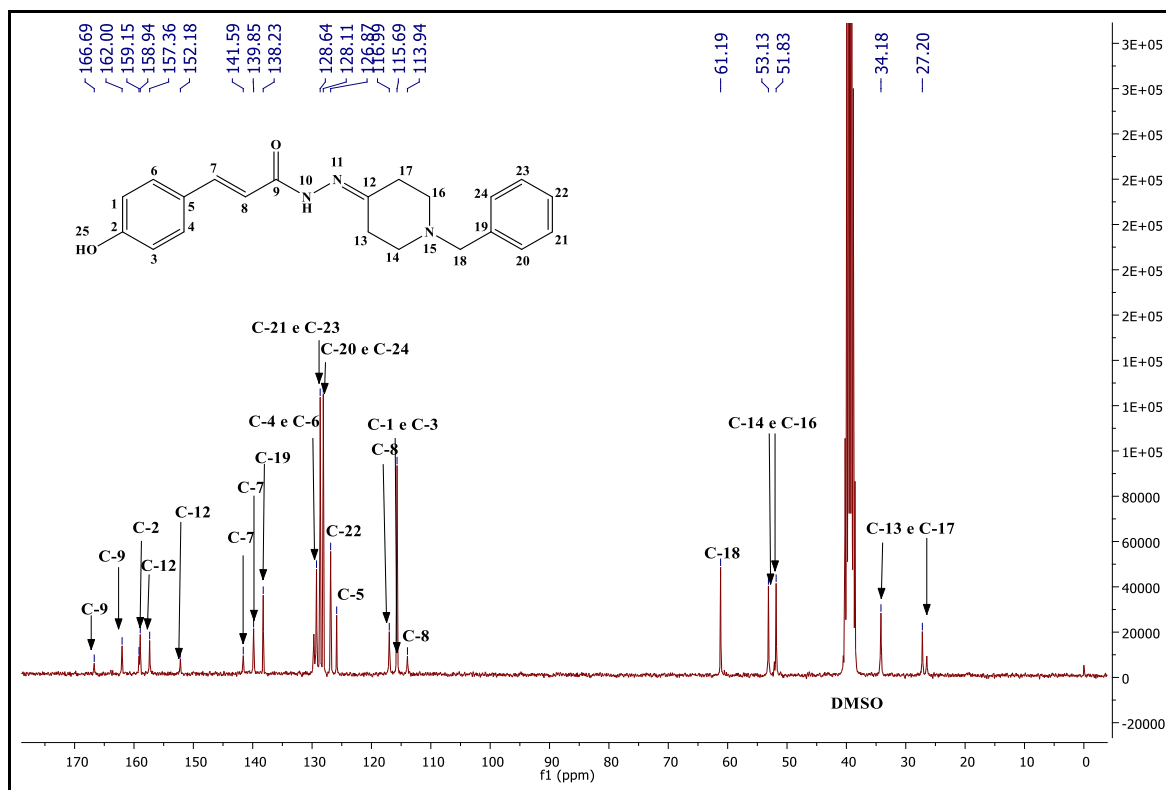
Fonte: do autor

Figura 180 - Espectro de RMN de ^1H do composto PQM 268 (300 MHz, DMSO- d_6)



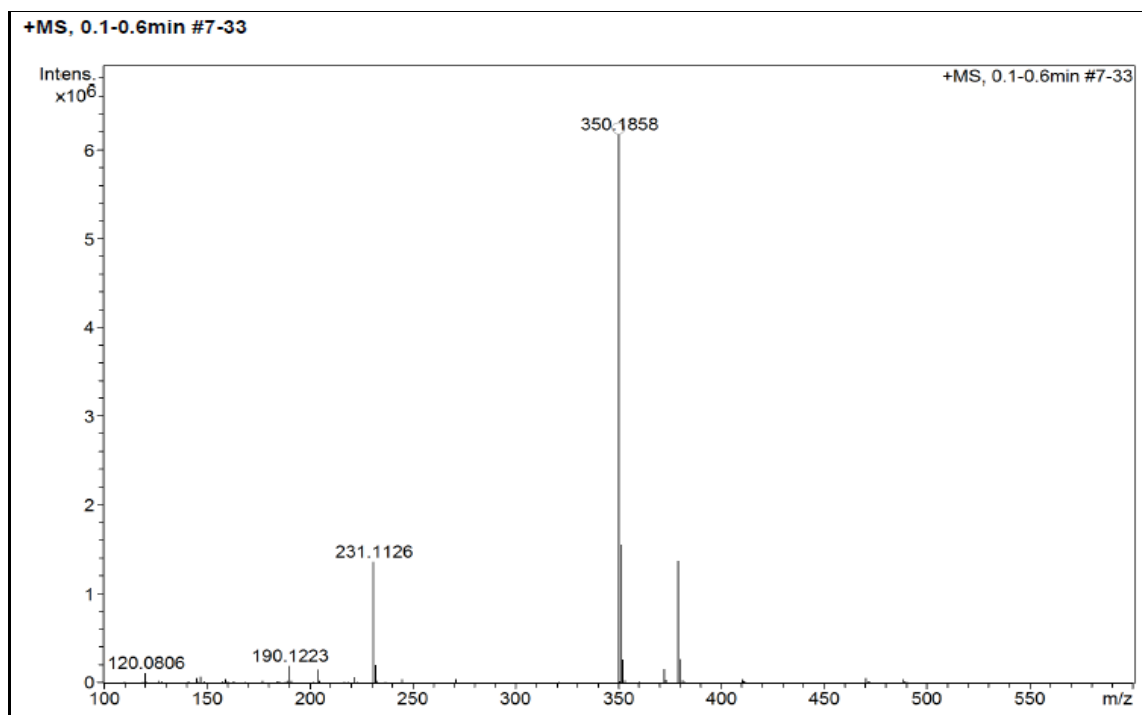
Fonte: do autor

Figura 181 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 268** (75 MHz, DMSO-d_6)



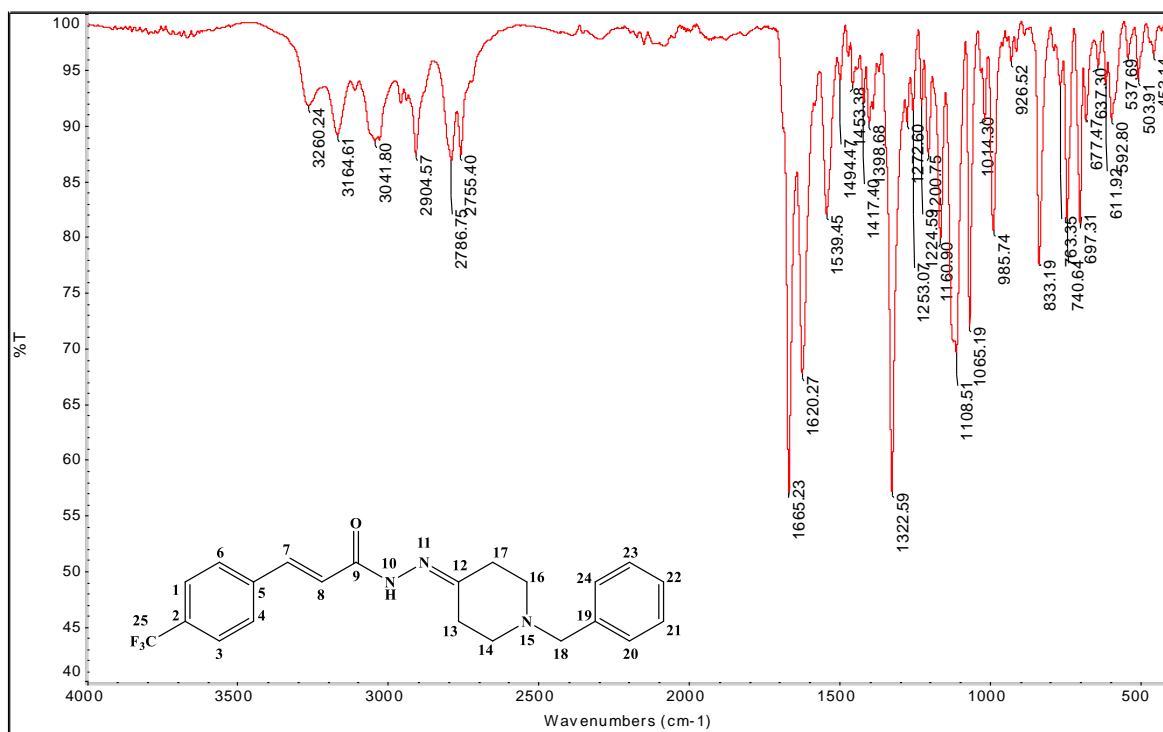
Fonte: do autor

Figura 182 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 268**



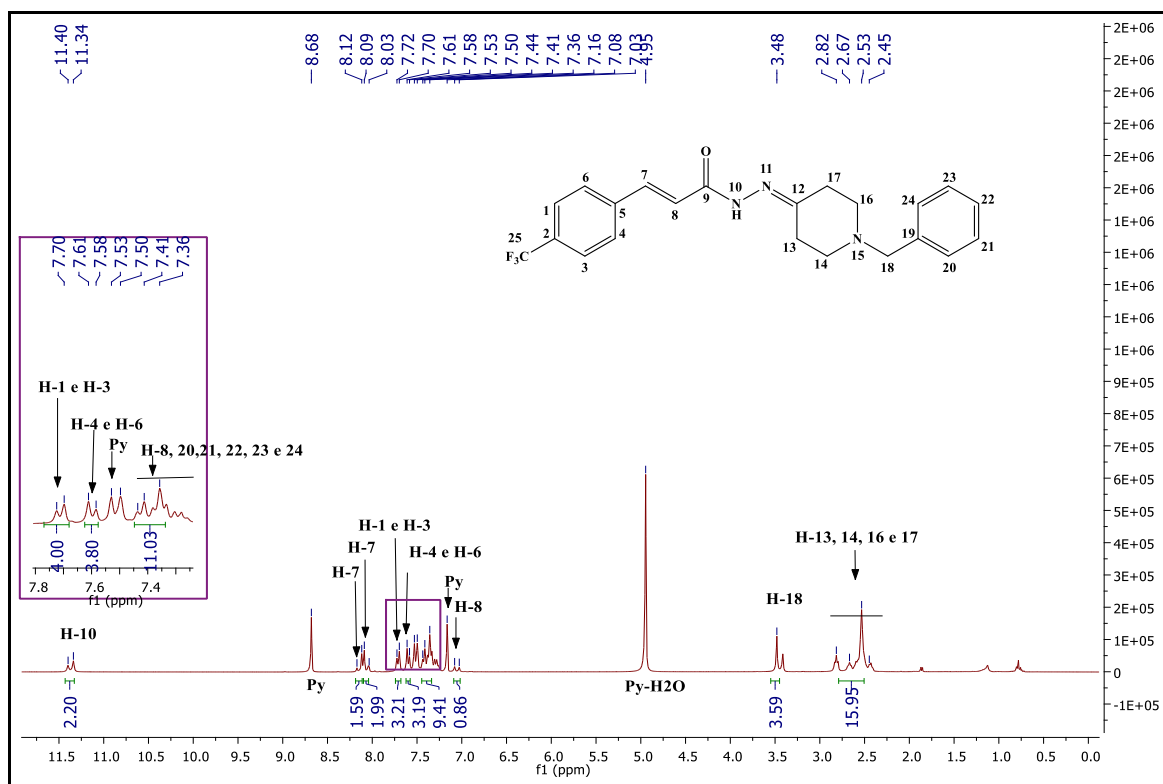
Fonte: do autor

Figura 183 - Espectro na região do infravermelho de PQM 269



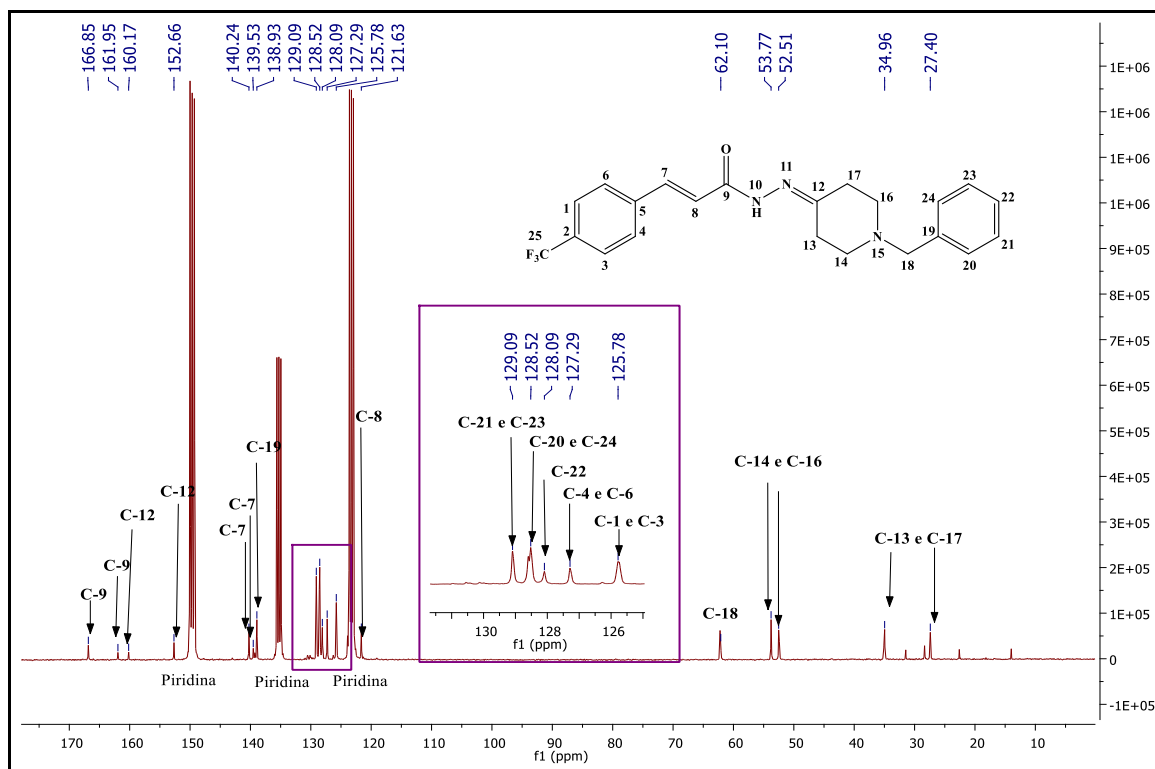
Fonte: do autor

Figura 184 - Espectro de RMN de ^1H do composto PQM 269 (300 MHz, Piridina- d_5)



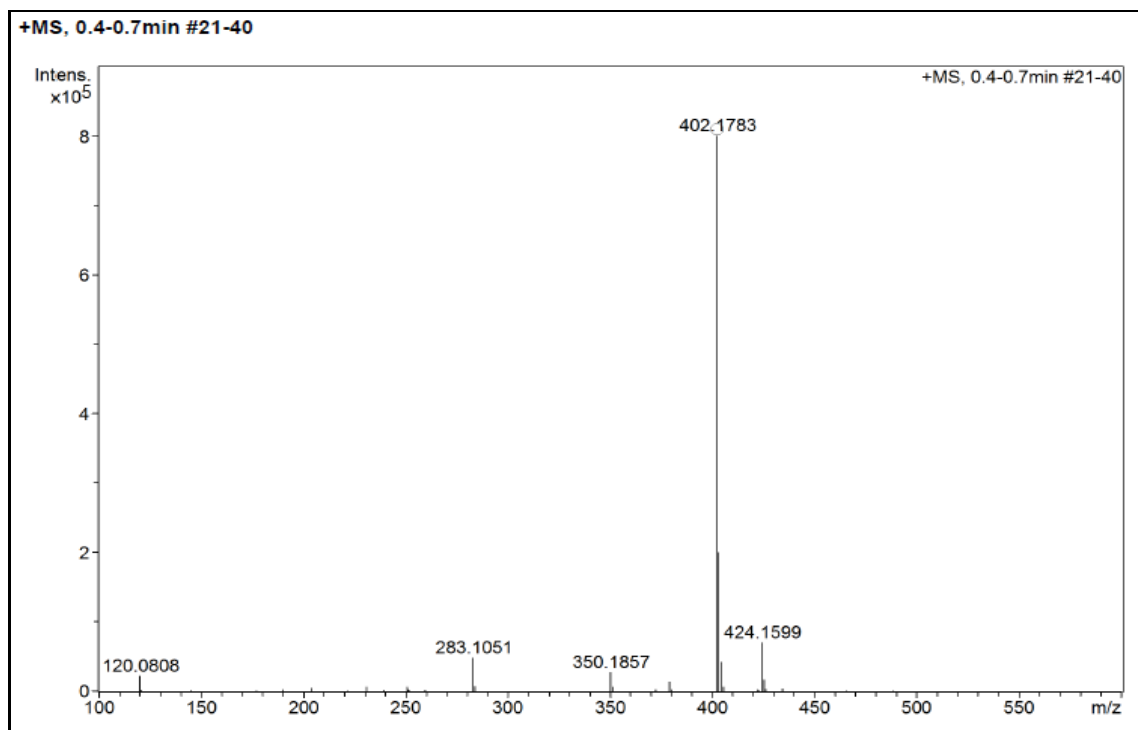
Fonte: do autor

Figura 185 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 269** (75 MHz, Piridina- d_5).



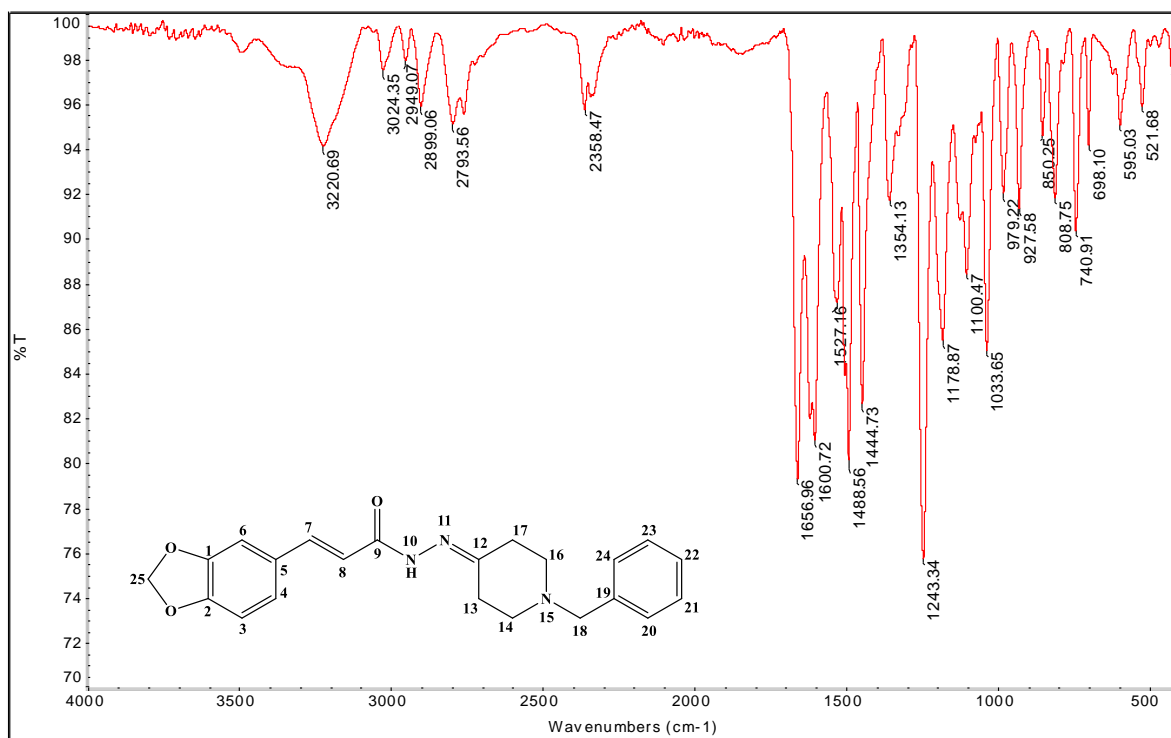
Fonte: do autor

Figura 186 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 269**



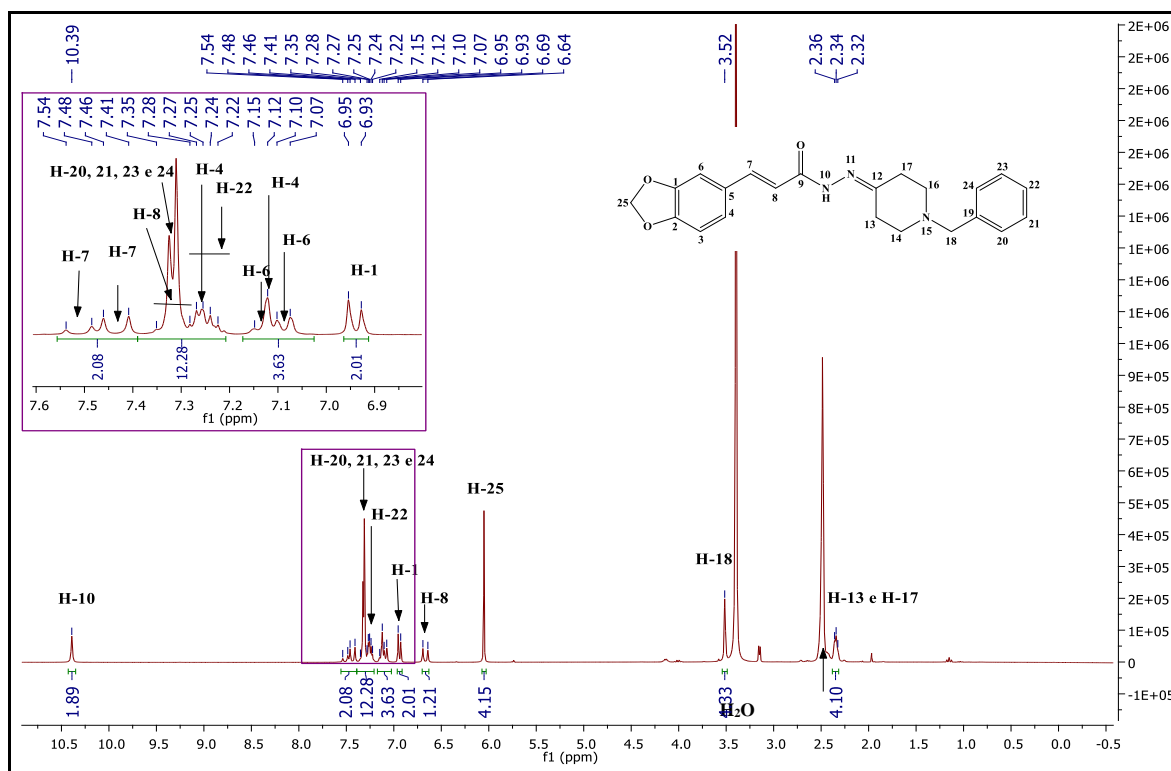
Fonte: do autor

Figura 187 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 270**



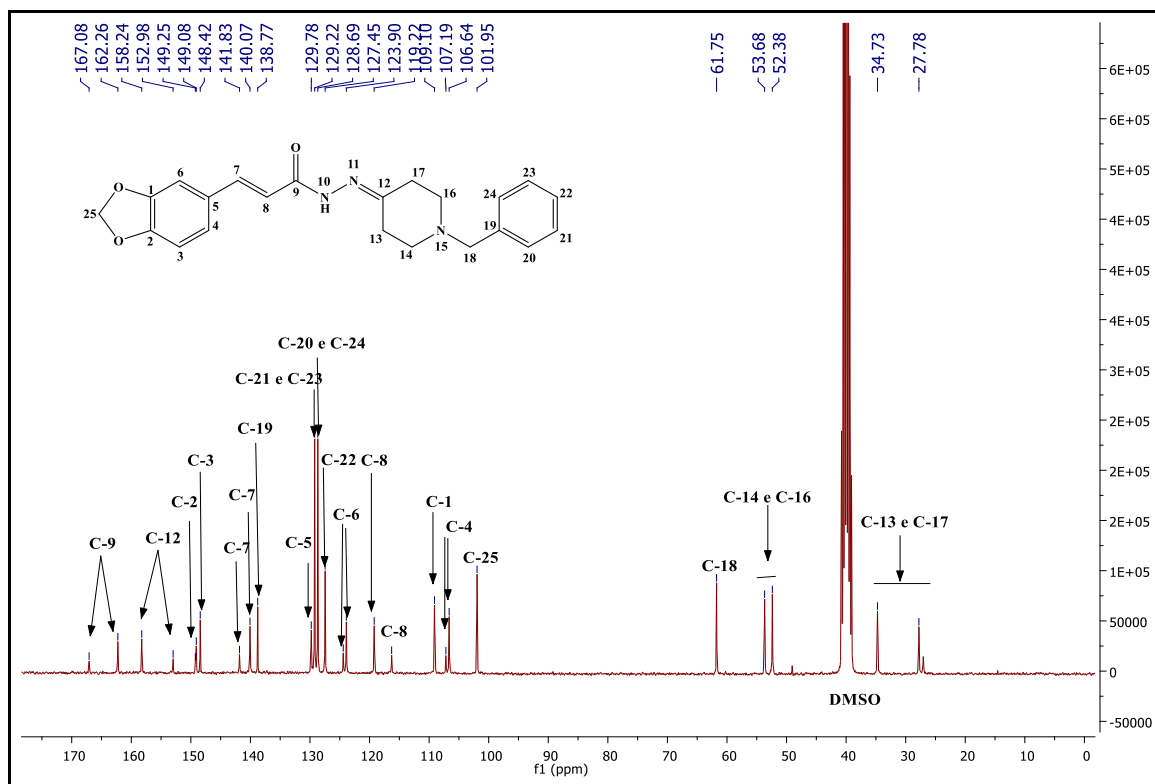
Fonte: do autor

Figura 188 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 270** (300 MHz, DMSO-d₆)



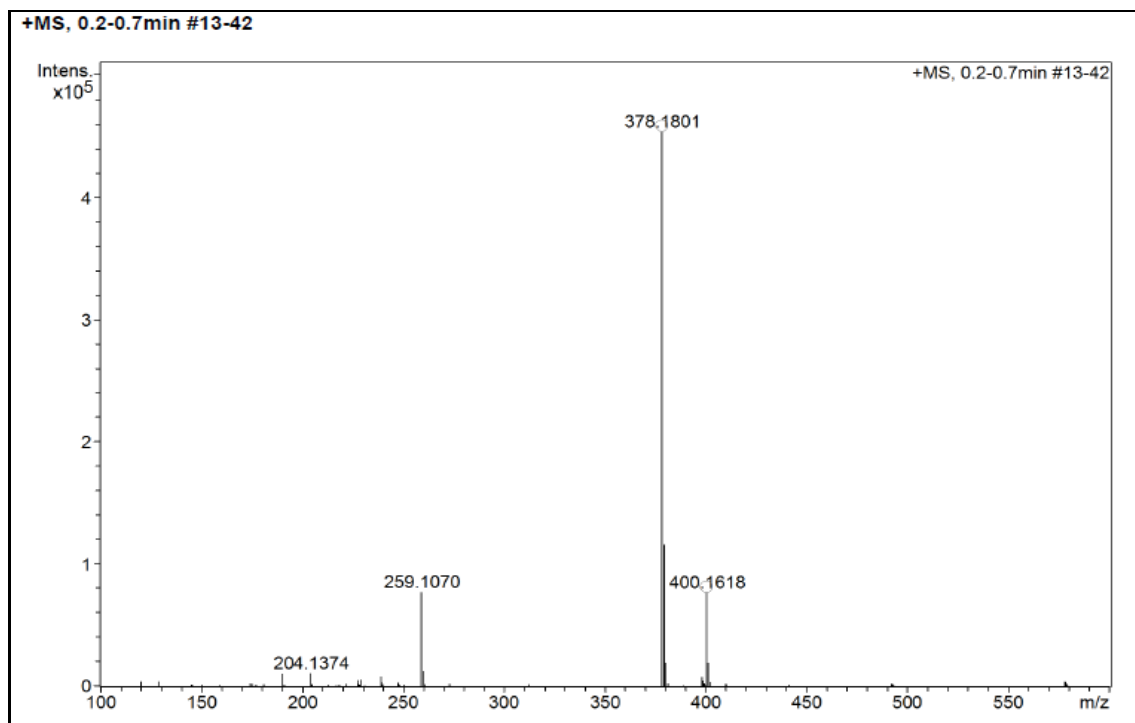
Fonte: do autor

Figura 189 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 270** (75 MHz, DMSO-d_6)



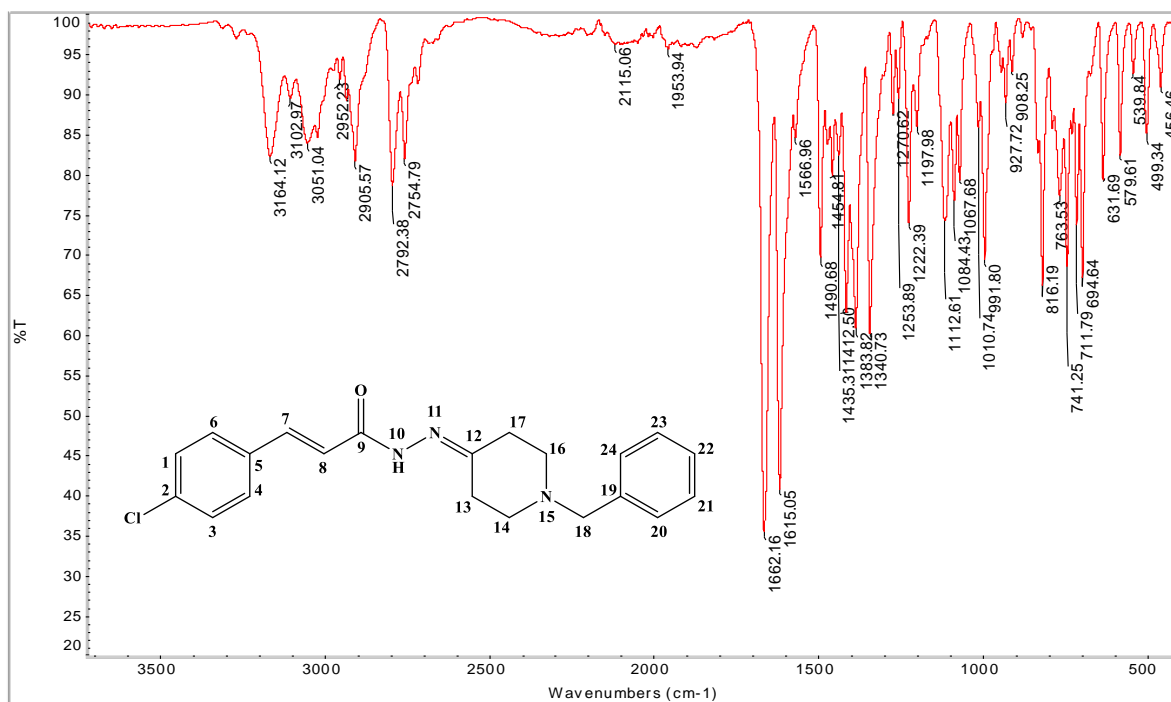
Fonte: do autor

Figura 190 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 270**



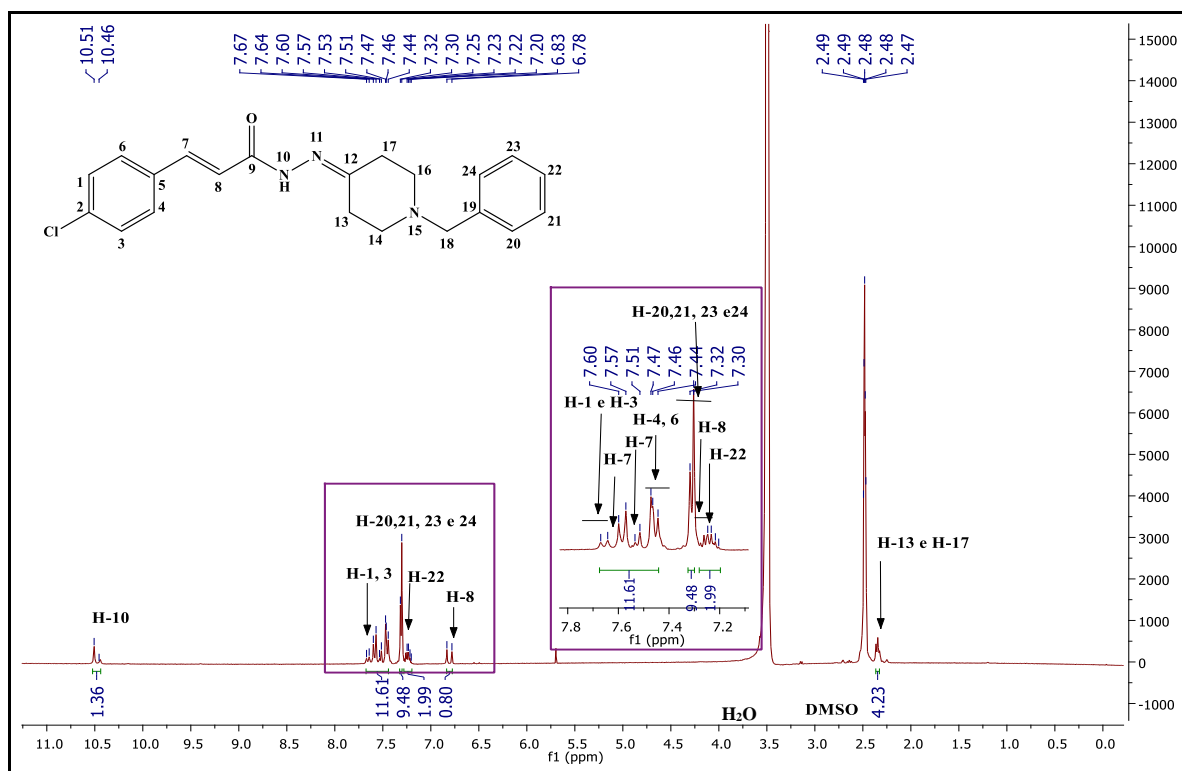
Fonte: do autor

Figura 191 - Espectro na região do infravermelho de **PQM 271**



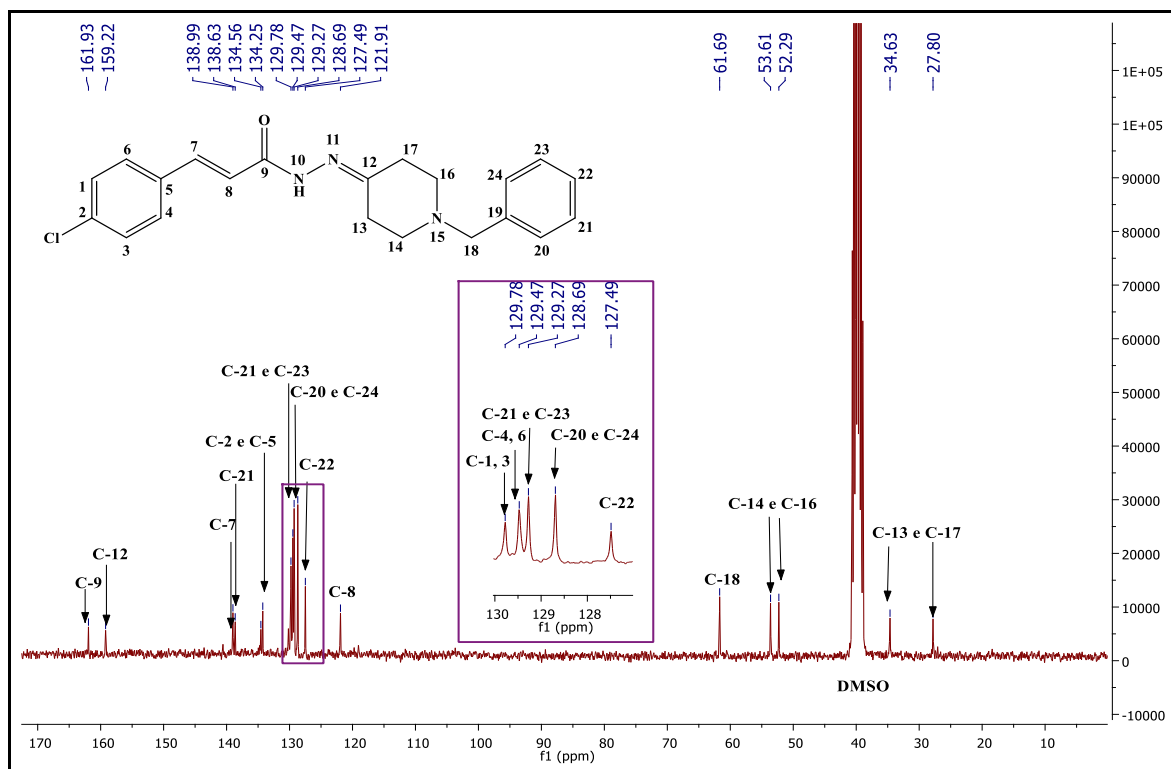
Fonte: do autor

Figura 192 - Espectro de RMN de ¹H do composto **PQM 271** (300 MHz, DMSO-d₆)



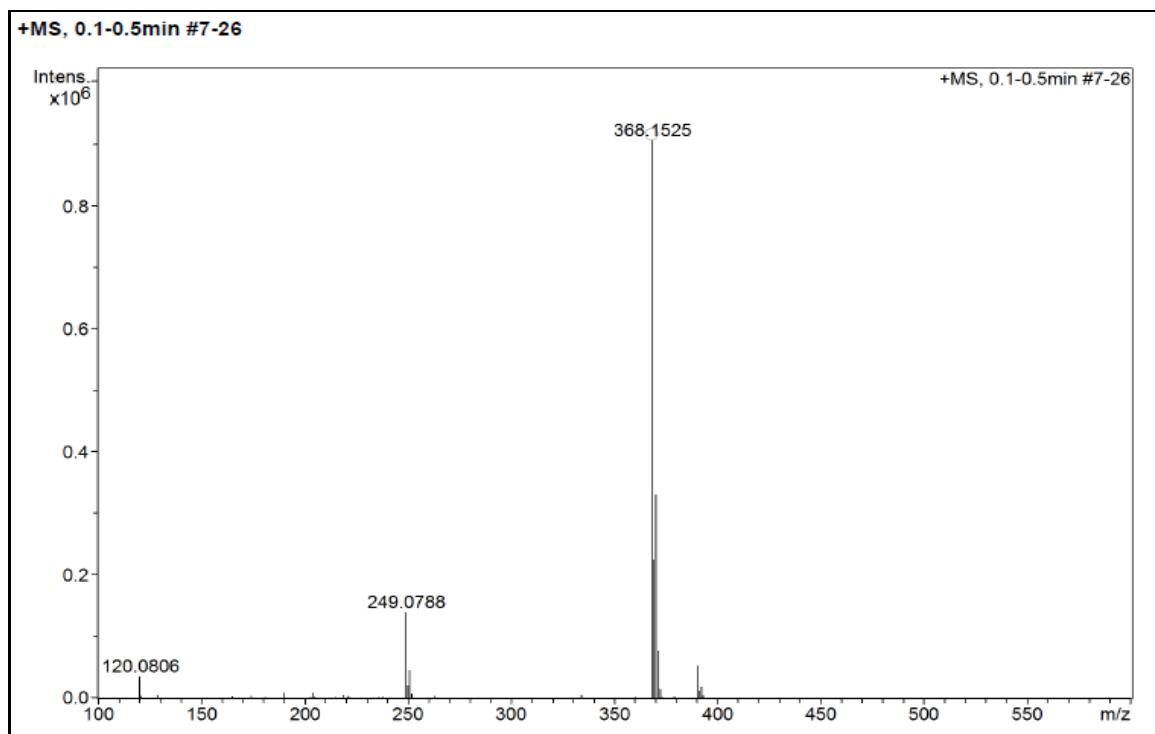
Fonte: do autor

Figura 193 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 271** (75 MHz, DMSO-d_6)



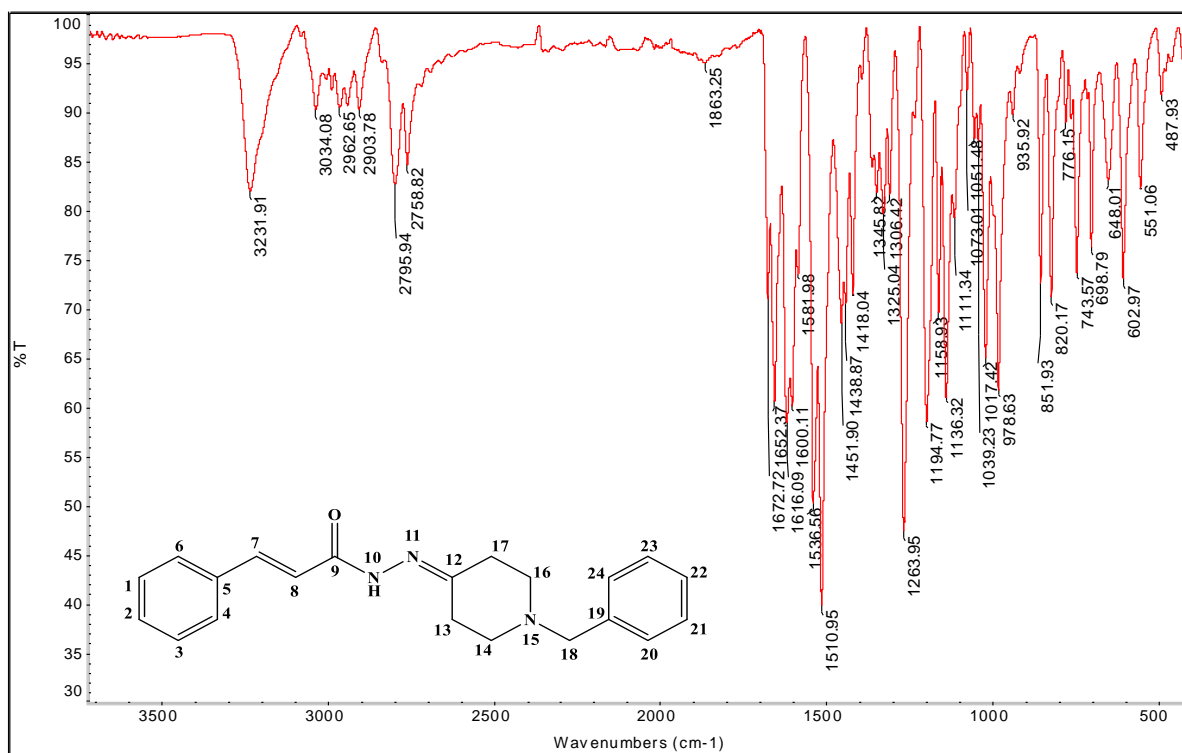
Fonte: do autor

Figura 194 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 271**



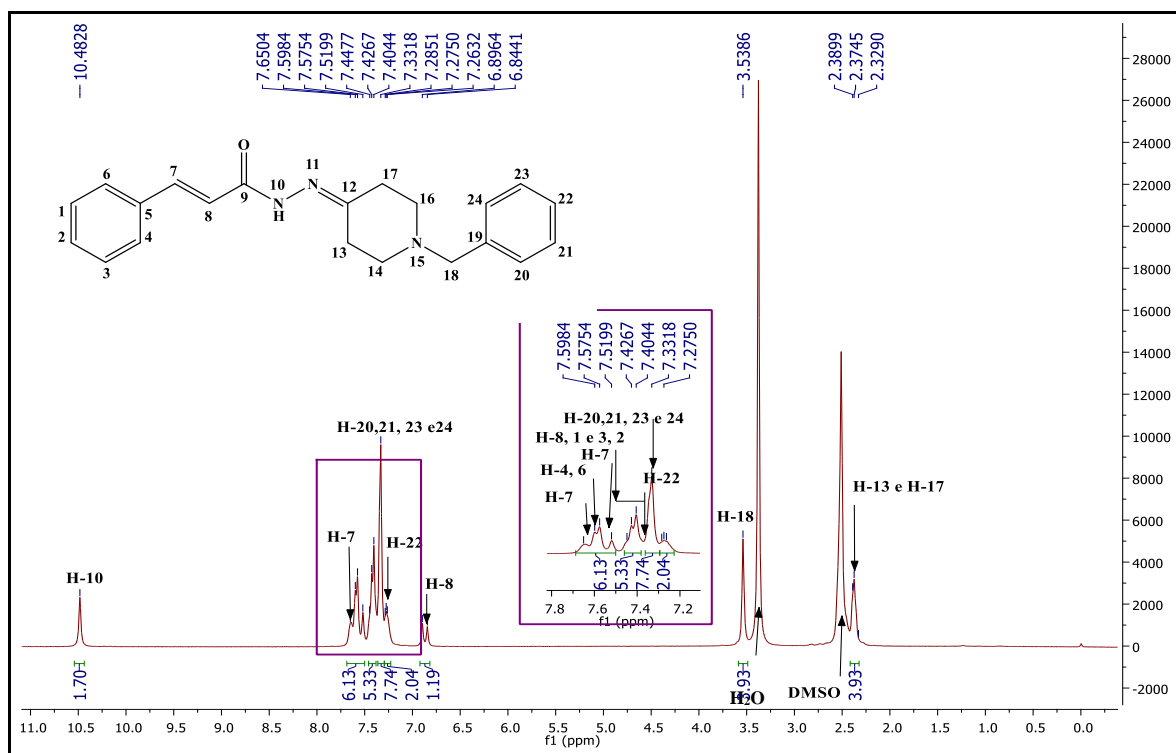
Fonte: do autor

Figura 195 - Espectro na região do infravermelho de PQM 272



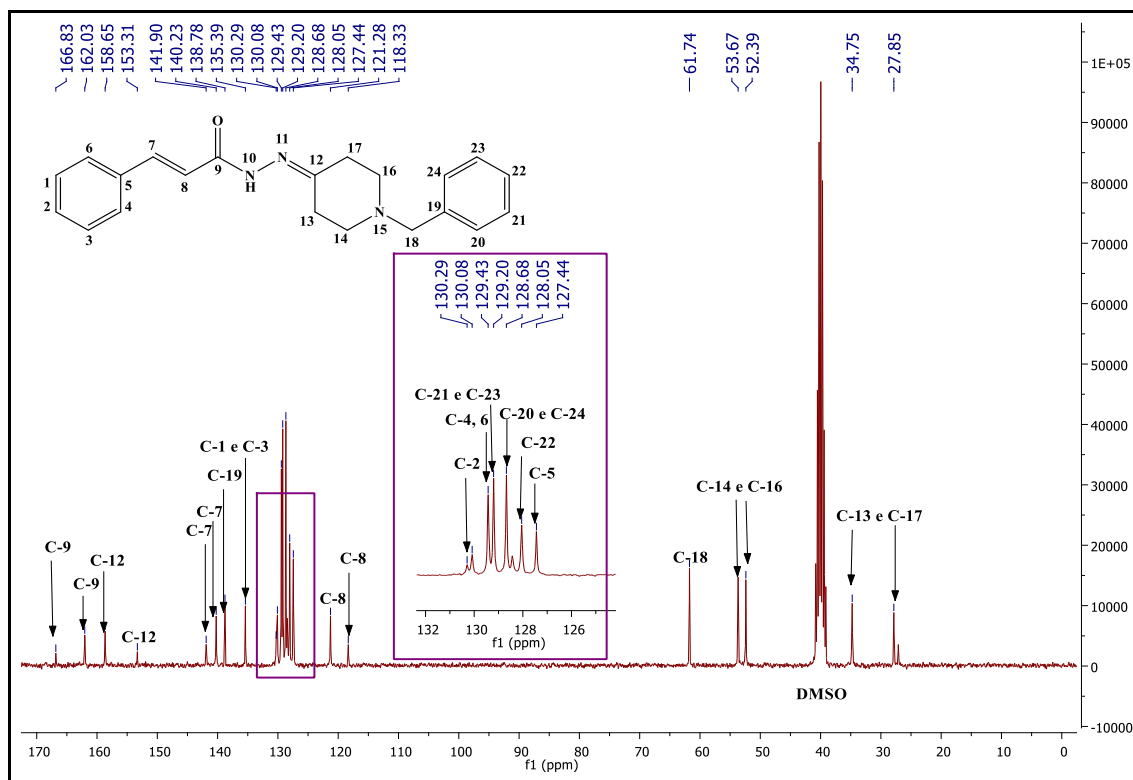
Fonte: do autor

Figura 196 - Espectro de RMN de ¹H do composto PQM 272 (300 MHz, DMSO-d₆)



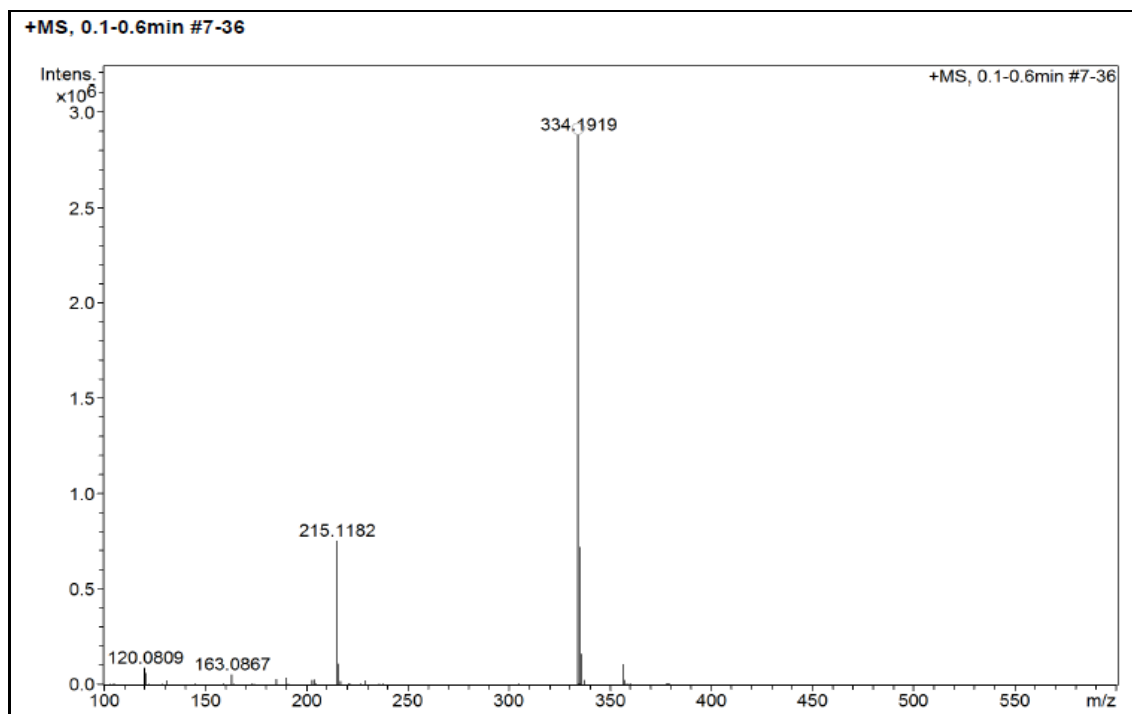
Fonte: do autor

Figura 197 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **PQM 272** (75 MHz, DMSO-d_6)



Fonte: do autor

Figura 198 - Espectro de massas de (ESI-MS) de **PQM 272**

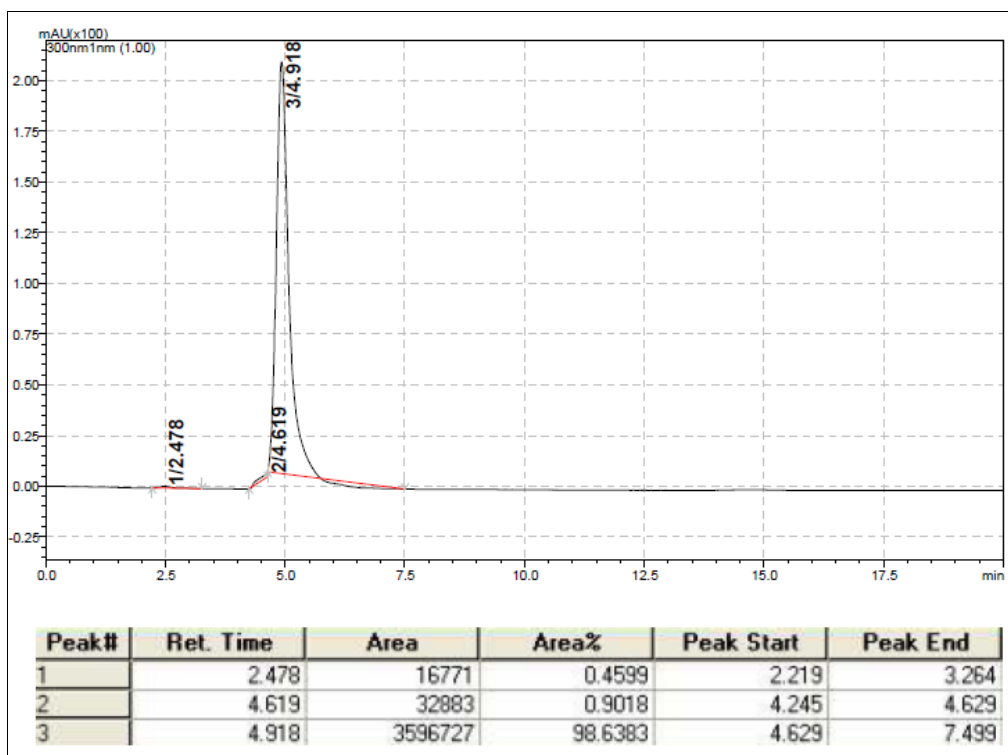


Fonte: do autor

ANEXO C

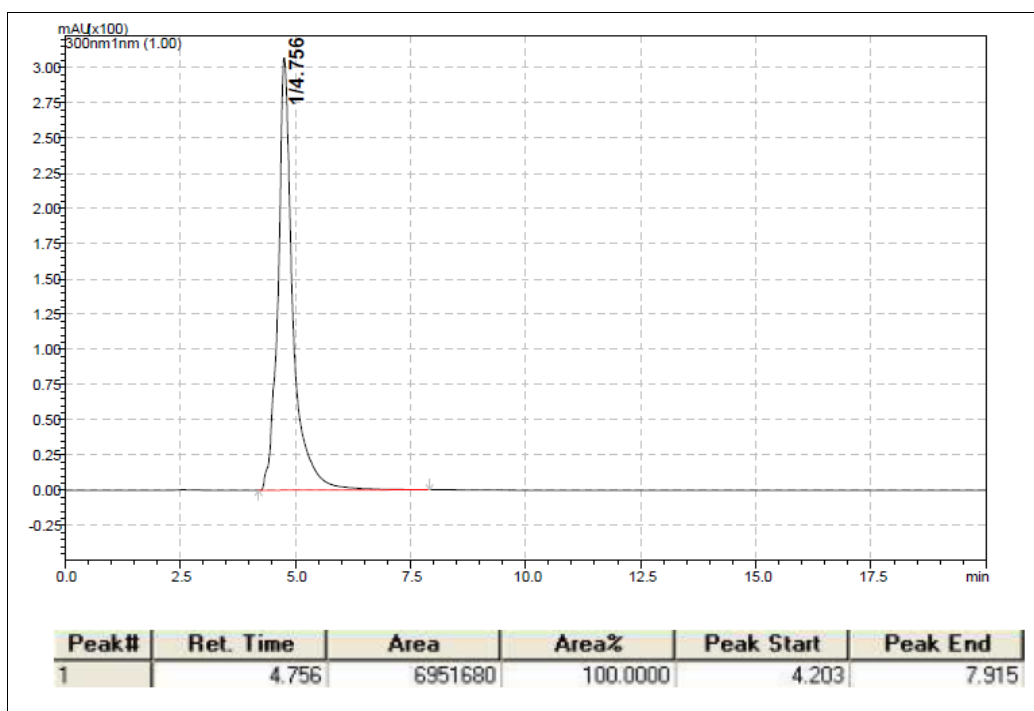
CROMATOGRAMAS DE HPLC

Figura 1 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-183

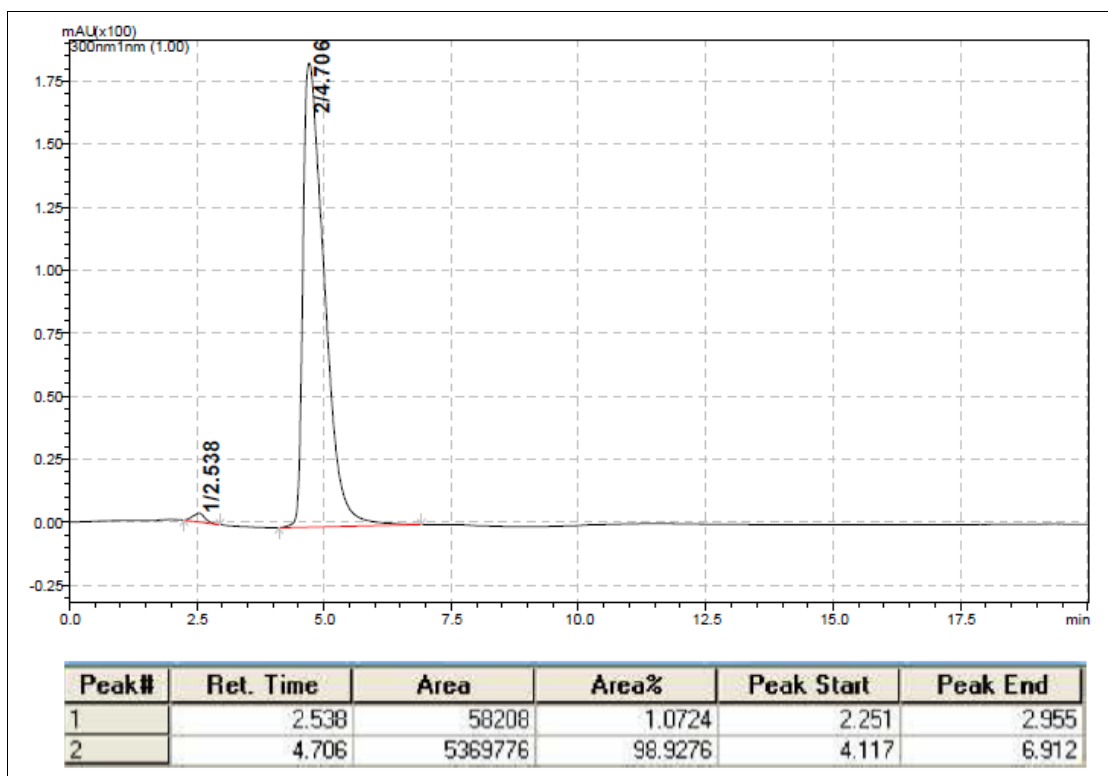


Fonte: do autor

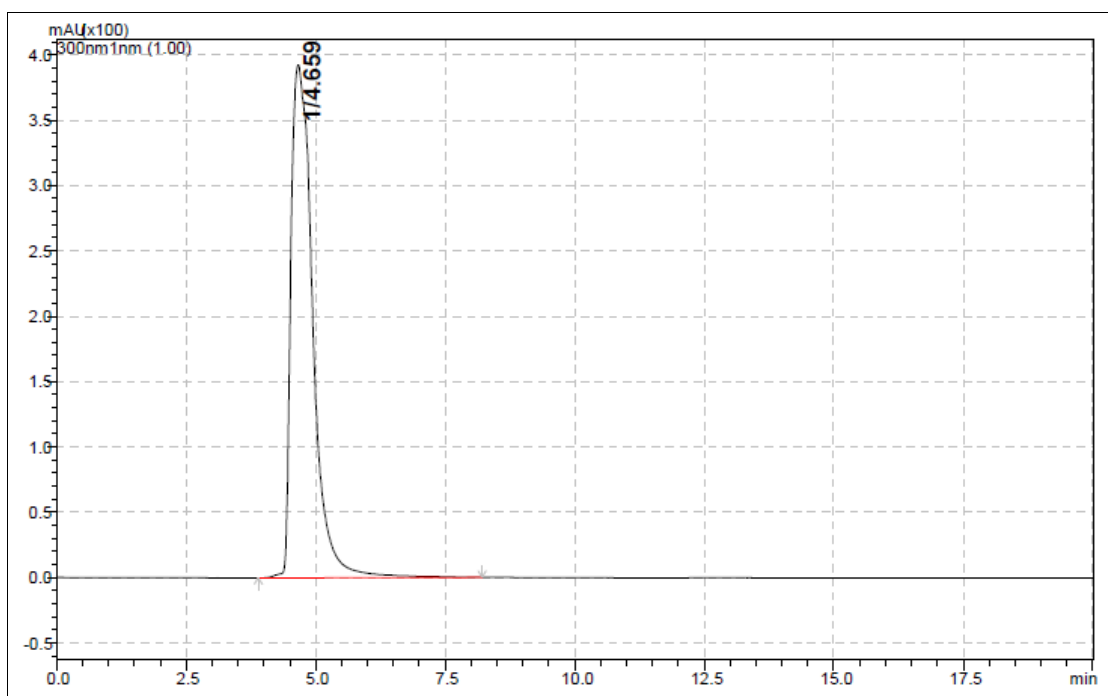
Figura 2 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-184



Fonte: do autor

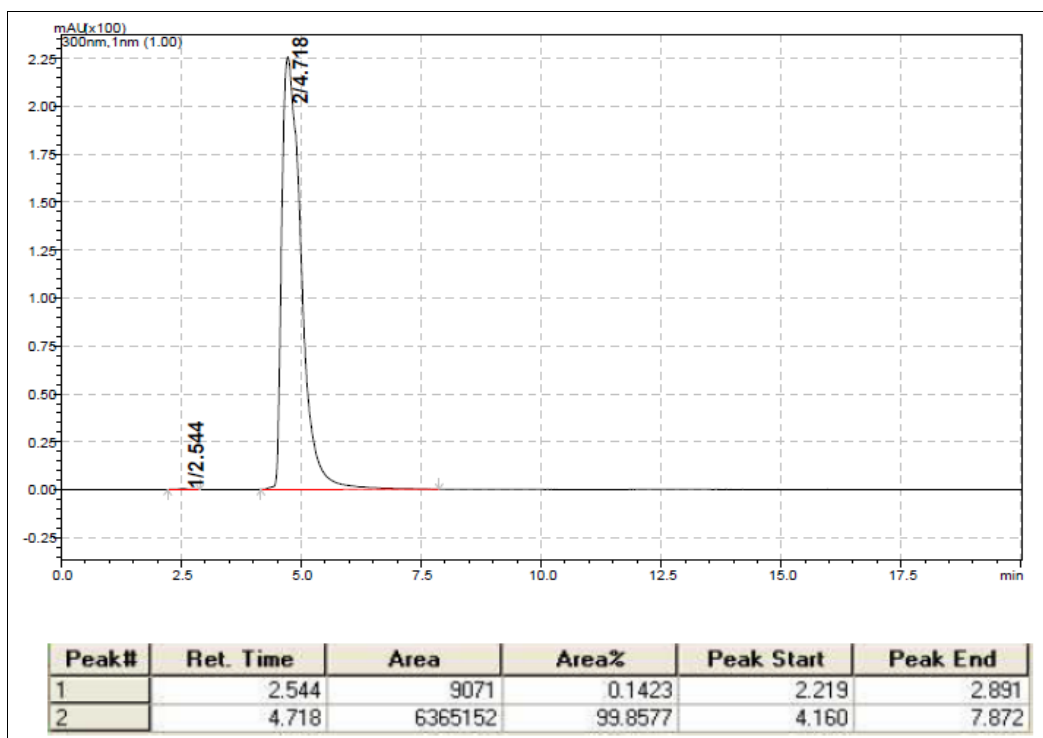
Figura 3 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-185

Fonte: do autor

Figura 4 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-186

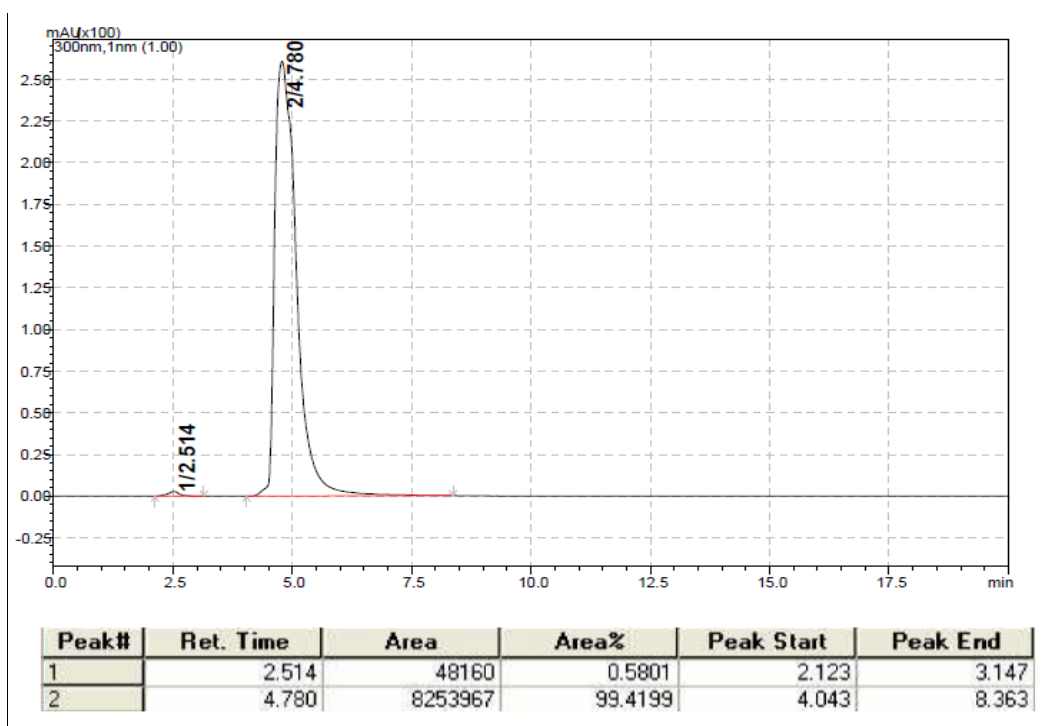
Fonte: do autor

Figura 5 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-187

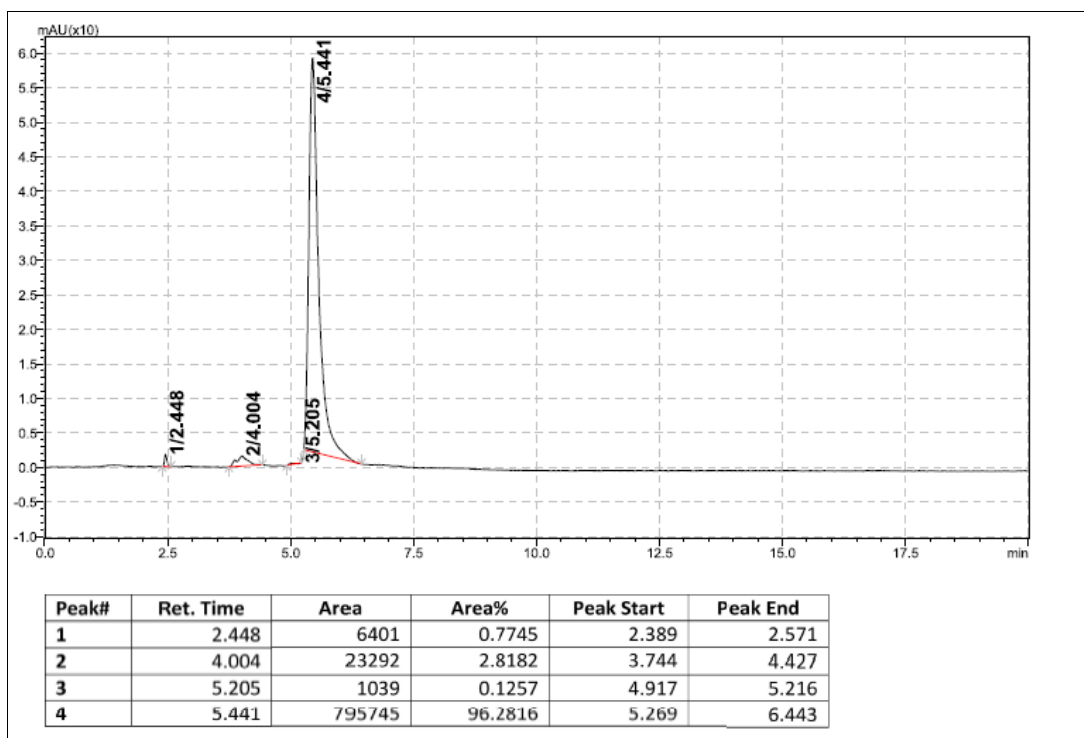


Fonte: do autor

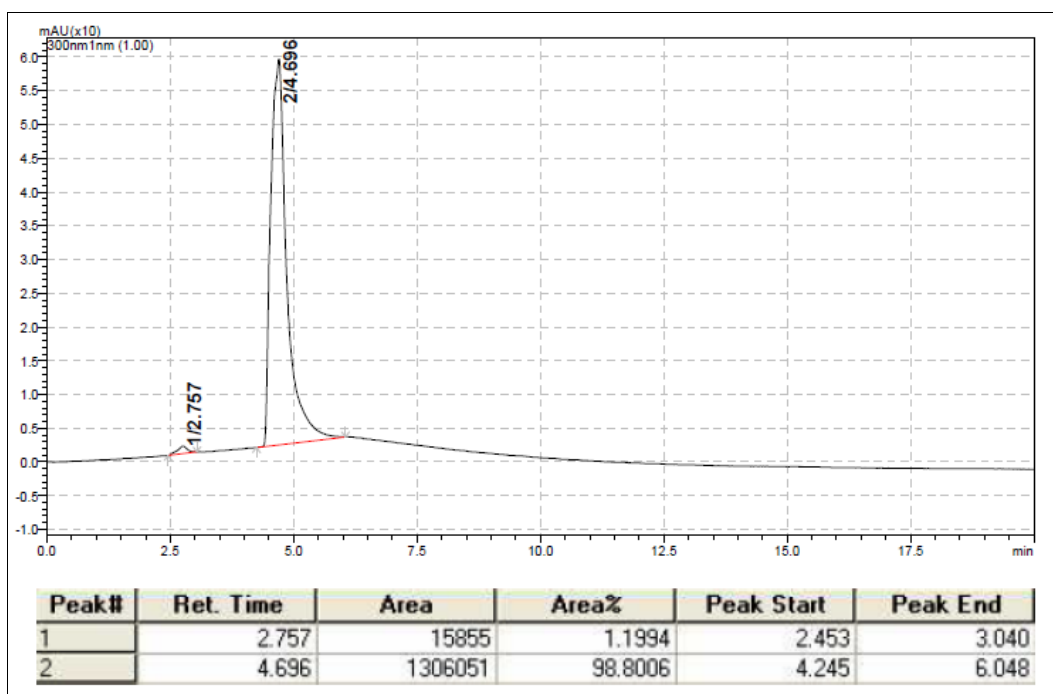
Figura 6 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-188



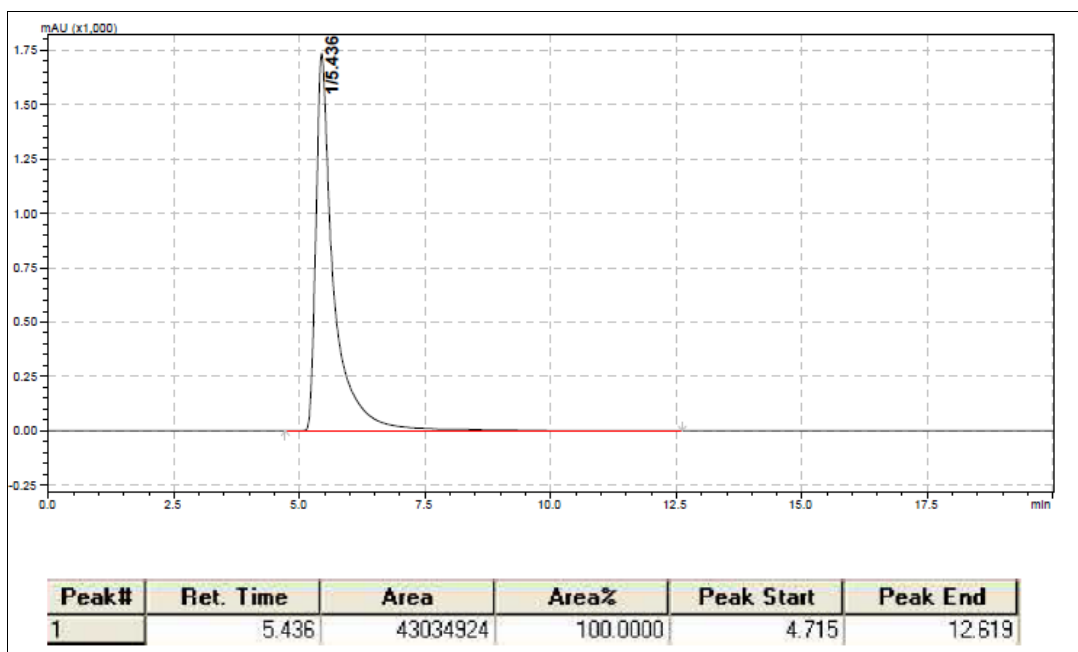
Fonte: do autor

Figura 7 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-189

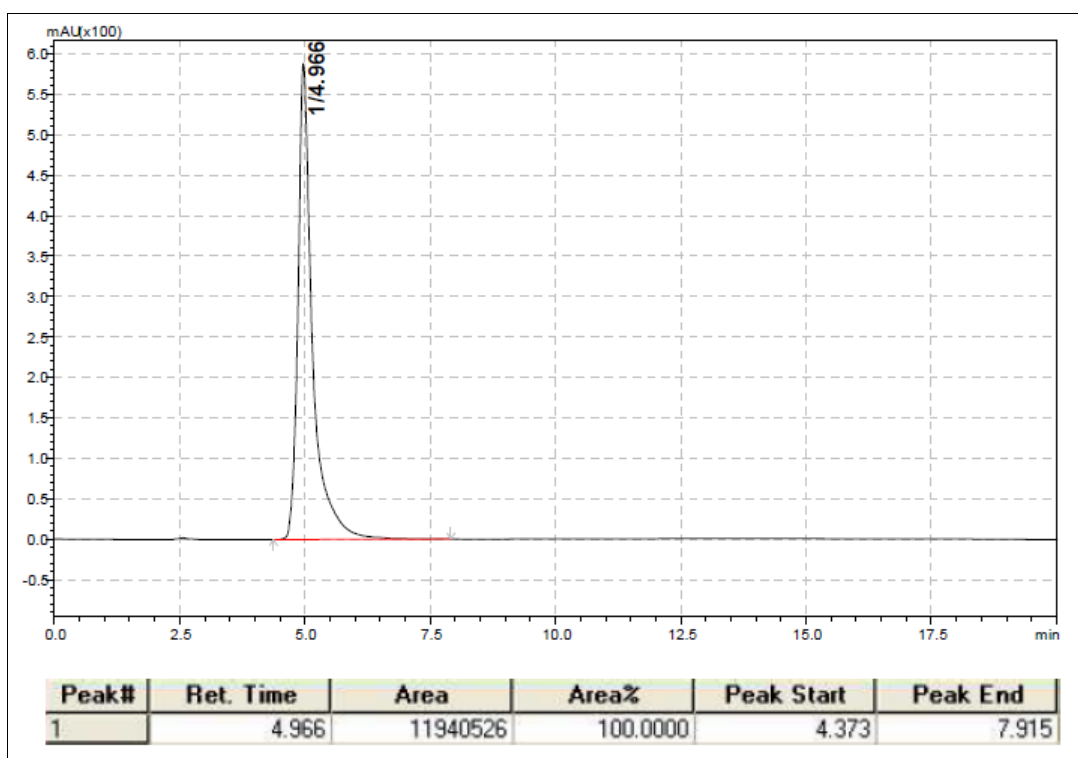
Fonte: do autor

Figura 8 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-190

Fonte: do autor

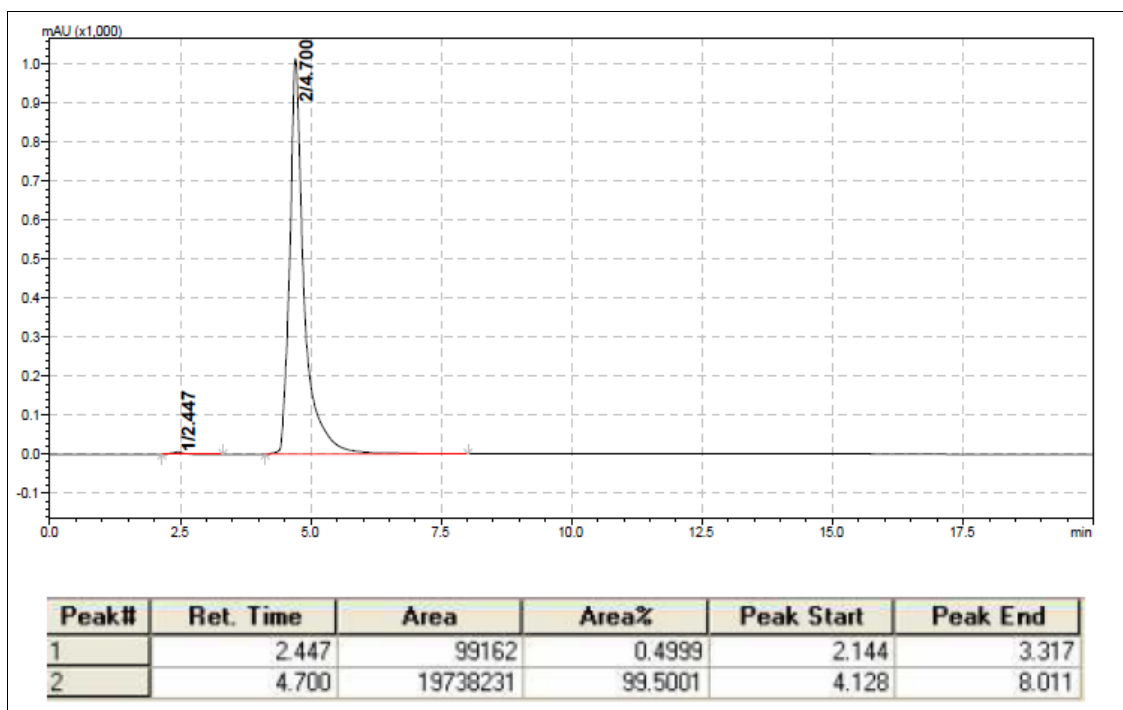
Figura 9 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-296

Fonte: do autor

Figura 10 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-297

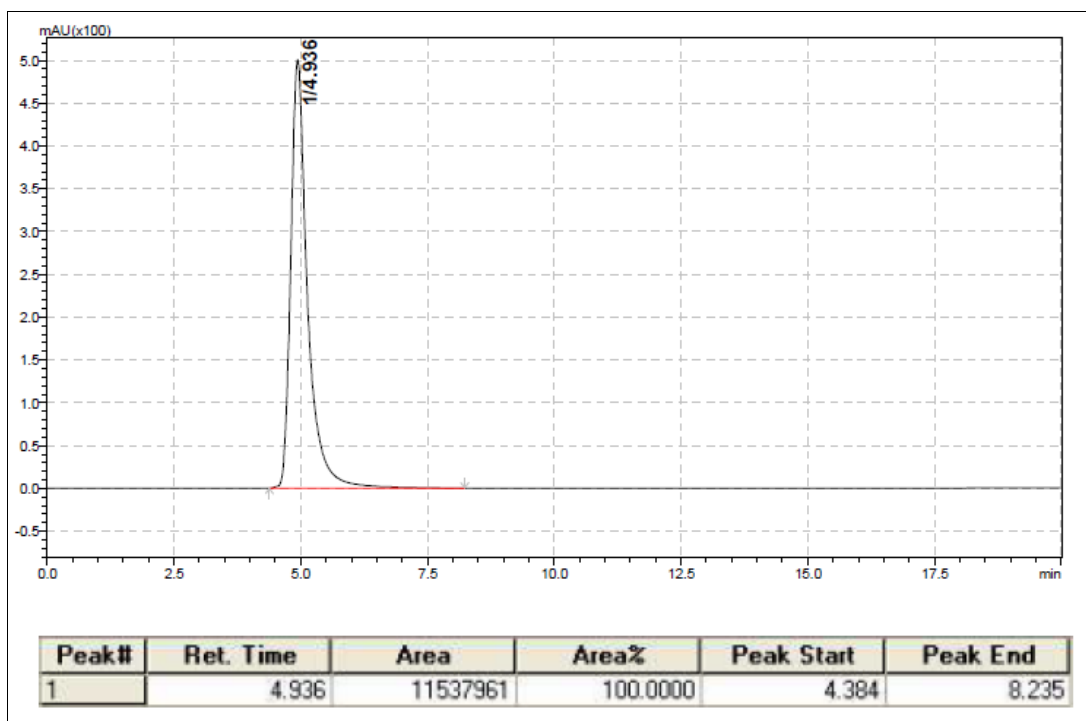
Fonte: do autor

Figura 11 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-298



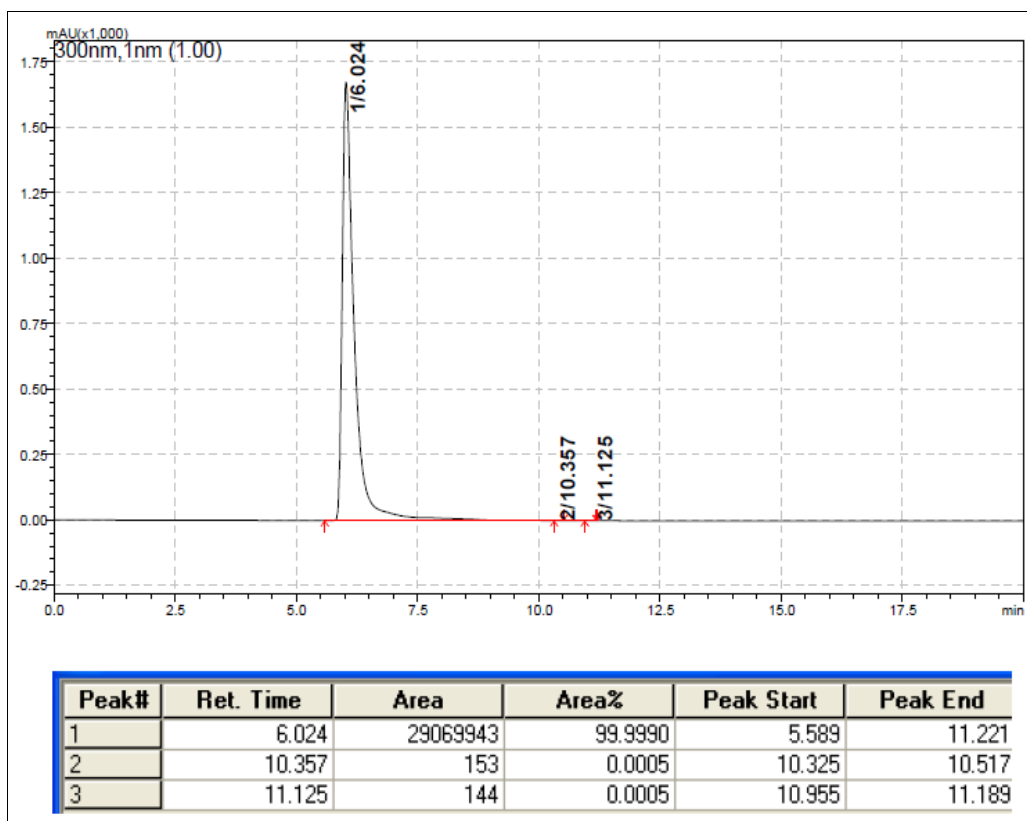
Fonte: do autor

Figura 12 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-299



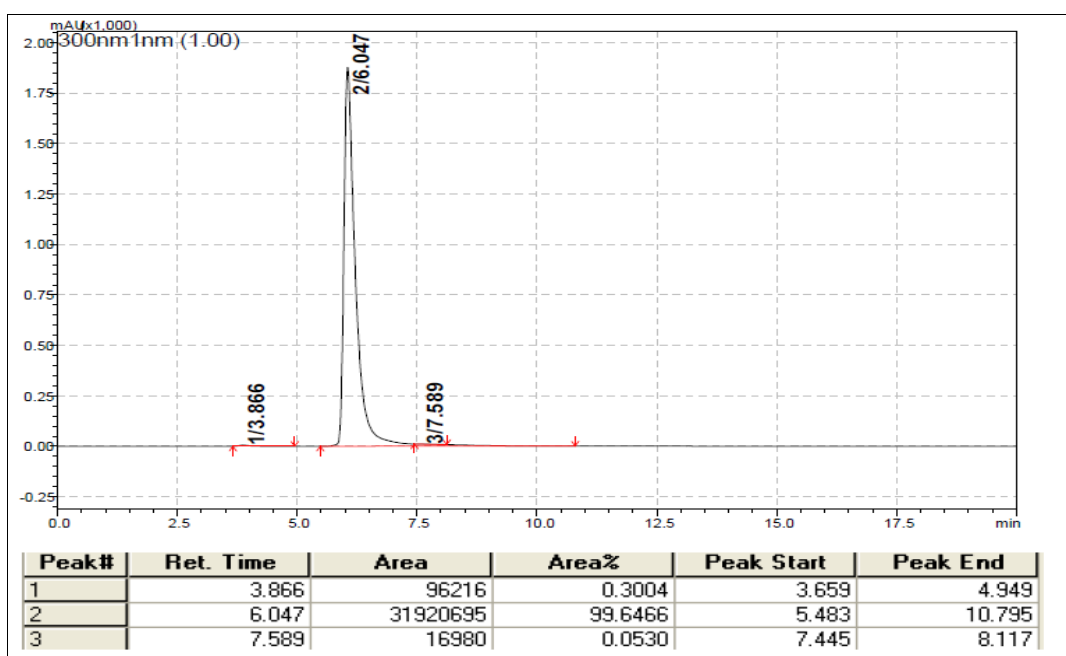
Fonte: do autor

Figura 13 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-211



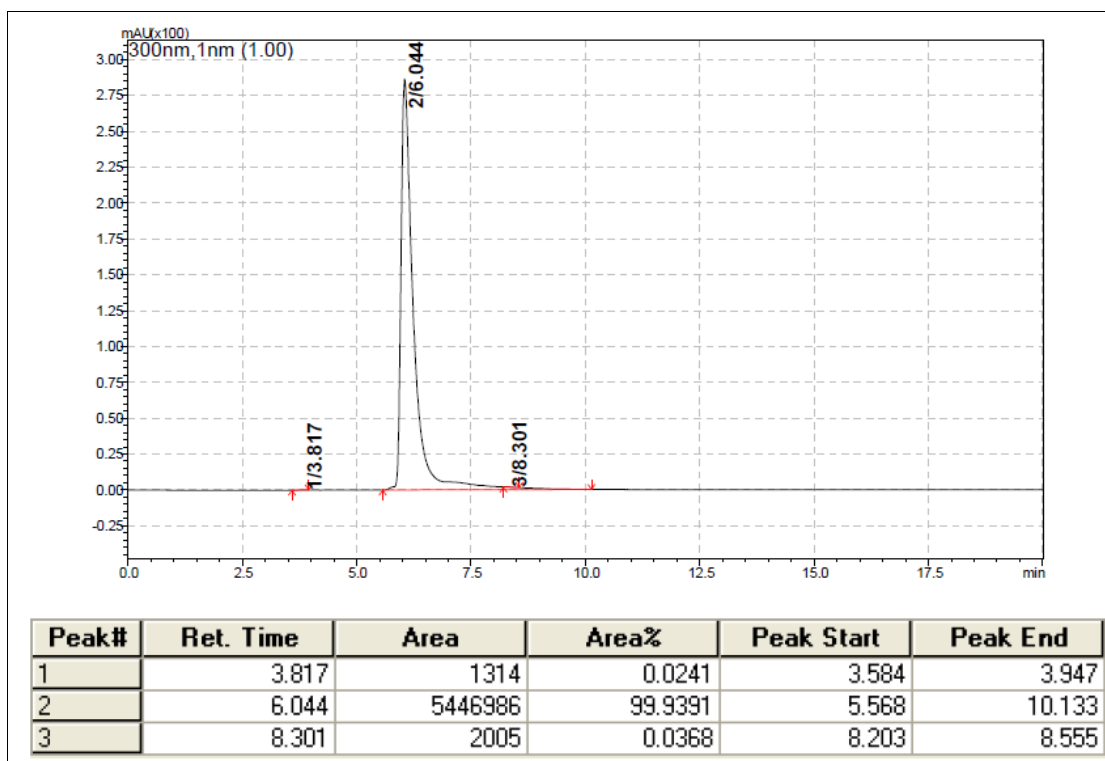
Fonte: do autor

Figura 14 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-212



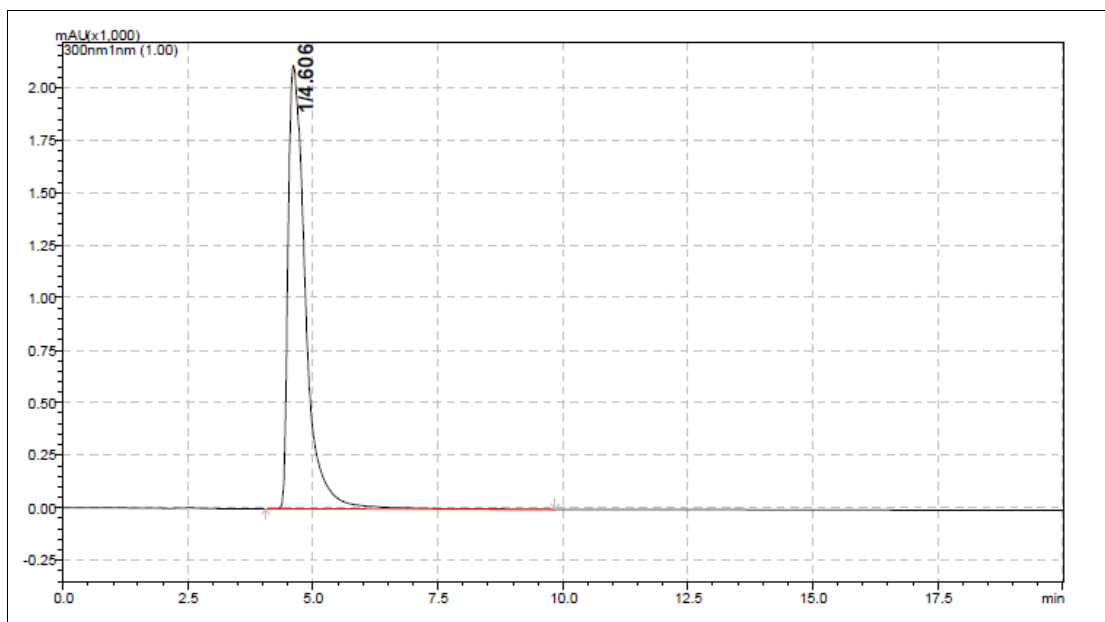
Fonte: do autor

Figura 15 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-213



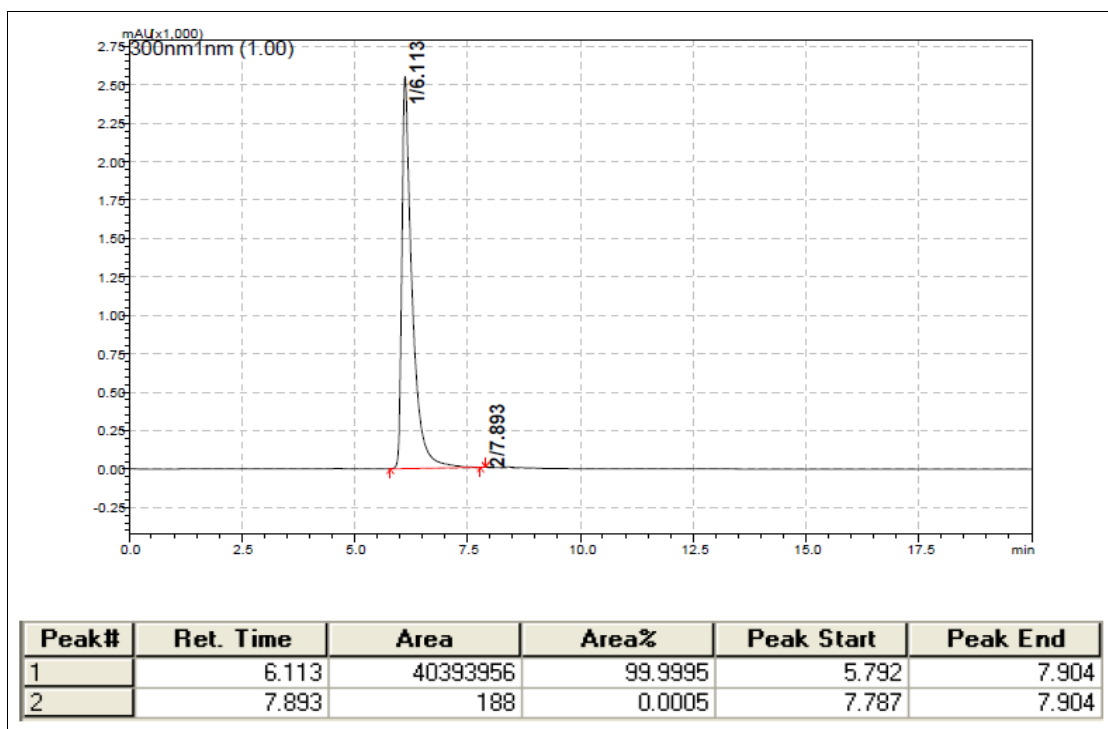
Fonte: do autor

Figura 16 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-214



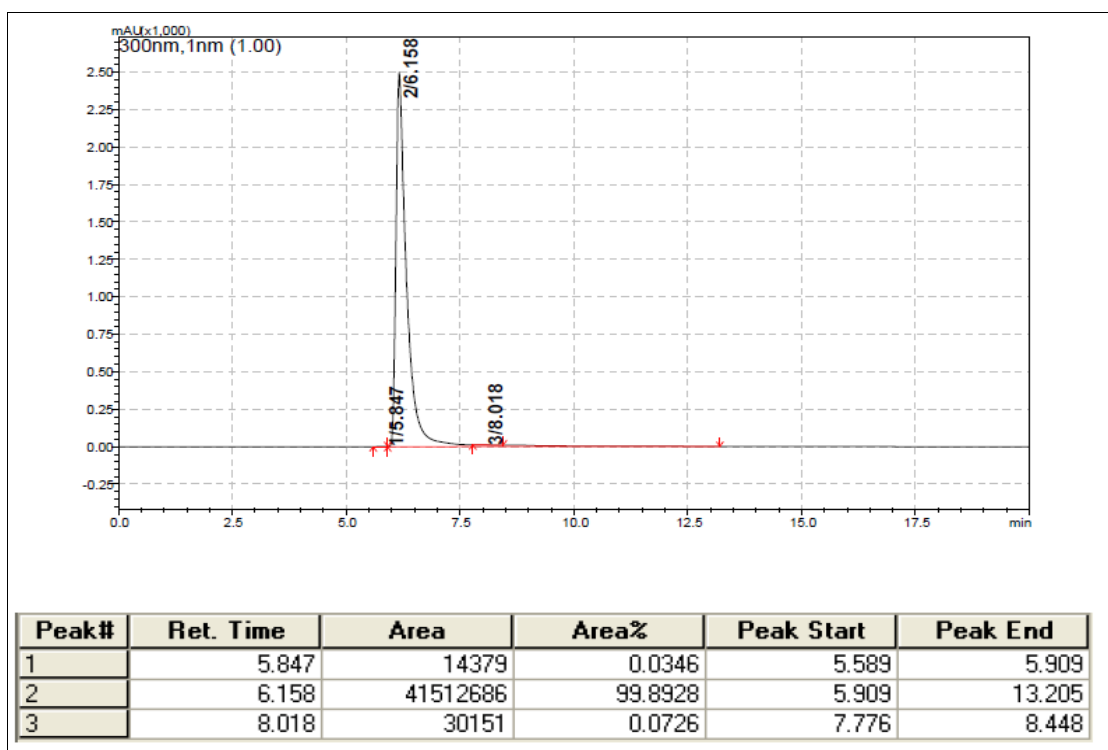
Fonte: do autor

Figura 17 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-215

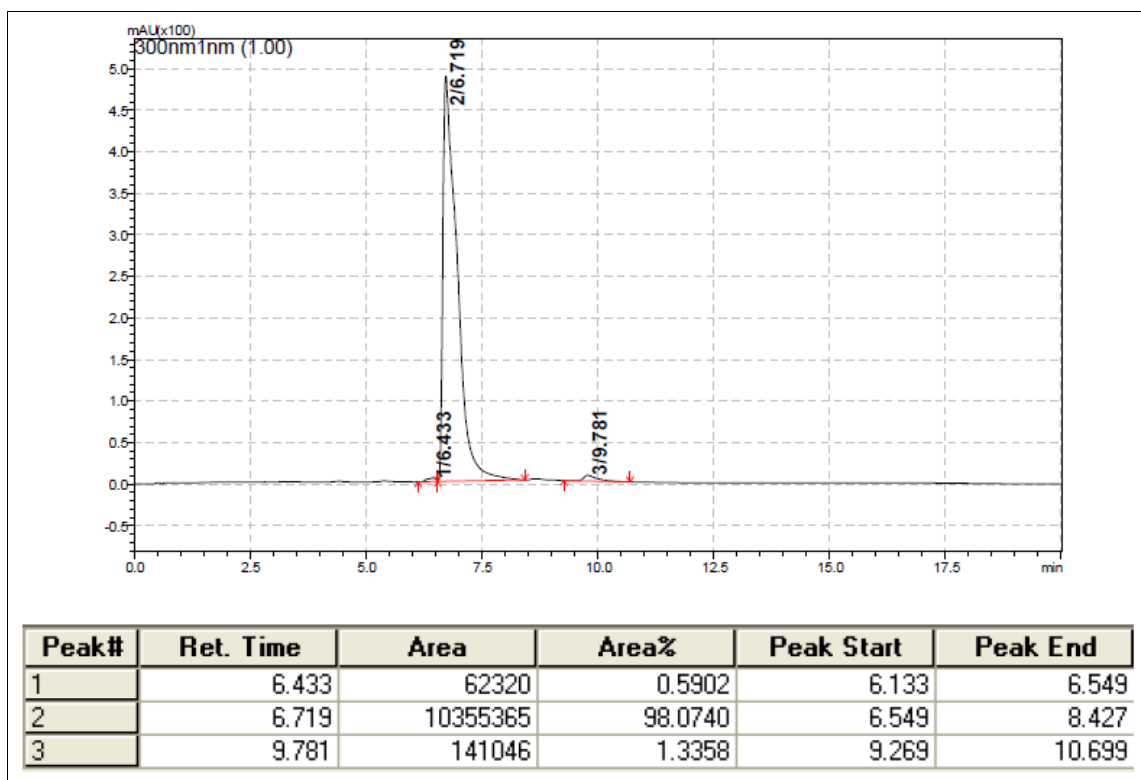


Fonte: do autor

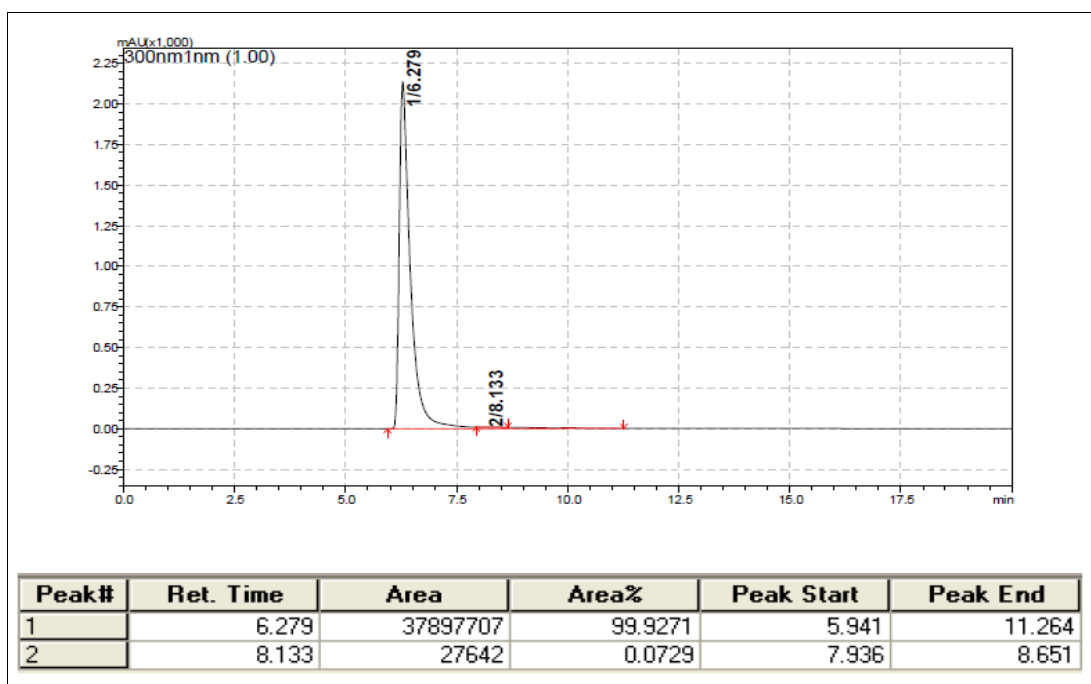
Figura 18 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-216



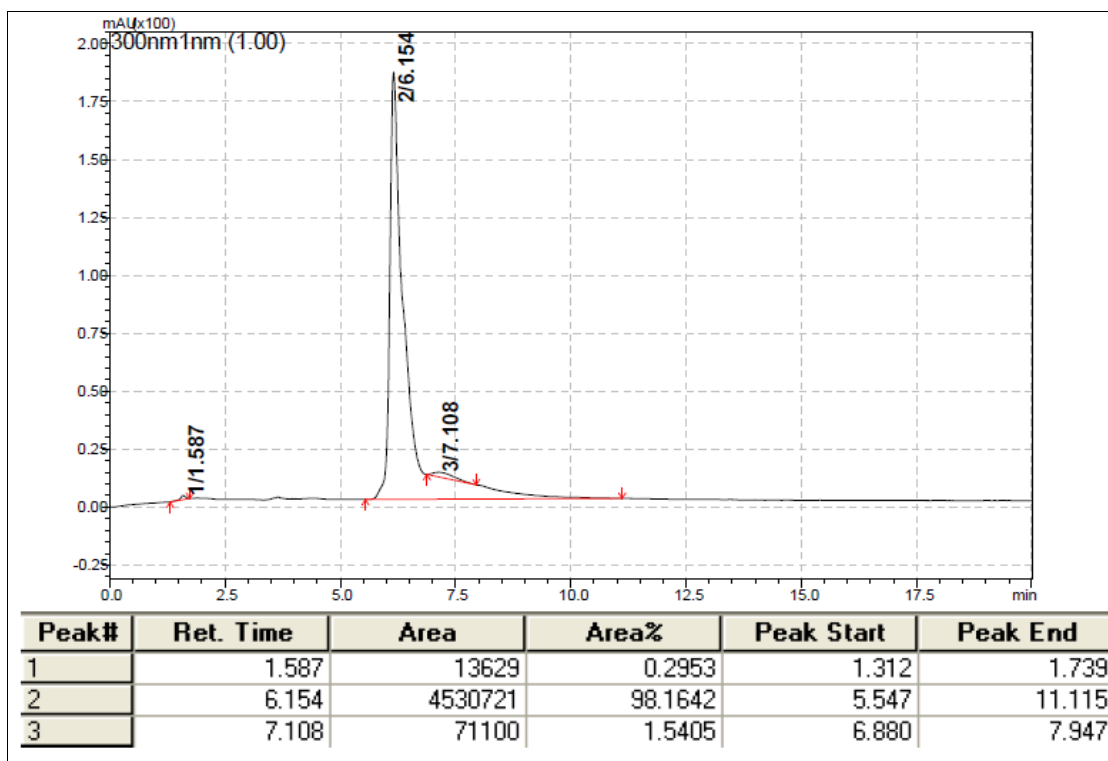
Fonte: do autor

Figura 19 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-217

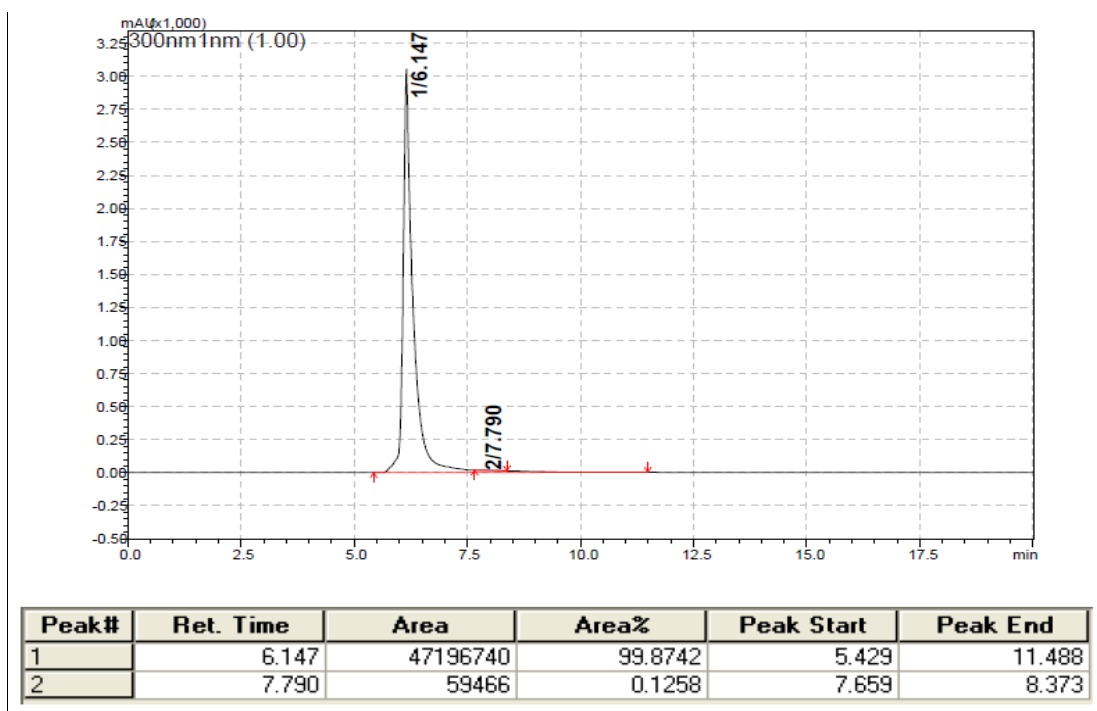
Fonte: do autor

Figura 20 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-218

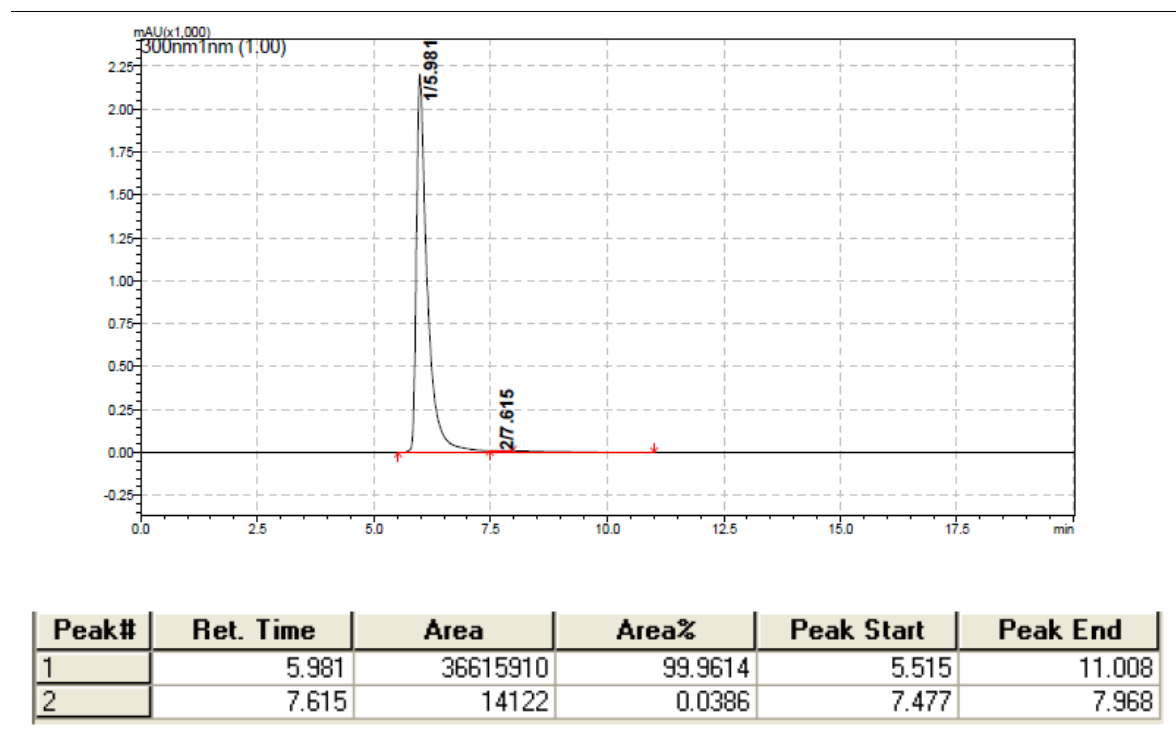
Fonte: do autor

Figura 21 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-219**

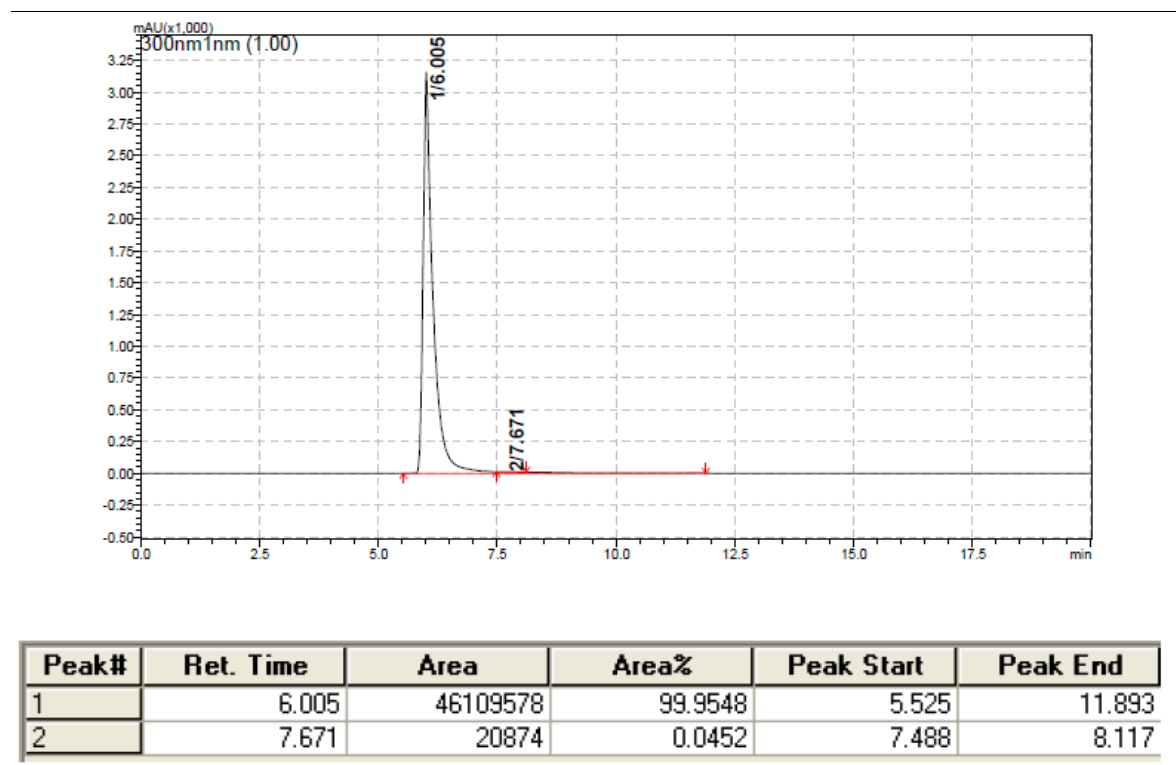
Fonte: do autor

Figura 22 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-220**

Fonte: do autor

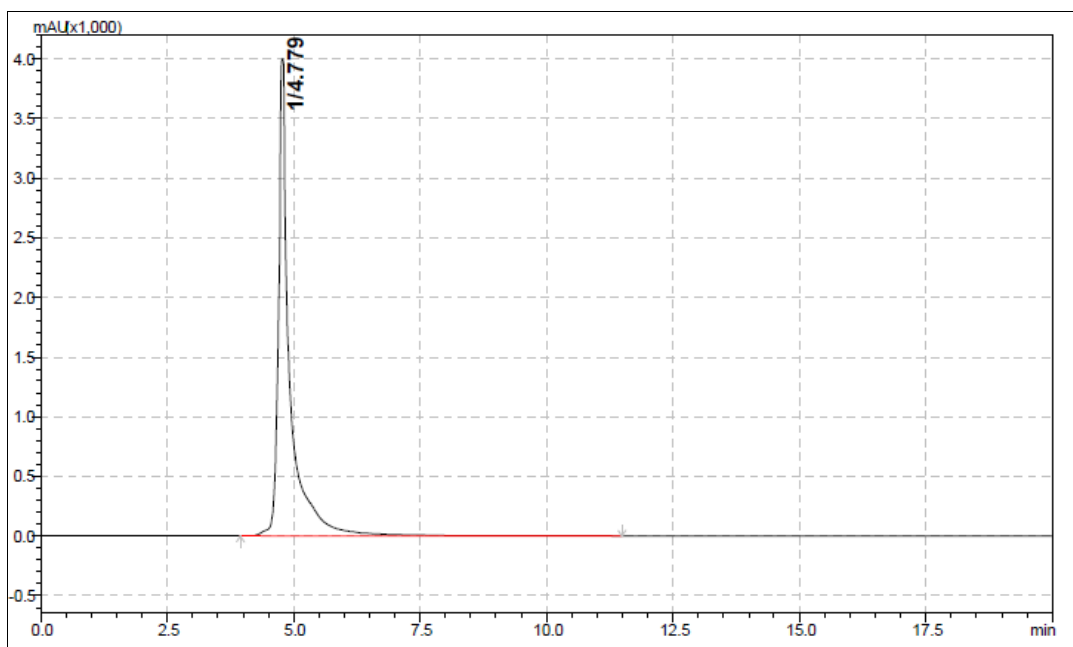
Figura 23 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-221**

Fonte: do autor

Figura 24 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-222**

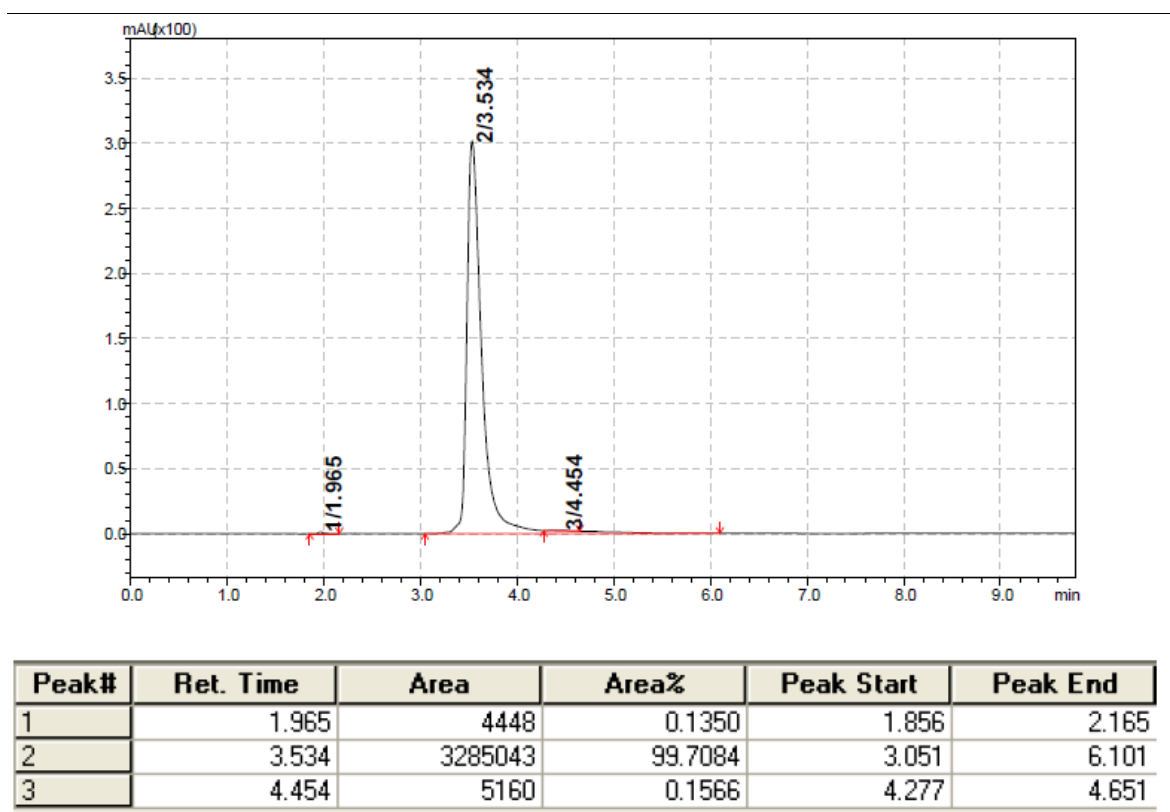
Fonte: do autor

Figura 25 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-223



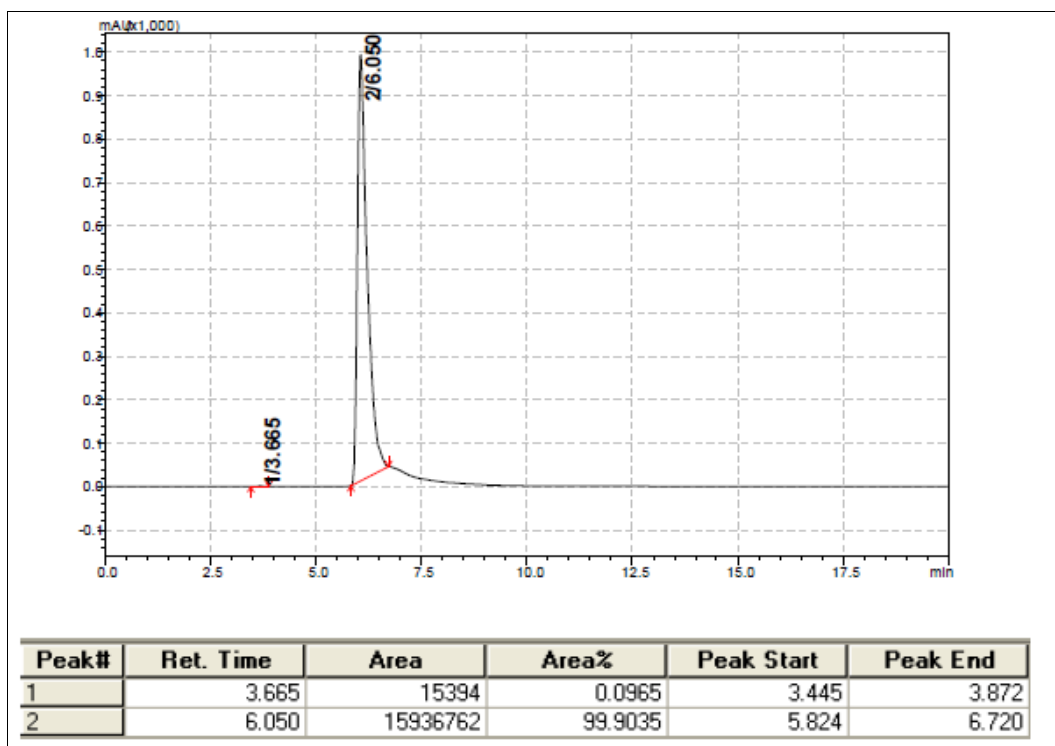
Fonte: do autor

Figura 26 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-224



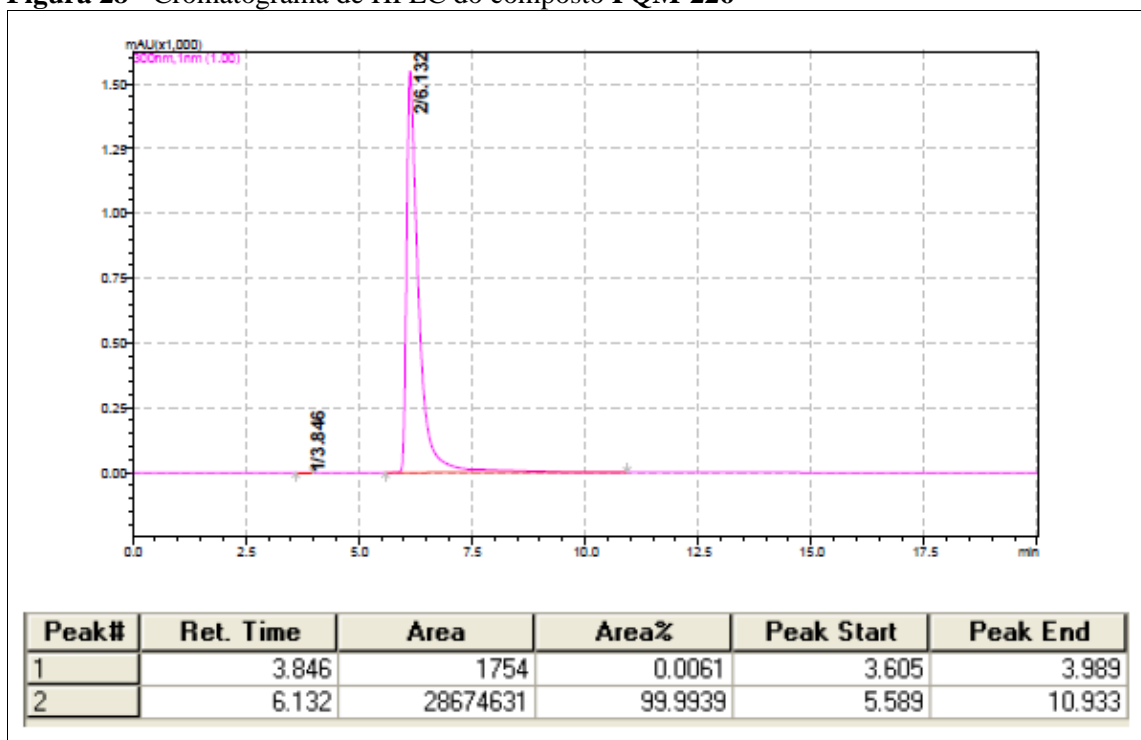
Fonte: do autor

Figura 27 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-225**



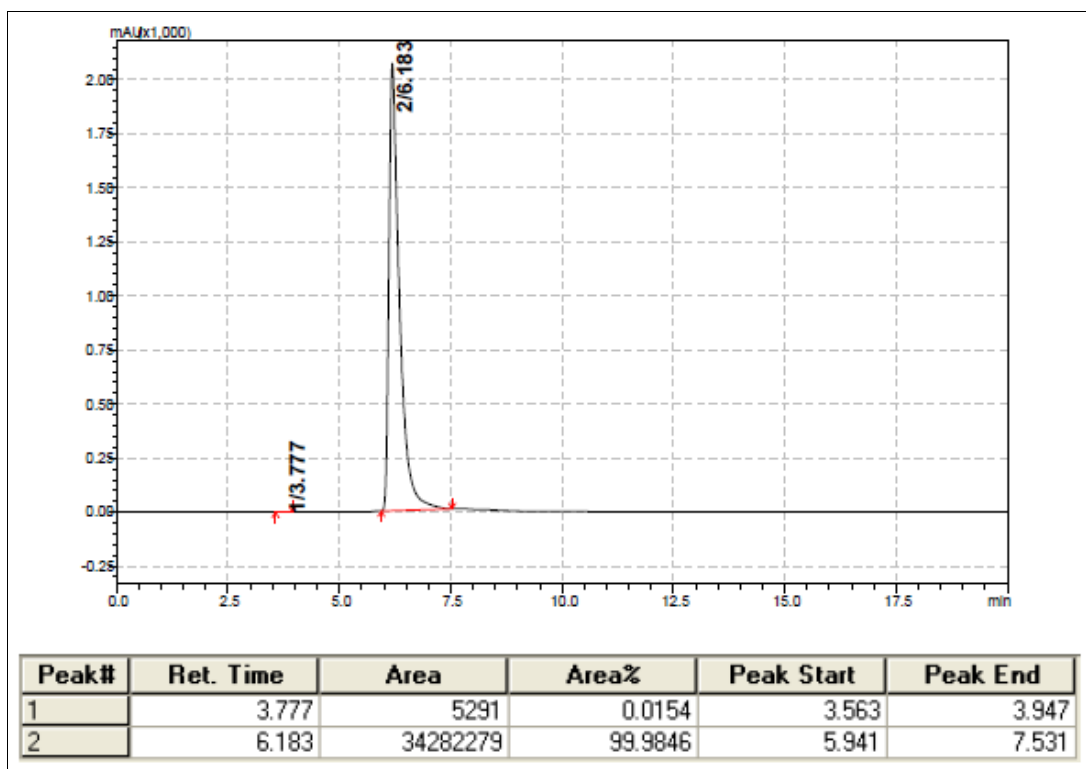
Fonte: do autor

Figura 28 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-226**



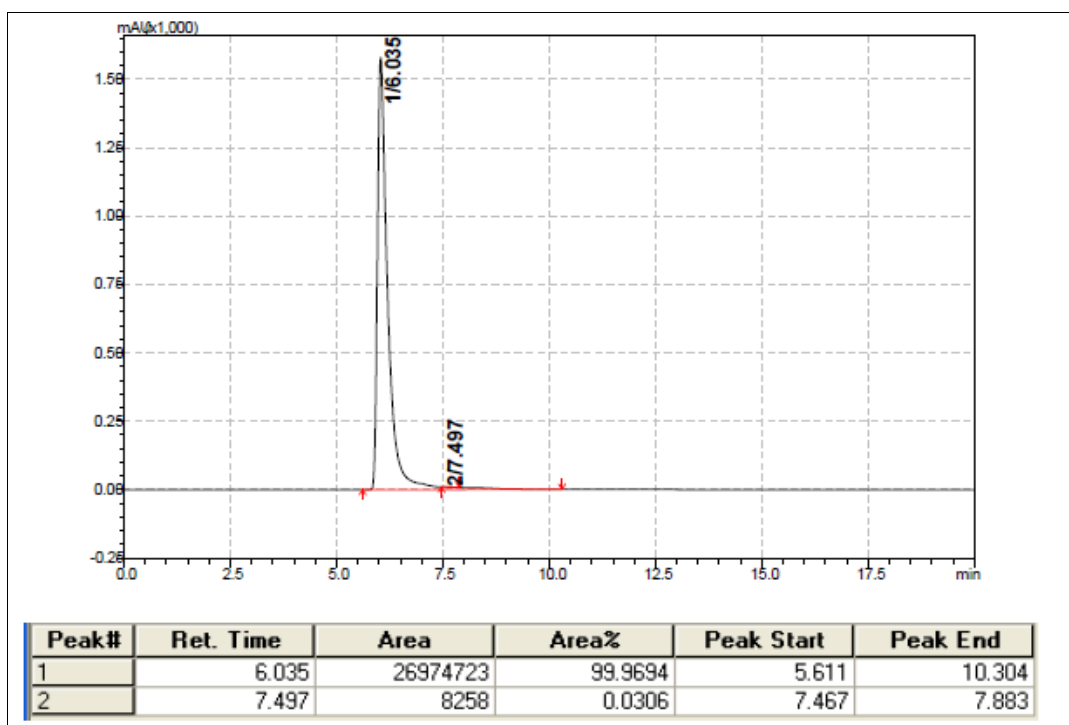
Fonte: do autor

Figura 29 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-227**



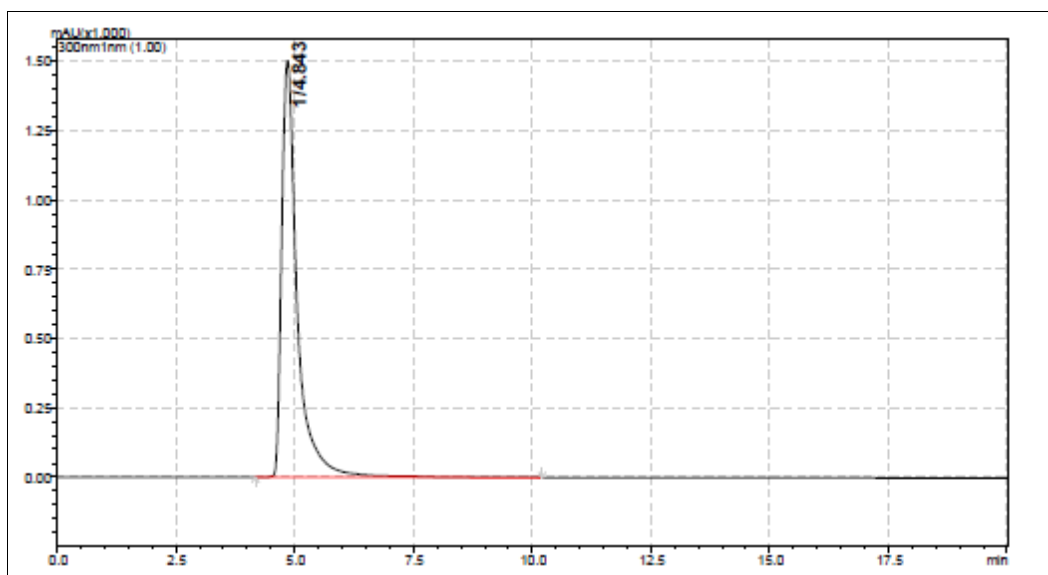
Fonte: do autor

Figura 30 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-228**



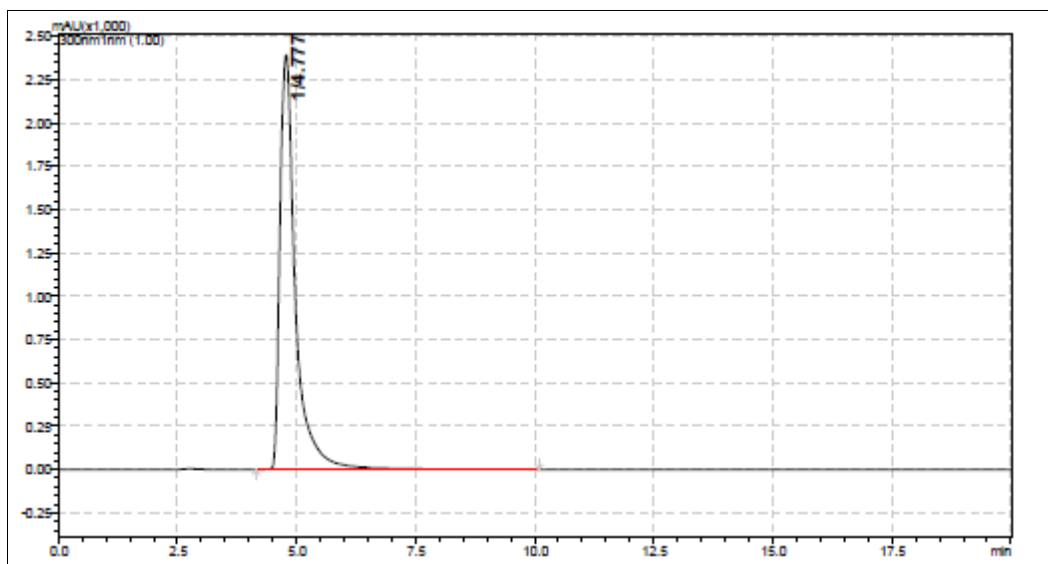
Fonte: do autor

Figura 31 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-263**



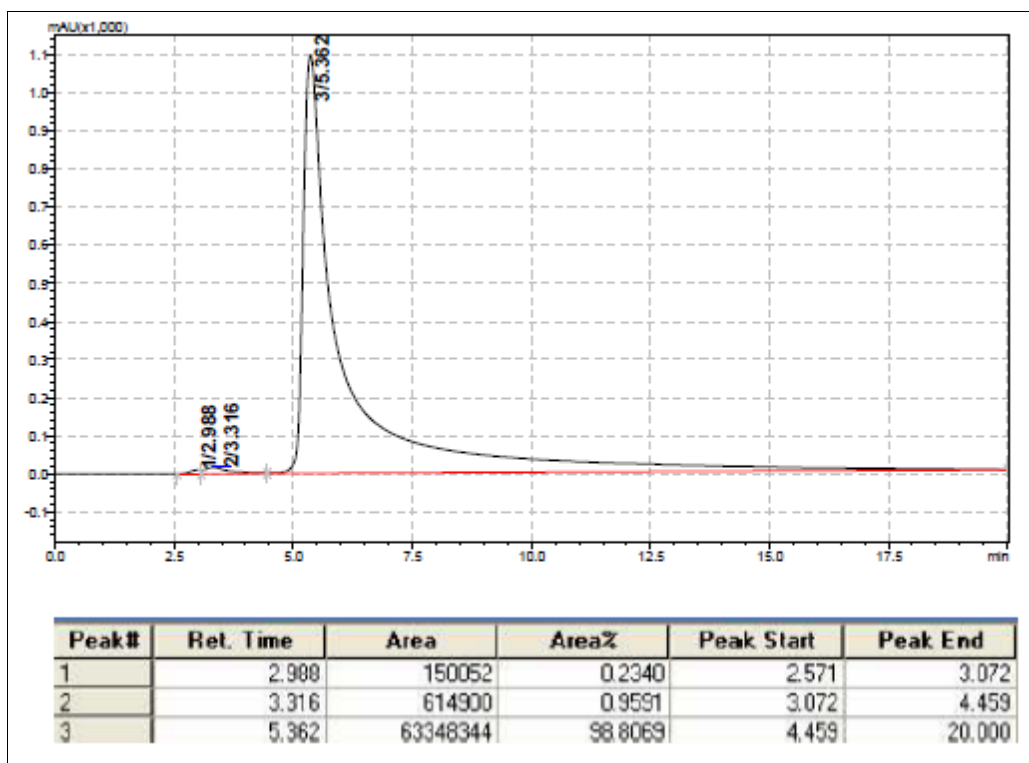
Fonte: do autor

Figura 32 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-264**



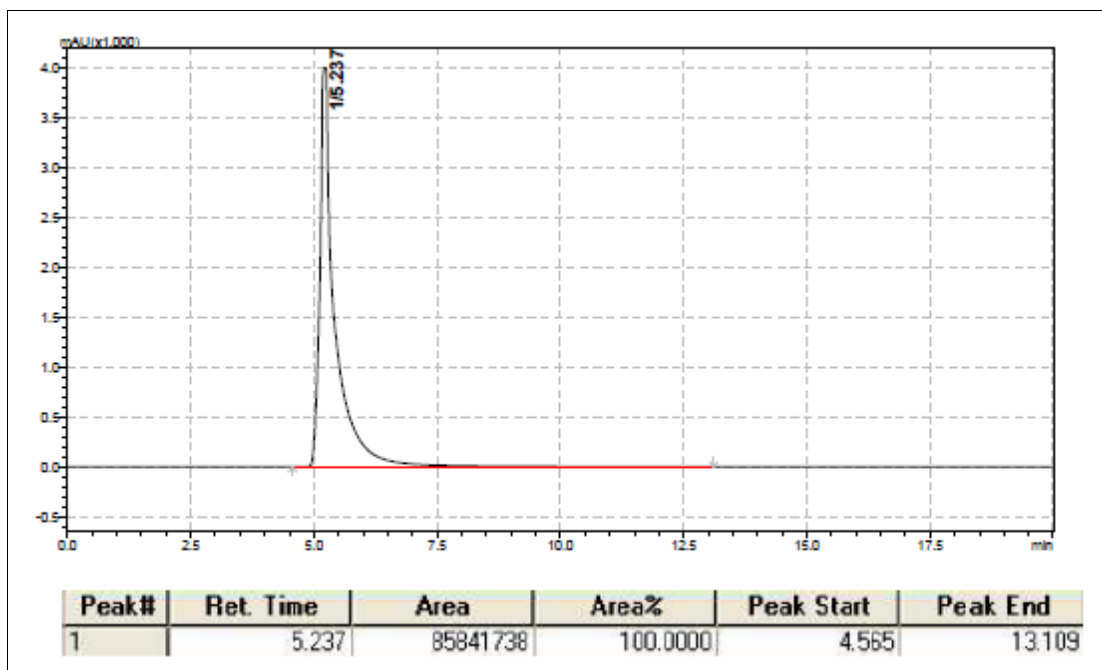
Fonte: do autor

Figura 33 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-265**



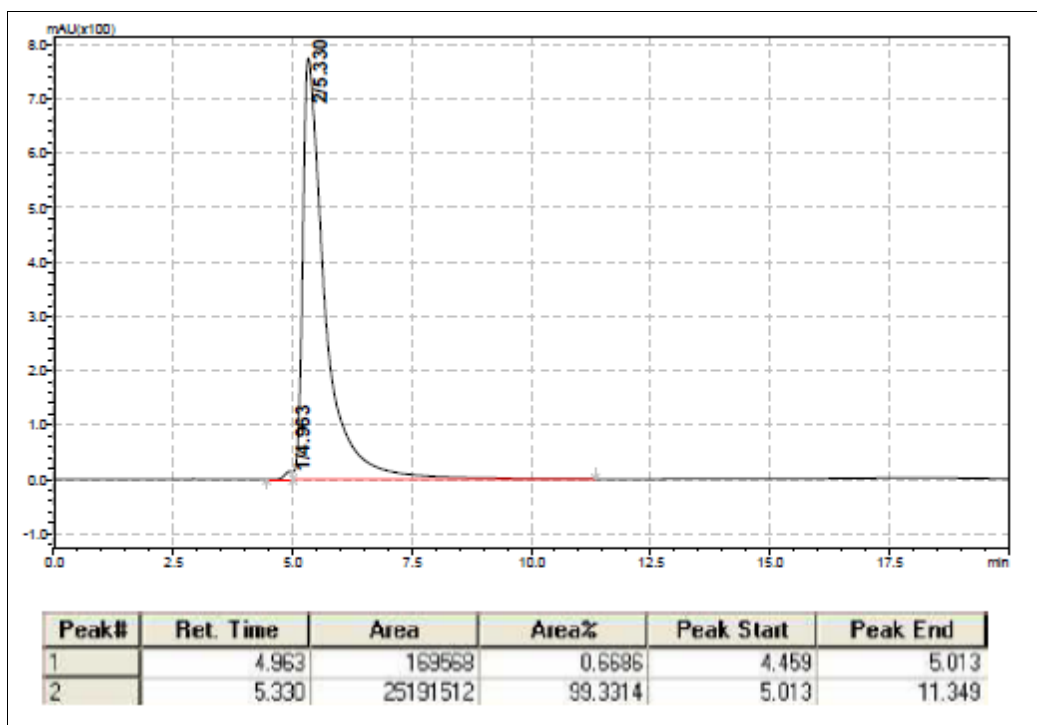
Fonte: do autor

Figura 34 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-266**



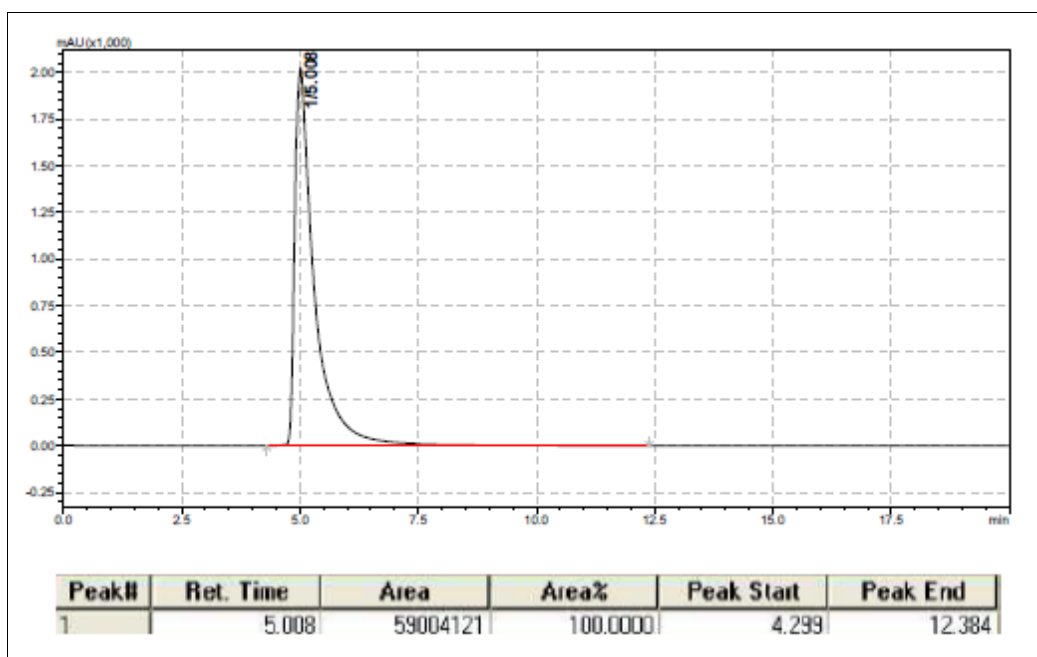
Fonte: do autor

Figura 35 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-267**



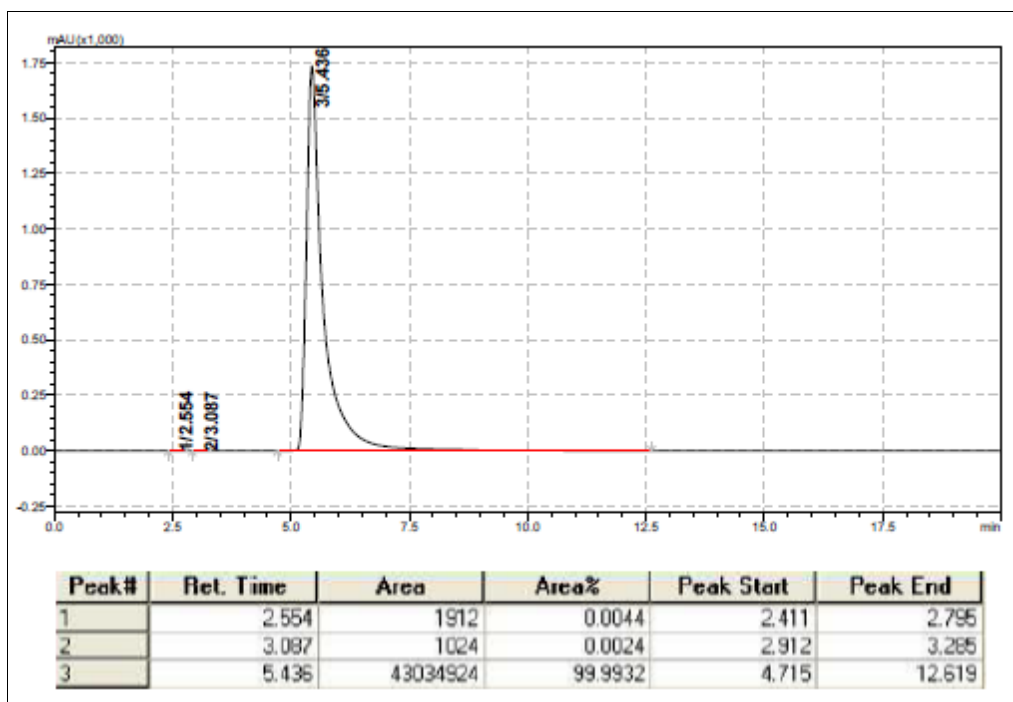
Fonte: do autor

Figura 36 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-268**



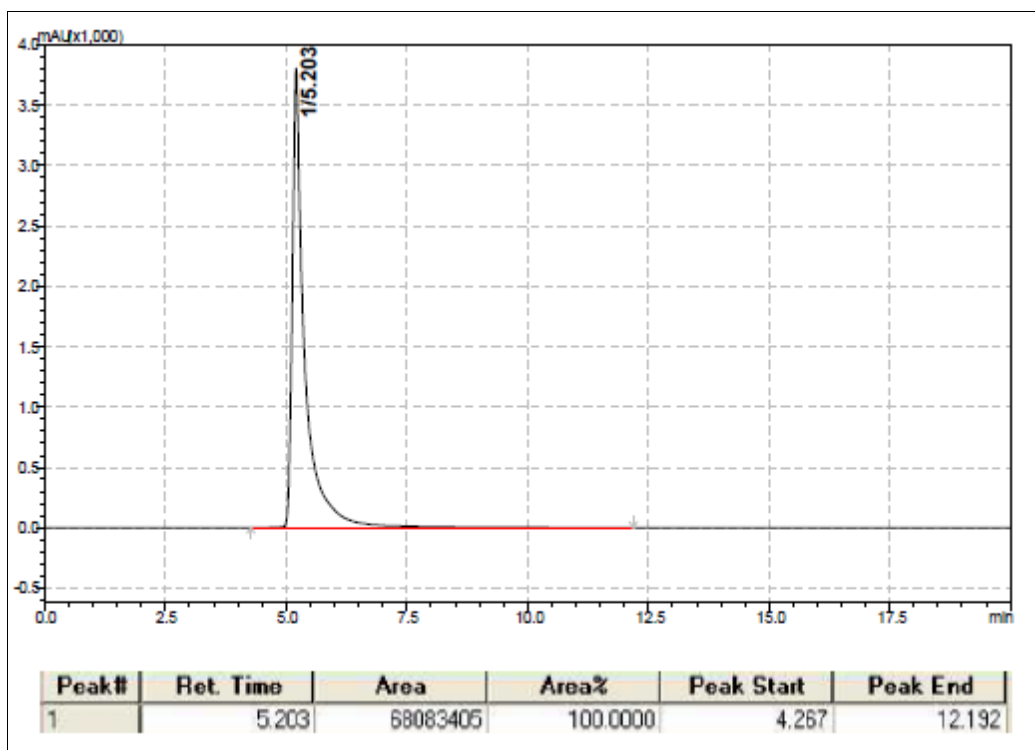
Fonte: do autor

Figura 37 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-269**

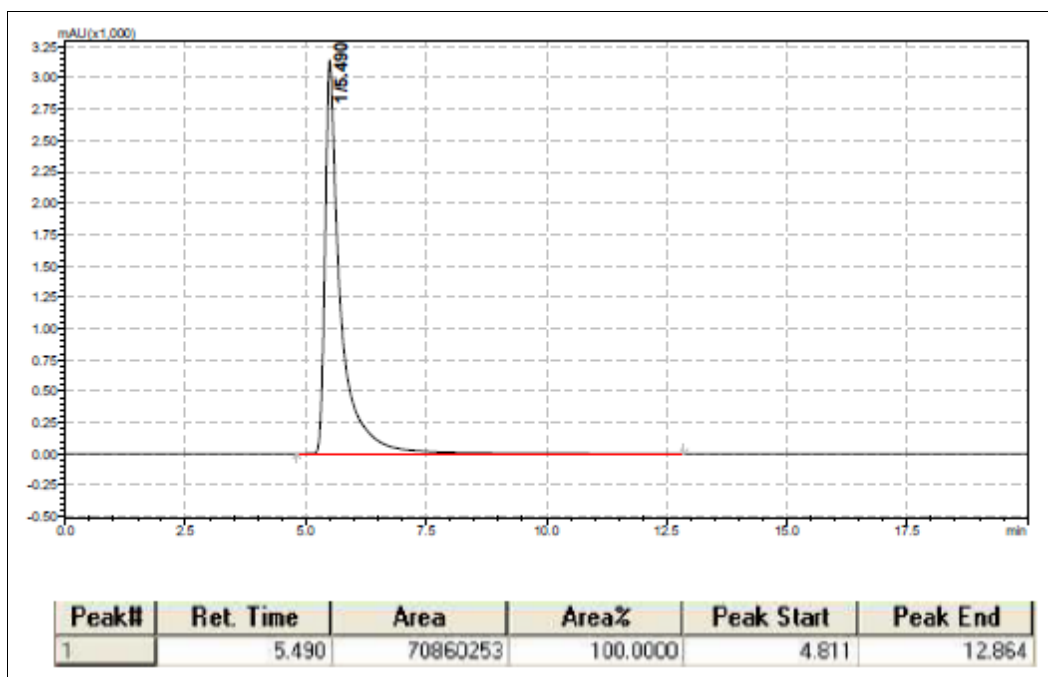


Fonte: do autor

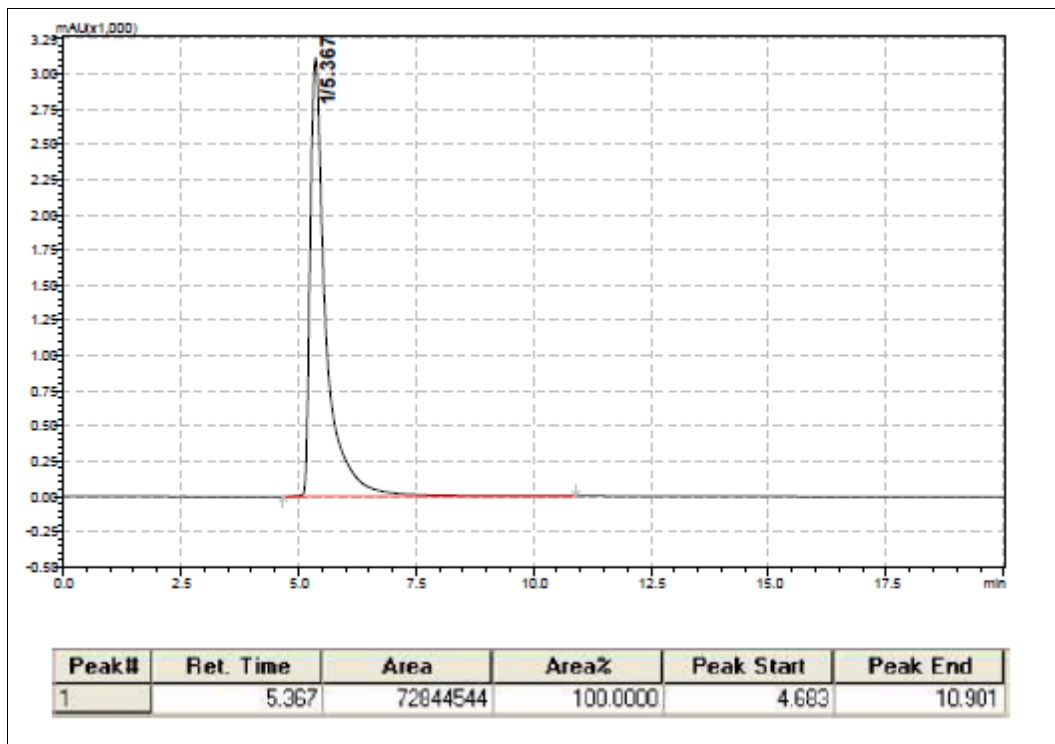
Figura 38 - Cromatograma de HPLC do composto **PQM-270**



Fonte: do autor

Figura 39 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-271

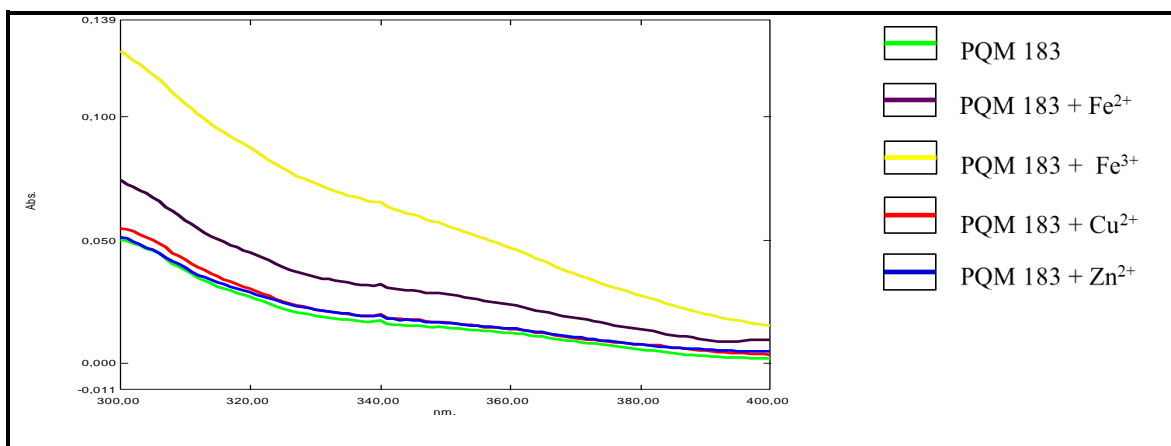
Fonte: do autor

Figura 40 - Cromatograma de HPLC do composto PQM-272

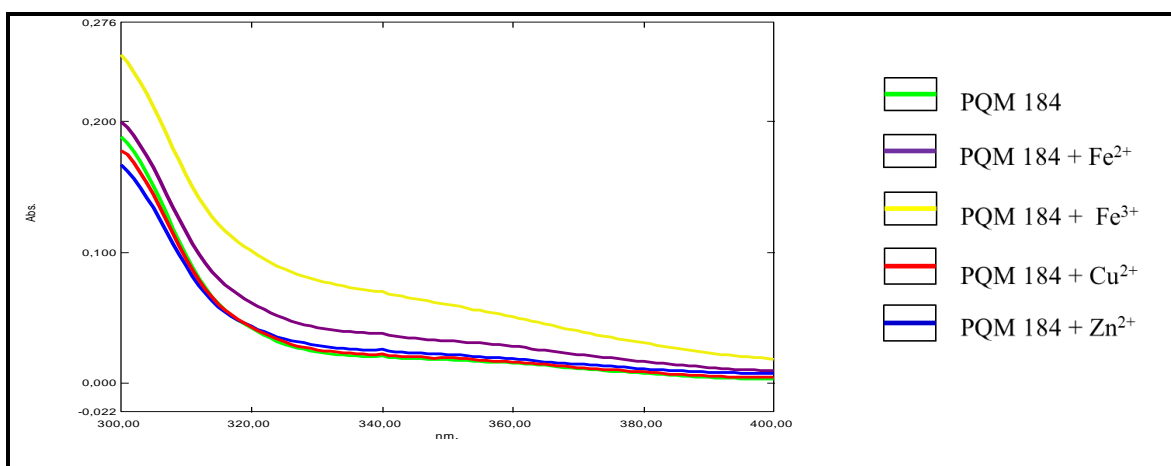
Fonte: do autor

ANEXO D

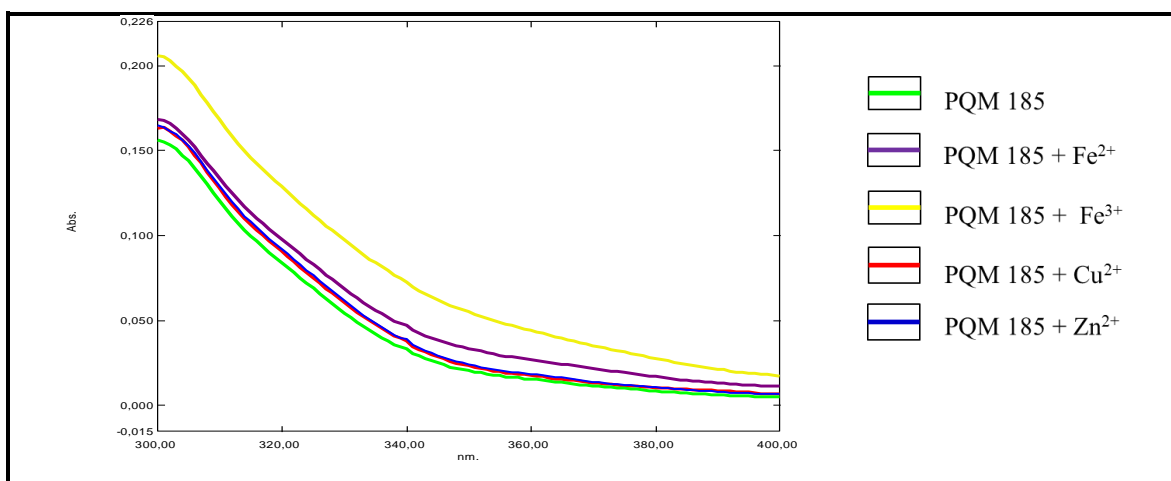
**ESPECTROS UV-VIS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA
DE FeSO_4 , FeCl_3 , CuSO_4 e ZnCl_2 .**

Figura 1. UV- Espectro de absorvância de **PQM-183**

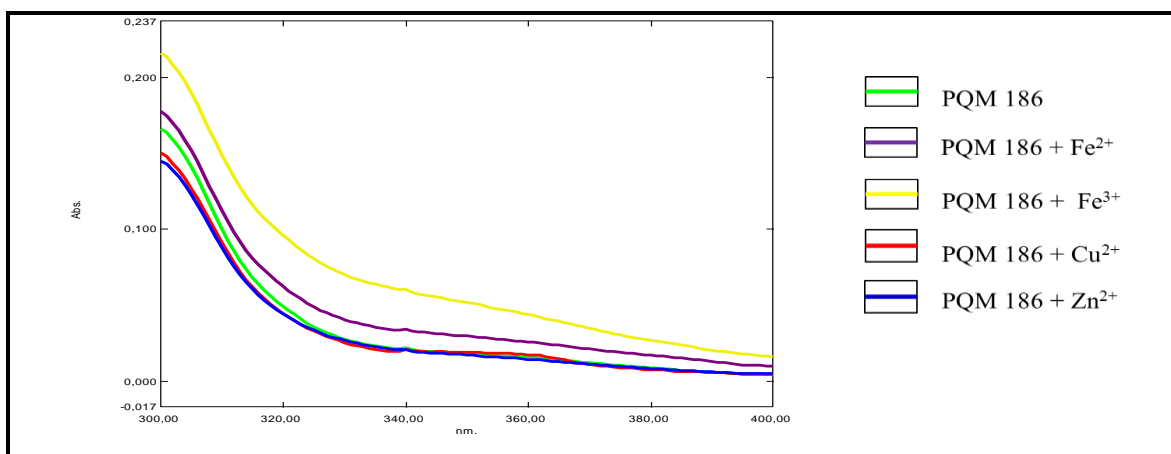
Fonte: do autor

Figura 2. UV- Espectro de absorvância de **PQM-184**

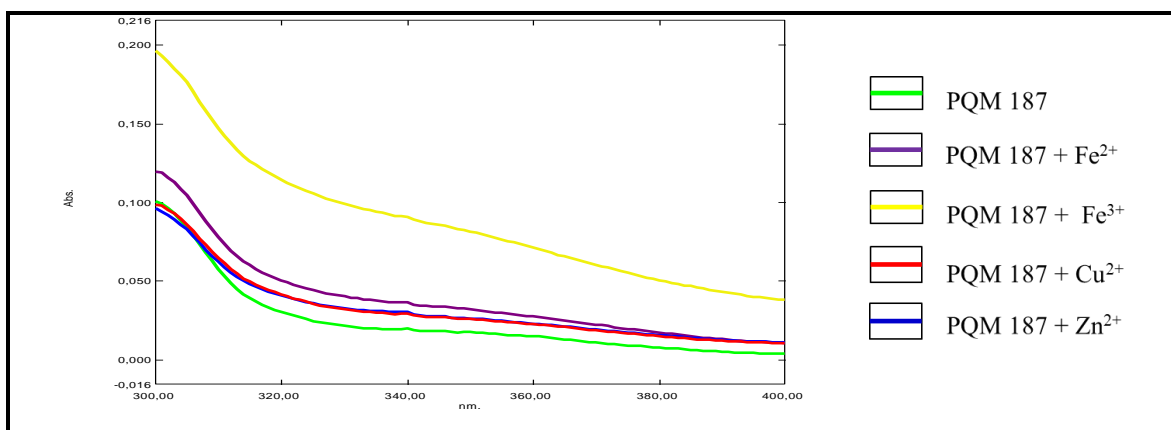
Fonte: do autor

Figura 3. UV- Espectro de absorvância de **PQM-185**

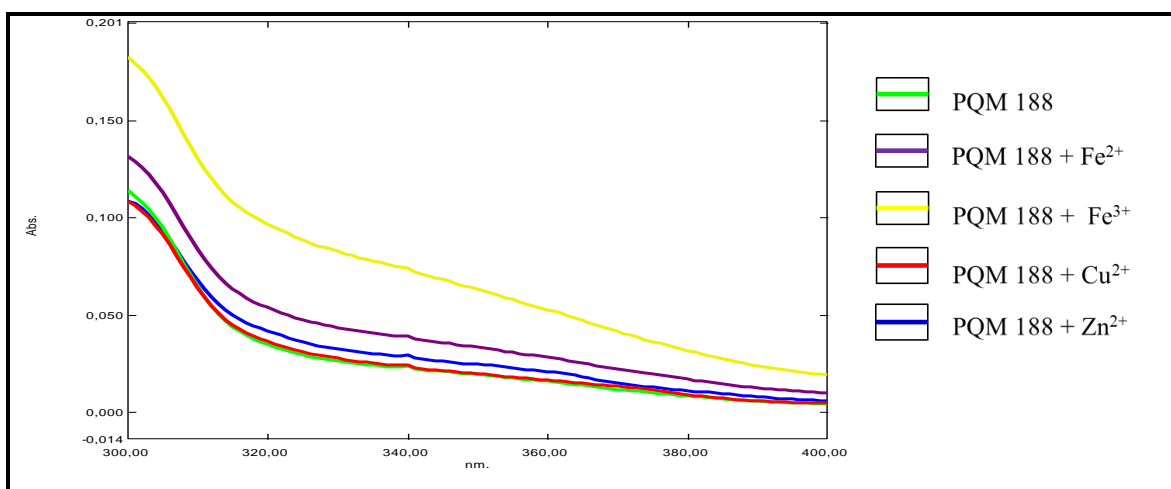
Fonte: do autor

Figura 4. UV- Espectro de absorvância de **PQM-186**

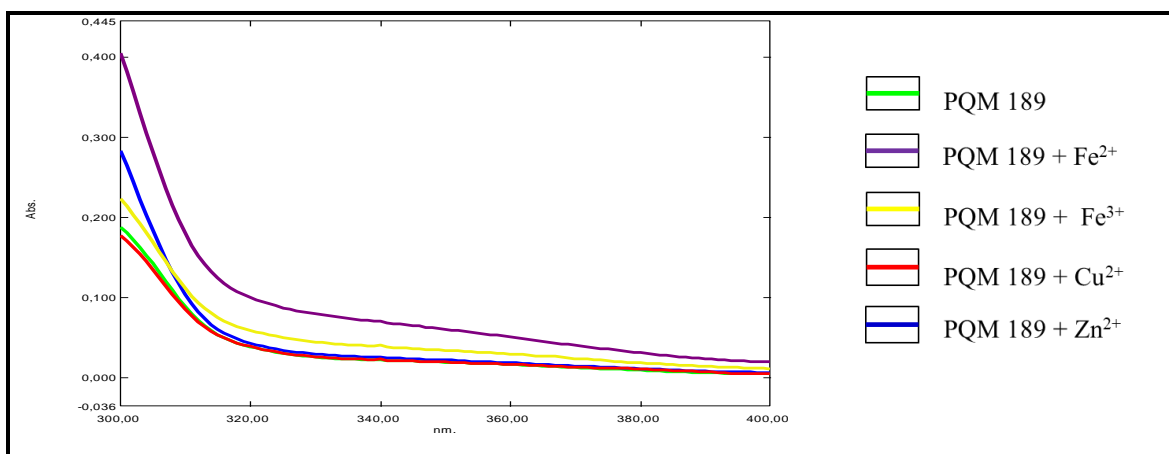
Fonte: do autor

Figura 5. UV- Espectro de absorvância de **PQM-187**

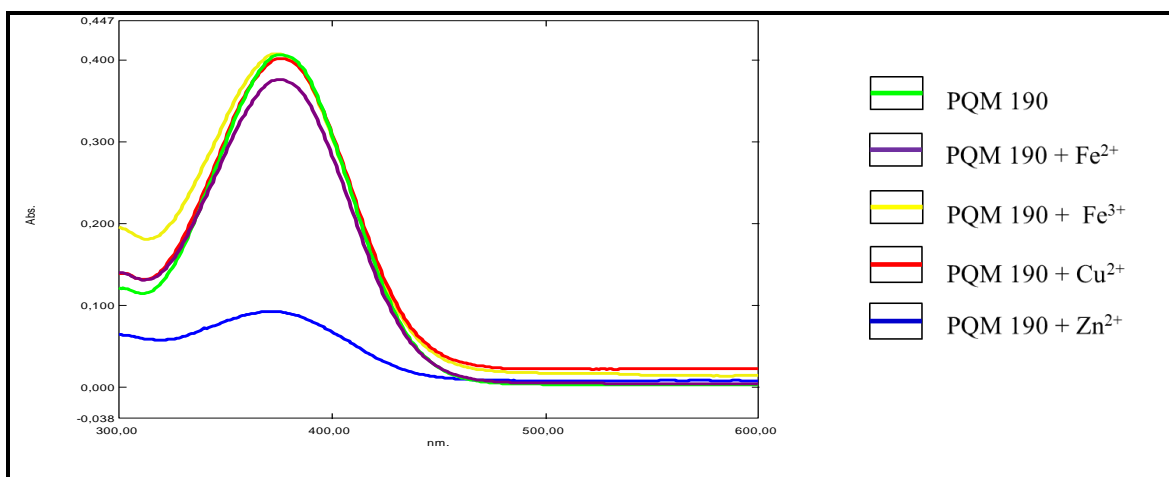
Fonte: do autor

Figura 6. UV- Espectro de absorvância de **PQM-188**

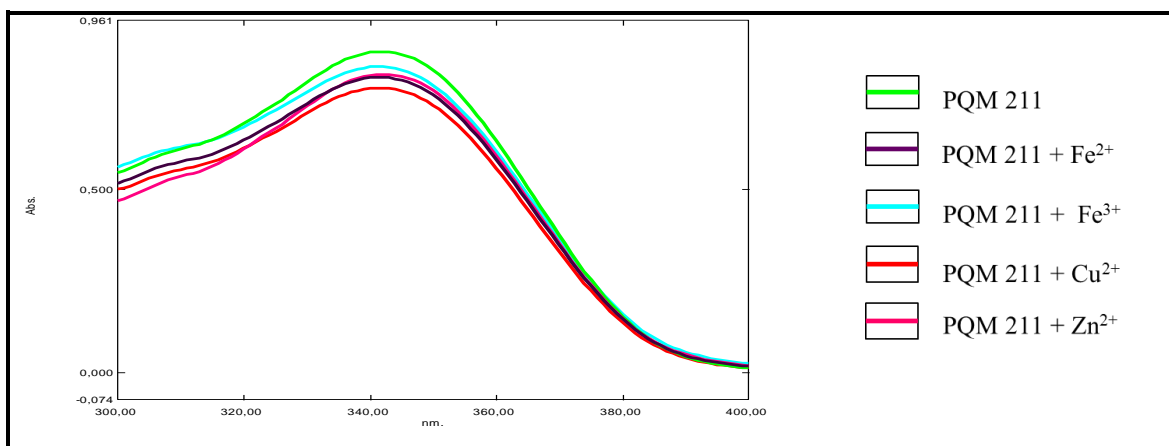
Fonte: do autor

Figura 7. UV- Espectro de absorvância de **PQM-189**

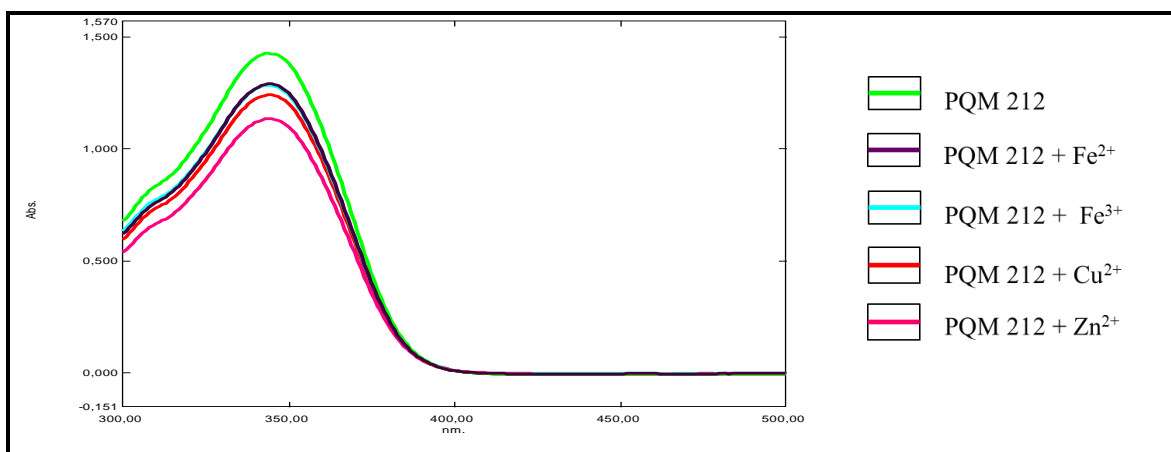
Fonte: do autor

Figura 8. UV- Espectro de absorvância de **PQM-190**

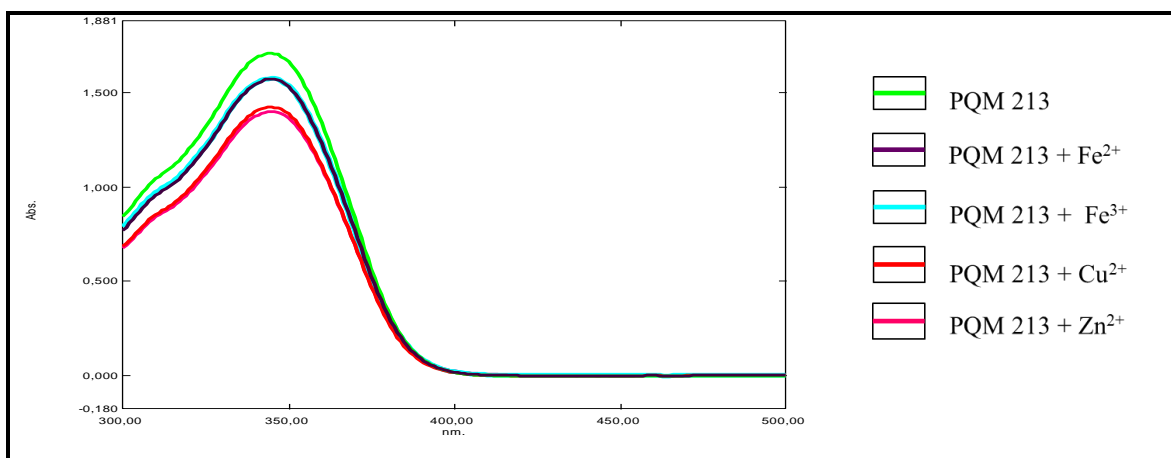
Fonte: do autor

Figura 9. UV- Espectro de absorvância de **PQM-211**

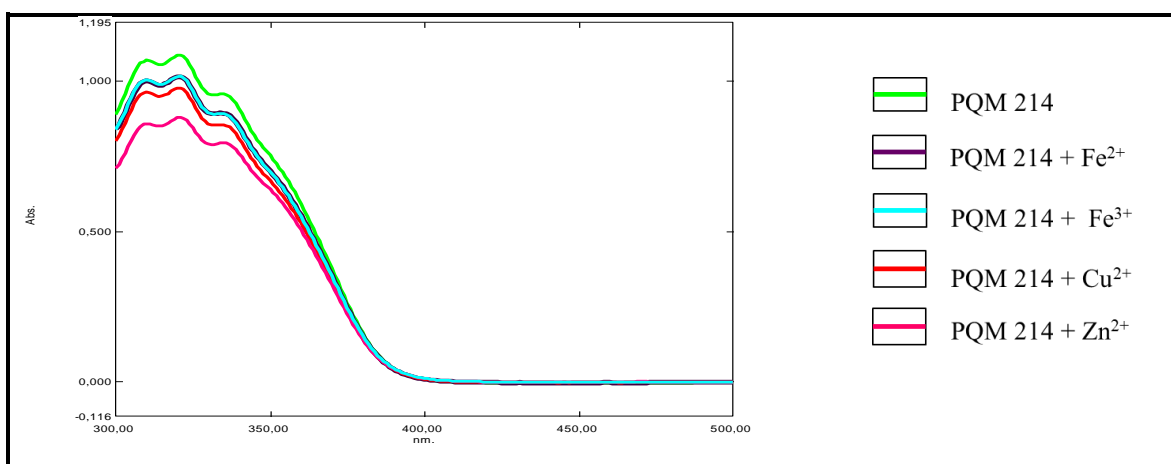
Fonte: do autor

Figura 10. UV - Espectro de absorbância de PQM-212

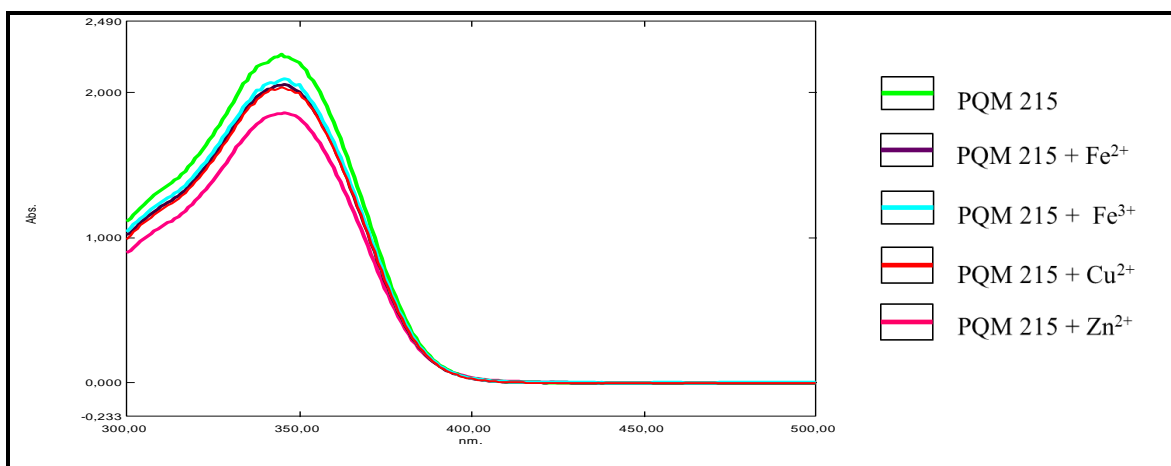
Fonte: do autor

Figura 11. UV - Espectro de absorbância de PQM-213

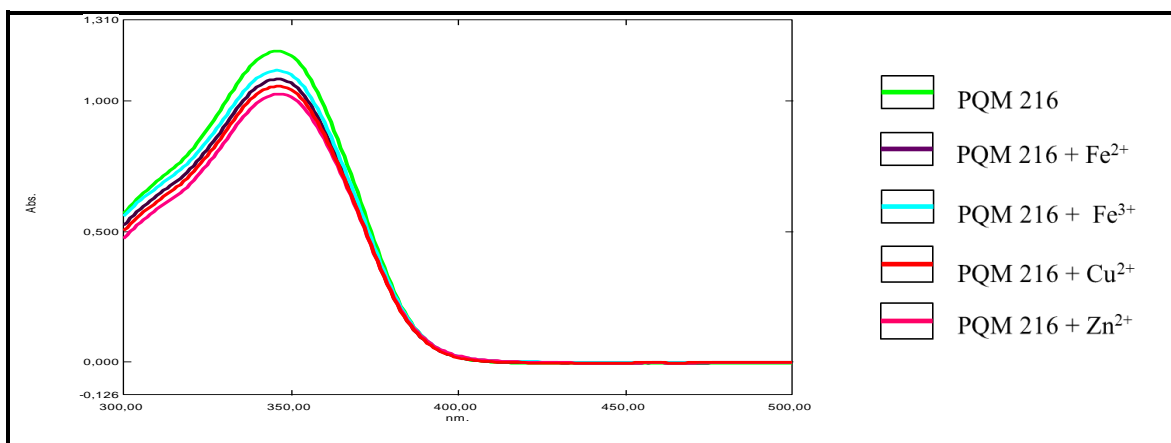
Fonte: do autor

Figura 12. UV - Espectro de absorbância de PQM-214

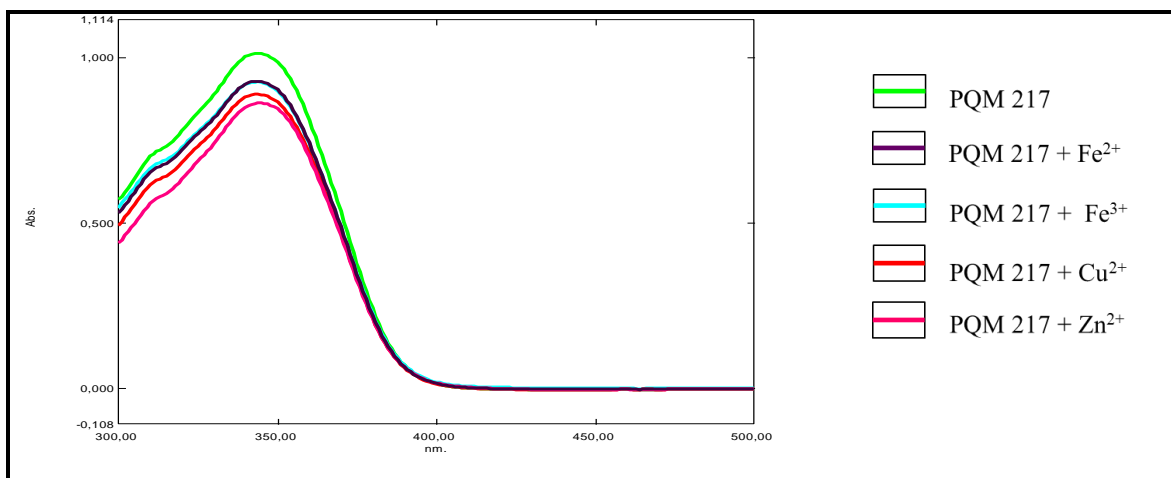
Fonte: do autor

Figura 13. UV - Espectro de absorbância de PQM-215

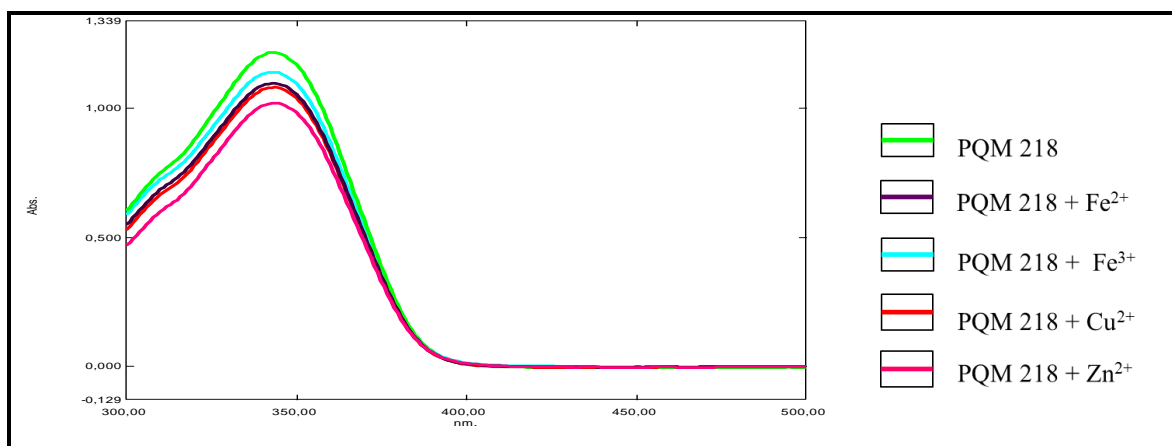
Fonte: do autor

Figura 14. UV - Espectro de absorbância de PQM-216

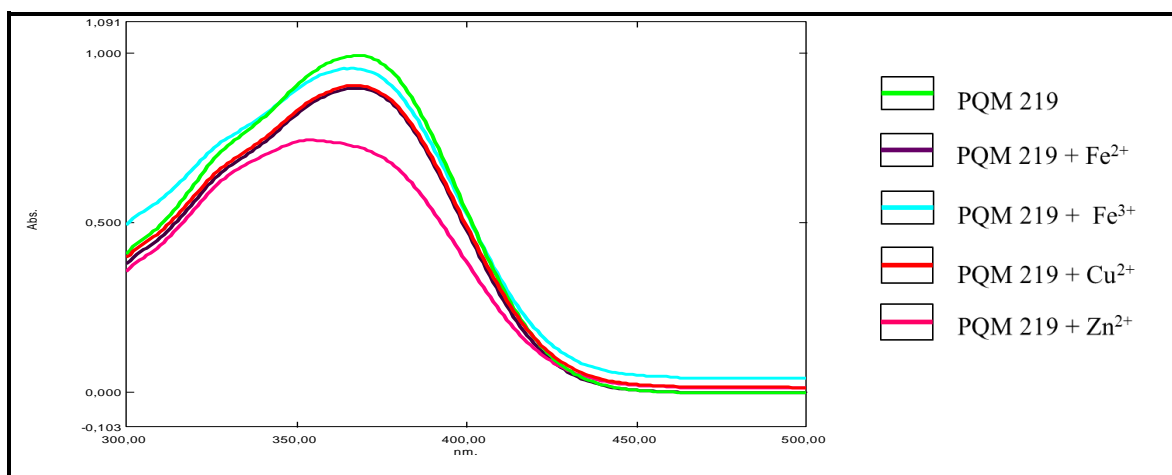
Fonte: do autor

Figura 15. UV - Espectro de absorbância de PQM-217

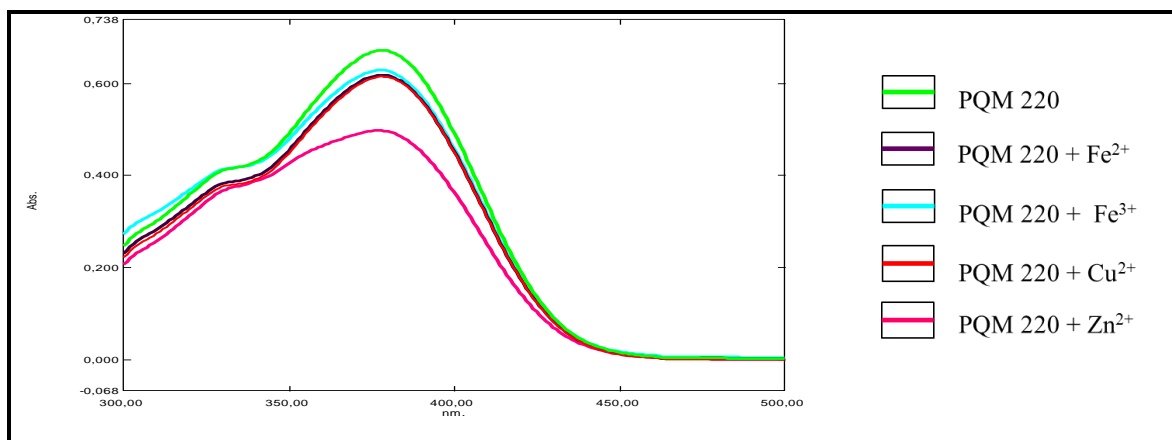
Fonte: do autor

Figura 16. UV - Espectro de absorbância de PQM-218

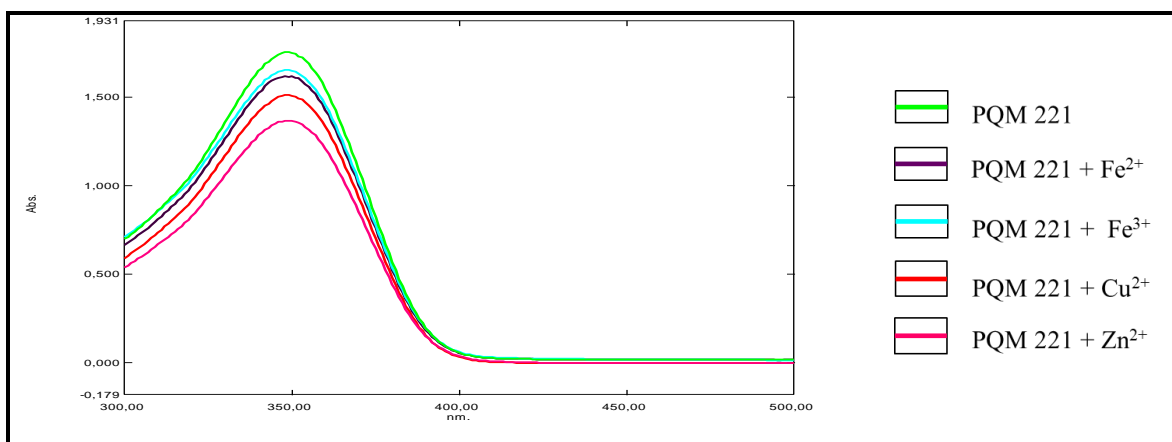
Fonte: do autor

Figura 17. UV - Espectro de absorbância de PQM-219

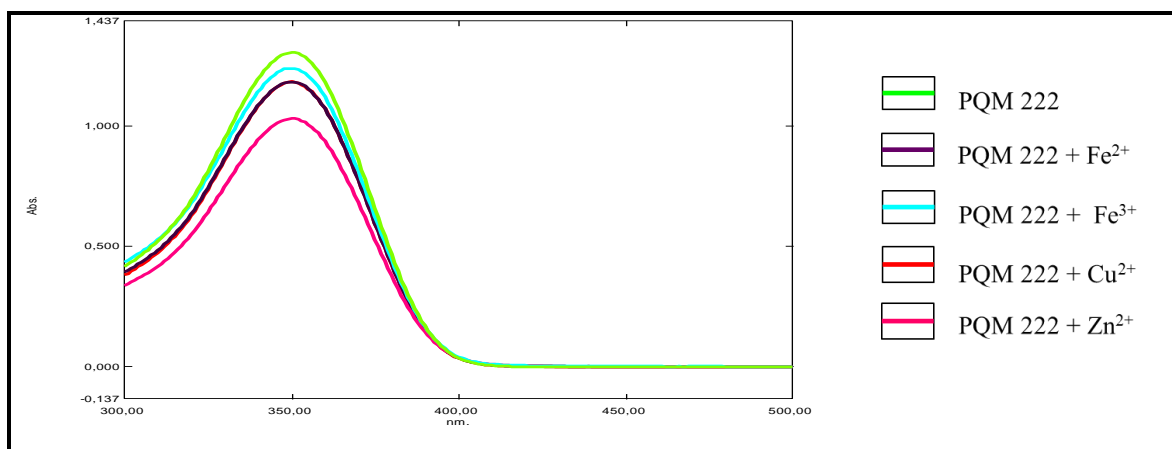
Fonte: do autor

Figura 18. UV - Espectro de absorbância de PQM-220

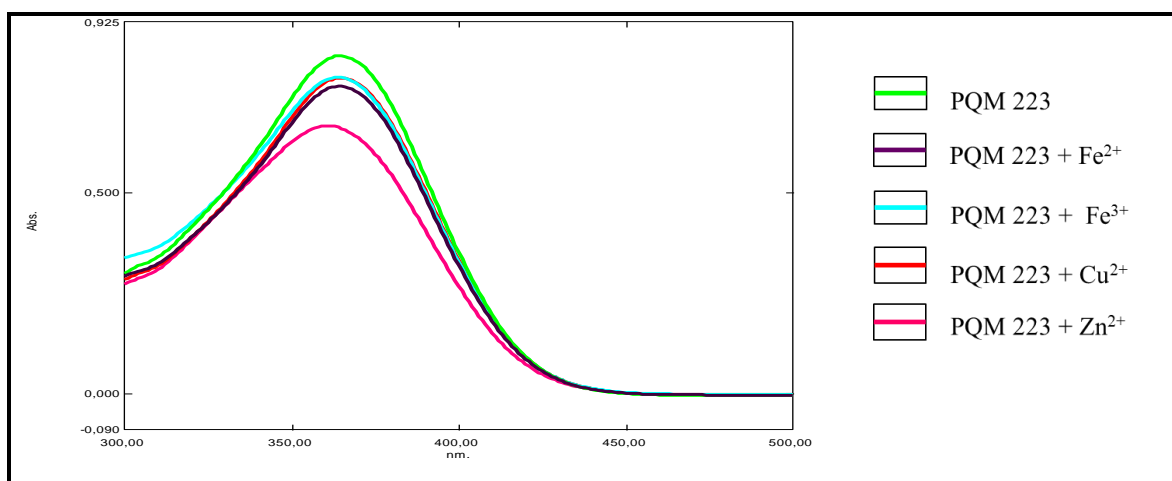
Fonte: do autor

Figura 19. UV - Espectro de absorbância de PQM-221

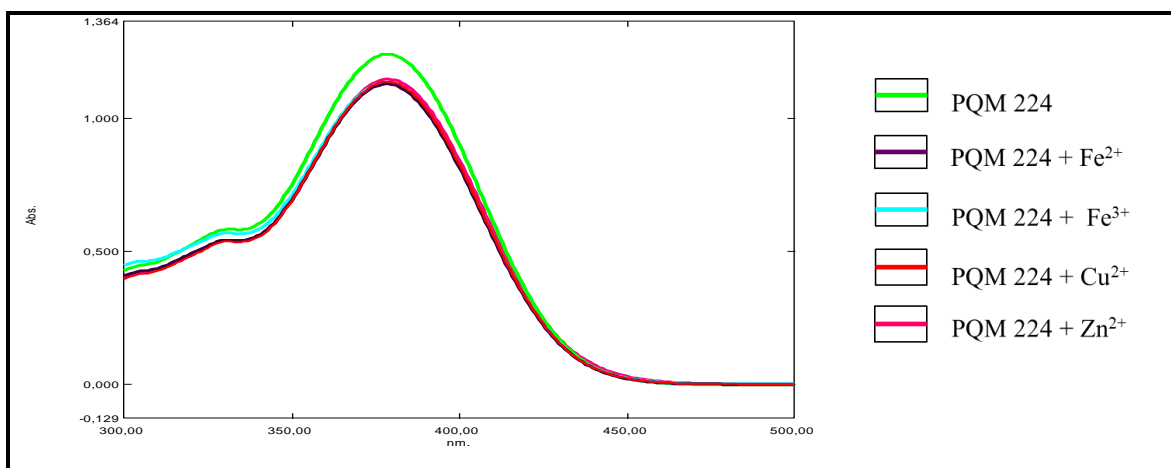
Fonte: do autor

Figura 20. UV - Espectro de absorbância de PQM-222

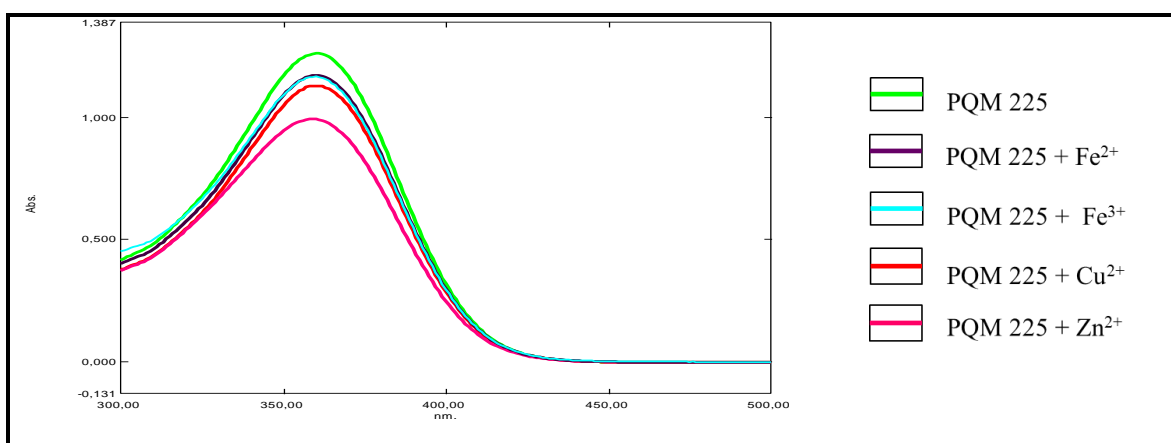
Fonte: do autor

Figura 21. UV - Espectro de absorbância de PQM-223

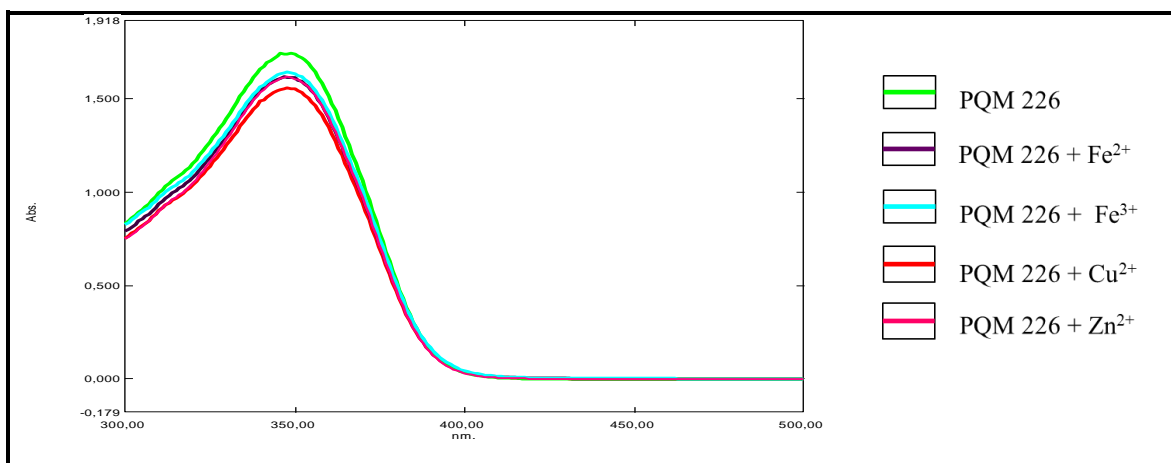
Fonte: do autor

Figura 22. UV - Espectro de absorbância de PQM-224

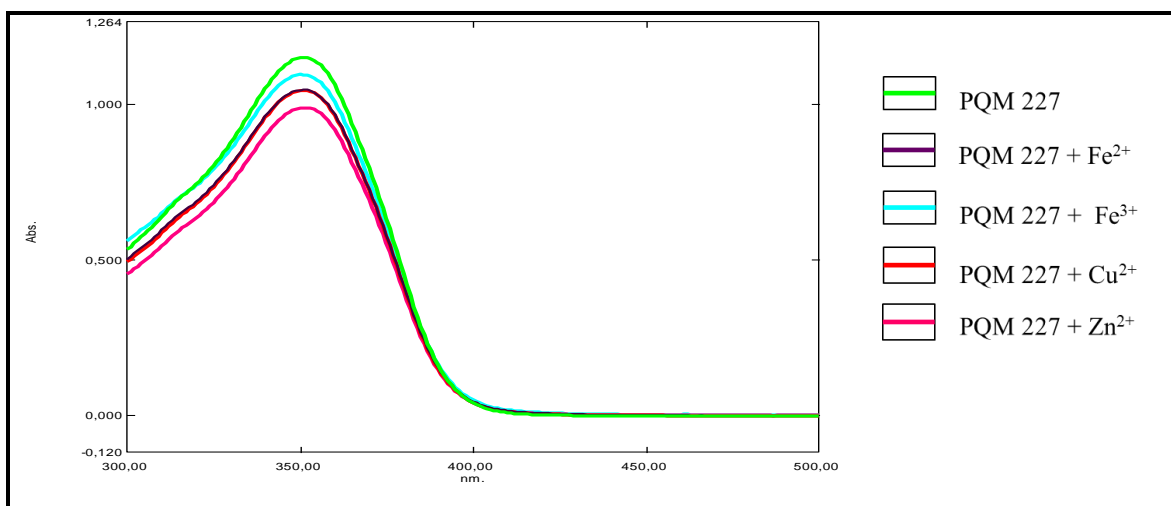
Fonte: do autor

Figura 23. UV - Espectro de absorbância de PQM-225

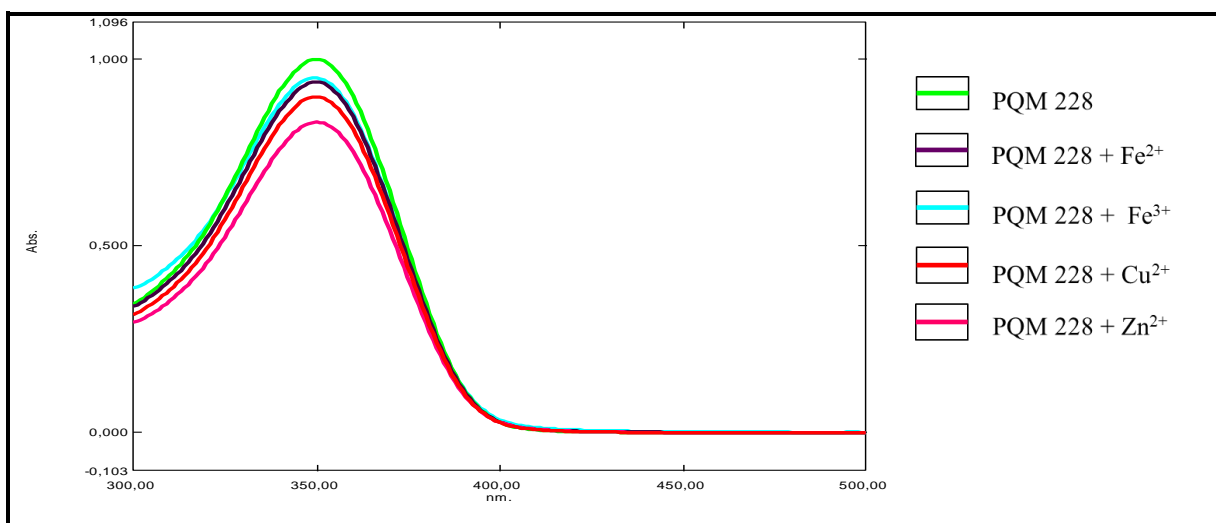
Fonte: do autor

Figura 24. UV - Espectro de absorbância de PQM-226

Fonte: do autor

Figura 25. UV - Espectro de absorbância de PQM-227

Fonte: do autor

Figura 26. UV - Espectro de absorbância de PQM-228

Fonte: do autor